التقنية الحيوية المايكروبية والتمور

تأليف
الدكتور حسن خالد حسن العكيدي

المشروع الاقليمي لبحوث النخيل والتمور
في الشرق الأدنى وشمال افريقيا

بغداد 1987

التقنيَّة الحيويَّة المايكروبيَّة والتُّمور

تأليف

الدكتور حسن خالد حسن العكيدي

مدير المركز الاقليمي لبحوث النخيل والتمور
في الشرق الأدنى وشمال افريقية
بغداد

بغداد 1987

المقدمـــة :

تعد التمور أحد أصناف الفاكهة اللذيـذة والحلوة المذاق والتي اقـترنت بتجارة العـرب والمسلمين على مر الزمن حيث كانت الغذاء الذي لا يستغنى عنه لما تتميز به هذه الثمـرة من قيمة غذائية عالية لاحتوائها على أهم عنصر غـذائي هو السكـريات والمعـادن والفيتامينـات. ونتيجة التقدم التكنولوجي وظهور أنماط جديدة من الحلويات والفواكـه ذات التعبئة الجـذابة والبراقة والاعلام المكثف حولها أدى إلى العزوف عن تناول التمور بشكلها الطبيعي. وبمـا أن الانتاج السنوي من التمور في ازدياد فلا بد من إيجـاد قنوات جـديدة لتصريفـه بشكل يخـدم المـواطن. ونتيجة للتقـدم العلمي في مجال الأحيـاء المجهريـة والتعرف عـلى مواصفـات هذه الأحياء وعملها. فقد أمكن من الحصول على الكثير من المنتجـات النافعـة للبشر من خلالهـا كالمضادات الحيـوية، الانـزيمات والفيتـامينات، والعقـاقير، والـبروتينات. . . الـخ من المواد المهمة. علماً بأن التمور تعتبر من المصادر الخام الضرورية والمهمة في هـذا المجال. وفي هـذا الكتاب ألقينا الضوء على بعض الأسس العامة في التقنية الحيوية ومجالات استعمالاتها. وكلنـا أمل أن نكون قد وفقنا في التوصل إلى آخر المعلومات في هذا المجال وتقـديمها بشكـل يتماشى مع حاجة أصحاب الاختصاص والعاملين في حقـل التمور والصنـاعات المـايكروبـايولـوجية خصوصاً وأن الحاجة أصبحت واضحة لاستعمال التمور ومشتقاتها.

المؤلف

آب 1987

PREFACE

One of the major objectives of Regional Project for Palm and Date Research Centre is to disseminate Scientific and Technical Information on the Improvement of the Date Palm Industry in the form of books, journals, bulletins and circulars with national and international agencies. The present aim is with a close collaboration between the Project and the Arab Federation for Social and Economic Development (AFSED), Kuwait.

This book is an attempt to provide basic information on dates and microbial Biotechnology and how to use dates as a raw material in microbial Biotechnology acquired workers, microbial fabric, as well as student.

The material in this Books Thirteen chapters includs Fundamental principles in microbial biotechnology, Fundamental principles in sterilization and disinfection, Culturing Technology, Design of laboratory, Dates development and Chemical Composition, Single cell protein technology, Production of organic acid alcohol production, Enzyme production, etc.

I am grateful to Documentation Staff of the Project specially Miss. Itidal Musa Khalil for her assistance and Mrs. Seita Kasbarian for typing.

This publication is made possible by financial assistance received from AFSED, Kuwait for specialized Documentation and Information Centre of the FAO Regional Project for Palm and Dates Research Centre in the Near East and North Africa, Baghdad-Iraq.

Dr. Hassan Khalid Hassan
Project Director

المحتويات

تقديم باللغة العربية 3
تقديم باللغة الانكليزية 4

المقدمة 11

الفصل الأول
المبادىء الأولية والرئيسية لتقنية الاحياء المجهرية

التطبيقات الصناعية على وراثة وانتخاب الاحياء المجهرية 15

الفصل الثاني
المبادىء الأساسية في علم تقنية الاحياء المجهرية

استخدامات تقنية الاحياء المجهرية 17
عمليات تصنيع الأغذية 17
عمليات للمايكروبايولوجي الصناعي 17
تحضير الكتلة الحيوية والمواد المترسبة في الوسط الزرعي 21
استعمال الاحياء المجهرية في التأليف الكيمياوي 22

الفصل الثالث
التغذية عند الأحياء المجهرية والمصادر الخام
المستعملة في التربة الصناعية

التغذية عند الأحياء 37
الاحياء المجهرية واحتياجاتها المختلفة للمادة الغذائية 37

مصادر الطاقة 38
مصادر التغذية 39
أولاً: المصدر الكربوني 39
ثانياً: المصادر النيتروجينية 42
ثالثاً: الأملاح المعدنية 43
رابعاً: عوامل النمو 43
التغذية وتبادل المواد عند الأحياء 45
ميكانزم التغذية 46
المصادر الخام المستعملة في التقنية الحيوية 48

الفصل الرابع
المبادىء الأساسية في التعقيم والتطهير

ميكانزم التعقيم والتطهير 54
التعقيم عند درجة الحرارة العالية 56
أنواع التعقيم 56

الفصل الخامس
تقنية التربية والانتقاء والجمع المختبري لمزارع الاحياء المجهرية الصناعية

تربية الأحياء المجهرية 63
طرق عزل الأحياء 63
طرق عزل المزارع النقية 65
طرق العزل الميكانيكي 65
طرق العزل البيولوجي 66
طرق زراعة أو تربية الأحياء 68
المزارع ذات الانتاج لمرة الواحدة 68
المزارع السنهورية 70
المزارع المستمرة 71
صيانة مزارع الأحياء المجهرية 75
جمع المزارع العامة 75
طرق صيانة مزارع الأحياء المجهرية 75
حفظ المزارع بالتجفيف 76

الحفظ على السطوح الاكرية الصلبة 76
الحفظ بالماء 77
الحفظ بالتجميد 77
الحفظ بالتجفيد 78

الفصل السادس
تصميم الأجهزة التخميرية

المقدمة 79
الأهداف 79
المؤشرات العملية 81
القضاء على التلوث 81
السحب المعقم للعينات 82
المضافات الأخرى المعقمة 82
التعقيم 83
السيطرة والقياسات 83
بعض المؤشرات المتفرقة 84
اختيار الأجهزة 85
دورق التخمير 85
الأوعية الهزازة 87
أنواع المخمرات الصناعية 89
تهوية المزارع الساكنة 98
التهوية في الدوارق الهزازة 98
التهوية والتحريك في مزارع الأحياء المجهرية الصناعية 100
العوامل المؤثرة على امتصاص الأوكسجين 102
جهاز التخمير المختبري 105
معدن الخباط 105
فصل الرغوة 107

الفصل السابع
نضوج ثمرة التمر والتركيب الكيمياوي لها

مكونات الثمرة 113

مراحل نضوج ثمرة التمر 114
السكريات في التمور 124
السكريات الأحادية في التمور 125
السكريات الثنائية في التمور 134
الماء في التمور 136
السليلوز وأشباه السليلوز في التمور 138
النشا في التمور 141
البكتين في التمور 143
البروتينات والأحماض الأمينية في التمور 145

الفصل الثامن
تقنية انتاج البروتين من الاحياء المجهرية

مقدمة 153
تقنية انتاج الخمائر 155
الخواص المورفولوجية والبيولوجية للخمائر 155
المحتوى الكيمياوي للخمائر 158
التغذية عند الخمائر 159
خمائر العلف من مصادر أولية نباتية 159
تحضير المزارع النقية للعملية الانتاجية 160
الخطوات التقنية 160
تقنية انتاج الخميرة الغذائية من عصير التمر 167
تقنية انتاج الخميرة الغذائية من التمر من نوع C. Utilis 168
استعمالات الخمائر المغذية 172

الفصل التاسع
تقنية انتاج الأحماض العضوية

انتاج حامض الكوجيك 183
انتاج حامض الفورميك 186
انتاج حامض الايتاكونيك 188
انتاج حامض الكلوكونيك 189
انتاج حامض الليمون 191

انتاج حامض الخليك 195

الفصل العاشر
تقنية انتاج الكحولات

المصادر الأولية 203
الاحياء المجهرية 204
انتاج الكحول وكفاءة التخمير 204
التخمير الصناعي 208
انتاج الكحول من التمور 210

الفصل الحادي عشر
تكنولوجيا انتاج الانزيمات عن طريق الاحياء المجهرية

انزيمات الاحياء المجهرية 217
مصادر الانزيمات 218
المزارع الصناعية لانتاج الانزيمات 219
طرق انتاج الانزيمات 220
الاستقلالية بين النمو وتأليف الانزيمات 226
الاحياء التي تؤلف انزيم البروتيز 227

الفصل الثاني عشر
تقنية انتاج الأحماض الامينية بواسطة الاحياء المجهرية

حامض الكلوتاميك 253
حامض اللايسين 258
حامض التربتوفان 263
حامض الالنين 265
حامض الميثونيين 267
حامض الاسبارجين 268
حامض الهوموسيرين 269
حامض الأورثنين 270
حامض الفالين 271
حامض البرولين 271

الفصل الثالث عشر
انتاج المضادات الحياتية

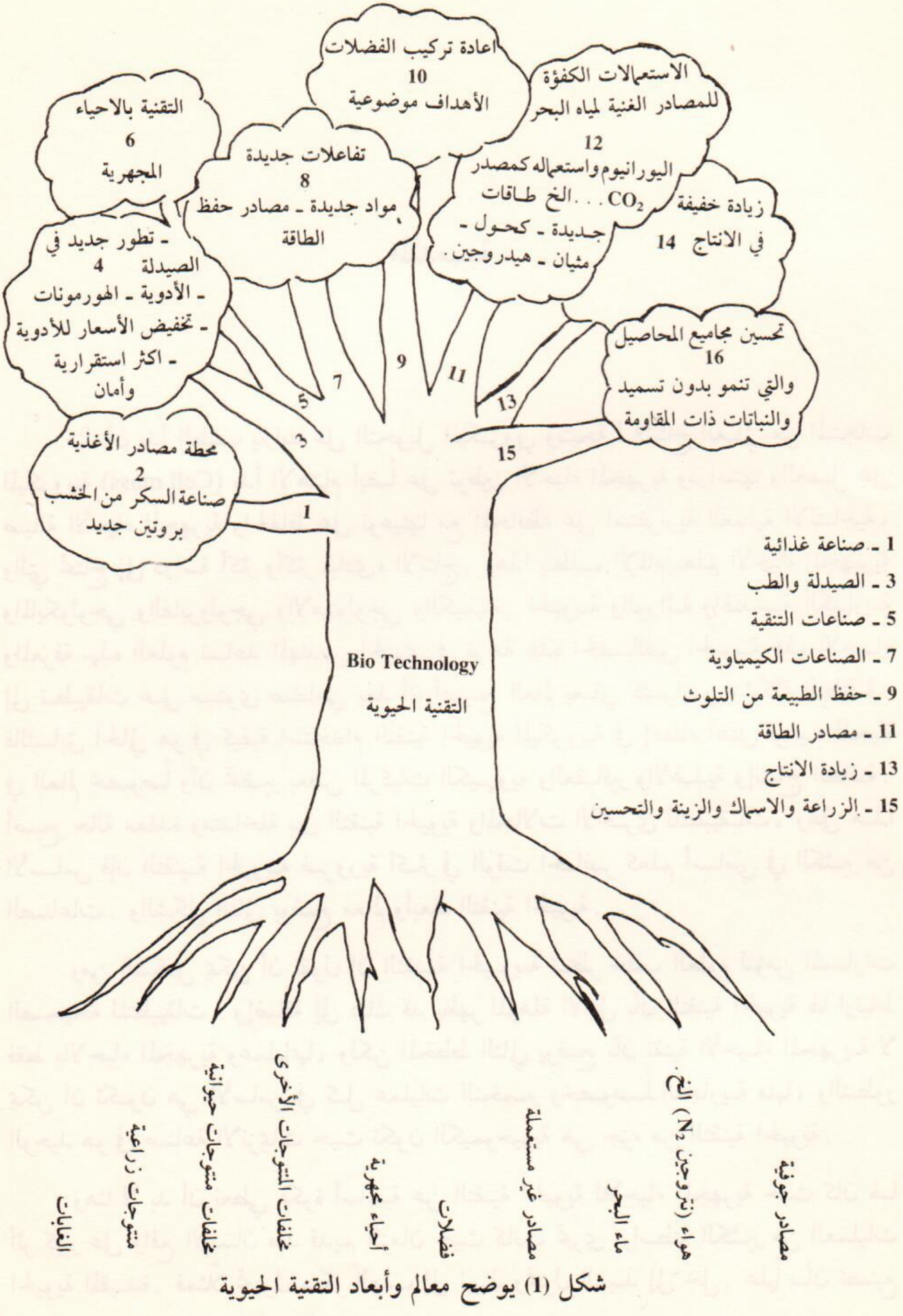
الطرق العامة لتحضير المضادات 276
طرق التربية المستمرة 277
الاحياء المجهرية ـ المجاميع الاساسية للمضادات الحيوية 278
المضادات الحيوية ذات الحوامض الامينية 279
الاحياء المجهرية 280
التربية على نطاق صناعي للاحياء المصنعة للبنسلين 282
التغيرات الكيموحيوية أثناء التربية 289
التخليق المتعدد للبنسلين 289
السافيلوسبورين 292
التربية الصناعية للسلالات المنتجة للتراسايكلين 296
الستربتومايسين 292
الاحياء المجهرية 300
التربية الصناعية للاحياء المصنعة للستربتومايسين 306
مانوزيد ستربتومايسين 308
النيومتسين 308
نوفوبيوتسين 310
الكانامايسين 312
الأولنيدومايسين 313
ارثرومايسين 314
الخاتمة 316
المصادر العربية 317
المصادر الأجنبية 317

المقدمـــة

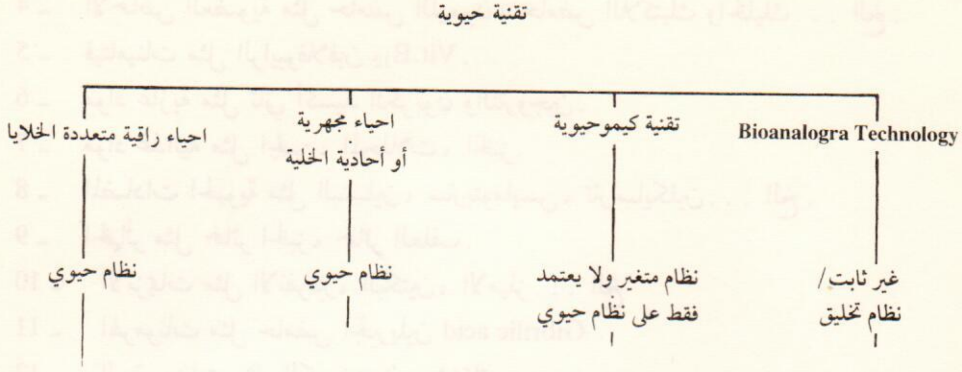
منذ أن بدأ الطلب يتزايد على التحويل الميكروبي ونتيجة للانتاج العالي من المنتجات الميكروبية (Cell mass) بدأ الاهتمام أيضاً على توطين الأحياء المجهرية ودراستها والعمل على صيانة الأحياء المجهرية والحفاظ على نوعيتها مع المحافظة على استقرارية العملية الانتاجية، والتي تحتاج إلى دراسة أكثر وأكثر لمبادىء الانتاج. وهذا يتطلب الإلمام بعلم الأحياء المجهرية والمايكولوجي والفابرولوجي والامينولوجي والكيمياء. الحيوية والوراثة والهندسة الكيماوية والمعرفة بهذه العلوم تساعد المهندس الحيوي في ترجمة هذه الخصائص الحيوية لهذه الأحياء إلى تطبيقات على مستوى صناعي بعد أن أصبح العالم يعاني كثيراً من مشكلة الطاقة. فالتسابق الحالي هو في كيفية استخدام التقنية الحيوية الميكروبية في إعطاء أعلى نوعية للحياة في العالم خصوصاً وأن تحضير بعض المركبات الكيماوية والعقاقير والأغذية وإنتاج الطاقة. أصبح حالة معقدة ومتداخلة بين التقنية الحيوية والمجالات الأخرى للتطبيقات، وعلى هذا الأساس فإن التقنية الحيوية ضرورية أكثر في الوقت الحاضر كعلم أساسي في الكثير من الصناعات. والشكل التالي يوضح معالم وأبعاد التقنية الحيوية.

ومن الشكل يمكن أن نقول إن التقنية الحيوية تنظر خلف العلوم لتؤمن المسارات الصحيحة للتطبيقات. وإضافة إلى ذلك قد يظهر للوهلة الأولى بأن التقنية الحيوية لها ارتباط فقط بالاحياء المجهرية وعملياتها، ولكن المخطط التالي يوضح بأن تقنية الأحياء المجهرية لا يمكن أن تكون هي الأساس في كل عمليات التخمير وخصوصاً التجارية منها، والتطور الوحيد هو في صناعة الانزيمات 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 تجرى بواسطته الكثير من العمليات الحيوية المقيدة. فمثلاً تحول سكر العنب إلى نبيذ وتحول النبيذ إلى خل. علماً بأن تصنيع



شكل (1) يوضح معالم وأبعاد التقنية الحيوية



الجبنـة والخبز يعتمـد اعتماداً كليّاً على دور الاحيـاء المجهريـة. لـذا كـانت المؤشرات الأولى لاكتشاف الاحياء المجهرية ودورها من قبل فـان ليفهوك (Van Leevwenhook) وتبعـه العالم Pasteur ثم تـوالت الاكتشافـات للتعرف عـلى التخمـرات اللبنيـة والكحـولية. ثم تـوالت الـدراسات لمعـرفـة مسببـات التخمـير حيث استـطاع Bagger من الاستفـادة من مستخلص الخمائر المأخوذ من خلايا الخمائر الحية وتأثيرها على المحلول السكري وتحـويله إلى كحول. ثم تبع ذلك العالم Raustrick حيث أشار إلى أن الاحياء المجهرية يمكنها انتاج مركبـات عضويـة معقدة من مصادر غذائية. ثم توالت الاكتشافـات الواحـدة بعد الأخـرى فتم الحصول عـلى الكحول، الكليسرين، الاسيتون والبنسلين والسـتربتومـايسين. . . الـخ. وفي وقتنا الحـاضر فإن العمل بالتقنية المـايكروبيـة سار بخـطوات سريعة خصـوصاً في التـطور التكنيكي والذي بدوره أعطى شواهد كثيرة وثمينة في العمليات التصنيعية.

ومن الجـانب الآخر يفضـل عند استعـمال الاحياء المجهـرية الصنـاعيـة في أي عمليـة صناعية ان تقدر الكلفة الاقتصادية للمنتـوج بحيث تكون الكلفـة الحيويـة الناتجـة ذا فائـدة اقتصادية. فمثلاً عند انتاج الخمائر أو المواد الأخرى المختلفة والتي تنفصل من الوسط عند نمو الاحياء المجهرية فيه فإنها تزيد من الكتلة الحيوية للاحيـاء. ومن ثم تبدأ بـانتاج المـواد وتبدأ من الكحولات أليفاتية والمضادات الحيـوية أي من الجـزيئات ذات الـوزن الجزيئي الـواطىء إلى أن تصل إلى الانزيمـات ذات الوزن الجـزيئي العالي، ويمكن حصر المنتـوجات الميكـروبية بالمنتجات التالية:

1 ـ مشروبات كحولية ـ مثل النبيذ، البيرة.
2 ـ مذيبات عضوية ـ مثل الاسيتون، كحول الايثايل والمثيلي.
3 ـ الاحماض الأمينية مثل اللايسين، الكلونامين. . . الخ.

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

5 ـ فيتامينات مثل الرايبوفلافين $Vit.B_{12}$.

6 ـ مواد غازية مثل ثاني أكسيد الكربون والنتروجين.

7 ـ مواد غذائية مثل الجبن، المخللات، الخبز.

8 ـ المضادات الحيوية مثل البنسلين، ستربتومايسن، تتراسايكلين. . . الخ.

9 ـ الخمائر مثل خمائر الخبز، خمائر العلف.

10 ـ الانزيمات مثل الانفرتير، البكتين، الاميلز. . . الخ

11 ـ الهرمونات مثل حامض الجيريلين Gibrilic acid

12 ـ السترويدات مثل الكورتيزون ومشتقاته.

13 ـ مواد مكسبة للطعم Mono Sodium glutamate.

14 ـ الجلسيرين.

15 ـ الكاوتشوك (المطاط).

16 ـ الدكستران.

الفصل الأول

المبادىء الأولية الرئيسية لتقنية الأحياء المجهرية

التطبيقات الصناعية على وراثة وانتخاب الأحياء المجهرية:

تطور علم تقنية الأحياء المجهرية بحجم كبير في خلال النصف الثاني من القرن العشرين. خصوصاً وقد حضرت الكثير من المنتجات المهمة في الزراعة والصناعة والطب (مضادات حيوية، فيتامينات، فلوريدات، سيترويدات، أحماض عضوية، هرمونات، بوليمرات، انزيمات، 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 وعملها.

ومن الظروف المحددة للنجاح هي دراسة السلالات المصنعة والعالية الانتاج ودراستها من الناحية الوراثية والتحكم في هذه السلالات وراثياً لأجل انتخاب أحسن السلالات انتاجاً. حيث أن اكتشاف الكثير من العوامل المؤثرة لاستحداث الطفرات الوراثية Mutation، ومن هذه العوامل كيماوية وفيزيائية حيث غيرت كثيراً من واقع حياة الاحياء المجهرية.

