أ- **الطرق الميكانيكية:** تشمل هذه الطرق عمليات الطحن والضغط والتجنيس والموجات فوق الصوتية. وتشمل أيضاً تعاقب استخدام ضغط مرتفع يعقبه مباشرة تخفيف الضغط وينتج عن ذلك جريان معلق الخلايا خلال صمام دقيق مما يؤدي إلى تكسير الخلايا. أما الموجات فوق الصوتية فتؤدي إلى تكوين تجاويف (Cavitations) حول الخلايا مما يسبب تكسرها وتستخدم على النطاق المختبري فقط لأنها تسبب تكوين حرارة مرتفعة.

ب- **الطرق غير الميكانيكية:** وتشمل الطرق الحرارية او الكيميائية أو الإنزيمية. ويعد التجفيف من الطرق الواسعة الاستعمال والذي يسبب تغيرات في تركيب جدار الخلية مما يسهل عملية استخلاص المكونات بواسطة المحاليل المنظمة أو الملحية. ويعد الأسيتون من المواد المستخدمة بنجاح في تجفيف الخلايا والحصول على ما يسمى بمسحوق الأسيتون (Acetone powder) وذلك بتعريض الخلايا إلى تراكيز عالية من الأسيتون. ويمكن أيضاً استخدام الطرق الكيميائية مثل إضافة الأملاح أو المواد ذات النشاط السطحي أو الإنزيمات المحللة أو استعمال الصدمة الأوزموزية.

يعد استعمال الإنزيمات المحللة أو الموجات فوق الصوتية من أفضل الطرق لتكسير جدران الخلايا لغرض الحصول على الإنزيمات الداخلية الفعالة (Intracellular enzymes)، بينما تعد الطرق الحرارية والأوزموزية أقل جودة وكفاءة. كما يعد التمزيق الميكانيكي الأقل كفاءة من جميع الطرق المذكورة.

هناك مراحل أخرى تشمل استخلاص المنتج المرغوب بواسطة مذيب معين وكذلك التركيز بالتبخير وباستعمال أجهزة مختلفة بعضها يستعمل لتركيز المنتجات الحساسة للحرارة. كما تستعمل طريقة الترشيح الغشائي (Membrane filtration) في تركيز المواد الذائبة بدون إجراء عملية تبخير ويتم ذلك باستخدام خاصية الفرق في الضغط الأوزموزي من خلال غشاء شبه نفاذ وبدرجات الحرارة العادية وبذلك يمكن المحافظة على المنتجات الحساسة للحرارة من التلف. وقد استعملت هذه الطريقة في السابق لإزالة الملوحة من ماء البحر.

أما بالنسبة لتنقية منتجات التخمر فإن درجة النقاوة تعتمد على نوع الاستخدام المطلوب. فعندما يكون الهدف هو الاستعمال الطبي أو الصيدلاني أو البحثي فيكون الوصول إلى درجة نقاوة عالية ضرورياً. أما الاستخدامات لأغراض أخرى مثل استخدام الانزيمات في المنظفات أو في تحضير

المنفحة الميكروبية أو استعمال الحوامض العضوية كمضافات غذائية أو في الصناعات الأخرى فلا يكون الوصول إلى نقاوة عالية ضرورياً ويمكن استعمال المنتوج المنقى جزئياً أو بدون تنقية لهذه الأغراض وذلك لتقليل كلفة الإنتاج. ومن طرق التنقية المستخدمة هي التبلور (Crystallization) وطرق الكروماتوكرافي المختلفة مثل كروماتوكرافي الترشيح الهلامي وكروماتوكرافي الادمصاص وكروماتوكرافي الألفة وكروماتوكرافي التبادل الأيوني.

يتم تسويق منتجات التقنية الحيوية إما بصورة سائلة أو بعد تجفيفها. وتعد عملية التجفيف المرحلة الأخيرة من عمليات الإنتاج والغرض منها الحصول على منتجات ثابتة ومناسبة للتداول والخزن. وبالنسبة للمنتجات الحساسة للحرارة مثل الإنزيمات والمستحضرات الصيدلانية فيجرى تجفيفها بدرجات حرارة واطئة. ويمكن تحسين ثباتية هذه المواد تجاه الحرارة بإضافة السكريات أو بعض المواد الخاملة الأخرى. وأهم طرق التجفيف المستخدمة هي:

1- التجفيف تحت التفريغ (Vacuum drying): وفيها يتم التجفيف تحت التفريغ بطريقة الوجبات في مجففات الحجرة (Chamber dryers) أو بالطريقة المستمرة في المجففات الاسطوانية الدوارة (Rotating drum dryers). يحدث انتقال الحرارة بصورة رئيسية بملامسة السطوح الساخنة التي تبخر الماء.

2- التجفيف بالرذاذ (Spray drying): تنتقل الحرارة في هذه الطريقة بالحمل. يتم ضخ السائل المراد تجفيفه بهيئة رذاذ من خلال نوزلات في حجرة التجفيف ويقابله تيار من الهواء الساخن (150-250 م) مؤدياً إلى تبخير سريع للماء بحيث تبقى درجة حرارة دقائق المنتوج منخفضة نسبياً. تستخدم هذه الطريقة في تجفيف الإنزيمات والمضادات الحيوية. تستعمل هذه الطريقة بصورة واسعة في تجفيف المواد الغذائية.

3- التجفيد (التجفيف بالتجميد) (Freeze drying): تعد من أكثر طرق التجفيف اعتدالاً وذلك لأن الماء يتسامى من الكتلة المجمدة. تجرى العملية بتجميد المحلول أو المعلق المراد تجفيفه إلى درجة حرارة منخفضة ثم يتم سحب الهواء من الوعاء لأحداث تفريغ قوي (Vacuum) فيؤدي ذلك إلى تسامي جزيئات الماء المتجمدة مباشرة وتحولها إلى بخار والذي يزال بالتكثيف. تستخدم هذه الطريقة في تجفيف بعض المنتجات الصيدلانية مثل اللقاحات والفايروسات ومصل الدم والهورمونات والإنزيمات والمواد الحساسة والثمينة التي تستخدم في التشخيص. ويستعمل التجفيد في تجفيف بعض الأغذية أيضاً.

تحضير اللقاح (البادئ)

(Inoculum preparation)

اللقاح هو مزرعة الأحياء المجهرية التي تضاف إلى وعاء التخمر لغرض القيام بعملية التخمر والحصول على المنتوج المرغوب. ويتم تحضير اللقاح بكمية تكفي لتلقيح وسط إنتاج المنتوج المرغوب. يتم تحضير اللقاح من مزرعة العمل المخزونة (Working stock culture) التي سبق الكلام عنها في فصل سابق. ويشترط في المزرعة المستخدمة في تحضير اللقاح توافر بعض الصفات منها:

1- أن تكون المزرعة سليمة وبحالة نشطة وذلك لتقليل طور الركود في عملية التخمر اللاحقة.
2- يمكن تحضيرها بحجم كبير لتعطي حجم كافي ومناسب من اللقاح.
3- تكون ذات صفات مورفولوجية مناسبة.
4- تكون خالية من التلوث.
5- تحافظ على قابليتها في إنتاج المنتوج المطلوب.

ومن المهم اختيار الوسط الغذائي المناسب لتحضير اللقاح. وقد يختلف تركيب الوسط المستخدم في تحضير اللقاح عن الوسط المستخدم في إنتاج المنتوج المرغوب. تقل فترة طور الركود (Lag phase) أثناء إنتاج المنتوج المرغوب عند إنتاج اللقاح في وسط يشابه وسط إنتاج المنتوج، ويعود ذلك إلى تقليل الفترة الزمنية التي يحتاجها الكائن المجهري للتأقلم على النمو في وسط الإنتاج وبذلك يختزل طور الركود أو التأقلم وبالتالي يقل زمن التخمر.

تتراوح كمية اللقاح اللازمة للزراعة عادة بين 3–10% من حجم الوسط الغذائي. وتبدأ عملية تحضير اللقاح كما ذكرنا من المزرعة الأصلية ثم تمر ببضعة مراحل للوصول إلى كمية اللقاح الكافية لتلقيح وسط الإنتاج في خزان التخمر. وقد يحتاج ذلك إلى مرحلتين أو ثلاثة تتم في الدوارق (فلاسكات) يليها 1–3 مراحل في خزانات التخمر، ويعتمد ذلك على حجم خزان الإنتاج المستعمل. إن زيادة مراحل عملية تحضير اللقاح وتكرار التلقيح يزيد من خطر التلوث ومن تغير السلالة ورجوعها إلى السلالة البرية الأصلية قبل التحسين الوراثي أو ما يسمى إنحلال السلالة (Strain degeneration) مما يستوجب القيام بعمليات السيطرة النوعية الدقيقة على السلالة.

نظراً لكثرة استعمال الأعفان في عمليات التقنية الحيوية سيتم شرح طرق تحضير لقاح الأعفان كمثال على تحضير لقاح الأحياء المجهرية. تستطيع معظم الأعفان ذات الأهمية الصناعية إنتاج سبورات لا جنسية لذلك يعد تحضير معلق السبورات هو الطريقة الشائعة في تحضير لقاح الأعفان. توجد 3 طرق لتحضير أو إنتاج السبورات هي:

1- **إنتاج السبورات على أوساط متصلبة:** تنتج أغلب الأعفان سبورات عند تنميتها على وسط أكار مناسب، ويجب توفير مساحة سطحية كبيرة لإنتاج كمية كافية من السبورات. يمكن استعمال القناني الاسطوانية (Roller bottles) لإنتاج سبورات العفن *Penicillium crysogenum* . يستعمل لهذا الغرض 300 مل من الوسط الغذائي المتصلب والذي يحوي 3% من الأكار ويعقم في قناني اسطوانية سعة لتر واحد ويبرد إلى حرارة 45 م وتدار القنينة على اسطوانة متحركة مع التبريد البطيء لتكوين غشاء رقيق من الوسط الغذائي المتصلب على السطح الداخلي للقنينة. تلقح القنينة بمعلق سبورات من مزرعة أكار مائلة وتحضن بدرجة حرارة 24 م لمدة 7 أيام لتكوين السبورات بكميات كبيرة. تتميز هذه القناني بإعطائها مساحة سطحية كبيرة لتنمية السبورات فضلاً عن كونها ذات حجم مناسب للاستعمال المختبري.

2- **إنتاج السبورات على أوساط صلبة:** تنتج بعض الأعفان سبورات بصورة غزيرة على سطح الحبوب يمكن فصلها وجمعها. يعد الشعير والذرة المجروشة ونخالة الحنطة أوساطاً غذائية ملائمة لإنتاج السبورات من أنواع كثيرة من الأعفان. يستعمل الخبز أيضاً لإنتاج السبورات من بعض الأعفان التابعة لأجناس *Aspergillus* و *Penicillium*. وفيما يأتي وصف لإنتاج سبورات العفن *Aspergillus ochraceus*: يوضع 200 غم من بذور الشعير أو 100 غم من نخالة الحنطة الرطبة في دورق مخروطي سعة 3 لتر وتلقح بسبورات العفن وتمزج وتحضن بدرجة حرارة 28 م ورطوبة نسبية 98% لمدة 6 أيام. كانت كمية السبورات (الكونيديات) التي تم الحصول عليها خمسة أضعاف الكمية التي تم الحصول عليها باستعمال وسط أكار سابورود (Sabouroud agar) في قناني روكس وأكثر من 50 مرة باستعمال الأكار المغذي (Nutrient agar) في نفس القناني المذكورة.

3- **إنتاج السبورات في المزارع المغمورة (Submerged cultures):** ينتج بعض الأعفان سبورات عند تنميتها في أوساط غذائية سائلة مناسبة بطريقة المزارع المغمورة. ومثال ذلك إنتاج لقاح العفن *Penicillium patulum* المستخدم في إنتاج المضاد الحيوي كريسيوفولفين (Griseofulvin) إذ يستخدم 600 مل من وسط غذائي سائل يتكون من مسحوق الشرش وفوسفات البوتاسيوم وكلوريد الكالسيوم وسائل منقوع الذرة في دورق سعة 2 لتر ويلقح بالسبورات وتحضن بدرجة حرارة 25 م لمدة 7 أيام.

استخدام لقاح السبورات: يمكن استخدام لقاح السبورات بطريقتين الأولى إضافة لقاح السبورات مباشرة إلى خزان الإنتاج حيث تتم عملية انبات السبورات وتحويلها إلى خلايا خضرية في خزان الإنتاج. ومن إيجابيات هذه الطريقة هو تقليل كلفة استعمال خزانات إضافية لإنبات السبورات ولكنه يزيد من زمن التخمر بسبب المدة اللازمة للإنبات. أما الطريقة الثانية فهي إنبات السبورات في خزان مستقل ثم إضافة الخلايا المنبتة إلى خزان الإنتاج مما يقلل من زمن التخمر ولكن هذه الطريقة تضيف كلفة إضافية تتمثل في عملية الإنبات في خزان مستقل وحاجتها إلى أيدي عاملة إضافية.

أ- المزارع الصلبة (Solid cultures):

وتسمى تخمرات الحالة الصلبة (Solid state fermentation). في هذا النوع تتم تنمية الكائن المجهري على مواد صلبة في حالة غياب أو شبه غياب الماء الحر. يعتمد الحد الأعلى لنسبة الرطوبة (قبل ظهور الماء الحر) في الأوساط الغذائية الصلبة على قابلية امتصاص المادة الصلبة للماء أي أن نسبة الرطوبة تعتمد على نوع الوسط الغذائي وتركيبه. فمثلاً يمكن ملاحظة ظهور الماء الحر في وسط من نوع من قلف الأشجار (Bark) عند وصول نسبة الرطوبة إلى 40% بينما لا يظهر الماء الحر في بقايا سيقان الحنطة (القش) إلا بعد وصول نسبة الرطوبة إلى 80%. أما الحد الأدنى للرطوبة الذي يسمح بنمو الأحياء المجهرية فهو 12% حيث تتوقف جميع الفعاليات الحيوية عند مستوى رطوبة أقل من هذا الحد.

إن الأوساط الغذائية الصلبة الشائعة الاستعمال في التخمرات الصلبة هي الحبوب والبقوليات ونخالة الحنطة والمواد السليلوزية مثل الخشب والقش. وتكون هذه المواد غير ذائبة أو قليلة الذوبان جداً في الماء وهي رخيصة ومن السهولة الحصول عليها وتحتوي على تركيز عالي من العناصر الغذائية. تعد التخمرات الصلبة قديمة جداً من الناحية التاريخية حيث استخدمت في الشرق منذ مئات السنين. تستخدم تخمرات الحالة الصلبة في إنتاج بعض الأغذية الشرقية مثل صلصة فول الصويا والميزو (Miso) والتمبي (Tempeh) وغيرها، وجميعها أغذية متخمرة ناتجة من تخمر فول الصويا والحبوب بواسطة الأعفان. تستخدم التخمرات الصلبة أيضاً في إنتاج الإنزيمات وبعض الأحماض العضوية مثل حامض الستريك. وقد تركز استعمال التخمرات الصلبة في الدول الغربية على تحلل المخلفات العضوية النباتية والحيوانية (Composting) وإنتاج السايلج والفطر (المشروم) وفي صناعة أنواع معينة من الأجبان. ويعتقد أن التخمرات الصلبة التي تستعمل المخلفات السليلوزية ستكون صناعة رئيسية في المستقبل لإنتاج الكتلة الحيوية والإيثانول وغاز الميثان وعدد من المنتجات الأخرى ذات الأهمية الاقتصادية. وبصورة عامة يمكن إنتاج أغلب منتجات التكنولوجيا الحيوية والتي تنتج بواسطة الحياء المجهرية باستخدام تخمرات الحالة الصلبة. ويعتمد استعمال هذه الطريقة على الجدوى الاقتصادية مقارنة مع التخمرات السائلة.

يعتمد نمو الأحياء المجهرية في التخمرات الصلبة بصورة كبيرة على النشاط المائي أو الفعالية المائية (Water activity, a_w). تنمو البكتريا عند نشاط مائي عالي بينما تتحمل النمو الخمائر عند نشاط مائي أقل. أما الأعفان فهي تتحمل نشاط مائي أقل من الخمائر قد يصل إلى 0.6. وتعد الأحياء المجهرية التي تتحمل وتتكاثر عند مستويات واطئة من النشاط المائي هي الأحياء المجهرية الرئيسية التي تسود في التخمرات الصلبة.

أنواع تخمرات الحالة الصلبة: تقسم التخمرات الصلبة إلى ثلاثة أنواع هي:

1- **تخمرات الحالة الصلبة بواسطة الفلورا الطبيعية:** وهي التخمرات التي تستعمل فيها الأحياء المجهرية الموجودة بصورة طبيعية في المادة المراد تخمرها وهي تشمل:

أ- عملية إنتاج السايلج (Silage production): وهي عملية لا هوائية تستعمل فيها المواد النباتية الخضراء التي يتم كبسها بشكل حزم أو بالات ويتم التخمر بدرجة حرارة 25-30 م لمدة 1-2 اسبوع. تكون بكتريا حامض اللاكتيك وخاصة *Lactobacillus bulgaricus* هي السائدة وتقوم بإنتاج حامض اللاكتيك وبذلك تمنع نمو بكتريا التفسخ (Putrefaction bacteria) ولا تتمكن الأعفان من النمو بسبب غياب الأوكسجين. الرطوبة المثالية لهذه العملية هي 50-65% وعند هذه الرطوبة تنشط فقط بكتريا حامض اللاكتيك التي تتحمل الضغط الأوزموزي وتحول الكاربوهيدرات (السكريات) إلى حامض اللاكتيك. إن الظروف الحامضية واللاهوائية في السايلج تحافظ عليه من التلف خلال خزنه ليستعمل في الأوقات التي يقل فيها العلف الأخضر.

ب- عملية تحلل المواد العضوية (Composting): يتم فيها تحلل المواد العضوية في المخلفات النباتية والحيوانية وهي تتضمن تعاقب أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية والتي تبدأ بالبكتريا المحبة للحرارة المعتدلة (Mesophilic bacteria) والخمائر والفطريات الخيطية (الأعفان) مروراً بالبكتريا الخيطية والأعفان المحبة للحرارة العالية. ويعد تكوين الحرارة نتيجة الفعاليات الحيوية لهذه الأحياء المجهرية مشكلة كبيرة ويجب تقليب المادة العضوية ميكانيكياً لتخفيف الحرارة ومنع تعقيم المادة العضوية وقتل الأحياء الموجودة فيها. تستخدم المواد العضوية المتحللة كسماد عضوي ويدخل كوسط تنمية لإنتاج الفطر (المشروم)، وتعد هذه العملية من أهم العمليات الناجحة للاستفادة من المخلفات السليلوزية.

2- **تخمرات الحالة الصلبة بواسطة المزارع النقية:** تجرى هذه التخمرات بإضافة لقاح من نوع واحد من الأحياء المجهرية إلى وسط الإنتاج. وتعد عملية كوجي (Koji process) مثالاً على هذه التخمرات وهي من العمليات القديمة جداً وتستعمل في تخمير الحبوب وفول الصويا لإنتاج الأغذية الشرقية بواسطة العفن *Aspergillus oryzae*. وتعد طريقة كوجي الأساس في عمليات تخمر أخرى مثل إنتاج الإنزيمات والأحماض العضوية والإيثانول على النطاق التجاري. كما تم تطوير هذه الطريقة لإنتاج الكتلة الحيوية من المواد النشوية ومن المواد السليلوزية.

3- **تخمرات الحالة الصلبة بواسطة المزارع المختلطة:** تجرى هذه التخمرات بإضافة لقاح من مزيج يتكون من أكثر من نوع من الأحياء المجهرية إلى وسط الإنتاج، فمثلاً وجد أن القش (مواد سليلوزية) يمكن أن يتحول إلى كتلة حيوية (خلايا) بصورة أكثر كفاءة عند استخدام مزارع مختلطة من العفن *Chaetomium cellulolyticum* مع خميرة *Candida lipolytica* أو من العفن *Trichoderma lignorum* مع نفس الخميرة السابق ذكرها مقارنة مع استخدام مزرعة نقية من العفن لوحده. ويعتقد أن سبب ذلك يعود إلى أن الخميرة تستهلك السكريات الزائدة التي تتحرر بفعل إنزيم السيليوليز الذي ينتجه العفن وهذه السكريات تسبب الكبح الهدمي وتجعل العفن يتجه إلى تكوين السبورات، لهذا فإن استهلاك السكريات الزائدة من قبل الخميرة تمنع الكبح الهدمي وبالتالي تمنع تكوين السبورات.

