بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرات التقنية الحيوية المرحلة الرابعة قسم علوم الاغذية

مدرس المادة طارق نواف خليل

المختبر الحادي عشر: إنتاج الأنزيمات وتقدير فعاليتها:

الأنزيمات هي عبارة عن مواد بروتينية لها وظائف متخصصة إذ تعتبر كعوامل مساعدة للتفاعلات الأنزيمية حيث أن عند دخول الأنزيمات في التفاعل فأنها تخرج من التفاعل كما دخلت دون أن تتأثر وهذا له دور في إمكانية تكرار استخدام نفس الأنزيم في عدة تفاعلات , وفي الفترة الأخيرة زاد الطلب على الأنزيمات نتيجة لأهميتها من الناحية الصناعية حيث تدخل في العديد من الصناعات الغذائية مثل صناعة الاجبان وترويق العصائر وكذلك تستخدم بعضها كعوامل تطرية للحوم وتضاف إلى الفواكه لتسهيل استخلاص العصير منها وفي مجال التقنية الحيوية مثل صناعة السكريات وإنتاج شراب الذرة ومستحضرات يمكن أن تستخدم في زيادة القيمة الغذائية لبعض البقوليات كما يمكن أن يستخدم في الصناعات الطبية كمستحضر يعطى للأشخاص الذي لديهم حساسية من تناول بعض المواد مثل حساسية اللاكتوز والكلوتين إذ يضاف مستحضر اللاكتيز والكلوتينيز كما تستخدم كمستحضرات مضادة للالتهابات ومساعدة للهضم وغيرها في كثير من الصناعات.

يمكن إنتاج الأنزيمات على النطاق التجاري من مصادر مختلفة مثل الأحياء المجهرية والنبات والحيوان , وتفضل مصادر الأحياء المجهرية على المصادر الأخرى وذلك لأنه تركيز الأنزيمات في النبات قليل فضلاً عن ارتباطها بالموسم والظروف الجوية , أما في الحيوانات فتكون الأنزيمات عبارة عن منتجات ثانوية في صناعة اللحوم وكمياتها قليلة , أما في الأحياء المجهرية فيمكن تجاوز كل تلك العقبات وذلك بإمكانية تهيئة الظروف الملائمة لنمو الكائن ألمجهري وإمكانية التحكم في الوسط الغذائي والظروف المحيطة به فضلاً عن إمكانية إجراء عملية التطفير والتلاعب بالمادة الوراثية لزيادة إنتاج الأنزيم فضلاً عن نقاوة الأنزيمات التحصل عليها من الأحياء المجهرية.

تقسم الأنزيمات إلى عدة أقسام من بين تلك التقسيمات هي تقسيمها حسب نوع الأنزيم إلى أنزيمات أساسية (essential enzymes) وأنزيمات مستحثة (Inducers enzymes).

- الأنزيمات الأساسية: وهي الأنزيمات التي تنتج من قبل الكائن ألمجهري في حالة وجود أو عدم وجود المادة التي يعمل عليها الأنزيم.

- الأنزيمات المستحثة: وهي الأنزيمات التي تنتج فقط عند وجود المادة التي يعمل عليها الأنزيم في الوسط الغذائي , إذ تقوم الأحياء المجهرية بإنتاج تلك الأنزيمات عندما تحتاج إلى تحليل بعض المركبات المعقدة (التي يعمل عليها الأنزيم) في الوسط الغذائي لاستخدامه في تغذيتها والتي لاتتمكن من استعمالها عندما تكون في حالتها الأصلية (المعقدة).

والتقسيم الآخر تقسيم الأنزيمات هو حسب مكان إنتاج الأنزيم من الخلية وتقسم إلى أنزيمات داخل خليوية وأنزيمات خارج خليوية.

- الأنزيم الداخل خليوي: وهي الأنزيمات التي تؤدي عملها داخل خلية الكائن ألمجهري أي انه المادة الخاضعة يمكن أن تدخل إلى داخل خلية الكائن ألمجهري لكي تكون على تماس مع الأنزيم وعملية فصل الأنزيم يتطلب فصل الخلايا عن مكونات الوسط (يؤخذ الراسب ويهمل الراشح) وتجرى عملية تكسير لجدار الخلايا لغرض تحرير الأنزيم.

- الأنزيم الخارج خليوي: وهي الأنزيمات التي تفرز من الكائن ألمجهري إلى الوسط الغذائي لكي تقوم بتحليل المادة الخاضعة المعقدة والتي لايمكن أن تدخل إلى خلية الكائن ألمجهري بحالتها الأصلية . وفصل هذه الأنزيمات يتطلب فصل الخلايا عن مكونات الوسط حيث يؤخذ الراشح ويهمل الراسب ثم تجرى عملية فصل الأنزيم بالترسيب.

1- أنزيم الانيولينيز:

وهو من الأنزيمات المستحثة بوجود الانيولين (الانيولين: سكر متعدد متجانس يتكون من ارتباط عدة وحدات من الفركتوز) وهو من الأنزيمات المحللة للانيولين إلى فركتوز يمكن الحصول عليه من الأحياء المجهرية ويتميز بصفات فيزيائية وحيوية مميزة تشجع استخدامه في العديد من الصناعات الغذائية والصيدلانية مثل درجة الحرارة المثلى لعمله تكون مرتفعة نسبياً والثبات الحراري ومقاومته للظروف الحامضية نسبياً.

طريقة العمل لإنتاج الانيولينيز من العفن *A. niger*

- تحضير معلق سبورات العفن
- تحضير وسط إنتاج الأنزيم

توزن المكونات التالية وتذاب في لتر ماء مقطر (10 غم انيولين نقي أو أي مادة تحتوي في تركبها على الانيولين مثل التفاح الأرضي ، 5 غم ببتون ، 2 غم مستخلص خميرة ، 0،5 غم كبريتات المغنيسيوم ، 0،1 كاربونات الكالسيوم)

- يعدل الأس الهيدروجيني للوسط إلى 5,8 باستخدام NaoH أو 0,1 HCL ع
- التعقيم بجهاز الاوتوكليف.
- عملية الإنتاج: يضاف اللقاح إلى وسط الإنتاج بنسبة 1% ثم يحضن في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 28مº لمدة ثلاثة أيام.
- الكشف عن إنتاج الأنزيم (تقدير الفعالية): بعد انتهاء عملية التحضين يجب أن تجرى عملية الكشف عن الإنتاج وذلك بتقدير الفعالية الأنزيمية في السائل الناتج من عملية التخمر باستخدام كاشف Dinitrosalicylic acid 3,5 (DNS 3,5).
- فصل الأنزيم: بعد انتهاء عملية التحضين والتأكد من إنتاج الأنزيم تتم عملية فصل الأنزيم يتم قبل ذلك معرفة نوع الأنزيم هل هو خارج خليوي أم داخل خليوي لكي يتم تصميم عملية الفصل (يمكن معرفة ذلك من خلال تقدير الفعالية الأنزيمية في الراسب والراشح لتحديد موقع الأنزيم) بما انه الانيولينيز هو خارج خليوي فتتم عملية فصل الأنزيم بإحدى طرق الترشيح يؤخذ الراشح ويهمل الراسب ، ثم تجرى عملية فصل الأنزيم بالترسيب.
- ترسيب الأنزيم: يتم ترسيب الأنزيم باستعمال محلول كبريتات الامونيوم أو الأسيتون المبرد وذلك بمزج حجم معين من الراشح مع حجم معين من المحلول المرسب بنسبة 1:1,5 (مرسب:راشح) ويترك المزيج في حمام ثلجي لمدة ساعة واحدة ثم تجرى عملية طرد مركزي (4000 دورة/دقيقة/لمدة 15 دقيقة) ثم يؤخذ الراسب ويهمل الراشح.
- يذاب الراسب (البروتين) أو (الأنزيم) بكمية معينة من محلول منظم الخلات (Acetate buffer) ذات pH 4,5 ليكون جاهز للاستخدام.

2- أنزيم الكلوكواميليز:

وكذلك يسمى أنزيم امايلوكلوكوسيديز وهو من الأنزيمات المستحثة بوجود النشأ إذ يعمل هذا الأنزيم على تحويل النشأ إلى كلوكوز مباشرةً عن طريق فصل وحدات الكلوكوز من النهاية غير المختزلة لجزيئة النشأ.

يمكن الحصول على هذا الأنزيم من بعض الاعفان خاصة A. niger بطريقة المزارع المغمورة باستعمال وسط غذائي يحتوي على نسبة 10 – 20% مواد نشوية والتي تزود الكائن ألمجهري ببعض متطلبات النمو بالإضافة إلى استعمال مواد أخرى لدعم نمو الكائن ألمجهري بالعناصر الغذائية الضرورية.

عملية إنتاج أنزيم كلوكواميليز من عفن A. niger بطريقة المزارع المغمورة:

- تحضير لقاح معلق السبورات
- تحضير الوسط الغذائي: توزن المكونات التالية وتذاب في لتر ماء مقطر

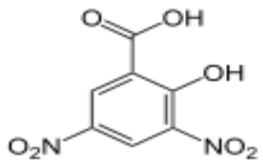
(10 غم نشأ , 5 غم ببتون , 2غم مستخلص خميرة , 0,5غم كبريتات المغنيسيوم)

- يعدل pH الوسط إلى 4,5 ثم يعقم بالاوتوكليف ويبرد
- يلقح الوسط بمعلق سبورات العفن.
- يحضن بدرجة حرارة 30مº لمدة 5 – 7 أيام مع الرج في حاضنة هزازة.
- بعد انتهاء التحضين تقدر الفعالية الأنزيمية باستخدام كاشف DNS 3,5
- ثم تجرى عملية فصل الأنزيم بإتباع الطريقة ذاتها في فصل أنزيم الانيولينيز.

تقدير الفعالية الأنزيمية:

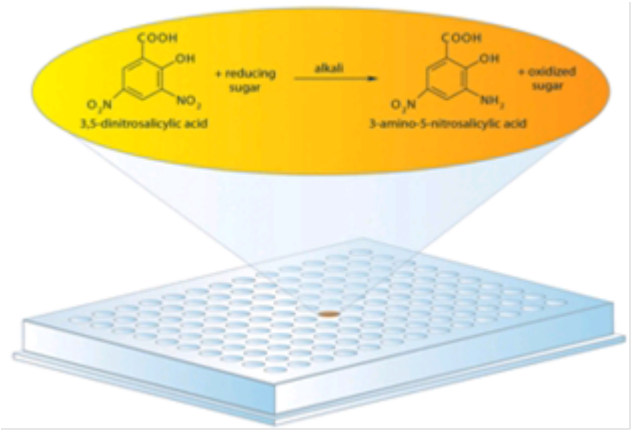
تعتبر عملية تقدير الفعالية الأنزيمية من الخطوات الرئيسية والأساسية في عملية إنتاج واستخدام الأنزيمات لأنه من خلال اختبار الفعالية الأنزيمية يمكن الحكم على درجة نشاط الأنزيم ونقاوته والكشف عن كميته من خلال حساب عدد الوحدات الأنزيمية الداخلة في التفاعل من خلال حساب كمية الناتج ، وتختلف طرق تقدير الفعالية الأنزيمية باختلاف الأنزيمات حيث هناك طريقة خاصة لتقدير الفعالية لكل مجموعة من مجاميع الأنزيمات وذلك حسب نوع الأنزيم والتفاعل الذي يشارك فيه.