إن استعمال هذه العوامل لإجراء طفرات جنينية لعدد كبير من السلالات المعروفة والمشهورة أعطت امكانية كبيرة لتطور تكنولوجيا علم تقنية الاحياء المجهرية الصناعية حيث حصل نتيجة هذه الطفرات على سلالات زاد انتاجها مئات المرات وكمثل عليها السلالة المصنعة للبنسلين حيث ازداد انتاجها 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 الانتاج العالي من المواد الضرورية لا يتوقف على الانتخاب الوراثي فقط بل ان هناك سلالات ذات انتاجية عالية في الطبيعة يمكن استغلالها وتحسين نوعيتها لكي تكون أكثر حيوية. والمثال عليها البكتريا Propionbacterium Shermanii التي تؤلف 30 ملغم/مل 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 سترويد ومشتقاته لمختلف المستحضرات. كما تم الحصول على بعض السلالات التي تعمل على تحويل السترويدات من نوع إلى آخر والمثال عليها السلالة Digimella Xadospore والتي تحول 50% من ديزوكسي هيدروكورتيزون إلى أبي 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 الكيمياوية والفيزياوية التي تحدث هذه التغيرات والتي بنتيجتها ازداد تراكم المواد المنتجة من قبل هذه الاحياء والتي بدورها أعطت تطبيقات واسعة لعلم تقنية الاحياء المجهرية.

إن تطور علم الوراثة والتربية والتحسين واكتشاف المنظمات الوراثية وغيرها من الأمور ساهم إلى حد كبير في تطور هذا المجال. كما أن الدراسات والاكتشافات التي أوضحت الكثير من التفاعلات الحاصلة في جسم الاحياء المجهرية وكذلك عن فسلجة وتطبع هذه الأحياء في الأوساط البيئية الغذائية المختلفة، إضافة إلى معرفة أي تغيير في المنظمات الوراثية للكائن المجهري سيغير من واقع العمليات في جسمه والذي بدوره سيؤدي إلى حدوث تغييرات في نظام عملها الكيموحيوي وبنتيجتها ستنتج منتجات نهائية تعرف باسم السلالة ورقمها. فمثلاً السلالة *Micrococcus glutamicus* ascotrophic-strain والتي تنتج 30 غم/لتر حامض اللايسين Lysine يمكن بواسطة الانتخاب الوراثي والتأثير على المنظمات الوراثية، زيادة انتاجية السلالة. وهنالك أمثلة كثيرة على الدراسات الوراثية والمطفرات اللكيماوية والفزياوية.

الفصل الثاني

المبادىء الأساسية في علم تقنية الأحياء المجهرية

Fundamental Principles in Microbial Biotechnology Sciences

منذ القدم عـرف تأثـير الأحياء المجهـرية في الصنـاعة وخصـوصـاً في انتـاج الكحول ـ الشراب، البيرة، الخل وكذلك تأثيرها في صناعـة الأجبان. كـل هذا وبـالاعتماد عـلى العلوم الأخرى فقد تطور استعمال الاحياء وتوسع أفق التكنولوجيا في هذا المضمار وتـطورت المعدات خصوصاً بعد أن قدمت علوم الأغذية الأخرى آلات واسعة لهذا الحقل، مما حدا بـالباحثين في التوسع والدراسة في هذا المجال وتكللت جهـودهم باستحـداث علم التقنية الحيـوية الـذي يتضمن التـأليف والتخليق الميكروبي للمـواد الغذائيـة والكيـماويـة ومـواد أخـرى ذات الأهميـة الاقتصـادية. ومن هـذا الباب سـوف نعطي أحـد التصنيفات للعمليـات المايكـروبيـولـوجيـة الصناعية من منطلق التكنولوجيا وبالاعتماد على مزايا وصفات المنتوج النهائي.

استخدامات تقنية الأحياء المجهرية:

1) عمليات تصنيع الأغذية

أ ـ تحويل المواد الغذائية الأساسية إلى مواد أخرى.

ب ـ تحويل جزء من المادة الغذائية الى مواد أخرى والتي بدورها ستغير من الطعم المذاق، الشكل الخارجي، الانضاج.

2) عمليات للمايكروبيولوجي الصناعي:

أ ـ تحضير احياء مجهرية حية.

ب ـ تحضير مادة حيوية ميكروبيولوجية (Biomass).

جـ ـ تحضير منتجات من داخل جسم الاحياء المجهرية نتيجة هدم الجدار الخلوي.

د ـ تحضير المادة الحيوية (Biomass) مـع تراكم مـواد نتيجة تـأثير الأحيـاء على مكـونات الوسط الغذائي.

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

1) عمليات تصنيع الأغذية

أ ـ 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 ـ تحويل جزء من المادة الغذائية إلى مواد أخرى

أيضاً هي إحدى العمليات في تصنيع الأغذية ولكن بطرق مايكروبيولوجية حيث يتضمن تحويل جزء من المادة الغذائية أو تحويلاً 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 ـ تحضير الاحياء المجهرية الحية Biomass

وهذا يعني تحضير الكتلة الحيوية Biomass نتيجة لنمو الأحياء المجهرية وخصوصاً السلالات المنتخبة والقياسية على الأوساط الغذائية سواء كانت أوساطاً سائلةً أم صلبة. وقد تكون هذه الـ Biomass ذات فائدة طبية أو ذات فائدة زراعية أو صناعية.

ولأجل الانتاج، مخطط رقم (1) يوضح المراحل الانتاجية والتي تبدأ بتحضير المزرعة المايكروبية والحفاظ عليها من تغير صفاتها، وذلك بالزراعة المستمرة وبأوقات مناسبة. حيث تعتبر المرحلة الأولى في الانتاج (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، واعداد الوسط الغذائي بالشكل المناسب بشكل مستحلباً أو محلولاً منتشراً وأحياناً قد يتطلب اضافة بعض المواد الكيماوية لأجل تبسيط مكونات الوسط ولأجل تأهيل الكائن المجهري للعمل، المثال عليها وهو انتاج الخمائر من مواد سليلوزية، فنحتاج إلى مواد تحلل السليلوز ومن ثم يمكن للخمائر من استهلاك الوحدات الكلوكوزية ثم تأتي بعد ذلك العملية التكنولوجية. فبعد تلقيح الوسط باللقاح المايكروبي يتم ملاحظة درجات الحرارة، الضغط، الحموضة، التهويه الكامل العملية 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 نمواً شديداً للـ 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 أيضاً على السائل المزرعي بكمية كبيرة والخطوة التالية هي كبس أو ضغط الـ Biomass أو تجفيفه.

ب) التحضير المايكروبيولوجي للكتلة الحيوية Biomass

إن انتاج الكتلة الحيوية تعتمد اعتماداً كبيراً على مقومات الوسط الغذائي ثم على طريقة الفصل وعملية التجفيف. فالمخطط رقم (3) يوضح العملية من المزرعة النامية إلى عملية الفصل ثم التجفيف والوصول إلى المنتوج النهائي. كذلك يجب السيطرة على العملية للحصول على المنتوج بالشكل المطلوب.

جـ) 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 البايوماس 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 الأساس والمثالي لهذا النوع من الانتاج، حيث أن المادة المرغوبة في جسم الكائن الميكروبي تستخلص بواسطة الطرق التالية:

أ ـ الطريقة الترسيبية:

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

المادة المرغوبة س تظهر عند اضافة 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 ذلك المركبات الأمينية والتي تكون مع الحوامض أملاحاً غير ذائبة.

$$\begin{matrix} R' & & & R' \\ \diagdown & & & \diagdown NH.HCl \\ \diagup NH + HCl & & \longrightarrow & \diagup \\ R'' & & & R'' \end{matrix}$$

ملح غير ذائب

المركب المرغوب هذا يمكن أن يكون حامضاً عضوياً والذي بنتيجة اتحاده مع الأيون اللاعضوي مثل الكالسيوم يكون ملحاً غير ذائب.

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

والمادة المرسبة يمكن أن تضاف على شكل محاليل بعد اذابتها في الماء وتكون اضافتها بكمية معينة وبنتيجة المزج نحصل على المادة المرغوبة والمطلوبة.

هذه الطريقة يمكن اعتمادها نظرياً ولكن من الناحية العملية تكون صعبة التطبيق، وللتوضيح فإن محلول المادة الاعتيادي يكون ذا حجم كبير مع التركيز القليل للمادة وهذا يعني وجوب اضافة 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 ـ هنالك بعض الطرق التي ترسب المواد الجانبية والتي تعتمد بالأساس على ما تقدم أعلاه بحيث تعطى الظروف المعينة لترسيب جزء من هذه المادة.

جـ ـ طريقة التبادل الأيوني

إن المادة المرغوبة لأي عملية مايكروبايولوجية يمكن فصلها من 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 امكانية فصل المادة وإزاحتها وإجراء عملية تنشيط ثانية إلى المبادل في نفس الوقت حيث تكون العملية مستمرة.

أن 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 المنقية في المبادل الأيوني وبنتيجتها نحصل على مادة نقية كما في مخطط رقم (7). ومن ثم تجرى عملية التبادل الأيوني مرة أخرى للحصول على المادة المرغوبة.

د ـ طريقة الاستخلاص

المادة المطلوبة أو المرغوبة من عملية تخمر مايكروبايولوجية يمكن أن تفصل من محلولها 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).

وكتطور لهذه العملية حيث، عند عملية الاستخلاص للمادة في محلول المزرعة، يمكن أن تضاف بعض المواد المنقية 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.

هـ ـ 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 اضافة إلى الكتلة الحيوية (Biomass) كما هو موضح في المخطط (10) لتحضير المنتوج النهائي للمركزات الحيوية وكما يلي:

1 ـ 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 المتبقية وغير المهضومة من الوسط الغذائي.

2 ـ الترسيب بالفصل التالي:

تتضمن ترسيب الكتلة الحيوية (Biomass) مع المواد المرسبة الحيوية حيث أن المادة المرسبة الحيوية ستكون بحالة غير ذائبة، وبهذا ستنفصل من السائل المزرعي وتترسب مع الكتلة الحيوية. ان طريقة الترسيب بواسطة المواد المنشطة أو المرسبة يمكن أن تكون مختلفة، انظر المخطط (11). حيث يكون سائل الزرعة خالياً أو حراً من المادة المرسبة أو المنشطة بسبب ترسب كل المواد. وبعد فصل هذه المواد مع الكتلة الحيوية نحصل على المركزات الحيوية والتي يتم تجفيفها، المخطط (11). إن المخططات الكاملة والتي تمثل تجفيف المنتوج النهائي وبقاء المواد الجانبية الأخرى المترسبة والتي تكون في السائل ويمكن اجراء حالة تكنولوجية واحدة وهي تجفيف الكتلة الحيوية بعد غسلها

هـ ـ استعمال الأحياء المجهرية في التأليف الكيمياوي لتحويل مادة إلى مادة أخرى

تحت هذا الباب نتطرق إلى الأنواع الخاصة من الأحياء المجهرية والتي بعملية مايكروبايوجية صناعية يمكنها من استعمال خاصيتها لأن تحول أحد المواد الكيمياوية الى 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 للاحياء المجهولة 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 الاسيتون والبيوتانول.

وكذلك يمكن الحصول أيضاً على تحضير الكلوكونيك من الكلوكوز وأكسدته إلى D..

سوربت وإلى L- سوربيوت. أما المنتجات الوسيطة فهي Vit.C من الكلوكوز.

العمليات التكنولوجية - المايكروبيولوجية تستعمل ليس فقط لتحويل مواد من أصل واحد إلى منتوج صناعي نهائي، ولكن كثيراً ما تعمل لتكوين المركبات الكيمياوية المعقدة والتي لا يمكن انتاجها إلا بوجود الأحياء المجهرية لمرحلة واحدة أو لعدة مراحل وكمثل عليها انتاج فيتامين C من الكلوكوز بالطريقة التالية:

D- كلوكوز ⟵ D سوربت ⟵ L سوربوز ⟵ L حامض الاسكوربيك

حيث من هذا المخطط فقط المرحلة الثانية تجري بمساعدة الأحياء المجهرية، أما الخطوات الأخرى فهي عمليات كيمياوية. وهناك حالات لا تحتاج إلى تدخل الأحياء المجهرية ولكن فقط تستعمل الطرق المايكروبيولوجية كعامل مساعد لتأليف المركب الكيمياوي المعقد، وكمثال على هذه العمليات المايكروبيولوجية من هذا النوع ما يلي: -

1 - التخمر المباشر Direct Fermentation

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

2 - نمو المزرعة الميكروبية:

هنالك امكانية 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 الاحياء وتكاثر ومن ثم تنقل.

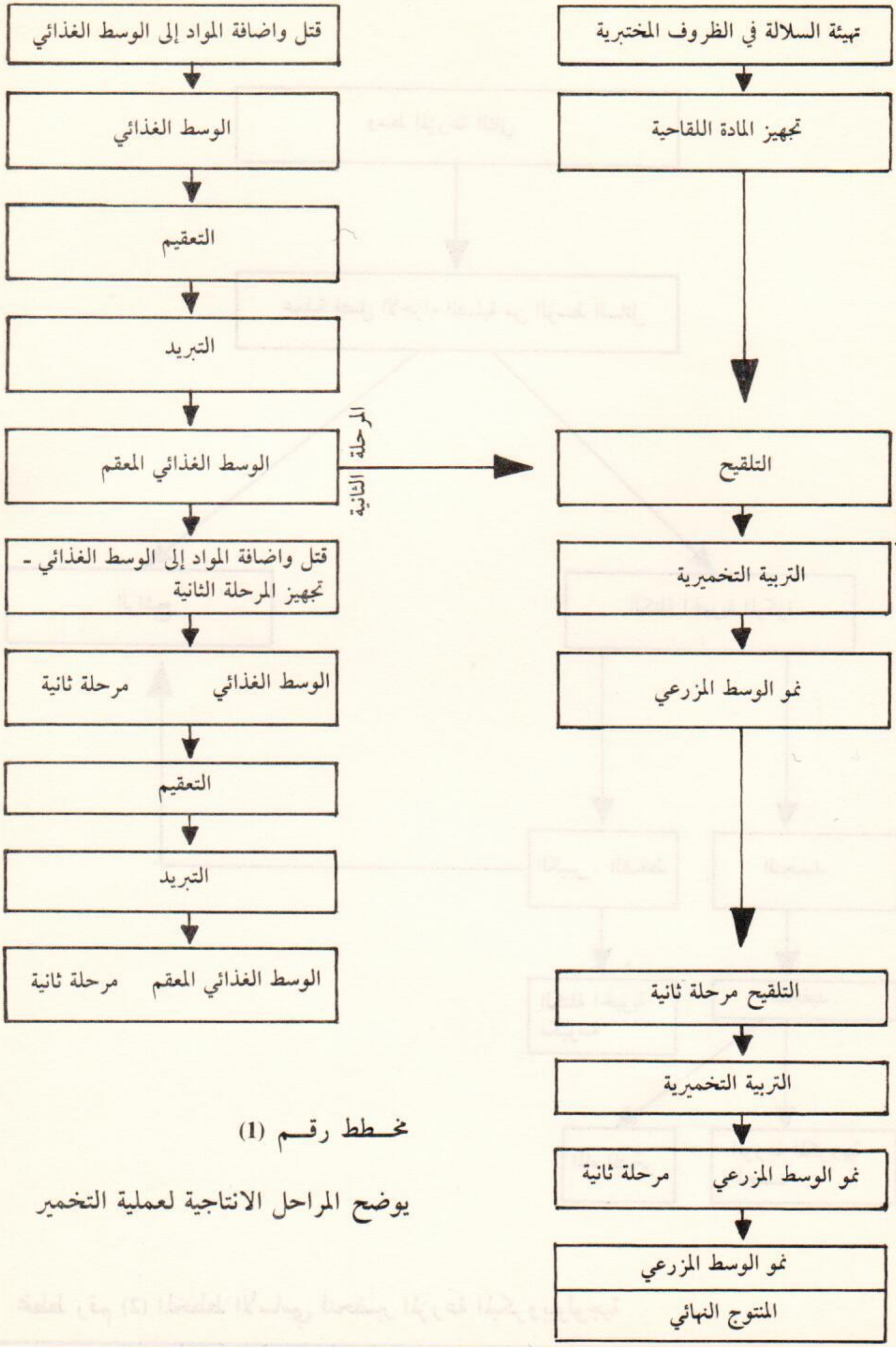
وهنا يظهر بأن ليس للأحياء المجهرية دخل بالتحويل بل للانزيمات التي تحتويها.

3 - محلول المزرعة المفصول: -

يمكن إجراء عملية التحويل من مادة إلى أخرى بواسطة استعمال محلول المزرعة المعزول أو المفصول من الأحياء، والذي يتضمن المواد اللازمة للتحويل.

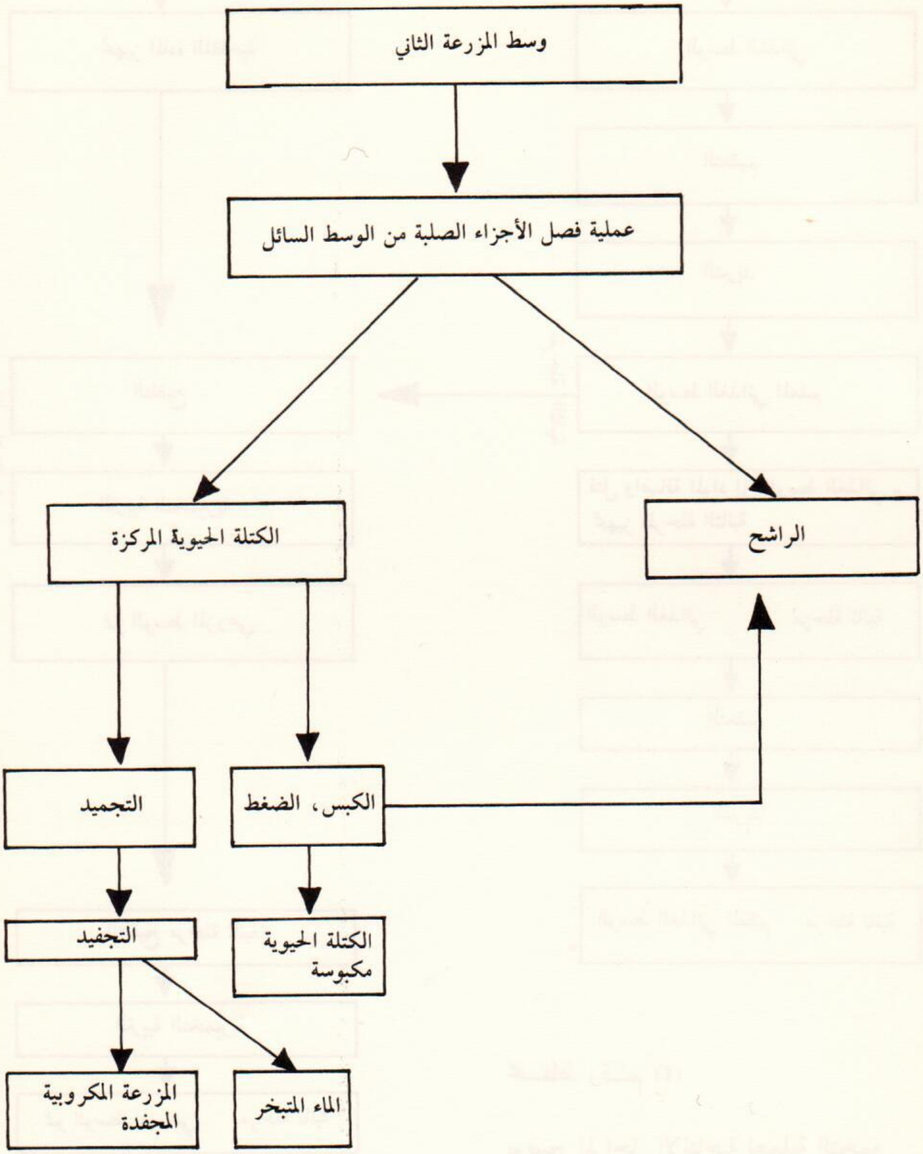
4 ـ المادة الحيوية المفصولة أو المعزولة:

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

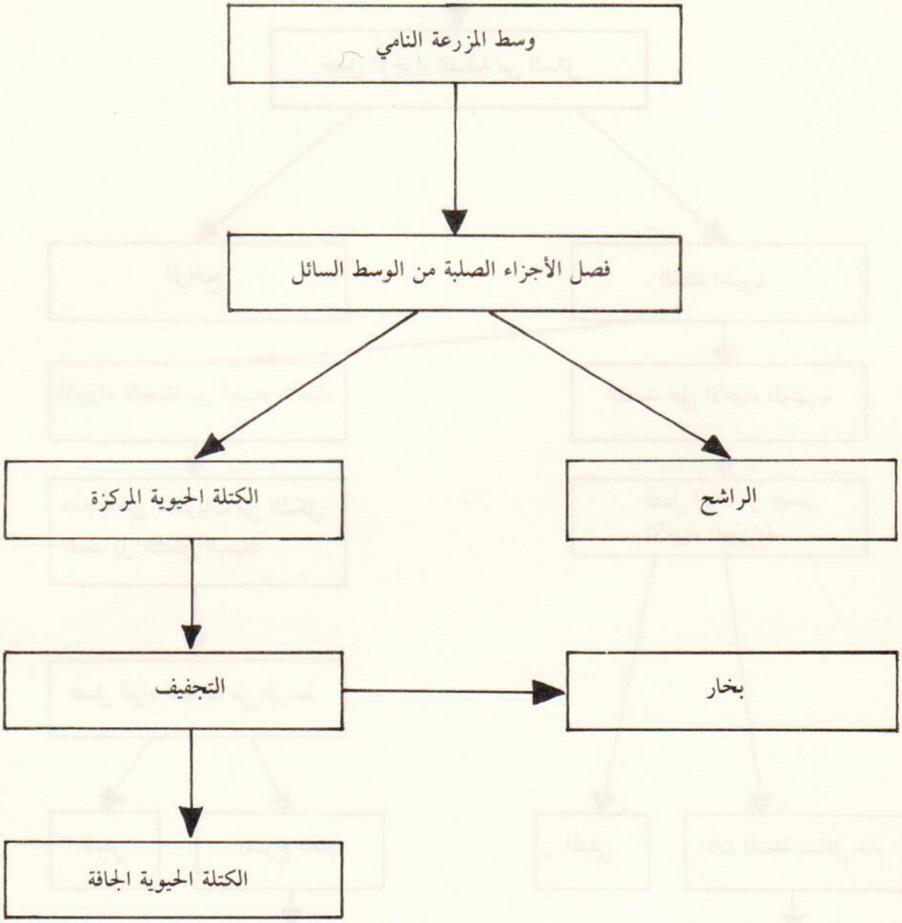


مخـطط رقـم (1)

