المختبر الخامس: استخدام الأشعة فوق البنفسجية للتطفير الوراثي:

تشكل الأحياء الدقيقة تنوعاً حيوياً طبيعياً كبيراً مما يساعد في سرعة غربلتها و تنميتها و تحسين إنتاجيتها و مردوديتها باستخدام تقنيات التخمير

تنتج بعض الأحياء الدقيقة أنزيمات ذات أهمية اقتصادية كبيرة ولكن بكميات ليست ذات جدوى اقتصادية وتجارية. نجحت الصناعة البيولوجية نجاحاً باهراً في زيادة إنتاج هذه الإنزيمات من خلال انتخاب الطفرات بعد غربلتها حيث يكون التطفير مصدراً للتغيرات الوراثية التي تنعكس على القدرة الإنتاجية للسلالات الميكروبية.

توجد الأنزيمات في كل الأحياء، إلا أنها تنتج بكميات قليلة وليست ذات جدوى اقتصادية. و من أجل زيادة إنتاج هذه الأنزيمات اللازمة لأغراض صناعية فهي غالباً ما تنتج باستعمال الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتريا، الخمائر، و الفطور حيث تصنع هذه الأنزيمات و تفرز في أوساط استنبات صنعيه

الطفرات Mutation: هي التغيير في تعاقب النيوكليوتيدات على جزيئة الحامض النووي DNA والذي يؤدي إلى تحوير المعلومات الوراثية ومن ثم تكوين بروتين محور.

تحدث الطفرة على مستويين: الأول مستوى الكروموسومات، والثاني مستوى الجينات. أما في النوع الأول فيحدث تغير مفاجئ في عدد الكروموسومات أو طريقة نظامها، وينشأ من هذا التغير ظهور صفة جديدة. وتسمى في هذه الحالة بالطفرة الكروموسومية. أما في النوع الثاني فيحدث تغير كيميائي في الجينات من حيث ترتيب القواعد النيتروجينية الموجودة في جزيء الDNA ، مما يؤدي في النهاية إلى تكوين إنزيم مختلف يكون مسؤولاً عن ظهور صفة وراثية جديدة، لم تكن موجودة في الوالدين. وتسمى في هذه الحالة بالطفرة الجينية. وقد تحدث الطفرة بنوعيها (الكروموسومي، والجيني) تلقائياً نتيجة خلل في انقسام الخلية

وأثبتت الكثير من التجارب أن قابلية الكائن ألمجهري على تقبل التطفير لاتعود فقط إلى العوامل المستخدمة في العملية ولكن هناك عوامل داخلية تعود إلى خلية الكائن ألمجهري مثل عدم الثبات الكيميائي والفيزيائي والوراثي لخلية الكائن ألمجهري ويلاحظ من ذلك أن عملية التطفير الغير مسيطر عليها تؤدي إلى التأثير السلبي على التركيب الجيني للخلايا.

قام Wood and Smith عام 1991 بدراسة تأثير الأشعة فوق البنفسجية UVC على الفطر awamori Aspergillusحيث عزلت الطفرة ذات إنتاجية لأنزيم الكسيلاناز مقدرة ب 200 وحدة أنزيمية/مل و هذه أعلى بنسبة ٣٠ %مقارنة مع السلالة الأم و التي أعطت ١٤٢ وحدة أنزيمية /مل.

الأشعة فوق البنفسجية الطفرة 11 UV-للفطرFusarium Oxysporum والتي اختبرت إنتاجيتها لأنزيم الكسيلاناز 19.1 وحدة/مل مقارنة مع 11.3 وحدة /مل للسلالة الأم حيث أمكن من خلال الأشعة فوق البنفسجية إحداث خمس طفرات إنتاجيتها أعلى من سلالة الأم بنسبة ٢٠-٤٠%

وتقسم الطفرات إلى نوعين:

1- **الطفرات التلقائية:**

وهي الطفرات التي تحدث بصورة طبيعية من دون أي معاملة مسبقة والتي تنتقل عبر الأجيال المتعاقبة أي تحدث نتيجة تكرار الانقسام ويمكن الكشف عنها من خلال وجود الجيل الجديد على أوساط حاوية على مادة سامة للعزلات الطبيعية (غير المطفرة)

2- **الطفرات المستحثة:**

وهي الطفرات التي تنشأ من خلال التسليط المباشر لأحد العوامل المطفرة Mutagens سواءً كانت فيزيائية أو كيميائية أو إحيائية على الكائن ألمجهري مما يؤدي إلى تغير في التركيب الوراثي والذي ينتقل عبر الأجيال المتعاقبة.

- الأشعة فوق البنفسجية Ultra violet (U.V):

وهي اشعة كهرومغناطسية غيرمؤينة تنقل طاقتها بالفوتونات وتقاس بوحدات الجول والارك Erg وهي إحدى العوامل التي تستخدم في التطفير وتكون ذات مدى واسع من الطول الموجي. ويتركز التأثير الحيوي للاشعة فوق البنفسجية في الحوامض النووية DNA و RNA التي تشكل المادة الوراثية الرئيسية للخلايا.

وتكون فعالة جداً عند طول موجي 265 و 254 حيث إنها تمتص بشدة من قبل الأحماض النووية وينتج عن ذلك طفرات وراثية أو موت الكائن ألمجهري ، وهناك عوامل مؤثرة على فعالية هذه الأشعة عند استخدامها في التطفير وهي:

- الزمن، حيث كلما زادت فترة التعرض زادت الفعالية
- شدة الأشعة
- المسافة بين مصباح الأشعة وبين الخلايا المراد تطفيرها
- نوع وكمية المادة المتعرضة للأشعة
- نفاذية الأشعة داخل الجسم
- طبيعة الجسم واحتوائه على بعض المواد مثل الأملاح والدهون والسكريات
- مرحلة نمو الكائن ألمجهري وحالته إذا كان خلية خضرية أو سبورات والتي تكون أكثر مقاومة وكذلك نوع الكائن ألمجهري حيث أن العفن أكثر مقاومة والسبورات أكثر مقاومة من الخلايا الخضرية

وممكن أن يكون التطفير سلبي في حالة زيادة الطول الموجي أو زيادة الفترة الزمنية المعرضة للتطفير.

تعد العديد من الانواع الفطرية أنموذجاً جيداً لدراسة الجوانب الوراثية في الكائنات الحقيقية النواة لاسباب متعددة منها انها حقيقية النواة وذات دورة حياة قصيرة قد لاتتجاوز (3-7 أيام) وسهولة انتخاب الطفرات وتحديدها فضلاً عن كونها تظهر صفات واضحة وامكانية تنميتها على اوساط طبيعية او صناعية في المختبر بالمقارنة مع صعوبة التطبيقات الوراثية على الكائنات حقيقية النواة الاخرى كما في الخلايا الحيوانية او الحيوانات الكبيرة . وأن التطبيقات الوراثية في الفطريات هي أفضل من التطبيقات على البكتريا والفايروسات بدليل انه يمكن متابعة التغيرات الوراثية التي تقع في الفطريات بسهولة من خلال المجهر الضوئي او الاستدلال عليها فسلجياً وذلك يتناسب وحجم الفطريات بالمقارنة مع حجم البكتريا والفايروسات.

<u>طريقة العمل:</u>

- يؤخذ 10 مل من معلق سبورات الفطر *A. niger* في طبق بتري (Petri dish).
- عرض الطبق مفتوحا للأشعة فوق البنفسجية على طول موجي 265 نانوميتر.
- يؤخذ 1مل من معلق السبورات عند الوقت صفر ، 5 ، 10 دقيقة ويوضع في طبق بتري معقم. ويصب 15مل من الوسط الغذائي PDA.
- يحرك الطبق بشكل رقم 8 لمزج السبورات بالوسط الغذائي ثم يترك الطبق في جو المختبر لكي يتصلب ثم يحضن بدرجة حرارة 28م لمدة 48 ساعة
- يتم انتخاب المستعمرات ذات الصفات الظاهرية المختلفة عن مستعمرات العينة غير المطفرة (Control).

- ينقل بواسطة إبرة التلقيح (Loop) جزء من المستعمرة المنتخبة إلى أنبوبة تحتوي على الوسط الغذائي PDA بشكل مائل لتحضير مزرعة نقية من الفطر المطفر
- التحضين بدرجة حرارة 28م لمدة 48 ساعة
- بعد انتهاء عملية التحضين يحضر معلق سبورات من المزرعة المائلة ويستخدم في إنتاج حامض الستريك وتقدر كمية الحامض المنتج وتقارن مع الكمية التي أنتجتها السبورات غير المطفرة.

٣- المواد و الطرائق:

٣-١- تنمية عزلات الفطر على وسط Potato Dextrose Agar (PDA) آغار ديكستروز بطاطا في أطباق بتري و تحضينها عند درجة حرارة ٣٠ مئوية لمدة 3 ايام.

