التقنية الحيوية

و المايكروبايولوجي الصناعي

تأليف

الدكتور حسن خالد العكيدي

التقنيّة الحيَويّة

والمايكروبايولوجي الصناعي

تأليف:

الدكتور حسن خالد حسن العكيدي

دار زهران للنشر والتوزيع

عمان - شارع الجامعة الأردنية

تلفاكس ٥٣٣١٢٨٩

مع تحيات د. سلام حسين عويد الهلالي

https://scholar.google.com/citations?user=t1aAacgAAAAJ&hl=en

salamalhelali@yahoo.com

فيس بك... كروب... رسائل وأطاريح في علوم الحياة

https://www.facebook.com/groups/Biothesis/

رقم الايداع لدى دائرة المكتبة الوطنية

(٢٠٠٠/٢/٣٥٠)

رقم التصنيف : ٥٧٦

المؤلف ومن هو في حكمه: حسن خالد حسن العكيدي

عنوان الكتاب : التقنية الحيوية والمايكروبايولجي

الموضوع الرئيسي : ١- المايكروبايولوجي

بيانات النشر : عمان : دار زهران للنشر والتوزيع

* تم اعداد بيانات الفهرسة والتصنيف الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

حقوق الطبع محفوظة للناشر

إهداء

إلى النور الذي أضاء دياجير ظلمة غربتي باعثاً في الأمل والحياة والتجديد... غامراً وجودي بفيض حنانه ... وسمو خلقه... فكان وسيظل البلسم الذي يتوهج في أعماق أعماقي... مشعاً بالدفء مشرقاً بالسعادة التي لا يدركها إلا من عاش بين ظهرانيها... فغمرني باعثاً ومحققها لفظاً جسدتها مضموناً بأحاسيسه التي لا يشعر بها إلا من ذاق صبابة الهوى رغم ظلم السنين

إلى نور حياتي أهدي هذا الجهود تخليداً لأجمل محبة، أملاً عسى أن تستمر ما حيينا... باعثاً السعادة للآخرين . إلى زوجتي بمحبة جعفر.

المؤلف

بسم الله الرحمن الرحيم

المقدمة:

إن الحمد لله نحمده، ونستعين به، ونستغفره، ونعوذ بالله من شرور أنفسنا وأشهد أن لا إله إلا الله وحده لا شريك له وأشهد أن محمدا عبده ورسوله، أما بعد...

كانت الطبعة الأولى من هذا الكتاب والتي نفذت تحت عنوان التقنية الحيوية الميكروبية والتمور، والتي طبعت من قبل المركز الإقليمي لبحوث النخيل والتمور للشرق الأدنى وشمال أفريقيا (FAO)، وإن ازدياد الطلب على هذا الكتاب جعلني أفكر في إعادة طبعه بشكل جديد وبعنوان جديد شامل مع تجديد في بعض محتوياته ليكون لكل العاملين في حقل التقنية الحيوية الميكروبية وعلى اختلاف مستوياتهم الثقافية في هذا المجال، خصوصا وأن مكتبتنا العربية تفتقر إلى مثل هذه المصادر، وخصوصا والعالم يتسابق لإيجاد مصادر جديدة لإنتاج الكثير من المواد التي تخدم الإنسانية والتي يمكن إنتاجها من الأحياء المجهرية والتي أصبحت مصدرا مهما لكثير من المنتجات.

وقد حاولت أن أجمع هذه المنتجات في أربعة عشر فصلا تضمنت المبادئ الرئيسية لتقنية الأحياء المجهرية، التغذية عند الأحياء والمصادر الخام المستعملة في التربية الصناعية، مبادئ التعقيم، التربية والانتقاء والجمع المختبري للأحياء الصناعية، تصميم أجهزة التخمير، تقنية إنتاج البروتين من الأحياء المجهرية، تقنية إنتاج البروتين من الأعفان، تقنية إنتاج الأحماض العضوية، تقنية إنتاج الكحوليات، تقنية إنتاج الأنزيمات، تقنية إنتاج الأحماض الأمينية، تقنية إنتاج المضادات الحيوية، إنتاج مواد النكهة. أرجو أن

أكون قد وفقت في إيصال المعلومـات بشـكل يفيـد متفهمنا العربـي ومن الله التوفيق.

المؤلف

المحتويات

تقديم باللغة العربية

المقدمة 17

الفصل الأول

المبادئ الأولية والرئيسية لتقنية الأحياء المجهرية

التطبيقات الصناعية على وراثة وانتخاب الأحياء المجهرية 25

ديناميكية النمو للأحياء والجدوى الاقتصادية ودور الحاسوب 28

الفصل الثاني

المبادئ الأساسية في علم تقنية الأحياء المجهرية

استخدامات تقنية الأحياء المجهرية 38

عمليات تصنيع الأغذية 39

عمليات المايكروبايولوجي الصناعي 40

تحضير الكتلة الحيوية والمواد المترسبة في الوسط الزراعي 45

استعمال الأحياء المجهرية في التأليف الكيماوي 60

الفصل الثالث

التغذية عند الأحياء المجهرية والمصادر الخام

المستعملة في التربية الصناعية

التغذية عند الأحياء 63

الأحياء المجهرية واحتياجاتها المختلفة للمواد الغذائية 63

مصادر الطاقة 64

مصادر التغذية 66
أولاً: المصدر الكربوني 66
ثانياً: المصادر النيتروجينية 70
ثالثاً: الأملاح المعدنية 70
رابعاً: عوامل النمو 71
التغذية وتبادل المواد عند الأحياء 75
ميكانزم التغذية 75
المصادر الخام المستعملة في التقنية الحيوية 79

الفصل الرابع

المبادئ الأساسية في التعقيم والتطهير

ميكانزم التعقيم والتطهير 91
التعقيم عند درجة الحرارة العالية 93
أنواع التعقيم 94

الفصل الخامس

تقنية التربية والانتقاء والجمع المختبري لمزارع الأحياء المجهرية الصناعية

تربية الأحياء المجهرية 103
طرق عزل الأحياء 104
طرق عزل المزارع النقية 107
طرق العزل الميكانيكي 107
طرق العزل البيولوجي 108
طرق زراعة أو تربية الأحياء 111

المزارع ذات الإنتاج لمرة الواحدة 112

المزارع المتهورية 114

المزارع المستمرة 116

صيانة مزارع الأحياء المجهرية 121

جمع المزارع العامة 122

طرق صيانة مزارع الأحياء المجهرية 123

حفظ المزارع بالتجفيف 123

الحفظ على السطوح الأكرية الصلبة 124

الحفظ بالماء 125

الحفظ بالتجميد 125

الحفظ بالتجفيد 126

الفصل السادس

تصميم الأجهزة التخميرية

المقدمة 131

الأهداف 131

المؤثرات العلمية 135

القضاء على التلوث 135

السحب المعقم للعينات 136

المضافات الأخرى المعقمة 137

التعقيم 137

السيطرة و القياسات 138

بعض المؤشرات المتفرقة 140
اختيار الأجهزة 142
دورق التخمير 142
الأوعية الهزازة 145
أنواع المخمرات الصناعية 149
تهوية المزارع الساكنة 160
التهوية في الدوارق الهزازة 161
التهوية والتحريك في مزارع الأحياء المجهرية الصناعية 164
العوامل المؤثرة على امتصاص الأوكسجين 167
جهاز التخمير المختبري 172
معدل انخباط 173
فصل الرغوة 177

الفصل السابع

الترشيح ومعدات الترشيح

الفصل الثامن

تقنية إنتاج البروتين من الأحياء المجهرية

مقدمة 213
تقنية إنتاج الخمائر 240
الخواص المورفولوجية والبيولوجية للخمائر 240
المحتوى الكيماوي للخمائر 245
التغذية عند الخمائر 246

خمائر العلف من مصادر أولية نباتية 246

تحضير المزارع النقية للعملية الإنتاجية 248

الخطوات التقنية 249

تقنية إنتاج الخميرة الغذائية من عصير التمر 259

تقنية إنتاج الخميرة الغذائية من التمر من نوع C. Utilis 261

استعمالات الخمائر المغذية 265

الفصل التاسع

تقنية إنتاج البروتين من الأعفان

تخليق البروتينات من العفن 279

الزراعة العميقة 281

أنواع العفن للتربية العميقة 282

الموديلات المختبرية للإنتاج 284

العوامل المؤثرة في المزارع الإنتاجية 286

العلاقة بين المصدر الكربوني والمصدر النيتروجيني N/C 287

مكونات المايسيليوم العفني 289

إنتاج مايسيليوم العفن 291

الفصل العاشر

إنتاج الدهون من الأحياء المجهرية 297

الفصل الحادي عشر

تقنية إنتاج الأحماض العضوية

إنتاج حامض الكوجيك 307

إنتاج حامض الفورميك 312

إنتاج حامض الإيتاكونيك 314

إنتاج حامض الكلوكونيك 317

إنتاج حامض الليمون 319

إنتاج حامض الخليك 325

الفصل الثاني عشر

تقنية إنتاج الكحولات للأغراض الطبية والصناعية

المصادر الأولية 350

الأحياء المجهرية 350

إنتاج الكحول وكفاءة التخمير 351

التخمير الصناعي 357

إنتاج الكحول من التمور 361

الفصل الثالث عشر

تكنولوجيا إنتاج الأنزيمات عن طريق الأحياء المجهرية

أنزيمات الأحياء المجهرية 372

مصادر الأنزيمات 374

المزارع الصناعية لإنتاج الأنزيمات 375

طرق إنتاج الأنزيمات 377

الاستقلالية بين النمو وإنتاج الأنزيمات 387

الأحياء التي تؤلف أنزيم الجزوتيز 389

الفصل الرابع عشر

تقنية إنتاج الأحماض الأمينية بواسطة الأحياء المجهرية

حامض الكلوتاميك 417

حامض اللايسين 427

حامض التربتوفان 435

حامض الالنين 438

حامض الميثونين 141

حامض الاسبارجين 442

حامض الهوموسيرين 444

حامض الاورنيثين 445

حامض الفالين 447

حامض البرولين 448

الفصل الخامس عشر

إنتاج المضادات الحياتية

الطرق العامة لتحضير المضادات 457

طرق التربية المستمرة 459

الأحياء المجهرية – المجاميع الأساسية للمضادات الحيوية 462

المضادات الحيوية ذات الحوامض الأمينية 463

الأحياء المجهرية 465

التربية على نطاق صناعي للأحياء المصنعة للبنسلين 479
التغيرات الكيموحيوية أثناء التربية 479
التخليق المتعدد للبنسلين 480
السافيلوسبورين 484
التربية الصناعية للسلالات المنتجة للتتراسايكلين 490
الستربتومايسين 495
الأحياء المجهرية 497
التربية الصناعية للأحياء المصنعة للستربتومايسين 505
مانوزيد ستربتومايسين 508
النيومايسين 509
نوفوبيوتسين 511
الكانامايسين 515
الأوليندومايسين 517
ارثرومايسن 519

الفصل السادس عشر

إنتاج مواد النكهة

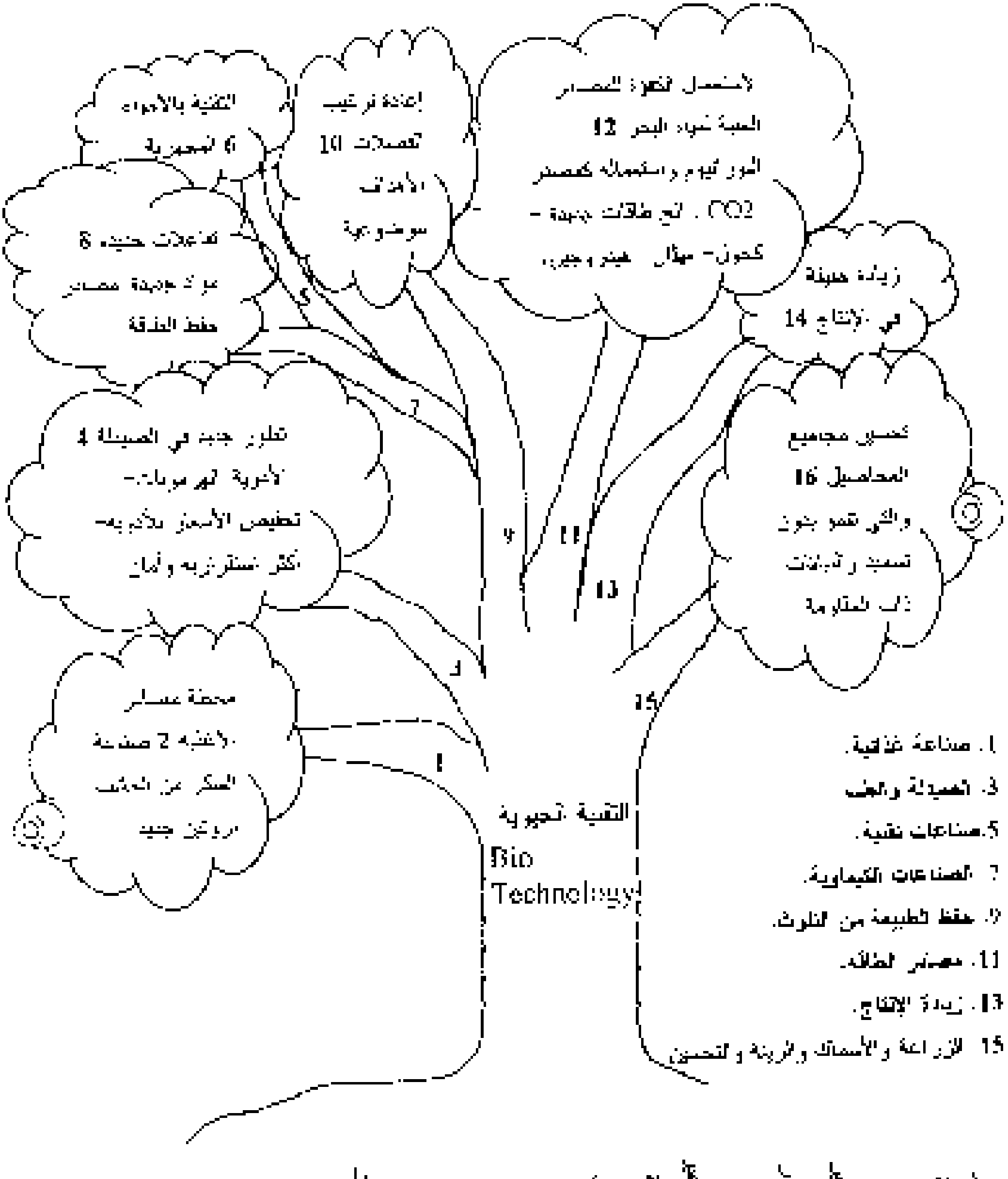
نكهة التفاح 525
نكهة الخوخ 525
نكهة فيتامين C 525
نكهة حامض اللاكتيك 526
نكهة حامض الستريك 526

تخمة حامض الخليك	527
الكوليسترول	527
الخاتمة	529
المصادر	530

المقدمة

منذ أن بدأ الطلب يتزايد على التحويل الميكروبي ونتيجة للإنتاج العـالي مـن المنتجات الميكروبية (Cell mass)، بدأ الاهتمام أيضـا علـى توطين الأحيـاء المجهرية ودراستها والعمل على صيانة الأحياء المجهرية والحفاظ على نوعيتها مع المحافظة على استقرارية العملية الإنتاجية، والتي تحتاج إلى دراسة أكثر وأكثر لمبادئ الإنتاج. وهذا يتطلب الإلمـام بعلـم الأحيـاء المجهريـة والمـايكولوجي والفايرولوجي والأنزيمولوجي والكيمياء الحيويـة والوراثة والهندسـة الكيماويـة والمعرفة بهذه العلوم تساعد المهندس الحيوي في ترجمة هذه الخصائص الحيويـة لهذه الأحياء إلى تطبيقات على مستوى صناعي بعد أن أصبح العالم يعـاني كثيـرا من مشكلة الطاقة.

فالسباق الحالي هو في كيفية استخدام التقنية الحيوية الميكروبية فـي إعطـاء أعلى نوعية للحياة في العالم خصوصا وأن تحضير بعـض المركبـات الكيماويـة والعقاقير والأغذية وإنتاج الطاقة أصبح حالة معقدة ومتداخلة بين التقنيـة الحيويـة والمجالات الأخرى للتطبيقات، وعلى هذا الأساس فإن التقنية الحيويـة ضروريـة أكثر في الوقت الحاضر كعلم أساسي في الكثير من الصناعـات، والشـكل التـالي يوضح معالم وأبعاد التقنية الحيوية.

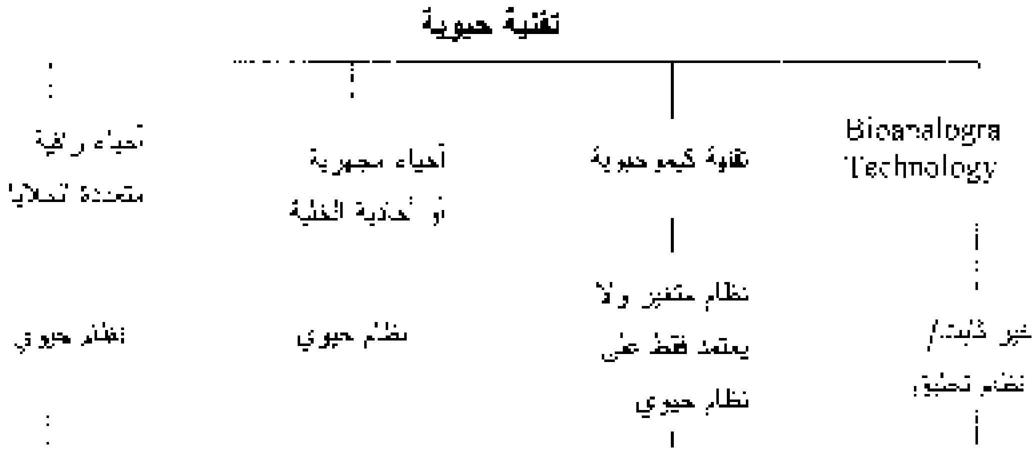


شكل ( ) يوضح معالم وأبعاد التقنية الحيوية

ومن الشكل يمكن أن نقول إن التقنية الحيوية تنطوي خلف العلوم لتؤمن المهارات الصحيحة للتطبيقات. وبإضافة إلى ذلك قد يظهر للوهلة الأولى بأن التقنية الحيوية لها ارتباط فقط بالأحياء المجهرية وعملياتها، ولكن المخطط التالي يوضح بأن تقنية الأحياء المجهرية لا يمكن أن تكون هي الأساس في كل عمليات التخمير وخصوصا التجارية منها، والتطور الوحيد هو في صناعة الأنزيمات حيث تكون الكيموحيوية هي جزء من التقنية الحيوية.

وهنا لا بد أن نعطي فكرة أساسية عن التقنية الحيوية للأحياء المجهرية حيث كان لها أثر كبير على واقع الإنسان منذ قديم الزمان حيث كانت تجري بواسطته الكثير من العمليات الحيوية المفيدة، فمثلا تحول سكر العنب إلى نبيذ وتحول النبيذ إلى خل. علما بأن تصنيع الجبنة والخبز يعتمد اعتمادا كليا على دور الأحياء المجهرية. لذا كانت المؤشرات الأولى لاكتشاف الأحياء المجهرية ودورها من قبل فان ليفنهوك (Van Leeuwenhook) وتبعه العالم (Pasteur) ثم توالت الاكتشافات للتعرف على التخمرات اللبنية والكحولية، ثم توالت الدراسات لمعرفة مسببات التخمير حيث استطاع (Ragger) من الاستفادة من مستخلص الخمائر المأخوذ من خلايا الخمائر الحية وتأثيرها على المحلول السكري وتحويله إلى كحول، ثم تبع ذلك العالم (Raustrick) حيث أشار إلى أن الأحياء المجهرية يمكنها إنتاج مركبات عضوية معقدة من مصادر غذائية، ثم توالت الاكتشافات الواحدة بعد الأخرى فتم الحصول على الكحول، الكليسرين، الأسيتون، والبنسلين والستربتومايسين... الخ. وفي وقتنا الحاضر فإن العمل بالتقنية الميكروبية صار

بخطوات سريعة خصوصاً في التطور التكنيكي والذي بدوره أعطى شواهد كثيرة وثمينة في العمليات التصنيعية.



ومن الجانب الآخر يفضل عند استعمال الأحياء المجهرية الصناعية في أي عملية صناعية أن تقدر الكلفة الاقتصادية للمنتوج بحيث تكون الكلفة الحيوية الناتجة ذات فائدة اقتصادية. فمثلاً عند إنتاج الخمائر أو المواد الأخرى المختلفة والتي تنفصل من الوسط عند نمو الأحياء المجهرية فيه فإنها تزيد من الكتلة الحيوية للأحياء. ومن ثم تبدأ بإنتاج المواد وتبدأ من الكحولات البدائية والمضادات الحيوية أي من الجزيئات ذات الوزن الجزيئي الواطئ إلى أن تصل إلى الأنزيمات ذات الوزن الجزيئي العالي، ويمكن حصر المنتوجات الميكروبية بالمنتجات التالية:

1. مشروبات كحولية – مثل النبيذ، البيرة.

2. مذيبات عضوية -- مثل الأسيتون، كحول الإيثايل والميثيلي.

3. الأحماض الأمينية مثل اللايسين، الكلوتامين...الخ.

4. الأحماض العضوية مثل حامض الليمون، حامض اللاكتيك والخليك..الخ.

5. فيتامينات مثل الرايبوفلافين Vit. B12.

6. مواد غازية مثل ثاني أكسيد الكربون والنيتروجين.

7. مواد غذائية مثل الجبن، المخللات، الخبز.

8. المضادات الحيوية مثل البنسلين، ستربتومايسين، تتراسايكلين...الخ.

9. الخمائر مثل خمائر الخبز، خمائر العلف.

10. الأنزيمات مثل الأنفرتيز، البكتينيز، الأميليز...الخ.

11. الهرمونات مثل حامض الجبرلين Gibrilic acid.

12. الستيرويدات مثل الكورتيزون ومشتقاته.

13. مواد مكسبة للطعم Mono Sodium glutamate.

14. الجلسرين.

15. الكاوتشوك (المطاط).

16. الدكستران.

الفصل الأول

المبادئ الأولية والرئيسية لتقنية الأحياء المجهرية

التطبيقات الصناعية على وراثة وانتخاب الأحياء المجهرية:

تطور علم تقنية الأحياء المجهرية بحجم كبير في خلال النصف الثاني من القرن العشرين. خصوصا وقد حضرت الكثير من المنتجات المهمة في الزراعة والصناعة والطب (مضادات حيوية، فيتامينات، فلوريدات، ستيرويدات، أحماض عضوية، هرمونات، بوليمرات، أنزيمات، مبيدات...الخ).

تعلق أهمية كبيرة على التطور التكنولوجي لعلم الأحياء المجهرية واكتشاف الكثير من الأحياء المجهرية في الطبيعة، واستخدام الكثير من المواد الخام التي تصلح لأن تكون مادة غذائية لهذه الكائنات وغيرها.

ومن الظروف المحددة للنجاح هي دراسة السلالات المصنعة والعالية الإنتاج ودراستها من الناحية الوراثية والتحكم في هذه السلالات وراثيا لأجل انتخاب أحسن السلالات إنتاجا. حيث أن اكتشاف الكثير من العوامل المؤثرة لاستحداث الطفرات الوراثية (Mutations)، ومن هذه العوامل كيماوية وفيزيائية حيث غيرت كثيرا من واقع حياة الأحياء المجهرية.

إن استعمال هذه العوامل لإجراء طفرات جينية لعدد كبير من السلالات المعروفة والمشهورة أعطت إمكانية كبيرة لتطور تكنولوجيا علم تقنية الأحياء المجهرية الصناعية حيث حصل نتيجة هذه الطفرات على سلالات زاد إنتاجها مئات المرات، وكمثال عليها السلالة المصنعة للبنسلين حيث ازداد إنتاجها عند

تعريضها تحت تأثير عامل أشعة فوق البنفسجية أو استعمال اثيلين أمين وغيرها من المواد...الخ، أو التحكم بأي صفة أخرى في السلالة. كما أن إحدى السلالات من جنس (Actinomycetes) التي كانت تنتج المضاد الحيوي كلوروتتراسايكلين (Chlorotatracyclin)، ونتيجة لهذا الاكتشاف أصبحت تؤلف المضاد الحيوي (Tetracyclin).

إن تحضير السلالات ذات الإنتاج العالي من المواد الضرورية لا يتوقف على الانتخاب الوراثي فقط بل إن هناك سلالات ذات إنتاجية عالية في الطبيعة يمكن استغلالها وتحسين نوعيتها لكي تكون أكثر حيوية، والمثال عليها البكتيريا (Propionbacterium Shermanii) التي تؤلف (30)ملغم/مسل فيتامين B_{12} والسلالة (Eremotheicum oxhbyi) التي تنتج من (1) طن كربوهيدرات (25)كغم فيتامين B_{12}، وهنالك الكثير من الأمثلة.

وفي السنوات الأخيرة دخل علم تقنية الأحياء المجهرية بعداً آخر نتيجة الانتخاب الوراثي حيث تم الحصول على الكثير من السلالات التي تنتج أكثر من (100) ستيرويد ومشتقاته لمختلف المستحضرات. كما تم الحصول على بعض السلالات التي تعمل على تحويل الستيرويدات من نوع إلى آخر والمثال عليها السلالة (Digimella Xadospore) والتي تحول (50%) من ديزوكسي هيدروكورتيزون... ومن هنا نرى أن الوراثة لعبت دوراً كبيراً في تقنية الأحياء المجهرية، حيث تم تحديد السلالات والمزايا والمواصفات وتحديد المنتجات.

ومن العوامل الوراثية الأخرى التي ساعدت على تطور علم تقنية الأحياء المجهرية هو اكتشاف الوظائف أو الدالات الكيموحيوية واكتشاف الجين المعقد (Complex gen) الذي يمثل وحدة عنصر لا غنى عنه حيث تتوارثه الأحياء من الآباء.

إن هذه الاكتشافات ساعدت على دراسة سلوكية الأحياء المجهرية وكيفية التعامل معها لأجل الحصول على تغيرات في الوظائف والدالات الكيموحيوية بواسطة بعض العوامل الكيماوية والفيزيائية التي تحدث هذه التغيرات والتي نتيجتها ازداد تراكم المواد المنتجة من قبل هذه الأحياء والتي بدورها أعطت تطبيقات واسعة لعلم تقنية الأحياء المجهرية.

إن تطور علم الوراثة والتربية والتحسين واكتشاف منظمات الوراثة وغيرها من الأمور ساهم إلى حد كبير في تطور هذا المجال. كما أن الدراسات والاكتشافات التي أوضحت الكثير من التفاعلات الحاصلة في جسم الأحياء المجهرية وكذلك عن طبيعة وتطبع هذه الأحياء في الأوساط البيئية الغذائية المختلفة، إضافة إلى معرفة أي تغيير في المنظمات الوراثية للكائن المجهري سيعبر عن واقع العمليات في جسمه والذي بدوره سيؤدي إلى حدوث تغيرات في نظام عملها الكيموحيوي وبنتيجتها سانتج منتجات نهائية تعرف باسم السلالة ورقمها، فمثلا السلالة (*Micrococcus glutamicus auxotrophic strain*) والتي تنتج (30) غم/لتر حامض اللايسين (Lysine) يمكن بواسطة الانتخاب

الوراثي والتأثير على المنظمات الوراثية، زيادة إنتاجية السلالة. وهنالك أمثلة كثيرة على الدراسات الوراثية والمطفرات الكيماوية والفيزيائية.

ديناميكية النمو للأحياء والجدوى الاقتصادية ودور الحاسوب:

إن التطور الحاصل في علم الأحياء المجهرية وفسلجتها، وكذلك التعرف بشكل مفصل على سلوكية الكائن المجهري واحتياجاته وكذلك التعرف على مفاصل الدقيقة لنموه ومعرفة احتياجات هذه المفاصل إلى التغذية المستمرة وأين يكون الاستهلاك الكبير من المواد الأولية، وأين يكون الدور الذي تتوازن فيه كمية الاستهلاك وعملية التكاثر، وكذلك معرفة المفصل المهم في عملية التمثيل الأيضي وزمنه والذي يكون له الدور الصناعي الإيجابي والاقتصادي في عملية الإنتاج لأي منتج ميكروبي. لذا كانت هذه المفاصل الشغل الشاغل لكثير من العاملين في حقل تربية الكائنات المجهرية لتثبت الفترة الضرورية للإنتاج في عمر الكائن المجهري حتى يمكن الدخول في العملية المايكروبيوتوجية الصناعية لإنتاج أي مادة بشكل اقتصادي وذلك لتقليل الفترة الزمنية للإنتاج حيث تبدأ الكائنات المجهرية فعلا بالتمثيل الأيضي، وكلنا يعلم بأن الكائنات المجهرية تمر بالأدوار الرئيسية للنمو وهي: -

1. الطور البدائي (Lag phase).
2. الطور اللوغارتمي (Logaritmic phase).

3. الطور الثابت (Stationery phase).

4. طور الموت (Death phase).

وما يهمنا من هذه الأطوار هو الطور الثابت (Stationery phase)، فكلما دخلنا في هذه المرحلة بسرعة في العملية المايكروبيولوجية فإن كفاءة العملية الإنتاجية ستكون عالية وفترة التخمير ستكون أقصر، لأنه لو تركنا العملية تمر بالأطوار الأول والثاني (الابتدائي واللوغاريتمي) فإنه سيحتاج إلى وقت (زمن) ويزيد في كلفة الإنتاج، وكذلك سيؤثر على محتويات الوسط الغذائي حيث سيستهلك جزء منها وأهمها المصدر الكربوهيدراتي والمصدر الأزوتي والفسفوري والعناصر الضرورية. لذا فإن الاهتمام بديناميكية أي كائن مجهري مستخدم أصبح أمراً ضروري جدا لأنه يختصر العملية الإنتاجية، إضافة إلى الاستفادة القصوى من المواد الأساسية للوسط الغذائي. وفي هذه الحالة يجب إعداد الكائن المجهري مسبقاً لكي يكون في الطور المهيأ للعمل الإنتاجي.

الحاسوب ودوره في عمليات التخمرات الصناعية:

إن للحاسوب الفضل الكبير في تطور علم البايوتكنولوجي وبخطوات متسارعة خلال الثلاثين سنة الماضية، حيث ذلل الحاسوب الكثير من الصعوبات التي كانت تجابه مهندس البايوتكنولوجي، ويمكن تلخيص هذه الصعوبات في النقاط التالية:-

1. صعوبات في مجال الوقت المبذول لأي عملية تكنولوجية.
2. صعوبات في مجال التحكم ببعض الأجهزة عن بعد.
3. صعوبات في مجال تسجيل المعلومات عن عملية التخمير وسلوكياتها.
4. صعوبات في تنفيذ برامج تكنولوجية لوقت طويل.
5. تقليل الأيدي العاملة في هذا المجال ومنع التلوث.
6. الدقة بالمعلومات.

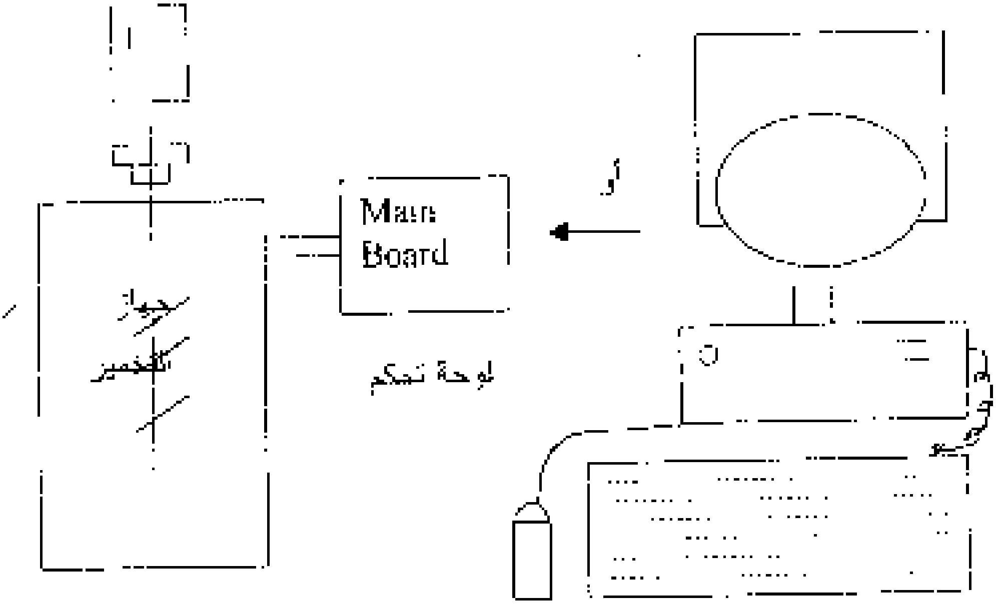
والذي يهمنا من الحاسوب هو الآتي: -

- الحرارة (حرارة التخمير): يمكن التحكم بدرجة حرارة المخمرات (Reacters) بواسطة برمجة الحاسوب على درجة الحرارة المطلوبة.
- درجة الأس الهيدروجيني: يمكن التحكم بالأس الهيدروجيني (pH) لوسط التخمير بواسطة الحاسوب بحيث يبرمج الحاسوب لكي يعطي الأمر إلى المحاليل الخاصة لتعديل الحموضة (pH).
- التهوية: يمكن التحكم بكمية الهواء المطلوبة الداخلة إلى المخمرات أيضا بواسطة البرمجة.

- الكثافة: يمكن برمجة الحاسوب لكي يسجل كثافة سائل التخمر في الأوقات التي يحتاجها مهندس البايوتكنولوجي.
- نضوب المواد: يمكن برمجة الحاسوب لكي يسجل كيفية نضوب المواد الأساسية (كالكربوهيدرات) في سائل التخمر والأمر بتغذية سلالات المزرعة بكمية من المادة المطلوبة ونفس الشيء بالنسبة إلى الأزوت والفوسفور والعناصر الغذائية الأخرى.

وأخيراً فمن خلال الحاسوب نستطيع معرفة بدء عملية التخمير وكذلك نهاية عملية التخمير، وكذلك الاضطرابات التي تحصل خلال عملية التخمير. لهذا فللحاسوب دور كبير في تطور علم البايوتكنولوجي، إضافة إلى ذلك فللحاسوب أيضاً أهمية كبيرة في الدراسات الفسلجية والوراثية والتصنيف المايكروبيولوجي.

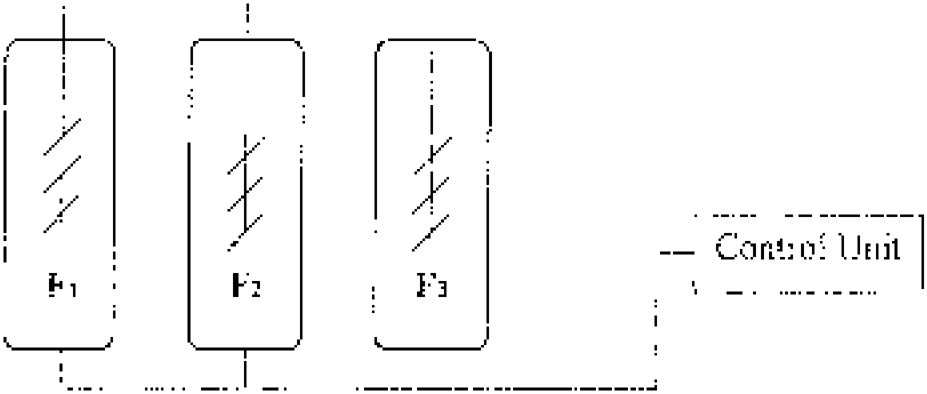
وأخيراً وليس آخراً فإن الشركات العالمية في هذا المجال بدأت ببيع بعض البرامج لتقنيات مختلفة ولخطوط إنتاجية في عالم المايكروبايولوجي. أما التطبيقات في مجال دور الحاسوب في المايكروبايولوجي التقني وهذه المخطط لبعض العمليات التي تتم.



يتم برمجة المخمر إما عن طريق:

1. جهاز الكمبيوتر الملحق بالمخمر (main Board)، حيث يتم تزويده بكافة المقاييس والمعايير المطلوبة لكي يتم تنفيذها بالحدود العليا والدنيا من درجات حرارة، تهوية، حموضة، العناصر اللازمة، الوسط البيئي، وعند حدوث أي تغير في هذه المعايير يتم إرسال إيعاز إلى الكمبيوتر بواسطة الحساسات الموجودة في المخمر ليتم معالجة هذا التغير أوتوماتيكيا.
2. ربط جهاز كمبيوتر بجهاز (main Board) وبرمجته وإعطاءه كافة المقاييس والمعايير المطلوبة للعملية.

وقد تم تطوير السيطرة هذه لتشمل المخمرات الثنائية والمتعددة (Multi Fermenter) لكي تقوم بالعمليات الحيوية المختلفة واللازمة عن طريـــق الحاسوب.



الفصل الثاني

المبادئ الأساسية في علم تقنية الأحياء المجهرية

Fundamental Principles in Microbial Biotechnology Sciences

المبادئ الأساسية في علم تقنية الأحياء المجهرية:

(Fundamental Principles in Microbial Biotechnology Sciences)

منذ القدم عرف تأثير الأحياء المجهرية في الصناعة وخصوصاً في إنتاج الكحول – الشراب، البيرة، الخل وكذلك تأثيرها في صناعة الأجبان. كل هذا وبالاعتماد على العلوم الأخرى فقد تطور استعمال الأحياء وتوسع أفق التكنولوجيا في هذا المضمار وتطورت المعدات خصوصاً بعد أن قدمت علوم الأغذية الأخرى الآن واسعة لهذا الحقل، مما حدا بالباحثين في التوسع والدراسة في هذا المجال وتكللت جهودهم باستحداث علم التقنية الحيوية الذي يتضمن التأليف والتخليق الميكروبي للمواد الغذائية والكيماوية ومواد أخرى ذات الأهمية الاقتصادية. ومن هذا الباب سوف نعطي أحد التصنيفات للعمليات المايكروبيولوجية الصناعية من منطلق التكنولوجيا وبالاعتماد على مزايا وصفات المنتوج النهائي.

استخدامات تقنية الأحياء المجهرية:

1) عمليات تصنيع الأغذية:

أ. تحويل المواد الغذائية الأساسية إلى مواد أخرى.

ب. تحويل جزء من المادة الغذائية إلى مواد أخرى والتي بدورها ستغير من الطعم (المذاق)، الشكل الخارجي، الإنضاج.

2) عمليات المايكروبيولوجي الصناعي:

أ. تحضير أحياء مجهرية حية.

ب. تحضير مادة حيوية ميكروبيولوجية (Biomass).

ج. تحضير منتجات من داخل جسم الأحياء المجهرية نتيجة هدم الجدار الخلوي.

د. تحضير المادة الحيوية (Biomass) مع تراكم مواد نتيجة تأثير الأحياء على مكونات الوسط الغذائي.

هـ. استعمال الأحياء المجهرية في التركيب والتأليف الكيماوي وتحويل مركب إلى آخر.

1) عمليات تصنيع الأغذية:

أ. تحويل مادة غذائية أساسية إلى مواد أخرى:

وهذه تعني تحويل مادة غذائية أساسية بواسطة الأحياء المجهرية إلى مواد أخرى نتيجة ظروف معينة وبتأثير عوامل كثيرة لسير العملية الميكروبيولوجية، ومثل على ذلك تحويل عصير الفاكهة إلى شراب أو كحول.

ب. تحويل جزء من المادة الغذائية إلى مواد أخرى:

أيضا هي إحدى العمليات في تصنيع الأغذية ولكن بطرق مايكروبيولوجية حيث يتضمن تحويل جزء من المادة الغذائية أو تحويلا لبعض المواد في المادة الأصلية نتيجة عمل الأحياء، والتي بدورها ستغير من طعم ومذاق وشكل ونضوج المادة، ومن الأمثلة عليها الجبن ومنتجات الألبان، اللحوم، تخمير الخبز، وكذلك خمائر العلف.

2) عمليات جوهرية للمايكروبيولوجي الصناعي:

أ. تحضير الأحياء المجهرية الحية (Biomass):

وهذا يعني تحضير الكتلة الحيوية (Biomass) نتيجة نمو الأحياء المجهرية خصوصا السلالات المنتخبة والقياسية على الأوساط الغذائية سواء كانت أوساطا سائلة أم صلبة. وقد تكون هذه الـ (Biomass) ذات فائدة طبية أو ذات فائدة زراعية أو صناعية.

ولأجل الإنتاج، مخطط رقم (1) يوضح المراحل الإنتاجية والتي تبدأ بتحضير المزرعة الميكروبية والحفاظ عليها من تغير صفاتها، وذلك بالزراعة المستمرة وبأوقات مناسبة، حيث تعتبر المرحلة الأولى في الإنتاج (مادة لقاحية) ثم تبدأ المرحلة الثانية وهي معرفة الظروف المختبرية من (pH)، حرارة، فترة النمو، تهوية ..الخ. كذلك معرفة الاحتياج الغذائي للسلالة قبل كل شيء، وإعداد الوسط الغذائي بالشكل المناسب بشكل مستحلب أو محلولا منتشرا وأحيانا قد يتطلب إضافة بعض المواد الكيماوية لأجل تنشيط مكونات الوسط ولأجل تأهيل الكائن المجهري

للعمل، المثال عليها وهو إنتاج الخمائر من مواد سليلوزية، فتحتاج إلى مواد تحليل السليلوز ومن ثم يمكن للخمائر من استهلاك الوحدات الجلوكوزية، ثم تأتي بعد ذلك العملية التكنولوجية. فبعد تلقيح الوسط باللقاح الميكروبي يتم ملاحظة درجات الحرارة، الضغط، الحموضة، التهوية الكاملة للعملية التكنولوجية. ويجب المحافظة على وحدة التعقيم للعملية ككل لكي يمنع التلوث.

إن نمو المزرعة المايكروبيولوجية، في كثير من الأحيان لا ينتهي بمرحلة واحدة، مخطط رقم (1). ففي المرحلة الأولى تربى الأحياء إلى درجة معينة من النمو وتعتبر كمادة لقاحية للوسط الغذائي الجديد وبحجم أكبر، وذلك بإضافة حجوم جديدة وبتخافيف معينة تتناسب وكمية المادة اللقاحية حيث سيعطي نموا شديدا لل (Biomass)، وبذلك نحصل على الحجم النهائي للوسط المزرعي كما هو مبين في المخطط رقم (2).

مخطط رقم (2):

جوهر هذا المخطط هو فصل البايوماس (Biomass) عن السائل المزرعي نتيجة فصل المواد الصلبة من السائل، فنحصل على (Biomass) مركزة ونحصل أيضا على السائل المزرعي بكمية كبيرة، والخطوة التالية هي كبس أو ضغط ال (Biomass) أو تجفيفه.

ب) التحضير المايكروبيولوجي للكتلة الحيوية (Biomass):

إن إنتاج الكتلة الحيوية تعتمد اعتمادا كبيرا على مقومات الوسط الغذائي ثم على طريقة الفصل وعملية التجفيف. فالمخطط رقم (3) يوضح العملية من المزرعة

الذائبة إلى عملية الفصل ثم التجفيف والوصول إلى المنتوج النهائي. كذلك يجب السيطرة على العملية للحصول على المنتوج بالشكل المطلوب.

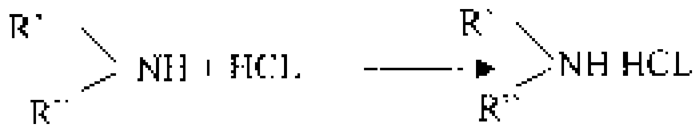
ج) تحضير المنتجات التي تحتويها الأحياء المجهرية:

وهذا يتضمن تحضير وفصل وتنظيف بعض المواد التي تحتويها أجسام الأحياء المجهرية، حيث يمكن الحصول على هذه المواد بعد هدم أجسام الأحياء المجهرية فالمخطط التكنولوجي يتضمن الحصول على البيوماس (Biomass) أولاً ومن ثم العمل على الكتلة الحيوية الحاصلة حيث تفصل وتنظف ومن ثم تجري عملية فصل هذه المواد من جسم الأحياء المجهرية، والمخطط رقم (4) يبين التخطيط الأساسي والمثالي لهذا النوع من الإنتاج حيث ان المادة المرغوبة في جسم الكائن الميكروبي تستخلص بواسطة الطرق الآتية:

أ. الطريقة الترسيبية:

من سائل المزرعة الحاصل ممكن أن تؤخذ المادة المرغوبة بالظروف المثالية مع التوخي من عامل الإذابة. المنتوج يمكن أن يكون راسبا بشكل ملح مع بعض الأيونات المضافة أو بشكل مركب معقد كما هو موضح بالمخطط رقم (5) حيث يمثل المخطط طريقة الترسيب، ويمكن إيضاحها بما يأتي: -

المادة المرغوبة س تظهر عند إضافة المادة ص الملح المتكون غير الذائب أو المعقد غير الذائب هو س ص. وفي بعض الحالات يمكن أن يكون المركب المرغوب من قاعدة عضوية ومثال تلك المركبات الأمينية والتي تكون مع الحوامض أملاحا غير ذائبة.



ملح غير ذائب

المركب المرغوب هنا يمكن أن يكون حامضا عضويا و الذي بنتيجة اتحاده مع الأيون اللاعضوي مثل الكالسيوم يكون ملحا غير ذائب.

$$2R \longrightarrow COOH + Ca^{++} \longrightarrow (R\ \ COO)_2\,Ca + 2H^{+}$$

و المادة المرسبة يمكن أن تضاف على شكل محاليل بعد إذابتها في الماء وتكون إضافتها بكمية معينة وبنتيجة المزج نحصل على المادة المرغوبة و المطلوبة.

هذه الطريقة يمكن اعتمادها نظريا ولكن من الناحية العملية تكون صعبة التطبيق، وللتوضيح فإن محلول المادة الاعتيادي يكون ذا حجم كبير مع التركيز القليل للمادة و هذا يعني وجوب إضافة كمية كبيرة من محلول المادة المرسبة إلى أن نحصل على ترسيب كل المادة المطلوبة أو المرغوبة. لذا يجب دراسة تركيز المادة في محلول المادة المرسبة وكذلك تركيز المادة المرغوب الحصول عليها، آخذين بالاعتبار ظروف التفاعل من (pH) ، الحالة الالكترونية، درجة الحرارة...الخ.

ب- هنالك بعض الطرق التي ترسب المواد الجانبية والتي تعتمد بالأساس على ما تقدم أعلاه بحيث تعطى الظروف المعينة لترسيب جزء من هذه المادة.

ج- طريقة التبادل الأيوني:

إن المادة المرغوبة لأي عملية مايكروبايولوجية يمكن فصلها عن خلال التبادل الأيوني وذلك بإمرار المحلول المزرعي من خلال مبادل أيوني بعد تنشيط المبادلات حيث تنفصل المادة المرغوبة عن السائل المزرعي وترتبط بالمبادل الأيوني.

بعد ارتباط المادة المرغوبة بالمبادل الأيوني تجري عملية غسل المادة وإزاحتها من المبادل كما هي موضحة في المخطط رقم (6). وإن التطور التكنولوجي أعطى إمكانية فصل المادة وإزاحتها وإجراء عملية تنشيط ثانية إلى المبادل في نفس الوقت حيث تكون العملية مستمرة.

إن بطريقة التبادل الأيوني نحصل على مادة نقية أو شبه نقية ويمكن عمل تجفيف لهذه المادة بواسطة التبخير أو التجفيف. وكتطور آخر جديد لطريقة التبادل الأيوني تستعمل بعض المواد النقية في المبادل الأيوني وبنتيجتها نحصل على مادة نقية كما في مخطط رقم (7). ومن ثم تجري عملية التبادل الأيوني مرة أخرى للحصول على المادة المرغوبة.

د. طريقة الاستخلاص:

المادة المطلوبة أو المرغوبة من عملية تخمر مايكروبايولوجية يمكن أن تفصل من محتولها المزرعي من خلال عملية الاستخلاص الكلي وذلك باستعمال أنظمة الاستخلاص (المذيبات). المادة تستخلص من محلول المزرعة وبهذه الطريقة تستخلص المادة المرغوبة مع المذيب، المخطط رقم (8).

وكتطوير لهذه العملية حيث، عند عملية الاستخلاص للمادة في محلول المزرعة، يمكن أن تضاف بعض المواد النقية للمادة المرغوبة وبعد ذلك تفرض الطريقة الملائمة لفصلها من محلولها المزرعي، مخطط (9). إن عملية فصل المادة المرغوبة يجب أن تصل إلى الدرجة اللازمة من النقاوة ويمكن استعمال الحالات المتنوعة للترسيب.

د. تحضير الكتلة الحيوية والمواد المترسبة في الوسط الزرعي:

جوهر هذه العملية هي عملية تكنولوجية خاصة لإعطاء شكل خاص للمادة المنتجة والمرغوب الحصول عليها من قبل الأحياء المجهرية والتي تتراكم في حالة ذائبة ثابتة في الوسط، وفي بعض الحالات ليس من السهل فصل المواد الحيوية الذائبة حيث أن تحضير المضادات الحيوية أو الأحماض الأمينية ذات الأهمية للثروة الحيوانية، حيث أن الوسط المزرعي يضم الكتلة الحيوية (Biomass) وكذلك بعض الفيتامينات والعناصر لذا يستحسن فصل الكتلة الحيوية والمواد الغذائية الأخرى ذات القيمة الغذائية في الوسط المزرعي ومردودها الاقتصادي على الثروة الحيوانية.

ولهذه الأسباب استعملت المركزات الحيوية التي تحتوي على المواد الحيوية الأساسية والتي هي مضادات حيوية، أحماض أمينية ومواد حيوية أخرى إضافة إلى الكتلة الحيوية (Biomass) كما هو موضح في المخطط (10) لتحضير المنتوج النهائي للمركزات الحيوية وكما يلي:-

1) التركيز بطرق التجفيف التالية:

بعد عملية التخمر للوسط كما هي موضحة في مخطط رقم (10) حيث نحصل بهذه الحالة على منتوج جاف يحتوي على الكتلة الحيوية (Biomass) والمواد الحيوية الذائبة وكل المواد الأخرى الموجودة في السائل المزرعي والمتضمن المواد المشتقة وغير المهضومة من الوسط الغذائي.

2) الترسيب بالفصل التالي:

تتضمن ترسيب الكتلة الحيوية (Biomass) مع المواد المرسبة الحيوية حيث أن المادة المرسبة الحيوية ستكون بحالة غير ذائبة، وبهذا ستنفصل عن السائل المزرعي وتترسب مع الكتلة الحيوية. إن طريقة الترسيب بواسطة المواد المنشطة أو المرسبة يمكن أن تكون مختلفة، أنظر المخطط (11)، حيث يكون سائل الزرعة خاليا أو حرا من المادة المرسبة أو المنشطة بسبب ترسب كل المواد.

وبعد فصل هذه المواد مع الكتلة الحيوية نحصل على المركزات الحيوية و التي يتم تجفيفها، المخطط (11). إن المخططات الكاملة والتي تمثل تجفيف المنتوج النهائي وبقاء المواد الجانبية الأخرى المترسبة والتي تكون في السائل ويمكن إجراء حالة تكنولوجية واحدة وهي تجفيف الكتلة الحيوية بعد غسلها.

و. استعمال الأحياء المجهرية في التأليف الكيماوي لتحويل مادة إلى مادة أخرى:

تحت هذا الباب نتطرق إلى الأنواع الخاصة من الأحياء المجهرية والتي بعملية ميكروبيولوجية صناعية يمكنها عن استعمال خاصيتها لأن تحول أحد المواد الكيماوية إلى مواد أخرى. وعلى هذا الأساس فإن جوهر العملية التخمرية الكلاسيكية في الصناعات الغذائية ومن الأمثلة عليها تخمر الكاربوهيدرات إلى كحول وأكسدة الكحول إلى حامض الخليك...الخ.

أما تحت تأثير النشاط الحيوي للأحياء المجهرية والتي تقودنا إلى بعض العمليات التي بنتيجتها نحصل على مواد نهائية، فعند التخمر الكحولي نصل إلى تركيز (96%) كحول اثيلي من الكلوكوز ولكن في الظروف الأخرى نحصل على الأسيتون والبيوتانول. وكذلك يمكن الحصول أيضا على تحضير الكلوكونيك من الكلوكوز وأكسدته إلى D... سوربت وإلى L- سوربيت. أما المنتجات الوسيطة فهي Vit.C من الجلوكوز.

العمليات التكنولوجية -- المايكروبيولوجية تستعمل ليس فقط لتحويل مواد عن أصل واحد إلى منتوج صناعي نهائي، ولكن كثيرا ما تعمل لتكوين المركبات الكيماوية المعقدة والتي لا يمكن إنتاجها إلا بوجود الأحياء المجهرية لمرحلة واحدة أو لعدة مراحل وكمثل عليها إنتاج فيتامين (C) من الجلوكوز بالطريقة التالية:--

D- جلوكوز ← D سوربت ← L سوربوز ← L حامض الاسكوربيك

حيث من هذا المخطط فقط المرحلة الثانية تجري بمساعدة الأحياء المجهرية، أما الخطوات الأخرى فهي عمليات كيماوية. وهنالك حالات لا تحتاج إلى تدخل

الأحياء المجهرية ولكن فقط تستعمل الطرق المايكروبيولوجية كعامل مساعد لتأليف المركب الكيماوي المعقد، وكمثال على هذه العمليات المايكروبيولوجية من هذا النوع ما يلي:-

1. التخمر المباشر Direct Fermentation:

تحت هذه الطريقة ينبغي تلقيح المزرعة أو الوسط الغذائي والمتضمن المادة التي يراد تحويلها وفي بداية الأمر ستنمو المزرعة وبنفس الوقت ستعطي إمكانية التأثير على تحويل المادة وفي نهاية العملية ستفصل الكتلة الحيوية المتكونة من محلول المزرعة وكذلك المادة المرغوبة والمطلوبة يتم فصلها وتنقيتها بإحدى الطرق الموضحة في المخططات الآنفة الذكر.

2. نمو المزرعة الميكروبية:

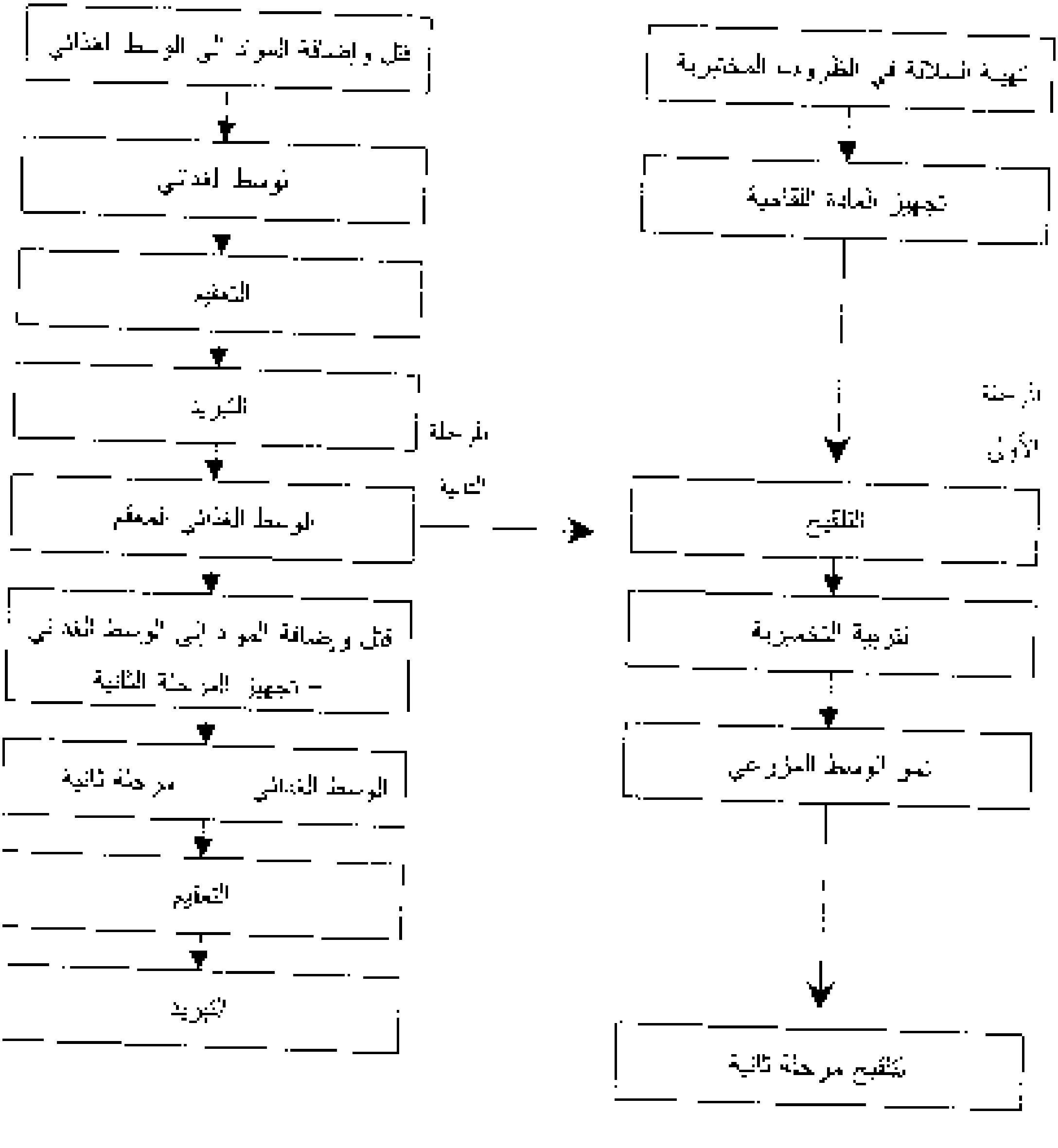
هناك إمكانية أخرى حيث أن المزرعة الميكروبية تنمو على الوسط الغذائي النقي إلى أن نحصل على نمو بدرجة مناسبة، بعد ذلك يضاف هذا النمو المزرعي الحاصل إلى المحلول الذي يتضمن المادة التي يراد تحويلها بتأثير الأحياء المجهرية، هذه الحالة تجرى عندما تكون المواد التي يراد تحويلها غير موجودة في الوسط الغذائي، لذا فتنمو الأحياء وتتكاثر ومن ثم تنقل. وهنا يظهر بأن ليس للأحياء المجهرية دخل بالتحويل بل للأنزيمات التي تحتويها.

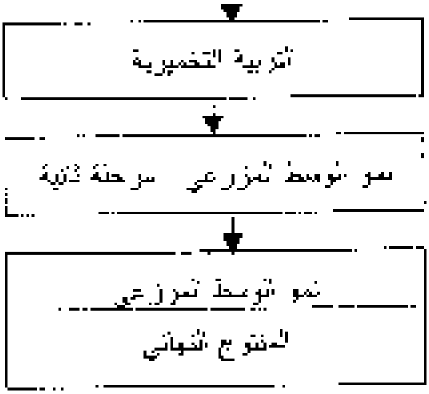
3. محلول المزرعة المفصول:

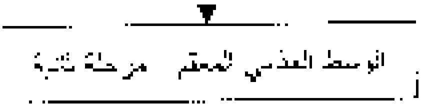
يمكن إجراء عملية التحويل من مادة إلى أخـــرى بواســطة اســتعمال محلــول المزرعة المعزول أو المفصول من الأحياء، والذي يتضمن المواد اللازمة للتحويل.

4. المادة الحيوية المفصولة أو المعزولة:

في هذه الحالة يمكن إجراء عملية التحويل بواسطة المادة الحيوية المفصولـة أو المعزولة في محلولها بإضافة الأنزيم المنقى أو أي مستحضر حيوي، في هذه الحالة سيقودنا الجزء المايكروبيولوجي من العملية إلى تحضير هذا المســتحضر وفصلــه وتنقيته بإحدى الطرق والمخططات الآنفة الذكر.

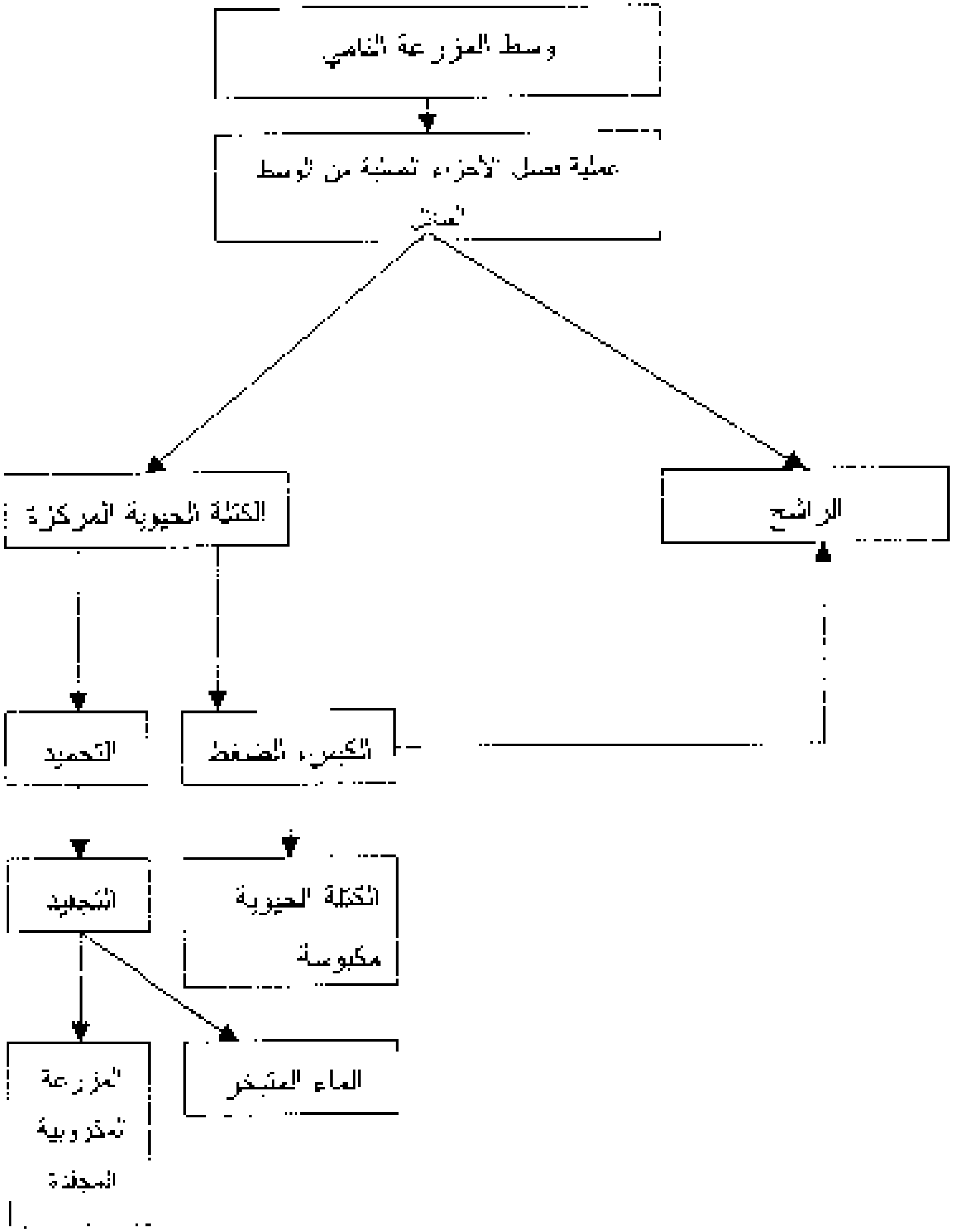

تهيئة السلالة في الظروف المختبرية
تجهيز المادة اللقاحية
المرحلة الأولى
التلقيح
التربية التخميرية
نمو الوسط المزرعي
تلقيح مرحلة ثانية
قتل وإضافة المواد إلى الوسط الغذائي
الوسط الغذائي
التعقيم
التبريد
المرحلة الثانية
الوسط الغذائي المعقم
قتل وإضافة المواد إلى الوسط الغذائي
- تجهيز المرحلة الثانية
الوسط الغذائي مرحلة ثانية
التعقيم
التبريد



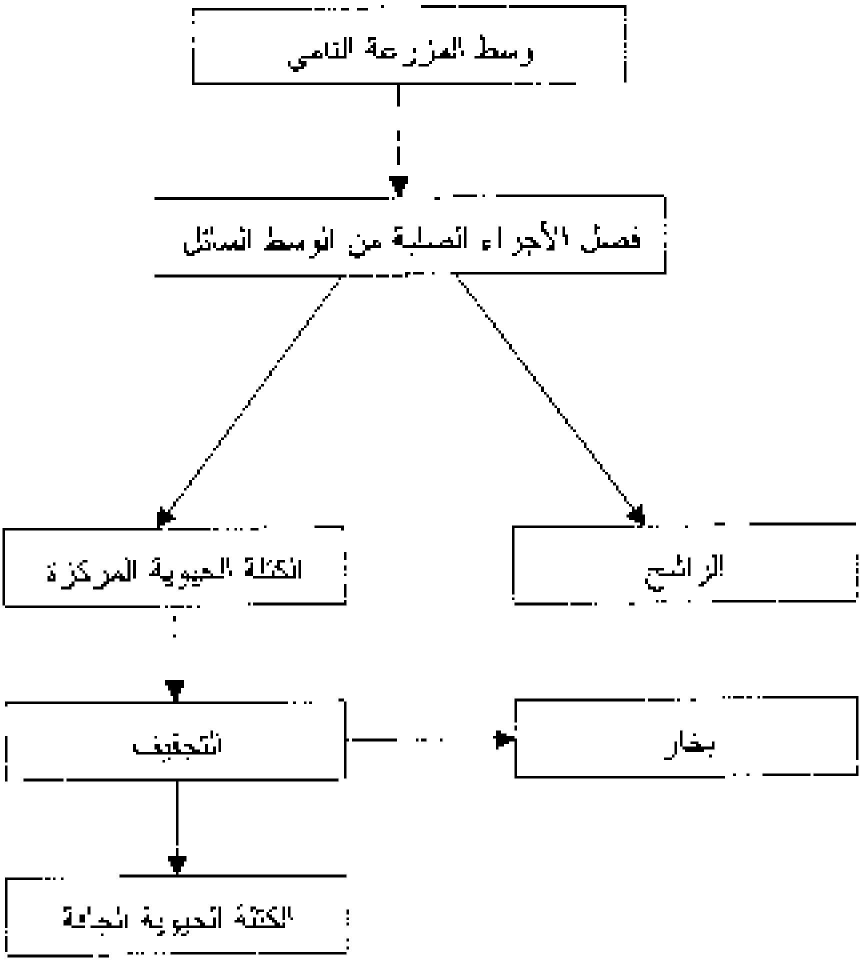


مخطط رقم (1)

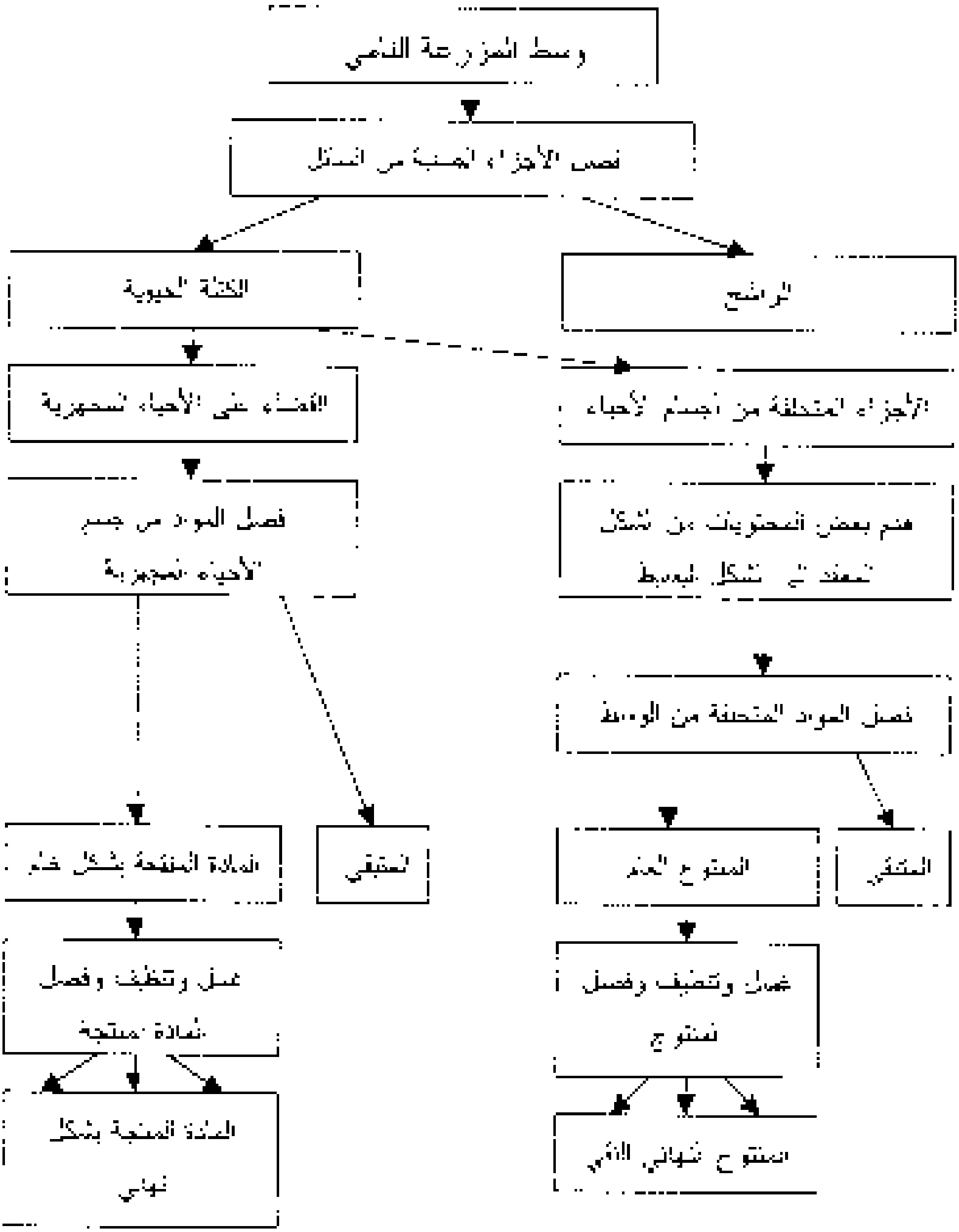
يوضح المراحل الإنتاجية لعملية التخمير



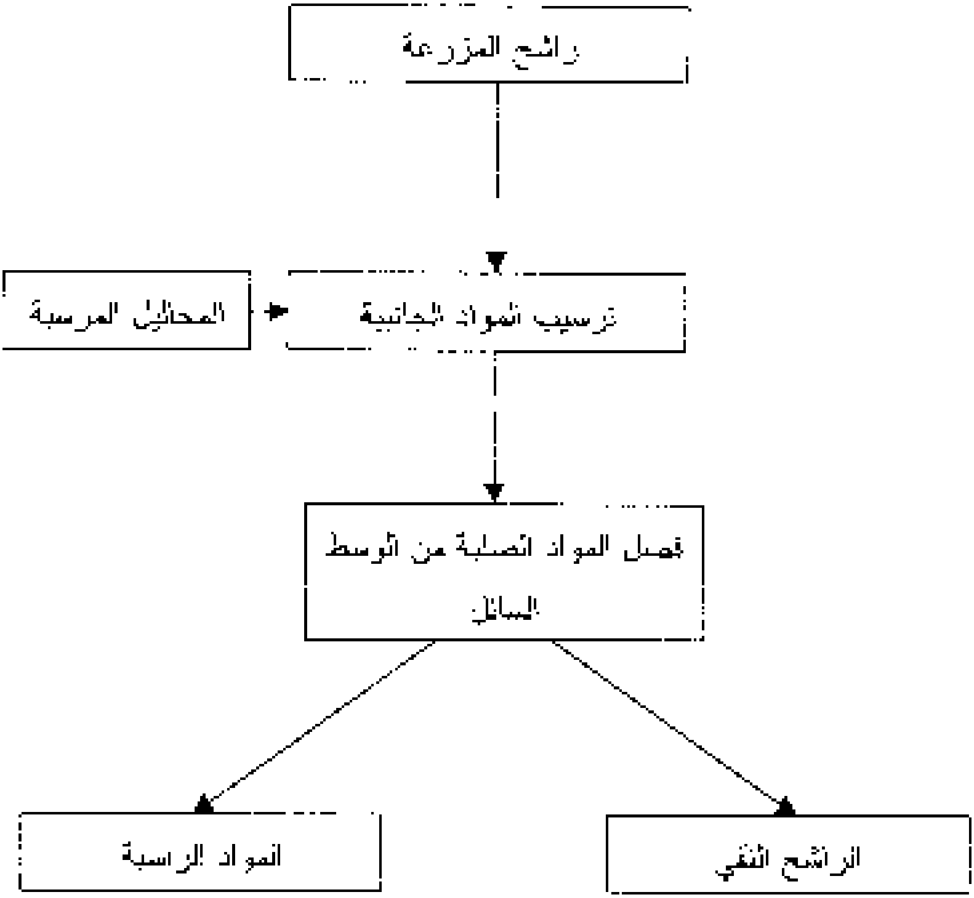
مخطط رقم (2) المخطط الأساسي لتحضير المزرعة الميكروبيولوجية



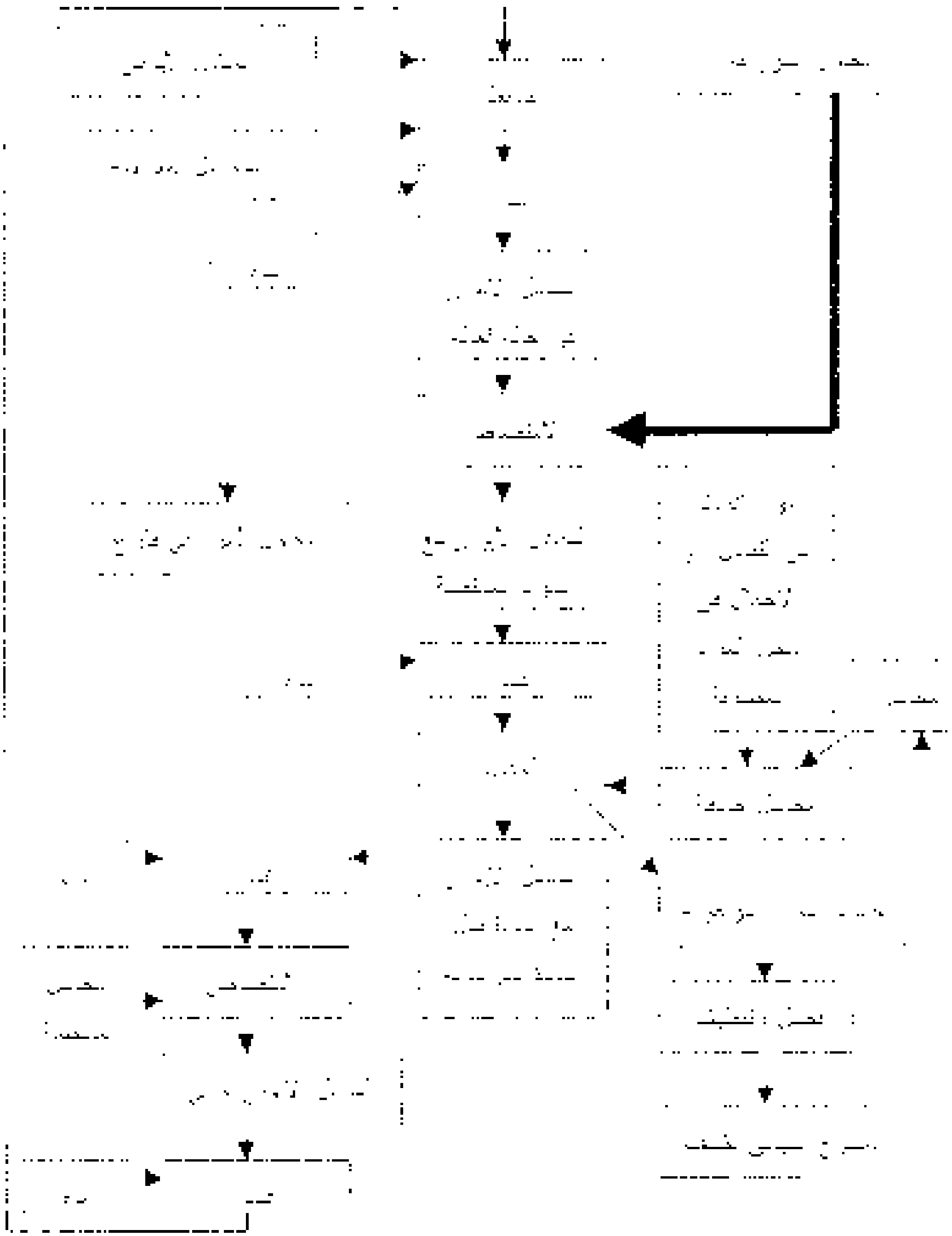
مخطط رقم (3) المخطط الأساسي لتحضير الكتلة الحيوية الجافة من وسط المزرعة.



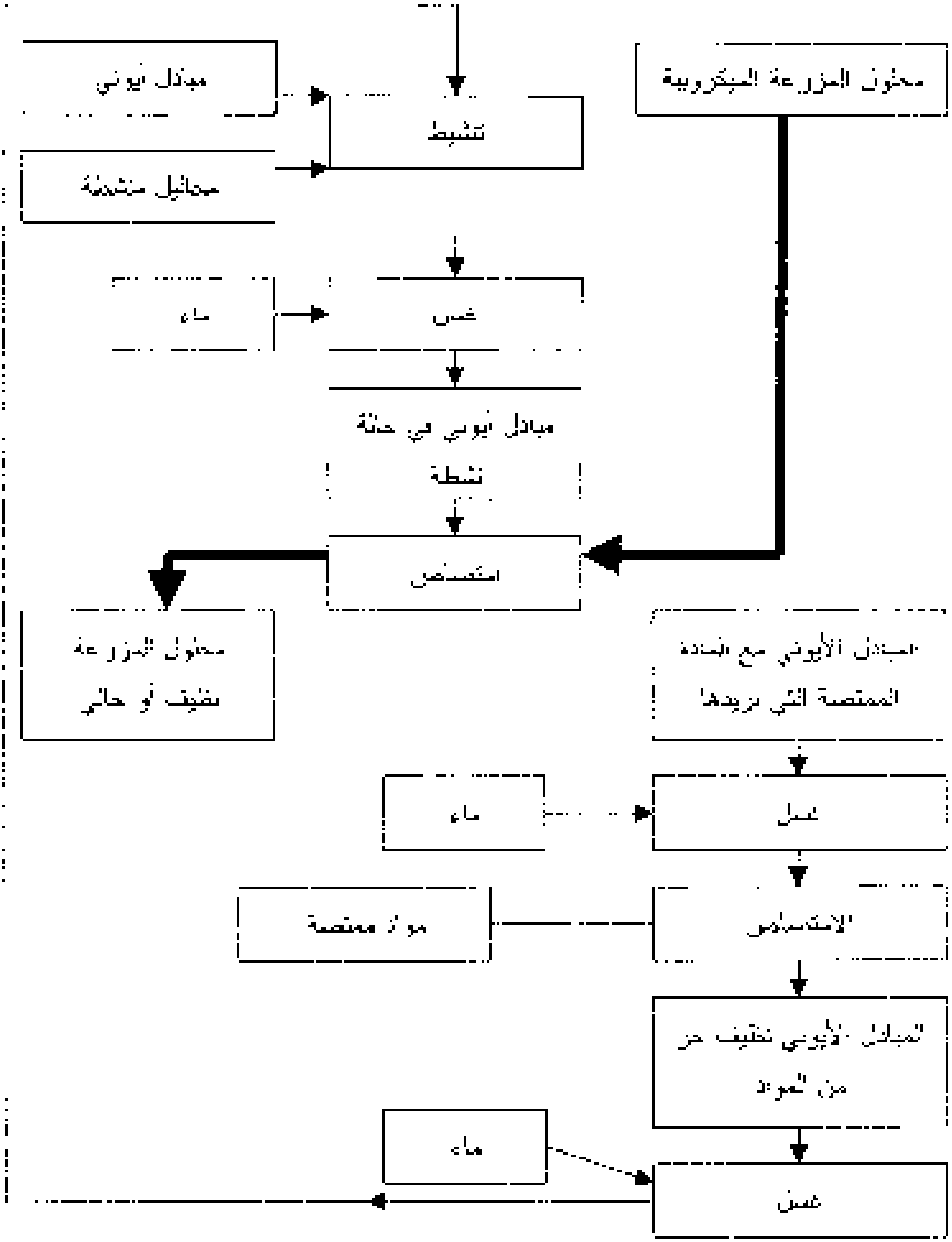
مخطط رقم (4) المخطط الأساسي لتحضير بعض المواد التي تتراكم في أجسام الأحياء المجهرية.



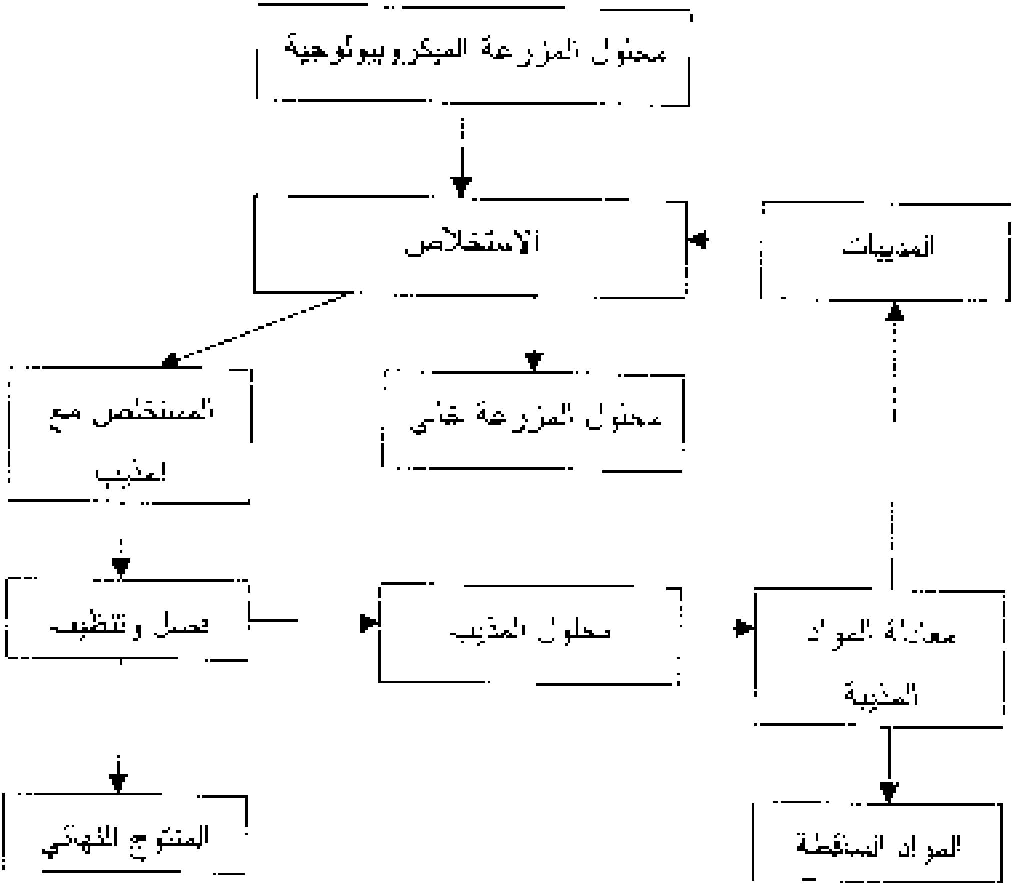
مخطط رقم (5)المخطط الأساسي لاستعمال الطرق الترسيبية كخاصية لتنقية الراشح



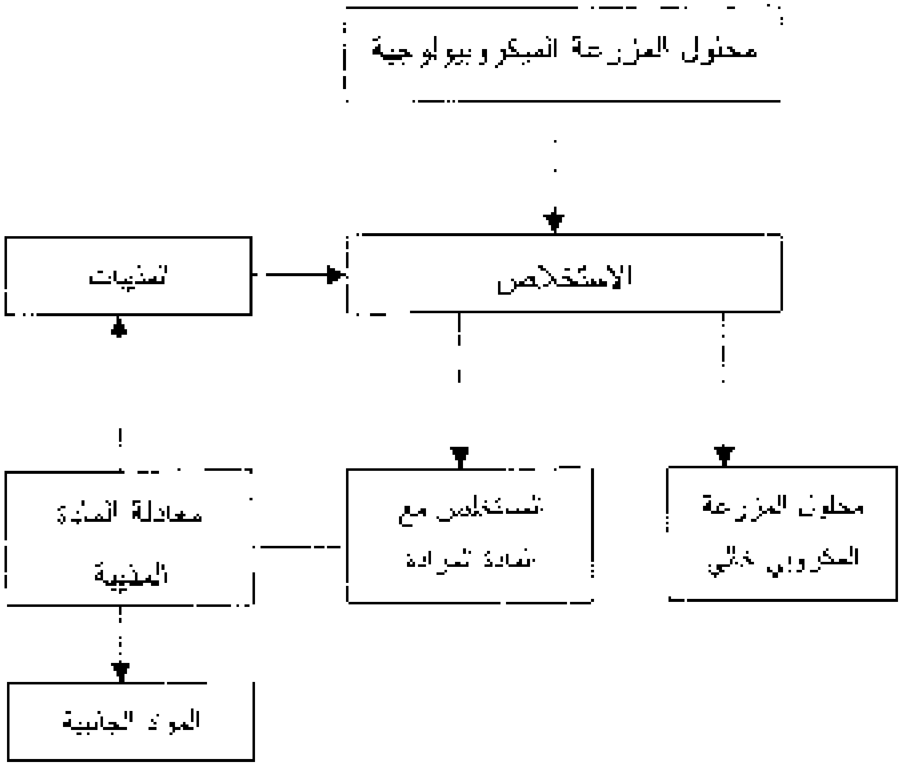
مخطط رقم (6) المخطط الاساسي لفصل المنتجات من الراتنج عبر التبادل الايوني



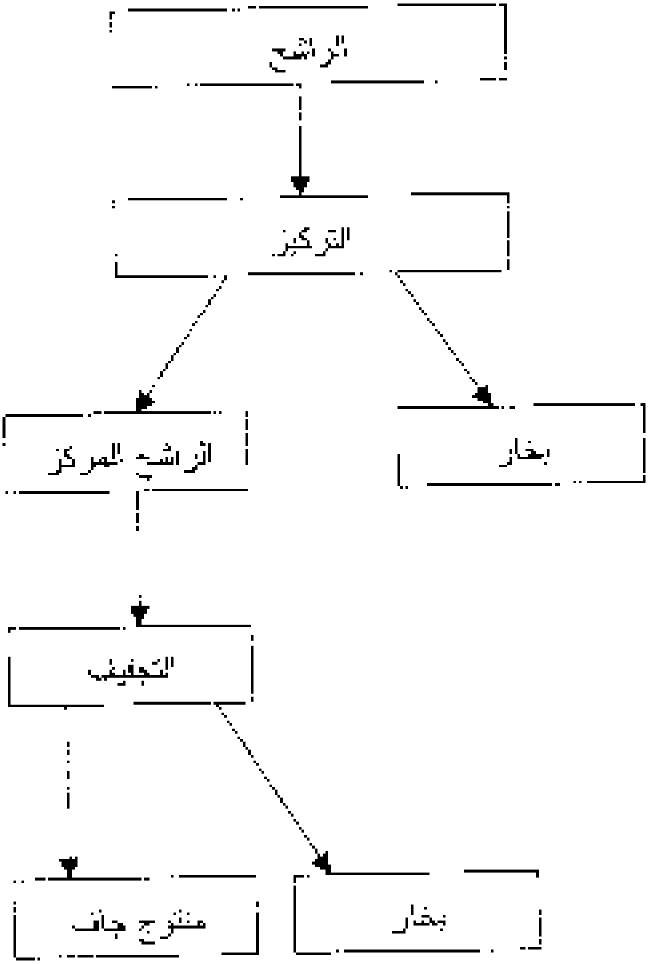
مخطط رقم (7) المخطط الأساسي لتنقية المحلول من خلال المبادل الأيوني.



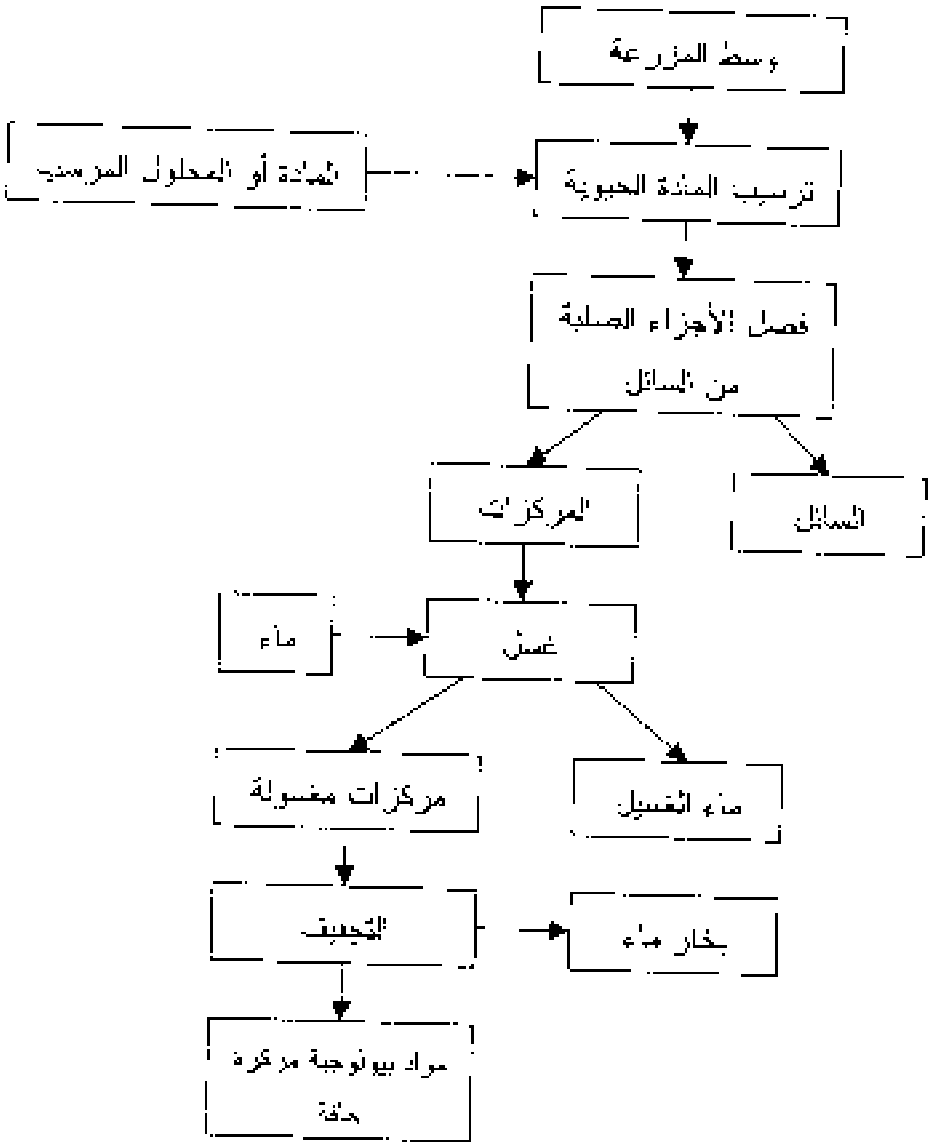
مخطط رقم (8) المخطط الأساسي لفصل المنتجات من المحاليل الراشحة من خلال عملية الاستخلاص



مخطط رقم (9) المخطط الأساسي لتنقية المحلول الراشح عبر عملية الاستخلاص.



مخطط رقم (10) المخطط الأساسي لتحضير المنقوع من وسط مزرعة من خلال التبخير والتجفيف



مخطط رقم (11) المخطط الأساسي لتحضير المواد الحيوية المركزة من خلال الترسيب بالمواد المرسبة النشطة.

الفصل الثالث

التغذية عند الأحياء المجهرية والمصادر الخام

Nutrition in Microorganism and Raw Material

التغذية عند الأحياء:

كما بينا سابقا إن الأحياء المجهرية كأي كائن حي تحتاج إلى الغذاء لغرض بناء جسمها وديمومة طاقتها الحركية، لذلك فإن الأحياء المجهرية تهضم المواد في وسط المزرعة وبواسطته تنمو وتتكاثر ومن جانب آخر تستعمله كمصدر للطاقة ولأجل التخليق الحيوي لبناء مواد جديدة.

ولا يمكن للأحياء من استعمال جميع مواد الوسط الغذائي دفعة واحدة أو في وقت واحد. وذلك لاحتياجها في المرحلة الأولى إلى مواد تساعد في نموها وتكاثرها وتحرير الطاقة ومن ثم تبدأ بعملية التخليق الحيوي.

الأحياء المجهرية واحتياجاتها المختلفة للمادة الغذائية:

للأحياء المجهرية القابلية على هضم وإنتاج مختلف الأشياء من المادة الغذائية (Substrate) وذلك حسب خواصها الوراثية حيث إن الخواص الوراثية تساعد في تكوين بعض عوامل النمو والتخليق، أما الأحياء التي ليست لها القابلية على تكوين أو تأليف هذه العوامل أو المواد فتحتاج إلى هذه العوامل بصورة جاهزة بإضافتها إلى الوسط. عموما كل الأحياء المجهرية تحتاج في نموها إلى الماء ومصادر الطاقة (كربون، نيتروجين، الأملاح المعدنية) وفي كل الحالات تحتاج إلى

الأوكسجين. ومن أهم الأسباب الأخرى اللازمة والضرورية هي توفر الظروف المناسبة من:

1- درجة الهيدروجيني (pH).

2- طاقة الأكسدة والاختزال.

3- درجة أو معدل الأملاح في الوسط ... الخ.

مصادر الطاقة:

إن الأحياء تحصل على الطاقة بالشكل التالي:

1- من عملية الأكسدة ومن عملية هدم بعض المواد في الوسط الغذائي.

2- من المواد الموجودة داخل جسمها.

عموماً فإن الأحياء المجهرية Heterotrophic يمكن أن تستعمل مصادر الكربون العضوية مثل (الغلوكوز، الفركتوز) لأجل تكوين الخلايا، أما الأحياء التي تسمى ليثوتروفي تستعمل فقط المركبات العضوية ذات التركيب المعقد، وعموماً فإن الجزء الأكبر من المواد الغذائية في جسم الكائن الذي تستعمل لأجل البناء لكتلة الخلايا الأخرى تستعمل كحاجة للاحتياجات، وإن الطاقة الكلية للعمليات الحيوية مبينة على الشكل التالي:

1- حوالي (90%) من الطاقة الكلية لتكوين المادة الخلوية.

2- حوالي (20%) تستخدم في العمليات الحيوية.

3- حوالي (10%) تستخدم كمصدر للحرارة الذاتية.

وتتجه الطاقة الحيوية المتحررة نتيجة سحب الالكترونات بعيداً عن درجة التأكسد، فكلما كانت درجة التأكسد كبيرة كلما كانت الطاقة أكثر. لذا فمن معادلة الطاقة المتحررة عند أكسدة كبيرة جداً مقارنة بالتحرر. أما عند أكسدة الجزيئة العضوية للكلوكوز فتنطلق حرارة بحدود (674.000) سعرة، بينما عند التحرر من التنفس فقط (22.000) سعرة. تستفاد من هذه الطاقة المتحررة في تحويل جزيئة الكلوكوز الواحدة المتحولة إلى حامض العضوية طاقة كيمياوية ذاتية لتكوين عناصر الخلية، ولا بأس من ذكر بعض الأحياء المجهرية التي تستعمل ضوء الشمس كمصدر للطاقة وتعطي محصلة طاقة ضعيفة مع انتاج (CO_2) وهذه العملية تدعى بـ Photosynthesis، ومجموعة أخرى من الأحياء تحصل على الطاقة من أكسدة المواد اللاعضوية (أملاح الحديد... اللاعضوي) وهذه الأحياء تدعى Chemoautotrophic ومن أمثلتها ما يلي:

1. الأحياء التي تؤكسد مركبات الكبريت ومثال عليها (Thiobacillus).
2. الأحياء التي تستعمل الهيدروجين ومثال عليها (Hydrogenomonas).
3. الأحياء التي تستعمل مواد مختلفة ومثال عليها (Nitrosomonas).
4. الأحياء التي تستفيد من الحديد.

وهناك مجموعة أخرى من الأحياء تحصل على الطاقة من أكسدة المركبات العضوية وتسمى بالـ Heterotrophic وهي كثيرة جداً تستفيد من المركبات العضوية مثل الكربوهيدرات.

مصادر التغذية:

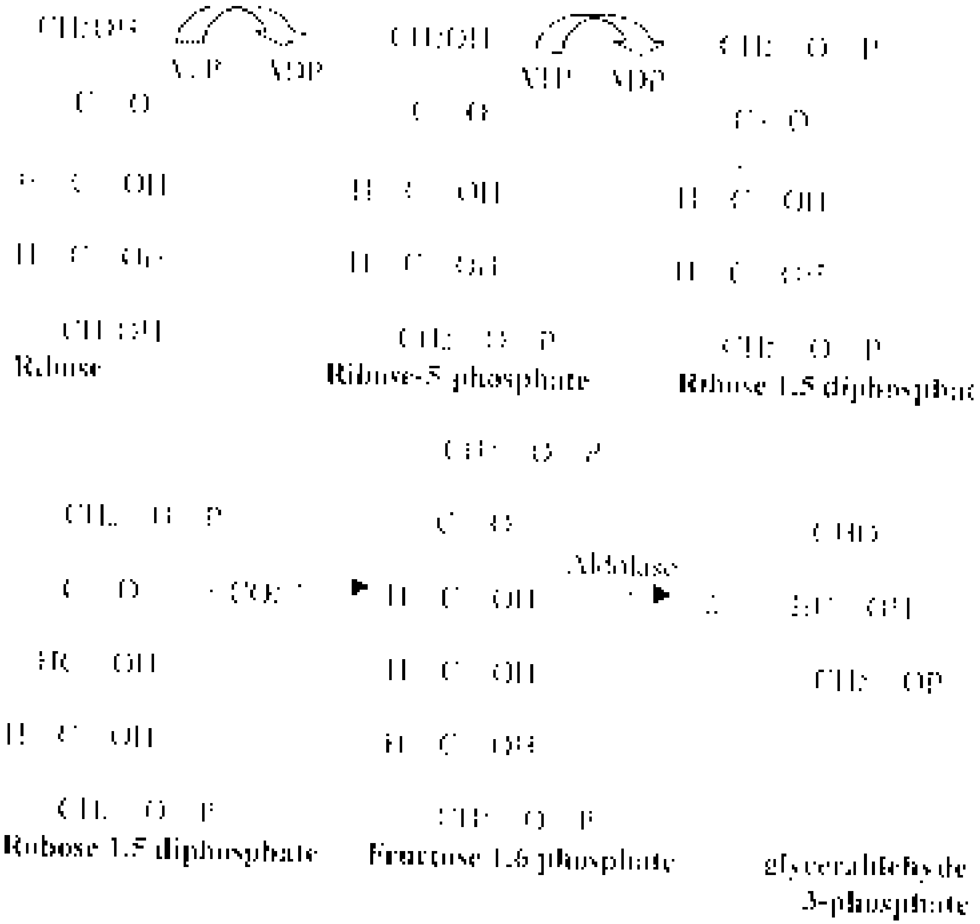
أولاً: المصدر الكربوني:

إن الأحياء المجهرية تحتاج إلى المصدر الكربوني وذلك لأنه:

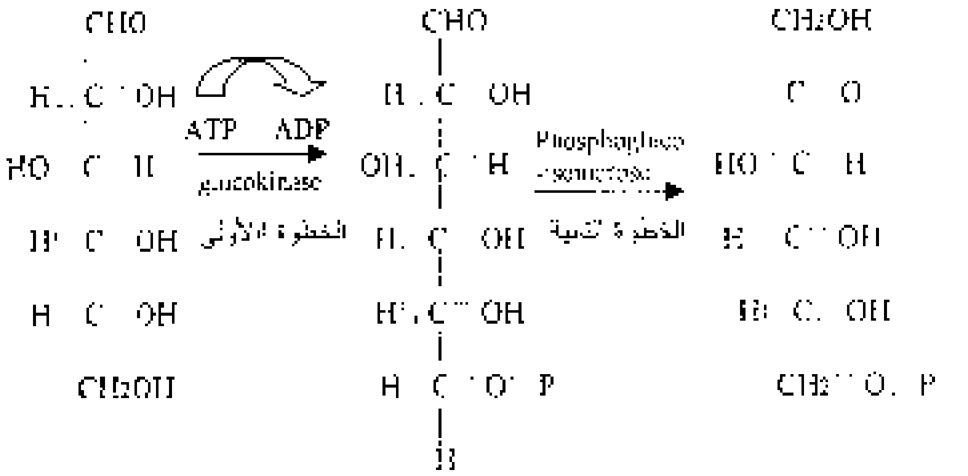
1. ضروري لإنتاج الطاقة للأحياء.

2. ضروري لتكوين المادة المكونة للتخليق الحيوي.