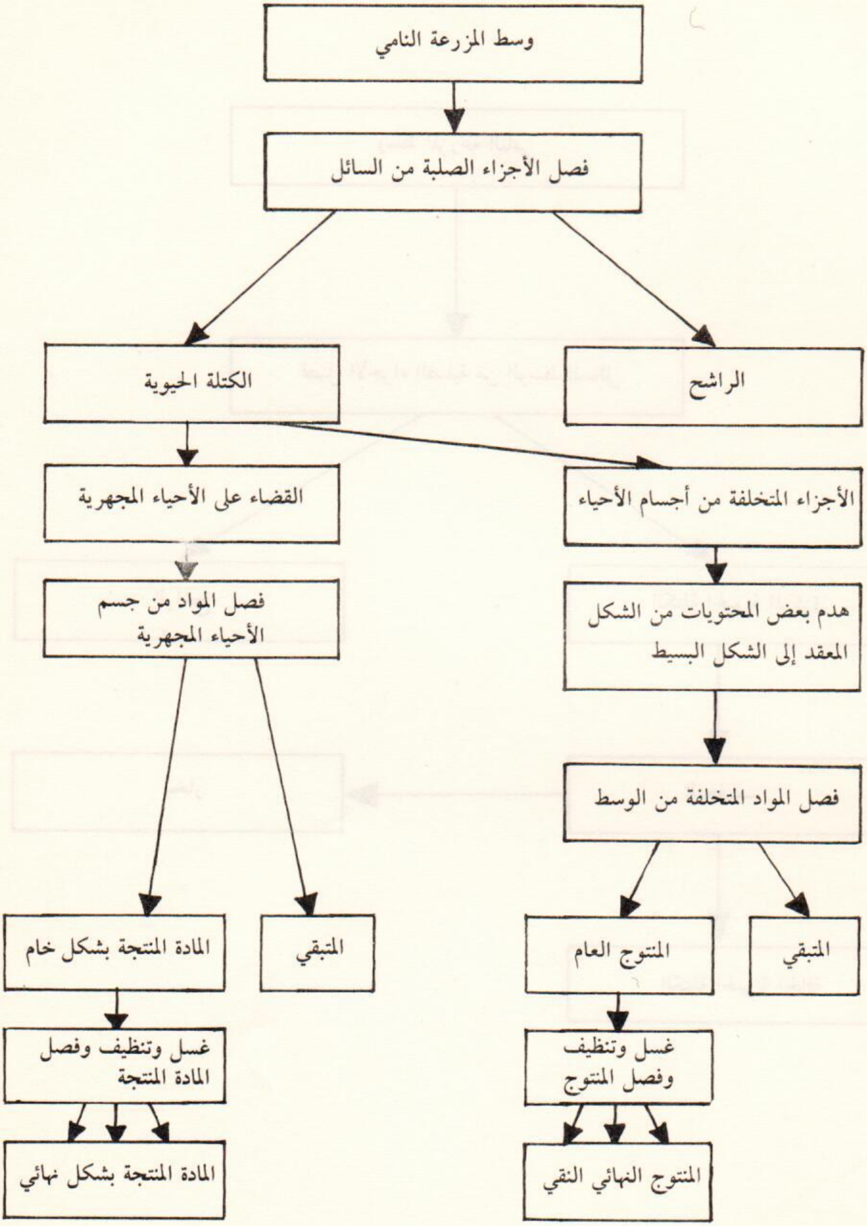
يوضح المراحل الانتاجية لعملية التخمير



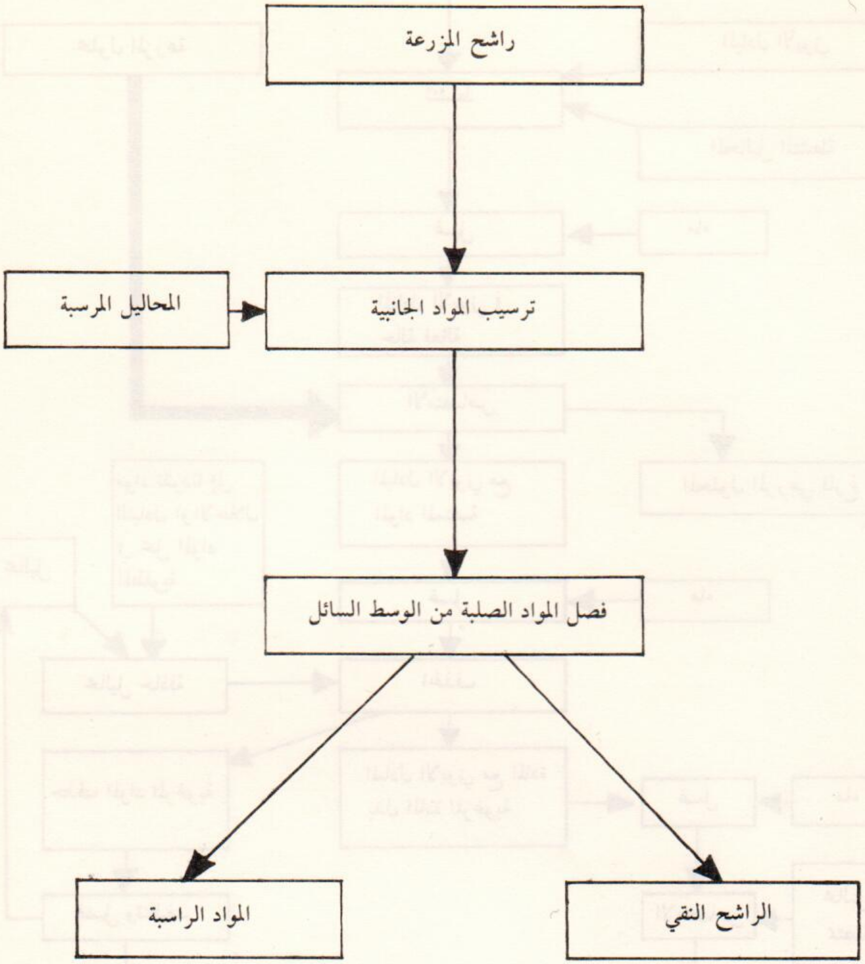
مخطط رقم (2) المخطط الأساسي لتحضير المزرعة الميكروبيولوجية



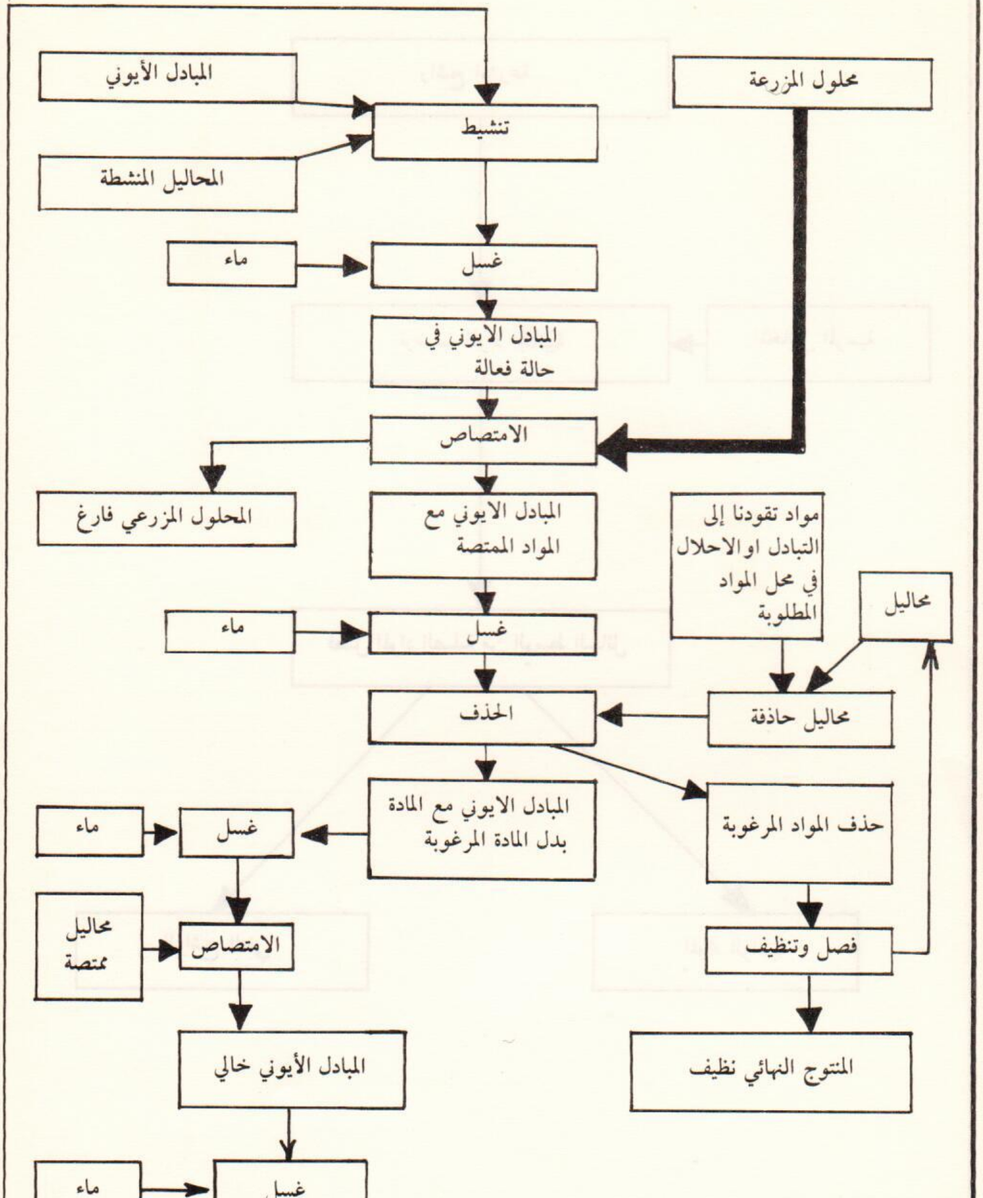
مخطط رقم (3) المخطط الأساسي لتحضير الكتلة الحيوية الجافة من وسط المزرعة



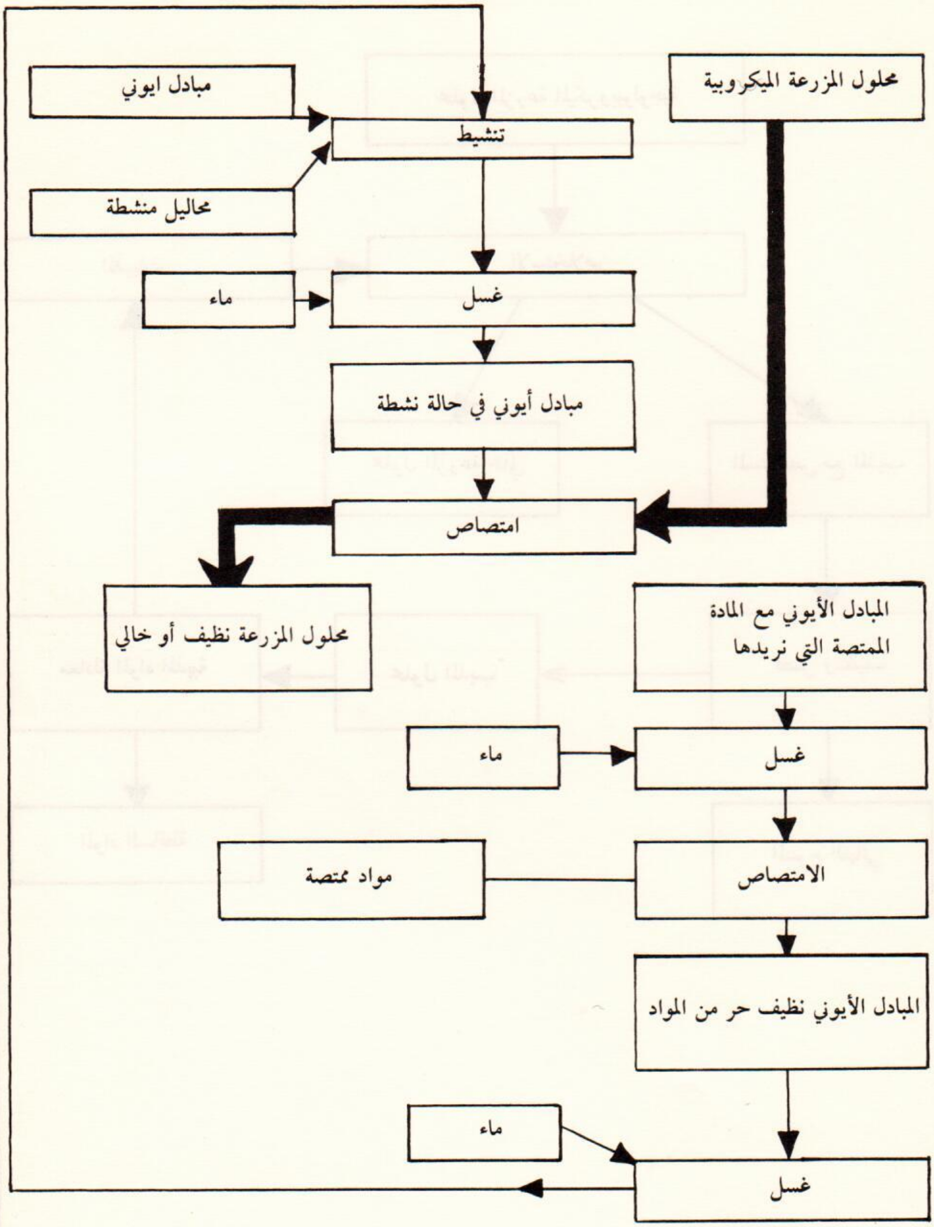
مخطط رقم (4) المخطط الأساسي لتحضير بعض المواد التي تتراكم في أجسام الأحياء المجهرية



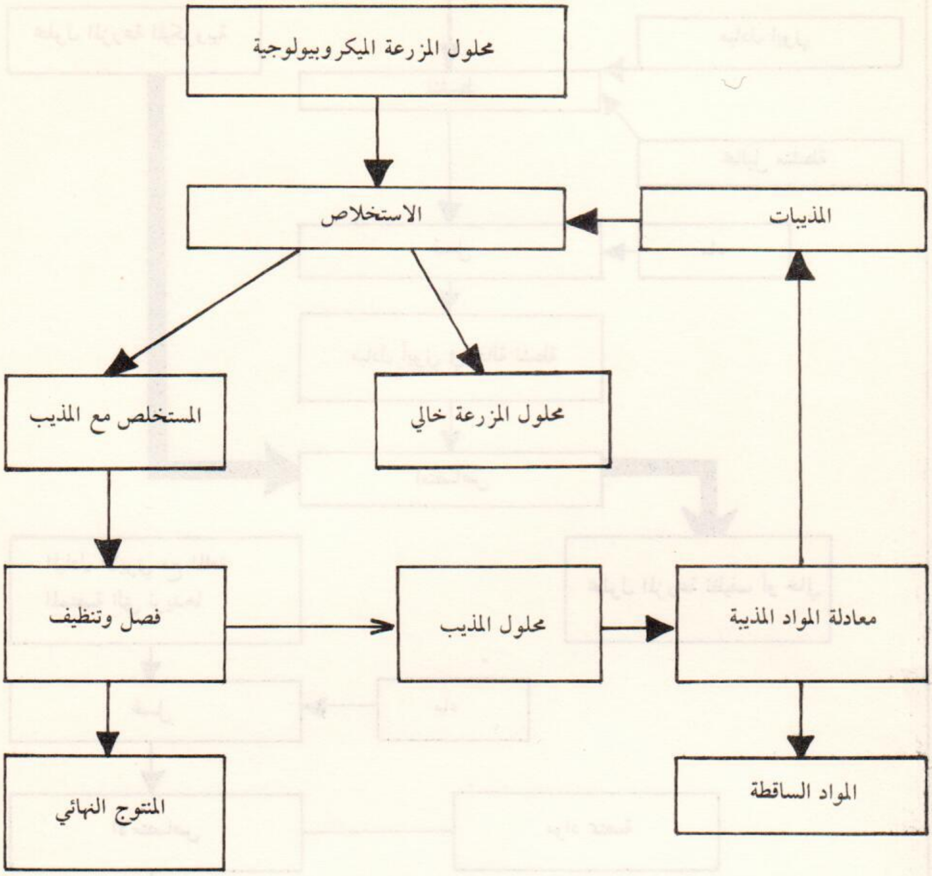
مخطط رقم (5) المخطط الأساسي لاستعمال الطرق الترسيبية كخاصية لتنقية الراشح



مخطط رقم (6) المخطط الأساسي لفصل المنتجات من الراشح عبر المبادل الأيوني

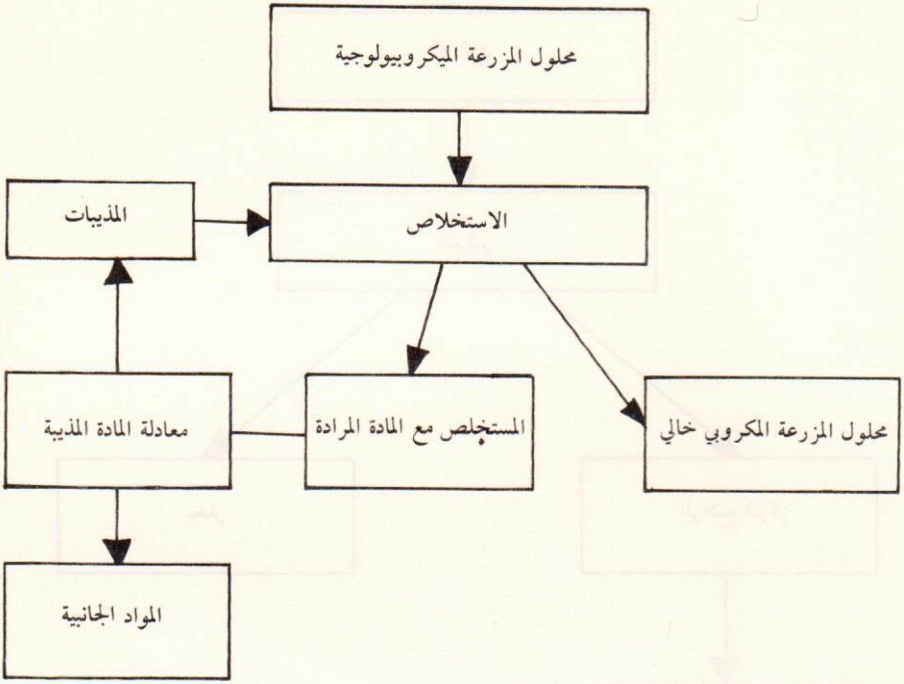


مخطط رقم (7) المخطط الأساسي لتنقية المحلول من خلال المبادل الأيوني

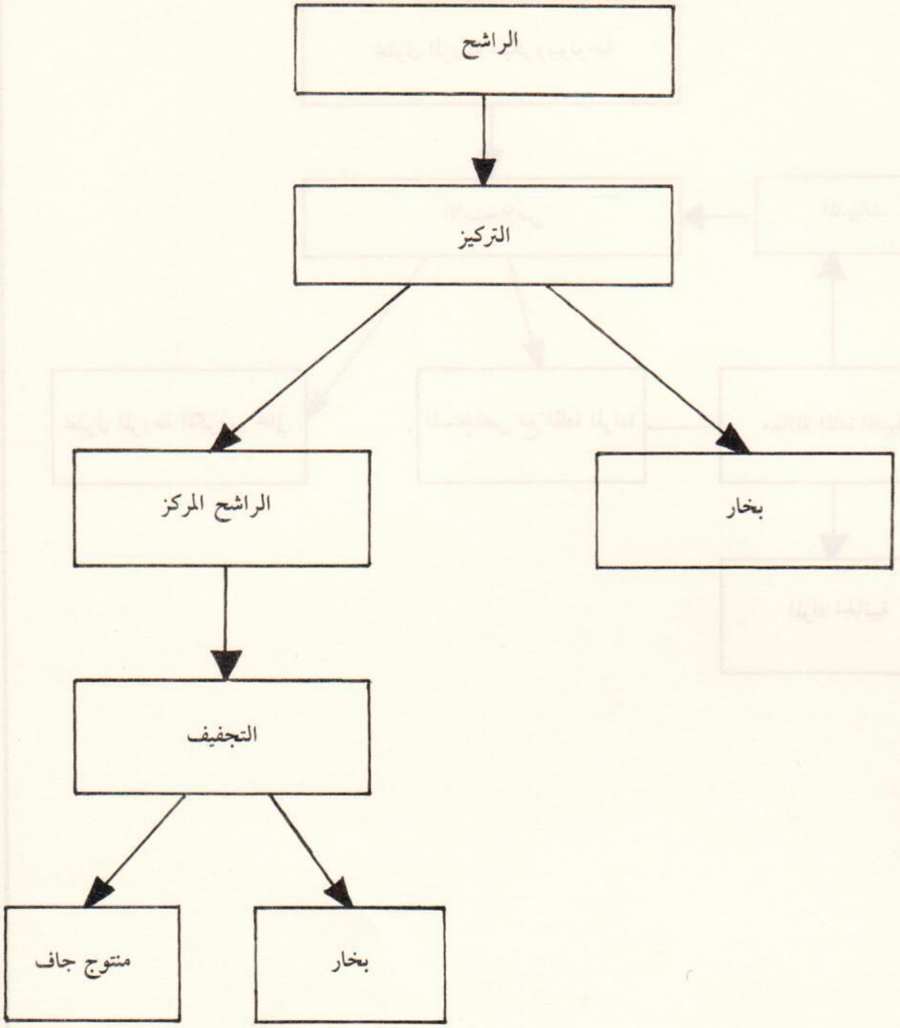


مخطط رقم (8)