تعد التخمرات الصلبة بصورة عامة تقنية رخيصة ولا تحتاج إلى تقنية عالية وفيما يأتي أهم إيجابيات وسلبيات تخمرات الحالة الصلبة.

أ- **الإيجابيات:**

1- الوسط الغذائي بسيط وطبيعي ورخيص مقارنة بالأوساط التركيبية عالية الكلفة.

2- يساعد مستوى الرطوبة المنخفض على استخدام أجهزة تخمر صغيرة الحجم ويقلل من فرص التلوث وقد لا يحتاج إلى عملية تعقيم.

3- يكون تركيز المنتوج المرغوب عالياً.

4- تحتاج إلى طاقة أقل مقارنة بالتخمرات السائلة التي تحتاج إلى عمليات خلط وتحريك.

5- يمكن تلبية متطلبات المزرعة من الأوكسجين عن طريق انتشار الغازات الذي يتم من خلال الفراغات بين جزيئات المواد الصلبة او بالتحريك البسيط مقارنة بعمليات التقليب في التخمرات السائلة.

ب- السلبيات:

1- يقتصر استعمال الطريقة على الأعفان التي تتحمل رطوبة منخفضة.

2- إنتاج حرارة عالية نتيجة الفعاليات الحيوية للخلايا والتي تعد إحدى مشكلات هذه التخمرات.

3- صعوبة السيطرة على ظروف التخمر بدقة مثل درجة الحرارة ودالة الحموضة (pH) وكمية الأوكسجين.

4- هناك منتجات محدودة يمكن إنتاجها بهذه الطريقة.

5- انخفاض معدل نمو الأحياء المجهرية.

عمليات فصل منتجات التقنية الحيوية

(Downstreaming)

يطلق مصطلح فصل المنتجات (Downstream) على جميع العمليات اللازمة لفصل وتنقية المنتوج أو المنتجات المرغوبة في أي نوع من العمليات الصناعية. تحتل هذه العملية أهمية كبيرة في التقنية الحيوية بسبب الاختلاف الكبير بين الوضع النهائي للمنتجات ووضعها الأصلي في داخل أجهزة التخمر. فمثلاً تعطي عملية التخمر المثالية مزيجاً من مواد صلبة منتشرة (الخلايا وبعض مكونات الوسط الغذائي) ومحلول مائي مخفف. وقد يكون المنتوج المرغوب موجوداً داخل الخلايا كواحد من المزيج المعقد لمكونات الخلية وفي هذه الحالة يتم فصل الخلايا عن وسط التخمر السائل يليها تمزيق جدرانها وفصل المنتوج المرغوب من المستخلص الخلوي، أو قد يكون موجوداً خارج الخلية في وسط النمو وفي هذه الحالة يتم فصل الخلايا والتخلص منها ثم فصل المنتوج المرغوب من وسط التخمر السائل (راشح المزرعة)، أو قد يكون موزعاً بين الاثنين. وفي جميع الحالات نحتاج إلى فصل وتركيز وتنقية المنتوج بعمليات دقيقة وفعالة مع الأخذ بنظر الاعتبار الجانب الاقتصادي للعملية، فقد وجد أن كلفة فصل وتنقية المنتوج تتراوح بين 20-60% من الكلفة الكلية للإنتاج، ويعود ذلك إلى

طبيعة وتركيب المنتوج المرغوب وطبيعة الوسط الموجود فيه ودرجة النقاوة المطلوب الوصول إليها.

إن بعض عمليات الفصل والتنقية المختبرية تكون غير اقتصادية عند تطبيقها على نطاق تجاري، كما أن بعض المنتجات تعد حساسة وتكون فعالة فقط عند ظروف معينة ومحددة من درجات الحرارة والدالة الحامضية (pH) والتركيز، لذلك يجب الاهتمام باختيار الطرق العلمية السليمة لفصل المنتوج لكي يبقى فعالاً ولا يتعرض للتلف. ولا توجد عملية واحدة مثالية لفصل جميع المنتجات فلكل منتج طريقة خاصة للفصل، كما أنه يتطلب في معظم الحالات دمج عدة عمليات أو مراحل للوصول إلى نتيجة جيدة لفصل المنتوج المطلوب.

وفيما يأتي شرح لأهم عمليات الفصل ومراحلها المختلفة.

1- **فصل الجسيمات الدقيقة (Separation of particles):** الخطوة الأولى بعد انتهاء التخمر هي فصل المواد الصلبة عن الجزء السائل. تتكون المواد الصلبة عادة من الخلايا الحرة أو الخلايا والإنزيمات المقيدة على مواد مدعمة فضلاً عن المكونات الصلبة للوسط الغذائي. إن معظم عمليات فصل الخلايا تعتمد على حجم وشكل الخلايا وكذلك وزنها النوعي (كثافتها) بالإضافة إلى طبيعة وسط التخمر ودرجة حرارته والدالة الحامضية له، فمثلاً يكون فصل الخلايا الكبيرة الحجم مثل الخمائر أكثر سهولة من فصل الخلايا الصغيرة مثل البكتريا عند استعمال طريقة الترسيب. ويتم أحياناً إضافة بعض المواد التي تسهل من عملية الفصل. ومن طرق الفصل الشائعة هي الترسيب الترشيح والطرد المركزي والتلبيد والطفو.

أ- **الترشيح (Filtration):** وهي طريقة واسعة الانتشار وتعد مثالية لفصل الأعفان والبكتريا الخيطية والكتل المتلبدة من الخمائر من وسط التخمر. تستعمل أوراق الترشيح أو قماش الململ في الفصل المختبري. أما على النطاق الصناعي فتستعمل طبقات من القماش أو الألياف التي تكبس للحصول على فتحات أو مسامات بأقطار معينة. يستعمل الضغط أحياناً مع عملية الترشيح لغرض زيادة سرعة الفصل.

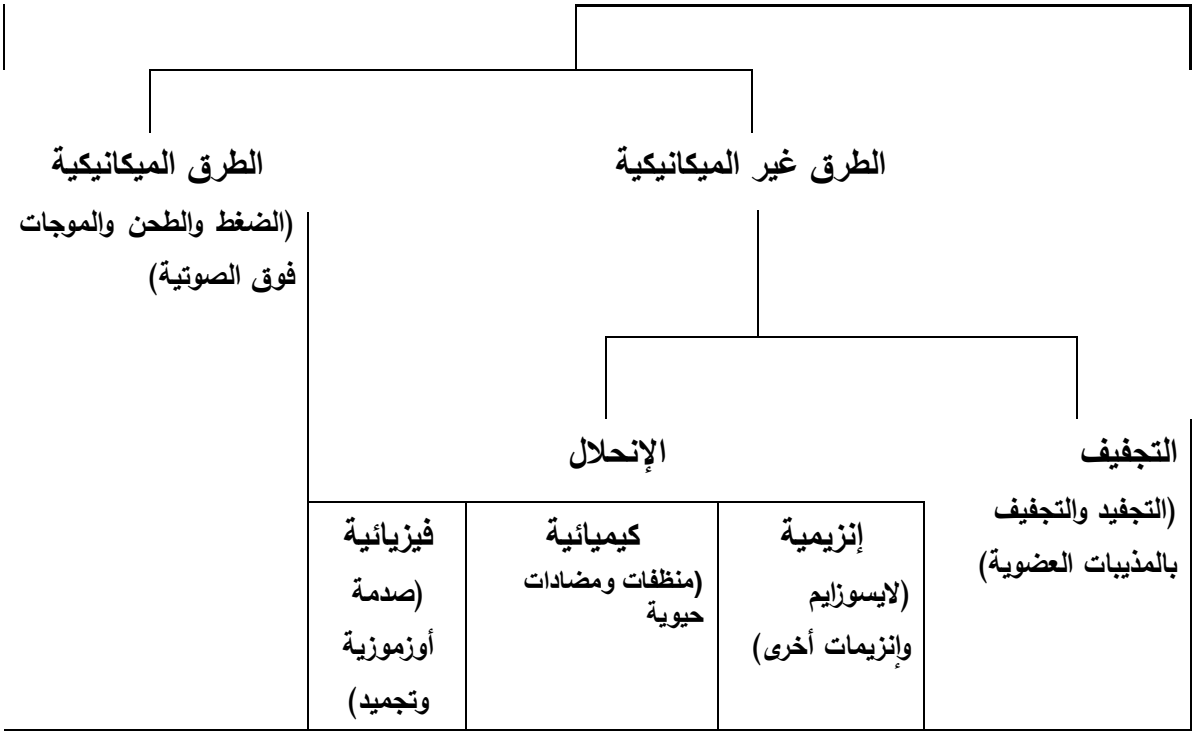
ب- **الطرد المركزي (Centrifugation):** يصعب فصل الخلايا الصغيرة الحجم، مثل البكتريا، بالترشيح البسيط، لذلك يمكن استعمال الطرد المركزي في فصلها (والذي يعتمد على الفرق في الكثافة بين المادة الصلبة والجزء السائل وهو يعاني أيضاً من بعض الصعوبات بسبب الفرق القليل بين كثافة السائل والخلايا. يستخدم الطرد المركزي كثيراً على النطاق

المختبري. أما على النطاق الصناعي ففيه بعض المشاكل بالإضافة إلى ارتفاع كلفته. يمكن استخدامه بنجاح وكفاءة عالية عند وجودفرق كبير في الكثافة بين الدقائق الصلبة والجزء السائل، أي عندما تكون كثافة السائل منخفضة، وهذه الحالة نادرة الوجود في معظم عمليات التكنولوجيا الحيوية.

ج- **التلبيد والطفو (Flocculation and flotation)**: تعد عملية فصل خلايا البكتريا الصغيرة الحجم عن وسط التخمر السائل من العمليات الصعبة جداً حتى في حالة استعمال الطرد المركزي، لذلك يتم اللجوء إلى تحسين عملية الفصل باستخدام تقنية التلبيد (وهي تشجيع الخلايا على التجمع مع بعضها بشكل عناقيد بغرض زيادة القطر أو الحجم) مما يزيد من معدل سرعة ترسيبها (حسب قانون ستوك). يمكن إحداث التلبيد بإضافة أملاح غير عضوية أو مواد شبه غروية. وتتأثر عملية التلبيد ببعض العوامل منها طبيعة الخلايا وعمرها والحالة الأيونية ودرجة الحرارة. عندما تكون كثافة الخلايا المتجمعة نتيجة التلبيد ليست كبيرة فإنها تطفو إلى السطح إذ تقوم فقاعات الهواء الصغيرة التي يتم دفعها من الأسفل بادمصاص الخلايا وسحبها إلى السطح. ويمكن تشجيع تكوين رغوة ثابتة على السطح بإضافة بعض المواد مثل الأمينات والأحماض الدهنية طويلة السلسلة ثم تجمع الخلايا المتجمعة في طبقة الرغوة. تستعمل عملية التلبيد بنجاح في عملية إنتاج بروتين أحاديات الخلية لفصل الكتلة الحيوية (الخلايا) في نهاية عملية التخمر.

2- **تمزيق الخلايا (Disintegration of cells)**: عنما يكون المنتوج المرغوب في داخل الخلايا (مثل الإنزيمات الداخل خليوية وبعض المركبات الأخرى) يتم اللجوء إلى تمزيق جدران الخلايا للحصول على المستخلص الخلوي الحاوي على المنتج المطلوب ثم يفصل المنتوج وينقى. وتعد عملية التمزيق من العمليات الصعبة بسبب قوة الجدار الخلوي والضغط الأوزموزي العالي داخل الخلية. ويصعب استخدام الطرق الميكانيكية البسيطة مثل الطحن لتمزيق الخلايا بسبب حجمها المتناهي في الصغر. ومن الضروري مراعاة عدم تلف المكونات المرغوبة في الخلية أثناء عملية تكسير الجدران. يوضح المخطط الآتي بعض الطرق المستخدمة في تمزيق جدران الخلايا.

طرق تمزيق جدران الخلايا



3- تقنية إعادة توليف الـ DNA (الهندسة الوراثية)

(Recombinant DNA technology

تطورت عمليات التحليل والتلاعب بالمادة الوراثية تطوراً كبيراً نتيجة تطوير تقنيات مختبرية لعزل وتنقية أية قطعة من الـ DNA وإكثارها ونقلها إلى كائنات حية أخرى لتظهر فيها الصفات التي تحملها تلك القطع والاتي قد تكون أصلاً غير موجودة في الخلية المضيفة. وقد ساعدت هذه التقنية في التركيز على مناطق معينة من الجينات والتي تحمل الصفة المرغوبة بعكس تقنية الاندماج البروتوبلاستي والتي تمتزج فيها جميع المادة الوراثية الموجودة في الخليتين المندمجتين.

حدثت بعض الاكتشافات المهمة في العقود الأخيرة في مجال علم الأحياء الجزيئي (Molecular biology) أدت إلى التطور السريع في تقنية إعادة توليف الـ DNA. ومن هذه الاكتشافات عزل سلالة متطفرة من بكتريا *Escherichia coli* ليس لها القدرة على تكسير الحامض الـ DNA الغريب الداخل إلى خلاياها، وكذلك اكتشاف بعض الانزيمات القاطعة (Restriction enzymes)التي تستطيع قطع خيط الـ DNA المزدوج إلى قطع صغيرة وفي مناطق معينة. كما تم التوصل إلى حل لمشكلة إدخال هذه القطع إلى داخل الخلية المضيفة وتضاعفها فيها وذلك بتحميلها على عوامل ناقلة (Vector) مثل البلازميدات البكتيرية (Plasmids) أو الفايروسات التي لها قابلية الدخول إلى الخلايا المضيفة. كما تم التوصل إلى طريقة تحميل أو ربط قطع الـ DNA المنقولة على العوامل الناقلة وذلك باستخدام الانزيمات اللاحمة (DNA ligases) ثم إدخال القطع مع العوامل الناقلة إلى الخلايا المضيفة مثل *E. coli* أو *Bacillus subtilis* عن طريق التحول (Transformation) أو خميرة *Saccharomyces cerevisiae*. وعندما تبدأ الخلية المضيفة بالنمو والتضاعف يتضاعف في داخلها أيضاً العامل الناقل وقطعة الـ DNA المنقولة معه، وتظهر الصفة التي تحملها هذه القطع المنقولة في الخلايا المضيفة. ويطلق على هذه التقنية الهندسة الوراثية (Genetic engineering) أو إعادة توليف الـDNA (Recombinant DNA technology, rDNA) أو كلونة الجينات (Gene cloning) وفيما يأتي الخطوات الرئيسية لتقنية الهندسة الوراثية:

1- عزل البلازميد الحلقي الذي له قابلية استقبال الـ DNA الغريب (يتم عزله من الخلايا المضيفة).

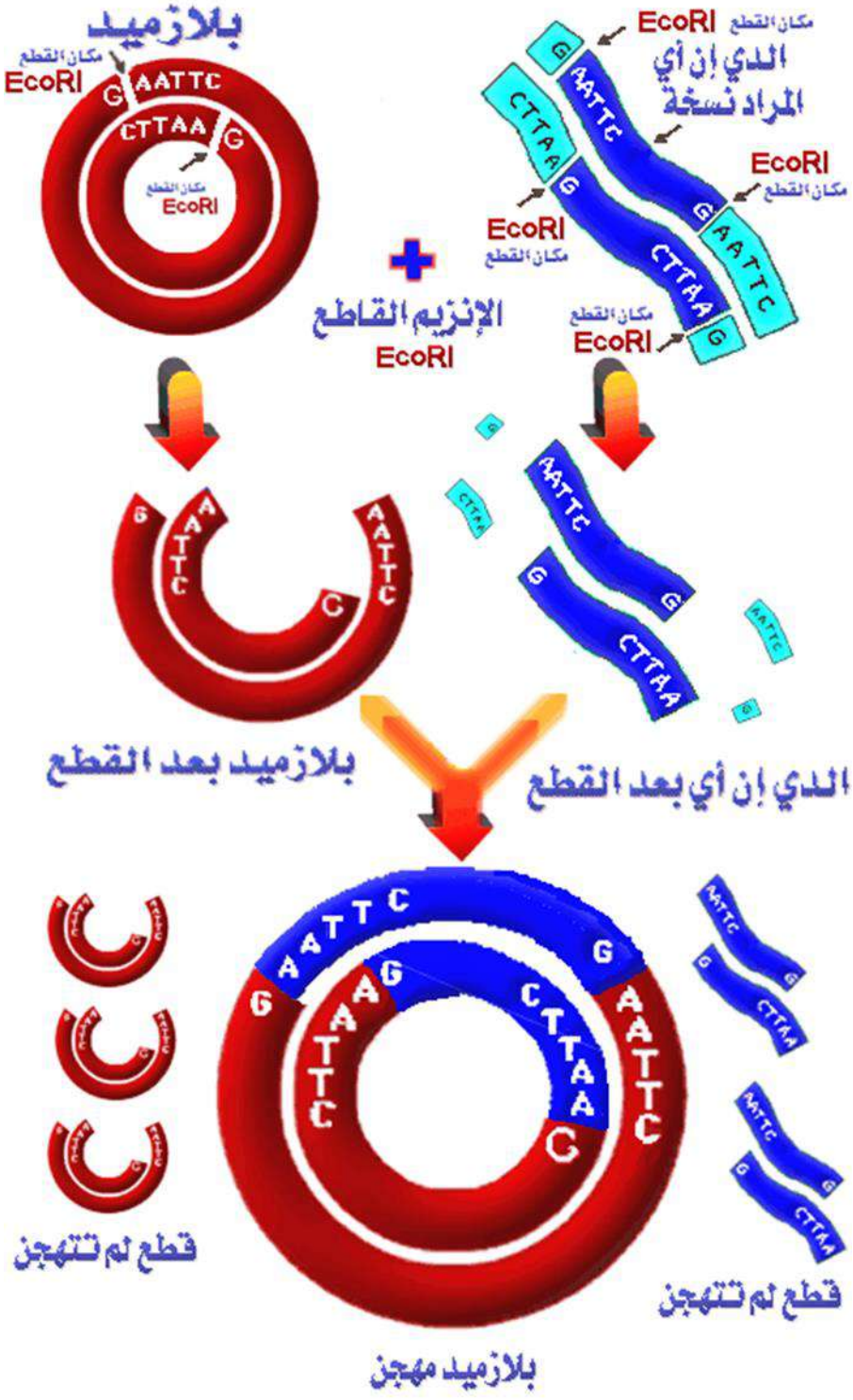
2- تحضير قطع الـ DNA أو الجين المطلوب نقله والي يحمل الصفة المرغوبة المطلوب نقلها باستخدام الانزيمات القاطعة. قد يؤخذ الجين المطلوب نقله من خلايا بدائية أو حقيقية النواة أو من الحيوانات او النباتات أو مخلقة مختبرياً.

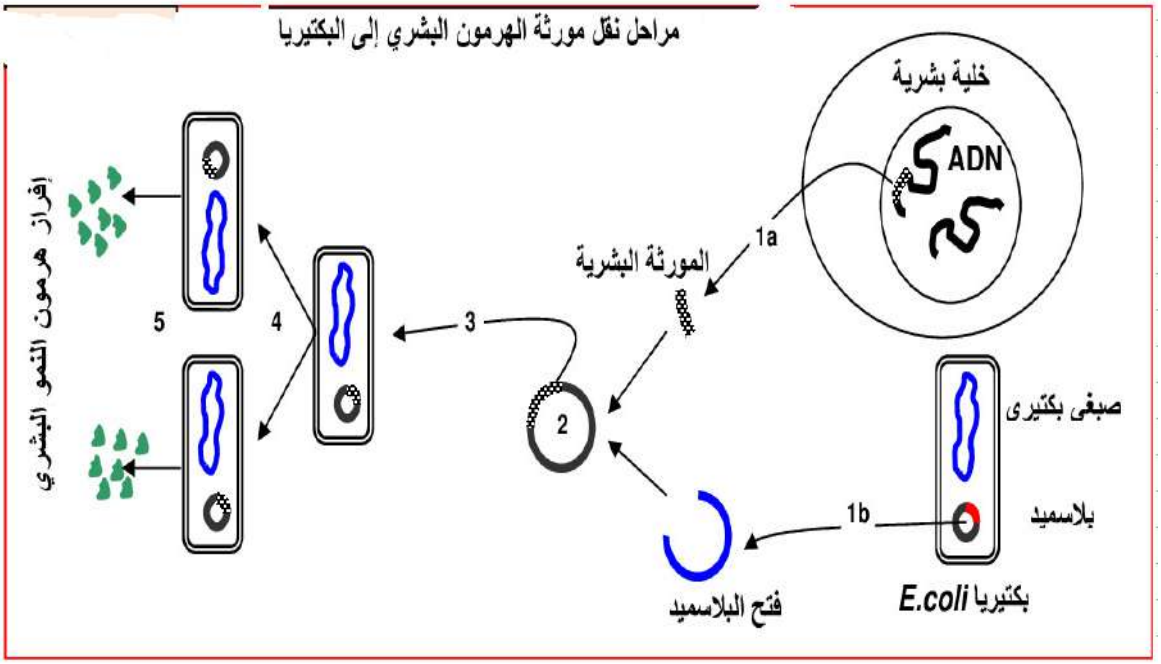
3- تحميل قطع الـ DNA على العامل الناقل باستخدام الانزيمات الرابطة (اللاحمة) لقطع الـ DNA (DNA ligases).