حضر المعلق البوغي بتركيز 10^{8} بوغ / مل في أنبوب زجاجي معقم يحوي ١٠ مل ماء ببتوني (٥غ / لتر NaCl ،٣غ / لتر ببتون، ١مل توين ٨٠ ،ماء مقطر) ليستخدم في عملية الانتاج

التقنية الحيوية والاحياء المجهرية :

وضعت عدة تعريفات للتقنية الحيوية كلها تتفق في المضمون وهو استعمال الخلايا الحية او مكوناتها في انتاج مواد مفيدة او في اصلاح التلوث البيئي, تتميز الاحياء المجهرية بعدة مميزات اهلتها لهذه العملية متميزة في ذلك على الخلايا الحيوانية او النباتية لذلك شكلت الصناعة المعتمدة على الاحياء المجهرية جزءاً كبيرا من العمليات الصناعية ان لم يكن لها دورا كليا. ومن مميزات الاحياء المجهرية :

1- سريعة النمو نظراً لكبر المساحة السطحية بالنسبة لحجم الخلية مما يوفر لها فرصة الاستخدام الامثل للعناصر الغذائية في الوسط الغذائي, وكذلك له دور في زيادة التنوع الحيوي للاحياء المجهرية بشكل كبير, علما نه هذه الفقرة تجعل الخلية معرضة كليا للتأثر بالظروف البيئية.
2- الأنظمة الوراثية للأحياء المجهرية أقل تعقيداً من الأحياء الراقية مما يسهل اجراء عمليات التطفير أوالكلونة.
3- تحتوي العديد من المسارات الأيضية سواءاً البنائية أو الهدمية المتنوعة للمادة الواحدة.
4- معظم الأحياء المجهرية خاصة البدائية النواة لاتعاني من الشيخوخة بعد عدة أجيال, وان كانت ذلك فلابد من انشاء مجموعة من الخلايا تحافظ على النوع.
5- يمكن للأحياء المجهرية التأقلم وبشكل سريع لاستهلاك مواد رخيصة ومتوفرة في الطبيعة.
6- بالأمكان زراعتها وانتاج أعداد كبيرة منها لتصل الى ملايين من الخلايا وفي وقت قصير وهذه الميزة غير متوفرة في الاحياء متعددة الخلايا الكبيرة مثل النبات والحيوان.

تعد الاحياء المجهرية في معظم الحالات اكثراستعمالا من العوامل الاخرى للاسباب التالية :

1- ارتفاع المساحة السطحية الى الحجم مما يسهل الاستغلال السريع للمواد الغذائية لدعم السرع العالية للفعاليات الايضية.
2- تمتلك الاحياء المجهرية المقدرة على القيام باعداد هائلة من الفعاليات الحيوية.
3- للاحياء المجهرية المقدرة على التطبع للظروف البيئية المختلفة بسهولة مما يسهل نقلها من البيئة الطبيعية الى المختبر وتنميتها على مصادر نتروجينية وكاربونية رخيصة الثمن وانتاج مركبات ذات قيمة على المستوى الاقتصادي والتجاري.
4- سهولة التعامل مع الاحياء المجهرية على صعيد التطفير الوراثي والهندسة الوراثية لغرض انتخاب وتصمم كائنات مجهرية استثنائية معدلة وراثيا لغرض تخليق المنتجات الحيوية بكميات تفوق قدرة الكائنات المجهرية الطبيعية.
5- المنتوج الذي ينتج من الاحياء المجهرية يكون اكثر نقاوة من الذي ينتج كيمياوياً

المختبر الأول: عزل الأحياء المجهرية من مصادر مختلفة:

تعتبر طريقة عزل الأحياء المجهرية من مصادرها من العمليات المهمة في مجال التقنية الحيوية وذلك لارتباطها الوثيق بجودة المنتج المطلوب إنتاجه من هذه الأحياء المجهرية لذلك يجب أن تكون الأحياء المجهرية التي تم انتخابها ذات صفات محددة ومميزة تساهم في الارتقاء بالمنتج وجودته. المصادر الطبيعية الرئيسية للأحياء المجهرية الصناعية هي التربة و الهواء و المياه و الأغذية الطازجة والمخمرة والفاسدة و الحيوانات والنباتات ومياه المجاري .

هناك عدة مجاميع من الاحياء المجهرية مثل البكتريا والخمائر والاعفان والطحالب، والتي تتفرع الى عدة اجناس وانواع تختلف في صفاتها الفسلجية والمورفولوجية وبالتالي اختلاف في طبيعه نموها والمركبات التي تنتجها، ونظراً لتلك الاختلاف في صفات الأحياء المجهرية فان عمليات العزل تأخذ طابعاً خاصاً اعتماداً على الكائن ألمجهري المراد عزله, وكذلك المركب المطلوب انتاجه، من خلال اختيار الوسط الغذائي وظروف النمو والعملية الانتاجية المناسبة, ويجب أن تنتهي عملية العزل بالحصول على كائن مجهري ذي قيمة اقتصادية من حيث الإنتاجية. بصورة عامة فأن الأحياء المجهرية في الطبيعة توجد بشكل مختلط وتكون بما يسمى بالمزارع المختلطة وتكون ملوثة للتربة والهواء والماء والمحاصيل الزراعية والأغذية وعند دراسة خواص كائن مجهري معين يكون من الصعب إجراء الاختبارات عليه في هذه الحالة لذلك يتم عزل وتنقية كل نوع من الأحياء المجهرية ودراسته بصورة منفردة عبر مايسمى بالمزارع النقية.

يتم عزل الاحياء المجهرية من مصادرها وذلك بعدة طرق :

1- الغربلة الاولية Primary screening : تتضمن عزل الاحياء المجهرية المنتجة لمادة معينة من البيئة وتشخيصها لمعرفة فيما اذا كانت ممرضة او غير ممرضة للانسان او الحيوان او النبات لان من الشروط الاساسية لاختيار او انتخاب السلالات المستعملة في الانتاج ان تكون غير مرضية وغير منتجة للسموم (Toxins) .

2- الغربلة الثانوية Secondary screening : تتضمن دراسة الظروف المثلى للنمو والانتاج مختبريا والتحري عن عدم انتاجها للسموم ودراسة افضل الطراق لاستخلاص وتنقية المنتوج كذلك التحوير الوراثي Genetic manipulation بالطفرات mutation او الاندماج البروتوبلاستي Protoplast fusion او باستنسال الجينات المناسبة gene cloning للسلالات المختارة او نقل صفات جديدة لم تكن تحتويها اصلا لغرض الحصول على سلالات ذات انتاجية مفرطة hyper production ودراسة ثبات الصفات المنقولة لهذه السلالات وراثيا ثم يتم استعمالها تجاريا.

1_ عزل الأحياء المجهرية من التربة:

- يوزن 10 غم من تربة الحديقة
- تضاف الـ 10 غم من التربة إلى 90 مل ماء معقم في زجاجة معقمة لكي نحصل على التخفيف الأول (10/1)
- ترج الأنبوبة جيداً ثم تترك لمدة 15 دقيقة لكي تترسب ذرات التربة ثم نكمل تحضير التخافيف وذلك بأخذ 1 مل من السائل الرائق العلوي من أنبوبة التخفيف الأولى وتضاف إلى أنبوبة اختبار جديدة تحتوي على 9 مل ماء معقم للحصول على التخفيف الثاني (100/1) ويرج جيداً ثم يؤخذ منه 1 مل وينقل إلى 9 مل ماء معقم ويرج جيداً للحصول على التخفيف الثالث (1000/1) وهكذا نستمر في التخافيف لحين الحصول على تخفيف 1/مليون (عملية النقل تكون باستخدام ماصات معقمة).
- يؤخذ 1 مل من أنبوبة التخفيف الأخير وتضاف إلى طبق بتري معقم (Petri dish) ويصب فوقه بمقدار 15 مل من الوسط الغذائي المناسب لنمو الكائن ألمجهري المطلوب ويمزج بشكل رقم 8 (ملاحظة: يجب أن تكون درجة حرارة الوسط الغذائي قبل الصب فوق التخفيف 42-45 مْ لكي لاتؤثر في حيوية اللقاح .... ثم يترك الطبق في درجة حرارة الغرفة لحين تصلب الوسط بعد ذلك توضع توضع بشكل مقلوب في حاضنة بدرجة حرارة 30مْ لمدة 48 ساعة.

ملاحظة: يستخدم وسط اكار البطاطا والدكستروز PDA لتنمية الفطريات وتكون مدة التحضين 5 – 7 أيام بدرجة حرارة 27 – 28مْ

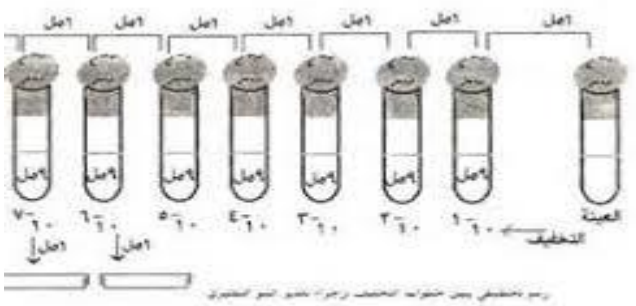
- بعد انتهاء مدة التحضين وملاحظة ظهور المستعمرات تؤخذ لمسة بواسطة ابرة التلقيح (Loop) من كل المستعمرات التي تنطبق صفاتها لما جمعناه سابقاً من معلومات عن الكائن ألمجهري المراد عزله وتفرش هذه اللمسة على طبق بتري آخر يحتوي على وسط الاكار المغذي لغرض التعرف أكثر على الصفات التصبيغية والاختبارات التشخيصية اللاحقة لإعطاء النتيجة النهائية للتشخيص ومن ثم تحضر شريحة بالطريقة الاعتيادية وتصبغ بصبغة كرام للتعرف على الصفات المورفولوجية لخلايا المستعمرات المعزولة.
- أما بالنسبة لعزلات الفطريات فيعمل شريحة محضرة بطريقة التحضير الرطب (wet mount) الخاصة بالفطريات وتكون كالتالي: (لمسة لوب + قطرة ماء + قطرة من ازرق المثيلين)
- تؤخذ لمسة من المستعمرات المرغوبة (المستعمرات التي تنطبق عليها جميع مواصفات الكائن ألمجهري الذي نبحث عنه) وتنقل إلى أنبوبة اختبار تحتوي على وسط غذائي مماثل تكون متصلبة بشكل مائل (slant) وتحضن في حاضنة بدرجة حرارة 28 – 30م لمدة 3 أيام بعدها نقوم باختبار قدرة الكائن ألمجهري على إنتاج المنتوج المطلوب بعدها نحفظ هذه الأنابيب المائلة في الثلاجة لحين الاستخدام.