(تركيب الكاشف Dinitrosalicylic acid 3,5)

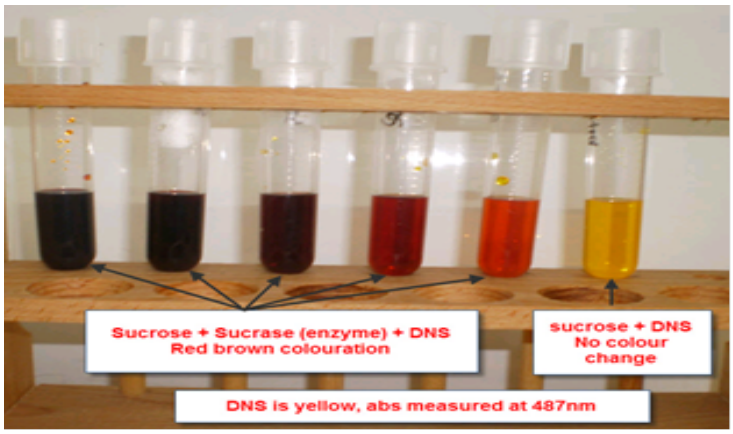


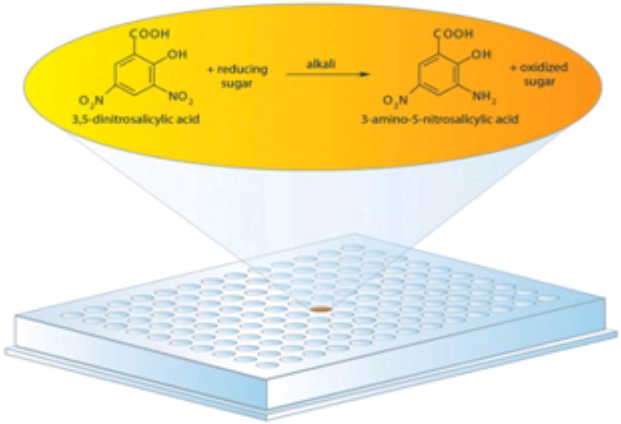
بالنسبة لقياس الفعالية الأنزيمية لأنزيمات الانيولينيز والكلوكواميلز واللذان ينسبان إلى مجموعة أنزيمات التحلل (Hydrolysis) وهي إحدى مجاميع الأنزيمات إذ يقومان بتحليل الانيولين والنشأ على التوالي من جزيئات معقدة غير مختزلة إلى سكريات مختزلة أحادية وهما الفركتوز والكلوكوز على التوالي ، تقاس الفعالية الأنزيمية لهذه الأنزيمات باستخدام كاشف Dinitrosalicylic acid 3,5 (DNS 3,5) تعتمد عملية قياس الفعالية الأنزيمية على قياس كمية السكريات المختزلة الناتجة من تحليل المواد الخاضعة المعقدة والتي تتفاعل مع الكاشف ليكون الناتج مركب معقد ذات لون احمر داكن شدته تتناسب طردياً مع تركيز السكر المختزل الناتج والذي يعتبر نتيجة لمدى نشاط وفعالية الأنزيم ، يقاس تركيز هذا اللون بجهاز المطياف (Spectrophotometer) على طول موجي 540 nm ، ليتم بعدها تحويل القراءة الناتجة إلى تركيز السكر الناتج من خلال المقارنة مع قراءات تعبير قياسي للسكر المطلوب والمحضر بتراكيز معلومة والتي تم قياسها بنفس الجهاز والطول الموجي.

(B) آلية حصول التفاعل



الصورة التالية توضح زيادة درجة اللون مع زيادة تركيز السكريات المختزلة في العينة بسبب زيادة تفاعلها مع الكاشف DNS





محاضرات التقنية الحيوية العملي
المرحلة الرابعة / قسم علوم الأغذية
مدرس المادة / طارق نواف خليل

إنتاج بروتين أحادي الخلية Single cell protein

انتاج بروتين احادي الخلية يمكن ان يطلق عليه انتاج الكتلة الحيوية وهي عبارة عن مصطلح عام يشمل انتاج خلايا الأحياء المجهرية الجافة والتي تتميز بارتفاع محتواها البروتيني فضلا عن احتوائها على نسب متباينة من المكونات الغذائية الاخرى مثل الكاربوهيدرات والفيتامينات والمعادن وغيرها والتي يتم إكثار خلاياها في عملية الإنتاج وتستخدم لغرض سد النقص الحاصل في البروتين الغذائي أما بإضافتها إلى عليقة الحيوان أو استخدام بعض أنواعها في تغذية الإنسان مثل الطحالب والأعفان والخمائر والعرهون والبكتريا ، ويتم إنتاجه بتنمية الكائن ألمجهري على مصادر رخيصة مثل عصير التمر أو مخلفات مصانع الورق، ويوجد اتجاه جديد لإنتاج البروتين أحادي الخلية بتنمية الكائن ألمجهري على الهيدروكاربونات حيث إنها متوفرة بنقاوة عالية مما يسهل من عملية استخلاص المنتوج وخلوه من الشوائب وفي حالة بقاء جزءاً منها في الوسط يسهل استخلاصه بالتبخير والتقطير واستخدامها مرة أخرى ، فهناك بعض الأحياء المجهرية لها القدرة على استخدام الميثانول كمصدر للكاربون مثل خميرة *Candida utilis* و *C. lipolytic* وكذلك مركبات هيدروكاربونية أخرى مثل البارافين وذلك باستخدام بكتريا Methylophillus وكذلك خميرة *S. cerevisia*
ان عملية انتاج بروتين احادي الخلية هي عملية انتاج مواد ايض اولية والتي تتضمن عملية انقسام الخلايا خلال الطور اللوغارتمي والتي تحتاج الى ظروف تهوية عالية.

مواصفات الاحياء المجهرية التى تستخدم فى انتاج بروتين احادي الخلية:

- تكون ذات معدل نمو مرتفع اي لها وقت جيل قصير
- امكانية استخدامها للاوساط الغذائية البسيطة
- تكون غير مرضية ولاتنتج سموم
- يكون تركيبها الكيميائي ملائم من حيث ارتفاع محتواها البروتيني وانخفاض محتوى الاحماض النووية RNA

اسباب الاتجاه الى انتاج بروتين احادي الخلية :

- تدعيم الاغذية الفقيرة بالبروتين والتعويض عن تدعيم الاغذية ببعض المواد المدعمة النباتية بسبب تذبذب انتاجها وارتباطها بالموسمية
- له مميزات اقتصادية من خلال انخفاض كلفة انتاجها واستخدام اوساط غذائية رخيصة في الانتاج والتخلص منها كمواد ملوثة للبيئة.

العملية الانتاجية :

- اختيار الكائن المجهري الملائم لعملية الانتاج
- تحديد الوسط الغذائي الملائم وطريقة التنمية
- اختيار المخمر (الجهاز الذي يتم فيه تنمية الكائن المجهري في الوسط الغذائي)

والذي يجب ان يكون ملائم للعملية الانتاجية والتي تكون هوائية اي يجب ان يحتوي المخمر على زعانف تقوم بتقليب الوسط الغذائي او تكون عملية التقليب من خلال ادخال هواء من اسفل المخمر.

انواع بروتين احادي الخلية (الاحياء المجهرية المستخدمة فى الانتاج) :

- البروتين البكتيري (البكتريا): تستعمل البكتريا في عملية الانتاج بصورة واسعة بسبب ارتفاع معدل نموها وامكانية استعمالها اوساط غذائية متعددة وارتفاع محتواها من البروتين (60 – 65%) ولكن يحد من استخدامها في الانتاج ارتفاع محتواه من الاحماض النووية RNA والذي يسبب ارتفاع نسبة حامض اليوريك في الانسان , ويجب الاهتمام بالتعقيم لان البكتريا تنمو في pH متعادل مما يسمح بنمو الاحياء المجهرية المرضية.
- بروتين الخمائر: ومن انواعها (*Saccharomyces* و *Candida*) الخمائر يكون معدل نموها ابطأ من البكتريا وتكون نسبة البروتين فيها 30 – 45% من ميزات الفطريات انها تنمو في pH 3.5 – 5 مما يحد من عملية التلوث ولها القدرة على استخدام مدى واسع من المصادر الكاربونية.
- بروتين الاعفان: معدل نمو الاعفان ابطأ من البكتريا والخمائر وتنمو على مدى واسع من ال pH (3-8) وبهذا المدى الواسع ممكن التعرض الى عامل التلوث بسبب امكانية نمو احياء مجهرية مرضية اما نسبة البروتين فتكون اقل من البكتريا والخمائر.

- بروتين الطحالب: ومن انواعها (*Spiruling* و *Scenedesmus*) وهي تقوم بعملية التركيب الضوئي ويمكن تنميتها في البرك وهي الطريقة الشائعة ولكن مشكلة التلوث والتأثر بالظروف المناخية تعد من المشاكل التي تواجه عملية الانتاج وكذلك ممكن تنميتها باستخدام الاوساط الغذائية كمية البروتين في الطحالب تصل الى 40%.

العوامل المؤثرة على عملية الانتاج:

- المصدر الكاربوني: يفضل استخدام الكاربوهيدرات ومشتقاتها مثل السكريات البسيطة والحرة (الكلوكوز , كالاكتوز , سكروز) وغيرها بالمقارنة مع استخدام مصادر كاربونية معقدة مرتبطة مثل السليلوز والتي تحتاج الى معاملات اولية قبل استخدامها كأوساط غذائية والتي تتميز بانها متوفرة على مدار السنة والمصادر الكاربونية الاخرى تشمل الهيدروكاربونات والميثانول والايثانول (الذي يتميز بسهولة ذوبانه في الماء وبعيد عن مخاطر الانفجار) وفضلات الصناعات الكيمياوية ولكن يجب الاهتمام بالناحية الاقتصادية.
- المصدر النيتروجيني: وتقسم الى نوعين مصادر عضوية مثل اليوريا وحامض اليوريك والنيتروجين والبروتين وفضلات معامل اللحوم اما المصادر النيتروجينية اللاعضوية مثل الامونيا واملاحها وتفضل المصادر النيتروجينية سهلة الاستهلاك ويفضل استخدام نسبة 1:10 (كاربون : نيتروجين) لانها تشجع نمو الخلايا وانتاج البروتين داخلها ولاتشجع تجمع الدهون ومشتقاتها وتفضل المصادر النيتروجينية اللاعضوية مثل الامونيا واملاحها بالمقارنة مع المصادر النيتروجينية العضوية والتي ترتفع فيها نسبة حامض اليوريك خاصة في انتاج البروتين للاستهلاك البشري بسبب عدم امتلاك الانسان للانزيم المؤكسد لحامض اليوريك بعكس الحيوانات.
- درجة الحرارة والتهوية والـ pH: (للبكتريا 6-7.5) ودرجة الحرارة للبكتريا (55-37م°) تكون هذه الظروف مختلفة حسب الكائن المجهري المستخدم في الانتاج اما الاوكسجين فيكون مهم جدا في عملية انتاج الكتلة الحيوية لانها تحتاج الى عملية اكسدة خلال الانقسام.