4- إدخال العامل الناقل الحامل للجين المطلوب إلى الخلية المضيفة.

5- إكثار الخلايا المضيفة والكشف عن الصفة التي تم نقلها (بنقل الجين المسؤول عنها).

ويبين المخططان الآتيان مراحل إجراء هذه التقنية.


بلازميد
مكان القطع
EcoRI
G AATTC
CTTAA G
مكان القطع
EcoRI
الإنزيم القاطع
EcoRI
EcoRI مكان القطع
الدي إن أي
المراد نسخة
G AATTC
CTTAA G
EcoRI
مكان القطع
EcoRI
مكان القطع
G AATTC
CTTAA G
مكان القطع
EcoRI
بلازميد بعد القطع
الدي إن أي بعد القطع
قطع لم تتهجن
قطع لم تتهجن
بلازميد مهجن



البلازميدات (Plasmids): وهي من المستلزمات الأساسية لتقنية الهندسة الوراثية. والبلازميدات عبارة عن جزيئات من الـ DNA ذات تركيب خيطي مزدوج توجد على هيئة حلقات مغلقة (O O O) موجودة في الخلايا المضيفة وهي تتكون من عدد قليل من الجينات المسؤولة عن بعض الصفات الوراثية، وهي غير مرتبطة بالكروموسومات. ويمكن القول أن البلازميدات تشبه الكروموسومات عدا كونها صغيرة وفيها عدد قليل من الجينات وكونها بشكل حلقات مغلقة. وتعد البلازميدات ذات أهمية خاصة في الزراعة والطب إذ أنها تحمل صفة مقاومة المضادات الحيوية في الأحياء المجهرية المرضية كما تحمل صفات إنتاج السموم والبروتينات الأخرى التي تزيد من قابلية الحياء المجهرية على الإصابة. كذلك تحمل البلازميدات صفة تثبيت لنتروجين في بكتريا العقد الجذرية (الرايزوبيوم ,Rhizobium) وبعضها يحمل صفة تحلل بعض المركبات المعقدة السامة مما يساعد في التخلص من تلوث البيئة بهذه المركبات. يتراوح الوزن الجزيئي للبلازميد بين مليون و 200 مليون دالتون (الدالتون Dalton هو وحدة قياس الوزن الجزيئي والدالتون الواحد يعادل وزن ذرة الهيدروجين)، ويمكن استعمال بعض البلازميدات كعوامل ناقلة للجينات من خلية إلى أخرى.

الإنزيمات القاطعة (Restriction enzymes): وهي من الانزيمات المحللة للـ DNA وتتميز بكونها تستطيع أن تكسر الأواصر التي تربط النيوكليوتيدات في جزيئة الـ DNA في مناطق

معينة مطلوبة بين الجينات (النيوكليوتيدات هي الوحدات البنائية لجزيئة الـ DNA) أي أنها تستطيع أن تفصل الجين المرغوب المطلوب نقله عن باقي الجينات)، كما أنها تستطيع أن تقطع حلقة البلازميد في منطقة معينة وتحوله إلى شكل مفتوح. وتوجد طرق أخرى غير انزيمية للحصول على قطع الـ DNA مثل الطرق الميكانيكية والموجات فوق الصوتية والتخليق الكيميائي.

التحميل على العوامل الناقلة: يمكن ربط الجين المرغوب أو قطعة الـ DNA المراد نقلها بالبلازميد بعدة طرق أهمها بواسطة انزيمات الربط أو الإنزيمات اللاحمة (DNA ligases) والتي تعمل على تكوين أواصر تساهمية بين جزيئات الـ DNA والعامل الناقل (البلازميد) وكما ذكرنا سابقاً.

ادخال العامل الناقل مع الجين المرغوب إلى الخلية المضيفة: تتم هذه العملية بعملية التحول (Transformation) والتي سبق التطرق إليها في موضوع التهجين. وتستعمل بعض الأساليب لتشجيع الخلية المضيفة على استقبال العامل الناقل المحمل بالجين المرغوب ويعتمد ذلك على نوع الخلية المضيفة، فمثلاً عند استعمال بكتريا *E. coli* كخلية مضيفة فإن خلاياها تعامل بمحلول كلوريد الكالسيوم البارد. أما عند استعمال بكتريا *Bacillus subtilis* كخلية مضيفة فإنها تعامل بتجويعها من المواد الغذائية لتشجيعها على أخذ قطع الـ DNA المحملة. أما بعض أنواع البكتريا الخيطية مثل تلك التابعة لجنس Streptomyces فيتم نزع الجدار الخلوي عنها لتكون بهيئة بروتوبلاست ثم معاملتها بكلوريد الكالسيوم ومادة البولي إثيلين كلايكول (PEG) لتصبح مستعدة لاستقبال الـ DNA المحمل. أما خلايا الخميرة فتتم معاملتها بالأيونات المعدنية القاعدية مثل الليثيوم لنفس الغرض المذكور.

الكشف عن نجاح عملية نقل الجين المرغوب إلى الخلايا المضيفة: تعد هذه المرحلة هي الأخيرة من مراحل تقنية الهندسة الوراثية وهي عملية صعبة ومعقدة نوعاً ما لأن عدد جزيئات الـ DNA أو الجينات المنقولة أقل بكثير من الجينات الأصلية الموجوة في الخلية المضيفة. ومن هذه الطرق هي الطرق المناعية التي تعتمد على استعمال أجسام مضادة (Antibodies) تعمل على البروتين أو الإنزيم الخاص بالصفة المرغوبة أو المنقولة والتي يمكن بواسطتها التعرف أو الكشف عن الخلايا المتحولة التي استقبلت الصفة الجديدة.

تطبيقات الهندسة الوراثية: تلعب الهندسة الوراثية دوراً كبيراً في تطوير التقنية الحيوية. إذ تستعمل الآن البكتريا والخمائر لإنتاج بروتينات الفايروسات وبروتينات الكائنات حقيقية النواة ذات الأهمية

الطبية والبيطرية وبكميات كبيرة. وفيما يأتي أمثلة لبعض البروتينات التي أنتجت بتقنية الهندسة الوراثية بإدخال جينات إلى خلايا الأحياء المجهرية.

1- الإنسيولين البشري.
2- الإنترفيرونات من النوع ألفا وبيتا وكاما.
3- المواد المضادة لجينات الفايروس المسبب لإلتهاب الكبد الفايروسي.
4- هورمون منظم النمو البشري.
5- بروتين الفايروس المسبب لأمراض الفم والقدم في الحيوانات.
6- رنين العجول.

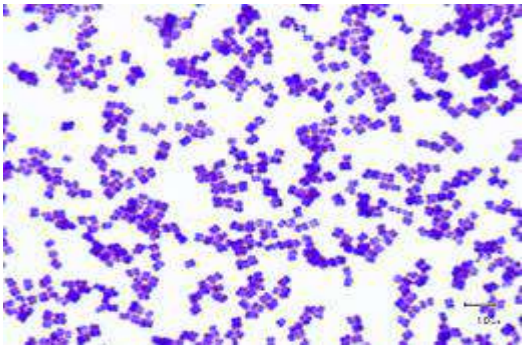
ويمكن استعمال الهندسة الوراثية أيضاً في نقل جينات مسؤولة عن إنتاج إنزيمات معينة إلى الكائنات المجهرية لزيادة كفاءة التمثيل فيها وبالتالي زيادة إنتاج الكثير من المركبات المرغوبة. ومن أمثلة ذلك زيادة كفاءة تمثيل النتروجين في بكتريا *Methylophilus methylotrophus* المستخدمة في إنتاج بروتين أحاديات الخلية من الميثانول وذلك بنقل الجين المسؤول عن إنتاج إنزيم الكلوتاميت ديهايدروجنيز (Glutamate dehydrogenase) إلى هذه البكتريا من بكتريا *E. coli*، وقد أدت هذه العملية إلى زيادة إنتاج بروتين أحاديات الخلية في هذه البكتريا بمقدار 7% تنميتها على وسط غذائي يحتوي على الميثانول والنتروجين. كما استخدمت الهندسة الوراثية في تحسين صفات البادئات المستعملة في صناعات الألبان مثل صفة مقاومة الفايروسات والقدرة على تخمر سكر اللاكتوز وإنتاج النيسين (Nisin).

خميرة الخبز Baker's Yeast

اشارت الدلائل التاريخية الى ان البشر قد صنع الخبز منذ القدم، حيث صنع في بابل لاول مرة منذ العام 2300 قبل الميلاد. اما الخبز المتخمر واكتشاف اختلافه عن حالته غير المتخمرة فان اكتشافها يعود الى المصريين القدماء ثم انتقلت عنهم الى منطقة البحر الابيض المتوسط وبقية انحاء العالم في القرن الثالث عشر قبل الميلاد.

الخميرة عبارة عن كائنات حية دقيقة حقيقية النواة تنتمي للفطريات من شعبة (Ascosporidae) ، تتكاثر جنسيا ولاجنسيا وغالبا ما يتم تكاثرها بالتبرعم. منها ما هو مفيد الذي يستعمل في التصنيع الحيوي ومنها ماهو ضار الذي يسبب العدوى والامراض للإنسان. تتبع خميرة الخبز (Baker's Yeast) مملكة الفطريات (Fungi) وقد عرف لحد الان اكثر من 200.000 سلالة منها. وتعد بانها من أهم أنواع الخمائر المفيدة في التصنيع الغذائي. تستمد الخمائر طاقتها من قدرتها في استهلاك وتحليل السكر الموجود في بيئتها، حيث تتمكن من افراز الانزيمات القادرة على تحليله وانتاج الكحول وثاني اوكسيد الكاربون .

Glucose $\xrightarrow{\text{pyruvate decarboxylase}}$ **Pyruvate → Acetaldehyde** $\longrightarrow$ **Ethanol**



شكل خميرة *Saccharomyces cerevisiae* كمستعمرات على الوسط وخلايا تحت المجهر.

بدات صناعة الخبز المتخمر حتى منتصف القرن التاسع عشر في اعتمادها على **استعمال الخميرة المتخلفة من صناعة البيرة** في تخمير العجين وقد كان الناتج منها ذا طعم مر نتيجة لوجود حشيشة الدينار في المواد الاولية الداخلة في صناعتها. فضلا عن ان بعض سلالاتها لاتتحمل الضغط الازموزي العالي للعجين المتخمر الناتج، مما ادى الى الحاجة في اقامة صناعة مستقلة خاصة في انتاج خميرة الخبز تجاريا.

الطريقة الثانية التي كانت مستعملة هي قيام صناعة خاصة لانتاج خميرة الخبز من خلال استعمال كمية من العجينة المتخمرة في عمليات تخمر لاحقة وقد اعتبرت هذه الطريقة غير عملية لاسيما على النطاق التجاري

وذلك لسببين: **الاول** ان الخميرة تنمو بصورة بطيئة جدا في العجينة وبذلك فانها تحتاج الى فترة تخمر طويلة مالم يتم اضافة عدد كبير من الخلايا وبالتالي تكون الحالة غير اقتصادية **والثاني** هو الطبيعة البلاستيكية للعجينة التي تكون معها عملية خزنها ونقلها صعبا عند استعمالها في عمليات التخمر اللاحقة وصعوبة خلطها مع كميات كبيرة من الماء والطحين.

بدأ انتاج الخميرة لاول مرة في هولندا وكان انذاك الناتج عنها لايتجاوز 4-6% من المادة الخام المستعملة وكان لاستعمال **طريقة Vienna** الاثر في زيادة الناتج الى 14% حيث استعمل فيها **كسبة الحبوب مع التهوية العالية**. في الاعوام بين 1915 الى 1920 تمكن العلماء الهولنديين والالمان من زيادة نشاطية وانتاج الخميرة من خلال استعمال **محلول سكري مخفف بوجود التهوية** التي سميت **طريقة Zulauf** التي ازداد انتاج الخميرة من دون زيادة في انتاج الكحول وقد تطورت من خلال تحوير الوسط الغذائي المستعمل حيث استعملت كسبة الحبوب ثم المالت واخيرا **استعمل المولاس** للانتاج الذي سبب في زيادة كفاءة الانتاج الى **90%** من قيمة الحاصل.

نتيجة لنشوب الحرب العالمية الثانية فقد ازداد الطلب والحاجة الى الخميرة ونتيجة لحالتها الطرية فان عمليات نقلها كانت ترافقه الصعوبة مما ادى الى تحسين حالة الانتاج وجعلها اكثر ثباتا لتسهيل نقلها وحفظها لفترات اطول مما ادى الى انتاج **خميرة الخبز الجافة الفعالة Active Dry Yeast** مع العلم ان الخميرة الجافة تحتاج الى اعادة ترطيب واضافة السكروز لتنشيطها لذلك تستعمل في الغالب الخميرة الطرية. وفي سبعينيات القرن الماضي تم تطوير حالات جديدة من الخميرة سميت الخميرة الجاهزة الجافة الفعالة Instant Active Dry Yeast (الشكل 1) التي لاتحتاج الى اعادة ترطيب قبل مزجها مع الطحين وهي الاكثر استعمالا في الاسواق لحد الان.

شكل ١. نماذج من خميرة الخبز

سلالة خميرة الخبز

تتميز سلالة خميرة الخبز بانها من النوع ***Saccharomyces cerevisiae*** وانها كي تتمكن من اداء فاعليتها في تخمير عجين الخبز فانها يجب ان تتصف بالصفات التالية:

-تتميز في صفات فسيولوجية ثابتة.
-تستهلك وبنشاط السكريات المكونة للعجين وتنتج الغاز بسهولة وبكفاءة عالية للوصول الى انتفاخ العجين.
- انتشار الخلايا بسهولة في الماء.

استعملت طرائق التحسين الوراثي المتنوعة لتحسين كفاءة النمو والتخمير لسلالات الخميرة المستعملة في تخمير عجين الخبز ولاستعمالها في اغراض متنوعة من عمليات تصنيع الخبز او المعجنات.

المغذيات المستعملة في انتاج خميرة الخبز

مصادر الكاربون والطاقة

يعد المولاس بانه المادة الاساس التي يمكن ان تستعمل في انتاج الخميرة. ويعتمد استعمال اي من نوعي المولاس سواء كان مصدره من البنجر السكري او القصب على مدى توفره والجانب الاقتصادي وكذلك نوعية ومواصفات الخميرة الناتجة. ان **استعمال المولاس من البنجر السكري** يعطي الخميرة الناتجة **لونا فاتحا** ولكنه يسبب في **زيادة متطلبات الاوكسجين الحيوية** (BOD) للخميرة لكونه يحتوي على المركب النتروجيني **Betain** الذي لاتستطيع الخميرة من استهلاكه. كما ان المولاس الذي مصدره البنجر السكري يعد **فقيرا بفيتامين البايوتين Biotin** مما يستوجب تدعيم وسط الانتاج به عند انتاج الخميرة كونها تحتاجه في عملياتها الايضية.

اما **مولاس القصب السكري** فانه يعطي **اللون الداكن للخميرة** الناتجة مما يستوجب غسله لمرات متعددة للحصول على اللون المطلوب، كما انه يعد **غنيا بفيتامين البايوتين Biotin ولايحتوي على كميات كبيرة من المركب النتروجيني Betain.**

استعمل **الشرش** في السنوات الاخيرة كمصدر للكاربون في تنمية خميرة الخبز وان استعماله يلزم معاملة الشرش **بانزيم اللاكتيز Lactase** قبل استعماله وذلك لان الخميرة لايمكنها استعمال اللاكتوز الموجود في الشرش لعدم امتلاكها لانزيم اللاكتيز. كما استعمل عصير التمر كمصدر للكاربون والطاقة وكذلك استعمال ناتج تحلل الخشب والسائل المكبرت الناتج من صناعة الورق ولكن الانتاج التجاري بقي مقتصرا لحد الان في استعمال المولاس كونه الاكثر ملائمة من الناحية الاقتصادية فضلا عن جودة المنتج من الخميرة.

مصادر النتروجين

تعد المركبات النتروجينية الموجودة في المولاس بنوعية غير كافية لسد احتياجات الخميرة لذلك يتم اضافة المصادر النتروجينية بشكل **املاح الامونيوم او الامونيا السائلة او اليوريا** حيث **لاتتمكن الخميرة من استهلاك وتمثيل النترات**.

الفيتامينات

ان اكثر ماتحتاج الخميرة من الفيتامينات هو البايوتين Biotin . اذ تحتوي الخميرة الطرية بين 0.75 الى 2.5 جزء بالمليون من هذا الفيتامين. يحتوي مولاس القصب على كميات كافية من البايوتين بين 0.5 الى 0.8 جزء بالمليون بينما كانت كمياته في مولاس البنجر منخفضة عند 0.01 الى 0.02 جزء بالمليون لذلك للحصول على الكمية الملائمة فانه يتم خلط 20% من مولاس القصب مع مولاس البنجر مع التدعيم بالبايوتين النقي، كما يمكن استبدال البايوتين باضافة حامض الاسبارتيك L+ Aspartic acid او ان يكون الاستبدال من حامض الاسبارتيك والاوليك. وعلى الرغم من امكانية الخميرة في التاقلم مع نقص كل من فيتامين Inositol و Pentothionate الا ان وجودهما يسبب في النمو المثالي للخميرة. كما انه من الضروري تدعيم المولاس بفيتامين الثايمين Thymine للحصول على تركيز عند 10 الى 50 ملغم ثايمين/ غم من الخميرة اذ ان وجوده يسبب في تحسين فعالية الخميرة الطرية.

العناصر المعدنية

ان اهم العناصر الغذائية التي تحتاجها الخميرة هو **عنصر الفوسفات** لذلك يفضل اضافته الى وسط التنمية من المولاس كي يكون نمو الخميرة مثاليا، ان الكمية التي يجب توفيرها للحصول على النمو المثالي هي بين 2.5 الى 3.5 % من P_2O_5 التي يتم امتصاصها بشكل تام، كما ان مصادره تتنوع من حامض الفوسفوريك او فوسفات الامونيوم او املاح الفوسفات القاعدية. ان محتوى المولاس من كل من البوتاسيوم والكالسيوم والصوديوم والكبريت تعد كافيه ولكنه يعتبر فقيرا وغير كافيا في محتواه من **المغنسيوم** لذلك يجب تدعيمه من هذا العنصر. كما تحتاج الخميرة الى بعض العناصر الصغرى **كالحديد والنحاس والمنغنيز والخارصين** الذي يعد المولاس غنيا بها ماعدا الخارصين الذي يضاف بشكل كبريتات الخارصين.

درجة الحرارة ودالة الحموضة

تتمكن خميرة الخبز من تحمل مدى واسع من دالة الحموضة عند نموها حيث تنمو عند دالة حموضة بين 3.6 الى 6.0 والمثالي عند 4.5 ان هذا المستوى من دالة الحموضة يسبب في الاقلال من التلوث البكتيري، **ان الانخفاض في مستوى الاس الهيدروجيني يسبب في ادمصاص المواد الملونة من المولاس على الخميرة الناتجة** لذلك فان بدء الانتاج التجاري يكون عند دالة حموضة 4.5 ثم ترتفع الى مستوى 5.0 عند نهاية فترة التخمر ويتم تعديل الحموضة من خلال اضافة الامونيا او اي قاعدة اخرى. اما بالنسبة لدرجة حرارة التنمية المثالية فقد وجد انها بين 28 الى 30 ° م اذ ان زمن الاخلاف يكون في اقصر حالاته في المدى الحراري المشار اليه.