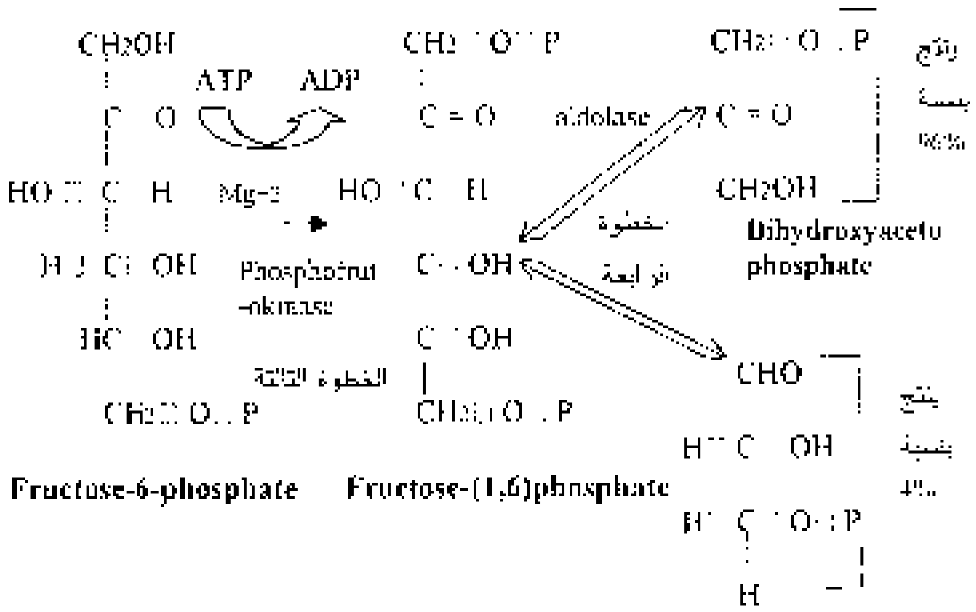
ويمكن للأحياء المجهرية الاستفادة من المصدر الكربوني بالشكل التالي:



وكذلك يمكن للأحياء المجهرية الاستفادة من المصادر الكربونية الناتجة من التحلل اللاهوائي للكربوهيدرات والمتمثل بالخطوات التالية:-

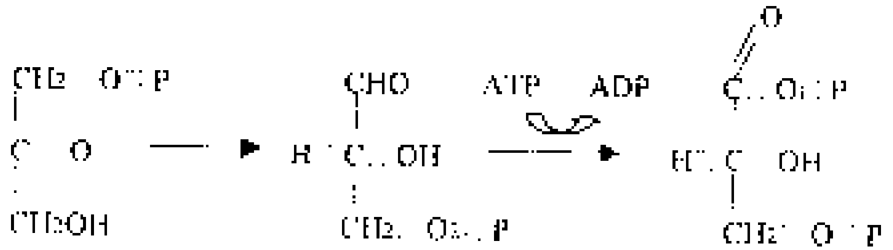


α-D glucose **glucose-6-phosphate** **Fructose-6-phosphate**



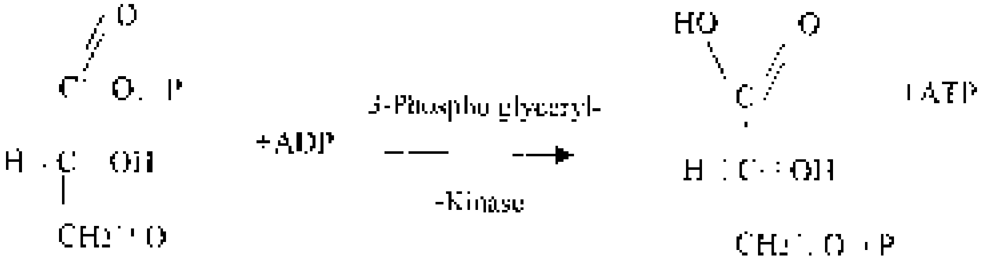
Fructose-6-phosphate **Fructose-(1,6)phosphate**

Glyceraldehyde-3-phosphate



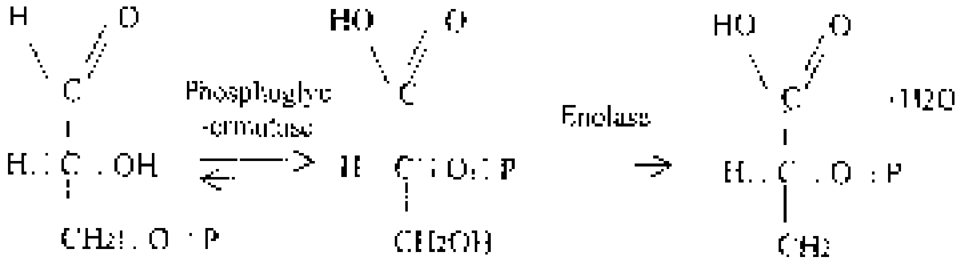
(dihydroxyaceto phosphate) glyceraldehyde-3-phosphate 1,3 diphosphoglycerine

(الخطوة الخامسة)



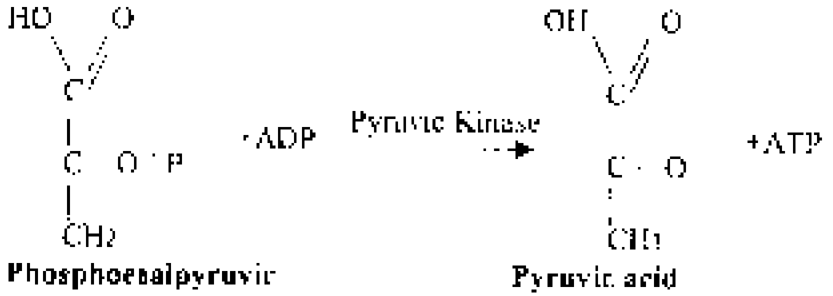
3-Phosphoglycer acid

(الخطوة السادسة)

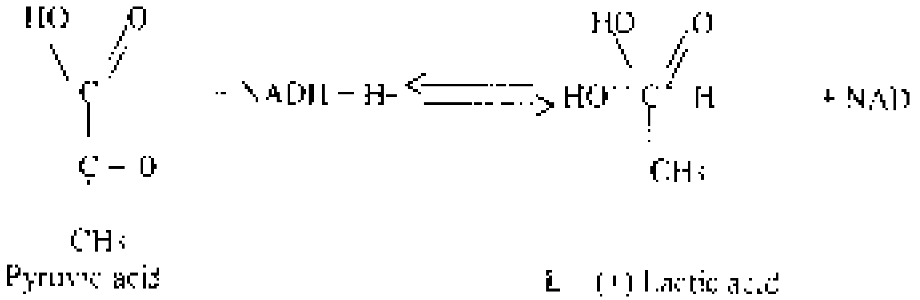


3-phosphoglycer-acid 2-phosphoglyceric-acid phosphoenalpyruvic -acid

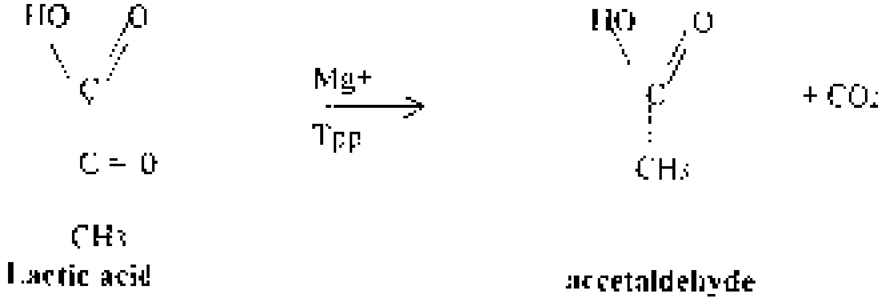
الخطوة السابعة الخطوة الثامنة

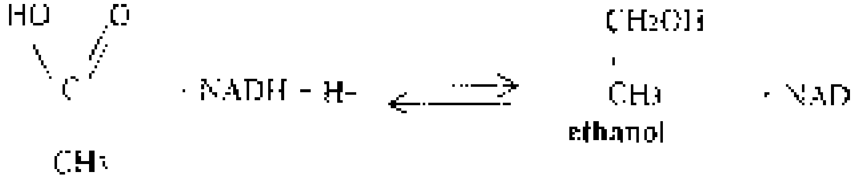


(الخطوة التاسعة)



(الخطوة العاشرة)





ثانيا: المصادر النيتروجينية:

البروتين عنصر مهم في بناء المادة الحية وهو مادة أساسية في تكوين الأنزيمات والبايروفيك والبريميدين، وتقسم الأحياء المجهرية بالنسبة إلى المصدر النيتروجيني إلى مجموعتين:-

1. مجموعة ال (Amino aphtotrophic):

هذه المجموعة يمكنها الاستفادة من المصدر النيتروجيني بشكل معدني ومن مصادر سهلة مثل نترات، أمونيك، أيونات، أمونيا، احماض، يوريا، والمثال عليها هو (niger).

2. مجموعة ال (Amino hetrotrophic):

هذه الأحياء يمكنها استعمال النيتروجين العضوي وخصوصا من الأحماض الأمينية المنفصلة، وتستعمل المركبات النيتروجينية البسيطة.

ثالثا: مصادر الأملاح المعدنية:

تعتبر الأملاح من العناصر الضرورية لأجسام الأحياء المجهرية والتي تكون ذائبة في الماء، ويمكن لأجسام الأحياء من امتصاصها والاستفادة منها، خصوصا وأن الماء يعمل على تنظيم امتصاص العناصر الضرورية والمهمة للأحياء وهي (S, P, O, N, C, Ni, Co, Cl, F, Na, Ca, K, Mo, Mn, Br, I).

الكبريت "S": يعتبر الكبريت من العناصر المهمة في البناء الخلـــوي للأحيـــاء المجهرية حيث يمكنها الاستفادة منه بصورة المختلفة.

الفوسفور "P": الأحياء المجهرية تتمكن من هضم الأملاح الفوسفاتية بسـهولة كبيرة، وكذلك بعض الحوامض الفسفورية وخصوصا حـــامض الارثوفوســفوريك (orthophosphoric acid) علما بأن عنصر الفوسفور مهم في البنـــاء الخلـــوي للأحياء المجهرية ولكنه في بعض الأحياء يكون له تأثير سلبي خصوصا على العفن (Asp. niger).

البوتاسيوم "K": عنصر البوتاسيوم أيضا من العناصر الأساســية فــي نمــو وتكاثر الأحياء المجهرية وفي إنتاج البروتين بنسبة عالية علما بأن للبوتاسيوم تــأثيرا كبيرا في إنتاج البروتينات.

المنغنيز "Mn": يعتبر المنغنيز من العناصر الضرورية لأجل نمـــو وتكـــاثر الأحياء المجهرية، لذا فإن الضرورة البيولوجية من الأملاح المعدنية فـــي الأحيـــاء المجهرية تتمثل في بناء الأجزاء الخلوية وفي تكوين الأنزيمات والتي لها دور فــي تخليق بعض المواد كالصبغات والمضادات الحيوية...الـخ. إضافــة إلــى دورهــا الفسلجي في التكاثر المجهري الحي.

رابعا: عوامل النمو (Growth Factors):

أ. الفيتامينات:

تعتبر الفيتامينات من عوامل النمو المهمة لكثير من الأحياء المجهرية حيث أن بعض هذه الأحياء لا يمكنها أن تنمو بدون وجود هذه الفيتامينات وبشكل جاهز وتسمى هذه الأحياء (Ascohetrotrophic)، فمثلا بكتيريا حامض اللبنيك تحتاج إلى إضافة فيتامين (B_2) وخميرة (Sacch. Oviformis) تحتاج إلى (Bioten).

ب- بعض المواد الكيماوية التي تساعد في تهيئة المركب في الوسط:

إن بعض الأحياء المجهرية تتعدى في احتياجاتها إلى أكثر من عنصري الكربون والنيتروجين لأجل نموها وتطلق بعض المركبات العضوية والفيتامينات، والمثال عليها بكتيريا (propionibacterium shermanii) التي تحتاج إلى عنصر (Co) و (5,6 dimethyl Benzel) لإنتاج فيتامين (B_{12}) وكذلك تحتاج الأحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية كالكلور وتتراسايكلين والكريزوفولفن إلى عنصر (Cl) لإنتاج حامض بنزل بنسلين.

ج- مكونات الوسط:

تعتمد نمو الأحياء المجهرية بصورة عامة على مكونات الوسط وكذلك من الخواص الفسلجية للكائن الحي، فمثلا بعض الأحياء المجهرية تستطيع هضم السكريات الثنائية وبعضها تهضم السكريات البسيطة، ونفس الشيء بالنسبة للمصادر النيتروجينية حيث نرى أن العلاقة متغيرة نحو المصادر النتروجينية، لذا يضاف بعض المستخلصات لأجل تجهيز الوسط بالنتروجين اللازم.

د- موازنة الوسط:

لأجل أن يكون الوسط مثاليا -لنمو الأحياء المجهرية- لا بد من موازنة المـــواد الداخلة في الوسط الغذائي المستعمل في التربية حيث يجب ربط الموازنة بين (N, C) الخ.

٥. حالات النمو:

إن تنمية إحدى المزارع المجهرية على أوساط غذائية يمكن أن يمر بطورين:

الطور الأول: طور نمو الأحياء المجهرية.

الطور الثاني: هو الطور التاليفي البيولوجي للمواد.

وهذان الطوران يتحددان بكثير من العوامل والظروف الخارجية.

و. سرعة نمو الأحياء:

إن سرعة نمو الأحياء تتوقف على عدد أجسام الأحياء الموجودة وعلى السرعة العامة للأحياء الظاهرة وعلى السرعة الخاصة لنمو الأحياء وكذلك علـى تركيز المواد.

منتوج	منتوج	أنزيم		مركب معقد		مادة	أنزيم

$$E + S \longrightarrow ES \longrightarrow E + P + P_2$$

سرعة التفاعل لكل تركيز أنزيمي يتحدد بمعادلة ميكالس:

$$\text{سرعة التفاعل} = \frac{V_1 \times S}{S + Km}$$

فالسرعة الممكنة لتفاعل المواد العضوية = V_1

التركيز المولي للمواد الداخلة في التفاعل S

ثابت ميكالس لتركيز المادة المتفاعلة Km

سرعة المواد المتفاعلة (Substrate) $\frac{ds}{dt}$ =

(التغير في تركيز المواد المتفاعلة) $ds = d\,S_2 - d\,S_1$

(التغير في الزمن) $dt = d\,T_2 - d\,T_1$

أما سرعة المواد الناتجة $\frac{dp}{dt}$ =

(التغير في تركيز المواد الناتجة) $dp = d\,p_2 - d\,p_1$

(التغير في الزمن) $dt = d\,t_2 - d\,t_1$

أما ثابت التفاعل (Km) فيتحدد عندما تتساوى سرعة المواد المتفاعلة مع سرعة المواد الناتجة:

أي أن

$$\frac{ds}{dt} = \frac{dp}{dt} = Km$$

ز. درجة حموضة الوسط:

إن لدرجة الحموضة دورا كبيرا في تغذية الأحياء المجهرية حيث أن لكل كائن حي درجة من الحموضة التي تمكنه من النمو والتكاثر، فمثلا العفن (P chrysoginum) درجة (pH) المثالية هي "5" أما لتخليق المضادات الحيوية فيتم عند (pH) "6.5 - 7.5".

ج. التركيز المثالي لمختلف المواد الداخلة في الوسط الغذائي وتوفر عملية التهوية والتحريك:

وأخيرا فإن توفر هذه العوامل يعطي الدور المثالي لتغذية الأحياء والنمو والتكاثر.

التغذية وتبادل المواد عند الأحياء المجهرية:

كما أوضحنا بأن الأحياء المجهرية تستهلك المواد الغذائية من المحيط الخارجي وتستعملها ليس فقط كمصدر في عمليات إنتاج الطاقة الحيوية، وإنما تستعملها في عمليات التركيب الحيوي (البناء الحيوي)، ويقصد بهذا عمليات البناء والتركيب لجسم الكائن الحي المجهري. فعملية التبادل لهذه المواد الغذائية من المحيط الخارجي وإدخالها في عمليات بنائية عادة تدعى بالتغذية. علما بأن ليس جميع الأجزاء الداخلة من المحيط الخارجي تستعمل كمادة غذائية، وقد تكون هذه الأجزاء ضرورية لخلق الظروف المثالية ومنها إعطاء درجة الحموضة "pH" المثالية والمحددة للمحيط وتوازن الأملاح، وتحدد مستوى الأكسدة والاختزال والضغط الأزموزي الملائم.

ميكانزم التغذية:

إن دخول المواد الغذائية إلى الجسم الميكروبي يتم بطريقة الانتشار والتبادل الإمصاصي، وإن سرعة الدخول تعتمد على استهلاك المحلول الغذائي في الجسم

الميكروبي، وعلى التغذية وعلى الخاصية النافذية للأغشية الميكروبية (الجدار الميكروبي) والغشاء البروتوبلازمي وأخيرا يعتمد على خواص المواد. وعندما تتهيأ كل هذه الظروف لهذه المواد الغذائية التي تدخل من خلال الأغشية الميكروبية وتستعمل لعملية البناء أو لعملية إنتاج الطاقة فهذا يؤمن النمو السريع والتكاثر.

ومن المتعارف عليه أن دخول المواد في الجسم الميكروبي يحدد بدرجة كبيرة من قبل الغشاء البروتوبلازمي (Lipoproto membrane) لكن الغشاء البروتوبلازمي ليس هو العائق الوحيد لدخول المحاليل الغذائية فقط، بل الأغشية الجدارية الميكروبية. فالجدار الميكروبي مثلا لكثير من البكتيريا لا يسمح أو لا يدخل الدكسترين ذا الوزن الجزيئي فوق (10,000) وهناك أمثلة كثيرة على هذا الموضوع.

ومن الواضح أن فتحات الجدار الميكروبي والأغشية الميكروبية تلعب دورا أساسيا لهذه العلاقة وتحدد دخول المواد، ويعمل الانتشار على الفرق في التركيز على جهتي الغشاء فقط والأخذ بعين الاعتبار مقدما التركيب الكيماوي وتركيب الأعضاء الميكروبية.

يكون واضحا أن المواد الغذائية يجب أن تذوب في الماء أو بالدهون وعندما تكون هذه المواد في حالة الذوبان وبالاعتماد على الفرق بين التركيز لهذه المواد في البروتوبلازما وفي (Substrate) تزداد سرعة انتشارها في جسم الميكروبي، كما أن الجزيئات الكبيرة يمكن تحللها بواسطة الأنزيمات (Exoenzyme) وبذلك

تكون المواد بسيطة ودقيقة وقابلة للذوبان وذات جزيئات صغيرة نسبياً وهذه المـواد الذائبة في الماء تصبح قادرة لأن تدخل الجسم الميكروبي. فمثلاً مادة الســـكوربيال تتحلل من قبل الأميليز إلى مالتوز والسليلوز بواسـطة أنزيـم (Cellulase) إلـى سكريات بسيطة، والمواد البروتينية بواسطة أنزيم البروتينيز (Proteinase) تتحول إلى أحماض أمينية، والدهون بواسطة أنزيم (Lipase) تتحـول إلـى تكلسـيرين وأحماض دهنية.

أما العناصر الغذائية (K, p, Br, Mo, Cu, Zn, S, Fe, Ca, Mg, Na) فإنها تدخل إلى داخل الجسم المجهري الحي نتيجة اتحادها مع مواد الوسط الغذائـي وبشكل مركبات مهضومة.

شكل (2) يوضح ميكانزم دخول المواد إلى جسم الكائن المجهري.

أما المواد الأخرى كالسكريات والكحول...الخ، لا تتحلل فإنها تمر من خلال جدران الأجسام الخلوية بسهولة لأنها تحتوي على مجموعات قطبية، مجموعات اكسجينية، مجموعات كاربوكسيلية، علماً بأن هذه الخاصية تعتمد على عدد هذه المجاميع، فكلما كان العدد لهذه المجاميع أقل كلما كان دخولها أسهل. والمثال عليها الكليسيرين الذي يملك ثلاث مجاميع هيدروكسيلية تدخل من خلال الجدران الميكروبية بصعوبة أكثر من الاثيل الكحول الذي يمتلك مجموعة هيدروكسيل واحدة.

أما مرور الأملاح المعدنية يتحدد بالشحنة الكهربائية للغشاء البروتوبلازمي البكتيري وبدرجة التأين للأملاح وكذلك ب (pH) للمحيط الغذائي، فإذا كان الغشاء البروتوبلازمي يحتوي على شحنة موجبة فإن الدقائق التي تحمل نفس الشحنة ستتنافر بينما تتجاذب مع الدقائق التي تحمل الشحنة المغايرة وهذه بدورها ستسهل من عملية مرورها من خلال الغشاء وتستمر العملية إلى أن نحصل على حالة التوازن.

وكما ذكر فإن مرور الأملاح يتحدد ب (pH) الوسط الغذائي فإذا كان (pH) الوسط الغذائي تحت درجة ال (Isoelectric point) فالسطح الميكروبي سيكون مشحوناً بشحنة موجبة، وعندما يكون (pH) أكثر قاعدية فالسطح الميكروبي سيشحن شحنة سالبة. إذن فعند (pH) محدد للوسط الغذائي ستجري عمليات التبادل الامتصاصي ونتيجة لهذه العمليات ستدخل مواد محددة في البروتوبلازم.

المصادر الخام المستعملة في التقنية الحيوية:

إن المصادر الخام المستعملة في تحضير الأوساط الغذائية لتربية الأحياء المجهرية اعتياديا لها خواص معينة، لذا سنجمل البعض من هذه المصادر:-

مستخلص الذرة:

يستعمل بكثرة في تربية الأحياء المجهرية الصناعية وعلى نطاق واسع في العالم لما له من مزايا:

1. يستعمل أحد مكونات الأوساط الغذائية المؤلفة.
2. يعطي ظروفا جيدة لنمو الأحياء وكذلك يساهم في خلق المكونات الأساسية وهذا المستخلص يحصل عليه كناتج عرضي من مصانع إنتاج النشا من الذرة، ويكون هذا المستخلص غني بالحوامض الأمينية، علما أنه يحتوي على عنصر الكبريت والفسفور والكالسيوم.

الفول:

مستخلص الفول يعتبر من المصادر المعروفة في تربيـــة الأحيـــاء المجهريـــة الصناعية وعلى نطاق واسع في العالم لما له من مزايا كثيرة حيث يحتوي:

بروتين	% 40
دهن	% 22-18.5
كربوهيدرات	% 15
رماد	% 5

علما بأن رماد الفول يحتوي على العناصر التالية (Ca, P, Fe, Mg, S).

الشعير:

مصدر خام ومشهور في عالم إنتاج البيرة وله تطبيقات واسعة وذلك لاحتوائـــه على المصدر الكربوهيدراتي (النشا) إضافة إلى احتوائه على "N" بحدود (1.5%) حيث يتم استخلاص المواد الكربوهيدراتية بواسطة الماء مع التسخين.

العنب:

من المصادر المعروفة منذ القدم والمستعملة في الصناعات الميكروبيولوجيـــة، ولكن لأهمية عصير العنب ولتزايد الطلب عليه بشكل طازج أصبح استـعماله فـــي خطوط التصنيع الميكروبيولوجي يتناقص – ولكن أحيانا يستعمل في بعض خطـــوط الميكروبيولوجية وذلك لأهمية محتوياته وهي:-

سكريات	% 17
حوامض	% 1

رماد   0.8 %

ورماد العنب يحتوي على عنصري (K, P) لكن عصير العنب يحتاج إلى إضافة ($CaCO_3$) لتعديل درجة حموضة العصير، علما بأن ($CaCO_3$) لا يؤثر في خواص الوسط الغذائي.

المصادر الكربوهيدراتية:

كثيرا ما تستعمل في التربية الصناعية للأحياء (مثل: سكروز، لاكتوز، الجلوكوز):

اللاكتوز:

هو أحد المواد الكربوهيدراتية المستعملة من قبل الأحياء المجهرية والذي يعتبر من المصادر المهمة في تربية الأحياء المجهرية.

السكروز:

يستخرج من قصب السكر (Saccharum officinarum) ومن بنجر السكر (Beta alba) حيث يستعمل في الإنتاج الميكروبي ويكون استعماله على الأشكال التالية:-

أ. السكروز الأبيض أو الاعتيادي.

ب. السكروز الخام القهوائي اللون غير النقي.

ج. المولاس وهو الشكل الخام غير النقي للسكروز.

النشا:

النشا موجود في الطبيعة وهو كمصدر كربوهيدراتي ويشكل الجزء الأعظم من حجم النباتات (الذرة، الفول، الفستق، الحنطة، الشعير، الشوفان)، والجزء الأعظم من النشا يحضر من الذرة، وهناك نشا البطاطا. وللنشا صور متعددة منها (الأميلوز، الأميلوبكتين، النشا الحيواني الكلايكوجين، الأميلوبكتن) وهناك صعوبة في استعمال النشا حيث يجب أن يحلل إما بواسطة المواد الكيماوية أو الأنزيمية إلى شكل أبسط (الكلوكوز) والذي يمثل مادة غذائية جيدة للأحياء.

أما عند التخمر الصناعي أو شبه الصناعي فيستعمل أيضا الدكسترين الذي له حجم جزيئي بين النشا والجلوكوز، ويمكن تحضيره بالسيطرة الكيماوية أو الأنزيمية لتحلل النشا.

المولاس:

سائل لزج بني غامق كثافته (1.4غم/سم3) تقريبا وهو الناتج العرضي عن مرحلة البلورة النهائية لمعامل السكر وتسمى عادة دبس السكر، ويشبه إلى حد كبير دبس التمور، وكلمة مولاس مشتقة من الاسم اللاتيني ومعناه شبيه بالعسل، وتعني كلمة (Molass) باللغة الاغريقية أسود. والمولاس له فائدة اقتصادية لاحتوائه على نسب عالية من السكريات الأحادية والثنائية والمركبات العضوية النتروجينية والأملاح المختلفة. والمولاس على نوعين:-

أ. مولاس البنجر: وهو الناتج العرضي من استخلاص السكر من البنجر.

ب. مولاس القصب: وهو الناتج العرضي من استخلاص السكر من القصب.

محتوياته:

يحتوي المولاس التجاري على حوالي (20%) من وزنه ماء بينما المولاس المنتج من المعامل تكون نسبة الماء فيه ما بين (12 – 17%) وزناً، لذا يخفف عند التصنيع لغرض إذابة بلورات السكر الناعمة، أما ما يحتويه من كربوهيدرات حيث يحتوي المولاس على عناصر الكربون والأوكسجين والهيدروجين وتكون نسبة (O) إلى (H_2) كنسبتها في الماء ويكون السكروز القسم الأعظم أو الأكبر (33.4 – 48.5%) من محتويات مولاس البنجر كما أنه يحتوي على كمية قليلة من السكريات المتقلبة (10.8 – 21.2%).

كذلك فإن المولاس يحتوي على الأملاح ومركبات عضوية غير سكرية فمن هذه المركبات مركبات عضوية غير سكرية، (مواد نايتروجينية) كالبروتينات: أحماض أمينية، اميدات، أما المركبات العضوية غير النايتروجينية فهي: البكتين، اتصاف السليلوز، أحماض العضوية أوكزاليك، خليك، سكسنيك، كلوتماميك، تارتاريك، ستريك.. الخ. أما الأملاح فيتضمن أملاح (Fe, Mg, Ca, K, Na)والمولاس غني بفيتامين (B_1, B_6). لذا فإن المولاس وسط غذائي مهم لتغذية الأحياء المجهرية.

التحلل الكامل للخشب:

إن الخشب المتحلل لا يستعمل على نطاق واسع في الصناعات الميكروبيولوجية ولكن يستعمل في إنتاج خمائر العلف، والتحلل الذي يتم تحت نطاق معين يؤمن النوعية البيولوجية الجيدة للسكريات، فعند تحلل الخشب مثلاً نحصل على مواد مانعة مثل (الفورفورال، أوكسي ميثل فورفورال، الدكسترين.. الخ).

ولذا يفضل الحصول على هذا التحلل بمحتوى أدنى من الفورفورال ويجب أن لا يكون أكثر من (0 12 – 0 8%) وعموماً فمحلول الخشب المتحلل يحتوي على ما يلي:–

1. السكريات العامة (سكريات مختزلة) 3 26

2. مواد غير سكرية 0 16 %

3. هكسوز 2.38 %

4. أحماض عضوية 0.38 %

5. فورفورال 0 052 %

6. أوكسي ميثل فورفورال 0.04 %

7. H_2SO_4 0.54 %

وعند الظروف الجيدة قد تقل نسبة (RS) إلى (4%) والفورفورال يصل إلى حد (0.08 %). أما أوكسي ميثل فورفورال يصل إلى (0.028 %).

التمور:

تعتبر التمور مصدرا مهما للسكريات إضافة إلى احتوائها على نسب من الأحماض الأمينية والفيتامينات والمعادن لذا تعتبر مصدرا جيدا لتنمية المزارع الصناعية من الأحياء المجهرية والجدول التالي يوضح تركيب التمور:-

السكريات الكلية	% 80
السكريات المتحركة	% 74
السكروز	% 5
الجلوكوز	% 38
الفركتوز	% 35
المواد الصلبة الذائبة	% 82
المواد الصلبة غير الذائبة	% 12
الحموضة النشطة	6
البروتين	% 2.20
الدهون	% 0.36
الرماد	% 1.10
الألياف	% 1.9

لذا فعصير التمر يعتبر مصدرا جيدا لنمو الأحياء مثل (Candida) و (Rhodotorula) و (Saccharomyces) وكذلك للأعفان مثل (Aspgillus).

الفصل الرابع

المبادئ الأساسية في التعقيم والتطهير

Fundamental Principles in Sterilization and Disinfection

المبادئ الأساسية في التعقيم والتطهير:

Fundamental Principles in Sterilization and Disinfection

من أساسيات أي عمل مايكروبيولوجي، و لأجل الدقة العلمية في هذا المجال و منع التلوث و السيطرة على الفعاليات الحيوية و توجيهها بالشكل الصحيح، و الحصول على أحياء مجهرية (عزلات) نقية، لأجل هذا كله كان لعملية التعقيم و التطهير مكان مهم في علم المايكروبيولوجي العام و التقني حيث أن العمل للحصول على عملية مايكروبيولوجية من مزرعة نقية يلزم الحفاظ على العملية من التلوث لكل من الوسط الزراعي، أدوات المختبر أو المعمل، لذا وضعت المبادئ الأساسية لأجل قتل الأحياء المجهرية و الحد منها.

التعقيم:

هو القضاء على جميع الأحياء المجهرية الموجودة في الوسط أو في المادة المعطاة. و قد استعمل الكثير من طرق التعقيم منها استعمال الحرق تحت درجات حرارة عالية و كذلك استعمال بعض المواد الغازية المتنوعة. (غاز الفورمالدهايد، أثيل أوكسايد، B بروبيو لاكتون و غيرها) و مختلف المركبات الكيماوية الأخرى، و كذلك أشعة الترافايوليت، أشعة الجاما ultrafiltration.

التطهير :

هو قتل أو طرد الأحياء المجهرية المرضية، و تحت عملية التطهير يمكـــن أن نصل إلى التعقيم و لكن عملية التطهير لا تعني التعقيم و التطهير كأســـاس يعتمـــد على المواد الكيماوية كحامض الكربوليك، الفورمالين و غيرها و فيها تقتل جميـــع الأحياء الخضرية الاعتيادية، و لكن ليس دائما، لأن القضـــاء علـــى السبورات و المواد المستعملة لأجل التطهير تسمى مواد التطهير Disinfection و يمكـــن أن يستعمل لها اسم antiseption (antiseptic) و هذه المواد تستعمل لأجل قتـــل أو منع نمو الأحياء و التي توجد في احتكاك مباشر و أن عملية التطهير تستعمل دائمـــا لتطهير الخزانات، المكائن، الملابس و المواد و غيرها.

:Antiseptic matter

تسمى المواد التي تستعمل لأجل قتل أو منع نمو الأحياء والتي توجد باحتكـــاك مـــباشر مع هذه المواد، فالمواد القاتلـــة (Bacterioside) والتي لا تقتـــل تســـمى (Bacterioseptic) وهذان النوعان يعتمدان على نوع المادة وتركيزها في الوسط. وتمت كلمة (aseptic) كان يستعمل لغرض التعقيم للتخلص من الأحياء المجهريـــة المرضية في الوسط والأدوات، أما الآن وقد استعمل (Bacterioside).

:Bacteriostatic

يقصد بهذا العنوان إيقاف نمو الأحياء المجهرية بمواد (microbiostatic) مثل (bacteriostatic) أو (Fungeostatic) حيث أنها لا تقتل الأحياء حالا بل توقـــف من عملية تكاثرها وفي النتيجة تقلل من عدد الأحياء الموجودة. الكثير مـــن المـــواد المطهرة (Microstatic) لها تأثير على الأحياء لكن عند زوال المطهر نـــرى أن

الأحياء تعود إلى التكاثر من جديد وخصوصاً المستحضرات مثل المضادات الحيوية (السلفاميد) لها تأثير (Microbiostatic).

ميكانزم التعقيم والتطهير:

إن عملية التطهير والتعقيم تعتمد على ثلاث نظريات:

1. بواسطة مواد أو مركبات كيماوية.
2. بواسطة الأشعة بوحدات معينة والتي تؤثر في جسم الكائن المجهري الحي.
3. استعمال الحرارة الجافة والرطبة. وجميعها تقودنا إلى ما يلي:-

1) تخثر البروتين:

المواد الكيماوية والحرارة العالية تؤثر على النظام الغروي والبروتوبلازمي والتي تنشأ عندها تغيرات في علاقاتها، ونتيجة لهذا سيحدث تخثر للبروتين. فأيون النحاس (Cu++) والزنك (Zn--) والحديد (Fe---) والتي لها شحنات إيجابية يمكنها معادلة الشحنات للأجزاء الغروية، وبنتيجة هذه المعادلة ستترسب.

فميكانزم عمل المطهرات مثل ($CuSO_4$, ZnO, $HgCl_2$) وغيرها فإنها تعمل على تخثر البروتين العائد للأحياء المجهرية بتأثير الأيونات المعدنية وبالاعتماد على الأواصر وعلى الوزن الذري لها. فمثلاً الأيونات ثلاثية الشحنة (+ + +) لها تأثير كبير جداً على التخثر من التي لها شحنتان (+ +) وهذه أيضاً بدورها تأثيرها أكبر من ذات الشحنة الواحدة (+) وعلى نفس الأساس يعتمد تأثير الفينول والكحولات والفورمالين وبعض المركبات العضوية الأخرى.

2) الروابط الكيماوية غير المتخصصة:

كثير من المواد مثل الفينول والفورمالين والقواعد القوية والأحماض وأيونات الكلور وغيرها ترتبط بارتباط غير متخصص مع بعض أو مع كل البروتينات مولدة مركبات وينشأ بذلك واقع غير متخصص وهذا بدوره يؤثر على بروتوبلازم الكائن الحي.

3) الروابط الكيماوية الخاصة (المتخصصة):

هناك بعض المجاميع (مركبات كيمائوية) والتي في تراكيز واطئة يمكنها من إيقاف مجموعة وظائف لأنزيم معين. والمثال عليها المضادات الحيوية (السلفاميد) التي يمكنها من إيقاف بعض الأنزيمات الميكروبية والتي تأثيرها (microbiostatic).

4) حرية العمل السطحي:

المواد الحيوية السطحية بنتيجة الامتصاص يمكنها أن تتراكم على سطحها كمية كبيرة من المطهرات والتي تحمل من قبل المواد الحيوية السطحية، وهذه بدورها تركزها في أجسام الكائن الحي أو على الأنزيمات وبنتيجة هذه العملية تخرب أو تعمل على تلف نفاذية الأغشية الميكروبية، وكذلك تعمل على إتلاف حيوية الأنزيمات وبالنتيجة عدم تجهيز أجسام الأحياء بالمواد الغذائية نتيجة للتلف الحاصل. وهنالك بعض المضادات الحيوية التي لها تأثير (Bacteriseptic)، وتأثير (Bacteriocide) وفي كل الحالات يكون بحالة متحدة (مع عوامل أخرى)

لأجل أن يقوم بواجبه فتأثيره (microbioside) يكون قوياً جداً في المحيط المائي أو الوسط السائل، حيث الماء يكون عامل منطلق لتخثر البروتين وهذا يعتمد على عوامل فيزيوكيماوية، وطبيعي بدرجة واطئة من ال (Hydration) (تجفيف) البروتوبلازم الأحياء.

فالسبورات مثلاً يكون الماء فيها بارتباط ثابت وبدون خاصية الماء الحر، لهذا ستبقى السبورات لفترة طويلة. فالحرق وتأثير المواد الكيماوية ستكون مطهرة (Disinfection) والمواد المطهرة تأثيرها ليس فورياً بل يعتمد على نوع الكائن المجهري الحي وعلى الثوابت الفسيولوجية وحساسية هذه الأحياء لهذه المواد كذلك تركيزها ودرجة حرارته. وسرعة المطهر (كيماوياً أو فيزياوياً) تؤثر في مزرعة ميكروبية في درجة حرارة ثابتة وتركيز معين و (pH) معين وزمن معين.

التعقيم عند درجة الحرارة العالية:

إن التعقيم عند درجة الحرارة العالية يضم البسترة والتندلة وحرق البخار والتعقيم بالبخار تحت الضغط والتعقيم الجاف.

أ) البسترة:

تستعمل عملية البسترة لتعقيم موضوعي تحت حرارة (65م°) ولفترة معينة صغيرة والتي عندها ستقضي على الأشكال الخضرية والبسترة يمكن أن تكون على درجة حرارة (65م°) ولمدة (30) دقيقة أو (72 م°) ولمدة (15) دقيقة أو (83 م°) ولمدة (1 – 2) دقيقة ونوع البسترة يتحدد من خواص الوسط.

ب) التندلة:

تستعمل عملية التندلة عند حرارة غليان الماء ولمدة (30) دقيقة وعند هذا النوع من التعقيم تموت الأحياء المجهرية الخضرية ولكن الأشكال السبورية تتحمل ويمكن أن لا تجري هذه العملية بنفس اليوم بل تترك المادة لتبرد ليوم وتعاد عملية التعقيم.

أنواع التعقيم:

التعقيم الجاف (Dry Heat Sterlization):

إن عملية التعقيم الجاف تعتمد على طرد الماء من المادة وبذلك فإن الأحياء المجهرية تتعرض إلى درجات حرارة عالية تصل إلى (330م) ولمدة (1/10) ثانية ومنها الطرق التالية:-

1. أفران الهواء الساخن **(Hot air ovens)** :

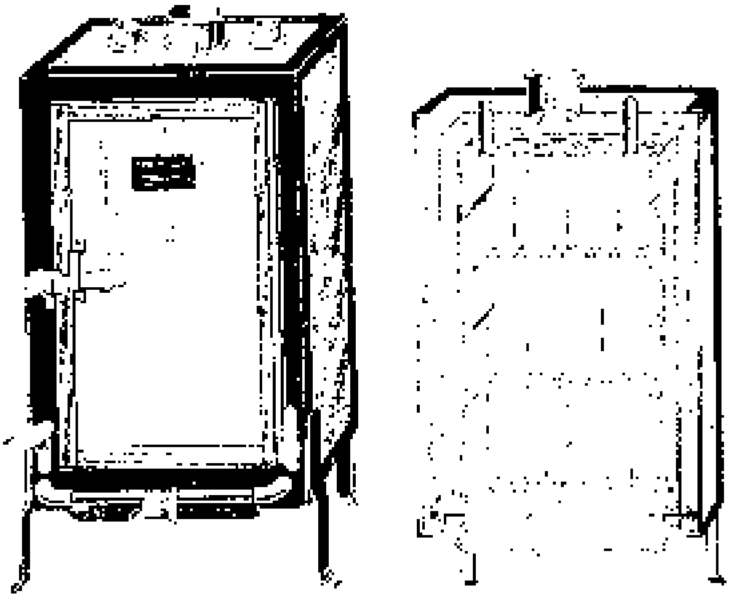
وتعتمد هذه الطريقة باستعمال أفران تعتمد أساسها على تسخين الهواء بداخلها كهربائيا حيث تصل درجة حرارته إلى (160 – 180م) ولمدة (2 – 3) ساعات وهذا النوع من الأفران يتم فيها تعقيم الأدوات الزجاجية المستعملة في التحضيرات المايكروبايولوجية ويستحسن استعمال أوعية معدنية أو نحاسية للحفاظ على هذه الأدوات الزجاجية معقمة لمدة أطول.

2. اللهب المباشر لدرجة الاحتراق (Incineration heat):

وبهذه الطريقة يستخدم لهب مصباح بنزن يستعمل في تعقيم ابر التلقيح على اختلاف أنواعها.

3. اللهب الكحولي (Alcohol Flaming):

يمكن تعقيم الكثير من الأدوات المعدنية المستعملة في حقل المايكروبايولوجي وذلك بأن يغمر في الكحول الاثيلي ومن ثم تعريضه إلى اللهب. كفاءة هذه الطريقة تعتمد على تكرار العملية.



شكل (3) يوضح المعقمات الجافة

التعقيم بالبخار تحت الضغط العالي:

في العمليات المايكروبايولوجية الصناعية يستخدم هذا النوع من التعقيم لتعقيم الأوساط والخزانات حيث توضع المواد المراد تعقيمها تحت البخار (120م) مباشرة وتحت ضغط لمدة (30) دقيقة فتموت الأحياء المجهرية الخضرية. والمثال على هذا النوع (Auto clave)، وفي هذه الطريقة يستعمل بخار الماء في إجراء التعقيم بدلا من الهواء الساخن ويكون إما بطريقة استغلال بخار الماء مباشرة أو أن يضغط إلى درجة يصل ضغطه الضغط الجوي وبذلك تزداد درجة حرارته، وإن التعقيم بالحرارة الرطبة له دور كبير في تجميع وتخثير البروتين الخلوي حيث أنها تفسد عن الطبيعة الغروية للبروتوبلازم الحي. ومن هذه الطرق:-

الأوتوكليف (Auto clave):

إن نظام استعمال جهاز الأوتوكليف يعتمد بالأساس على رفع درجة حرارة الأبخرة مع الضغط إلى درجات أعلى وبذلك نحصل على درجات حرارة أكثر ارتفاعا. والأوتوكليف عبارة عن أسطوانة معدنية ذات مقاومة عالية (الصلب) أي يتحمل الضغط، وهذه الأسطوانة لها غطاء محكم وعليه منظم حسب الضغط الذي نحتاجه، كذلك فإن هذه الأسطوانة مزودة بفتحة لأجل رفع الضغط ولأجل طرد الهواء عند بدء عملية التعقيم ومن ثم تغلق هذه الفتحة لأجل دفع الضغط.

تسخين الجهاز يعتمد على نوع الشركة المصنعة إما كهربائيا أو غازيا. كذلك فإن هذه الأسطوانة ممكن أن تكون مصنعة بصورة أفقية أو عمودية.

والجدول التالي يوضح العلاقة ما بين زيادة الضغط للبخار ودرجة حرارته:-

ض/غ	درجة الحرارة
صفر	100
5	107.7
10	115
15	121
20	126
25	130

الأشعة:

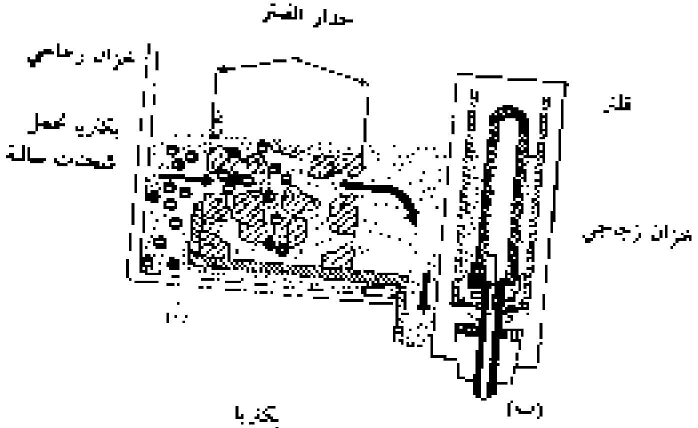
تستعمل الأشعة في التعقيم والتطهير حيث يمكن استعمال الأشعة الالكترومغناطيسية. وكذلك الأشعة (Ultra Violet Region) ما بين (A 2800-2400) التي هي قاتلة للأحياء حيث تنفذ إلى داخل الخلية وتعمل أعمال عكسية في بناء بروتوبلازم، وإن التشعيع عملية ناجحة في القضاء على الأحياء المرضية. ويمكن أن تقضي على سبورات (Baccilus Sublitus γ Rays Inization) تستعمل لتعقيم الأجهزة، وتأثيرها قاتل للأحياء المجهرية والمثال عليها الأشعة التي تخرج من (Radinisotope Co).

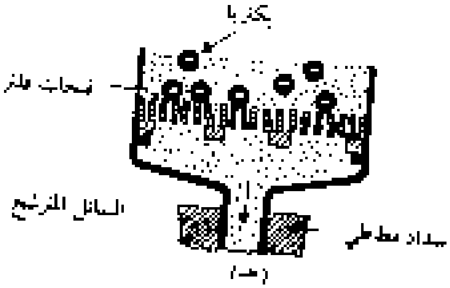
المرشحات:

هنالك نوعان من الترشيح لتعقيم السوائل والغازات أحدهما يختلف عن الآخر بالأساس:-

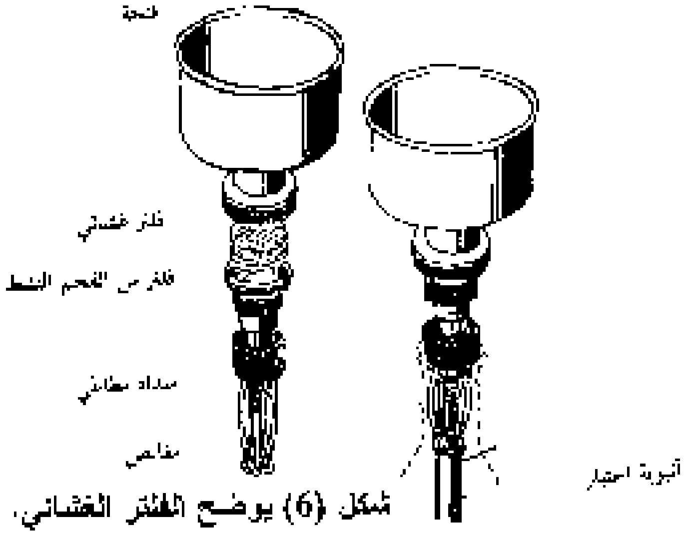
١. الترشيح الحقيقي (True Filtration sterilization):

فالغاز أو السائل بمروره بالغشاء وعبر الثقوب الصغيرة والأقل حجماً من حجم البكتيريا، لذا تطرد هذه الأحياء من السائل أو الغاز ويستعمل لذلك مرشحات من البورسلين أو الزجاج.

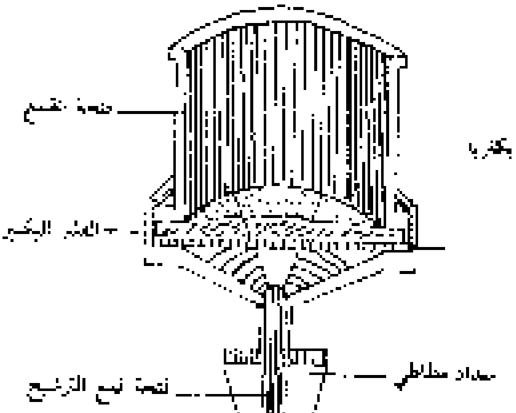




شكل (5): (أ) يوضح تأثير الامتصاص للفلتر في عملية الترشيح.
(ب) تأثير الفلتر الغشائي.
(ج) أقطار البكتيريا كذلك الدور الامتصاصي للبكتيريا الذي يلعب دوراً في تبادل الشحنات.



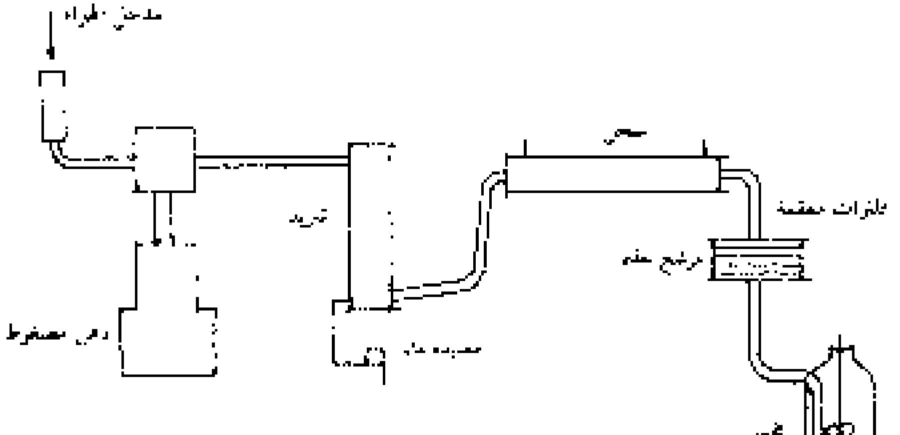
شكل (6) يوضح الفلتر الغشائي.



شكل (7) يوضح فلتر زاتيس.

2. هذه الطريقة لا تعتمد على حجم الثقوب ولكن هذه المرشحات تحتوي على فايبر مضغوط أو قطن زجاجي أو قطن صوفي، وهذه المـــواد تعقـم بالهواء المعقم بسرعة (اقدم/ ساعة) على (Slag Wool) والمدفوع بدائـــرة إلـى كثافة (17 لب/قدم) مع فايبر بقطر (6µ) أو أقل، هذه المادة الفيبرية يمكن أن تدهـن، لذا فسوف تتساقط عبر الفلترات الأحياء المجهرية، وهنالك ثلاث قضايا شائعة فـي تلوث السوائل بالهواء :-

1. هو الانخفاض الزائد بالضغط المرتبط بقلة درجة الحرارة بسبب التلوث.
2. البرمجة غير الكاملة للضاغط، والمشكلة هي في ضغط الـهواء مـع رطوبـة (50%) ودرجة حرارة (45ف) وهذا يكبس إلى حد (20لب/دقيقة).



شكل (8) يوضح موقع المرشحات (الفلتر) في المخطط التكنولوجي.

الفصل الخامس

تقنية التربية والانتقاء والجمع المختبري لمزارع الأحياء المجهرية الصناعية

Culturing Technology, Selection and Laboratory Collection for Industrial Microorganism

تقنية التربية والانتقاء والجمع المختبري لمزارع الأحياء المجهرية الصناعية:

Culturing Technology, Selection and Laboratory Collection for Industrial Microorganism:

تربية الأحياء المجهرية:

يمكن للأحياء المجهرية النمو ليس فقط على الأوساط الطبيعية بل على الأوساط الصناعية أيضا. فالأوساط التي تستعمل لنمو الأحياء تسمى بأوساط التربية و التـــي إما أن تكون سائلة أو صلبة.

والتي تتضمن ما يلي:-

1. الماء.
2. المادة الغذائية.
3. درجة التفاعل (pH).
4. ظروف الأكسدة والاختزال.
5. المواد الحيوية البيولوجية.
6. الظروف المثلى للحرارة و التهوية و التحريك.
7. مواد أخرى التي يلزم وجودها.

طرق عزل الأحياء:

لتحديد مزرعة نقية من الطبيعة، يجب دراسة خصائصها من الناحية المورفولوجية والفسيولوجية والحيوية. ويعتبر باستور أول من وضع الخطوط الأولى للعزل وذلك بتحديد ظروف العزل من حيث عملية النمو والحجم واللمعان للمستعمرات. علما أنه توصل إلى استعمال الأوساط الغذائية السائلة لتحضير المزارع النقية وبهذه الطريقة استطاع تحديد المواد التي تعزل النوع الواحد. ولكن هذه الطريقة لم تكن متكاملة حيث أن هناك العديد من الأحياء التي يمكنها أن تعيش في نفس الوسط.

وفي سنة (1881) استطاع روبرت كوخ "Robert Koch" من التوصل إلى استعمال الأوساط الغذائية الصلبة لعزل المزارع النقية مما شجع على ذلك نمو أنواع مختلفة من الأحياء خصوصا الأعفان حيث أعطت ألوانا مختلفة، ومشاهدة حوامل السبورات على السطح الغذائي الصلب، كما ولاحظ النموات على سطح قطع البطاطا وظهور مستعمرات معزولة مع اختلاف ألوان سبوراتها، وتحت ظروف معقمة عزل عينات من هذه المستعمرات الملونة فوجد بأن هذه الأحياء والمأخوذة من مختلف المستعمرات تختلف في صفاتها من الناحية المورفولوجية.

ثم قام بعد ذلك بزراعة الأنواع المعزولة على أوساط من البطاطا المعقمة فحصل على مزارع نقية. فمستعمرات النوع الواحد لها خواص ومزايا من حيث البناء والشكل، الحجم، اللون،...الخ. هذه المواصفات للمستعمرات هي خاصية

للنوع المعزول. كذلك السلالة المهجنة يمكن معرفتها من دراسة الخواص والصفات للمستعمرة ويمكن تحديدها ومعرفتها وإرجاعها إلى الأصل.

ولأجل عزل المزارع النقية في زمن كوخ (Koch) استعملوا "الأوساط الجيلاتينية والتي لها طابع جيد. وقدرتها على الإسالة في درجة حرارة فوق (25م°). وفي بداية عام (1882) انجليا هيسا (Anglic Heca) من مختبر روبرت كوخ، فرضت الأوساط الغذائية الأكرية "Agar" والتي تسيل عند درجة حرارة (90 – 100م°) هذا العمل اتسع وانتعش لإعطائه نتائج جيدة إلى يومنا هذا. وقبل ثلاث سنوات من هذا العمل استطاع الباحثون الروس ومنهم (L. L.Haudenrch) سنة (1885) بأن يحث استعمال الأطباق الزجاجية المزدوجة والتي تسمى الآن (petridish) والتي تم إيضاحها بعد ذلك من قبل (R Petri) سنة (1887).

وبعدها جاء آخرون درسوا ونجاح طرق عزل المزارع النقية، وقبل حقبة من الزمن وجد بأن بعض الأحياء من نوع (Autotriphic) تحتاج إلى توفر المواد العضوية مثل (Agar-Agar) في الوسط الغذائي بعكس بعض الأحياء المجهرية الأخرى والتي هي (Hetrotrophic) تنمو على (Agar-Agar)، وهذا مما جعل الدارسين أن يبحثوا على مواد كيماوية أخرى مفيدة للحصول على أوساط جلاتينية مناسبة وبنجاح كبير استعملت السليكات "SiO_2" والتي بواسطتها يمكن الحصول على أوساط غذائية صلبة وجيلاتينية.

ولتحضير السليكات يجب الأخذ بالاعتبار المحافظة على بعض الظروف مثل الحرارة، pH، تركيز "SiO_2"، توفر المواد اللازمة ذات الطبيعة المتأينة. إضافة إلى الجيلاتين و (Agra-Agra) و "SiO_2"، لأجل تحضير الأوساط الغذائية الصلبة تستعمل أيضا الأوساط التالية:-

سيرم الدم، بياض البيض، صفار البيض والذي يتخثر عند الحرارة، البطاطا، الجزر، الخبز، اللحم وغيرها.

لأجل تربية الأحياء وعزلها إلى مزارع نقية على السطوح الصلبة، استعملت مرشحات غشائية والمصنعة من مادة اسيتات السليلوز (Cellulose acetate) أو أي مادة أخرى مشابهة وبأقطار مسامية بحجم أكبر من (0.5 U). هذه الأغشية تعقم بواسطة مواد غازية معقمة أو بواسطة أشعة فوق البنفسجية أو أشعة جاما، وهنالك أيضا مرشحات معدنية، ويتم العزل بترشيح السوائل والمواد الغذائية الصناعية وفضلات المعامل، وكل السوائل التي تحتوي على الأحياء المجهرية فإن هذه المرشحات تسمح بمرور السوائل فقط بينما تبقى الأحياء المجهرية على السطح الغشائي للمرشحات، وهنالك مرشحات تسمح لنوع واحد من الأحياء للمرور من خلال الغشاء. ومن ثم زراعة هذه الأحياء على الأوساط الغذائية الصلبة وتهيئة الظروف الملائمة لها ولأجل العزل الكامل للمزارع النقية من بعض الأنواع تستعمل الأوساط الغذائية المنتخبة (Selective madia).

فمثلا لأجل نمو الخمائر والأعفان يستعمل وسط سابورو (1) والذي أكثر محتوياته كاربوهيدراتية وله (pH) منخفض نوعا (5.5)، وهو جيد جدا لنمو هاتين المجموعتين من الأحياء المجهرية.

ومكونات هذا الوسط هي كالآتي:-

لتر من الماء المقطر، (40غم) جلوكوز أو مالتوز، (10غم) ببتون، اكر اكر (20غم)، (pH) الوسط (5.5 - 5) ويمكن أن يضاف للوسط بلورات من (crystal violet) والستربتومايسين التي تمنع نمو المايكروفلورا.

طرق عزل المزارع النقية:

الطرق المستعملة لأجل الحصول على المزارع النقية من المزارع المختلطة يمكن تقسيمها إلى مجموعتين. طرق أساس فصلها ميكانيكي، وطرق أساسها الاعتماد على الخواص البيولوجية.

1. طرق الفصل الميكانيكي للأحياء:

هنالك العديد من طرق الفصل الميكانيكي ومنها:

أ. Fraction method: (رثوي باستور):

وهذه الطريقة تعتمد على درجة التخفيف الكبيرة للمادة المدروسة حتى نحصل على جسم ميكروبي واحد.

ب. طريقة روبرت كوخ:

من خلال التجارب المستمرة لزراعة الأحياء على الأوساط الصلبة، فقد استطاع روبرت كوخ من استعمال طريقة لوي باستور نفسها ولكن على وسط صلب بـــدلا من الوسط السائل.

ج. طريقة دريكالسكي:

حيث استعمل الوسط الغذائي الصلب لأجل الفصل باستعمال صحـون عديـدة (petridish) والزرع يتم بواسـطة (Spatula)، وبنفـس (Spatula) يتـم زرع الصحون على السطح الغذائي الصلب حيث ستقل كمية الأحياء في الصحون إلى أن تصل إلى الصحن الذي يحتوي على مستعمرات أقل. نتيجة هذه العمليـــة نحصـل على مستعمرات ومنها يعمل تخفيف للمستعمرات المفصولة وإنمائها على السـطح الأخرى ويتم زراعتها من جديد فتحصل على مزارع نقية.

2. طرق العزل البيولوجي للمزارع والحصول على مزارع نقية:

لقد استطاع الكثير من المشتغلين في حقل عالم الأحياء المجهرية عزل الأحيــاء بطريق بيولوجي بالاعتماد على طريقة تكاثرها وتأثير مختلف العوامل الفسيولوجية والكيماوية والبيولوجية عليها.

وسوف نذكر البعض من هذه الطرق وبدون إيضاح لجوهرها حيــث أن هـذه الطرق متوفرة في كثير من المصادر العلمية. ومن هذه الطرق:-

أ. طريقة ج. ن. كابرجسكي 1919:

أول من وضع طريقة لعزل الأحياء المجهرية المتحركة عن الأحياء المجهرية غير المتحركة وذلك باستعماله أوساطا غذائية صلبة والموضوعة في أطباق والمعلمة بأوراق فلتر مخططة من جهتيها، وعند عملية الحضن فإن سرعة حركة الأحياء تختلف فيما بينها وعند فترات مختلفة من الحضن (3-5-7) ساعات، تؤخذ الورقة ويتم نقل المستعمرات ذات الأبعاد المختلفة في أنابيب اختبار فبذلك نحصل على مزارع نقية.

ب. طريقة ي. ي. شاكوفيا (E.E. Shakyvia):

بهذه الطريقة يتم زراعة اللقاح في أسفل الماء المتكثف في قعر ال(Slant)، فعند عملية الحضن فإن الأحياء المتحركة ستنمو على السطح ال(Slant) أما غير المتحركة فستبقى في الماء المتكثف.

ج. طريقة ب.ب. يولسوف 1935:

وقد تم تحوير هذه الطريقة من قبل م.ج. كيجنكو 1958 حيث يستعمل وعاء خاص وبعض الأوساط الغذائية الخاصة. وإن هذه الطريقة تستعمل لمعرفة الأحياء المجهرية وخصوصا البكتيريا المتحركة. فتحت الطرق البيولوجية هنالك أيضا طرق عزل الأحياء اللاهوائية.

د. طريقة فيون – فيليال:

وعند هذه الطريقة يتم فصل الأحياء المجهرية ميكانيكيـــا وخاصـــة المقاومـــة للأوكسجين الهوائي، فبعد إذابة وتبريد الوسط الغذائي الصلب تســتعمل الماصـــات المبسترة (Pipets) حيث يترك قليلا من الوسط الغذائي في هذه الماصــــات وتســد وتغلق نهاياتها وتترك لبضعة أيام في الحاضنة، ومن ثـــم يجـــري لـــها التخـــافيف اللازمة ومن ثم يعمل فصل لهذه المستعمرات كمزارع نقية.

هـ. طريقة الروستات (Anerostate):

تعتمد هذه الطريقة على تهيئة الظروف اللاهوائية للوسط الغذائي والــذي تنمــو فيه المزارع المختلطة ويتم هذا إما باستعمال ديسكيتر أو أجـهزة معدنيــة مفرغــة وباستعمال مواد كيماوية مثل (Na_2CO_3, $Na_2S_2O_4$).

كيفية الحصول على المزارع النقية من المتحورات (Mutant):

- **بطريقة الطبع المعاد (Replication):**

بعد الحصول على المتحورات من السلالات تزرع هذه على الوســـط الغذائــي المثالي للنمو ومن ثم يعمل لها التخفيف اللازم في محلـــول فسيولوجي، وبعـــد أن تطبع على المحلول الفسيولوجي الاعتيادي يؤخذ (50 سم^3) منه ويلقح به الســطح الأكري الموضوع في طبق بتري بواسطة ملعقة (Spatula).

يوزع اللقاح على سطوح أطباق عديدة بالتتابع إلى أن يصل إلى الطبق الذي سيحوي أقل كمية من اللقاح ومن ثم يتم الحضن وبعد فترة الحضن سنحصل على مستعمرات ومنها يصل طبعات على قرص طبع المغلف بقطعة قماش بطريقة معقمة تحمل هذه الطبعات وتطبع على صحون جديدة ومن ثم تحضن، وبعد عملية الحضن سنحصل على مستعمرات معينة ومحددة بشكل واضح ومن هذه الطبعات سنحصل على مزارع نقية بواسطة زراعتها على الأوساط المنتجة، فمثلاً الأوساط التي تحتوي على البنسلين ستنمو عليها الأحياء التي لها مقاومة للبنسلين وكذلك الوسط المحتوي على الثيرونين (Therotine) ستنمو عليه فقط الأحياء المقاومة للثيرونين. وبهذه الطريقة يمكن أن نحصل على مزارع نقية.

- **فصل المزارع (Auxotrophic) بمساعدة البنسلين:**

تؤخذ الأحياء المجهرية في الطور اللوغاريتمي وتشعع بالأشعة فوق البنفسجية (UV) وتحضن بعد ذلك ومن ثم تنشر في محلول فسيولوجي، وبعد فترة معينة من التجويع للأحياء في هذا المحلول يضاف إليها مادة البنسلين بتركيز معين تمنع أو تقتل الأحياء وتبقى فقط أحياء الـ (Auxotrophic) فإنها ستنمو بصورة نقية.

- **طرق زراعة أو تربية الأحياء:**

إن من طرق زراعة الأحياء ما يلي:-

1. الزراعة ذات الإنتاج لمرة واحدة (Batch Culture).
2. الزراعة التزامنية (Synchronous Culture).
3. الزراعة المستمرة (Continuous Culture).

1- الزراعة ذات الإنتاج لمرة واحدة (Batch Culture):

الأحياء المجهرية في هذا النوع من التربية لا تكون مايسيليوم فسي الأوساط الغذائية السائلة وكذلك سرعة نموها مختلفة وتتغير في وقت التربية، وتمتاز بالأطوار الأربعة وخصوصا طور النمو. بعد التلقيح للوسط بالمادة اللقاحية يبدأ طور الركود، وعدد الأحياء في هذا الطور لا تتميز ويكون قليلا. وظروف النمو تجهز لأجل التكاثر السريع.

أما الطور الثاني فيسمى بالطور اللوغاريتمي أو (Expotential phase): وهو طور النمو ويتميز هذا الطور بنمو الأحياء بسرعة عظمى بحيث تصل الأحياء إلى عمر معين بحيث يمكنها الانقسام اعتياديا إلى قسمين، وكحالة استثنائية للخمائر هي عملية التبرعم وكذلك بعض الأحياء البكترية تكون أجساما جديدة وبعد فترة من الزمن ستنفصل الواحدة عن الأخرى أو أن تبقى متحدة بمجموعات على شكل سلسلة.

وفي الطور اللوغاريتمي أجسام الأحياء تنقسم بسرعة ثابتة، وإذا كان تركيز الأحياء في الوسط هو (x) ملغم/مل (كمادة جافة Biomass)؛ فإن سرعة النمو U يمكن حسابها بالشكل التالي :-

$$U = \frac{1}{X} * \frac{dx}{dt}$$

فإذا كان عدد أجسام الأحياء في لحظة معينة (t_1) هي (x_1) وفي لحظة زمنية أخرى (t_2) هي (x_2) ولأجل تحضير المتوسط لجيل واحد من أجسام الأحياء أو العدد الكامل للجيل والذي ينعكس من خلال المعادلة التالية:-

$$\text{العدد الكامل للجيل} = \frac{t_2 - t_1}{3.32\,(\log x_2 - \log x_1)}$$

فترة التكاثر لبعض الأنواع البكترية هي بحدود (20 – 30) دقيقة أما أبطأ عملية نمو للأحياء فتصل إلى عدة أيام.

في المزارع ذات الإنتاج لمرة واحدة (نظام الوجبة) فسرعة النمو كبيرة جداً وتحدد وفق المعادلة التالية:-

$$U = U_{max}\left(\frac{S}{K_s + S}\right)$$

حيث أن:

(U_{max}) = السرعة العظمى للنمو في الوسط المحدد.

(S) = تركيز المواد المعطاة.

(K_s) = الثابت العام ويمثل متوسط السرعة القصوى للنمو في الوسط المحدد.

$$K_s = \frac{U_{max}}{2}$$

ونتيجة سرعة تكاثر الأحياء المجهرية خلال طور (Expolantial phase)، فإن مواد الوسط الغذائي ستنضب بسرعة وكمية المواد المنتجة سوف تزداد وهذا سوف يقودنا في النهاية إلى الطور الثالث (Stationary phase) للنمو وهنا يكون

تركيز أجسام الأحياء المجهرية ثابتا وهذه الفترة يمكن أن تكون مختلفة الطول، وبعدها يأتي الطور الرابع – طور الموت (Death phase) حيث أن عدد أجسام الأحياء ينخفض.

إن الأحياء المجهرية التي ستتكاثر على أسطح الأوساط الغذائية الصلبة ستكون مستعمرات على السطح وفي أعماق الوسط ستعمل على تنظيم مواد الوسط كالأوكسجين وغيرها لأجل عمل توازن طبيعي لنمو الأحياء على الأوساط الغذائية الصلبة.

وعند نمو المايسليوم في الأوساط الغذائية السائلة فإن نمو واستمرارية بناء الهيفات يبقى مرتبطا أو متصلا بقمم نهاياتها أو قريبا منها وبمجالها والمستوجمات الاعتيادية لا تكون هايفا، أما الخلايا المايسلية غير المقسمة فالمايسليوم يكون محتويا على العديد من الأنوية، أما النمو على سطح الوسط الصلب فالمايسليوم سينمو في كل الاتجاهات وتكون مستعمرات دائرية.

2. المزارع السنهورية (Syncronous Culture):

عند الزراعة الإنتاجية ذات الوجبة (Batch) وفي الطور اللوغاريتمي (expotential phase) الأحياء المجهرية لا تكون جميعها في عمر واحد، أو بتعبير آخر إن الأجسام الميكروبية في فترة النمو لا تكون متشابهة من حيث درجة الانقسام وكذلك نوع أو شكل عملية التكاثر.

ففي هذه الحالة من التربية والتي عندها الأحياء تكون في حالة فسيولوجية مختلفة تعطي صعوبات كثيرة والتي يجب عندها عمل دراسات لحيوية الأحياء وسايتولوجيتها وفسلجتها، وهذه الدراسات ممكنة ولكن يجب أن تكون الأحياء متقاربة نوعا ما. لذلك فنتيجة الدراسات توصل الباحثون إلى التربية السنهورية والتي تعتمد في أساسها على إيقاف جميع العمليات الحيوية والفسلجية لفترة زمنية والحفاظ على محتويات الخلية بدون أي تأثير، وعند زوال هذا العامل ستبدأ أجسام الأحياء في وقت واحد بالانقسام والتكاثر وتكون الأحياء في حالة واحدة وهذه المزارع تدعى بـ(Syncronous Culture).

ويتم الحصول على هذه المزارع بإحدى الطرق التالية:-

الطريقة الأولى:

وتعتمد على مبدأ تغير الظروف المحيطة كتغير درجة الحرارة، تغير مواد الوسط... فعندما تكون درجة الحرارة ضمن الحدود المثالية فالنمو للأحياء يكون مثاليا وشبه مثالي فمثلا السلالة *(Tetrahymena Pyriforms)* التي تنمو وتتكاثر عند درجة حرارة (40 م) فعندما تنخفض الحرارة إلى (28 م) ولمدة (10-20) دقيقة فإن الأحياء ستتوقف عن النمو والتكاثر، ولكن حين عودة درجة الحرارة إلى (40 م) فسوف تبدأ المزرعة السنهورية.

وكذلك يمكن الحصول على هذا النوع من المزارع باستعمال أوساط غذائية متغيرة. فمثلا احياء ال (Autotrophic) عند وضعها لفترة زمنية في وسط لا

يحتوي على المواد اللازمة والضرورية لنموها فعند وضعها في وسط متكامل المواد فإنها ستنمو. وبذلك نحصل على المزرعة السنهورية وكذلك يمكن الحصول على هذا النوع من المزارع باستعمال مواد مانعة "Inhibiters" مثل مادة الكلورتفينكول أو لتعريضها إلى الأشعة فوق البنفسجية لفترات زمنية معينة.

الطريقة الثانية:

وتعتمد هذه الطريقة على الانتخاب الميكانيكي حيث يتم تعيين أو تحديد عمر المزرعة أو حجم الخلايا وذلك باستعمال مرشحات غشائية خاصة لهذا الغرض وبعدها يحضن المحلول الراشح لمدة جيلين أو ثلاثة. حينئذ سنحصل على المزرعة السنهورية، أو يمكن أخذ أجسام الأحياء المجهرية من طور معين من أطوار النمو ومن ثم إضافة الدكستيرين إليها ومن ثم تطرد مركزيا. فالخلايا الكبيرة ستترسب أما الخلايا الفتية فستكون بحالة انقسام. أما الخلايا الصغيرة فإنها ستطفو ويمكن أخذ هذه الخلايا ونقلها بصورة معقمة في وسط جديد. وبذلك نكون قد حصلنا على مزرعة سنهورية (Syncronous Culture) وفي استمرارية ثلاثة أجيال.

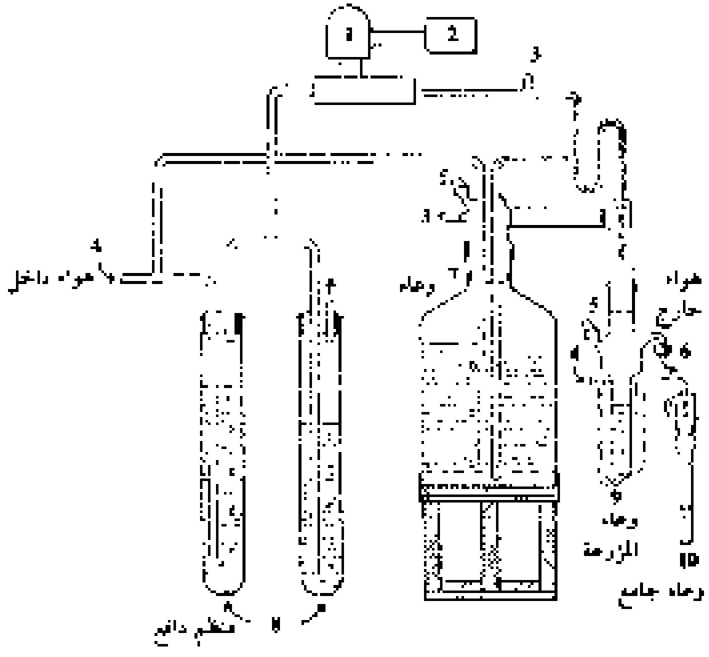
3. المزارع المستمرة (Continuous Culture):

لتفادي الانخفاض الحاصل في سرعة انقسام خلايا الأحياء في المزارع ذات الوجبة الواحدة (Batch Culture) نتيجة نضوب المادة الغذائية وتراكم المنتوج في الوسط. استحدثت طريقة المزارع المستمرة التي تعتمد على استمرارية الطور اللوغاريتمي وطور (stationary phase). وفي هذه الطريقة استخدم نوعان من الأجهزة التي تربط بالمخمر.

النوع الأول ويسمى (Turbiostat) والذي يعتمد على قياس العكارة.

أما النوع الثاني فيسمى (photoelement) والذي يعتمد على قياس الكثافة، ماثل التخمير، حيث يعمل كلا الجهازين على تنظيم عملية ضخ الوسط بحجوم ثابتة وبصورة مستمرة وبذلك سوف تستمر المزارع بالتكاثر وبطور لوغاريتمي ثابت.

أما الطريقة الثانية للزراعة المستمرة والتي تعتمد على نظام (Chemo) والذي عنده ينظم إعطاء أو إضافة وسط بسرعة معتمدة على السرعة المعروفة والقصوى لنمو الأحياء. هذا النوع من الأجهزة أو الأنظمة وجدت له تطبيقات واسعة والفضل يعود إلى سهولة بنائه وسهولة عمله. حيث أن نظام (Turbiostat) عمله بالضبط غير ثابت أو متذبذب لأن الأحياء يجب أن تربى عند السرعة القصوى للنمو وعند درجة كبيرة من التخفيف. وأهم عامل عند الـ (chemostat) هو التنظيم لسرعة إعطاء الوسط الغذائي والمرتبط بسرعة ينظم نمو الأحياء فإذا كان إعطاء الوسط الغذائي بصورة سريعة فيمكن غسله أو عند إعطائه الوسط بصورة بطيئة فإنها ستأتي في الطور (stationary phase) والشكل التالي يوضح المخطط الاعتيادي لـ(chemostat).



1. قسم متخصص لنمو المزرعة الميكروبية.
2. ساعة.
3. عكس ترقين.
4. هواء.
5. فتحة.
6. فتحة الهواء الخارج.
7. خزان.
8. منظم بعد الدفع أو الكبس.
9. خزان.
10. خزان الجمع.

شكل (9) يوضح نظام Chemostat

في نظام ال (chemostat) فالعاملان الاثنان يجب أن يكونـــا منظمـــين. فــإن سرعة نمو المزرعة يجب أن تكون ثابتة.

وسرعة وضع الوسط (f) إلى حجم المزرعة (V) يسمى بسرعة التخفيف (D).

$$\text{سرعة التخفيف} = \frac{f}{V} = D \ .$$

سرعة التخفيف هي مساوية لحجم الوسط الغذائي في الوعـــاء ولمـدة ســاعة واحدة، وقت العملية $\frac{1}{D}$ هي معادلة أو مساوية لمتوسط الوقت لوضع الأحياء في الوعاء، وعموما فإن السرعة الأسية (expotantial speed) تنعكس بالمعادلـــة التالية:-

$$\mu = \frac{1}{x} * \frac{dx}{dt} \qquad \ldots\ldots\ldots (1)$$

ومن هذه المعادلة نعرف بأن سرعة النمو هي مساوية لـ

$$\frac{dx}{dt} = UX \qquad \ldots\ldots\ldots (2)$$

حيث أن D هي سرعة التخفيف. سرعة غسل الأحياء من الوعاء مبعين من المعادلة:-

$$-\frac{dx}{dt} = Dx \qquad \ldots\ldots\ldots (3)$$

الزيادة العامة للنمو ستكون:-

$$Ux - Dx = x\,(U-D)$$

عندما تكون المزرعة في (stationary phase) والتي عندها يكــــون تركــيز الأحياء ثابتا فإن x(U-D=O) ومن هنا (U=D) وعند استعاضة (U) ب(Umax) سنحصل:-

$$D = Umax \left(\frac{S}{KS + S} \right) \quad \ldots\ldots\ldots\ldots(4)$$

ومن هذا يظهر بأن كل قيمة ل(U) للمزرعة المستمرة سيكون أقل من (Umax) المعينة للمزارع (Batch) والتي يعكس ب(S/Ks+S) يجب أن تكون أقل من (1) أما سرعة استعمال الوسط الغذائي (substrate) في وحدة الزمن .

$$\frac{ds}{dt} = \frac{ds}{dx} = \frac{dx}{dt} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots(5)$$

فالإنتاج (Y) من وحدة غذائية مستعملة هي مساوية ل (-dx/ds) وعند التعويض بالمعادلة رقم (2) و (3) سنحصل على:

$$-\frac{ds}{dt} = D\frac{x}{y} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots(6)$$

ومن هنا يظهر بأن كل تغيير لتركيز ال (substrate) في المزرعة (ds/dt) هي مساوية للمواد الموضوعة مطروح منها المواد الخارجة مضاف إليها المستعمل الفعلي (أو المستهلك):

$$\frac{ds}{dt} = DSR - DS - D\frac{x}{y}$$

حيث أن (SR) هو تركيز ال(substrate) في الوسط الغذائي الأساسي ولكن في السرعة الموجودة والثابتة فتعتبر التركيز (ds/dt) sybstrate هو مساو إلى صفر، ومن هنا:-

$$DSR = Ds + D \frac{x}{y} \quad \ldots\ldots\ldots(8)$$

أو

$$x = y\,(S_R - S) \quad \ldots\ldots\ldots(9)$$

وإن استعمال المعادلة (4) و (9) يمكن أن يؤثر بتركيز أجسام الأحياء في (substrate) لكل من قيمة (D) و (SR) إذ (Ks Umax) و (Y) هي معروفة.

طريقة التربية المستمرة يمكن القول عليها بأنها عملية من عمليات المايكروبيولوجي التكنيكي.

صيانة مزارع الأحياء المجهرية:

إن عملية انتخاب سلالات الأحياء المجهرية المستعملة للعمليات التخميرية المختلفة والطرق المستعملة لصيانتها هي عملية مهمة جدا، لذا وجب وضع الأسس لهذه العملية لصيانة هذه الأحياء. ويجب أن تكون هذه الأحياء تحت الشروط التالية:-

1. السلالة يجب أن تكون مستقرة وراثيا.
2. السلالة يجب أن تكون جاهزة الصيانة لفترات زمنية.
3. السلالة يجب أن تنتج عدة خلايا خضرية أو أسبورية أو أي وحـــدات إنتاجيـــة أخرى.
4. السلالة يجب أن تنمو (Vigorougly) وبسرعة بعد عملية التلقيح فـــي وعـــاء التخمير.
5. السلالة يجب أن تكون نقية وحرة من التلوث بالأحياء الأخرى والبكتريوفاج.
6. السلالة يجب أن تقاوم التلوث إذا كان محتملا.
7. السلالة يجب أن تكون قابلة للتغير من قبل المطفرات (mutation agent).

لذا سنتطرق هنا إلى الطرق المستعملة لأجل صيانة الأحياء المجهرية المستعملة في التخمرات الصناعية مع فوائد هذه الطرق وسلبياتها.

جمع المزارع العامة:

العديد من المايكروبايولوجيين والكيماويين يعتمـــدون علـــى المـــزارع العامـــة والشائعة للأحياء المجهرية والمستعملة في عمليات التخمرات الصناعية المتخصصة بالإضافة إلى مجمع الأحياء المجهرية في أمريكـــا، والمجمـــع الإقليمـــي الشـــمالي للأبحاث في أمريكا في (Pearia)، ومعهد التخمرات في أوساكا ومعهد (Bureau) في هولندا، والمجمع الوطني للبكتيريا الصناعية في بريطانيا. وهنالك العديـــد مـــن المجمعات الخاصة التي تعمل في بعض السلالات وحسب الطلب، وحديثـــا هنـــالك

دائرة الاختراعات في بعض أقطار العالم والتي وضعت بعض القوانين ليس فقط للصيانة بل لكفاءة التخمير أيضا وللعملية الميكروبيولوجية.

طرق صيانة مزارع الأحياء المجهرية:

هنالك ثلاثة طرق لصيانة مزارع الأحياء المجهرية عموما والمستعملة في صناعة التخمرات الصناعية وكل واحدة لها متغيرات متعددة.

1. تجفيف الأحياء المجهرية في التربة أو أي مادة صلبة أخرى.
2. خزن الأحياء المجهرية في أوساط غذائية صلبة (slant agar) أو في (menstra) حيث التنفس والتمثيل الغذائي يكونان عند الحد الأدنى وهذه تتضمن خزن الخلايا في المجمدات أو خزن الخلايا أو الاسبورات في الماء.
3. حذف الماء من الخلايا أو الأسبورات باستعمال طريقة التجفيد (lyophilization) في ظروف متعددة. والتكنولوجي المستعمل في التطبيقات الميكروبيولوجية وتجنب المشاكل التي تحدث نتيجة الوظائف الفسيولوجية لكل كائن مجهري حي.

أ. حفظ المزارع بالتجفيف:

(Trollope) عام (1975) أشار في دراسته إلى (33) نوع بكتيريا و (22) من الفطريات، لوحظ بأن (64%) من البكتيريا و (77%) من الفطريات المجففة بعد أربع سنوات على سلكاجل (Silica Jel) وعلى شكل مسحوق والتي حزنت على

درجة حرارة الغرفة ودرجة حرارة (4م) كانت جيدة. أما (Pridham) عام (1973) لاحظ بعد دراسة (1800) اكتيوماستس جففت في التربة نصفها قاوم بعد (20) سنة خزن.

أما (Kuznetsov) عام (1973) فقد وجد بأن (92-96%) يكون حيويا بعد (4-5) سنوات أما (Tujma) عام (1973) فقد وجدت طريقة تجفيف مزارع البكتيريا والبكتريوفاج تحت التفريغ عند درجة حرارة (2-5م) وعند استعمال سدادات قطنية والتي تستعمل لأجل إزالة الماء من الخلايا، والخلايا تعامل بلطف عند عملية التجميد.

ولكن هناك طريقة بسيطة تستعمل للخمائر حيث يضاف ($CaCO_3$) إلى المعلق التخميري وتركه إلى أن يجف.

ب. صيانة المزارع بخزنها في محيط يحدد نشاطها التمثيلي:

1. الخزن على مسطح الأكر (Agar staints):

صيانة المزارع بعد زرعها على مسطحات أكرية وخزن هذه المسطحات في الثلاجات أو تحت الزيت هي عمليا مستعملة لعدة سنوات. الدراسات الحديثة اقترحت بأن الخزن تحت الزيت يكون لمدة (10) شهور لا يغير من (Carbohydrate assimilation) للسلالات (Mucor recemosus Asp. niger, cunninghamelta echinatu) وهنالك دراسات لبعض السلالات يمكن حفظها تحت الزيت لمدة سنة أو سنتين أو أربع سنوات وعند حرارة خزن (4.5م).

2. حفظ السبورات في الماء:

لوحظ ولفترة طويلة قابلية بعض سبورات الفطريات الشائعة والمنتشرة في ماء مقطر والمحضونة في ثلاجة وعلى درجة حرارة (18-20م) بعض النجاح بالفحوصات التي جرت على النوع (Saccharomyces Cerevisiae) وعلى النوع (Sarcina lutea) والمنتشرة في معلق بقري والمخزونة في ثلاجة أكثر من سنة.

3. الحفظ في حرارة التجميد:

(Yamasato) وآخرون عام(1973) درس قابلية (259) سلالة العائدة إلى (32) نوع و(135) جنس والمنتشرة في معلق (10%) كليسرول وخزنت تحت درجة حرارة (-53م) ولمدة (16) شهر فحوالي (10%) من بكتريا الموجبة لصبغة كرام (G-Ve) و(3%) من بكتريا السالبة لصبغة كرام (G-Ve) فقدت قابليتها بسرعة لذا اقترح استعمال العسل بدل الكليسرول في الحفظ بالتجميد.

أما حفظ الخلايا والنواة أثناء الخزن في النيتروجين السائل فإن استعماله أصبح بشكل واسع بعد أن استطاع (Sokolski) عام (1964) من وصف العملية كذلك الفوائد التي نجمت من هذه العملية. أما الطريقة المستعملة للأعفان فقد شرحت من قبل (MacDonald) عام (1964) أما للستربتومايس (Streptomyces) فقد حفظت بطريقة (McDaniel) عام (1968) وهنالك عدة اكتشافات من هذا المجال لأحياء أخرى.

أما (Daily & Higgen) عام (1973) فقد درسوا إمكانيــة محلــول المعلــق والمتكون من (10%) كليسرول و (5%) إما لاكتوز أو مالتوز أو رامينـــوز فــي المحلول المعلق للأحياء يزيد من قابلية السبورات والخلايا الخضرية وقطع مايسليم الـ(Striptomyces). أما (Moore) وآخرون عام (1975) فقد لاحظوا من خــلال التجارب المختبرية مع بكتريا المرضية للنباتات بــأن الوســط المناســب لحفظــها بالتجميد هو (10%) حليب فرز ثم خزنها بالتجميد.

أما (Welling & Stewart) عام (1973) فقد أشارا إلــى صعوبــة صيانــة خميرة البيرة بالتجفيد (lyophilization) ولكن نجحت متى ما كان محلول المعلــق للخلية مخلوط مع (10%) كليسرول وتجمد تدريجيا وتخزن في (-196م).

ج. الحفظ (حفظ الأحياء المجهرية بالتجفيد lyophilization):

هذه الطريقة مستعملة على نطاق واسع لحفظ المزارع فقد لاحــظ (Haynes) عام (1955) بأن التجميد بالتجفيف في هذا المخطط حيث أن الخلايا توضـــع فــي أمبولات زجاجية معقمة والمعلقة في حامض أو محلول حافظ والمعقم كالســيروم أو حليب فرز وبسرعة تجمد في درجات حرارة منخفضة وتجفف تحت تفريــغ عــال والامبولات بعد ذلك تقفل وتخزن في الثلاجة. ومعظم المزارع التي تحفــظ بــهذه الطريقة فإنها تحفظ لسنين عديدة.

والدراسات التي عملت على هذه الطريقة وخاصة على المحلول الحافظ فيمكن ان يستعمل الغازات بدل عملية التفريغ تحت الضغط بعد عملية التجميد، والتطبيقات كثيرة على هذه الطريقة خصوصا لبعض الأنواع من الأحياء، حيث (Redway) وجماعته عام (1974) استطاع أن يستعمل سيروم الخيل الذي يحتوي على الكربوهيدرات والمواد ذات العلاقة أما (Marshall) وجماعته (1973) استطاع حفظ المزرعة المختلطة في وسط المرق المهضوم مع محلول سكروز -- كلوتمامين وخزنت تحت مختلف الغازات وعند درجات من (Water activity) المختلفة، وقد ظهر أن الأحياء تموت عند الدرجة الرطبة وكذلك عند الدرجة الجافة.

د. بنك السلالات:

اهتمت أكثر الدول المتطورة في إنشاء بنوك خاصة للسلالات الصناعية ذات الإنتاجية العالية تحت أرقام بعد معرفة خواصها الفسلجية والوراثية وثبات إنتاجيتها، وتتسابق بعض دول العالم في هذا المجال، وأصبح لهذه السلالات سوقا عالمية وتباع هذه السلالات بأسعار عالية، وتتميز أمريكا وبريطانيا وألمانيا واليابان وروسيا بهذه البنوك وأن المجال كبير في وطننا العربي حيث يمكن تطوير الأحياء المجهرية البرية عن طريق الدراسات العليا في الجامعات وكذلك الدراسات في المراكز العلمية المنتشرة للوصول إلى بنك عربي في هذا المجال.

وتحت تصنيف وراثي وبأرقام لأن الأحياء التي تنتج في دول الغرب لا يمكن أن تعطي نفس الإنتاج في محيطنا العربي لأن المناخ يختلف وتحتاج إلى عملية

تطبيع للظروف الجديدة فمثلا سلالة خميرة الخبز الفعالة في ألمانيا لا يمكن أن ينتـــج بنفس الفاعلية في السعودية وذلك لاختلاف درجات الحرارة.

الفصل السادس

تصميم أجهزة التخمير المختبرية

Design of Laboratory Fermenters

تصميم لأجهزة التخمير المختبرية:
(Design of Laboratory Fermenters)

1. مقدمة:

امتدت التجارب حول التخمير سنين طويلة، ولكن التأكيد على تصميم أجهزة التخمير تركز في الربع الأخير من القرن؛ إذ قامت مئات البحوث لوصف أجهزة للتخمير على درجات مختلفة من التعقيد.

يتناول هذا الفصل تعريف العوامل المؤثرة على اختيار الجهاز وبصورة خاصة على المستوى المختبري، كما سيلقي نظرة عامة على المؤشرات ذات العلاقة بالموضوع كالمواد المستخدمة في التصميم، تعقيم الهواء الداخل الوسط الغذائي المستعمل، السيطرة على ظروف التجربة...الخ. مع الأخذ بعين الاعتبار أن الجهاز قيد الدراسة هو للحصول على مزروع واحد نقي أو خليط من الأنواع محدد الهوية وعلى درجة عالية من النقاوة.

2. الأهداف (Objectives):

تؤثر على اختيار الجهاز جملة من العوامل، أهمها صلاحيته للتجربة قيد الدرس واقتصاديته والحاجة لكونه يتناسب مع الأنظمة الميكروبية العديدة. أكثر الأجهزة

شيوعا هي دورق ايرلنماير، والوعاء المحرك (Stirred Vessel) والذي غالبا ما يكون اسطوانة عمودية.

من المفيد اعتماد تصميم يتناسب ومقتضيات العملية الإنتاجية أي يوضع الغرض من العملية الإنتاجية عين الاعتبار، وعلى هذا تقسم الأهداف بصورة عامة إلى أربعة أقسام:-

أ. الإنتاج الخلوي (Provision of Cells):

يكون الهدف هنا ببساطة إنتاج كتلة خلوية في وقت مناسب. ويكفي لمثل هذا النوع من العمليات الإنتاج جهاز الإنتاج جهاز بسيط خال من التعقيد. أما عندما يراد الحصول على خلايا في حالة فسلجية معينة فيجب عند ذلك إجراء العديد من التغييرات على تصميم الجهاز، وتحتم في مثل هذه الحالات استعمال أجهزة التخمير ذات النظام المكروبي المستمر المنظم (Controlled Continuous Culture equip).

ب. إنتاج مواد عرضية (Provision of Products):

عندما لا يكون المنتوج الخلوي هو الهدف الأساس من العملية الإنتاجية يكون اختيار الجهاز والظروف العملية متناسبة مع إنتاج المواد العرضية المراد الحصول عليها، فمثلا تحتاج إلى زيادة تركيز المضادات الحياتية أو الفيتامينات عشرة أضعاف في الأجهزة الهزازة عما هي عليه في الأجهزة الساكنة، إضافة إلى كون

سعة الجهاز تتحدد بالهدف المراد الحصول عليه من النواتج المرضية إن للتحليل أو للتجارب الطبية، أو للقيام بعملية عزلها وتنقيتها على نطاق تجاري.

ج. دراسة النمو والتمثيل الغذائي (Study of Growth & Metabolis):

لدراسة مؤشرات النمو والتمثيل الغذائي، يجب الحذر عند أخذ النماذج وذلك عند إجراء بعض القياسات (درجة الحموضة، الأوكسجين المذاب، ثاني أكسيد الكربون المذاب، التركيز الخلوي، محتوى الفرزات الداخلة والخارجة...الخ)، كذلك عند إضافة بعض المواد اللازمة للسيطرة على درجة الحموضة ومنع الرغوة، أو بعض المثبطات أو منظمات النمو.

في أنظمة النمو المكروبي المستمرة (Continuous Microbiol System) لا بد من وجود وسيلة لتغيير حجم الوسط أو معدل تدفق الوسط الغذائي أو كليهما معا، وكذلك الحال مع أنظمة النمو المكروبي متعددة المراحل (Multistage-Culture) من الضروري وجود بعض الضوابط التي تسهل نقل الوسط الغذائي من وعاء لآخر أو إعادة ضخ جزء منه...الخ.

د. المؤشرات اللازمة لتصميم المعمل: (Parameters required for Plant Design)

كما سبق ذكره مناسب لتصميم واختيار الأجهزة المختبرية، سواء كانت التجربة المختبرية نهائية أم أنها مرحلة أولية للتجارب على نطاق تجاري. وفي الحالة

الأخيرة من الواجب إضافة بعض التطوير والتغيير على التصميم المطبق في المختبر.

بصورة مثالية التخطيط يقوم على أساس المؤشرات البيولوجية أو على الأقل بعض الظواهر الفيزيائية والتي تعكس بشكل مباشر أهمية بيولوجية كمعدل امتصاص الأوكسجين مثلاً. ولكن الواقع العملي لا ينطبق وهذه الحقيقة، إذ لا يمكن التوفيق بين المؤشرات البيولوجية والتصميم على أساس فيزيائي، الأسس المهمة التي يعتمدها المهندس للوصول إلى تصميم ذات طابع اقتصادي ويلتقي مع متطلبات البيولوجي، تتضمن الطاقة المستهلكة من قبل الجهاز، معدل سريان الهواء، تأثير الضغط، معدل الخلط، ومعدل انتقال الحرارة أثناء التعقيم والتبريد وأثناء عملية التخمير.

قابلية الجهاز على نقل الحرارة ذات أهمية بالنسبة للنظام المكروبي الذي يتأثر بالتغيرات الحاصلة في الوسط أثناء التعقيم والسيطرة على درجة الحرارة أثناء العملية الإنتاجية.

ولتصميم معين، نسبة الحجم إلى المساحة السطحية الخارجية تتناسب طردياً مع قطر الوعاء، ومعدل انبعاث الحرارة أو امتصاصها لكل وحدة سطح تزداد بنفس النسبة تقريباً حتى تصل الحد الذي يكون فيه معدل انتقال الحرارة خلال السطح من وإلى الوسط الغذائي (والمنظم حرارياً) غير كافٍ للوصول للدرجة

المطلوبة، عند ذلك يجب إضافة مصدر آخر يكون عادة بشكل لفات كهربائية داخلية.

3. المؤشرات العملية:

سبق وأن طرحنا تأثير متطلبات الإنتاجية على الطبيعة العامة للجهاز المستخدم، وقبل تحديد تصميم الجهاز لا بد من مراجعة بعض المؤشرات المتعلقة بتقنية العمل والتي يمكن تلخيصها بما يلي:-

أ. القضاء على مصادر التلوث:
(Freedom from Contamination)

وهو أحد المتطلبات الأساسية والتي لا تؤثر فقط على التصميم والمواصفات القياسية لجهاز التخمير واختيار الأدوات المستخدمة فيها كالصمامات والمضخات، وإنما على الخطوات العملية المتبعة في التنظيف والتعقيم والتلقيح وأخذ العينات وفصل النواتج. يجب أن يكون الجهاز بسيطا قدر الإمكان، وذا مجار نظيفة ولا يحوي شقوقا أو جيوبا والتي تجعل التنظيف صعبا أو تعرقل وصول الحرارة وغيرها من المعقمات. ويجب أن يعتمد نفس الأسلوب في اختيار الصمامات والأساس المتبع في ربطها بالجهاز. كما يجب أن يؤخذ بعين الاعتبار تصميم أي قطعة تهيئ مجرى مفتوحا بين النظام الداخلي للوعاء والمحيط الخارجي. وينطبق هذا بصورة خاصة على ضوابط المحركات والمضخات ونقاط سحب النماذج.. الخ، إذ يجب التقليل من هذه اللوازم قدر المستطاع.

من الأفضل أن تكون السطوح التي تكون بتماس مع محتـــوى الجـــهاز غـــير ناضحة ومقاومة لتأثير المواد الكيماوية. أما عن مضخات الهواء فيجب أن تصمـــم بشكل اقتصادي محكم للتقليل من خطر دخول أحياء مجهرية غريبة إلى حـــد غـــير مقبول. التلوث الناجم عن دخول أحياء غريبة خلال الفتحات أو نتيجة لوجود منـــافذ يقلل عادة بجعل الضغط داخل الجهاز أعلى مما هو في المحيـــط الخـــارجي. وقـــد يكون هذا غير مقبول في زراعة الأحياء المجهرية المرضية، إذ تستدعي الضـــرورة تشغيل الجهاز تحت ضغط أقل من الضغط الخارجي، وهنا لا بد من تصميم دقيـــق جدا وذوي ضوابط خاصة.

ب. السحب المعقم للعينات (Aseptic removal of samples):

لهذه المشكلة وجهان، الأول هو الحفاظ على العينة المأخوذة من التلوث وخصوصا إذا كانت لفحص نقاوة النموذج قيد الدرس، والثاني هـــو الحيطـــة عنـــد سحب العينة لمنع تلوث محتوى وعاء التخمير. المعدات المستخدمة لأخذ العينة قـــد تكون أدوات إضافية مثل إبرة حقن تزرق خلال حاجز لسحب النموذج ثـــم ترمـــى بعد الاستعمال.

المحاذير من استعمال هذه اللوازم هو أن الغلق المحكم لمكان سحب العينة يحتـــم استعمال أدوات دقيقة ورقيعة جدا وهذا يتعاكس ومتطلبات بعض الطرق التحليليـــة والتي تقتضي أخذ نماذج كبيرة حاوية على كتلة خلوية كبيرة مما يستدعي اســـتعمال أدوات لا تفي بالغرض المطلوب. قد تكون أدوات سحب العينة داخلة فـــي تركيـــب

الجهاز والتي يمكن نقل العينة خلالها بالضخ أو الضغط. المشكل الأساسي الذي ينشأ عن هذا التصميم هو إمكانية بقاء قسم من العينة المسحوبة على فوهة الصمامات، وعندها يجب الحذر من التلوث الخارجي الناجم عن نمو بعض الأحياء المجهرية القريبة على الوسط الغذائي المتبقي. وبالإمكان تلافي هذا المشكل بإتباع طريقة الغلق بالبخار.

ج.المضافات الأخرى المعقمة Aseptic Additions

وتشمل هذه الأملاح الغذائية، مواد ضد الرغوة، مثبطات النمو، الماء، الهواء واللقاح. و تضاف هذه المواد عن طريق أحواض مربوطة بالجهاز تحوي كميات منها كافية لكل العملية الإنتاجية، أو قد تضاف بواسطة إبرة حقن والتي تربط بصورة بالجهاز. التصميم المتقن للجهاز يقلل من خطر التلوث بصورة مباشرة وكذلك احتمالات الأخطاء العملية أثناء النقل.

د.التعقيم Sterilization

تقوم عمليات التعقيم على أساس استخدام البخار. وقد يعقم الجهاز فارغاً ثم يملأ بالوسط الغذائي المعقم أيضاً، أو قد يكون التعقيم سوية. من الضروري تعقيم أجهزة التخمير التي تزيد سعتها على (50) لتر على حدة. وفي حالة استعمال (Autoclave) يجب قدر المستطاع تعقيم كل ما يتعلق بجهاز التخمير من معدات ولوازم سوية للتقليل من التلوث أثناء ربطها بعد التعقيم. وهنالك بعض المساوئ من جراء تعقيم الوسط الغذائي مع جهاز التخمير سوية وهي أن الوسط الغذائي لا تسمح

له فرصة الدوران، وبالتالي يكون تغلغل الحرارة بطيئة وهذا يظهر جليا في الوحدات العملية الكبيرة.

في الحالات التي يتأثر بها محتوى الوسط الغذائي بالحرارة من الأفضل تعقيم مكوناته على حدة ثم تضخ إلى وعاء التخمير المعقم، ويجب الحذر من دخول هواء غير معقم إلى الجهاز أثناء التبريد. وبالإمكان تعقيم أجهزة التخمير بواسطة المحاليل المطهرة، ولو أن هذه الطريقة لا تعطي ضمانا بمعاملة كل السطوح، إضافة ضرورة تعقيم مرشحات الهواء باستعمال الحرارة على حدة. وفي حالة استعمال المواد الكيماوية في التعقيم، من الضروري التأكد من عدم تفاعلها مع الجهاز وخصوصا صمامات غلق الجهاز وكذلك يجب أن تكون سهلة الإزالة ولا تترك أثرا.

د. السيطرة و القياسات Control & Measurements

من متطلبات العملية الإنتاجية قياس العديد من المؤشرات وفي نفس الوقت السيطرة عليها ضمن حدود معينة أثناء العملية الإنتاجية بواسطة ضوابط خاصة. وهذه المؤشرات تقسم إلى نوعين يمثل الأول منها أوجه تفاعل فسلجية الكائن المجهري مع بيئته الخارجية وتشمل معدل النمو، التركيز الخلوي، تركيز المواد العرضية القائمة، درجة الحموضة، معدل التنفس، انبعاث الحرارة، وتكوين السبورات. والقسم الثاني يشمل درجة الحرارة، الضغط، معدل سريان الهواء، شدة الهز، معدل ضخ الوسط الغذائي ومحتواه، وتعتبر هذه العوامل خارجية مستقلة عن المزروع.

السيطرة على العملية البيولوجية تتضمن السيطرة على واحدة أو أكثر من هـذه المتغيرات الخارجية للحصول على ظروف بيئية ملائمة للفعالية البيولوجية. وكـل متغير خارجي بالإمكان تثبيته أو تغييره تبعا لأسس مثبتـة مسبقا عـن العمليـة البيولوجية، في نفس الوقت بالإمكان قياس أحـد المؤشـرات البيولوجيـة لحفـظ المؤشرات الخارجية وبالتالي الوصول إلى النتيجة المطلوبة.

عدد القياسات المأخوذة ونوعية الطرق المتبعة وطبيعة أنظمة السيطرة المعتمـدة لا تؤثر فقط على التصميم الأساس لجهاز التخمير ولكن على حجمه أيضـا. فعلـى سبيل المثال، في القياسات المعتمدة على سحب النماذج يجب أن لا يؤثر حجم وعـدد النماذج المسحوبة على حجم الوسط الغذائي في وعاء التخمير بشكل كبير.

وكذلك عند إجراء القياسات داخل الجهاز مثلا ستكون المعدات اللازمة بتمـاس مع النظام البيولوجي (كأعمدة قياس درجة الحموضة، والأوكسجين المذاب...الـخ) وعليه يجب أن يتوفر فيها العديد من المواصفات كضرورة مقاومتها لظروف جـهاز التخمير ومحتواه من المواد الكيماوية، كما يجب أن لا تكـون مصـدرا للتلـوث ويمكن الحد من هذه المساوئ بوضع المعدات فوق مستوى المحـاليل في جـهاز التخمير.

بعض المؤشرات المتفرقة:

بالإضافة إلى العوامل المذكورة سابقا، الثقة في العمل، ومراقبة المكونات وإدارة الأجهزة والتنظيف والتطوير تعتبر مهمة. إذا كانت ملاحظة المحتويات تعتبر من المؤشرات المهمة، فاستخدام أوعية زجاجية صغيرة يكون مناسبا، إذ لا يمكن تجهيز إضاءة كافية في غطاء أي جهاز ذي قطر أصغر من (12) إنش.

وقد تدخل منافذ للرؤية في تصميم الجهاز، ومنافذ الرؤية هذه تزيد من احتمال خطر التلوث، ومن الممكن تلافي هذه المشكلة باستعمال أنابيب ذات جدران سميكة، وقد يزيد هذا الأسلوب في صعوبة السيطرة على درجة الحرارة المثلى، إلا إذا كان انتقال الحرارة بالنسبة للتسخين والتبريد لا يكون خلال الجدران.

إذا كانت أوعية التخمير لا تعقم على حدة يكون من الأفضل تقليل حجمها لتسهيل نقلها باليد خلال المراحل العملية المختلفة من التنظيف إلى التعقيم والتلقيح بدون الحاجة إلى النقل الميكانيكي.

كل المعدات الزجاجية بالإمكان تنظيفها وتعقيمها باستعمال مواد التنظيف والمطهرات. وهذه السهولة قد لا تتوفر أحيانا بسبب التغييرات في الهندسة الداخلية لهذه المعدات مثل شكل وحجم المحركات والحواجز. هنالك بعض الفوائد بالنسبة للتنظيف في التصميم الذي يسمح بفراغ في داخل الوعاء، ومن الممكن التوصل إليه في الأوعية الزجاجية والمعدنية بوضع غطاء معدني يثبت بإطار قابل للحركة، وهذا الغطاء يجب أن يحكم بشكل يساعد على حمل كل معدات تحريك جهاز

التخمير، وكذلك أنابيب دخول الهواء وخروجه وكل اللوازم الأخرى مثـــل أعمـــدة قياس درجة الحموضة ونقاط سحب النماذج.

المتطلبات الأساسية في تصميم جهاز التخمير متشـــابهة إذا كـــان العمـــل مـــع (Batch-wise on cont).

النظام المكروبي المستمر يتطلب بعض المستلزمات التي تعطي تجهيزا مســتمرا للوسط الغذائي وسحبا للمنتوج مع تنظيم حجم الوسط الغذائي في وعاء التخمير.

في النظام المكروبي متعدد المراحل تكون المعدات المسؤولة عن سحب النمـاذج مسؤولة أيضا عن الضخ إلى الوعاء الثاني من سلسلة أوعية التحضير المستخدمة.

وأبسط نوع من المعدات المستعملة لسحب النماذج يكون عبـــارة عـــن أنبـــوب سلكي (Wire tube).

وهو ذو فائدة في أنه يتحكم دائما في كمية النموذج ولكن تنشأ صعوبات أحيانـــا في كون التكتل المجهري يكون تجمعات كبيرة تبقى على السلك وخصوصا عندمـــا يكون معدل الضخ منخفضا ويمكن تلافي معدل الضخ المنخفـــض باتبـــاع طريقـــة الضخ المتقطع على مراحل تكفي للحفاظ على النظام المستمر (Continuous Culture).

وكذلك فإن معدل الوقت اللازم للجيل الواحـــد (Mean generation time) والذي يتراوح بين (20-120) دقيقة بالنسبة للنظام المكروبـــي المســـتمر، يحتـــم استعمال أجهزة أصغر بكثير من تلك المستعملة في ال(Batch Culture) والتـــي يكون فيها جزء كبير من الوقت الكلي للعملية الإنتاجية يصرف فـــي الفـــترة بيـــن التلقيح وأعلى معدل للفعالية البيولوجية.

اختيار الأجهزة (Selection of equipments):

بعد تثبيت العوامل المؤثرة على اختيار الأجهزة، سنناقش صفات الأجهزة المتوفرة تجارياً أو الممكن تجميعها من بعض المعدات المتوفرة مع الإشارة إلى بعض الأنواع ذات المواصفات الخاصة ولكنها غير شائعة الاستعمال:-

أ. دورق التخمير (Flask Fermenter):

أكثر الأنواع شيوعاً هو دورق أيرلنماير وبالإمكان استعمال دوارق مسطحة القاعدة أو مدورة القاعدة مع تصميم خاص كما في دوارق باستور المستعملة لمزرع الخمائر.