المواد الاولية المستخدمة في عملية الانتاج:

- الالكانات: تتميز بأنها (متوفرة واسعارها مناسبة وامكانية استخدامها من قبل عدد من الاحياء المجهرية) ومن سلبياتها (تحتاج الى عمليات تنقية كثير اثناء الاستخلاص بسبب تكون نكهة النفط في المنتوج وكذلك احتمالية وجود بعض المواد المسرطنة. ومن الامثلة على الالكانات (الميثان) :
- الميثان: ويتميز بسهولة التنقية والاستخلاص لانه مادة غازية, ومن سلبياته يحتاج الى عمليات تهوية شديدة للوصول الى اكسدة تامة من قبل الاحياء المجهرية وكذلك خطورة مزج الميثان مع الاوكسجين

بسبب تعرضه للانفجار ممايستلزم استخدام اوعية خاصة , وكذلك من سلبياته انه قليل الذوبان في الماء.

- الكحولات: الميثان يمكن تحويله الى ميثانول والذي يكون بدوره قابل للذوبان في الماء ويحتاج الى كميات اقل من الاوكسجين ومعدلات اقل من التبريد ولكن اسعاره مرتفعة نسبياً.
- الكاربوهيدرات: وتشمل بعض المخلفات النباتية والتي تحتوي على نسبة عالية من المواد القابلة للتخمر لكن بعض هذه المخلفات الزراعية والتي تحتوي على السليلوز تحتاج الى معاملات خاصة قبل استخدامها في عملية التخمر وذلك لتداخل السكريات مع المكونات الخشبية الاخرى مما يعيق عملية التخمر وهذه المعاملات قد تكون انزيمية او كيميائية
- من المصادر الكاربوهيدراتية المستخدمة (الشرش) وهو السائل المتخلف من صناعة الجبن والذي يتميز بارتفاع محتواه من سكر اللاكتوز ولكن يعاب على استخدامه هو محدودية الاحياء المجهرية التي تحلل اللاكتوز.
- من المصادر الكاربوهيدراتية (النشأ) هوسكر متعدد متجانس يتكون من ارتباط عدة وحدات من الكلوكوز.
- (ملاحظة: من الممكن استخدام بادئ مختلط من الاحياء المجهرية الأول يقوم بعملية التحلل وتكسير الجزيئات المعقدة الى ابسط والثاني يقوم بعملية الاستهلاك ويدخل في عملية الانتاج.

طريقة العمل لاستخدام خميرة *Candida utilis* في إنتاج بروتين أحاديات الخلية:

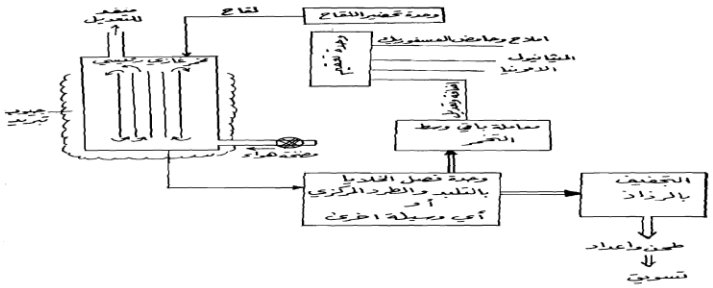
1- يوضع 100 مل من الوسط الغذائي التالي في دورق سعة 250 مل

- 5g\L مصدر سكري
- $(NH_4)HPO_4$ 2g\L
- 2g\L مستخلص خميرة
- 5g\L ببتون
- KH_2PO_4 2g\L
- $MgSO_4.7H_2O$ 1g\L

تذاب هذه المكونات في لتر واحد من الماء المقطر ثم يضبط الpH على 4.5 ويعقم بجهاز الاوتوكليف

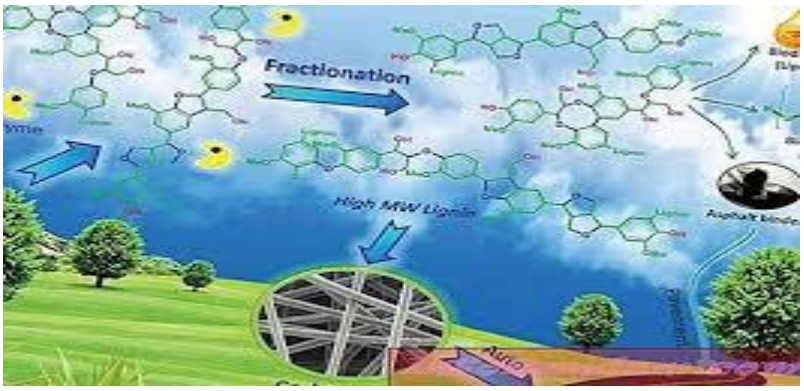
2- تحت ظروف التعقيم يضاف 1.5% ايثانول للدورق

3- يلقح الدورق بالخميرة وتحضن على درجة حرارة 30م° في الحضان الهزاز على سرعة 150 دورة/الدقيقة ولمدة 3 أيام
4- ترشح المزرعة خلال ورقة ترشيح وتجفف ويحسب الوزن الجاف



شكل ١٥ : ١ انتاج البوليمر من البكتريا *Methylophilus methylotrophus* باستعمال الايثانول .

محاضرات التقنية الحيوية العملي
المرحلة الرابعة قسم علوم الأغذية
مدرس المادة : طارق نواف خليل



تأثير المصدر الكاربوني على إنتاج الكتلة الحيوية ومنتجاتها:

يعد عنصر الكاربون من من العناصر الأساسية لنمو الكائن ألمجهري إذ يؤدي عملاً مزدوجاً في الخلية حيث يستخدم في عمليات بناء الخلية وإنتاج المركبات التي تنتجها الكائنات المجهرية حيث تصل نسبته إلى 50% من الوزن الجاف للخلية كما يعد عنصر طاقة مهم لنمو الكائن ألمجهري لذلك يعتبر احد العناصر الأساسية ضمن تركيب الوسط الغذائي ويجب أن يستخدم المصدر الكاربوني بنسب محددة ضمن تركيب الوسط الغذائي وهذه النسبة مرتبطة بنوع الكائن ألمجهري المستخدم ونوع المنتج المطلوب إذ قد يؤدي ارتفاع النسبة إلى تأثير كبحي على عمل الكائن ألمجهري. وتقسم الأحياء المجهرية إلى عدة أقسام اعتماداً على نوعية المصادر الكاربونية التي تستخدمها إلى:

- أحياء ذاتية التغذية وهي الأحياء التي يمكنها تثبيت ثاني اوكسيد الكاربون وتحتاج تلك الأحياء إلى طاقة لغرض التثبيت وتشمل الطحالب القادرة على البناء الضوئي.
- كائنات غير ذاتية التغذية وهي التي تستخدم الكاربون العضوي فقط ولا تمتلك الصبغات المتعلقة بالتثبيت الضوئي أو أنظمة تثبيت ثاني اوكسيد الكاربون وتتمثل بالخلايا الحيوانية والفطريات الابتدائية وبعض الطحالب ومعظم البكتريا. وهناك أحياء مجهرية قادرة على نوعي التغذية تسمى بمختلطة التغذية.

تختلف الأحياء المجهرية في مدى ونوعيات مصادر الكاربون التي تستطيع استهلاكها فالخلايا الحيوانية والنباتية تستطيع استهلاك عدد محدد من المصادر الكاربونية بالمقارنة مع الأحياء المجهرية والتي تستخدم العديد من المصادر الكاربونية خلال عمليات الإنتاج المختلفة في التقنية الحيوية ومن مختلف الأحياء المجهرية. يضاف مصدر الكاربون إلى الوسط الغذائي بشكلين:

أ- بإضافة مواد نقية تشمل:

- الهيدروكاربونات والتي يجب أن يكون عدد ذرات الكاربون في تركيبها C8 – C18 كونها غير ذائبة بالماء بعكس المركبات ذات عدد ذرات الكاربون الأقل من ذلك وذلك لتأثيرها السمي على الخلية كونها تذوب في الماء وتعمل كمذيب لأغلفة الخلية وبروتيناتها.
- زيت الغاز ممكن استعماله كمادة خاضعة ولكن يعاب على استخدامه انه 10% فقط من تركيبه مواد قابلة للتخمر والجزء الباقي يجب استرجاعه من وسط التخمر.
- السكريات الأحادية (الكلوكوز والفركتوز وغيرها) والسكريات الثنائية (السكروز والمالتوز وغيرها) والسكريات المتعددة والتي تكون جزيئاتها كبيرة وغير ذائبة في الماء وقد تكون بشكل محاليل غروية ويجب تحضيرها بشكل جيد قبل إضافتها للوسط الغذائي مثل النشأ وغيرها).
- الكحولات: تستخدم بشكل واسع كمصدر كاربوني وذلك لكونها متوفرة بنقاوة عالية ولا تترك مخلفات ويمكن إزالتها بسهولة من وسط التخمر متجانسة وذائبة في الماء , من أكثر الكحولات المستخدمة هي الايثانول والميثانول واللذان يتشابهان من حيث قابلية الذوبان في الماء ألا أن الايثانول مفضل في بعض الأحيان لان

الميثانول أكثر تطايراً وأكثر سمية, ويجب الاهتمام باستخدام درجات حرارة واطئة نسبياً عند استخدام الكحول وذلك لسرعة تبخرها.

ب- **مواد طبيعية والتي تكون غير نقية** : وهي عبارة عن نواتج عرضية لبعض الصناعات مثل الشرش و المولاس و نقيع الذرة والمستخلصات النباتية وغيرها والتي تعتبر مفضلة من الناحيتين الإنتاجية والاقتصادية إذ يوفر استخدام تلك المواد عدة ميزات منها:

- التخلص من تلك المواد باعتبارها مصدراً من مصادر تلوث البيئة واستخدامه في إنتاج منتجات مفيدة.
- تحتوي على مواد ضرورية لنمو الكائن ألمجهري مثل الفيتامينات والأملاح المعدنية والنيتروجين بالإضافة إلى مصدر الكاربون
- سهولة الحصول عليها ورخص أسعارها.

من تلك المواد المستخدمة ضمن الأوساط الغذائية كمصادر للكاربون:

المولاس: هو الناتج العرضي لصناعة السكر وهو سائل كثيف ذو لون غامق يحتوي على نسبة عالية من السكروز ولكنه فقير بالمواد النيتروجينية يعتبر وسط جيد للعديد من الأحياء المجهرية ولذلك يمكن استخدامه في العديد من الصناعات مثل خميرة الخبز والايثانول وبروتين أحادي الخلية وغيرها ولكنه يحتاج للعديد من التحضيرات قبل الاستخدام مثل التدعيم وتعديل الpH والكثافة وغيرها.

نقيع الذرة: ناتج عرضي لصناعة النشأ من الذرة الصفراء ويحتوي على كمية من السكريات المتعددة والبسيطة.

الشرش: عبارة عن السائل العرضي الناتج من صناعة الجبن بعد إزالة البروتين والدهن إذ يحتوي على لاكتوز بنسبة 70% .

الزيوت النباتية والحيوانية: هذه المواد تحتوي على طاقة تفوق الطاقة المخزونة في الكاربوهيدرات وإضافتها يؤدي أكثر من غرض كونها مواد مضادة للرغوة بالإضافة إلى كونها مصادر كاربونية لكن يعاب على الدهون كونها صلبة وتحتاج إلى درجات حرارة عالية نسبياً لتحويلها إلى سائلة. من تلك الزيوت هي زيت فول الصويا والكتان وزيت الزيتون.