المخطط الأساسي لفصل المنتجات من المحاليل الراشحة من خلال عملية الاستخلاص

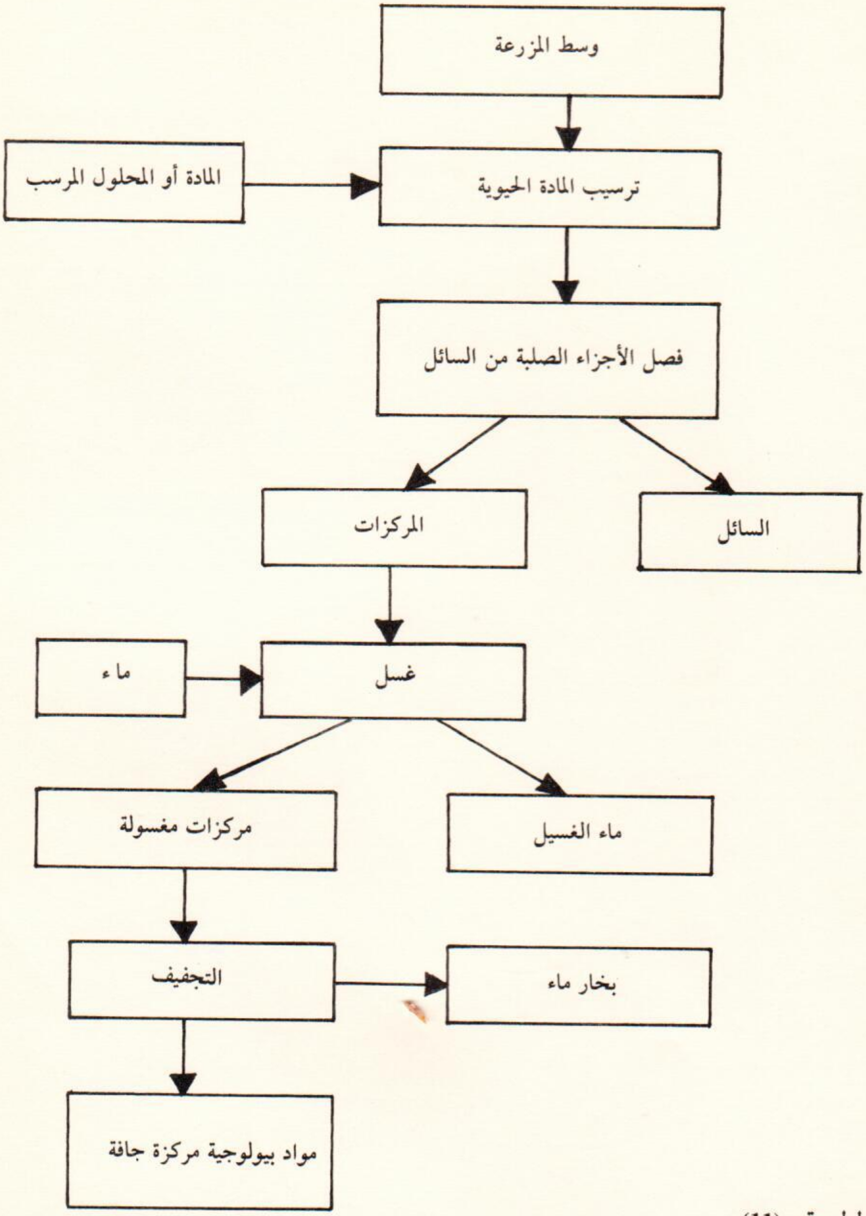


مخطط رقم (9) المخطط الأساسي لتنقية المحلول الراشح عبر عملية الاستخلاص



مخطط رقم (10)

المخطط الأساسي لتحضير المنتوج 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 الاحياء المجهرية والمصادر الخام

Nutrition in Microorganism and Raw Material

التغذية عند الأحياء:

كما بينا سابقاً 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 وانتاج مختلف الأشياء من المادة الغذائية (Substrate) وذلك حسب خواصها الوراثية حيث أن 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، فعموماً كل الأحياء المجهرية تحتاج في نموها إلى الماء ومصادر الطاقة (كربون، نايتروجين، الأملاح المعدنية) وفي كل الحالات تحتاج إلى الأوكسجين. ومن أهم الأشياء الأخرى اللازمة والضرورية هي توفير الظروف الملائمة من:

1 ـ الرقم الهيدروجيني (pH).
2 ـ طاقة الأكسدة والاختزال.
3 ـ درجة أو معدل الأملاح في الوسط... الخ.

مصادر الطاقة : ـ

إن الأحياء تحصل على الطاقة بالشكل التالي :

1 ـ من عملية الأكسدة ومن عملية هدم بعض المواد في الوسط الغذائي .
2 ـ من المواد الموجودة داخل جسمها .

عموماً فإن الأحياء المجهرية (Hetrotrophic) يمكن أن تستعمل مختلف المركبات العضوية مثل (الغازلين، البارافين) لأجل تكوين الطاقة، أما لأجل التأليف البيولوجي فتستعمل فقط المركبات العضوية ذات الترتيب المتماثل، وعموماً فإن الجزء الأكبر من المواد الغذائية في جسم الكائن الحي تستعمل لأجل الطاقة أما القسم القليل الآخر فتستعمل لحاجة البلاستيدات، وان الطاقة الكلية للعمليات الحيوية مبينة على الشكل التالي :

1 ـ حوالى 50% من الطاقة الكلية لتكوين البناء الخلوي .
2 ـ حوالى 20% تستخدم في العمليات المرغوبة .
3 ـ حوالى 30% تستخدم كمصدر للحرارة وأشكالها .

وكمية الطاقة الحيوية المتحررة نتيجة عمليات التأكسد تعتمد على درجة التأكسد، فكلما كانت درجة التأكسد كبيرة كلما كانت الطاقة أكثر، لذا فإن معامل الطاقة المتحررة عند التنفس كبيرة جداً مقارنة بالتخمر. أما عند التأكسد الكامل للجزيئة الغرامية للكلوكوز فستتولد حرارة بحدود (674,000) سعرة، أما عند التخمر فستتولد فقط (22,000) سعرة. اضافة إلى هذا فإنه يتحرر من جزيئة الكلوكوز الواحدة المتحولة إلى حامض الغنبيك طاقة تسمى طاقة التكوين غير المرئية. ولا يفوتنا بأن هنالك بعض الأحياء يمكنها من استعمال ضوء الشمس كمصدر للطاقة ولتعطي محله طاقة ضعيفة مع انتاج (CO_2) وهذه العملية تدعى بـ (Photosyntesis). ومجموعة أخرى من الاحياء تحصل على الطاقة من أكسدة المواد اللاعضوية (أمونيا، نترات، أملاح الحديد اللاعضوي) وهذه الأحياء خاصة (Homotrophic) وعليها الأمثلة عليها هي : ـ

1 ـ الأحياء التي تختزل مركبات الكبريت ومثال عليها (Thiobacillus).
2 ـ الاحياء التي تستعمل الكربون والمثال عليها (Hydrogemonas).
3 ـ الاحياء التي تستعمل مواد مختلفة والمثال عليها (Nitrosomonas).
4 ـ الاحياء التي تستفيد من الحديد.

وهنالك مجموعة أخرى من الأحياء تحصل على الطاقة من أكسدة المواد العضوية وتسمى بالـ (Hetrotrophic) وهي كثيرة حيث تستفاد من المواد العضوية مثل السكريات.

مصادر التغذية

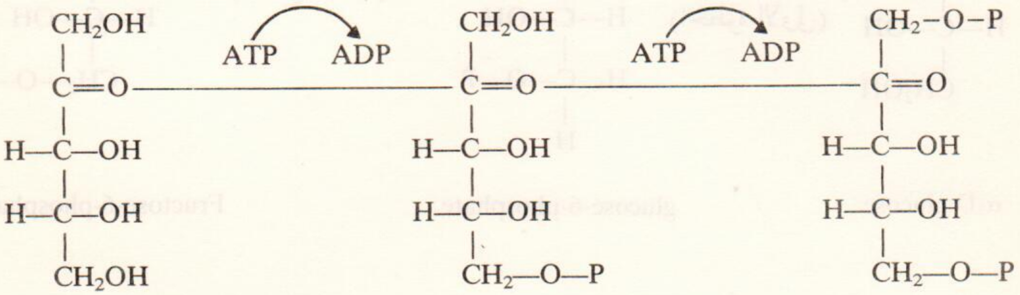
أولاً: المصدر الكربوني: -

ان الأحياء المجهرية تحتاج إلى المصدر الكربوني وذلك لأنه:

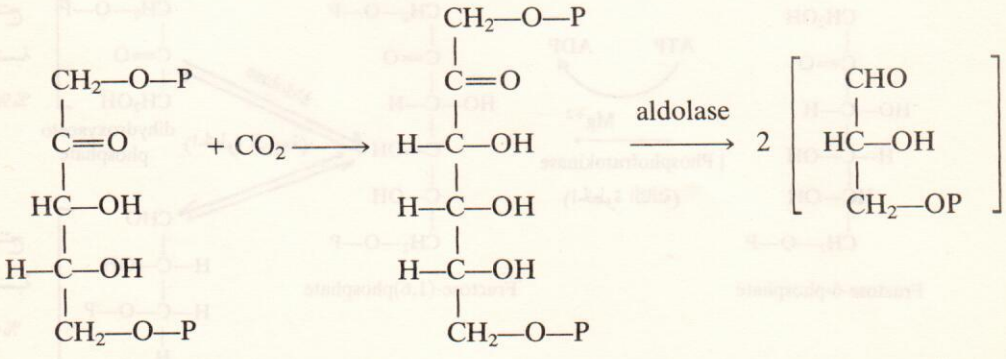
1 ـ ضروري ولازم لكل الأحياء.

2 ـ ضروري لتكوين المادة الميكروبية أو للتخليق الحيوي.

ويمكن للأحياء المجهرية الاستفادة من المصدر الكاربوني بالشكل التالي:

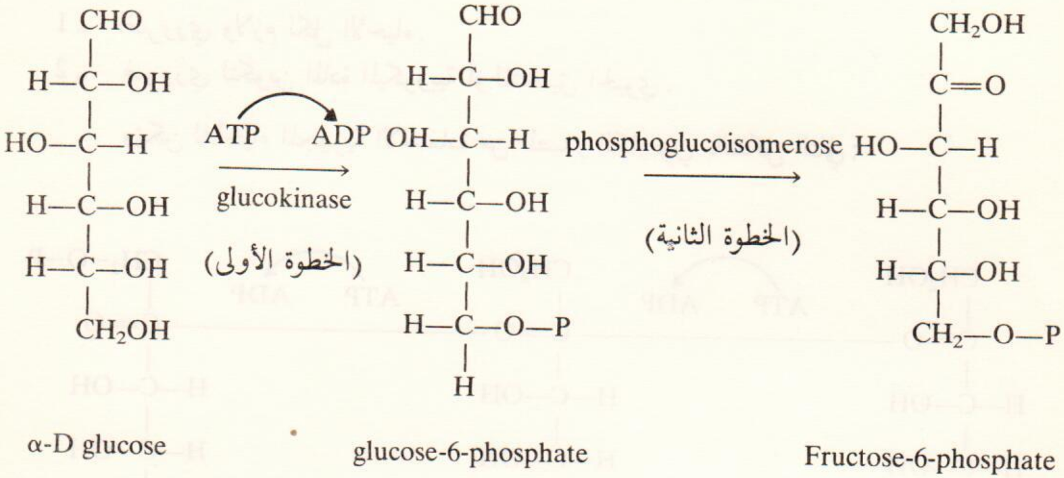


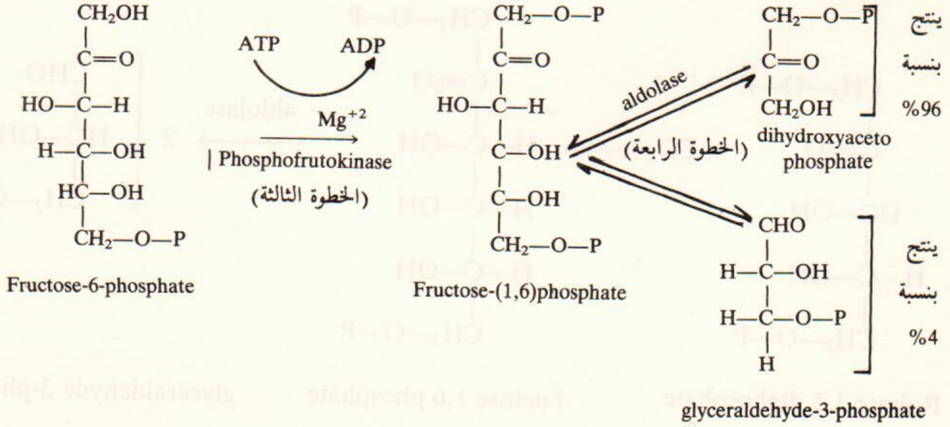
Ribose Ribose-5-phosphate Ribose1,5 diphosphat

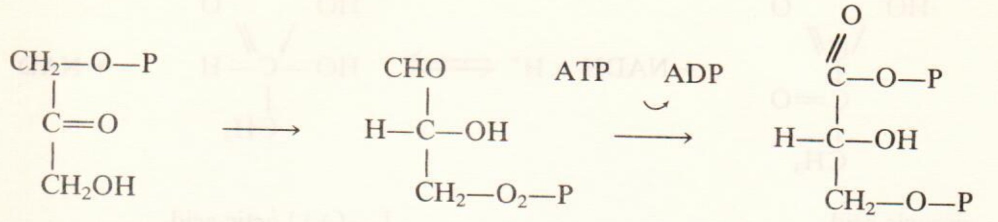


Robose 1,5 diphosphate Fuctose 1,6 phosphate glyceraldehyde 3-phosphate

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

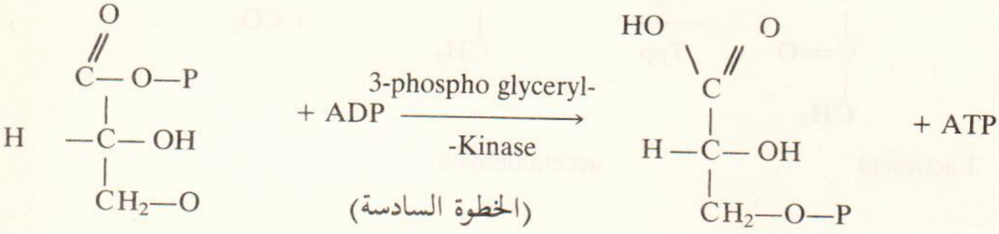




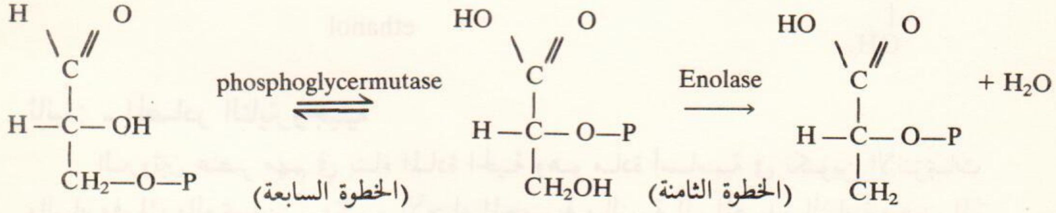


(dihydroxyacceto phosphate) glyceraldehyde-3-phosphate 1,3 diphosphoglycerine

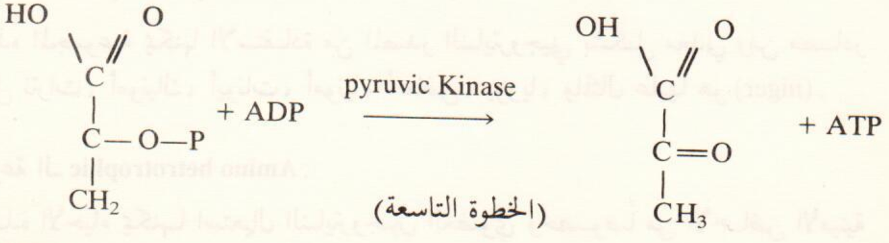
(الخطوة الخامسة)



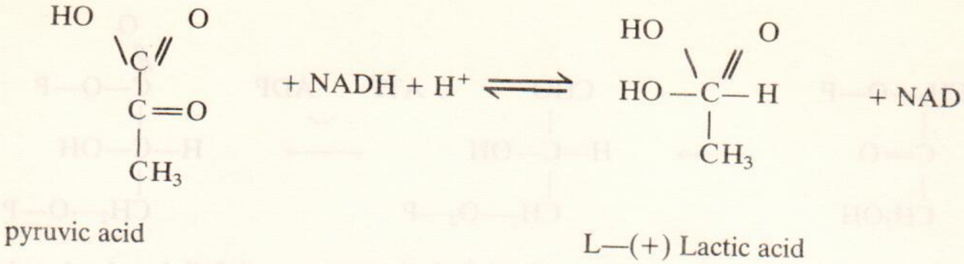
3-phosphoglycer acid



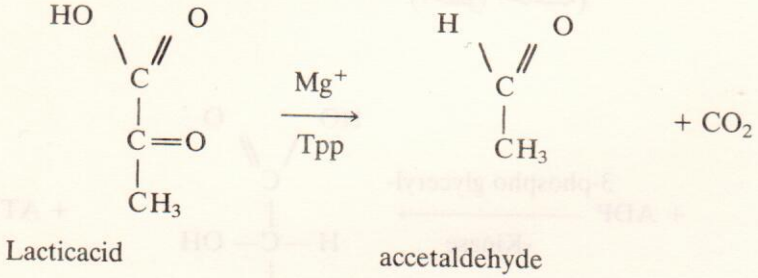
3-phosphoglycer- acid 2-phosphoglyceric-acid phosphoenalpyruvic-acid

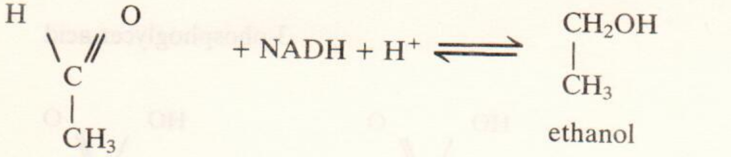


phosphoenalpyruvic Pyruvic acid



(الخطوة العاشرة)





ثانياً: ـ المصادر النايتروجينية

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

1 ـ مجموعة الـ Amino aphtotrophic

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

2 ـ مجموعة الـ Amino hetrotrophic :

هذه الأحياء يمكنها استعمال النايتروجين العضوي وخصوصاً من الأحماض الأمينية المنفصلة، وتستعمل المركبات النايتروجينية البسيطة.

ثالثاً: مصادر الأملاح المعدنية

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

الكبريت «S» يعتبر الكبريت من العناصر المهمة في البناء الخلوي للاحياء المجهرية حيث يمكنها الاستفادة منه بصوره المختلفة.

الفوسفور «P»: ـ الأحياء المجهرية تتمكن من هضم الأملاح الفوسفاتية بسهولة كبيرة وكذلك بعض الحوامض الفوسفورية وخصوصاً حامض الارثوفوسفوريك orthophosphoric acid علماً بأن عنصر الفوسفور مهم في البناء الخلوي للأحياء المجهرية ولكنه في بعض الأحياء يكون له تأثير سلبي خصوصاً على العفن Asp. niger.

البوتاسيوم K: ـ عنصر البوتاسيوم أيضاً من العناصر الأساسية في نمو وتكاثر الاحياء المجهرية وفي انتاج البروتين بنسبة عالية علماً بأن للبوتاسيوم تأثيراً كبيراً في انتاج البروتينات.

المنغنيز Mn: ـ يعتبر المنغنيز من العناصر الضرورية لأجل نمو وتكاثر الأحياء المجهرية. لذا فإن الضرورة البايولوجية من الأملاح المعدنية في الأحياء المجهرية تتمثل في بناء الأجزاء الخلوية وفي تكوين الانزيمات والتي لها دور في تخليق بعض المواد كالصبغات والمضادات الحيوية... الخ. اضافة إلى دورها الفسلجي في الكائن المجهري الحي.

رابعاً: عوامل النمو Growth Factors

أ ـ 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)، فمثلاً بكتريا حامض اللبنيك تحتاج إلى إضافة فيتامين (B_2) وخميرة Sacch. Oviformis تحتاج إلى (Bioten).

ب ـ بعض المواد الكيمياوية التي تساعد في تهيئة المركب في الوسط:

إن بعض الأحياء المجهرية تتعدى في احتياجاتها إلى أكثر من عنصري الكربون والنتروجين لأجل نموها وتخليق بعض المركبات العضوية والفيتامينات، والمثال عليها بكتريا

(propionibacterium shermanii) التي تحتاج إلى عنصر Co و 5,6 dimethyl Benzel لانتاج فيتامين (B_{12}). وكذلك تحتاج الأحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية كالكلوروتتراسايكلين والكريزوفولفن إلى عنصر Cl لانتاج حامض بنزل بنسلين.

جـ ـ مكونات الوسط:

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

د ـ موازنة الوسط:

لأجل أن يكون الوسط مثالياً ـ لنمو الاحياء المجهرية ـ لا بد من موازنة المواد الداخلة في الوسط الغذائي المستعمل في التربة حيث يجب ربط الموازنة بين (C ، N).. الخ.

هـ ـ حالات النمو:

ان تنمية احدى المزارع المجهرية على أوساط غذائية يمكن أن يمر بطورين:

الطور الأول: طور نمو الأحياء المجهرية.

الطور الثاني: هو الطور التأليفي البيولوجي للمواد.

وهذان الطوران يتحددان بكثير من العوامل والظروف الخارجية.

و ـ سرعة نمو الاحياء:

ان سرعة نمو الاحياء تتوقف على عدد اجسام الأحياء الموجودة وعلى السرعة العامة للأحياء الظاهرة وعلى السرعة الخاصة لنمو الاحياء وكذلك على تركيز المواد.