إذا كان معدل انتقال الكتلة (Mass Transfer) بين الوسط الغذائي والغاز المحيط من المؤشرات غير الضرورية للعملية الإنتاجية يتبع أسلوب الزراعة الساكنة (الثابتة) (Stationary Culture) ويكون اختيار الدورق والنسبة بين الدورق إلى حجم الوسط الغذائي بصورة عامة تقريبي.

هذه الزراعة بالإمكان إجراءها في الحاضنات المختبرية أو على رفوف في غرف ذات درجات حرارة مناسبة.

بعض الأحياء المجهرية تنمو بصورة طبقة سطحية أو (Pelhile) صغيرة في الزراعة الساكنة. التحريك أو الهز يؤدي إلى نمو موزع بشكل أكثر كان يكون

بشكل خلايا مفردة أو كتل صغيرة، ولهذا العديد من المؤشرات البيوكيماوية، ويكون اختيار الزراعة الساكنة أو المتحركة على أساس أهمية هذه العوامل.

فعندما يكون انتقال الكتلة بين الوسط الغذائي والغاز (Gas/ Culture mass transfer) من العوامل المهمة، أو عندما يكون النمو السطحي غير مرغوب يكون الاختيار محددا واستعمال دورق أيرلنماير هو أكثر الوسائل عملية.

لهذه الدوارق العديد من الفوائد التي تتفوق بها على أغلب أجهزة التخمير المختبرية المستعملة وهذه تكمن في رخص ثمنها، بساطتها، سهلة التنظيف والتعقيم والتحضير، قلة الحيز الذي تشغله، إمكانية تثبيتها بأدوات ماسكة بسيطة على طبقة معدنية مجهزة للحركة الدورانية أو الترددية واستخدامها للتجارب الأولية في عمليات المسح المبدئية على السلالات المثلى للعمل، أو انتخاب الوسط الغذائي الأفضل وذلك بتغيير حجم الوسط وسرعة الهز، حيث نحصل على معلومات مهمة عن تأثير التهوية والتحريك.

وأهمية هذه التجارب تكمن في كونها تقلل الخطأ في التجارب المجراة على نطاق كبير.

عنق الدوارق تسد بواسطة صوف قطني أو بلاستيك مثقب. وهذا الترتيب يمنع التلوث ولكنه يسمح بتبادل الغاز بين محتوى الدورق والمحيط الخارجي. معدات

التبادل يعتمد على ثغرات السداد والتي تختلف من دورق إلى آخـــر خصوصـــا إذا كانت معمولة باليد.

إذا كان المطلوب معدلا منتظما لسريان الهواء فبالإمكان تثبيت ســداد مطــاطي يحمل أنبوبا داخليا وخارجيا مربوطا إلى (Manifold) وقد يكون هــذا ضروريــا لبعض الأغراض الخاصة إلا أنه يحــرف الاتجــاه البســيط المعتمــد فــي دورق إيرلنماير. وللوصول إلى نسبة كبيرة من السطح/ الحجم ولمنع تبلل الســداد يجــب تحديد حجم الوسط الغذائي بالنسبة لسعة الدورق (100مل/250مــل ســعة دورق 500 مل/2لتر سعة دورق).

في حالة وجود عدد كبير من الدوارق على نفس الدرجــة الحراريــة تســتعمل غرفة متنظمة الحرارة، وفي حالة تشغيل الأجهزة في غرف ذات درجات حــرارة عالية (فوق 35م)، يجــب الاهتمــام باختيــار المحركــات الكهربائيــة، تزييــت العتلات...الخ.

ولأعداد قليلة من الدوارق أو في التجارب التي تكون فيها درجة الحرارة هـــي أحد المؤثرات التجريبية المهمة، هنالك وحدات داخلية في الجهاز لتنظيــم درجــة الحرارة ولو أن هذه الوحدات لا تصمم لمدى واسع من درجات الحرارة.

ب. الأوعية الهزازة (Stirred Vessels):

جهاز التخمير الوحيد الذي ينافس الدوارق في شيوع استعمالها هو الوعاء الهزاز والذي يكون بهيئة اسطوانة عمودية ذات قاعدة مسطحة ومجهزة بهزاز مركزي.

وهنالك العديد من هذه الأوعية تختلف فيما بينها في تفاصيل التصميم أو بعض التغييرات اللازمة للتجارب ذات المتطلبات الخاصة. هذه الأنواع يمكن تقسيمها إلى قسمين:-

1. The fully-baffled vessel with sparger aeration.
2. The vortex fermenter, which is unbaffled and provides aeration by entraining aie from the headspace into the vortex produced by the action – of impeller

النوع الأول يفضل على الثاني فيما يتعلق بخلط المكونات وانتقال الكتلة وبالإمكان الاعتماد عليه خصوصاً في التجارب التي تتغير فيها لزوجة المحاليل أثناء عملية التخمير.

الفائدة الأساسية من النوع الثاني إضافة إلى بساطته هو قلة احتياجه إلى مواد ضد الرغوة وهذا ينشأ من إعادة سحب هذه المواد إلى الوعاء لكنها تكون على حساب انتقال الكتلة (Mass transfer) وقلة قابليته. جهاز التخمير الفعالة تعود إلى كبر حجم الغاز المحمول (حجم الغاز غير الذائب في وحدة حجم الوسط الغذائي) وكذلك إلى الحجم المشغول بال (vortex)، وعليه فهذا النوع مستعمل في التجارب التي لا يحبذ فيها استعمال المواد ضد الرغوة.

لأجهزة التخمير من نوع (batch) ذات السعة الفعلية (3-5) لتر (الحجم الكلي (5-10) لتر)، هي الأكثر شيوعاً، إذ أنها مواصفات أجهزة التخمير الكبيرة مع بعض المواصفات الأخرى والتي تجعلها مفضلة أكثر كسهولة العمل والاقتصادية...الخ.

أما بالنسبة لأجهزة التخمير المستمرة (Continuous Fermentation) وبصورة خاصة عندما تكون فترة الحضانة قليلة، تستعمل حجوم صغيرة معها على نطاق المختبر، وبالإمكان إدخال العديد من التغييرات على التصميم والأساس للحصول على كل المتطلبات الضرورية للقياس والسيطرة.

أكثر أجهزة التخمير المختبرية لها جزء علوي من معدن لا يصدأ (Stainless Steel) يحمل هزازاً ومصدر التهوية وأنابيب أخذ النماذج وتصريف الهواء وجيب المحرار.

الأجهزة المعدنية تكون مصنعة بشكل قطعة واحدة ذات قاعدة مشبعة، أما الأجهزة الزجاجية فتكون على هيئة اسطوانة ذات قاعدة مسطحة أو نصف كروية، أو أنها تتألف من أنبوب مثبت بين الغطاء الرأسي والقاعدة المعدنية مع إدخال نطاق مطاط للربط.

وللنظام المكروبي متعدد المراحل (Multistage system) تستعمل الأوعية المتتالية والتي يتم نقل الوسط الغذائي بينها بواسطة أنبوب سلكي (Wire)، ولهذا الأنبوب بعض المساوئ:-

1. عندما يكون معدل السريان بطيئا يؤدي إلى ترسب بعض المواد الصلبة عليه.
2. تنظيم ارتفاع الأنبوب.

ومن الممكن تلافي هذه الصعوبات باستخدام سداد لتغطية الأنبوب، فعند دخول الوسط الغذائي يرتفع المستوى في أوعية التخمير فيندفع السداد ويتم نقل النماذج بمعدل أسرع من معدل سريان الوسط الغذائي في الأوعية. ومما تجدر الإشارة إليه أن السريان والنقل لا يكونان مستمرين بصورة فعلية ولكن الفترة الزمنية بين مرحلة وأخرى يمكن اعتبار العملية بموضعها مستمرة.

ومن الأفضل أن تكون أوعية التخمر في النظام المكروبي متعددة المراحل بترتيب تدريجي بحيث يكون وعاء ما في السلسلة أقل انخفاضا من مستوى الوعاء الذي يليه، وهذا يقضي على احتمال نقص الأوكسجين أو الترسب على الأنابيب.

الملاحظات المستخلصة (Concluding Remarks):

هنالك العديد من المواصفات للأجهزة المستخدمة لتنمية الأحياء المجهرية أو الخلايا النسيجية، البعض منها لأغراض خاصة والبعض الآخر مصمم للعديد من الاستعمالات.

أكثر الأجهزة شيوعا (Shaken flask, & Stirred Vessel) يمتاز الأول بقلة كلفته وإمكانية استعماله للعديد من التجارب العلمية. النوع الثاني قد يكون بسيطا أو على درجة عالية من التعقيد ومجهزا بالعديد من المعدات المشغلة يدويا أو بصورة أوتوماتيكية، وعند اختيار الجهاز المناسب يجب أولا تحديد متطلبات التجربة والهدف منها. فإن كانت لمجرد الحصول على كمية قليلة من الخلايا أو نواتج التخمير العرضية فتستعمل الأجهزة البسيطة، أما في حالة كون العملية إنتاجية على نطاق تجاري فيجب التوفيق بين اقتصاديتها والإدامة وتكاليف العمل...الخ.

وهنالك تصاميم قياسية متوفرة لدى المجهزين جميعها تستند على وحدة أساسية تختلف في درجة تعقيدها تبعا لما تزود به من المعدات اللازمة لضبط المؤشرات العملية.

النواتج في العملية الميكروبيولوجية (الناتج الخلوي، النواتج العرضية، معدل الإنتاج...الخ)، تتأثر بشكل كبير بطبيعة الجهاز والظروف المستخدمة أثناء العمل وكذلك بالسلالة وطبيعة الوسط الغذائي.

تكاليف الأجهزة تختلف ليس فقط من نوع لآخر ولكن بين الأنواع المختلفة ذات السعة الواحدة والتصميم الأساسي الواحد. ويعود هذا الاختلاف في دقة التصميم والمواصفات القياسية المعتمدة فيه.

ج. أنواع المخمرات الصناعية:

من الأمور البديهية لتحديد أي عمر تخمري يجب أن تحدد أيضا الوسائل التي يمكن أن تنفذ هذه العملية وبشكل رئيسي، وهي:-

1. صلاحية المخمر للتجربة.
2. تناسب المخمر والنظام الميكروبي.
3. اقتصادية الجهاز.

أما الأمور الثانوية الأخرى التي يجب ملاحظتها لتحديد العملية أو التجربة فتعتمد على:

1. أجهزة الإنتاج الخلوي – جهاز بسيط غير معقد.
2. أجهزة لإنتاج مواد عرضية – وفي هذه الحالة يمكن أن نختار الأجهزة الهزازة بدلا من الساكنة وكذلك سعة المحصول.

3. أجهزة لدراسة النمو والتمثيل الغذائي – وهنا يجب أن يتميز المخمر ببعض الأجهزة الملحقة لقياس الحرارة و (pH) و (O_2) المذاب، (CO_2)، التركيز الخلوي، السيطرة على الرغوة.

4. أجهزة التخمير ذات الدفعة الواحدة والمستمرة وهنا يزود المخمر المستمر لوحدات إضافية – كخزان المواد الأولية البيئية وأجهزة ملحقة أخرى التي تعتمد على قياس العكرة وضبط (pH) و (O_2)،...الخ.

5. أجهزة تعتمد على نوعية المنتوج، وهنا يحتاج جهاز التخمير إلى نظام تحريك ويعتمد هذا النظام على نوع المحور، عدد المراوح في المخمر، عدد الريش في المروحة الواحدة، نوعية المروحة كما هو موضح في الشكل (11)، علما بأن بعض المخمرات يحتاج إلى مساحة ضوئية.

6. أجهزة تعتمد على نوعية البيئة – وهنا يمكن أن تصنع الأجهزة من الزجاج، المعدن، البلاستك.

ومن كل ما تقدم فإن الأجهزة تعتمد على مؤشرات بيولوجية وبعض الظواهر الفيزيائية التي تعكس بشكل مباشر أهمية بيولوجية كمعدل امتصاص (O_2) مثلا وبذلك تكون الأجهزة من هذا القبيل نوعين:-

1. أجهزة تخمير هوائية، وهذا أيضا له جانبان إما أن يكون مخمرا ذا تهوية مركزية أو مخمرا ذا تهوية تعتمد على الفراغ العلوي وحركة المراوح.
2. أجهزة تخمير ساكنة (غير هوائية).

أما من حيث الشكل فهناك أجهزة التخمير العمودية وهناك الأفقية والمخروطية، أما المخمر البسيط فكما هو في الشكل (10).

• ولأجل تصميم المخمر يجب أن نراعي الأمور التالية:-

1. ارتفاع خزان التخمير.
2. قطر خزان المخمر.
3. عدد المراوح.
4. عدد الحواجز.
5. عدد ريش المروحة.
6. قطر الريشة.
7. عرض المروحة.
8. عرض الحاجز وارتفاعه.
9. ارتفاع المروحة عن قاع المخمر.
10. نوع (Turbine).
11. قطر التوربين.
12. عرض الثقوب الهوائية في القاع.

كل هذه الأمور تلعب دورا مهما في تحديد القوة الدافعة للسائل (الوسط البيئي)، سرعة الخلط، التهوية، ظاهرة الانتشار وخلط الهواء بالسائل. ومن هنا تبدأ العلاقات الحسابية والبنائية للتصميم. وحسب التجارب في هذا المجال وجد أن الوحدات اللازمة والقياسية للمخمر هي موضحة في الشكل (3) حيث أن المعدلات الحسابية للمخمر يجب أن تكون كما يلي:-

في المخمر ذي المراوح (Flat-Blade Turbine) فيجب أن تكون نسبة قطر المروحة / قطر الخزان (0.33) وكذلك إلى نسبة ارتفاع الخزان / قطر الخزان (1.0). أما من حيث طول المروحة / قطر المروحة فتكون النسبة (0.25) وكذلك بالنسبة إلى عرض المروحة / قطر المروحة (0.2) علما بأن ارتفاع المروحة / قطر المروحة أيضا يجب أن لا تزيد نسبته عن (1.0) هذا بالنسبة إلى مخمر ذي أربع مراوح. أما النوع الثاني فهو (Paddle) فالنسبة هي تعاقبيا (0.25، 1.0،

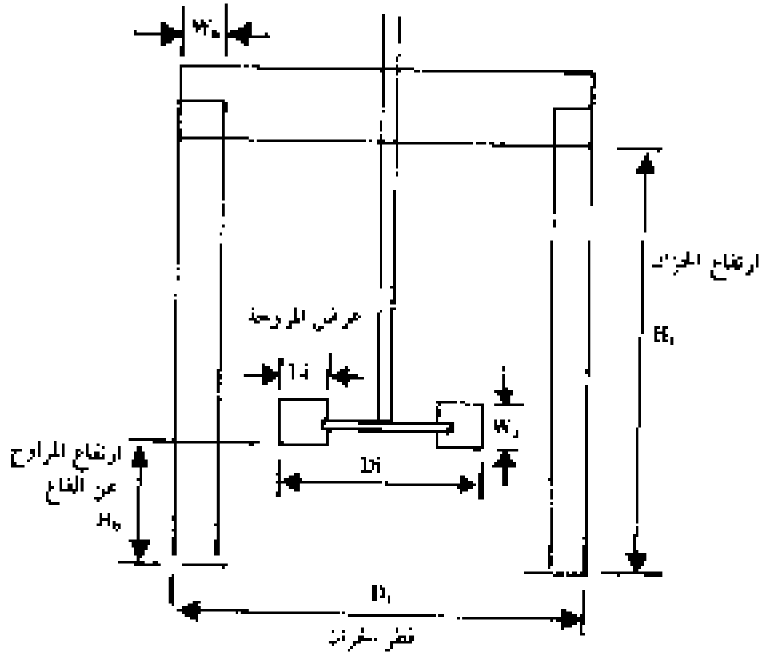
1.0-0.33) وكذلك بالنسبة إلى المخمر ذي (Propeller) فأيضا تكون النسب على التعاقب كما هي موضحة في الشكل (10).

وهناك أيضا علاقة بنائية للمخمر من حيث التهوية حيث يجب أن تكون العلاقة كما يلي:-

H/D = 2.0 – 3.0
dr/D = 0.3 – 0.5
B/D = 0.07 – 0.1

حيث أن D = قطر المخمر.
R = ارتفاع المخمر.
d = قطر التوربين.
B = أقطار الثقوب الهوائية.

وعموما المخمرات التوربينية تؤمن (%) من مسك الهواء في الوسط الغذائي، كذلك فإن تعدد المراوح في المخمر تأثيرا كبيرا على قوة التهوية وهما كما موضحين في الشكل (11) حيث تشير الدراسات إلى أنه كلما زاد من قوة التهوية والتحريك والتي تقدر عادة بنيوتن، وكذلك تشير الدراسات إلى أن حركة المراوح لها علاقة بالحواجز (baffles) حيث هناك حركة لجريان السائل من خلال حركة المراوح، وهناك حركة لمجرى الهواء أو غاز الأوكسجين وهناك مناطق لتبادل المواد في مناطق معينة وهناك مناطق ميتة.



شكل (10) يوضح المعادلات الحسابية للمخمر القياسي.

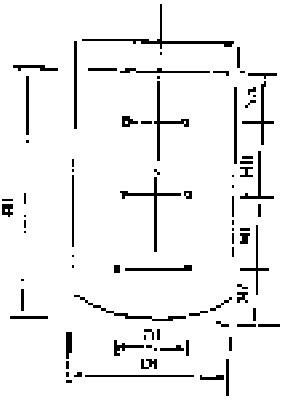
قطر الخزان

المعادلات الحسابية للمخمر القياسي

النموذج	ارتفاع المروحة عن القاع / قطر المروحة	عرض المروحة / قطر المروحة	عرض المروحة / قطر المروحة	ارتفاع الخزان / قطر الخزان

قطر المروحة / قطر الخزان

	$\frac{Di}{Dt}$	$\frac{Ht}{Dt}$	$\frac{Li}{Di}$	$\frac{Wi}{Di}$	$\frac{Wb}{Dt}$	عددها	$\frac{Hb}{Di}$
Flat-Blade Turbine	0.33	1.0	0.25	0.2	1.0	4	0.1
Paddle	0.33	1.0	- -	0.25	1.0	4	0.1
Propeller	0.33	1.0	Pitch = Di		1.0	4	0.1



عدد المراوح	2	3	
HL/Dt	1.38	1.38	ارتفاع المخمر/قطره
Di/Dt	0.3	0.3	قطر المراوح/قطر المخمر
HA-Di	1.3	1.0	مسافة المروحة الأولى عن السطح/قطر المخمر
HB/Di	2.0	1.3	مسافة ما بين الأولى والثانية/قطر المخمر
Hc/Di	2.0	1.3	الثانية عن الثالثة/قطر المخمر
Hc/Di	1.3	1.0	الثالثة عن القعر/قطر المخمر

حجم المثل 4 100 leters

شكل (11) يوضح تأثير عدد المراوح على قوة التهوية والتحريك.

ومن هذا الفصل لا يمكن أن تعطي كل التصورات لتصميم المخمر، هنالك الكثير من المخططات والمعادلات الحسابية التي لها علاقة بنوع المنتوج وكذلك بسلوكية الأحياء المجهرية المستعملة، وفيما يلي صورة مختصرة لبعض المخمرات والمخمرات عموما:-

1. المخمر الاعتيادي ذو الدفعة الواحدة (Batch. F.) في الشكل (12).
2. المخمرات المستمرة (Continuous F.) كما في الشكل (13).

3. المخمرات الأنبوبية (Tubular F) كما في الشكل (14).

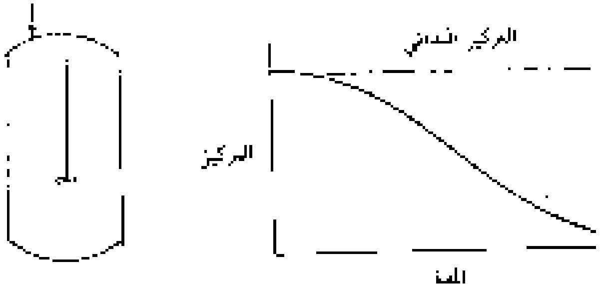
4. المخمرات ذو الطبيعة المائعة (Fluidized F) كما هي في الشكل (15).

5. مخمرات برجية (Tower F.) كما هي في الشكل (16).

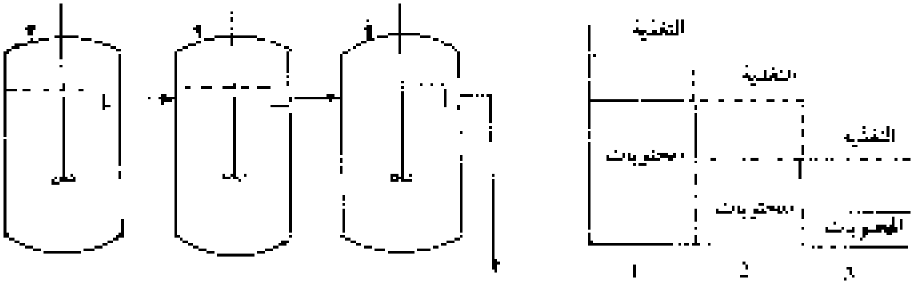
الجدول رقم (1) يوضح الاختلافات بين المخمرات.

أما لشرح بسيط للمخمر (Tubular F.): ففي هذا المخمر تدرس المواد المتفاعلة واتجاهها، حيث تدخل هذه المواد من نهاية وتخرج من النهاية الثانية في جريان منتظم والكتلة الحيوية للأحياء يمكن أن تكون بشكل عالق أو بشكل (flocs)، وسلوك (flocs) يعتمد على معدل الجريان والتغير من الفرش (bed) الثابت إلى (bed) المتغير.

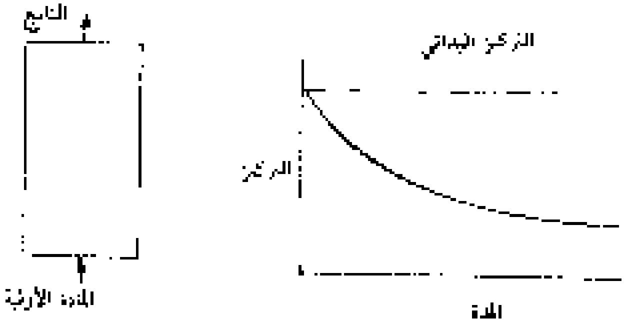
أما المخمر (Fluidized F.): فإن ميكانيكية هذا النوع موضحة في الشكل، فالدقائق العالقة تكون عالقة في السائل وحسب الحجوم المختلفة حيث تتدرج في ان(bed) الدقائق الصغيرة تكون في القمة ولكن بنفاذية تتغير والتي تؤثر على (microbial held-u)، وهذا النوع من المخمرات مستعمل في صناعة البيرة أكثر ستمرارية لتخمائر (yeast flocs).



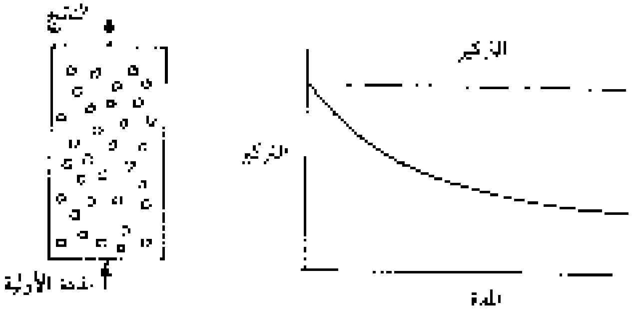
شكل (12) مخمر الدفعة الواحدة.



شكل (13) مخمرات ذات المحور المتحرك والمستمر الناتج.



شكل (14) المخمر الأنبوبي (Tubular F.)



شكل (15) المادة الأولى (Fluidized Fermenter)

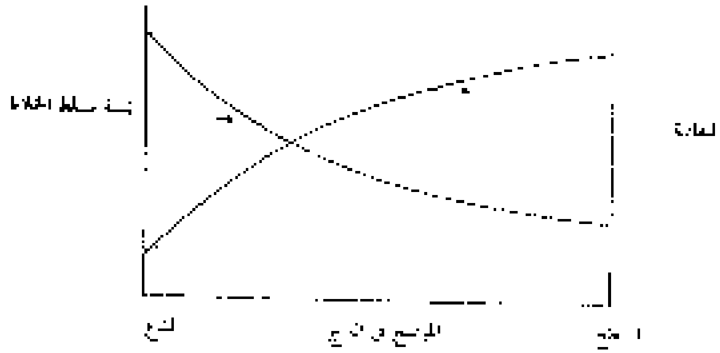
وكما يبدو من الجدول أن المايسليوم المتكون يعتمد اعتمادا كليا على نظـــام التهوية والتحريك المستعمل وممثلا عند التهويـــة OzmN0.08 / لـــتر دقيقــة لـ(*Mrchella hortensis*) وقد حصل على أعلى إنتاج من المايسليوم بينمـــا عند التهوية OzmM, 0 20-0.15 / لتر / دقيقة، أصبح النمو ... إلا أن الإنتاج أصبح أقل في حالة (*Agaricus Campestris*) أعطى أعلـــى إنتـــاج عنـــد التهوية OzmM 0 2] / لتر / دقيقة، وهذا يوضح أن درجة التهويـــة تعتمـــد بدرجة كبيرة على خواص الكائن المجهري.

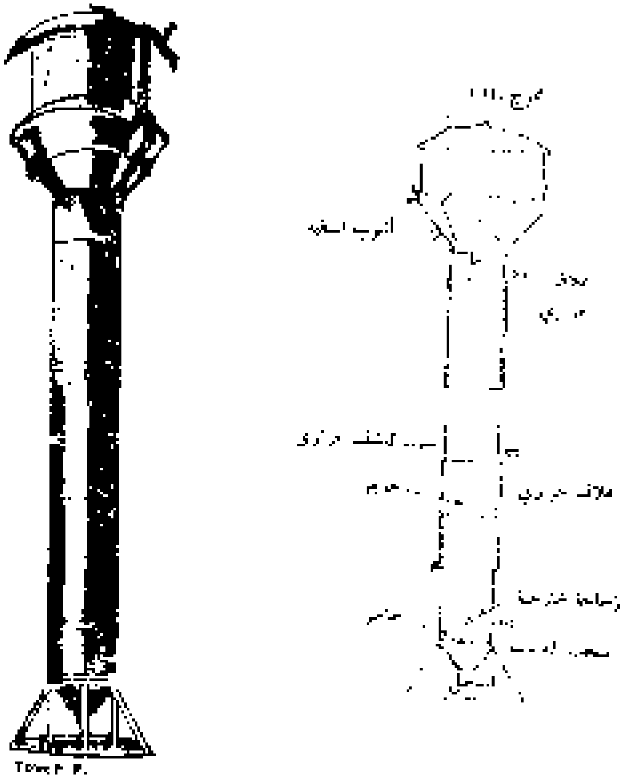
إن جريان الهواء له أيضا أهمية معينة لتحريك وسط المزرعة، ويعتمد هـذا ليس فقط على سرعة الجريان ولكن على حجم الخزان المجهز أيضـــا يتضـــح ذلك من تأثير جريان الهواء في الفرمنتورات الكبيرة أكثر فعاليـــة وخصوصـــا

عند الفرمنتورات ذات الوسط الغذائي العالي، يستعمل الهواء أساساً لأجل التهوية، إلا أنه بالإضافة إلى ذلك يساعد في عملية التحريك مما يؤدي إلى خفض ميكانيكية مراوح التحريك.

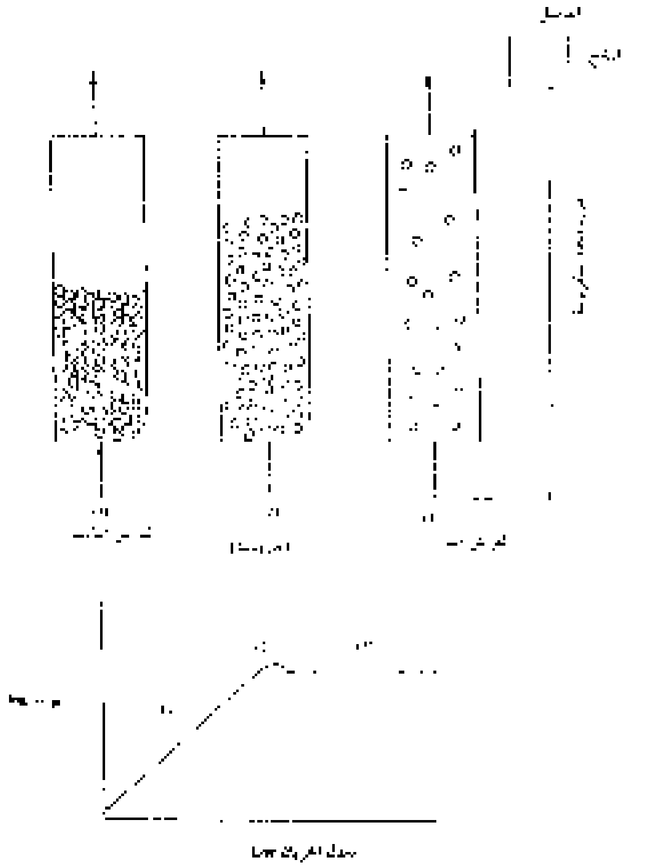
ولأجل عملية التصحيح بين التهوية في الدوارق الهزازة والفرمنتورات المهواة يمكن مقارنتها بالاعتماد على القيمة (KLa).

ولأجل الحصول على التمثيل الميكروبي تستعمل الكثير من المعدات والأجهزة المختلفة – كحاضنات للنمو الميكروبي، ويمكن أن تكون أنابيب اختبار، دورق حجمي فرمنتور، إن استعمال (Shaking Instrument) واستعمال الأوساط الغذائية (Substrate) فإن الحاضنات الهزازة تعطي تهوية ملائمة.





شكل (16) يوضح المخمر البرجي (Tower F.)



تأثير معدل الجريان على الجزيئات في المخمر الأنبوبي

شكل (17) يوضح أنواع الفراش وكذلك معدل الجريان

تهوية المزارع الساكنة:

تستعمل هذه الطريقة في حالات التحضير المزارع الاعتيادية وخصوصاً عند إنتاج بعض المنتجات العفنية، وهذه الطريقة تمتاز بعدم وجود مشاكل تهوية حيث تستعمل فيها مختلف الدوارق المختبرية أو الأدوات الإنتاجية. وفي المختبر تستعمل زجاجيات خاصة كما في الشكل.

التهوية والتغذية في هذه المزرعة تمتاز بصفات معينـــة والمثـل عليـها هـو المايسليوم الفطري النامي في السطح العلوي حيث يحصل على كميـــة مـن (O_2) أكبر مقارنة بالمايسليوم النامي في الجزء السفلي، إلا أنه من حيــث التغذيـة فـإن الجزء السفلي سيتغذى بصورة أكبر من المصادر النتروجينية والكربونيــة...الـخ. وفي هذه الحالة هناك اختلافات في نمو المايسليوم في نفس الدورق نظرا لاختـلاف ظروف التهوية والتغذية. وتمتاز هذه الطريقة من التربية بسهولتها وسرعة نتائجها.

طريقة التربية الساكنة (Static Cultivation) للعفن وللأحياء الأخرى التـــي تنمو على السطح. يجب أن نعلم أو أن نثبت الكثير مـــن الأطــوار للتربيـــة وهـــي ضرورية حيث تحتاج إلى كميات معينة من (O_2) ثم يقل احتياجها تدريجيا، وهـــذه الحالة هي ضرورية في حالة الفطريات البازيدية التي تنمو بصعوبة فـــي الأنـــواع الأخرى من طرق التربية.

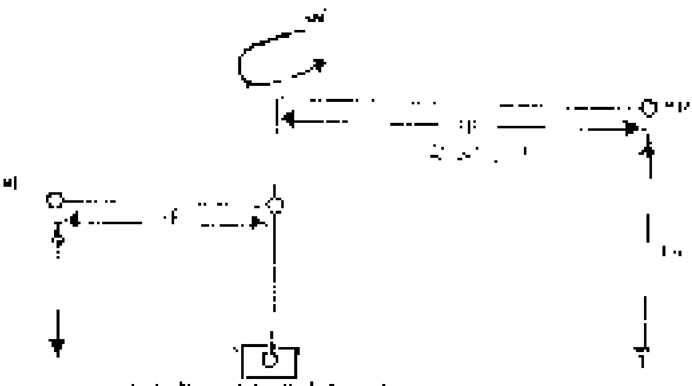
التهوية في الدوارق الهزازة:
(Aeration in Shaking Flask Fermention)

في الحرب العالمية الثانية كان البنسلين ينتـــج بطريقـــة (Deep Culture)؛ والمثال على هذه الطريقة لإنتاج البنسلين طريقة التخمير بالدوارق الـــهزازة وهــذا

بدوره أعطى ظروفا جيدة للمزارع الميكروبية لأن تنمو في الظروف الهوائية وعلى نطاق مختبري وفي حجوم صغيرة وبكميات قليلة من الوسط الغذائي، والذي أعطى إمكانية كبيرة لدراسة الفعالية الحيوية لكثير من السلالات المحسورة، ولهذا كله استعملت الدوارق بحجم (100، 250، 750 سم3) والتي تم هزها في جهاز خاص وبطريقة ميكانيكية وبدوران (اعتياديا 2,5 سم في القطر) وعموما كانت سرعة الدوران (220) دورة/ دقيقة.

دور جدران الدوارق في العملية يتلخص بأن الوسط الغذائي أو المزرعة ككل تطرد بالقوة المركزية والذي يعزل المادة أو الكتلة عن بعضها بارتطامها بجدار المخمر ولذلك تهوى المزرعة بنتيجة الانتشار. حجم الوسط الغذائي في الدورق اعتياديا يحدد التهوية وكذلك نسبة حجم الوسط إلى حجم الدورق. إن ميكانيكية هز مثل هذه المزارع يعطي تأثيرا كاملا وخصوصا في الهزازات المدارية.

وإن الهزازات المدارية مجهزة بمثبتات لولبية والتي بدورها ترتبط بقاعدة من الألومنيوم الخفيف، (Orpital Shaker) وهذه القاعدة مستندة على أربع بولبرنات (ball-bearings in cups) وهذه بدورها متصلة بمحرك كهربائي. علما بأن بولبرنات تقع مباشرة تحت مركز الدوران وكل نقطة في القاعدة الألومينية تقوم بحركة دورانية. ويعتمد قطر الحركة على قطر كل من طرفي القاعدة من مركز الثقل، والشكل رقم (18) يبين أو يوضح العملية.



شكل (18) يوضح المخطط الخاص للهزاز

WP = تأثير وزن طرف الآلة من القاعدة وعلى طول ذراعها Lp من محور الدوران.

WF = تأثير وزن الصحن على المسافة Lf من محور الدوران.

LP = مسافة حركة القاعدة الدائرة من مركز الثقل.

LF = مسافة الصحن من مركز الثقل.

قوة الطرد المركزي التي تسحب الوزن الكلي للقاعدة =

كتلة القاعدة × مربع السرعة للتدوير الزاوي × تأثير قطر الدوران (والذي يعادل ويساوي حركة القاعدة).

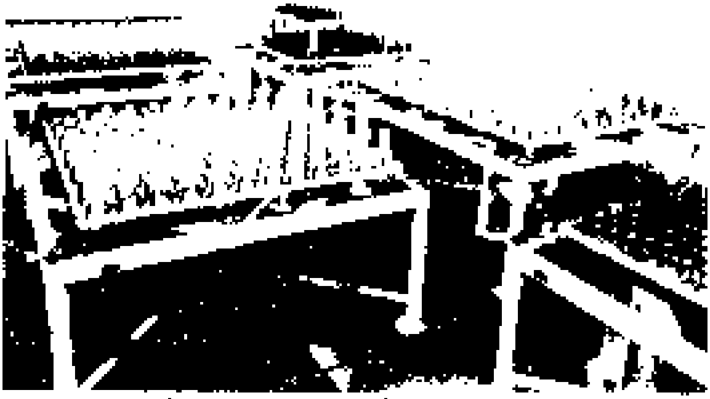
$$\frac{W_p}{g} = W r P = \frac{W_F}{g} \quad W r^2 f$$

أي في حالات مراكز الثقل المختلفة او المتصبة تعطي الشكل:

الفوة الطاردة × (Lp – Lf)

عملية التهوية والتحريك في الدوارق الهزازة يمكن أن يسيطر عليها بثلاث طرق:-

1. التهوية والتحريك لها علاقة عكسية بعمق (وهذا يعني بحجم السائل في الدورق).
2. التهوية والتحريك له علاقة مباشرة مع سرعة الدوران وطول الذراع أو قطر الحركة.
3. هنالك بعض العمليات الميكانيكية والتي تزيد من درجة التهوية والتحريك بسبب (Turbulence).



التهوية والتحريك في مزارع الأحياء المجهرية:

إن الجزء الأكبر من الأحياء المجهرية هي هوائية، ونموها في الأوساط السائلة أو على الأوساط الصلبة مرتبطة ارتباطا وثيقا بكمية الأوكسجين اللازمة والكافية لنمو المزارع، وبالتالي في تكوين المنتوج الميكروبي المرغوب أو الاثنين معا

أن كمية الأوكسجين اللازمة تحدد وتعين نوع الكائن المجهري المصنع إذا مـــا علمنا أنها تختلف الواحدة عن الأخرى بكمية استهلاكها للأوكسجين. كذلك عمليـات التمثيل الحيوي تحتاج أيضا إلى كمية معينة من الأوكسجين، علما بـــأن العمليات الحيوية تنتج أوكسجين وهذا ما توصل إليه (Shu) عام (1953) حيث قسم احتيـاج هذه الأحياء المجهرية للأوكسجين إلى ثلاثة مجاميع:

أ. عمليات نادرا احتياج للأوكسجين من أجل نمو الأحياء المجهرية نفســها وكذلـك لأجل تأليف بعض المنتجات والمثل عليها هو إنتاج الأحماض ومنها (*Usmiage Zeae*).

ب. عمليات يكون فيها الأوكسجين ضروريا جدا للأحياء المجهرية لأجل التمثيـل الحيوي وكذلك لعملية التخليق ومثال ذلك تخليق (α – amylase) مـــن قبـل (*Asp.niger*).

ج. عمليات تحتاج إلى كمية قليلة من الأوكسجين للحصول على أعلى إنتاج، ومثـال ذلك عند تخليق حامض الليمون (Citric acid) بفعل (*Asp.niger*).

رغم معلوماتنا عن هذه المجاميع فلا يخفى علينـا أهميـة الوسـط الخـارجي وتأثيره، رغم معرفة جميع العوامل للكائن المجهري والتي تحدد الأوكسجين الـلازم للوسط الخارجي ودوره وهذا ما أثبته (Johnson) عام (1959) وحدد ذلك بدرجة

التهوية فقد فرض إحدى المعادلات لأجل حساب سرعة التهوية للأحياء المجهرية تعرض التخليق الحيوي (Biosynthesis) عند زرع الأحياء المجهرية في وسط كاربوهيدراتي.

$$A = \left(\frac{.3333}{Y} - 4.8 \right) G$$

حيث أن:-

A = الأوكسجين اللازم في ml / دقيقة.

Y = الإنتاج للكتلة الميكروبية الجافة في غم / 100غم جلوكوز.

G = ثابت النمو.

والتي بدراسة المادة الميكروبية في غم / دقيقة. هذه المعادلة طبقت وحصل على كتلة حيوية مايكروبية تحتوي على (%47) من الكربون، (%0.5) من الهيدروجين، (%75) من النيتروجين، (%8) رماد.

رغم هذه المحاولة كان هناك خطأ حاصل في حساب سرعة التهوية نظرا للتغيرات البسيطة في مكونات المادة الميكروبية ولكن الخطأ لم يكن كبيرا. وهنا يتضح لنا بأن تجهيز أو إضافة الأوكسجين للأحياء المجهرية نظريا لم تكن دراسته متكاملة إذ أن تأثيره في الإنتاج واضح وواقعي، ومن هذه العلاقة نرى أن هنالك بعض العقبات في مرور الأوكسجين في صورة الغازي في جسم الميكروب حيث أن هنالك عوامل مؤثرة على إذابة الأوكسجين في الوسط الغذائي، وأن هذه العوامل هي ضرورية لأجسام الأحياء المجهرية من الأوكسجين غير الذائب وقد عرف هذا العامل من قبل (Bartholo mew) عام (1950).

العوامل التي تؤثر على امتصاص الأوكسجين:

من العوامل المعروفة هي علاقة امتصاص الأوكسجين من مـــزارع الأحيـاء المجهرية وهذا يحملنا إلى دراسة الخواص الفيزيائية والكيماوية لوسط التربية، ومن البديهي أن أجسام الأحياء المجهرية لها مختلف الخواص المورفولوجية وأهمها هـي التجمعات الميكروبية، حيث أن هذه التجمعات لها دور كبير في امتصاص وحمـــل الأوكسجين عن خلال المايسليوم الذي يحمل كميات كبيرة، وقد أثبت هـــذا (Finn) سنة (1954) حيث أوجد علاقة هذه التجمعات الميكروبية على حمل الأوكسجين.

ووجد (Chain & Gualand) عام (1954) أن المايسليوم غير الحي يخفـض تأثير التهوية، حيث أن الصفات الفيزيائية والكيماوية لمـزارع الأحيـاء المجهريـة تتغير باستمرار في وقت نمو الأحياء. كذلك شكل الخزانات التخمرية (الفرمنتـــور) أيضا لها علاقة مؤثرة على التهوية وهذا ما نراه فعلا في الأوعية الـــهزازة وفـي الفرمنتورات (Carman & Shu) عام (1957) فقد نجحوا في أن يكتشـــفوا بـأن عملية التهوية مبنية على أسس دورانية مـــن شـأنها زيـادة سـرعة امتصـاص الأوكسجين من قبل مزارع الأحياء المجهرية.

كذلك من العوامل المؤثرة في عملية التهوية أو امتصـــاص (O_2) هـو نـوع التحريك المستعمل، وعلى هذا الأساس هنالك نوعان من الأنظمة:-

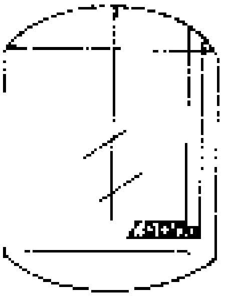
أ. نظام يمثل في جوهره سلسلة من الفتحات في قاعدة الفرمنتور والتي تعمل على توزيع ميكانيك الحركة بكفاءة عالية.

ب. نظام يعتمد على السيطرة المركزية والتي يمكن معرفتها من خلال اسطوانة زجاجية مركزية والتي تحتوي في داخلها على مادة صلبة (سيراميك) والتي بواسطتها يمكننا من التحكم في توزيع الهواء بالكمية المطلوبة.

النظام الأول يفرض لكثير من الحالات الاعتيادية وغيرها وهو عملي عند الاستعمال. إن ظهور أو تكون الفقاعات الهوائية في هذا النظام قد درس من قبل (Davidson & Amick) سنة (1956) واللذين أوضحا بأنه عند السرع القليلة أو البطيئة لجريان الهواء في نظام الفتحات تعطي فقاعات بشكل متجانس يعتمد حجمها على سرعة التهوية وكذلك على أقطار الفتحات. من جهة أخرى عندما تكون سرعة جريان الهواء أكثر، سيكون الانعكاس على سطح المزرعة أكثر وهذا يعتمد على قطر الفتحات.

ومن الجدير بالذكر أن استعمال الفتحات الصغيرة غير محبذ حيث أن تراكم المايسليوم سيغلق الفتحات الهوائية (Fortune) سنة (1956) والتهوية الاعتيادية لأي عملية مايكروبيولوجية تجري بالتحريك والتي تكون جزءا من نظام التهوية، التحريك يرفع من فعالية التهوية. حيث من خلال التحريك وزيادة في جريان الفقاعات الهوائية في المزارع السائلة المتحركة ولفترة مستمرة ستكون الفقاعات الهوائية داخل السائل موزعة بانتظام (Iritt) سنة (1954)، وفي بعض الحالات الأخرى من التهوية يتوجب استعمال السرع العالية للمراوح (700– 1500

دور دقيقة) حيث أن مبادل الممزوجة سيزداد حجما لكي يعطي إمكانية كبيرة لتوزيع الهواء. الدراسات على هذا الموضوع قليلة جدا ولكن يمكن إلقاء الضوء عليه كعنصر أو كعامل مساعد.



شكل (19) يوضح الخاض المحوري الهزاز

إن الخمائر تحتاج للتهوية وخصوصا في فترة التكاثر. فإن سرعة التهوية لها تأثير على نمو الخمائر (ويست وكادن West & Gaden) سنة (1952)، حيث أثبتا بأن سرعة عملية التكاثر في كل الأحوال تعتمد على محتويات المزرعة. إلا أن التحريك عامل مؤثر في خلط المكونات الغذائية في الوسط. وفي حالة حساب التهوية والتحريك لتحضير المايسليوم من الفطريات فيعطي بشكل O_2 ml/لتر/ساعة، أو يحسب بأي شكل مقارب. وللتحريك تستعمل المراوح الميكانيكية أو تستعمل محاور دورانية.

إن الجدول رقم (4) يعكس لنا ظروف التهوية والتحريك لـ(Deep Culture) لمختلف الفطريات ومزاياها.

إن تقنية التخمر (إنتاج وتحويل النواتج المختلفة بواسطة الأحياء المجهرية) قد تقدم بدرجة كبيرة خلال السنوات المنصرمة. بحيث أن تصاميم الأجهزة أصبحت لها أهمية بصورة متزايدة. والتخمر الصناعي كما هو الحال في إنتاج المضادات الحيوية يحتاج إلى تطوير لبعض أنواع الأجهزة المستعملة ومع ذلك فإن تصميمات الأجهزة ما تزال غير مثالية. ففي حالة تكوين فكرة لتصميم الجهاز يجب أن نميز بين المعامل المختبرية من جهة وبين الوحدات الإنتاجية من جهة أخرى فالحالة الأولى (تحضيرية) والفكرة هي:

1. الاستفادة التامة .
2. معرفة كل الخطوات المستعملة.
3. سهولة الاستعمال مع قابلية لملاحظة كل شيء.

أما في الحالة الثانية (الإنتاجية) الفكرة هي:

1. المحصول الكبير بكلفة قليلة.
2. انتظام واعتماد الإنتاج.
3. الاعتماد على الفعاليات الأوتوماتيكية أكثر من الاستعمال اليدوي.

جدول

يبين ظروف التهوية والتحريك عند Deep Culture ويبين صفات وأشكال النمو

نوع الأحياء	نوع الخزان	درجة التهوية	درجة التحريك	شكل النمو
Agaricus blazei	دورق 3سم - فرمنتور هزاز	250	80 دورة/دقيقة	0.25 سم حجم الكتلة
	فرمنتور 20L	0.25-0.5 حجم هواء/وسط/دقيقة		2,5 Cm
Caricus campestricus	دورق 600سم3 حجم الوسط 150سم	13mMoz/ dm³/h	دورة/دقيقة	
	فرمنتور 7.5L	1 حجم هواء/وسط/دقيقة	172 دورة/دقيقة	كريمية
	فرمنتور 20L	1-3حجم/وسط/ دقيقة	400 دورة/دقيقة	كروية
Marchella mortensis	فرمنتور 12L	0.08-0.2 mM O2/dm³/min	—	0.05
				0.15-0.20m

كل التجارب للفعاليات المايكروبيولوجية تبدأ في الحاضنة الهزازة بعد ظـــروف الزراعة المختبرية المثالية تماماً مما يجعل تصميم أجهزة التخمر المختــبري هدفـاً رئيسياً، وبواسطة التخمر المختبري يمكن إنتاج أو تجهيز أحياء مجهريـــة بشـــروط

محيطية ومعيشية بحيث نحصل على الطاقة القصوى للنمو، وعند الحصول على هذه الطاقة القصوى نستطيع من خلالها أن نصمم الأجهزة ونبنيها.

هنالك عدة معامل للإنتاج في الوقت الحاضر ولكنها غير اقتصادية، وإشارة للحقيقة المذكورة أعلاه فإن التقنية المايكروبيولوجية في عدة حالات لم نركز عليها، ولهذا السبب فإن جهاز التخمر المختبري يجب أن لا يكون حاويا على خباط (Stirrer) فقط، لأن هذا سوف ينقص من فعاليته.

إن المخمر المختبري يجب أن يكون مكيفا لظروف عديدة، مثلا يجب أن يكون ملائما لعملية التخمر وللأحياء المجهرية المستعملة، حيث يشكل مرحلة انتقال ما بين الخضاض (Shaker) وجهاز التخمر الصناعي.

جهاز التخمر المختبري:

في هذا الجهاز فالقوة المحركة أو المسيرة له (Drive) وهو من أهم الوحدات البنائية للجهاز، حيث يمكن استعمالها وبصورة معقمة لأجل تجهيز مراوح الخلط داخل المخمر بالطاقة حيث تعتبر هذه الوحدة القوة المسيرة للحركة. لذا يجب الاهتمام كثيرا بصيغة تركيبته على غطاء الجهاز، علما بأنه يجب الاهتمام بالنقاط التالية:-

<u>أولا:</u> خطر الإصابة بالتلوث حيث أن عمود السائل في جهاز التخمير ينتج قوة ضاغطة عالية للغلق حتى ولو أن الجهاز في حالة الراحة أو السكون (بدون عمل).

ثالثاً: عندما الجهاز يبقى غير متصل بمحتويات السائل مثل الزعنفة الفاصلة، أو الاتصال المغناطيسي/ التوربيني يجب أن نتنبه إلى أن وزن الماطور (drive)؛ لا يمكن للغطاء من تحمله حيث أن الماطور يزن عدة آلاف من الكيلو غرامات.

معدن الخباط (Stirrer element):

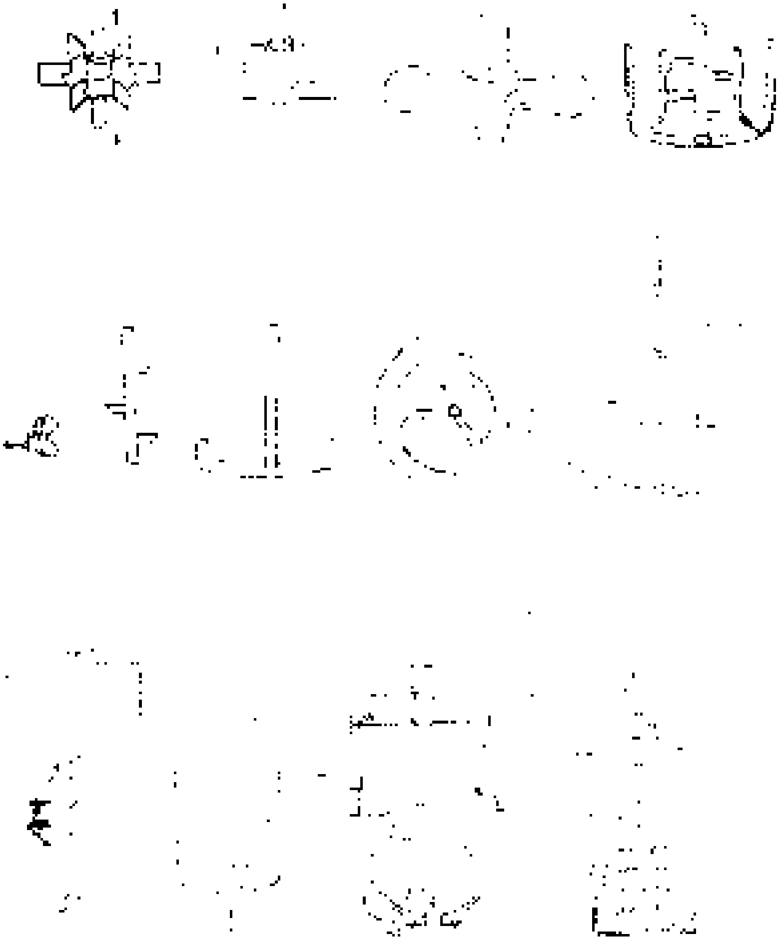
الاهتمام يجب أن يركز على اختيار أجهزة الخبط والحركة، فالخباط اللوحي الاعتيادي مع (1،2) أو أكثر من الأنواع التوربينية هو أكثر شيوعاً ويستعمل بصورة كبيرة في الأبحاث. إن الشعور السائد هو أن الخباط اللوحي يستعمل خصوصاً للمنتوجات التي تتصف بدرجة لزوجة عالية ويستعمل بصورة أكثر في التخمر الهوائي عندما يكون استخدام أو استعمال (O_2) قليلاً. هذا الجهاز له صعوبة كبيرة في ضغط الهواء على شكل فقاعات صغيرة، لذا فهو يستهلك طاقة كبيرة وباستمرار تيار عالٍ من الهواء للجهاز يمكن التخلص من الفقاعات الهوائية عن طريق المحور، وبهذا نكون قد فقدنا بعض الطاقة. هذا النوع مهم في تربية الأعفان لأن الجهاز سيبقى على تركيب هذا المايسليوم. الألواح سوف تعمل بسرعة قليلة نسبياً (الأجهزة المختبرية ما بين 300 – 800 دورة/ دقيقة).

إن أجهزة الخبط الخاصة الأخرى تم بناؤها بالاعتماد على الكثير من العوامل، فالخميرة مثلاً مع هواء نسبياً عالٍ (خصوصاً عندما يكون O_2 عاملاً معرقلاً) سوف تؤدي دائرة كاملة يمكن التخلص من الهواء الموجود في الفقاعات الصغيرة. وهذه العملية يمكن استعمالها لمنتوجات متعددة، وذلك عندما تحكم وحدة الاستحداث

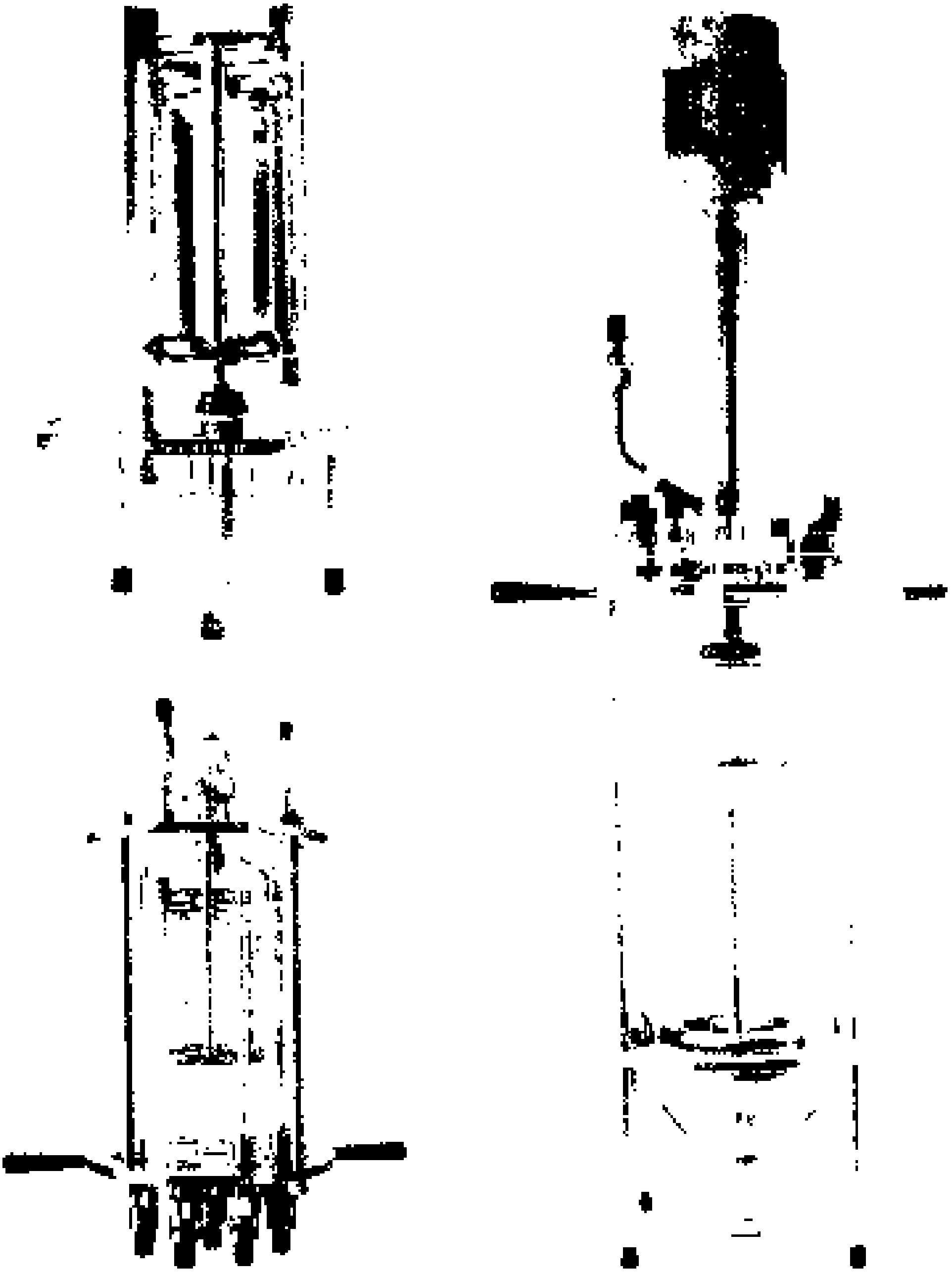
(emulsion unit) تحدث كمية كبيرة من الطاقة يمكن استعمالها في الدائرة، أو في عمل تكسير الفقاعات. سرعة الخباط هي بحدود (3000 دورة/ دقيقة).

وهذا النوع من الخباط تم البرهنة على أنه ملائم لزراعة التورولا (Torula) خصوصا إذا زرعت مع مزيل الرغوة ولهذه الطريقة خميرة التورولا يمكن إنتاجها في أجهزة التخمر الصناعية مع استهلاك طاقة نسبيا قليلة. وهناك خباط آخر لزراعة الأحياء المجهرية من الأوساط السائلة التي تحتوي على مواد غذائية غير قابلة للذوبان في الماء مثل النفط والبارافين وهذه الخباطات تكون موزعة على طول وعاء التخمر. حيث أن الهواء سيتعدى قعر الوعاء بطريق الكبس المستمر. وبنفس الوقت البارافين غير الذائب يؤخذ ويكسر لعدة مرات.

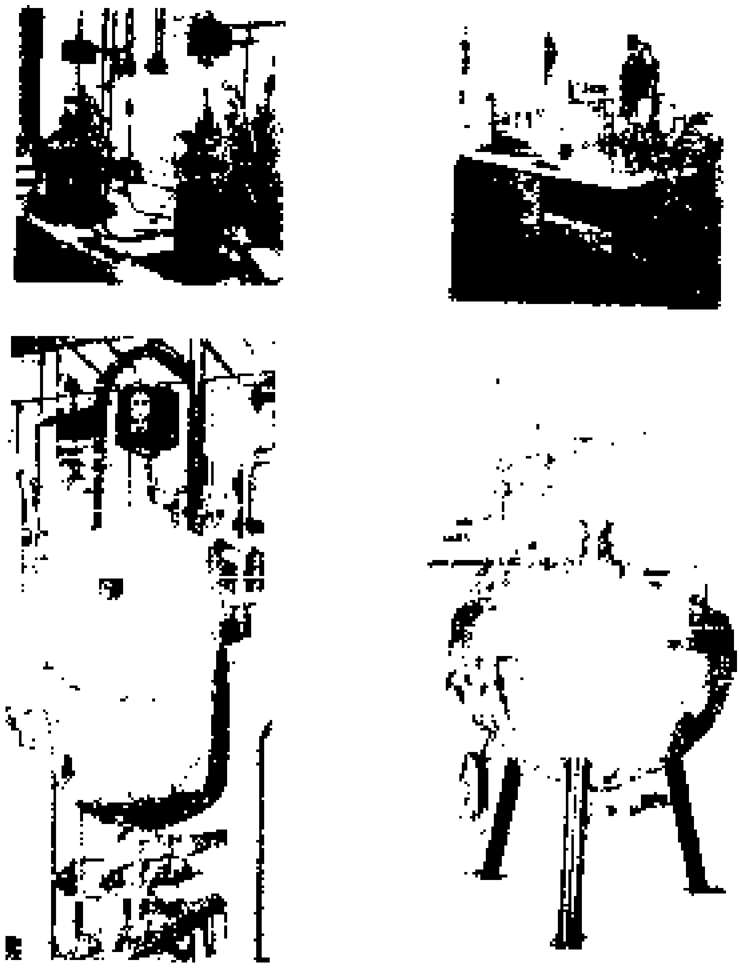
ومن الواضح أن جهاز التخمر المختبري يكلف كثيرا إذا قارناه بوعاء زجاجي بسيط مع خباط. وأن كليهما يؤديان نفس العمل. إن الجهاز المختبري يتميز استعماله لمزارع مختلفة، وله أنظمة خبط مختلفة وسرعات متفاوتة، والتعقيم ذاتي. وكذلك عملية التلقيح تتم بواسطة الجدار من خلال (Needle) والغلق ميكانيكي، لهذا كانت كلفة الجهاز ذا شأن وهذا بالضرورة يحتاج إلى إدخال جهاز لقياس الحرارة، (pH) والأوكسجين... الخ.



شكل (20) يوضح بعض أنواع الخباطات المستعملة



شكل (21) يوضح مقاطع في مخمرات مختلفة.



شكل (22) يوضح بعض أشكال المخمرات المخبرية الاعتيادية

فصل الرغوة (foam separator):

إن فصل الرغوة ميكانيكياً يمكن اعتباره مشكلة قديمة كالتخمر نفسه ليس فقط بالمختبر ولكن في الصناعة كذلك في الحقل. حالياً معظم الأجهزة تزيل الرغوة بدلاً من خلطها مع فقدان هواء التخمر الهوائي. بعد دراسة عدة تصاميم كان من الممكن

حل هذه المشكلة بفصل الرغوة في عمود استخلاص الهواء (dearation tube) بواسطة الفاصل الاعتيادي، ومع ذلك فإن هذه العملية غير ناجحة والرغوة تسربت من الأنبوب بحيث أصبح الجهاز معقدا وغير معقم. وبهذه الطريقة تم القضاء على الرغوة في الفصل الاعتيادي الذي يعتمد على عملية الطرد المركزي للسائل الفائض مما سيخلق لنا طبقة رغوة ثانوية، وهذه تعتبر نقطة ضعف للجهاز.

المشكلة الآن يمكن حلها باستعمال الأقراص الفاصلة مع وجود ثقوب داخلية غازية وهذه الثقوب منتشرة. وهذه الأقراص موجودة نسبيا بعيدة الواحدة عن الأخرى. وهذه الأقراص توضع في طبقة الرغوة في جهاز التخمير بحيث أن السائل الراجع وغير المار في الجدار المعاكس ولكن في طبقة الرغوة نفسها بحيث نستطيع من الحصول على دورة كاملة (صورة رقم (21) توضح هذه العملية والجهاز).

في تصميم وبناء الأجهزة المختبرية وفي معامل التخمير الصناعية أمكن حل بعض المشاكل خصوصا والتي تتعلق بأجهزة الغلق حيث تم صنع عملية الغلق المزدوج الذي يمكن أن تتجمع وتبرد. للتبسيط فإن فاصل الرغوة للأجهزة المختبرية مركب مباشرة على المحور الخباط، ومع ذلك فإن هذا الجهاز لا يمكن استعماله لزراعة المايسليم لأن سرعة المحور بطيئة جدا لكميات كبيرة للرغوة في الأجهزة المختبرية وللفصل الجيد يجب أن تكون سرعة المحور ما بين (2000-3000 دورة/ دقيقة).

هذا ممكن للخمائر والبكتريا أما لمزارع المايسلوم والمزارع الحساسة فإن السرعة العالية سوف تكسر الخلايا، لهذا السبب يكون الفاصل بعيدا عن الخباط. وبسبب الفرق الكبير في الوزن النوعي ما بين الهواء والطبقة السائلة فإن (rpm) الدوران/ دقيقة لجهاز فاصل الرغوة الصناعي هو نسبيا قليل ولا يمكن مقارنة للفاصل الاعتيادي بسبب كبر الجهاز، لهذا فإن السرعة هي ما بين (500-1000) (rpm).

إن استعمال المواد الكيماوية المضادة للرغوة لها تأثير سلبي على الناتج. حيث أن هذه المواد الكيماوية تمتص من قبل السطح الميكروبي وتخترق جدار الخلية. لذا فإن أهم استفادة من الفصل الرغوي الميكانيكي هي عدم استعمال مضادات الرغوة الكيماوية بالإضافة إلى تجنب استعمال مواد غريبة خلال إنتاج الخميرة وخصوصا المواد الغذائية.

عن استعمال فاصل الرغوة سوف يسمح باستعمال تكنيك جديد للتخمر: بعض المزارع يمكن زراعتها في درجات أكسدة قصوى باستعمال جهاز التخمر مملوء بصورة تامة بمزيج من الهواء والبيئة الغذائية (Substrate)، ففي حالة تخمر السنايد والذي يستعمل خلالها جهاز سعته (1000 لتر) وبهذه الدرجة من التهوية فقط (60%) من حجم جهاز التخمر الكلي يمكن استعماله، بالإضافة إلى هذه الحقيقة كميات كبيرة من الأمتار المكعبة يمكن الاستفادة منها باستعمال (Conventional Stirrer system) (جهاز الخبط الشامل) ربما لسبب جودة نقل

الأوكسجين وجودة التخلص من الغازات عند إنتاج رغوة اعتيادية، جهاز التخمير يمكن علوه تقريباً إلى مستوى الفاصل.

من الملاحظ في هذا الفاصل يجب أن يكون مركزاً بصورة دقيقة لتخمير البارافين والهايدروكربون والميثان واللذين يحتاجان لعملية تكسير شديد وفصل دقيق للغازات المستعملة.

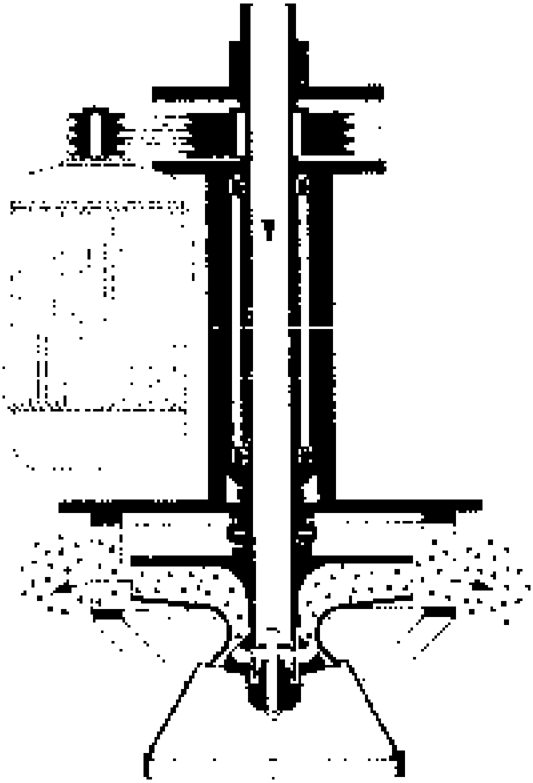
ميكانيكية الجهاز (Instrumentation):

وهذا يتألف من منظم (pH) مع مضخات ضرورية للحوامض وقياسات تصميم الـ(pH). تغذيات المنظم تعطى بواسطة لوحة السيطرة والتي تؤمن الدقة وتمنع التصحيح الزائد في كلا الاتجاهين. وكذلك منظم الحرارة لجهاز التخمير المختبري.

يستعمل جهاز منظم أو PID ولجهاز التخمر الزجاجي يستعمل المحراز مع لوحة تسجيل صغيرة. إن سرعة الخياط (stirrer) ودخول الهواء تنظم يدوياً. مرونة جهاز التخمر الزجاجي تؤمن بوجود جهاز إضافي وهذا يجهز بصورة جهاز مساعد.

لإنتاج مزارع مستمرة في أجهزة التخمر المختبرية هناك جهاز حديدي يمكن استعماله خصوصاً لزراعة الخمائر بوجود البرافين والهايدروكربون.

هذه العملية تجري كالآتي: يثبت الفرمنتور مع الفاصل الرغوي ثم يملأ وبعـــد التلقيح، وبعد وصول مرحلة Lag phase للنمو تضاف المادة الغذائيـــة Substrate بصورة مستمرة وآلية باستعمال مضخة (Pump) تنظم نسبة التهوية إلى حد معين مع إمرار الهواء خلال المستحلب وخروجه من فتحـــة الفرمنتـــور مـــارا بالفــاصل الرغوي



أجزاء جهاز فاصل الرغوة الميكانيكي

شكل (23) يوضح مخطط عمل جهاز فاصل الرغوة

إن الاستهلاك الكهربائي للخياط أو لماطور الخياط حساس جدا لتكوين الكيماوي للمواد الغذائية Substrate وكذلك الهواء المار خلال المستحلب وخلال الفاصل الرغوي خصوصا عند تثبيت أو إيصال الخياط بالمحور، فإذا ازدادت كمية الجزء السائل فإن الاستهلاك الكهربائي يرفع أيضا والعكس بالعكس.

وهنالك كشاف ضوئي على جهاز الفوتيه مثبت بطريقة الاختبار القيمة المناسبة للسعة بين الهواء والمادة الغذائية (في حالة البرافين أو الخمائر فإن النسبة تكون ٦٠٠ : ٤ تقريبا) وحالما يتغير تركيب المواد الغذائية المضافة فإن صمام التخلية يفتح من خلال المنظومة التي سبق ذكرها حتى تعود حالة التوازن المحددة إلى ظروفها المعينة، وينظم ماطور مضخة إضافة المواد الغذائية (Substrate) بحيث تكون دفعاته بحدها الأقصى ولكن دون أن يؤدي ذلك إلى غسل الخمائر.

أما السعة الإنتاجية لهذا الجهاز يمكن قياسها بطريقة بسيطة لهذه الطريقة من الممكن وفي مختبر بسيط نسبيا حيث يتعامل مع الزراعة المستمرة (Cont.culture) والتي تستمر لعدد قليل من الأشهر.

المخمر الصناعي (Industrial Fermenter):

المخمرات الصناعية لها سعة عمل حجمية تتراوح من (300 إلى 100.000) لتر وربما أكثر ، وأن المخمرات الصناعية من حيث التصميم تشبه إلى حد كبير المخمرات المختبرية، فهي أيضا تحتوي على عملية تعقيم ولكن تكون عملية معقدة حيث يجب الانتباه إلى الأنابيب والصمامات وأجهزة نقل المواد التي تجري بصورة كهربائية من خلال لوحة السيطرة، علما بأن عملية التعقيم تنظم بموقتات خاصة، بحيث يمكن الوصول إلى أي نقطة ضمن الجهاز بسهولة. والصمامات الثنائية في أنابيب الإنتاج تعقم من كلا جهتيها بالبخار وتسحب المادة الماء المكثفة تباعا خارج الجهاز وتنظيم الضغط بحيث تصل درجة الحرارة (121م).

إن عملية التخمر الذاتية هي دائما حسنة حتى ولو كان الوقت المخصص للتخمير هو أضعاف الوقت المخصص للتعقيم. والسيطرة على التخمير يكون عادة عملية بسيطة (تثبيت كمية الهواء، درجة التفاعل، الحرارة) إن أي نقص أو خطأ في التعقيم سوف يؤديان إلى التلوث والفقدان إن الهدف الرئيسي من التخمير الصناعي هو حفظ الطاقة ويشمل الطاقة المستخدمة في تحريك الخباط أو الطاقة المستخدمة في المكبس الهوائي أو الطاقة المستخدمة في فصل المواد المتفاعلة في المواد المغذية.

مساوئ عملية التخمر مقارنة بالعمليات الكيماوية التقنية هي أن العمل هنا يتعلق بمحاليل ذات تراكيز قليلة نسبيا وإذا ما تمكن الإنسان من رفع هذه التراكيز

بخضاض أكثر كفاءة وتوفير تهوية كافية، فإن الوقت المخصص لعمليـــة التخمـــير سينقص وبذلك ترتفع أهمية هذه العملية البايولوجية.

الفصل السابع

الترشيح ومعدات الترشيح والتنقية
Filtration and Clarification

الترشيح ومعدات الترشيح والتنقية:
(Filtration and Clarification)

المقدمة:

لقد تطورت تقنيات الترشيح خلال الثلاثون سنة الماضية تطورا كبيرا وذلك لتطور العلوم والتقنيات وكذلك من خلال تلبية الحاجات الملحة من قبل بعض الصناعات والمجالات والمرافق التي تكون فيها عمليات الترشيح مهمة وللحصول على النقاوة العالية ومن أهم هذه المجالات:-

1. الصناعات الغذائية.
2. الصناعات الكيماوية.
3. الصناعات الدوائية.
4. صناعة التخمرات.

ونتيجة لهذه الاحتياجات نهضت الشركات العالمية لتلبي هذه الاحتياجات وعموما فلا بد من إعطاء فكرة عن عملية الترشيح والتي تعتمد على العناصر الرئيسية التالية:-

<u>الأول</u>: درجة الاحتجاز للمرشح. <u>الثالث</u>: المتانة

<u>الثاني</u>: سرعة الترشيح. <u>الرابع</u>: مقاومتها للحرارة.

ودرجة الاحتجاز تعني قدرة المرشح على الاحتفاظ بالحبيبــــات أو الدقــائق أو الرواسب ذات الأقطار المعينة بالاعتماد على الخصائص الفيزيائية للمرشح.

وقد اختلفت أنواع المرشحات بالاعتماد على نوعية المرشح ومكوناتـــه فــهنالك الألياف السليلوزية ذات المسامية المختلفة، ومن هذه المرشحات ما يلي:-

أ. **المرشحات السليلوزية:**

1. مرشح سليلوزي متكون مـــن أســتات الســيليلوز (Cellulose acetate) ونسيجه له قابلية حجز دقــــائق بحجــم (0.2) مليمـــايكرون إلـــى (0.8) مليمايكرون علما بأن هذا النوع من المرشحات لها القابلية لتحمل الحــــرارة إلى (134م) أتوكليفيا أو (180م) بالفرن الجاف.
2. مرشح سليلوزي متكون من نترات السليلوز ويتميز هذا المرشــــح بقابليـة احتجاز للدقائق من (0.01) مليمايكرون إلى (0.8) مليمايكرون كمــا أنــه يقاوم الحرارة (حرارة التعقيم) (121م).
3. مرشح نترات السليلوز الأسود وتتراوح درجة الاحتجاز في هذا النوع مــن المرشحات من (0.45) مليمايكرون إلى (8) مليمايكرون.
4. مرشحات إيسترات السليلوز ولها درجة احتجاز مختلفة.

ب. **مرشحات بولي أمايد:**

مرشح بولي أمايد له درجة احتجاز ما بيــن (3) مليمـــايكرون إلـــى (1.2) مليمايكرون.

ج. مرشح بولي فنيل كلورايد:

وهذا النوع من المرشحات له درجة احتجاز ما بين (0.8 – 0.2)مليمايكرون.

د. المرشح الجيلاتيني:

وهذا النوع من المرشحات لها درجة احتجاز (3) مليمايكرون.

هـ. مرشحات بولي سلفون (poly Sulfone):

ولها درجات احتجاز مختلفة.

و. مرشحات بولي كاربونيت (poly Carbonate):

ولها درجات احتجاز مختلفة.

ز. مرشحات بولي فنيل ادنين داي فلورايد (poly vinylidenedif):

ولها درجات احتجاز مختلفة.

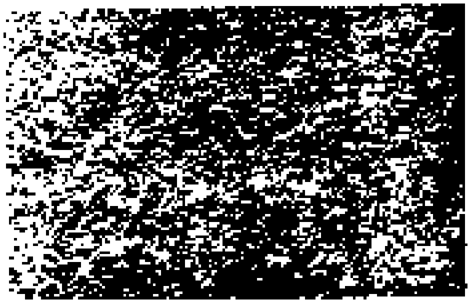
ح. مرشحات النايلون (66) (Nylon 66):

ولها درجات احتجاز مختلفة.

ط. المرشحات الزجاجية.

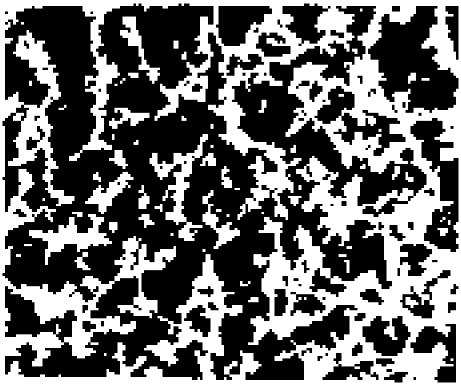
ي. مرشحات السليكونية.

ك. مرشحات البوليمر المشترك ستايرين داي فينل بنزين.

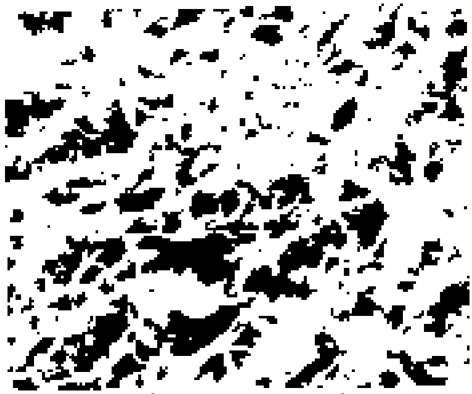


بولي سلفون

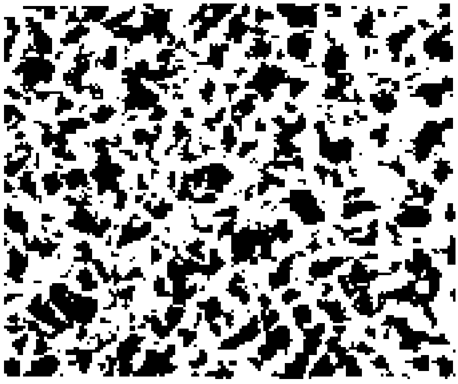
بولي كاربونيت



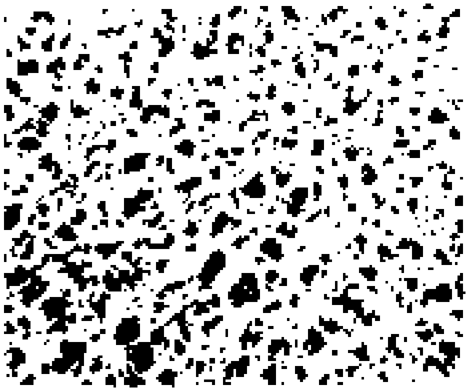
سليلوز



بولي فنيل ادنين داي فلورايد



نايلون



بولي بروبلين

أغشية مختلفة ذات مسامية (0.2) مليمايكرون

وجاءت هذه المرشحات في السنوات الماضية للوصول إلى مرشح لحجز البكتريا وأن يكون اقتصادي وأمني. وقد قاد العمل إلى استعمال طبقتين من الأغشية: فالغشاء الأول يحضن الغشاء الثاني. هذه العملية جعلت إمكانية اختزال البكتريا من (10^{9}) في (100) لتر إلى (1) في اللتر، هذا الترشيح المهم والسريع كان من استعمال نوعين من المرشحات أحدهما (0.2 + 0.8 مليمايكرون) أو باستعمال (0.65 + 0.2 مليمايكرون) وهناك من استعمل (0.2 + 0.2 مليمايكرون) وهذا العمل قاد الشركات والفنيين فيها من استعمال أغشية (بولي سلفون)، هذه الأغشية اعتياديا تستعمل الطبقة المزدوجة والمتماثلة والتي يكون فيها الجانب العلوي ما بين (10 – 20 مليمايكرون)، والجانب السفلي (0.1 مليمايكرون)، إن فائدة المسامية الكبيرة في الجانب العلوي هي للقياسات الأولية للمواد وللأحياء المجهرية وحجمها، فمثلا بكتريا (serratia mareesun) قطرها (0.4) مليمايكرون. أما السبورات (B. subtilis) وتقريبا (2 – 3) مليمايكرون.

والمهم في عملية الترشيح هو استمرارية معدل الجريان بالاعتماد على الضغط وعلى نوعية الوسط الغذائي (Substrate)، وهنالك من عمل مرشحات على درجتين من ضغط الترشيح.

الترشيح الأول تحت ضغط (1) بار لخمسة اللتر الأولى.

الترشيح الثاني يكون تحت ضغط (2) بار للأمتار الباقية.

لذا فالمرشحات تلعب دورا كبيرا في بعض المصانع البايوتكنولوجية، وأهم هذه الصناعات صناعة الكحولات، صناعة الخل، صناعة حامض الليمون...الخ. ففي

صناعة الكحولات يجب التخلص أو الحصول على (Biomass) من خميرة (Saccharomyces spp) وفي صناعة الخل يجب التخلص من (Acetobatter aceti) وفي صناعة حامض الليمون يجب التخلص من الـمايسليوم لـ(Aspergillus niger).

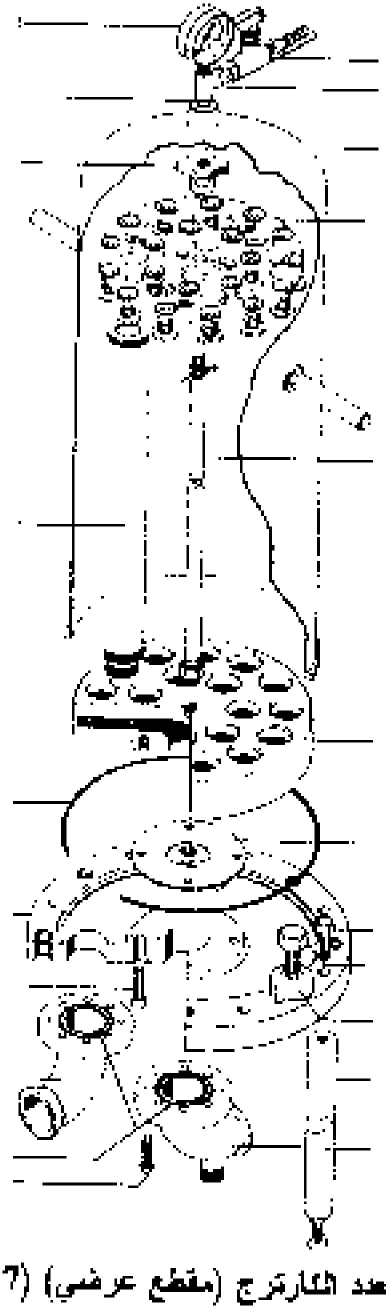
المرشحات المعملية البسيطة:

هذه المرشحات متوسطة الحجم يمكن الاستفادة منها في مصانع إنتاج المياه المعدنية أو العصائر أو المشروبات الغازية والتي تعتمد على الكارتريج المتكون من:-

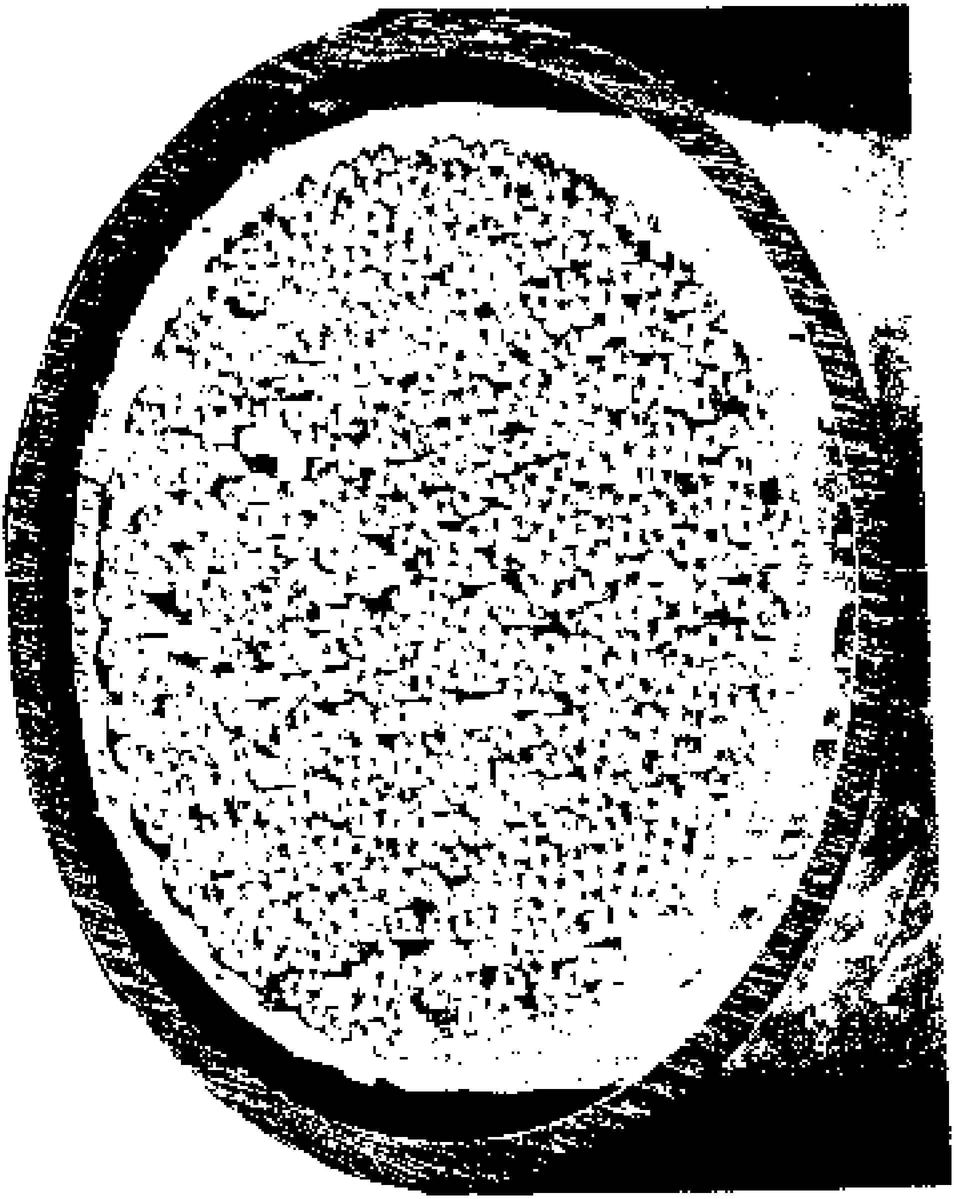
1. الطبقات المساندة (Support Layers).
2. القفص الحاجز (Cage).
3. القلب أو اللبة (Core).
4. القاعدة (Adaptors).

ويعتمد عدد الكارتريج في وحدة الفلتر ما بين (25- 30) بالاعتماد على سعة وطاقة المعمل، علما بأن الطبقات المساندة قد تصنع من البولستر بولي بروبلين أو بولستر بولي بروبلين أو (PVOF).

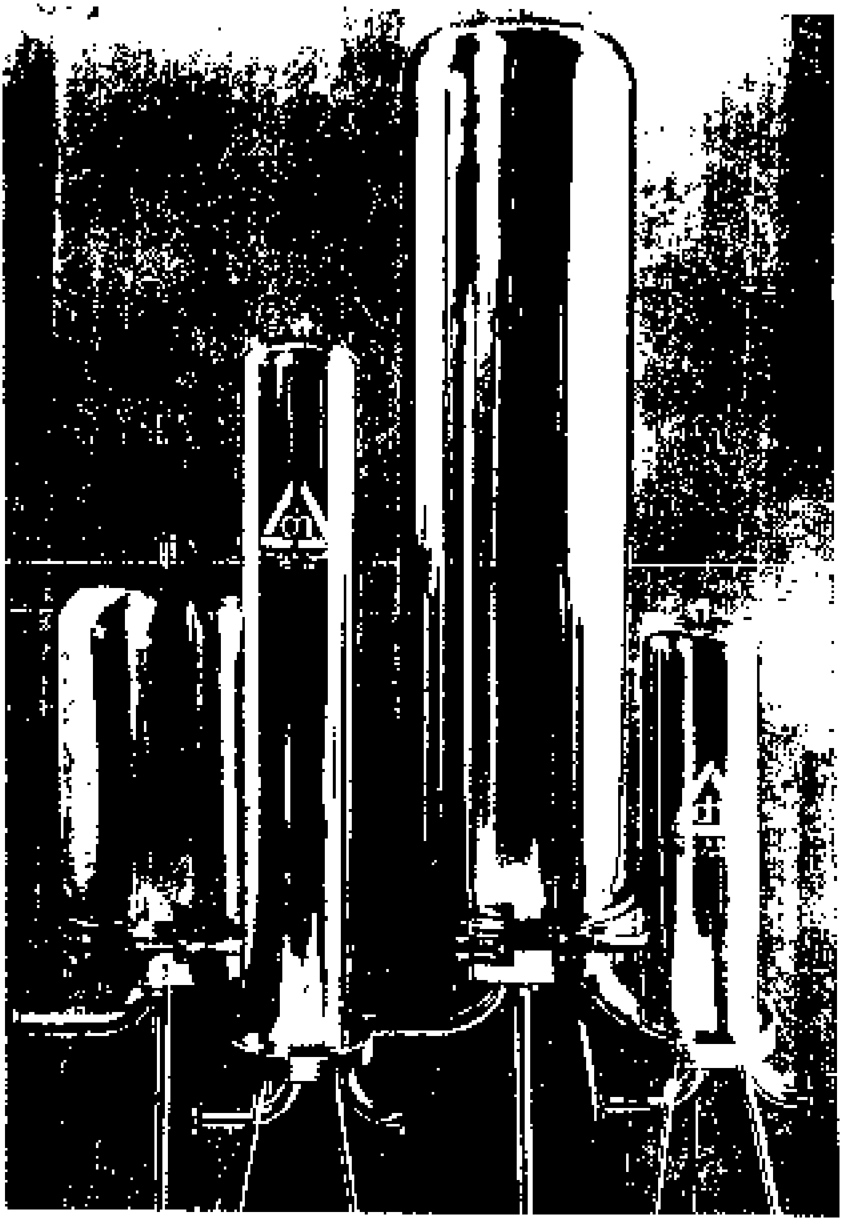
أما القفص الحاجز فيكون من البولي بروبلين، أما القلب أو اللبة من البولي بروبلين، أما القاعدة فتكون من بولسترين أو بولي بروبلين أو استينلس ستيل.



فلتر متعدد الكارترج (مقطع عرضي) (17 كارترج)



مقطع عرضي في كارترج



فلترات مختلفة الحجوم للتنقية والترشيح

وهنالك أنواع مختلفة من الكارترج تكون من الفخار علما بأن هذه الوحدات تحتاج إلى عملية صيانة لأن عمر الكارترج محدد كذلك عملية الغسيل والتنظيف والتعقيم المستمر.

المرشحات الصناعية:

1. (Filter Press) – المرشح الضاغط.
2. (Tubulan Filter) – المرشح الأنبوبي.
3. (Vertical Tank, V. Leaf Filter) – المرشح ذو الخزان العمودي.
4. (Horizontal Tank V. Leaf Filter) – المرشح ذو الخزان الأفقي.
5. (Rotating Leaf Filters) – المرشح الدوار.
6. (Horizontal Leaf Filters) – المرشح ذو الفلاتر الأفقية.
7. (Special Filter) –المرشح الخاص.
8. (Ultra Filter) – المرشح الفائق.
9. (Vacuum Filter) – المرشح تحت التكوم (التفريغ).

كل هذه الفلاتر تعمل على النسيج الفلتري المتنوع وعلى المسامية المختلفة كما أنها تتميز باحتياجات الصناعات المختلفة في كفاءة الترشيح علما بأن بعضها يحتاج إلى مواد مساعدة للترشيح (Filter aid)، كالسلايت أو البرلايت...الخ. من مواد الترشيح المساعدة لكي نضمن ترشيح فائق وناجح.

كما أن تصميم هذه الفلاتر يعتمد على عدم انسداد أنسجة الترشيح فهناك إما نظام اهتزازي لمنع تراكم المواد المترسبة أو هناك قاشطة معينة أو هناك تبديل سريع لأغشية الترشيح كما في (Filter Press)، كما أن المرشح الدوار الذي يعتمد على عملية الدوران لمنع تراكم الرواسب فوق بعضها.

فالفلتر بريس مثلا يستعمل في كثير من الصناعات (الغذائية والكيماوية) لسهولة عمله إضافة إلى أن هنالك حجوم مختلفة من هذا النوع يعتمد على نوعية المواد المترشحة. فصناعة المياه المعدنية، صناعة المشروبات الغازية، صناعة الدبس، صناعة الخل، صناعة الكحول والزيوت...الخ تحتاج إلى مثل هذا النوع من الفلاتر.

أما النوع (الفلتر الأنبوبي) (Tubular Filter) فهذا النوع من المرشحات يعتمد على الأنابيب الثابتة والقائمة وأنابيب مرنة ومادة السلايت تكون في الأنابيب الصلدة من أجل تكوين معقد يسهل الترسيب على هذه المواد المساعدة للترشيح وتكون قابلية هذه المادة من تغطية (11 – 13كغم)مادة مساعدة للترشيح لكل (100م2) مساحة بعد ضغط الفلتر لكي يصل إلى الطاقة القصوى التي تجرى من خلال الأنابيب لعمل الملاط (Slurry) ومن ثم ترسيبه على الأغشية.

أما النوع(Vertical Tank,V.L.F.) الخزان عمودي والفلاتر أفقية فهو مصمم لتصريف المواد الرطبة والجافة وحيث هنالك إمكانية لطرح الرواسب خارجا بفتح من داخل الفلاتر بواسطة فتح الأبواب الخاصة والسريعة. لهذا ليس هنالك أي انسداد للأغشية الفلترية بسبب التذبذب أو الاهتزازية ولأجل هذا فهذا النوع يكون تصميم الخزان والفلاتر بشكل عمودي.

أما النوع الآخر فهو (Horizontal Tank – vertical Leaf filter) وهذا يعني أن الخزان يكون افقي والفلاتر فيه تكون عمودية ويكون هذا النوع من الفلاتر ذو كفاءة عالية وذلك بدخول المادة من خلال الفلاتر العمودية والتي تصب في النهاية في الأنبوب النهائي بعد عملية الترشيح والمواد المرشحة Cake فإنها تصرف خارجا من خلال فتحة التصريف.

النوع الفلتر الدوراني: (Rotating Leaf Filter) وهذا النوع من الفلاتر يستعمل كثيرا في بعض الصناعات والذي يعتمد في الأساس أن تكون الفلاتر أفقية تدخل المادة من فتحة (المدخل) والتي ترتفع في الفلاتر وبعدها تخرج بعد عملية (الفلترة) من فتحة الخروج والمواد المترسبة تكشط لتخرج من فتحة التصريف.

الفلتر الدوراني مع الموزع الرئيس:
(Rotating Filter with Mainfold Deak)
هذا النوع من الفلاتر يعتمد بالأساس على توزيع المادة المراد ترشيحها من خلال موزعات في أعلى الفلاتر بشكل منتظم. والفلاتر بحركتها الدائرية توزع المادة على الفلاتر لأجل تنقية المادة المراد ترشيحها والتي تخرج من خلال الأنبوب الوسطي. أما ال(cake) فتخرج من فتحة في أسفل الخزان.

الفلتر الدوراني تحت الفاكيوم **(Rotating Filter under vacuum):**
هذا المرشح يعتمد بالأساس على سحب المواد المراد ترشيحها إلى الداخل بواسطة الأنابيب التي تكون معلقة بفلتر جامع وبنتيجة الفاكيوم ستترسب المواد على

الفلتر والمادة المراد ترشيحها تنفذ إلى الأنابيب التي تجمع في أنبوب رئيســـس إلـــى الخارج. علما بأن سكينة القشط تستمر نتيجة دوران الدولاب.

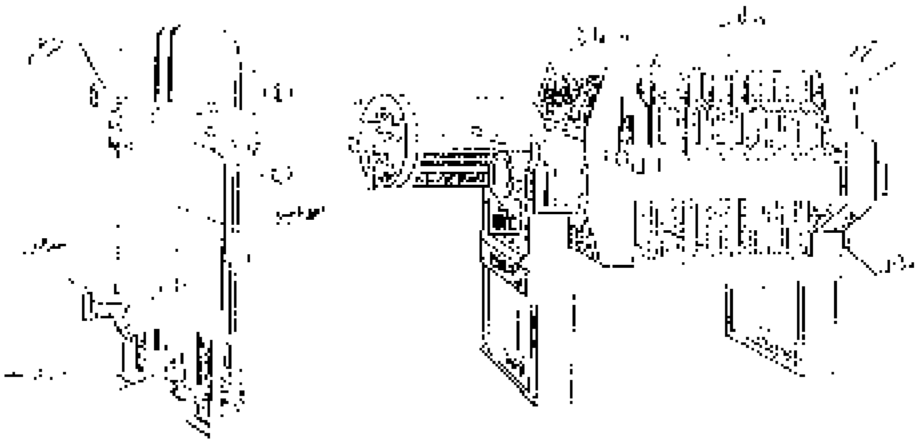
(Ultra Filter):

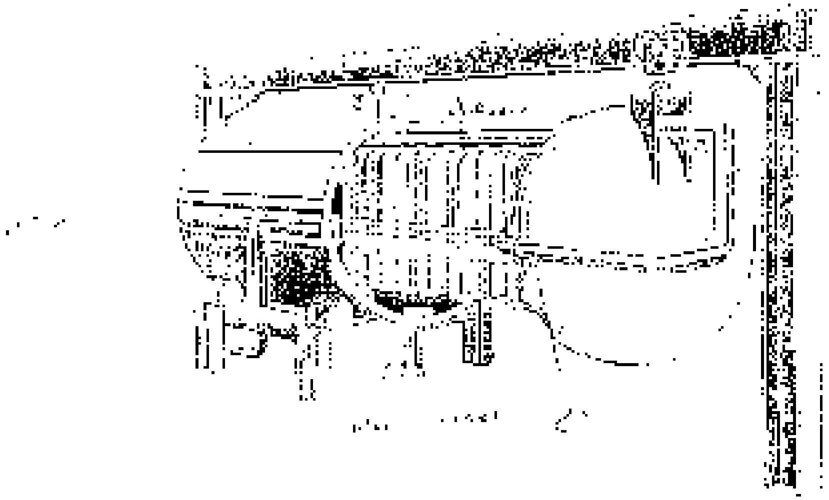
وهو أيضا يعتمد على الفلاتر المتنوعة ولكن سرعة الترشيح تكون عالية.

(Special Filter):

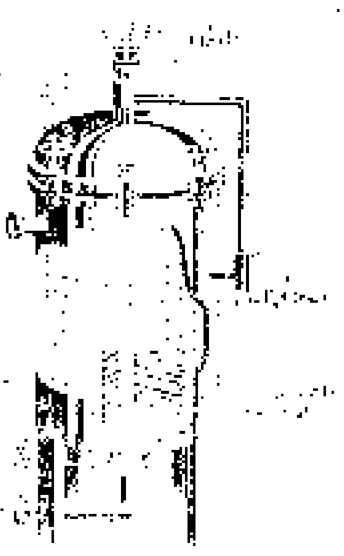
هذا النوع يكون مخصص لبعض الأغــــراض الصناعيـــة المتخصصـــة وذات الاحتياجات المختلفة ووفق مواصفات مطلوبة.