العوامل المؤثرة على اختيار المصدر الكاربوني:

- نوعية المادة المطلوب إنتاجها
- قابلية المصدر الكاربوني على تحمل المعاملات الحرارية والتعقيم للوسط الغذائي وان لاتؤدي تلك المعاملات إلى تحوير في تركيب الوسط.
- متوفر وغير مكلف من الناحية الاقتصادية.

تأثير المصدر الكاربوني على إنتاج الكتلة الحيوية لخميرة الخبز: *Saccharomyces cerevisiae*

المواد وطريقة العمل:

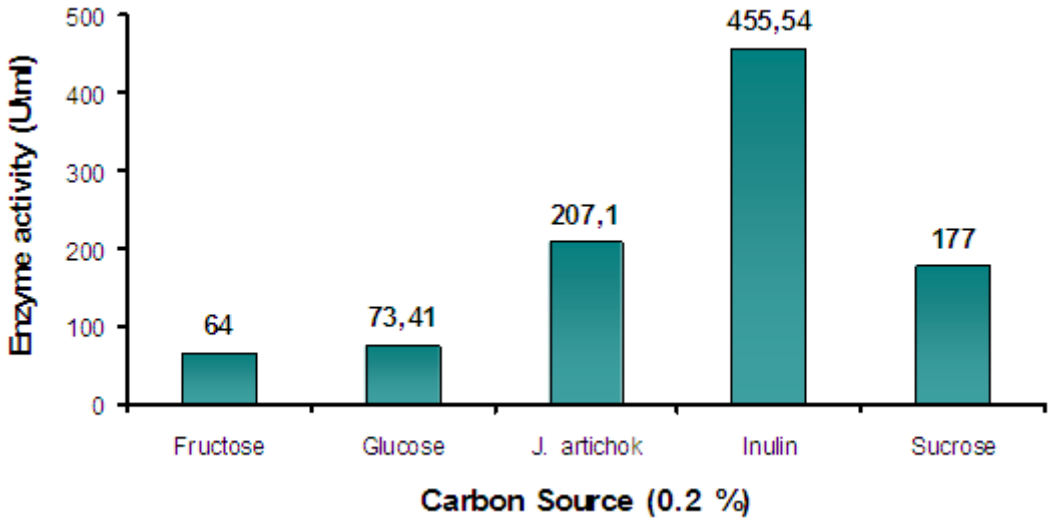
- تحضير مصادر كاربونية مختلفة مثل مالتوز , كلوكوز , فركتوز , شرش , سكروز
- تحضير وسط غذائي يتكون من : (نترات الأمونيوم 1غم , كبريتات الامونيوم 1غم , فوسفات الصوديوم الحامضية 4غم , فوسفات البوتاسيوم الحامضية 2غم , كلوريد الصوديوم 1غم . مستخلص خميرة 1غم + المصدر الكاربوني) تذاب في لتر ماء مقطر , ملاحظة (تحضر أوساط غذائية بعدد المصادر الكاربونية المختلفة بتشابه جميع المكونات ماعدا المصدر الكاربوني ويجب أن تثبت جميع الظروف المحيطة بالتجربة).
- يحضر لقاح الكائن ألمجهري (بإضافة 2غم خميرة إلى 100 مل محلول كلوريد الصوديوم 0,85%)
- تلقح جميع الفلاسكات الحاوية على الوسط الغذائي المعقم ب 1مل لقاح الخميرة.

ملاحظة: يجب أن يتلائم الكائن ألمجهري المستخدم مع تركيب الوسط الغذائي وذلك لعدم قدرة بعض الكائنات المجهرية على النمو في بعض الأوساط الغذائية لعدم قدرتها على إفراز الأنزيمات المحللة كما في حالة عدم استخدام خميرة الخبز مع الأوساط الغذائية الحاوية على الشرش لعدم امتلاكها أنزيم اللاكتيز بعكس خميرة *Kluyveromyces* وفي حالة عدم توفر الخميرة الثانية تستخدم الأولى لكن يضاف معها أنزيم اللاكتيز.

- تحضن الدوارق بدرجة حرارة 25 – 30مº لمدة 3 – 5 أيام في ظروف متشابهة.

- بعد انتهاء عملية التحضين يتم تقدير الكتلة الحيوية الناتجة على أساس الوزن الجاف ويلاحظ المصدر الكاربوني المفضل من قبل الكائن ألمجهري والذي أعطى أفضل إنتاجية.

(الشكل التالي يوضح كيفية التعبير عن نتائج تاثير المصدر الكاربوني على الانتاج)



شكل (1) يوضح تاثير المصدر الكاربوني على انتاج الانزيمات والذي يوضح افضلية الانيولين من قبل الكائن المجهري بسبب انتاجه كميات اكبر من الانزيم باستخدام الانيولين واقل المصادر المفضلة هو الفركتوز.

محاضرات التقنية الحيوية / العملي

المرحلة الرابعة / قسم علوم الأغذية مدرس المادة / طارق نواف خليل

المختبر الرابع: تخمرات حامض اللاكتيك:

حامض اللاكتيك : هو أحد الاحماض العضوية الكاربوكسيلية واسمه الكيميائي 2-hydroxypropionic acid وصيغته التركيبية $CH_3CHOHCOOH$ ويسمى أيضاً بحامض اللبنيك. تم اكتشافه عام 1780 من قبل العالم السويدي Scheele في اللبن الرائب (Yogurt).

وفي عام 1839 تمكن العالم Fremy من إنتاج هذا الحامض عن طريق تخمر بعض الكاربوهيرات مثل السكروز واللاكتوز والنشا والدكسترين. وكان يعتقد في البداية أنه من مركبات الحليب الأصلية ولكن بعد اكتشاف عمليات التخمر من قبل العالم لويس باستور عام 1857 تبين أنه ينتج من تخمر سكر الحليب بوساطة الأحياء المجهرية الموجودة فيه.

تم إدراج هذا الحامض كماده مأمونة الاستعمال من الناحية الصحيه عند استعماله كمادة مضافة إلى الغذاء (Generally Recognized As Safe, GRAS) من قبل منظمة الغذاء والدواء (Food and Drug Administration, FDA). يعد هذا الحامض أكثر الأحماض الكاربوكسيلية انتشاراً في الطبيعة.

يمكن انتاجه بالطريقة الكيميائية والحيوية والتي تكون مفضلة بسبب النقاوة العالية للمنتج, فضلا عن التلوث البيئي الناتج من عملية الانتاج الكيميائي للحامض كذك محدودية الموارد البتروكيميائية والتي تعد مواد اولية للانتاج.

هناك عدة مستويات في نقاوة الحامض الناتج مثل حامض عالي النقاوة الذي يستخدم للاغراض الصيدلانية والطبية والغذائية، وكذلك الناتج الاقل نقاوة الذي يحتوي على نسبة من الشوائب يستخدم للاغراض الصناعية.

وقد ازداد استهلاكه مؤخراً بسبب دوره الكبير في إنتاج العديد من المواد المهمة ومنها إنتاج حامض اللاكتيك المتعدد (المكوثر) (PLA) القابل للتحلل الحيوي وهو مادة ذات استعمالات متعددة, وحاليا يتم إنتاج معظم حامض اللاكتيك عن طريق عملية التخمر(باستخدام مزارع الاحياء المجهرية).

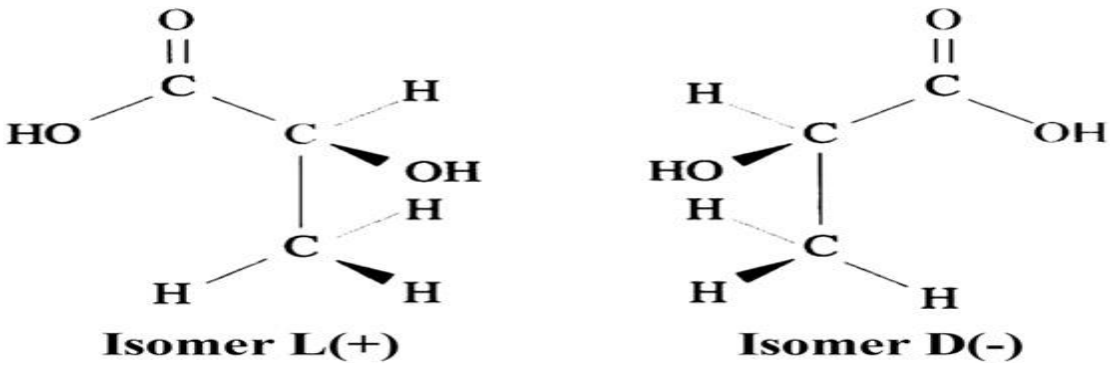
يوجد حامض اللاكتيك في الطبيعة في الاغذية المتخمرة مثل الالبان والخضراوات وغيرها ويوجد في الانسجة العضلية, ينتج الحامض من السكريات الموجودة في المادة الخاضعة مثل الكلوكوز وبتأثير بكتريا حامض اللاكتيك, والتي تضم مجموعة من البكتريا العصوية مثل *Lactobacillus bervis* و *Lactobacillus plantarum* وكذلك بكتريا كروية الشكل مثل *Leuconostoc mesenteroides*

الية انتاج الحامض بتحول السكريات الموجودة في المادة الخاضعة بفعل الاحياء المجهرية الى حامض البايروفيك والذي بدوره يتحول (يختزل) خلال مسار EMP ويتحول الى حامض اللاكتيك ينتج الحامض بصيغتين L و D بسبب امكانية الاحياء المجهرية على انتاج نوعين من الانزيمات المحللة (lactatedehydrogenase) والتي يمكن تنتج الحامض وفق المعادلة التالية:

$$CH3COCOOH\ (pyruvic) + NADH \rightarrow NAD + CH3CHOHCOOH\ (lactic\ acid)$$

- **صفات الحامض:**

تعتمد الصفات الفيزياوية للحامض على نوع النظير الضوئي (D , L) وبصورة عامة الحامض عديم اللون والرائحة، سائل ثقيل قابل للامتزاج بالماء والكحول و الايثر ولا يذ وب في الكلوروفورم وهو حامض ضعيف التفكك قليل التطاير ، لا يتبلور من المحلول كالأحماض الأخرى ،غالبية أملاحه قابلة للذوبان في الماء وقابل للبلمرة



صيغة L و D لحامض اللاكتيك

استعمالات حامض اللاكتيك:

هناك أربعة مجالات رئيسية لاستعمالات حامض اللاكتيك هي الغذاء ومستحضرات التجميل والمستحضرات الصيدلانية والتطبيقات الكيميائية. يستعمل حوالي 35% من الحامض المنتج في مجال التصنيع الغذائي
لحامض اللاكتيك العديد من التطبيقات في الصناعات الطبية والدوائية إذ يدخل هذا الحامض في صناعة مستحضرات التجميل (Cosmetics) وفي مواد تنظيف وترطيب البشرة إضافةً إلى تأثيره المضاد للمكروبات وفعاليته الملحوظه في تفتيح البشرة, ويرتبط تاثير الترطيب مباشرة بقدرة اللاكتات على الاحتفاظ بالماء. يعود سبب قدرة حامض اللاكتيك على المحافظة على البشرة إلى منع تكوين بعض المواد المسببة لاسمرار الجلد والتي تتخلق بصورة طبيعية في جسم الانسان. تستعمل لاكتات الأثيل (Ethyl lactate) في العديد من مستحضرات علاج حب الشباب لقدرته الجيدة في سحب الزيوت وبقع المواد المعقدة الأخرى دون أي تأثير سمي, وبالنظر لامكانية توفير هذا الحامض بنقاوة عالية تصل إلى 98% فإن هذا الحامض يدخل في صناعة الأدوية الخاصة بهشاشة العظام.