2- عزل الأحياء المجهرية من الماء:

- يؤخذ 50 مل من ماء الأنهار أو المستنقعات في قنينة زجاجية معقمة ويحضر منها تخافيف 10/1 و 100/1
- تتبع نفس الخطوات المستخدمة في عزل الأحياء المجهرية من التربة كما ذكر سابقاً.

3- عزل الأحياء المجهرية من الأغذية الطازجة أو الفاسدة:

- يؤخذ 10 غم من المادة الغذائية وتضاف إلى 90 مل ماء معقم في هاون خزفي ويضاف له كمية مناسبة من رمل البحر (رمل البحر يساعد في عملية السحق) وبذلك يتم الحصول على التخفيف الأول 10/1
- نكمل تحضير التخافيف 100/1 و 1000/1
- تتبع نفس الخطوات السابقة في عزل الأحياء المجهرية من التربة .



الشكل يوضح طريقة تحضير التخافيف

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

المختبر الثالث: تحضير اللقاح لعملية الانتاج :

تعتبر من العمليات المهمة التي يجب إجراءها قبل عملية التخمر حيث ينشط الكائن ألمجهري عادةً وذلك بإجراء عمليات التنمية على أوساط غذائية مناسبة لنوع الكائن ألمجهري بعد ذلك تتم عملية تحضير اللقاح والتي تكون أما بتحضير لقاح السبورات كما يحصل في حالة الاعفان المنتجة للسبورات ويطلق عليه لقاح سبورات الاعفان أو بتحضير لقاح الخلايا الخضرية بالنسبة للاعفان غير المكونة للسبورات وفي هذه الحالة يطلق عليه معلق الخلايا الخضرية.

1- تحضير لقاح السبورات Spore inoculum
2- تحضير لقاح المايسيليوم Mycelium inoculum

ان اغلب الفطريات المستخدمة في التقنية الحيوية مكونة للسبورات وذلك بسبب حاجة العملية التصنيعية الى لقاح السبورات لذلك يجب تنمية الكائن المجهري في وسط غذائي يشجع تكون السبورات اضافة الى ملائمة ظروف النمو لعملية الانتاج, يمكن إنتاج السبورات باستخدام بعض الأوساط الطبيعية مثل النخالة أو الرز أو الشعير أو جريش الحبوب الأخرى , كما يمكن إنتاجها باستخدام أوساط صناعية سائلة أو متصلبة وكما يلي:

1- التنمية على سطح الاوساط السائلة الراكدة في هذه الحالة يجب الموازنة بين نسبة التهوية وكمية النيتروجين في الوسط الغذائي والتي تتراوح بين 0.05 – 0.1% اذ ان التهوية القليلة تحتم استخدام كميات قليلة من النيتروجين.

2- انتاج السبورات على الاوساط الغذائية الصلبة, اذ يمكن للكثير من الفطريات النمو على اسطح الاوساط الصلبة مثل الحبوب والرز والذرة وغيرها. وتعتمد عملية الانتاج في هذه الحالة على نسبة الرطوبة الموجودة اصلا في الوسط او المضافة والتي تفضل ان تكون مناسبة لنمو الكائن المجهري، فضلا عن التهوية والتي تعد مهمة في نوعية السبورات الناتجة.

3- انتاج السبورات على اوساط الاكار, بصورة عامة تفضل المساحة السطحية الواسعة لعملية النمو لذلك تصلب هذه الاوساط بشكل يسمح بتكوين مساحات سطحية واسعة مثل القناني الكبيرة التي يوضع فيها الوسط ويعقم ويدور ببطئ ثم يترك ليتصلب على الجدران ثم يتم التلقيح باحد الكائنات المجهرية المناسبة والمكونة للسبورات، من مساوئ هذه الطريقة النمو الفطري سوف يغطي الجدران فيحجب رؤية وملاحظة النمو بشكل دقيق .

تحضير لقاح السبورات الاعفان بطريقة المزارع الصلبة:

إنتاج السبورات على بيئة الرز :

- وزن 15 غم من الرز في دورق مخروطي سعة 250 مل ويضاف له 25 مل من الماء لغرض الترطيب ورفع المحتوى الرطوبي
- يغلق بسدادة قطنية ثم يعقم بجهاز الاوتوكليف بدرجة حرارة 121مْ وضغط 1 جو لمدة 30 دقيقة
- تبرد إلى حرارة الغرفة ثم تلقح بإضافة 5 مل من معلق السبورات المأخوذة من مزرعة مائلة أو مزرعة سائلة قديمة لأحد الاعفان المتوفرة مثل *A. niger*
- تحضن بدرجة حرارة 25مْ لمدة أسبوع واحد وخلال التحضين سوف يلاحظ إنبات ونمو السبورات مكونة هايفات تتخلل بين حبات الرز ثم تبدأ بتكوين سبورات جديدة

يتم الحصول على لقاح السبورات كما يلي:

- يضاف 25 مل من الماء المعقم إلى الدورق الحاوي على السبورات كما يمكن إضافة 1 مل من مادة Tween 80 حيث تعمل هذه المادة على منع تجمع السبورات وتوزيعها بشكل متجانس في المعلق
- يرشح المعلق خلال صوف زجاجي أو ململ معقم
- ينقل الراشح إلى أنبوبة اختبار و يطرد مركزياً بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق ثم تؤخذ السبورات ويضاف لها كمية من الماء المعقم وترج ثم تطرد مركزياً مرة أخرى لغرض الغسل
- يؤخذ الراسب (السبورات) ويضاف له 5 مل ماء معقم وتحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

انتاج معلق السبورات باستخدام وسط الخبز:

- يستخد الخبز المصنع من الطحين والخالي من اي مواد حافظة يقطع الى اجزاء صغيرة ويوضع في دورق مناسب ويسد بسدادة قطنية ويعقم بجهاز الاوتوكليف
- يرطب بكمية مناسبة من الماء
- يلقح من مزرعة فطرية باستخدام ابرة التلقيح ويحضن لمدة 7 ايام على 30م
- بعد انتهاء عملية التحضين تلاحظ النموات الناتجة ويضاف 100 مل ماء مقطر معقم مع الرج الشديد ثم يتم ترشيح المزرعة خلال قماش ترشيح
- يتم حساب عدد السبورات الناتجة باستخدام Haemocytometer ويحفظ العالق في الثلاجة لحين الاستخدام.

تحضير لقاح المايسيليوم:

تستخدم هذه الطريقة في حالة الاعفان غير المنتجة للسبورات

- ضع 100 مل من بيئة Sabroud broth (وهو عبارة عن وسط سائل يستخدم لتحضين الخمائر والاعفان ولايستخدم للبكتريا بسبب طبيعة مكوناته التي تتألف من 10 غم / لتر كازين و meat pepton و 20 غم / لتر دكستروز ويكون ذات pH 5,6) في دورق مخروطي سعة 500 مل وتعقم بجهاز الاوتوكليف
- بعد انتهاء التعقيم تلقح بكمية قليلة من المايسيليوم ثم تحضن بدرجة حرارة 25مْ
- بعد أسبوع واحد من التحضين يتم سحق وكسر المايسيليوم النامي باستخدام خلاط معقم
- ينقل اللقاح إلى أنابيب معقمة وتقفل جيدا وتحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

تحضير لقاح البكتريا والخمائر:

يؤخذ 1 غم من خميرة الخبز الجافة وتوضع في 5 مل من مستخلص المولت المعقم وذات pH 4,6 وتترك لمدة نصف ساعة بعدها ينقل منه 0,1 مل وتلقح به طبق بتري بعملية التخطيط يحتوي وسط غذائي مناسب ثم تجرى عملية التحضين بحرارة 30مْ لمدة أسبوع.

تحضير مزرعة العمل للخميرة:

يستخدم الوسط الغذائي الذي يتكون من 20 غم مستخلص مولت و 15 غم فوسفات ثنائي الامونيوم و 5 غم كبريتات النحاس ويعدل الأس الهيدروجيني إلى 4,6 ويكمل الحجم إلى لتر واحد بالماء المقطر , يوزع الوسط الغذائي على دوارق بأحجام ملائمة لكل دورق تعقم بجهاز الاوتوكليف بعدها تلقح بالخميرة وتحضن على 30مْ لمدة أسبوع لتكون جاهزة للاستخدام.

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

المختبر الثاني: حفظ الأحياء المجهرية الصناعية:

هو اختزال معدل النمو عن طريق تقليل حركيات الفعاليات الحيوية أو تعليقها لفترة زمنية محددة بحيث تكون قابلة لإعادة نشاط هذه الفعاليات إلى وضعها الاعتيادي عند تنميتها في الأوساط الملائمة وتحت الظروف الملائمة . إن عمليات حفظ البكتريا لها خصوصية وذلك لأنها سريعة النمو ووقت الجيل لها قصير وبذلك تدخل المزارع طور الركود وتغيراته في وقت اقصر من غيرها من الخلايا لاسيما حقيقية النواة، فضلاً عن محتواها العالي من الماء الذي يصل إلى 80%.
ويتطلب تنمية البكتريا على أوساط غذائية غنية كي يمكنها تجميع المواد الحامية Protectants كما يفضل أن تنمو لحين اكتمال النمو في الخلايا أي إلى طور الركود المبكرEarly Stationary Phase .
يتم حفظ الاحياء المجهرية الصناعية لكون عملية العزل عملية مكلفة وتستغرق وقتاً طويلاً فضلا عن عدم ضمان الحصول على كائن مجهري ذو طاقة انتاجية عالية كما في العزلة الاولى, لذلك يجب المحافظة على هذه الأحياء المجهرية لكي تبقى محافظة على الصفات التي عزلت وحفظت من اجلها وكذلك تهدف إلى بقاء الكائنات المجهرية بحالة فسيولوجية عالية ومحافظة على حيويتها لأطول فترة ممكنة من اجل استخدامها في الصناعة لان عمليات التصنيع مستمرة وتحتاج إلى لقاح جاهز يكون نشط وخالي من التلوث , فضلاً عن ذلك فان اعادة الزراعة والتنقية قد يؤدي إلى زيادة التعرض للتلوث وبالتالي نلجأ إلى اعادة عمليات التنقية لأكثر من مرة وهذا يسبب تكون طفرات وراثية بسبب كثرة الانقسام لخلية الكائن ألمجهري والطفرة الوراثية هي التغير في صفات الكائن ألمجهري وبالتالي فقدان السلالة المنتخبة للصفة التي عزلت وحفظت من اجلها لذلك يجب إيجاد أفضل الوسائل لحفظ المزارع , الهدف من الحفظ هو المحافظة على خواص الخلايا الكلية (الوراثية والحيوية والمورفولوجية) بحيث يمكن استخدامها عند الحاجة لإنتاج منتوج مرغوب.