فلتر هواء (Air Filter)

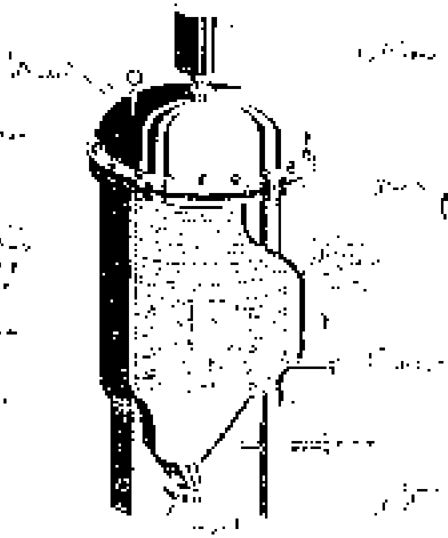




خزان أفقي مع فلتر عمودي

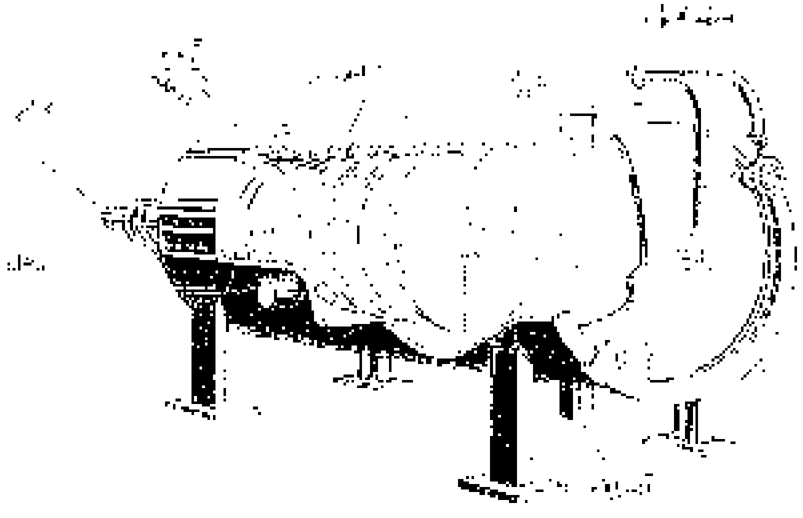


الفلتر الأفقي

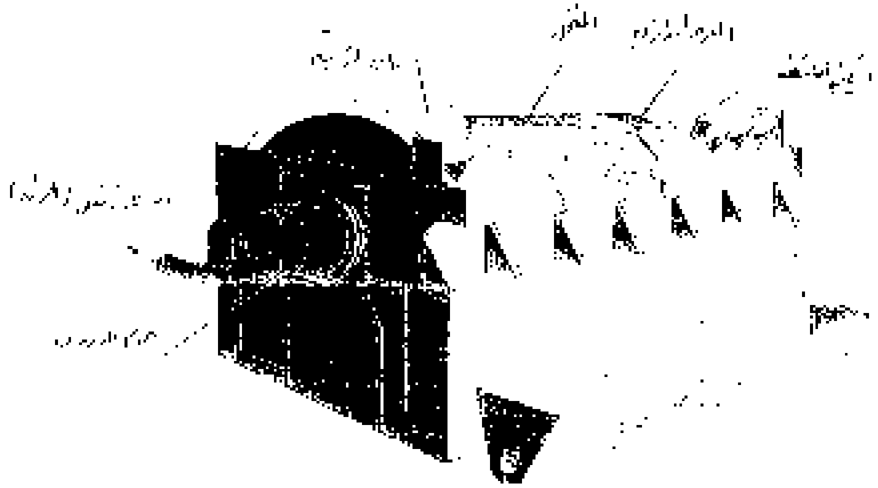


الفلتر الدوراني (طرد مركزي)

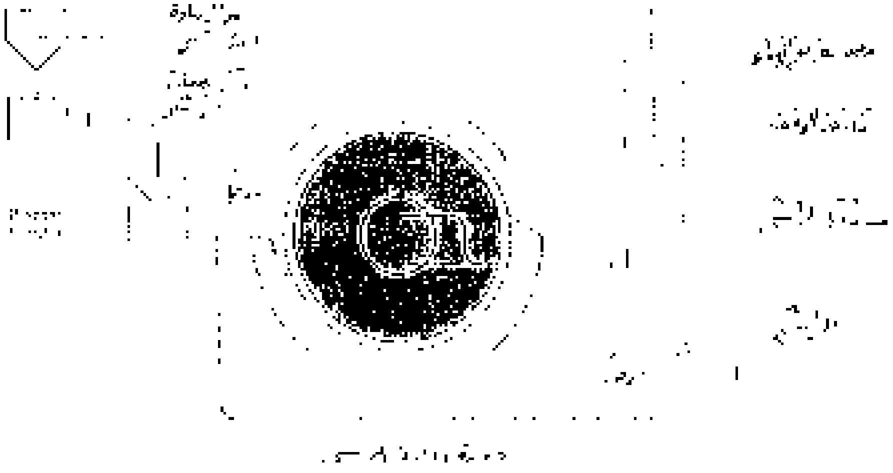
الفلتر العمودي



الفلتر الدوراني مع موزع

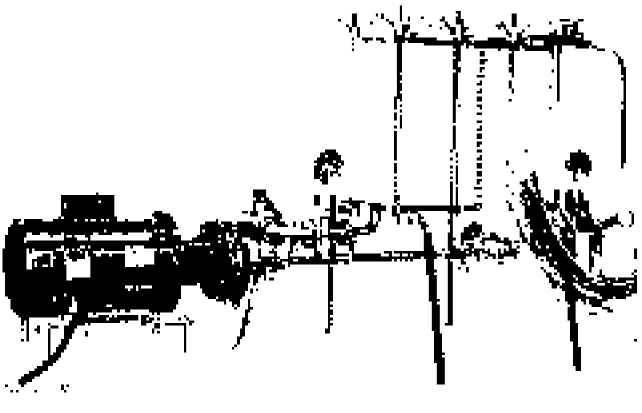


الفلتر الدوراني تحت الفاكيوم

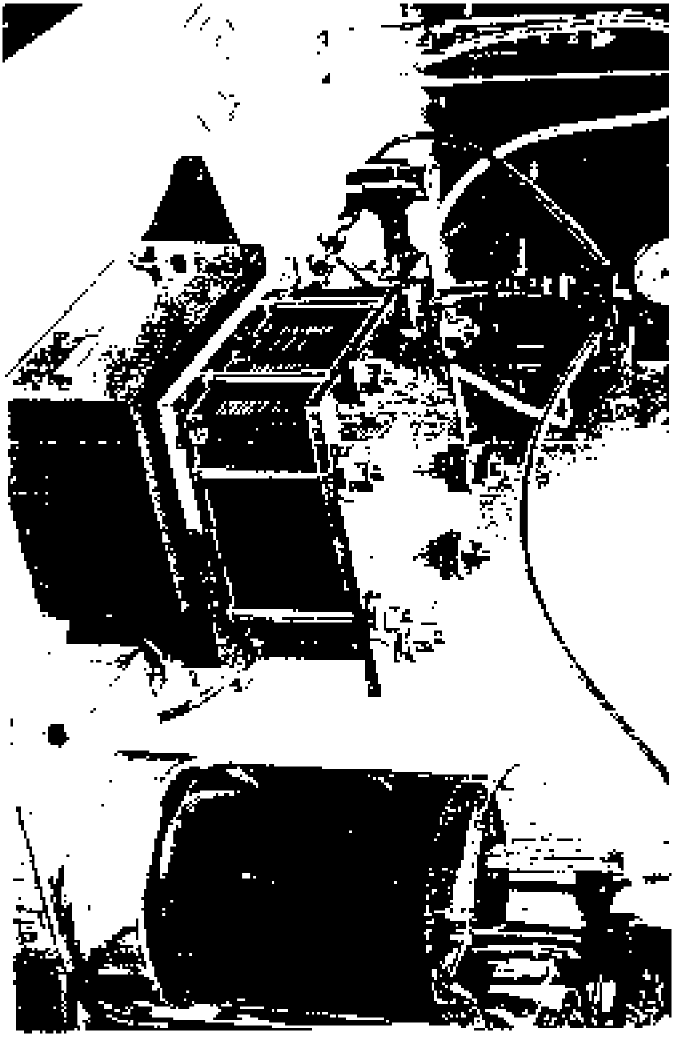


مخطط للفلتر الدوراني تحت الفاكيوم (Rotary vacuum precoat Filter)

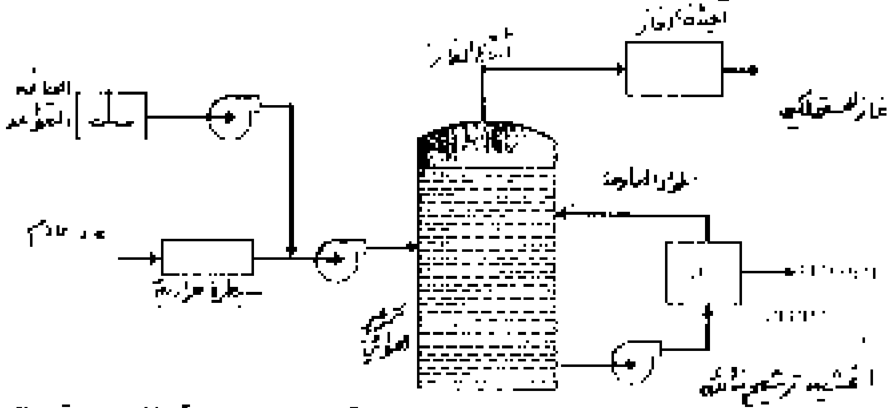
نوع متقدم من فلاتر الفائقة الترشيح (Ultra Filtration)



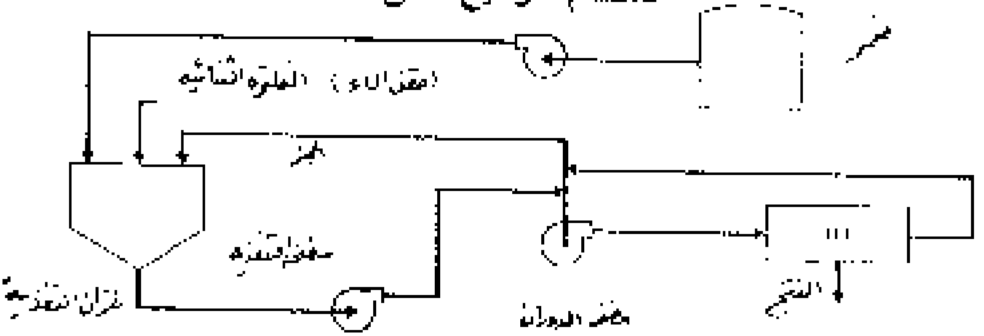
فلتر فائق الترشيح مع مضخة (Ultra Filtration with pump)



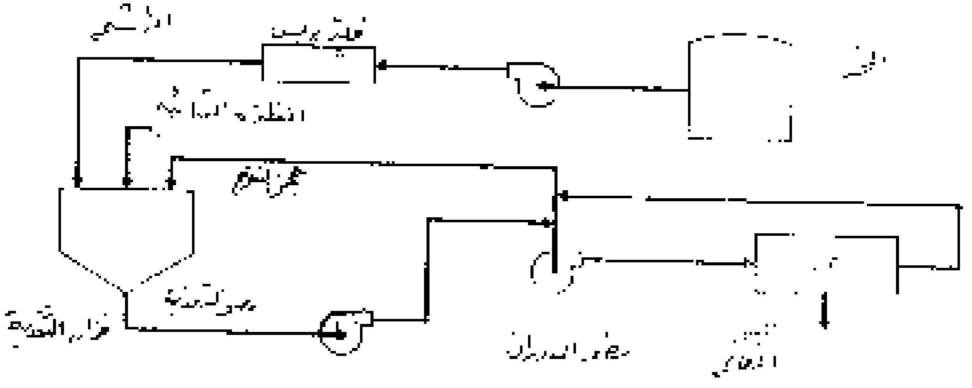
الفلاتر الخاصة (Special Filters)



مخطط لإحدى معامل معاملة المياه العادمة اللاهوائية والتي :MRS Process تستخدم الترشيح الفائق



مخطط لتنقية بيئة التخمير ويبين فيها وحدة الترشيح U/F



مخطط لتنقية وتركيز بروتين الخلية الواحدة وتبين فيها وحدة الترشيح الفائق U/F

الترشيح والتنقية بواسطة قوى الطرد المركزية:

:(Filtration and Classification by Decantation or Separation)

استعمل هذا النوع من الترشيح والتنقية في مصانع الحليب ومصانع الكحول وانتشرت بهذا النوع من تقنيات الترشيح والتنقية إلى المجالات الأخرى المتعددة ومنها البايوتكنولوجي حيث يمكن بهذه التقنيات الحصول على الكتل الحيوية (Biomass) لكثير من عمليات التصنيع البيوتكنولوجي كالحصول على خمائر الخبز (Saccharomyces spp) أو خمائر العلف (Rhodoturla spp) أو (Candida spp.) حيث تجرى عملية الفصل عند سرع معينة بالاعتماد على فروق الكثافات بين سائل الترشيح وكتل الأحياء وبعدها تجرى عملية الغسل ثم الإعادة مرة أخرى لفصلها.

أما المجالات الأخرى فيمكن أيضا فصل الراشح من عملية التخمير لإنتاج حامض الليمون أو أي حامض آخر حيث يفصل الراشح وبعد ذلك تقسم عملية الترسيب والفصل والتبلورة.

أنواع الفرازات أو الديكانترات:-

1. ديكانتر الأفقي.
2. ديكانتر العمودي (centerfuge).
3. سنترفيوج ذو القرص.

ديكانتر

سنترفيوج

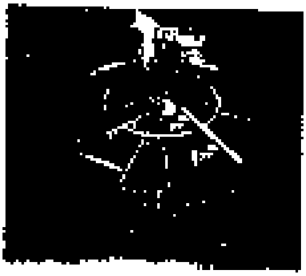
سنترفيوج مع قرص رذاذي

الفلتر القرصي

فلتر الأنطقة

فلتر الأسطواني الدائري

فلتر بلاستيكي



فلتر أفقي

وهنا لا بد لنا من الإشارة أن كل هذه الوحدات التي ذكرت لا بد مـــن ديمومـــة التطهير والتعقيم بمواد التطهير وعموما فإن أكثر المصانع تستعمل الكلور، اليـــود، الكحول، الأوزون، بيروكسيد الهيدروجين...الخ، علما بأن المطهر يجب أن يتوفـــر فيه الأمور التالية:-

1. أن يكون بطيء التحلل.
2. أن لا تكون له رائحة ومذاق كريهين.
3. أن لا يؤثر في الأجهزة المراد تطهيرها.
4. أن لا يتفاعل مع مواد الأجهزة.
5. سريع التعقيم والتطهير.
6. ليس له آثار سامة.
7. ليس هنالك خطر عند تجاوز الكمية المحدودة.
8. سهولة القضاء على الأحياء المجهرية.

الفصل الثامن

تقنية إنتاج البروتين من الأحياء المجهرية (الخمائر)

Single Cell Protein Technology

تقنية إنتاج البروتين من الأحياء المجهرية (الخمائر)
(Single Cell Protein Technology)

إنتاج بروتين الخلية الواحدة:

تشير الإحصائيات والوقائع إلى أن نصف سكان العالم يعانون من مشكلة نقص الغذاء، إلا أن هذه المشكلة ستصبح من أخطر المشاكل في المستقبل القريب فسيبلغ سكان العالم في نهاية هذا القرن إلى (6000) مليون نسمة، أما احتياجات السكان من البروتين الحيواني فستبلغ (85) مليون طن عام (2000)، فالنقص كبير وواضح.

وإن توفير احتياجات البشر من البروتين الحيواني بالقدر الذي يتناسب مع ضرورة ملاحظة التزايد الضخم في عدد السكان يعتبر أملا بعيد المنال بل ومستحيلا فإن احتمالات تحقيق خطط تنمية الإنتاج الزراعي والحيواني في عالمنا هذا المضطرب هي احتمالات لا يمكن أن تكون ذات أثر فعال. ومن ثم لا بد من الالتجاء إلى وسائل أخرى لا تصطدم بمثل الصعوبات والعوائق التي تصطدم بها الوسائل التقليدية لتنمية الإنتاج الزراعي والحيواني. أما تلك الوسائل فتمكن في مقدرة بعض الكائنات الحية الدقيقة على النمو والتكاثر وبالتالي إنتاج البروتين وذلك بسرعة وكفاءة عاليتين.

الخميرة كمصدر للبروتين:

في أحقاب متعاقبة من الزمن توصل علماء المايكروبيولوجيا إلى إنتاج عديد من أنواع الخمائر على نطاق صناعي كمصدر للبروتين.

وقد برزت إمكانية تنمية الخميرة للاستهلاك المباشر كغذاء سنة(1910) من قبل (Delbruck) ومساعديه وقد نجح في ذلك بعد (20) سنة من اكتشاف باستور للغموض الذي كان يكتنف تخمر الخلية الحية للخميرة. ولعل خميرة البيرة التي تسمى علميا ب(saccharomyces cerviceae) هي أول ما استخدم من أنواع الخمائر لإنتاج البروتين على نطاق صناعي وذلك لأنها أساس صناعة البيرة وصناعة الكحول من زمن بعيد. ففي الحرب العالمية الأولى أنقصت ألمانيا نتاج البيرة إلى نحو(60%) من إنتاج ما قبل الحرب وذلك للتفرغ لإنتاج الخميرة واستغلالها كغذاء.

وفي نفس الوقت أدى نقص الحبوب خلال الحرب إلى إدخال المولاس كنواتج عرضي من صناعة السكر الذي يعتبر غني بالفوسفات والأمونيا لتكوين بيئة صالحة للنمو.

بعد ذلك ساعد (Hayduck) سنة(1919) في توضيح أهمية إضافة المغذيات في خطوات الصناعة مع زيادة عدد الخميرة وهذه المعلومات أحدثت انقلاب في صناعة الخمائر المغذية.

وفي الحرب العالمية الثانية اقامت بريطانيا مصنعا في جامايكا لإنتاج الخميرة في سبيل تموين الجيوش المحاربة وسد حاجة المدنيين، وحذت الولايات المتحدة حذوها فأقامت مصنعا في سانت لويس بولاية ميسوري لنفس الغرض وذلك بتنمية الخميرة المعروفة حاليا باسم (Candida utilis) .

أما أحسن خميرة جافة صنعت كانت في استراليا في بداية سنة(1940).

أما فكرة الاستفادة من فضلات معامل الورق لإنتاج الخميرة الغذائية فكانت من قبل العلماء (Oflechner Sihmidt Fink 1947-1941)، مشتغلين آخرين اقترحوا استعمال قشور الموز و الموالح و الخشب المتحلل وفضلات سوائل السلفايت من مصانع الورق كمصادر للكاربوهيدرات، كذلك البرافينات من الزيوت النفطية كمصادر للهيدروكاربون لإنتاج الخميرة الغذائية.

ومن العوامل التي شجعت للاتجاه لإنتاج البروتين من الأحياء الدقيقة إضافة إلى ما سبق هو ما يلي:-

1. يمكن تنميتها بكميات كبيرة: مثال على ذلك، فالبقرة التي تزن(500) كغم تعطي كغم من اللحم يوميا عند تغذيتها تغذية جيدة بينما تعطي الخميرة بنفس الوزن من تنميتها تحت نفس الظروف المناسبة(50)طنا وذلك مع تشابه النوعين وتفوقهما بطبيعة تركيبهما الكيماوي على البروتين النباتي الفقير.
2. سرعتها الكبيرة على النمو: من المثال السابق يتبين أن سرعة إنتاج البروتين الميكروبي تصل إلى(100.000) ضعف عن إنتاج البروتين الحيواني.

3. كفاءتها العالية في تحويل المواد الخام ذات قيمة حيوية عالية (Biomass).
4. لها القابلية على استخدام أنواع كثيرة من المصادر الرخيصة والتي يعتبر قسم منها كفضلات معامل.
5. إنتاجها لا يحتاج إلى مساحات كبيرة ولا يعتمد على الظروف الجوية.

أنواع الخمائر المستعملة:

النظرة الحديثة لهذا الموضوع تأخذ في الاعتبار عدد من العوامل في اختيار الخميرة الغذائية، وهي: -

1. يجب أن تكون ذات قيمة غذائية عالية.
2. ذات نكهة مقبولة.
3. قابليتها (المزروعة) على الثبات وقيامها بفعالياتها الحيوية.
4. قابليتها على التمثيل النسبي العالي لعدد كبير من المصادر المحتوية على الكاربون والنيتروجين.
5. قابليتها على النمو بسرعة وإنتاجها الكبير.
6. سهولة إزالة المواد الغير مرغوبة وإكسابها مظهر جيد

ومن الطبيعي أن يوجد عدد كبير من الخمائر الصالحة لهذه الصناعة بصورة عامة.

الخميرة الغذائية التي تسوق، وتشمل ثلاث أنواع من جنس (Saccharomyces) ونوعين من جنس (Candida). ويقع تحت جنس (Saccharomyces) ما يلي: -

أ- **(S. Caelcbergenis)**:- تستخلص من البيرة.

ب- **(S. Carvisiae)**:- السلالات المترسبة بعد نموها على المولاس.

جـ **(Candida feragilis)**:- تزرع على شرش الجبن.

أما تحت جنس **(Candida)** فتقع الأنواع التالية:-

أ- **(Candida utilis)**: تتكاثر على السوائل المكبرتة الخارجة من معامل الورق.

ب- **(Candida tropicales)**: تعامل كما تعامل (utilis) في بعض معامل الخميرة، وقد اشتهرت (utilis) على نطاق تجاري في هذه الصناعة حيث عرفت بخميرة (Toryla yeast) وغالبا ما تدعى بـ(Torulepsis). وقد دربت أنواع أخرى من الخمائر الواقعة تحت جنس (Candida) مثل (C. Arbora) و (C. Pulcherima) و (C. Reukaufii).

بالنسبة للنوع (C. utilis) توجد عدد من السلالات وأحدها المعروف ب(C. utilis major) تنتج خلايا كبيرة والآخـــر (C. utilis thermophilis). وهي تنمو في درجات حرارة عالية أكثر من غيرها من الخمـــائر، تنمـو بحـدود (36-39م).

صفات الخميرة الغذائية:

أ. **الصفات البيولوجية:** كما ذكرت سابقا توجد (ة) أنواع من الخمائر والجـــدول التالي يبين الاختلافات في صفات النمو للمزارع المستعملة لإنتــاج الخميـرة الغذائية يمكنه أن يقارن فيما بينها:-

Nutrient	S cervisiae	S carlsthgbnsis	Sfragilis cutlis	C. tropicalis
Glucose	-	−	+	+
Galactose	+	−	+	±
Sucrose	+	-	+	-
Lactose	+	- +	-	-
Xylose	-	- -	+	−
Kno3	-	- -	-	-
Ethanal	+	- −	±	-
Maltose	+	+	−	+
Avarage size	(5×9)	(7×9) (4×6)	(4×7)	(7×9)

حيث + – تشير إلى التمثيل (النمو).

(±) – تشير إلى ضعيفة النمو.

– – تشير إلى أنه لا يحدث نمو.

من هذا الجدول يمكن ان نعرف أن خميرة الثورلا هي أحسن الأنواع ولكن من جهة أخرى أن جميع هذه الخمائر بصورة لها القابلية على الاستفادة من الأمونيا، اليوريا وبعض الأحماض الأمينية، ويمكنها أن تصنع مجموعات فيتامين (B)، تمتص كثير من الفيتامينات وتتكاثر خضريا بصورة جيدة هوائيا وعلى حرارة (30م) لكي تنتج تقريبا (50غم) من الخلايا الجافة لكل (100غم) جلوكوز، وقد امتازت (C. U.) عن بقية الخمائر بما يلي:-

1. لأنها تهاجم أكثر مركبات الكربون والهيدروجين تتضمن المركبات الموجودة في الجدول إضافة إلى (aceto acetate) الفيوماريك حامض السكسونيك وهي لذلك قادرة على أن تستفيد من الهكسوز والبنتوز.

2. تعيش في البيئات التي تقل فيها نسبة النتروجين الذي تحتاجه للنمو ويمكن أن يعوض ذلك بتنميتها على اليوريا والنتريت. من هذه الخاصية يمكننا أن نستفيد من فضلات مصانع الورق بتنمية الخميرة عليها وهذه من أهم خواصها.

3. تختلف عن باقي الخمائر بتصنيعها (Biotin).

ب. **التركيب:** الاختلاف في المادة الأولية وظروف الإنتاج والتلوث تؤثر على تركيب الخميرة. طبيعة بيئة النمو ودرجة التهوية من العوامل الرئيسية التي تؤثر على تركيب الخميرة والخميرة تتضمن المحتويات التالية بعد إنتاجها:

Compund	**Fodder yeast Composition Percent**
Moisture	7 – 40
Raw protein	45 – 54
Nitrogen – free eataoc	23 – 30
Ash	6 – 8
P_2O_5	2 – 4
VitB1 / loog	6000 – 10 – 000 – I U.
VitB2 camplex / loog	800 – 1001 – U.
Nicontc acid	40 – 5 omg %
Glutathien	400 – 600 mg %
Raw fat	2 – 4

تحليل بروتين الخميرة نوعيته وأهميته:-

1. حوالي نصف الوزن الجاف للخميرة هو بروتين حقيقي (Nx6.25) يحتوي (80%) أحماض أمينية (13%)، أحماض نووية (8%) أمونيا.

2. مكونات الأحماض الأمينية الأساسية للخميرة الغذائية التجارية في النوعين التاليين:-

أ. (S. Carvisiae) من المولاس.

ب. (C. utilis): من النواتج العرضية لمعامل الورق وهي كالآتي:-

A.A	S. Ceviae	C. utilis
Lysine	8.2	6.7
Valine	5.5	6.3
Leucine	7.9	7.0
Lsoleicine	5.5	5.3
Threonine	4.8	5.5
Methionine	2.5	1.2
Phenylanine	4.5	4.3
Trytophane	1.2	1.2
Cystophane	1.6	0.7
Histidine	4.0	1.9
Tryto-sine	5.0	3.3
Argine	5.0	5.4

3. من الجدول يتبين أن بروتين الخميرة الغذائية يتميز بوفرة حامض (Trypto phane, lysine).

4. يتميز بروتين الخميرة بسهولة هضمه وقيمته الحيوية الغذائية تصل إلى (87%) مقارنة بالمركبات المكونة لمعظم بيض الدجاج الذي يساوي (96-97%).

5. القيمة الحقيقية للخمائر المغذية هو كمكمل وليس كبديل للأغذية الأخرى.

6. إضافة (42.524) غم من الخمائر المغذية في خبز اللوف سوف يعطي إضافة للغذاء قيمتها تكافئ إضافة (2.5) بيضة لنفس الخبز.

7. الخمائر المغذية أصبحت كذلك مصدر جيد لفيتامين (B).

8. عندما يجهز بروتين الخميرة بحامض (Methionine)، تكون الاستفادة من البروتين تساوي كفاءة الاستفادة من بروتين الكازين.

9. بروتين الخميرة ثبت أنه يفوق بروتين الحبوب من ناحية القيمة الغذائية ولكن قيمته البيولوجية للبروتين الميكروبي لا تقع في نفس مستوى البروتين الحيواني حيث أنه غني في اللايسين والتربتوفان كما سبق القول، غير انه فقير في الأحماض الأمينية الأخرى الحاملة للكبريت مثل الميثايونين والسستين. ومع كل ذلك فهو يفضل بكثير على بروتين الحبوب الفقيرة غالباً لمعظم الأحماض الأمينية الأساسية.

والجدول التالي يبين مكونات البروتين لبعض المصادر الغذائية مقارنة مع بروتين الخميرة الغذائية نوع تورلا وخميرة ناتجة من التخمير بارافينات البترول:-

المكونات	دقيق القمح	مسحوق اللحم	لبن الأبقار	خميرة التوريلا ناتجة عن التخمر السكريات	خميرة ناتجة من تخمير برافينات البترول
بروتين على أساس الوزن الجاف	13.2	59.4	33.1	44.4	43.6
الأحماض الأمينية الأساسية %					
ليوسين	7.5	8.0	11.0	7.6	7.0
أيزوليوسين	4.3	6.0	7.8	5.5	7.05
فالين	4.1	5.5	74.5	6.0	8.4
ثريونين	5.7	5.0	4.7	5.4	9.1
سستين	1.9	1.20	1.0	1.0	1.0
ليسين	1.9	10.0	8.7	6.8	11.6
ارجنين	4.2	7.7	4.3	4.1	8.0
هستدين	2.2	3.3	2.6	1.7	8.1
فينيل ألانين	5.5	5.0	5.5	3.9	7.9
تربتوفان	0.8	1.4	1.5	1.6	1.2
ميثايونين	1.5	3.2	3.2	1.8	1.2

العوامل التي تؤثر على اختيار طريقة التصنيع:

من الطبيعي أن يختلف كل نوع من أنواع الخمائر عن الأخر من حيث الاحتياجات الغذائية والحرارة المثلى والظروف البيئية الأخرى ثم معدل النمو للمحصول الناتج وحجم الخلايا وكثافتها، وكذلك مقارنتها للانحلال الذاتي ودرجة ثباتها للصفات المزرعية وتحليلها للمواد المثبطة إلى غير ذلك مما يؤثر في اقتصاديات الإنتاج.

وقد لخص (Tamneo baum) سنة (1971) العوامل الرئيسية التي بموجبها يمكن اختيار أي طريقة يمكن استعمالها:-

1. **العوامل التصنيعية والتجارية:**

أ. إنتاج البروتين لكل وحدة من المادة الخام المنماة عليها الخميرة.

ب. تكاليف المصادر الكربوهيدراتية.

ج. تكاليف المصادر المغذية الأخرى: مثل المعادن، الفيتامينات والعناصر الأساسية.

د. تكاليف التعقيم.

ه. تكاليف إزالة المواد الغير مرغوبة من الخمائر.

2. **العوامل الغذائية:-**

أ. الأحماض الأمينية الأساسية.

ب. قابلية البروتين للهضم.

ج. تأثير المواد الخارجية على الخلية.

ه. جدار الخلية – الأحماض – النووية – وغيرها من مكونات البروتين.

3. العوامل الغذائية في التصنيع:–

مثل النكهة – التركيب – قابليتها على الذوبان – اللون – إمكانية تحسين تصنيعها بحيث تعطي نوعية جيدة.

أ. المواد الخام المستعملة:

ويقصد بعوامل التصنيع ظروف ومتطلبات النمو للخميرة الغذائية وهي تشمل ما يلي:– المادة الأولية (Raw material):–

يمكن أن نمد حاجة الخميرة من المواد الأولية العضوية تزويدها بمصدر الكربون والهيدروجين والأوكسجين وذلك من ثلاثة مصادر هي:–

1. المواد الكربوهيدراتية (Carbohydrate).
2. الهيدروكربونات (Hydrocarbon).
3. المواد السليلوزية (Cellulose).

المواد الكربوهيدراتية:

تعتبر الكربوهيدرات المصدر العضوي الرئيس لتجهيز الخميرة بالعناصر (C.H.O.)، ويعتبر هذا المصدر رخيص جدا لأنه يكون ناتج ثانوي لبعض الصناعات مثل المولاس الناتج من صناعة السكر (معامل البنجر السكري) كذلك يمكن أن يعتبر السائل الناتج من طبخ المواد السليلوزية مع كبريتيد الصوديوم من معامل الورق هو أهم مصدر للكربوهيدرات لتوفره بكميات كبيرة.

إضافة إلى ذلك فهناك شرش الجبن وحديثا تم الاتجاه إلى التمر وذلك لوفرة إنتاجه ولاحتوائه على نسبة السكر اللازمة لنمو الخميرة حيث يحتوي على (70%) من وزن التمر سكر محلول في الجزء الطري منها لذلك يمكن أن يستفاد من كميات التمر الزائدة أو الغير صالحة لتغذية الإنسان والحيوان في إنتاج البروتين للخميرة وكما ذكرنا سابقا فقد اقترح بعض العلماء استعمال قشور الموز وقشور الموالح بعد عصرها لإنتاج الخميرة الغذائية.

من المهم أن نذكر أنه يجب أن تسبق استعمال المواد الأولية معاملات خاصة بنوع المادة الأولية المستعملة فمثلا المولاس المستعمل سواء من قصب السكر أو البنجر فإنه يجب أن تجرى عليه عمليات تنقية ومزج وتخفيف لكي يصبح جاهز للاستعمال.

أما السوائل الناتجة من معامل الورق يجب أن يتخلص من ثاني أكسيد الكبريت الموجود فيه بكميات كبيرة بواسطة التهوية، أو (Stripping) ومعاملتها باللايم (Lime) فيصبح السائل المعامل بهذه الطريقة جاهز للاستعمال ومناسب بدرجة كبيرة لنمو الخميرة عليه أكثر من غيرها. بهذا يتفادى التلوث الحاصل خلال الإنتاج. أما التمر فيجب أن يعمل على شكل عجينة ثم تتخلص من النوى بإمرارها على مناخل ذات أقطار تصف سنتمايكرون فتكون العجينة جاهزة للاستعمال. وهذه العمليات قد تكون ضرورية لكي يتم الحصول على السكر وإزالة الزيادة في الأيونات والمواد السامة لكي يضبط (pH).

الهيدروكربونات:

لقد تبين حديثا وبالذات في منتصف الخمسينات أنه يمكن تنمية بعض الخمــــائر مختبريا على بعض مشتقات البترول المحتوية على نسبة عالية من البارفينات وذلــك بعد أن شوهد نمو أنواع مختلفة من الميكروبات في خزانات البترول وفـــي الـترب المشبعة بالزيت وحتى تحت سطوح البيتومينية، وقد ازداد الاهتمام بذلك لموضـــوع وقد أجريت أبحاث عديدة في فرنسا و إنجلترا واليابان على النطاق العملي والنصـــف الصناعي وانتهت بنجاح ملحوظ.

المواد السليلوزية:

أمكن تنمية الخمائر المغذية على فضلات الخشب بعد تحليلها تحليـــلا مـــائي أو أنزيمي وهي موجودة في بعض دول العالم.

ب. المواد الكيماوية المضافة:

كمية المواد الغير عضوية المغذية يجب أن تضاف اعتمادا على المادة الأوليـــة التي سوف تنمى عليها الخميرة، مثال على ذلك المولاس (البنجر/ قصب الســـكر)، عادة غني بالبوتاسيوم وفقير نوعا ما بالنتروجين والفسفور ولكن السائل الناتج عـــن مصانع الورق يكون فقير من العناصر الثلاثة السابقة والتي يحتاجها بكميات كبيرة. لذلك يجب أن تضاف المغذية اللاعضوية إلى المادة الأولية لكي تجـــهز الخميرة بالمواد الغذائية اللازمة لنموها فيضاف:

1. النتروجين:

المصدر الاعتيادي للنتروجين لتحضير الخميرة الغذائية هو الأمونيـا وأمـلاح الأمونيا مثل كبريتات الأمونيا كذلك الأحماض الأمينية من التحليل المائي للحبـوب وذلك لتجهيز النتروجين القابل للتمثيل ويستعمل تجاريا اليوريا في الـهند وأمريكـا الجنوبية حيث تضاف إلى المولاس المتخمر.

2. الفسفور:

يستعمل حامض الفسفوريك وفوسفات الأمونيـوم أو البوتاسـيوم وهـي المصـادر الرئيسية للفسفور وقد استعمل السوبر فوسفات بنجاح في الولايات المتحدة.

3. مغذيات أخرى:

كلوريد البوتاسيوم كبريتات المغنيسيوم أو كلوريد المغنيسيوم قد تضـاف إلـى المادة الخام التي بها نقص من ناحية المواد المذكورة سابقا.

مواد السيطرة على عملية التخمر:

مواد تضاف للسيطرة على الرغوة (Foaming):-

يجب السيطرة على الزيادة في الرغوة عند حدوثـها فـي المخمـر باسـتعمال مانعات الرغوي الكيماوية ويجب أن يتوفر بها الشروط التالية:

1. يكون فعلها عالي بتراكيز قليلة.
2. ثابتة تحت ظروف الاستعمال.
3. رخيصة الثمن.

ويجب أن تعقم المواد الرغوة بالحرارة قبل الاستعمال وتضاف أوتوماتيكيا إلى أوعية الإنتاج عندما ترتفع الرغوة. تستعمل المواد الدهنية (Polyglycols) المصنع بكثرة وهي عديمة الطعم واللون وتذوب بالماء ومن المواد المانعة للرغوة والمستعملة هي

(Sulfonate Castor oil) ،(Dodecanol, DC Antifoam Vegifat-y) أو أجزاء متساوية من (Tetradecanol, Hexadecanol) مع زيت البرافين. إزالة الرغوة ميكانيكيا يكون أفضل ولكن مواد الإزالة الكيماوية هي الغالبة.

مواد تضاف للسيطرة على (pH):

يمكن السيطرة على (pH) باستعمال أحماض مثل حامض الكبريتيك والفسفوريك أو أحماض أخرى ،يتم ذلك بواسطة جهاز (pH) أوتوماتيكي أو مسجل (Manually) والـ(pH) الابتدائي بصورة عامة يضبط على (4.5).

الماء المضاف:

يجب أن يؤخذ بعين الاعتبار حجوم الماء اللازمة في أغراض التصنيع والتبريد ويشترط أن يكون الماء معقم قبل الاستعمال.

التهوية:

التهوية المناسبة هي واحدة من أهم العوامل في إنتاج الخميرة حيث تستعمل بكميات كبيرة ولكن بحد معين، فإذا كانت أقل من المطلوب تتجه الخميرة لإنتاج

الكحول أكثر من جعلها تنمو، أما إذا كانت أكثر من اللازم فتسبب زيـــادة للتنفس والحرارة وعليه إنتاج أقل كمية من خلايا الخميرة نتيجة للتنافس بين خلايا الخمـيرة في الحالة الأولى نتيجة لتغير ظروف البيئة في الحالة الثانيـة؛ ويجـب أن يرشـح الهواء الداخل من الغبار والأحياء الدقيقة عند استعماله لإنتاج الخميرة.

السيطرة على نسبة التهوية:

لأي نموذج من المواد التي تعمل عليها الخميرة يجب أن نـــأخذ بالاعتبـــار أن نسبة الأوكسجين المأخوذ يجب أن تتناسب مع نسبة المادة المجهزة ونسـبة تكويـن الخميرة.

وبمعنى آخر للتوازن الحيوي يتضمن تعيين الوزن للأوكسجين المساوي تقريبـا لنفس الوزن من المادة الجافة للخميرة وقد أثبت هريسون (Harrison) بحساب هذا التحول وكذلك حدد المعادلة النهائية لتصنيع الخميرة (معتمداً على الـوزن) والتـي هي:

200 gm sucrose + 10.4 NH_3 + 102gO_2 = 100gm yeast dry master including 9.5 inorganic matter.

- 145.2g CO_2
- 77.2g H_2O

ويمكن أن تقاس نسبة الهواء الداخــــل (Orifice meter أو flow-meter) ويمكن أن يسيطر على كمية الهواء الداخل أوتوماتيكيا، وقد وجد أن مساحة السـطح لحجم معين من فقاعات الهواء السائل تزداد كلما صغر حجم الفقاعات لذلك سـيكون

السطح أكثر اتصالا مع أصغر حجم من الفقاعات أكثر مما لو كانت الفقاعات كبيرة ومدة اتصالها مع البيئة أطول.

إذ تحتاج إلى كمية قليلة من الهواء وعندما يكون حجم الفقاعة صغير لذلك في صناعة الخمائر يجب أن تختار الحجم المناسب الذي تكون كفاءته عالية غير مكلفة كثيرا. والفقاعات المستخدمة تجاريا من
(0.0001-1) إنش في القطر وقد استعملت بنجاح أنابيب التهوية التي تكون فتحاتها (2/32 - 1/64) انش الهواء يدخل بالقرب من قاع الخزان وشبكة التهوية التي سوف تكون بهذا الشكل تكون متجانسة في توزيع الهواء داخل المقطع العرضي للفرمنتور فالهواء اللازم للفرمنتورات الواسعة والغير عميقة يختلف عن الهواء اللازم للفرمنتورات الضيقة العميقة. والاختلاف يكون في طول الفقاعة التي تكون في تماس مع البيئة ليكون أكثر فعالية، اعتمادا على إنتاج الخميرة فإن الفرمنتور الصغير يحتاج كمية من الهواء أكبر من الفرمنتور الكبير.

وظائف الأوكسجين الموجود في الهواء:

1. منع التخمر.
2. زيادة التنفس.
3. تحويل البيئة أو خلطها.
4. يزيل المواد السامة من الناتج النهائي.
5. ينبه الخميرة بالنمو خضريا.

درجة الحرارة:

الحرارة المناسبة تعتمد على نوع سلالة الخميرة هو مذكور سابقا أو بالحرارة المتسبة سوف تعمل على أن تعين أعلى إنتاج بأقل قدر من التكاليف.

اعتياديا المعدل هو (25 -30 م) ويكون مناسب مع ذلك درجة (37 م) وقد استعملت حاليا بصورة عرضية لبعض السلالات.

التلوث في صناعة الخميرة (Contamination Problems):

تتعرض مزارع الأحياء الدقيقة عند تنميتها على نطاق كبير إلى التلوث كذلك فإن مزارع الخميرة النقية عند تربيتها تتلوث بأنواع من الكائنات الحية الدقيقة. إلا أن مزارع الخميرة تتمو بة وتتحمل الظروف التي لا تتحملها هذه الكائنات الأخرى فلا تتأثر الخميرة كثيرا بكمية الكلور التي تقتل البكتيريا كما أن للخميرة القدرة على تحمل درجات الحموضة العالية.

فتضاف الأحماض المعدنية عند تربية الخميرة كما سبق ذكره حتى تصل (pH) (4.5) وبذلك يمنع نمو البكتريا خصوصا إذا كان ذلك لفترة قصيرة، وكما سبق القول فإن لنمو الخميرة يناسبه الرقم (pH) (3.4) وهذا يعتبر من العوامل المساعدة في منع تكاثر البكتريا في مصانع الخميرة وعموما فإن البكتريا المكونة للجراثيم لا تسبب مشكلة حيث أنها مثل باقي البكتريا تفشل في النمو في البيئات الحمضية نوعا ما، كذلك فإن معظم الفطر والعفن لا تجد البيئة المناسبة في أوعية التخمر وتتحطم هذه الكائنات.

إن نوعا من الخمائر و الفطر الشبيه الخميرة في بعض صفاتـــها لحـــد مـــا تجــد الفرصة مهيأة للنمو حيث يزيد نموها عن الخميرة الأصلية في أوعية التخمير مثـــل الميكوديرما وهي تسبب مشاكل إذا وحدثت في بدء نمو الخميرة، كمـــا أن اســتعمال الأدوات المناسبة في تربية مزارع الخميرة واتباع التغذية و النظافة و التعقيم المســتمر لخطوط الإنتاج يؤدي حتما إلى تقليل فرص التلوث بهذه الأحياء الدقيقة.

ونظرا لمشاكل تلوث الخميرة بالأحياء الدقيقة فقد اقترح إضافة بعـــض المــواد المطهرة في أجهزة التخمير، إلا أن ذلك يؤثر في نمو الخميرة. وفي مصنع إنتـــاج الخميرة الغذائية يجب تنظيف كل خطوط الإنتاج و الأنابيب و الأوعية التي تلامـــس الخميرة و العصير وذلك باستعمال المنظفات الصناعية (DETERGENTS)، كمـــا يجب معاملتها بالبخار بين الحين و الآخر أو يوميا منعا لحدوث التلوث.

جدول (4) يوضح المقارنة بين مصادر البروتين النباتية وبروتين الخلية الواحدة

الفرق	البروتين النباتي	بروتين الخلية الواحدة
التوازن الغذائي	متباين ويحتاج إلى تقييم	متوازن بين البروتين والنشويات والدهون
القيمة البروتينية	متوسطة إلى عالية	عالية جدا (60-85%)
الفترة الزمنية للإنتاج	طويلة جدا (2880ساعة)	قصيرة جدا (24-28ساعة)
كمية الحوامض الأمينية	متوسطة إلى ناقصة	عالية ويتضمنها اللايسين وباستثناء المثيونين
اليد العاملة المطلوبة	كبيرة	قليلة
إمكانية التوسع والسيطرة في الإنتاج	صعبة ومحدودة	سهلة وذات آفاق
المساحة المطلوبة لتوفير 1000 طن علف	3629 دونم أو 907 هكتار	1 دونم
تأثر الإنتاج بالتقلبات البيئية والموسمية	كبير	غير متأثر
الإصابة بالأمراض	واسعة (مترشحات، بكتريا، فطريات، اكتنومايستز - حشرات)	الخمائر غير متأثرة، البكتريا قد تصاب بالمترشحات البكترية
وجود بكتريا مرضية	مصدر عدوى (السلمونيلا)	لا توجد
فترة خزن الناتج	قصيرة	طويلة

الفرق	البروتين النباتي	بروتين الخلية الواحدة
كلفة إنتاج الطن الواحد(**)	(250)دولار على أساس فول الصويا (1800) دولار على أساس حبوب كبيرة	(575) دولار (برافينات) (330--400) دولار (غاز الميثان)(*)
تقلبات الأسعار	كبيرة	ضئيلة عند توفر المادة الأولية
استثمار رأس المال	(180)مليون دولار/ (100)ألف طن حبوب سنويا	(80)مليون دولار/ (100)(CH_4) ألف طن (200) مليون دولار/ (100) ألف طن برافينات سنويا

(*): باعتبار كلفة (25) سنت/ مليون BTU (1000قدم3 من الغاز الطبيعي).

(**): نسبة البروتين في الناتج النباتي دون (20%) وفي بروتينات وحيدة الخليـــة (60 – 85%).

جدول (5) يوضح تأثير طبيعة المواد الأولية المستعملة في إنتاج بروتين أحادي الخلية (SCP) (في حالة التخمر المستمر في محيط سائل).

المساوئ	المحاسن	المواد الأولية المستعملة
- تحتاج إلى تهوية قوية. - طريقة تولد حرارة مرتفعة. مرحلتان للزرع. طرح بقايا الهيدروكربونات قبل الفصل (مرحلة ثانية). استخلاص بواسطة مذيب وغسل SCP. - فقدان 20% من الناتج أثناء التجفيف نتيجة لعملية الاستخلاص والغسل.	- ثبوت النمو. إنتاج كميات كبيرة من SCP.	(البرافين).
درجة التطاير العالية تسبب بعض المشاكل عند الحرق (سريع الاشتعال وبالوقت نفسه يمكن أن تكون عملية مهبطة لنمو الخمائر). - يحتاج إلى تهوية قوية. - طريقة تولد حرارة مرتفعة.	مصدر جيد للكربون. نسبة عالية من التطاير هذه ميزة جيدة لعملية التجفيف. - مرحلة واحدة للزرع. - إنتاج كميات كبيرة من SCP	(ميثانول).

المساوئ	المحاسن	المواد الأولية المستعملة
- يحتاج إلى عملية تجفيف. - يحتاج إلى عملية تنقية للمواد الأولية. - يحتاج إلى عملية تعقيم للمواد الأولية. يحتاج الى عملية تبريد قوية. يترك فضلات تقدر ب(40%) من الناتج.	- محيط جيد للنمو لا يحتاج بإضافة أمونيا وفسفور فقط. - مرحلة واحدة للتخمر. - الكمية المنتجة محدودة.	(مولاس القصب والمواد البكتينية والنشوية)
- يحتاج إلى معاملة أولية تكون إما كيماوية أو أنزيمية كتحليل السليلوز. صعوبة طرح مادة الفيرفول التي تكون مثبط للنمو. - يحتاج إلى عملية تجفيف.	- محيط للنمو لا يحتاج سوى بإضافة أمونيا وفسفور فقط. - نسبة الفضلات المتبقية قليلة.	(مواد سليلوزية)
- يطرح مواد متبقية تثبط نمو الأحياء المجهرية. - مكلف جدا. - يترك فضلات بعد الإنتاج.	مرحلة واحدة للزرع. استفادة اقتصادية من المخلفات.	محلول الكبريت.
- يحتاج إلى حرارة عالية للتعقيم.	- لا يحتاج إلى تعادل لأنه بطبيعته حامضي. - مرحلة واحدة للزرع. - استفادة اقتصادية من المخلفات.	شرش الجبن

جدول (6) يوضح بعض الصفات الطبيعية للخمائر، البكتيريا، الأعفان

ميزات غير مرغوبة	ميزات مرغوبة	نوع الأحياء المجهرية
- نموها بطيء نسبياً 3-4ساعات - نسبة البروتين لا تتجاوز ال60 - فقيرة بالحوامض الأمينية الكبريتية - نسبة الدهون نسبياً مرتفعة حوالي 6 - نسبة اختيار الأصناف متحددة نسبيا.	- أحياء المجهرية معروفة منذ مدة طويلة - أحياء المجهرية الأكثر دراسة - نادرا أن تكون سامة أو مرضية - تنمو على محيط حامضي سهولة تصنيعها وترسيبها تحتوي على نسبة عالية من الأيس والثريونين 6-9 - تحتوي على نسبة وعلنة من الحوامض 4 10 - غنية بالفيتامينات مجموعة ب - استعمالها في حالتها الخام حيث تمزج مع طحين الحبوب وتدخل في تصنيع المعجنات	خمائر
- صعوبة استعمالها من حيث الشروط الصحية ومنع التلوث حيث تسبب بعض الأمراض المعوية - محتوانها على نسب عالية من الحوامض النووية تبلغ 10-16 - صعوبة اختيار الpH	- نمو سريع حيث كل 100غ ينتج 7غم تحتوي على نسبة بروتين تصل إلى 80 تحتوي على نسبة قليلة من الدهون 1.5-2.5 إمكانية استعمال أنواع عديدة - إمكانية تنميتها على درجات حرارة عالية وهذا ما يقلل استعمال أجهزة التبريد	بكتيريا

نوع الأحياء المجهرية	ميزات مرغوبة	ميزات غير مرغوبة
أعفان	أحياء مجهرية معروفة مثل Fusarium نادرا أن تكون سامة أو مرضية - تنمو على مواد أولية مختلفة منها السليلوز - سهولة الحصول على الناتج بعملية ترشيح بسيطة - معدل احتوائها على نسبة البروتين تقدر بـ75 مثل spiruina maxima - تحوي حوامض أمينية بصورة متوازنة - احتوائها على الحوامض النووية بين 3 5	- وقت التكاثر وسرعة النمو بطيئة 5 12 ساعة

تقنية إنتاج الخمائر:

تعتبر تقنية وإنتاج الخمائر جزءا من التقنية الحيوية المايكروبيولوجيـــة وذلـــك لأنها تعتمد على نوع الخلايا الخميرية، حيث أن كل نوع يكون منتوجا يختلف عـــن الآخر فمثلا:-

1.خمائر العلف:

والتي تعتبر ذات أهمية كبيرة لاحتوائها على البروتين وتضـــاف إلـــى غـــذاء الحيوان وذلك لحل مشكلة نقص البروتين لتغذية الإنسان.

2.خمائر الخبز:

تستعمل لإنتاج الخبز والتي عرفت قبل (6000) سنة وكانت تنتج خميرة الخـــبز كناتج عرضي لإنتاج الكحول أو الشراب. وفـــي ســـنة (1950) ابتـــدأ أول إنتـــاج الخمائر للخبز في فينا (Vienna).

الخواص المورفولوجية والبايولوجية للخمائر مع ربطها بالتقنية

حجم وشكل الخمائر:

عند الفحص الميكروسكوبي للخمائر نلاحظ بأعداد كبيرة وهي إما أن تكون وحيـــدة أو متصلة بسلسلة. كل خلية تمثل كائنا حيا منفصولا يمكنه أن يعيش بصورة مســـتقلة ويكون خلايا جديدة، ولا يمكن ملاحظة المايسليوم في الخمـــائر، وتظـــهر خلايـــا

الخميرة عندما تكون مفردة وتكون عديمة اللون ولكن عندما تنمـــو علــى أوســاط صناعية فإنها تكون مستعمرات قد تكون بيضاء أو كريمية اللون أو تكون محتويـــة على صبغات.

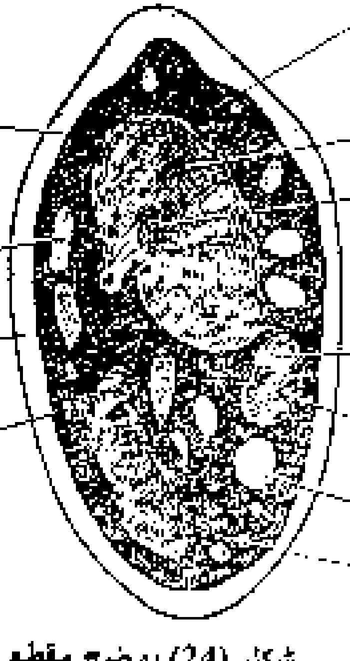
ومستلزمات بعض الخمائر الناقصـــة تكــون ذات لــون بــراق وأن صفــات المستعمرة تكون مفيدة في تصنيف مجموعة الخمائر التي من الصعب تصنيفها.

شكل خلايا الخمائر غير ثابت فهي إما أن تكون دائرية، بيضويـــة، كمثريـــة أو أسطوانية الشكل، وأغلب الخمائر تكون كمثرية الشـــكل... ومـــن أمثلـــة الخمـــائر الدائريـــة مجموعـــة (Saccharomyces) والتـــي تـــأخذ أشـــكالا بيضويـــة (Toralopsis)، ومن الأنواع المتطاولة هي (Candida mycondroia) وأحيانـــا يكون شـــكلها كمـــثري أو ليمونـــي وخصوصـــا التـــي تتكـــاثر بـــالتبرعم مثـــل (Sacaharomy ces Hansenaspora).

إن شكل خلايا الخمائر يتأثر بعمر المزرعة وظروف الوسط الغذائي والحـــرارة و(pH) وعلى فسلجتها، وبعض الأنواع من الخمائر لها مايسليوم نوعي خصوصـــا عنـــد (Candida) وفـــي بعـــض الأحيـــان يكـــون شـــكلها شـــبيها بالقنينـــة (Pityrosporum) أو على شكل ثلاثي الزاويـــة (Trigonopsis). أمـــا حجـــم الخمائر فهو غير ثابت ومتغير ويتراوح ما بين (4–10) ميكرون طـــولا و (2–8) ميكرون سمكا. أما البناء الخلوي للخمائر فهو أكثر تعقيدا من البكتريا.

أما جدار الخلية فيتكون من طبقتين أو أكثر، الجدار الخارجي صلب وشفاف ومطاطي وسمكه قد يصل إلى (A 1000)، وتكون الطبقة الخارجية والوسطى من نوع (Hydrophobic). أما الداخلية فتكون (Asmophobic) والوسطى لها انعالية الإلكترونية و (Hydrophilic) سمكها في الخلايا الفتية قليل ويزداد في الخلايا الكبيرة، يلاحظ هذا في الخلايا الموجودة في الوعقة أو الحلقة المتكونة على سطح الوسط الغذائي للمائش.

والجدار الخلوي في الخمائر يحتوي على الكلايكوجين وهو يشكل عموماً بحدود (90%) من المادة الجافة. أما ال(10%) المتبقية تضم البروتينات (6-7%) مرتبط مع الكيموسللوز و(3%) كيتن ودهون وجلوكوز أمين.



شكل (24) يوضح مقطع في الخميرة

الغشاء الخلوي:

عبارة عن غطاء مطاطي رقيق يحدد البروتوبلازم من الجهة الخارجية، وفي الحقيقة فإن جوهر الغشاء الخلوي عبارة عن جزء خارجي متميز في البروتوبلازم إلى درجة معينة، ويتكون من مركب دهني بروتيني وبروتينات نووية ومركبات الكالسيوم ويتميز بنفاذية كبيرة وخاصة للأملاح.

بالنسبة لحياة الخلية هذا الغشاء يوجد كحاجز خلوي داخلي والذي بواسطته تنظم دخول المواد وخروجها بين البروتوبلازم والوسط الخارجي، وبسبب هذه النفاذية الكبيرة للغشاء الخلوي فالضغط الأزموزي الداخلي قليل نسبيا ويتراوح ما بين (3-6) ضغط جوي.

البروتوبلازم:

البروتوبلازم يملأ جسم الخلايا داخليا وهو من أهم الأجزاء الرئيسية لبناء جسم الخلية الخمائرية والذي يجري فيه القسم الأساسي للعمليات المرغوبة خصوصا في الخلايا الفتية. يكون البروتوبلازم متجانس مع قليل من التجويات الغذائية وعند ملاحظة الخلايا تحت الميكروسكوب تظهر شفافيته وبلون أزرق.

الرايبوسومات:

إن بروتوبلازم الخلية الخمائرية يحتوي على كمية كبيرة من الحبيبات الميكروجزيئية تدعى الرايبوسوم، حجمها يتراوح بين (50-200) مل مايكرون يدخل في تركيبها الدهون والبروتينات والأحماض الأمينية

(Ribomucleic acids). الأهمية الرئيسية لهذه الأجزاء تحت المجهرية هي دعم إنتاج أو تكوين البروتينات على حساب الأحماض الأمينية الفعالة التي تنتج من المايتوكوندريا.

الفجوات الغذائية:

لخلايا الخمائر صفة خاصة وهي وجود الفجوات الغذائية بشكل دائم كأجزاء رئيسية عادة في البروتوبلازم. ويشاهد ما بين (1-2) فجوة غذائية. ومع كبر حجم الخلايا يزداد عدد الفجوات الغذائية. شكلها متغير من دائري إلى مضلع نتيجة حركة البروتوبلازم، وفي حالات معروفة ينتج منها بواسطة التبرعم فجوات غذائية صغيرة والتي بعد ذلك تندمج مع الفجوة الغذائية الأم.

ميتاكروماتين:

هي عبارة عن أحد أجزاء الفجوة الغذائية، ومن المثبتات والملونات الداخلة في الفجوة. والمايتاكروماتين يفرز في المحلول الفروي بشكل حبيبات ذات حجم (0.2-0.6) مل مايكرون. محتوى الميتاكروماتين في الفجوة الغذائية غير ثابت ويتراكم بكميات كبيرة وأحيانا يختفي في الخلايا الجائعة، وكذلك يقل المايتاكروماتين بسرعة، وكثافة المايتاكروماتين هي أقل من كثافة البروتوبلازم. إن تراكم المايتاكروماتين والكلايكوجين في الخلية يحدث في آن واحد وأن تكوين هذه المادة يعتمد على وجود الفوسفات في المواد الغذائية، وأحد مميزات المايتاكروماتين هي عدم تلونها بنفس اللون الذي يحوي الملونات.

النواة:

النواة هي أحد أعضاء الخلية الخمائرية، ولأجل الاختلاف والتمييز عن البكتريا يلاحظ وجود النواة، وهي اعتياديا تكون في مختلف الأماكن في البروتوبلازم ولكن كثيرا ما تكون قريبة من الفجوة الغذائية الرئيسية.

النواة تلاحظ بوضوح عند الخلايا الموضوعة في ماء معقم لعدة أيام حيث يكون البروتوبلازم بحالة جائعة وشفافا ومتجانسا حيث نواة الخلية لها شكل كمثري دائري وقليلا ما تكون على هيئة شكل بيضوي ومحاطة بطبقتين رقيقتين تدعى بالأغشية النووية وتحتوي على سائل شفاف. يمكن أن تشاهد النواة بأحسن حالة بعد أن تثبت الخلية بطريقة (Bowen)، والنواة تحتوي على الكروموسومات وعددها يعتمد على نوع وصنف الخمائر، واعتياديا تتراوح بين (4-12).

المحتوى الكيماوي للخمائر:

إن التحليل الكيماوي أظهر بأن الخمائر تحتوي على أكثر من (70) عنصرا ومن أهمها الكربون، الهيدروجين، الأوكسجين، النيتروجين، الكبريت، الفوسفور، الكالسيوم، البوتاسيوم، المنغنيز. العناصر الأربعة الأولى هي التي تبني المواد العضوية.

والخلية الخمائرية تحتوي على محتوى مائي (75-80%) و(20-25%) مواد جافة. المواد الجافة تكون عبارة عن مواد عضوية وعناصر معدنية والعناصر المعدنية لا تحتل أكثر من (12-15%) من المادة الجافة. أما المواد العضوية فهي

البروتينات، الأحماض النووية، الكربوهيدرات، الدهون. وأهم مادة قيمة في الخمائر هي البروتينات، وتقدر بحدود (35%-55%) من المادة الجافة.

التغذية عند الخمائر:

الوسط الغذائي هو لازم وضروري لتربية الخمائر، والوسط يجب أن يحتوي على مواد ضرورية ولازمة لعمليات الطاقة المرغوبة وتأليف المركبات المعقدة في الكتلة الحيوية. وللخمائر أعضاء خاصة للتغذية، فهي تمتص المواد الغذائية وتفصلها تمثيليا عن خلال كل السطح. وإن إذابة المواد الغذائية في الخلية هي عملية معقدة وهي تحت الدراسة حتى الآن.

خمائر العلف من مصادر أولية نباتية:

من المعروف أن واحدة أو اثنتان من السلالات تميزت على صعيد إنتاج بروتين العلف والتي استخدمت بنطاق واسع وكبير في تغذية الحيوانات كمصادر مملوءة بالبروتين والثيامين والأملاح. ومن أبرز محتويات خمائر العلف أنها تحتوي على (48-52%) بروتين و(13-16%) رماد. إضافة إلى ما ذكر فإنها غنية بالأحماض الأمينية الأساسية والتي تعطي لها القيمة البايولوجية العالية.

إضافة إلى ذلك فإن خمائر العلف تكون غنية بفيتامين (B_1, B_2, B_3, B_6) وحامض الفوليك وفيتامين D. ويمكن لخمائر العلف أن تستعمل نفس المصادر التي تستعملها خمائر الخبز. وقد تم التعرف على الكثير من هذه الأحياء منها: (Candida utilis) والمعروفة بـ((Torula utilis) أو *Candida tropicales*,)

Candida Pulcherima, *Trilopsis utilis*, *Hanscula suveolens*, *Hanscnula amemale*, Zygosaccharmyces, Sacchoromyces cervisiae pichia polymorpha Trichosporim pullulans) (Bunker 1961).

وتعتبر Candida utilis هي الأفضل والتي يمكنها من هضـــم الســـكريات أو المصادر الكربوهيدراتية السداسية والخماسية والأحمـــاض العضويـــة -Organic acid، ومن الخمائر ذات الكفاءة العالية لإنتاج الـــبروتين Candida utilis var major حيث أنها سريعة النمو والتكاثر ويمكنها أن تستهلك السكر مـــن الوســـط بكفاءة (60%).

أما السلالة Candida utilis var thermophilis حيث أنها تنمو وتتطور فـــي الأوساط ذات الحرارة العالية وتختلف الكانديدا من نوع لآخر فـــي قابليتـــها علـــى الهضم للمواد.

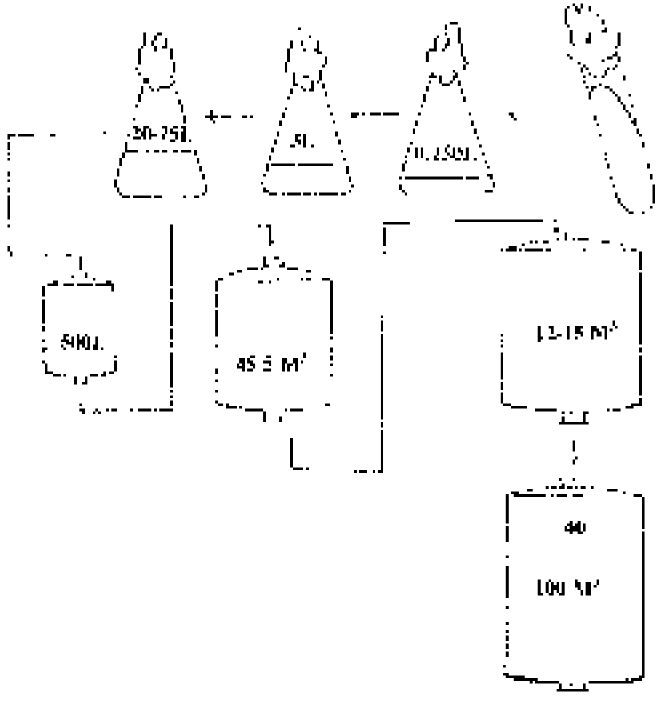
تحضير المزارع النقية للعملية الإنتاجية:

إن تحضير مزارع الخميرة النقية تعتمد على المراحل التالية، ويمكن تلخيصها بأربع مراحل:-

1. الحصول على المزارع النقية عند الظروف المختبرية.
2. الحصول على المزارع النقية في حجم صغير باستعمال حاضن هزاز.
3. الحصول على المزارع النقية في حجم كبير باستعمال حاضن هزاز.
4. الحصول على المزارع النقية في حجم كبير فرمنتور مختبري.

1- الحصول على المزارع النقية في المختبر:

على النطاق المختبري يمكن الزرع في فلاسكات (دوارق) ذات الحجوم (250مل)، (3لتر)، (20-25لتر)، وعند الظروف المثلى من حرارة (pH) كما في الشكل:



الخطوات التقنية:

إن خطوات إنتاج خمائر الخبز من قاعدة مولاسية أو عصير تمر تنتهي بالخطوات التالية:

1. مشروع إنتاج الخمائر:

أ. قسم تهيئة معاملة المولاس وتنقية وتصفية المولاس أو عصير التمر.

ب. قسم تهيئة المزرعة.

ج. قسم تربية الخميرة.

د. قسم الفصل.

هـ. قسم عمل القوالب والتعبئة والتغليف.

و. قسم خزن المنتوج الجاهز.

2. مشروع المساعدة:

أ. قسم تهيئة الأملاح الغذائية.

ب. قسم الترشيح.

1. مشروع إنتاج الخمائر:

قسم معالجة أو عصير التمر: يجهز المولاس بحموضة وحرارة خاصة ويكون كالتالي:

يغطى جهاز التنقية بالماء ويسخن إلى درجة حرارة (50-60 م)، وتضاف بعد ذلك الكمية اللازمة من حامض الكبريتيك، حيث يضاف الحامض المركز بنسبة (0.6-1.0%) إلى المولاس غير المخفف، إن كمية البخار الناتجة هي (50-

70%) بعد إضافة حامض الكبريتيك، بعد الإضافة يسمح للمحور الدوار والمراوح بالعمل ويعطي (75%) من الكمية الكلية المحسوبة من مادة السوبر فوسفات المضافة. وفي نفس الوقت يضاف المولاس. يسخن السائل إلى حد الغليان بالبخار ويستمر لمدة (30 60) دقيقة. ثم يضاف ماء بارد بنسبة (20%) في المواد الصلبة، وبعد ذلك يضافإلى المزيج الناتج (50%) سلفات الأمونيوم ثم توقف حركة المحور ويترك المولاس لمدة (6-8) ساعات.

بعد عملية تبريد المولاس، يستخلص المولاس النقي بواسطة جهاز الطرد المركزي، ويوضع المولاس النقي في خزان تحت حرارة (80 م). أما بالنسبة لعصير التمر فالعملية أسهل حيث يتم استعمال العصير مباشرة أو أحيانا يتم معاملته للتخلص من بعض المواد الشائبة أو الألياف السليلوزية.

2.تحضير المزرعة اللقاحية:

إن أكثر معامل خميرة الخبز تستعمل النوع (Saccharomyces cervisae) وكل معمل له سلالة ذات رقم معين مخزونة في أنبوبة اختبار ونامية على سطح أكري والتي يعاد زراعتها مرتين في الشهر. إن عملية تجهيز اللقاح تنتهي بثلاث مراحل هي:-

المرحلة الأولى:

تلقح دوارق مخروطية من المزرعة الخمائرية النقية الجاهزة في المختبر والنامية في وسط غذائي صلب، وعند الظروف المعقمة يتم تلقيح ثلاثة دوارق ذات

محتوى مائي حجم (50) مل وبتركيز (10-11%). إن الخمائر في الدوارق المعقمة ستنمو في مدة (18-20) ساعة عند درجة حرارة (30 م).

المرحلة الثانية:

في هذه المرحلة يتم تلقيح دوارق ذات حجم أكبر ذات حجم (450) من مستخلص مائي مع تركيز (9.5-10%) المعقمة باللقاح الجاهز من المرحلة الأولى. وبعدها تبدأ عملية النمو لمدة (18-20) ساعة عند درجة حرارة (30-31م).

المرحلة الثالثة:

في هذه المرحلة يتم بها تلقيح الدوارق ذات الحجم (4.5) لتر، والحاوية على المستخلص المائي والمعقمة ثم تنقل محتويات المرحلة الثانية إليه وتجري عملية النمو عند نفس الظروف السابقة.

3.فصل المزرعة النقية:

في هذه الخطوة يهيأ اللقاح لكي يتطبع بالوسط الغذائي وبذلك نحصل على لقاح وتتضمن عملية التهيئة طورين. الوسط الغذائي يهيأ بشكل معقم والذي عنده يخفف المولاس بالماء إلى حد (12%) مواد جافة. وعلى سبيل المثال إذا كانت كمية الوسط (800) لتر يضاف إليها (60) لتر مستخلص مائي بتركيز (12%) مادة جافة و(200) غم "داي- مونوفوسفيت" ثم يعقم الوسط لمدة (30) دقيقة ومن ثم يبرد إلى درجة (30 م).

1. الطور الأول – الحاضن الصغير:

وفي هذا الطور تؤخذ (80-100) لتر من الوسط وتجري عليه كافة العمليات بصورة معقمة وباستمرارية (14-18) ساعة وفي كل ساعتين يضخ له هواء، وبذلك سنحصل على (0.8-1.0) كغم من الخمائر.

2. الطور الثاني – الحاضن الكبير:

وفيه يوضع الوسط الغذائي بحجم (800-820) لتر وتجرى كل العمليات فيه بصورة معقمة. تنقل جميع محتويات الحاضن الصغير بعد انتهاء عملية النمو إلى الحاضن الكبير.

تبدأ عملية التربية الجديدة عند (30 م) ولمدة (12) ساعة وتعطي فترات تهوية كل (10-15) دقيقة إلى أن ترتفع كثافة سائل الخميرة إلى (4%) مواد صلبة، وبذلك تنتهي العملية في هذه المرحلة والتي تعطي (8-12) كغم خمائر.

المرحلة الإنتاجية:

يعقم المولاس في كل المراحل الإنتاجية وبحسب كمية الاملاح.

المخمر الأم:

وهو المخمر الإنتاجي الأول والذي يتم فيه تعقيم المولاس وتبريده إلى (30 م) (والمحتوي على 13% مواد صلبة، و pH (4.5-5)).

تنقل محتويات الحاضن (حجم 800لتر) والذي يعتبر كلقاح للمخمر الأم وحجم المولاس الأساسي يكون (656) كغم، عملية التكاثر في هذه المرحلة هي حوالي (12) ساعة. بعد مرور (3) ساعات من العملية تعطى جرعة بسيطة من الهواء إلى نهاية المرحلة وعندما تصل كثافة الوسط إلى (4.5 4%) مواد صلبة فإن المحتويات تنقل إلى المرحلة التالية. الإنتاج (60-80) كغم خمائر.

المخمر الوسطي:

المخمر الوسطي له حجم (30م3) يحتوي على نظام لضبط درجة الحرارة وتوزيع الهواء، ويكون حجم المولاس (3) طن، ويتم التعقيم في المخمر من خلال النظام الحراري البخاري في المخمر، بعد ذلك ترفع درجة الحرارة إلى (30 م). وتنتهي عملية التلقيح من المرحلة السابقة بكثافة أولية للوسط هي (8%) مواد صلبة. وتبدأ التهوية من بداية التلقيح ب(30م3/1م3 وسط/ساعة) وتستمر العملية حوالي (8) ساعات. ويمكن معرفة نهاية العملية من خلال انخفاض تركيز المواد الصلبة الذائبة إلى حدود (3-4%) مواد صلبة.

المخمر الإنتاجي لخمائر الجيل (أ):

وهذه العملية تمثل بجهاز أو بمخمر بحجم (140م3) وله نظام للتهوية، حجم المولاس المستعمل بحوالي (6) طن وتجرى عملية التعقيم بصورة منفصلة. يوضع في المخمر (6%) مولاس من حجم المخمر و(10%) سلفات الأمونيا و(17%) سوبر فوسفات ثم تجرى عملية تلقيح للوسط. تبدأ عملية النمو مع ضبط جميع الظروف.

ويكون نظام إضافة المولاس أو عصير التمر والأملاح على الشكل التالي:

	الإضافة بالساعات %												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
المولاس أو عصير التمر		6	-	4	5	7	9	01	01	12	13	13	11
سلفات الأمونيا	10	-	10	10	10	15	15	15	15	-	-	-	-
سوبر فوسفات	17	-	17	17	17	17	17	-	-	-	-	-	-

والخمائر المنتجة تفصل من خلال جهاز فصل وتخزن على شكل مستحلب في خزانات خاصة وعند درجة حرارة (2-4°م).

المخمر الإنتاجي للخمائر الجيل (ب):

المخمر للجيل (ب) يتمثل بخزان حديدي ذو تبريد خارجي (الماء يجـــري مـن خلال أنابيب بطبقات رقيقة على جدار المخمر من الخارج، أما التهوية فتجري مـــن خلال حركة توربينية المرتبطة بنظام عمودي والذي بدوره يعطي التهوية للمـــولاس المعقم والأملاح المحسوبة من المرحلة السابقة وكذلك الخمائر المنتجة من المرحلـــة السابقة.

تنتهي عملية النمو بـ(12) ساعة (دورة) والتهوية من (1500-8000) م3/ساعة. المحتوى العام لجهاز التخمير بعد عملية الفصل والغسل والخزن. تعتبر الخمائر الناتجة كمادة تلقيحية للجيل (ج).

جهاز التخمير للجيل الثالث (ج):

تستعمل أجهزة لأجل الجيل الثالث من نوع فوكل بوش (Vogel Bosh) وبحجم (135م3)، وعند درجة حرارة (29-30 م). إن الهواء المستعمل لهذه العملية هو (7م3/ك) كغم هو خمائر جافة. أما التهوية فتكون عن طريق جهاز دوار، وتجري عملية التهوية بصورة عمودية على عملية الدوران حيث تتكون فقاعات صغيرة جداً.

يضاف المولاس والأملاح بالموازنة مع وقت تراكم الخمائر وتكرر العملية بعد كل (12-14) ساعة (دورة). تنخفض لزوجة الوسط عند الجيل (ج) مع رفع الإنتاج. يلقح الوسط بالخمائر الحاصلة من الجيل (ب)، مع ضبط الـ(pH) وكذلك الأملاح الغذائية. أما مزيل الرغوة فيضاف أوتوماتيكيا بالتدريج وعند الاحتياج. وكذلك الحال بالنسبة إلى عملية التهوية. يرسل المعلق الخمائري بتركيز (90)غم/لتر إلى أجهزة الفصل المركزي.

قسم الفصل:

فصل الأجيال (أ، ب، ج): لأجل فصل الخمائر من سائل التخمير، تتم العملية بأجهزة فصل تحت تأثير قوة الطرد المركزي للسائل، حيث يفصل إلى اتجاهين وبأوزان نوعية مختلفة، سائل التخمر (0.1-1.002) والخمائر (1.08-1.12).

إن استمرارية إضافة الخمائر في سائل التخمر سيرفع من تأثير التحلل الأنزيمي في الخلايا، وهذا بدوره سيقلل من قوة فعالية الخمائر وكذلك خزنها.

المرحلة الثانية من الفصل نتيجة لزيادة لزوجة المستحلب الخمائري، حيث أنه قبل عملية الفصل بالطرد المركزي الثاني والثالث يجب تخفيفه أربع مرات بالماء لأجل غسل الخمائر. وإن حجم الماء يساعد على فتح لون الخمائر وكذلك تخفف من لون صبغة السائل فوق الخمائر من بقايا لون المولاس أو عصير التمر أو أي مصدر آخر إلى أن يظهر لون الخمائر المعروف، حيث أنه من المعروف أن المواد الصبغية تنتشر فوق خلايا الخمائر ونتيجة لعملية الامتصاص.

قسم التبريد:

تخزن الخمائر بعد عملية الفصل في خزانات مبردة عند درجة (2-4 م) لأجل الخميرة الأم و(6 م) للخميرة الباقية التي تنتج، والخزانات المبردة مجهزة بأغلفة تبريد بالإضافة إلى كونها مجهزة بمحور دوار لأجل تنظيم الحرارة. علماً بأنه يتم تعديل (pH) إلى (6-6.2).

قسم عمل الأشكال والتعبئة:

للجيل (ج) وبعد عملية الفصل تجري عملية تشكيل الخمائر تحت مرشحات مفرغة. فالخمائر ستكون متجمعة وتحت تأثير كثافة مستحلب الخمائر والذي يجب أن لا يقل عن (600-700)غم/لتر خمائر، كما ويجب أن لا تكون درجة الحرارة للسكرومايسس (Sacchromyces) أعلى من (12 م).

ولأجل تحضير خمائر ذات نوعية جيدة تستعمل مرشحات تحت التفريغ الـــلازم ويستحسن استعمال مرشح نسيجي.

إن عملية الترشيح بواسطة مرشح نوع (Vacuum filter) تجـــرى بالطريقـــة التالية: يوضع المستحلب الخمائري في حوض المرشح المفرغ (Vacuum filter) وتمرر الخمائر من خلال سطح النسيج الرشح والتي ستترسب عنده. أمـــا الراشـــح فيذهب عن خلال قنوات. إن فصل خلايا الخمائر من الفلتر يكون بواســـطة ســـكينة عندها تكون الخمائر جاهزة لأجل عمل التشكيلات.

ولأجل عمل الأشكال كثيرا ما تستعمل مكائن عمل القوالـــب والأشـــكال حيـــث تشكل الخمائر في قوالب ذات وزن (500) غم أو (2500) غم حيث يتم ذلك مـــن خلال:

1. ماكنة عمل الأشكال والمجهزة بقوالب بحجم (150) كغم خمائر.
2. ماكنة صنع الأغلفة والتي يوضع فيها المنتوج (أغلفة) وعموما يكون من غلاف ورقي ذي طبقتين.

قسم الأملاح الغذائية:

يتم في هذا القسم تحضير الأملاح الخاصـــة بالعمليـــة الإنتاجيـــة كالمحـــاليل الفوسفاتية، والكبريتية، والأمونية.

السيطرة على الإنتاج:

العمليات الأساسية في معمل إنتاج الخميرة يسيطر عليها بالسيطرة اللازمة (بالمعدات القياسية) وأكبر جزء منها يجرى أتوماتيكيا ومن قسم معين ينظم السيطرة وينظم كافة العمليات ومنها عملية التهوية في جهاز التخمير ومن خلال مانومتر (Defferential manometer). أما القياس (pH) فهنالك جهاز خاص يقيس درجة التفاعل الهايدروجيني. كذلك وهنالك جهاز آخر يقيس كثافة الوسط التخميري ومن خلال هذا الجهاز تنظم عملية دفع جرعات من الوسط الغذائي إلى المخمر الرئيسي.

السيطرة التكنولوجية والمايكروبيولوجية:

السيطرة المايكروبيولوجية على الإنتاج تتم بالمختبر المايكروبيولوجي حيث هو الذي يثبت النقاوة للمزرعة في جهاز التخمير.

وفي المعمل تتم المتابعة التالية: -

1. كل ساعتين يؤخذ نموذج من جهاز التخمر ويتم دراسته تحت المجهر لأجل تحديد درجة نمو خلايا الخمائر وتقرأ المؤشرات التالية: ملاحظة الخمائر البرية، الغريبة، المايكروفلورا طريقة التكاثر.
2. السيطرة على النظافة من حيث الأجهزة والخزن.
3. السيطرة على نوعية المنتوج الجاهز.
   أ. نقاوة ونظافة المزرعة.
   ب. نسبة الخلايا الميتة.

4. السيطرة على النظام الحراري في خزانات التبريد.

5. السيطرة الميكروبيولوجية على المواد الخام والمواد المساعدة.

6. السيطرة الميكروبيولوجية الصحية على الإنتاج والأجهزة.

7. السيطرة الكيماوية للمواد الخام وللمواد الوسطية وللعملية وللمنتوج الجاهز.

1. تحاليل المواد الخام:

1. تحديد نسبة (H_2SO_4).

2. تحديد نسبة (P_2O_5) في محلول سوبرفوسفات.

2. تحاليل المولاس أو عصير التمر:

أ. المحتوى السكري.

ب. الحموضة.

ج. نسبة الفلويات.

د. المحتوى الرمادي (Ash).

تقنية إنتاج الخميرة الغذائية من عصير التمر:

إن عملية إنتاج الخميرة الغذائية من التمر تحتاج إلى بعض الخطوات التصنيعية ومن أهمها:-

1. عمليات تخص المادة الخام نفسها وذلك لأجل استخلاص المادة السكرية منها وكذلك المواد الأخرى كالمعادن والأحماض الأمينية ذات الأهمية لتنمية الخمائر. كذلك يجب تثبيت أحسن الظروف للاستخلاص من حيث نسبة كمية

الماء إلى كمية التمر، نوعية هرس التمور، درجة الحرارة المستعملة، (pH)، الوقت.

2. عمليات تخص الكائن المجهري حيث هناك عمليات لأجل تحضير الخمائر لكي تنمو على المستخلص المائي للتمور.

3. عمليات تثبيت الظروف للتربية وهذا يتطلب الدراية الكافية بالسلالة المستعملة، لذا يجب تثبيت درجة الحرارة و(pH) والتهوية وكمية اللقاح وكذلك تراكيز المصادر الأساسية كالنايتروجين والفوسفور والكربون اللازمة لنمو الخمائر.

4. عملية ثبوت ديناميكية نمو الخميرة في وسط عصير التمر لمعرفة زمن كل طور وإن هذه العملية لها دور كبير من الناحية الاقتصادية حيث تثبت ديناميكية السلالة والوقت اللازم لانتهاء عملية التخمير.

5. عملية تثبيت نقاوة العصير حيث أن عملية استخلاص السكريات بالماء يحتاج إلى درجات حرارة عالية ما بين (80-90 د)، وكذلك تعتمد عملية ثبات نقاوة المستخلص على نسبة الماء: التمر، ويمكن قياس نقاوة العصير بالمعادلة التالية:-

$$\text{النقاوة} = \frac{\text{السكريات المختزلة}}{\text{المواد الصلبة الذائبة}} \times (100)$$

إنتاج الخميرة الغذائية من التمر من النوع (C. Utilis):

1. **تحضير المواد الأولية:** يتم تحضير عصير التمر بالطرق التقليدية وبنسبة سكرية تعتمد على نوع الكائن المجهري والمتعارف عليه (4-10%).
2. **التخمير:** تبدأ العملية بوضع الوسط الغذائي في الفرمنتور على درجة حرارة (30 م) ونلقحها ب(100) مل من معلق الخميرة.

في منتصف الوقت تقل نسبة السكر في ال(Mash) بطريقة (Schools) أو (بولز) يحفظ (pH) ال(Mash) بين (3-4.5) تبعاً لنوع الخميرة بإضافة هيدروكسيد الأمونيوم بكمية مناسبة، عند الضرورة يستمر في عملية التخمر بإضافة الماء إلى المخمر. كمية السكر في الوسط (Mash) تحفظ بنسبة (0.5%) بإضافة عصير التمر. التخمير يستمر لمدة يومين (16) إلى (72) ساعة تجرى تهوية ل(Mash) لمدة (8) ساعات/ يوم ب(20) لتر هواء معقم، يبدأ بتحريك ال(Mash) بواسطة محركين محوريين يدور كل منهما (400) دورة/ بالدقيقة.

في المرحلة الأولى: يلاحظ صعوبة تقدير أو ملاحظة السكر المستهلك.

في المرحلة الثانية: يتضح قلة السكر بسرعة إلى تركيز (0.5%) سكر، وهذه النسبة يحافظ عليها بالتغذية المستمرة للمخمر وبنسبة (100) مل/ساعة/سرعة. استهلاك السكر تحسب كل ساعة لكل لتر من العجينة.

خطوات صناعة الخميرة الغذائية تجاريا من التمر:

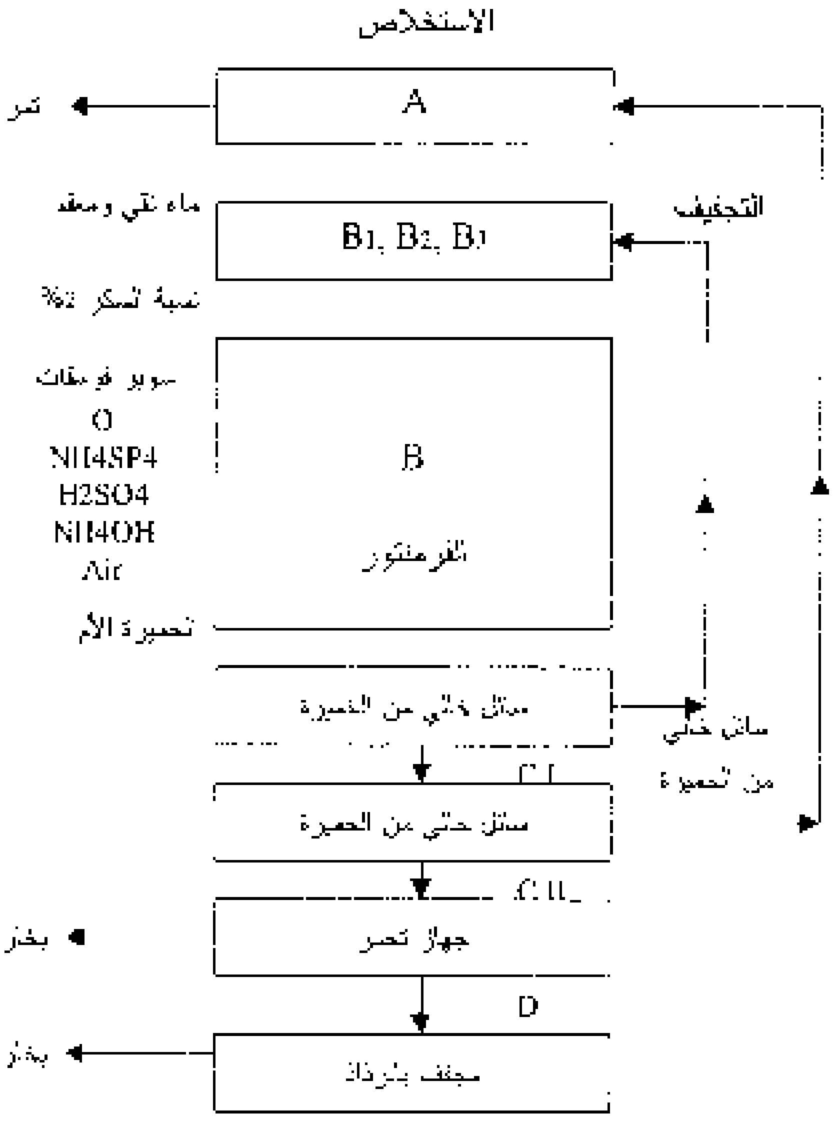
الرسم التخطيطي التالي يوضح خطوات صناعة الخميرة الغذائية والأجهزة التي تدخل بالتصنيع: الخطوة الأولى هو استخلاص مستخلص التمر حيث يجب أن تكون محتويات العصير من السكر (10) بركس (Bx)، وتتم هذه الخطوة في (A) مع المحافظة على نسبة التمر إلى الماء وهي (1:5) عند الاستخلاص.

عصير التمر يخفف إلى تركيز مناسب في الخزان (ب) يكمل بإضافة المغذيات الضرورية التي تحتاجها الخميرة من الفسفور والنتروجين، ويتم حقن السائل بواسطة الخميرة المحضرة بكمية ونوعية جيدة، وتخمر في مخمر كبير الحجم الذي هو (ب) سعة (100-200) مع عملية تهوية مناسبة. الاحتياجات المناسبة للتخمر (درجة الحرارة (pH)، (O_2) اللازم...الخ) يجب أن تلاحظ بدقة.

السائل المتخلف من عمليات الفصل والخالي كليا من الخمائر يعاد جزئيا إلى خزان استخلاص التمر (A) وإلى خزان التجفيف (B_1). عجينة الخميرة المركزة تجفف بواسطة جهاز التجفيف بالرذاذ (F) فتكون الرطوبة النهائية في الخميرة الغذائية هي (6%) التي تغلف وترسل إلى غرف التخزين.

النوى المتبقية بعد تصنيع العصير المستخلص وبقية الراشح التمر يجفف ويكرر ويعمل كغذاء يخلط مع الجريش يكون مناسبا لتغذية الحيوانات.

إنتاج الخميرة الغذائية من التمر (رسم تخطيطي لعمليات التصنيع)



خميرة غذائية جافة نسبة المادة E (94%) ورطوبة (6%)

إنتاج الخميرة الغذائية من (S.C.):

إنتاج الخميرة الجافة الابتدائية من السلالة (S.C.) يوازي إنتاج خميرة الخبز حتى مرحلة التركيز والغسل للخلايا حيث تصبح عجينة ثقيلة (كما يلاحظ في المخطط)، وبعد ذلك تؤخذ العجينة وتبستر وتجفف إلى رطوبة (6%) ثم تطحن، وبعدها تعبأ ثم تخزن. لون الخلايا المعلقة يكون لونا فاتحا. تدعى اعتياديا بكريم الخميرة.

إنتاج الخميرة (C.U.) بعد تنميتها على السوائل المختلفة من معامل الورق:

إنتاج الخميرة الجافة من التمور بالتخمر المستمر من السائل المتخلف من معامل الورق، حوالي (20%) من هذا السائل (المادة الصلبة) هي السكر ومواد عضوية جاهزة للاستفادة منها حيويا بواسطة سلالة مختارة من (C.U.)، مع ذلك فإن هذا النظام من الإنتاج يختلف اختلافا كبيرا عن تخمير المولاس كما يلاحظ من المخطط وهذا شرح مختصر للعمليات.

تحضير وسط التخمر: يتضمن مزج السائل المكبرت مع عدة عناصر مختلفة وتزال الزيادة من (SO_2) بتعديل ال(pH) بالأمونيا، تحليل السكر والمواد الفسفورية إضافة البوتاسيوم والفسفور. يتم إضافة الفسفور تبعا لكمية السكر المتخمر وكذلك تضاف الأمونيا لتنظيم ال(pH) خلال الإنتاج.

كفاءة التهوية يتم التحكم بها باستمرار بقياس كمية الأوكسجين الذائب خلال مراحل التخمير، تضاف المادة السائلة (الوسط الغذائي) من القمة ومن خلال أنبوب متصل بالخزان يسحب من السائل إلى المجفف (60.000) غالون يتم مزجها بالمحور بسرعة مع مستحلب الخميرة بنسبة (100) غالون في الدقيقة.

درجة حرارة الإنتاج يحافظ عليها قريبا عند (32 م) بصورة مستمرة من المستحلب خلال مبرد خارجي، تسحب الخميرة بضخ بنسبة توازن المادة الداخلة في البيئة، بعدها تغسل وتعقم وتجفف إلى أقل من (6%) رطوبة بالمجففات ثم تطحن إلى مسحوق وتعبأ في أغلفة بلاستيكية. بعدها يقاس أو يختبر لمسحوق الناتج في مختبرات التحليل ويجب أن يكون المسحوق حاويا على المواصفات القياسية.

استعمالات الخمائر المغذية:

1. تستعمل كغذاء للإنسان للتغذية المباشرة وتكون على شكل مسحوق أو كبسولات أو تكبس على شكل حبوب، وكذلك تمزج مع الأغذية لاحتوائه على البروتين والفيتامين خصوصا مجموعة فيتامين (B) وغيرها من المغذيات التي تكون رخيصة الثمن، وفي البلدان التي تقل فيها مصادر البروتين ورخص المواد الكربوهيدراتية.

2. الخمائر المغذية كذلك تستعمل في إنتاج الأدوية كمصادر للفيتامينات والأحماض الأمينية والأحماض النووية وغيرها من أجزاء البروتين التي تفيد في التصنيع الغذائي والأدوية.

3. تستعمل في المستشفيات على شكل حبوب أو كبسولات.

4. تستعمل لتغذية الحيوانات مثل الفراخ في صورة مقبولة. والجدول رقم (10) والشكل رقم (30) يوضحان تأثير التراكيز المختلفة من سكريات التمور في الوسط الغذائي على إنتاجية سلالات الخمائر المختلفة، حيث يوضحان إنتاجية هذه السلالات والمحسوبة إلى (1%) سكر. أما الجدول رقم (11) فيوضح التحاليل الكيماوية للكتلة الحيوية الناتجة من عصير التمر. أما المخطط رقم (12) فيوضح التصميم الكامل لمعمل الإنتاج لبروتين الأحياء المجهرية من عصير التمر.

أما المخططات (13, 14, 15, 16, 17) فتمثل الطرق العالمية في إنتاج بروتين الأحياء المجهرية من بعض المصادر الأخرى.

جدول رقم (7)

يبين دراسة تأثير التراكيز المختلفة من السكر للوسط الغذائي على إنتاجية سلالات مختلفة من الكتلة الحيوية الجافة

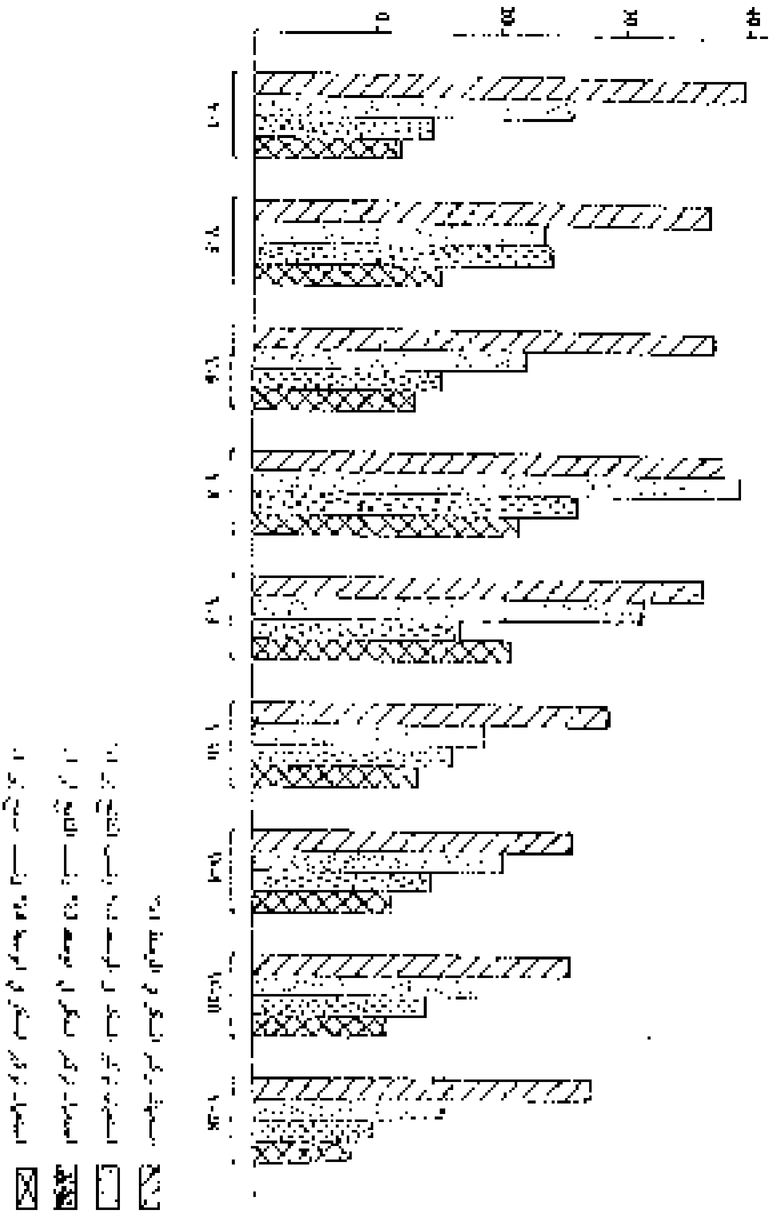
اسم السلالة ورقمها	عصير التمر تركيز 1%	عصير تمر تركيز 2% منسوب إلى 1%	عصير تمر تركيز 3% منسوب إلى 1%	عصير تمر تركيز منسوب إلى
Candida sp. y-1	39.30	25.50	14.19	11.84
Candida sp. y-2	24.20	16.50	15.30	-
Candida sp. y-3	32.87	20.85	14.93	-
Candida sp. y-4	31.70	23.00	21.13	-
Candida sp. y-5	36.67	23.30	23.92	14.99
Candida sp. y-6	36.97	21.95	15.20	13.08
Candida sp. y-8	37.73	39.00	26.36	21.28
Candida sp. y-9	36.17	31.25	16.76	20.56
Candida sp. y-12	21.60	26.90	20.73	-
Candida sp. y-13	15.80	22.50	15.68	-
Candida sp. y-14	29.47	19.45	14.10	-
Candida sp. y-22	34.90	13.40	22.00	-
Candida sp. y-26	19.53	23.65	7.73	-
Candida sp. y-29	19.27	15.67	13.96	-
Candida sp. y-28	27.21	15.15	9.58	7.73
Candida sp* y-10	28.56	18.53	15.94	13.19
Candida sp* y-11	3.86	0.87	-	0.83
Candida sp. y-20	9.83	11.68	10.89	8.65
Sacch.sp. y-21	8.04	12.19	11.24	10.65
Sacch.sp. y-24	15.36	10.62	9.01	7.89
Sacch.sp. y-25	17.36	15.55	10.4	8.78

اسم السلالة ورقمها	عصير التمر تركيز 1%	عصير تمر تركيز 2% منسوب إلى 1%	عصير تمر تركيز 3% منسوب إلى 1%	عصير تمر تركيز منسوب إلى
Sacch.sp. y-27	18.31	13.87	10.70	10.72
Sacch.sp. w-1	14.77	16.87	14.68	10.83
Sacch.sp. w-2	22.45	14.03	12.63	10.11
Sacch.sp. w-3	20.36	15.74	12.73	10.10
Sacch.sp. w-4	20.01	14.90	15.05	8.65
Sacch.sp. w-5	20.04	15.09	12.97	8.95
Sacch.sp. w-6	4.15	12.08	12.55	6.48
Sacch.sp. w-7	22.09	13.28	11.62	9.36
Sacch.sp. w-8	25.54	20.01	14.40	11.25
Sacch.sp. w-9	21.19	16.80	14.52	11.14
Sacch.sp. w-10	25.40	18.06	13.96	10.53

(*): عزلات محلية من عصير تمر متخمر.

جدول رقم (8) يبين التحاليل الكيماوية للكتلة الحيوية
للسلالات التسع المنتجة ذات الإنتاج العالي
والتي جمعت في تركيز (1%) سكر وبالمحتوى الملحي
($0.6\%\ K_2HPO_4$ $0.31\%MgSO_4\ 7H_2O$ $0.05\%NH_4SO_4$)

السلالة ورقمها	الكتلة الحيوية %	رطوبة %	الرماد	N النيتروجين الكلي gm/100gm %	البروتين الكلي Nx6.25 %	الأحماض الأمينية % gm	الأحماض النووية الكلية 00
Candida sp.y-10	39.40	2.42	7.05	5.66	35.37	30.80	00
Candida sp.y-5	36.67	2.10	6.03	7.29	45.59	40.00	00
Candida sp.y-4	36.97	2.72	7.53	6.58	41.11	28.90	00
Candida sp.y-8	37.73	1.53	8.07	6.03	37.64	32.98	20
Candida sp.y-9	36.17	2.04	2.63	7.04	44.01	30.90	50
Sacch sp.y-10	28.56	4.89	7.60	5.84	36.49	42.4	40
Sacch sp.y-8	25.54	4.43	4.86	7.59	47.45	39.20	40
Sacch sp.y-10	25.40	3.91	9.66	8.08	50.53	34.51	40
Rodotorula y-2	27.21	4.30	7.81	34.06	4.95	29.00	50



شكل (25) يوضح تأثير التراكيز المختلفة من السكر على إنتاج الكتلة الحيوية

1 - خزان لمحلول K_2HPO_4

2 - مضخة لرفع كمية NH_4SO_4

3 - خزان لمحلول NH_4SO_4

4 - مضخة لرفع محلول NH_4SO_4

5 - خزان خلط المحاليل المستخدمة مع نسبة التعقيم

6 - مضخة لنقل الوسط المغذي

7 - المخمر

8 - استلام الهواء

9 - استخلاص عنصر ... بواسطة Ethanol

10 - المستخلص المائي للخميرة

11 - الفصل المستمر بالطرد المركزي لفصل الخلايا ثم نقلها إلى خزان رقم 15

12 - فاصل Mermentier

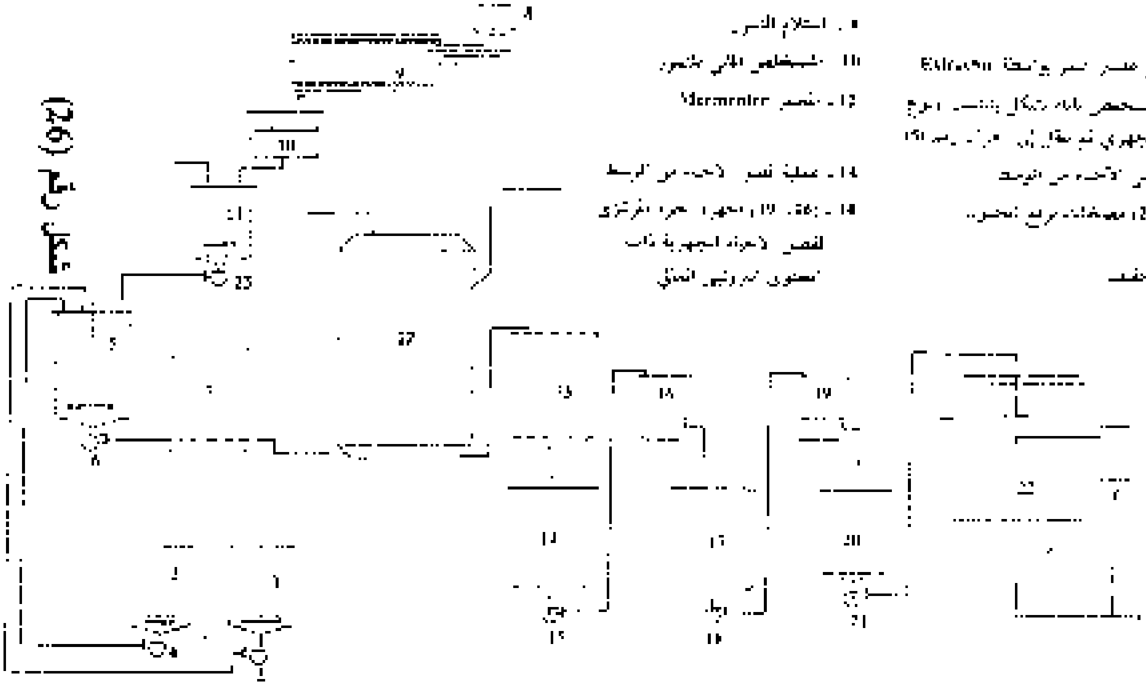
13 - سحب السائل الناتج من الوسط

14 - عملية فصل الخميرة من الوسط

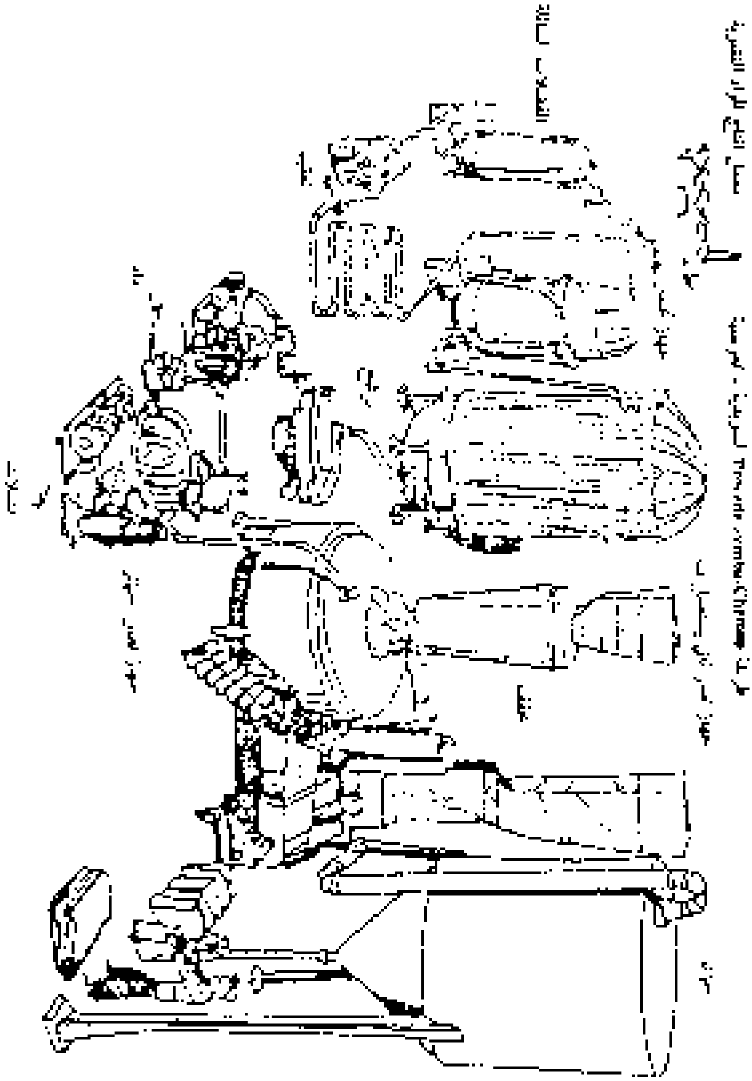
15 ، 16 ، 21 مضخات لرفع المحلول

18 ، 19 ، 20 أجهزة الطرد المركزي لفصل الخميرة ذات المحتوى البروتيني العالي

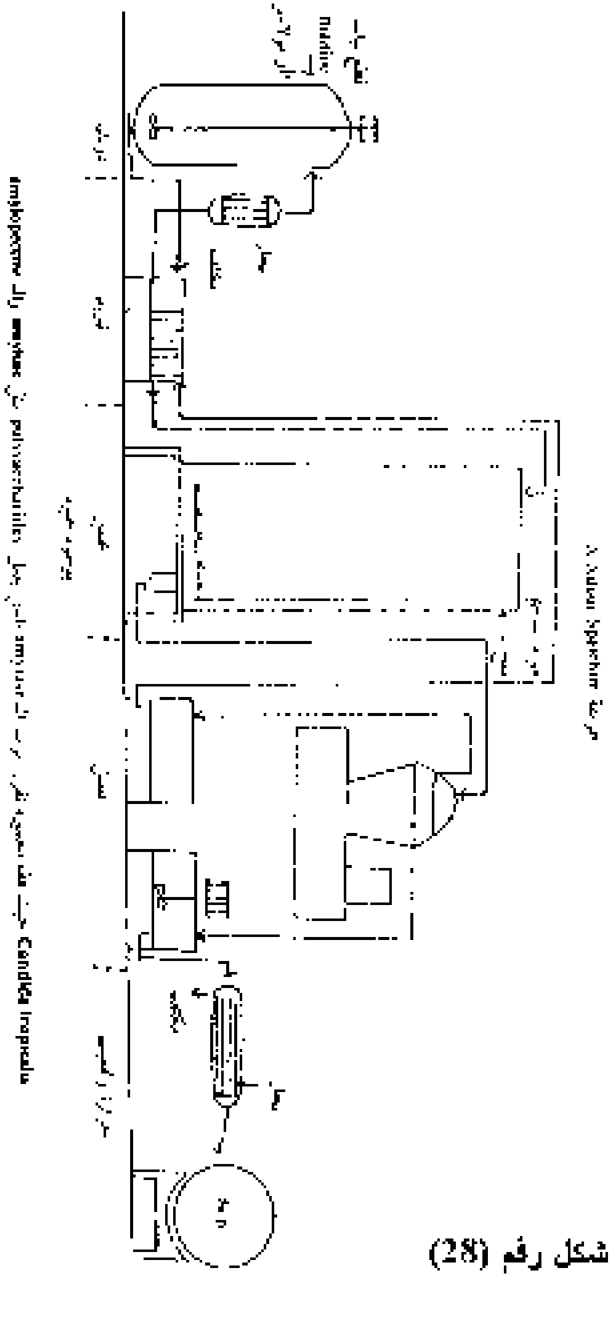
22 - سحب المخلفات



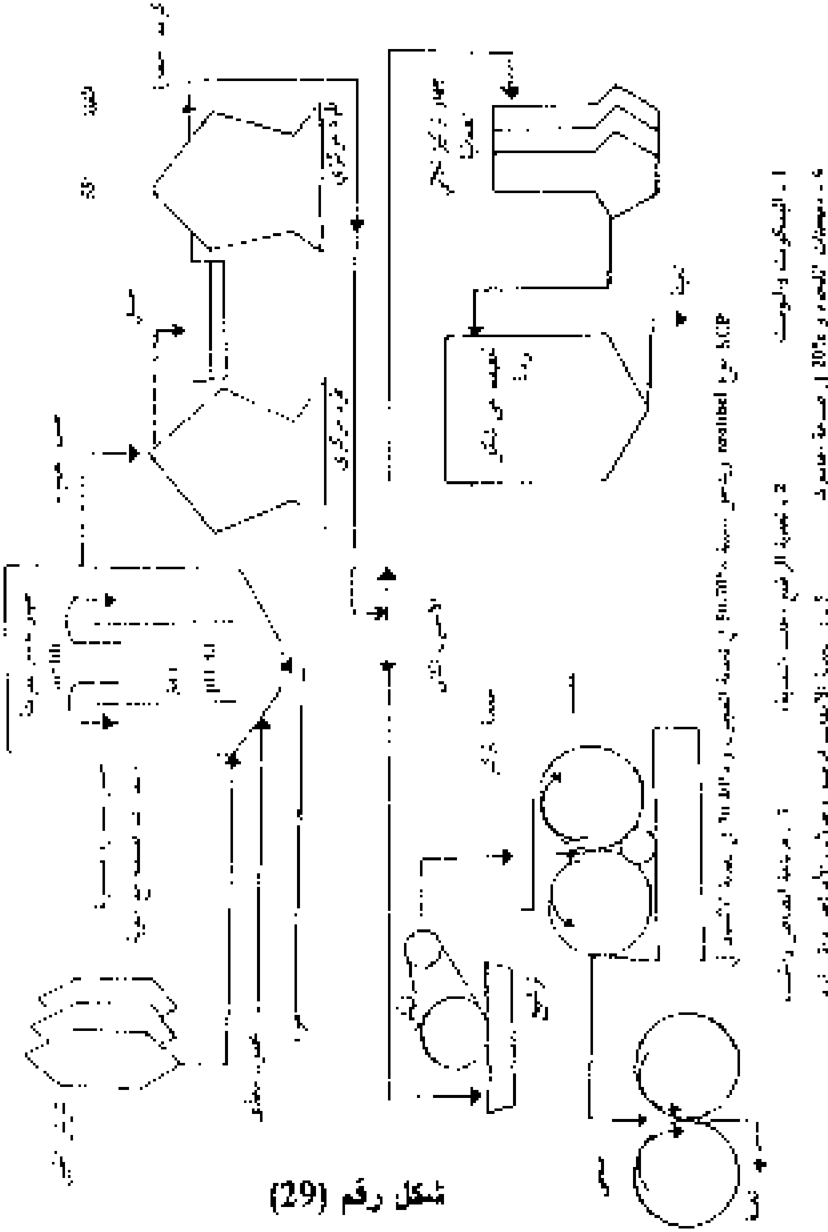
شكل رقم (26)



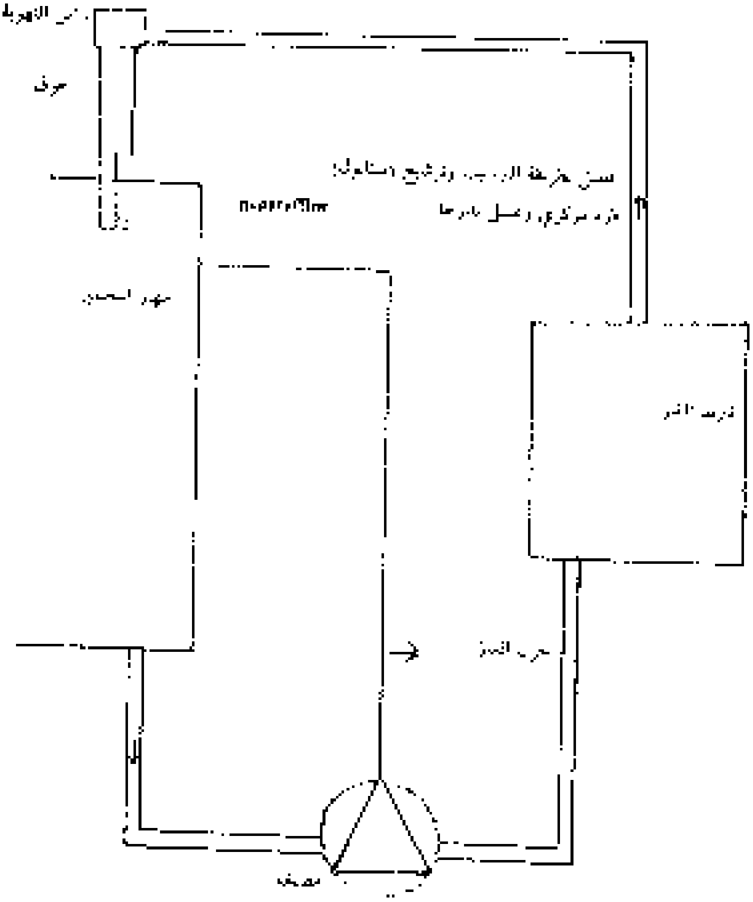
شكل رقم (27)



شكل رقم (28)

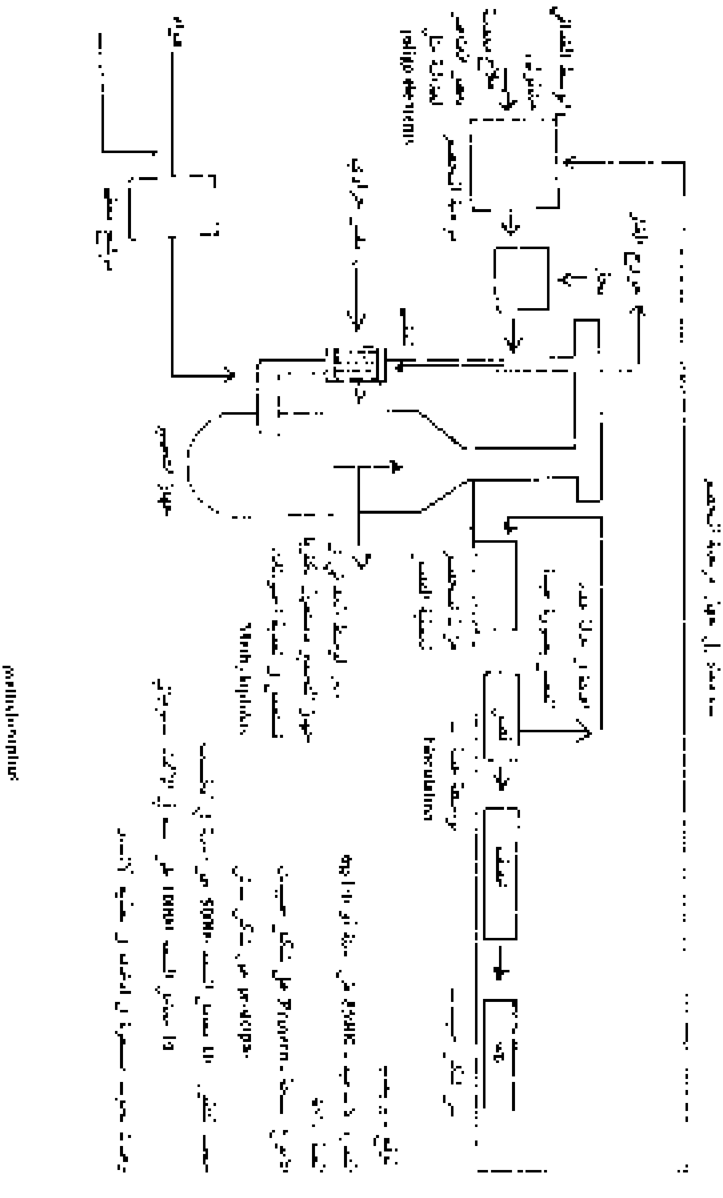


شكل رقم (29)



[illegible]	ميثانول	n-paraffin
الحرارة	35	18
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	0.5-4
[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	40	

شكل رقم (30): طريقة IFP (فرنسية)



شكل (31): طريقة ICI

الفصل التاسع

تقنية إنتاج البروتين من الأعفان
Mold Protein Technology

تقنية إنتاج البروتين من الأعفان:
(Mold Protein Technology)

إنتاج البروتين العفني:

تخليق البروتينات من العفن:

يمكن الحصول على المايسيليوم من السلالات الراقية للعفن بواسطة الزراعة المايكروبايولوجية الإنتاجية (Deep Culture) واستخدامه كمركزات بروتينية للحيوانات أو كغذاء اعتيادي للإنسان، وتم استخلاص أكبر كمية من المايسيليوم من العفن (Taka) سنة (1929) نتيجة لتطور صناعة المضادات الحيوية خلال الحرب العالمية الثانية، حيث وجد أن السلالة (Aspergilus oryzae) تميزت باحتوائها على (38%) من المواد الجافة بروتين بالإضافة إلى احتوائها فيتامين (B Complex).