أنواع تخمرات حامض اللاكتيك:

التخمر البسيط:

ويسمى أيضاً بالتخمر المتجانس.. Homofermentation حيث تتحول السكريات إلى حامض لاكتيك بفعل بعض أنواع البكتريا مثل Lactobacilli و Streptococci

تخمر مختلط:

ينتج حامض اللاكتيك مختلطاً مع حامض الخليك والايثانول و CO_2 وأحياناً الجليسرول وتقوم بهذا التخمر بكتريا *Escherichia coli*.وبعض أنواع البكتريا المعوية الأخرى (Entericbacteria).

- **بعض طرق انتاج حامض اللاكتيك:**

من الممكن الحصول على حامض اللاكتيك بتخمر اللهانة الطازجة حيث تتكون حموضة نتيجة لتكون حامض اللاكتيك من السكريات الطبيعية الموجودة في أوراق اللهانة بفعل الاحياء المجهرية (بكتريا حامض اللاكتيك) والموجودة بصورة طبيعة على أوراق اللهانة وهي التي تعطي النكهة الخاصة لمنتوج اللهانة المتخمرة. يضاف الملح الى اللهانة اثناء عملية التخمر المتخمرة لأنه يعمل على سحب عصارة أنسجة اللهانة إلى الخارج وتكوين محلول ملحي سكري يشجع نمو بكتريا حامض اللاكتيك.
تعتبر اللهانة الحمراء أكثر حلاوة من اللهانة الخضراء وبذلك يمكن أن تنتج حاض لاكتيك أكثر بسبب احتوائها على محتوى عالي من السكريات القابلة للتخمر بفعل الأحياء المجهرية.

طريقة العمل لانتاج حامض اللاكتيك من اوراق اللهانة:

- تغسل اللهانة وتزال الأوراق الخارجية ويقسم رأس اللهانة إلى نصفين ويزال الساق
- تقطع الأوراق إلى قطع صغيرة بحجم 1 سم ويوزن 100 غم منها ثم يوزن 3 غم من ملح الطعام
- تمزج اللهانة المفرومة مع الملح وتعبأ في قناني زجاجية مناسبة ويضاف لها كمية من الماء المعقم وتكبس
- توضع قطعة خشبية أو زجاجية في الأعلى وتضغط اللهانة إلى أن يخرج بعض من السائل إلى الأعلى
- تسحب كمية من السائل باستخدام ماصة ويقاس ال pH لتتبع تطور نمو بكتريا حامض اللاكتيك
- تغطى الزجاجة أو قنينة الكبس بغطاء زجاجي أو ورق ألمنيوم وتخزن لمدة 3 أسابيع
- يتم فحص الطعم والرائحة والقوام وال pH اسبوعياً لنلاحظ التالي:

طعم حامضي ، رائحة تخمرية ، (تلوث) لزجة بسبب دخول بكتريا محللة للسليلوز والنشأ والبروتين ، قوام لين ، (تلوث) رائحة حارة ، (تلوث) طعم حار، انخفاض قراءة ال pH أسبوعيا.

- خذ قطرة من السائل المتخمر وقم بتحضير شريحة وافحصها تحت المجهر بطريقة التحضير الرطب وذلك بوضع قطرة على شريحة مع قطرة من صبغة ازرق المثيلين ثم نضع غطاء الشريحة وتفحص تحت المجهر بقوة تكبير 40X.

- **الطريقة الاخرى لانتاج حامض اللاكتيك هي باستخدام مزارع الاحياء المجهرية وتنميتها على الاوساط الغذائية:**

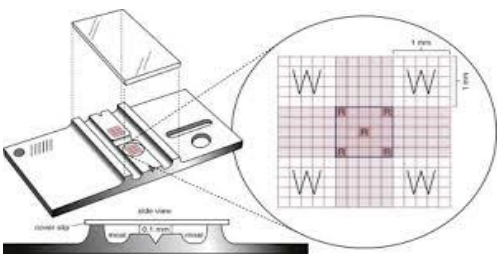
يمكن انتاج حامض اللاكتيك باستخدام انواع مختلفة من الاحياء المجهرية ومن هذه الاحياء المجهرية الفطر Rhizopus Oryzae باستعمال طريقة المزارع المغمورة وبطريقة الوجبات وبظروف هوائية. وكذلك يمكن استخدام بكتريا *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* بتنميتها على المولاس الناتج من صناعة السكر حيث اظهرت نتائج الدراسات بان المولاس بتركيز 12 و 18 % وسط تخمير مناسب لإنتاج حامض اللاكتيك الخام لاحتوائه على نسبة مرتفعة من مادة التفاعل (السكريات) والمركبات النيتروجينية وغير النيتروجينية إضافة لاحتوائه على العديد من الفيتامينات والأملاح الضرورية لنمو البكتيريا مثل الرايبوفلافين وحامض البانتوثينك والنياسين والبايوتين ومركبات الفسفور العضوية واملاح الكالسيوم والمغنيسيوم والحديد ولكن يجب المحافظة على تركيز المولاس ضمن الحدود المسموح بها وعدم زيادة تركيزه وذلك لصعوبة استخلاص حامض اللاكتيك من وسط التخمير بسبب زيادة لزوجة الوسط وصعوبة قصر لون سائل التخمير

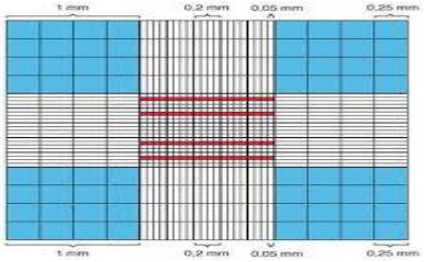
- **مواد وطرق العمل لانتاج حامض اللاكتيك باستخدام الفطر Rhizopus Oryzae بالمزارع المغمورة:**

1- مزرعة الفطر المطلوب استخدامه حيث يتم استخدام سلالة منتخبة لها القدرة على انتاج الحامض , ويتم تنشيطها باستخدام وسط PDA

2- تحضير اللقاح : يتم استخدام الابواغ الفطرية في عملية الانتاج والتي يتم الحصول عليها بتنمية المزرعة الاصلية في فلاسكات زجاجية تحتوي على وسط غذائي PDA المعقم وتتم عملية التحضين في درجة حاضنة بدرجة حرارة 30م لمدة 7 ايام , بعد اكتمال عملية التحضين يتم عزل الابواغ باضافة كمية مناسبة من الماء المقطر المعقم الى الدورق مع التحريك بعناية لاطلاق الابواغ الفطرية ثم الترشيح من خلال القطن الموضوع في قمع والذي تم تعقيمهم مسبقاً , ليتم بعدها حساب عدد الابواغ الناتجة باستخدام شريحة زجاجية تسمى Hemocytometer , يتم حفظ الابواغ في الماء المعقم بالتبريد لحين الاستخدام.

(شكل توضيحي لشريحة Hemocytometer)





3- تحضير الوسط الغذائي الخاص بالانتاج والذي يتكون من المكونات التالية :

المادة	التركيز (غم / لتر ماء مقطر pH = 7)
كلوكوز	15
$MgSO_4.7H_2O$	0.025
NH_4NO_3	0.05
KH_2PO_4	0.03
$ZnSO_4.5H_2O$	0.004
CaCO3	5

يوزع الوسط الغذائي في دوارق سعة 250 مل وبواقع 100 مل لكل دورق ثم تعقم بجهاز الاوتوكليف بحرارة 121م لمدة 15 دقيقة. بعد انتهاء التعقيم وتبريد الوسط الغذائي يتم تلقيحه باللقاح الخاص بالانتاج (الابواغ) وبواقع 10 ^{6} بوغ / مل ويحضن في حاضنة بدرجة حرارة 30م لمدة اسبوع.

4- الكشف عن حامض اللاكتيك الناتج:

يتم فصل الكتلة الحيوية (الرواسب واجزاء الخلايا) بطريقة الترشيح باستخدام ورق ترشيح نوع Whattman رقم 1 , ثم يؤخذ الراشح وتقدر حموضته بطريقة التسحيح وتحتسب كحامض لاكتيك وتتم عملية التسحيح كمايلي:

- ناخذ 10 مل راشح المزرعة يضاق له عدة قطرات من دليل الفينول فثالين تركيزه 1% ثم التسحيح مع قاعدة NaOH 0.1 عياري الى ان يظهر اللون الوردي ثم تحسب كمية القاعدة المستهلكة لتغيير اللون وتتم الحسابات كما يلي:
- الحموضة (%حامض اللاكتيك) = حجم NaOH المستهلك × العيارية × الوزن الملي مكافئ للحامض

حجم العينة × 100

- كذلك ممكن تقدير تطور العملية الانتاجية بقياس الاس الهيدروجيني (pH) بجهاز pH-meter وملاحظة انخفاض الحموضة بزيادة تكون الحامض.
- التقدير الكمي للحامض الناتج باستخدام جهازHPLC (high performance presureliquidchromotogrphy)

يمكن تعريف هذه التقنية بانها احدى طرق تقدير الاحماض العضوية بالكروماتوكرافي والذي يسمى هنا بكروماتوكرافي الاداء العالي او الضغط العالي ويتكون هذا الجهاز من طورين اساسيين هما الطور الثابت و الطور المتحرك وكذلك يتالف من عدة اجزاء والتي تشمل وحدة المذيبات (الطور المتحرك) وغرفة الحقن وعمود الفصل (الطور الثابت) والكاشف الضوئي والمضخة التي تدفع العينة خلال الجهاز, ويعتمد الاساس العلمي للتقدير بهذا الجهاز على توزيع العينة نفسها بين الطورين الثابت والمتحرك ومدة بقائها في احدهما مما يؤدي الى تكون منحنى يعطي فكرة عن تركيز العينة.

وتكون متطلبات تقدير الحامض بهذا الجهاز هي الظروف التالية:

نوع العمود C18 ,, الطور المتحرك مزج محلول منظم 12 % واستونايترل 88% ,, الامتصاص الضوئي 220 نانوميتر ,, ومعدل الجريان 1مل / دقيقة ودرجة الحرارة 35م ,, والكمية المحقونة 20 مايكروليتر

المختبر الخامس عشر / تقييد الخلايا والأنزيمات

تعرف عملية ثبيت الخلايا بأنها طريقة ربط الخلايا والأنزيمات مع مادة غير قابلة للذوبان في الماء بطريقة لاتسمح بانتشارها في الوسط الغذائي وتسمح بسهولة فصلها بعد انتهاء العملية الإنتاجية.