منتوج		منتوج		انزيم		مركب معقد		مادة		انزيم
P_2	+	P	+	E	⟵	ES	⟵	S	+	E

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

سرعة التفاعل لكل تركيز انزيمي يتحدد بمعادلة ميكالسن:

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

فالسرعة الممكنة لتفاعل المواد العضوية = V_1

التركيز المولي للمواد الداخلة في التفاعل S

ثابت ميكالسن لتركيز المادة المتفاعلة Km

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

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

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

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

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

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

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

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

ز ـ درجة حموضة الوسط:

ان لدرجة الحموضة دوراً كبيراً في تغذية الاحياء المجهرية حيث ان لكل كائن حي درجة من الحموضة التي تمكنه من النمو والتكاثر، فمثلاً العفن P. chrysoginum درجة pH المثالية هي «5» أما لتخليق المضادات الحيوية فيتم عند pH «6.5 - 7.5».

ح ـ التركيز المثالي لمختلف المواد الداخلة في الوسط الغذائي وتوفر عملية التهوية والتحريك:

وأخيراً فإن توفر هذه العوامل يعطي الدور المثالي لتغذية الاحياء 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 انتاج 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 وادخالها في عمليات بنائية عادة تدعى بالتغذية. علماً بأن ليس جميع الأجزاء الداخلة من المحيط الخارجي تستعمل كمادة غذائية، وقد تكون هذه الأجزاء ضرورية لخلق الظروف المثالية ومنها اعطاء درجة الحموضة «pH» المثالية والمحددة للمحيط وتوازن الأملاح، وتحدد مستوى الأكسدة والاختزال والضغط الأزموزي الملائم.

ميكانزم التغذية:

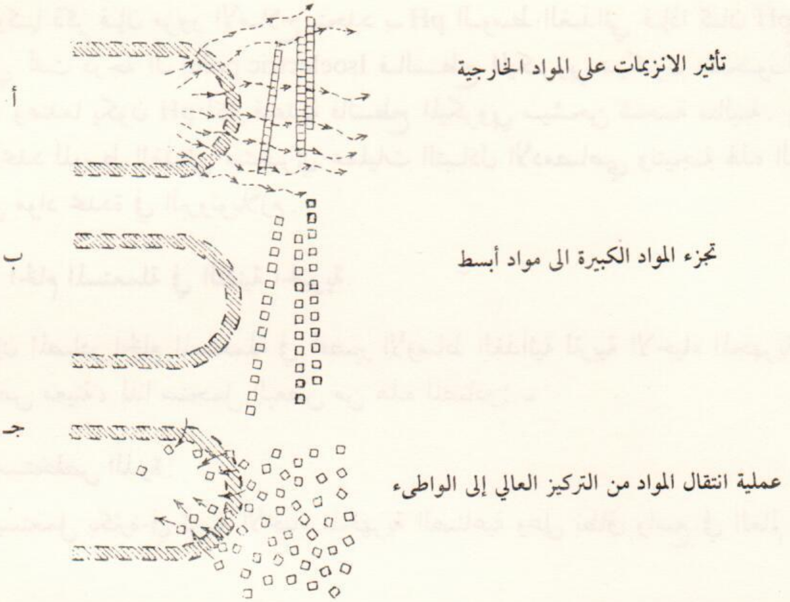
ان دخول المواد الغذائية إلى الجسم الميكروبي يتم بطريقة الانتشار والتبادل الإدمصاصي وان سرعة الدخول تعتمد على استهلاك المحلول الغذائي في الجسم الميكروبي، وعلى النفاذية وعلى الخاصية التنافذية للأغشية الميكروبية (الجدار الميكروبي) والغشاء البروتوبلازمي وأخيراً يعتمد على خواص المواد. وعندما تتهيأ كل هذه الظروف لهذه المواد الغذائية التي تدخل من خلال الأغشية الميكروبية وتستعمل لعملية البناء أو لعملية انتاج الطاقة فهذا يؤمن النمو السريع والتكاثر.

من 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 مثلاً لكثير من البكتريا لا يسمح أو لا يدخل الدكسترين ذا الوزن الجزيئي فوق 10,000 وهنالك أمثلة كثيرة على هذا الموضوع.

ومن الواضح فإن فتحات الجدار الميكروبي والأغشية الميكروبية تلعب دوراً أساسياً لهذه العلاقة وتحدد دخول المواد، ويعمل الانتشار على الفرق في التركيز على جهتي الغشاء فقط والأخذ بعين الاعتبار مقدماً التركيب الكيمياوي وتركيب الأعضاء الميكروبية.

يكون واضحاً 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» يزداد سرعة انتشارها في جسم الميكروب، كما أن الجزيئات الكبيرة يمكن تحللها بواسطة الانزيمات Exoenzyme وبذلك تكون المواد بسيطة ودقيقة وقابلة للذوبان وذات جزيئات صغيرة نسبياً، وهذه المواد الذائبة في الماء تصبح قادرة لأن تدخل الجسم الميكروبي. فمثلاً مادة السكوربيال تتحلل من قبل الأميليز إلى مالتوز والسيليلوز بواسطة انزيم

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



Cellulase إلى سكريات بسيطة، والمواد البروتينية بواسطة انزيم البروتينز Proteinase تتحول إلى أحماض أمينية، والدهون بواسطة انزيم Lipase تتحول إلى الكلسيرين وأحماض دهنية.

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

أما المواد الأخرى كالسكريات والكحول... الخ لا تتحلل فإنها تمر من خلال جدران الأجسام الخلوية بسهولة لأنها تحتوي على مجموعات قطبية، مجموعات أوكسجينية، مجموعات كاريوكسيلية، 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 يملك مجموعة هيدروكسيل واحدة.

أما مرور الأملاح المعدنية يتحدد بالشحنة الكهربائية للغشاء البروتوبلازمي البكتيري وبدرجة التأين للأملاح وكذلك بـ 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 بـ pH الوسط الغذائي فإذا كان pH الوسط الغذائي تحت درجة الـ 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 الأدمصاصي ونتيجة لهذه العمليات ستدخل مواد محددة في البروتوبلازم.

المصادر الخام المستعملة في التقنية الحيوية

إن المصادر الخام المستعملة في تحضير الأوساط الغذائية لتربية الاحياء المجهرية اعتيادياً 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 ظروفاً جيدة لنمو الأحياء وكذلك يساهم في خلق المكونات الأساسية وهذا المستخلص يحصل عليه كناتج عرضي من مصانع انتاج النشا من الذرة، ويكون هذا المستخلص غني بالحوامض الأمينية، علماً أنه يحتوي على عنصر الكبريت والفسفور والكالسيوم.

الفول:

مستخلص الفول يعتبر من المصادر المعروفة في تربية الأحياء المجهرية الصناعية وعلى نطاق واسع في العالم لما له من مزايا كثيرة حيث يحتوي:

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

علماً أن رماد الفول يحتوي على العناصر التالية (S، Mg، Fe، P، Ca).

الشعير:

مصدر خام ومشهور في عالم انتاج البيرة وله تطبيقات واسعة وذلك لاحتوائه على المصدر الكربوهيدراتي (النشا) اضافة 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 المايكروبيولوجية، ولكن لأهمية عصير العنب ولتزايد الطلب عليه بشكل طازج أصبح استعماله في خطوط التصنيع الميكروبيولوجي يتناقص ـ ولكن أحياناً يستعمل في بعض خطوط الميكروبيولوجية وذلك لأهمية محتوياته وهي: ـ

سكريات	%17
حوامض	%1
رماد	%0.8

ورماد العنب يحتوي على عنصري (P، K) لكن عصير العنب يحتاج إلى اضافة «$CaCO_3$» لتعديل درجة حموضة العصير، علماً أن «$CaCO_3$» لا يؤثر في خواص الوسط الغذائي.

المصادر الكربوهيدراتية

كثيراً ما نستعمل في التربية الصناعية للاحياء (نشا، سكروز، لاكتوز، الكلوكوز).

اللاكتوز:

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

السكروز:

يستخرج من قصب السكر «Saccharium officinarum» ومن بنجر السكر «Beta alba» حيث يستعمل في الانتاج الميكروبي ويكون استعماله على الأشكال التالية: ـ

أ ـ السكروز الأبيض أو الاعتيادي.
ب ـ السكروز الخام القهوائي اللون غير النقي.
حـ ـ 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 النشاط يحضر من الذرة. وهناك نشا البطاطا. وللنشا صور متعددة منها (الاميلوز، الاميلوبكتين، النشا الحيواني، الكلايكوجين، الاميلوبكتن) وهنالك صعوبة في استعمال النشا حيث يجب أن يحلل إما بواسطة المواد الكيمياوية أو الانزيمية إلى شكل أبسط (الكلوكوز) والذي يمثل مادة غذائية جيدة للأحياء.

أما عند التخمر الصناعي أو شبه الصناعي فيستعمل أيضاً الدكسترين الذي له حجم جزئي بين النشا والكلوكوز ويمكن تحضيره بالسيطرة الكيمياوية أو الانزيمية لتحلل النشا.

المولاس:

سائل لزج بني غامق كثافته 1.4 غم/سم^3 تقريباً 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 الاحادية والثنائية والمركبات العضوية النتروجينية وغير النتروجينية والأملاح المختلفة. والمولاس على نوعين:

أ ـ مولاس البنجر: وهو الناتج العرضي من استخلاص السكر من البنجر.
ب ـ مولاس القصب: وهو الناتج العرضي من استخلاص السكر من القصب.

محتوياته:

يحتوي المولاس التجاري على حوالى 20% من وزنه ماء بينما المولاس المنتج من المعامل تكون نسبة الماء فيه ما بين 12-17 وزناً، لذا يخفف عند التصدير لغرض اذابة بلورات السكر الناعمة، أما ما يحتويه من كربوهيدرات حيث يحتوي المولاس على عناصر الكربون والأوكسجين والهيدروجين وتكون نسبة (H_2 إلى O) كنسبتها في الماء ويكون السكروز القسم الأعظم أو الأكبر 33.4-48.5% من محتوياته مولاس البنجر كما أنه يحتوي على كمية قليلة من

السكريات المنقلبة 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، اميدان، أما المركبات العضوية غير النايتروجينية فهي، البكتين، انصاف السيليلوز، أحماض العضوية أوكزاليك، خليك، سكسنيك، كلوناميك، تارتاريك، ستريك. . . الخ.

أما الأملاح فيتضمن أملاح (Na، K، Ca، Mg، Fe) والمولاس غني بفيتامين (B_1، B_6). لذا فإن المولاس وسط غذائي مهم لتغذية الأحياء المجهرية.

التحلل الكامل للخشب:

ان الخشب المتحلل لا يستعمل على نطاق واسع في الصناعات الميكروبيولوجية ولكن يستعمل في انتاج 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 ـ السكريات العامة (سكريات مختزلة)	3.26
2 ـ مواد غير سكرية	%0.16
3 ـ هكسوز	%2.38
4 ـ أحماض عضوية	%0.38
5 ـ فورفورال	%0.052
6 ـ أوكسي ميثل فورفورال	%0.04
7 ـ 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%

الفصل الرابع

المبادىء الأساسية في التعقيم والتطهير

Fundamental Principles in Sterilization And Disinfection

من أساسيات أي عمل مايكروبيولوجي، ولأجل الدقة العلمية في هذا المجال ومنع التلوث والسيطرة على الفعاليات الحيوية وتوجيهها بالشكل الصحيح، وللحصول على أحياء مجهرية (عزلات) نقية، لأجل هذا كله كان لعملية التعقيم والتطهير مكان مهم في علم المايكروبيولوجي العام والتقني 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 المبادىء الأساسية لأجل قتل الاحياء المجهرية والحد منها.

التعقيم: -

هو القضاء على جميع الأحياء المجهرية الموجودة في الوسط أو في المادة المعطاة. وقد استعمل الكثير من طرق التعقيم منها استعمال الحرق تحت درجات حرارة عالية وكذلك استعمال بعض المواد الغازية المتنوعة. (غاز الفورمالدهايد، أثيل أوكسايد، B- بروبيو لاكتون وغيرها) ومختلف المركبات الكيمياوية الأخرى، وكذلك أشعة الترافايوليت. أشعة الجاما ultrafiltration.

التطهير:

هو قتل أو طرد الأحياء المجهرية المرضية، وتحت عملية التطهير يمكن أن نصل إلى التعقيم ولكن عملية التطهير لا تعني التعقيم والتطهير كأساس يعتمد على المواد الكيمياوية كحامض الكربونيك، الفورمالين وغيرها وفيه تقتل جميع الأحياء الخضرية الاعتيادية، ولكن ليس دائماً، لأن القضاء على السبورات والمواد المستعملة لأجل التطهير تسمى مواد التطهير Disinfection ويمكن أن يستعمل لها اسم antiseption (antiseptic) وهذه المواد تستعمل لأجل قتل أو منع نمو الأحياء والتي توجد في قربها احتكاك مباشر وأن عملية التطهير تستعمل دائماً لتطهير الخزانات، المكائن، الملابس والمواد وغيرها.

Antiseptic matter :

تسمى المواد التي تستعمل لأجل قتل أو منع نمو الأحياء والتي توجد باحتكاك مباشر مع هذه المواد، فالمواد القاتلة Bacterioside والتي لا تقتل تسمى Bacterioseptic وهذان النوعان يعتمدان على نوع المادة وتركيزها في الوسط. وتحت كلمة aseptic كان يستعمل لغرض التعقيم للتخلص من الاحياء المجهرية المرضية في الوسط والأدوات، أما الآن فقد استعمل Bacterioside.

Bacteriostatic :

يقصد بهذا العنوان ايقاف نمو الاحياء المجهرية بمواد microbiostatic مثل Bacteriostatic أو Fungeostatic حيث أنها لا تقتل الاحياء حالاً بل توقف من عملية تكاثرها وفي النتيجة تقلل من عدد الأحياء الموجودة. الكثير من المواد المطهرة Microstatic لها تأثير على الأحياء، لكن عند زوال المطهر نرى أن الأحياء تعود إلى التكاثر من جديد وخصوصاً المستحضرات الموجودة مثل المضادات الحيوية (السلفاميد) لها تأثير Microbiostatic.

ميكانزم التعقيم والتطهير

ان عملية التطهير والتعقيم تعتمد على ثلاث نظريات:

(1) بواسطة مواد أو مركبات كيمياوية.
(2) بواسطة الأشعة بوحدات معينة والتي تأثر في جسم الكائن المجهري الحي.
(3) استعمال الحرارة الجافة والرطبة. وجميعها تقودنا إلى ما يلي:

(1) تخثر البروتين:

المواد الكيمياوية والحرارة العالية تؤثر على النظام الغروى والبروتوبلازمي والتي تنشأ عندها تغيرات في علاقاتها، ونتيجة لهذا سيحدث تخثر للبروتين. فأيون النحاس Cu^{++} والزنك Zn^{++} والحديد Fe^{+++} والتي لها شحنات ايجابية يمكنها من معادلة الشحنات للأجزاء الغروية، وبنتيجة هذه المعادلة سترسب. 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 ثلاثيه 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 الكيمياوية 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 الكيمياوية الخاصة (المتخصصة):

هناك بعض المجاميع (مركبات كيمياوية والتي في تراكيز واطئة يمكنها من ايقاف مجموعة وظائف لانزيم معين. والمثال عليها المضادات الحيوية (السلفاميد) التي يمكنها من ايقاف بعض الانزيمات 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 جسم الكائن الحي أو على الانزيمات وبنتيجة هذه العملية تُخرب أو تعمل على تلف نفاذية الأغشية الميكروبية، وكذلك تعمل على أتلاف حيوية الانزيمات 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 تقوم بواجبه. فتأثيره microbioside يكون قوياً جداً في المحيط المائي أو الوسط السائل، حيث الماء يكون عامل ملطف لتخثر البروتين وهذا يعتمد على عوامل فيزيوكيمياوية. وطبيعي بدرجة واطئة من الـ Hydration (التجفيف) لبروتوبلازم الأحياء.

فالسبورات مثلاً يكون الماء فيها بارتباط ثابت وبدون خاصية الماء الحر، لذا ستبقى السبورات لفترة طويلة. فالحرق وتأثير المواد الكيمياوية 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 (كيمياوياً أو فيزياوياً) تؤثر في مزرعة ميكروبية في درجة حرارة ثابتة وتركيز معين و pH معين وزمن معين.

التعقيم عند درجة الحرارة العالية

ان 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 65° م ولفترة معينة صغيرة والتي عندها ستقضي على الاشكال الخضرية والبسترة يمكن أن يكون على درجة حرارة 65° م 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 الاحياء المجهرية الخضرية ولكن الأشكال السبورية تتحدد ويمكن أن لا تجرى هذه العملية بنفس اليوم بل تترك المادة لتبرد ليوم وتعاد عملية التعقيم.

أنواع التعقيم

التعقيم الجاف Dry Heat Sterlization

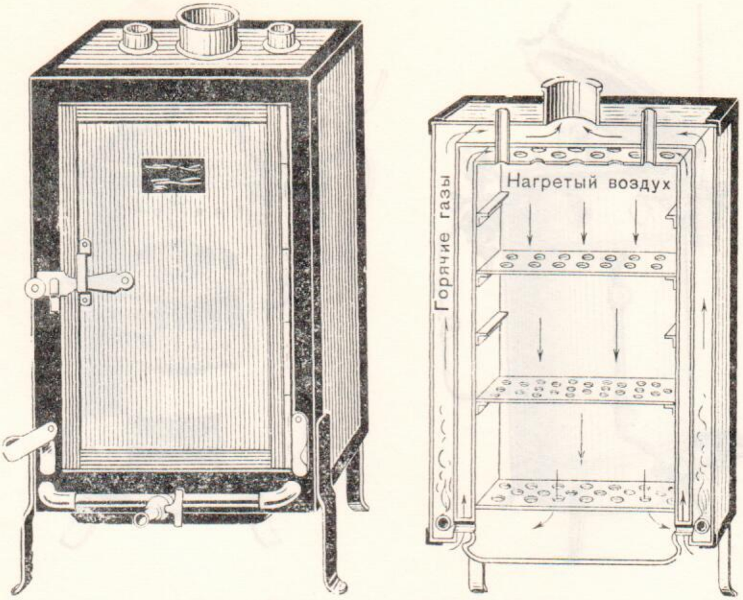
ان عملية التعقيم الجاف تعتمد على طرد الماء من المادة وبذلك فإن الأحياء المجهرية تتعرض إلى درجات حرارة عالية تصل إلى 330° م ولمدة 1/10 ثانية ومنها الطرق التالية: ـ

1 ـ أفران الهواء الساخن Hot air ovens

وتعتمد هذه الطريقة باستعمال أفران تعتمد أساسها على تسخين الهواء بداخلها كهربائياً حيث تصل درجة حرارته إلى 160-180° م 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 ـ اللهب المباشر لدرجة الاحتراق Incineration heat

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



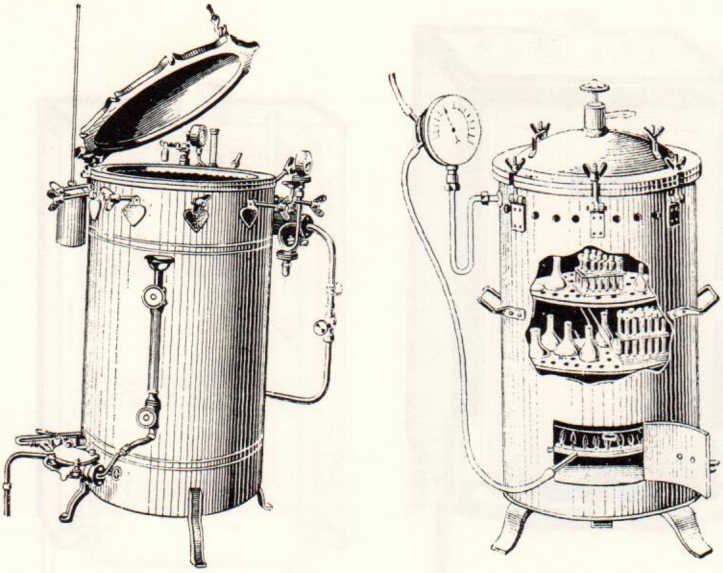
شكل (3) يوضح المعقمات الجافة

3 ـ اللهب الكحولي Alcohol Flamming : ـ

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.

التعقيم بالبخار تحت الضغط العالي:

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



شكل (4) يوضح المعقمات الرطبة

الأوتوكليف Auto clave :

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

تسخين الجهاز يعتمد على نوع الشركة المصنعة إما كهربائياً أو غازياً. كذلك فإن هذه الاسطوانة ممكن أن تكون مصنعة بصورة أفقية أو عمودية.

والجدول التالي يوضح العلاقة ما بين زيادة الضغط للبخار ودرجة حرارته.

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

الأشعة :

تستعمل الاشعة في التعقيم والتطهير حيث يمكن استعمال الأشعة الألكترومغناطيسية. وكذلك الأشعة Ultra Violet Region ما بين 2800-2400 A° التي هي قاتلة للاحياء حيث تنفذ إلى داخل الخلية وتعمل أعمال عكسية في بناء بروتوبلازم ، وأن التشعيع عملية ناجحة في القضاء على الاحياء المرضية. ويمكن أن تقضي على سبورات *Baccilus Sublitis γ Rays Ionization* تستعمل لتعقيم الأجهزة، وتأثيرها قاتل للاحياء المجهرية والمثال عليها الأشعة التي تخرج من Radioisotop Co .

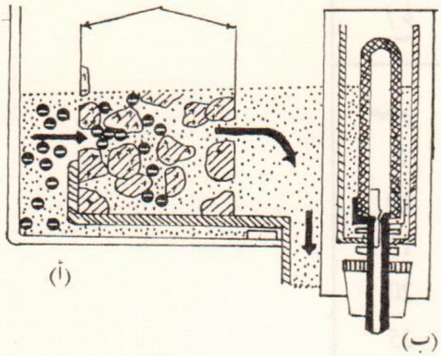
المرشحات :

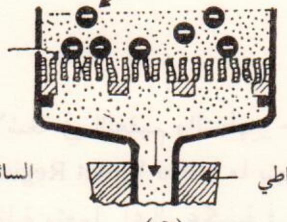
هنالك نوعان من الترشيح لتعقيم السوائل والغازات أحدهما يختلف عن الآخر بالأساس.