وأثبتت الدراسات الأخيرة لنوع الأسبركلس وجنس البنسليوم Aspergilus and Penellium احتوائه على جميع الأحماض الأمينية وبكمية جيدة جدا حيث استعمل في الحرب العالمية الثانية كغذاء أو كعقار طبي إضافة إلى احتوائه على المقومات الصحية للإنسان والمتوفرة في المايسيليوم (Rhizopus, Candida, Fusaruim) ولكن لم يتم استعمال المايسيليوم (1954 Fisher) من قبل الإنسان بجميع أنواعه والحاوية على المثيونين.

أثبتت الدراسات الجارية على مايســيليوم (Rizopus) والفيوزاريـم (منيشـن 1945) في احتوائه الأخير على البروتين أكثر من خمائر الخبز، وفي نفس الوقـت تم الحصول على مايسيليوم بعـض الأنـواع مـن ال(Aspergillus) والبنسـليم (Penecillum) (woolley 1938) حيث وصل إلى (50%) في (Aspergillus) لبعض الحيوانات، أما بالنسبة لكميات (Toxic matter) فهي قليلة.

إن مستخرجات العفن ومايسيليوم العفن هي مواد محددة لتخليق المضادات وهذه تقودنا إلى فكرة الحصول على العفن الراقي بواسـطة الزراعـة العميقـة Deep Culture، والتهوية والخلط والتحريك (فرمنتور). تستعمل الفضلات الخارجة مـن صناعة التعليب أو الألبان أو المواد الزراعية الخام في تكويـن الوسـط الغذائـي (المزرعي) يمكنه الحصول على منتوج واحد بمستويات جيدة ونوعية حسـنة فـي الظروف المثالية للتربية العميقة (Deep Culture) فيقدر الإنتاج السـنوي للعفـن الطازج بحوالي (75 80) ألف طن من عمليات التربية العميقة للعفن الراقي.

يمكن إنتاج المايسيليوم من وسـط سـائل حـاوي انيوليـن (Inolin) وهـذه المؤشرات الأولية من قبل (Fron 1905) وفي نفس الوقت تم في أمريكا دراسـة العوامل والعلاقات على المزارع لإنتاج المايسيليوم مـن (A. Campestris) فـي وسط غذائي سائل (Duggar 1905) يعتبر السكوربنتول مصـدر للكربـون كمـا يمكن افتراض بعض السكريات البسيطة مصـدر للكربـون حيـث أن الكربـون والنبتونك هي مصادر جيدة للنتروجين من أملاح الأمونيا، أعـاد سـتاير (Styer) (1928-1930) تجربة ال(Duggar) واكتشـف أن العفـن يظـهر قليـل مـن

المايسيليوم في حالة كون تركيز السكريات قليل في الوسط المستخدم حيث يتم في حالة التركيز (0.2 M) أما إذا وجدت أملاح الأمونيا بتركيز أكثر من (0.1 M) فقد أوضح (Duggar) وكذلك ستاير بنفس الوقت أن الـ(A. Campestris) تنمو بصورة جيدة في حالة تراكيز الأملاح اللاعضوية (مثل الفوسفات) بين (0.015-0.1 M).

وأوضحت دراسة (Treschow 1943) الاحتياج السلفاتي (K • M) (Mg^{+2}) حيث تكون بتركيز (0.01-0.2 M) وتأثيرها على نمو الـ(A. Campestris) فاكتشف دومر تأثير (K^{2}) ونسبته على الميسيليوم نتيجة علاقته بعوامل النمو وتأثير السمي على نمو المايسيليوم مثل (صوديوم بنزوات) وفيتامين (B5) على (Pasliota hortensis) ومن الدارسين للعفن الآخرين (Lembert سنة 1938) الذي استعمل طريقة الزراعة العميقة (Deep culture) للعفن الراقي حيث وجد أن مايسيليوم الـ(A. Campestris) يمكن زرعه بهذه الطريقة وكذلك (Hamfeld سنة 1948) على (Agaricus Campestris) و Brock سنة 1951) الذي قام بزرع (Morchella esculents fries) على الأوساط السائلة أما في سنة (1952) فقد تم زراعة (A. Campestris) في (25) لتر فرمنتور وتم الحصول على صناعة رخيصة واقتصادية لهذه الأنواع من العفن من قبل Humfeld and Sugihara.

الزراعة العميقة (Deep Culture) (هامفلد):

حيث استعمل طرق عديدة للتربية العميقة للعفن (Deep Culture) مع توفر الظروف الجيدة والمناسبة ففي هذه الحالة فإن الحصول على المادة وبنفس المحتويات للعفن في الظروف الطبيعية يكون صعب. (1955 Bushnell) حصل على الكربون من الكلوكوز في المايسيليوم في درجات التحول المعنية وفي أنواع مختلفة من العفن (50) نوع، واختلافها في حدود (10%) عند (verpa conica) إلى (93%) عند (Boigaria Inguinas) واستعملت الأنواع التالية من العفن الكلوكوز بتراكيز (20, 90, 48, 16, 37, 33%) وهذه الأنواع هي
(M. hybrida) (Boletus Inguinams) (M esculenta) (M doliciosa) (Morchella crassipes) (Agaricus rodmanii).

استخدم (Szuecs) سنة (1956) عدة طرق لتصنيع مايسيليوم العفن من ال(Morula) وقد فرض كل من (Robinson and Davidson) سنة(1956)الحصول على مايسيليوم ال (M. horlenin) (M asculenta) (Morchella crassipes) (1963 Litchfield).

أنواع العفن في التربية العميقة (Deep Culture):

تنتج الأنواع الكثيرة من العفن بالتربية الإنتاجية (Deep Culture) للحصول على مايسيليوم العفن ومنها (Agaricus sp) (Morchella sp) (Imaciumll burtierum, polyporus squamosus) والتي تم زرعها في ظروف صناعية أو شبه صناعية وخصوصا ال(Morchella sp.) وذلك لإنتاجية على نطاق صناعي. ومن الجدول التالي نلاحظ أن الكثير من الأعفان الراقية تتم زراعتها بالطريقة الإنتاجية(Deep Culture) للحصول على مايسيليوم العفن:-

الجدول رقم ( ):

التركيز	نوع الوسط	الفطر
5.0	L كلوكوز. D كلكتوز. مالتوز. D مانتور. سكروز. D كسيلوز. دكستران. D سالان. سكوزيبال الاثيب. D فركتوز	A. campestris
2.5-00	D كلوكوز	
5 0	5.0 مولاس القصب	
3 0	مستخلص الذرة	
6 0	مولاس البنجر	
5 0	D كلوكوز	A. blazei
1 5	السائل السلفتي	
6 0	شرائح القصب	Polyporus
	مولاس القصب	squamosus
6 0	مولاس القصب	Canthorellus erbarius
0.47	D مستحلب الفول	Tricholoma nudum
0 5-2.02	السائل السلفاتي المعامل	Morchella hybrida
	D كلوكوز	Morchella crassopes
2.5-5	لاكتوز. مالتوز	M. esculenta
4.0	شرش الجبن	M. hortensis

التركيز	نوع الوسط	العفن
5.0	مولاس القصب	M. esculenta
	سكروز، D- كسيلوز	
30	مستخلص الذرة	
12.0	مولاس القصب	
2-6	D كلوكوز	Coprinus comatus
5.0	D كلوكوز	Pleurotus ostreatus

الموديلات المختبرية للإنتاج:

كتب الكثير من العاملين في المختبرات المتخصصات والطرق المستخدمة في الحصول على المزارع الإنتاجية للعفن (Deep Culture) في فرمنتور (Humfeld and Sugihara)ل واستعمل الأخيران الـ(ferbahol Fermanter) لزراعة (A. compestris) في وسط حجمه (2) لتر ودرجة حرارة (25 م) وفترة حضانة (5–6) أيام مع التحريك والتهوية.

كانت المزرعة المستعملة للحضن في الفرمنتور ذا الوسط الحجمي (20) لتر كلوكوز، درجة خلط (400) دورة/ دقيقة، سرعة التهوية كانت (200) سم/دقيقة وحجم الهواء/ حجم واحد/ دقيقة/ لحجم واحد من الوسط.

ينتج الوسط كمية أكبر باستعمال (2-3) حجم هواء/ دقيقة/ حجم واحد من الوسط عند التهوية، فينتج حوالي (100) غم مايسيليوم مع (80%) رطوبة لكل لتر من الوسط الغذائي الذي تركيزه (5%) سكر.

تمت عملية التلقيح سنة (1960) من قبل (Cirilo و Hardwick) تجريبيا في أحد المختبرات الصناعية المعقدة الشبه صناعية وبحجم (20) لتر والحاوية على السائل المتفاني ودرجة التهوية هي (0.25-5.0) حجما هواء/ دقيقة لفترة (8) ساعات في فرمنتور لتهويته (10%) فتم الحصول على منتوج عظيم.

تكون الزراعة الصناعية للعفن الراقي والمعروف رسميا في أمريكا عند المشتغلين في معهد باثال العيموران هي في فرمنتور حجمه (8م) وذا وسط غذائي حجمه (4.5-5م) والحضن لمدة (72) ساعة عند درجة حرارة هي (25 م) فتم الحصول على (2طن) مايسيليوم عفن، ثم العمل الآن وبطرق صناعية جديدة لحضن العفن الراقي في كثير من الدول.

طرق تحضير وتنمية المزارع العفنية:

يمكن لمزارع المايسيليوم العفنة أن تطرح منتوج وذلك بحضنها على أوساط غذائية أكرية صلبة...الخ حيث تنتشر في أطباق (pitridish) فتنمو الأعفان البوغية من خلال هذه السبورات على وسط جانك أو أي وسط آخر المهم أنه يعطي النمو الأعلى (minimum media) يستعمل خليط البنسلين والتريتومايسين في عملية التكوين العكسي ويمكن الحضن عند درجة حرارة (25-30 م) ليتم الحصول

ليس على الأجيال والمستعمرات فقط ولكن أيضا الحصول على المزارع النقية بواسطة السبورات من أنسجة اسبوركارب النسيجي وهذه تنمو بدورها بصورة بطيئة جدا (مدة 25 يوما) إضافة إلى أن نسبة السبورات تكون قليلة جدا (Stoller 1954).

يمكن تكوين مزارع نقية من العفن ومايسيليوم العفن وذلك بالتعقيم والزراعة أو التلقيح لمايسيليوم العفن. يكون مايسيليوم العفن بحجم الثمار وعند زراعته على أوساط غذائية صلبة ويكون نموه جيدا في الأوساط الأكرية عموما.

العوامل المؤثرة في المزارع الإنتاجية:

يمكن استعمال مختلف المواد الأولية لأجل الإنتاج الصناعي للمايسيليوم العفني والمصادر الأولية (الجدول السابق) ويكون تركيز المواد الغذائية الأساسية على طريقة التقدير (التجربة) في المزارع الصناعية.

يعطي وجود الكربوهيدرات (والذي يعتبر من العناصر المهمة والأساسية) لتوفر الظروف الجيدة لكونه عامل مهم في تكوين مادة الخلية. ينمو العفن بصورة جيدة في تركيز كربوهيدراتي يتراوح ما بين (2–6%).

تستهلك الكثير من أنواع مايسيليوم العفن السكريات المعقدة والبروتينات بسرعة لذا يجب أن تكون (السكريات والبروتينات) بشكل بسيط (غير معقد) في الوسط ويفضل كونها متحللة كي يسهل هضمها واستهلاكها ببساطة من قبل العفن.

يمكن للعفن أن يأخذ النيتروجين من المركبات الغير عضوية مثل (NH_4Cl) أمونيوم سلفات و $(NH_4)SO_4$ وأمونيوم فوسفات وأمونيوم نايتريت ونترات البوتاسيوم ونتريت البوتاسيوم.

أما المصادر العضوية فمنها اليوريا، يمكن الاستفادة من تحلل البروتينات والأحماض الأمينية أو مستخلص الخمائر الغني بالأحماض الأمينية وكذلك عن مستخلص الذرة أو ($(NH_4)_2HPO_4$) الذي هو ضروري لتعديل الـ(pH)، بضم المصادر الآزوتية العضوية وغير العضوية من حيث أنواعها والأحياء التي تعيش عليها وذلك لتركيزها النتروجيني المناسب.

العلاقة بين كمية الكربون والنيتروجين (C: N):

تلعب العلاقة بين (C: N) في الأوساط الغذائية دورا مهما في الزراعة الجيدة وفي تنمية الميسيليوم العفني حيث توفر له ظروف الحركة وهذه تعتبر مهمة نسبيا فمثلا (Agaricus Campestris) و (NRRL 2335) في وسط غذائي مؤلف من الكلوكوز ونترات الأمونيوم بنسبة (معدل Range) (73.3:1-20:1) ولكن حسب ما قاله (Reusser 1958) أن أحسن نسبة كانت عند (25:1-20:1) والأصناف الأخرى المختلفة (NRRL 2335) مصطفى (Moustafa 1960) لأنواع (Morchella).

وتكون العلاقات نفسها مختلفة.

كذلك (M. hybrid cray 149) حيث معدل النسبة من (16.1) إلى (73.3:1) حيث أعطت أعلى إنتاج عند (20:1-16:1) (Reusser 1958) ثم النمو بالنسبة لـ(M. hortensis) (في الوسط الحاوي على كلوكوز وفوسفات الأمونيوم) بصورة جيدة عندما كانت النسبة بين (C/N) من (3:1) إلى (30:1) وكان أعلى إنتاج لهذا النوع في حدود (5.1) (Litchfield 1963) وخاصة في الوسط الحاوي على مستخلص الذرة وهذا مهم للعفن (Agricus sp) و(Morcheila sp) اللذان ينموان جيدا في الأوساط المؤلفة، أما بعض الأنواع مثل (Coprinus Comatus) فتحتاج إلى ثيامين (Eddy 1958).

درجات الحرارة المثالية للأعفان التالية هي:-

Agaricus Compatis	16-35 c	25 c
Morchella Sp.	2-28 c	12-22 c
M. esculenta	10-36 c	25 c
M. hortensis	4-27 c	25 c
M. crassipes	4-27 c	25 c

يعمل العفن بأحسن صورة عند (pH) بين (5.0-7.0) ويوضح ذلك في الجدول التالي.

سترتفع الـ(pH) في البداية وتبقى في حدود (1.5-2) في الوسط الغذائي المحتوي يوريا (2630–3500) ملغم، وكما هو معروف أن المايسيليوم عبارة عن مجاميع من الهايفا.

العفن	الوسط الغذائي	مجال (pH)	المثالي (pH)
A gaicus blasei	كلوكوز -وسط تاليفي	3.5-7.5	
A. campeshis	كلوكوز اوسط تاليفي	4.0-8.0	6.8-7.8
Morchella esculenta	كلوكوز -وسط تاليفي	6-8	6.5
Triboloma nudum	كلوكوز اوسط تاليفي	2.5-6.5	3.0-5.0

مقومات المايسيليوم العفني:

نلاحظ من التركيب الكيماوي للمايسيليوم العفني والعربي صناعيا مثل (A. Campestris) وهو مقارب إلى مقومات أو ظروف تربية العفن عند (Mor.Sp.).

محتويات البروتين لل(A. Campestris) كما هو موضح في الجدول اللاحق.

يبين الجدول محتويات كل مايسيليوم من الأحياء المتنوعة (Fungi) بالنسبة للنيتروجين، البروتين، الكربوهيدرات، الرماد.

يبين إنتاج المايسيليوم الفطري من البروتين

في أوساط مختلفة:

نوع الفطر	وسط غذائي مايسليوم غم/دسم	إنتاج المايسيليوم (كمادة جافة) غم مايسليوم/100غم سكر	محتوى البروتين كمادة جافة
Agaricus blazei	15.2-26.6	41.0-51.0	32.50
Agaricus campestris	3.4-17.2	19.2-87.4	14.5-44.6
Boletus Indecisus	3.6-20.8	34.3-150.0	14.7-34.1
Morchella crassipes	0.75-8.02	27.8-48.6	29.8-30.6
M. esculents	0.85-7.42	32.1-50.4	29.6-31.1
M. hartensis	1.23-8.65	33.5-49.0	32.2-35.2
M. hybrida	4.10-29.6	31.2-89.1	10.5-48.3
Trichaloma nudum	3.52-16.7	33.4-130.0	27.9-54.6

فمثلا من (4.5-6 أو 6.5) وبعد نهاية (24) ساعة من الحضن وعند تركيز (N) نلاحظ انخفاض قيمة ال(pH) عند استهلاك الأمونيا وزيادة الأحماض بعد انفصال بعض الأيونات وأثناء نمو مايسيليوم الفطر الذي يتم في وسط مثل (SO4- PO4-Cl) عند الزراعة.

نلاحظ أن ال(A. campestris) اثناء تواجدها في وسط مع أملاح الأمونيا فبن ال(pH) تزداد من (7.5-6.1) و (4.6-4.4) وفـــي ال(Morchella hortensis) من (5.1-6.5) أو (5.2).

نلاحظ هناك علاقة رابطة بين التهوية والخلط والمنتوج في المزروع لعفنية كما يظهر في المثال التالي على إنتاج مايسيليوم ال(Morchella hortensis) بالطريقة العميقة (Deep Culture) الذي حصل عليه بإنتاج كبير وعالي عند تهوية دقيقـــة الوسط (mO2/L) (0.08m).

وحصل على أعلى إنتـــاج بالنسـبة لـــ(A. campestris) عنــد التهويـــة (0.2/mO2/لتر/دقيقة) (مصطفى) (Moustafa 1960).

إنتاج مايسيليوم العفن (Fungi):

يعتمد إنتاج مايسيليوم العفن على معرفة نوع الزراعة ومقومات الوسط الغذائي وظروف الزراعة.

يعطي الوسط المثالي المحتوي أعلى إنتاج للعفن في المصادر الخام التالية:

الأحياء	المادة
A. blazei	مستخلص الذرة
A. campestris	مولاس القصب
B. Indecisus	السائل المنقاتي
M. Hybrida	مولاس القصب

تختلف فترات الحضانة وجودتها بالنسبة للأنواع:

M. hertensis	4.5-6.0	يوم
M. creassipies	6.5-7.5	يوم
M. esculenta	5.5-6.0	يوم

يكون الوسط الحاوي جلوكوز ومواد أولية حية، لاكتوز، ينتج في بعض أنواع الطحالب. يوجد اختلاف كبير في الإنتاج للأنواع المفضلة وهذا ناتج لاختلاف المواد الغذائية الأساسية المستعملة في المزارع مثل (مسولاس القصب، مولاس البنجر، الجلوكوز، فول الصويا، مالتوز، مواد سريتا، مستخلص الذرة، وسط غذائي، مستخلص المالت).

الأحماض الأمينية التي يحتويها بروتين العفن:

ألنين، ارجنين، اسبارجين، لستين، لكوثاتين، كليسين، هستزين، ايزوليوسين، ليوسين، ليزين، ميثونانين، فينل الين، بروتين، سيرين، ثيرونين، تربتوفان، تربتوون، فالين.

المحتوى الفيتاميني لمايسيليوم العفن:

وجد أنها غنية بالفيتامينات كما يظهر في النوع (Sporoforitio) وخصوصاً فيتامين (B5) الذي يكون أكثر من المايسيليوم بحوالي (4-7) مرات وكذلك محتوى فيتامين (B6) (A. campestris, sporophente) يحوي من (2-25) مرة أكثر من فيتامين المايسيليوم.

المصادر السليلوزية وإنتاج البروتين الخلوي من الأحياء المجهرية:

تعتبر المصادر السليلوزية على اختلاف مصادرها- مخلفات صناعة الأغذية/ سيقان نباتات الذرة، الشعير والقمح وكذلك كرب وتجريد، نوى التكسور، الورق والعزوق مصدراً جيداً لتنمية الأحياء المجهرية الصناعية، بكتريا، أعفان، وهذا لا يتم إلا بعد معاملة المصدر السليلوزي بالأحماض المخففة أو القواعد وبتراكيز تتراوح ما بين (2-4) عياري وعند درجة حرارة (126) ولمدة ساعتين.

وبعد ذلك يمكن تنمية الأحياء المجهرية من نوع (Saccharomyces sp.) (Candida utilis) (Aspergillus oryzae) (Asp. niger) وبكتريا (Cellulmonas Flavigena) وفي أوساط غذائية تحتوي على المصدر النيتروجيني والفسفوري وقد أعطت نتائج جيدة بإنتاج البروتين وعند درجة حرارة (25-28 م) و (pH) (5.0).

الكائن المجهري	نوع السليلوز	كمية البروتين المنتج
Cellulomenas Flavigena	سليلوز الذرة	%20.57
	سليلوز الشعير	%18.7
Candida utilis	سليلوز سعف النخيل	%20
Saccharomyces	سليلوز سعف النخيل	%25

الفصل العاشر

تقنية إنتاج الدهون من الأحياء المجهرية

(Production of lipid by Microorganism)

إنتاج الدهون من الأحياء المجهرية:
(Production of lipid by Microorganism)

المقدمة:

نتيجة لتزايد الطلب على الدهون والزيوت من المصادر التقليدية بشقيها النباتي والحيواني؛ وذلك لتنوع الأغذية المصنعة والجاهزة وكثرة استعمال الدهون في إنتاج الحلويات والعقاقير...الخ، رغم التطور الحاصل في إنتاج الزيوت والدهون كما ونوعا من السمنة الحيوانية إلى زيت فول الصويا وزيت عباد الشمس وزيت نوى النخيل وزيت الزيتون وزيت بذرة القطن وزيت جوز الهند، وزيت السمسم وزيت الأسماك والشحوم الحيوانية.

ورغم التطور الكبير في مجال إنتاج الزيوت، لكن كلفة إنتاجها عالية وبذلك نجد أن أسعارها لا زالت عالية، لذا قام الكثير من الباحثين بالبحث عن مصادر جديدة سريعة الإنتاج وذات كلف واطئة، خصوصا العاملين في مجال البيوتكنولوجي فاختبروا سلالات مختلفة من الأحياء في إنتاج الدهون من الأحياء المجهرية نتيجة سلوكية هذه الأحياء في بعض النبات الزرعية وتحت ظروف مثالية من درجة الحرارة إلى تهوية، إلى تراكيز من العناصر

وأثبتت هذه الاختبارات بأن المواد الخام التي تصلح لإنتـــاج بروتيـــن الخليـــة الواحدة (Single cell protein) تصلح أيضاً لإنتاج الدهون، وكـــان أول إنتـــاج للدهون من قبل الألمان أثناء الحرب العالمية الثانية.

الأحياء المجهرية المنتجة للدهون:

بدأت الدراسات في إنتاج الدهون من الأحياء عام (1914-1919)، وكان أولـــها إنتاج الدهون من (Endomyces vernalis) حيث أعطت إنتاجا يقـــدر بـ(42%) لبيدات وعند ظروف مثالية للإنتاج وفترة تخمير (72) ســـاعة، ودرجـــة حـــرارة التخمير (15-20 م)، وفي بيئة كربوهيدراتية مع الأخذ بعين الاعتبار خلوها مـــن المصدر النيتروجيني.

أما (Moyer and Coghill) فكانت عملية التخمر تأخذ وقتا (7) أيـــام. أمـــا (Ratledge 1976) فقد أشار إلى إنتاج الدهون من الســـلالة (Candida utilis) عند وســـط كربوهيدراتـــي ودرجـــة حـــرارة (30 م). كمـــا وجـــد أن الســـلالة (Rhodotorula gracilis) يكون إنتاجها يتميز عند تحقيق الـ(pH) المثالي والذي يتراوح ما بين (pH 6-3).

أما (Enboetal 1946) في تشكوســـلوفاكيا (Kleizeller 1948) في السويد، حيث وجد الأول بأن (Rhodotorula gracilis) تنمو في وسط بيئي غني بـــالمواد الغذائية وبالنيتروجين وكذلك (Kleizeller) وجد بـأن (Torulopsis Lipofara) هي الأخرى تنمو وتنتج الدهون وبوجود النيتروجين، وعلى العموم فإن الســـلالات المنتجة للدهون وبنسبة (50%) من الوزن الجاف هي:-

(Rhodotorula, Cryptococcus terricolus, Aspergillus terreus, Gracilis. Mucor, Cireinellondes, Chaetomrum gloosum)
ومن الأعفان السلالة (Rhizopus nigricans) .

أما الطحالب فهناك الكثير وخصوصاً الجنس (Microcystis) وجنس (Anabaena) وهي من طحالب المياه الحلوة وكذلك جنس (Voltuex) و (Spirogyra) و (Cladoppera)، أما البكتريا فلا يمكن استغلالها لأن كميات الدهون قليلة.

والجدول التالية توضح نسبة الدهن في بعض الطحالب وكذلك نسبة الدهون في (Chlorella pyrenodosa):–

جدول الحموض الدهنية التي وجدت في بعض الأحياء (بكتريا):

حموض عادية مشبعة	حموض متفرعة	حموض هيدروكسي	حموض غير مشبعة
بيوتريك	—	—	
كابرويك	—	-	—
لوريك			-
ميرستيك	-	—	
ستياريك	تيوبركلوستياريك	داي هيدروكسي ستياريك	أوليك وليتوليك
بالمتيك	—	—	9هكسا- ينويك
أراكيديك	فثانويك	—	ديفتريك

عن: (Chargolf 1933 and Goris 1920) و

.(1938 Crowder and Anderson)

ليبيدات Chlorella pyrenoidosa النامية في ظروف تجريبية مختلفة Milner 1948	
الليبيدات الكلية % من الوزن الجاف	75.5-23.2
الحموض الدهنية % من مجموع الليبيدات	86.8-28.0
الدهون % من وزن النبات	68.6--6.8
المواد غير القابلة للتصبن %	12.0 03.3
المواد الذائبة في الجزء المتصبن%من الليبيدات	60.0-09.9
الرقم اليودي (هانس)	163.1-125.3
الوزن المكافئ	274 1 269.5
نسبة حمض البالميتيك%من مجموع الحموض الدهنية	3.5-0.4
C16 غير مشبع%من مجموع الحموض الدهنية	29.0-18.0
C18 غير مشبع%من مجموع الحموض الدهنية	67.1-53.9
درجة عدم التشبع لـC16 غير المشبع	من-4.1إلى-H04.4
درجة عدم التشبع لـC18 غير المشبع	من-3.4إلى-H4.5
درجة عدم التشبع لـC16+ C18 غير المشبع	من-3.2إلى H3.6

مستخلص الايثير لبعض أنواع الطحالب البنية
(Brown algae [Haas & Hill 1933])

النوع	البيئة	نسبة مستخلص الايثير% من الوزن الجاف	نسبة الدهن الحقيقي %
Pelvetia canaliculata F libera	مستنقع ملحي	8.64	8
Pelvetia canaliculata	رذاذ ماء	4.88	4.9
Fucus vesiculosus ecad volubitis	مستنقع ملحي		
Ascophyllum nodosum	ساحلية متوسطة	2.87	
Himanthalia lorea	ساحلية منخفضة	1.21	
Laminaria digitata	تحت ساحلية	0.46	0.3
Pellargophycus	تحت ساحلية	0.27	
Nereocystis	تحت ساحلية	1.06	
Laminaria andessonii	تحت ساحلية	0.65	

صفات المستخلص الايثيري من المادة المجففة من مرحلتين

من مراحل نمو الفطر [Kiesel 1927]

الصفة	مرحلة (كتلة لزجة ليس بها جراثيم)	مرحلة الجراثيم غير الناضجة
نسبة المستخلص%من الوزن الجاف	40.1	35.1
رقم الحمض	14.9	23.5
رقم التصبن	193.2	198.4
الرقم اليودي	102.5	112.0
نسبة الحموضة الدهنية%	86.6	83.2
المواد غير القابلة للتصبن%	04.4	6.3
كوليسترول نقي %	3.0	3.9
الجليسرول %	07.7	7.1
الفسفور	-	0.01
السكريات	أثار	أثار
الحموض غير المشبعة%من مجموع الحموض الدهنية	87.8	89.4
الحموض المشبعة%من مجموع الحموض الدهنية	12.2	10.6

صفات الدهن المستخلص من بعض الخمائر [Eckey 1954]

Yeast no.72	Rhodotorula gracilis	Sacchoromyces cerevisiae	الصفة
		نوع الخميرة	
30.0	49.6	6.9	نسبة الدهن% من الوزن الجاف
67.8	–	108.4–28.6	رقم الحمض
205.5	190.0	156.6 109.6	رقم التصبن
62.5	79.0	130.4 61.3	الرقم اليودي
	–	66.4--47.4	ناتج الحموض الدهنية %
2.4	3.1	46.6–19.6	المواد غير القابلة للتصبن%
–	–	7.4	رايخرت ميسل
–		3.4	رقم بولنسكي
–	صفر	7.3	حموض تتطاير بالبخار
0.4	01.1	–	ميريستيك
25.6	29.8	13.5	بالميتيك
5.9	08.8	8.3 4.5	ستياريك
5.1	1.4	–	حموض مشبعة فوق C18
1.3	1.8	–	C16:16 غير مشبع
54.5	40.1	66.9	أولييك
5.7	11.2	4.1	أوكتاديكادي إينويك
0.7	4.8	–	أوكتاديكاتري إينويك
01.1	1.0		C20-C22 حموض غير مشبعة

الفصل الحادي عشر

تقنية إنتاج الأحماض العضوية

Production Technology of Organic Acid

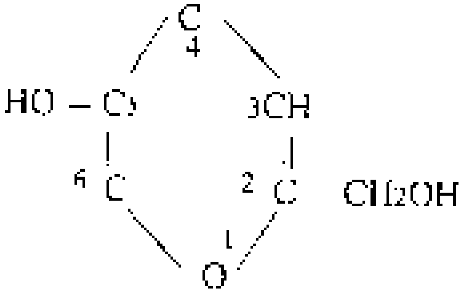
تقنية إنتاج الأحماض العضوية
(Production Technology of Organic Acid)

إن الأحياء المجهرية تتمكن من تكوين حوامض متنوعة وكنتيجة للتمثيل الأيضي والأكسدة للكربوهيدرات، فإنها تنتج الحوامض كحامض الخليك والبروبيونيك وحامض الليمون وحامض الكلوكونيك، وغيرها من الأحماض التي لها تطبيقات واسعة كحامض الفورميك وحامض الكوجيك.

إن للأحماض العضوية استعمالات عديدة في الصناعات الغذائية وفي الصناعة الأخرى.

إنتاج حامض الكوجيك: (Kojic Acid Production)

إن حامض الكوجيك هو (2-hydroxymethyl-5 hydroxy-gamma-pyrone) وله التركيب البنائي التالي:



(Kojic Acid)

ويعتبر (Saito 1907) أول من فصل حامض الكوجيك كمنتوج ثانوي من عملية تخمر الرز بواسطة عفن ال(Asp. Oryzae)، أما (Yabuta 1912) فقد اقترح تسمية الحامض بهذا الاسم.

الأحياء المجهرية المصنعة للحامض:

هناك الكثير من الأحياء المجهرية التي يمكنها أن تؤلف حامض الكوجيك وأهمها:

-: Aspergillus Sp. ومنها

.A. clavatus, A. awamori, A. Flavus, A. gymosardse, A. Aoryzae, A. effusus

وكذلك يمكن إنتاج هذا الحامض من قبل بكتريا ال(Acetobacter) ومن عفن ال(penicilium daleae).

التربية الصناعية:

من المصادر الكربوهيدراتية الأولية المستخدمة في تحضير هذا الحامض هي عصير التمر، السكروز، المالتوز، الجلوكوز، الفركتوز، الدكسترين...الخ، وإن التركيز المثالي للمصدر الكربوهيدراتي هو ما بين (15- 33%) وباستعمال السلالة (Asp. flavus).

وكذلك تم الحصول على أعلى إنتاج لهذا الحامض باستخدام الوسط الجلوكوزي ذي تركيز (20%) وباستخدام الوسط الكسيلوزي ذي تركيز (10%).

مكونات الوسط الجلوكوزي المثالي لإنتاج الحامض:

المواد	الكمية: غم/لتر
$MgSO_4.7H_2O$	0.500
KCl	0.100
H_3PO_4	0.054
NH_4NO_3	1.125
glucose	20

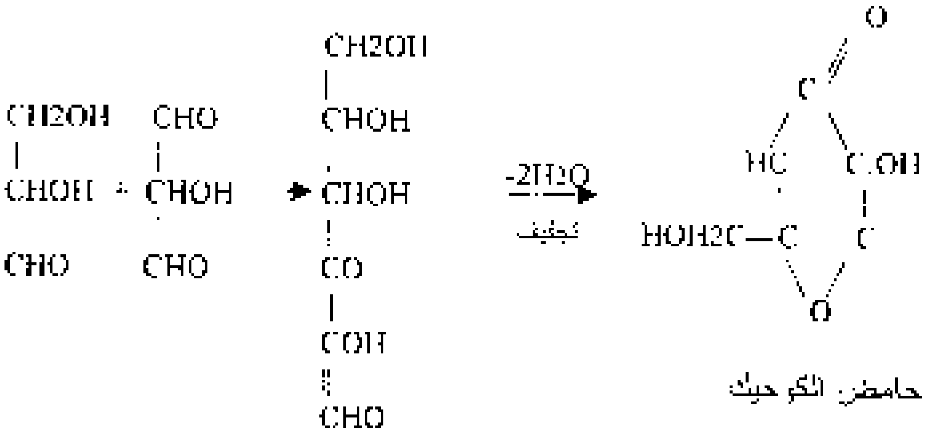
ولقد كان الأس الهيدروجيني للوسط المثالي لإنتاج الحامض هو ما بين (2-5)، أما درجة الحرارة المثلى فهي ما بين (20-35 ْم) بالنسبة للأحياء من نوع (A.flavus) وما بين (30-35 ْم) بالنسبة للأحياء من مجموعة ال (Asp. flavus-oryzae).

وأخيراً فإن أعلى إنتاج لحامض الكوجيك من قبل السلالات المصنعة كان بحدود (50-60%) محسوباً للمصدر الكربوني.

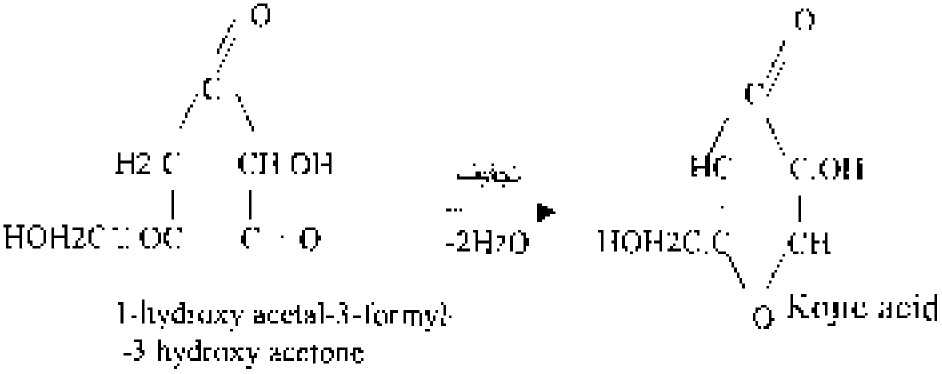
التخليق الحيوي للحامض (Biosythesis):

إن ميكانزم التخليق الحيوي لحامض الكوجيك قد اقترن بقياس نشاط أحياء ال(Asp.oryzae) و ال(Asp. flavus-oryzae).

وهناك العديد من النظريات والاقتراحات لإيضاح ميكانزم إنتاج الحامض. ففي عام (1930) اقترح كل من (Gregorini) و (Corbellini) بأن نواة ال(pyrene) تؤلف من مركبات ثلاثية الكربون. وكمثال على ذلك جزيئان من مركب ثلاثي الكربون تتحد لتكون جزيئة واحدة، وبواسطة التجفيف تتحول إلى حامض الكوجيك.



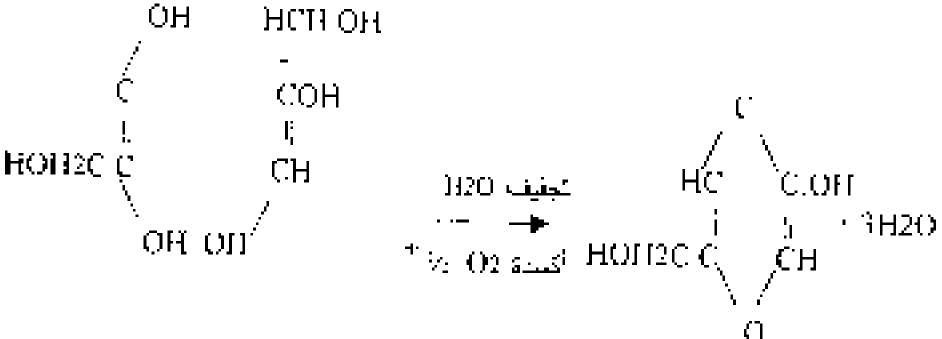
اما (May) وآخرون أوضحوا بأن إنتاج هذا الحامض يتم من بعض المركبـــات التي تحتوي على (2 ,3) ذرات كربون، حيث اقترحوا بأن مركب ال (1-hydroxyacetyl-3 formyl-3-hydroxy acetone) يتحول بالتجفيف إلى حـــــامض الكوجيك، ولكن واجهوا صعوبة في فصل الحامض المتكون.



وفي عام (1931) (Raistrick, Lilly, Charlis, Birkinshaw) اقترحوا نظريـــة ليضاح ميكانزم الإنتاج الحامض، وهذه النظرية تعتمد على حقيقة وهي أن الإيثانول

موجود اعتيادياً في التخمرات العفنية وخصوصاً في العمليـــات التخمريـــة لإنتـــاج حامض الكوجيك، ويلعب الإيثانول دور في إنتاج ال(Acetaldehyde) ومـــا لـــهذا الأخير من دور في تثبيت العديد من الأوساط الغذائية لعفن ال(Asp.oryzae)- وبذلك فإن الإيثانول يزيد من تكوين الكوجيك من المحلول الجلوكوزي باعتباره أحد المـواد الوسطية للتخمر.

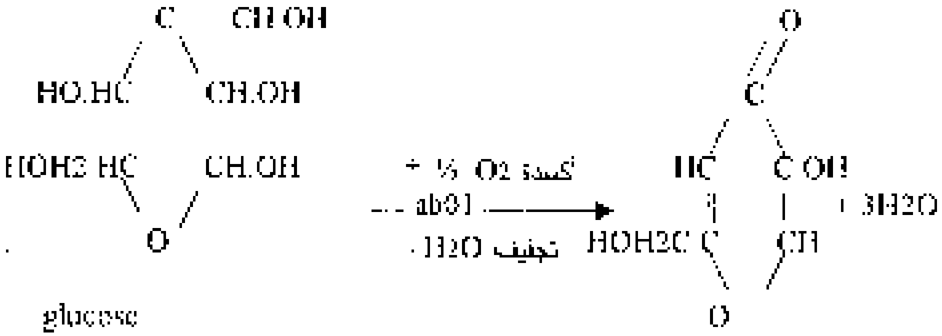
أما (Challenger) وآخرون فقد أعطوا اقتراحـــاً منطقيـــاً لتحضـــير حـــامض الكوجيك من ال(dihydroxy acetone) وبعملية الأكسدة والتجفيف.



dihydroxy acetone

Kojic acid

أما (Yabuta) فوضع إنتاج الحامض من سكر الجلوكوز مباشرة وبعملية الأكسدة والتجفيف:



Kojic acid

إنتاج حامض الفورميك (Formic Acid production):

إن لحامض الفورميك أهمية كبيرة في مجال الصناعة وخصوصا في صناعـــة الراتنجات، (Resins)...الخ. وفي سنة (1958) أعلن (جاكسن) عـــن أول تحضـــير صناعي لحامض الفورميك بطريقة مايكروبيولوجية.

الأحياء المجهرية المصنعة للحامض:

هنالك الكثير من الأحياء المجهرية المصنعة لحامض الفورميك ومنها: (mucor, Cunninghamella, Circinella, Rhizopus) ولكن أهميا هو جنـــس ال(Rhizopus) ومنه:

R. chiuniang, R. chinensic. R nigricans, R. Formosenses. R. Japonicus, R delleniar, R. Niveus. R. ton keniensis,
R. microsporus. R. arhizus. R. tritici

وهنالك الكثير من الدراسات والبحوث التي تشير إلى أحياء أخرى منتجـة لـــهذا الحامض ومنها (Asp fumaricus) حيث أعطت نتاجاً (70%) حامض فورميك عـــن المصدر السكري.

التربية الصناعية:

إن التربية السطحية أو العميقة لإنتاج حامض الفورميك بأعلى إنتاج تتم باستعمال أحياء من نوع الـ(R. Japonicus) وباستخدام وسط غذائي متميز بمركباته، ومن المصادر الكربوهيدراتية المستعملة هي (الجلوكوز، الفركتوز، مانوز، كلاكتوز، مالتوز، سكروز، سليلوز) وتعتبر المولاس مصدرا كربوهيدراتيا جيدا لاحتوائها على السكريات المطلوبة لإنتاج هذا الحامض.

ومن العوامل الضرورية الأخرى والتي تؤثر على إنتاج الحامض هي نسبة الكربون/النتروجين (C/N) في الوسط حيث وجد أن أحياء الـ(R. nigricans) تحتاج (C/N) بنسبة (5:1)، أما أحياء الـ(R. arrhizus) فتحتاج (C/N) بنسبة (100:1).

وكذلك نسبة الـ(N) في الوسط تلعب دورا كبيرا في إنتاج الحامض، فانخفاض نسبة (N) في الوسط يقودنا إلى إنتاج أحماض أخرى أما الزيادة فستؤدي إلى قلة إنتاج الحامض.

أما الأملاح الفلزية فهي الأخرى لها دور في تأليف الحامض من قبل السلالات (R. nigricans, R. oryzae, R. arrhizus)؛ ومن هذه العناصر الـ(Zn) فالتركيز الأمثل له (10) ملغم/ مل، (Mn) بتركيز (20–40) ملغم/ مل، (P) بتركيز (200) ملغم/ مل.

مكونات الوسط المثالي لإنتاج حامض الفورميك

150-50 غم	جلوكوز
2.5-1.2 غم	$(NH_4)SO_4$
0.5-0.25 غم	$MgSO_4.7H_2O$
0.5 غم	K_2HPO_4
0.3 غم	KH_2OP_4
60-25 غم	$CaCO_3$

أما ظروف التربية للسلالة (R. delmar) من درجة حرارة وفترة حضن فـــــهي (٢٨-٣٠ م) ولمدة (١٥-١٨) يوما حيث تم الحصول على أعلى إنتاج هـــو (58.8) غم حامض/(100) غم جلوكوز. أما عند التربية العميقـــة للســـلالة (R. nigricans) فكان أعلى إنتاج هو (81.9) غم حامض/ (100) غم سكر.

إنتاج حامض الأيتاكونيك (Itaconic Acid productin):

تم إنتاج هذا الحامض باستخدام السلالة (*Asp. Itaconicus*)

وله التركيب البنائي التالي:

CH_2

|

C — COH (حامض الأيتاكونيك)

|

CH_2 $COOH$

إن لحامض الأيتاكونيك استخدامات عديدة منها استخدامه كراتنجات مغلقة في أغلفة التعبئة، استخدامه كمادة تضاف إلى بعض العطور لرفع جودتها ونوعيتها، أو كمادة تضاف إلى النبيذ أو البيرة لأغراض خاصة.

الأحياء المجهرية المصنعة للحامض:

بالإضافة إلى إنتاج الحامض من قبل السلالة (Asp. Itaconicus)، فهناك إمكانيات أخرى لإنتاج هذا الحامض من قبل السلالة (Asp. terreus) وبإنتاج يتراوح ما بين (٥٨غم – ٦٥غم/ ١٠٠غم سكر)، وباستخدام وسط غذائي يحتوي على (٦%) سكر وعند درجة حموضة (٨%).

التربية الصناعية:

يمكن إنتاج الحامض بالتربية السطحية أو العميقة للسلالة (A. terreus) وباستخدام أوساط غذائية صلبة وسائلة ومن مصادر كربوهيدراتية عديدة كقصب السكر، عصير سكر البنجر، سكريات التمور.. الخ، والذي يتأثر (الإنتاج) بعدة عوامل: منها التهوية، التحريك، طرق التعقيم، طرق تحضير اللقاح، مكونات الوسط الغذائي المستخدم، وجود أيونات بعض الفلزات، ال(pH)، درجة الحرارة.. الخ. لذا فمن الأمور المهمة في إنتاج حامض الأيتاكونيك من هذه الأوساط هو – تأمين (pH) المثالي للوسط يتراوح ما بين (١,٩–٢,٢). فإذا كان ال(pH) أقل من (١,٩) فإنه سيعمل على تثبيط نمو المايسليوم للأحياء، أما إذا كان

(pH) أعلى من (٢,٢٠) فإن النمو يتكيف نحو النمو الأعظم والأقصى ولكن على حساب إنتاج الحامض.

- تأمين درجة حرارة مثلى للإنتاج وهي (٣٠ م).
- الإنتاج يتأثر بوجود أيونات بعض الفلزات، فإن وجود أيونات (النحاس، الزنك، المغنيسيوم، الكالسيوم) يزيد من إنتاج الحامض فكلما زادت نسبة تلك الأيونات يزداد إنتاج الحامض المحضر.

أما بالنسبة لأيون الحديد فإن التحضير الميكروبي لحامض الأيتاكونيك له حساسية معينة نحو أيون الحديد. فكلما زادت كمية أيون الحديد كلما قل إنتاج الحامض.

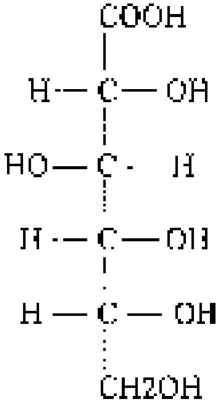
والجدول التالي يبين مكونات الأوساط المثالية المستخدمة في إنتاج الحامض

مكونات الوسط الغذائي لتحضير اللقاح		مكونات الوسط الغذائي للمرحلة الثانية لتحضير اللقاح		مكونات الوسط الإنتاجي	
مستخلص الشعير ٦٠ غم		جلوكوز	٢٧٥ غم	جلوكوز	١٦٥ غم
٨٠٠ غم وسط سائل	يحتوي:	نترات الصوديوم	٥ غم	سلفات المغنيسيوم	٠,٤٤ غم
لاكتوز	١٠ غم	سلفات المغنيسيوم	٠,٠٢٤ غم	نترات الأمونيوم	٢,٥ غم

جلوكوز	٥ غم	كلوريد البوتاسيوم	٠,٠٠٥ غم	كلوريد الصوديوم	٠,٠٤ غم
KH2PO4	٠,٠٦ غم	حامض الفوسفوريك	٠,٠٠٣ غم	ZnSO4	٠,٠٠٤ غم
سلفات المغنيسيوم	٠,٠٥ غم	مستخلص الذرة	٠,٥ غم	مستخلص الذرة	٤ مل
KCl	٠,٠١ غم			ماء	١ لتر
NaCl	٥ غم				
ترترات البوتاسيوم	٣ غم				
CuSO4 5H2O	٠,٠٠٤ غم				
مستخلص الذرة	٥ مل				
ترترات الحديد	٠,٠٠٥ غم				
سلفات المنغنيز	٠,٠٠٥ غم				
اليوريا	٠,١٠ غم				

إنتاج حامض الكلوكونيك (Cluconic Acid production):

حامض الكلوكونيك هو المنتوج السريع لتأكسد الجلوكوز وله استعمالات واسعة في مجالي الطب والصناعات الغذائية، وله التركيب البنائي التالي:-



(Cluconic acid)

الأحياء المجهرية المصنعة للحامض:

حامض الكلوكونيك يمكن أن يؤلف من عدد كبير من الأحياء المجهرية كبكتريا ال(Pseudomonas) وال(Acetobacter) وعفن ال(*Aspergillus Sp*) وعفن ال(penicillium Sp).

التربية الصناعية:

إن إنتاج حامض الكلوكونيك يتم بطريقة التربية الصناعية العميقة لعفن ال(Asp-niger) وباستعمال الأوساط الغذائية الموضحة في الجدول التالي :-

المحتويات المختلفة في الوسط الغذائي غم / لتر

مقومات الوسط الغذائي	وسط أكيري للتربية	وسط لتكوين السبورات	وسط للحصول على لقاح مايسلي	الوسط الإنتاجي
جلوكوز	30	50	100	150-350
MgSO4 7H2O	0.10	0.12	0.25	0.156
KH2PO4	0.12	0.144	0.30	0.188
(NH4)HPO4	-	0.56	0.80	0.388
NH4NO3	0.225	-	-	-
Peptone	0.25	0.20	0.20	-
بطاطا	200.0	-	-	-
Agar	20	1.5	-	-
CaCO3	4.0	-	37.5	20.0
مستخلص الشعير	-	45	40	-

فالعمليات الميكروبيولوجية لتحضير الحامض تتضمن: تحضير اللقاح السبوري والذي يتم في دوارق خاصة وذات حجوم معينة وعند ظروف مثلى من درجة حرارة (٣٠ْم) و(pH) (٦.٥) وفترة حضن لمدة (٧) أيام، ثم ينقل اللقاح السبوري إلى المخمرات المحتوية على الأوساط الغذائية اللازمة وعند ظروف مثلى من درجة حرارة (٣٠ْم) وتهوية وتحريك مع ضبط الـ(pH).

ويمكن الاستدلال على نهاية العملية التخمرية بانخفاض تركيز الجلوكوز في الوسط الغذائي إلى (١%) وبزيادة تركيز الحامض المنتج إلى (٩٥%).

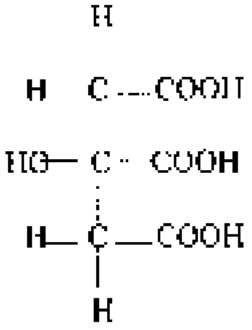
استعمالات الحامض:

١. استعماله في تحضير الـ(Resins) (الراتنجات).
٢. يستعمل في الصناعات العقاقيرية كمصدر علاجي للكالسيوم وخصوصاً لدى الحوامل والأطفال.
٣. أما الفيروكلوكونيك فإنه يستعمل في تغذية المصابين بفقر الدم (الأنيميا).

إنتاج حامض الليمون (Citric acid production):

وهو أحد الأحماض المهمة في الصناعات الغذائية والعقاقيرية وله استعمالات عديدة وذلك لطعمه اللذيذ وقلة سميته وسرعة هضمه.

وله التركيب التالي:



Citric acid
(حامض الليمون)

الأحياء المصنعة للحامض:

هنالك الكثير من الأحياء المجهرية وأهمها عفن ال(*Asp. niger*) وكذلك يمكـــن إنتاجه من قبل ال(Asp. Carbonarius)، (Asp. glacucus) ، (Asp. Cinnamoneus)، (Asp. awamori)، (Asp. fumaricus) ، (Asp. auveus)، (mucor pyriformis)، (citromyces citrous)، (citromyces pfefferianus)، (Citromyces glauber)، (pen. Arenarium)، (pen. Alivaceum)، (pen glaucum).

التربية الصناعية:

يتم إنتاج حامض الليمون بالتربية السطحية أو المغمورة للأحياء (عفن) ال(*A.sp. niger*) لما تتميز به هذه السلالة من إنتاجها العالي للحامض. لذا فهناك عوامل ثلاثة مهمة تؤثر على إنتاج الحامض وهي:-

١. نوع السلالة المصنعة للحامض.

٢. مقومات الوسط الغذائي والذي يربى عليه العفن والذي تجري من خلاله عملية التخمير. فالوسط الغذائي يجب أن يحتوي على المواد اللازمة لبناء جسم الكائن المجهري الحي وعلى المواد اللازمة لتأليف الحامض.

٣. ظروف التربية والتي لها دور كبير في إنتاج الحامض.

بالنسبة لمقومات الوسط الغذائي فهي:-

أ. المصدر الكربوني (السكروز، الفركتوز، الجلوكوز، عصير التمر..الخ).

ب. المصدر النيتروجيني ($NHNO_3$ ،KNO_3 ،$NHCl$، الكاربامايد)

ولكن أفضل مصدر نيتروجيني هو ال($NHNO_3$ ،KNO_3).

ج. الأملاح الاعتيادية مثل ($FeSO_4$) بنسبة (٠,١٥-٠,٢٥%)، ($ZnSO_4$) بنسبة (٠,١%)، ($CuSO_4$) بنسبة (٠,٠١%).

أما ما يخص ظروف التربية فتشمل درجة الحرارة، ال(pH) (فدرجة الحرارة المثلى لنمو المايسيليوم هي (٣٤-٣٥ م) و ال(pH) هو (٣,٥-٢,٥))، التهوية. فالتهوية بالأكسجين النقي مهم جداً في إنتاج حامض الليمون لإعطاء الظروف المناسبة للإنتاج أحسن من التهوية بالهواء الاعتيادي.

المراحل التي يمر بها إنتاج حامض الليمون عن طريـــق الأحيـــاء المجهرية:

أ. تحضير المادة اللقاحية لإنتاج حامض الليمون.

ب. عملية التخمير.

ج. التنقية الكيماوية.

أ – تحضير المادة اللقاحية:

تعتبر هذه المرحلة من المراحل المهمة في إنتاج الحامض وهي عملية مســتمرة لتحضير المزرعة النقية والتي تكون اسبوراتها سريعة النمو ومايســـيلها ذا قابليـــة حيوية عالية لإنتاج الحامض وتحت ظروف معقمة. ولأجـــل اســتمرارية الثبـــات المورفولوجي والفسيولوجي والحيوي للمزرعة النقية تزرع في أنابيب اختبـــار ذات وسط غذائي مكون من (malt ager) وملح الطعام والكاربامايد.

وبعد ذلك يتم نقل أسبورات هذه المزرعـــة النقيـــة إلـــى المخمـــر وبحســـاب (٧٠،٠٠٠) سبور/مل وسط غذائي والـــذي يمثـــل حوالـــي (١،٥)غـــم ســـبورات جافة/١م٣ من محلول الوسط الغذائي في المخمر.

ب – عملية التخمير :

تبدأ هذه العملية بنقل اسبورات المزرعة النقية إلى المخمر المعقم والمحتوي على الوسط الغذائي المعقم أيضا.

وهناك طوران لهذه العملية: الطور الأول هو طور النمو حيث يستعمل السكر بصورة رئيسية لتكوين المايسيليوم وفيه يكون إنتاج الحامض قليلا، أما الطور الثاني فهو الطور الذي يكون نمو المايسيليوم فيه بأقصى حد ويكون فيه إنتاج الحامض على أشده ويتحول كل السكر إلى حامض الليمون.

(تجرى عملية التخمر عند درجة حرارة (25 م) ولمدة (9) أيام وعند درجة حموضة تتراوح بين (4.5–02.2) لكي نحصل على إنتاج جيد لحامض الليمون.

ج – التنقية الكيماوية:

إن الغرض من هذه المرحلة هو الحصول على بلورات حامض الليمون، وتكون كمية الحامض في سائل التخمير بحدود:

حامض الليمون	% 90 – 70
حامض الأوكزاليك	% 25 – 9
حامض الكلوكوزيك وأحماض أخرى	% 9 – 6

وتتضمن التنقية الكيماوية لحامض الليمون ما يلي:-

1- عملية المعادلة للحامض:

وتتم المعدلة (للحامض) بواسـطة كلوريـد الكالسـيوم (CaCl2)، (Ca(OH)2) (هيدروكسيد الكالسيوم) فيتحول حامض الليمون الحر إلى ملـح كالسـيومي (ملـح سترات الكالسيوم) غير ذائب لأملاح مترسبة:-

$$2C_6H_8O_7 + 3Ca(OH)_2 - Ca_3(C_6H_5O_7)_2 - 6H_2O$$

2. الترشيح و غسل سترات الكالسيوم:

ترشح المادة المتفاعلة و هي حارة بعد الانتهاء من عملية ترسيب سترات الكالسـيوم من خلال مرشح (Filter) مع التفريغ ويغسل الراسب على الفلتر بالماء الحار وبدرجـة حرارة لا تقل عن (90 م).

3. معاملة سترات الكالسيوم مع حامض الكبريتيك (H2SO4) ذي وزن نوعـي (84%)للحصول على حامض الليمون الحر في المحلول.

$$Ca_3(C_6H_5O_7)_2 + 3H_2SO_4 \quad 2C_6H_8O_7 - 3CaCO_4$$

راسب الجبس حامض الليمون

4. ترشيح المحلول:

تفصل سائل الليمون الحر عن الراسب بواسطة مرشح ذي تفريـغ(Vacuum filter).

5. عملية التكثيف:

إن عملية التكثيف لسائل الليمون الحر تتم بمرحلتي تبخير بينهما عملية ترشيح ففـي المرحلة الأولى يتم التبخر في مكثف تفريغي عند درجة حرارة (60-70 م)وبتفريـغ قدره (600mm)، ومن هذه المرحلة نحصل على حامض ليمون ذو وزن نوعي قـدره (1.24-1.26)والذي يقابل تركيز الحامض (700غم/لتر). ثم ينقل المحلول المكثف إلى

خزان ويعامل بالفحم بنسبة (0.03-0.05%)محسوبا على كمية حامض الليمون .بعد ذلك يتم الترشيح بإضافة (filter aid) برلايت بنسبة (1-4%).

أما المرحلة الثانية من التبخير فهي كالأولى إلى أن نحصل على حامض ذي وزن نوعي (1.39).

6. عملية البلورة لحامض الليمون
7. عملية الطرد المركزي للبلورات
8. التجفيف للبلورات باستعمال هواء درجة حرارته (30-35 م)
9. التعبئة

إنتاج الستريك ($C_6H_8O_7$) من التمور:

هذا النوع من الإنتاج يعتمد على نوع من الأحياء المجهرية التي هي (Asp. niger) والتي تعمل على تخمير السكريات وتحويلها إلى حامض الستريك. إن هذه العملية دقيقة جدا إذ تحتاج إلى نوع من الدراسة الكلية لأجل الحصول على الحامض نقيا غير ملوث بالأوكزاليك؛ وذلك في مخمر (reactor) خاص ذي تهوية وضغط وحرارة و(pH). إن الناتج من هذه العملية لكل (100) جزء سكر (عصير التمر) حصل على (89%) حامض ليمون (زيكي) وكذلك من كل (100) جزء سكر (عصير التمر) حصل على (74%) حامض ليمون (العبيدي). أما الإنتاج العالمي فمن كل (100) جزء سكر بلوري حصل على (12) جزء من حامض الليمون.

إنتاج حامض الخليك:

منذ عرف الإنسان فن إنتاج البيرة والنبيذ عرف الخل كمادة هامة تضاف لبعض المواد الغذائية. ويعرف الخل بأنه ناتج تخمر (Acetification) المحاليل الكحولية المستخرجة من السكر أو المواد النشوية. وهناك مواد عديدة لصناعة الخل إلا أن الكحول يعتبر اقتصاديا وهو الأساس في هذه الصناعة وبالرغم من أن التفاح والعنب وبعض الحبوب والمولاس تعتبر المواد الرئيسية في إنتاج الخل إلا أنه يمكن إنتاجه من مواد أخرى مثل الكمثري والخوخ والتين والبرتقال والرمان، كما يمكن استخراجه من بعض الفواكه الجافة مثل البرقوق والمشمش والبلح.

وبتحليل بعض المواد النشوية مثل البطاطا والأرز والذرة والقمح، يمكن كذلك إنتاج الخل. وعموما يجب التأكيد بأنه مهما كانت المواد الأولية المستخدمة في صناعة الخل فإنه لا بد من أن تمر هذه المواد بدور التخمر الكحولي أولا ثم تحول على أساس صناعي إلى حامض الخليك أو الخل.

وللحامض التركيب البنائي التالي: $CH3COOH$

الأحياء المجهرية المصنعة للحامض:

بكتريا حامض الخليك هي من جنس (Acetobacter) والشائعة باسم حامض الخليك، وهي تتضمن المجاميع المهمة للأكسدة أو الدالة الصناعية لأكسدة الكحول الاثيلي وينتج حامض الخليك.

إن الجنس (Acetebacter Begerinch) له الصفات التالية: الخلايا بيضوية (ellipsoidal) إلى شكل متطاول، وحيدة، أو مزدوجة أو سلاسل قصيرة لها أشكال عديدة منها البيضوي والكمثري وعلى شكل جسور...الخ.

الخضراء النقية هي سالبة لصبغة كرام لا تكون سبورات إذا كانت متحركة فتكون لها (Polar flagellation) (أسواط قطبية). إن أكثر أجناس هذا النوع هي تحولية إلى هوائية وكل الأنواع هي (Catalase Positive) والجنس هنا هو (Chemoheterotrophic) مؤكسدة لكثير من المواد العضوية إلى أحماض عضوية والأكسدة العامة له هو انتاج حامض الخليك من الكحول وكلوكونيك.

أما تغذيتها فتبدأ من أبسط وسط إلى أعقده. الحرارة المثلى تعتمد على النوع. أما الأجناس فهي موجودة بكثرة في الطبيعة وهي مهمة خاصة في دورة الكربون الطبيعية وفي انتاج الخل وكذلك في فساد الأغذية. أما أهم الأوساط فهي

1) وسط فراتير	Frateur 1960
مستخلص خميرة	% 3
كربونات كالسيوم	% 2
أكر أكر	% 2
ماء مقطر	1000 مل
2) وسط وجدي	1966
مستخلص الخميرة	% 1
جلوكوز	% [illegible]
أكر	% 2
ماء مقطر	1000 مل
3) وسط هاتسن	1948

% 8	Beer Wort
1000 مل	ماء مقطر

4) وسط دي ليي De-Ley

مستخلص الخميرة	% 2
جلوكوز	% 5
اكر	% 2
ماء مقطر	1000 مل

5) وسط ستيفان وجبس 1968 Staphan & Gibbs

مستخلص الخميرة	% 3
اكر	% 2
بروموكريسول الأخضر	% 0.022
ماء مقطر	1000 مل

6) وسط هـ ج هنس H. J. Heinz Co.

المادة	التركيز غم/لتر
جلوكوز	0.280
مستخلص الخميرة	0.280
$(NH_4)_2HPO_4$	0.170
حامض الستريك	0.060
[illegible]	0.060
KCl	0.048

خل	10.000
إيثانول	55.000

وبالدراسات أظهرت بأن هناك تحويرات لهذا الوسط وهي كما يلي:

المواد	وسط لتحضير اللقاح غم/لتر	الوسط البيئي للتخمر غم/لتر
مستخلص الخميرة	10.0	5.0
$(NH_4)_2HPO_4$	0.24	0.24
$MgSO_4$	0.25	0.28
KH_2PO_4	0.25	0.25
حامض الستريك	0.12	0.12
[illegible]	0.12	0.12
KCl	0.090	0.090
حامض اللاكتيك	1.00	1.00
إيثانول	80.00	Variable
مضاد الرغوة		0.80

وسط الخل الأبيض	
سكر الذرة	0 باوند
Di ammonium phosphate	4 باوند
سلفات المغنيسيوم	1 باوند
سترات البوتاسيوم	[illegible] باوند
بانتوثين الكالسيوم	[illegible] غم

ميكانزم تكوين حامض الخليك:

إن أكسدة الكحول إلى حامض الخليك هو نتيجة (dehydration react) والمتضمن نظام سايتوكرومي. ويمثل الاسيتالديهايد هو الأساس الوسطي وأول من كتب هذا هو (Bayer) والتحول الكحولي إلى حامض الخليك يظهر بالتفاعلات التالية:

1- تكوين الاسيتالديهايد:

$$CH_3-\overset{OH}{\underset{OH}{C}}-H \xrightarrow[\text{dehydrogenase}]{\text{alcohol}} CH_3-\overset{O}{\underset{H}{C}} + 2H^+ + 2e$$

2- هدرجة الاسيتالديهايد (Hydration of acetaldehyde):

$$CH_3-\overset{O}{\underset{H}{C}} + H_2O \rightarrow CH_3-\overset{OH}{\underset{H}{C}}-OH$$

3- تكوين حامض الخليك:

$$CH_3-\overset{OH}{\underset{H}{C}}-OH \xrightarrow[\text{dehydrogenase}]{\text{aldehyde}} CH_3-\overset{O}{\underset{OH}{C}} + 2H^+ + 2e$$

ويجب أن تكون هذه التفاعلات مضبوطة ضبطاً محكماً.

وإن الخل الطبيعي هو الناتج من التخمر الكحولي للخامات الطبيعية دون أن يتدخل عمليات الصناعة عملية التقطير ويتم بتحول المواد السكرية إلى مواد كحولية عن طريق التخمر الطبيعي بمساعدة خمائر معينة ومن ثم تحويل تلك المادة الكحولية إلى حامض الخليك ضمن المحلول نفسه بواسطة بكتيريا خاصة وبمساعدة أوكسجين الجو.

أي إن المواد السكرية هي المادة الأولية كالعنب أو التمور أو غيرها من الفواكه والمنتجات النباتية تتحول بصورة طبيعية الى حامض الخليك وبذلك يبقى الخل محافظاً على نفس نكهة المادة الأولية الناتج عنها ومحتفظاً بالقسم الأكبر من المواد الغذائية الموجودة فيها، وتحتاج عمليات تحويل المواد الأولية كالعنب والتمر إلى خل لفترة تتراوح ما بين (1-2) شهر وفق الطرق التكنولوجية.

صناعة الخل (Acetification):

يتم صناعة الخل بطريقتين :

أ- الطريقة البطيئة **(Slow process)**.

ب- الطريقة السريعة **(generator process)**.

أولاً: الطريقة البطيئة (slow process)

هي طريقة قديمة لإنتاج أفخر أنواع الخل وفيها تستعمل حاويات سعة (50 - 60) جالون، ويمكن تلخيص هذه الطريقة فيما يلي:

يملأ (1/3 - 1/4) الحاوية بنوع من الخل الجيد المحتوي على مزرعة نشطة من بكتريا حامض الخليك ثم يضاف المحلول الكحولي (vinegar stock) إلى أن يبلغ (1/2 - 2/3) حجم الحاوية ثم يترك الخليط في الحاوية حتى يصل إلى أعلى نسبة من حامض الخليك ثم يسحب (2/3 - 3/4) من محتويات الحاوية ويضاف بدلاً منها محلول كحولي جديد وهكذا بتكرار العملية.

ونظراً لبطء العملية والتي تستغرق (1 - 4) أشهر أو أكثر تبعاً لدرجة الحرارة فإن الخل الناتج يحتوي على كمية كبيرة من الأسترات وخصوصاً (Ethyl Acetate) أكثر من الخل الناتج بالطريقة السريعة رغم استعمال نفس المحلول الكحولي. ولقد تمت عدة تعديلات في هذه الطريقة لغرض زيادة سرعة

التخمر وتكوين الطبقة الهوائية من بكتريا حامض الخليك المرغوبة لزيادة سطح الأكسدة.

ثانيا: الطريقة السريعة (Generator Process):

تستخدم هذه الطريقة حاليا لإنتاج الخل صناعيا وقد صمم جهاز التخمر على أساس زيادة سطح المحلول الكحولي للحصول علي أكبر نسبة من الهواء اللازم لبكتريا حامض الخليك لأكسدة الكحول، وقد بدئ في استخدام هذه الطريقة في أوائل هذا القرن ويمكن تلخيصها فيما يلي:-

يستخدم جهاز أسطواني الشكل يبلغ قطرة (10) أقدام وطوله (20) قدما يزود بفتحات تسمح بمرور الهواء وينقسم الجهاز إلى ثلاث غرف؛ العليا يوضع بها موزعات المحلول الكحولي وهي على شكل رشاش يتحرك حركة دائرية لتوزيع الكحول توزيعا منتظما والحجرة الوسطى يوضع بها نشارة خشب لزيادة سطح المحلول الكحولي والحجرة السفلى لتجميع الخل، وعند بدء العملية يمرر خل غير معقم لتلقيح مساحة النشارة ببكتريا حامض الخليك، وهذه العملية تجرى عند الابتداء وغالبا لا تكرر ثم يمرر المحلول الكحولي من الموزعات علي النشارة حتى يتم تحويله إلى خل ويتجمع في الحجرة السفلى من الجهاز، ويجب ملاحظة أن هذه النشارة لا تحوي مواد ذات رائحة غير مرغوبة أو طعم مما يؤثر في الخل الناتج، كما يجب ألا تحتوي على مواد معدنية وخاصة النحاس والحديد التي تؤثر في الخل. كما يجب ضبط درجة حرارة وسرعة مرور المحلول الكحولي وحجم الهواء المار، وعموما تكون درجة الحرارة بين (80 85) ف.

ويتم فقدان كثير من الكحول والخل في هذه الطريقة بالتبخير أو بتمام أكسدتها إلى ثاني أكسيد الكربون والماء كما يستخدم بعضها في نمو بكتريا الخل، ويمكن تقليل كمية الفقد بضبط درجة الحرارة ومرور الهواء في الجهاز وينتج الجهاز البالغ طوله (20) قدما ما بين (100.80) جالون خل في اليوم. ويسحب الخل إلى خزانات التخزين حيث يترك لمدة أسابيع أو أشهر وفي بعض الأوقات يترك لفترة وجيزة أحيانا للتعتيق أو النضج.

نعتيق الخل (Aging):

هي عملية الغرض منها تحسين الخل وإكسابه مظهرا شفافا خصوصا الخل المصنوع من عصير العنب أو التفاح، وفي هذه العملية تتكون أسترات تكسب الخل رائحة وطعم خاصتين وتتم عادة أثناء التخزين، وقد يضاف الكراميل إلى الخل لإكسابه لون داكن. وتحدث عملية الـ(esterification) كما هو موضح بالمعادلة التالية:-

$$CH_3COOH + CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3COOCH_2CH_3 + H_2O$$

حامض الخليك   اثيل الكحول   Ethyl acetate

ويجب ان يوضع الخل في براميل خشبية مملوءة او غرف التعتيق، فإذا لم يحفظ في أوعية بعيدا عن الهواء، فإن بعض الخل يؤكسد بواسطة بكتريا الخل (Aceto bacter aceti) الموجودة في أجهزة التخمر وكذلك بواسطة (Acetobacter xylinum) إلى ثاني أكسيد الكربون وماء.

وبواسطة بكتريا الخل(Aceto bacter aceti) الموجودة في أجهزة التخمر، وكذلك بواسطة (Acetobacter xylinum) إلى ثاني أكسيد كربون وماء:

$$CH_3COOH + O_2 \xrightarrow{acetobacter} 2CO_2 + 2H_2O.$$

حامض الخليك

ترويق الخل (Clarification):

كما هو معتاد يجب أن يكون الخل صاف براق عند بيعه لذلك يجب ترويقه. ويتأثر الترويق بنظم التصفية وفي حالات الإنتاج الجيد التي يستخدم فيها خامات طبيعية كالتفاح والعنب، يجب ترويق الخل بإمرار، أو ترشيحه بعد إضافة مساعدة الفلتر سليكا أو أي (Filter aid) وخلطها جيداً بالخل ثم تترك حتى ترسب مواد الترويق ويسحب السائل الرائق. (المواد المروقة هي البومين البيض، كازين، جيلاتين، بالتونايت) وتترسب في القعر وتعمل نظام غروي يتم فصلها بسهولة بواسطة المرشحات.

البسترة والتعقيم (Pasteurization and Sterilization):

بعد إجراء عملية الترويق والتصفية غالباً ما يتكون طبقة إسفنجية (أم الخل) قرب القاع أو يتكون غشاء سميك قرب السطح أو يتعكر الخل وذلك بسبب بدء نمو بكتريا حامض الخليك ويمكن تلافي ذلك باستخدام البسترة أو التعقيم.

ويبستر الخل بإحدى الطرق الآتية:

1- (In bulk) يسخن الخل إلى درجة (140°-150°) ف لمدة نصف ساعة، ثم يبرد إلى (80°-90°) ف، ويعبأ في براميل أو زجاجات وتقفل.

2. (By continuous flash pasteurization) يسخن الخل ثم يعبأ في زجاجات على درجة (150° 160°) ف ثم تقفل.

3. (By bottle Pasteurization) حيث يعبأ الخل في زجاجات وتسخن لدرجة (150° 160°) ف لمدة كافية حتى يصل منتصف أو وسط الزجاجة إلى هذه الدرجة ثم تقفل الزجاجات وتبرد. كما يستعمل المواد الحافظة الكيماوية للتأثير في بكتريا حامض الخليك مثل حامض البنزويك وثاني أكسيد الكبريت.

كشف الغش في الخل:

يصعب أحيانا كشف الخل الصناعي في الخل، ولكن تقدير بعض المواد الموجودة أو غير الموجودة والتي تعتبر طبيعية للخل تسهل اكتشاف الغش في الخل ويعتبر مركب الاسيتيل ميثيل كربينول (Acetal methyl carbinol) أحد المكونات الخاصة الموجودة غالبا في جميع أصناف الخل التي من أصل بيولوجي أو حيوي.

كذلك يوجد حامض الفورميك (Formic) في الخل الصناعي بكمية عالية بينما يوجد بنسبة صغيرة جدا في الخل الطبيعي، كذلك يمكن بإجراء بعض التحليلات الطبيعية والكيماوية مثل (specific gravity) والرماد والكحول والحموضة الكلية والأحماض الطيارة وغير الطيارة، درجة الاستقطاب

(Total reducing substances) قبل وبعد التحويل والسكريات ومركب الاستيل ميثيل كربينول والمواد المختزلة الطيارة وحامض الفوسفوريك الذائب وغير الذائب والأحماض المعدنية و (pentasaux-permanganate oxidation value) وحامض الفورميك والجلسرول.

من هذه التحليلات جميعها، ومعرفة تكوين الخل الطبيعي والصناعي يمكن معرفة أو الكشف عن الخل الناتج من التخمر الخليكي أو الخل المحضر صناعياً.

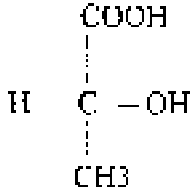
التمور وإنتاج الخل:

تعتبر التمور مادة خام أساسية وجيدة لصناعة الخل لما تحتويه التمور من مصدر سكري. ويتميز الخل المنتج من التمور بلونه الزاهي وطعمه اللذيذ والنكهة اللطيفة.

حامض اللاكتيك

إنتاج حامض اللاكتيك (Lactic acid Production):

<u>مقدمة:</u>



منذ عدة قرون يستخدم التخمر اللاكتيكي لحفظ الأغذية وكان يعتبر أهم طرق الحفظ حتى استعمال التعليب والتجميد منذ ما يقارب (150) عام، ولا يزال حفظ الأغذية بالتجفيف والتخمر اللاكتيكي (التخليل) يعتبر من الطرق الكبرى لحفظ

الأغذية، حامض اللاكتيك ينتج على كميات صغيرة من قبل الكثير من الأحياء المجهرية. وطريقة تحضيره من الأحياء المجهرية أصبحت معروفة.

إحدى مجاميع الأحياء المجهرية ينتج حامض اللاكتيك كمنتوج أساس في عملية الهدم اللاهوائي للمكربات.

ويمكن تقسيم هذه الأحياء إلى مجموعتين متخصصتين:

أ- (Homofermentative) والتي تنتج حامض اللاكتيك وأثر بسيط من بعض المنتوجات الوسطية الأخرى نتيجة التحول الغذائي.

ب- (Heterofermentative) والتي ينتج إضافة إلى حامض اللاكتيك مواد أخرى و(CO_2)، إيثانول، حامض الخليك ولأجل الإنتاج الصناعي لحامض اللاكتيك كثيراً ما تستخدم الأحياء من نوع (Homofermentative)

التركيب الجزيئي لحامض اللاكتيك يتكون من ذرة الكربون المتناظرة (Asymmetric) لذلك يوجد لها شكلان فعالان:

D – form	L+form
COOH	COOH
H C OH	OH C H
CH_3	CH_3
حامض اللاكتيك (-)D	حامض اللاكتيك (+)L

وفي أكثر الحالات فإن الأحياء المجهرية المصنعة لحامض اللاكتيك تكون ذات نوعين (L+) و (D-) ، وهناك أحياء مجهرية مثل (Rhizopus oryzae) التي تنتج (L+) Lactic.

الأحياء المجهرية (Microorganism):

إن تحضير حامض اللاكتيك بواسطة استعمال الأحياء المجهرية المصنعة من نوع (Homofermentative Lactic acid) سمي بذلك بسبب تصنيع (L+) اللاكتيك من (R. Oryzae) حيث إن استعمال الأنواع المختلفة من الأحياء المجهرية مثل (Lactic acid bacteria) لإنتاج حامض اللاكتيك يرتبط مع خواص ومزايا الوسط الغذائي ونوع المصدر الكربوهيدراتي المستعملة لعملية التخمير. ومن هذه المستعمرات عن الأجبان.

فمثلاً (Lactobacterium delbrueckii) التي أعطت تخمراً جيداً وعقب عمل الانتخاب الوراثي لهذه السلالة واستعمال الجلوكوز كمصدر كربوهيدراتي في فرمنتور ذو فعالية عالية، ومع ضبط محتويات الوسط الغذائي وعوامل النمو بالاستفادة من المواد الأولية كاستعمال مستخلص الذرة والنشا وفضلات المعامل الغذائية، تم تحضير حامض اللاكتيك.

ومن الأمثلة عليها: استعمال مادة الشرش حيث تستعمله السلالات لتخمير سكر اللاكتوز، ومن هذه السلالات (Lactobacterium Thermophilus Streptococcus)، وعند استعمال مواد خام مثل النشا لإنتاج حامض اللاكتيك تستعمل السلالة

(Lactobacillus Pentosus L. Plantarum)، ومن الأحيـــاء التـــي تســـتعمل بعـــض فضـــلات المعـــامل مثـــل الكـــبريت الســـائل (Sulfits Ligour) والنشـــب مثـــل (Lactobacterom pentoccetum).

وإن القسم الأعظم من الأعفان ينتج الشكل (D) من حامض اللاكتيك مثل:
R. nhtoesis, R. oryzae, R. nodasus, R. joponicus, R. pseudochinensis, R. saleborsus, R. elegans, R. tritici, R. stolonifer, R. shanghaiensis, Monilia temari, Mucor rouxii, R. chinensis وفقط Blastochadis Pringsheimii
إلى تكون الشكل (L) لحامض اللاكتيك.

العملية الصناعية لإنتاج حامض اللاكتيك:

يمكن إنتاج حامض اللاكتيك على نطاق واسع بفعل (Homofermentative Lactic acid Bacteria) بنموها في فرمنتور كبير يحتوي على آلاف الألتـــار مـــن الوســـط الغذائي، وقبل كل شيء الوسط يجب أن يحتوي على مصدر كربوهيدراتـــي مثـــل جلوكوز، مالتوز، لاكتوز، سكروز، والتي أهمها الجلوكوز الذي يحضر من تحلـــل نشا الذرة ونشا مصادر أخرى ويبقى جلوكوز نشا الذرة مادة رئيسية لكـــل الطـــرق المعروفة لتحضير حامض اللاكتيك.

إن أحياء حامض اللاكتيك تحتاج لأجل نموها مصادر عضويـــة كـــالنيتروجين، حيث أن نشا الذرة عند تحلله وكذلك نشا الشعير يعطي للوسط الغذائي كميـــة مـــن الجلوكوز اللازمة وهي (10-15%)، وكذلك تحتاج إلى (10%) كربونات الكالســـيوم التي تحافظ على درجة التفاعل (pH) المثالي لنمو أحياء حامض اللاكتيك.

إضافة إلى المصدر الكربوهيدراتي (جلوكوز) كمادة رئيسية يستعمل الشرش لمعامل الألبان كمادة أولية حيث تجرى بسترته، وقد تم تحضير حامض اللاكتيك من الشرش المنتج من معامل الألبان فمن شرش (45) مليون طن حليب ينتج (1.2) طن سكر لاكتوز.

إضافة إلى هذا فقد استعمل أيضا المولاس لإنتاج حامض اللاكتيك من قبل مسن نشا البطاطا المحلل وكذلك من مصادر أولية أخرى يمكن أن تكون بنتوزات وزايلوز (Xylose) ارابنوز التي تخمر من قبل (Lactobacterium Pentoaceticum) وقد نجح بعض الدارسون في إنكلترا وأمريكا باستعمال الكبريت السائل (Sulfite Liquor) لإنتاج حامض اللاكتيك (ليوتنرد 1948). كذلك الاستفادة من ستعمال نشا بعض المواد لإنتاج حامض اللاكتيك (Lactobactirum Thermophilum) .

إضافة إلى المصادر الخام الأولية للكربوهيدرات وإلى أن يصل تركيزها (10–12%) سكر في الوسط الغذائي يمكن إضافة مصادر نيتروجينية حسب احتياج النوع الميكروبي، وكذلك الأملاح العضوية والعناصر المعدنية، وكربونات الكالسيوم والمحافظة على (pH) (5.5–6.0).

عملية التخمير (Fermentation):

لأجل عملية التخمير تستعمل مختلف الأنواع من الأحياء المجهرية ذات النشاط الحيوي على تمثيل المواد الكربوهيدراتية وتحويلها إلى حامض اللاكتيك. فلأجل تخمير سكر الجلوكوز من نشا الذرة يستعمل (L. delberneekii)، أما لتخمير الشرش يستعمل (L. bulgaricum) والمخلوطة مع (strep Tharmophilic) ولأجل تخمير الخشب المتحلل يستعمل (L. bulgaricum)، أما لأجل التخمير المباشر للنشا فيستعمل (L. thermophellum)، أما الجلوكوز المنتج من نشا البطاطا أو السائل البكتيري فيستعمل (L. Pentosus).

المادة اللقاحية تجهز بطريقة اعتيادية مبتدأ من أنبوبة الاختبار –فلاسك حجم صغير – فلاسك حجم كبير – فرمنتور ذو وعاء صغير – فرمنتور أكبر حجماً، وهكذا إلى الفرمنتور الإنتاجي.

الوفرة من اللقاح المحتوى ترتبط مع كربونتسات الكالسيوم ليكون حامض اللاكتيك. فعند المعامل أو المصانع يجب أن تجهز اللقاح في فرمنتورات صغيرة الحجم ومن ثم تنقل إلى الفرمنتور الإنتاجي واللقاح يجب أن يحفظ بصورة دائمة بحالة جيدة. فترة الحضن للمادة اللقاحية هي ما بين (16–18) ساعة وعند حرارة (45°م) درجة مئوية.

عمليات التخمر المستمرة لوسط سكري تركيزه (10–12%) سكر علماً بأن التركيز العالي للسكر سيعطي كمية أكبر من لاكتات الكالسيوم في نهاية التخمر، والذي بدوره سيخفض من عملية التخمر لأن عملية التخمير تجري بسرعة وفي خلال (24) ساعة الأولى سينخفض تركيز السكر في الوسط إلى (3–4%). بعد ذلك شدة التخمر تقل وتحتاج إلى فترة زمنية بحدود (6–9) أيام لكي يصل التركيز إلى (0.1–0.2) خلال هذا الوقت تزال المزرعة بحرك، ويجب المحافظة على (pH) بحدود (5.5–6.5) حيث أن بكتريا حامض اللاكتيك يمكنها من تخمير الكربوهيدرات بشدة عند (6.9).

تعد التربية الناجحة المستخدمة (Rhizopus oryzae) لإنتاج الشكل (L) حامض اللاكتيك على وسط جلوكوزي مع الأملاح والمواد الضرورية الإنتاج كان بحدود (60–70%) حامض لاكتيك محسوب بالنسبة للمصدر السكري، والعملية تحتاج إلى (20) يوم (لونت 1945). وبنفس الطريقة عند التخمير العميق في الفرمنتور الأسطواني الدوراني الألمنيومي لإنتاج حامض الكلوكونيك العملية احتاجت إلى (36) ساعة، الإنتاج كان بحدود (70–72%) محسوب على المصدر السكري (دار، 1956).

تطبيقات حامض اللاكتيك:

حامض اللاكتيك له طعم ومذاق حامض جيد وهو مهم في الأغذية التي تحتاج إلى حموضة وفي صناعة المحللات، وأكثر مركباته تذوب في الماء، حيث أن إذابة لاكتات الكالسيوم في الماء يعطي امكانية لاستعماله في تكنولوجيا صناعة الجلود

وكذلك لأجل تصنيع الخيوط والأنسجة، وعند استرته سيكون نصف حامض هذا البولمر عند صرفه مع الزيوت النباتية أو الزيوت، وفي غياب العامل المساعد سيكون راتنجات ثمينة.

لاكتات الكالسيوم توجد لها استعمالات واسعة في الحيوانات والدواجن لأجل زيادة إنتاج الحليب من الأبقار في الشتاء، وإنتاج البيض. لاكتات الكالسيوم تستعمل أيضا في تحميض الخبز. لاكتات النحاس لها دور في إنتاج البلاستيك، كما يستعمل حامض اللاكتيك في مختلف الأغذية.

الفصل الثاني عشر

تقنية إنتاج الكحولات

Production Technology of Alcohol

تقنية إنتاج الكحولات

(Production Technology of Alcohol)

المقدمة:

يعتبر التخمر الكحولي أكبر قطاعات التخمرات الصناعية بالنسبة الهائلة لكمية الإنتاج وكذلك كثرة وحدات إنتاجية وما يضمه من الأعداد الوفيرة من الأفراد الذين يعملون في هذا القطاع. وتعتبر صناعة التخمر الكحولي في الوقت الحاضر هي النمو المطرد لهذه الصناعة القديمة والتي يرجع السبب الرئيسي لانتشارها لاستعمال الإنسان الكحول الاثيلي الناتج في حفظ المواد الغذائية، وعندما تعددت المشروبات الكحولية وازداد إنتاجها وجدت معظم الحكومات الفرصة لفرض ضرائب عديدة على هذا النوع من الإنتاج الذي يدخل في أغراض عديدة.

وقد ازدادت أهمية الكحول الاثيلي في زمن الحرب العالمية الثانية يتضاعف الإنتاج من أربع أو خمس مرات للمطلوب عادة، وذلك لاستعماله في إنتاج المطاط الصناعي وصناعة المساحيق غير المكونة للدخان (Smokeless).

المصادر الأولية:

من المصادر الاولية للتخمر الكحولي هي الذرة، الشعير، المولاس، العنب وكافة المصادر الكربوهيدراتية...الخ. وتحتاج بعض المواد الأولية إلى معاملتها كيماويا وفيزيائيا قبل عملية التخمير للحصول على السكر المقلوب. وقد تستعمل سكريات الـ(Sulfite Liquior) المنتج من نباتات ذوات الفلقة الواحدة حيث يحتوي السائل الكبريتي على سكر الجلوكوز والكالكتوز، وإن خمائر (Sacchromyces) يمكنها من تخمير هذه السكريات لإنتاج الإيثانول. وكذلك يمكن الاستفادة من أخشاب النباتات الطرية منها والصلبة حيث تختلف فيما بينها باحتوائها على السكريات المختزلة، فالأخشاب الصلبة تحتوي على نسبة سكر أعلى من الطرية وكذلك يقل احتواؤها على مادة اللكنين.

الأحياء المجهرية:

في التخمر الكحولي المشاركة الوحيدة في العملية هي الخمائر وخصوصا (Sacchromyces Cerrisiae) وقليلا (S. ellipsoideus). ومن مميزات السلالات المصنعة يجب أن تكون سريعة التكاثر ويقف نموها عند التركيز العالي للسكريات أو الكحولات. ولها القابلية بأن تحول الكربوهيدرات إلى كحول مع إنتاج مواد جانبية ذات حجم قليل، درجات الحرارة المثالية لها هي (32 م) لا تتأثر بصورة شديدة لتغير المحيط.

وبالعمل الوراثي يمكن أن تصل إلى خمائر ذات مزايا عالية من حيث إنتاج

الكحول، وفعلا تم التوصل إلى سلالات من (Sacchromyces) التي لها الإمكانية من تحويل (77-88%) من الكربوهيدرات المحللة من الخشب و(65-75) من كربوهيدرات الأخشاب الصلبة. أما الكربوهيدرات الباقية غير المتخمرة هي بنتوزات.

ومن الأحياء المحللة للخشب (Clostridum butylicum) وكذلك (a erobacter aerogenes Candida, Monilia, Torulopsis).

إنتاج الكحول وكفاءة التخمر:

تتكرر هذه المصطلحات في الصناعة بكثرة ويمكن تعريفها بالآتي:

$$\text{نسبة كفاءة التخمر} = \frac{\text{كمية الكحول المنتج فعلا}}{\text{كمية الكحول الناتج نظريا من السكر المتخمر}} \times 100$$

ومن أهمية تقدير كمية الكحول المنتج صناعيا حيث يتضح أن نسبة الكحول الناتج لوحدة المادة الخام المستخدمة، وكما تعتبر كفاءة التخمر المؤشر الحقيقي للحالة الفسيولوجية للخميرة، بينما تقيم كفاءة المصنع جميع العمليات التي تتم في المادة الخام حتى تقطير الكحول وتخزينه. ويقدر الكحول الناتج بعدد الجالونات الناتجة بالنسبة لاردب (Bushel) الحبوب المتخمرة أو عدد جالونات الكحول الناتجة لكل (100) رطل من الحبوب الجافة. ويمكن تلخيص عملية تكنولوجيا تخمر المولاس في الآتي:

1. تخفيف محلول المولاس أو عصير التمر (Dilution of the Molasses or date juice).

2. إضافة الخميرة (Inoculation with yeast).

3. عملية التخمر (Fermentation).

4. عملية التقطير لإنتاج الكحول (Distillation).

وتتجه الدراسة الآن في صناعة تخمر المولاس وعصير التمر لإنتاج الكحول إلى الاهتمام بما يلي:-

1. أنسب الطرق لزيادة نسبة الإنتاج.

2. استمرار عملية التخمر.

3. المنتجات الثانوية (By product utilization and disposal)

كيف يمكن استخدامها وكذلك التخلص من المادة التالفة.

المواد الخام المستعملة في التخمر (Raw materials).

1. **العسل الأسود** (Blackstrap molasses):

هو ناتج ثانوي من صناعة السكر بعد بلورة السكر من العصير بعد تبخيره، وتتكرر عملية بلورة السكر من العصير ثلاث مرات تقريبا حتى تتجمع المواد العضوية غير السكرية والسكر المحول (Invert Sugar)، وتزداد لزوجة المولاس لدرجة تمنع بلورة السكروز من هذا العصير، وعلى ذلك يعتبر المولاس مزيجا مركبا من السكروز والأملاح والسكر المحول والأجزاء غير السكرية الموجودة في

العصير، علاوة على مواد غير قابلة للتخمر تتراوح نسبتها (17-5 %) من المولاس. ويتركب هذا النوع من المولاس حسب التحليل من:

Solids	%85.83 مواد صلبة
Sucrose	%40:30 سكروز
Invert Sugar	%18 :12 سكر محول
Ash	%10:7 رماد
Organic non Sugars	%25:20 مواد عضوية غير سكرية

وعادة يتم تخمر حوالي (90%) من السكريات.

2. المولاس المحول (Invert molasses):

ينتج هذا النوع من المولاس من تبخير العصير دون الحصول على بلورات السكروز، ثم يحول السكروز بواسطة الأحماض المعدنية أو الخميرة (التي تحتوي على نسبة عالية من أنزيم الأنفرتيز)، وذلك لمنع تبلور السكروز وخصوصا أثناء عملية التخزين. ويتكون هذا النوع من المولاس من:

%85-80 مواد صلبة، 15-35% سكروز.

%60-40 سكر محلول، 4:2% رماد.

%8-4 مواد غير سكرية.

وعادة يتم تخمر (95%) من هذه السكريات. ومن المعروف أن المواد الكربوهيدراتية المتخمرة بواسطة الخميرة في المولاس هي السكريات السكروز والسكر المحول.

المزارع المستخدمة في التخمر الكحولي (Cultures):

تتميز مزارع الخميرة المستخدمة في إنتاج الكحول بما يلي:

1. القدرة على سرعة التخمر وبكفاءة في التركيز العالي من السكر.
2. احتمال درجة الحرارة العالية وكذلك التركيزات العالية من المواد الصلبة غير السكرية. وتستخدم عادة سلالات من (Saccharomyces Cervisiae) تحفظ في المختبرات التابعة للمصانع على بيئات معقمة من الأجار يدخل فيها المولت أو المولاس.

وتتم مراحل التخمر الكحولي للمولاس في تنكات كبيرة مختلفة الحجم. فالمرحلة الأولى التي تعرف باسم (Preseed stage) يكون حجمها (300) جالون، ويستخدم فيها محلول المولاس المعقم المخفف وبعض العناصر غير العضوية إذا لزم الأمر، ويبلغ تركيز السكر في هذا المحلول (8-12%).

وكذلك يستخدم نفس المحلول السابق في المرحلة الثانية المعروفة باسم (Seed stage)، وفي المرحلة التي تلي ذلك، وهي مرحلة (Final Seed Stage)، تكون حجمها (10،000) جالون من العصير الذي يستخدم لحقن وعاء التخمر (To inoculate the Final Fermenter)، وهذه يبلغ حجمها (125،000) جالون بالرغم من وجود أحجام أكبر من ذلك تستعمل في بعض المصانع. وعادة يتم التلقيح بالخميرة بنسبة (2:4%) من حجم النواة النشطة (Yeast Active Seed) لأوعية

التخمر الأخيرة، ومن المرجح أن يتم بنجاح التلقيح بالخميرة قبل أن يتم تخمر (2/3) المحلول السكري في هذا الوعاء.

3. عصير التمر (راجع الفصل الثاني والثامن).

تحضير العصير (Mash Preparing):

يخفف المولاس أو عصير التمر بالماء حتى يصل تركيز السكر من (14:18%) ثم يدفع مباشرة إلى داخل (Fermentor)، وعادة ما يستعمل هذا المحلول دون تعقيم بالرغم من أنه في بعض الحالات عندما يتم بسترته تزداد كفاءته بنسبة ملحوظة. وعندما يمتلئ وعاء التخمر إلى ما يقرب من (4/1:8/1) حجماً تضاف الخميرة النشطة بنسبة (2 :4%) من هذا الحجم حتى يسمح ذلك بزيادة نشاطها عند تمام ملء الوعاء والذي يستغرق مدة ملئه حوالي (8) ساعات وحتى يمنع ذلك أيضاً حدوث أي تلوث في هذه المدة (To avoid growth of contaminating organisms) ثم تضبط حموضة العصير بحيث تكون
(pH. 5:4) وذلك بإضافة (2.1) جالون من حامض الكبريتيك لكل (1000) جالون من العصير، ويمكن استخدام حامض الهيدروكلوريك أو اللاكتيك لضبط درجة الـ(pH)، ويختلف رقم الـ(pH) تبعاً لنوع المولاس المستخدم، إلا أن بداية التخمر في درجة (pH 5.4 8) تعتبر هي الأوفق.

ويحتوي المولاس على معظم العناصر (Nutrients) اللازمة للخميرة لسرعة وكفاءة التخمر، إلا أنه يفضل في بعض الحالات إضافة كمية قليلة من كبريتات الأمونيوم للعصير لزيادة سرعة وكفاءة التخمر، وتختلف هذه الكمية من (1-2) رطل لكل (1000) جالون من المولاس المستعملة، ونادراً ما يضاف أملاح الفوسفات في تخمر العسل الأسود.

ويصعب حدوث التخمر عند استعمال (High Test Molasses) عنه في العسل الأسود، حيث يحتوي الأول على كمية قليلة من العناصر (Nutrients) اللازمة للخميرة، وعلى ذلك يضاف (4-6) أرطال من كبريتات الأمونيوم لكل (1000) جالون من العصير وكذلك كمية مناسبة من أملاح الفوسفات، ولكي يسهل تخمر المولاس المحول يضاف عصير نازل من تخمر سابق إليه قد يصل إلى (50%) من حجم العصير المستعمل.

درجة حرارة التخمر (Fermentation Temperatures):

عادة ما يبدأ التخمر على درجة بين (80-90) ف، وقد تصل الحرارة إلى (92-95) ف، ونظراً لارتفاع درجة الحرارة أثناء التخمر إلى ما يقرب من (38)ف فإنه يستعمل رشاش من الماء البارد على أوعية التخمر أو يبرد العصير بالملف (Coils) في وسط بارد، ومن المفضل أن تبقى درجة الحرارة أثناء التخمر أقل من (98) ف.

مدة التخمر (Fermentation Time):

يبدأ التخمر بعد ملء الخزانات (Fermentation) ويكون نشطاً بعد ٢٤ ساعة، وتختلف المدة اللازمة لانتهاء التخمر تبعاً لنوع المادة الأولية المستعملة، ويتراوح الوقت اللازم لانتهاء التخمر بين ٤٨ إلى ٧٢ ساعة، ويكون السائل الناتج محتوياً على ٨-١٠٪ كحول ويطلق عليه (Beer) يدفع في خزانات كبيرة للتخزين قبل التقطير.