تكون عملية الخزن على نوعين :
1- الخزن لفترة قصيرة : تخزن السلالات على اوساط مائلة مغلقة بشكل محكم بدرجة 4 م لمدة 2-3 شهر .
2- الخزن لفترة طويلة : تصل الى 10 سنوات وتتم اما :

الشروط الواجب توفرها في الأحياء المجهرية المراد حفظها:
- أن تكون السلالة ثابتة وراثياً
- أن تتحمل الحفظ لفترات طويلة
- أن تكون ذات قابلية عالية لتكوين الخلايا الخضرية والسبورات
- أن تنمو بسرعة بعد عملية الحفظ واستخدامها في المنتوج
- أن تكون نقية
- أن تكون مقاومة للتلوث
- أن يكون لها استعدا لتقبل التحسينات الوراثية مثل عمليات التطفير

ويعتمد عمر الخلايا خلال الخزن على طريقة الخزن المستخدمة، ومن الطرق المستخدمة في حفظ الأحياء المجهرية هي:

1- حفظ السبورات في الماء المعقم:

طريقة الحفظ كمايلي:
- تؤخذ مزرعة من البكتريا أو الفطريات (المكونة للسبورات) بعمر أسبوع واحد وتنمى على وسط غذائي مناسب مثل الاكار المغذي بالنسبة لتنمية البكتريا أو PDA (وسط اكار البطاطا والدكستروز) للفطريات بشرط أن تكون سبورات على سطح هذا الوسط .
- يضاف 5 مل من الماء المقطر والمعقم على سطح المزرعة في ظروف معقمة وتزال السبورات من سطح المزرعة بالقشط باستخدام إبرة التلقيح المعقمة حيث يتم الحصول على معلق السبورات في الماء المعقم.
- في بعض الأحيان تضاف مادة Tween 80 والذي هي عبارة عن مادة زيتية تساعد في تجانس توزيع السبورات في الماء.

- ينقل معلق السبورات إلى أنبوبة اختبار معقمة ويكتب عليها المعلومات اللازمة ثم تحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

2- <u>حفظ السبورات بالتربة المعقمة:</u>

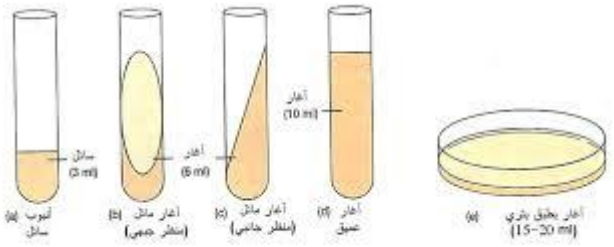
هذه الطريقة تستخدم لحفظ سبورات الاعفان وتتضمن :

- وزن 10 غم من تربة الحديقة المجففة وتوضع في أنبوبة اختبار ويضاف لها 2 مل ماء لإعطاء رطوبة 20٪ .
- تعقم الأنابيب باستخدام جهاز الاوتوكليف بدرجة حرارة 121مْ لمدة نصف ساعة وليومين متتالين لضمان عملية التعقيم بسبب ارتفاع الحمولة الميكروبية للتربة.
- يضاف نصف مل من معلق السبورات السابق تحضيره في الطريق السابقة وباستخدام ماصة معقمة وتحت ظروف.
- يحضن بدرجة حرارة 25مْ لمدة أسبوع.
- بعد انتهاء مدة التحضين يوضع اللقاح في الثلاجة بدرجة حرارة 4مْ لحين الاستخدام
- ((هذه الطريقة تستخدم للحفظ لفترات طويلة نسبياً قد تصل إلى عدة سنوات 10 إلى 15 سنة وحسب نوع الكائن ألمجهري))

3- <u>الحفظ بالزيت:</u>

يمكن إطالة ففترة خزن المزارع بتغطيتها بالزيت مثل الزيت المعدني أو البارافين السائل حيث يمنع جفاف المزرعة ويمنع تأثير الأوكسجين وبذلك تبقى المزرعة محافظة على حيويتها.

- بواسطة إبرة التلقيح المعقمة تؤخذ لمسة من مزرعة الكائن ألمجهري وتنقل إلى أنبوبة اختبار تحتوى على بيئة الاكار المغذي المائلة.
- توضع في الحضان بدرجة حرارة30مْ لمدة يومين.
- بعد ملاحظة النمو الجيد على سطح الوسط الغذائي يصب قليل من زيت البارافين المعقم على سطح المزرعة المائلة والذي تتلخص أهميته لمنع أو تقليل التبخر والجفاف للوسط الغذائي , وتحفظ بالثلاجة لحين الاستخدام. (تستخدم هذه الطريقة لحفظ السبورات والخلايا الخضرية لفترات طويلة تتراوح بين 6-8 أشهر .



4- **<u>الحفظ بالتجفيد: Lypholization</u>**

هي طريقة حديثة نسبيا تعتبر من الطرق المهمة والمستعملة بشكل واسع لعمليات الحفظ لفترات طويلة تصل إلى عدة سنوات أو أكثر تتلخص بتجفيف العينة بعد تجميدها أي سحب المحتوى الرطوبي للعينة بطريقة التسامي (انتقال الماء من الحالة الصلبة إلى الحالة الغازية دون المرور بالسائلة) تحت التفريغ وهناك بعض الظروف التي تؤثر على نجاح الطريقة:

1- أن تكون الخلايا مكتملة النمو
2- يجب أن تغذى الخلايا بشكل جيد لتزيد مقاومتها لعملية التجفيد
3- أن تكون أعداد الخلايا كبيرة في النموذج

حجم الخلايا يجب أن يكون مناسب لعملية التجفيد فقد وجد انه كلما زاد حجم الخلايا زادت حساسيتها للعملية خصوصاً خلال مرحلة التجفيف حيث أن التأثير على أي مركب خلوي يؤدي إلى موت الخلايا لذلك فإنها غير ملائمة لحفظ الفطريات في الطور الخضري وغير ملائمة لحفظ الطحالب لكنها ملائمة لحفظ البكتريا لكنها ليست قاعدة عامة لان الفيروسات اصغر من البكتريا وأكثر حساسية للتجفيد , واستعملت مواد مثل مصل الدم والحليب الفرز في حماية الخلايا من تاثير انخفاض درجات الحرارة سنة 1909 للاستفادة من صفاتها الغروية لحماية الخلايا، وفي عام 1940 استعملت المواد البلورية مثل السكروز والكلوكوز التي لها قابليات عالية على الذوبان التي تساعد في التأثيرات الحامية وقللت بشكل

كبير من موت الخلايا .كما يستخدم الكلسرين تركيزه 86% لحماية الخلايا من التجميد (هذا يشمل الحفظ بالتجفيد والتجميد)

وتتلخص العملية كمايلي:

- تؤخذ خلايا من الفطريات أو الخمائر أو البكتريا النامية على وسط غذائي مناسب ويضاف إليها 5 مل من محلول يحتوي 10٪ حليب فرز و 5٪ اينوسول معقم وتكتمل المزارع للحصول على معلق من الخلايا.
- ينقل المعلق إلى أنابيب خاصة بجهاز التجفيد.
- يجمد المعلق بدرجة حرارة -20مْ مع التدوير بحيث يكون التجميد على جدار الأنبوبة بحيث نحصل على مساحة سطحية كبيرة.
- توضع الأنابيب بجهاز التجفيد Freeze dryer حيث يتم تسامي الرطوبة بتأثير التفريغ الهوائي ولحين الحصول على مسحوق جاف.
- تقفل الأنابيب وتحفظ بالثلاجة لحين الاستخدام.
- ((يمكن أن تستخدم هذه الطريقة لحفظ العزلات لفترات طويلة قد تصل إلى سنوات))

5- <u>الحفظ بخفض درجات الحرارة ويشمل</u>

أ- بالتبريد:

أن خفض درجة الحرارة يؤدي إلى تغيرات في آلية النمو للخلايا إذ تنخفض معدلات النمو إلى معدل واطئ جداً ومن هذا المنطلق يمكن استعمال خفض درجات الحرارة لحفظ الخلايا لفترات مختلفة اعتماداً على درجة حرارة الخزن. ومن درجات الحفظ هي درجة حرارة التبريد التي تكون بين 2-5مْ وهي تكون ملائمة لفترات الحفظ القصيرة نظراً لان العديد من الفعاليات الحيوية تستمر في هذه الدرجة الحرارية بالمقارنة مع درجة حرارة التجميد والتي تصل إلى -15مْ أو اقل أو استعمال النيتروجين السائل.

ب- التجميد :

وهي الطريقة الأبسط والأكثر استعمالاً لحفظ المزارع البكتيرية، إذ يمكن استعمال درجات حرارية تحت الصفر (-20 أو-80) م أو استعمال النتروجين السائل والذي فيه تنخفض درجة الحرارة الى -196 م ، إذ تعمل على تعليق أي فعالية بايولوجية وتعطي ثباتية جيدة وإمكانية الخزن لفترات طويلة فضلاً عن احتفاظها بحيوية عالية.