(1) الترشيح الحقيقي True Filtration sterilization :

فالغاز أو السائل بمروره بالغشاء وعبر الثقوب الصغيرة الحجم أقل من حجم البكتريا. لذا تطرد هذه الاحياء من السائل أو الغاز ويستعمل لذلك مرشحات من البورسلين أو الزجاج.

(2) هذه الطريقة لا تعتمد على حجم الثقوب ولكن هذه المرشحات تحتوي على فايبر مضغوط أو قطن زجاجي أو قطن صوفي، وهذه المواد تعقم بالهواء المعقم بسرعة 1

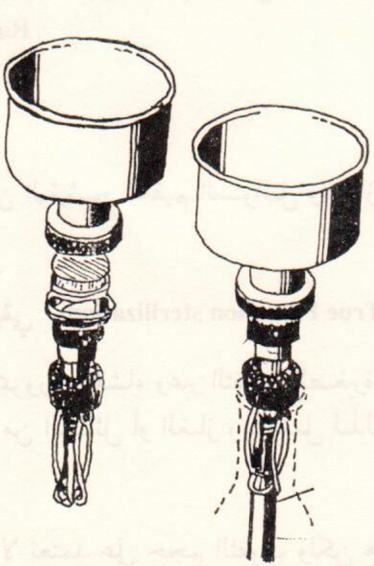




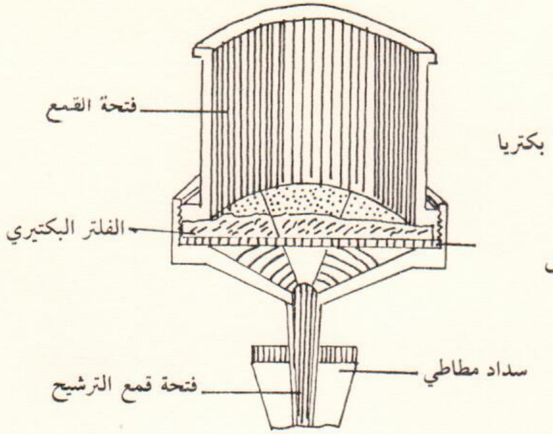
شكل (5) (أ) يوضح تأثير الامتصاص للفلتر في عملية الترشيح

(ب) تأثير الفلتر الغشائي

(جـ)أقطار البكتريا كذلك الدور الادمصاصي للبكتريا الذي يلعب دوراً في تبادل الشحنات



شكل (6) يوضح الفلتر الغشائي

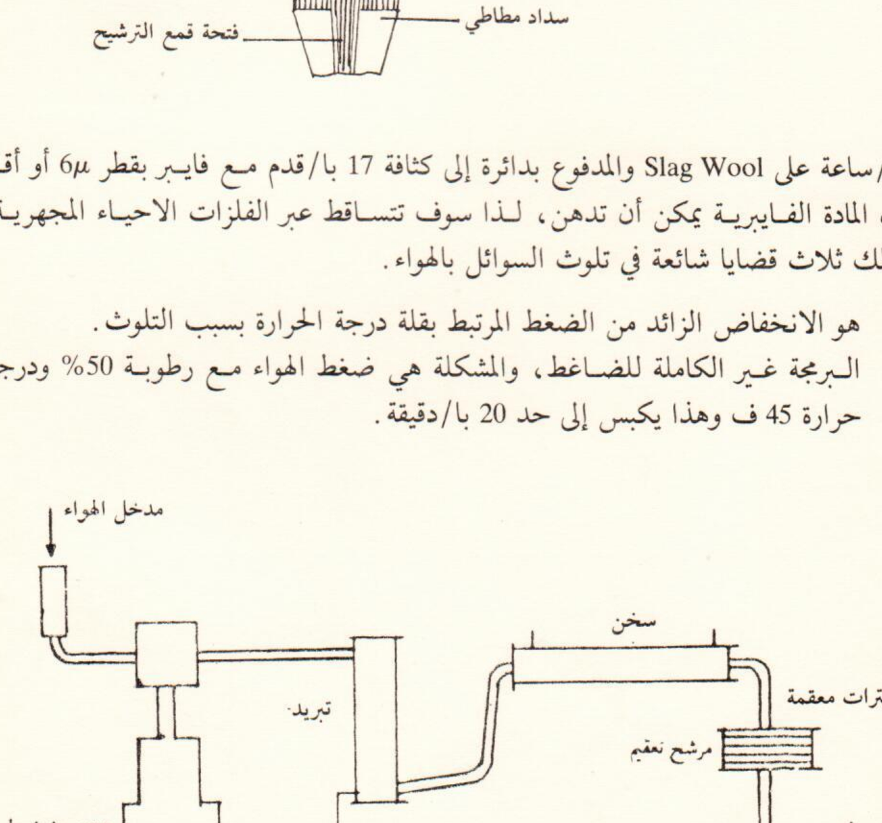


شكل (7) يوضح فلتر زاتيس

قدم/ساعة على Slag Wool والمدفوع بدائرة إلى كثافة 17 با/قدم مع فايبر بقطر 6μ أو أقل هذه المادة الفايبرية يمكن أن تدهن، لذا سوف تتساقط عبر الفلزات الاحياء المجهرية. وهنالك ثلاث قضايا شائعة في تلوث السوائل بالهواء.

(1) هو الانخفاض الزائد من الضغط المرتبط بقلة درجة الحرارة بسبب التلوث.

(2) البرمجة غير الكاملة للضاغط، والمشكلة هي ضغط الهواء مع رطوبة 50% ودرجة حرارة 45 ف وهذا يكبس إلى حد 20 با/دقيقة.



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

الفصل الخامس

تقنية التربية والانتقاء والجمع المختبري لمزارع الاحياء 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 أيضاً. فالأوساط التي تستعمل لنمو الاحياء تسمى بأوساط التربية والتي إما أن تكون سائلة أو صلبة.

والتي تتضمن ما يلي:

1 ـ الماء
2 ـ المادة الغذائية.
3 ـ درجة التفاعل pH
4 ـ ظروف الأكسدة والاختزال
5 ـ المواد الحيوية البيولوجية
6 ـ الظروف المثلى للحرارة والتهوية والتحريك
7 ـ 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 بتحديده ظروف العزل من حيث عملية النمو والحجم واللمعان للمستعمرات. علماً 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 الاحياء 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 خصوصاً الاعفان حيث أعطت ألواناً 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 واللون، . . . الخ. هذه المواصفات للمستعمرات هي خاصية للنوع المعزول. كذلك السلالة المهجنة يمكن معرفتها من دراسة الخواص والصفات للمستعمرة ويمكن تحديدها ومعرفتها وارجاعها إلى الأصل.

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

وبعدها جاء آخرون درسوا وبنجاح طرق عزل المزارع النقية، وقبل حقبة من الزمن وجد بأن بعض الأحياء من نوع Autotrophic 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 كيمياوية 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.

اضافة إلى الجيلاتين و Agar-Agar و Sio_2، لأجل تحضير الأوساط الغذائية الصلبة تستعمل أيضاً الأوساط التالية:

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

ولأجل تربية الاحياء وعزلها إلى مزارع نقية على السطوح الصلبة، استعملت مرشحات غشائية والمصنعة من مادة استات 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 كاما، وهنالك أيضاً مرشحات معدنية، ويتم العزل بترشيح السوائل والمواد الغذائية الصناعية وفضلات المعامل، وكل السوائل التي تحتوي على الاحياء 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 الاحياء على الأوساط الغذائية الصلبة وتهيئة الظروف الملائمة لها ولأجل العزل الكامل للمزارع النقية من بعض الأنواع تستعمل الأوساط الغذائية المنتخبة Selective media.

فمثلاً لأجل نمو الخمائر والأعفان يستعمل وسط سايوروا (1) والذي أكثر محتوياته كاربوهيدراتية وله pH منخفض نوعاً 5.5، وهو جيد جداً لنمو هاتين المجموعتين من الأحياء المجهرية.

ومكونات هذا الوسط هي كالآتي:

لتر من الماء المقطر، 40° م كلوكوز أو مالتوز، 10 غم بيشون، اكر ـ اكر 20 غم، 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 ـ طرق الفصل الميكانيكي للأحياء

هنالك العديد من طرق الفصل الميكانيكي ومنها:

أ ـ Fraction method : لـ (لوي باستور)

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

ب ـ طريقة روبرت كوخ :

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

ج ـ طريقة دريكالسكي :

حيث استعمل الوسط الغذائي الصلب لأجل الفصل باستعمال صحون عديدة petridish والزرع يتم بواسطة Spatula، وبنفس Spatula يتم زرع الصحون على السطح الغذائي الصلب حيث ستقل كمية الاحياء في الصحون إلى أن تصل إلى الصحن الذي يحتوي على مستعمرات أقل. نتيجة هذه العملية نحصل على مستعمرات ومنها يعمل تخافيف للمستعمرات المفصولة والنامية على السطح الأكري ويتم زراعتها من جديد فنحصل على مزارع نقية.

2 ـ طرق العزل البيولوجي للمزارع والحصول على مزارع نقية :

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

وسوف نذكر البعض من هذه الطرق وبدون ايضاح لجوهرها حيث ان هذه الطرق متوفرة في كثير من المصادر العملية.

ومن هذه الطرق : ـ

أ ـ طريقة جـ. ن. كابرجسكي 1919 :

أول من وضع طريقة لعزل الأحياء المجهرية المتحركة عن الاحياء المجهرية غير المتحركة وذلك باستعماله أوساطاً غذائية صلبة والموضوعة في أطباق والمعلمة بأوراق فلتر مخططة من جهتيها، وعند عملية الحضن فإن سرعة حركة الاحياء تختلف فيما بينها وعند

فترات مختلفة من الحضن 3-5-7 ساعات، تؤخذ الورقة ويتم نقل المستعمرات ذات الابعاد المختلفة في أنابيب اختبار فبذلك نحصل على مزارع نقية.

ب ـ طريقة ي. ي. شاكوفيا E.E. Shakyvia:

بهذه الطريقة يتم زراعة اللقاح في الماء المكثف في قعر الـ Slant، فعند عملية الحضن فإن الاحياء المتحركة ستنمو على السطح الـ Slant أما غير المتحركة فستبقى في الماء المكثف.

جـ ـ طريقة ب. ب. يولسوف 1935:

وقد تم تحوير هذه الطريقة من قبل م. ج. كيجنكو **1958** حيث يستعمل وعاء خاص وبعض الأوساط الغذائية الخاصة. وان هذه الطريقة تستعمل لمعرفة الاحياء المجهرية المرضية وخصوصاً البكتريا المتحركة. فتحت الطرق البيولوجية هناك أيضاً طرق عزل الاحياء اللاهوائية.

د ـ طريقة فيون ـ فيفيال:

وعند هذه الطريقة يتم فصل الاحياء المجهرية ميكانيكياً وخاصة المقاومة للأوكسجين الهوائي، فبعد اذابة وتبريد الوسط الغذائي الصلب تستعمل الماصات Pipets المبسترة حيث يترك قليل من الوسط الغذائي في هذه الماصات وتسد وتغلق نهاياتها وتترك لبضعة أيام في الحاضنة، ومن ثم يجري لها التخافيف اللازمة ومن ثم يعمل فصل لهذه المستعمرات كمزارع نقية.

هـ ـ طريقة انروستات Anerostate

تعتمد هذه الطريقة على تهيئة الظروف اللاهوائية للوسط الغذائي والذي تنمو فيه المزارع المختلطة ويتم هذا اما باستعمال ديسكيتر أو أجهزة معدنية مفرغة وباستعمال مواد كيمياوية مثل $Na_2S_2O_4$، Na_2CO_3

كيفية الحصول على المزارع النقية من المتحورات Mutant

بطريقة الطبع المعاد Replication

بعد الحصول على المتحورات من السلالات تزرع هذه على الوسط الغذائي المثالي للنمو ومن ثم يعمل لها التخفيف اللازم في محلول فسيولوجي، وبعد أن تنطبع على المحلول

الفسيولوجي الاعتيادي يؤخذ 50 سم^3 منه ويلقح به السطح الاكري الموضوع في طبق يتري 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 يعمل طبعات على قرص طبع المغلف بقطعة قماش وبطريقة معقمة تحمل هذه الطبعات وتطبع على صحون جديدة ومن ثم تحضن. وبعد عملية الحضن سنحصل على مستعمرات معينة ومحددة بشكل واضح ومن هذه الطبعات نحصل على مزارع نقية بواسطة زراعتها على الأوساط المنتجة. فمثلاً الأوساط التي تحتوي على البنسلين ستنمو عليها الاحياء التي لها مقاومة للبنسلين. وكذلك الوسط المحتوي على الشيرونين Theronine فستنمو عليه فقط الاحياء المقاومة للثيرونين. وبهذه الطريقة يمكن أن نحصل على مزارع نقية.

فصل المزارع **Auxotrophic** بمساعدة البنسلين

تؤخذ الاحياء المجهرية في الطور اللوغارتمي وتشعع بالأشعة فوق البنفسجية UV وتحضن بعد ذلك ومن ثم تنشر في محلول فسيولوجي. وبعد فترة معينة من التجويع للاحياء في هذا المحلول يضاف إليها مادة البنسلين بتركيز معين لمنع أو لقتل الاحياء، وتبقى فقط احياء الـ Auxotrophic. فإنها ستنمو بصورة نقية.

طرق زراعة أو تربية الأحياء:

ان من طرق زراعة الأحياء ما يلي:

1 ـ الزراعة ذات الانتاج لمرة واحدة «Batch Culture»
2 ـ الزراعة السنهورية «Synevonous Culture»
3 ـ الزراعة المستمرة «Continious Culture»

1 ـ الزراعة ذات الانتاج لمرة واحدة:

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

أما الطور الثاني فيسمى بالطور اللوغارتمي أو Expotential phase وهو طور النمو.

ويتميز هذا الطور بنمو الأحياء بسرعة عظمى بحيث تصل الأحياء إلى عمر معين بحيث يمكنها الانقسام اعتيادياً إلى قسمين. وكحالة استثنائية للخمائر هي عملية التبرعم وكذلك بعض الأحياء البكترية تكوّن أجساماً جديدة وبعد فترة من الزمن ستنفصل الواحدة عن الأخرى أو أن تبقى متحدة بمجموعات على شكل سلسلة.

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

$$U = \frac{I}{X} \cdot \frac{dx}{dt}$$

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:

$$\text{العدد الكامل للجيل} = \frac{t_2 - t_1}{3.32\ (\log \alpha_2 + \log x_1)}$$

فترة التكاثر لبعض الأنواع البكترية هي بحدود 20-30 دقيقة اما أبطأ عملية نمو للاحياء فتصل إلى عدة أيام.

في المزارع ذات الانتاج لمرة واحدة (نظام الوجبة) فسرعة النمو كبيرة جداً وتتحدد وفق المعادلة التالية:

$$U = U\,max \left(\frac{S}{Ks + S} \right)$$

حيث أن Umax = السرعة العظمى للنمو في الوسط المحدد

S = تركيز المواد المعطاة

Ks = الثابت العام ويمثل متوسط السرعة القصوى للنمو في الوسط المحدد

$$Ks = \frac{Umax}{2}$$

ونتيجة سرعة تكاثر الأحياء المجهرية خلال طور Expotantial phase فإن مواد الوسط الغذائي ستنضب بسرعة وكمية المواد المنتجة سوف تزداد وهذا سوف يقودنا في النهاية إلى الطور الثالث statinary phase للنمو. وهنا يكون تركيز أجسام الأحياء المجهرية ثابتاً وهذه الفترة يمكن أن تكون مختلفة الطول. وبعدها يأتي الطور الرابع ـ طور الموت Death phase. حيث أن عدد أجسام الأحياء ينخفض.

ان الاحياء 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 الهايفات يبقى مرتبطاً أو متصلاً بقمم نهاياتها أو قريباً منها وبمجالها والسترجمات الاعتيادية لا تكون هايفاً، أما الخلايا المايسلية غير المقسمة فالمايسليوم يكون محتوياً على العديد من الأنوية. أما النمو على سطح الوسط الصلب فالمايسليوم سينمو في كل الاتجاهات وتكون مستعمرات دائرية.

2 ـ المزارع السنهورية Syncronous Culture

عند الزراعة الانتاجية ذات الوجبة Batch وفي الطور اللوغارتمي (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 نوعاً ما. لذلك فبنتيجة الدراسات توصل الباحثون إلى التربية السنهورية والتي تعتمد في أساسها على ايقاف جميع العمليات الحيوية والفسلجية لفترة زمنية والحفاظ على محتويات الخلية بدون أي تأثير، وعند زوال هذا العامل ستبدأ أجسام الأحياء في وقت واحد لأن بالانقسام والتكاثر وتكون الاحياء في حالة واحدة وهذه المزارع تدعى بـ Syncronous Culture.

ويتم الحصول على هذه المزارع بأحد الطرق التالية:

الطريقة الأولى:

وتعتمد على مبدأ تغير الظروف المحيطة كتغير درجة الحرارة، تغير مواد الوسط... الخ.

فعندما تكون درجة الحرارة ضمن الحدود المثالية فالنمو للاحياء يكون مثالياً وشبه مثالي فمثلاً 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. فمثلاً احياء الـ Auotrophic 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 الكلورنفينكول 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 اضافة الدكسترين اليها ومن ثم تطرد مركزياً. 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.

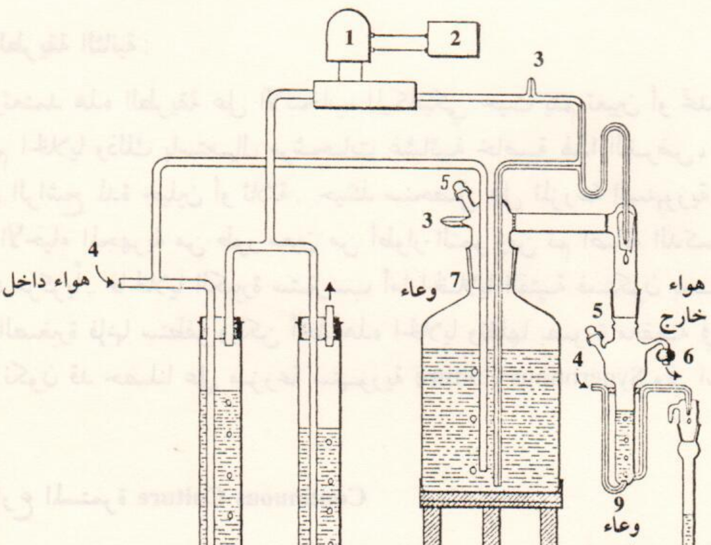
3 ـ المزارع المستمرة Continuous Culture

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 اللوغارتمي وطور statinary 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، سائل التخمير، حيث يعمل كلا الجهازين على تنظيم عملية ضخ الوسط بحجوم ثابتة وبصورة مستمرة وبذلك سوف تستمر المزارع بالتكاثر وبطور لوغارتمي ثابت.

أما الطريقة الثانية للزراعة المستمرة والتي تعتمد على نظام Chemo والذي عنده ينظم اعطاء أو اضافة 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 الاحياء يجب أن تربى عند السرعة القصوى للنمو وعند درجة كبيرة من التخفيف. وأهم عامل عند الـ chemostat هو التنظيم لسرعة اعطاء الوسط الغذائي والمرتبط بسرعة ينظم نمو الاحياء فإذا كان اعطاء الوسط الغذائي بصورة سريعة فيمكن غسله أو عند اعطائه الوسط بصورة بطيئة فإنها ستأتي في الطور statinary phase والشكل التالي يوضح المخطط الاعتيادي لـ chemostat.



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

شكل (9) يوضح نظام Chemostat

في نـظام الـ chemostat فالعـاملان الاثنـان يجب أن يكونـا منظمـين. فإن سرعـة نمو المزرعة يجب أن تكون ثابتة.

وسرعة وضع الوسط f إلى حجم المزرعة v يسمى بسرعة التجفيف D.

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

سرعة التخفيف هي مساويـة لحجم الوسط الغـذائي في الوعـاء ولمدة سـاعة واحـدة، وقت العملية $\frac{I}{D}$ هي معادلة أو مساوية لمتوسط الوقت لوضـع الاحياء في الـوعاء، وعمـوماً فإن السرعة الأسسية expotantial speed تنعكس بالمعادلة التالية:

$$\mu = \frac{I}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \qquad \text{.................} \; (1)$$

ومن هذه المعادلة ندرس بأن سرعة النمو هي مساوية لـ

$$\frac{dx}{dt} = UX \qquad \text{.................} \; (2)$$

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

$$- \frac{dx}{dt} = Dx \qquad \text{................} \; (3)$$

الزيادة العامة للنمو ستكون

$$Ux + Dx = x\,(U\text{-}D)$$

عندما المزرعة في stationary phase والتي عندها يكون تركيز الأحياء ثـابتاً فـإن x (U−D=O) ومن هنا U=D وعند استعاضة U بـ Umax سنحصل

$$D = U_{max}\left(\frac{S}{KS + S}\right) \qquad \text{................} \; (4)$$

ومن هذا يظهر بأن كل قيمة لـ U للمزرعة المستمرة سيكون أقل من Umax المعينة للمزارع Batch والتي يعكس بـ S/K_S+S يجب أن تكون أقل من I أما سرعة استعمال الوسط الغذائي (substrate).