معدلات الانتاجية

ان طريقة الانتاج التجارية المتبعة في انتاج خميرة الخبز هي طريقة مزارع االوجبات المغذاة لذلك فان الخميرة لايمكن ان تكون عند مستوى الطور اللوغاريتمي في مراحل نموها الانتاجية وانما تمر في جميع مراحل النمو للاحياء المجهرية. **تعرف الانتاجية بانها عدد غرامات الخميرة التي تنتج في كل لتر من وسط الانتاج في الساعة الواحدة.** يبلغ معدل الانتاج باستعمال المولاس كوسط تنمية عند 3 غم/لتر/ساعة في الخمسة عشر ساعة الاولى من عمليات التخمر ثم تحتاج بين 16 الى 20 ساعة للوصول الى ثمانية اضعاف اعدادها. **يفضل دائما ان يكون تركيز الايثانول بين 0.05 الى 0.1% في المزرعة كي يتم الحصول على اعلى اعداد من خلايا الخميرة** ويمكن ان يصل حجم الخميرة المنتجة الى 30% كمواد صلبة التي تعني استهلاك بين 80 الى 100% من المولاس كوسط تنمية.

طرائق السيطرة على عملية الانتاج

بدات طرائق السيطرة على الانتاج التجاري في بداية مراحل عمليات تصنيع الخميرة من خلال قياس مستوى دالة الحموضة وكذلك درجة حرارة التنمية. تبعها استعمال طرائق لتحديد مستوى التكاثر للخلايا من خلال تحديد كفائتها في تكوين البراعم الذي يعد مقياسا لتحديد حالة التكاثر للخميرة. ثم تطورت طرائق تحديد كفاءة الانتاج من خلال استعمال **مقياس انتاج الايثانول** اذ ان انخفاض تركيز الايثانول يشير الى كفاءة خلايا الخميرة وزيادة انتاجها حيث ان الخميرة تبدا بانتاج الايثانول عندما يكون تركيز السكر في المزرعة اكثر من 0.28 غم/لتر وان

انخفاضة عن هذا التركيز يسبب في استهلاك الايثانول من قبل الخميرة. كذلك يمكن السيطرة على معدل التغذية او الانتاج من خلال **قياس مستوى O_2 الذائب** في وسط التنمية. اذ ان مستوى O_2 عند 12% يعد مثاليا للحصول على اعلى كمية انتاج من خلايا الخميرة وان الانخفاض عن هذا المستوى يعطي اشارة الى اضافة وسط التنمية من المولاس وحالة ارتفاعه تشير الى كفاية وسط التنمية للخميرة. ومن الطرق الاخرى للسيطرة على عملية الانتاج هي **قياس معامل التنفس (RO)** اذ ان قيمته يجب ان تكون 1 التي تعني ان كمية CO_2 المتحررة تكون مساوية الى كمية O_2 المستعملة في تخمير الوسط الكاربوهيدراتي وانه لانتاج 0.5 غم من الخميرة من كل غرام من السكر المستهلك فانه يجب ان يكون (RO) عند مستوى 1.04 .

طريقة فصل خلايا الخميرة

تستعمل عملية الطرد المركزي لاجراء فصل خلايا الخميرة عن وسط الانتاج بعد انتهاء عمليات التخمر، اذ يسمى الجزء المتبقي بعد ازالة السائل في عملية الفصل كريمة الخميرة Yeast Cream التي يتم غسلها مرات متعددة حسب نوع المولاس المستعمل باستعمال الماء ويكون الناتج محتويا على 18 الى 20% من المواد الصلبة الكلية. يتم خزن الكريمة المشار اليها بالتبريد عند 1 الى 4 ° م لحين استعمالها في تحضير الخميرة الطرية او الجافة الفعالة او الجافة الفعالة الجاهزة. ولتحضير الخميرة الطرية يتم نقل الكريمة الى مرشحات دوارة مفرغة او مرشحات ضاغطة حيث يتم ازالة اكبر كمية من الماء الموجود فيها وانتاج كتلة مضغوطة من الخميرة تحتوي على 30% من المواد الصلبة التي يتم اضافة الزيت النباتي لتسهيل التقطيع وفي حالات معينة تضاف مضادات الفطريات كاغلفة لها فضلا عن تغليفها بالورق الشمعي ويتم حفظها باستمال التبريد لحين الاستعمال.

الخميرة الجافة الفعالة

تنتج الخميرة الجافة الفعالة من خلال امرار كتلة الخميرة الناتجة من المرشحات الضاغطة في باثقات ذا احجام بين 0.5 الى 3.5 ملم للحصول منها على خيوط متطاولة مشابهه لحالة السباكتي التي يتم تقطيعها الى اقطار بين 1.5 الى 3.0 سم وتجفف عند حرارة 38 ° م لحين وصول الرطوبة الى مستوى 8% دون فقدان حيويتها وغالبا ماتستخدم مجففات الانفاق ذات الحزام الناقل في التجفيف. ان الخميرة الناتجة تحتاج الى اعادة ترطيب قبل استعمالها في تخمير عجين الخبز.

الخميرة الجافة الفعالة الجاهزة

خميرة الخبز Baker's Yeast

هي الخميرة الناتجة بعد اجراء عمليات التجفيف في مجففات المضجع السائل حيث تستعمل سلالات من الخميرة محورة وراثيا لتتحمل حرارة التجفيف المستعملة. تتميز الخميرة الناتجة من هذه الطريقة في عدم الحاجة الى اعادة ترطيب لخلاياها عند استعمالها في تخمير عجينة الخبز وذلك لكونها ذات نشاطية متميزة حيث تم تحسين صفاتها الوراثية من خلال التحوير الوراثي. في هذه الطريقة تتم الاستفادة من بخار الماء المستعمل في التجفيف في التبريد. لذلك فان استعمال درجات الحرارة العالية عند 70 الى 80 ° م يكون غير ضارا بخلايا الخميرة وتستعمل هذه للوصول الى مستوى رطوبة عند 35% ثم يتم استعمال حرارة منخفضة عند 40 ° م لخفض نسبة الرطوبة الى 4% في المرحلة الثانية من التجفيف. ان شكل الخميرة الناتجة من هذه الطريقة يكون اسطواني واقطارها بين 0.2 الى 0.5 ملم واطوالها بين 1 الى 2 ملم وذا مظهر مسامي.

2- مصادر الكاربون المتجددة:

ثنائي أوكسيد الكاربون: وهو يستعمل من قبل الكائنات التي تقوم بالتركيب الضوئي مثل الطحالب. ويوجد CO_2 في الهواء الجوي بنسبة منخفضة (0.03%) بحيث لا يكفي لسد حاجة الطحالب. ويمكن الحصول على كميات إضافية منه من مصادر رخيصة مثل غاز الاحتراق الذي يحوي 0.5-5% من CO_2 وكذلك من البحيرات القلوية التي تحوي تركيز عالي من كاربونات الصوديوم. إن استخدام البرك في تنمية الطحالب له بعض الميزات فهو أكثر كفاءة في استخدام ضوء الشمس إذ يمكن تنمية الطحالب على مدار السنة, ويمكن استغلال أي نوع من الأراضي للتنمية بغض النظر عن خصوبتها, ولكن هناك بعض السلبيات لهذا النظام مثل تأثير الظروف الجوية مثل الغيوم وحجبها للضوء وكذلك تعرضها للحيوانات والحشرات والأدغال والأمراض. ومن أكثر أجناس الطحالب نجاحاً لهذا الغرض هو جنس *Spirulina* والذي ينمو بصورة جيدة في البحيرات القلوية (وحتى دالة حامضية 11) مما يمنع حدوث تلوث بالأحياء المجهرية الأخرى والحصول على مزرعة نقية من هذا الطحلب. وفي الوقت الحاضر تمتلك شركة سوسا تيكسكوكو (Sosa texcoco) مشروعاً لإنتاج طحلب *Spirulina maxima* في برك بعمق متر واحد, ويجنى الطحلب بالترشيح ثم يركز ويجفف. يصل الحاصل إلى حوالي 50 طن\هكتار\سنة وهو إنتاج عالي مقارنة بمحصول فول الصويا الذي تبلغ إنتاجيته 6 طن\هكتار\سنة. قد تنمى الطحالب على مياه الفضلات أيضاً وذلك لغرضين هما التخلص من التلوث وإنتاج البروتين في نفس الوقت.

المولاس: وهو الوسط الغذائي التقليدي في إنتاج خميرة الخبز أو خميرة التوريولا (*Candida utilis*). والمولاس هو الناتج العرضي لعملية إنتاج السكر من البنجر أو من قصب السكر ويستعمل أيضاً بكثرة كوسط في إنتاج الإيثانول. ويعد المولاس وسط جيد لإنتاج بروتين أحاديات الخلية ولكن بسبب الطلب العالي عليه في صناعات التخمير الأخرى فإنه يعد مصدراً مرتفع الثمن في إنتاج بروتين أحاديات الخلية.

الشرش: هو السائل المتخلف من صناعة الجبن بعد إزالة الدهن والكازين من الحليب الكامل. يحتوي الشرش المجفف على 70% لاكتوز و 9-14% بروتين و 9% رماد. ينتج سنوياً أكثر من 100 مليون طن في العالم ويرمى أكثر من نصفها كفضلات مما يزيد من مشكلات تلوث البيئة. تم خلال الحرب العالمية الأولى إنتاج كميات من مايسيليوم الفطر *Geotrichum candidum* بتنميته على الشرش. أما في الوقت الحاضر فإن الكائن المجهري الشائع الاستعمال على الشرش فهو الخمائر وخاصة خميرة الفراجلس (Fragilis yeast) وهي *Kluyveromyces fragilis* وتستخدم هذه الخميرة في بعض المشاريع في

العالم وعلى نطاق تجاري لإنتاج بروتين أحاديات الخلية وخاصة في فرنسا وأميركا والتي تنتجه للتغذية البشرية والحيوانية. وفي ألمانيا تستخدم مزرعة مختلطة من بكتريا *Lactobacillus bulgaricus* و خميرة *Candida Krusei*. أما في النمسا فتستخدم سلالة سريعة النمو ومقاومة للحموضة من خميرة *Candida intermedia* وتنتج أكثر من 2500 طن سنوياً من بروتين أحاديات الخلية والذي يستعمل للاستهلاك البشري.

المواد الناتجة من تحلل السكريات المتعددة Polysaccharides hydrolysates

يمكن إجراء عملية تحلل للمواد السلليلوزية والنشوية إلى سكريات أحادية, وبصورة رئيسية الكلوكوز, ثم تنمية أنواع عديدة من الأحياء المجهرية لإنتاج الكتلة الحيوية وخاصة خميرة التوريولا. يتم تحلل السكريات المتعددة عادة بمعاملتها بالإنزيمات أو الحوامض. يحلل السليلوز عادة بواسطة إنزيم السيليوليز الذي ينتجه العفن *Trichoderma reesei*. وقبل التحلل يجب أن تعامل المخلفات السليلوزية ببعض المعاملات الكيميائية أو الفيزيائية أو الميكروبية لتحرير مادة السيليلوز لتسهيل تحللها الإنزيمي. وتعد معاملة المخلفات السليلوزية بالقلويات وخاصة هيدروكسيد الصوديوم من أقدم وأحسن الطرق.

أما بالنسبة للمواد النشوية, فإن استعمال النشا ذي النوعية العالية يعد غير اقتصادي في إنتاج بروتين أحاديات الخلية لكونه غالي الثمن. قامت إحدى الشركات البريطانية باستعمال ناتج تحلل النشا (الكلوكوز) في إنتاج بروتين أحاديات الخلية باستخدام إحدى سلالات العفن *Fusarium graminearum*. إن السبب الرئيسي في استخدام العفن هو تركيبه الخيطي الذي يسهل فصله فضلاً عن إمكانية تصنيع منتج منه يشبه اللحم في قوامه, ويسمى هذا المنتوج البروتين الفطري (Mycoprotein). وقد وافقت السلطات على استخدامه في التغذية البشرية وحالياً تصنع منه بعض المنتجات الغذائية. ويتم تقليل نسبة الـ RNA من 10% إلى 1% بعد التخمر بتعريض مايسيليوم الفطر إلى حرارة 64 م لمدة 20 دقيقة وذلك لتنشيط إنزيم الرايبونيوكلييز الداخلي (RNase) الذي يحلل الـ RNA. يتم بعدها فصل المايسيليوم بالترشيح مع التفريغ ثم تضاف له مواد مطعمة بنكهة لحم الدجاج, ويحتوي المنتوج على نسبة 45% من البروتين.

معاملة المخلفات وإنتاج بروتين احاديات الخلية: يمكن استعمال مخلفات بعض مصانع الأغذية وبعض المخلفات الزراعية في إنتاج بروتين أحاديات الخلية وفي هذه الحالة تؤدي عملية الإنتاج هدفين هما التخلص من المخلفات وإنتاج كتلة حيوية غنية بالبروتين. من هذه المخلفات هي مخلفات مصانع الحلويات والبطاطا ومصانع التعليب والشرش والسائل المكبرت المتخلف من صناعة الورق (Sulfite waste liquor). تنتج سنوياً كميات كبيرة من هذه المخلفات القابلة للتخمر وتسبب مشاكل تلوث كبيرة للبيئة ويمكن استخدامها في

إنتاج بروتين احاديات الخلية. ويوجد الكثير من المشاريع على المستوى التجاري في العالم والتي تقوم على أساس معاملة المخلفات وإنتاج بروتين أحاديات الخلية, ومثال ذلك مشروع قامت به إحدى الشركات البريطانية لإنتاج خميرة التوريولا باستخدام السائل المتخلف من مصانع الحلويات وبالطريقة المستمرة. وتؤدي هذه العملية إلى تقليل متطلب الأوكسجين الحيوي (Biological oxygen demand) (والذي يعد مؤشراً على التلوث) بنسبة 81% وتنتج أكثر من 1,5 طن من خميرة التوريولا الجافة يومياً. وفي كندا وجد مشروع لمعاملة المخلفات الزراعية (مثل القش ومخلفات قصب السكر ونشارة الخشب) وإنتاج بروتين أحاديات الخلية وذلك بمعاملة هذه المخلفات معاملة ابتدائية بالمواد الكيميائية أو الحرارة ثم تخميرها بالعفن *Chaetomium cellulolyticum* وبطريقتي التخمرات السائلة والصلبة وتم الحصول على منتوج يحتوي على 35% بروتين.

القيمة الغذائية لبروتين أحاديات الخلية: تتحدد أهمية بروتين أحاديات الخلية المستعمل في تغذية الإنسان والحيوان بقيمته الغذائية. تحتوي البكتريا على أعلى كمية من البروتين بينما تحتوي الأعفان على أقل كمية من البروتين وتحتوي الخمائر والطحالب على كميات متوسطة منه. أما بالنسبة لنوعية البروتين فإن بروتين أحاديات الخلية تنقصه الأحماض الأمينية الحاوية على الكبريت لذلك يتم تدعيم بروتين أحاديات الخلية بالمثيونين عند استخدامه في تغذية فروج اللحم. وتسمح التشريعات في بعض الدول باستخدام بروتين أحاديات الخلية في التغذية. حيث تسمح التشريعات في الولايات المتحدة مثلاً باستخدام خميرة الخبز وخميرة الفراجلس وخميرة التوريولا والبروتين المستخلص من خميرة الخبز في تغذية الإنسان, كما سمحت التشريعات البريطانية باستخدام البروتين الفطري كبديل للحم الدجاج في تغذية الإنسان وكذلك سمحت باستخدام الخلايا الجافة لبكتريا , كما سمحت التشريعات البريطانية باستخدام البروتين الفطري كبديل للحم الدجاج في تغذية الإنسان وكذلك سمحت باستخدام الخلايا الجافة لبكتريا *Methylophilus methylotrophus* في تغذية الحيوان.

لا يشكل وجود الأحماض النووية في بروتين احاديات الخلية أية مشكلة في تغذية بعض الحيوانات بسبب امتلاكها لإنزيم اليورات أوكسيديز (اليوريكيز) (Uricase or urate oxidase) والذي يحول حامض اليوريك إلى مركب ذائب يفرز مع البول بينما لا يمتلك الإنسان هذا الإنزيم وإن تناول مركبات البيورين تؤدي إلى نسبة حامض اليوريك في الدم والتي تسبب الإصابة بداء النقرس. إن الحد المسموح تناوله من الأحماض النووية هو حوالي 2 غم يومياً مما

يسمح باستهلاك حوالي 10 غم من بروتين أحاديات الخلية في االيوم الواحد, لذلك يجب معاملة بروتين أحاديات الخلية لتقليل الأحماض النووية فيه وذلك إما بتعريض الخلايا لصدمة حرارية او استخلاص الأحماض النووية في وسط قاعدي أو بالطريقتين معاً.

بروتين أحاديات الخلية

Single-cell protein

يستعمل هذا المصطلح للدلالة على الخلايا الجافة للأحياء المجهرية مثل الطحالب والبكتريا والخمائر والأعفان والفطريات الراقية والتي تنمى في أنظمة مزرعية وعلى نطاق تجاري لاستعمالها مصدراً للبروتين في تغذية الإنسان والحيوان. وعلى الرغم من أن هذه الأحياء المجهرية تنمى بصورة أساسية من أجل محتواها البروتيني، ولكنها تحتوي على الكاربوهيدرات والدهون والفيتامينات والأملاح المعدنية. وقد استخدمت الأحياء المجهرية منذ القدم في التغذية، فالطحالب التابعة لجنس *Spirulina* كانت تجمع من البرك في المكسيك من قبل قبائل الـ Aztecs لاستعمالها مصدراً للبروتين، كما تستهلك الطحالب المجففة لهذا الجنس إلى هذا اليوم من قبل شعوب منطقة بحيرة تشاد (Chad) في أفريقيا.

نشأ أول إنتاج على النطاق الصناعي للأحياء المجهرية لاستخدامها في التغذية في ألمانيا خلال الحرب العالمية الأولى حيث تمت تنمية خميرة الخبز (*Saccharomyces cerevisiae*) على المولاس كمصدر للكاربون والطاقة مع إضافة أملاح الأمونيوم كمصدر نتروجيني، واستخدمت في تغذية الإنسان وبذلك استغنت ألمانيا عن 60% من استيرادها من الأغذية خلال الحرب. وخلال الحرب العالمية الثانية وفي ألمانيا أيضاً استخدمت خميرة التوريولا (*Candida utilis*) لنفس الغرض بتنميتها على السائل المتخلف من مصانع الورق وعلى السكريات الناتجة عن التحلل الحامضي للخشب، حيث تم إنتاج حوالي 15 ألف طن \ سنة من هذه الخميرة التي كانت تضاف إلى الأغذية وخاصة الشوربات. وقد انتشر إنتاج خميرة التوريولا في بقية أنحاء العالم بعد الحرب لاستخدامها في تغذية الإنسان والحيوان واستمر إنتاجها إلى الآن. وفي الستينات من القرن الماضي طورت بعض شركات النفط عملية صناعية لتنمية الأحياء المجهرية على النفط ومشتقاته لإنتاج بروتين أحاديات الخلية. وقد تمت تنمية خميرة *Candida lipolytica* على الألكانات (Alkanes) المشتقة من النفط (وهي هايدروكاربونات ذات سلاسل مستقيمة). وفي العقود الأخيرة حصل تطور كبير في مجال وراثة وفسلجة وتغذية الأحياء المجهرية مما أدى إلى تحسينات في إنتاج بروتين أحاديات الخلية من أنواع كثيرة من الأحياء المجهرية المنماة على مدى واسع من المواد الخام .

الأحياء المجهرية المستخدمة في إنتاج بروتين أحاديات الخلية: هناك بعض الصفات الواجب توفرها في هذه الأحياء المجهرية والتي تستخدم كمصدر بروتيني لتغذية الإنسان والحيوان. وأهم هذه الصفات هي:

1- لا تسبب أمراض للنبات أو الحيوان أو الإنسان.

2- ذات قيمة تغذوية جيدة.

3- لا تنتج مواد سامة.

4- ذات كلفة إنتاج واطئة. وتعتمد كلفة الإنتاج على بعض العوامل مثل معدل النمو وحاصل الإنتاج والمحتوى البروتيني والحاجة إلى عناصر غذائية مدعمة وكلفة عمليات الفصل والتجفيف.