وجد أن لمعدل التجميد تأثير كبير على فعالية الخلايا، إذ وجد إن أفضل معدل لانخفاض الحرارة عند التجميد هو درجة مئوية واحدة لكل دقيقة، أما التجميد السريع فأنه يؤدي إلى تكوين بلورات ثلجية داخل الخلية، في التجميد بمعدل واطئ يؤدي إلى تكوين بلورات ثلجية خارج الخلايا وهذا يؤدي إلى تجفيف الخلايا نتيجة لسحب الماء منها مما يؤدي إلى تركيز المحاليل الالكتروليتية داخل الخلايا وبالتالي موت الخلايا ليس نتيجة التأثير الميكانيكي للبلورات الثلجية وإنما التسمم بالايونات.

6- <u>الحفظ بالنيتروجين السائل:</u>

يمكن حفظ الأحياء المجهرية وذلك بحفظها بدرجة حرارة منخفضة جداً تصل درجة الحرارة إلى -150م° وذلك باستخدام أجهزة تجميد بالنيتروجين السائل.
تتلخص العملية بتنمية الكائن ألمجهري على وسط غذائي مناسب ومن ثم تمزج (تعلق) في عامل يحفظها من الانجماد مثل 10% كليسيرول ثم يوضع المعلق في أنابيب زجاجية محكمة الغلق ثم تحفظ بالنيتروجين السائل. تعتبر هذه العملية مكلفة جدا بالإضافة إلى إمكانية عطب الجهاز وهذه من سلبيات الطريقة.

7- <u>الحفظ بالتجفيف :</u>

هو عملية سحب الماء من الخلايا بحيث يكون محتواها من الماء بحدود 10% والذي هو مقارب للمحتوى المائي الموجود في الخلايا المتحملة للجفاف التي يكون محتواها المائي اقل من 10% لذلك عند تجفيف الخلايا لا بد من تقليل المحتوى المائي إلى هذا المستوى، وتوجد أكثر من طريقة لسحب الماء من المواد الحية ولكل مجموعة من الخلايا طريقة ملائمة قد لا تلائم المجموعة الأخرى.
ذكرت بعض البحوث أن الفعاليات الحيوية يحصل لها تخميد عند التجفيف وذلك لأن للماء دوراً أساسياً في الفعاليات الحيوية، إذ يحافظ على تراكيب الأغشية الخلوية بالوضع الصحيح فضلا عن أن معظم التفاعلات الأنزيمية تتم في وسط مائي، ويجب أن تكون عمليات التجفيف متكاملة بحيث تترك كميات قليلة من الماء للحفاظ على الأحياء وأغشيتها أما عند عدم اكتمال عملية التجفيف فإن بقايا الماء تقوم بمزاحمة المواد الحامية Protectants على مواقع تداخلها مع الدهون الفوسفاتية وبذلك يلاحظ فشل عمليات التجفيف غير الكاملة، وتمتاز عملية التجفيف بعدة ميزات منها اختزال حجم النموذج نتيجة لسحب الماء ويمكن تشكيل الخلايا الناتجة بسهولة Formulation فضلاً عن أن إزالة الماء من الطور السائل اقل كلفة من إزالته من الطور الصلب بالتسامي وكذلك لا تحصل اجهادات التجميد نظراً لعدم مرور النماذج بهذه العملية.
وأشارت الدراسات الحديثة إلى استعمال التجفيف الرذاذي Spray-drying بدلاً من التجفيف بالتجميد Freeze-drying (التجفيد)عند تجفيف المزارع البكتيرية المنتجة للبكتريوسينات وكذلك المستعملة كبوادئ في (الألبان والاجبان) وذلك لكون التجفيف الرذاذي يستهلك أقل طاقة عند إزالة الماء ويحتفظ بعيوشية وفعالية أعلى مقارنة مع التجفيف بالتجميد نظراً لعدم تعرض المزارع البكتيرية لأضرار التجميد .

<u>تأثير إضافة المواد الحامية (الوقائية) Protectants :</u>

تُعد إضافة المواد الحامية Protectants إلى المزارع البكتيرية عند إجراء حفظها بالتجفيف من العوامل التي تزيد من قابليتها على مقاومة ظروف الخزن والاحتفاظ بحيويتها وفعاليتها لغرض منع الفقد أو الضياع الحاصل فيها خلال مدة الحفظ, ذكرت بعض الدراسات أن عمل المواد الحامية يتمثل بشكل رئيس في حالة الجفاف أو غيرها من الظروف بمنع التحولات لدهون الأغشية من الطور السائل والمائع البلوري إلى الطور الهلامي الذي يرافقه عادة تلف الأغشية ونضوح المواد الخلوية الداخلية إلى الخارج. أشار باحثين إلى ضرورة توفر المواد الحامية عند التجفيف وذلك لمنع تكوين الأواصر بين مواقع مختلفة على جزيئة الإنزيم أو بين جزيئات الإنزيم والتي تؤدي إلى تفاعلات غير قابلة للرجوع وبالتالي تثبيط فعالية الأنزيمات.

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

المخمر **Fermenter**

يعتبر جهاز المخمر من أساسيات الإنتاج في مجال التقنية الحيوية إذ يعتبر احد مقومات نجاح العملية الإنتاجية ويجب أن يكون القائم بالعملية الإنتاجية على معرفة تامة بعمل وأجزاء هذا الجهاز وذلك لضمان نجاح العملية الإنتاجية وخلوها من أي تلوث بالإضافة إلى تمكنه من تجاوز أي طارئ يحدث أثناء العملية الإنتاجية مثل ارتفاع أو انخفاض درجة الحرارة والpH بالإضافة إلى إضافة الوسط الغذائي أو سحب الناتج ومنع تراكمه أو تكون الرغوة والتي بمجملها تؤثر على الظروف المثالية لنمو الكائن ألمجهري .
والجهاز مصنوع من المعدن غير القابل للصدأ (Stainless steel) ويكون محكم الغلق ويتكون من ستة وحدات أساسية وهي:

اولاً- وحدة السيطرة والتنظيم: ومنها يتم السيطرة على العمليات التالية:

1- نظام السيطرة على التحريك:
حيث تستخدم سرعة تحريك تتراوح بين 10- 150 دورة/دقيقة وهذه تعتمد على طبيعة الوسط الغذائي المستخدم إذ بزيادة كثافة الوسط وصلابته نحتاج إلى سرعة تحريك أكثر وذلك لضمان الوصول إلى تجانس أكثر بين الوسط الغذائي واللقاح لزيادة المساحة السطحية للتلامس بين الوسط الغذائي واللقاح لرفع كفاءة العملية الإنتاجية.

2- نظام السيطرة على درجة الحرارة:
تكون درجة حرارة الجهاز بين 4 - 69م° وتعتمد درجة الحرارة المستخدمة على نوع وحالة الكائن ألمجهري المستخدم في الإنتاج, والمسؤول عن المحافظة على درجة الحرارة المطلوبة هي وحدة التبريد.

3- نظام السيطرة على الرغوة foaming:
قسم من السوائل التي تستخدم ضمن مكونات الوسط الغذائي لها القابلية على تكوين الرغوة عند تحريكها مثل المولاس وهذه الرغوة ممكن أن تؤثر على كفاءة العملية الإنتاجية من حيث تقليل كفاءة التهوية (في حال عملية الإنتاج هوائية) وبالتالي نحتاج إلى معدات تهوية إضافية, وكذلك لها دور في إحداث التلوث, ويمكن السيطرة على هذه الرغوة بطريقتين:

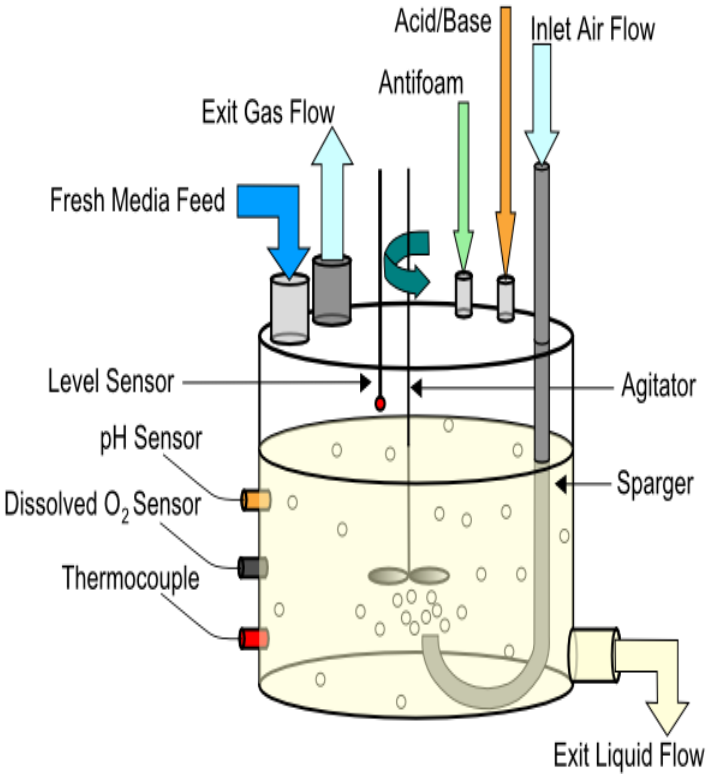
- الطريقة الميكانيكية: عند تكون الرغوة يتحسسها مجس موجود في أعلى وعاء التخمر عندها يعطي إيعاز إلى مقلب ميكانيكي يعمل على تكسير الرغوة ميكانيكياً
- الطريقة الكيميائية: عند تكون الرغوة يتحسسها مجس الرغوة الموجود في الجهاز ليعطي الإيعاز إلى مضخة خاصة تحتوي مواد مانعة للرغوة تقوم بضخها إلى وعاء الجهاز تقوم بالتفاعل مع هذه الرغوة وبالتالي إخمادها, توجد العديد من السوائل المانعة للرغوة مثل الزيوت المعدنية وهي الأكثر استخداماً وكذلك زيوت نباتية أو الحيوانية أو الكحولات وهذه محدودة الاستخدام.