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

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

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

ومن هنا يظهر بأن كل تغيير لتركيز الـ 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 الـ substrate في الوسط الغذائي الأساسي ولكن في السرعة الموجودة والثابتة فتعتبر التركيز sybstrate (ds/dt) هو مساو إلى الصفر، ومن هنا:

$$DS_R = D_S + D\frac{x}{y} \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (8)$$

أو

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

ومثل استعمال المعادلة (4) و (9) يمكن أن يؤثر بتركيز أجسام الأحياء في substrate لكل من قيمة D و S_R إذا K_S 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 جداً، لذا وجب وضع الأسس لهذه العملية لصيانة هذه الأحياء. ويجب أن تكون هذه الأحياء تحت الشروط التالية:

(1) السلالة يجب أن تكون مستقرة وراثياً.
(2) السلالة يجب أن تكون جاهزة الصيانة لفترات زمنية.
(3) السلالة يجب أن تنتج عدة خلايا خضرية أو أسبورية أو أي وحدات انتاجية أخرى.
(4) السلالة يجب أن تنمو Vigorougly وبسرعة بعد عملية التلقيح في وعاء التخمير.
(5) السلالة يجب أن تكون نقية وحرة من التلوث بالاحياء الأخرى والبكتريوفاج.
(6) السلالة يجب أن تقاوم التلوث إذا كان محتملاً.
(7) السلالة يجب أن تكون قابلة للتغير من قبل المطفرات mutation agent.

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

(أ) جمع المزارع العامة:

العديد من المايكروبايولوجيين والكيمياويين يعتمدون على المزارع العامة والشائعة للأحياء المجهرية والمستعملة في عمليات التخمرات الصناعية المتخصصة بالاضافة إلى مجمع الأحياء المجهرية في أمريكا، والمجمع الاقليمي الشمالي للأبحاث في أمريكا في Pearia، ومعهد التخمرات في أوساكا ومعهد Bureau في هولندا، والمجمع الوطني للبكتريا الصناعية في بريطانيا. وهنالك العديد من المجمعات الخاصة التي تعمل في بعض السلالات وحسب الطلب، وحديثاً هنالك دائرة الاختراعات في بعض أقطار العالم والتي وضعت بعض القوانين ليس فقط للصيانة بل لكفاءة التخمير أيضاً وللعملية الميكروبيولوجية.

طرق صيانة مزارع الأحياء المجهرية:

هنالك ثلاثة طرق لصيانة مزارع الأحياء المجهرية عموماً والمستعملة في صناعة

التخمرات الصناعية وكل واحدة لها متغيرات متعددة.

(1) تجفيف الأحياء المجهرية في التربة أو أي مادة صلبة أخرى.

(2) خزن الاحياء المجهرية في أوساط غذائية صلبة slant agar أو في menstra حيث التنفس والتمثيل الغذائي يكوّنان الحد الأدنى وهذه تتضمن خزن الخلايا في المجمدات أو خزن الخلايا أو الاسبورات في الماء.

(3) حذف الماء من الخلايا أو الاسبورات باستعمال طريقة التجفيد lyophilization في ظروف متعددة. والتكنولوجي المستعمل في التطبيقات الميكروبيولوجية ولتجنب المشاكل التي تحدث نتيجة الوظائف الفسيولوجية لكل كائن مجهري حي.

(1) حفظ المزارع بالتجفيف

Trollope 1975 أشار في دراسته إلى 33 نوع بكتريا و 22 من الفطريات، لوحظ بأن 64% من البكتريا و 77% من الفطريات المجففة بعد أربع سنوات على سلكاجل Selca Jel وعلى شكل مسحوق والتي خزنت على درجة حرارة الغرفة ودرجة حرارة 4 م أمّا 1973 Pridham لاحظ بعد دراسة 1800 اكتيوماستس جففت في التربة نصفها قاوم بعد 20 سنة خزن.

أما Kuznetsov 1973 فقد وجد بأن 92-96% يكون حيوياً بعد 4-5 سنوات أمّا 1973 Tijima فقد وجدت طريقة تجفيف مزارع البكتريا واليكتريوفاج تحت التفريع عند درجة حرارة 2-5 م وعند استعمال سدادات قطنية والتي تستعمل لأجل ازالة الماء من الخلايا، والخلايا تعامل بلطف في عملية التجميد.

ولكن هناك طريقة بسيطة تستعمل للخمائر حيث يضاف $CaCO_3$ إلى المعلق الخميري وتركه إلى أن يجف إلى مسحوق.

(ب) صيانة المزارع بخزنها في محيط يحدد نشاطها التمثيلي:

(1) الخزن على مسطح الأكر Agar stalnts

صيانة المزارع بعد زرعها على مسطحات اكرية وخزن هذه المسطحات في الثلاجات أو تحت الزيت هي عملياً مستعملة لعدة سنوات. الدراسات الحديثة اقترحت بأن الخزن تحت الزيت يكون لمدة 10 شهور لا يغير من Carbohydrate assimilation للسلالات *Mucor re-*

cemosus ASp. miger, eunninghamella echinatu وهناك دراسات لبعض السلالات يمكن حفظها تحت الزيت لمدة سنة أو سنتين أو أربع سنوات وعند حرارة خزن 4.5° م.

(2) حفظ السبورات في الماء

لوحظت ولفترة طويلة قابلية بعض سبورات الفطريات الشائعة والمنتشرة في ماء مقطر والمحضونة في ثلاجة وعلى درجة حرارة (18-20) لوحظ 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 1973 درس قابلية 259 سلالة العائدة إلى 32 نوع ولـ 135 جنس والمنتشرة في معلق 10% كليسرول وخزنت تحت درجة حرارة 53-° م ولمدة 16، شهر فحوالى 10% من بكتريا الموجبة لصبغه كرام G-Ve و 3% من بكتريا السالبة لصيغة كرام G-Ve فقدت قابليتها بسرعة لذا اقترح استعمال العسل بدل الكليسرول في الحفظ بالتجميد.

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

أما Daily & Higgen 1973 فقد درسوا امكانية محلول المعلق والمتكون من 10% كليسرول و 5% إما لاكتوز أو مالتوز أو رامينوز في المحلول لمعلق للاحياء يزيد من قابلية السبورات والخلايا الخضرية وفطع مايسليم الـStrptomyces. أما Moore وآخرون 1975 فقد لاحظوا من خلال التجارب المختبرية مع بكتريا المرضية للنباتات بأن الوسط المناسب لحفظها بالتجميد هو 10% حليب فرز ثم خزنها بالتجميد.

أما Welling & Stewart 1973 فقد أشارا إلى صعوبة صيانة خميرة البيرة بالتجفيد lyophilization ولكن نجحت متى ما كان محلول المعلق للخلية مخلوط مع 10% كليسرول وتجمد تدريجياً أم/دقيقة وتخزن في ـ 196 م.

ج ـ الحفظ (حفظ الأحياء المجهرية بالتجفيد lyophilization)

هذه الطريقة مستعملة على نطاق واسع لحفظ المزارع فقد لاحظ Haynes 1955 بأن التجميد بالتجفيف في هذا المخطط حيث أن الخلايا توضع في أمبولات زجاجية معقمة والمعلقة في حامل أو محلول حافظ والمعقم كالسيروم أو حليب فرز وبسرعة تجمد في درجات حرارة منخفضة وتجفف تحت تفريغ عالٍ والاميولات بعد ذلك تقفل وتخزن في الثلاجة. ومعظم المزارع التي تحفظ بهذه الطريقة فإنها تحفظ لسنين عديدة.

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

الفصل السادس

تصميم لأجهزة التخمير المختبرية

Design of Laboratory Fermenters

1 ـ 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 ـ الأهداف Objectives:

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

اكثر الأجهزة شيوعاً هي دورق ايرلنماير، والوعاء المحرك (Stirred Vessel) والذي غالباً ما يكون اسطوانة عمودية.

من المفيد اعتماد تصميم يتناسب ومقتضيات العملية الانتاجية أي يوضح الغرض من العملية الانتاجية عين الاعتبار، وعلى هذا تقسم الأهداف بصورة عامة الى أربعة أقسام:

أ ـ الانتاج الخلوي Provision of Cells

يكون الهدف هنا ببساطة انتاج كتلة خلوية في وقت مناسب. ويكفي لمثل هذا النوع

من العمليات الانتاج جهاز الانتاج جهاز بسيط خال من التعقيد. أما عندما يراد الحصول على خلايا في حالة فسلجية معينة فيجب عند ذاك اجراء العديد من التغييرات على تصميم الجهاز، ولتحتم في مثل هذه الحالات استعمال أجهزة التخمير ذات النظام المكروبي المستمر المنظم (Controlled Continuous Culture equip.).

ب ـ انتاج مواد عرضية Provision of Products

عندما لا يكون المنتوج الخلوي هو الهدف الأساس من العملية الانتاجية يكون اختيار الجهاز والظروف العملية متناسبة مع انتاج المواد العرضية المراد الحصول عليها، فمثلاً تحتاج الى زيادة تركيز المضادات الحياتية أو الفيتامينات عشرة أضعاف في الأجهزة الهزازة عما هي عليه في الأجهزة الساكنة، إضافة الى كون سعة الجهاز تتحدد بالهدف المراد الحصول عليه من النواتج العرضية إن للتحليل أو للتجارب الطبية، أو للقيام بعملية عزلها وتنقيتها على نطاق تجاري.

جـ ـ دراسة النمو والتمثيل الغذائي Study of Growth & Metabolis

لدراسة مؤشرات النمو والتمثيل الغذائي، يجب الحذر عند أخذ النماذج وذلك عند اجراء بعض القياسات (درجة الحموضة، الأوكسجين المذاب، ثاني أوكسيد الكربون المذاب، التركيز الخلوي، محتوى الغازات الداخلة والخارجة. . . الخ)، كذلك عند إضافة بعض المواد اللازمة للسيطرة على درجة الحموضة ومنع الرغوة، أو بعض الشبطات 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 معاً، وكذلك الحال مع أنظمة النمو المكروبي متعددة المراحل (Multistage-Culture) من الضروري وجود بعض الضوابط التي تهيىء نقل الوسط الغذائي من وعاء لآخر أو إعادة ضخ جزء منه. . . الخ.

د ـ المؤشرات اللازمة لتصميم المعمل Parameters required for Plant Design

كل ما 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 الفيزياوية والتي تعكس بشكل مباشر أهمية بايولوجية كمعدل امتصاص الاوكسجين مثلاً. ولكن الواقع العملي لا ينطبق وهذه الحقيقة، إذ لا يمكن التوفيق بين المؤشرات البيولوجية والتصميم على أساس فيزياوي، الأسس المهمة التي يعتمدها المهندس للوصول الى 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 بالتغييرات الحاصلة في الوسط أثناء التعقيم والسيطرة على درجة الحرارة أثناء العملية الإنتاجية.

ولتصميم معين، لنسبة الحجم الى 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 والى الوسط الغذائي (والمنظم حرارياً) غير كافٍ للوصول للدرجة المطلوبة، عند ذاك يجب إضافة مصدر آخر يكون عادة بشكل لفات كهربائية داخلية.

3 ـ المؤشرات العملية

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

أ ـ القضاء على مصادر التلوث Freedom From Contamination

وهو أحد المتطلبات الأساسية والتي لا تؤثر فقط على التصميم والمواصفات القياسية لجهاز التخمير واختيار الأدوات المستخدمة فيه كالصمامات والمضخات، وإنما على الخطوات العملية المتبعة في التنظيف والتعقيم والتلقيح وأخذ العينات وفصل النواتج.

يجب أن يكون الجهاز بسيطاً قدر الامكان، وذا مجار نظيفة ولا يحوي شقوقاً أو جيوباً والتي تجعل التنظيف صعباً 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 تهيء مجرى مفتوحاً 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 محتوى الجهاز غير ناضحة ومقاومة لتأثير المواد الكيماوية. أما عن مضخات الهواء فيجب أن تصمم بشكل اقتصادي محكم للتقليل من خطر دخول احياء مجهرية غريبة الى حد غير مقبول. التلوث الناجم عن دخول احياء غريبة خلال الفتحات أو نتيجة لوجود منافذ يقلل عادة بجعل الضغط داخل الجهاز أعلى مما هو في المحيط الخارجي. وقد يكون هذا غير مقبول في زراعة الأحياء المجهرية المرضية، إذ تستدعي الضرورة تشغيل الجهاز تحت ضغط، أقل من الضغط الخارجي، وهنا لا بد من تصميم دقيق جداً وذي ضوابط خاصة.

ب ـ السحب المعقم للعينات Aseptic removal of samples

لهذه المشكلة وجهان، الأول هو الحفاظ على العينة المأخوذة من التلوث وخصوصاً اذا كانت لفحص نقاوة النموذج قيد الدرس، والثاني هو الحيطة عند سحب العينة لمنع تلوث محتوى وعاء التخمير.

المعدات المستخدمة لأخذ العينة قد تكون أدوات إضافية مثل إبرة حقن تزرقّ خلال حاجز لسحب النموذج ثم ترمى بعد الاستعمال.

المحاذير من استعمال هذه اللوازم هو أن الغلق المحكم لمكان سحب العينة يحتم استعمال أدوات دقيقة ورفيعة جداً وهذا يتعاكس ومتطلبات بعض الطرق التحليلية والتي تقتضي أخذ نماذج كبيرة حاوية على كتلة خلوية كبيرة مما يستدعي استعمال أدوات لا تفي بالغرض المطلوب. قد تكون أدوات سحب العينة داخلة في تركيب الجهاز والتي يمكن نقل العينة خلالها بالضخ أو الضغط. المشكل الأساس الذي يتبلور 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. وبالامكان تلافي هذا المشكل باتباع طريقة الغلق بالبخار.

جـ ـ المضافات الأخرى المعقمة Aseptic Additions

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

د ـ التعقيم Sterilization

تقوم عمليات التعقيم على أساس استخدام البخار. وقد يعقم الجهاز فارغاً ثم يملأ بالوسط الغذائي المعقم ايضاً، أو قد يكون التعقيم سوية. من الضروري تعقيم أجهزة التخمير التي تزيد سعتها على 50 لتر على حدة. وفي حالة استعمال Aotoclave يجب قدر المستطاع تعقيم كل ما يتعلق بجهاز التخمير من معدات ولوازم سوية للتقليل من التلوث أثناء ربطها بعد التعقيم. وهنالك بعض المساوىء من جراء تعقيم الوسط الغذائي مع جهاز التخمير سوية وهي أن الوسط الغذائي لا تسنح له فرصة الدوران، وبالتالي يكون تغلغل الحرارة بطيء وهذا يظهر جلياً في الوحدات العملية الكبيرة. في الحالات التي يتأثر بها محتوى الوسط الغذائي بالحرارة من الأفضل تعقيم مكوناته على حدة ثم تضخ الى وعاء التخمير المعقم، ويجب الحذر من دخول هواء غير معقم الى الجهاز أثناء التبريد.

وبالامكان تعقيم أجهزة التخمير بواسطة المحاليل المطهرة، ولو أن هذه الطريقة لا تعطي ضماناً بمعاملة كل السطوح، اضافة لضرورة تعقيم مرشحات الهواء باستعمال الحرارة على حدة.

وفي حالة استعمال المواد الكيمياوية في التعقيم، من الضروري التأكد من عدم تفاعلها مع الجهاز وخصوصاً صمامات غلق الجهاز وكذلك يجب أن تكون سهلة الإزالة ولا تترك أثاراً.

هـ ـ السيطرة والقياسات Control & Measurements

من متطلبات العملية الانتاجية قياس العديد من المؤشرات وفي نفس الوقت السيطرة عليها ضمن حدود معينة أثناء العملية الانتاجية بواسطة ضوابط خاصة. وهذه المؤشرات تقسم الى 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 عوامل خارجية مستقلة عن المزروع.

السيطرة على العملية البيولوجية تتضمن السيطرة على واحدة أو أكثر من هذه المتغيرات الخارجية للحصول على ظروف بيئية ملائمة للفعالية البيولوجية. وكل متغير خارجي بالامكان تثبيته أو تغييره تبعاً لأسس مثبتة مسبقاً عن العملية البيولوجية، في نفس الوقت

بالامكان قياس أحد المؤشرات البيولوجية لحفظ المؤشرات الخارجية وبالتالي الوصول الى النتيجة المطلوبة.

عدد القياسات المأخوذة ونوعية الطرق المتبعة وطبيعة أنظمة السيطرة المعتمدة لا تؤثر فقط على التصميم الأساس لجهاز التخمير ولكن على حجمه أيضاً.

فعلى سبيل المثال، في القياسات المعتمدة على سحب النماذج يجب أن لا يؤثر حجم وعدد النماذج المسحوبة على حجم الوسط الغذائي في وعاء التخمير بشكل كبير.

وكذلك عند اجراء القياسات داخل الجهاز مثلاً ستكون المعدات اللازمة بتماس مع النظام البيولوجي (كأعمدة قياس درجة الحموضة، والأوكسجين المذاب... الخ) وعليه يجب أن يتوفر فيها العديد من المواصفات كضرورة مقاومتها لظروف جهاز التخمير ومحتواه من المواد الكيماوية، كما يجب ألا تكون مصدراً للتلوث ويمكن الحد من هذه المساوىء بوضع المعدات فوق مستوى المحاليل في جهاز التخمير.

بعض المؤشرات المتفرقة

بالإضافة الى العوامل المذكورة سابقاً، الدقة في العمل، ومراقبة المكونات وادارة الأجهزة والتنظيف والتطوير تعتبر مهمة.

اذا كانت ملاحظة المحتويات تعتبر من المؤشرات المهمة، فاستخدام أوعية زجاجية صغيرة يكون مناسباً، اذ لا يمكن تجهيز اضاءة 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، الا اذا كان انتقال الحرارة بالنسبة للتسخين والتبريد لا يكون خلال الجدران.

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

كل المعدات الزجاجية بالامكان تنظيفها وتعقيمها باستعمال مواد التنظيف والمطهرات. وهذه السهولة قد لا تتوفر أحياناً 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 اليه 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 مثل أعمدة قياس درجة الحموضة ونقاط سحب النماذج.

المتطلبات الأساسية في تصميم جهاز التخمير متشابهة اذا كان العمل مع batch-wrse on cont.

النظام المكروبي المستمر يتطلب بعض المستلزمات التي تعطي تجهيزاً مستمراً للوسط الغذائي وسحباً للمنتوج مع تنظيم حجم الوسط الغذائي في وعاء التخمير.

في النظام المكروبي متعدد المراحل تكون المعدات المسؤولة عن سحب النماذج مسؤولة ايضاً عن الضخ الى الوعاء الثاني من سلسلة أوعية التحضير المستخدمة.

وأبسط نوع من المعدات المستعملة لسحب النماذج يكون عبارة عن أنبوب سلكي (Weir tube).

وهو ذو فائدة في أنه يتحكم ذاتياً في كمية النموذج ولكن تنشأ صعوبة أحياناً في كون الكائن المجهري يكون تجمعات كبيرة تبقى على السلك وخصوصاً عندما يكون معدل الضخ منخفضاً.

ويمكن تلافي معدل الضخ المنخفض باتباع طريقة الضخ المتقطع على مراحل تكفي للحفاظ على النظام المستمر. (Continuous Culture).

وكذلك فإن معدل الوقت اللازم للجيل الواحد Mean generation time والذي يتراوح بين (20-120 دقيقة) بالنسبة للنظام المكروبي المستمر، يحتم استعمال أجهزة أصغر بكثير من تلك المستعملة في الـ Batch Culture والتي يكون فيها جزء كبير من الوقت الكلي للعملية الانتاجية يصرف في الفترة بين التلقيح وأعلى معدل للفعالية البيولوجية.

اختيار الأجهزة Selection of Equipment:

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 ـ دورق التخمير Flask Fermenter:

أكثر الأنواع شيوعاً هو دورق ايرلتماير وبالامكان استعمال دوارق مسطحة القاعدة أو

مدورة القاعدة مع تصميم خاص كما في دوارق باستور المستعملة لزرع الخمائر.

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

هذه الزراعة بالامكان اجراءها في الحاضنات المختبرية أو على رفوف في غرف ذات درجات حرارة مناسبة.

بعض الأحياء المجهرية تنمو بصورة طبقة سطحية أو Pelbile صغيرة في الزراعة الساكنة. التحريك أو الهز يؤدي الى نمو موزع بشكل أكثر كأن 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 محدداً واستعمال دورق ايرلنماير 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، امكانية تثبيتها بأدوات ماسكة بسيطة على طبقة معدنية مجهزة للحركة الدورانية أو التوافقية واستخدامها للتجارب الأولية في عمليات المسح المبدئية على السلالات المثلى للعمل، أو إنتخاب 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. معدل التبادل يعتمد على ثغرات السداد والتي تختلف من دورق الى آخر خصوصاً اذا كانت معمولة باليد.

اذا كان المطلوب معدلاً منتظماً لسريان الهواء فبالامكان تثبيت سداد مطاطي يحمل أنبوباً داخلياً وخارجياً مربوطاً الى Manifold. وقد يكون هذا ضرورياً لبعض الأغراض الخاصة الا أنه يحرف الاتجاه البسيط المعتمد في دورق ايرلنماير.

وللوصول الى نسبة كبيرة من السطح / الحجم ولمنع تبلل السداد يجب تحديد حجم الوسط الغذائي بالنسبة لسعة الدورق (100 / مل / 250 مل سعة دورق 500 مل / 2 لتر سعة دورق).

في حالة وجود عدد كبير من الدوارق على نفس الدرجة الحرارية تستعمل غرفة منتظمة الحرارة، وفي حالة تشغيل الأجهزة في غرف ذات درجات حرارة عالية (فوق 35° م) يجب الاهتمام باختيار المحركات الكهربائية، تزييت العتلات... الخ.

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

ب ـ 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 ممكن تقسيمها الى قسمين: -

1 - The fully-baffled vessel with sparger acration.

2 - The vortex fermenter, which is unbaffled and provides acration by entraining are 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 الى بساطته هو قلّة احتياجه الى مواد ضد الرغوة وهذا ينشأ من اعادة سحب هذه المواد الى الوعاء لكنها تكون على حساب انتقال الكتلة (Mass transfer) وقلة قابليته. جهاز التحضير الفعالة تعود الى كبر حجم الغاز المحمول (حجم الغاز غير الذائب في وحدة حجم الوسط الغذائي) وكذلك الى الحجم المشغول بالـ vortex، وعليه فهذا النوع مستعمل في التجارب التي لا يحبذ فيها استعمال المواد ضد الرغوة.