٣- التلوث (Contamination)

عند حدوث التلوث في التخمر الكحولي [illegible] المحلول [illegible] الكحول [illegible] عن طريق ضبط رقم الـ pH عند [illegible] يعتبر العامل الفعال ضد التلوث، فالبكتريا التي تسبب التلوث لا تستطيع النمو عند هذه الدرجة من الحموضة، [illegible] التخمر [illegible] الكحول [illegible] وكذلك الكحول الناتج من التخمر ويمنع هذه الميكروبات من النمو والمعروف أن [illegible] وكذلك الكحول الناتج من التخمر ويمنع هذه الميكروبات من النمو، والمعروف أن العديد من البكتريا لا تتكاثر في محلول سكري يبلغ (١٥٪) وفي بعض المصانع يستعمل (Ammonium bifluoride) كمادة مطهرة، إلا أنه لا يجب استعمال المادة المطهرة في المصانع التي توجه نتاج الخمر لاستعماله كعلف حيواني.

أولاً: التخمير الصناعي:

إن الإنتاج التخميري الصناعي للكحولات مرتبط بدرجة كبيرة بتجهيز الوسط التخمري، والتجهيز يختلف لكل مادة أولية:

أ. عند استعمال المواد الأولية مثل نشا الحبوب يجب إجراء بعض العمليات مثل طحن الحبوب، تحليلها إلى مواد بسيطة باستعمال الأنزيم، ولهذا يجب أن تكون عملية الطحن جيدة جدا حتى تكون عمل انزيم الأميلاز أكثر فعالية لتحويل النشا إلى سكر، هذه العملية تتم اعتياديا عند pH (5.5-6.0) وعند حرارات مختلفة، فعند الحنطة (68 م) ولمدة (30) دقيقة، وعند الذرة (71-74 م) كدرجة أولى حيث يحلل (80-85%) من النشا إلى أن ترتفع درجة الحرارة إلى (80 م).

ب. تجهيز المادة اللقاحية: إن لتجهيز المادة اللقاحية مرحلتين:
المرحلة الأولى مختبرية، أما الثانية معملية.

المرحلة الأولى: تحضر المزرعة على نطاق المختبر بواسطة زرعها على سطح اكار مائل (Agar Slant Malt) وبعد عملية التحضين على درجة الحرارة المثلى يلقح دورق به وسط غذائي سائل وبحجم معين ولقاح بنسبة (3-5%) ويحضن لمدة يومين، وهكذا إلى أن نصل إلى الحجوم المختبرية المحددة وباستعمال وسط وعلى درجة مثلى (Malt Extract) ولفترة حضن (24) ساعة وعلى درجة حرارة (30 م).

تعتمد الظروف المعملية على الظروف المختبرية، لذا عند تجهيز اللقاح في اليومين الأولين تنمى (100) كغم من الكتلة الحيوية مع (200) لتر ماء، وكثيرا ما يستعمل مالت الشعير بنسبة (80%) أو السكروز بنسبة (20%) أو (40%) ذرة و(60%) مالت شعير. الوسط يجب أن يكون (0.1-0.3) وحموضة الوسط (pH)

تعــــرف بـ(11250) أو تستعمل بكتريـا حــامض اللاكتيـك (Lactobacillus delbrueckii).

تجرى عملية التعقيم ثم التبريد ومن ثم تبدأ عملية التلقيح بالمزرعة المحضرة المحضرة وتترك عملية التخمر عند حرارة (27-37 م) إلى أن ينخفض تركيز المادة الكربوهيدراتية إلى النصف، حينئذ يمكن تجهيز اللقاح لعملية تخمرية أخــرى منه، حيث تحتوي على (2%) ويمكن استعمالها للدور الثاني.

وأخيرا استعملت طريقة أخرى لتحضير المزرعة وذلك باستعمال وسط غذائي بالنسب التالية: (70%) طحين ذرة (30%) مالت شعير مع (20%) وسط تخمري قديم، ويمكن أن تضاف مادة الكاربامايد بنسبة (0.64%) كمصدر نيتروجيني في فرمنتور إنتاجي والذي يحضن عند حرارة (30 م) وتهوية (8) حجم هواء/حجم وسط/دقيقة، والخبط يكون بواسطة خباط توربيني. وبعد (16) ساعة من تركيز الخلايا سيصبح حوالي (400-500) مليون خلية/مل.

ثانيا: التخمير الإنتاجي:

عملية التخمر ليست معقدة عند تخمير النشا يستعمل وسط يحتوي على حوالي (16%) كربوهيدرات مع pH (4.8-5) والمحضرة بإضافة (20-25%) من وسط تخمري سابق مع الأخذ بعين الاعتبار حجم الجهاز التخمري، وتجري العملية عند

حرارة (30 م)، والخبط (التحريك) لمدة (40 -60) ساعة لأن تحول الدكسترات إلى مالتوز بطيء. السائل التخمري يحتوي على (6.5-8.5) كحول على فرض التقطير.

عملية إنتاج الكحول من مولاس القصب أو عصير التمر:

لعملية إنتاج الكحول من مولاس القصب. الوسط التخمري يجهز ب(14-18%) محلول سكر، مبستر، لقاح تخمري نشط يضاف نسبة (2-4%) إذا كان الفرمنتسور مملوءا إلى (1/4) أو (1/8)، والذي يسمح للخمائر لأن تنمو في خلال ملئ الفرمنتور وال(pH) المثالي للوسط التخمري (4.8-5.0) وبدلا من (H2SO4) يمكن أن يستعمل (HCl) أو حامض اللاكتيك، وللوسط الغذائي يضاف (0.364/0.725) كغم سلفات الأمونيوم لكل (1م3) وسط غذائي، وكما هو معروف يمكن أن يضاف (10-20%) مزرعة مستعملة - حرارة عملية التخمر في البداية (21-27م)، وبعد ذلك (32-33م) عملية التخمر تبدأ بعد ملئ الفرمنتور ب(24) ساعة وبحالة نشطة وستنتهي العملية اعتياديا بعد (48-72) ساعة، سائل التخمر يحتوي على (6-9%) كحول، عند استعمال قصب السكر أو عصير التمر الذي هو غني بالمصدر الكربوهيدراتي، والأشكال من (32-38) توضح شأن المصادر الغذائية على إنتاج الكحول من التمور والذي هو غني بالمواد الغذائية ، لذلك عملية التخمر ستنتهي بحدود (36) ساعة.

أما عند عملية إنتاج الكحول من (Salfite Liquinr) فلا يلقح بالمزرعة اللقاحيــة النقية إلا بعد أن تنمو الأحياء (الخمائر) على وسط غذائي ومن ثم تنقل الخمائر بعــد فصلها إلى الوسط السلفاتي، وبهذه الطريقة يرتفع إنتاج الكحول إلى (15%).

إنتاج الكحول الصناعي من التمور:

عزلت (72) عزلة خميرة من مصادر طبيعية تراوح إنتاجها الكحولي على وسط عصير التمر (24 بركس) (2.4-14.1%).

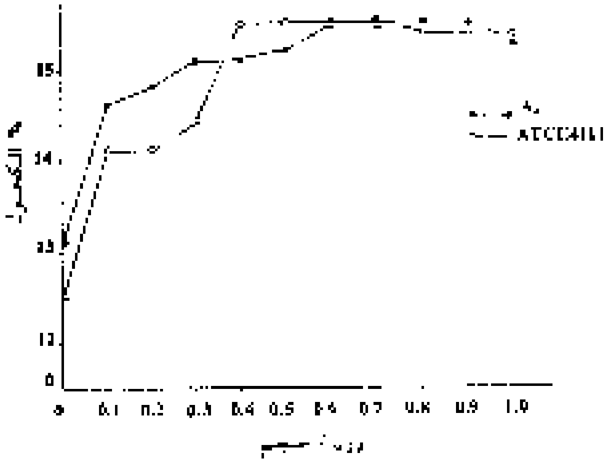
فالعزلات (T3, S18, G5, D2, D1, A6, A4) حيث تميزت بكفاءتها العالية فــي إنتاج الكحول وكانت نســبته (14.1، 13.0، 12.6، 13.9، 13.8، 13، 13.1%) على التوالي. درست صفاتها المظهرية والمزرعية والبيوكيماوية وشــخصت علــى أنها تتبع الجنس (*Saccharomyces* spp.).

بدراسة الظروف البيئية الملائمة لإنتاج الكحــول مــن قبــل هــذه العــزلات والسلالات الأجنبية المســتخدمة كمقارنــة، وجــد أن درجــة الحــرارة والرقــم الهيدروجيني الأمثل (25 م) (4.5). وقد اختيرت العزلــة المحليــة (A4) وســلالة المقارنة (ATCC 4111) لإجراء التجارب اللاحقة، وبإضافة المدعمات إلى وســط التخمير لوحظ أن أفضل تركيز مدعمات للعزلة المحلية في إنتــاج الكحــول هــو (0.6% و/ح) من كبريتات الأمونيوم و(0.2%) من فوسفات البوتاسيوم، أما بالنسبة للسلالة المقارنة فكان (0.4%) و(0.2%) على التوالي من الملحين. وقــد وجــد أن

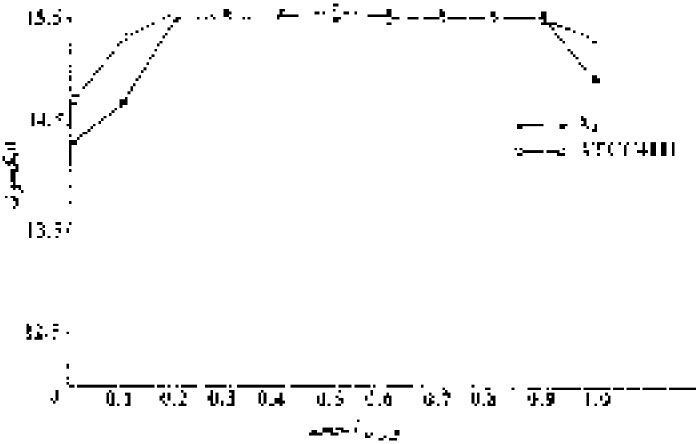
تركيز (٢٤ بركس) من عصير التمر هو الأفضل من التراكيز المستخدمة وكانت العزلة المحلية أكثر مقاومة من (ATCC 4111) لتأثير التراكيز العالية من البركس.

وفي تجربة ديناميكية إنتاج الكحول من عصير التمر بتركيز سكر كلـي (٢٢% و/ح) بطريقة المزرعة الساكنة، كان الناتج الكحولي (١٢,٥% ح/ح) وبمتبقي من السكر (٤% و/ح) للعزلة المحلية بعد (٧٢) ساعة و(١٢,١%) كحول، (٥,٤%) سكر لسلالة المقارنة الأجنبية، أما بطريقة المخمر المختبري كان الناتج الكحولي (١٥,٠%) والمتبقي من السكر (٠,٤%) للعزلة المحلية (١٣,٣%) و(٣,٦%) على التوالي للسلالة الأجنبية بعد (٢٤) ساعة.

وقد أنتجت العزلة (A4) عند استخدام المولاس لإنتاج الكحول بطريقة المزرعة الساكنة (٩.٣%) كحول وبمتبقي سكري (٧,٨%)، أما السلالة الأجنبية فكان الناتج الكحولي والمتبقي من السكر (٨,٢%)، (٩,٦%) على التوالي بعد (٧٢) ساعة.



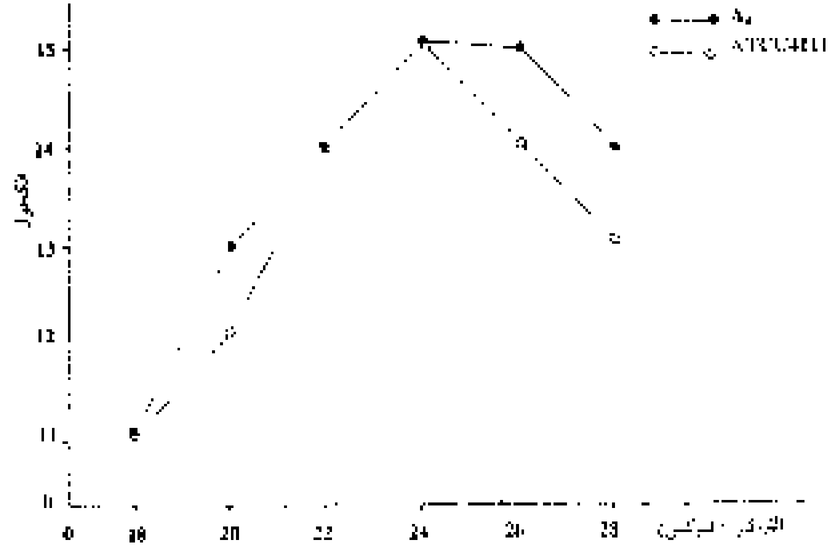
شكل رقم (32): تأثير المصدر النيتروجيني (NH4)2SO4 على إنتاج الكحول من عصير التمر باستخدام العزلة المحلية (A4) والسلالة الأجنبية (ATCC 4111)



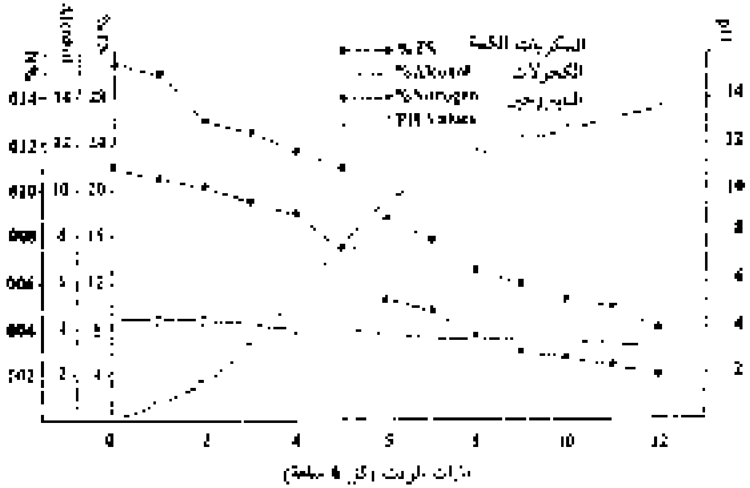
شكل رقم (33): تأثير المصدر الفسفوري KH2PO4 على إنتاج الكحول من عصير التمر باستخدام العزلة المحلية (A4) والسلالة الأجنبية (ATCC 4111)

جدول (8) تأثير تراكيز مختلفة من الـ(TSS) على الناتج الكحولي لسلالة (ATCC 4111) والعزلة (A4)

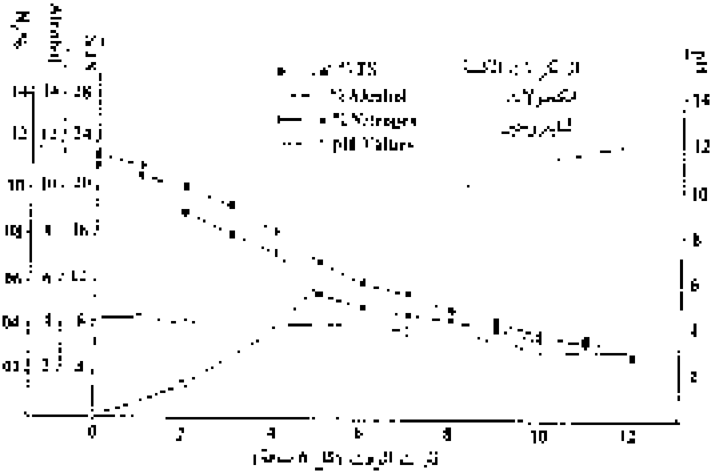
التراكيز	A4	ATCC 4111	المعدل
18	11.64	11.45	11.52e
20	13.15	12.95	13.05c
22	14.1	14.1	14.1c
24	15.5	15.5	15.5a
26	15.1	14.45	14.77b
28	14.1	13.4	13.75d
المعدل	13.94	13.64	



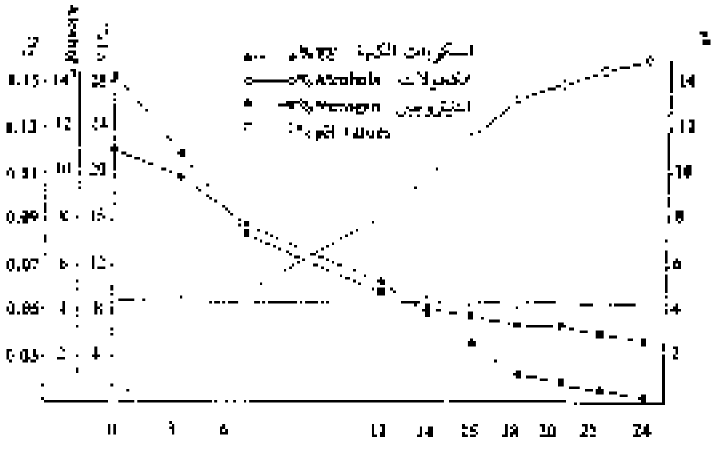
شكل رقم (34): تأثير تراكيز متصاعدة من المواد الصلبة الذائبة الكلية (البركس) على انتاج الكحول من عصير التمر باستخدام العزلة المحلية (A4) والسلالة الأجنبية (ATCC 4111)



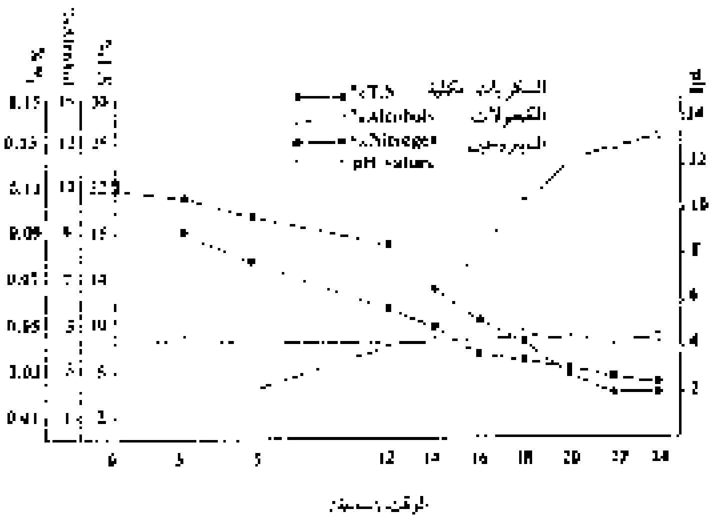
شكل رقم (35): ديناميكية انتاج الكحول بطريقة المزرعة الساكنة من عصير التمر باستخدام العزلة المحلية (A9)



شكل رقم (36): ديناميكية إنتاج الكحول بطريقة المزرعة المتكثفة من عصير التمر باستخدام السلالة الأجنبية ATCC 4111



شكل رقم (37): ديناميكية إنتاج الكحول بطريقة التخمر المختبري من عصير التمر باستخدام العزلة المحلية (A4)



شكل رقم (38): ديناميكية إنتاج الكحول بطريقة المخمر المختبري من عصير التمر باستخدام السلالة الأجنبية ATCC 4111

الفصل الثالث عشر

تكنولوجيا إنتاج الأنزيمات عن طريق الأحياء المجهرية

Technology of Enzyme production Using Microorganism

تكنولوجيا إنتاج الأنزيمات عن طريق الأحياء المجهرية:

(Technology of Enzyme production Using Microorganism)

المقدمة:

إن الأنزيمات هي محفزات حيوية ذات طبيعة بروتينية موجودة في جميع خلايا الأنسجة الحية وتسرع من التفاعلات الكيميائية المرغوبة، وتدخل الأنزيمات في تركيب العدد الكبير من المنتجات الصناعية مثل (الأحماض العضوية، المضادات الحيوية، الفيتامينات وغيرها) وكذلك تعمل على تعجيل التفاعلات.

تنتج الأنزيمات من قبل الأحياء المجهرية، والأنزيم المنتج من قبل الأحياء المجهرية يتميز بنشاط خارجي أو داخلي معتمدا بذلك على الظروف البيئية التي تكون خلالها بعض الأنزيمات ذات تركيب واضح ولكن يمكننا القول بأن البعض الآخر من الأنزيمات يمتاز بتراكيب معقدة، وقد استغل الإنسان الأنزيمات منذ قديم الزمان ولكن بدون معرفة حقيقية بها، حيث نرى أن بعضا من الأحياء المجهرية لعبت دورا في تحويل وتغيير أو تبديل الكثير من التفاعلات الكيميائية مما أدى إلى الاستفادة من التغير في إنتاج نماذج مختلفة من المنتجات الغذائية مثل تخمير العجين، الخمر والجبن.

وستتم مناقشة بعض المشاكل التي تعترض صناعة الأنزيمات اليوم والتطورات لتطوير هذه الصناعة.

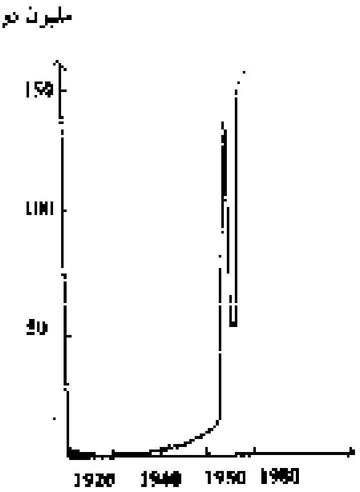
لقد صدرت الكثير من البحوث والنشرات في موضوع إنتاج الأنزيمات عن طريق الأحياء المجهرية، وقليلا جدا ما نجد في هذه الدراسات المعلومات الأساسية

للمنتوج وكمؤشر للسوق العالمي في إنتاج الأنزيمات عن طريق الأحياء المجهرية، وكما هو معروف بدأت أولى الدراسات لإنتاج الأنزيم (Takadiastase) في أمريكا عام (١٨٩٤) وكما هو موضح في الشكل رقم (٣٩) حيث يظهر القسم الأول من الشكل أن الإنتاج موجود ولكن خدماته قليلة حيث لم تظهر أهميته الاقتصادية في ذلك الوقت حتى سنة (١٩٦٥)، حيث ظهرت الأهمية الاقتصادية للأنزيمات وخصوصا (Detergent Enzyme) التي استعملت لأغراض عامة.

هذا التطور أعطى للمنتجين معطيات اقتصادية ذات مردود عالٍ ولكن في عام (١٩٧١) تردت هذه الصناعة وانخفض الإنتاج بسبب ظهور الأعراض الجديدة (الحساسية) (Allergic Symptom) التي اكتشفت من قبل بعض العاملين في حقل العناية بالأنزيمات في معامل (Detergent Enzyme). هذا الأثر العام أدى إلى انخفاض المبيعات، لذا وجب الحذر والاحتراس في هذه الصناعة مما جعل العناية بصناعة الأنزيمات والتحقق عليها باعتناء من الأمور المهمة، إلى أن ظهرت عملية الكبسلة للأنزيمات مما أعطى الحياة مرة ثانية لهذه الصناعة. وكذلك فإن صناعة (Detergent Enzyme) وصلت المستوى العالي في سوق المنظفات نتيجة التقنية العلمية المتطورة.

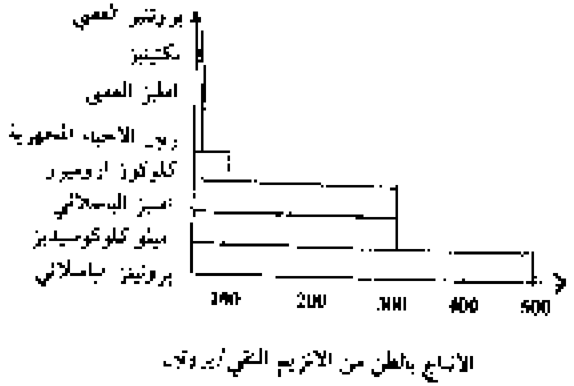
وظهرت أهمية إنتاج أنزيم ألفا أميليز كلوكوسيديز في بعض الصناعات، وخلال السنوات الأخيرة وجدنا التطور الحقيقي في إنتاج الجلوكوز أيزوميريز الذي يعمل على إنتاج فركتوز من الجلوكوز، وكذلك ظهور التطبيقات الجديدة في عالم إنتاج الأنزيمات من الأحياء المجهرية فإن إنتاج أنزيم (Termal) وظهوره في سوق الأنزيمات والذي وصلت مبيعاته في سنة (١٩٧٧) بحدود (٥٠) مليون دولار

بالنسبة، هذه الأرقام هي قليلة للذين يهتمون بقيم الإنتاج الأنزيمي وإن شكل رقم (40) يعطي الحجم الفيزيائي لإنتاج الأنزيمات في العالم بالسنة محسوبة بالأطنان نقاوة/ أنزيم حيوي بروتيني.



شكل (39) يوضح قيم إنتاج الأنزيم من الأحياء المجهرية في العالم خلال الأعوام.

وكما يظهر من المنحني البياني رقم (40) أن إنتاج البروتينز الباسلاني هو المتغلب ويتبعه أميلو كلوكوسيديز والفا امليز، وكما يظهر من المنحنى بأنه يعكس الإنتاج حيث أن أنزيم جلوكوز ازوميرز بشكله (Immobilized Form) أعلى بعدة مرات من الأنزيمات الأخرى. وأود أن أشير إلى أن لا علاقة هناك ما بين كمية ونقاوة الأنزيم البروتيني والأسعار. وغالباً ما يتوارد إلى الأذهان لماذا بعض الأنزيمات هي مهمة.



شكل رقم (40) يوضح إنتاج العالم من الأنزيم

والجواب عليها سهل جدا حيث أن الإقبال على أي أنزيم يعتمد على إلمام الشامل بالأنزيم، معرفة فائدته الاقتصادية، مجالات استعمال الأنزيم، معرفة التقنية لإنتاج الأنزيم حيث يجب أن تكون متاحة. وعلى سبيل المثال فلو أخذنا أنزيم جلوكوز أزوميريز فيجب أن نلم بأسعار السكر والنشا مع حساب الفارق بينهما، كذلك توافر التقنيات الحديثة لإنتاج الأنزيم بحيث يسهل ملاحقة التطور الحاصل في هذه الصناعة.

أنزيمات الأحياء المجهرية:

إن أنزيمات الأحياء المجهرية يمكن استعمالها بطريقتين هما:-

1. استعمال الأحياء المجهرية لكي تلعب دور العامل المساعد بما تنتجه من أنزيمات لإحداث التغيرات المطلوبة في تلك التفاعلات الكيماوية المعينة مثل استعمال الخمائر في صناعة النبيذ، ونرى في هذه الحالة أنه بالإضافة إلى إحداث التغير في ذلك التفاعل فهناك ميزات أخرى لهذه العملية كإحداث تغيير

حيوي، تحسين النكهة والطعم للمنتوج، وذلك نظرا لوجود مركبات أخرى في تكوين أجسام تلك الأحياء المجهرية نتيجة لعمليات التمثيل الحيوي المعقد والحاصل نتيجة لنمو هذه الأحياء في تلك الأوساط، ومن هذه المنتجات (تصنيع الخبز، الجبن، النبيذ، البيرة).

2. استعمال إنزيم نقي مستخلص من الأحياء المجهرية لإحداث التغيرات المطلوبة في هذه الحالة فإن الفائدة المستخلصة من إضافة الإنزيم النقي تتم بإحداث تغيرات محددة جدا لغرض حصول تفاعل كيميائي في وسط معين. ومثال على ذلك (إنتاج الأحماض الأمينية من تحلل البروتينات)، حيث تتم هذه العملية بخلط إنزيم معين أو خليط من الإنزيمات لغرض تحليل البروتين إلى أحماضه الأمينية المختلفة وكذلك عند الحصول على سكر من النشا فيتم الحصول على الناتج بإضافة خليط من الإنزيمات α و β أميلاز.

صفات الإنزيمات:

تمتاز الإنزيمات بصفة رئيسية في استخدامها كمواد أو عوامل مساعدة في كثير من العمليات الصناعية والكيميائية، ويقصد بالعمليات الصناعية هو تصنيع المنتجات الغذائية، ومن الصفات المهمة للإنزيمات التي تدخل في تصنيع المنتجات الغذائية هي:

1. أن تكون غير سامة عند ارتباطها بأي من المواد الغذائية.

2. يجب مراعاة الظروف المثالية مثل الحرارة و(pH) وذلك لأهمية هذه الظروف في نشاط الإنزيم وكما نرى ذلك في حالة بناء السكورينال حيث يجب توفر درجة الحرارة العالية بتركيز عالٍ للحموضة (pH)، فمثلا في صناعة البيرة تستخدم الإنزيمات المحطمة للبروتين، ونتيجة لنشاط هذه الإنزيمات فإنها ستعطي للبيرة لونا داكنا عند التبريد.

ومن الدراسات العلمية الأولى لإنزيمات الأحياء المجهرية نلاحظ بأن البداية كانت في سنة (1894) من قبل العالم (تاكامين وآخرون) وذلك بحصوله على إنزيم الأمليز من الطحالب، وتعتبر هذه البداية نقطة الانطلاق لانتشار الدراسات والأبحاث المتعلقة بإنتاج الإنزيمات من الأحياء المجهرية وعلى نطاق صناعي، وقد انتشرت هذه الدراسات في السنوات الأخيرة وخاصة في فرنسا من قبل (Baiden بويدن وافرونت).

مصادر الإنزيمات:

إن الإنزيمات هي حصيلة المصادر الطبيعية التالية:-

- النباتات: مثل إنزيم مالت امليز، دايستيز، بابين، بروميلين.
- الحيوانات: مثل إنزيم البنكرياس، ببسين.

- الكائنات المجهرية: مثل إنزيم اماليز ، أمينو بيبتيديز ، بولي كالاكترونيز ، كلوكواوكسيدز ، فركتوفورانيز ، دكسترينيز ، كلوكوسيديز .

ومن الملاحظ أن الإنزيمات المستخلصة من النباتات تكون بكمية كبيرة جدا ولكن لهذا الإنتاج محاذير معينة، لأننا نحتاج فيه إلى توفير كمية كبيرة من النباتات والتي من الممكن أن لا تعطي المردود المطلوب من الإنزيمات قياسا إلى التكاليف التي استخدمت في توفير هذه النباتات وهذا يعتبر جانبا سلبيا من الناحية الاقتصادية.

أما إمكانية الحصول على الإنزيمات من الأحياء المجهرية فهي غير محدودة، وبالإضافة إلى تميزها عن المصدرين السابقين بأنها متنوعة وغير منتهية حيث يمكن السيطرة عليها وعلى عوامل الإنتاج. ونتيجة للدراسات الكثيرة التي تم بواسطتها معرفة العلاقات لتخليق الإنزيمات الميكروبية فإن إنتاج الإنزيمات من الأحياء المجهرية أصبح ذا نطاق صناعي قائم وكبير.

المزارع الصناعية لإنتاج الإنزيمات:

استطاع (Pollock 1963) من تقسيم الإنزيمات الميكروبية إلى:-

1- (Endoenzyme): التي ترتبط في بناء محدود ومعين في جسم الأحياء.

2- (Exoenzyme) : التي لا ترتبط مع بناء جسم الأحياء ولكن تنتج من تأثير الأحياء المجهرية في الوسط الغذائي.

إن إنزيمات المجموعة الأولى يكون موقعها في بروتوبلازم الأحياء أو في الغشاء الخلوي لها (Pollock 1963).

ويمكن الحصول على الإنزيم من جسم الكائن المجهري الحي بعد موته وتفسخ الخلية، أو خروجه نتيجة وجود عطب في نفاذية غشاء الخلية.

إن عملية الحصول على إنزيمات الأحياء المجهرية بنطاق صناعي تكون مرتبطة مع ميكانيكية فصلها عن جسم الكائن المجهري النامي في الأوساط الزراعية. كذلك يجب الإلمام بأسباب وعوامل التطبيق العملي للإنزيمات في مزارعها من حيث تهيئة الظروف الملائمة والمناسبة للإنتاج حيث لهذه الظروف أهمية كبيرة، لأن هناك الكثير من الأحياء المجهرية الثنائية الغرض حيث يمكنها تأليف أنواع أخرى من المواد أو الإنزيمات ولكن ليس بوقت واحد، بل ترتبط مع نمو جسم الكائن المجهري وظروف الوسط الغذائي والذي يعتمد على هذا أي أنزيم تريد أن نحصل عليه وبأي درجة من النقاوة، وتعتمد كل عملية ميكروبيولوجية للحصول على إنزيمات على دراسة ميتابولزم وعمل انتخاب للسلالات المتوفرة والمنتجة والتي يجب أن تتوفر فيها الشروط التالية:-

1. يجب أن لا تكون مرضية.
2. يجب أن لا تنتج سموما.
3. يجب أن لا تتأثر ببعض العوامل البيولوجية أي بمعنى أن لا تكون حساسة جدا.
4. يجب أن تعتمد وسطا غذائيا لثبات إنتاج الإنزيم المطلوب.

عوامل ذات العلاقة بتخليق الإنزيمات:

إن العوامل التي لها علاقة بتخليق الإنزيمات من الأحياء المجهرية يمكن أن تكون موضوعة في مجاميع:

١. مكونات الوسط الغذائي:

إن الوسط الغذائي يجب أن يؤمن النمو الأمثل للسلالات المنتجة للإنزيمات، ومن المعروف أيضا بأنه ليس أفضل نمو للمزارع الميكروبيولوجية يعطي دائما أعلى إنتاج للإنزيمات ولكن على العموم أعلى إنتاج للإنزيمات يحصل في الأوساط الصناعية والمتضمنة المواد التي تؤمن نمو الأحياء، ومن هذه المواد اللازمة والقادرة على إحداث التخليق (الحيني) لعمل الإنزيمات، وهي الأحماض الأمينية، الفيتامينات، العناصر المعدنية، تركيز المادة الكربوهيدراتية، التهوية المناسبة وتحديد بعض مقومات الوسط.

ففي مزارع نظام الدفعة هناك تعقيدات وذلك بسبب التغييرات الكثيرة التي تحصل على الوسط بالاعتماد على العلاقات، فمثلا تغير مصدر نترات البوتاسيوم بدلا من سلفات الأمونيوم ففي هذه الحالة استعماله من قبل الأحياء المجهرية سوف يغير من حموضة الوسط وبهذا سيبقى الكتيون (Cation) (K+)؛ أما في الحالة الثانية (سلفات الأمونيوم) فسيبقى فقط الأنيون (anion) (SO4)؛ هذه العلاقة تكون واضحة عند إنتاج إنزيم الأميليز من (Asp. oryzae) فالسكوما [٥٠] حيث اكتشف بأن إنتاج هذا الإنزيم في الوسط يقدر بـ(٩٥%) عند استعمال سلفات الأمونيوم. أما عند استعمال نترات البوتاسيوم في المحيط فإن الإنتساج يصل إلى النصف ويكون داخل الخلايا (في المايسليوم). أما إذا استعملنا (pH) قاعدي مع

المخمر، أما التحريك فيتم بمحرك دوراني الذي يؤمن الخلط كذلك يجب أن تؤمن الدرجة الحرارية المثلى.

إن عملية التعقيم -تعقيم الوسط الغذائي- يجب أن تتم بحيث لا تفقد أية مادة من المواد الداخلة في الوسط، لأن الحرارة العالية قد تؤدي إلى تلف البروتينات والكربوهيدرات وتغيير اللون. بعد ذلك تأتي عملية التبريد، ثم تهيئة الظروف المناسبة لعملية التخمر لإنتاج الإنزيم.

ب. التربية على الأوساط نصف الصلبة:

إن هذا النوع من التربية لإنتاج الإنزيم وعلى سبيل المثال إنتاج إنزيم البروتينز (protenase or amylae) من (Asp. oryzae) حيث يتم إعداد اللقاح على مستخلص اللحم (مرق اللحم) كمصدر كربوني وبعض الأملاح المعدنية في أواني الومينية وعلى شكل أفقي وذات محاور دوارة. الحضن يبدأ بجهد كبير لإنتاج السبورات بشدة وعلى أوساط غذائية تحتوي على مستخلص لحم الدواجن مخلوطة مع مصادر كربوهيدراتية وأملاح معدنية ومحاليل منظمة (Buffer) مع رطوبة (90%). يجهز هذا الوسط الغذائي ويعقم قبل عملية التلقيح التي تتم في الأواني أو الخزانات. ومن ثم تتم عملية تلقيح الوسط الغذائي بالاسبورات النامية (اللقاح) (Asp. oryzae) للحصول على إنزيم الأمليز والبروتينز وعند درجة حرارة (20 م)، فترة النمو لـ(Asp. oryzae) هي (24–48) ساعة وقد تمتد لأنواع أخرى إلى (7-8) أيام، وبعد هذه العملية تبدأ عملية استخلاص الإنزيم.

5. تثبيت الظروف المثالية بشكل منفرد للكائن المجهري التي لها علاقة بالإنتاج ومنها، التهوية- التحريك- (pH)- الحرارة... الخ.

طرق إنتاج الأنزيمات:

إن الإنتاج الصناعي للانزيمات له نوعان من التربية:-

أ. التربية (المغمورة أو الغاطسة).

ب. التربية على أوساط شبه صلبة.

فعند النوع الأول سنحصل على عملية تخمر كبيرة. أما بالنسبة للنوع الثاني فيكون النمو على وسط غذائي صلب. وإن اختيار أحد هذين النوعين يعتمد على نوعية السلالة المنتجة وكذلك نمو ظروف التربية، وقد ثبت بأن أحسن نوع للتربية هو (المغمورة) بسبب إنتاجها العالي وسهولة عملها والسيطرة عليها.

أ. التربية المغمورة (B.Subtillus):

إنتاج أنزيم (amylase):

إن هذه التربية كأي عملية ميكروبيولوجية صناعية تعتمد أولا على تجهيز اللقاح مختبريا ل(B.Subtillus) وباستعمال الطرق المختبرية من أنبوبة اختبار إلى مخمر بحجم (200-1000) لتر وسط غذائي. تنتقل هذه المادة الملقحة إلى المصنع في خزانات سعة (3م3) إلى (100م3) مع تأمين النقل بصورة معقمة، حيث تجرى عملية تعقيم الخزانات بالبخار وبدرجة (120 م) ولمدة نصف ساعة، تكون التهوية بالهواء المعقم بنظام الدفعة الواحدة أو بنظام الفتحة بالاعتماد على أساسيات

نترات البوتاسيوم حيث تعطي الحموضة المثالية للمزرعة فإن (85%) من الإنزيم يكون في الوسط وليس داخل الخلايا.

ويمكن الإشارة إلى كثير من الأمثلة لعلاقة الوسط الغذائي بتخليق الإنزيمات. وعموما فإن المواد الخام المستعملة للتقنية والإنتاج يجب أن تكون متوفرة وبحجم كبير لأجل ديمومة الإنتاج وكذلك بأقل كلفة ومن هذه المواد الخام النشا المتحلل، السكروز، المولاس، الذرة، الحنطة، الشعير، فول الصويا، معجون حبوب القطن، عجينة جوز الهند، الشرش.

ويمكن أن يكون عصير التمر ذا فعالية كبيرة في إنتاج الإنزيمات وذلك بتنمية الأحياء المجهرية المتخصصة بإنتاج الإنزيم على عصير التمر، ولا يخفى بأن عصير التمر غني بالمواد الكربوهيدراتية وبعض الأحماض الأمينية الضرورية للأحياء المجهرية حيث أن عصير التمر يحتوي أيضا على الفيتامينات والعناصر المعدنية اللازمة لنمو هذه الأحياء، لذا فمن المتوقع أن يكون للتمور شأن كبير في هذا المجال.

أ. المصادر النيتروجينية (N):

يلعب المصدر النيتروجيني دورا محددا عند إنتاج الإنزيمات، فعند إضافة المصدر النيتروجيني بشكل مركبا معقدا فإنه يدخل في إنتاج الأنزيم و لكن لا

يساعد في نمو الأحياء، فمثلا عند تأليف الأنزيم مـــن (Clostridium septicum, Staphylococcus aureus) حيث يعمل على التحفيز أو التنشيط الذاتي (1945 Rogers) و لكن يمكن لمرق الرز من التنشيط لإنتاج أنزيـــم (Protase) من (B. Subtillus) (1945 Tsuchihira) وكذلك أنزيم (Piptidase) من (Cl.Hystolyticum) (1961 Warren).

وهنالك الكثير من المصادر النيتروجينية البسيطة منها والمعقـــدة والتـــي هـــي مصدر جيد لعمليات إنتاج الأنزيمات مثـــل نـــترات الأمونيـــا، سـلفات الأمونيـا وخصوصا لعمليات إنتاج الأنزيمات السيليلوزية من (Trichoderma Viride)، وعند عدم توفر هذه المصادر النيتروجينية فإن الإنتاج ينخفض(1958 Toyama) ويجب أن لا ننسى أهمية العناصر الأخرى النيتروجينية مثل البنتون(Peptone) وعناصر بعض الأملاح أيضا.

ب.المصادر الكربوهيدراتية:

إن المصادر الكربوهيدراتية هي المصدر الأساسي للكربون الذي تحتاجـــه الأحياء المجهرية في عملية التأليف و التخليق الحيوي إضافة إلى كونه مصـــدرا للطاقة. إضـافة إلى ذلك فإن المصدر الكربوهيدراتي يمكن أن يلعب دورا تحت علاقته لتكوين الأنزيمات: اللبنا بعلاقته لتكوين الأمليز ، الدكســـتريز بعلاقتـــه لتكوين كلوكوسيديز ...الخ.

إذا فإن الكائن يتكيف بالنسبة إلى نوعية وكمية مصدر الطاقة. حيث أن الكـــائن المجهري لا يمكنه من استعمال مصدر الطاقة في الوسط الغذائي في بدايـــة الأمــر

إلى أن يتطبع على هذا المصدر, لذلك فكمية الطاقة لأجل تأليف الأنزيم تأتي اعتيادياً من عمل التركيب الجيني للأحياء المجهرية وكذلك عن تمثيل الوسط.والمثال عليها (Clostridium) (Cl. Lanigani or flavum)، حيث لا يمكنها أن تنمو في الوسط المحتوي على(0.5%)ببتون و(0.5%) مستخلص خمائر، (0.5%) سلفات الصوديوم وبدون إضافة مصدر كربوني (جلوكوز 2%) لتصنيع الأنزيم (Lanigan 1959).

ووجد أيضاً بأن تكوين أنزيم (Kitinase) من (streptomyces) يثبط من إضافة الجلوكوز إلى وسط التربية والمحتوي (griseus) على مصدر الكايتين (Jeuniaux 1955)، وكذلك وجد بأن إنتاج أنزيم (B-Fructofuranase) يزداد عشر مرات عند استعمال الرافينوز كمصدر كربوني بدلاً عن السكروز وثبط إنتاج هذا الأنزيم عند(10%) جلوكوز (Davies 1956) أن التأثير التثبيطي لإنتاج الأنزيمات من قبل المصدر الكربوهيدراتي يعتمد اعتماداً وثيقاً بتراكيزها في الوسط، وهناك الكثير من الدراسات التي تثبت بأن التراكيز الواطئة من الجلوكوز يمكنها من تنشيط إنتاج الأنزيم (Del CastilloK,Castaneda-Agullo 1958).

وكمثال عليها فالجلوكوز يمكن أن يكون منشطاً لتأليف أنزيم (B-fructofuranase) من (S.fragilis) وعند تركيز 0.1 ملغم/سم3 (Davies 1953). وأحسن مثل على ذلك هو المصدر (Sacchrmomnopalmatai) الذي هو أحسن محث لتأليف أنزيم (B-Fructofuranase) من قبل

(P. quadritincatum QM 1871 P brefeldionum وخاصة من (Penicillium Sp.) (QM 1875)، ولكن يحتاج إلى وقت بينما نستطيع أن نحصل على نفس الأنزيم وبنفس النسبة عند استعمال السكروز بتراكيز واطئة (Reese 1962).

وكذلك بالنسبة لأنزيم البروتيز حيث هنالك عدة مؤشرات تشير إلى أن التركيز العالي للكربوهيدرات في الوسط يؤدي إلى تثبيط إنتاج الأنزيم (Berman Rettger 1918) وكذلك من قبل (Quntelberg 1953) حيث أثبتوا بأن إنتاج أنزيم بروتيز من قبل (B. Subtilis) في وسط يحتوي على (8-6%) جلوكوز. أما (Watanabe وآخرون 1959) فقد أثبت إنتاج أنزيم البروتيز من قبل (B. natto) عند تركيز جلوكوزي (4%).

ج. محتويات المركبات الكربوهيدراتية في الوسط :

يعتمد إنتاج المستحضر الأنزيمي اعتماداً على محتوى المركب الكربوهيدراتي والذي له تأثير على إنتاج الأنزيم. فمثلاً الإنزيم المبلور (α amylase) والمستحصل من الوسط المعقد الحاوي على (2.73%) كربوهيدرات. والأنزيم المنتج من قبل (Asp. oryzae) والمربى على وسط محتوي على (0.25%) كربوهيدرات والأنزيمان يحتويان على مصدر نيتروجيني هو الالنين (alanin) (Hanafusa 1955).

أما إنزيم الانفرتيز من (B Subtilis)، فأحسن (pH) هو (7) مقارنـــــة ب(ph8).

أما عند (pH4) فيكون غير مستقر (Negoro Fukumoto 1954). ويمكن الحصـــول على المستحضر الإنزيمي بشكل متبلور كمركب معقد مع الكربوهيدرات (Negoro, Fukumoto 1957) وعند تربية (Leuconostoc mesenteroides) في وســط (10%) سكروز فالمستحضر النـــاتج ديكســـتران ســـكروز يحتـــوي (70%) إلـــى (80%) ديكستران.

أما إذا استعمل وسط يحتوي على (10%) مالتوز مـــع (2%) ســـكروز فصـــل ديكستران سكروز المحتوي فقط على (7.5%) ديكستران (Bailey et 1957) وكذلك أيضا بالنسبة إلى (*Streptococcus bovis*) المربى علـــى وســـط (4%) ســـكروز، فالديكستران سكروز احتوى على (70%) بولي سكرايد و(1.79%) نيتروجين فقـط. أما عند تربيته على وسط جلوكوزي فتحصل على (4%) بولي ســـكرايد و(9.06%) نيتروجين.

د. حيوية الأحياء المجهرية المنتجة للإنزيمات:

إن الأحياء المجهرية المنتجة للإنزيمات هي مختلفة فيما بينها من حيـــث إنتـــاج الإنزيمات وكذلك من حيث حساسيتها إلى بعض المواد في الوسط الغذائي حيـــث أن الأحياء تثبط عملها بوجود بعض المواد المثبطة أو بعض العوامل التي تثبط عملـــها. فمثلا إن إنزيم البروتيز ينتج من أحيـــاء مختلفـــة فـــهو ينتـــج مـــن (Pencillium cyaneofluvem) (Singh 1960) وكذلك ينتج من (B Subtilis) (Fukumoto 1959)

وكذلك من (Asp. oryzae) (Muiro 105) فهنا يعتمد تثبيط إنتاج الإنزيم على مثبطات نمو الأحياء.

هـ. العناصر المعدنية:

(Co, Cu, Zn, Mg, Ca. Mo, Microelements):

وهذه العناصر ضرورية لنمو الأحياء المجهرية ولكن بعضها ضروري لأن يكون إنزيما فلذلك أصبح لها أهمية كبيرة للتثبيط والتنشيط لكثير من الأنزيمات، فالأنزيم (amylase) بشكله البلوري يحتوي على (Ca) وبكمية جزيئة كالسيوم لكل جزيئة بروتين الضرورية واللازمة لحيوية هذا الأنزيم، ولثبات هذا الأنزيم بشكله يمكن القول أنه بحدود (60%) من (Ca) الضروري لبلورة أنزيم (amylase) من (Asp.oryzae)، ويمكن تعويضه بالبروم (Br) بدون أي تغيير في حيويته، ويمكن أيضا أن يعوض بـ(Mg)، (oikaw 1959)، أما إذا كانت المحتويات الكالسيومية (amylase) المنتجة من (Bac. Amyloliquefaceomens) يمكن تعويضها بالعنصر (Sr) فإن حيويته ستزداد (4) مرات/ ملغم بروتين (N).

أما أيون الحديد فهو يثبط الكثير من الفعاليات الحيوية، وعلى سبيل المثال أيون الحديد يثبط أنزيم (Protase, gelatinase) أما أيون (Fe++) و(Zn++) فمنشطة لأنزيم فايبروزين من (Asp. oryzae) وكذلك فإن لأيون (Zn) دورا ضروريا في تنشيط البروتينز. وهنالك أمثلة كثيرة في هذا المجال.

و. عوامل النمو (Growth Factor):

1. إن محتويات الوسط الغذائي لها علاقة في تكوين الأنزيمات فمثلا إن عـــدم كفاية بعض العناصر الغذائية الأساسية في الوسط الغذائي لا يعطي إنتاجـــا جيدا من الأنزيم وذلك بسبب استهلاك هاتين المادتين في النمو وليس النمـــو الأقصى.

2.(pH) – درجة التفاعل الهيدروجيني:

يختلف (pH) إنتاج الأنزيمات من كائن مجهري لآخر ويعتمد اعتمادا كـــاملا علـــى نوعية الأنزيـــم المنتـــج، ولأجـــل اســـتقرارية الأنزيـــم وخصوصـــا الأنزيمـــات (ExoEnzyme) التي تتحدد كثيرا بالرقم الهيدروجيني (pH) حيث تكون عنده نشطة. وهنالك الكثير من الأحياء المجهرية المنتجة لأنزيمات (ExoEnzyme) يتقارب الرقم الهيدروجيني لنموها مع الرقم الهيدروجيني لنشاط الأنزيم، ولكـــن هنـــاك بعـــض الحالات التي يكون فيها الاختلاف كبيرا.

3.درجة الحرارة:

إن لدرجة الحرارة دورا كبيرا في تأليف وتخليق الأنزيمات وكذلك في ســـرعة الإنتاج، لذا فمن الصعب جدا توافق الاثنين معا. لذا فيمكن أن تثبت درجة حـــرارة معينة لأجل النمو المثالي، ومن ثم تغيير درجة الحرارة لتأليف الأنزيـــم. وهنـــالك حالات كثيرة بحيث تكون درجة الحرارة المثلى للنمو عالية فمثلا درجـــة الحـــرارة المثاليـــة لـ(Asp niger) (30 م) بينمـــا لتـــأليف أنزيـــم بكتيـــن اســـيتريز (Polygalacturonase, pectin Estrase) يحتـــاج إلـــى درجة مثاليـــة هـــي (12 م) .(Gaunamn of Nef 1948)

وهنالك علامة أخرى حيث أن درجة الحرارة إضافة إلى أنها تؤثر على النمو لكنها تؤثر أيضاً على خواص الأنزيم المنتج، فمثلاً أنزيم (α - amylase) من (Bac coagulans) حيث تكون درجة حرارة الأنزيم مرتبطة ومعتمدة على درجة حرارة المزرعة.

4.التهوية:

إن دور التهوية وأهميتها في التأليف البيولوجي للأنزيمات مهم وهنالك آراء مختلفة حول درجة التهوية وتكون مرتبطة مع أنواع الأنزيمات، فمثلاً عن تأليف البروتينز القاعدي (alkaline protase) من (B.Sabtilis) تحتاج إلى الظروف القاصة والتهوية الشديدة، بينما الحصول على البروتينز المتعادل من (B.stearothermophiluses) لا يحتاج إلى تهوية شديدة بل بالعكس فإنه بالتهوية يثبط تأليف الأنزيم (1957 O Brient Compbell)، وهنالك أمثلة عديدة حول تأثير التهوية على إنتاج الأنزيمات. وهنالك بعض الأنواع من الأحياء التي تحتاج إلى تهوية، فمثلاً (*Asp.foetidus*) تؤلف أنزيم البكتينيز (Pectinase) ولكن عند التحريك لا يمكن أن تؤلفه. أما الأنواع (Botytis cinerea) و(Asp.Sp.Rhizopus) و(Mucor.Sp) و(Peculleum) تؤلف إنزيم (Polygalactrona) عند المزارع الساكنة (Nyeste 1960).

الاستقلالية بين النمو وتأليف الأنزيمات:

إن تحديد بعض المؤشرات كالوقت، النمو، الإنتاج، وخصوصاً أنزيمات (Exoenzyme) هي غير مثبتة وهي تتغير بالاعتماد على نوع الأنزيم وظروف نمو الأحياء. فمثلاً لتخليق إنزيم (Phospholipase) من (CL.Perfringens) تحتاج من (6–17) ساعة ويختفي بعد (60) ساعة من التربية.

وهنالك إنزيمات أخرى تحتاج إلى وقت أو فترة (100–120) ساعة (Ryer 1949) وإن الإنتاج الأعظم لإنتاج الإنزيم يكون مرتبطاً بإيقاف النمو إضافة إلى توفر المواد الخاصة في الوسط وخصوصاً (B. Indcutor) والذي هو ضروري تأليف الإنزيم.

إن انخفاض الإنتاج يكون سببه تقسيم الأحياء بعد أن تصل إلى مرحلة من النمو. وهناك أمثلة كثيرة على الإنتاج الأعظم والانخفاض الذي يحصل عند (B.Subtilis) عندما ينتج أعظم إنتاج عند (6) أيام وبعدها ينخفض (Stachybotrys atra) (Reynold 1945) ينتج أعظم إنتاج سيليلوز عند (12–18) يوم، ويمكن اختصاره إلى (7) أيام (Asp. oryzae) (Yonatt 1958) ينتج أعظم (amylase) (2–3) أيام وبعدها ينخفض.

أما عند (Asp. niger PPL 558) ينتج أعظم كمية (amylase) (2–3) يوم وبعدها ينخفض إلى (صفر) وعندها ينتج جلوكوزسيديز (1951، 1952) (Shu, Black wood). أما (Sporotrichium pulinosoly am126) ينتج أعظم كمية من أنزيم سيليلوليز في فترة (3–4) أيام (Resse Mandels 1959)، ومن هذا يظهر

أن إنتاج الأنزيم كما يطرحه بعض الباحثين يعتمد على نوعية الوسط وتركيبه، وكذلك على الظروف.

الأحياء التي تؤلف أنزيم البروتيز (Protase):

هنالك مجموعة كبيرة من الأحياء المجهرية التي يمكنها تأليف أنزيم البروتيز، ومن هذه الأنزيمات هي: أنزيم كاربوكسي بيبتيدز (3.4.2) وداي ببتيدز (3.4.3) وبروتيز (3.4.4) وهذا النوع من الأنزيمات يساعد في تحليل البروتينات، والكاربوكسي بيتديز والداي تيدات، وكذلك يساعد في كسر الأواصر البيتيدية.

الأحياء:

1. البكتريا: إن البكتريا المؤلفة لأنزيم البروتيز تكون بالأشكال التالية: -

أ. بكتريا تؤلف أنزيم البروتيز ولا يثبط ببعض العوامل. ومن هذه المجموعة (B.Subtilis) (11-10) وكذلك (B.Cereus [9]) وكذلك الأحياء التالية:

Macrococcus freudenreichii pH (5-7)
Proteus vulgaris pH (9-5)

ب. بكتريا تؤلف الأنزيم البروتيز ولكن تثبط من قبل بعض العوامل، ويمكن أن تثبط ببعض المعادن الأيونية، ومن هذه الأحياء:

Bac. Amyloliquefaciens pH (6-8)
Bac. Subtilis

أما البروتينيز الذي يكسر الكرياتين والـــهيموجلوبين وبروتيـــن فــول الصويـــا والجيلاتين مثلا تثبط من (EDTA) وتنشط من (Cs, Mg. Mn, Co. Zn)؛ ومن هـــذه الأحياء:

Bac. Cereus (6.8-Ca)
Bac. Stearothermophilus (6.9-7.2) Ca, Mn.

ج. بكتريا تؤلف أنزيم كلوستريدي بيتيديز A (3.4.4.19) ومن هذه الأحياء:
Cl. Capitovale (6.5-7.0) Ca++

وهذا الأنزيم يحلل الكلاكوجين وقد تحتاج بعض الأحياء إلى بعض مثل:
Cl. Perfringens

د. (Creatine Kinase) يحلل الكارين ويثبط من (EDTA) في تركـــيز (23M) وتؤلف من قبل pH (9-8.5) (Streptomyces fradial) وبوجود (Mg++, Ca++)؛

هـ. وهناك الكثير من الأحياء البكتيرية كلها تصنع البروتينيز ومنها:
Streptococcus sp
Staph. Sp

2. الأعفان: إن هناك الكثير من الطحالب التي يمكنها تـــأليف أنزيـــم البروتينـــيز بالاعتماد على (pH) المثالي للطحالب ويمكن تقسيمها إلى ثلاثة مجاميع:

أ. النوع الحامضي:

هذا النوع من البروتينيز تؤلف من:-

(3.5Asp. oryzae)
Penecillium Janthinellum. (pH3)

ب.النوع المتعادل: هذا النوع من البروتينيز تؤلف من (Asp oryzae) و (Asp ochraceus) و (pH) المثالي (7.6-7.4) وهذا النوع من البروتينيز يحلل كل البروتينات.

ج. النوع القاعدي: هذا النوع من البروتينيز تؤلف من قبل (Pen. Eyanlofulam (8-9.5) (pH) Asp sojae Asp.oryzae) وكذلك من قبل (Mortiorella remispora).

الأحياء التي تؤلف أنزيمات أخرى:

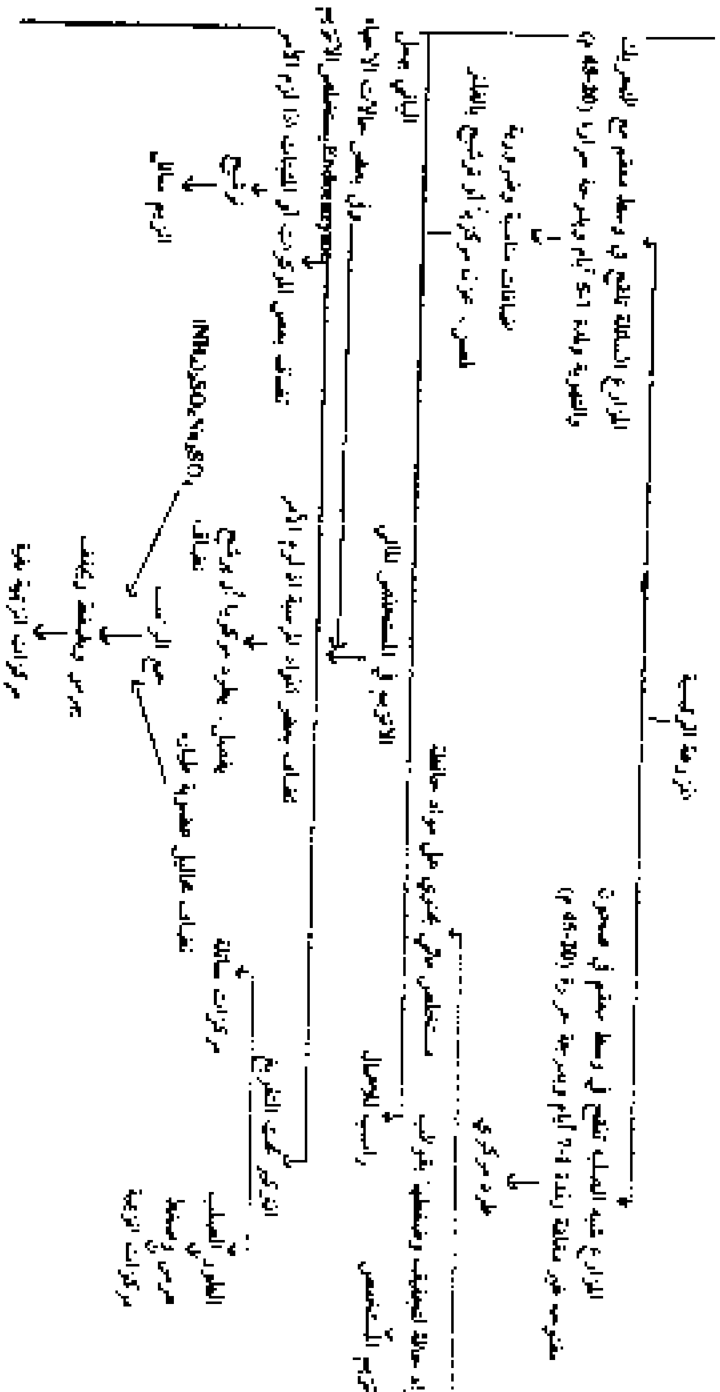
لبعض البكتريا والطحالب يمكنها من تأليف (Enzyme Estrase) واللايبيز والمثال عليها:

Cl. novyi – Estrase
Cl. oedematiens Estrase
Asp. awamori Lipase
Rhizopus nigricans – Lipase
Asp. Flavus
Cl. Perfringens phasphohpase
Bacullus Cereus
B. subtilis
B. megaterium

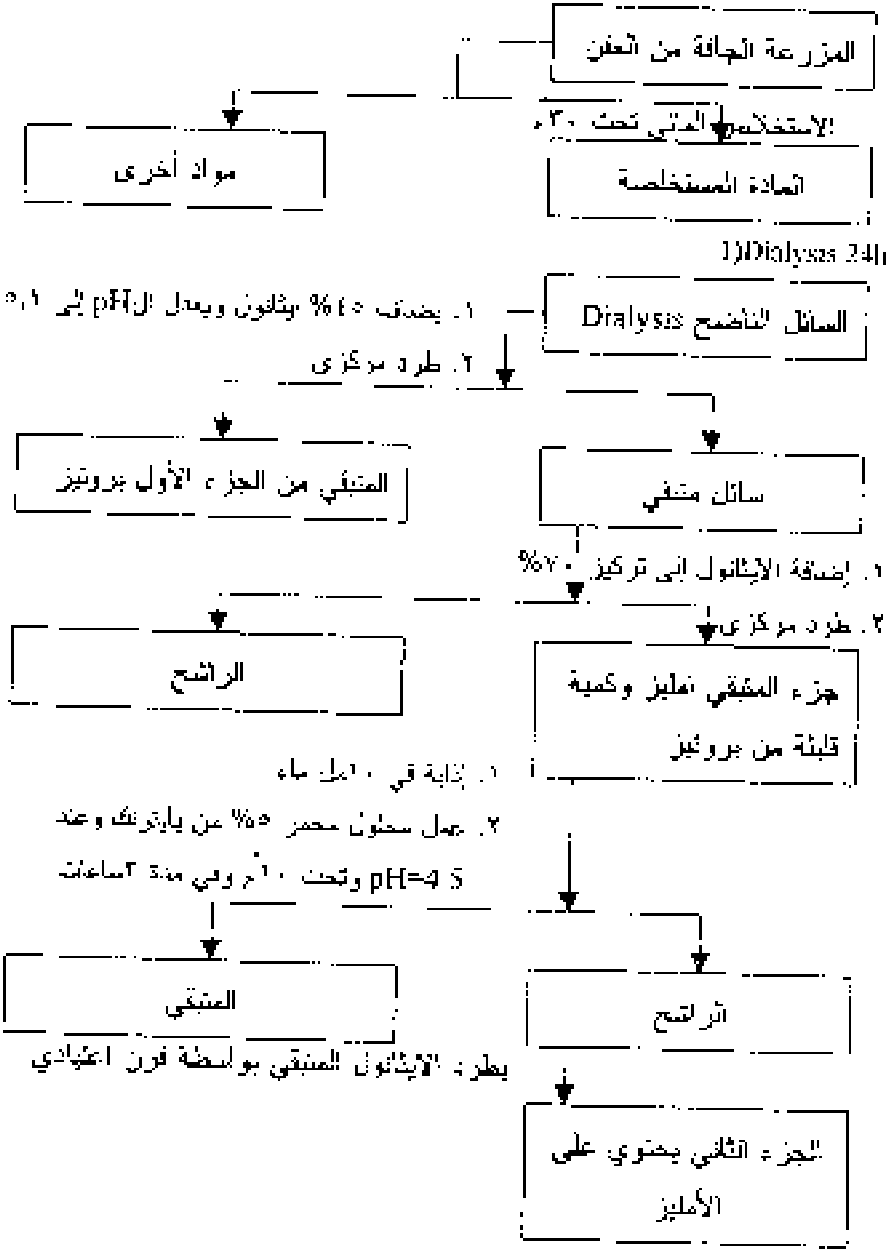
Pencillinase (Bacullus Cereus, B. subtilis, B. megaterium)

وهناك بعض مخططات لكيفية الحصول على الأنزيمات.

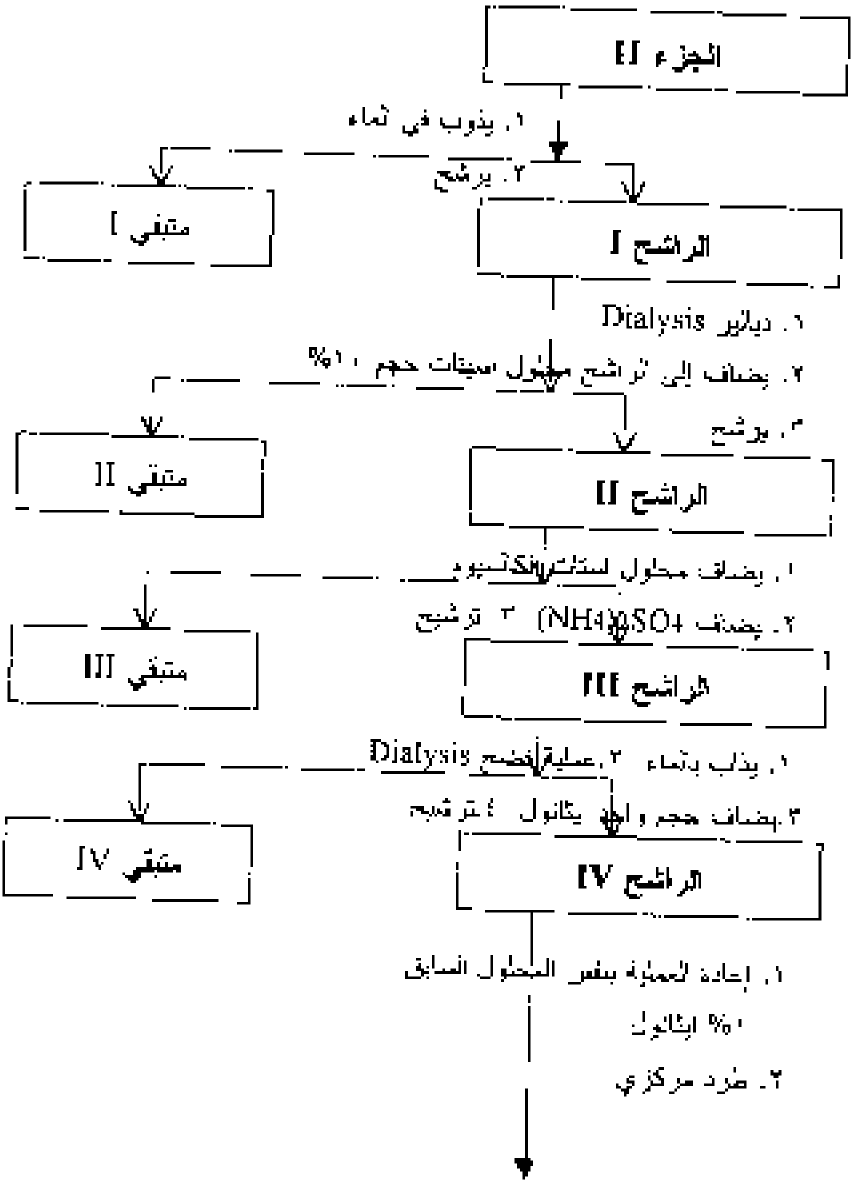
مخطط (1) للحصول على الأنزيمات من الأحياء المجهرية



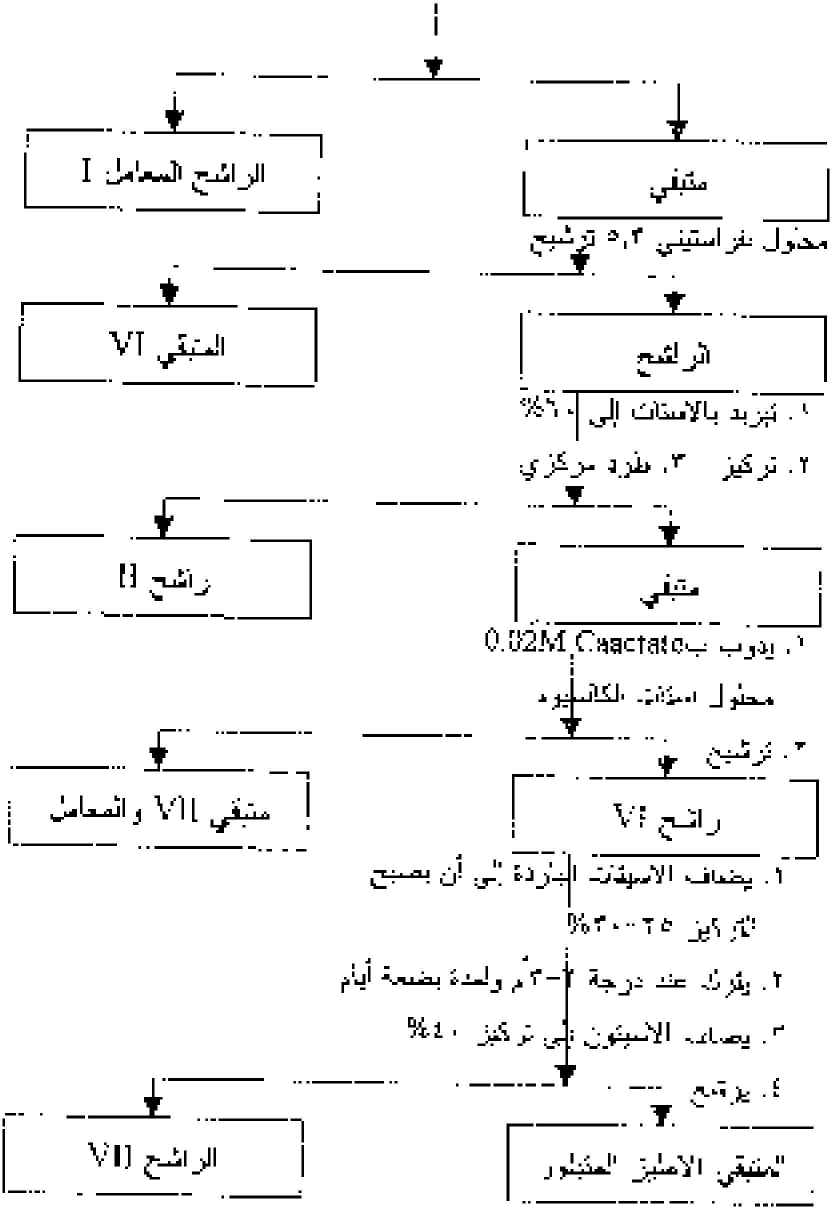
مخطط (2) تنقية الأمليز من البروتيز



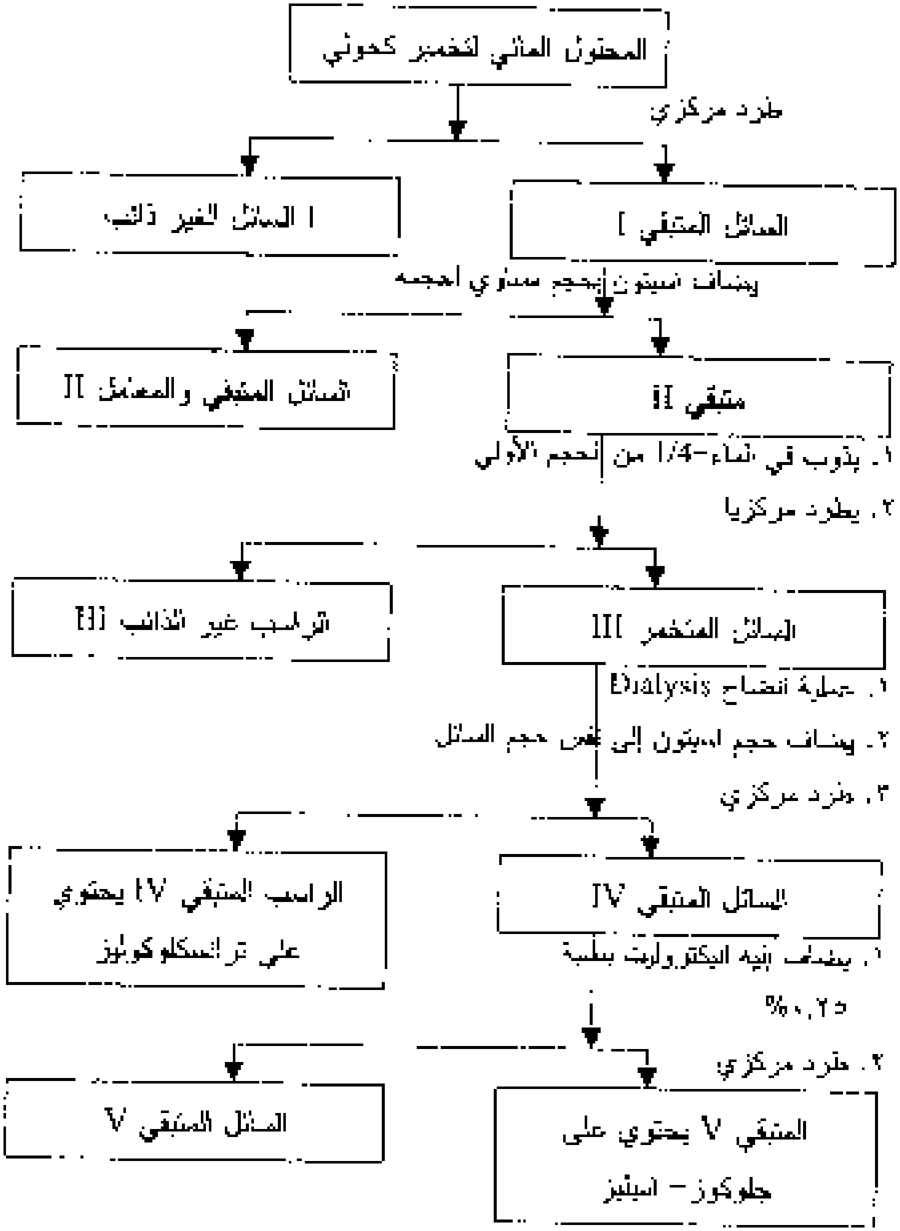
تابع مخطط رقم (2): تنقية وبلورة amylase من Asp. oryzae



تابع مخطط رقم (2)

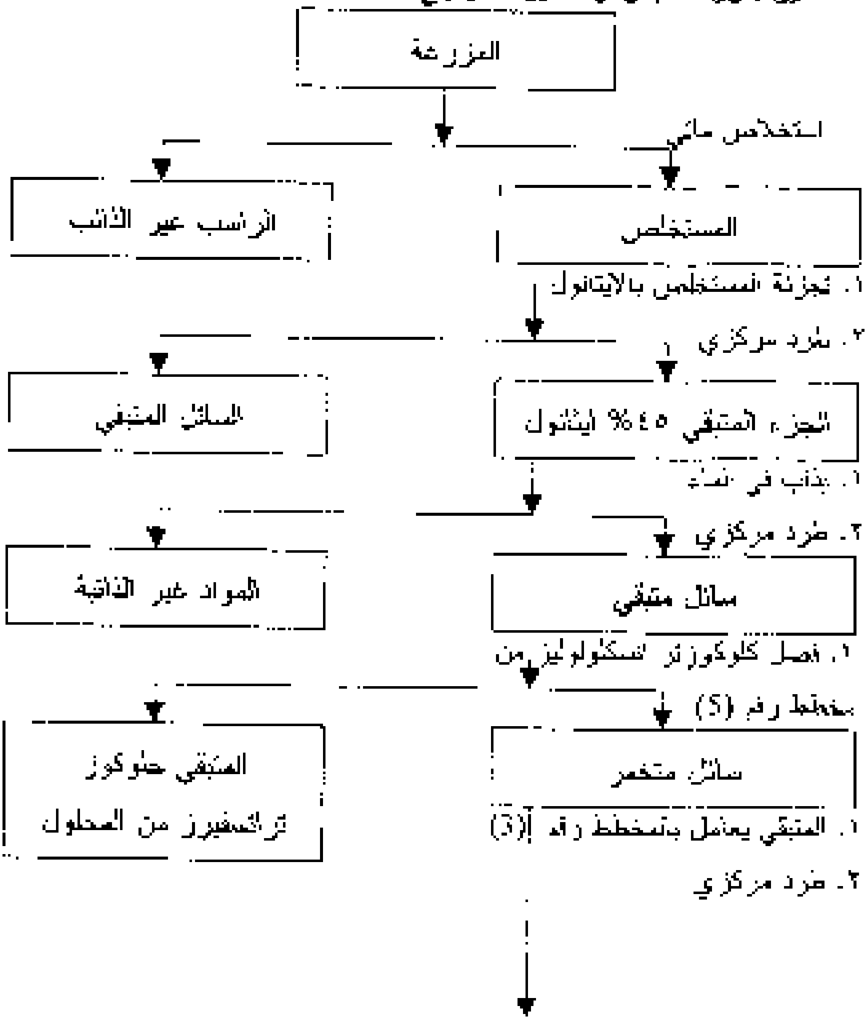


مخطط (3): تحرير الجلوكوز اميليز من جلوكو ترانسفيريز

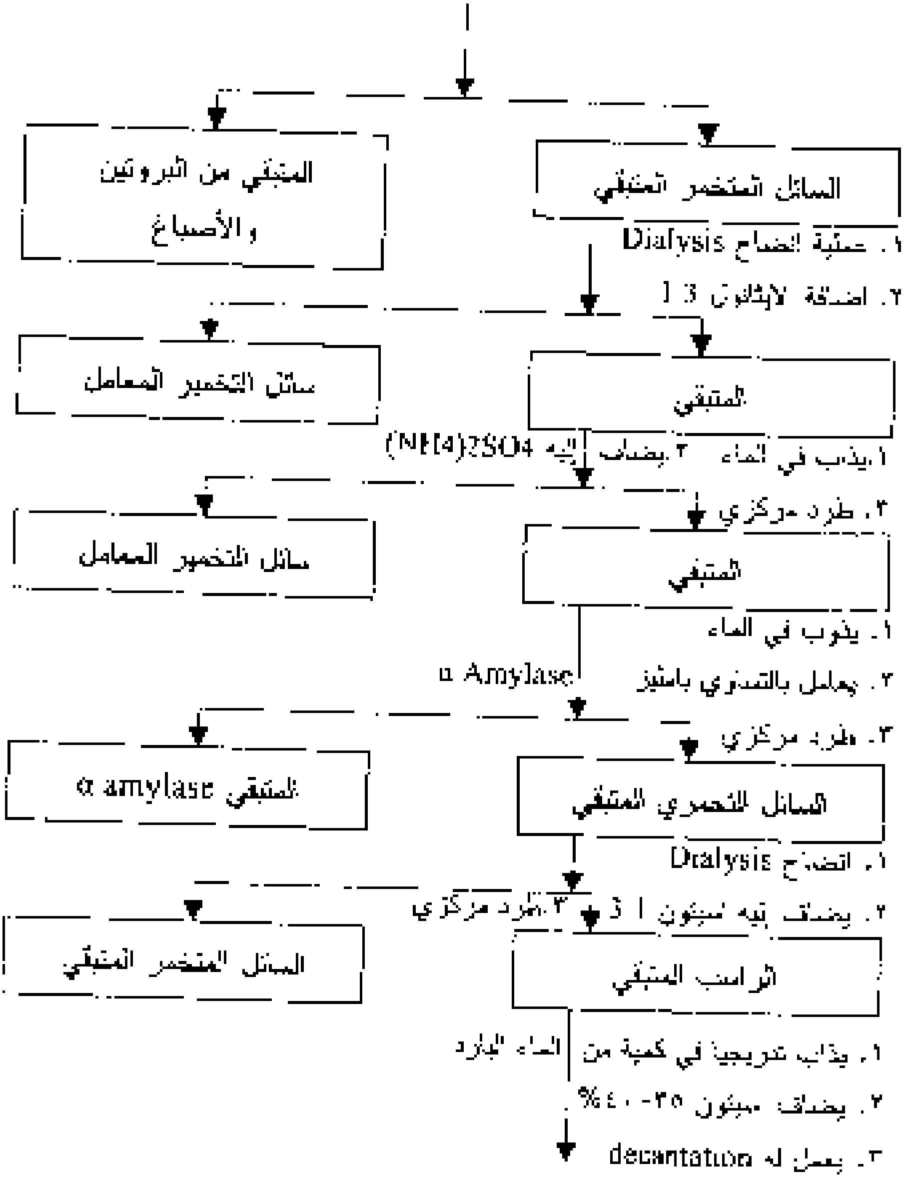


مخطط رقم (4):

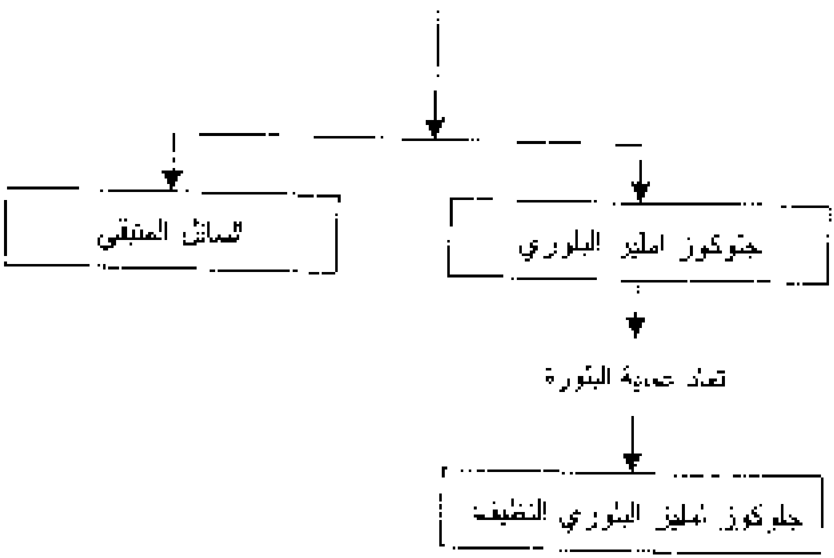
تحضير بلورات جلوكو اميز المزارع السطحية ل(Asp.awamori)



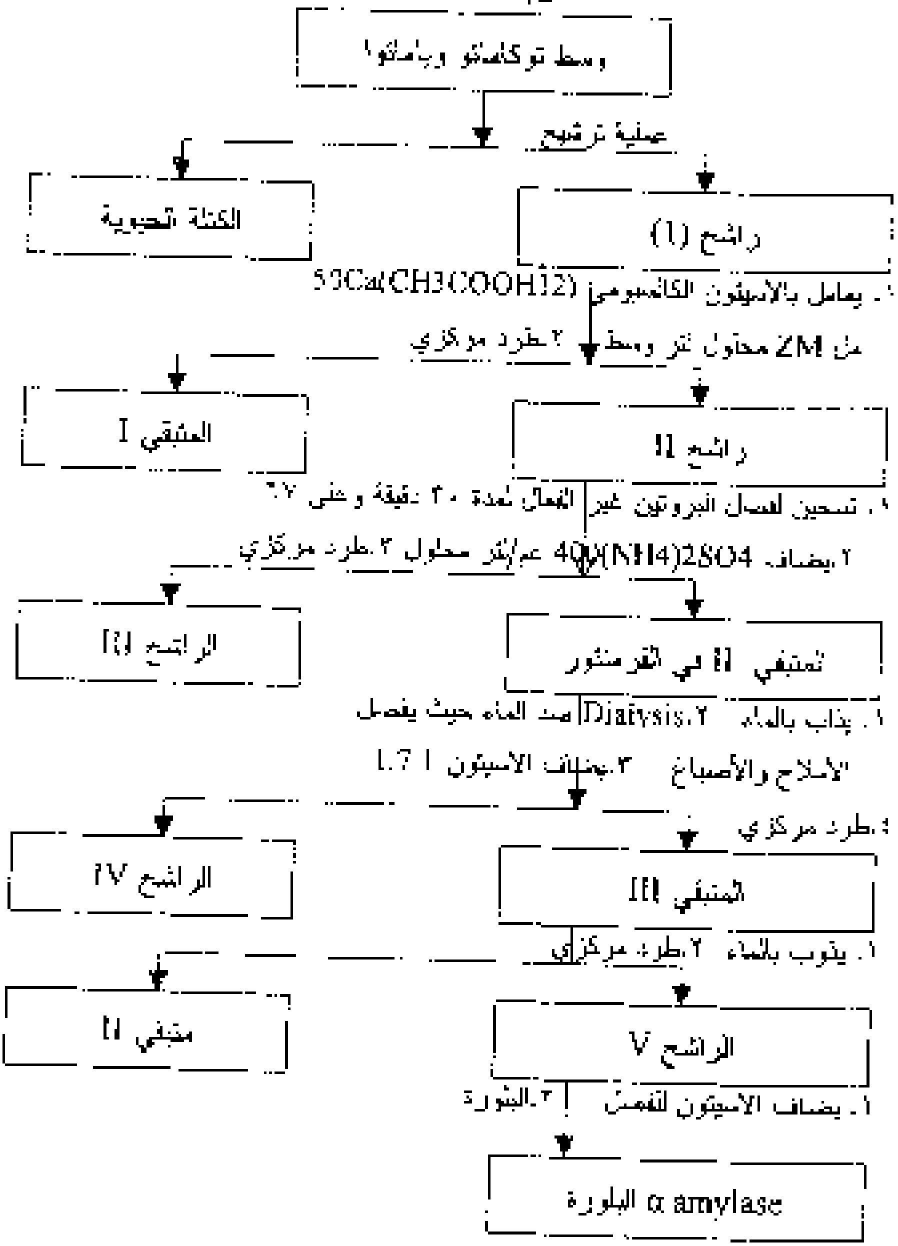
تابع مخطط رقم (4)



مخطط تابع أيضا رقم (4)

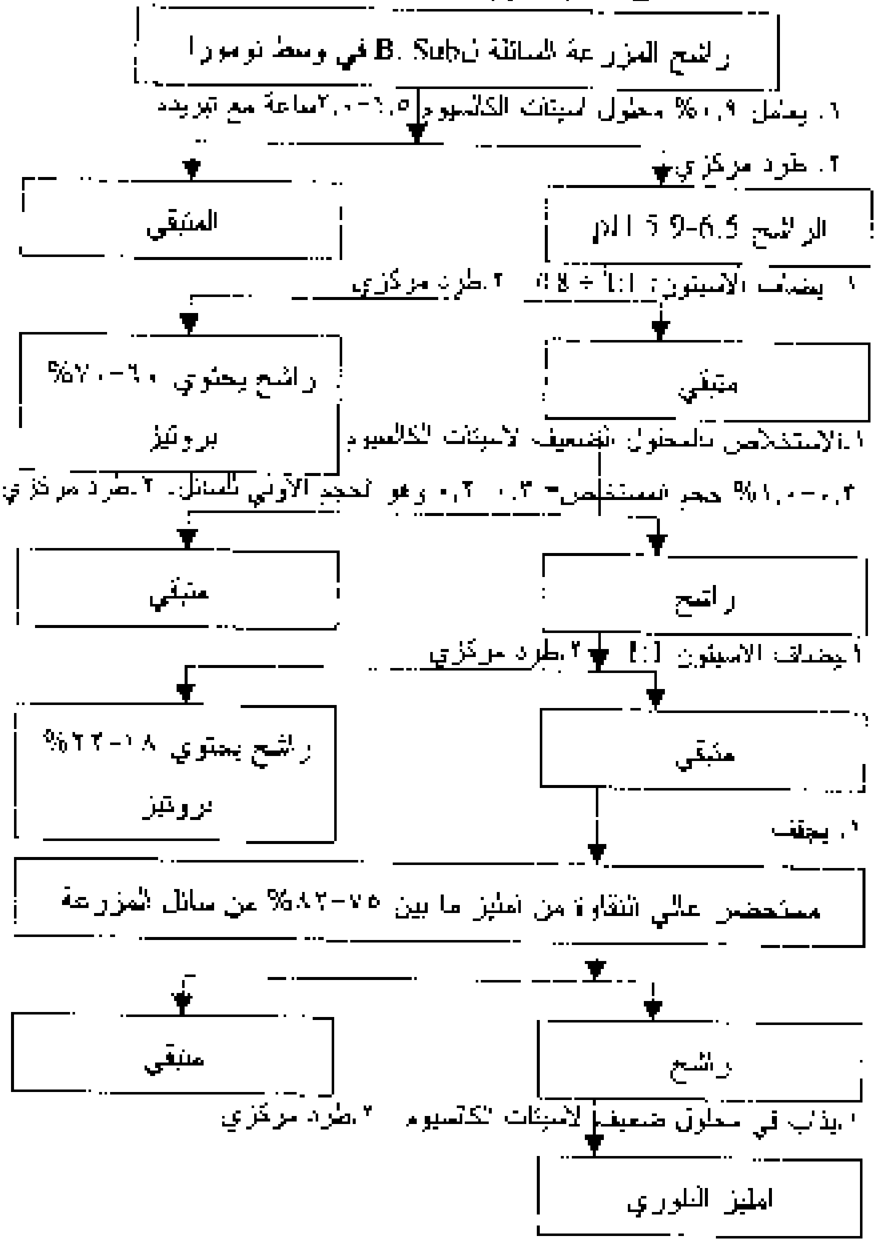


مخطط (5) تحضير بلورات amylase من المزارع الغاطسة لـ(Bacillus subtitis)

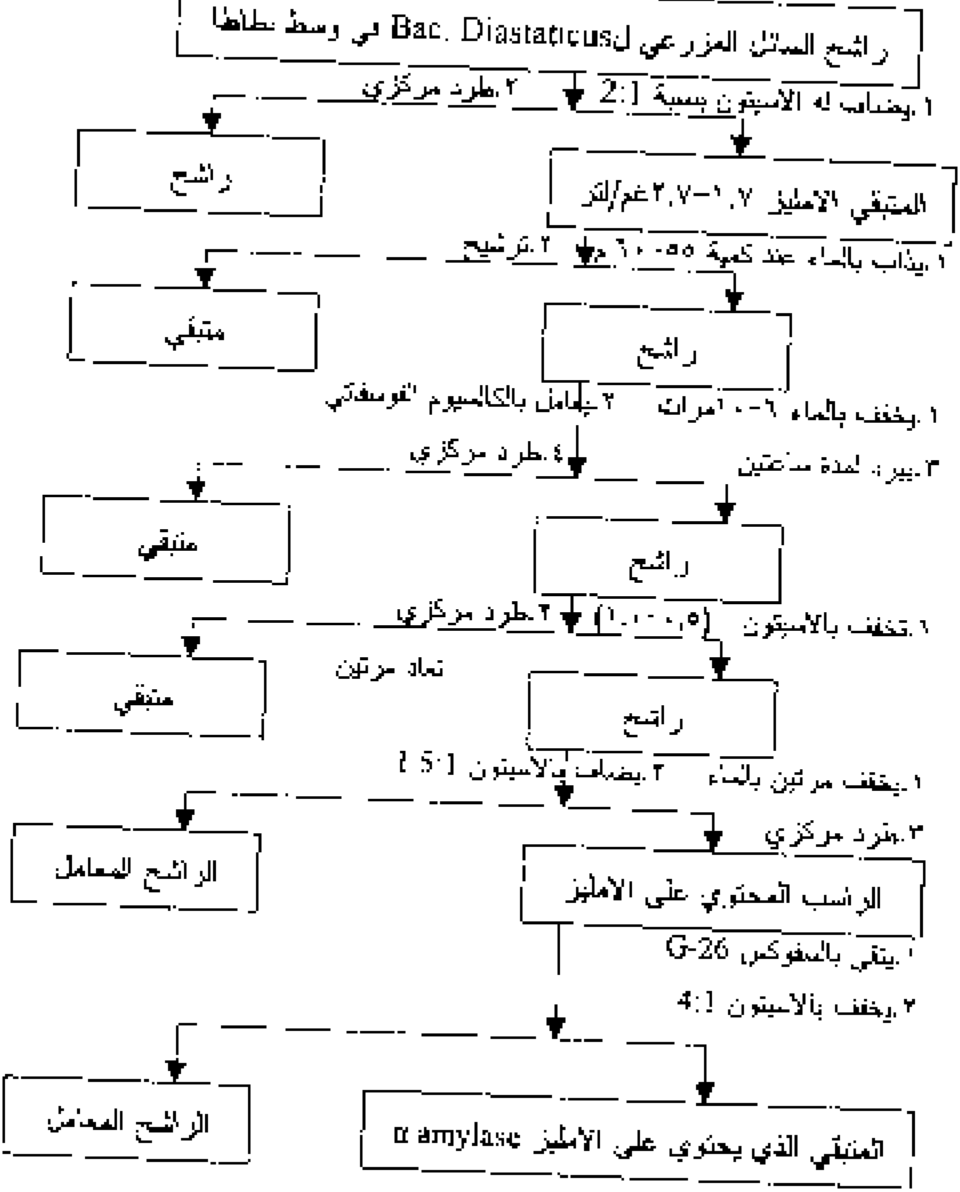


مخطط رقم (6): تحضير البلورات النقية لل(amylase)

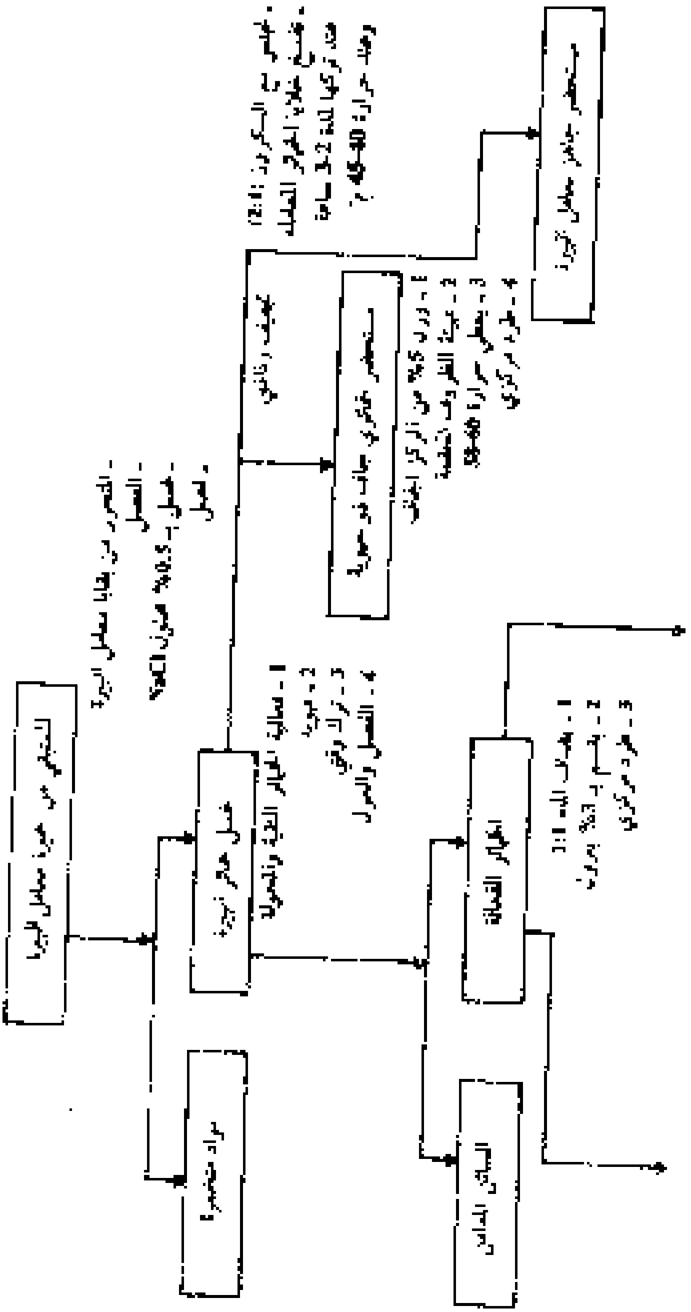
من سائل المزرعة (Bac subtilis)



مخطط رقم (7): تحضير المستحضر الاميليزي من المزارع الغاطسة (Bac. diastatias)

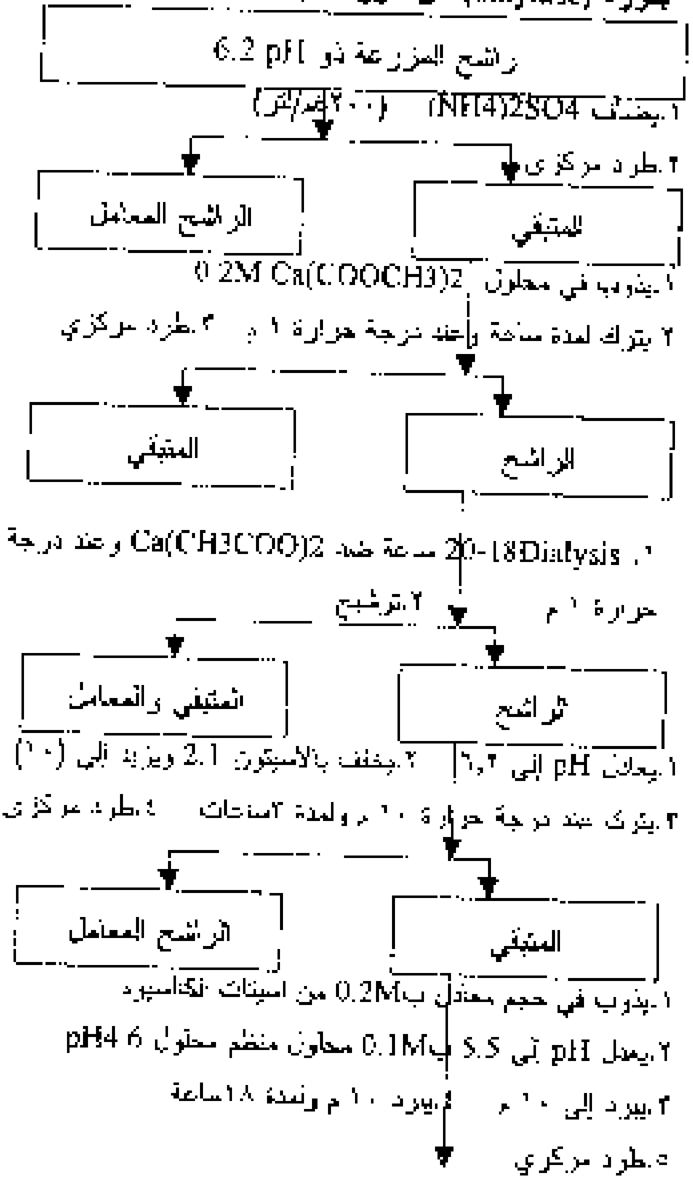


مخطط رقم (8): تحضير مستحضر (B-Fructo furanase) في درجات مختلفة من النقاوة

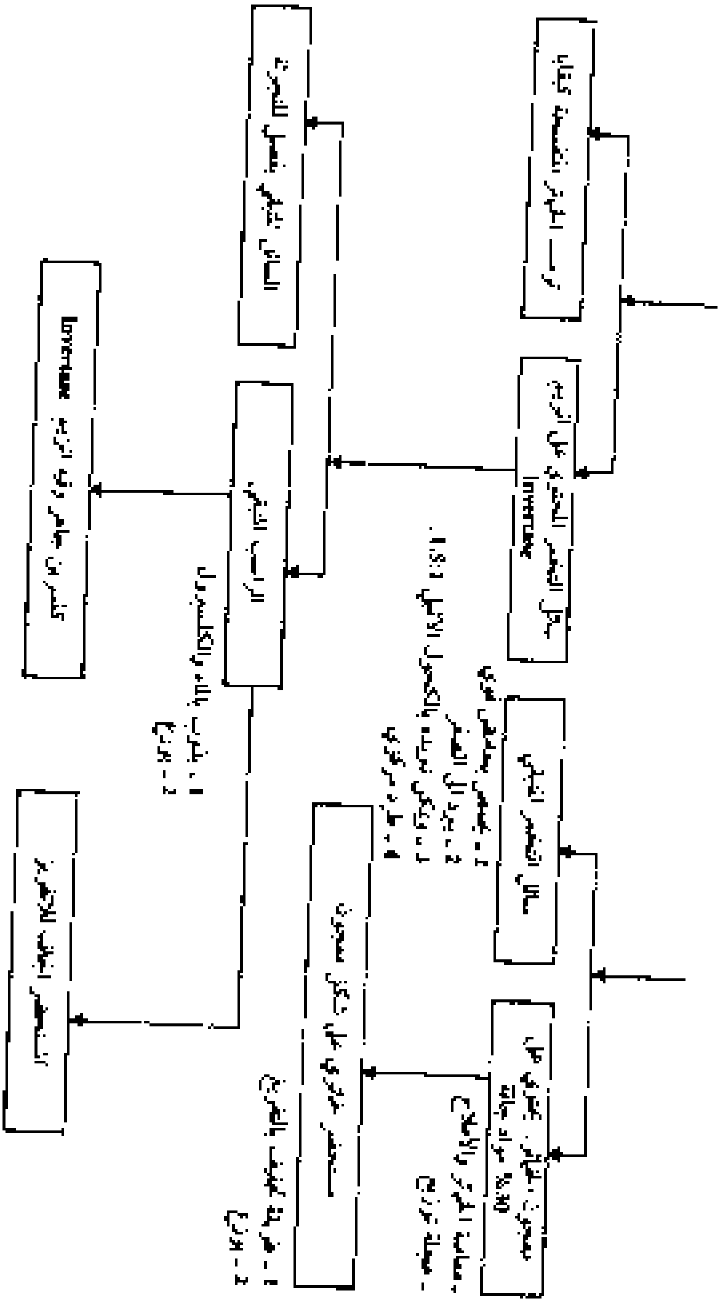


مخطط رقم (9):-

بلورة (amylase) من مزرعة (Act. Aurefaciens)

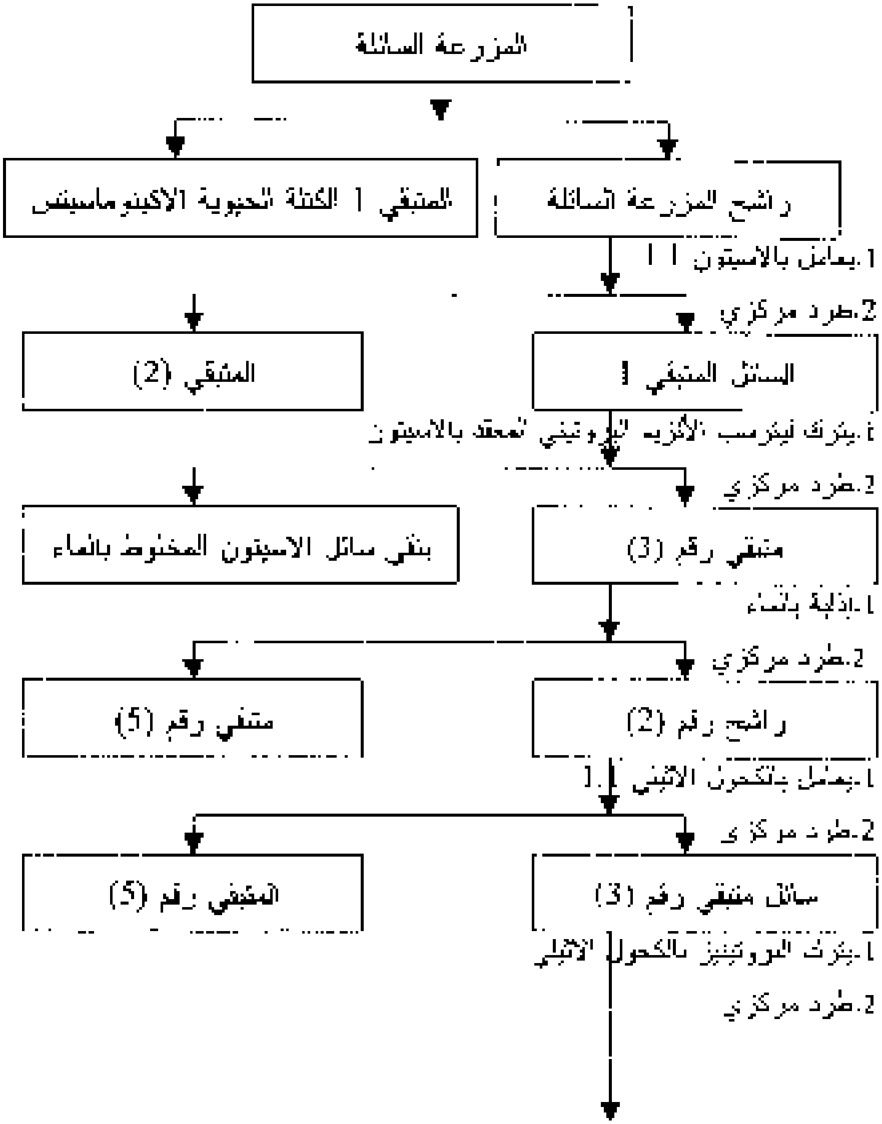


تابع مخطط رقم (9)