4- نظام السيطرة على الpH داخل المخمر:
تختلف قيمة الأس الهيدروجيني داخل الجهاز باختلاف الكائن ألمجهري المستخدم والمادة المطلوب إنتاجها وبالتالي يجب المحافظة على قيمة الأس الهيدروجيني المثلى لعملية الإنتاج من خلال هذه الوحدة والتي تحتوي على مادتين منفصلتين احدهما لها تأثير حامضي والأخرى قاعدي, في حال تغير الأس الهيدروجيني المطلوب بالارتفاع أو الانخفاض عن القيمة المطلوبة تستلم هذه الوحدة ايعازاً من مجس خاص موجود في الجهاز يعمل على قياس الpH وبالتالي تقوم المضخة الخاصة بهذه الوحدة بضخ المادة المناسبة سواء الحامضية أو القاعدية لغرض تعديل الpH .

5- نظام السيطرة على O2 :
تختلف العمليات الإنتاجية بمتطلباتها للأوكسجين حيث تقسم العمليات الإنتاجية حسب حاجتها إلى الأوكسجين إلى هوائية وغير هوائية وهناك عمليات تحتاج إلى ظروف تهوية قليلة تسمى شحيحة التهوية, يمكن المحافظة على تلك المتطلبات من خلال هذه الوحدة والتي هي عبارة عن قطب أو الكترولیت يتكون من غشاء polypropylene والذي يدخل من خلاله الأوكسجين إلى خلية تحتوي على عمود من الرصاص وكاثود من الفضة, ويؤدي وجود الأوكسجين إلى تكون تيار في الوسط ويتم السيطرة على التلوث بواسطة فلترات خاصة معقمة.

ثانياً- وحدة التحريك:
وهي عبارة عن محرك (motor) مرتبط بجهاز منظم سرعة موجود في أسفل وعاء التخمر مثبت ببكرة وحزام ويحتوي على أربعة ريش تتحرك بسرعة ثابتة يتم السيطرة عليها بواسطة نظام السيطرة.
ج- وحدة التبريد: هذه الوحدة تكون مستقلة عن وعاء التخمر مرتبطة بواسطة انابيب تحتوي على ماء بارد التي تدفع الماء إلى جهاز التبريد, وتعمل هذه الوحدة عند ارتفاع درجة الحرارة في وعاء التخمر.
د- وعاء التخمر: وهو عبارة عن وعاء اسطواني الشكل مفتوح الطرفين يثبت من الأعلى والأسفل بواسطة ماسكات يمكن فتحها عندما يراد غسل وتعقيم الجهاز.
و- المسجل: يحتوي على ستة قنوات تتبادل على التسجيل على ورقة خاصة بالجهاز ويقوم بتسجيل ظروف عملية التخمر وتشمل تسجيل سرعة التحريك والpH و التهوية والحرارة واستخدام موانع الرغوة وغيرها من ظروف عملية التخمر.
هـ- المضخة: تستخدم لإدخال الوسط الغذائي وخروج المنتوج كما توجد في وحدات أخرى من أجزاء الجهاز مثل ضخ سوائل التبريد ومانع الرغوة والحوامض والقواعد للمحافظة على الpH.

فيما يلي تخطيط يوضح جهاز مخمر:



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

إنتاج الكحول الصناعي (الايثانول):

يمكن إنتاج الايثانول على النطاق الصناعي بطريقتين إما بالطريقة الحيوية (بالأحياء المجهرية) أو بالطريقة الكيميائية والتي تتلخص بتحويل الاثيلين المشتق من البترول أو الغاز الطبيعي إلى ايثانول بدرجة حرارة عالية بوجود الماء والعوامل المحفزة وقد تفضل الطريقة الحيوية بسبب ارتفاع أسعار البترول وعدم اقتصادية الطريقة الكيميائية. لتدخل في ذلك التقنية الحيوية والتي لها مجال واسع في دعم الاحتياج الكبير للطاقة من جوانب عدة من ضمنها باستعمال عمليات التخمر لإنتاج الكحولات بصورة عامة والايثانول بصورة خاصة وذلك لتعدد استعمالاته على النطاق الصناعي وفي مجال الطاقة. فمن المعروف إن أهم مصدر خارجي للطاقة على الكرة الأرضية هو الشمس ولكنها تكون بشكل متقطع ويصعب الاحتفاظ بها وخزنها لاستعمالها عند الحاجة. لذلك فمن الضروري توفير مصادر متجددة للطاقة كذلك هناك العديد من المؤشرات التي تستوجب إيجاد مصادر بديلة للطاقة كمصدر للطاقة بعد تضاعف أسعار البترول ومشتقاته بالإضافة إلى أن مصادر البترول معرضة للنفاذ يوماً ما لذلك فان إنتاج الكحول يمثل احد البدائل المهمة للطاقة, هناك عدة ميزات لإنتاج الكحول مفيدة منها:

- يمكن استعمال المخلفات الزراعية ومخلفات المصانع كمواد خاضعة في عملية الإنتاج وهذا له دور في الحد من التلوث وكذلك رخصها وتوفرها.
- توفر الإمكانيات لإجراء مثل تلك التخمرات وسهولة عمليات الفصل.
- عند استخدام الكحول كمصدر للطاقة فأنه يحترق دون إن يترك مخلفات.

كذلك هناك فوائد صناعية للكحول مثل:

- يستخدم كمذيب للعديد من المركبات في المجال المختبري والمواد الصيدلانية وبعض مواد التنظيف المنزلية ومواد التجميل والعطورات وعمليات التعقيم
- يستعمل كمادة مضادة للانجماد
- يشترك كمادة وسطية في تصنيع المواد التي تستخرج من النفط

اختيار المواد الخاضعة المستخدمة لإنتاج الكحول الصناعي:

يعتبر دقة اختيار تلك المواد من ضروريات العملية الإنتاجية وذلك لارتباطها بشكل مباشر بجودة وكمية الناتج وهنا العديد من العوامل التي تؤثر على على اختيار تلك المواد مثل:

- أسعار المواد الأولية وكلفة نقلها.
- ارتفاع محتواها من السكريات القابلة للتخمر.
- إن يكون الناتج الرئيسي لعملية التخمر هو الكحول مع نسبة قليلة من الشوائب وبذلك سهولة عمليات الفصل.

تقسم المواد الأولية المستخدمة في الإنتاج إلى قسمين:

أ- مواد تستعمل بشكل مباشر وهي التي تكون فيها تراكيز السكريات القابلة للتخمر بنسبة عالية وتشمل:

- عصير قصب وبنجر السكر واللذان يعتبران سريعا التلف لذلك يفضل نقله وإيصاله إلى المصانع بعناية ويمكن إجراء بعض المعاملات على العصير لزيادة ثباتيته ومقاومة التلف مثل تحلل جزئي لمنع تبلور السكروز أو تركيز العصير لتصل نسبة السكر فيه إلى 70 – 80% وممكن إضافة مواد مثبطة للأحياء المجهرية. ويمكن تحضيره بتقطيع القصب أو البنجر ويضاف إليه الماء الساخن 80م° ثم يعصر ويستخدم.

- ومن المواد الأخرى هي المولاس والذي يعاب عليه ارتفاع محتواه من ايونات الكالسيوم والتي لها تأثير مثبط على عمل الأحياء المجهرية.
- عصير الذرة والذي يعتبر مفيد وذلك لإمكانية زراعته في ظروف جوية متفاوتة.
- فضلات الفواكه بعد عصرها.

ب- مواد تحتاج إلى معاملات أولية أنزيمية أو كيمياوية لتحويل مكوناتها إلى مواد قابلة للتخمر وتشمل:

- المواد النشوية مثل الحبوب مثل الذرة والحنطة والشعير وغيرها وعملية التحضير تشمل التنظيف والطحن لتسهيل عملية الترطيب بالماء وتعديل الpH والطبخ لمدة 10 – 30 دقيقة ثم التبريد ثم إضافة الأنزيمات المحللة للنشأ.
- المواد السليلوزية الذي تكون متوفرة بشكل كبير من خلال النباتات ولكن من مساوئ استخدامها هو تركيبها المعقد مما أدى إلى الحد من استعماله كمادة خاضعة. من المعاملات التي تجرى عليه التحلل ألحامضي باستخدام حامض HCL بتركيز 0,1 – 0,2% لمدة 2 – 4 ساعات بعد ذلك تعادل الحموضة لمنع هدم السكريات الناتجة. كذلك ممكن إجراء معاملات التحلل الأنزيمي والتي تكون مفضلة في أكثر الأحيان.
- المخلفات النباتية.

من المواد الأخرى المستخدمة ضمن مكونات الوسط الغذائي هي المواد المساعدة للنمو مثل الفيتامينات والأملاح والمعادن.