طرق التثبيت: تستخدم طرق كيميائية وفيزيائية لتثبيت الخلايا وتشمل:

- ربط الخلايا على سطح مادة غير قابلة للذوبان في الماء إما بطريقة الادمصاص بآصرة أيونية وهيدروجينية بين سطح الخلية والمادة المدعمة ويعتمد الارتباط على طبيعة الشحنة الموجودة على جدار الخلية وتعد هذه الطريقة غير قاسية بسبب طبيعة الآصرة المسؤولة عن الارتباط ونتيجة لهذا الارتباط الضعيف قد يحدث تسرب (فك ارتباط) للخلايا المقيدة من المادة المدعمة وهذه الظاهرة تعد ذات فائدة بسبب إمكانية تجديد النظام بخلايا أكثر فعالية. وتتحدد ثباتية الطريقة بمعدل ادمصاص الخلايا من قبل المادة المدعمة. من المواد التي تستخدم في هذه الطريقة نشارة الخشب والزجاج.
- الربط التساهمي إلى مادة صلبة: في هذه الطريقة يكون الربط من خلال المجاميع الفعالة الموجودة على سطح الخلية مثل COOH و OH عملية الارتباط في هذه الطريقة تكون أكثر كفاءة نتيجة لطبيعة الارتباط ويكون التسرب اقل من سلبيات هذه الطريقة احتمال ارتباط الأنزيمات من جهة الموقع الفعال. من المواد المستخدمة كمواد مدعمة هي السيراميك والنايلون.
- الحجز داخل مادة هلامية مسامية لاتسمح بنفاذ الخلية لكن تسمح بنفاذ المادة الخاضعة او الوسط الغذائي ونواتج التفاعل وتكون خاملة من الناحية الكيموحيوية (لاتتفاعل مع الخلية المقيدة) يجري فيها تقييد الخلايا بصورة فيزيائية بدون أواصر بحيث لايتأثر الموقع الفعال خاصة للأنزيمات وهذه الطريقة تكون غير ملائمة في حالة استخدام المواد الخاضعة (الأوساط الغذائية) ذات الأوزان الجزيئية العالية لعدم تمكنها من الدخول من خلال فتحات الهلام وملامستها للخلية او الأنزيم. من المواد التي تستخدم للتقييد في هذه الطريقة هي هلام الجينات الصوديوم او الكالسيوم وهلام الاكريلامايد المتعدد. توجد هناك طرق تقييد أخرى ممكن أن تستخدم.

تعد عملية التقييد من التقنيات المهمة والمستخدمة بشكل واسع في العديد من المجالات الصناعية و المختبرية نظراً لما تتميز به هذه الطريقة من فوائد مقارنة باستخدام الخلايا بالشكل الحر مثل:

- إمكانية استخدام الأنزيمات والخلايا (اللقاح) لأكثر من مرة وذلك يعود لإمكانية فصل واسترجاع تلك الخلايا من وسط التفاعل بعدة طرق مثل الترشيح والطرد المركزي مقارنة بالخلايا الحرة والتي تستخدم مرة واحدة وذلك لانتشاره في الوسط الغذائي او وسط التفاعل.
- استخدام مواد مدعمة رخيصة وتعتبر من ملوثات البيئة.
- السيطرة الدقيقة على التفاعل.
- إمكانية إجراء الطريقة المستمرة في الإنتاج والتي لها فوائد اقتصادية بالمقارنة مع الوجبات.
- سهولة عملية فصل المنتوج.
- زيادة ثباتية الأنزيمات المقيدة بسبب توفير الغطاء من المادة الساندة وارتفاع درجة الحرارة والأس الهيدروجيني الأمثل لعمل هذه الأنزيمات.

طريقة العمل لتقييد الأنزيمات بطريقة الحج في هلام الجينات الصوديوم:

تجري العملية بمزج محلول الخلايا مع محلول الهلام قبل وصوله إلى مرحلة التهلم بعدها يتم تحويل المزيج إلى هلام بإضافة مادة كيميائية او بتغيير درجة الحرارة. وتتم العملية كمايلي:

- تحضير محلول الهلام
- تخضير محلول الخلايا
- مزج حجم معين من كل من المحلولين
- يحضر محلول كلوريد الكالسيوم حيث يساعد على تحويل محلول الجينات الصوديوم إلى هلام.

- بواسطة أنبوبة زجاجية (سرنجة) يتم سحب المزيج ويقطر على شكل كرات داخل الإناء الذي يحتوي على كلوريد الكالسيوم ويترك لمدة 10 – 15 دقيقة في درجة حرارة 25م° لتحولها إلى كرات هلامية.
- تجري عملية الترشيح لفصل الكرات الهلامية وتقاس الفعالية الأنزيمية في الكرات لتحديد كفاء التقييد.
- توضع الكرات في عمود زجاجي وتحفظ بالتبريد لحين الاستعمال.

تقييد الخلايا بالادمصاص على نشارة الخشب:

- تحضير محلول الخلايا
- تحضير نشارة الخشب والتي تكون ذات أحجام مناسبة ومتساوية من ناحية المساحة السطحية وتغسل لأكثر من مرة بالماء المقطر أو المحلول المنظم.
- مزج حجم معين من محلول الخلايا مع كمية مناسبة من نشارة الخشب حتى نحصل على معلق.
- يترك المزيج بدرجة حرارة 25م° لمدة نصف ساعة ثم يسكب المحلول الفائض وتقاس الفعالية الأنزيمية في النشارة لتحديد كفاءة التقييد.
- يتم حفظ النشارة المثبت عليها الخلايا في عمود زجاجي وتحفظ بالتبريد لحين الاستخدام.

ملاحظة: (المقصود بمحلول الخلايا أما محلول خلايا أحياء مجهريه أو محلول أنزيمي).

تقنية حيوية / عملي **مدرس المادة**
المرحلة الرابعة / قسم علوم لأغذية **طارق نواف خليل**

المختبر السابع إنتاج حامض الستريك:

حامض الستريك هو حامض ثلاثي الكاربوكسيل لاحتوائه على ثلاث مجاميع كاربوكسيل في تركيبه وصيغته ألجزيئيه (CH2COOHCOHCOOHCH2COOH) كان المصدر الرئيسي له على النطاق التجاري عصير الليمون إلى بداية العشرينات من القرن الماضي إذ تم تطوير طريقة لإنتاجه من الأحياء المجهرية , تعتبر عملية إنتاج حامض الستريك من الصناعات الستراتيجية في مجال التقنية الحيوية حيث انه يدخل في العديد من الصناعات مثل الغذائية مثل مادة نكهة للمشروبات الغازية وعصير الفواكه والمربيات والدوائية كمذيب وفي مستحضرات التجميل والصناعات الكيميائية مثل دباغة الجلود وصناعة النسيج والأحبار وإزالة الصدأ وغيرها في العديد من الصناعات , تعدد أغراض واستخدامات حامض الستريك جعلت هذه الصناعة من الصناعات المهمة في مجال التقنية الحيوية.

الظروف المزرعية لإنتاج حامض الستريك:

تختلف الظروف المزرعية حسب السلالة المستخدمة وطريقة الإنتاج , الاحتياجات الرئيسية لوسط الإنتاج في عملية التخمر هي مصدر الكاربون والنيتروجين والفوسفات والمغنيسيوم بالإضافة إلى الpH والتي تختلف حسب نوع الوسط إذ تكون بين 5-6 للوسط الذي يحتوي على المولاس والذي له دور في تسهيل إنبات السبورات وتسهيل عملية النمو , بينما تكون 2-3 للوسط الذي يحتوي على السكروز أو الكلوكوز.

هناك بعض المواد المدعمة التي تضاف إلى الوسط الغذائي لتشجيع عملية الإنتاج مثل الميثانول والذي يضاف بنسبة 3-4% وفائدته هي تقليل نمو المايسيليوم ويؤخر تكوين السبورات وبالتالي زيادة كمية الحامض وكذلك له دور في تكييف الكائن ألمجهري حيث يزيد من نفاذية جدار الخلية للحامض دون أن يضعف عملية الايض وبذلك يسمح بإفراز السترات من الخلية. ولدرجة الحرارة دور مهم في عملية الإنتاج إذ تكون بين 25-30م° ويؤدي ارتفاع درجة الحرارة إلى أكثر من ذلك إلى الإسراع من عملية التنفس والتخمر ويحدث نمو للخلايا بشكل كبير مما يسبب تأكسد كمية من السكر والذي يتحول إلى CO_2 مما يقلل كمية الحامض الناتج.

وتعد عملية التهوية من العوامل المهمة من عوامل الإنتاج إذ تعد عملية إنتاج حامض الستريك عملية هوائية وتتوقف العملية في حال التوقف بتجهيز الأوكسجين , وتختلف متطلبات المزرعة للتهوية حسب طريقة الإنتاج إذ تكون اقل مايكون عند استخدام المزارع السطحية بسبب زيادة المساحة السطحية المعرضة للتهوية , وتكون المتطلبات أكثر بقليل في حالة المزارع الصلبة والتي تكون حبيبية الشكل مما تسمح بتواجد الأوكسجين في المسافات البينية الموجودة بين الحبيبات المكونة للوسط , بينما تكون المتطلبات في أقصاها وتحتاج إلى معدات تهوية وتقليب عند استخدام المزارع المغمورة.

مراحل إنتاج حامض الستريك باستخدام لقاح سبورات العفن *A. niger* :

1- **تحضير خزانات التخمر**:

يتم غسل خزانات التحضير بواسطة محلول الديتول في الماء بتركيز 2% ، ويتم التعقيم بواسطة مزيج من لتر واحد الفورمالين مع 100 غرام برمنجنات البوتاسيوم عند درجة 50م° لمدة يومين ثم يتم التخلص من بخار الفورمالين باستعمال هيدروكسيد الأمونيوم ، بعدها يتم تشغيل دورة الهواء مع ضبط درجة الحرارة عند 45م°.

2- تحضير لقاح سبورات العفن.

3- تحضير الوسط الغذائي:

أ- مكونات الوسط الغذائي تشمل:

السكروز 140 غم , KH_2PO_4 2,5 غم , $MgSO_4.7H_2O$ 0,25 غم , NH_4NO_3 2.23 غم , أو $(NH_4)_2CO_3$ 2,5 غم ويمكن الاستعاضة عن السكروز بالمولاس أو الدبس الحاوي على 14% سكر (تذاب المكونات أعلاه في لتر ماء مقطر).

ب- يضبط الpH إلى 2-3 أو 5-6 حسب المصدر الكاربوني المستخدم.

ج- تعقيم الوسط بجهاز الاوتوكليف بدرجة حرارة 121م° وضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة.

د- تبريد الوسط والتلقيح بمعلق السبورات بتركيز 2% أو بإضافة معلق سبورات في Tween80 0,8% .

هـ- التحضين بدرجة حرارة 28م° لمدة أسبوع في حضان هزاز للمزارع المغمورة أو محضن عادي للمزارع السطحية.

و- بعد انتهاء فترة التحضين يتم الكشف عن إنتاج الحامض وذلك بترشيح المزرعة خلال ورق ترشيح ويقدر ال pH في الراشح كما تقدر الحموضة الكلية كحامض ستريك وذلك بتسحيح 5 مل من الراشح مع محلول 0.1 N هيدروكسيد الصوديوم وباستعمال دليل الفينول فثالين , ويمكن حساب كمية الحامض من خلال العلاقة التالية :

1مل هيدروكسيد الصوديوم (1عياري) = 0,007 غم حامض ستريك

تحسب كمية الحامض على أساس ملغم حامض / 1 مل راشح.

(ملاحظة: للحصول على 14% سكر من الدبس يمزج 22 غم من الدبس مع 78 ماء).