ومن أهم مجاميع الأحياء المجهرية المستخدمة في إنتاج بروتينات احاديات الخلية هي:

1- الطحالب: تعود معظم الطحالب المستخدمة لهذا الغرض إلى أجناس *Spirulina* و *Chlorella* و *Scenedesmus*. تنمى الطحالب إما بطريقة التغذية الذاتية بالتركيب الضوئي (استخدام الضوء ومصادر الكاربون غير العضوية) أو بالتغذية العضوية (استخدام مركبات الكاربون العضوية مصدراً للكاربون والطاقة). وطريقة التركيب الضوئي هي الأكثر استعمالاً لذلك يعد الضوء هو العامل المحدد في عملية الإنتاج على النطاق التجاري. تعتمد الطريقة المثلى لإنتاج الكتلة الحيوية للطحالب على استعمال البرك المفتوحة وبوجود ضوء الشمس. وفي هذه الحالة تعد مشكلة التلوث من أهم المشكلات حيث لا يمكن المحافظة على ظروف التعقيم وبكلفة معقولة. والمشكلة الأخرى تتمثل بالكثافة الواطئة للخلايا (والتي تتراوح بين 1-2 غم من المادة الجافة لكل لتر على النطاق التجاري) مما يستوجب استعمال مساحات واسعة من المسطحات المائية. تصل نسبة البروتين في الطحالب إلى 60% وبمحتوى جيد من الأحماض الأمينية بالرغم من انخفاض الأحماض الأمينية الحاوية على الكبريت. وتحتوي الطحالب على كميات عالية من الصبغات الخاصة بالتركيب الضوئي والتي تعد مرغوبة عند استعمال الطحالب في تحضير الأعلاف المركبة الحيوانات ولكنها غير مرغوبة عند استعمال الطحالب للاستهلاك البشري. وقد بينت التجارب أن إضافة طحالب *Chlorella* و *Scenedesmus* إلى أغذية الإنسان قد سببت حدوث مشاكل تغذوية، ولكن يبدو أن الطحلب *Spirulina* أكثر ملاءمة للاستهلاك البشري.

2- البكتريا (Bacteria): من إيجابيات استعمال البكتريا في إنتاج بروتين أحاديات الخلية هو معدل نموها العالي مقارنة بالأحياء المجهرية الأخرى. وهناك أنواع كثيرة من البكتريا التي تستعمل لهذا الغرض بسبب قابليتها على استعمال مدى واسع من المواد الخاضعة. ويجب المحافظة على ظروف التعقيم خلال الإنتاج لأن الدالة الحامضية (pH) تضبط عند 5-7 في أغلب الأحيان مما يتيح المجال للتلوث بالبكتريا المرضية. ومن مشكلات استعمال البكتريا هي صعوبة عملية فصل الخلايا بالطرد المركزي. تحتوي البكتريا على نسبة عالية من البروتين (أكثر من 80%) وبمحتوى جيد من الأحماض الأمينية مع وجود نقص قليل في الأحماض الأمينية الحاوية على الكبريت. تحتوي البكتريا على نسبة عالية من الأحماض النووية، وخاصة RNA، (حوالي 20%) مما يستوجب اجراء بعض المعاملات لتخفيضها قبل استعمالها في التغذية البشرية، كما أنه يجب الأخذ بنظر الاعتبار إمكانية إنتاج بعض السموم من قبل بعض أنواع البكتريا.

3- الخمائر (Yeasts): إن أهم الخمائر المستخدمة لهذا الغرض تعود إلى أجناس *Saccharomyces* و *Candida* و *Torulopsis*. ويعد معدل نمو الخمائر عالياً بالرغم من أنها أبطأ من البكتريا. تضبط دالة الحموضة عادة عند 3.5-5 أثناء التنمية مما يفيد في تقليل خطر التلوث البكتيري. يمكن فصل خلايا الخميرة بسهولة من وسط النمو بالطرد المركزي. تتراوح نسبة البروتين في الخمائر بين 55-60% وبمحتوى جيد من الأحماض الأمينية بالرغم من وجود نقص أيضاً في الأحماض المحتوية على الكبريت وبصورة أشد مما هو عليه في البكتريا. ويمكن تدعيمها بالميثيونين والذي أصبحت إضافته شائعة لأغلب أنواع بروتين أحاديات الخلية المستعملة في العلف الحيواني. وتحتوي الخمائر على كميات عالية من مجموعة فيتامين B. تحتوي الخمائر على حوالي 15% من الأحماض النووية (على أساس الوزن الجاف) مما يستوجب معاملة الخميرة الناتجة لتقليل محتواها من هذه الأحماض.

4- الفطريات الخيطية (الأعفان) (Filamentous fungi or moulds): إن معدل نمو الأعفان أقل من معدل نمو البكتريا والخمائر بصورة عامة ويختلف معدل نموها بحسب مكونات الوسط الغذائي المستخدم. ينمو عدد من الأعفان بصورة جيدة عند دالة حامضية تتراوح بين 3-8 ويمكن أن تنمو عند أقل من 5 مما يقلل من التلوث البكتيري ولكن يكون

هناك خطر من التلوث بالخمائر ما لم تجرى التنمية تحت ظروف التعقيم. تتراوح نسبة البروتين في الأعفان بين 50–55% وهو ذو محتوى جيد من الأحماض الأمينية ولكن نسبة الأحماض الأمينية الحاوية على الكبريت تكون منخفضة أيضاً. وتحتوي الأعفان سريعة النمو على نسبة عالية من الأحماض النووية (تصل نسبة الـ RNA إلى 15%). وتنتج بعض الأعفان مركبات سامة تسمى السموم الفطرية (Mycotoxins) لذا يجب التأكد من أن السلالات المستخدمة في تغذية الإنسان والحيوان لا تنتج هذه السموم.

المواد الخاضعة المستخدمة في إنتاج بروتين أحاديات الخلية: تقسم مصادر الكاربون المستعملة في إنتاج بروتين أحاديات الخلية إلى قسمين هما المصادر المتحجرة (البتروكيميائيات) وهي المواد التي تتناقص باستمرار في الطبيعة ويقصد بها النفط ومشتقاته. أما القسم الثاني فهو المصادر المتجددة والتي يتجدد إنتاجها في الطبيعة باستمرار مثل غاز ثنائي أوكسيد الكاربون والمركبات العضوية المختلفة.

1– **مصادر الكاربون المتحجرة (البتروكيميائيات):** تشمل كلاً من الألكانات (n-alkanes) وزيت الغاز (Gas oil) الحاوي على الألكانات والميثان والميثانول والإيثانول.

الهايدروكاربونات السائلة: يعتقد أن الألكانات التي لها عدد قليل من ذرات الكاربون تتراوح بين 5–8 (n-pentane إلى n- octane) تكون سامة للخلية لتأثيرها المذيب على أغلفة الخلية وبروتينات هذه الأغلفة، لذلك فالألكانات التي تستعمل عادة كمواد خاضعة هي التي تحتوي على 9–18 ذرة كاربون والتي تكون غير ذائبة في الماء غالباً وهي تنتشر في وسط التخمر بفعل التقليب والتهوية لتكوين مستحلب. ويعتقد أن الأحياء التي تستخدم الهايدروكاربونات تقوم بإنتاج مواد تساعد على الاستحلاب وانتشار جزيئات الهايدروكاربونات وعبورها من خلال جدار الخلية إلى الداخل. وجد أن أنسب الأحياء المجهرية للنمو على الألكانات الطبيعية هي الخمائر التابعة لجنس *Candida*. إن أكسدة الهايدروكاربونات وتحولها إلى كاربوهيدرات تحتاج إلى كمية كبيرة من الهواء بسبب عدم احتواء الهايدروكاربونات على أوكسيجين، وبالمقابل فالهايدروكاربونات تحتوي على الكاربون بكميات أكبر من الكاربوهيدرات. ولهذا السبب فإن استخدام الهايدروكاربونات في التنمية يلزم كميات أقل من مصادر الكاربون وكمية أكبر من الأوكسجين.

الهايدروكاربونات الغازية: يعد الميثان من أكثر الهايدروكاربونات الغازية التي استخدمت في إنتاج بروتين أحاديات الخلية. والميثان هو المادة الرئيسية في الغاز الطبيعي الذي يتم حرقه عند آبار النفط في بعض مناطق العالم. ومن ميزاته كمادة خاضعة في إنتاج بروتين أحاديات الخلية هي توفره بنقاوة عالية وعدم تركه لمخلفات عند التخمر وإمكانية إزالته

بسهولة من وسط التخمر فضلاً عن معامل إنتاجه العالي وباستخدام الطريقة المستمرة. أما أهم المشكلات التي تواجه استعماله فهي ضرورة نقل غاز الميثان والأوكسجين والخطورة الناتجة عن استخدام مادة خام غازية. إن الحاجة إلى انتقال عالي للأوكسجين في المخمرات يرافقه إنتاج كمية كبيرة من الحرارة مما يستلزم إجراء عمليات تبريد. ومن المشاكل الأخرى هي تكوين نواتج تخمر مثبطة في الوسط الغذائي وخطورة حصول انفجار عند زيادة تركيز الأوكسجين. تعد هذه المشاكل سبباً لعدم تمكن الكثير من المشاريع التي تستخدم الميثان من الإنتاج على النطاق الصناعي.

يستطيع عدد محدود من الأحياء المجهرية، وخاصة البكتريا، من استخدام الميثان كمصدر للكاربون والطاقة ومنها بكتريا *Pseudomonas methanica* و *Methylococcus capsulatus*.

الميثانول: يمكن تحضير الميثانول كيميائياً من الميثان المتوفر في الغاز الطبيعي، أو من الفحم الحجري وزيت الغاز والخشب. ومن ايجابيات استعمال الميثانول هي ذوبانه الكامل في الماء وقلة المخاطر الناجمة عن الانفجار ووجود أنواع كثيرة من الأحياء المجهرية التي تستطيع النمو عليه مثل بكتريا *Methylomonas methanolica* و *Pseudomonas utili* ومن الخمائر *Candida boidinii*.

الإيثانول: يمكن الحصول عليه من النفط بإضافة الماء إلى الأثيلين. وللإيثانول نفس مزايا الميثانول. وتستطيع أنواع من البكتريا والخمائر والأعفان استخدامه. ويوجد مشروع واحد في العالم على النطاق التجاري لإنتاج بروتين احاديات الخلية من الإيثانول قامت به شركة أموكو (Amoco) الأميركية للأغذية حيث ينتج مصنعها حوالي 5000 طن\ سنة من خميرة التوريولا (Candida utilis) ويستخدم المنتوج في تغذية الإنسان.

الانتاج الحيوي للفيتامينات

تعرف الفيتامينات بانها المواد العضوية التي تحتاجها الكائنات الحية بتراكيز موزونة كي تؤدي وظائفها الحيوية، تنظم الفيتامينات تفاعلات كيميائية هامة تحول فيها خلايا الجسم مكونات الغذاء إلى طاقة ومركبات في الأنسجة الحية. ان اغلب الكائنات الحية لاتتمكن من تصنيعها لذلك تلجا للحصول عليها في اعتمادها على مصادر خارجية لها. لكل فيتامين استعمالات يختص بها دون غيره لدرجة ان أي فيتامين من هذه الفيتامينات لا يمكن ان يحل محل فيتامين آخر أو يعمل عمله، بيد أن افتقار الجسم لواحد من الفيتامينات يعرقل وظيفة الآخر، ويؤدي النقص أو الافتقار المستمر إلى فيتامين معين إلى حدوث مرض عوز الفيتامين. تتنوع الامراض التي تنتج عن نقص انواع الفيتامينات ومن امثلتها البري بري والبلاغرا والاسقربوط والكساح (لين العظام). وقد ترافقت بداية اكتشاف الفيتامينات مع البحث عن أسباب الأمراض الناتجة عن نقصها. ان اول استعمال لمصطلح الفيتامين كان عام 1911م من قبل العالم FUNK الذي اكتشف العامل المسبب لمرض البري بري Beri-beri . حيث وجد ان العامل المسؤول عن اعراض المرض هو فيتامين B_{12} . من هذا الاكتشاف تم التعرف على مجاميع الفيتامينات التي تبين انها عوامل ضرورية يحتاجها الجسم بتراكيز واطئة وليس لها قيمة من ناحية انتاج الطاقة ولايتمكن الكائن الحي في الغالب من تصنيعها حيويا، وان الحالات المشار اليها تعتبر الصفات الرئيسة التي تفرقها عن الانواع الاخرى من العوامل كالانزيمات والعناصر الصغرى والهورمونات.

مصادر الفيتامينات

ان من أكثر العقاقير التى يتم تعاطيها دون وصفة طبية (Non-prescription medication) على الرغم من التحفظات الطبية على ذلك هي الفيتامينات إلا أنه اصبح أمر واقع على مستوى العالم . تعد المصادر الخارجية للفيتامينات هي الاساس في سد احتياجات الانسان وكذلك الحيوانات منها وذلك لعدم مقدرة جسم الكائن الحي في تصنيع اغلبها. وتعد البكتريا المتواجدة في الامعاء مصدرا لعدد من انواع الفيتامينات التي يحتاجها الانسان لاسيما فيتامين K والبايوتين وفيتامين B_{12} ولكن الكميات المنتجة تكون دائما غير كافية لسد الاحتياجات منها.

انتاج الفيتامينات

الانتاج الحيوي للفيتامينات

يعد انتاج الفيتامينات ذا اهمية بالغة نظرا للحاجة اليها في كثير من التفاعلات والتحولات الايضية وكونها ذا قيمة علاجية ومواد ضرورية للنمو في الجسم. تدخل الفيتامينات كمضافات في الكثير من الصناعات الغذائية كما في تدعيم الخبز الابيض بالفيتامينات فضلا عن استخدام النقية منها في الاغراض العلاجية. ان مصادر الحصول على الفيتامينات يكون اما من المصادر الطبيعية او من التخليق الكيميائي. وان اهم المصادر الطبيعية هي الاتي:

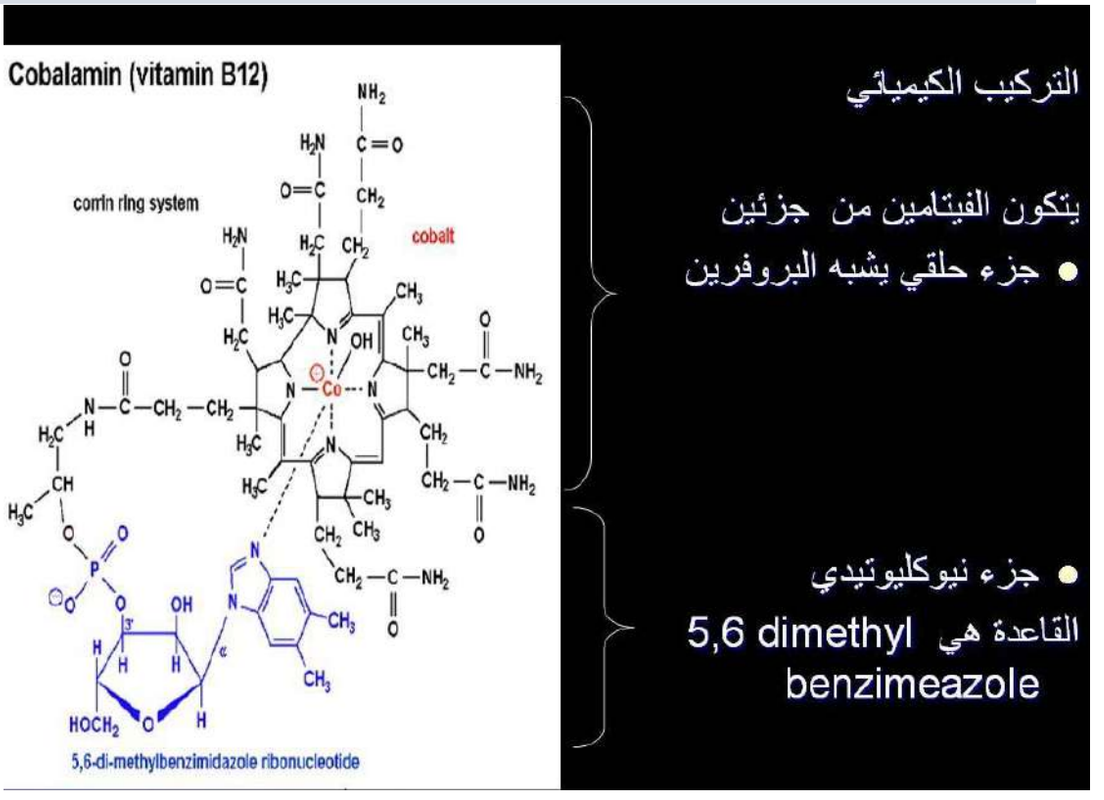
1) المصادر الحيوانية: كما في السمك والكبد والبيض وغيرها.
2) المصادر النباتية: كالخضراوات لاسيما الداكنة والملونة كاللهانة والسبيناغ والجزر وغيرها الكثير.
3) الاحياء المجهرية: كما في خميرة الخبز والانواع البكتيرية المختلفة.

كما تم انتاج بعض الفيتامينات باستخدام التخليق الكيميائي ولكن خطوات الانتاج تعد بانها معقدة في اغلب حالات الانتاج كما انها تتضمن خطوات متعددة. لذلك فان الاتجاه الى الانتاج الحيوي من خلال استعمال الاحياء المجهرية يعد مقبولا اقتصاديا وانتاجيا حيث أثبتت مقدرتها على إنتاج الثيامين B1 والريبوفلافين B2 وحمض الفوليك والبانتوثينيك والبيرودوكسيل والبايوتين . كذلك سجلت لتلك الاحياء إسهاماتً كبيرة فى إنتاج فيتامينات A و K من غير الذائبة في الماء. كما تلعب عمليات التحول الكيميائى ذات الطابع البيولوجي biotransformation دور هام فى إنتاج حمضى الأسكوربك Vitamin C والتوكوفيرول.Vitamin E .

وان من اهم الفيتامينات التي يتم انتاجها تجاريا باستعمال الاحياء المجهرية هي كل من فيتامين B12 والرايبوفلافين B2.

فيتامين B12

ان بدايات التعرف على فيتامين B_{12} كانت بعد اكتشاف علاقته مع حصول حالات فقر الدم الخبيث في الانسان حيث توصل العلماء Minot and Murphy في العام 1926 الى ان فقر الدم الخبيث يمكن علاجه عند التغذية على الكبد الطازج. توالت الابحاث بعد ذلك لاجل التوصل الى العامل الرئيس في العلاج حيث تم عزله في العام 1948 من كبد الثور ومن الاحياء المجهرية المنتجه له. كما تم التعرف على تركيبة الفيتامين في العام 1955 وذلك من خلال استعمال الاشعة السينية وفي العام 1973 (الشكل 1).



شكل 1. التركيب الكيميائي لفيتامين B_{12}

ان من اهم الاعراض الناتجة عن نقص الفيتامين هي الاتي:

فقر الدم كبير الكريات (Macrocytic anemia) ، تعب ووهن عام ، فقدان الشهية للطعام، تشنجات عصبية التي قد تصل إلى حالة الغيبوبة وإن فقر الدم بعوز فيتامين B12 هو فقر الدم الوحيد الذي يترافق مع أعراض عصبية. كما يمكن ان يكون عاملا مسببا لامراض اخرى، مثل زيادة احتمال الإصابة بتصلب الشرايين، بسبب حصول فرط هوموسيستينيميا الدم (Homocysteinemia) الناجمة عن نقص الفيتامين لذلك ينصح ان تكون فحوصات قياس مستويات B12 جزءًا من الفحوصات الروتينية، كما هو حال فحوصات السكر والدهنيات.

شكل لبعض حالات نقص فيتامين B12

إن المصدر الرئيس لهذا الفيتامين في الطعام هي اللحوم، البيض ومنتجات الحليب. ترتبط مستويات الفيتامين وحالات امتصاصه مع العامل المَعِدي الداخلي(Gastric intrinsic factor) في المعدة ومعدلات افرازه ليتم امتصاصهما معًا كمركب بتاثير العامل الداخلي في أقصى الأمعاء الدقيقة اللَّفائِفِيَّة(Terminal ileum) . لذلك فان جميع العوامل التي تؤثر في افراز العامل الداخلي تسبب في نقص امتصاص الفيتامين.

شكل يوضح بعض الاغذية التي تحتوي فيتامين B12.

ان الكميات الموصى بتناولها من هذا الفيتامين هي عند هي 2.4 ميكروغرام يوميا.

تم انتاج B_{12} كيميائيا في اكثر من 70 خطوه لذلك لم تستعمل هذه الطريقة في الانتاج التجاري كذلك لم تستعمل تجاريا طريقة استخلاصة من كبد الثور كونها غير اقتصادية حيث يتركز الفيتامين عند 1 ملغم/ كغم من الكبد. لذلك اتجهت الانظار الى استعمال الاحياء المجهرية في عملية انتاج الفيتامين وكانت البدايات مع بعض انواع بكتريا Streptomyces حيث تم استخلاصة من متبقيات الوسط المستعمل في انتاج المضادات الحيوية.