مواصفات الكائن ألمجهري المستخدم في عملية التخمر:

- إن يكون الكحول هو الناتج الرئيسي لعمليات التخمر وبكميات كبيرة
- إن يكون معدل النمو والتخمر مرتفع ويساعد ذلك في اختيار مخمرات صغيرة الحجم
- لها القدرة على تحمل تراكيز سكرية عالية
- لها القدرة على تحمل تراكيز عالية من الايثانول
- لها القدرة على تحمل درجات حرارة عالية نسبياً خلال عملية التخمر لتقليل كلفة التبريد
- يجب إن يتلائم نوع الكائن ألمجهري مع تركيب الوسط الغذائي وهناك عدة أنواع من الأحياء المجهرية التي من الممكن إن تستخدم في عملية الإنتاج ولكن تختلف باختلاف تركيب الوسط الغذائي:

1- خميرة *Saccharomyces cerevisiae* تستخدم عند استخدام وسط غذائي سكريات بسيطة.وكذلك *S. uvarum* والتي تتميز بسهولة فصلها.
2- خميرة *Kluyveromyces fragilis* عند استخدام الشرش كمادة خاضعة والذي يتميز بارتفاع نسبة اللاكتوز وذلك لامتلاكها أنزيم اللاكتيز.
3- *Candida utilis* عند استخدام الأوساط الغذائية المحتوية على السكريات الخماسية والسائل المتخلف من صناعة الورق والذي يتميز بارتفاع محتواه من الكبريت.
4- بكتريا *Zymomonas mobilis* والتي تتميز بسرعة تخمير السكريات ضعف العملية باستخدام خميرة الخبز وتتحمل تراكيز عالية من السكر في وسط التخمر ولها قدرة إنتاجية عالية ولكن معوقات استخدامها تتمثل بصعوبة فصلها لصغر حجمها فضلاً عن قلة تحملها لتراكيز الايثانول العالية.

عملية الإنتاج:

تعتبر عملية إنتاج الكحول لاهوائية ولكن الأحياء المجهرية تحتاج الأوكسجين في بداية العملية لغرض بداية النمو والانقسام لذلك يجب توفير كمية قليلة من الهواء لتدعيم عملية النمو. تتلخص معادلة تحويل السكر إلى كحول كما يلي:

$C_6H_{12}O_6 + 2ADP >>>> 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP$

عملية إنتاج الكحول تعتمد على تغيير في المسارات الايضية التي تسلكها الكائنات المجهرية أثناء نموها في الوسط الغذائي وذلك باتجاه إنتاجها للكحول دون اللجوء إلى إنتاج الكتلة الحيوية ويعتمد ذلك على تقليل العامل المحدد للإنتاج وهو التهوية مع زيادة تركيز السكر بوجود كمية من الفوسفات. حيث أن الأوكسجين له في تحويل المصدر السكري إلى كتلة حيوية و CO_2.

<u>المواد و طريقة العمل لإنتاج الكحول باستخدام خميرة الخبز:</u>

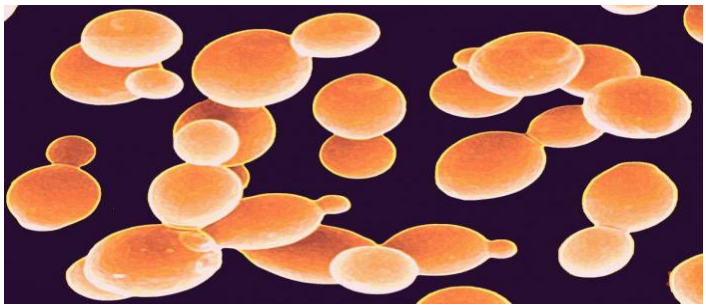
- تحضير الوسط الغذائي وكمايلي: (نترات الأمونيوم 1غم , كبريتات الامونيوم 1غم , فوسفات الصوديوم الحامضية 4غم , فوسفات البوتاسيوم الحامضية 2غم , كلوريد الصوديوم 1غم . مستخلص خميرة 1غم + المصدر الكاربوني) تذاب في لتر ماء مقطر.وتوضع الأوساط الغذائية في دوارق حجمية ذات فوهة صغيرة وتغطى بطبقة من الزيت وتسد بسدادة قطنية لتحديد كمية الهواء ثم يعقم بجهاز الاوتوكليف.
- تحضير عالق الخميرة وذلك بإضافة 2 غم خميرة إلى 100 مل محلول كلوريد الصوديوم تركيزه 0,85%.
- تلقح الدوارق الحاوية على الوسط الغذائي بلقاح الخميرة.
- تحضن الفلاسكات بدرجة حرارة 25 – 30مº لمدة 3 – 5 أيام
- بعد انتهاء مدة التحضين يتم الكشف عن الكحول الناتج وكمايلي:

يحضر محلول دايكرومات البوتاسيوم وحامض الكبريتيك المركز وتتم العملية بمزج 1 مل من السائل المتخمر مع قطرات من دايكرومات البوتاسيوم مع قطرات من حامض الكبريتيك بعد الرج يتكون لون اخضر للدلالة على وجود الكحول

- يتم بعدها فصل الكحول الناتج بالتقطير ويؤدي إنتاج كمية كبيرة من الكحول إلى خفض تكاليف الإنتاج بسبب انخفاض الحاجة إلى البخار خلال المراحل الأولى من التقطير.

المرحلة الرابعة علوم الأغذية / الكورس الربيعي
مدرس المادة : طارق نواف خليل

إنتاج خميرة الخبز



تعتبر هذه الصناعة من الصناعات المهمة في مجال التقنية الحيوية لما لها من أهمية اقتصادية كبيرة مهمة حيث تدخل خميرة الخبز في العديد من الصناعات المهمة خاصة في صناعة المعجنات والكحول والخل وغيرها من الصناعات فضلاً عن القيمة الغذائية العالية التي تتميز بها الخميرة وبذلك ترفع من القيمة الغذائية للمنتجات التي تدخل في صناعتها إذ تتميز الخمائر بارتفاع محتواها من الأحماض الأمينة وفيتامينات B والأملاح المعدنية, وتنتج خميرة الخبز في الوقت الحاضر بطريقتين هما الوجبات والمستمرة.

- طريقة الوجبات تعني مزج اللقاح والوسط الغذائي في المخمر وتهيئة الظروف الملائمة وغلق الجهاز لحين اكتمال عملية التحضين ثم يتم فصل الناتج
- الطريقة المستمرة تعني إدخال الوسط الغذائي بسرعة معينة تعادل كمية الناتج المسحوب.

ظروف الإنتاج:

1- الوسط الغذائي :

يعتبر الوسط الغذائي من العوامل ذات التماس المباشر بنمو خلايا الخميرة وهو الوسط الذي يحتوي على المكونات والعناصر الغذائية التي تتغذى عليه خلايا الخمائر لكي تستمر في النمو والتكاثر, في إنتاج خميرة الخبز يجب أن يكون الوسط يشجع انقسام الخلية أي يجب أن يكون طور النمو اللوغارتمي في أقصى مايكون لضمان زيادة كمية الناتج, (تشجيع نمو وتكاثر الخلايا) هناك عدة عوامل تحدد اختيار مكونات الوسط الغذائي منها:

- المادة المطلوب إنتاجها سواءاً كانت خلايا أو منتجاتها
- سهولة استخدامها كمصدر تغذوي من قبل الكائن ألمجهري
- لاتحتوي على تأثير سمي
- لاتتداخل مع المنتج

من أكثر المواد استخداماً كوسط غذائي لإنتاج خلايا الخميرة هي مولاس القصب ومولاس البنجر لما يتميزان به من محتوى مرتفع من السكريات القابلة للتمثيل من قبل خلايا الخمائر فضلاً عن احتوائها على الفيتامينات والأملاح المعدنية المهمة للنمو والتكاثر كما إنها من المواد الخام المتوفرة من مخلفات المصانع واستخدامه له دور في الحد من تلوث البيئة فضلاً عن رخص ثمنه وذلك له دور في تقليل كلفة الإنتاج وفي بعض الأحيان يستخدم في الوسط الغذائي مزيج من كلا النوعين لتدعيم الوسط الغذائي النهائي .

من ميزات مولاس البنجر يؤدي إلى إنتاج خميرة ذات لون كريمي فاتح أكثر قبولاً في السوق عن تلك الناتجة من استخدام مولاس القصب والتي تكون ذات لون غامق بسبب احتواءه على أصباغ تدمص على أسطح جدار خلية الخميرة وذلك يتطلب زيادة مراحل الغسل للتخلص من هذه الألوان وكذلك افتقاره لبعض العناصر الغذائية المهمة للنمو مثل البانتوثينيك والاينوسيتول.

ومن عيوب مولاس البنجر احتواءه على نسبة منخفضة من البيوتين والذي له دور في عملية التكاثر والنمو فضلاً عن احتواءه على مركب البيتين والذي هو مركب نيتروجيني لاتتمكن الخميرة من تمثيله وبالتالي يخرج مع السائل الناتج من عملية التخمر وبالتالي يزيد من مراحل فصل المنتوج فضلاً عن وجوده يزيد من تلوث البيئة وكذلك يعمل على زيادة المتطلب الاوكسجيني.

ولاستخدام المولاس كوسط إنتاج يجب معاملته ببعض المعاملات لأنه لايستخدم بحالته الخام وذلك لارتفاع نسبة المواد الصلبة فيه واحتواءه على بعض المواد النيتروجينية والأملاح بتراكيز مرتفعة تؤثر في نمو الخميرة. من هذه المعاملات التي تجرى على المولاس هي:

- معادلة الpH ، التعقيم ، تدعيمه ببعض العناصر الغذائية المهمة للنمو ، تخفيف التركيز ، طرد مركزي للتخلص من المواد العالقة والتي قد تؤثر على عملية التهوية وارتفاع نسبة التلوث

العناصر الغذائية التي تضاف مع الوسط:

أ- مصدر الكاربون: مثل السكريات الأحادية والثنائية والمواد غير السكرية مثل المركبات العضوية.
ب- مصدر النيتروجين: تستخدم الامونيا وكبريتات الامونيوم وفوسفات الامونيوم والبروتينات الذائبة وغيرها
ت- الفسفور: يستخدم فوسفات ثنائي أو أحادي الهيدروجين وهو عنصر أساسي في تركيب الخمائر
ث- المغنيسيوم: له دور في عملية النمو ويستخدم بشكل كبريتات المغنيسيوم.
ج- بعض المركبات التي يدعم بها الوسط الغذائي مثل البايوتين والبانتوثين والاينوسيتول

من الظروف المزرعية الأخرى هي التهوية:
حيث تعتبر هذه العملية هوائية فيجب توفير الهواء في خزانات التخمر لتوجيه خلايا الخميرة إلى التكاثر لان قلة التهوية تلجأ الخميرة إلى إنتاج الكحول وعادةً يعمد إلى تقليل ضغط الهواء قرب نهاية فترة التخمير وذلك للمساعدة على انضاج الخلايا ولإبقاء الخميرة على شكل معلق لحين فصلها من الوسط ، ومن الظروف المزرعية الأخرى هي الحرارة وال pH.