فصل حامض الستريك:

1 - فصل الفطر والرواسب بعد التخمير

بعد عملية التخمير يتم فصل سائل التخمر من نموات الفطر بواسطة الترشيح ، حيث يتم غسيل الفطر بالماء ، ويضاف إلي السائل التخميري .

2- الترسيب

يتم ترسيب حامض الستريك الناتج من عملية التخمير علي هيئة سترات الكالسيوم الغير قابلة لذوبان بإضافة مستحلب من هيدروكسيد الكالسيوم 25% أو كسيد كالسيوم في الماء إلي السائل المتخمر بعد رفع درجة حرارته إلي 80-85مº بواسطة البخار مع التقليب المستمر حتى يصل المحلول إلي أس هيدروجيني 6-7 .

3- فصل سترات الكالسيوم

بعد انتهاء عملية الترسيب تفصل سترات الكالسيوم بواسطة الطرد المركزي أو الترشيح، ثم يتم غسيل سترات الكالسيوم بالماء البارد علي أن تحتوي حوالي 10% رطوبة.

4- استرجاع الحامض من سترات الكالسيوم

يتم عمل معلق من سترات الكالسيوم في الماء (30%) ثم يضاف حامض الكبريتيك المركز ببطء شديد مع التقليب المستمر مع مراقبة الأس الهيدروجيني لوسط التفاعل حتى يصل 1.1 مع ملاحظة عدم رفع درجة الحرارة أكثر من (30-35ºم).

5- فصل محلول حامض الستريك من كبريتات الكالسيوم

يفصل محلول حامض الستريك من كبريتات الكالسيوم (الجبس) بواسطة الترشيح بعد غسلها لاسترجاع محلول الحامض المتبقي ويضاف ماء الغسيل إلي المحلول الأصلي .

6- تنقية محلول حامض الستريك

يمرر محلول حامض الستريك الناتج علي عمود من الكربون النشط لإزالة اللون حتي يتم الحصول علي محلول عديم اللون ، ثم بعد ذلك يمرر المحلول علي عمود من المبادل الايوني للتخلص من الايونات .

7- البلورة

وتتم بواسطة أربعة معدات هي علي التوالي :

أ – المبخر تحت تفريغ لمحلول حامض الستريك ويتم التسخين بواسطة بخار ماء من المرجل البخاري يمر خلال انابيب التسخين .

ب – المبلور ويقوم بفصل بلورات حامض الستريك

ج – جهاز الطرد المركزي ويقوم بفصل السوائل من البلورات

د – المجفف ويقوم بتجفيف البلورات عن طريق هواء ساخن عند درجة 40مº ليتم في النهاية الحصول علي حامض الستريك المتبلور.

محاضرات التقنية الحيوية العملي
المرحلة الرابعة قسم علوم الأغذية
مدرس المادة : طارق نواف خليل

تخمرات الحالة الصلبة :

وهي التخمرات التي تجري باستخدام مواد خاضعة (أوساط غذائية) صلبة تحتوي على نسبة رطوبة لاتقل عن 12% بغياب الماء الحر ويعتمد الحد الأعلى لنسبة الرطوبة قبل ظهور الماء الحر في الأوساط الغذائية على قابلية امتصاص المادة الصلبة للماء وبذلك تعتمد على نوع الوسط الغذائي. ويتضح من ذلك أن الأحياء المجهرية السائد استخدامها هي التي لاتفضل نشاط مائي مرتفع أي اقل من 0,7
ويعتبر الجانب الاقتصادي من أولويات استخدام هذه التخمرات. من تلك المواد التي تستخدم كمواد خاضعة نخالة الحنطة والقش والخشب والحبوب والبقوليات. أن من أهم الفروقات مابين تخمرات الحالة الصلبة والحالة السائلة هو:

- المواد الغذائية في الأوساط السائلة تكون في حالة تناقص أما في الصلبة فبعض الأحيان تكون في حالة تناقص أما في الأغلب فإنها تكون ثابتة أو في ازدياد بسبب عمليات التحلل من قبل الكائن ألمجهري.
- في الأوساط الصلبة تكون المواد الغذائية غير متاحة في بداية عملية التخمر لذلك يجب إجراء معاملات أولية على تلك المواد لغرض توفير المواد الغذائية وجعلها متاحة للأحياء المجهرية وكذلك لتقليص حجم الجزيئات وزيادة المساحة السطحية المعرضة منها لعمليات التحلل من قبل الأحياء المجهرية. من تلك المعاملات الأولية: (الطحن , معاملة المواد السليلوزية بالمواد الكيمياوية , غلي المواد البروتينية مثل الكولاجين بدرجات حرارية عالية تحت ضغط لغرض تكسر الأواصر الببتيدية وتحولها إلى هلام , عمليات النقع كما في حالة استخدام المواد النشوية).

العوامل المؤثرة على تخمرات الحالة الصلبة:

1- نوع الكائن ألمجهري المستخدم: حيث تفضل دائما الفطريات والخمائر والبكتريا الموجبة لصبغة كرام لأنها تنتج أنزيمات مستحثة وخارج خلوية بعكس البكتريا السالبة لصبغة كرام فإنها تميل للاحتفاظ بأنزيماتها داخل الخلية وقد يعود ذلك إلى طبيعة البيئة التي تعيش فيها تلك الأحياء المجهرية حيث تفضل السالبة الأوساط المخففة بعكس الموجبة لصبغة كرام.
2- طبيعة المادة الخاضعة من حيث التركيب وكذلك فيما لو كانت محبة أو كارهة للماء وكذلك حجم الدقائق.
3- التهوية: تعتبر اغلب تخمرات الحالة الصلبة هوائية ويتأثر عامل التهوية بطبيعة تكاثر الكائن ألمجهري في الوسط الغذائي وطبيعة وحجم دقائق الوسط الغذائي
4- انتقال الحرارة التي تتولد أثناء عملية التخمر بسبب طبيعة الوسط الغذائي ستكون صعبة بسبب انخفاض المحتوى الرطوبي.

مزايا تخمرات الحالة الصلبة:

- اقتصادية عملية التخمر من خلال طبيعة الوسط الغذائي وكلفته والحيز التي تأخذه بسبب انخفاض الرطوبة
- لاتحتاج إلى عملية تقليب وهذا له دور في الحد من الطاقة المصروفة.
- عمليات التهوية بسيطة.
- عملية تحضير الوسط الغذائي بسيطة ولاتكون رغوة.

أما سلبيات هذه التخمرات:

- عملية التخمر تكون مقتصرة على نوع معين من الأحياء المجهرية خاصة الفطريات بسبب المحتوى الرطوبي المنخفض وبذلك تحد من المواد التي تنتج بهذه الطريقة.
- تتولد حرارة خلال العملية من الصعب التخلص منها.
- من الصعوبة التحكم في نسبة الرطوبة.
- انخفاض معدلات نمو الأحياء المجهرية.

طريقة العمل لإنتاج أنزيم السليوليز بتخمرات الحالة الصلبة باستخدام العفن *Trichoderma resii*:

- توزن 10 غم نخالة الحنطة في دورق سعة 250 مل.

- يحضر وسط غذائي سائل لتدعيم نخالة الحنطة وذلك لافتقارها إلى بعض المعادن والأملاح وكمايلي:

$CaCl_2 + MgCl_2 + K_2HPO_4 + (NH4)_2SO_4$ وبمعدل 1غم / لتر ماء مقطر

- ويمكن استخدام Tween80 مذاب في الماء ضمن مكونات الوسط بنسبة 0,3% والذي له دور في زيادة نفاذية الخلية للأنزيم.
- يضاف 20 مل من الوسط الغذائي السائل إلى نخالة الحنطة مع المزج الجيد ثم يعقم الوسط الغذائي بجهاز الاوتوكليف.
- بعد انتهاء التعقيم والتبريد يلقح الوسط بـ 1مل لقاح معلق سبورات العفن.
- التحضين بدرجة حرارة 28م° لمدة أسبوع.
- بعد انتهاء مدة التحضين يتم استخلاص الأنزيم (تحضير المحلول الأنزيمي) الناتج وكمايلي:
- يضاف 100 مل من محلول دارئ السترات (Citrate buffer) ذو 4,8 pH إلى محتويات الدورق (يحضر الدارئ بمزج 46 مل حامض ستريك 0,05 مولر (10,5 غم/لتر ماء) مع 72 مل محلول سترات الصوديوم 14,5 غم/لتر)
- ترج محتويات الدورق لمدة نصف ساعة في هزاز.
- ترشح المحتويات أو يستخدم الطرد المركزي للحصول على راشح الأنزيم.
- تقدر الفعالية الأنزيمية كمياً وذلك بتقدير كمي السكريات المختزلة في 1 مل راشح بطريقة DNS 3,5 (dinitro salicylic acid).

- تقدير الفعالية الأنزيمية:
- مزج 0,4 مل محلول أنزيمي مع 0,6 مل محلول سترات الصوديوم 0,5% ثم يغمر 0,5غم ورق ترشيح في المزيج ويحضن في حمام مائي بدرجة حرارة 50مْ لمدة 120 دقيقة بعدها يضاف 1مل كاشف DNS ويوضع المزيج لمدة خمس دقائق في حمام مائي مغلي ثم يخفف المزيج بالماء المقطر و يقاس الامتصاص الضوئي للمزيج بجهاز المطياف بطول موجي 490 nm .
- تعتمد قياس الفعالية الأنزيمية على تحلل السكريات الغير مختزلة والمتمثلة بالسليلوز الموجود في المادة الخاضعة إلى كلوكوز وارتباط هذه السكريات مع الكاشف ليتكون معقد ذات لون داكن يقاس بجهاز المطياف.
- يحضر منحنى قياسي من الكلوكوز النقي بالتراكيز التالية 50 , 100 , 150 , 200 , 250 , 300مل/مل وتقاس بجهاز المطياف ويتم معرفة التركيز من خلال المقارنة بين العينة والعينة القياسية.

المرحلة الرابعة قسم علوم الاغذية
التقنية الحيوية / الجزء العملي
مدرس المادة : طارق نواف خليل

عزل كائن مجهري منتج للمضادات الحيوية وإنتاج المضادات الحيوية:

المضادات الحيوية عبارة نواتج ايضية ثانوية تنتجها الاحياء المجهرية المتخصصة في انتاجها في نهاية فترة النمو ليس لها دور في نمو خلية الكائن ألمجهري لكن لها فعل مثبط لنمو الكائنات المجهرية المنافسة لنمو الكائن المنتج وذلك لإمكانية تداخلها مع نمو تلك الأحياء المجهرية, وهي مواد تفرز من قبل الأحياء المجهرية بطيئة النمو. كانت أول ملاحظة لتلك المواد 1928 من قبل الكسندر فلمنك حيث لاحظ تثبيط بكتريا *Staphylococcus aureus* عند وجودها مع فطر *penicillium notatum* والذي له القدرة على إنتاج البنسيلين ثم أخذت عملية الإنتاج بالتطور من خلال البحث عن عزلات تنتج كميات كبيرة من المضادات الحيوية او تطوير قابلية الإنتاج للعزلات المتحصل عليها. وعادةً تفضل الطريقة الحيوية في عملية إنتاج المواد الحيوية التي تستعمل للاستخدام البشري وذلك لان العديد من هذه المواد تكون ذات طبيعة معقدة لذلك تكون الأنظمة الحيوية أكثر كفاءة في إنتاجها كذلك تكون عملية التطوير والتحوير ذات مدى أوسع بالطريقة الحيوية من خلال السيطرة على الوسط الغذائي وإجراء عمليات تحسين وراثي للكائن المنتج.