انتاج فيتامين B_{12}

استعملت انواع متعددة من الاحياء المجهرية في انتاج فيتامين B12 ولكن الانواع الاكثر استعمالا هي بكتريا *Propionibacterium* ونوعان من بكتريا جنس البروبيونك هي كل من *Pseudomonas dentrificans* و *freudenreichii* *P. shermanii* بعد تنميتها على وسط المولاس او المصادر الاخرى الغنية بالكاربوهيدرات. وقد فضلت الانواع في اعلاه على الانواع البكتيرية الاخرى لاسيما بكتريا Streptomyces

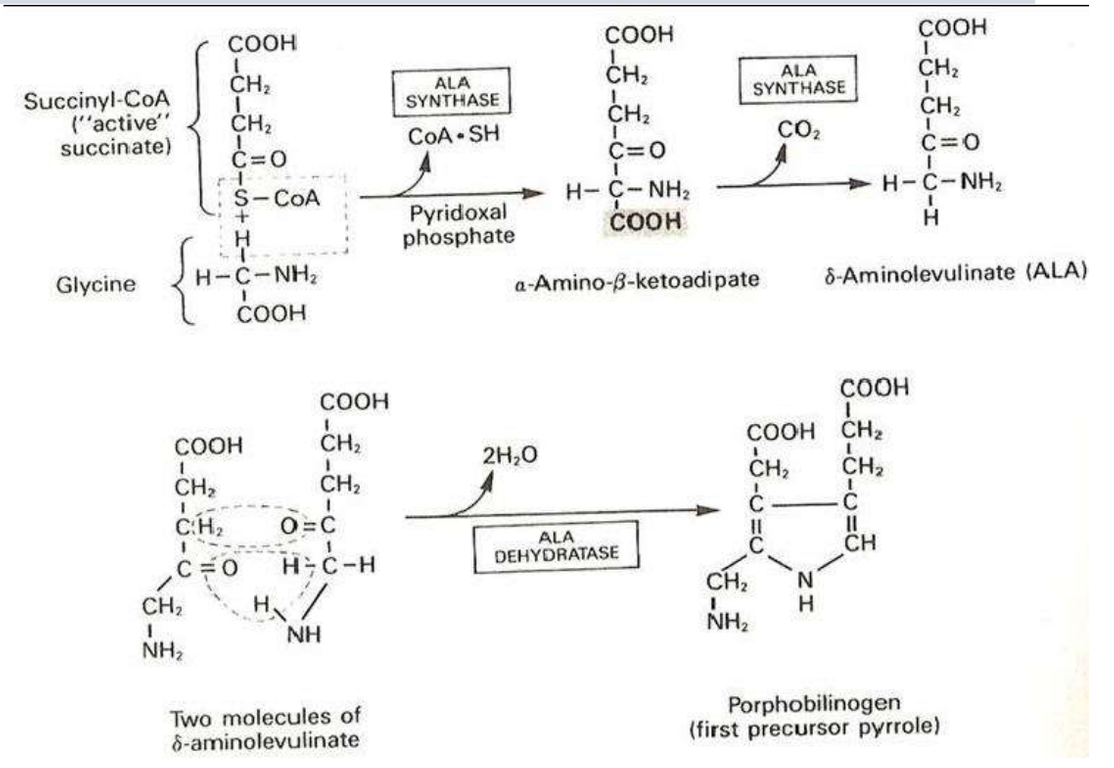
وذلك لكون تلك الانواع ذات انتاجية عالية فضلا عن سرعة نموها مقارنة مع الانواع من جنس Streptomyces

.

1. انتاج فيتامين B12 باستعمال بكتريا *Pseudomonas dentrificans*

استعملت انواع متعددة من جنس بكتريا Pseudomonas في انتاج فيتامين B12 الا ان بعض السلالات الطافرة من النوع البكتيري *Pseudomonas dentrificans* الذي عزل في العام 1960 كانت الاكثر انتاجا مقارنة مع الانواع البكتيرية الاخرى. وبعد اجراء التحسينات الوراثية على السلاله البكتيرية اعلاه تم تحسين الانتاج ليصبح في العام 1970 عند 60 ملغم من الفيتامين من كل لتر من الوسط المستعمل للانتاج.

ان افضل وسط لانتاج الفيتامين باستعمال هذه البكتريا هو مولاس البنجر السكري Sugar cane molasses وذلك لاحتوائه على 5-10% من مادة **Betaine** التي يكون تركيبها بشكل كلايسين ثلاثي المثيل (Tri-methyl glycine). يتم انتاج الفيتامين من خلال التحفيز لتخليق انزيم **Ala-synthetase** الذي له دورا رئيسا في انتاج حامض **β-aminolevulinic acid** الذي يعد المادة الاساس في تكوين فيتامين **B12**. اذ تتكون عنه مادة **porphobilinogen** وان اتحاد اربعة وحدات من هذا المركب يتكون الجزء الحلقي من الفيتامين الذي يرتبط مع الجزء النيوكلوتيدي ليتكون الفيتامين الكامل **(الشكل 2)**. لاتقتصر اهمية وجود مادة البيتين **Betaine** في التحفيز على الانتاج انما يكون تاثيرها ايضا في زيادة نفاذية جدر الخلايا المايكروبية المنتجة مما يسبب في سهولة تناضح الفيتامين خارج الخلايا الى وسط الانتاج. ان عملية انتاج الفيتامين من النوع البكتيري *Pseudomonas dentrificans* تتم تحت الظروف الهوائية كما ان اضافة **ملح الكوبلت** ومركب **5,6 dimethyl benzimidazole** تعد ضرورية لاتمام عملية الانتاج كون النوع البكتيري يستعمل المضافين اعلاه في اتمام عملية تخليق الفيتامين.



شكل 2. مراحل تكون فيتامين B12 حيويا

ان درجة الحرارة المثالية لتنمية البكتريا وانتاج الفيتامين هي عند **29** ° م وتستمر التنمية على الوسط لمدة **3** ايام ويستعمل التحريك عند سرعة لاتقل عن 150 دورة/ دقيقة ، كما ان الاس الهيدروجيني يجب ان يكون عند **7.4** .

2. انتاج فيتامين B12 باستعمال بكتريا *Propionibacterium shermanii*

ينتج فيتامين B12 من النوع البكتيري *Propionibacterium shermanii* في ظروف **قليلة التهوية** على وسط غذائي يتكون من الكاربوهيدرات لاسيما مولاس البنجر السكري مع اضافة عنصر الكوبلت الى الوسط الغذائي. يعتمد انتاج الفيتامين على مقدار تكون مركب 5,6 dimethyl benzimidazole داخل الخلية التي تتمكن من تخليقه. ان توفير الظروف اللاهوائية يؤدي في الحصول على انتاج عال من الفيتامين على الرغم من ان التهوية تسبب في تشجيع تكوين مركب DBI الضروري لانتاج الفيتامين. مع العلم بانها تسبب في كبح احدى خطوات تخليق الفيتامين. لذلك يفضل اجراء المرحلة الاولى من عملية التخمر تحت الظروف غير الهوائية التي تؤدي في استهلاك جميع كمية السكر الموجودة في الوسط الغذائي وكذلك تكوين مركب **Cobinamide** دون تاثير كابح. وعندما تتبعها تزويد المزرعة بالهواء فان الحالة تسبب في التحفيز لتخليق المركب **DBI** وتحويل المركب **Cobinamide** الى **Cobalamin** الذي يعد بانه فيتامين B12 . تتم التنمية على الوسط الغذائي عند 30 ° م تحت ظروف لاهوائية ومستوى اس هيدوجيني عند **6.5** لمدة ثلاثة ايام يتبعها ادخال كميات قليلة من الهواء مع التحريك عند نفس الظروف مع تغيير مستوى الاس الهيدروجيني الى 7 في

الثلاثة ايام الثانية وتستعمل هيدروكسيد الامونيوم لضبط مستوى الاس الهيدوجيني. ان كمية الانتاج تحت الظروف المشار اليها يمكن ان يصل الى 50 ملغم/ لتر من الوسط.

فيتامين الرايبوفلافين B2

فيتامين (Vitamin B2) المعروف أيضاً بالريبوفلافين، يعد بانه احد اهم مجموعة فيتامينات B التي تذوب بالماء ويمكن تناوله مع أو بدون وصفة طبيب. اذ يتواجد في عدد من الأطعمة.

يعد الفيتامين اساسيا في إنتاج الطاقة من الكاربوهيدرات كذلك في انتاج الأحماض الأمينية. كما يساعد على الحفاظ على سلامة الغلافات والأغشية المخاطية كالتي في بطانة الفم. الفيتامين ب2 ليس ساماً وهو يعزز وظيفة الخلايا والايض؛ ما يجعله عنصراً غذائياً ذا اهمية كبيرة .

يستعمل في علاج اليرقان لدى المولودين حديثاً. كما يمكن أن يفيد الفيتامين الأشخاص الذين يعانون من بدايات الارتعاش، فقر الدم، داء الشقيقة، اضطرابات الأكل، الملاريا،سرطان المريء والاكتئاب.

شكل يوضح نماذج لبعض الاغذية التي تحتوي فيتامين B2

يعتبر اللبن ومنتجاته كذلك بعض الخضروات والخميرة من المصادر الأساسية لهذا الفيتامين حيث تحتوي عليه بنسب كبيرة. هذا الفيتامين لاتؤثر الحرارة في تركيبه ولكنه يتاكسد بوجود الضوء. لا يستطيع جسم الإنسان الاحتفاظ به مما يستلزم الحصول عليه من مصادر خارجية باستمرار. تم فصل الفيتامين لاول مرة بصورة نقية من الحليب في 1879 ولم يتم التعرف عليه كفيتامين الا في العام 1920 وتم تشخيص تركيبة الكيميائي في العام 1930 كما تم تخليقه لاول مرة في العام 1935.

ان اعراض نقص الفيتامين تظهر بشكل تشققات مؤلمة في زوايا الفم وعلى الشفتين، تقرحات في الفم واللسان وقد يصبح لون اللسان أرجواني، كذلك في ظهور بقع حمراء دهنية ومتقشرة تظهر على الأنف، بين الأنف والشفتين، على الأذنين والجفنين، وان استمرار نقصه يسبب في حصول فقر الدمّ.

ان الجرعات الموصى بها من الفيتامين هي 1.0 الى 1.6 ملغم يوميا.

تركيب الفيتامين B2

يتم انتاج الفيتامين من اتحاد Flavin مع Isoalloxazine و Polyol و D–ribitol الذي يشتق من سكر الرايبوز Ribose . ومن مركباته اشتق اسمة الرايبوفلافين. اذ انه يوجد في الطبيعة بهيئة Flavin mononucleotide (FMN) و Flavin adenine dinucleotide(FAD)

انتاج فيتامين B2

ينتج الفيتامين على النطاق التجاري من خلال التخليق الكيميائي او الطريقة شبه الحيوية من خلال التخليق الحيوي لسكر الرايبوز ثم التحول الكيميائي الى الفيتامين او التخليق الحيوي الكامل لانتاج فيتامين B2.

1. الطريقة شبه الحيوية لانتاج الفيتامين

تستعمل السلالات المتطفرة من بكتريا *Bacillus subtilis* وبكتريا *B. pumilus* في انتاج سكر الرايبوز اذ ان انتاجه بهذه الطريقة يعد اقل كلفه من انتاجه بالطرق الكيميائية. تتميز السلالات المطفرة بانها لاتتجهه الى تكوين السبورات وينقصها انزيم **transketolase** ولها فعالية عالية من انزيم **2-deoxy-d-glucose oxidase** . تنتج السلالتين مايقارب **75** غم/لتر من الرايبوز. بعد انتهاء مدة التخمر يتم فصل خلايا البكتريا بواسطة الترشيح وبعد تركيز الراشح الى نصف الحجم يضاف **الايثانول** بمقدار **25%** من حجم الراشح الاصلي. يزال الراسب ويمرر الراشح المتبقي خلال مبادلات ايونية وكاتيونية للتخلص من الاملاح ويقصر اللون من خلال الامرار بالفحم المنشط. بعدها يضاف 4 امثال حجم السائل من الايثانول لبلورتة حيث يتبلور مايقارب من 70% من الرايبوز. يتم انتاج نصف الانتاج العالمي من الرايبوز بهذه الطريقة.

2. الطريقة الحيوية لانتاج الرايبوفلافين

يتم انتاج مايقارب من 30% من الانتاج العالمي بهذه الطريقة من خلال استعمال الاحياء المجهرية. يوجد فيتامين B2 في الاحياء المجهرية باحى الصيغتين FMN او FAD يتم تصنيف الاحياء المجهرية المنتجة للفيتامين اعتمادا الى قابليتها للانتاج اذ تصنف الى الاتي:

1) الاحياء المجهرية التي تنتج 100 ملغم/لتر مثل بكتريا ***Clostridium acetobutylicum*** اذ تنتج مايقارب 100 ملغم من الفيتامين/ لتر خلال مدة 4 ايام. الانتاج البكتيري في هذه الحالة يكون حساسا لوجود بعض الايونات لاسيما الحديد Fe^{+2}.
2) الاحياء المجهرية التي تنتج اكثر من 500 ملغم/لتر وتشمل الخمائر ***Candida flareri*** اذ انها تنتج مايقارب 600 ملغم/ لتر خلال 7 ايام وكذلك في ان الخمائر تتحسس للايونات المعدنية الذي يسبب عدم استعمالها في الانتاج التجاري.
3) الاحياء المجهرية التي تنتج في مستوى عدة **غرامات** من الفيتامين اذ تزيد في بعض الاحيان عن **10 غم/لتر** التي تضم انواع من الفطريات الكيسية المتطفرة من الانواع ***Eremothecium ashbyii*** و

Ashbya gossypii وسلالة من النوع البكتيري ***Bacillus subtilis*** المتحصل عليها من الهندسة الوراثية. ان الانواع المشار اليها في اعلاه لاتتاثر بوجود الحديد في الوسط الغذائي. استعمل الفطر ***Eremothecium ashbyii*** في الانتاج منذ العام 1935 وبلغت قابليته في الانتاج عند 5.3 غم/لتر ولكن هذا الفطر يبدي تغيرات وراثية مما يسبب في مشاكل عند الانتاج.اما الفطر ***Ashbya gossypii*** فانه اكثر ثباتا على الرغم من انتاجه عند 0.5 غم/لتر وان شركة Merck تستعمله في الانتاج بعد ان حسنت كمية الانتاج.

1- انتاج الرايبوفلافين من الفطر *Ashbya gossypii*

ان قابلية سلالة الفطر *Ashbya gossypii* على انتاج الفيتامين قد حسنت لتصل بين 10 الى 15 غم/لتر، وقد اعتمد تحسينها من خلال التطفير وكذلك توفير الوسط الغذائي للتنمية المثالية. يعد الزيت هو المصدر الكاربوني المفضل لتنمية سلالة الفطر لاسيما من **زيت فول الصويا او الذرة** فضلا عن انواع السكريات من الكلوكوز والسكروز والمالتوز اما المصدر النتروجيني فان **الببتون** يعد المفضل في التنمية وكذلك سائل نقيع الذرة ومستخلص الخميرة. كما وجد ان اضافة 1–3 غم من الكلايسين لكل لتر من الوسط الغذائي تسبب في زيادة الانتاج من 10–30% ومنها يمكن ان تكون زيادة الانتاج عند 14–20 غم/لتر من الرايبوفلافين.

2- انتاج الرايبوفلافين من البكتريا *Bacillus subtilis*

ان السلالة من النوع البكتيري اعلاه المنتجة لفيتامين الرايبوفلافين قد تم الحصول عليها من خلال استعمال الهندسة الوراثية وتتميز عن استعمال الفطريات الكيسية في انها تحتاج الى زمن اقصر للانتاج. تتم التنمية باستخدام الوسط الملائم والمتوفر عند 37 ° م لمدة يومين مع التحريك حيث يكون الناتج عند 4.5 غم/ لتر.

فصل وتنقية الرايبوفلافين

تعتمد طريقة فصل الرايبوفلافين على الغرض من استعماله حيث يمكن ان يستعمل كعلف حيواني او للاستعمال الصيدلاني. فعند استعماله للعلف الحيواني يتم ضبط الاس الهيدروجيني عند 4.5 بعد انتهاء عملية التخمير يتبعها اجراء تركيز للمزرعة ثم التجفيف.

يمكن الحصول على مركز الفيتامين من خلال معاملة المزرعة بانزيم البروتييز القاعدي لمدة 3 ساعات عند حرارة 60 ° م ثم تجرى عملية الطرد المركزي مع التبريد عند 25 ° م واس هيدروجيني 7.0 بعدها يتم اخذ الراسب ويغسل بالماء ثم يجفف.

اما في حالة الحاجة اليه للاستعمالات الصيدلانية فان عملية الفصل تبدأ بضبط الاس الهيدروجيني عند 4.5 ثم التسخين عند 121 ° م لمدة ساعة حيث تتم اذابة الفيتامين. يجرى بعدها ازالة الراسب باستعمال الطرد المركزي عند 3000 دورة/ دقيقة تجرى معاملة السائل بغاز مختزل مثل كلويد التيتانيوم اذ يترسب في هذه الحالة الرايبوفلافين المختزل الذي يكون اقل ذوبانا من المتاكسد. يتم اعادة الاكسدة للفيتامين بالهواء ويذاب في 10%

من حامض الهيدروكلوريك عند حرارة 60 ° م ، اذ تتم بلورة الفيتامين بعد التبريد ومعادلة الاس الهيدروجيني للوسط الموجود فيه الفيتامين.

أ- المزارع الصلبة (Solid cultures):

وتسمى تخمرات الحالة الصلبة (Solid state fermentation). في هذا النوع تتم تنمية الكائن المجهري على مواد صلبة في حالة غياب أو شبه غياب الماء الحر. يعتمد الحد الأعلى لنسبة الرطوبة (قبل ظهور الماء الحر) في الأوساط الغذائية الصلبة على قابلية امتصاص المادة الصلبة للماء أي أن نسبة الرطوبة تعتمد على نوع الوسط الغذائي وتركيبه. فمثلاً يمكن ملاحظة ظهور الماء الحر في وسط من نوع من قلف الأشجار (Bark) عند وصول نسبة الرطوبة إلى 40% بينما لا يظهر الماء الحر في بقايا سيقان الحنطة (القش) إلا بعد وصول نسبة الرطوبة إلى 80%. أما الحد الأدنى للرطوبة الذي يسمح بنمو الأحياء المجهرية فهو 12% حيث تتوقف جميع الفعاليات الحيوية عند مستوى رطوبة أقل من هذا الحد.

إن الأوساط الغذائية الصلبة الشائعة الاستعمال في التخمرات الصلبة هي الحبوب والبقوليات ونخالة الحنطة والمواد السليلوزية مثل الخشب والقش. وتكون هذه المواد غير ذائبة أو قليلة الذوبان جداً في الماء وهي رخيصة ومن السهولة الحصول عليها وتحتوي على تركيز عالي من العناصر الغذائية. تعد التخمرات الصلبة قديمة جداً من الناحية التاريخية حيث استخدمت في الشرق منذ مئات السنين. تستخدم تخمرات الحالة الصلبة في إنتاج بعض الأغذية الشرقية مثل صلصة فول الصويا والميزو (Miso) والتمبي (Tempeh) وغيرها، وجميعها أغذية متخمرة ناتجة من تخمر فول الصويا والحبوب بواسطة الأعفان. تستخدم التخمرات الصلبة أيضاً في إنتاج الإنزيمات وبعض الأحماض العضوية مثل حامض الستريك. وقد تركز استعمال التخمرات الصلبة في الدول الغربية على تحلل المخلفات العضوية النباتية والحيوانية (Composting) وإنتاج السايلج والفطر (المشروم) وفي صناعة أنواع معينة من الأجبان. ويعتقد أن التخمرات الصلبة التي تستعمل المخلفات السليلوزية ستكون صناعة رئيسية في المستقبل لإنتاج الكتلة الحيوية والإيثانول وغاز الميثان وعدد من المنتجات الأخرى ذات الأهمية الاقتصادية. وبصورة عامة يمكن إنتاج أغلب منتجات التكنولوجيا الحيوية والتي تنتج بواسطة الحياء المجهرية باستخدام تخمرات الحالة الصلبة. ويعتمد استعمال هذه الطريقة على الجدوى الاقتصادية مقارنة مع التخمرات السائلة.

يعتمد نمو الأحياء المجهرية في التخمرات الصلبة بصورة كبيرة على النشاط المائي أو الفعالية المائية (Water activity, a_w). تنمو البكتريا عند نشاط مائي عالي بينما تتحمل النمو الخمائر عند نشاط مائي أقل. أما الأعفان فهي تتحمل نشاط مائي أقل من الخمائر قد يصل إلى 0.6. وتعد الأحياء المجهرية التي تتحمل وتتكاثر عند مستويات واطئة من النشاط المائي هي الأحياء المجهرية الرئيسية التي تسود في التخمرات الصلبة.