- طريقة إنتاج خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisia :*

1- تحضير اللقاح
تأخذ هذه العملية عدة مراحل لكي يتم الحصول على خلايا نشطة تدخل ضمن مكونات اللقاح في عملية الإنتاج وتبدأ العملية بنقل غرام واحد من الخميرة الجافة إلى 5 مل مستخلص المولت السائل المعقم وذات pH 4,6 ثم يترك المزيج لمدة نصف ساعة لغرض النقع
بعد ذلك يتم نقل حجم معين من المزيج إلى أطباق تحتوي على وسط Malt extract agar (مستخلص المولت والاكار) ثم تحضن الأطباق بدرجة حرارة 30م° لمدة 24ساعة وتلاحظ عملية النمو. (النموات الناتجة من هذا الوسط تنقل إلى اللقاح المنشط (1)
- تحضير لقاح منشط (1): حيث يستخدم الوسط الغذائي التالي:
10 غم مستخلص خميرة ، 10 غم فوسفات ثنائي الامونيوم ، 5 غم كبريتات النحاس ، تذاب المكونات في لتر ماء مقطر ويعدل ال pH إلى 4,6 ويوزع في فلاسكات مع مراعاة المساحة السطحية في كل فلاسك ويعقم بجهاز الاوتوكليف بعد إنهاء التعقيم يلقح الوسط من النموات الناتجة من المرحلة السابقة وتحضن بدرجة حرارة 30م° لمدة 24 ساعة وتلاحظ النموات الناتجة لكي تستخدم في تلقيح الوسط الغذائي المستخدم في تحضير اللقاح المنشط (2).

- تحضير لقاح منشط (2): حيث يستخدم الوسط الغذائي التالي:
1 لتر مولاس بتركيز 10% ، 4 غم يوريا ، 3,5 غم فوسفات ثنائي الامونيوم ، 2،5 غم كبريتات المغنيسيوم ، 2،5 غم مستخلص المولت ويعدل ال pH إلى 4,6 ويوزع في فلاسكات ويعقم ويلقح بإضافة 1 مل من النمو الناتج من الوسط السابق مع الرج ويلقح لمدة 24 ساعة أخرى , بعد انتهاء التحضين تستخدم النموات الناتجة في عملية إنتاج خلايا الخميرة

2- تحضير وسط الإنتاج:
تستخدم دوارق سعة 500 مل تحتوي على 100 مل من الوسط الغذائي التالي:
(مولاس مخفف بتركيز 5% سكر ذات pH 4,5 (يعدل الأس الهيدروجيني باستخدام حامض الكبريتيك 1ع ويسخن لدرجة الغليان (سوف تتكون رواسب) ثم يرشح) ثم يضاف للراشح المواد التالية:
- فوسفات ثنائي الامونيوم 0,32% - كبريتات المغنيسيوم 0,16% - يوريا 0,15%
ثم يضبط ال pH على 4,6 ثم يعقم الوسط بجهاز الاوتوكليف ويبرد.
- يضاف اللقاح بنسبة 5% إلى الوسط الغذائي ويحضن على درجة حرارة 30م° لمدة 24-48 ساعة في حاضنة هزازة.

- بعد انتهاء مدة التحضين يتم ترشيح السائل الناتج بإحدى طرق الترشيح والحصول على خميرة تصل نسبة الرطوبة فيها إلى 68- 70% ثم تقطع إلى أشكال اسطوانية ثم تجفف الخميرة بمجففات بدرجة حرارة 30-35م° لتكون جاهزة للتعبئة والاستخدام.

المواصفات القياسية للخميرة الناتجة:

- أن لاتزيد نسبة النيتروجين الكلي عن 8% لان زيادته عن ذلك يؤدي إلى تلفها بسبب زيادة المحتوى البروتيني
- أن تكون ذات قوة تخميرية عالية من خلال تقدير CO_2 الناتجة من عملية التخمر لكمية معينة من السكر في وقت محدد.
- أن تحتوي على نسبة عالية من الكربوهيدرات المخزنة والتي تعمل على استمرار التنفس الداخلي للخلية مما يزيد من فترة حيويتها وحفظها.
- أن تكون ذات نقاوة عالية من خلال انخفاض نسبة الأحياء المجهرية الملوثة.
- أن تكون ذات لون وطعم ورائحة مقبولة.
- يراعى عند فصل الخلايا من السائل المتخمر أن تكون في نهاية الطور اللوغارتمي حتى تكون ذات لون واحد ومتزامنة لكي تنشط في وقت واحد عند استخدامها في عملية التخمير
- أن تكون ذات محتوى مرتفع من فيتامينات B-complex وذلك باستخدام مواد خام غنية بهذه الفيتامينات وهذا له دور في زيادة القيمة الغذائية للمنتجات التي تستخدم بها.

تقدير حيوية وفعالية الخميرة:

تجرى هذه الاختبارات للتأكد من جودة خميرة الخبز الناتجة وذلك لارتباطها بجودة المنتجات التي تستخدم فيها إذ يجب أن تكون الخميرة بحالة فسيولوجية عالية لكي تؤدي الغرض المطلوب من استخدامها.

1- اختبار حيوية الخميرة:
يجرى هذا الاختبار لغرض الكشف عن الخلايا الحية والميتة في خميرة الخبز الناتجة وباستخدام كاشف ازرق المثيلين ويكون الأساس فيه هو أن الخلايا الحية لاتصبغ بصبغة ازرق المثيلين وذلك لكون الجدار الخلوي لخميرة الخبز يكون بحالة فعالة ولا يسمح بدخول الصبغة إلى داخل خلية الخميرة وتلاحظ تحت المجهر عبارة عن كرة محاطة بلون ازرق , على العكس من الخلايا الميتة والتي يكون فيها الجدار الخلوي غير فعال ويسمح بدخول الصبغة إلى داخل خلية الخميرة والتي تأخذ لون الصبغة وتظهر تحت المجهر على شكل كرة زرقاء.

طريقة العمل:
- تحضر صبغة ازرق المثيلين بنسبة (1 : 10000)في محلول منظم السترات (Citrate buffer) ذات pH 4،6 .
- يحضر معلق الخميرة بتركيز 1% على أساس الوزن الجاف
- يؤخذ 1 مل من الصبغة ويضاف إلى 2 مل معلق خميرة ويرج الخليط ويترك في درجة حرارة 25م° لمدة 10 – 15 دقيقة مع الرج لكي تتداخل الصبغة مع خلايا الخميرة.
- بعد انتهاء المدة تؤخذ قطرة من المزيج وتوضع على شريحة ميكروسكوبية وتفرش بمساحة 1سم2 وذلك باستخدام غطاء الشريحة ذات الأبعاد ذاتها
- ثم تلاحظ الشريحة تحت المجهر بقوة تكبير 40 وتحسب عدد الخلايا الحية والميتة في 20 حقل ميكروسكوبي ثم تحسب النسبة المئوية للحيوية باستخدام المعادلة التالية:

% للحيوية = (عدد الخلايا الحية / عدد الخلايا الميتة) × 100

2- اختبار فعالية الخميرة:

يجرى هذا الاختبار لمعرفة نشاط الخميرة وقدرتها على تحويل السكريات الموجودة في وسط التفاعل (خليط الإنتاج) إلى غازات Co_2 وحساب كميتها من خلال معرفة أوزان المواد الداخلة في التفاعل (كمية السكر) وكمية غاز Co_2 الناتجة في وقت محدد وذلك باستخدام جهاز قياس الضغط (Pressure meter).

طريقة العمل:

- يمزج 10 غم طحين مع 7 مل ماء مع 0,38 غم خميرة ثم تمزج لحين الحصول على عجينة متماسكة.
- تفرش العجينة في قعر الإناء الموجود في جهاز قياس الضغط ثم يغلق الجهاز.
- يوضع في حمام مائي بدرجة حرارة 30 – 35م° لمدة ساعة
- ثم يقرأ مقياس الضغط الموجود في الجهاز كل 15 دقيقة لملاحظة ارتفاع الضغط الناتج من إنتاج غاز Co_2 وهذه القراءة تعبر عن نشاط الخميرة.

تابع لمحاضرة انتاج الخميرة

المرحلة الرابعة / قسم علوم الاغذية / تقنية حيوية عملي

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 º م لحين استعمالها في تحضير الخميرة الطرية او الجافة الفعالة او الجافة الفعالة الجاهزة.

- لتحضير 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 ذات 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 º 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

هي الخميرة الناتجة بعد اج ا رء عمليات التجفيف في مجففات المضجع السائل حيث تستعمل سلالات من الخميرة محورة و ا رثيا لتتحمل ح ا ررة 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 الو ا رثية من خلال التحوير الو ا رثي. في هذه الطريقة تتم الاستفادة من بخار الماء المستعمل في التجفيف في التبريد. لذلك فان استعمال درجات الح ا ررة العالية عند 70 الى 80 º م يكون غير ضا ا ر بخلايا الخميرة وتستعمل هذه للوصول الى مستوى رطوبة عند 35 % ثم يتم استعمال ح ا ررة منخفضة عند 40 º 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.