المصادر المنتجة للمضادات:

- الاعفان مثل *Cephalosporium* الذي ينتج السيفالوسبورين وجنس *penicillium* الذي ينتج البنسيلين
- البكتريا الحقيقية والبكتريا الخيطية مثل *streptomyces* الذي ينتج التتراسايكلين.
- النباتات حيث وجد بان بعض النباتات تحتوي مركبات لها تأثير المضادات الحيوية والتي أطلق عليها Phytocides إذ لوحظ بان هذه المواد تنتج عند حصول أذى للنبات او تحت ظروف خاصة.
- الحيوانات: مثل أنزيم اللايسوزايم الموجود في بياض البيض والدموع والذي يحلل الببتيدوكلايكان الموجود ضمن تركيب الجدار الخلوي للكائن ألمجهري , كذلك توجد مواد أخرى تسمى الانترفيرونات تحضر تجارياً من الخلايا المشتقة من أجنة الدجاج والخلايا اللمفاوية لها تأثير على نمو الفيروسات.

عملية إنتاج المضادات الحيوية:

تتم اغلب عمليات الإنتاج باستخدام طريقة المزارع المغمورة والأحياء المجهرية المستخدمة تكون هوائية لذلك يتم استعمال عملية تقليب الوسط الغذائي أثناء فترة التخمر وبما انه المضادات الحيوية نواتج ايض ثانوية لذلك تكرس بداية عملية التخمر لإنتاج الكتلة الحيوية ثم تليها العملية الإنتاجية والتي تتعلق عادةً بفسلجة الكائن ألمجهري. وتتشابه طرق إنتاج اغلب المضادات الحيوية من خلال استخدام المزارع المغمورة مع توفر أفضل نسب للتهوية لكن يمكن إجراء بعض التحويرات لكي تصبح طريقة الإنتاج ملائمة أكثر لنوع المضاد الحيوي المطلوب إنتاجه ومن هذه التحويرات هي:

- إمكانية استخدام طريقة الوجبات او الوجبات المغذاة من خلال تنظيم عملية سحب 30 – 60% من الوسط الغذائي مع الخلايا بعد فترة زمنية معينة من الإنتاج وتعويضه بوسط جديد.
- يمكن استخدام طريقة الزراعة المتسلسلة وفيها تستعمل عدة مخمرات حيث تزرع الأحياء المجهرية في المخمر الأول الحاوي على وسط غذائي وبعد وصولها إلى مرحلة نمو معينة تنقل إلى مخمر ثاني او ثالث يحوي ظروف خاصة لإنتاج ذلك المضاد الحيوي.

<u>طريقة العمل لعزل كائن مجهري منتج للمضادات الحيوية:</u>

- وزن 5غم تربة وتمزج مع 100 مل ماء.
- يحضر وسط PDA المعقم في طبق بتري.
- يصب 2مل من مزيج التربة مع الماء ويوضع في طبق بتري.
- التحضين في حضان بدرجة حرارة 28م° لمدة 3 أيام.
- بعد انتهاء مدة التحضين تلاحظ النموات ويحضر وسط أكار مغذي سائل ويضاف له بكتريا *E.Coli* او أي بكتريا مرضية ويصب من هذا المزيج 2مل فوق طبق الـ PDA المحضن سابقاً ويعاد تحضينه لمدة 3 أيام مرة أخرى.
- بعد انتهاء مدة التحضين تلاحظ النتائج وهي تكون هالات شفافة في الوسط الغذائي وهي عبارة عن المناطق التي تحتوي على الكائن ألمجهري المنتج للمضادات الحيوية والتي لم تستطع بكتريا *E.Coli* من النمو فيها وبذلك تقطع هذه المناطق وتعاد تنميتها وتنقيتها في أوساط غذائية جديدة لاستخدامها في عملية إنتاج المضادات الحيوية.

<u>إنتاج المضادات الحيوية (البنسيلين):</u>

يعتبر البنسيلين أول مضاد حيوي مكتشف من قبل العالم الكسندر فلمنك والذي كان ينتج من العفن *penicillium notatum* ولكن وجد بان العفن *penicillium chrysogenum* ينتج كميات كبيرة منه ويمكن أن يستخدم في الإنتاج التجاري خاصة بعد إجراء عمليات التطفير والتحسين الوراثي والتي رفعت الوحدة الإنتاجية لترتفع من0,0012غم / لتر إلى 50غم / لتر.

<u>العملية الإنتاجية:</u>

تتم العملية الإنتاجية على مرحلتين وتشمل الأولى تنمية وتنشيط اللقاح (سبورات العفن) ومن ثم الثانية عمليةالانتاج. المرحلة الأولى يتم فيها تنشيط المزرعة الأولية (سبورات العفن) المنتج للمضاد الحيوي والمحفوظ مسبقاً بالتجفيد او النيتروجين السائل وإجراء عملية الإنبات وذلك بتلقيحها بالوسط الغذائي المناسب للتنشيط في الحضان لمدة 3 أيام بدرجة حرارة 28 – 30م°. بعد الانتهاء يتم استخدام اللقاح في المرحلة الثانية.

المرحلة الثانية (الإنتاجية) وتشمل:

تحضير الوسط الغذائي:

يجب أن يكون الوسط ملائم للعملية الإنتاجية (لنمو الكائن ألمجهري والمنتوج المطلوب) من ناحية المكونات والتي لها دور في اختزال طور النمو للحصول على أفضل إنتاجية وكذلك طريقة العملية الإنتاجية باستخدام مزارع الوجبات او الوجبات المغذاة بمعدل بطئ ويجب أن تتصف مكونات الوسط الغذائي بتشجيعها الكائن ألمجهري على إنتاج البنسيلين وتقليل طور

النمو وكذلك تتميز برخصها وتوفرها وإعطائها أفضل كمية ممكنة من المنتوج وسهلة الذوبان والترشيح.

يتكون الوسط الغذائي من:

- مخلفات صناعة الذرة (نقيع الذرة) بتركيز 4 – 5% ويمكن الاستعاضة عنه بمصادر نيتروجينية أخرى مثل خلاصة فول الصويا او الشرش.
- مصدر كاربوني ويعتبر الكلوكوز او اللاكتوز هو المناسب لإنتاج البنسيلين.
- كبريتات الامونيوم وفوسفات البوتاسيوم
- بعض المضافات والتي تعتبر مواد بنائية للبنسيلين مثل Phenyl acetic acid اوPhenoxy acetic acid والتي تضاف بنسبة 0,5 – 0,8% ويفضل أن تضاف في المراحل المتأخرة حيث أنها تؤدي إلى تثبيط النمو في المراحل الأولى.
- pH يتراوح بين 6,8 - 7,4 خلال عملية التخمر بإضافة هيدروكسيد الصوديوم او حامض الكبريتيك ودرجة حرارة عملية التخمر 25م°.
- التهوية والتي تعد من أساسيات عملية الإنتاج لانها هوائية ويعتمد معدل انتقال الأوكسجين على سرعة التحريك ولزوجة وطبيعة الوسط الغذائي.
- قد تصل مدة التخمر إلى أسبوع للوصول إلى إتمام عملية التخمر.
- تستخدم طريقة الوجبات المغذاة بشكل كبير في عملية الإنتاج حيث تضاف المواد التمهيدية الخاصة بسلاسل البنسيلين والمصدر الكاربوني على فترات او بصورة مستمرة.

هناك عدة عوامل تؤثر على العملية الإنتاجية مثل:

- طريقة الإنتاج والتي تفضل أن تكون متقطعة (وجبات) وتحور في المرحلة الإنتاجية لتضاف مواد الوسط الغذائي ببطئ لغرض إطالة فترة الإنتاج. ويمكن أن تحور الطريقة إلى طريقة الوجبات المغذاة وفيها يتم سحب نسبة معينة من وسط التخمر قد تصل إلى 60% على فترات متقطعة ويتم تعويضها بوسط جديد الغاية من هذا التحوير هو بقاء كمية عناصر النمو محددة في الوسط واتجاه الكائن ألمجهري إلى إنتاج المضاد الحيوي وبذلك ارتفاع كمية الناتج.
- معدل استهلاك السكر من العوامل التي تؤثر في العملية الإنتاجية لذلك يضاف اللاكتوز في المرحلة الإنتاجية لان الفطر يستهلكه ببطئ وذلك يزيد من كمية الإنتاج.
- التهوية.
- بعد انتهاء عملية التحضين تبدأ عملية الاستخلاص.

<u>فصل واستخلاص البنسيلين الناتج:</u>

يعتبر البنسيلين هو منتج خارج خليوي ماعدا نسبة قليلة منه تبقى مرتبطة بجدار خلية الكائن ألمجهري. يجب الاهتمام بطريقة فصل وتنقية المضادات الحيوية بصورة عامة لأنها غالباً ماتستخدم للأغراض العلاجية لذلك يفضل الحصول عليه بالشكل المتبلور الذي يمثل المراحل النهائية لعملية التنقية, وتبدأ عملية الفصل بالترشيح او الطرد المركزي ثم يؤخذ الراشح ويستخلص منه المضاد الحيوي بالمذيبات او الترسيب او الطرد المركزي الفائق ويمكن استخدام أكثر من مذيب لإمكانية فصل اكبر جزء من الشوائب بسبب اختلاف قابلية المذيبات على فصلها للشوائب بعد ذلك تبلور او ترسب من المذيب باستخدام خلات البوتاسيوم ويمكن إعادة هذه العملية أكثر من مرة لزيادة النقاوة.

الترسيب: تعتمد الطريقة إلى ربط المضاد إلى مادة عضوية او معدنية للحصول على مركب غير ذائب يمكن أن يفصل بالترشيح او الطرد المركزي ثم يغسل الراسب وقد يجفف ويستخلص منه المضاد.

ليتم بعدها إجراء عملية التنقية والفصل باستخدام مبادلات أيونية او طرق الكروماتوكرافي والتي تتضمن فصل المذيب من خلال طبيعة الشحنات الموجودة ضمن تركيبه والتي تكون إما حامضية او قاعدية وتتضمن الطريقة بإمرار الخليط الحاوي على المضاد على راتنجات (مبادلات) تحمل شحنات ملائمة أي معاكسة للمضاد وبذلك سوف ترتبط المضادات بتلك الراتنجات تاركة الشوائب تمر إلى الأسفل ثم تغسل الأعمدة بمحاليل خاصة للحصول على المضادات التي يتم تركيزها وتنقيتها باستخدام أعمدة تحمل شحنات متشابهة مع المضاد والتي تتنافر مع المضاد لكن ترتبط مع الشوائب.
التجفيف: وذلك لتقليل المحتوى الرطوبي وبما انه المضادات الحيوية حساسة للحرارة لذلك تستخدم طرق خاصة للتجفيف مثل التجفيف بالرذاذ للكميات الكبيرة او التجفيف تحت التفريغ او التجفيف بالتجفيد.
لتدخل بعدها المرحلة النهائية من التنقية بواسطة البلورة او استخدام طرق الفصل بالكروماتوكرافي على أساس الوزن الجزيئي وللوصول إلى درجات عالية من النقاوة يفضل ربط أكثر من طريقة تنقية للوصول إلى أفضل نتيجة.