أنواع تخمرات الحالة الصلبة: تقسم التخمرات الصلبة إلى ثلاثة أنواع هي:

1- **تخمرات الحالة الصلبة بواسطة الفلورا الطبيعية:** وهي التخمرات التي تستعمل فيها الأحياء المجهرية الموجودة بصورة طبيعية في المادة المراد تخمرها وهي تشمل:

أ- عملية إنتاج السايلج (Silage production): وهي عملية لا هوائية تستعمل فيها المواد النباتية الخضراء التي يتم كبسها بشكل حزم أو بالات ويتم التخمر بدرجة حرارة 25-30 م لمدة 1-2 اسبوع. تكون بكتريا حامض اللاكتيك وخاصة *Lactobacillus bulgaricus* هي السائدة وتقوم بإنتاج حامض اللاكتيك وبذلك تمنع نمو بكتريا التفسخ (Putrefaction bacteria) ولا تتمكن الأعفان من النمو بسبب غياب الأوكسجين. الرطوبة المثالية لهذه العملية هي 50-65% وعند هذه الرطوبة تنشط فقط بكتريا حامض اللاكتيك التي تتحمل الضغط الأوزموزي وتحول الكاربوهيدرات (السكريات) إلى حامض اللاكتيك. إن الظروف الحامضية واللاهوائية في السايلج تحافظ عليه من التلف خلال خزنه ليستعمل في الأوقات التي يقل فيها العلف الأخضر.

ب- عملية تحلل المواد العضوية (Composting): يتم فيها تحلل المواد العضوية في المخلفات النباتية والحيوانية وهي تتضمن تعاقب أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية والتي تبدأ بالبكتريا المحبة للحرارة المعتدلة (Mesophilic bacteria) والخمائر والفطريات الخيطية (الأعفان) مروراً بالبكتريا الخيطية والأعفان المحبة للحرارة العالية. ويعد تكوين الحرارة نتيجة الفعاليات الحيوية لهذه الأحياء المجهرية مشكلة كبيرة ويجب تقليب المادة العضوية ميكانيكياً لتخفيف الحرارة ومنع تعقيم المادة العضوية وقتل الأحياء الموجودة فيها. تستخدم المواد العضوية المتحللة كسماد عضوي ويدخل كوسط تنمية لإنتاج الفطر (المشروم)، وتعد هذه العملية من أهم العمليات الناجحة للاستفادة من المخلفات السليلوزية.

2- **تخمرات الحالة الصلبة بواسطة المزارع النقية:** تجرى هذه التخمرات بإضافة لقاح من نوع واحد من الأحياء المجهرية إلى وسط الإنتاج. وتعد عملية كوجي (Koji process) مثالاً على هذه التخمرات وهي من العمليات القديمة جداً وتستعمل في تخمير الحبوب وفول الصويا لإنتاج الأغذية الشرقية بواسطة العفن *Aspergillus oryzae*. وتعد طريقة كوجي الأساس في عمليات تخمر أخرى مثل إنتاج الإنزيمات والأحماض العضوية والإيثانول على النطاق التجاري. كما تم تطوير هذه الطريقة لإنتاج الكتلة الحيوية من المواد النشوية ومن المواد السليلوزية.

3- **تخمرات الحالة الصلبة بواسطة المزارع المختلطة:** تجرى هذه التخمرات بإضافة لقاح من مزيج يتكون من أكثر من نوع من الأحياء المجهرية إلى وسط الإنتاج، فمثلاً وجد أن القش (مواد سليلوزية) يمكن أن يتحول إلى كتلة حيوية (خلايا) بصورة أكثر كفاءة عند استخدام مزارع مختلطة من العفن *Chaetomium cellulolyticum* مع خميرة *Candida lipolytica* أو من العفن *Trichoderma lignorum* مع نفس الخميرة السابق ذكرها مقارنة مع استخدام مزرعة نقية من العفن لوحده. ويعتقد أن سبب ذلك يعود إلى أن الخميرة تستهلك السكريات الزائدة التي تتحرر بفعل إنزيم السيليوليز الذي ينتجه العفن وهذه السكريات تسبب الكبح الهدمي وتجعل العفن يتجه إلى تكوين السبورات، لهذا فإن استهلاك السكريات الزائدة من قبل الخميرة تمنع الكبح الهدمي وبالتالي تمنع تكوين السبورات.

تعد التخمرات الصلبة بصورة عامة تقنية رخيصة ولا تحتاج إلى تقنية عالية وفيما يأتي أهم إيجابيات وسلبيات تخمرات الحالة الصلبة.

أ- **الإيجابيات:**

1- الوسط الغذائي بسيط وطبيعي ورخيص مقارنة بالأوساط التركيبية عالية الكلفة.

2- يساعد مستوى الرطوبة المنخفض على استخدام أجهزة تخمر صغيرة الحجم ويقلل من فرص التلوث وقد لا يحتاج إلى عملية تعقيم.

3- يكون تركيز المنتوج المرغوب عالياً.

4- تحتاج إلى طاقة أقل مقارنة بالتخمرات السائلة التي تحتاج إلى عمليات خلط وتحريك.

5- يمكن تلبية متطلبات المزرعة من الأوكسجين عن طريق انتشار الغازات الذي يتم من خلال الفراغات بين جزيئات المواد الصلبة او بالتحريك البسيط مقارنة بعمليات التقليب في التخمرات السائلة.

ب- السلبيات:

1- يقتصر استعمال الطريقة على الأعفان التي تتحمل رطوبة منخفضة.

2- إنتاج حرارة عالية نتيجة الفعاليات الحيوية للخلايا والتي تعد إحدى مشكلات هذه التخمرات.

3- صعوبة السيطرة على ظروف التخمر بدقة مثل درجة الحرارة ودالة الحموضة (pH) وكمية الأوكسجين.

4- هناك منتجات محدودة يمكن إنتاجها بهذه الطريقة.

5- انخفاض معدل نمو الأحياء المجهرية.

عمليات فصل منتجات التقنية الحيوية

(Downstreaming)

يطلق مصطلح فصل المنتجات (Downstream) على جميع العمليات اللازمة لفصل وتنقية المنتوج أو المنتجات المرغوبة في أي نوع من العمليات الصناعية. تحتل هذه العملية أهمية كبيرة في التقنية الحيوية بسبب الاختلاف الكبير بين الوضع النهائي للمنتجات ووضعها الأصلي في داخل أجهزة التخمر. فمثلاً تعطي عملية التخمر المثالية مزيجاً من مواد صلبة منتشرة (الخلايا وبعض مكونات الوسط الغذائي) ومحلول مائي مخفف. وقد يكون المنتوج المرغوب موجوداً داخل الخلايا كواحد من المزيج المعقد لمكونات الخلية وفي هذه الحالة يتم فصل الخلايا عن وسط التخمر السائل يليها تمزيق جدرانها وفصل المنتوج المرغوب من المستخلص الخلوي، أو قد يكون موجوداً خارج الخلية في وسط النمو وفي هذه الحالة يتم فصل الخلايا والتخلص منها ثم فصل المنتوج المرغوب من وسط التخمر السائل (راشح المزرعة)، أو قد يكون موزعاً بين الاثنين. وفي جميع الحالات نحتاج إلى فصل وتركيز وتنقية المنتوج بعمليات دقيقة وفعالة مع الأخذ بنظر الاعتبار الجانب الاقتصادي للعملية، فقد وجد أن كلفة فصل وتنقية المنتوج تتراوح بين 20-60% من الكلفة الكلية للإنتاج، ويعود ذلك إلى

طبيعة وتركيب المنتوج المرغوب وطبيعة الوسط الموجود فيه ودرجة النقاوة المطلوب الوصول إليها.

إن بعض عمليات الفصل والتنقية المختبرية تكون غير اقتصادية عند تطبيقها على نطاق تجاري، كما أن بعض المنتجات تعد حساسة وتكون فعالة فقط عند ظروف معينة ومحددة من درجات الحرارة والدالة الحامضية (pH) والتركيز، لذلك يجب الاهتمام باختيار الطرق العلمية السليمة لفصل المنتوج لكي يبقى فعالاً ولا يتعرض للتلف. ولا توجد عملية واحدة مثالية لفصل جميع المنتجات فلكل منتج طريقة خاصة للفصل، كما أنه يتطلب في معظم الحالات دمج عدة عمليات أو مراحل للوصول إلى نتيجة جيدة لفصل المنتوج المطلوب.

وفيما يأتي شرح لأهم عمليات الفصل ومراحلها المختلفة.

1- **فصل الجسيمات الدقيقة (Separation of particles):** الخطوة الأولى بعد انتهاء التخمر هي فصل المواد الصلبة عن الجزء السائل. تتكون المواد الصلبة عادة من الخلايا الحرة أو الخلايا والإنزيمات المقيدة على مواد مدعمة فضلاً عن المكونات الصلبة للوسط الغذائي. إن معظم عمليات فصل الخلايا تعتمد على حجم وشكل الخلايا وكذلك وزنها النوعي (كثافتها) بالإضافة إلى طبيعة وسط التخمر ودرجة حرارته والدالة الحامضية له، فمثلاً يكون فصل الخلايا الكبيرة الحجم مثل الخمائر أكثر سهولة من فصل الخلايا الصغيرة مثل البكتريا عند استعمال طريقة الترسيب. ويتم أحياناً إضافة بعض المواد التي تسهل من عملية الفصل. ومن طرق الفصل الشائعة هي الترسيب الترشيح والطرد المركزي والتلبيد والطفو.

أ- **الترشيح (Filtration):** وهي طريقة واسعة الانتشار وتعد مثالية لفصل الأعفان والبكتريا الخيطية والكتل المتلبدة من الخمائر من وسط التخمر. تستعمل أوراق الترشيح أو قماش الململ في الفصل المختبري. أما على النطاق الصناعي فتستعمل طبقات من القماش أو الألياف التي تكبس للحصول على فتحات أو مسامات بأقطار معينة. يستعمل الضغط أحياناً مع عملية الترشيح لغرض زيادة سرعة الفصل.

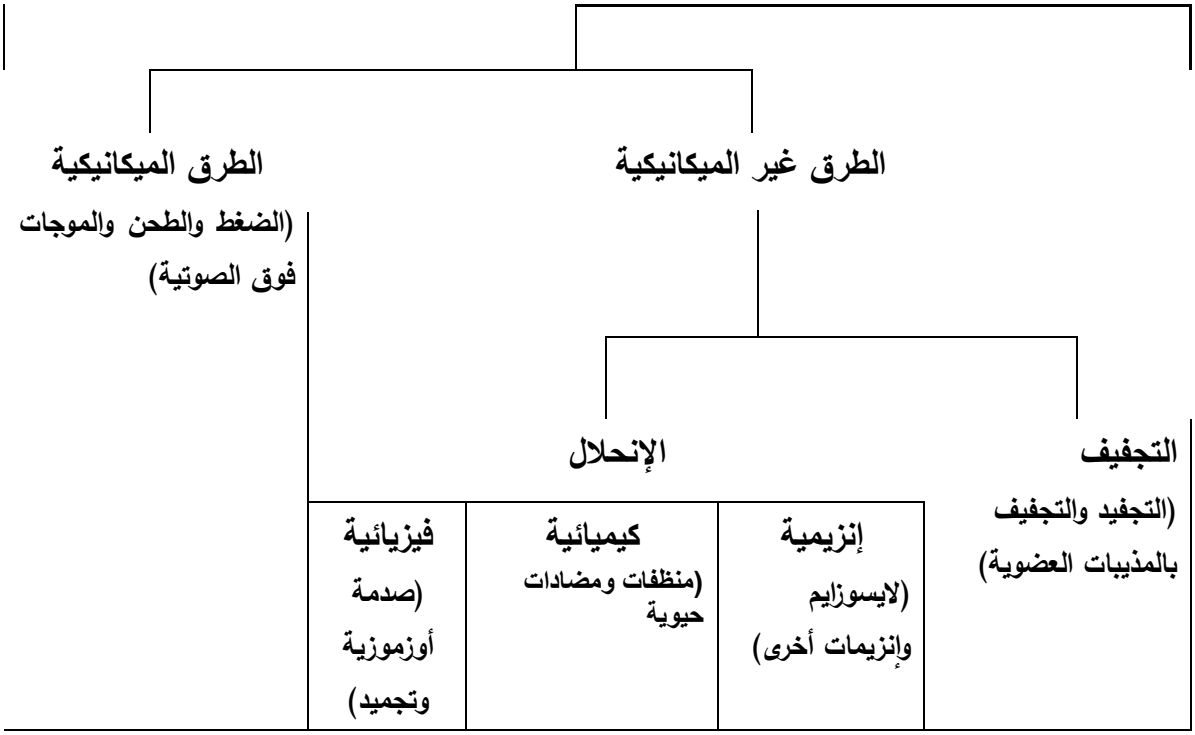
ب- **الطرد المركزي (Centrifugation):** يصعب فصل الخلايا الصغيرة الحجم، مثل البكتريا، بالترشيح البسيط، لذلك يمكن استعمال الطرد المركزي في فصلها (والذي يعتمد على الفرق في الكثافة بين المادة الصلبة والجزء السائل وهو يعاني أيضاً من بعض الصعوبات بسبب الفرق القليل بين كثافة السائل والخلايا. يستخدم الطرد المركزي كثيراً على النطاق

المختبري. أما على النطاق الصناعي ففيه بعض المشاكل بالإضافة إلى ارتفاع كلفته. يمكن استخدامه بنجاح وكفاءة عالية عند وجودفرق كبير في الكثافة بين الدقائق الصلبة والجزء السائل، أي عندما تكون كثافة السائل منخفضة، وهذه الحالة نادرة الوجود في معظم عمليات التكنولوجيا الحيوية.

ج- **التلبيد والطفو (Flocculation and flotation)**: تعد عملية فصل خلايا البكتريا الصغيرة الحجم عن وسط التخمر السائل من العمليات الصعبة جداً حتى في حالة استعمال الطرد المركزي، لذلك يتم اللجوء إلى تحسين عملية الفصل باستخدام تقنية التلبيد (وهي تشجيع الخلايا على التجمع مع بعضها بشكل عناقيد بغرض زيادة القطر أو الحجم) مما يزيد من معدل سرعة ترسيبها (حسب قانون ستوك). يمكن إحداث التلبيد بإضافة أملاح غير عضوية أو مواد شبه غروية. وتتأثر عملية التلبيد ببعض العوامل منها طبيعة الخلايا وعمرها والحالة الأيونية ودرجة الحرارة. عندما تكون كثافة الخلايا المتجمعة نتيجة التلبيد ليست كبيرة فإنها تطفو إلى السطح إذ تقوم فقاعات الهواء الصغيرة التي يتم دفعها من الأسفل بادمصاص الخلايا وسحبها إلى السطح. ويمكن تشجيع تكوين رغوة ثابتة على السطح بإضافة بعض المواد مثل الأمينات والأحماض الدهنية طويلة السلسلة ثم تجمع الخلايا المتجمعة في طبقة الرغوة. تستعمل عملية التلبيد بنجاح في عملية إنتاج بروتين أحاديات الخلية لفصل الكتلة الحيوية (الخلايا) في نهاية عملية التخمر.

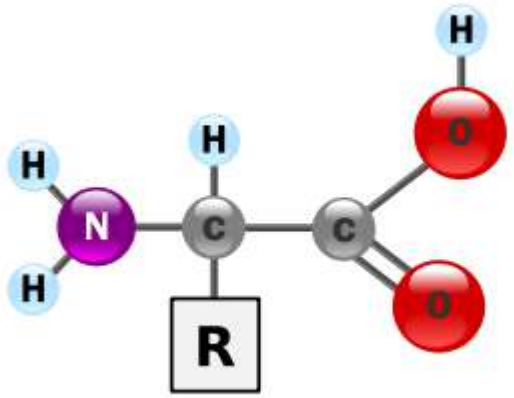
2- **تمزيق الخلايا (Disintegration of cells)**: عنما يكون المنتوج المرغوب في داخل الخلايا (مثل الإنزيمات الداخل خليوية وبعض المركبات الأخرى) يتم اللجوء إلى تمزيق جدران الخلايا للحصول على المستخلص الخلوي الحاوي على المنتج المطلوب ثم يفصل المنتوج وينقى. وتعد عملية التمزيق من العمليات الصعبة بسبب قوة الجدار الخلوي والضغط الأوزموزي العالي داخل الخلية. ويصعب استخدام الطرق الميكانيكية البسيطة مثل الطحن لتمزيق الخلايا بسبب حجمها المتناهي في الصغر. ومن الضروري مراعاة عدم تلف المكونات المرغوبة في الخلية أثناء عملية تكسير الجدران. يوضح المخطط الآتي بعض الطرق المستخدمة في تمزيق جدران الخلايا.

طرق تمزيق جدران الخلايا



الأحماض الأمينية (Amino Acids)

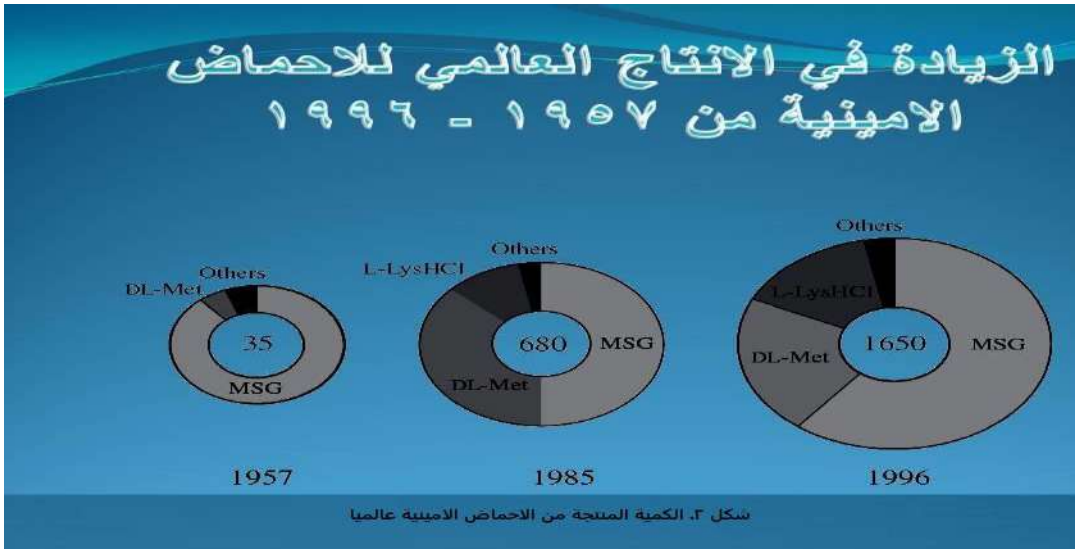
يعد الحامض الأميني بانه أحد انواع المركبات العضوية، يتميز في امتلاكه لنوعين من الجذور الكيميائية، هي الجذر القاعدي الأميني $-NH_2$ وجذر حامضي كربوكسيلي $COOH$ متحدتين مع ذرة كربون مرتبطة بدورها بسلسلة عضوية جانبية R Side chain تكون مختلفة من حمض أميني إلى آخر (الشكل 1). تعتبر الأحماض الأمينية وحدة التركيب الأساسية للبروتينات في الكائنات الحية.



شكل ١. الهيكل الاساسي للاحماض الامينية

كما انها تعد الوحدات الاساسية لبناء وتكوين الببتيدات والبروتين في الجسم. اذ يمكن ملاحظتها بسهولة بعد هضم البروتين. يبلغ مجموع الاحماض الامينية عند 20 حامضا امينيا منها ثمانية انواع تعد أساسية وذات اهمية للجسم البشري (التي لا يمكن للجسم البشري أن يصنعها بنفسه) والمتبقي منها غير أساسية (يتمكن الجسم البشري من تصنيعها، بشرط التغذية السليمة). وعلى الرغم من قدرة الجسم على تصنيع الأحماض غير الأساسية، إلا أنه في بعض الأحيان يتوجب أخذ مكملات للأحماض غير الأساسية لضمان توفر الكمية المثلى في الجسم. هناك نوع من الاحماض الامينية تسمى الاحماض شبه–الأساسية، اذ ان الجسم يستطيع تصنيعها ولكن بكميات محدودة.