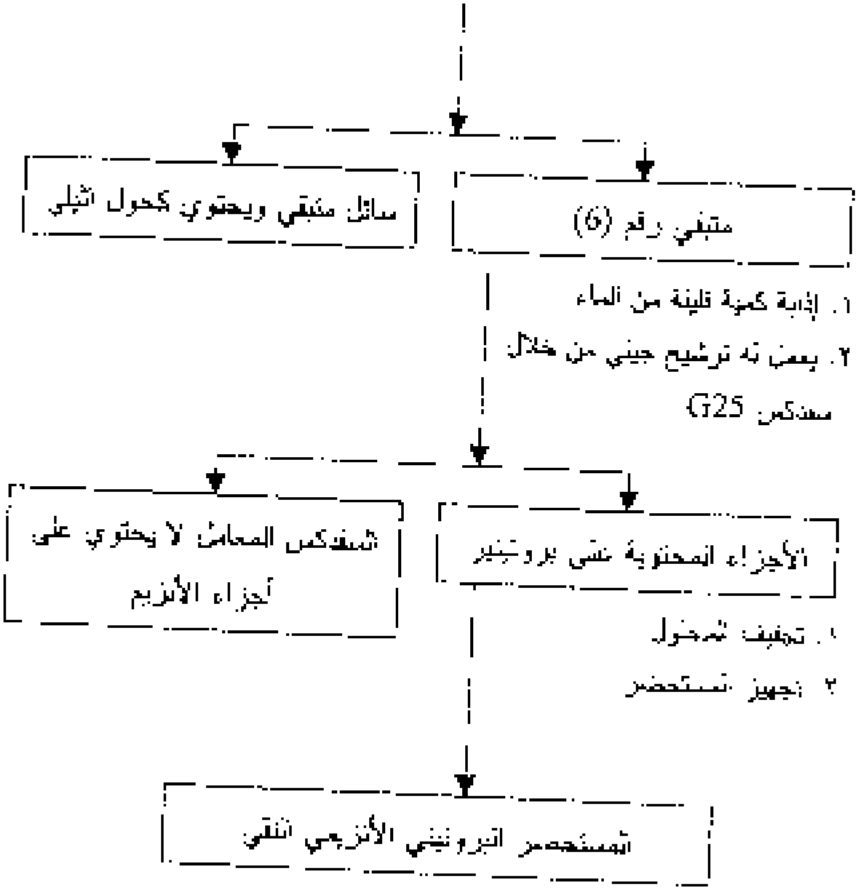


مخطط رقم (10): تنقية المستحضر

الأنزيمي من سائل المزرعة لـ(Micromonospora vulgaris)



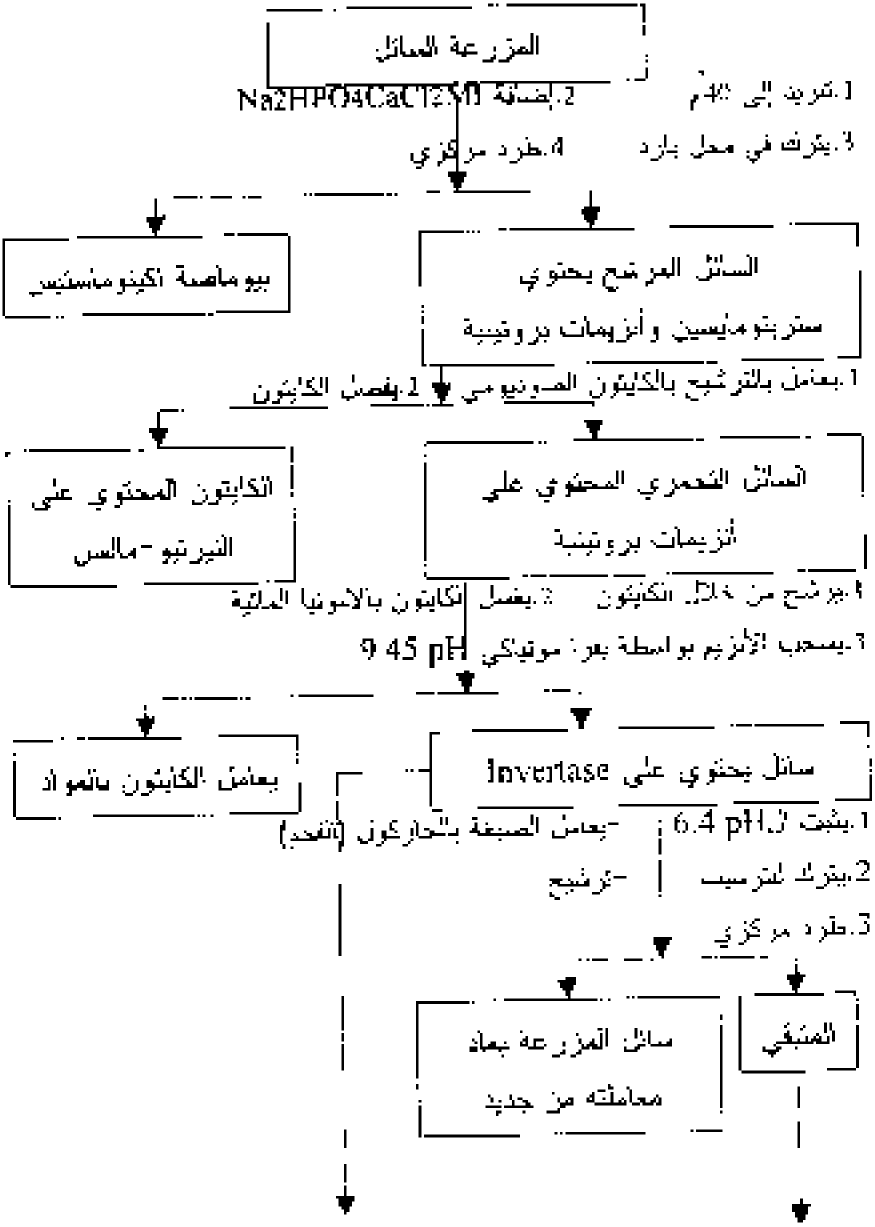
تابع مخطط (10)



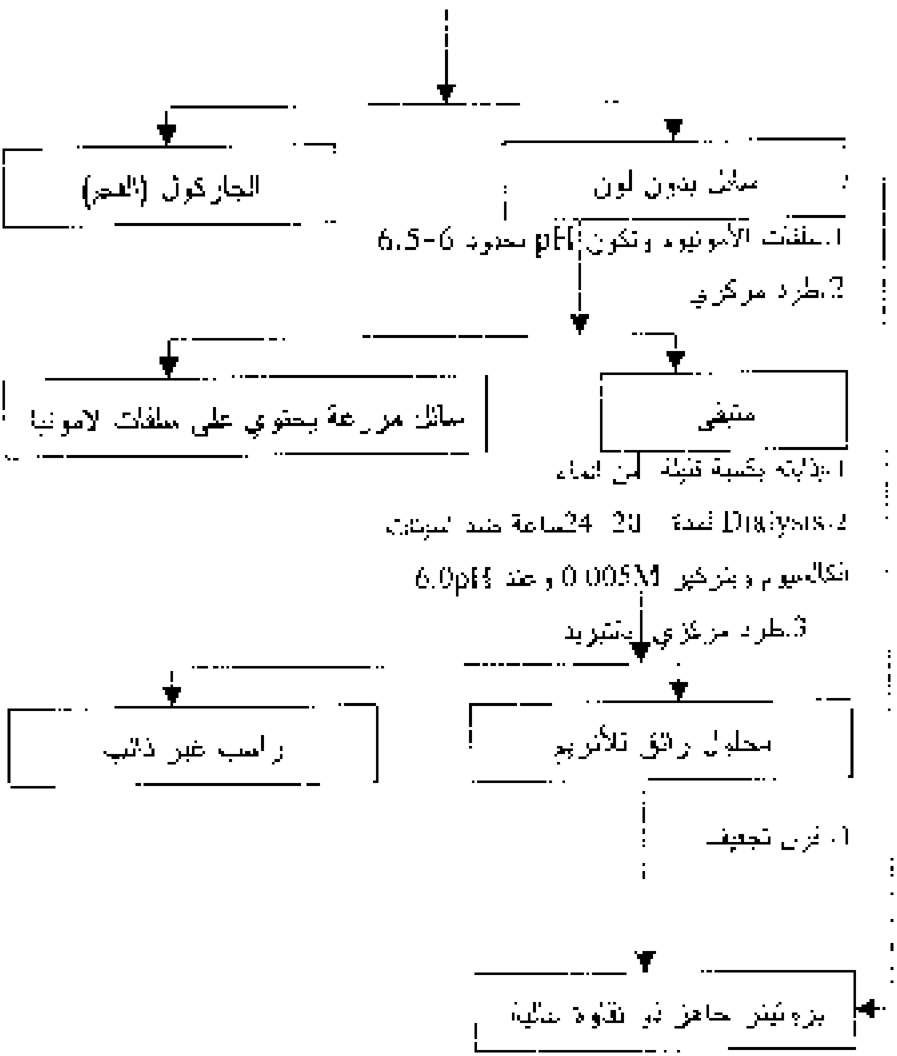
سائل متبقي ويحتوي كحول اثيلي
متبقي رقم (6)
١. إذابة كمية قليلة من الماء
٢. يعمل له ترشيح جيلي من خلال
سفادكس G25
السفادكس المحمل لا يحتوي على
أجزاء الأنزيم
الأجزاء المحتوية على بروتينات
١. تجفيف المحلول
٢. تجهيز المستحضر
المستحضر البروتيني الأنزيمي النقي

مخطط رقم (11) تحضير أنزيم البروتينيز

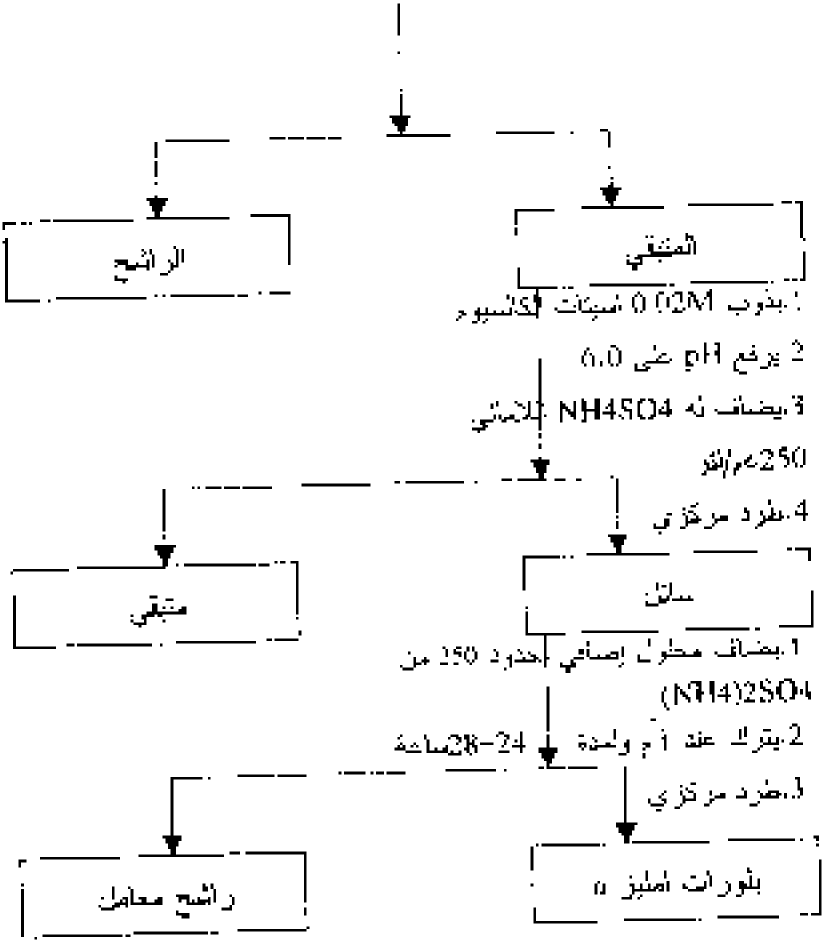
من مزرعة غاطسة لـ(streptomycis griseus)



تابع مخطط رقم (11)

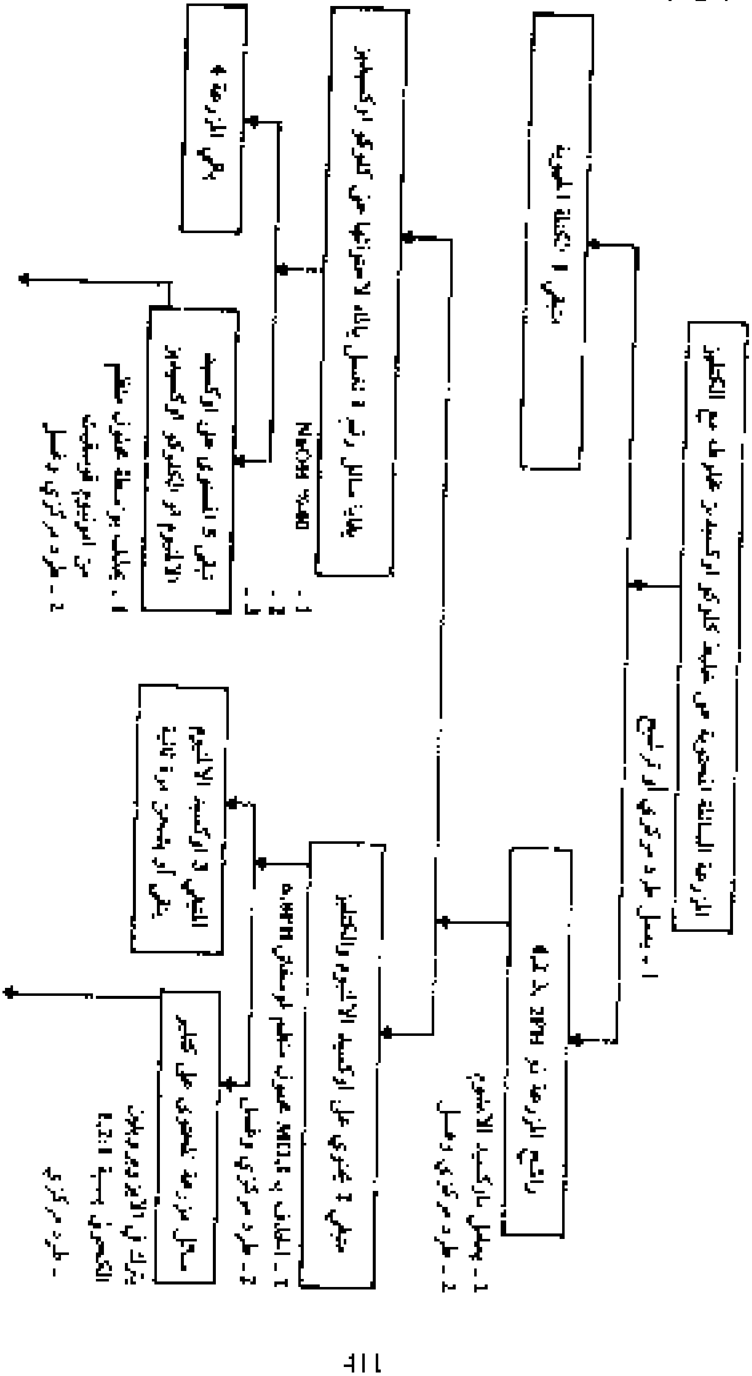


تابع مخطط رقم (11)

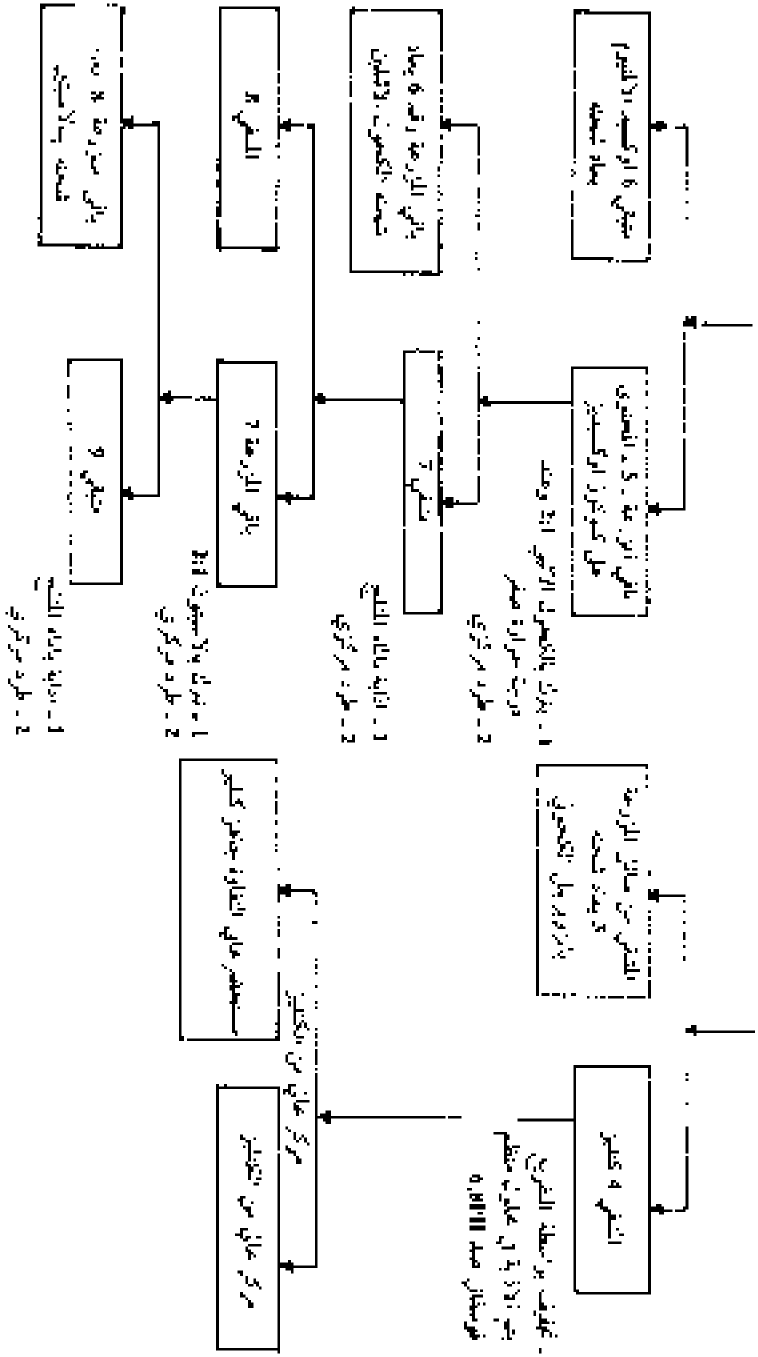


مخطط رقم (12): تحضير أنزيمي

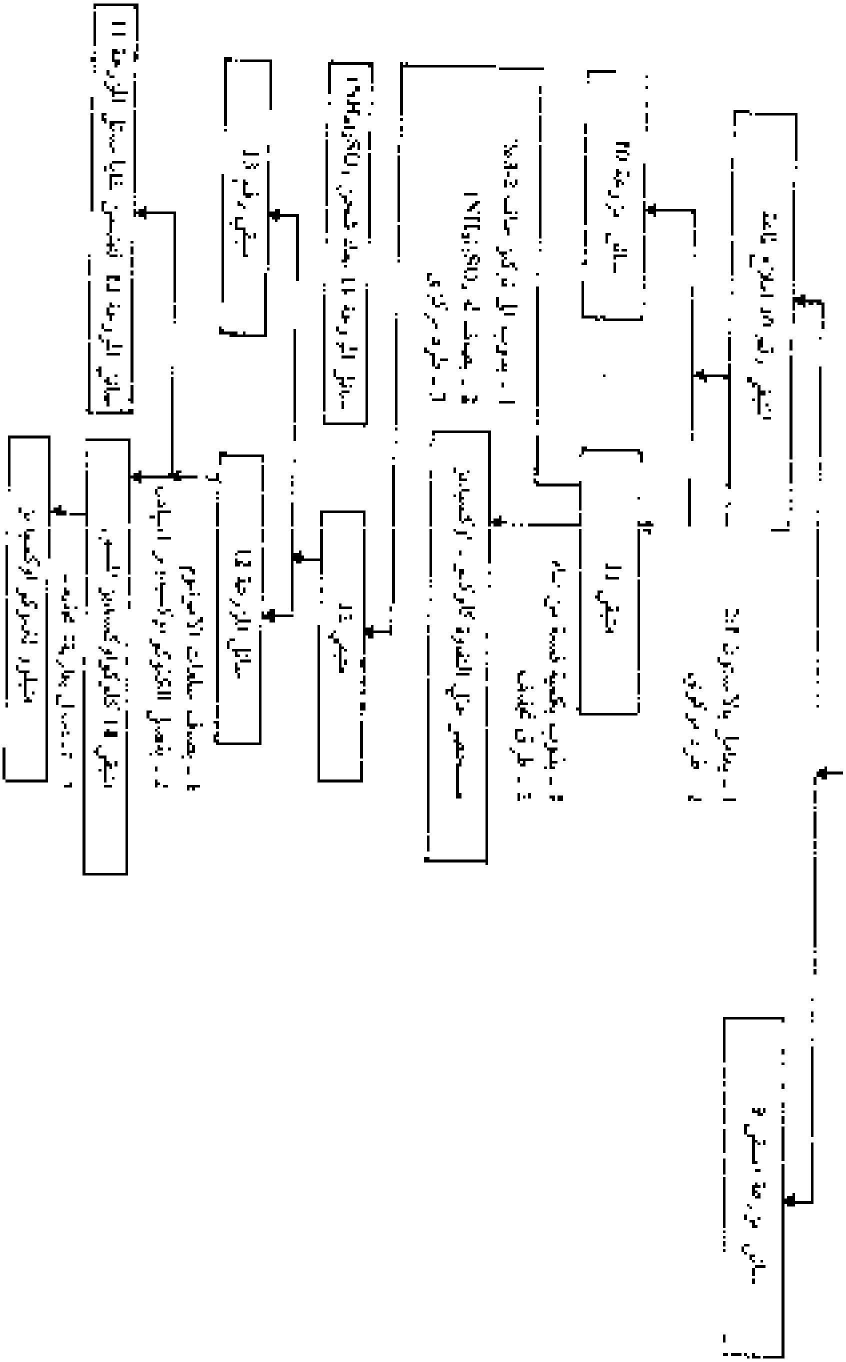
جلوكوز أوكسيديز والكتاليز من مزرعة (Pen. Vitale)



تابع مخطط رقم (12)



تابع مخطط رقم (12)

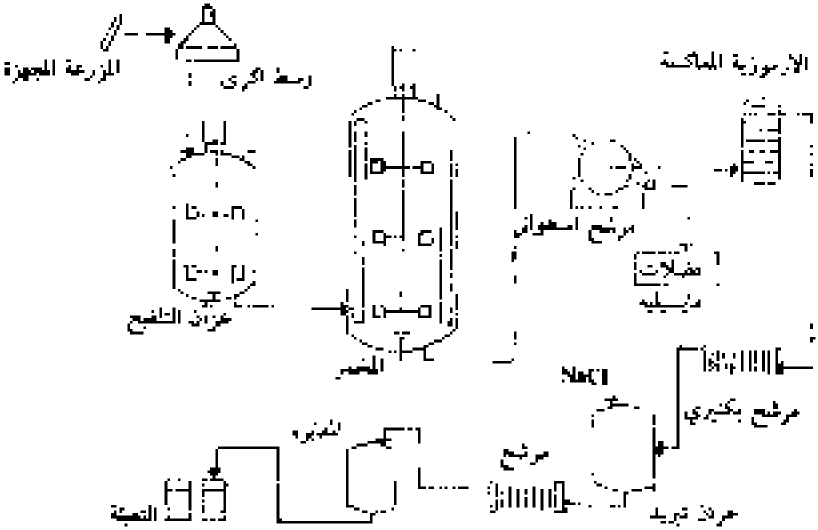


مخطط لتكنولوجيا إنتاج الأنزيم

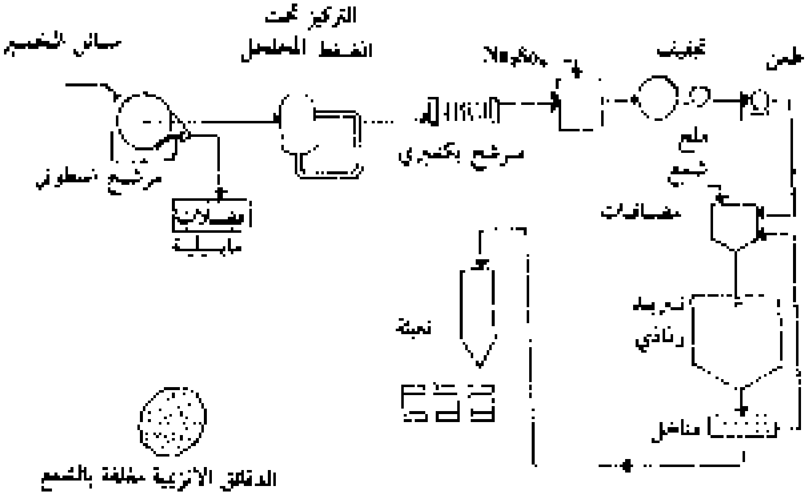
وكما أوضحنا فإن أكثر الإنزيمات تنتج بالزراعة المغمورة في المخمرات مـــع ضبط العوامل المهمة في تكنولوجيا التخمير، من سيطرة أوتوماتيكية على ظـــروف التخمير وعلى سعة التهوية واحتمالات التغذية المستمرة خلال عملية التخمير، ومـــن العمليات الإنتاجية لإنتاج الإنزيم من مرق التخمير هي موضحة في الشـــكل رقـــم (41)، حيث يتم عن طريق هذا المخطط إنتاج الإنزيم السائل.

إن الخطوات الرئيسية تبدأ بعد عملية التخمير، حيث يتم فيها عزل المايســـيليوم ثم التركيز بواسطة الازموزية المعاكسة، ثم عملية الترشيح ومـــن خـــلال مرشـــح بكتيري، ومن ثم تبدأ عملية إضافة المادة الحافظة NaCl ومن بعد ذلك تبدأ معـــايرة سائل التخمر ثم التعبئة. إن عملية إنتاج الإنزيم السائل هي الشائعة حيـــث أنـــها لا تحتاج إلى عمليات إضافية أخرى تزيد من الكلفـــة، إضافـــة إلـــى أن المســـتهلكين يفضلونه سائلاً.

أما مخطط إنتاج الإنزيم الصلب فالمخطط يكون أكثر تعقيداً كما هو موضح فـــي الشكل (42) حيث يجب إضافة وحدة جديدة إلى وحـــدات التصنيـــع وهـــي وحـــدة الترسيب، والترسيب يتم بإضافة الملح كما هو موضح في الشكل، ثم تـــأتي عمليـــة التجفيف ويجب أن عملية التجفيف تخدم غرض إنتاج الإنزيم وتمنع تكون الغبـــار. لذا وجب معاملة الإنزيم بمواد مضافة مثل الشمع ثم ينشر في حاضنـــه، حيـــث أن القطرات الصغيرة تتكون ثم تتصلب بالتبريد وبعد عملية التخلل تكون جاهزة للتعبئة والإنزيم سيكون بشكل دقائق.



شكل رقم (41) يوضح إنتاج المستحضر الإنزيمي السائل



شكل رقم (42) يوضح إنتاج المسحوق الإنزيمي الحر

الفصل الرابع عشر

تقنية إنتاج الأحماض الأمينية بواسطة الأحياء المجهرية

Production Technology of Amino Acid by Microorganism

تقنية إنتاج الأحماض الأمينية بواسطة الأحياء المجهرية:

(Production Technology of Amino Acid by Microorganism)

إن التأليف البيولوجي للأحماض الأمينية من قبل الأحياء المجهرية أعطى أهمية كبيرة في السنين الأخيرة، خصوصاً بعد إنتاج حامض الكلوتامين والاسبارجين في اليابان عام (1957) حيث كثرت الدراسات حول هذا الموضوع، ومن النتائج المستحصلة في تأليف الأحماض الأمينية بواسطة الأحياء المجهرية لوحظت خاصيتان :-

الخاصية الأولى: هي أن الأحياء المنتجة للأحماض الأمينية هي من نوع (Auxotrophic).

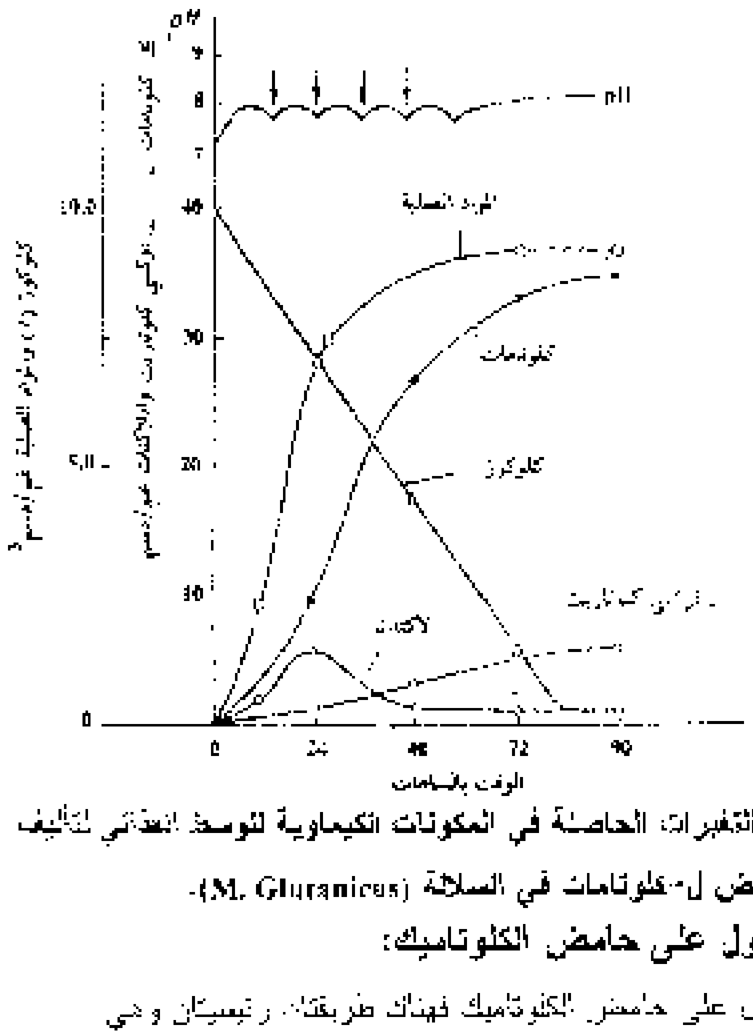
الخاصية الثانية: اكتشاف كيفية السيطرة على ميكانيكية التأليف. لذا كان الاهتمام متزايدا لإنتاج الأحماض الأمينية خصوصا ولأن للأحماض الأمينية أهمية كبيرة في تغذية الإنسان والحيوان والتي كان متناولها عن طريق النباتات البروتينية وبتراكيز قليلة. وسنأتي بهذا الفصل ببعض التفصيلات عن إنتاج بعض الحوامض الأمينية.

حامض الكلوتاميك (L – Glutamic Acid):

من خلال التفتيش عن كلوتامات الصوديوم لأجل تحسين نوعية المنتجات الغذائية، فقد يتم الحصول على حامض الكلوتاميك بواسطة تحلل بعض بروتينات النباتات.

وفي عام (1956) بدأت أول الدراسات للتقنية الميكروبيولوجية في هذا المجال تأخذ محلها لإنتاج حامض الكلوتاميك. حيث تمكن بعض المشتغلين من فصل بعض الأحياء المنتجة لهذا الحامض في وسط غذائي (Substrate) تحتوي على جلوكوز وأيونات الأمونيا وتم تشخيص هذه الأحياء فكانت من نوع (*Micrococcus glutamicus*)، واكتشفت أيضا سلالة أخرى من نوع (*Bacillus sp.*).

ومن دراسة بعض صفات السلالة (*Micrococcus glutamicus*) من حيث الشكل فكانت عصوية قصيرة، موجبة لصبغة كرام، تكون السبورات، هوائية، غير متحركة وليس لها أسواط، وتحتاج إلى عنصر البايوتين (Biotein) عند نموها. وعموما هذه السلالة يمكنها النمو على المواد الكربوهيدراتية وأيونات الأمونيا ومع التهوية المناسبة لإنتاج هذا الحامض. والمنحنى التالي يوضح اعتماد الكائن المجهري على ظروف المزرعة، وعند توفر الظروف الملائمة فإنه يستطيع إنتاج (50) غم حامض كلوتاميك/ من كل (100–150 امم) جلوكوز.



شكل (42) يوضح التغيرات الحاصلة في المكونات الكيماوية للوسط الغذائي لتأليف حامض ل-كلوتامات في السلالة (M. Glutanicus).

طرق الحصول على حامض الكلوتاميك:

لأجل الحصول على حامض الكلوتاميك فهناك طريقتان رئيسيتان وهي

1- بطريق الوجبة الواحدة (Single Stage) وفيها الأحياء تنمى على مصدر كربوهيدراتي ومصدر نايتروجيني.

2- بطريق الوجبتين (double stage) وهذه الطريقة تعتمد على تحضير الكيتوكلوتاريك (α - Keto glutaric Acid) بواسطة الأحياء أو بواسطة

مستحضرات إنزيمية، وهنالك عدد كبير من الأحياء التي تنتج (α - Keto glutamic Acid) ومنها:

Pseudomonas fluorescans
Bacterium Ketoglutarcum
Proteus Sp.
Kluyvera Citrophila

وعندما تحدث عملية (Diamination) لمجموعة الأمين. حيث تم دراسة العديد من الأحياء وفي وسط يحتوي على (α – Keto glutamic Acid) وأملاح الأمونيا فكان إنتاج حامض الكلوتاميك من السلالة (pseudomonas ovalis) عاليا. وبعد معادلة حموضة الوسط (pH) وعند درجة حرارة (30 م) يتحول (60%) من (α - Keto glutamic Acid) إلى حامض الكلوتاميك. وبنتيجة هذه الدراسة تم الحصول على إنتاج يقدر ب(30%) حامض الكلوتاميك من الجلوكوز المستعمل. إن هذه الطريقة يمكن أن تطبق على الأنواع التالية أيضا:
(Aspergillus sp.), (Sacchromyces sp.), (Xanthomonas sp.), (Psedomoeas sp.) وعند (pH) (8.5-6.8) ودرجة حرارة (20-45 م). علما بأن حامض الكلوتاميك يمكن أن ينتج من (α – Ketoglutamic Acid) بواسطة (trans amination) ويستعمل لهذا السلالة (E. Coli) في البروتين المتحلل مع حامض الاسبارجين.

كذلك يمكن إنتاج حامض الكلوتاميك بطريقة اختزال مجموعة الأمين لحامض (α – Ketoglutamic Acid). حيث يكون إنزيم (Dihydro Kinase) عاملا مهما لحامض الكلوتاميك في الأنواع:-

Eschrichia, Pseudomones, Bacterium, Erwina, Serratia, Debaryomyces.
Pseudomonas ovalis proteus vulgatus

أما السلالة (*Micrococcus glutamicus*) فتعطي أعلى حيوية للإنزيم الذي يعمل على مجموعة الأمين. كما أنه يمكن الحصول على حامض الكلوتاميك من مصـــدر فورمايت (Format) وباستعمال الأحياء التالية:

B. Pumillus, B. Subtillus, B. natto, B. mesentericus, B. Cereus,
E. coli Serratia marcescens, psudomonas aesoginosa xanthemonas pruni

تقنية إنتاج حامض الكلوتاميك من الأحيـــــاء المجهريـــة المنتجسة والعمليات الصناعية:

إن السلالة المصنعـــــة (*Micrococcus glutamicus*) هـــي إحـــدى الســـلالات المشهورة في إنتاج هذا الحامض، ولأجل تحضير اللقاح يحتاج إلى وســـط غذائـــي (Substrate) الذي يحتوي على (2%)جلوكـــوز، (1%)ببتـــون، (0.5%)مســـتخلص اللحم، (0.5%)NaCl، وعند ظروف حـــرارة حضـــن (28 م) و(pH) (7.2-7.0)، وفترة حضن (24)ساعة وفي حاضن هزاز ذي سرعة (220دورة/دقيقة). ومن ثـــم يتم نقل اللقاح إلى وسط التخمير المحتوي على المكونات التاليـــة (10%)جلوكـــوز، (MgSO4. 7H2O0.001. K2HPO4, 0.01, (NH4)2SO4, 0.2).

وعند ظروف تبريد على درجة حرارة (25 م) مع تعديل حموضة الوسط (pH) بإضافة (10%) محلول كارمايد وعند إضافة (2.5)ملغم/دسم3، وفي حاضن هـــزاز

وبعد فترة (48) ساعة سنحصل على (42)غم/دسم3 حـــامض كلوتـــاميك، أمـــا إذا استخدم تركيز (15%) جلوكوز فسنحصل على (52)غم/دسم3.

أما بالنسبة للسلالة (*Brevibacterium divaricatum*) التـــي تعمـــل فـي وســـط جلوكوزي تركيزه (10%)كارمايد (0.05MgSO4 7H2O, 0.2K2HPO4,0.3) مستخلص اللحم (0.2) مستخلص الشعير (3%) مســـتخلص الـــذرة (0.15). فـــإن السلالة ستنتج في الساعة الثلاثين من الحضن (44.2غم/دسم3) حامض كلوتاميك.

وهناك العديد من السلالات التي تنتج هذا الحامض. أما المخطط العام لتحضـــير الحامض من الســـلالة (*Micrococcus glutamicus*) والســـلالة (Brivibacterium flavum) فقد تم تحديده، علماً بأن (75%) من إنتاج هذا الحـــامض ينتـــج بطـــرق ميكروبيولوجية و(20%) بالطرق الكيماوية و(5%) ينتـــج بواسطة التحلـــل. أمـــا العمليات التكنولوجية المستخدمة لتحضير هذا الحامض فـــهي بالتربيـــة الغاطســـة وبظـروف هوائية وبنظام الوجبة. وعموما فإن الأوساط المستعملة للإنتاج تحتـــوي على جلوكوز (100غم) وببتون (2ملم)، وثيامين، ومستخلص الذرة.

وقد يستبدل المصدر الكربوني بالاسيتات. فيكون الوسط كالتالي:-

أسيتات الأمونيوم (1.5%)

أسيتات الصوديوم (1%)

0.2%K2HPO4

Fe و Mn0.00002

pH الوسط (٨)

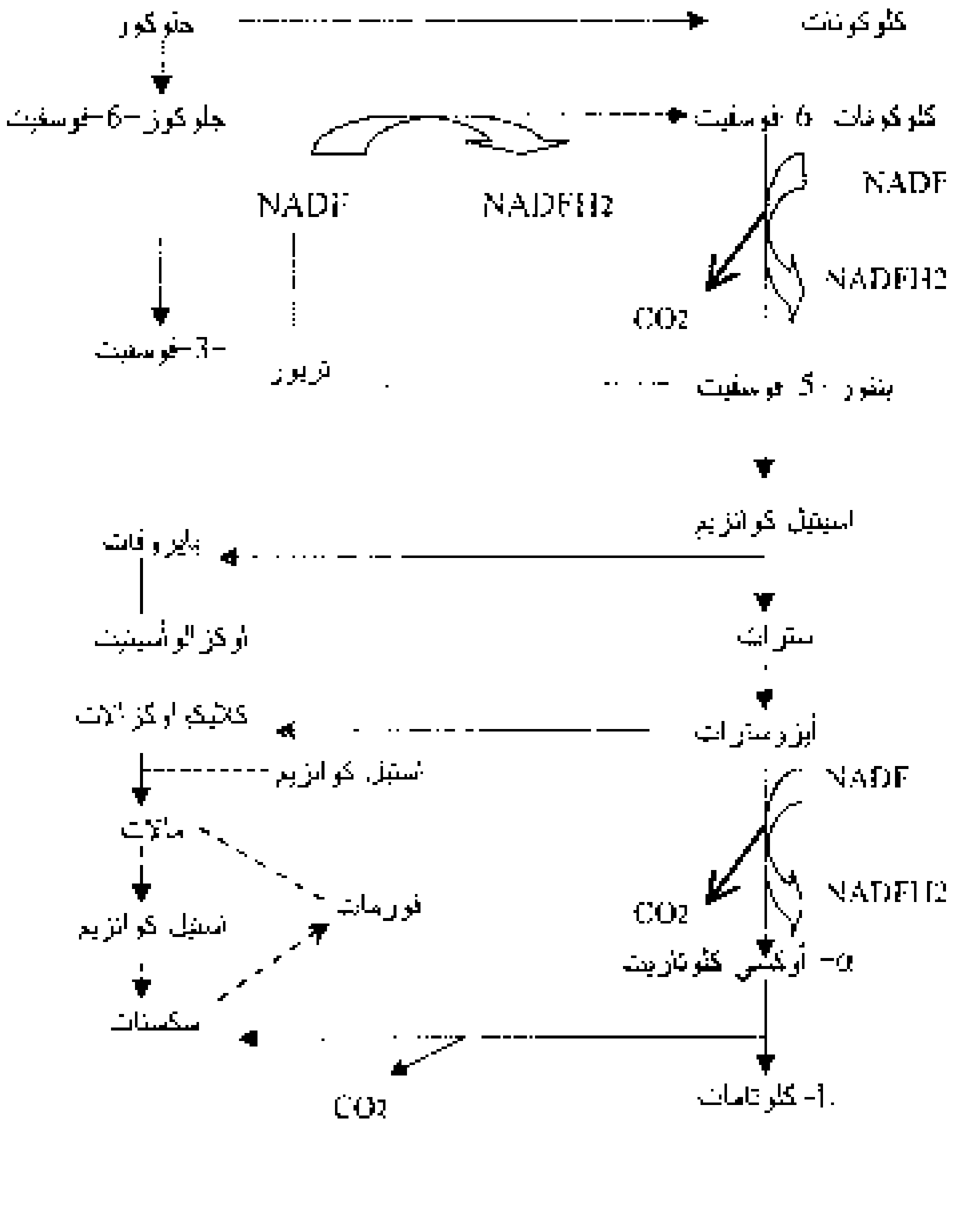
ماء (لتر)

خطوات إنتاج الحامض:

1. التحضير المختبري للقاح.
2. تحضير الأوساط الغذائية الخاصة بتحضير اللقاح.
3. تحضير اللقاح بالمخمرات.
4. التربية الإنتاجية للأحياء لإنتاج الحامض.
5. فصل الكتل الحيوية.
6. عملية استخلاص الأحماض الأمينية وتركيزها وبلورتها.

أما عملية الإنتاج فتجري اعتياديا في أربع مخمرات ذات حجم (200م³). ومن الأمور المهمة عند الإنتاج هي كيفية إضافة المصدر النيتروجيني لأن أي انخفاض في كمية (N) سيخفض من إنتاج الحامض.

مخطط يوضح تكوين حامض الكلوتاميك من (*Micro Coccus glutamicus*)



أما الخطوات الأيضية لهذه العملية فهي:-

أ- ميتابولزم الكربوهيدرات يمر من خلال سلسلة أيدين مايرهوف، ودورة هكسوموتوفوسفيت.

ب- عند التهوية الضعيفة يلاحظ أن سلسلة أيدن مايرهوف تبتعد عن نهجها حيث تراكم حامض اللبنيك.

ج- عند التهوية الجيدة يلاحظ دورة هكسوموتوفوسفيت ويلاحظ تأكسد حامض الكلوتاميك، والمخطط يوضح العملية.

2. حامض اللايسين (-CH2CH2CH2CH2NH2):

من المعلوم أن حامض اللايسين هو أحد مكونات أو محتويات بعض النباتات البقولية والمحاصيل، وهو من الأحماض المهمة التي يحتاجها الجسم ولكميات المتوفرة في هذه النباتات والمحاصيل قليلة، لذا فسنبحث عن إمكانيات جديدة والتفتيش عن مصادر جديدة وذات مردود اقتصادي كبير، ونتيجة للعمل المستمر في هذا المجال لإنتاج حامض الكلوتامين تم التوصل إلى إنتاج حامض اللايسين عن طريق الأحياء المجهرية، حيث أنهما يشتركان بخاصية واحدة. وقد تم فعلا الحصول على إنتاج حامض اللايسين بمرحلة واحدة أو بمرحلتين.

إن ظهور حامض اللايسين الحر في الوسط الغذائي درس من قبل الكثيرين في المزارع المغمورة مع التحريك المستمر في مزارع ذات بيئة تحتوي على جلوكوز، يوريا، وقد تم إنتاج (5-15) ملغم حامض اللايسين/لتر. أما السلالة

(*Ustilago Maydis*) فقد أنتجت (200–300) ملغم/لتر فــي الظــروف الاعتياديــة للزراعة. كما تم تحديد السلالة (Ustilago Maydis) وكذلك الســلالة (Cliodadium roseum) والتي تنتج بحدود (700–800) ملغم/لتر عند ظروف حامض هزاز. أمــا عند زراعة (U. maydis) في مخمر ذي حجم خمسة لترات فقد تم الحصول علــى إنتاج (1.95)غم/لتر لايسين و(1.9)غم/لتر حامض كلوتامين وغم/لتر أرجنين.

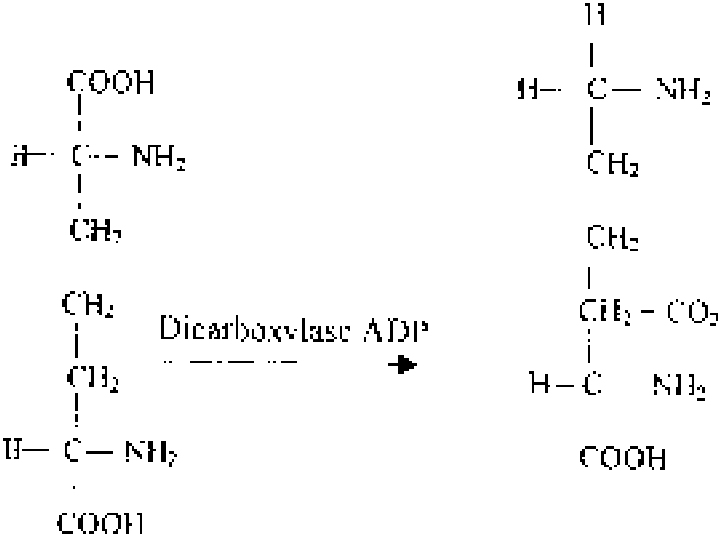
ومن العمل الوراثي تم الحصول على بعض التحويرات للسلالة (*M. glutamicus*) بواسطة العوامل الفيزيائية للأشعة فوق البنفســجية (ultra volite ray)، حيث ازداد الإنتاج إلى (20)غم/ لايسين/ لتر في وسط بيئي معين.

إن إنتاج (L. Lysin) من السلالة (*M. glutamicus*) يختلف من حيــث طبيعــة تأليف الكلوتامات، حيــث أن الســلالة (*M. glutamicus*) تحتــاج إلــى بيوتيــن وهوموسيرين لأجل النمو في وسط المولاس. وعموما فــإن الســلالات الصناعيــة للإنتاج تعتمد على الوسط التالي لل (*M. glutamicus*) :

جلوكوز	% 7.5
NH4SO4	% 1.5
K2HPO4	0.05
CaCO3	% 1
بايوتين	10 كغم/لتر

وقد حصل اليابانيون على إنتاج يقدر ب(70غم/لتـــر3) علـــى وســـط يحتـــوي حامض الخليك وإنتاج حامض اللايسين ويتم بمرحلتين ومن خلال عملية ميكروبيـــة وباستعمال (α. E Diamino pelinic acid) كعامل مساعد في الإنتاج.

حيث يتبين أيضاً بأن المرحلة الأولى هي عملية تحضير السلالة (E coli)، أمـــا المرحلة الثانية فهي عملية كربوكسيلية مـــن قبـــل أنزيـــم (DAP dicarboxlase) (الكاربوكسيليز)، الحامض (α E. diamino pelinic acid) يكون من قبـــل بكتريـــا (Acrobacter areogenase) وحسب الميكانزم التالي:



وهذا الخليط المتفاعل يحضن لمدة (24) ساعة عند درجة (28 م) مع إضافـــة كمية قليلة من فيتامين (B2) وحامض الليمون ليساعد عملية الكربوكسلة.

ميكانيكية بناء اللايسين:

إن الحصول على متحورات اكسوتروفية ليس فقط تعمل على زيـادة إمكانيـة بناء اللايسين ميكروبيولوجيا بل سمحت هذه المتحورات بإعطاء المجال لاكتشـاف درجات منفصلة لبناء هذا الحامض، وهي كما موضحة في الشكل اللاحق.

حيث يبين الشكل بناء حامض اللايسين من حامض الاسـبارجين، إن المتحـور الاسـكوتروفية مـن نـوع (Micsococcus) و (Brivibacterium) تحتـاج إلـى الهوموسرين، الميثونين، بتروسين، ايسولوسين، كذلك إن هذه المتحـورات تحتـاج أيضا إلى أمونين الفوسفات وبالحدود المثلى وكذلك البايوتين.

الخطوات التقنية لإنتاج اللايسين:

إن إنتاج الحامض يعتمد على طورين، الطور الأول هـو المتحـور (E-coli) المنتج إلى الحامض (d'amiaopenisic acid) الضروري لبناء حامض اللايسين، أمـا الطور الثاني فهو ل(Dicarboxylation) للحامض وتحويله إلى (L-Lysine) بواسطة الأحياء المجهرية المحتوية على (Dicarboxylase).

ويعتبر الوسط التالي مثالا للسـلالة (E-coli) وهـي (NH4)2HPO4)%0.5)، مستخلص الذرة (%0.5)، مكسروز (%0.5) وعند (pH) (7.5) وعند فترة حضـن (72) ساعة وعند درجة حرارة (28 م) مع التحريـك. وسـرعة تهويـة (1حجـم هواء/حجم وسط/دقيقة) أعطت إنتاج (9)ملغم/لتر من الحامض.

أما بالنسبة للســـلالة (Micrococcus glutamicue) الاكسـوتروفية، والســلالة (Brivibacterium sp.) أعطت نتائج مشجعة لإنتاج هذا الحامض والذي تراوح مـــا بين (18-35غم/لتر) والإنتاج يعتمد على الخطوات التالية:

1. تنمية اللقاح على الوسط الغذائي.

2. إنتاج لقاح للمخمر.

3. تلقيح المخمر مع التهوية والتحريك.

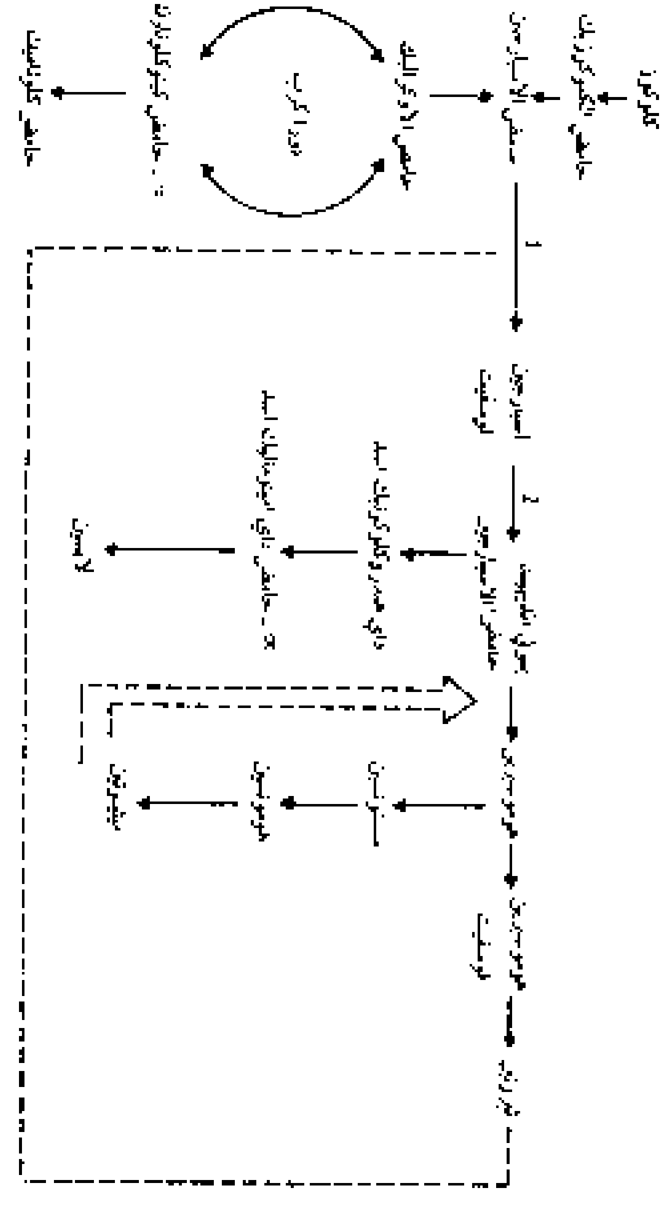
4. إنتاج المزارع الميكروبية للحصول على (L-Lysine).

5. تثبيت (Lysine) في الوسط.

6. عملية تبخير.

7. الخلط والتجفيف للحصول على بلورات الحامض.

مخطط (حامض الكلوتاميك)



تقنية إنتاج الحامض الأميني:

:(Production Technology of L-Theronine)

إن تحضير الحامض الأميني (L-Theronine) من قبل الأحيــاء المجهريــة ذو أهمية كبيرة في مجال الصناعة. إذا كان لدينا تصور على التحضير الكيماوي لــهذا الحامض من المصادر الخام الطبيعية أو المصادر التقليدية والذي يتطلب الكثير عــن الجهد والكلف.

وقد صدرت الكثير من الدراسات والبحوث التي تتعلق بتأليف هــذا الحــامض. وفي سنة (1991) تم اكتشاف السلالة المتحورة (mutant) من النــوع (Neurospora sp.) و(Bacillus subtilus E. Coli) والتي يمكنها تأليف كمية مــــن حــامض (L-Theronine) والتي أعطت إنتاجا يقدر بـ(2-3)غم/لتر ثيرونين (Theronine) عنـــد تربيتها على بيئات محتوية على (D L Homoserine) كأحد المكونـــات الأساســية للبيئة ومع ظروف خاصة من التهوية.

وفي بداية عام (1969) فقد اكتشف إنتاج السـلالة (*Arthrobacter paraffineus*) الاسكوتروفية لعلاقتها مع الايزولوسين وفي البيئة الحاوية على نسب (n-paraffin, L valine, L Theronine) وبكمية (10)ملغم/لــتر وســط غذائــي. إن التحضــير الميكروبيولوجي لـ(L Theronine) يمكن أن يكون تحت طريقتين، الأولى مباشـــرة في الحصول على سلالة ذات ميزة اكسوتروفية والتي تحــول الهوموســيرين إلــى ثيرونين.

البناء المباشر (Direct Binsynthesis):

للحصول على سلالات اكسوتروفية من النوع (E. coli) والتي يمكن توجيهها بعملية إيقاف عملية التمثيل الأيضي عند نقاط مختلفة لتأليف الأحماض: الارجنين، تربتوفان، هستدين، ميثونين-أيزولوتسين، ليثرين، فالين. حيث تم تأليف (L- Theronine) من سلالة بكترية من نوع (D E-coli) وبحدود إنتاجية تقدر (100-300)ملغم ثرونين/لتر و(20)ملغم/لتر من DAP و(20)ملغم/لتر لايسين.

ونتيجة لتطفير هذه السلالة والحصول على متحورات (mutant) فقد تم الحصول على أعلى إنتاج للأحماض الأمينية خصوصا الثيرونين مرتبطا مع DAP وعند البيئة ذات المكونات التالية مانيتول (2%)، $(NH_4)_2SO_4$ (0.15%)، K_2HPO_4 (0.7%)، $MgSO_4\text{-}7H_2O$ (0.1%)، DAP (120)ملغم/لتر، وعند ظروف حضن (37 م) ولكن عند زيادة تركيز DAP تقل كمية الثيرونين.

أما عند التربية على بيئة حاوية على السوربيتول وعند درجة حرارة حضن (28 م) أنتجت الكمية القصوى للثيرونين بعد فترة حضن دامت (42-48)ساعة، وعند محتوى ميثونيني تقدر ب(50)ملغم/لتر وكمية DAP (175)ملغم/لتر في البيئة الغذائية.

تحويل الحامض الأميني الهوموسيرين:

بعض الأجناس من الأحياء المجهرية يمكنها تحويل الهوموسيرين إلى (B-L- Theronine) ، وأعلى كمية من هذا الحامض يمكن الحصول عليها من السلالة (B

Subtilus) ومن بعض السلالات من جنس الخميرة ولكن الحامض المنتج سيكون داخل خلايا الخميرة. أما الوسط الغذائي المستخدم فيكون ذا محتوى (10%) جلوكوز، (1.2%) DL-هوموسيرين، فالسلالة (B. Subtilus) أنتجت (3.7)غم/لتر (L-Theronine).

وإن أعلى إنتاج تم الحصول عليه من السلالة (xanthomonas citri) وفي الوسط الغذائي والمكونات (10%) جلوكوز، و(2%)(NH4)2SO4، و(0.2%) K2HPO4، و(0.3%) MgSO4-7H2O، و(20%) CaCO3، (1%) هوموسيرين، كان (5)غم/لتر من (L-Theronine).

ويمكن الاستفادة من تحويل (50%) من الهوموسيرين إلى (L-Theronine) حيث يكون دور الهوموسيرين عاملاً مساعداً في بناء الثيرونين والميثايونين. إن بعض أنواع الخمائر تحول الهوموسيرين إلى ثيرونين بواسطة إنزيمات (Homoserine Kinase) كعامل مساعد لعملية الفسفرة خصوصاً لمجموعة الهايدروكسيل.

حامض التربتوفان (L- Treptophane):

يمكن تأليف هذا الحامض من الكائنات المجهرية الحية من نوع (claviceps purpuvea) ومن مادة الأندول، حيث أعطت إحدى المزارع كمية تقدر بـ(1.5)غم/لتر.

أما السلالة الاكسوتروفية للتربتوفان (E. coli) فقد أعطت إنتاجا (10)غم/لتر (L-Treptophane) في بيئة تحتوي على الأندول والسيرين. وهنالك أنواع أخرى من الخمائر التي أعطت إنتاجا يقدر ب(1.4)غم/لتر وفي وسط يحتوي على (antherlic acid) كجزء أساسي في الوسط.

والدراسات جارية في مجال تحضير التربتوفان ميكروبيولوجيا والتي تعتمد على تحويل الانثرانيك، الاندول والسيرين إلى حامض التربتوفان:-

تحويل حامض الانثرانيك:

إن تحويل حامض الانثرانيك إلى حامض التربتوفان وبغياب السيرين والسكر يكون من قبل الخميرة (Candida) وكذلك من النوع (Hansenula) والتي يمكنها من تأليف (3)ملغم/لتر تربتوفان عند البيئة الحاوية على حامض الانثرانيك.

تحويل الاندول والسيرين:

يمكن استعمال مايسيليوم من مزرعة (Claviceps purpurea) والتي تعزل من مرض صدأ الحنطة والتي لها القابلية على إنتاج حامض التربتوفان من الاندول والسيرين ومع المكونات البيئية التالية:-

جلوكوز (1%)، كلوريد النترات (0.5%)، N-Z-amine (0.5%)، بيتون (0.5%)، مستخلص اللحم (0.5%)، وتم الحضن عند درجة حرارة (26 م) ولمدة (72)ساعة وفي حاضن هزاز ذو سرعة (110) دورة/دقيقة.

ومن هذه المزرعة يتم تلقيح المزارع الكبيرة، ونسبة اللقاح تكون (5%) ثم تحضن لمدة (48) ساعة وتحت نفس الظروف التي ذكرت وعند درجة تهوية (0.7) حجم هواء/وسط/دقيقة، وسرعة خلط (400) دورة/دقيقة، ودرجة حرارة (28 م).

أما مكونات الوسط الغذائي فتكون كالآتي:-

جلوكوز (2%)، $(NH_4)_2SO_4$ (0.4%)، كلايسين (0.15%)، KH_2PO_4 (0.88%)، $NaHPO_4.12H_2O$ (1.54%)، مستخلص الذرة (1%)، وأثناء عملية التخمير وبعد مرور (30) ساعة من التحضن يتم إضافة الاندول وبنسبة (0.01%) ويتم تعديل الـ(pH) للبيئة ما بين (5.0-6.5)، وإن إضافة الاندول هو لإنتاج التربتوفان. وقد أعطت هذه السلالة إنتاجاً يقدر بـ(1.9)غم/لتر تربتوفان.

أما عند خلط الاندول والسيرين وبوجود السلالة (E. Coli) في بيئة غذائية مكونة من النسب المئوية التالية. كليسرول (1.0)، $(NH_4)_2HPO_4$ (0.35)، $KHPO_4$ (1.0)، $MgSO_4.7H_2O$ (0.002)، حامض الاستريك (0.005)، (pH) (7.5)، حيث يتم تهيئة هذه المواد في وعاء حجم (100مل) لأجل تحضير اللقاح، وبعدها يتم تلقيح المخمرات ذات الحجم الأكبر، ويتم التحضن عند (pH) (8)، ومن ثم يضاف (6)غم من مادة الاندول و(12)غم من (D.L. Serine)، وبعد فترة حضن لمدة (16) ساعة، وعند درجة حرارة (37 م) فإن كمية حامض التربتوفان "L" التي ستتكون هي بحدود (0.4) غم.

ومن الطرق المستعملة للحصول على التربتوفان هي تحويل حامض ال (3-Indolglucosic) حيث يعمل كمنشط بيولوجي للأحياء المجهرية حيث استخدمت الكثير من الأحياء المجهرية والمختلفة وعلى الوسط ذي المكونات التالية وبالنسب المئوية:-

جلوكوز	0.4	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02
NH_4Cl	0.2	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0055
KH_2PO_4	0.15	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.00005
NH_2HPO_4	0.22	pH	7.6

بعد عملية الحضن لمدة (18) ساعة وعند درجة حرارة (30 م)، وعند ظروف تهوية جيدة في حاضن هزاز، أجسام الأحياء المجهرية تغسل بمحلول فسيولوجي وتجفف بدرجات حرارة منخفضة وتحت التفريغ، بعد ذلك تنقل في إحدى الدوارق الكبيرة والتي تحتوي على (1-5) من الحجم النهائي ملغم/مل (15%) من حجم المنتوج الكبير، ومع وجود مساعدة (3-Indol glucosic acid) L- كلوتامات، (L-aspargine) ومع (pH) (7.6)، وفترة حضن لمدة (6) ساعات وعند درجة حرارة حضن أعطت السلالة (Bac megaterium) أعلى كمية من حامض التربتوفان تقدر بـ(7.9) غم/لتر. ولكن السلالة (E. coli K12) أنتجت (7.86).

حامض الالنين:

الالنين حامض أميني آخر يمكن أن يؤلف من قبل الأحياء المجهرية- كالبكتريا والخمائر والطحالب المايسلية، حيث تحتاج إلى بيئات غذائية تحتوي على إحدى

المنابع الخاصة لتاليف الالنين، ومن هذه الأحياء السلالة (*Pseudomonas sp*) الذي ينتج فقط (L-alanin).

طرق تخليق حامض الالنين:

هنالك طريقتان لبناء حامض الالنين، فالطريقة الأولى هي المباشرة بالاعتماد على المصدر الكربوهيدراتي حيث يتم تحويل حامض الاسبارجين إلى حامض الالنين، بواسطة السلالات:-

(Achromobacter Alcaligenus Micrococcus flavobacterium Bacillus sp , Aerobacter sp , Escherichia sp)

والتي تحتاج إلى بيئة غذائية ذات محتوى بنتوزي ومع المكونات التالية:-

كسيلوز	% 3	كارباميد	% 0.4
KHPO4	% 0.1	KNO3	% 1.3
MgSO4 7H2O	% 0.05	NH4Cl	% 0.7

ويمكن إضافة مستخلص اللحم إلى الوسط، كذلك يمكن إضافة مستخلص الخمائر، أو مستخلص الذرة الصفراء وبنسبة (0.3%) مع إضافة (1%) CaCO3، ويحضن في الحاضن الهزاز عند درجة حرارة (30 م) ولمدة (72) ساعة.

كما وهنالك أنواع أخرى من الأحياء المجهرية التي يمكنها تأليف حامض الالنين وهي :-

Brevibacterium pentoso, -aminoacidicum nov. sp., Brevibacterium pentoso-alanicum nov. sp

فالنوع الأول ينتج في البيئة الجلوكوزية وليس فقط حامض الالنين ولكن أيضاً حامض الكلوتامين. وعموما البيئة العامة هي:-

جلوكوز (10%)، سلفات الأمونيا (2%)، ببتون (0.2%)، مستخلص الخمائر (0.05%)، K2HPO4 (2.0%)، MgSO4.7H2O (0.1%)، CaCO3 (0.03%).

كذلك فإن إضافة الأملاح الأمونية للأحماض العضوية كالاكتيك، والكلوكوزيك يزيد من إنتاج حامض الالنين إلى (17-18) غم/لتر. وكذلك فإن دور مستخلص الخمائر يساعد في تنمية المزرعة والإنتاج الحامض ويمكن أيضاً أن يستعمل الثيامين، والبايوتين خصوصاً للسلالة (Bacillus lentus) أما السلالات الأخرى من الأحياء المجهرية التي تنتج هذا الحامض فهي:-

Brevibacterium monoflagelum
Brevibacterium amylolyticum
Corynebacterium gelatinosum

إن إنتاج حامض الالنين من السلالة (Corynebacterium gelatinosum) يحتاج إلى حامض الكلوكوزيك و د كيتوكلوتارات وكمية قليلة من حامض الكلوتاميك. وإن عملية إنتاج حامض الالنين معقدة جدا. أما إنتاج حامض الالنين من السلالة (Ustilago maydis) الاكسوتروفية والتي تحتاج لتنشيطها إلى مواد تكون ضرورية لعملها. حيث أنها تحتاج إلى حامض النيكوتين لتؤلف (20غم/لتر) النين عند استهلاكها حامض الكلوكوزيك.

وبعد تحوير هذه السلالة (ascotrophic mutant) وبعلاقتها بحامض الالنين والميثونين، وحامض الثيكوتين، فإن هذا المتحور أنتج كمية عالية من حامض الالنين وبتركيز عال، ومن السلالات الأخرى التي يمكنها تأليف هذا الحامض هي (Fusarium moniliforme) التي أعطت إنتاجا يقدر ب(14.2)غم/لتر.

طريقة انتزاع الكاربوكسيل من حامض الاسبارجين:

(Decarboxlation of aspartic acid method):

إن الطريقة الثانية لتخليق حامض (L-alanin) هي بواسطة انتزاع كاربوكسيل لحامض (L-aspartic acid) حيث أن إنزيم (B-dicarboxylase) يؤثر على (L-aspartic acid) وإن كثيرا من الأحياء المجهرية تحتوي على هذا الإنزيم خصوصا السلالات: (xanthomonas sp.)، (pseudomonas sp.)، والسلالة (xanthomonas oryzae) التي عند الرقم الهيدروجيني (4.6) تقوم بتحويل حامض الاسبارجين إلى (L-alanin) وعند درجة حرارة (40 م)، وعند المحيط القاعدي فإن (L-alanin) سيكون (D-L alanin). وبهذه الحالة يمكن انتزاع لكاربوكسيل من قبل الكثير من الأنواع المجهرية مثل:-

Acetobacter sp., Pseudomonas sp., Achromobacter sp., Ooispora sp., Torulopsis sp., Absidia sp., Asp. sp., Mucor sp.

إنتاج حامض الميثونين:

إن حامض الميثونين هو احد اثنين من الأحماض الأمينية التي تستعمل في أشكال كثيرة ومختلفة في الصناعات الغذائية، وقبل كل شيء يستعمل لتغذية الدواجن. وإن الدراسات في هذا المجال محدودة للحصول على هذا الحامض. حيث

ينتج من قبل (Ustilago maydis) التي تصنع حامض اللايسين بحدود: (6)غم/لتر ميثونين. وكذلك يمكن إنتاجه من الأحياء التالية:-

Torula lactis, Pseudomonas xanthe, Streptomyces erythrus, Serratia marcescens, Penicillium Islandicum

حيث يمكنها من تحويل (methyl marcapto-L-hydroxymacloulta) إلى ميثونين، وأعلى إنتاج تم الحصول عليه من السلالة (pseudomonas) هو (13.2)غم ميثونين.

إنتاج حامض الاسبارجين (Aspargine-L):

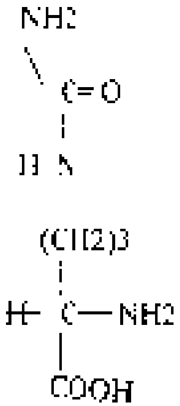
يمكن الحصول على الاسبارجين بطريقة ميكروبيولوجية بواسطة تحويل الفورمات من حيوية الأحياء للسلالات (Bacillus megaterium) والذي عنده تتحول (80%) من الفورمات إلى حامض الاسبارجين.

أما السلالات (Pseudomonas Fluorescensea, E coli K12) فإنها أيضا تنتج حامض الاسبارجين من حامض الفورميك وبنسبة (95%). وتتطور علم البيوتكنولوجي فقد تم تحويل (99%) من الفورمات إلى حامض اسبارجين من السلالة (E coli) ومن نسبة لقاح (1%) وفي بيئة غذائية تحتوي على (5%) فورمات الأمونيا وعند (pH) (4-7.2) ودرجة حرارة (37 م) وفترة حضن دامت (24) ساعة.

حامض السترولين:

يمكن للسلالة الاكسوتروفية (Bacillus subtilus) والتي تحتاج إلى منشط لعلاقتها مع حامض الارجنين حيث تؤلف حامض السترولين وبكمية (١٦.٩غم/لتر) وفترة حضن تقارب (72) ساعة وعند درجة حرارة (34 م)، ومقومات الوسط الغذائي هي النسب المئوية التالية:-

جلوكوز	% 13
KH_2PO_4	% 0.3
$MgSO_4\ 7H_2O$	% 0.04
NH_4Cl	% 3.0



الصيغة البنائية للحامض

فول الصويا المتحلل (1.0%)، أيونات الحديد (2)ملغم/لتر، أيونات المنغنيز (7)ملغم/لتر، بيوتين (4)ملغم/لتر، ثيامين (200)ملغم/لتر.

+ خليط من أحماض أمينية (0.3%)، وبعد فترة الحضن يضاف (50%) $CaCO_3$.

حامض L- هوموسيرين:

يمكن للسلالة الاكسوتروفية (Micrococcus glutamicus) التي تصنع الثيرونين أن تصنع L هوموسيرين وبحدود (7)غم/لتر في البيئة الغذائية وعند حاضن هزاز (Incubater shaker) ودرجة حرارة حضن (28 م) وفي بيئة ذات المكونات التالية: جلوكوز (10%)، NH4SO4 (2%)، مستخلص الخميرة (0.5%)، MgSO4 7H2O (0.3%)، K2HPO4 (0.1%)، CaCO3 (2%)، ببتون (1.5%)، N-Z-amin (1%).

وفي هذه الظروف تكون كمية الهوموسيرين واللايسين المنتجة متساوية ولكن يمكن بهذه الحالة أن لا يضاف (N-Z-amin) أو (peptone) بل يضاف البايوتين (Biotene) بكمية (3-30)ملغم/لتر وكمية من الثيرونين بحدود (400-500) ملغم/لتر.

فإن إنتاج الهوموسيرين سيكون بحدود (13-15)غم/لتر، واللايسين (6) غم/لتر. ولكن ظهور أي كمية من الميثونين في الوسط سيعمل على منع بناء الهوموسيرين.

حامض L- أيزوليوتسين:

إن حامض L- أيزوليوتسين هو أحد أغلى الأحماض الأمينية، والكميات المنتجة من هذا الحامض قليلة، ويعتمد إنتاجه على مكونات البيئة الغذائية المستخدمة، ونوعية الأحياء المنماة. حيث هنالك الكثير من الأحياء المجهرية التي تؤلف L- أيزوليوتسين مثل (Pseudomonas sp) والتي تنتج بحدود (12) غم/لتر عندما تزرع على بيئة معقدة تحتوي على (20)غم/لتر أحماض أمينية ودهنية وعند

ظروف تهوية ملائمة والمحضونة في حاضن هزاز، أما السلالة (B Subtilis) فإنها تؤلف L- أيزوليوسين عند وجود L و D أحماض أمينية دهنية.

لقد تم تنميتها في بيئة غذائية تحتوي على (10%) جلوكوز، كتاميد، مستخلص فول الصويا، بيتون، أملاح لا عضوية (1%) أنتجت (6)غم/لتر أيزوليوسين.

أما الأنواع الأخرى من الأحياء المجهرية (Micrococcus glatamicus)، (E-coli Breivibacterium ammoniager) فهي منتجة لهذا الحامض ولكن بحدود معينة. أما السلالات (Streptomyces rimosus)، (Serratia marcescens) فتحتاج إلى حامض الثيرونين في البيئة لأجل تأليف حامض L- أيزوليوسين وعند الظروف الهوائية وبكمية تقدر (4.6)غم/لتر.

حامض (L-Ornithin):

إن تأليف حامض (L-Ornithin) من السلالات المتحورة كالسلالة (Micrococcus glatamicus) وعند توفير السترولين، الارجنين، أوكسي ترولين في البيئة الغذائية، وعند ظروف حضن (28 م) وفترة حضن (72) ساعة أنتجت كمية من هذا الحامض (L-Ornithin) تقدر ب(26.2)غم/لتر من بيئة غذائية ذات المكونات التالية:-

جلوكوز (10%)، K_2HPO_4 (0.1%)، $MgSO_4.7H_2O$ (0.025%) NH_4Cl (1.0%)، كاربامين (0.3%)، مستخلص الذرة الصفراء (0.5%)، N-Z-amin (1%)، pH (6-7).

وميكانزم الإنتاج يعتمد على تحويل الارجنين بعد استهلاكه من قبـل الكائنــات المجهرية إلى كلوتامات ومنع فســفرة (N-acetylglotamat) والتـي تعتـبر مــن المنتوجات الوسطية في سلسلة العمليات الإنتاجية الأيضية لتكوين الاورثيــن مــن الكلوتامات.

حامض L-Therosine و L-phenylalanin:

بدأ إنتاج هذه الأحماض الأمينية من الأحياء المجهرية في ســنة (1960) بعـد دراسات تكنولوجية وميكروبيولوجية، وقد حدد الإنتاج بـ(500–900) ملغم/لتر فنيل النين.

ولكن في السنوات الأخيرة ونتيجة التطور البيوتكنولوجي تم التعرف على سلالة متحورة من (E.coli) ذات الصيغة الاكسترونية لعلاقتها مع (L-Therosine) حيـث تم الحصول على (2)غم/لتر فنيل النين. وقد تم العثور على متحور أخر من نــوع (Micrococcus glatamicus) أنتجت (2-5) غم/لتر فنيا النين.

وهناك سلالات أخرى مثل (Alealigenes Faecalis) أمكنهـا مــن تحويـل (63.5) من حامض إلى فنيل النيــن. أمــا الســلالات (Aerobacter aerogenus)، (Pseudomonas aeruginosa)، (Peruciviae) فقد أنتجت (53%) من هذا الحامض. ويمكن للسلالات المتحورة (E. coli) و(Micrococcus glasamicus) مــن تصنيـع

(Thirosine) بدل الفنيل النين ولكن في ظروف تختلف عن ظروف إنتاج فنيل النين.

إنتاج حامض (L-Valine):

الفالين حامض أميني الذي كثيرا ما درس من قبل العاملين في حقل التأليف الميكروبيولوجي، حيث تم تأليفه من قبل الأحياء المجهرية عام (1960) من السلالات: (Aerobacter cloacae)، (Aerobacter aerogenus)، والتي تعتبر من السلالات ذات الإنتاجية العالية من حامض (L-Valine) وفي بيئة ذات المكونات التالية:-

جلوكوز (10%)، NH4Cl (1.2%)، MgSO4 7H2O (0.04%)، Kcl (0.31%)، KH2PO4 (0.2%)، K2HPO4 (0.1%)، CaCO3 (3.5%)، و(10)غم/لتر كل من NiSO4-6H2O، MnSO4 7H2O، NaMoO4. وتحضن عند درجة حرارة (30 م) مع التهوية حيث أنتجت (13) غم/لتر L-Valine.

وكما أن السلالة (Paracolobacterium Californa) تنتج (15) غم/لتر L-فالين. وإن السلالة (E. coli) تنتج (7.5)غم/لتر L-Valine. وقد أظهرت السلالة (Brevibacterium ammonagenus) إنتاجية تقدر ب(6)غم/لتر. أما من السلالة المتحورة (M. glutamicus) فقد أعطت إنتاجا منه بحدود (3.7-8.79) غم/لتر.

حامض البرولين:

هنالك عدد كبير من الأحياء المجهرية التي تؤلف حامض البرولين ولكن يمكن القول بأن السلالة (Brevibacterium Flavium) هي السلالة المتخصصة ذات الإنتاج العالي وبعد معاملة هذه السلالة بالعوامل الوراثية الفيزيائية كالأشعة فوق البنفسجية ، حصل على المتحور (B. Flavium) (Atcc 14067) حيث أعطى إنتاجا يقدر ب(11.4)غم/لتر برولين وعند درجة حرارة حضن (31 م) وعند فترة حضن (72) ساعة وعلى البيئة الغذائية التالية:-

جلوكوز (10%)، $(NH_4)_2SO_4$ (05.5%)، KH_2PO_4 (0.1%)، $MgSO_4.7H_2O$ (0.04%)، $CaCO_3$ (- 0%)، بيتون (0.45%)، (L-Isolysine) (0.015)، ثيامين (0-28%)، Mn++، Fe++28.

إن تركيز أيزوليوتسين والبايوتين مهم لتأليف البرولين، فعند التركيز الواطئ تنتج السلالة حامض(palmatic) ، ولكن عند التركيز العالي فإنها ستؤلف البرولين.

التوقعات المايكروبيولوجية لتأليف الأحماض الأمينية:

إن الإنتاج المايكروبيولوجي بدأ ينتشر ويتوسع نطاق إنتاجه في كل العالم وخصوصا في إنتاج حامضي الكوتامين واللايسين، أما إنتاج حامض الفالين و الايزولتسين فإنه ينتج بحدود معينة في اليابان

أما الأحماض الأمينية كالهوموسيرين، اوريثين، تسيترولين، فطرق إنتاجها أصبحت معروفة ولكن تحتاج إلى دراسات مستفيضة من الناحية الاقتصادية.
كذلك عن التوقف عند بعض التحولات كتحويل حامض الفورميك إلى أسبارجين أو (phenyl preglbasic acid) إلى فنيل الثين، كذلك يجب دراسة الطرق التكنولوجية لإنتاج الميثونين، ثيرونين، تريبتوفان، حيث أنها تحتاج إلى دراسات أوسع والعمل على إيجاد مصادر خام لها. كذلك أن الأحياء المجهرية من خلال عملها فإنها تنتج بعض المركبات الوسطية وبكميات كبيرة، وأهميتها كبيرة لهذا فالحصول عليها صعب لأنها تحتاج إلى السيطرة على الميكانزم وعلى الحالات الوظيفية للأحياء المجهرية (أجسامها).

كذلك من الضروري معرفة الناحية الفسلجية وكذلك ديناميكية نمو هذه الأحياء، ومعرفة مزايا السلالة هل هي اكسوتروفية أم لا.

ثم إذا كانت السلالة اكسوتروفية المستعملة فإن التمثيل الأيضي سيؤثر على الطريقة. ونحتاج الطريقة إلى تنظيم للروابط المستعملة لكي نحصل على أحماض أمينية بصورة مستمرة.

وكذلك تحتاج بعض العمليات إلى مواد لإنتاج الالنين والكلايسين والتربين. ويعتبر عصير التمر مادة خام وجيدة لإنتاج الأحماض الأمينية، خصوصاً وأن الوطن العربي يتميز بالإنتاج الكبير لهذه المادة الخام وأن التوجه إلى استخدامها أصبح من الضرورة بمكان.

الفصل الخامس عشر

إنتاج المضادات الحيانية

Production Technology of Antibiotics

إنتاج المضادات الحياتية:
(Production Technology of Antibiotics)

تعرف المضادات الحياتية أو المضادات الحيوية بأنها المواد الكيميائية العضوية التي تنتجها أحياء مجهرية كنواتج أيضية ولها تأثير مبيد أو موقف لنمو غيرها من الأحياء المجهرية. وقد أشار إلى ذلك (Waksman 1942) حيث اعتبر المواد الكيميائية الحاصل عليها من الأحياء المجهرية والتي لها تأثير مثبط للنمو أو لها تأثير قاتل لأحياء أخرى في التخافيف الكبيرة. وبعد كل ما تقدم استطاع من تحديد أو البدء بتأليف المواد الشفائية (الدوائية) مثل السلفاميد. وفي بداية القرن التاسع عشر تم الاهتداء إلى مادة الكنين والفوزيما.

وفي عام (1929) استطاع (Fleming) من اكتشاف الجزء الأكبر من المضادات الحيوية التي لها تأثير قاتل للأعفان وللبكتريا (Bacteriostatic & Fungostatic) وبعض المضادات الحيوية التي لها صفة عدم السمية، أما القسم الآخر فله سمية ضعيفة، لذلك استعملت كأوساط شفائية (دوائية) وعند تخافيف كبيرة. والمضاد الحيوي قد يختص بكائن حي مجهري واحد أو بمجموعة من الأحياء المجهرية. وقد تكون هذه الأحياء قليلة ولكن لها تأثير واسع.

إن تخليق المضادات الحيوية من الأحياء المجهرية يختلف عن تخليق المواد الأخرى نظراً لتعقيد جزيئة المضاد الحيوي وكذلك التفاعلات الخاصة لأجل تخليقه

حيث يعتمد هيكله على تكثيف حلقات D - ، الأحماض الأمينية والسكريات. وعلى العموم فإن المشكلة في تأليف المضاد الحيوي تقف عند حالتين، وهي الارتباط مع خواص الصفات الكيماوية للمواد مثل البولي سكرايد (Polysacchride) والبناء الببتيدي (Peptide structure) أو البناء الأروماتي الحلقي (Aromatic ring)، أو تكون مرتبطة على الشكل التالي مع بعض الصفات الخاصة للأجزاء المكونة مثل (D-Amino acid, Funelo acetic acid and others).

ويمكن أن يخلق المضاد الحيوي نتيجة خطأ أو تغيير في التمثيل الأيضي، هذه الأخطاء الأيضية يمكن أن تكون عميقة بعد تثبيتها وراثيا بواسطة الانتخاب الوراثي للسلالات (Mutant)، وطبيعي أن مثل هذا العمل سيحسن من صفات السلالة الرئيسية (Original strain)، وبهذا سنحصل على الكثير من السلالات ذات الإنتاج العالي للمضاد الحيوي، فمثلا إنتاج البنسلين كان تحت (100) وحدة/مل وباستعمال السلالة Penicillum Chyrysogenum Q176 وبعد عملية الانتخاب الوراثي Genetic Selection للسلالة NRRL 1951 أعطت انتاج 2000وحدة/مل. أما انتاج المضاد بنزل بنسلين فكان يتزايد بنفس الطريقة إلى Mg (8) (التي تكافي 13000 وحدة اوكسفوردية/ مل .

وفي خلال 20-25 سنة الأخيرة تم اكتشاف أكثر من 1200 مضادا حيويا، وأن انتاج هذه المضادات لم يزد عن 3000 طن/بالسنة بالاعتماد على عدد قليل من السلالات تقدر بـ 50-60 سلالة والتي تنتج البنسلين أو السفالوسورين والريفومايسين، وداي هايدروستربتومايسين Dihydrosterptomysin، والأخيرة يتم الحصول عليها نتيجة التركيب أو خلط أحد المخلفات الميكروبيولوجية مع

التحويرات الكيمياوية. فمثلا الكلورفينكول يحصل عليه صناعيا بواسطة التركيب الكيمياوي. لذا وجب اضافة المركبات الكيمياوية لكي يحصل على البنسلين، السفالوسبورين، بولي ميكسن، الكرامسيدين، والكريزوفلافين ... الخ . وكذلك مجموعة التتراسايكلين، مجموعة البنسلين . والجدول التالي يوضح الأحياء التي تولف المضادات الحيوية على نطاق صناعي :

الجدول رقم (9) يبين الأحياء المجهرية

المستعملة لتحضير المضادات الحيوية صناعيا

الكائن المجهري الحي	المضاد الحيوي	النوع الكيمياوي	المؤثر الحيوي
Streptomyces canus	امفوماسين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces nodosus	امفوتريسين	بولي اسين	طحالب، خمائر
B.Sybtiusis	اتروسين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
B.Subtilis	باسترونسيا	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces griseochromogenes	بلاستسدين	بولي ببتايد	طحالب
Streptomycesgriseus	كاندسيدين	بولي اسين	طحالب، خمائر
Bacillus colissimus	كولستين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces griseus	سكلوهكسامايد	بولي ببتايد	طحالب
Streptomyces orchidaceus	سكلوسرين	احماض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyceserythreus	ارثرومايسين	ماكرولايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Fusidium coccineum	حامض الفوزديك	ستيرويد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Microsporium purpurea	جنتامايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Bacillus brives	كراميسيدين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Pencilium griseofulbum	كريزوفلافين	بولي سايك	طحالب
Streptomyces hydroscopicus	هايكرومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام
Streptomyces janamyceticus	كاسومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام
Streptomyces	لنكومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام

kitasoensis			
Streptomyces fradiae	نيومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces nivens	نوفوبيوسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces noursei	نيستاتين	بولي ببتايد	طحالب ، خمائر
Streptomycesantibioticus	اوليندومايسين	ماكرولايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces rimosus	تيرومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام وبروتوزوا
Bacillus polymexa	بولي ميكسين B	بولي ببتايد	بكتريا سالبة لصبغة كرام
Streptomyces sp	سبريترمايسين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces mediteranei	ريفومايسين SV	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Wocardia lurida	ريستوسيتين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces ambofaciens	سبيرامايسين	ماكرولايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces virginae	ستافيلومايسين	ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces endus	ستندومايسين	ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces griseus	ستربتومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام TB
المنتوج الكيمياوي للستربتومايسين	داي هايدروستربتومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام TB
Streptomyces azureus	ثيوستربتون	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces fradiae	تايلوزين	ماكرولايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces hachjoin	تري كومايسين	بولي ببتايد لاكتون	طحالب : خمائر
Pencillum chrysogenum	بنسلين G	منتوج حوامض أمينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Pencillum Chrysogenum	بنسلين V	منتوج حوامض أمينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Pencillum chrysogenum	بنسلين O	منتوج حوامض أمينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
منتوج كيمياوي لـ	كلوكساسيلين	منتوج حوامض أمينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
6-amino penicillic acid	ديكلوكساسيلين	منتوج حوامض أمينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
	نافسيلين	منتوج حوامض أمينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
	اوكساسيلين	منتوج حوامض أمينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام

بكتريا موجبة لصبغة كرام	مشتق حوامض امينية	دوستلين	
بكتريا موجبة لصبغة كرام	مشتق حوامض امينية	سيفلين	
بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام	تتراسايكلين	تتراسايكلين كلوروتتراسايكلين	Streptomyces aureofaciens
بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام	تتراسايكلين	6 - ديمثيل - 7 - كلوروتتراسايكلين	Streptomyces aureofaciens
بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام	تتراسايكلين	5 - هيدروكسي تتراسايكلين	Streptomyces rimose
بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام والركتسيا	تتراسايكلين	تتراسايكلين تتراسايكلين	Streptomyces aureofaciens

الطرق العامة لتحضير المضادات الحيوية:

إن أكثر المضادات الحيوية المتوفرة حالياً في السوق العالمية هي نتيجة الإنتاج الصناعي لتطبيقات علم الأحياء المجهرية الصناعية وتهيئة الظروف الهوائية للسلالات المصنعة. حيث توجد في الوقت الحاضر الكثير من الدراسات والنشريات التي تعطي تفصيلاً كاملاً لعمليات التحضير والإنتاج رغم أن المنتجين الكبار يعتبرون هذه التفصيلات عن طرق التحضير سراً ولا يمكن الإعلان عنه لأسباب احتكارية وتجارية. ولكن بسبب التقدم العلمي والتكنولوجي في أكثر دول العالم جعل المخطط العام لطرق التحضير والإنتاج معروفة وبشكل جيد ويعتمد على الدولة المصنعة لما لديهم من خبرة في مجال البحث والتطوير. وعلى العموم فإن المعمل الواحد يمكن أن ينتج أكثر من مضاد باستعمال طرق أكثر مرونة ودقة وباستعمال نفس الأجهزة.

المخمر الإنتاجي (Production Fermenter) تكثير من المواد له حجم يقارب (110-135م3) حيث يكون ارتفاعه اعتياديا ضعف العرض وهي أجهزة على العموم تكون مغلقة وذات تخصص للإنتاج المعقم لكائن مجهري معين، وتصنع هذه المخمرات من حديد الصلب غير قابل للصدأ أو من صفائح الكروم -النيكلايبة. ولكن نتيجة الدراسات في السنوات الأخيرة تم استعمال أنواع من الحديد ذات نوعية معينة لصناعة هذه الأجهزة التي تحتوي على منظمات للتهوية والتحريك والتعقيم.

الأوساط الغذائية المستعملة للتربية:

إن العملية الإنتاجية للمضادات الحيوية تشبه أي عملية ميكروبيولوجية صناعية ولكن عملية التعقيم تكون ملاحقة للإنتاج في المخمر الإنتاجي، ابتداء من المخمر المختبري ومن الضروري مراقبة العملية بعد توفير كل شروط التعقيم منعا للتلوث بالأحياء المجهرية المقاومة للمضادات أو مع البكتريوفاج.

وبعد عملية تبريد الوسط الغذائي التربوي للدرجة الحرارية الضرورية اللازمة للكائن المجهري المختص يتم تلقيح الوسط بالنموذج المختبري وبتركيز يقارب (1%) والموجود في طور النمو اللوغاريتمي (log phase) مع التحريك والتهوية والحرارة المناسبة للسلالة.

تحضير اللقاح (Preparation of Inoculum Culture):

إن من أولى الأمور في أي عملية ميكروبيولوجية إنتاجية صناعية تبدأ بعملية إعداد اللقاح من المختبر بالاعتماد على أنبوبة الاختبار إلى الفلاسك إلى حجم المخمرات الصغيرة ثم الكبيرة على التعاقب من خلال نموذج مختبري واحد أو اثنين مع تناظر الأحجام النامية.

واللقاح يحضن في الحاضنات لمدة (24–48) ساعة بالاعتماد على السلالة الصناعية وظروفها، ومن ثم تنقل الأخيرة تحت الضغط إلى المخمر الإنتاجي. وتوجد نشريات عديدة عن نماذج لخزانات التخمير الكبيرة الحجم للقاح والتي فيها يمكن أن يعد اللقاح والذي يمثل بحدود (10%) من حجم الوسط الإنتاجي.

كما أن حامضية الوسط (pH) وإضافة المواد الغذائية يكون حسب المتطلبات القياسية المناسبة للسلالة. ويجب أن نعلم بأن طرق إنتاج المضادات الحيوية المختلفة لها خصائص معينة والتي يجب أن تلاحظ باستمرار.

طرق التربية المستمرة (Continuous Culture):

تحضير المضادات الحيوية بالطريقة المستمرة (Continuous Culture)، ولهذا الموضوع نشريات وامتيازات (Patent) ولكن أكثرها تعود إلى التقنيات المختبرية أو العمليات شبه الإنتاجية. فعند العملية الميكروبيولوجية لتخليق أي مضاد حيوي يجب أن نعلم بأنه ليس دائما يكون نمو المزرعة وتأليف المضاد الحيوي في وقت واحد، لأن ظروف نمو المزرعة من (مقومات الوسط، تهوية، pH) تكون مختلفة عن تلك التي تؤدي إلى التخليق الأعظم (Maximum production) للمضاد الحيوي.

وهناك حالات تشذ عن هذه القاعدة، ففي حالة التخليق الحيوي للكلورفينكول (Chlorophenicol) من السلالة (Streptomyces Venezulae) حيث تكون عملية النمو تتماشى مع عملية التأليف الحيوي (كرهارت ديارليس 1959) ولكن تحضير الكلورفينكول على نطاق صناعي اعتمد الآن فقط على طريقة (التركيب الكيماوي).

وتوجد نشريات عديدة لاستعمال نظام (One Stage Fermentation) للتحضير المستمر للمضادات الحياتية وبشكل خاص (البنسلين) (كلوشوف وآخرون 1952)، وفي حالة استعمال الأجهزة مع التحريك والتهوية وعلى وسط يحتوي على سكر اللاكتوز والجلوكوز ومستخلص الذرة وعند نمو المزرعة. هؤلاء المؤلفين استطاعوا من تحضير وجبة إنتاجية بمقدار (360) منغم/مل بنسلين والتي تتناسب سعتها بـ(7.5) ملغم/مل/ساعة.

وبطريقة مشابهة لما هو موضح أوضح (كاكي 1952 وآخرون) النظام المستمر لتحضير البنسلين، وكذلك للستربتومايسين تم إيضاحه من قبل (جاكسن 1950 وغيره) واعتبر امتيازا إنجليزيا باسم (جاكسن) علما بأن أكثر البحوث للتحضير المستمر تعود للأنظمة الثنائية الوعاء (Double Stage System) التي يتم في إحدى الأوعية حيث تعطي الظروف الملائمة لنمو المزرعة، وفي الخزان الثاني حيث يتم فيها التخليق الحيوي للمضاد الحيوي.

وعند توفر الظروف الجيدة للسلالة فتعطي إنتاجاً عالياً على النطاق المختبري، ففي حالة البنسلين (Penicillin) أعطى (1500) وحدة/مل (بيرت وآخرون 1960). لكن بيرت وكانوا استطاعوا اقتراح طريقة جديدة للتربية المستمرة لتحضير البنسلين وباستعمال وسط غذائي ذات pH (7) في المخمر الأول الذي يشجع نمو الطحالب بشكل خاص.

أما (براون 1958) فقد أعلن في المؤتمر الدولي السابع للأحياء المجهرية عن الظروف شبه العملية لإنتاج الستربتومايسين من السلالة (Streptomyces Griseus) وبالطريقة المستمرة وفي مخمر ذي حجم (3000) لتر حيث حصل على إنتاج (78-88%) ستربتومايسين، وقد تفحص بعض الصعوبات التي وجدها من حيث الكلفة وأشار إلى أن المصانع المختصة لا يمكن أن تكون مؤهلة لعملية الإنتاج المستمر للمضادات الحيوية.

الأحياء المجهرية - المجاميع الأساسية للمضادات الحيوية:

المضادات الحيوية يمكن ترتيبها من حيث الإنتاج على الأسس التالية:

أ- إذا أخذنا بعين الاعتبار الأحياء المصنعة فيمكن تقسيمها إلى بكتيرية، أكتينوماستيتس، طحلبية...الخ.

ب- أما إذا أخذنا بعين الاعتبار خاصية التأثير فيمكن تصنيفها ضد الطحالب، ضد البكتريا، ضد الفيروسات.

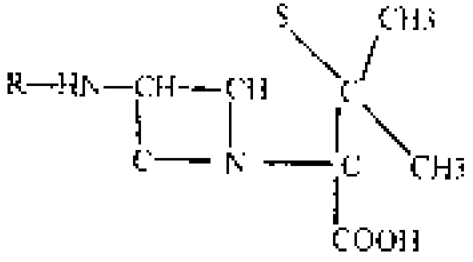
ج- أما إذا أخذنا بعين الاعتبار التركيب الكيماوي فيمكن تصنيفها حسب التركيب الكيماوي لأن ميكانيكية التأثير مربوطة بالتركيب الكيماوي.

المضادات الحيوية ذات الحوامض الأمينية:

:(Amino Acid Antibiotics)

<u>البنسلين (Penicilin):</u>

منتج حيوي وهو أحد المجاميع ذات التجانس من حيث التركيب والذي يمتلك تقريبا نفس الصفات للمضاد الحيوي، المنتوجات المتفرقة لهذه المجموعة يتميز الواحد عن الآخر بالأصرة الأميدية (amide bond) في مختلف السلاسل الجانبية والتابعة لنظام عام لمجموعة نواة (B-lactamicoazolidenic) المكثفة والمعروفة كحامض (6- amino penicilic acid):



التركيب العام لحامض الامينوبنسلين:

:(Amino penicillic acid)

البنسلينات تتميز في الطبيعة بمجموعة (R-group)، إن أول المستحضرات للبنسلين تم تحضيرها من سطح مزارع (Penicillum notatum) على أوساط بسيطة نسبيا.

بنسلين N (سفالوسبورين) R=CO(CH2)3CN(NH2)COOH

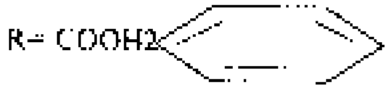
D-α aminoadizel-Penicillin

بنسلين P(d²-pentenl penicillin) R=-COOH2 OH:CH CH2CH3

K(n-hepta)-penicillin) بنسلين

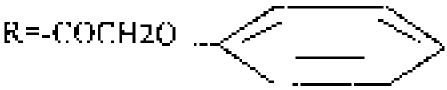
R=-CO(CH2)6 CH3

G(benzel-penicillin) بنسلين

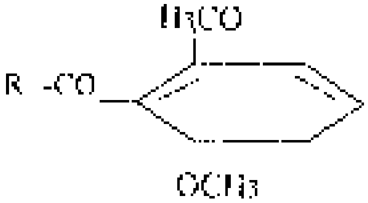


X(p-hydroxybenzel-penicillin) بنسلين

V(phenoxy methyl-penicillin) بنسلين

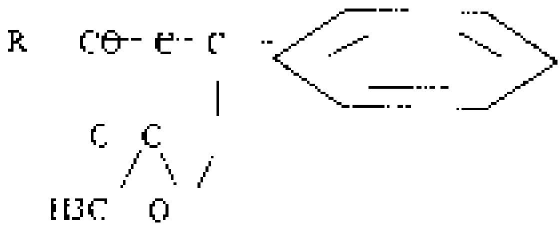


[6-(2 6Dimetoxy benzamid penicillin)] بنسلين

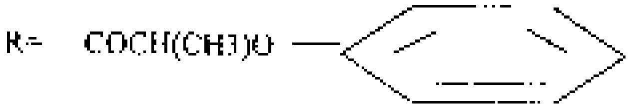


كلوكسيد تسلين

[6-(5-methyl-3-orthochlorophynelIso gasol-carbamide penicillin-]

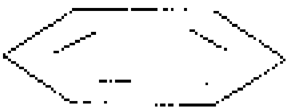


فينوكسي اثيل بنسلين: (α-phenoxy ethel penicillin)



امبسلين:

D-aminophenol acedamid penicillin

R— - COCH(NH2) —


وفي سنة (1941) تم اكتشاف التأثير المساعد لمستخلص الذرة الصفراء على التخليق الحيوي للبنسلين وفي ذات الوقت تكون إحدى مكوناته (B-phenlethylamine) الذي يوجه التخليق الحيوي نحو تحضير (G) بنسلين الذي هو البنسلين الأساسي في الصناعات البنسلينية.

الأحياء المجهرية (Microorganism):

بن النوع الذي تم عزله من قبل فلمنك (Flaming) والذي عرف باسم (Penicilium notation) استعمل في البداية لتحضير البنسلين إلا أن هذه السلالة كانت واطئة الإنتاج، ومع ذلك فقد تم التوصل بعد الدراسات العديدة لانتخاب سلالات جديدة أكثر إنتاجية.

ونتيجة هذه الدراسات فإن إحدى الاحتمالات الطبيعية لسلالة فلمنك (NRRL-1249-B-21) أمكنها من تأليف أكثر من مضاد، ونتيجة لهذا العزل المستمر للسلالات تم ابتكار التحسينات التطويرية على الطريقة المستعملة لتحضير البنسلين وتبعا لذلك فقد ارتفعت منتوجات البنسلين إلى (200) وحدة/مل (الوحدة الأوكسفوردية الواحدة 0.6Mg) مع توفير الظروف.

ومع العمل الوراثي للسلالات التي استعملت من النوع (P notatum) تم اكتشاف أنواع جديدة ومتنوعة من أجناس (Aspergillues) و(Penicillium) التي لها القابلية

على تخليق البنسلين، ومن هنا ابتدأ العمل على توجيه الدراسات نحو السلالات التي يمكنها من الإنتاج في الظروف العميقة.

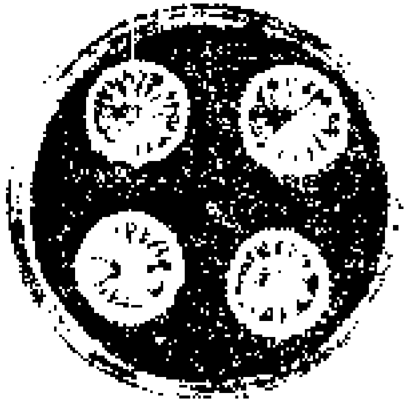
إن هذا التطور وتكوين المضاد الحيوي أثناء هذه التقنيات أمكن عزل على البطيخ، وهي سلالة من نوع (Penicillium chrysogenum) التي عرفت بسلالة (NRRL-1951) والتي أظهرت حيوية في تصنيع البنسلين في التربة العميقة.

:(Penicillium chrysogenum)

تتميز هذه السلالة عن السلالة (P. notatum) بشكل رئيسي أولاً بشكل كونيداته، حيث كونيداته تكون ذات شكل بيضوي في حين أنه عند السلالة الثانية تكون الكونيدات بدرجة أو بأخرى دائرية (حلقية) على وسط جابك – دوكسن.

السلالة (P. chrysogenum) تكون مستعمرات بعد (12-18) يوم وبأقطار (05.5-4.0) سم وذات نصف قطر أخدودي، وتكون المستعمرة مغطاة بالكونيدات المرصوفة بشكل كثيف، ولكن عند بعض السلالات يمكن أن تكون هذه الظاهرة ضعيفة جداً.

المايسيليوم لهذه السلالة ذو لون مائل إلى الاصفرار مع فوارق مختلفة في اللون، في حين أن السطح المغطى بالكونيدات يكون ذا لون أصفر –مخضر أو أزرق– مخضر. إن الحافة الخارجية يكون لونها ضاربا إلى البياض بعرض (1-4) ملم شكل (43).



شكل (43)

Penicillium chrysogenum Q176

[illegible]

(2.8 – 3.0) ميكرون وذات سطوح ملساء وتنتج تجمعات البكونيديا بكميات عظيمة تجاري.

وبواسطة الانتخاب الوراثي للسلالة (NRRL 1951) تم عزل السلالة (NRRL 832) و (NRRL 1951 B25) وهو سلالة أكثر من السلالة الأساسية في معهد كارنيكي هذه السلالة الجديدة تم تعريضها لأشعة (X-Ray) وإن أحد الطافرات التي بقيت على قيد الحياة ظهرت بأنها أكثر فعالية وأكثر إنتاجية مرتين.

ديميرك (1948) استطاع إنتاج (500) وحدة/مل من السلالة (X-1612) بعد تعريضها إلى خط إنتاجي لأشعة X والأشعة فوق البنفسجية.

باكي وآخرون (1948) استطاعوا من تشكيل عائلة كاملة من الطفرات [illegible] في إنتاج البنسلين (شكل 10). حدود هذه الطفرات من السلالة بنسلين (Q-176) [illegible] إنتاجها بـ(1000) وحدة/مل. وبنفس الطريقة تم عزل الطفرات (NRRL 1951 B25) بطريقة عشوائية، ومن أشهر وأحدث وهي الآن مستعملة كثيراً في الصناعة كما في السلالة (NRRL 1951 B25) وكذلك السلالة (Wis Q-176) والتي تحمل صفات كثيرة لم تكن موجودة في السلالة الأصلية. فمثلاً أنها لا تصنع الصبغة الصفراء (Yellow pigment) ولا الكريزوجينين ولكنها تصنع (benzylpenicillin) وكذلك وصل الحد الأعلى للإنتاج بـ(2000) وحدة/مل (حليم، 1966).