تدخل الاحماض الامينية في مجالات متعددة لعل اهمها بناء الخلايا وإصلاح الأنسجة، اذ ان الأحماض الأمينية تشكل مادة البناء الرئيسية للأجسام المضادة لمكافحة غزو البكتريا والفيروسات، وهي تشكل جزءا أساسيا من نظام الإنزيمات والهرمونات. كما انها تدخل في بناء البروتينات النووية، وتدخل ايضا الاحماض الأمينية بمهام أخرى كنواقل عصبية ومواد أولية لبعض الهرمونات أو كمصدر للطاقة. كما انها تدخل كمضافات للاغذية وفي الصناعات الدوائية ومواد التجميل وكمواد خام في الصناعات الكيميائية كما تدخل في تدعيم الاعلاف الحيوانية لزيادة انتاجها. بلغ الانتاج العالمي لحد العام 2003 مايقارب من 2 مليون طن متري (الشكل 2).



شكل ٣. الكمية المنتجة من الاحماض الامينية عالميا

ان طرائق انتاجها تتضمن ثلاثة انواع (الجدول 1) هي:

1. التحلل المائي للبروتينات 2. التصنيع الكيميائي 3. الانتاج الميكروبي.

جدول ١. الكميات المنتجة من انواع الاحماض الامينية وطريقة انتاجها

Amino acid	Estimated production (ton/year)	Processes
MSG	1,000,000	Fermentation
D,L-Methionine	350,000	Chemical synthesis
L-Lysine HCl	250,000	Fermentation
Glycine	22,000	Chemical synthesis
L-Phenylalanine	8,000	Fermentation, chemical synthesis
L-Aspartic acid	7,000	Enzymatic method
L-Threonine	4,000	Fermentation
L-Cysteine	1,500	Extraction, enzymatic method
D,L-Alanine	1,500	Chemical synthesis
L-Glutamine	1,300	Fermentation
L-Arginine	1,200	Fermentation
L-Tryptophan	500	Fermentation, enzymatic method
L-Valine	500	Fermentation
L-Leucine	500	Fermentation, extraction
L-Alanine	500	Enzymatic method
L-Isoleucine	400	Fermentation
L-Histidine	400	Fermentation
L-Proline	350	Fermentation
L-Serine	200	Fermentation
L-Tyrosine	120	Extraction

تنتمي الأحماض الأمينية المكونة للبروتينات الموجودة في الطبيعة إلى فئة ألفا α–Amino Acids وذلك لأن جذري الأمين والهيدروكسيل يرتبطان بذرة الكربون الأولى في السلسلة. كما توجد احماض أمينية أحيائية من فئة بيتا مثل البيتا–ألانين (β–Alanine) وأخرى من فئة كاما مثل حمض الكاما–أمينوبيوتيريك (γ–Aminobutyric acid) ورغم وجود عدد كبير من الاحماض الألفا–الأمينية في الطبيعة إلا أن السلاسل البروتينية لاتحتوي سوى 20 نوعا منها فقط. وتتوفر أيضا مجموعة من الاحماض الأمينية المصنعة كيميائيا ولها عدة استعمالات في مجال الصناعة الكيميائية والصيدلية والغذائية.

ان تصنيع الاحماض الامينية كيميائيا يكون الناتج عنها خليط من النوعين L و D اذ ان النوع D يعد ضارا في الصحة ولايمكن استعماله في التغذية بينما يكون الناتج من الانتاج الميكروبي من النوع L فقط التي يمكن استعمالها بامان في التغذية والاضافات الغذائية. وتتنوع استعمالات الاحماض الامينية حسب النوع كذلك اعتمادا الى نوعية طريقة التصنيع (الجدول 2).

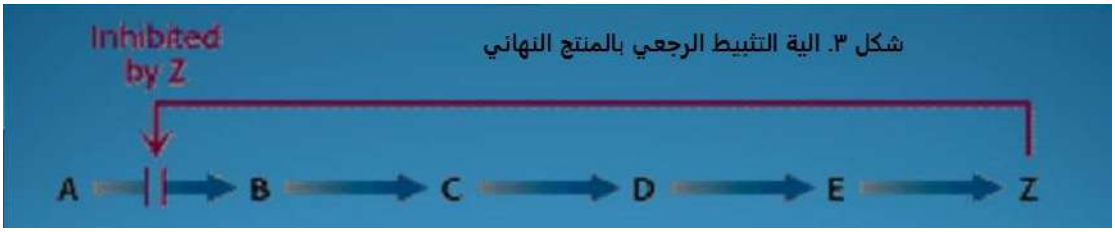
جدول ٣. انواع الاحماض الامينية المنتجة مايكروبيا واستعمالاتها

الاحماض الامينية	الاستعمالات
L- Glutamate	محسن للنكهه ومطري للحم
L- Asparatate , L- A lanine	عصائر الفواكه
L- Glycine	محسن للنكهه في الاغذية المحلاة
L- Cystein	مضاد للاكسدة في العصائر ، وفي صناعة الخبز
L- Tryptophane , L- Histidine	مضاد للاكسدة في الاغذية المختلفة مثل الحليب
L- Lysine , L-methionine	محسن للقيمة الغذائية خاصة في الاغذية النباتية

التقنيات المستعملة في زيادة انتاج الاحماض الامينية من الخلايا...

ان من اهم التقنيات التي يتم عند استعمالها زيادة انتاج الخلايا الميكروبية من الاحماض الامينية هي الاتي:

1. انتاج سلالات طافرة مثبط فيها الية التثبيط بالتغذية الراجعة من المنتج النهائي (Feed back inhibition from final product) في الميكروبات الصناعية المنتجة للاحماض الامينية. التي تتضمن قابلية الحامض الاميني كناتج نهائي في تثبيط الانزيم الاول المسؤول عن بداية انتاج الحامض الاميني (الشكل 3).



شكل ٣. الية التثبيط الرجعي بالمنتج النهائي

2. انتاج مايكروبات صناعية طافرة منتجة للاحماض الامينية ذات قابلية في مقاومة الاجهاد Repression: تتضمن الحالة في انتاج طفرات لاتنتج البروتين المثبط Repressor protein او انها تتمكن من انتاج البروتين المثبط ولكنه يكون غير متوافقا للارتباط مع الحامض الاميني المراد انتاجه. وبالتالي لايحدث ارتباط البروتين المنتج مع الجين المشغل الذي تتم من خلاله عملية النسخ للحامض الاميني.
3. ان تكون الخلايا الميكروبية الصناعية الطافرة ذا قابلية عالية في التنافذ من خلال الغشاء السايتوبلازمي. الذي يتم من خلال الحالة المشار اليها قابلية الخلية الميكروبية الصناعية على افراز الحامض الاميني خارج الخلية لمنعها من تثبيط مسار انتاجه عند وصول تركيزه الى مستوى عالي يتم معه تثبيط انتاج الحامض الاميني.

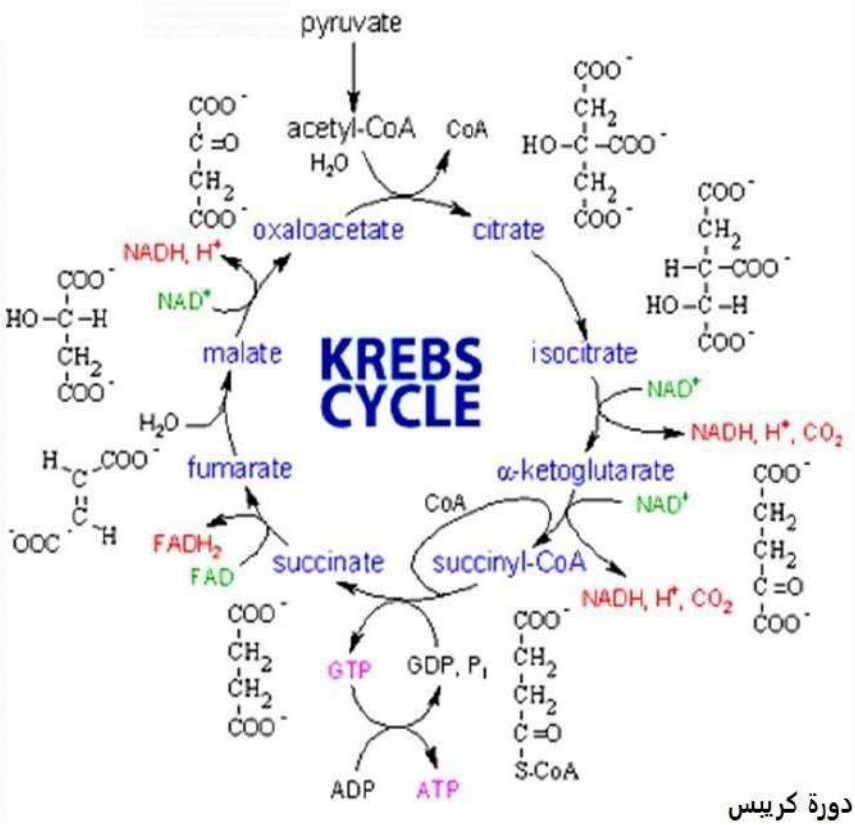
انتاج حامض الكلوتاميك L- glutamic acid production

انتج حامض الكلوتاميك بداية من خلال التحلل المائي لكلوتين الحنطة بشكل كلوتامات الصوديوم الاحادية Mono sodium glutamate في العام 1909 في اليابان . اما اول انتاج للحامض من خلال استعمال الاحياء المجهرية فقد كان في العام 1957. يستعمل الحامض المنتج في الصناعات الغذائية كعامل نكهة حيث يعطي نكهة اللحوم.

استعملت في انتاجه بكتريا ***Corynebacterium glutamicum*** على النطاق التجاري كما امكن انتاجه من سلالات بكتيرية اخرى تابعة للاجناس Brevibacterium و Arthrobacter و Micrococcus . ان من صفات الكائن ان يكون مقاوما للاقمات الفايروسية التي في حالة وجودها فانها تسبب في فشل عملية الانتاج . يتم الانتاج بعد تنمية النوع البكتيري على الوسط الزرعي الملائم الذي يكون محتويا على **الكلوكوز والاملاح غير العضوية** كما يحتوي على **البايوتين** في تركيز اقل من الحد المثالي لنمو الكائن المجهري، الذي يسبب نقصه في زيادة نفاذية جدار الخلية البكتيرية وبالتالي السماح للخلية في افراز مكوناتها من حامض الكلوتاميك الى الوسط الغذائي خارج الخلية. ان انتاج الخلية البكتيرية ***Corynebacterium glutamicum*** لكمية من الحامض تصل الى 50 ملغم في داخلها الى حدوث ظاهرة تثبيط التغذية الراجعة FBI اذا لم تكن السلالة البكتيرية قد حسنت لتكون مقاومة لتلك الحالة. يؤدي اضافة **البنسلين** او احد العوامل الفعالة على السطح مثل Tween 60 or 40 خلال فترة التخمر الى زيادة نفاذية جدار الخلية المايكروبية عند اي مستوى من البايوتين في الوسط الغذائي لذلك فانه يمكن استعمال الاوساط الغذائية الطبيعية الرخيصة والغنية بالبايوتين مثل مولاس القصب او البنجر، كما يمكن استعمال البارفينات الطبيعية او حامض الخليك او الايثانول بدل من الكاربوهيدرات لاسيما منها مرتفعة التكاليف.

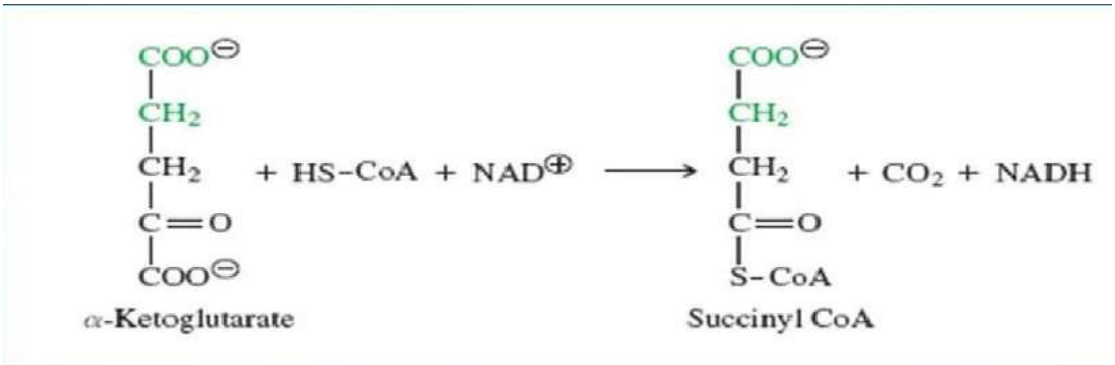
الية انتاج حامض الكلوتاميك

تعتمد الية انتاج حامض الكلوتاميك في تكوين المسار الايضي من دورة الحامض ثلاثي الكاربوكسيل غير الكاملة (الشكل 4).



شكل ٤. دورة كريبس

ان عدم اكتمال دورة كريبس تحصل بسبب النقص في الانزيم الذي يسبب في تحويل حامض الكلوتاميك الى حامض السكسنيك (الشكل 5) المسمى **α-keto glutarate dehydrogenase** حيث يؤدي النقص في انتاجه من قبل البكتريا الى زيادة تجمع حامض الكلوتاميك في داخل الخلية. ان السلالات المنتجة للكلوتاميت تكون في العادة ذا فعالية عالية من انزيم **Glutamate dehydrogenase** الذي يحول مركب **α-keto glutarate الى Glutamate** . كما ان **نقص البايوتين** يسبب في **زيادة النفاذية للغشاء الخلوي** للسلالة البكتيرية واعطاء النفاذية المناسبة لخروج الكلوتاميت مع الوسط الغذائي. تحتاج السلالة المذكورة من البكتريا الى **الاملاح من الفوسفات والبوتاسيوم والمغنسيوم والمنغنيز** كما يجب اضافة **املاح الامونيوم** كمصدر للنتروجين كونه يدخل في تخليق الكلوتامين في داخل الخلية.



شكل 5. الخطوة الرئيسة في انتاج حامض الكلوتاميك في دورة كريبس

ظروف انتاج حامض الكلوتاميك

تتم عملية انتاج حامض الكلوتاميك باستعمال المخمر في **طريقة التنمية المستمرة**. تتم عملية التخمير عند **حرارة 30 الى 35 ° م** ومستوى من الاس الهيدروجيني عند **7 الى 8** ويتم الضبط باستعمال الامونيا. يجب **توفير الاوكسجين بشكل جيد** في جهاز المخمر اذ ان انخفاض نسبته تسبب في انخفاض انتاج الكلوتاميك وانتاج كل من حامض اللاكتيك والسكسنيت بدله. اما في حالة زيادة تركيز الاوكسجين فانها تؤدي الى تجمع كميات اضافية من حامض α-keto glutarate . كذلك تسبب **الكميات الزائدة من البايوتين** في الاتجاه الى تكوين حامض اللاكتيك حتى مع وجود الكميات المناسبة من التهوية. يمكن استبدال حالات زيادة البايوتين للحصول على النفاذية في الغشاء في اضافة البنسلين او العوامل الفعالة على السطح.

يمكن الحصول على الكلوتاميك بعد مدة تنمية بين 48 الى 72 ساعة من بدء التخمر. وان تركيز حامض الكلوتاميك يصل الى 50% من وزن الكاربوهيدرات الموجودة في الوسط المستعمل للتنمية. ان استعمال البنجر السكري تسبب في زيادة نسبة انتاج الحامض وذلك لاحتواء المولاس على 3 الى 5% من حامض Pyrrolidone-5-carboxylic الذي يعد Amide داخلي لحامض الكلوتاميك.

فصل وتنقية حامض الكلوتاميك

يتم فصل حامض الكلوتاميك وتنقيته من خلال فصل الخلايا من المزرعة السائلة بطريقة الطرد المركزي وتتم بلورة حامض الكلوتاميك بعد خفض الاس الهيدروجيني الى نقطة التعادل الكهربائي للكلوتاميك Isoelectric point عند **3.2 pH** باستعمال حامض الهيدروكلوريك. ان المحافظة على دالة الحموضة مضبوطة عند 3.2 تسهل من الحصول على البلورات النقية من الحامض كما يتم اضافة حامض الهيدروكلوريك وراشح المزرعة بصورة منفصلة الى معلق البلورات من الحامض عند نقطة التعادل للحامض

للحصول على البلورات النقية. ان بقاء نسبة مرتفعة من السكر في الوسط يتكون عنها بلورات ضعيفة بعكس الحال الذي تتكون معه بلورات جيدة في حالة وجود بعض الاحماض الامينية في الوسط الغذائي.

تحضر **مادة كلوتاميت الصوديوم الاحادية** من بلورات حامض الكلوتاميك النوع L حيث يذاب في محلول **هيدروكسيد الصوديوم** ثم يتم قصر المحلول الناتج وتركيزه وبلورته. وفي حالة استعمال المبادلات الايونية قوية القاعدية فانه يتم الحصول على كلوتاميت الصوديوم الاحادية من دون فصل حامض الكلوتاميك لانه يتم ازالة الاحماض العضوية عدا الامينية في تلك الحالة.

انتاج اللايسين L–lysine

يعد الحامض الاميني اللايسين بانه من الاحماض الامينية الاساسية وان استعماله في الغالب يكون مدعما للاعلاف الحيوانية وان انتاجه في الغالب يكون باستعمال الاحياء المجهرية حيث تصل الى اكثر من 80% من انتاجه والمتبقي بحدود 20% يكون انتاجها بالتخليق الكيميائي.

الية انتاج اللايسين

يستعمل نوع البكتريا ***Corynebacterium glutamicum*** في انتاج اللايسين ولكنها تكون من النوع **الاوكسوترفية للهوموسيرين** (اي السلالة التي فقدت صفة انتاج الهوموسيرين). تنتج هذه السلالة للحامض الاميني اللايسين بعد تنميتها تحت الظروف المناسبة للانتاج. اذ ان حالة الانتاج تتطلب اضافة البايوتين بكميات مناسبة حيث ان اضافته بكميات قليلة سيؤدي الى اتجاه البكتريا لانتاج حامض الكلوتاميك كما ان زيادته يسبب في الاتجاه الى انتاج كل من حامضي اللاكتيت والسكسنيت. ان اضافة المضاد الحيوي البنسلين الى الوسط الغذائي للانتاج يؤدي الى الاتجاه في زيادة انتاج الكلوتاميك.

ان الية الانتاج تكمن في **زيادة فعالية انزيم Aspartokinase** الذي يزيد من كمية اللايسين المنتجه من خلال **فاعليته في تثبيط ظاهرة التغذية الراجعة المتعددة** Multivalent feed back homoserine **باللايسين والثريونين** اذ ان السلالة اعلاه **ينقصها انزيم Homoserine dehydrogenase** الذي في حالة وجودة سوف يتجهه الانتاج للاحماض الامينية الاخرى. ان تثبيط التغذية الراجعة يكون ناتجا من انخفاض مستوى الثريونين وبذلك يحافظ انزيم Aspartokinase على فعاليته وبالتالي زيادة انتاج اللايسين.

نظرا لكون السلالة فاقده لصفة انتاج الهوموسيرين وان كل من الحامض الاميني المثيونين والثريونين يتم انتاجهما من الهوموسيرين فانه بالتالي يكون هناك فقدان لهذان الحامضان في البكتريا لذلك فانه هناك حاجة الى اضافتهما الى الوسط الغذائي الخاص بالانتاج.

وجد ان انواع اخرى من الانواع البكتيرية تتمكن من انتاج اللايسين لاسيما من انواع الاجناس Brevibacterium و Bacillus و Corynebacterium.

عملية انتاج اللايسين

تتم عملية الانتاج لحامض اللايسين باستعمال النوع البكتيري ***Corynebacterium glutamicum*** تحت الظروف الهوائية من التنمية حيث يكون المخمر محتويا على وسائل توفير التهوية والتقليب وعند حرارة 28 ° م وفي المستوى المثالي من الاعداد الميكروبية وذلك للمحافظة على السلالة من حالة انحلال السلاله وحصول الطفرات الراجعة لها. **يستعمل في الغالب وسط المولاس المخلوط بجريش فول الصويا المتحلل** كما يتم المحافظة على **وسط التخمر متعادلا** وذلك من خلال اضافة محلول **الامونيا**. تكتمل مدة التنمية بعد **48 الى 72 ساعة** وتكون كمية الناتج عند **50 غم لكل لتر** من الوسط الغذائي.

فصل اللايسين

يتم فصل حامض اللايسين مباشرة من راشح المزرعة بشكل **هيدروكسيد اللايسين** بعد اضافة حامض HCL الى الراشح وادمصاص اللايسين على عمود التبادل الكاتيوني المتكون من الامونيوم، حيث يسحب اللايسين من العمود باضافة الامونيا السائلة بعدها يتم تخفيفه باضافة حامض HCL لتتم بلورته بشكل L–lysine hydrochloride .