[illegible] التغيير [illegible]

[illegible] تأثير كبير [illegible]

[illegible] في أزمة Shantung [illegible]

[illegible] الأمريكية [illegible]

[illegible] خارجية

التربية على نطاق صناعي للأحياء المصنعة للبنسلين:

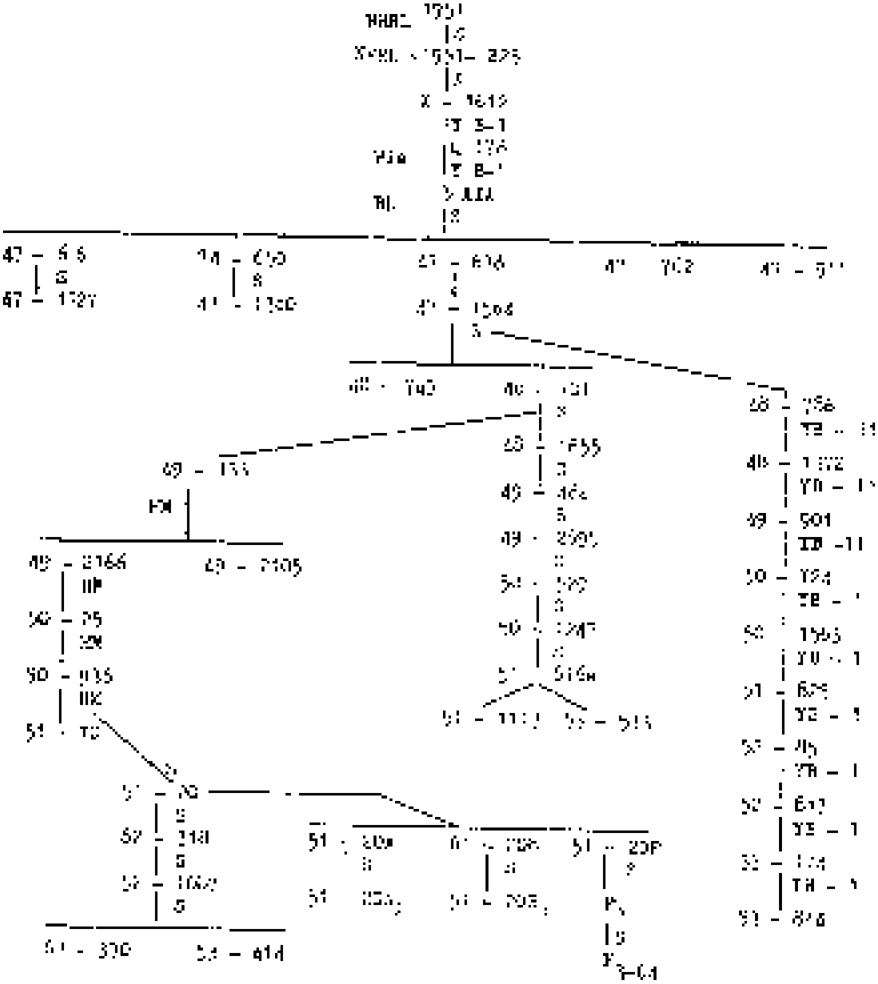
إن الأوساط الغذائية للمزارع السطحية لل (P. notatum) تتكون من مكونات بسيطة نسبيا وتكون شبيهة بأوساط جابك-دوكس. وبالتجارب تم معرفة دور سكر اللاكتوز لهذه الأوساط بحيث يساعد في نمو وتطور المزرعة أكثر نتيجة لبنائها البطيء الذي يحتاجه المصدر الكربوهيدراتي بشكل أكثر توازنا.

كذلك إن إضافة المصادر النيتروجينية إلى الوسط الغذائي هو الآخر فمثلا إضافة الكازين المتحلل. مستخلص الخمائر، مستخلص الذرة الصفراء، مستخلص المحاصيل الزيتية-القطن، الفستق، الفول...الخ يزيد من إنتاج البنسلين، كذلك دور مستخلص الذرة مثلا له دور آخر حيث يؤدي إلى المساعدة في تكوين حامض (phenylacetic acid) الذي يعتبر كوحدة أساسية لتأليف (benzel penicillin).

لذا فإن انتقاء وتركيب الوسط الغذائي لمرحلة إنتاجية هو مسألة ضرورية وفي غاية الأهمية. فبالرغم من أن سر تركيب هذه الأوساط أصبح احتكارا للشركات المنتجة، إلا أن تركيبها العام أصبح الآن واحدا نسبيا.

شكل (44): الروابط الوراثية لضروب عائلة (وسكونسن)

P. chrysogenum من فاسك وستافر (1955)



ففي عام (1947) جارنس وجوكسون اقترحا الوسط الحساوي على اللاكتوز والأملاح المعدنية ولاكتات الأمونيوم واستات الأمونيوم و(phenylacetic acid) أما كالم وهوكنسيون (1947) فقد اقترحا فعالية مستخلص الذرة. والجدول التالي يوضح أهمية دور مستخلص الذرة.

جدول (10): يبين التركيب الكيماوي المحدد للأوساط الغذائية مع مستخلص الذرة لإنتاج بنسلين (Hochenhull 1956)

الوسط	% المواد المضافة	% المواد المضافة
	الوسط مع مستخلص الذرة C.S.L	وسط هوسكنهول وكالم
الكربوهيدرات الرئيسية	3.0 -4.0 لاكتوز	3.0 لاكتوز
كربوهيدرات أخرى	صفر-0.5 جلوكوز	1.0 جلوكوز
	سكريات مختزلة (بولي سكريات)	1.5 نشا
أحماض عضوية	0.05 خل	0.25 خل
	0.50 لاكتيك	1.0 لاكتيك
حوامض خاصة	مثيل اثيل امين وغيرها	phenylacetic acid 0.05
مصادر نتروجينية رئيسية	أحماض أمينية، ببتيدات	0.5 سلفات الأمونيوم
مصادر نتروجينية أخرى	أمونياك	0.3 اثيل أمين
نتروجين عام	0.8 -0.9	0.5

ولأجل موازنة (pH) يضاف كميات من كربونات الكالسيوم (CaCO3) بحدود (0.05%) إلى الوسط الغذائي حيث أن دورها مع الفوسفات اللاعضوية في الوسط

تؤدي وظيفة (Buffer system) ولكن تأثيرها مؤقت حيث أن الأنظمة البفرية تكون معقدة وتعتمد على الكاتيونات (Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}, NH_4^+)، وكذلك على الأيونات (PO_4^{-3}) وكذلك على دور العوامل الحامضية كاللاكتات والاستات، وعلى المنتجات الوسطية نتيجة الميتابولزم، لذا يجب أن يكون (pH) بحدود (6.8–7.4).

وقد تضاف الزيوت النباتية والحيوانية إلى الوسط الغذائي ليس فقط كمواد مانعة ولكن كمصادر كربونية وللطاقة. ونتيجة لذلك فقد ارتفع الإنتاج (بيرسان 1949، كورسورت 1951) وقد ثبت أن تأثير هذه الزيوت يعود إلى استرات الحوامض الدهنية. كذلك فإن العامل المثالي المؤثر على الإنتاج هو لزوم وجود سلاسل كربونية ذات (14) ذرة علما بأن (oxidation) له دور كبير في حالة الحوامض الدهنية المتواجدة في الطبيعة وخصوصا (C14-16) وكذلك أثبتت التجارب بأن التراكيز القليلة للثايوسلفات (Thiosulfate) تلائم التخليق الحيوي للبنسلين حيث تحدد سمية الحامل (phenyl acetic acid) للطحالب (هوسكنهون وآخرون 1953).

وعموما فإن تركيب الوسط الإنتاجي المميز هو الآتي:-

لاكتوز	3-5 %	KH_2PO_4	0.4 %
جلوكوز	1 %	الدهون النباتية والحيوانية	0.25 %
مستخلص الذرة (مادة جافة)	3-5 %	pH	6
كربونات الكالسيوم	1 %		

تحضير اللقاح والمزارع الإنتاجية:

يتم تحضير اللقاح في دورق حجم (500) مل يحتوي على (100) مل وسط غذائي وتوضع فيه (2.5 %) كونيدات منتشرة (Suspention) من السلالة (P. chrysogenum) والنامية في الوسط الحاوي على (2.5%) كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) الملائم لتكوين الأسبورات والمحضونة عند درجة حرارة (25 م) في حاضن هزاز وعند (250) دورة/دقيقة.

وفي نهاية الطور اللوغاريتمي بعد فترة حضن أربعة أيام تنقل المزرعة إلى دورق ذي حجم أربع لترات والحاوية على (2) لتر وسط، ويتم الحضن بنفس الظروف لمدة يومين في حاضن هزاز، وتتم أيضا عملية نقل المزرعة الجديدة إلى مخمر (Fermenter) حجم (800) لتر والحاوي على وسط (500) لتر، ويكون المخمر معمولا من صلب غير قابل للصدأ ومجهزا بأجهزة تهوية وتحريك ومنظما لدرجات الحرارة النموذجية (مثالية).

ويستمر التحضين لمدة ثلاثة أيام ثم تنقل محتويات هذه المزرعة والتي هي في طور النمو (expotentional phase) إلى مخمر ثان حيث تتم التربية فيه بنفس الشروط. وتتم عملية تلقيح الفرمنتورات الثانية بنسبة (%10) (من اللقاح). وإن الوسط الغذائي لتحضير اللقاح ولتحضير المخمرات الإنتاجية متشابهة، إلا أن المخمرات الإنتاجية تحتوي على سكر اللاكتوز بنسبة (2-%3) بدلا من السكر الاعتيادي.

والمخمر (الفرمنتور) الإنتاجي يكون بحجم (50م3) ويحتوي على وسط غذائي بحجم (30م3) ومجهز بأجهزة تهوية وتحريك، وضبط الـ(pH) بواسطة القواعد والحوامض ومانع الرغوة. علما بأن الوسط الغذائي يكون معقما مع (phenyl acetic acid) والعملية الإنتاجية تستمر لمدة (6-9) أيام، وخلال هذه المدة يتراكم البنسلين في الوسط.

العملية الميكروبيولوجية المحددة لإنتاج البنسلين:

إن عملية تحضير البنسلين تتضمن ثلاثة أطوار وهي:-

1. طور النمو (Growth phase).
2. طور النضوج (Ripping phase) خلاله يتراكم الجزء الأكبر من البنسلين.
3. طور التعتيق (Aging phase).

ففي وقت طور نمو المايسليم حيث ينمو بسرعة ويهضم الجزء الأكبر من المركبات النيتروجينية المعقدة وكذلك قسما من المصادر الكربوهيدراتية أيضا

وتراكم الأمونياك، كذلك فإن حامض الخليك هو الآخر يختفي بسرعة حتـــى ولـو كانت كمياته قليلة، وفي هذه الحالة ينضب (20%) من اللاكتوز (هــــانك وآخـرون 1958).

أما (pH) الوسط فيرتفع إلى (7.5)، وفي هذه الفترة يتكون الجزء الأكبـــر مــن المايسليم.

أما الطور الثاني طور النضوج (Ripping phase) الذي يبدأ بحـــدود الســاعة (48–60) من عملية الحضن عندما ينتهي تقريبا الطور الأول حيث يهضم بســرعة سكر اللاكتوز، والأمونياك اللازم لتأليف المايسليم.

ولأجل عملية تأليف البنسلين فاللاكتات عادة لا تهضم طالما أن السكر موجــود في الوسط.

تطور النضوج هو أساس التخليق الحيوي للبنسلين، ومن المهم جدا فــــي هــذا الطور أن يكون (pH) (7) لأنه في حالة (pH) فوق (7.5) وبوجود أملاح الأمونيــا فإن البنسلين المتكون ينهدم بسرعة، وكذلك يجب السيطرة علـــى درجــة حـرارة الطور بحدود (25 م) (± 0.5 م) (وأن وجونسون 1955).

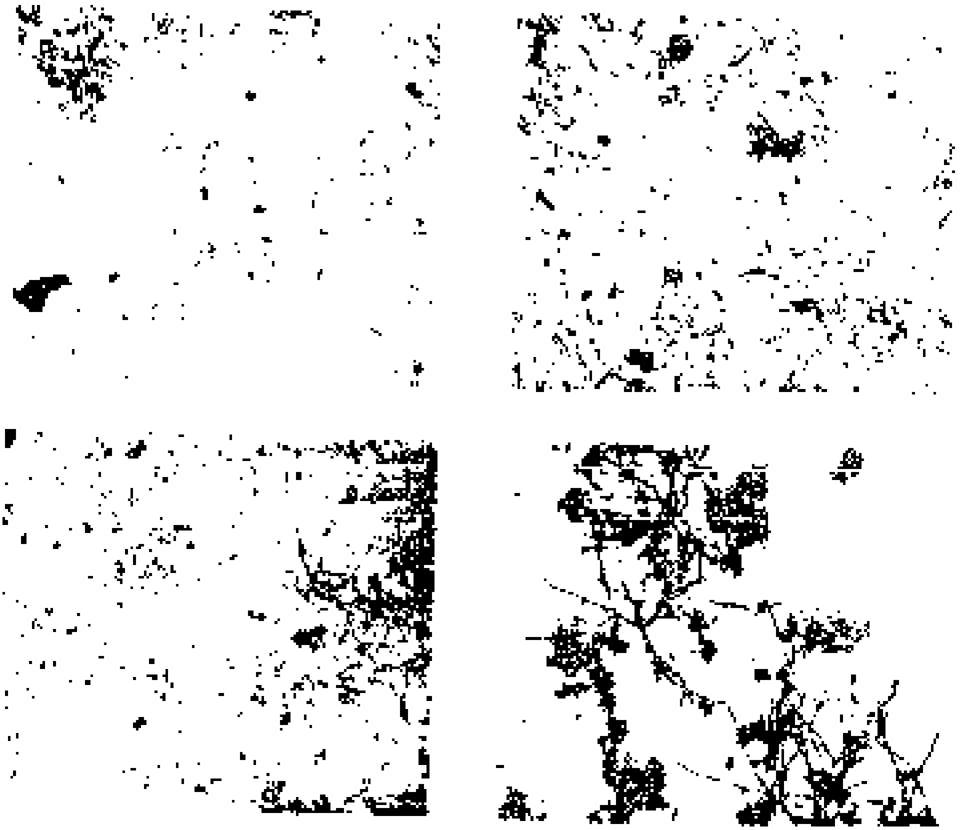
أما الطور الثالث وهو طور التعتيق (Aging phase) ليست له أهمية كبيرة، لأنه عند الظروف الإنتاجية فإن البنسلين يجمع قبل حلول هذا الطـــور، وفـــي الجـــدول التالي نرى تشخيص الأطوار الثلاثة:-

جدول (11): يبين المتغيرات المصيرة للأطوار الثلاثة لتكوين البنسلين

(كلوفلر وآخرون 1945 Koffler & etal)

	الطور الأول النمو	الطور الثاني النضوج	الطور الثالث تعتيق
إنتاج البنسلين	ضعيف	الإنتاج الأعظم	تراكم
PH	بسرعة يرتفع	ثابت أو يقل قليلا	-
المايسليوم	ينمو بسرعة وذو محتوى N عال	النمو بطيء ذو محتوى N قليل	انخفاض N في المواد الصلبة الجافة
اللاكتوز	يستهلك ببطء	بسرعة يستهلك	ينضب
اللاكتيك	ينضب بسرعة		--
الأمونيا	يتحرر في الوسط	يستعمل	يتحرر في الوسط
النترات	يستعمل ببطء	يستعمل ببطء	يستعمل ببطء وينضب
N-الأموني	يستعمل بشدة	تركيزه ثابت	تركيزه يزداد
الفوسفات اللاعضوية	يستعمل بحده الأقصى وببطء	يستعمل ببطء	لا يستعمل ويتحرر
Q02(N	حده الأعظم	ينخفض	إلى حده الأدنى

أما بالنسبة إلى (الخيوف ونوري ١٩٧٣) فقد حددا أطوار الإنتاج بثلاثة أطوار للفطر (P. chrysogenum) تبعاً للتغيرات المورفولوجية الموضحة (شكل ٤٤).



شكل (45): (Penicilium chrysogenum)

ويتضمن **الطور الأول** (first phase) نمو الكونيدات وتكوين فجوات صغيرة من السايتوبلازم وتحتوي على قليل من الفقاعات والمحتوية في بعض الأحيان على حبيبات.

الطور الثاني: يتضمن نمو المايسليوم وبروتوبلازمها (Basophilic) والحبيبات تختفي تدريجيا، وفي نهاية الطور تتكون قطرات دهنية.

الطور الثالث: يتضمن تكوين قطرات كبيرة من الدهون وبدنية (Citrophilic protoplasm).

الطور الرابع: يتضمن هذا الطور بأن تكون الفقاعات مع الحبيبات الدهنية بشكل قطرات صغيرة وواضحة وأضعف مما كانت عليه في الطور الثالث (Basophilic protoplasm).

الطور الخامس: في هذا الطور تبقى الخلايا منتفخة بالفراغات المركزية الكبيرة والتي تحتوي على حبيبة أو عدة حبيبات كبيرة ولا توجد القطرات الزيتية.

الطور السادس: تكون الخلايا منتفخة في هذا الطور وتكثفها بدون حبيبات والفراغات المركزية كبيرة، ولا يوجد حبيبات زيتية حيث تستقيم بعض النهايات ذات التركيب الزيتي. وتبدأ مرحلة التفسخ.

التغيرات الكيموحيوية أثناء التربية:

إن الكثير من خصائص الأوساط الغذائية تكون مرتبطة بطبيعة البنسلين إذ السلالات الجينية ووجود كمية كبيرة من الفوسفات والذي هو ضروري للحصول على درجة عالية من (phosphoglyceraldehyde phosphologyceric acid) مع تراكم البايروفات، وزيادة كمية الفوسفات الكبيرة يضغط على تجميع منتجات

السكريات المتفسفرة ويزيد من تكوين (ATP) حيث يعطي الجو الملائم لاستعمال السكريات والتي تكون المنتجات الحامضية من البايروفات والتي قد تثبط العملية بعدم وجود السكريات، لذا يضاف اللاكتوز الذي يهضم ببطء. وكمية البايروفات ضرورية لتخليق الفالين (Valine). ويمكن توجيهه إلى (acetate) ومع التجميع لتكوين (Aceto acetate) وحوامض دهنية أو بواسطة أكسدته عن طريق (دورة الحوامض الثلاثية الكربون).

إن تكوين (acetal-CoA) والحوامض الدهنية يمكن أن يضغط عن طريق جلب الأحماض العضوية في الوسط، وبذلك يمكن أن يوضح أو يفسر تأثير الدهون لزيادة تأليف البنسلين.

إن ظروف عملية التربية وخصوصاً الاختزال العالي الذاتي (يكفي لغرض أكسدة اللاكتات) وإن وجود أيونات الأمونيوم عالية، وخلال الطور الثاني يساعد عمليات الاختزال لل (α-Ketoglutarat) إلى (L-glutamic acid) ويظهر منها تحديد التأثير على دورة السترات (كرب سايكل) بسبب انعدام (C4) حيث أن المنتوجات الوسطية أو البينية عند مثل هذه الظروف يجب أن تقلل الأكسدة لل(Acetyl-CoA) بواسطة دورة السترات والتي عندها يدرس تحويل البايروفات إلى (α-acetic lactat) التي هي من المركبات الوسطية لتخليق (Valine).

التخليق المتعدد للبنسلين (Polysynthsis of Penicillin):

إن التخليق المتعدد للبنسلين يلزم وجوب (6-amino penicillic-) والتي يمكن أن يكون.

أما إذا كان الغرض لأسباب صيدلانية (عقاقير) فإنه يسحب من المزرعة عن طريق الاستخلاص بواسطة (n-butanol) ومن ثم تجرى عليه عملية غسل بنفس الطريقة. وغالبا ما يستعمل الباسترين الحاوي على الزنك كمنتوج عالي الفعالية وقابليته مرتفعة عند الحفظ. وجدول رقم (12) يبين بعض الخصائص النوعية للعمليات الميكروبيولوجية لتحضير الباسترين.

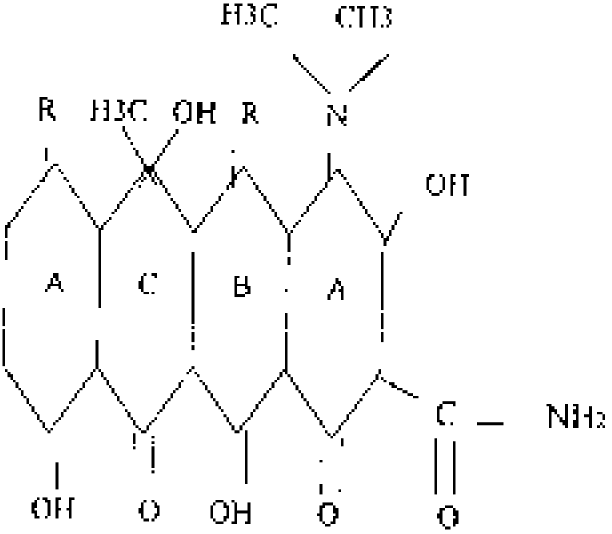
جدول رقم (12): يوضح بعض الخصائص النوعية لتحضير الباسترين

الباسترين وحدة/مل	مدة الحضن	طرق التهوية	مكونات الوسط
26−10	(3-5) يوم	على سطح المزرعة	تربتون، مستخلص اللحم Broth
88	(7) يوم	على سطح المزرعة	طحين الصويا، نشا، لاكتات الكالسيوم
90−30	(26) ساعة	تربية عميقة	طحين الصويا، لاكتات الكالسيوم، $CaCO_3$، دكستران
125	(24) ساعة	تربية عميقة	طحين الصويا، طحين بذور القطن، $CaCO_3$، دكستران
325	(24) ساعة	تربية عميقة	طحين الصويا، نشا، $CaCO_3$

الوحدة الواحدة: هي كمية الباسترين الذي في حالة تخفيفه بنسبة (1:1024) يثبط النمو لمجموعة خاصة هي (Streptococcus) وعند ظروف معينة.

التتراسايكلين :

المضادات الحيوية التتراسايكلينية تشكل أو تكون مجموعة متقاربة جنسيا وهي ذات تأثير واسع وذو أهمية صناعية عظيمة ولها التركيب العام التالي:-



تتراسايكلين (R1، R2=H)

أوكسي تتراسايكلين (تراماسين) =(R1=H، R2=OH) -

كلوروتتراسايكلين (أورمايسين)=(R1=Cl، R2=H)

بروموتتراسايكلين R1=Br، R2=H

الذرات الكربونية (asemetric) والتتراسايكلينات يمتلك عمودا عاما هو (Hydro Naphtazenic) وهي فعالة (invivo) ضد الكثير من الأحياء المجهرية الـ-G (g+ve، G-ve) وضد بعض الركتسيا المرضية والكثير من الفايروسات وتأثيرها قبل كل شيء

(Bacterostatic)، ولكن عند التراكيز العالية يكــــون (Bacterocide) وعـدا ذلــك فالكلورتتراسايكلين والأوكسي تتراسايكلين لها القابلية على تنشيــط نمــو النباتـــات، الطيور، الخنازير، ولذلك وجد لها بعض التطبيقات في المخاليط الغذائية.

وفي عام (1948) تمكن داكر من عزل السلالة (*Streptomyces aureofaciens*) من التربة والتي لها القابلية على تأليف الكلورتتراسايكلين. وبعد سنة مـــن العمــل المتواصل استطاع (فاتيلي وآخرون 1950) من عزل (Streptomyces rimosus) من التربة والتي لها القابلية على تأليف أوكسي تتراسايكلين. وخـــلال العشـــرين ســنة الأخيرة تم عزل العديد من الخطوط من (Streptomyces sp.) المؤلفة للمضـــادات. والجدول التالي يوضح الأحياء المصنعة للتتراسايكلين.

جدول رقم (13): يوضح مصنعات التتراسايكلين (O.TC, TC, Cl. TC)

	O.TC	TC	الأحياء المجهرية
كتومايتسين O.TC	TC	Cl TC	*Streptomyces albofavus*
O.TC	TC	-	*Streptomyces antibioticus*
-	TC	Cl TC	*Streptomyces aureofaciens*

- *Streptomyces* Califernicus - TC - *Streptomyces* aureus

Streptomyces اكتومايتسين O.TC - - *Streptomyces cellulosae* كتومايتسين TC

Streptomyces O.TC TC Cl TC *Streptomyces flavus* O.TC TC - *flaveolus*

O.TC - - *fuscofaciens*

وتحضيره أسهل بطريق كيماوي. ونتيجة الدراسات تم الكشف عن عـــدد كبــير من المواد المتعددة لتخليق البنسلين (-6-Amino Penicillic acid) الـــذي يمكــن أن يحضر بواسطة تهايم (Degradation) لل (Penicillin G) مــن الأنزيــم (Benzel

وهذه الإنزيمات يمكن أن تحضر (Penicillin-Amidase) Penicillin-Acetalase) من الأنواع البكترية المنتجة لصبغة كرام الأعفان، الخمائر، والجدول التالي يوضح الأحياء المنتجة للبنسلين.

جدول رقم (14) يوضح الخطوط المكتشفة لإنتاج

بنسلين أميديز (Penicillin Amidase)

نوع الأحياء المجهرية	الأحياء التي تؤلف
البكتريا	Pseudomenas, Xanthomonas, Alcaligenus, Flavobacterium, Escherichia, Aerobacter, Erwina, Serratia, Protus, Bordetella, Micrococcus, Sarcina, Corynebacteriem, Cellomonas, Nocardia, Bacillus
الفطريات والطحالب	Alternaria, Aspergillus, Epicoccum, Fasarium, Mucor, Penicillium, Phoma, Trichoderma.
الخمائر	Cryptococcus, Saccharomyces, Trichosporon
الإكتنوماستس	Streptomyces.

سافيلوسبورين (Cephalosporium):-

السافيلوسبورين مضاد حيوي من أنواع البنسلين، وينتج من النوع (Cephalosporium sp)، حيث هناك مجموعتان هما (Cephalosporium-N) و (Cephalosporium C) حيث مجموعة (Cephalosporium C) هي حيوية ضد (Streptococcus) وضد بعض أنواع (Bacillus g-ve).

أما سافيلوسبورين (N) فهو حيوي ضد (Salmonella)، أما الطرق التصنيعية لها فهي مشابهة في عدة نواح للتي تستعمل في تحضير البنسلين (Polysynthesis of Antibiotics Bacteria).

التأليف الحيوي للمضادات من البكتريا:

المضادات الحيوية شبه ببتيدية من أصل بكتري:

تنسب إلى هذه المجموعة المضادات الحيوية الباسلاثية مثل كرامسين، بولي ميكسين، اتايروساندين.

المجموعة الباسلاثية (Bacillis group):

السلالة الرئيسية والمصنعة للباسترين عزلت من الطبيعة وكانت السلالة من نوع ال(Bacillis subtilis) ولكن بعد الاكتشافات تم إنتاجها من *(B. Licheniformis)* و(B. Licheniformis) حيث تؤلف مجموعة مختلفة من المضادات الحياتية الشبه ببتيدية متجانسة وخاصة الباسترين (G, F3, F2, F1, F, E, D, C, B, A1, A) ومن كل هذه المضادات فقط باسترين (A) له تأثير مضاد للأحياء المجهرية وبشكل عالٍ جداً. ولأجل تحضير الباسترين تجرى التربية العميقة المتقطعة (نظام الدفعة) انكيب (1951) والتي حققت نجاحاً في عدة معامل في أمريكا. وتتم العملية بحفظ السبورات في تربة جافة ومطحونة بدقة. وعند عملية التحضير ينقل إلى دورق حجم (4) لتر مع وسط غذائي ذي محتوى بيتون، (Peptone Broth) وتحضن في

حاضن هزاز عند درجة حرارة (37 م) ولمدة (14–18) ساعة ومن ثم ينقــل هــذا اللقاح إلى مخمر لقاحي (Fermenter) حجم (800) لترا والحاوي على (600) لــتر وسط حيث يتم حضن هذه المحتويات عند درجة حــرارة (37 م) ولمــدة (14–18) ساعة ومن ثم ينقل هذا اللقاح إلى مخمر لقاحي (Fermenter) حجـــم (800) لــتر والحاوي على (600) لتر وسط حيث يتم حضن هذه المحتويات عند درجة حــرارة (37 م) وعند تهوية شديدة ولمدة ستة ســاعات. ثــم ينقــل اللقــاح إلـــى مخمــر (Fermenter) الحاوي على (3000) لتر وسط ذو التركيب التالي:

4 % طحين
0.5 كربونات الكالسيوم
0.5 نشا

والحضن يكون بنفس الظروف كما في المخمر ذو الحجم (800) لــتر واللقــاح يجب أن يكون في طور (expotentional phase) ويستعمل للمخمــر الإنتــاجي ذو الحجم (100م3). الحضن يجري عند (37 م) وتهوية شديدة وتحريك، وفـــي نهايــة عملية الحضن فالوسط يعامل حسب الغرض الذي أنتج منــه الماســترين. فللتغذيــة الحيوان يجب تبخر المزرعة وتجفف وتخلط بالمركزات الغذائية.

الأحياء المجهرية	TC	O.TC	
Streptomyces lusitanus	Cl TC	TC	-
Streptomyces parvus	-	TC	O TC اكتومايثين
Streptomyces platensis	-	-	O.TC
Streptomyces rimosus	-	TC	O TC اكتومايسين

CLTC- كلورتتراسايكلين
TC -تتراسايكلين
OTC -أوكسي تتراسايكلين

وقد تم عزل العديد من السلالات بشكل نقي وخصوصاً:-

S. Fuscofaciens, S. feofaciens, S. aureofaciens

S. rimosus, S. platensis, S. Lusitanus,

S. Viridofaciens, S. Vendargensis, S. sayamaensis

المصنعات للبنسلين والستربتومايسين والتتراسايكلين. ومن خلال العمل الوراثي على السلالة (S. aureofaciens) استطاع (راكس 1954 وداكر 1954) من الحصول على متحور (mutant) والتي لها القابلية على تأليف الكلورتتراسايكلين (SC) مرة أكثر من المزروعة الأصلية. واستطاع (دايون 1950 ومتري 1954 وآخرون 1956) في تربية نفس السلالة في وسط غذائي ذي كمية محدودة من أيون الكلور فأنتجت الكلورتتراسايكلين والتتراسايكلين. والآن ينتج فقط التتراسايكلين في وسط حاوي على الكلوريدات (غورشك وجماعته 1956-1959). ولكن هناك بعض المتحورات الأخرى التي تقل البروميد بدل الكلوريد حيث تنتج بذلك (7-Bromotetracyclin-) (ليت 1957) كذلك بعض المتحورات من نفس السلالة والحاوية على عدد قليل من (Methyl group) فإنها تؤلف (6-dimethyl tetracyclin) (مسكوريك 1959).

الأحياء المجهرية (Microorganism):

لأجل إنتاج الكلورتتراسايكلين على نطاق صناعي يستعمل النوع (Streptomyces aureofaciens Dagger) وخاصة السلالات 11652, 11653, 11654 (12416-C, ATCC) وهذا النوع يكون على سطح الأوساط الغذائية الصلبة مستعمرات عديمة اللون في البداية ولكن بعد يومين أو ثلاثة أيام يتحول اللون إلى قهواني مصفر، والمايسليم الهوائي ذو اللون الأبيض عند تكوين الاسبورات يتلون بلون قهواني أو قهواني رصاصي. والاسبورات تكون دائرية أو بيضوية (عليجية)، والمايسليم يكون ذو سمك (0.7-0.8) ميكرون في المزارع الفتية وتكون المزارع القديمة يكون ذو سمك (1.4-1.6) ميكرون.

النوع (S. aureifaciens) لا يكون على الوسط التصنيفي الأكري (Synthesis Agar media) اسبورات ولكنه يفصل الصبغة القهوائية الصفراء، وفي المستعمرات النامية على الوسط (MPA) لا يكون مايسليم هوائي وتنفصل الصبغة الخضراء المصفرة. ويعزي بعض المؤلفين إلى أن شدة اللون تكون مربوطة بالتصنيف الحيوي للمضاد الحيوي ويمكن أن يستفاد من هذه الصفة كعلامة لعزل السلالات الصناعية.

إن كل السلالات الصناعية من نوع (S. aureifaciens) يمكن أن تستعمل الجلوكوز، السكروز، النشا كمصادر كربونية. أما المصادر النيتروجينية تمكنها من هضم الكثير من الأنواع: الأملاح الأمونية، نترات، كاربامايد ولكن للعمليات الصناعية يفضل وجود طحين، فول الصويا، بذور القطن، مستخلص الذرة،

واعتيادياً إن أفضل السلالات المصنعة هي التي تكون مستعمراتها ضعيفة الأسبورات ولكنها قوية الصبغات، وإن السلالات (S. aureifaciens) يمكن أن تصنف تبعاً لنوعياتهم (قابليتهم على هضم الكلوريدات والبروميدات) حيث بوجود الكلوريدات في الوسط تؤلف بالدرجة الأولى الكلوروتتراسايكلين وكميات قليلة عن التتراسايكلين. وفي غياب الكلوريدات تستعمل البروميدات حيث يكون بروموتتراسايكلين. علماً بأن إذا احتوى الوسط الغذائي أيونات الكلوريد والبروميد في وقت واحد فإن أيونات البروم لا تستعمل لإنتاج بروموتتراسايكلين ولكنها تعمل كمثبط لإنتاج الكلوروتتراسايكلين، ونتيجة لذلك سيكون إنتاج التتراسايكلين هو المنتوج الرئيسي لهذه العملية.

أما الأحياء المجهرية المصنعة للأوكسي تتراسايكلين فهي (S. platensis, S. galvus, S. armillatus, S. griseoflavus, S. rimosus) ولكن للإنتاج الصناعي تستخدم السلالة (S. rimosus).

إن السلالة (S. rimosus) تكون مستعمرات ذات سطوح صفائحية ملساء أو خشنة أو سطوح منحنية ملونة باللون الأصفر والمايسيليوم الهوائي لهذه السلالة له لون بنفسجي رصاصي مميز وهايفاته الهوائية تكون ذات شكل حلزوني أما كونيداته فتكون أسطوانية الشكل تقريباً وذات قياسات (1.4–0.8) × (0.7–0.6) مايكرون ومن الخواص الأخرى لهذه السلالة بأن مستعمراتها في بعض الأحيان تكون مغطاة بأغطية طولية والتي تكون فيها أجزاء المستعمرة ذات شقوق أو انقلاع. إن السلالة (S. rimosus) تنمو بضعف في الوسط (MPA) كذلك أنها تختزل النترات وتميع

الجلاتين بدون أن تكون صبغة كما أنها لا تستعمل السكروز. ولكن المصادر الكربونية لهذه السلالة هي الجلوكوز، اللاكتوز، المالتوز، النشا، الكليسرول، وإن كل السلالات المتحورة من هذا النوع من الأحياء، والعالية الإنتاج، يمكنها من هضم الدهون النباتية مثل زيت فول الصويا أو الفستق، كذلك فإنها تهضم نفس المصادر النيتروجينية.

كما وأن السلالات (S. griseoflavus, S. aureofaceins) تميز أو تختلف عن (S. rimosus) بأنها فوق وسط الجيلاتين تكون صبغة صفراء وتحلل بروتينات الحليب وهايفته الهوائية ليست حلزونية أما السلالة (S. armilarus) فإنها تنمو على الأوساط النباتية وتكون صبغات، كما أن السلالة (S. griseoflavus) والتي تختلف عن السلالة (S. rimosus) بأنها لا تحلل السكوربيك ولا تختزل النيتروجين.

التربية الصناعية للسلالات المنتجة للتتراسايكلين:

إن الأوساط الغذائية لتحضير التتراسايكلينات تكون متشابهة من حيث الجوهر ولكن يجب الأخذ بعين الاعتبار الاحتياجات المميزة للسلالات خصوصاً الإضافات النوعية.

فالسلالة (S. aureofacenes) التي هي منتشرة في أكثر دول العالم تهضم السكروز لتحضير المادة الأسبورية (السبورات) حيث يستعمل الوسط ذو المحتوى التالي:-

0.2 % مستخلص اللحم
1 % جلوكوز

0.05 % اسبارجين

ومصدر فوسفاتي وأملاح معدنية أخرى. أو يحتوي على النسب التالية:-

0.2-0.3 % سكروز
0.1-0.5 % دكستران
0.1-0.2 % مستخلص اللحم

أملاح معدنية و pH (6.8-7.0).

أما الأوساط النوعية لتحضير اللقاح فتحتوي على النسب التالية:-

0.5-1.0 % مستخلص الذرة
0.2 % جلوكوز
0.2 % سلفات الأمونيوم

أملاح معدنية وهنا يمكن أن يستعمل بدل الجلوكوز السكروز أيضا وكذلك يمكن أن يضاف فول الصويا بنسبة (1-2 %) ومولاس (0.2%).

أما الأوساط الإنتاجية فيكون لها التركيب التالي: (وسط فان دونك ودي سومر 1952):-

2.5-3.0 % سكروز
0.2-0.3 % سلفات الأمونيوم
0.4-0.6 % كربونات كالسيوم
1.5-2.0 % طحين الفستق
0.2-0.3 % مستخلص الذرة

0.2 - 0.4 % كلوريد الصوديوم

0.2 % مولاس القصب

أو وسط روكنيفيا وآخرون 1959:

50 % مستخلص الذرة 1% مادة جافة

0.5 % نترات الأمونيوم

0.2 % كلوريد الصوديوم

0.4 % كربونات الكالسيوم

2 % نشا

pH= 6.6 – 6.8

وقد أمكن إنتاج (1250) ملغم/مل كلورتتراسايكلين من السلالة (S. aurefaciens) من وسط يحتوي على سكروز، طحين الفستق، مستخلص الذرة، المولاس، سلفات الأمونيوم، كربونات الكالسيوم، نترات الصوديوم. وقد أمكن تحضير (1000) ملغم/مل أوكسي تتراسايكلين (ريكنا وآخرون 1951 وسوين وآخرون 1950)، وقد استطاع ميلاخ (1965) من إنتاج (1500-2000) ملغم/مل تتراسايكلين.

أما الوسط الغذائي المثالي الذي أمكن عقده من تحضير (2500) ملغم/مل كلورتتراسايكلين، فيجب أن يحتوي على: مستخلص الذرة (3%)، نشا (1.5 - 8%)، $CaCO_3$ (0.9%)، $(NH_4)_2SO_4$ (0.33%)، NH_4Cl (0.1%)، $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

(0.2%)، $FeSO_4.4H_2O$ (0.005)، $ZnSO_4.8H_2O$ (0.01%)، $CoCl_2.6H_2O$ (0.0005)، دهن خنزير (0.5–1.0%).

(دهن خنزير يضاف بين وقت وآخر)، ويجب أن تكون حموضة الوسط الغذائي (pH) ما بين (6.6–6.8) قبل التعقيم لكي نحصل بعد ذلك على (pH) (7).

من المصادر الكربونية التي تهضم بشكل جيد هي السكريات الأحادية والثنائية والنشا والدكسترين. كما وأن استعمال طحين الذرة والقمح قد أعطى نتائج جيدة. كما أن الدهون المستعملة كمواد مضادة ضد الرغوة وبتركيز (3–4%) يمكن أن تكون مصادر كربونية أيضاً (أورتونو 1961، زاليفا 1961). حيث أعطى الوسط المؤلف من دهن خنزير ودهن فول الصويا وزيت الخروع إضافة إلى المواد الأخرى كمية جيدة من التتراسايكلين (كورنيلس وآخرون 1955). أما المصادر النيتروجينية المستعملة في التربية أملاح الأمونيوم، بولي بيبتايد، بروتينات، الأحماض الأمينية، مستخلص الذرة، طحين الصويا، كلوتين وغيرها. ويمكن الاستفادة من المصادر الخام كمصادر فوسفورية ومعدنية بنفس الوقت، حيث أن تركيز الفوسفور في الوسط له أهمية كبيرة في عملية التخليق الحيوي للتتراسايكلين.

فال(KH_2PO_4) وبتركيز (0.03%) يخفض من تحضير الكلورتتراسايكلين إلى النصف. أما (Benzel thiosulfate) وبتركيز (0.0004%) يؤثر تأثيراً جيداً على إنتاج الكلورتتراسايكلين حيث يفترض أن يلائم طور غير معروف لحد الآن في التخليق الحيوي للكلورتتراسايكلين.

أملاح الكالسيوم والمغنيسيوم لها وظيفة مزدوجة حيث أن أيوناتها هي من العوامل الضابطة للحموضة (pH)، وكذلك يقلل من سمية المضاد الحيوي. كما هو معلوم حيث أن الكميات المثلية من الكلورتتراسايكلين بحدود (100)ملغم/لتر تعمل على تقليل بتنفس مزرعة عمرها (10) ساعات وبحوالي (73%) وعملية التثبيط هذه يمكن معادلتها بسحب أيونات المواد العطرية وإضافة أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم.

درجة الحرارة:

إن الدرجة الحرارية المثلى للسلالات تختلف حسب نوع السلالة. فالسلالة (S. aureofaciens ATCC 11652) يكون نموها أفضل عند درجة حرارة (28°م)، أما السلالة (S. aureofaciens ATCC 12416) فيكون أفضل درجة لنموها هي (30–33°م) وعموماً فالدرجة الحرارية المفضلة تكون ما بين (27–28°م) للأحياء المجهرية المختلفة للمضادات الحيوية.

التهوية:

عموماً يكون إنتاج المضادات الحيوية من الأحياء المجهرية الهوائية، لهذا فإن تموين المزرعة الإنتاجية في وقت العمليات الإنتاجية بالأوكسجين الكافي يكون من الخواص الضرورية.

كذلك يجب أن نعلم بأن السلالة (S. aureofaciens) حساسة جداً تجاه قلة الأوكسجين.

تحضير المادة اللقاحية:

المزرعة الاسبورية (البوغية) ← المزرعة الزرعمية الأمية ← ← تلقيح المزرعة اللقاحية ← النامية على وسط النشا سلفات الأمونيوم ← المخمرات ذات الوسط مستخلص الذرة، كربونات الكالسيوم، كلوريد الصوديوم، و(pH) (6.8-7.0).

المزرعة الزرعمية والمزرعة اللقاحية تحضن في الحاضن الهزاز وعند سرعة (200-250) دورة/دقيقة وعند درجة الحرارة (27-28°م) وفترة (48-72) ساعة. أما المزرعة الإنتاجية فتزرع بنسبة لقاح (5-10%) للقاح وتجري عملية الحضن عند درجة حرارة (27-28°م) مع تهوية (0.77) دورة/دقيقة للأوكسي تتراسايكلين. علماً بأن وقت التربية وتحضير اللقاح يختلف حسب السلالة المستعملة.

المضادات الحيوية الجلوكوزيدية والمتعددة التسكر:

إن أهم مثل لهذه المجموعة هو الـ(Streptomycin) الذي أكتشف من قبل (فاكسمان 1944) كناتج لل(Streptomyces griseuc).

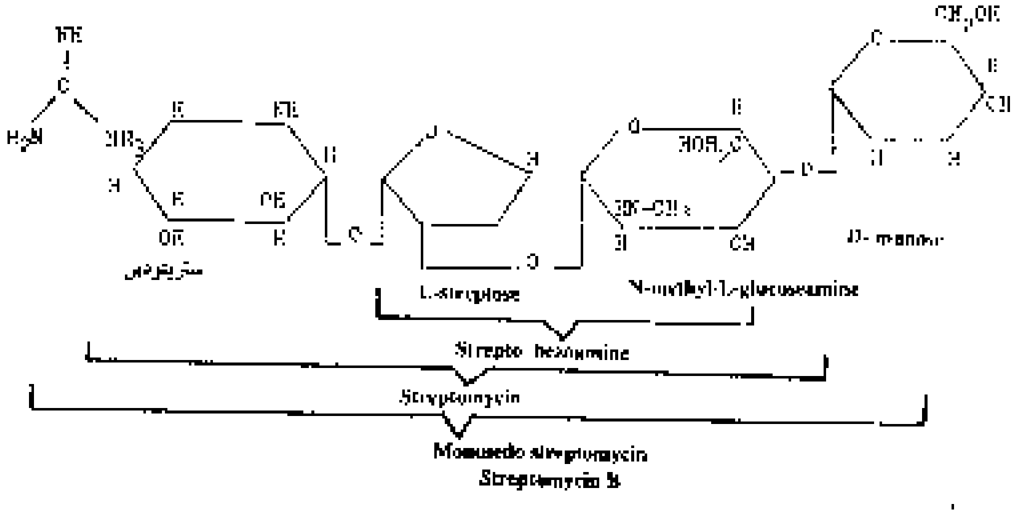
الستربتومايسين (Streptomycin):

الستربتومايسين يظهر كمادة فعالة ضد مرض السل كذلك له تطبيقات واسعة ضد بعض أمراض النباتات. علماً بأن الستربتومايسين و(Manozide

(Streptomycin وجلوكوزيد الستربيتودين (شكل 4) الكلوكونـــــات، الســتربتونين، يكون مربوطاً بأصرة 5 (α-glucoside) مع مادة سكرية (sugar methylation).

(L. streptose) التي تكون أصــرة (aglucoside N-methyl-L-glucoseamine).

وهكذا فالجزيئة المخصصة الستربتومايسين يمكن أن ترتبـط بواســطة أصــرة (α-glucoside) ب(D-mannose) وتكون (mannosedo streptomycin). وعند تكثيـــف باقي ال(streptoside) بواسطة تكوين مجموعات كحولية أوليــة يمكــن أن تكــون مضادات حيوية متجانسة وان تكثف مجموعة المثيل تؤدي إلى تكوين هيدروكســـي ستربتومايسين. أما اختزال مجموعة الالديهايد فتؤدي إلـــى تكويــن هيدروكســي ستروبتومايسين أيضاً.



شكل (46): يوضح تركيب الستربتومايسين والمانوزيد ستربتومايسين

الأحياء المجهرية:

لأجل التخليق الحيوي للستربتومايسين تستعمل السلالات ذات الإنتاجية العالية. ويستعمل لأجل ذلك (S. griseus)؛ والأكتينومايسيس (actinomyces, globisporus) فعند تربية (S. griseus) فوق الأوساط الغذائية الصلبة تكون مستعمرات ذات سطوح ملساء أو خشنة والتي تكون في البداية عديمة اللون تقريباً بعد ذلك تتخذ لوناً ذهبياً أزرق مصفراً أو بنياً قهوائياً حيث يكون مايسليم هوائياً منظوراً جيداً ويمتلك شكلاً غبارياً وملوناً بلون أبيض، أصفر، رصاصي، رصاصي مزرق، هايفاته تصل إلى سمك (0.6-1.0) مايكرون والمايسليم يكون مقسماً الاسبورات تكون على شكل سلاسل ولها شكل دائري إهليجي (صعيفة الانفصالة) ولها قياسات (0.8-0.7×1.0-0.7) مايكرون عند النمو في الأوساط الغذائية يكون طبقة رقيقة والتي في المراحل الأخيرة تتلون باللون الأخضر. وكذلك مايسليم هذا النوع يكون هوائياً وينمو على مرق اللحم الآكري بصورة جيدة ويكون مستعمرات بلون الكريم. والمايسليم يكون لوناً أبيض أو رصاصياً فاتحاً.

هذا النوع من الأحياء يميع الجلاتين، يحلل بروتينات الحليب ويحللها، يحلل السكروز، يختزل النترات. (واكسمان وجماعته: شاتز وبوكي واكسمان 1944) استطاعوا من عزل سلالتين من (S. griseus) والمطابقة مع السلالة التي تم عزلها عام (1915) (واكسمان وكورتس 1916) المزروعة التي عزلت عام (1915) من قبل واكسمان بعد أن تم تثبيت الصفات المحتوية لها وتشخيصها لم تظهر أي فعالية مضادة ولها مقاومة للضوء (رايني 1947). وعند تثبيت (ISI) المطلية بواسطة

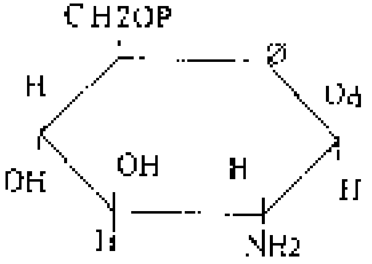
الأشعة فوق البنفسجية (كلنر 1949) نحج حيث حصل على سلالة متحــورة تنتـج (Sterptomycin).

(S. ramosus) نوع منتشر هو الآخر في الطبيعة وتوجد عليه دراســات كثيـرة لإنتاج (Sterptomycin) (ريفر 1952).

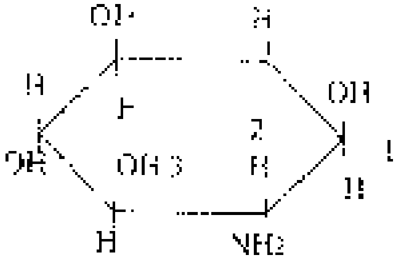
أما السلالة (Sterptomyces Griseocarnus) كما أشــار (كــارندي 1951) فإنــها تولف أوكسي تتراسايكلين على وسط (MPA) حيث يكون مستعمرات بلون الكريــم وبدون مايسليم هوائي مع صبغة صفراء فهوائية فاتحة قابلة للذوبان. أما إذا زرعت على وسط تأليفي فإن نموها يكون ضعيفاً ويكون نمو المايسليم هوائياً ويكون أبيض اللون كما أنه لا يكون أسبورات. وكذلك لا يكون الصبغات، ويحلل الجلاتين، يحلـل الببتون، ولكنه لا يخثر الحليب ولكنه يحلل النشا ولا يختزل النترات وهايفاته ليست حلزونية.

العوامل المؤثرة على تخليق الستربتومايسين:

كما هو معلوم في الستربتوزين والستربتوزين والتي تعتمد علــى (L-streptose) و (N-methyl-L-glucoseamine). كذلك يعتبر الأرجنيـــن مصــدراً نباتيــاً أيضــاً للستربتوزين حين إن مجموعة (N-methyl) فــي (N-methyl-L-glucoseamine) والتي يتكون بواسطة(N-methylation) وذلك نتيجة مساهمة(streptonic acid) حيث يتكون(glucoseamine-6-phosphate) بواسطة غلق الحلقة حيث يتكــون(manose amine) الذي يأخذ مجموعة الأمين بعد ذلك.



glucose-6-phosphate

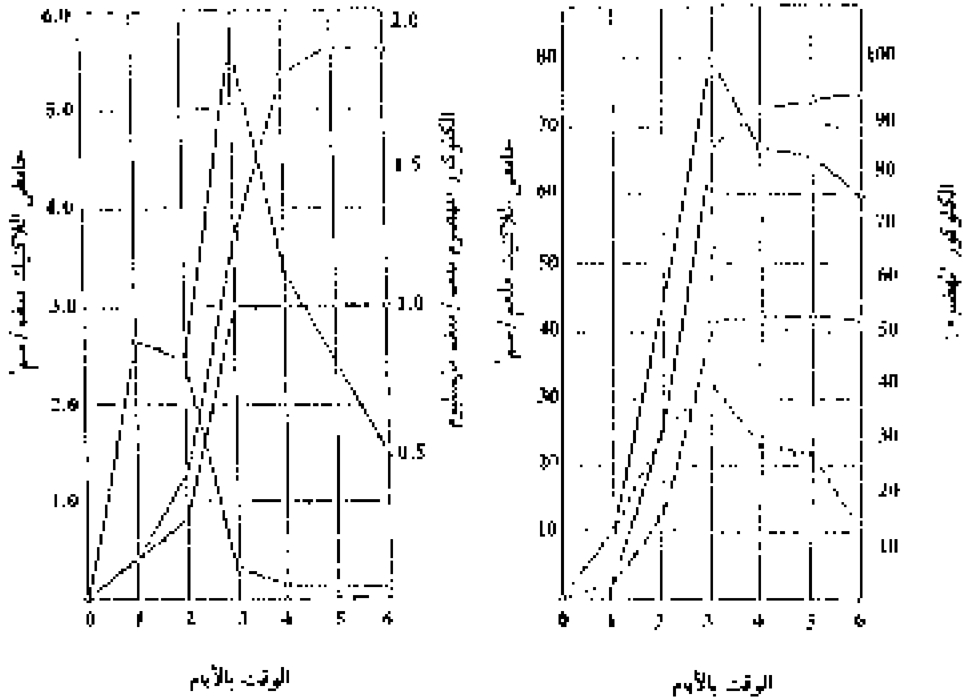


mannose amine

ولم يعرف حتى الآن ماهية التخليق الحيوي لعمود(streptose) والذي مصدره الجلوكوز.

وعموماً فلو أخذنا بعين الاعتبار الأوساط الغذائية المعتمدة للتخليق الحيوي نرى أنها تتركب من أكبر جزء أساسي هـي الجلوكـوز كمصـدر للكربـون للسلالة (streptomyces griseus) وهذا ما يجعلنا ندرس ميتابولزم هذا المصدر لمثل هـذه السلالة والذي يتضمن عمليات هدم الكربوهيدرات (عنك وجماعته 1958) بحضور توسط تتحد أو تتعين في أي سلسلة سيتم هدم الجلوكوز ومهما كانت عملية التهدم فإن الجلوكوز غير المستعمل لتخليـق الستربتومايسـين سـيتحول إلى (Triso-phosphate) الذي بطريق عكسي يتحول إلى (Hexose) ومن هناك تـأتي عمليـة التأكسد من خـلال دورة (Tricarboxylic acid) وفـي حالـة قلـة الأوكسـجين فالبيروفات يمكن أن تختزل إلى لاكتات (فوكسهل وجماعته 1954) وأن التهويـة تؤثر على ميتابولزم الجلوكوز.

فالتهوية الزائدة تقلل سرعة استعمال الجلوكوز من قبل (S. griseus) وتكون اللاكتات (بروفولوميو وجماعته 1950) والعامل المؤثر الآخر هو الفسفور حيث بزيادة الفوسفات يزداد التخليق الحيوي للستربتومايسين من (S. griseus) ولكن عندما ترتفع كمية الفوسفور وفي تركيز معين فالتخليق الحيوي للستربتومايسين سوف يقل بالرغم من أن كمية الكتلة الحيوية ستزداد (واندروف وجماعته 1948).



(A) (B)

شكل (47) يوضح استعمال الجلوكوز وحامض اللاكتيك من قبل السلالة (streptomyces) في وسط غذائي حيث يشير إلى:

(A) إنتاج اللاكتات بصورة لا هوائية (B) إنتاج اللاكتات بصورة هوائية

جدول (15): يبين التغيرات في الأطوار الثلاثة عند نمو

(S. griseus) (Garner وجماعته 1950)

	الطور الأول للنمو النمو	الطور الثاني للنمو النضج	الطور الثالث الهرم
الستربتومايسين	إنتاج ضعيف يرتفع تدريجياً	الإنتاج الأعظم ينخفض ببطء جداً	الكمية لا تزداد ترتفع
المايسليم	ينمو بسرعة الجلوكوز ينصب اعتيادياً	يزداد وزنه تدريجيا ويهضم ببطء	تكسر المايسليوم متحللا الهضم من قبل كل الجسم
الأمونيا	يتحرر في الوسط	يستهلك	يتحرر
الفوسفات اللاعضوية	تتحرر	تستهلك	تتحرر
كمية امتصاص الأوكسجين	عالية	وسط	قليلة

كما أن الزرنيخ أيضاً يظهر تأثيراً مشابهاً. وقد أثبتت التجارب بأن الفوسفات لها تأثير على هدم الجلوكوز وعلى تخليق الستربتومايسين حيث ظهر أن المايسليوم النظيف والمغسول يزداد استهلاكه للأوكسجين وسرعة تهديم الجلوكوز عند إضافة الفوسفور اللاعضوي وإن استرة الفوسفور اللاعضوي تكون على أشدها عند (pH)

(7.6) عندما تكون عملية التنفس على أشدها وهذه الشروط محفزة للتخليق الحيــوي للستربتومايسين (فوكسهون 1954) والجدول التالي يوضح تــأثير الفوســفور علــى إنتاج الستربتومايسين.

جدول (16): يبين تأثير الفوسفور والزرنيخ على إنتاج الستربتومايسين

المواد المضافة	الوقت بالأيام	كمية الستربتومايسين ملغم/مل	pH
ماء (كونترول)	6	1.530	7.10
	–	1.180	7.620

(0.005M)

ــــــــاء 8.06 420 -:! 8.08 510 -:: 8.08 580 -- K2HPO4

(كونـــــترول) 6 1.120 8.28 – 1.020 8.26 – 0.980 8.28 زرســـينات

(زرنيخ) – 645 7.22 – 640 7.62 – 595 7.48

تلقح المزارع المجهرية في وسط غذائي مع الصويا (40)مل وسط فـــي دورق حجم (250)مل وتحضن في حاضن هزاز عنـــد درجـــة حـــرارة (28م) وبثـــلاث مكررات (بوكسر وآخرون 1947، فوكسهن 1957). أما خوتكن هول (1960)فلقـــد أعطى تصوراً للأواصر أو الروابـــط بيـــن تخليـــق الستربتومايســـين ومتطلبـــات الأوكسجين، والجلوكوز، والفوسفات، وعملية الفسفرة تجري كمـــا فـــي المخطـــط التالي:-

الفسفرة الافتراضية للمركبات الوسطية + المستقبل   حامض

Olego sugar streptomycinic acid : PL

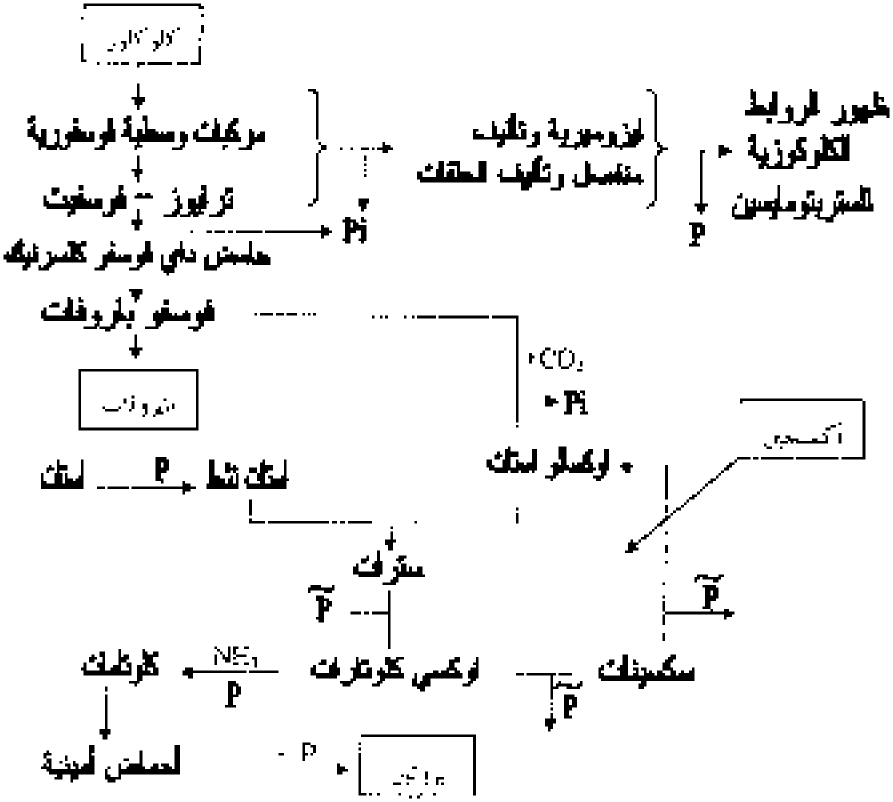
ولأجل التأليف الحيوي يلزم:-

أ- تثبت تركيز منخفض للفوسفات غير العضوية.

ب- أن يوجد الكثير من المركبات الفوسفورية.

ومستوى الفوسفور غير العضوي يمكن أن يضبط عن طريق تركيزه في الخلايا بواسطة تركيز الوسط، حيث عندما يحتوي الوسط أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم فإنها ترسب الفوسفور عند (pH) (7)، ومن الممكن ضمان المستوى المنخفض للفوسفات في الخلايا عندما تحفز عملية الفسفرة المؤكسدة والتي يربط فيها الفوسفات تحت شكل سترات هايدروكربونية أو مركبات أخرى مشابهة. هذه العملية تترك مركبات فوسفورية وسطية كما يوضح ذلك في الشكل رقم (6) حيث تبدو الأواصر تتبادل بين الجلوكوز وتأليف السيتريتومايسين والتروتينات عند (S. griseus)، الهضم اللاحق للجلوكوز تعتمد على ميتابولزم (Triso phosphate) حيث تأثير الفوسفور يظهر في عودة تكثيف المركبات الفوسفورية الوسطية إلى حامض العنيك. وعند التهوية الجيدة سوف يرجع إلى (CO_2) في دورة الحامض الثلاثي الكربون وبهذه الطريقة سيتحول أكثر الفوسفور غير العضوي إلى عضوي، ومن ذلك يفهم أن تجهيز الأوكسجين هو لربط الفوسفور غير العضوي لشكل عضوي هو من أهم العوامل. والعامل الآخر المهم هو تجهيز المزرعة بالكربوهيدرات الكافية لأجل تكوين المركبات الوسطية.

شكل رقم (48) يوضح الروابط التبادلية للكلوكــوز والستربتومايســين والـبروتين عنـد S griseus



لذا فلتأليف الستربتومايسين يلزم: توفير المصدر الأوكسجيني وتركيزات منخفضـة للفوسفور غير العضــوي، وتركيز الجلوكوز والتركيـزات المشـابهة للمـواد النيتروجينية في الوسط والتي تؤدي بالنتيجة إلى التأليف السريع للبروتينـات. بعـد تأليف المايسليوم وإن اختيار مصادر النيتروجين يجب أن يكون بشكل ومـن نـوع (N) المهضوم وأن يكــون تــأليف الـبروتيني سـيكون بطيئاً ونتيجـة ذلـك

فالكربوهيدرات سوف تستعمل في الميسلومات الناضجة لتأليف السبتريتومايسين وليس لتكوين الكتلة الحيوية.

التربي الصناعية للأحياء المصنعة للسبترتيومايسين:

إن التربية الصناعية للسلالة (S. griseus) المصنعــة للسبترتيومايسـين تتـأثر بالعديد من العوامل أهمها هو تركيب الوسط الغذائي. لقد اقترح الكثير من الأوســاط الغذائية للسلالة (S. griseus) حيث تستعمل الكثير مـن المصــادر الكربوهيدراتيـة المختلفة كالفركتوز والجلوكوز والســكريات وهــذه تضمـن أعلــى إنتــاج مـن السبترتيومايسين ومع النمو المرتفع. إن أكثر السلالات تتطلـب أيضـاً مصــادر نيتروجينية، ويجب أن تكون المصادر النيتروجينية المستعملة بشكل متساوي وبــأقل تركيز، وهضمها يجب أن لا يؤدي إلى تغيير كبير في حامضية الوسط الغذائي

ومن ذلك استعمال الأملاح الأمونية للحوامض القوية، وقد اقــترح (واكســمان وهنزس 1945، ودول 1951، وهوكستل 1944 وآخرون) الوسط الغذائي النموذجــي لتحضير السترتيومايسين وهو كالآتي:-

1. طحين فول الصويا (4%).
2. كلوريد الصوديوم (0.25%).
3. كميات متساوية من الفوسفور وقياسية.

التهوية للسلالة (S. griseus) ضرورية وكمية الأوكسجين الممتص يمكــن أن تصل إلى (130) لتر/ساعة/مل من المزرعة (زولاتس برمان 1947) وبالنسبة للحسي

براتولوميو وآخرون (1950) فإن منتوج السبترتومايسين يزداد بزيادة عملية التحريك إلى قيمة محدودة عندما تصبح ثابتة، بزيادة سرعة الدوران. التخليق الحيوي يقل ونفس الشيء يلاحظ عند زيادة سرعة التيار الهوائي. إن توزيع الهواء خلال أو عبر الفلتر المركزي يعطي نتيجة أفضل.

الحرارة و(pH):

السلالات المختلفة لها درجات حرارة مثالية مختلفة. اعتيادياً تستعمل درجات حرارة (24-26°م) ولكن بالنسبة لبعض البحوث فإن أفضل درجات حرارة هي (27-29°م) (روهود وفلتر 1966)، وبالنسبة لإحدى الدراسات للسلالة (S. griseus) أعطى إنتاجاً يقدر ب(1180)ملغم/لتر ولمدة (118) ساعة، وعند درجة حرارة (27°م) أعطى إنتاج (2041) ملغم/لتر لمدة (118) ساعة وعند درجة حرارة (29°م) أعطى إنتاج (2194) ملغم/لتر لمدة (104) ساعة، وعند درجة حرارة (31°م) أعطى إنتاج (414) ملغم/لتر لمدة (72) ساعة، (دولانس 1981)، ومن هنا تم تثبيت درجة حرارة (18.5°م) كدرجة حرارة مثالية. وكل هذه النتائج كانت تحت (pH) (7-8).

المزرعة اللقاحية والإنتاجية:

(Inoculam Culture & Production Culture):

عملية التخليق الحيوي للستربتومايسين في الظروف العميقة للتربية (S. griseus) تتكون من المراحل التالية: إعداد المادة اللقاحية في دوارق هزازة، وفي جهاز حاضن صغير، وفي جهاز لقاحي كبير وفي النهاية التربية الإنتاجية. المادة

اللقاحية في الدوارق، تحضر كوسط غذائي فيها المادة الاسبورية في الحاضن الهزاز وعند درجة حرارة (26-28°م) ثم ينقل إلى جهاز (مخمر) صغير حيث تبقى التربية لمدة (30-70) ساعة بالتهوية والتحريك، ومن ثم ينقل إلى الجهاز الكبير (مخمر) وعند نفس الشروط لمدة (20-40) ساعة – التربية في المخمر الإنتاجي تستمر لمدة (168-192) ساعة.

فعند التربية الإنتاجية لـ(S. griseus) توجد هناك ثلاثة أطوار، الطور الأول يمتاز بالهدم والاستعمال الكبير للمكونات الغذائية في الوسط ونمو المايسيليوم إلى تحضير حجم أقصى. تركيز المكونات الغذائية (P, C, N) يقل، وتحرر الأمونيات والـ(pH) يرتفع من (6.7-7.6) عند نهاية الساعة الساعة –0.02 لامتصاص الأوكسجين يحصل يقدر بـ 52 (QO2D0 150) فتكون بذلك كميات ضئيلة من الستربتومايسين. نمو المايسيليوم يتم بنشر وقت استعمال الجلوكوز، والنيتروجين يمنع الارتفاع الكبير في الحامض (pH) خلال هذا الطور الذي يستمر (48) ساعة.

الطور الثاني:

يتميز الطور الثاني بالهضم البطيء لبقية المواد الغذائية مع التحلل المتأخر للمايسيليوم والذي يتفسخ بعد ذلك، ونتيجة لذلك يتراكم في الوسط الأمونيات والفوسفور غير العضوي ويهبط الأوكسجين إلى الصفر. تأليف (RNA) يتوقف تقريباً والبروتوبلازم تبدأ بالاختلاف. ويظهر تكوين الاسبورات، وإن أهم خصائص هذا الطور هو الارتفاع السريع للستربتومايسين (pH) الوسط يهبط اعتيادياً في اليوم الثالث والرابع إلى (6.7-6.8) حيث في اليوم الخامس يرتفع من جديد إلى (7.7).

خلال الطور الثالث: المايسليوم يبدأ بالانحلال بشدة كما في الجدول رقم (7).

مانوزيد ستربتومايسين (Manosed Streptomycin):

إن المنوزيد ستربتومايسين أو ستربتومايسين (B) له فضلات (D)- مونوزيسة مرتبطة بأصرة α – جلوكــوز وكذلــك بـ(C4) لــل(N-methyl-glucose amine) ويحضر هذا المضاد من تربية (S. griseus) وفعالية هذا المضاد للأحياء المجهريـة تكون واطئة بحدود (20%) من فعاليــة الستربتومايســين. لــذا فالعمليــة تجــرى للمونوزيد ستربتومايسين بحيث (α-manose) لا يرتفع عن (10%) من الحجم العــام في نهاية التربية ويمكن أن يهدم أو يتحول إلى الستربتومايســـين بواسـطة إنزيـم المانوزدايسيز. ويمكن الحصول على هذا الإنزيم بإضافة مئات الخمائر، ومكونـات بعض الأعشاب أو (0.1%) من (α-methyl mannose) وإن هذا الإنزيم غير مستقر (قلق) وبسهولة جداً يثبط. وهنالك الكثير من العوامل التي تؤثر علــى عمــل هــذا الإنزيم وهي:

أ- الفلزات الثقيلة والتهوية غير الكاملة تثبط عمل الإنزيم.

ب- (pH) المثالي لنشاط هو بحدود (8) ولكــن مثــل هــذا الـ(pH) لا يمكــن الحصول عليه إلا في الطور الثالث أي بعد أن تنتهي عملية التخليــق الحيــوي للستربتومايسين.

ج- تركيز سكر جلوكوز فوق (0.5–1.0%) يثبط عمله نهائياً.

د- درجة الحرارة بحدود (32°م) تعمل على نشاط الإنزيم ولكن مثل هذه الدرجــة لا يسمح بها بعد انتهاء التخليق الحيوي للستربتومايسين. حيث الوقت الذي خلاله يجب أن يتم تأليف المانوزيد ستربتومايسين يكون محدوداً جداً لأنه يقـــع بين لحظتيــن

قريبتين وبالذات بين اللحظة التي يقل الجلوكوز فيها تحت (0.5-1.0%) واللحظـــة التي ينتهي بها تأليف البروتينات وبالتالي الإنزيمات.

النيومتسين:

مضاد حيوي صناعي هام آخر هو النيوميتسين والذي تم إنتاجــه مــن الســلالة (*Streptomyces fradiae*) (واكسمان ولبد 1949) وفي هذا المضاد الحيوي المعقــد والمركب توجد ثلاثة مضادات حيوية متجانسة هي نيومتســين (C, B,A)، ولكــن الإنتاج في المصانع الكبيرة يوجد بشكل رئيسي النيومتسين (B). والــذي يحضــر صناعياً من (*Streptomyces fradiae*)، ويمكن كذلك أن يؤلف مــن (*Streptomyces albogriseolus*) السلالة (*Streptomyces fradiae*) تكون هايفات ملساء للمايســليم الهوائي. فعند النمو في الوسط التاليي يكون مستعمرات ملساء عديمة اللــون مــع مايسليوم هوائي وردي، وعلى (MPA) المستعمرات تكون صفـــراء أو برتقاليــة، ويذوب الجلاتين ويحلل البيتون الحليب ويختزل ويحلل النشا ولا يختزل النترات.

(*S. fradiae*) تنمو جيداً في الوسط ذي المصادر النيتروجينية المعدنيـــة كذلــك الحاوية على مستخلص الذرة، مستخلص اللحم، بيتون الكــازين المحلــل، طحيــن الصويا، وغيرها. ولكن استعمال مختلف المصـــادر الكربونيـــة – كربوهيدرات، كحولات، أحماض عضوية، دهون.

تحضير اللقاح والمزارع الإنتاجية:

المزارع اللقاحية يتم تحضيرها في بوارق لقاحية بواسطة المـــزارع الرحميـــة (الأم) (mother culture) وبنسبة (5%) وهذا اللقاح بنسبة (0.2-1.0%) ينقل إلـــى

مخمر للقاحي ولهذه المزارع تستعمل أوساط حاوية على طحين الصويا، المكوربيال، سلفات الأمونيوم، (KH_2PO_4) – كلوريد الصوديوم، كربونات الكالسيوم، تحضن المزارع في حاضن هزاز عند درجة حرارة (28–30°م) لمدة (36–48) ساعة. أما المزرعة في المخمر فإنها تحضن لمدة (18–24) ساعة وتجرى عملية التهوية والتحريك. أما المزارع المستقرة فيمكن أن تحفظ لمدة (15 – 30) يوم عند درجة حرارة (2–6°م).

التربية الصناعية (Deep culture):

عند هذه التربية تستعمل أوساط تأليفية. وهي أوساط معقدة تكون حاوية على طحين الصويا، النشا، الجلوكوز، سلفات الأمونيوم، وعند الأوساط التأليفية تؤلف السلالة (*S. fradiae*) (3000) وحدة/مل. أما في الأوساط المعقدة مع الكربوهيدرات وطحين الصويا ينتج (12000) وحدة نيومايسين/مل وسط.

التربية تتم عند درجة حرارة (28–30°م) وعند التربية نلاحظ ثلاث مراحل:-

المرحلة الأولى: تشمل اليوم الأول، والذي فيه تنمو الاسبورات ويتراكم المايسليوم الفتي المتشابك نتيجة المتانة غير العشوائية للهايفات.

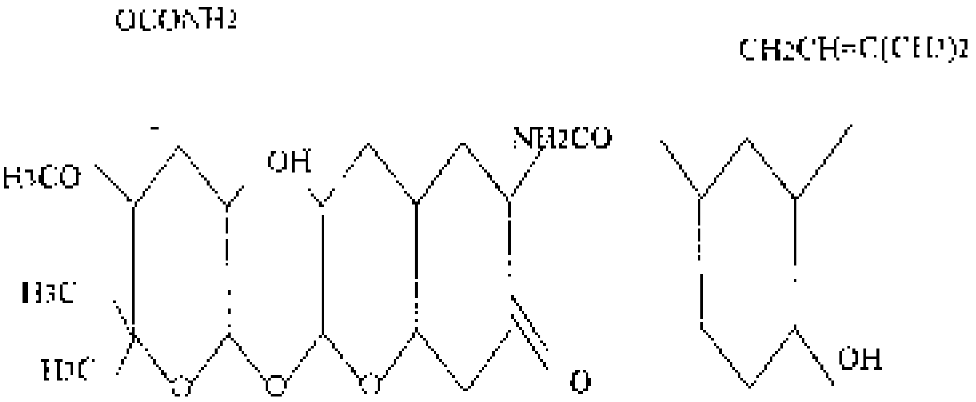
تعتبر هذه هي المرحلة الثانية، أما المرحلة الثالثة بعد اليوم الثاني وتمتاز هذه المرحلة بقلة (Basophilic haphae) وباختلاف البروتوبلازم. وبعدها تتشكل هايفات مستطيلة رفيعة وغير متشعبة. وخلال كل مرحلة نمو المايسليوم (2–3يوم) (pH) الوسط يهبط من (6.5–6.8) إلى (6) وذلك يعود لتحضير الحوامض الكيتونية.

كمية الكربوهيدرات، الفسفور غير العضوي، الأملاح الأمونية تقل وبنهاية اليوم الثالث نمو المايسليوم يبدأ بالتباطؤ، وينهي هضم الكربوهيدرات، ويرتفع الـ(pH) وتبدأ مرحلة تفسخ الخلايا، ومحتويات الأحماض الكيتونية. أما في اليوم الرابع والخامس فيرتفع الـ(pH) إلى (7.0-7.2). النيومايسين يؤلف أكبر كمية بعد أن ينتهي نمو المايسليوم عند تركيز واطئ للفسفور غير العضوي بحدود (6-10) ملغم %.

نوفوبيوسين:

المضاد الحيوي نوفوبيوسين يؤلف من (Streptomyces spheroides) (سمث 1956) و (Streptomyces niveus) (والك 1955، 1956).

وقد تم اكتشاف منتوج من (Streptomyces spheroides) وقد سمي بمختلف الأسماء منها كاثومايسين (والك وجماعته 1955) ستربتونيفيسين (سمث 1956) وكارديلومايسين (ونكس درايت 1955) وله الشكل التالي:-



نيوبيوتسين

الأحياء المجهرية وشروط التربية:

النوفوبيوتسين يؤلف من (Streptomyces spharoides) (سمث وأعوانـــه 1956) ومن (Streptomyces niveus) (والكر وجماعته 1955، 1956) ومنذ اكتشافه ثبت بأن إضافة (0.5) غم من حامض نوفوبيوتسين/لتر وسط غذائي يزيد من المنتـــوج من (190-257) ملغم/لتر.

وواحد غم/لتر من حامض (P-amino oxalic acid) يزيد المحصول إلـــى (398) ملغم/لتر و(0.05) غم/لتر من (hydroxy-3 methyl-2-butal-benzoic acid) يزيـــد المحصول من (123) ملغم إلى (203) ملغم/لتر، وفـــي الفـــترة الأخـــيرة ظـــهرت إعلانات بأن (L-Thirosine) يمكـــن أن يكـــون كحـــامل عنـــد التخليـــق الحيـــوي للنوفوبيوتسين (جامبرز وجماعته 1960).

وقد اقترح الكثير من الأوساط الغذائية للتربيـــة (S. spheroides) و (S.niveus) وأن أبسط وسط مقترح من قبل (سمث 1956) يحتوي علـــى الجلوكـــوز، نباتـــات عشبية (20، 40غم/لتر) على التوالي. وقد تم الحصول على إنتاج (475)غـــم/لتـــر. وبالنسبة لدراسات سمث لكثير من المصادر الغذائية فكان أحسن مصـــدر كربونـــي للسلالة (S. niveus) هو السكروز، ثم الجلوكوز والنشا، أما المصادر غير المناسبة كزيت الكبد، والمولاس واللاكتوز، حيث للمصدر الكربونـــي تـــأثير علـــى إنتـــاج النوفوبيوثـــين المعطى، وكذلك النباتات العشبية والجلوكوز والنشا حيـــث يتكـــون أيضاً مضادات حيوية أخرى مضادة وبكمية (1065) و(1040) ملغم/لتر منـــه فقـــط (70-75%) بينما عند المالتوز كمصدر كربوهيدراتي يكون (750-820) ملغم/لتـــر، ولكن نسبة النوفوبيوثيين تحتل (94-95%) منها (أون 1961) هذه المنتوجات يمكـــن أن تزداد إذا كان في الوسط نباتات عشبية وكذلك بإضافة أحماض عضوية بكميـــة (0.5-2.0) غم/لتر (نوساما وسمث 1961).

وفي هذا المجال علاقة أكثر لحامض الفـــنيك حيـــث يعطـــي إنتاجـــاً (835) ملغم/لتر، وكذلك حامض الفورميك يعطي إنتاجاً بـ(570) ملغم/لـــتر. وتحسينات ملموسة تحصل بإضافة الخل، السترات، السوكسينات، الكلوكونـــات. أمـــا بالنسبة (سمث 1956) فعند تربية السلالة (S. niveus) على وسط يحتوي على مســـتخلص اللحم، الببتون. فإن الكمية القصوى للمايسليوم يمكن الحصول عليها بعد (60) ساعة من عملية الحضن، وبعدها تبدأ بالانخفاض. أما تأليف المضاد الحيوي فإنه يبدأ فـــي الساعة (30) بعد عملية الحضن، ويستمر حتى الساعة (90).

(pH) الوسط يرتفع من (6-8) إلى (7.6) عند (24) ساعة الأولى ويستمر بهذا المستوى حتى الساعة (80)، ومن بعدها يرتفع ال(pH) إلى (8) وفي كل الأحوال والاحتمالات وبنتيجة التفسخ الحاصلة في بداية العملية تستهلك الكربوهيدرات بكمية قليلة.

المضاد الحيوي سيصنع من المايسليوم الناضج، وعند عملية تأليف المضاد يبدأ تأثير ال(pH)، حيث عندما يكون ال(pH) بحدود (7-9) والتسحيح للنوفوبيوتسين يكون أقل من وسط يكون ال(pH) فيه (8). وهنا يفسر التأثير السمي للنوفوبيوتسين عند ال(pH) (7.5) حيث يتوقع عند هذه القيمة لل(pH) إن المضاد الحيوي ينفذ بسهولة في خلايا المايسليوم، حيث إذا أضيف (1000) ملغم/لتر نوفوبيوتسين إلى مزرعة عمرها (2-3) بمايسليوم نشط النمو وعند (7.5) (pH) فسإن المايسليوم سوف يتحلل خلال (24) ساعة. أما عند ال(pH) (5.9) فإنه يبقى كاملاً غير مهضم. أما في التجارب السرية إنتاجية فقد تم تحضير أكبر كمية من منتوج نوفوبيوتسين عند (pH) (7-7.5) (أوت 1961)، ولكن عند هذه القيمة أيضاً يمكن أن يرجع النوفوبيوتسين إلى (Decarbamel) الوجه غير الفعال للنوفوبيوتسين.

أما درجة الحرارة المثالية لنمو المزرعة هي (26-28°م). أما تحضيره فيحضر المايسليوم اللقاحي في دوارق هزازة بواسطة زرع السلالة على وسط فول الصويا، جلوكوز، سلفات الأمونيوم، وعند درجة حرارة (26-28°م) ولمدة ثلاثة أيام. أما المصادر الخام الأخرى فيمكن استعمال طحين الذرة بدل فول الصويا. وفي الأوساط الإنتاجية يتوخى غياب مركب سلفات الأمونيوم حيث غياب هذا المركب

سيؤدي إلى تكوين (pH) غير مساعد ومنخفض لـذا فيمكـن الاستعاضة أيضـاً بمصادر أخرى كنترات الأمونيوم، نترات البوتاسيوم، ولكـن لا يفضـل استعمال نترات الصوديوم أو الكالسيوم. كذلك يجب أن لا يجمع بين السكروز والنشـا فـي وسط واحد حيث أن تأليف المضاد الحيوي سوف يقل مرتين أقل ممـا لـو كـان الجلوكوز وحده. وإلى هذه المجموعة أيضاً ينتمي الكانامايسين.

الكانامايسين (Kanamycin):

إن هذا المضاد الحيوي تم اكتشافه من قبل (أومنازاوسـا 1957) ومـن السـلالة (Streptomyces Kanamyceteus) وعلـى الأوسـاط المسـتعملة لتحضـير الستربتومايسين والنيومايسين. درجة الحرارة المثلى لإنتاج هذه السلالة هـي (27-28 م°). أما الرقم الهيدروجيني (pH) (7.1-7.6)، وأكبر مضاد حيوي يحضر بوسط حاوي على النشا وبإضافة دهون طيارة. أما كمية الفوسفور غير العضوي يجـب أن يكون في حدود (2-4%) ملغم، ومع تهوية قوية. أما التربية الإنتاجية فتكـون فـي وسط فول الصويا، نشا، وبفترة حضن (120) ساعة. الكميـة القصـوى والمنتجـة للكانامايسين كانت عند حدود (90-120) ساعة.

المضادات الحيوية المايكروليدية:

المضادات الحيوية المايكروليدية هي إحدى أهم المجاميع مـن وجهـة نظـر كيماوية لأنها تمتلك دائرة كبيرة وبدرجة كبيرة وله حلقة لاكتونيـة ومنـها ترتبـط (Dimethyl-amino saturated sugar) (بريكفد هرمان 1958).

المضادات الحيوية المايكروليدية تحضر من قبل مختلف أنواع (*Streptomyces* sp.) وإلى هذا النوع من المضادات الحيوية تنتمي المضادات الحيوية التالية: ارثومايسين (ماي كيوري وجماعته 1952)، بكرامايسين (بروك مان وهانكل 1951) كاربومايسين (ماكنامايسين) (وكنر وجماعته 1953) منمايسين (هوتن وجماعته 1953)، سيرامايسون (تورماتسين) (بترت ستداتكو وجماعته 1954) كوريمان وجماعته 1956)، أوليان دومايسين (موي وجماعته 1954) ناربومايسين (كوريمز وأعوانه 1955)، تيلوزين (ستاركو وجماعته 1961).

ولكن هذه المضادات تنتج عند حدود (pH) مثالي والتخليق الحيوي للمضاد الحيوي يعتمد على ظروف الوسط حيث أن أملاح الحديد تقلل من فعالية المايسليوم الفطري. أما الفوسفور المعدني والمغنيسيوم فإنها تسهل تحضير الارثرومايسين. ولكن زيادة كمية الفوسفور تؤدي إلى تقليل المنتوج، وهكذا في وسط فول الصويا (25%) ملغم والفوسفور المعدني يقلل المنتوج ب(25%).

التهوية والحرارة:

يزداد إنتاج الارثرومايسين في كل الأوساط التأليفية والغنية بزيادة سرعة التهوية ولكن في حالة استعمال أوساط فقيرة فإنها لا تتأثر (زيدرك 1959). وعند عملية التخليق الحيوي للارثرومايسين يلاحظ خاصية نوعية لا تلاحظ عند تحضير أكثر المضادات الحيوية. وكذلك فإن رفع درجة الحرارة ينشط تأليف المضاد الحيوي، وهذا يسري بشكل خاص على الأحياء المصنعة والتي تمتاز بسرعة نمو

منخفضة. أما الدرجة الحرارية (33-34°م) فإنها ترفع الإنتاج لدى تربية (S. erythreus) عدا المنتوج الارثرومايسين (A). أما الارثرومايسين (B)(C) فينتج بكميات قليلة بالاعتماد على السلالة ونوعيتها وشروط التربية ومكونات الوسط. أما في حالة وجود فائض من الفوسفور المعدني في الوسط، وحينما يثبط تخليق الارثرومايسين (A) في الوسط فنلاحظ تراكم تراكيب بيولوجية غير فعالة.

اولنندومايسين:

إن المضاد الحيوي اولنندومايسين يحضر من السلالة (Streptomyces antibioticus ATCC 11891) (سوبن وجماعته 1946) حيث تحفظ المزارع بشكلها الاسبوري على (slant) أو على أوساط صلبة لتحضير المايسليوم، والتربية تكون بها أحادية أو ثنائية المرحلة.

أما في جهاز التربية (جهاز التلقيح) ذي الحجم حيث تزداد فترة التحضير في أجهزة التربية الأولى بحدود (50-70) ساعة، وفي التربية الثانية تحتاج إلى (8-12) ساعة وعند درجة حرارة (26-28°م)، وعند ظروف التحريك المستمر والتهوية. فالمايسليوم ينمو بسرعة جداً ويكتسي بلون أبيض كهرماني-رصاصياً. وفي بعض الأحيان تنمو الخلايا. أما الوسط فيكون لونه قهوائي. هذا المايسليوم النامي يتم نقله إلى الوسط الإنتاجي بنسبة (20%) والتربية تتم عند درجة حرارة (27-28°م) مع التهوية (دورة هواء/دورة وسط/دقيقة). أما سرعة التحريك فتكون (180-200) دورة/دقيقة. ويضاف إلى الوسط قطرات من زيت مانع الرغوة. وفي عملية التربية الصناعية يلاحظ طورين:-

الطور الأول: وفيه يتم النمو السريع للمايسليوم وهضم المواد الغذائية.

الطور الثاني: يتميز بالنمو البطيء وبالتفسخ الجزئي وتأليف المضاد الحيوي. وفي (40-72) ساعة من عملية التخمير تتكون كتلة حيوية (Biomass) كبيرة وحول المنطقة المتعادلة. والتخليق الحيوي لـ(أوليان دومايسين) يبدأ من الساعة (60) إلى الساعة (72) ويستمر بالنمو إلى نهاية العملية، حيث يقل تأليف المضاد الحيوي ويزداد تفسخ الخلايا.

الأوساط الغذائية:

كما هو معلوم في أكثر مصانع المضادات الحيوية حيث تكون الأوساط الغذائية المستعملة للتربية الإنتاجية ذات خواص معقدة. فالأوساط النموذجية تحتوي على (غم/لتر): نشا (25)، جلوكوز (25)، طحين فول الصويا (47)، مستخلص الذرة مادة جافة (10)، خمائر (8)، 5 $NaCl$، 2 $CaCO_3$، $COCl_2$ رقائق أو نخالة حنطة (بريدبرك 1959)؛ أو الوسط التالي نشا (15)، طحين الصويا (15)، 1 $COCl_2$، دهن خنزير (20)غم/لتر، في حين أن الوسط الأول أعطى إنتاجاً قدره (349)ملغم/لتر. وإن الدراسات في هذا المجال مستمرة حيث أضيفت بعض المواد إلى الوسط حققت إنتاجاً قدره (918)ملغم/لتر. (هوكسما وآخرون 1958)، ويمكن أن تستعمل المصادر الكربوهيدراتية كالسكروز، النشا، الدكسترين، الفركتوز. وكذلك يمكن أن يستعمل المصادر النيتروجينية المعقدة التي تهضم بشكل أفضل.

اللقاح يجهز بالمرابق وبالتحضين الهزاز وعند درجة حرارة (30-32°م)، وبعد (2-3) يوم ثم يتم النقل إلى المخمر الإنتاجي.

التربية الإنتاجية تتم بالتربية العميقة وبالتهوية المستمرة والتحريك، دورة هواء/دورة وسط/دقيقة، وتكون درجة الحرارة خلال النصف الأول من العملية (31-32°م)، وفي خلال الدور الثاني للتربية الإنتاجية تنخفض درجة الحرارة إلى (28-29°م)، وتضاف دهون نباتية أو حيوانية لإزالة الرغوة، وعملية التربية تستمر (80-100) ساعة، ففي الأيام الأولى للتربية المايسليوم ينمو بسرعة، بعد اليوم الثالث كمية الكتلة الحيوية (Biomass) لا تزداد. خلال ذلك الوقت تنضب تقريبا كافة المصادر الكربوهيدراتية ولكن تزداد الحوامض الكيتونية. وفي اليوم الثالث تصل الدرجة القصوى وفي اليوم الخامس تهبط كميتها إلى الصفر. أما الـ(pH) فيكون حامضياً ضعيفاً أو متعادلاً ولكن باختفاء الأحماض الكيتونية فإن الـ(pH) يرتفع. وهذا يعود من جهة أخرى لتحضير الأمونيا بنهاية التربية، حيث تكون قد بدأت عمليات التفسخ للمايسليوم الفطري. أما عنصر الفوسفات الموجود فيه فيمتص في الأيام الأولى (اليوم الأول والثاني) ولكن قرب نهاية التربية تبدأ بالظهور كميات قليلة.

أرثرومايسين:

من الناحية التطبيقية يعتبر الارثرومايسين واحداً من أهم المضادات الحيوية المايكروليدية وهو ينتج من السلالة (*Streptomyces erythreus*) في عام (1952) من قبل م.كندي، ولكن على مستوى إنتاجي صناعي تم تصنيعه من قبل هري عام

(١٩٩٤) وعلى وسط غذائي اعتيادي يكون مستعمرات ذات حواف خارجية مائلة، نامية ومتداخلة بعيق في الوسط وفي البداية تملك المستعمرات أو المزارع لوناً أبيضاً ولكنها بعد ذلك ومن الجانب والجهة السفلى تتلون بلون وردي أو أصفر، يكون صبغة قابلة للذوبان وتنتشر بسهولة في الوسط. الهايفات الهوائيات تكون حلزونية على الأكثر، وفي الأوساط التأليفية تكون مزارع بيضاء أما على مرق اللحم الأكري فتكون مستعمرات كريمية. الجلاتين يذوب، يحلل ببتون الحليب، يحلل النشا، يختزل النترات.

التربية الصناعية لمصنعات الارثرومايسين:

المصنعات الفعالة المستعملة والتي تكون أشكالها اسبورية ومنها تحضر المزارع اللقاحية. والمزرعة تتميز بالبداية في الوسط الأكري وضمن فترة (12-14) يوماً، وتحضيرها يتم بطورين حيث يتم التلقيح في جهاز التربية لتحضير المزرعة الرحمية حيث تنمو الهايفات الخيطية وتفرق عن كثير من العمليات الأخرى لتحضير المضادات الحيوية وهنا فقط يتكون الاوليندومتسين وتبعاً لدرجة نمو الكتلة الحيوية ويتلون الوسط إلى لون أسود-قهوائي. الشكل المورفولوجي للمايسليوم يتغير بمرور العملية التربوية وخلال (12-24) ساعة في الوسط البيني تتراكم كتلة حيوية كبيرة مكونة مستعمرات مفككة وزغبية، والهايفات تكون سميكة جداً ومتفرعة، والبازوفليا واضحة بشدة. وخلال اليوم الثاني يبدأ الطور الثاني، وتقل البازوفليا وجزء من المايسليوم السميك يبدأ بالتحلل وتظهر هايفات نحيفة، والمواد النووية الموجودة فيها تكون صغيرة ومرتبة بكثافة وتختلف عن هايفات الطور الأول. وفي هذا الطور يبدأ الإنتاج الشديد للاوليندومتسين ونمو المايسليوم

يستمر حتى اليوم الرابع بالتقابل على هايفات الطور الثاني النحيفة، وتحلل مستمر لهايفات الطور الأول المميزة. وبذلك تحضر الهايفات الفارغة.

أما السلالة (*Streptomyces antibioticus*) حيث تنمو جيداً في وسط معقد التركيب والحاوي على طحين الصويا والذرة أو طحين الذرة ولكن يمكن أن يتمسو في وسط تأليفي أيضاً والحاوي على نترات الكالسيوم أو سلفات الأمونيوم. ومن المصادر الكربونية يستعمل الجلوكوز، النشا، مالتوز، كليسرين، طحين الذرة دهون، كحولات متخلفة، ومن المصادر النيتروجينية المساعدة لنمو، هي طحين الصويا، مستخلص الذرة والكازين المتحلل وأملاح الأمونيوم والنترات. وتركيز الفوسفور غير العضوي يكون بحدود (12-15) ملغم%، وبارتفاع تركيز الفوسفور يثبط التخليق الحيوي للاوليندومايسين. أما الوسط الجيد لنمو (S. antibioticus ATCC 11891) فيحتوي غم/لتر: طحين الصويا (15)، جلوكوز (20)، نشا (10)، (9)، طحين (5)، نيتروجين أميني SN2-amin، (موير وجماعته 1956)، ويضاف إلى هذا الوسط (30) ملغم/لتر كردين البرتقالي، فالمنتوج يرتفع مرتين تقريباً من (260) إلى (450) ملغم/لتر (زيتماكس وتوبل 1958).

تلوزين :

التلوزين يولد من سلالة (Streptomyces fradiae) السلالة (M-84-z-2724) في وسط مكوناته غم/لتر:

جلوكوز (35)، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5؛ K_2HPO_4 2.3؛ $CaCO_3$ 3؛ ثايـــن (2)، L-valine ؛ بيوتين (5)، كلوتسين (7)، مثيل أوليـــت (25)، فإنــها ستـتوقف فـوق (2000) ملغم/لتر.

تلوزين ينتج عند درجة حرارة (30°م). المصادر الكربونية الجيدة هي الجلوكوز والمالتوز، زيت فول الصويا عند تركيز (20) مل/لتر أعطى إنتاج (1600)ملغم/لتر مثيل (methyl alitat) (1900) ملغم/لتر، ويمكن أن يكون هذا المصدر خليطاً مـــن (methyl palmatat) و(methyl stearat) بأجزاء متساوية عنـــد الإضافـــة للوسـط حوالي (%25) (methyl caprat) أو(caplerate) تثبط كلياً تأليف المضاد الحيــوي. الفوسفات K_2HPO_4 يمكن أن يحتوي على (2.4) غم/لتر وهو التركـــيز المثـالي ولكن عند الوصول إلى (5) غم/لتر سلفات المغنيسيوم، تركيز الفوسفات يمكـــن أن يرتفع (ستارك 1961).

متمايسين :

لتحضير هذا المضاد الحيوي يمكن استعمال الوسط المحتوي علـــى غــم/لتر: طحين الصويا (30)؛ جلوكوز (50)؛ K_2HPO_4 (0.5)؛ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1؛ ويمكـــن أن يستعمل مستخلص الخمائر (22.5) غم/لتر وببتون (15) غم/لتر والإنتاج يكـون ما بين (400–700) ملغم/لتر.

الفصل السادس عشر

إنتاج مواد النكهة

Aromatic Substance

إنتاج مواد النكهة:

(Aromatic Substance)

إن التطور السريع في تقنيات إنتاج النكهات من النباتات والأحياء المجهرية والأحياء المائية نتيجة تطور المنتجات الغذائية واستنباط منتجات غذائية جديدة أدى إلى تزايد الطلب على مواد النكهة؛ لذا اتجه الباحثون في مجال الأحياء المجهرية إلى إيجاد البدائل الضرورية والرخيصة الثمن والتي تتمتع بمواصفات جيدة، وليس لها تأثير سلبي على صحة الإنسان.

ومن النكهات التي تم إنتاجها من الأحياء هي نكهة التفاح التي تم إنتاجها من خميرة (Hansenula sp) وكذلك نكهة الخوخ التي صنعت من لاكتون خميرة (sporobolomyce)؛ ونكهة جوز الهند التي أنتجت من بعض الأعفان، ونكهة الحس التي أنتجت من بعض الخمائر، ونكهة البيرة من خمائر الخبز.

أما المواد الأخرى التي تم إنتاجها من الأحياء المجهرية هي (vit C)؛ حامض الاسكوربيك المهم في كافة الصناعات الغذائية الذي يدعم المنتج الغذائي بالفيتامين، إضافة إلى أنه يحافظ لون المنتوج من التغيرات، وقد تم الحصول على هذا الفيتامين نتيجة تخمر سكر الجلوكوز بواسطة بكتريا (Erwinia sp)؛ الثانية (Corynebacterium).

Erwinia Sp

D-glucose ——► acid 2.5 diaceto gluconate

Corynebact sp. / H_2O

2 aceto gluconate ——► Ascorbic Acid vit. C

أما حامض اللاكتيك (Lactic acid) الذي يعطي النكهة الجيدة للمخللات، فينتج من عملية الهدم اللاهوائي للسكريات، وإن الأحياء المصنعة لهذا الحامض على نوعين (L+) و(D-)، فالأحياء المصنعة من نوع (Homofermentative lactic acid B) تصنع (L−)، ويمكن أيضاً تصنيعه من العفن (R. oryzae).

أما البكتريا المصنعة فهي (Lactobacterium delbrueckii)، وهنالك سلالات أخرى مثل (L-Plantarum) و(L-Pentosus). أما الأعفان فكثيرة وقد ذكرنا إنتاج حامض اللاكتيك سابقاً. ومن مواد النكهة حامض الستريك الذي يعتبر أهم الأحماض في صناعة المشروبات الغازية والمربيات والعصائر، وينتج هذا الحامض بواسطة العفن (Aspergillus niger) أو بواسطة الخميرة (Candida

lipolytica) بعد تنميتها على أوساط كربوهيدراتية مثل المولاس، عصير التمر، مشتقات نفطية.

أما حامض الخليك الذي يعتبر مادة مهمة في التصنيع الغذائي والذي يتميز بنكهة خاصة ويكسب المخللات طعماً ومذاقاً مستحسناً، وينتج هذه النكهة من نمو بكتريا (acetobacter Suboxdans, acetobacter aciti) والنامية على مصدر كربوهيدراتي. أما الكليسرول وهي مادة لها استعمالات غذائية وكيماوية وعقاقيرية تم إنتاجها بتنمية الخميرة (Saccharomyces Cerevisiae) على المولاس أو عصير التمر أو أي مصدر كربوهيدراتي آخر. وكما تم إنتاج المواد الستيرويدية (Stroides) التي تستخدم في إنتاج العقاقير الطبية، حيث تم إنتاجها من الخميرة (Rhodotrula sp).

النكلوكان: مركب سكري متعدد لجزيئة الجلوكوز تم استخلاصه من خميرة (Schizosaccharomyces pombe) ويستعمل هذا المركب في الصناعات الغذائية وأهمها صناعة الحلويات (المستكه) والشوكولا.

خاتمة

إن من كل ما تقدم من تقدم تقني في المايكروبايولوجي الصناعي يعطي آفاقاً جديدة وكبيرة لاستخدام سكريات التمور في الإنتاج، وإن المستقبل لكفيل بهذا العطاء.

المصادر العربية

1. الدورة التدريبية لمنتجات التمور (1982). مجلس البحث العلمي مركز البحوث الزراعية والموارد المائية. قسم النخيل والتمور.
2. الصمام. رعد – التقنية الحيوية – مطبعة اربد.
3. العكيدي، حسن خالد (1982). إنتاج بروتين الخلية الواحدة من عصير التمر مجلة علوم الحياة. العدد 2/1.
4. العكيدي، حسن خالد (1981). دراسة عن إمكانية إنتاج حامض الليمون من التمور العراقية.
5. العكيدي، حسن خالد (1979). تصنيع الانزيمات عن طريق الأحياء المجهرية. تقرير علمي. مجلس البحث العلمي.
6. العكيدي، حسن خالد (1985). تصنيع التمور ومنتجات التخليلة السليلوزية. الاتحاد العربي للصناعات الغذائية.
7. العكيدي، حسن خالد (1982). تكنولوجيا إنتاج الخمائر. دراسة مقدمة إلى الاتحاد العربي للصناعات الغذائية.
8. العكيدي، حسن خالد (1985). إنتاج البروتين بواسطة الفطر Asp. niger؛ باستخدام مسحوق نوى التمر. مجلة البحوث الزراعية العدد 4 ص (197-206).

المصادر الأجنبية :(Foreign References):

1- Aunstrup, K., 1977. Production of Industrial Enzyme.
2- Bardarolf. c. 1964. Antibiotics. Sofia
3- Beshkov, M... 1974. Industrial Microbiology-Cresto danal-Bulgariaplovdiv
4- Breed. R.S., E.G.D. Murray, N.R. Smith 1957. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore.
5- Casida, L.E., JR Jhon Wiley and Sons. 1964. Industrial Microbiology
6- Chain, E.B., 1958.Chemistrey and Biochemistry. Ann. Rev. Biochem. 27, 167-222
7- Cook, A.H., 1958. The Chemistry and Biology of yeast. New York
8- Di Maico. A. and Pennella. 1969. The fermentation of tetracylines pp. 45-92 in progress in Industrial. Microbiology, Vol. I
9- Frazier, W.C., 1962. Microbiologia de los alimentos. Habana
10- Frobisher, M., 1962. Fundamentals of Microbiology. London.
11- Gunsalus. J.C., R.Y., Stamer, 1960-1964. Atreatise, vol 1-5. New York, London.
12- Gebhardt, L.P., D.A. Anderson. 1965. Microbiology, III edition, Saint Louis
13- Kavanagh, F. 1963. Analytical Microbiology. London.
14- Llewelyn, D.A., 1968. Microbiology. London.
15- Lodder J., N.J.W., Kreger-van Rij. 1952. The yeast. Amsterdam
16- Miller, T.L.. and Johnson, K.J., 1966. Biotechnology and Bioengineering. Vol. VIII
17- Peppler, H.J., 1967. Microbial Technology. New York.
18- Perscott, S.C., Dunn, 1959. Industrial Microbiology.
19- Peterson. W.H., and M.S., Peterson, 1954. In Industrial fermentation vol. II
20- Quayle, J.R., 1968. Microbiology. London
21- Raghavendra Rao. M.R., 1967. Annual Review of Microbiology vol II
22- Rainbow, C. and A.H.. Rose. 1963. Biochemistry of Industrial Microorganism, ed. London
23- Rhodes, A.D.L., Fletchev. 1966. Principle of Industrial Microbiology. Pregamon Press

24- Ribbons D.W., 1968. Microbiology-London
25- Rose, A.H., 1968 Chemical Microbiology, second edition. London
26- Sarles. W.B., W.C., Frazier, J.B., Wilson S.G Knight, 1970 Microbiologia general aplicada. La Habana
27- Spencer Y.F.T., P.A.Y. Gerin. 1965. Progress in Ind Microbiology, Vol 7.
28- Stark, W.M and K.L. Smith. The erythromycin fermentation In progress in Industrial Microbiology, vol III. pp 211-230
29- Swan son C.P., T Merz, W.I. Young. 1967. Cytogenetics New Jersey
30- Verona O., 1950. Microbiologia della fermentation, microbiologia Industrial Firenze.
31- Young G.G., 1961. Witton's Microbiology New York.

MICROBIAL BIOTECHNOLOGY

By:

Dr. Hassan K. Hassan Al Oqaidi

Amman-2000

مع تحيات د. سلام حسين عويد الهلالي

https://scholar.google.com/citations?
user=t1aAacgAAAAJ&hl=en

salamalhelali@yahoo.com

فيس بك... كروب... رسائل وأطاريح في علوم الحياة

https://www.facebook.com/groups/
/Biothesis

https://www.researchgate.net/profile/
/Salam_Ewaid

07807137614

هذا الكتاب

نتيجة للتطور العلمي الهائل الذي يشـــــــــهده العالم في كافة الميادين كان لزاماً علينا ان نواكب هذا التطور ونســــايره. خاصة في ميدان يعتبر من اهم الميادين العلميــة تأثــراً بهــذا التطور الا وهو المايكروبيــولوجي الصناعي، واننا اذ نقــدم للقارئ الكريم بشكل عام، ودارسي الاختصاص بشكل خاص هذا الكتاب فاننا نقدم له آخر ما وصل له هذا العلم من تطور يعينه على معرفة خفايا هذا العلم والفوائد المتوخاه منــه. وفي كافة المجالات الحياتية والطبية والزراعية وليكن ذلك مكسبــاً للمكتبة العربية والدراسين ، ونسأل الله تعالى ان نكون قــد وفقــنا في مســــعانا هذا انه نعم المولى ونعم النصير .

المتخصصون في الكتاب الجامعي الأكاديمي العربي والأجنبي

دار زهــــران

للنشــر والتــوزيع

تلفاكس ٥٣٣١٢٨٩ - ص.ب ١١٢٤٣٧ - عمان ١١١٢١