لأجهـزة التخمير من نـوع (batch) ذات السعة الفعليـة 3-5 لـتر (الحجم الكـلي 5-10 لـتر)، هي الأكثر شيـوعاً، اذ لهـا مواصفـات أجهزة التخمـير الكبيرة مـع بعض المواصفـات الأخرى والتي تجعلها مفضلة أكثر كسهولة الحمل والاقتصادية. . . الخ.

أما بالنسبة لأجهزة التخمـير المستمرة (Continuous Fermentation) وبصـورة خاصـة عندما تكون فترة الحضانة قليلة، تستعمل حجوم صغيرة معها على نطاق المختبر، وبالامكـان ادخال العديد من التغييرات على التصميم والأساس للحصول على كل المتطلبـات 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 واحـدة ذات قاعـدة متسعة، أمـا الأجهزة الزجاجية فتكون على هيئة اسطوانة ذات قاعدة مسطحة أو نصف كروية، أو أنها تتـألف من أنبوب مثبت بين الغطاء الرأسي والقاعدة المعدنية مع ادخال نطاق مطاط للربط.

وللنظام المكروبي متعدد المراحل (Multistage System) تستعمل الأوعية المتتاليـة والتي يتم نقـل الـوسط الغـذائي بينهـا بـواسـطة انبـوب سلكي (Weir)، ولهـذا الأنبـوب بعض المساويء.

1 ـ عندما يكون معدل السريان بطيئاً يؤدي الى ترسب بعض المواد الصلبة عليه.

2 ـ تنظيم ارتفاع الأنبوب.

ومن الممكن تـلافي هذه الصعـوبات بـاستخدام سـداد لتغطيـة الأنبوب، فعنـد دخول الوسط الغذائي يـرتفع المستـوى في أوعية التخمـير فيندفـع السداد ويتم نقـل النماذج بمعـدل أسرع من معـدل سريان الـوسط الغذائي في الأوعيـة. ومما تجـدر الاشارة اليـه أن السريـان والنقل لا يكونان مستمرين بصورة فعلية ولكن الفترة الزمنية بين مرحلة وأخرى يمكن اعتبـار العملية بموضعها مستمرة.

ومن الأفضـل أن تكون أوعيـة التخمر في النـظام المكـروبي متعـددة المـراحـل بـترتيب تدريجي بحيث يكون وعاء ما في السلسلة أقل انخفاضاً من مستوى الوعاء الذي يسبقه وهذا يقضي على احتمال نقص الأوكسجين أو الترسب على الأنابيب.

الملاحظات المستخلصة Concluding Remarks

هنالك العديد من المواصفات للأجهزة المستخدمة لتنمية الأحياء المجهـرية أو الخـلايا

النسيجية، البعض منها لأغراض خاصة والبعض الآخر مصمم للعديد من الاستعمالات.

أكثر الأجهزة شيوعاً Shaken flask, & Stirred Vessel يمتاز الأول بقلة كلفته وإمكانية استعماله للعديد من التجارب العلمية. النوع الثاني قد يكون بسيطاً أو على درجة عالية من التعقيد ومجهزاً بالعديد من المعدات المشغلة يدوياً أو بصورة اوتوماتيكية، وعند اختيار الجهاز المناسب يجب أولاً 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 والادامة وتكاليف العمل... الخ.

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

النواتج في العملية الميكروبيولوجية (الناتج الخلوي، النواتج العرضية، معدل الانتاج... الخ)، تتأثر بشكل كبير بطبيعة الجهاز والظروف المستخدمة اثناء 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 الى الاختلاف في دقة التصميم والمواصفات القياسية المعتمدة فيه.

حـ ـ أنواع المخمرات الصناعية:

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

1 ـ صلاحية المخمر للتجربة.
2 ـ تناسب المخمر والنظام المايكروبي.
3 ـ اقتصادية الجهاز.

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

1 ـ أجهزة الانتاج الخلوي ـ جهاز بسيط غير معقد.
2 ـ اجهزة لانتاج مواد عرضية ـ وفي هذه الحالة يمكن أن نختار الأجهزة الهزازة بدلاً من الساكنة وكذلك سعة المحصول.

3 ـ اجهزة لدراسة النمو والتمثيل الغذائي ـ وهنا يجب أن يتميز المخمر ببعض الأجهزة الملحقة لقياس الحرارة و pH ,O_2 المذاب، CO_2، التركيز الخلوي، السيطرة على الرغوة.

4 ـ أجهزة التخمير ذات الدفعة الواحدة والمستمرة وهنا يزود المخمر المستمر لوحدات اضافية ـ كخزان المواد الأولية البيئية وأجهزة ملحقة أخرى التي تعتمد على قياس العكره وضبط O_2, pH، . . الخ.

5 ـ أجهزة تعتمد على نوعية المنتوج، وهنا يحتاج جهاز التخمير الى 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)، علماً بأن بعض المخمرات يحتاج الى مساحة ضوئية.

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

ومن كل ما تقدم فإن الأجهزة تعتمد على مؤشرات بيولوجيية وبعض الظواهر الفيزياوية التي تعكس بشكل مباشر أهمية بايولوجية كمعدل أمتصاص O_2 مثلاً وبذلك تكون الأجهزة من هذا القبيل نوعين:

1 ـ أجهزة تخمير هوائية، وهذا أيضاً له جانبان إما أن يكون مخمراً ذا تهوية مركزية أو مخمراً ذا تهوية يعتمد على الفراغ العلوي وحركة المراوح.

2 ـ 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 دوراً مهماً 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 الى نسبة ارتفاع الخزان / قطر الخزان 1.0. أما من حيث طول المروحة / قطر المروحة فتكون النسبة 0.25 وكذلك بالنسبة الى عرض المروحة / قطر المروحة 0.2، علماً بأن ارتفاع المروحة / قطر المروحة أيضاً يجب أن لا تزيد نسبته عن 1.0 هذا بالنسبة الى مخمر ذي اربع مراوح. أما النوع الثاني فهو Paddle فالنسبة هي تعاقبياً 1, 0.25, 1.0, 0.33 - وكذلك بالنسبة الى المخمر ذي Propeller فأيضاً تكون النسب على التعاقب كما هي موضحة في الشكل (10).

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

$H/D = 2.0 - 5.0$

$dr/D = 0.3 - 0.5$

$B/D = 0.07 - 0.1$

حيث أن D = قطر المخمر

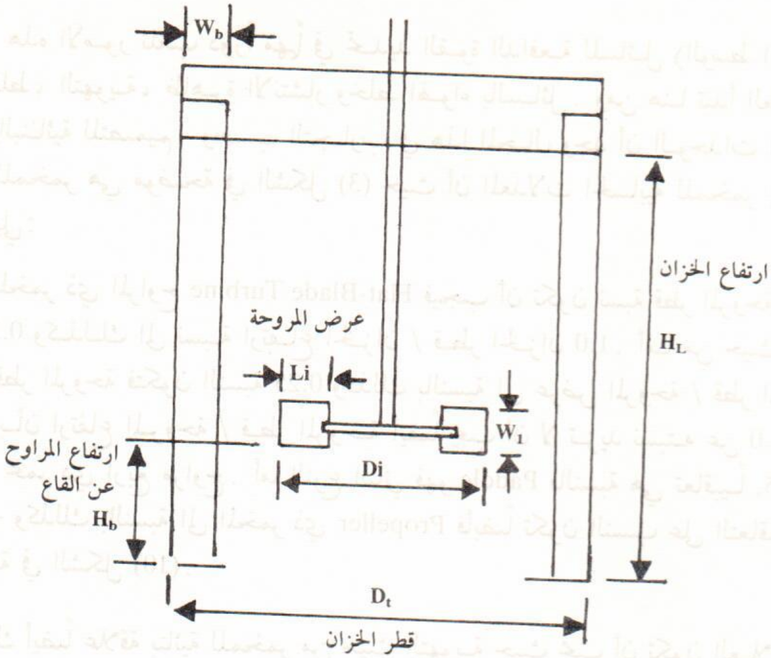
R = ارتفاع المخمر

d = قطر التوربين.

B = اقطار الثقوب الهوائية.

وعموماً المخمرات التوربينية تؤمن % من مسك الهواء في الوسط الغذائي، كذلك فإن لعدد المراوح في المخمر تأثيراً كبيراً 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 الى أن حركة المراوح لها علاقة بالحواجز baffles حيث هناك حركة لجريان السائل من خلال حركة المراوح، وهناك حركة لمجرى الهواء أو غاز الاوكسجين وهناك مناطق لتبادل المواد في مناطق معينة وهناك مناطق ميتة.

ومن هذا الفصل لا يمكن ان نعطي كل التصورات لتصميم المخمر هنالك الكثير من



شكل (10) يوضح المعدلات الحسابية للخمر القياسي

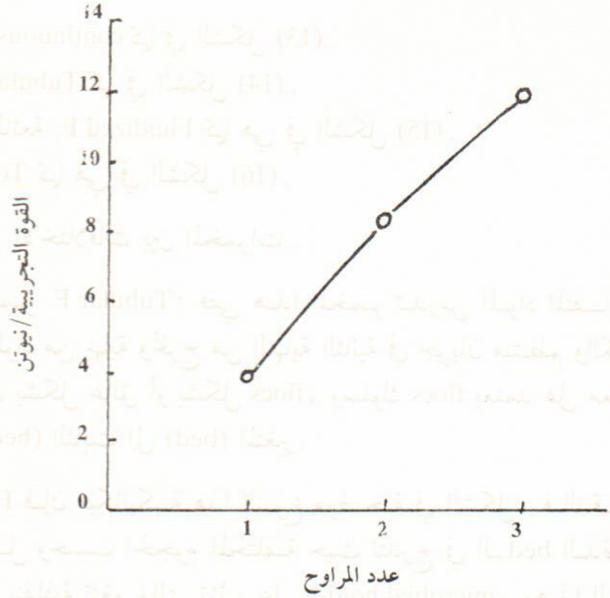
قطر الخزان

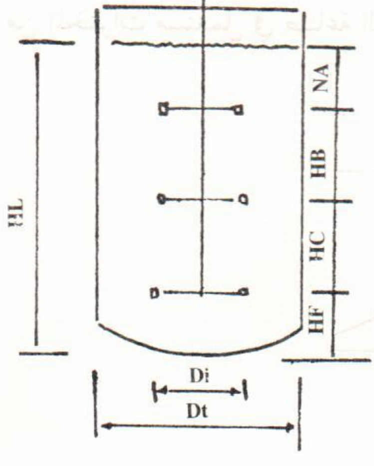
المعادلات الحسابية للمخمر القياسي

	قطر المروحة / قطر الخزان	ارتفاع الخزان / قطر الخزان	عرض المروحة / قطر المروحة	عرض المروحة / قطر المروحة	الحواجز		ارتفاع المروحة عن القاع / قطر المروحة
	$\frac{D_i}{D_t}$	$\frac{H_L}{D_t}$	$\frac{L_i}{D_i}$	$\frac{W_i}{D_i}$	$\frac{W_b}{D_t}$	عددها	$\frac{H_b}{D_i}$
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

المخططات والمعادلات الحسابية التي لها علاقة بنوع المنتوج وكذلك بسلوكية الاحياء المجهرية المستعملة، وفيما يلي صورة مختصرة لبعض المخمرات والمخمرات عموماً:

1 ـ المخمر الاعتيادي ذو الدفعة الواحدة Batch. F. في الشكل (12).





عدد المراوح	2	3	
H_L/D_t	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 السائل 4.100 leters

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

2 ـ المخمرات المستمرة .continuous F كما في الشكل (13).

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

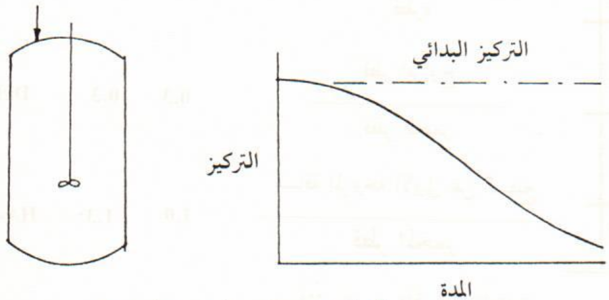
4 ـ المخمرات ذو الطبيعة المائعة .Fluidized F كما هي في الشكل (15).

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

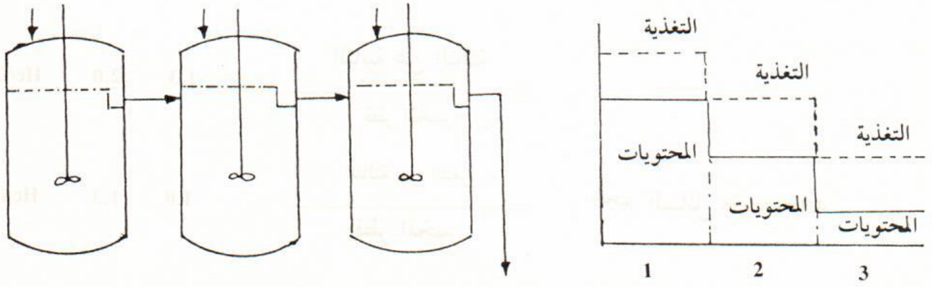
الجدول رقم (1) يوضح الاختلافات بين المخمرات.

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 للاحياء يمكن أن تكون بشكل عالق أو بشكل flocs، وسلوك flocs يعتمد على معدل الجريان والتغير من الفراش (bed) الثابت الى (bed) المتغير.

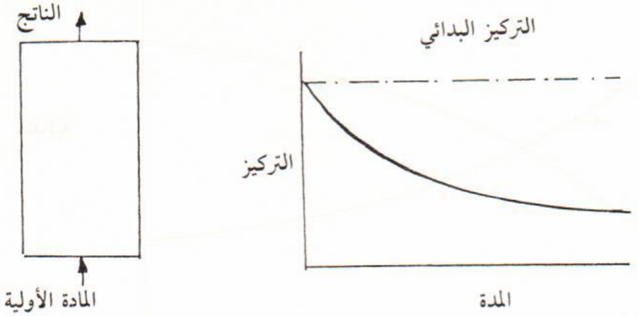
أما المخمر .Fluidized F فإن ميكانيكية هذا النوع موضحة في الشكل، فالدقائق العالقة تكون عالقة في السائل وحسب الحجوم المختلفة حيث تتدرج في الـ bed الدقائق الصغيرة تكون في القمة ولكن بنفاذية تتغير والتي تؤثر على microbial hold-u، وهذا النوع من المخمرات مستعمل في صناعة البيرة أكثر استقرارية للخمائر (yeast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



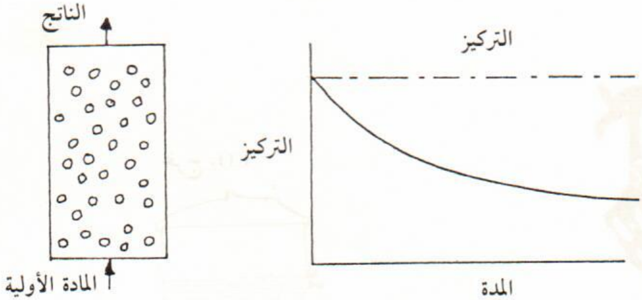
شكل (12) مخمر الدفعة الواحدة



شكل (13) مخمرات ذات المحور المتحرك والمستمر الناتج



شكل (14) المخمر الانبوبي .Tublular F

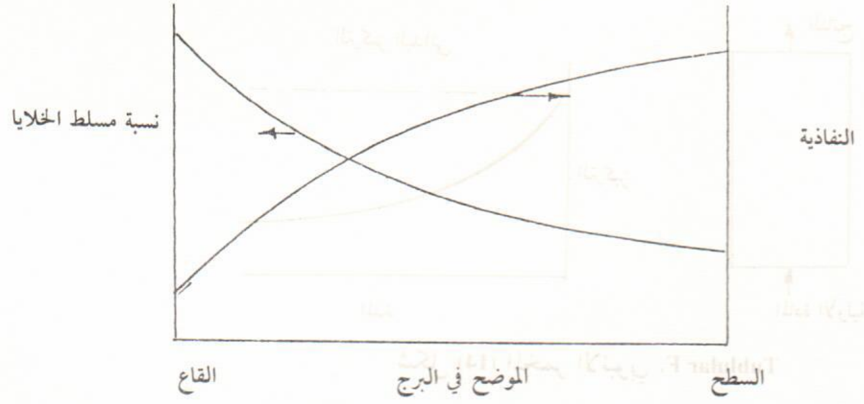


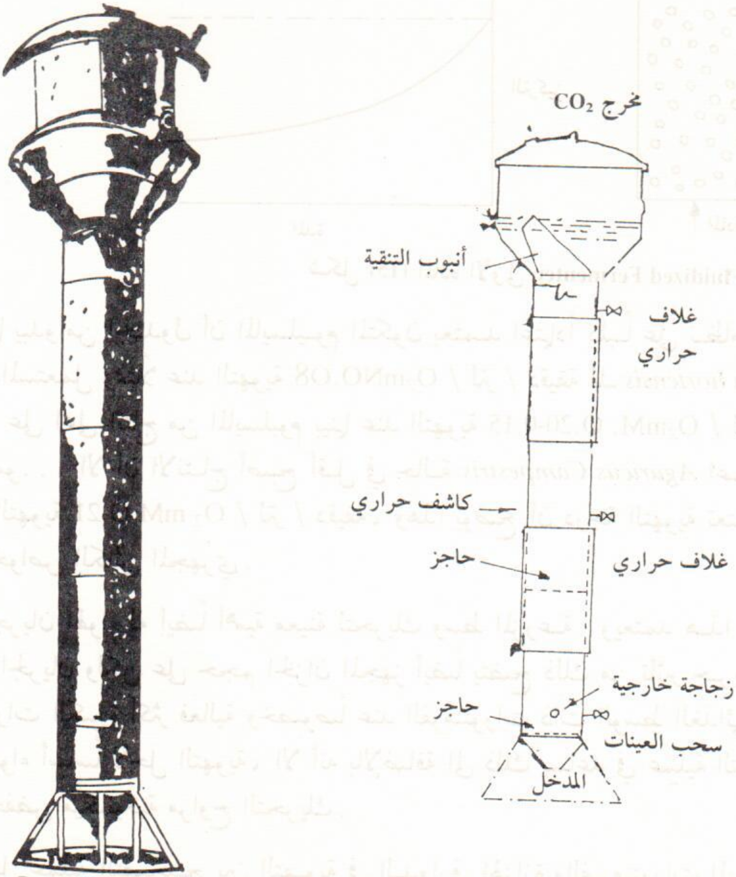
شكل (15) المادة الأولى **Fluidized Fermenter**

وكما يبدو من الجدول أن المايسليوم المتكون يعتمد اعتماداً كلياً على نظام التهوية والتحريك المستعمل وممثلاً عند التهوية O_2mNO.O8 / لتر / دقيقة للـ *Mirchella hortensis* وقد حصل على اعلى انتاج من المايسليوم بينما عند التهوية O_2mM, O.20-0.15 / لتر / دقيقة أصبح النمو. . . الا أن الانتاج أصبح أقل في حالة *Agaricus Campestris* اعطى اعلى انتاج عند التهوية O_2 mM O.21 / لتر / دقيقة، وهذا يوضح أن درجة التهوية تعتمد بدرجة كبيرة على خواص الكائن المجهري.

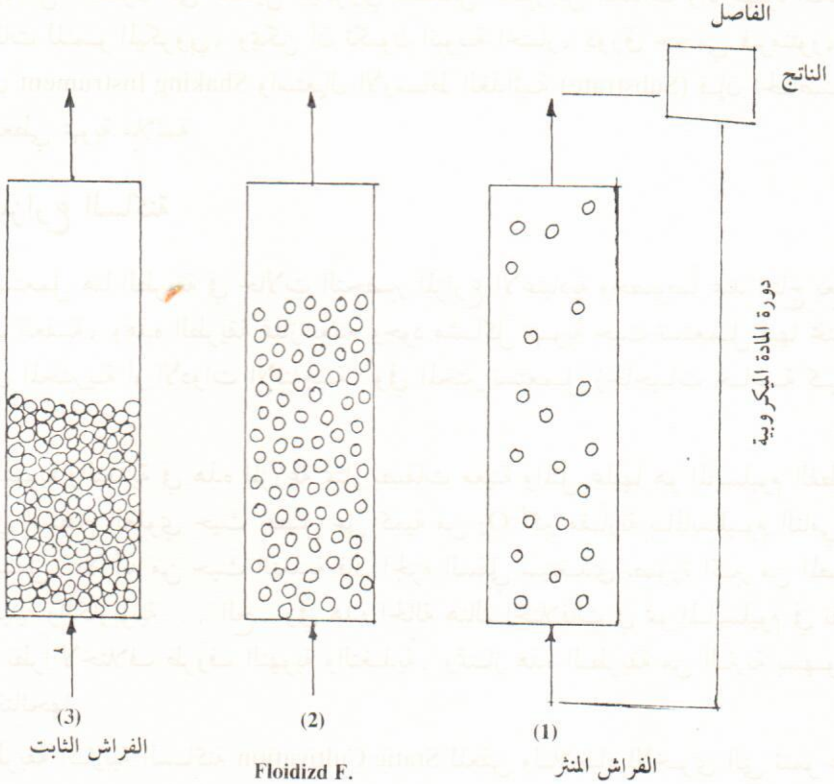
إن جريان الهواء له أيضاً أهمية معينة لتحريك وسط المزرعة. ويعتمد هذا ليس فقط على سرعة الجريان ولكن على حجم الخزان المجهز أيضاً يتضح ذلك من تأثير جريان الهواء في الفرمنتورات الكبيرة أكثر فعالية وخصوصاً عند الفرمنتورات ذات الوسط الغذائي العالي. يستعمل الهواء أساساً لأجل التهوية، الا أنه بالإضافة الى ذلك يساعد في عملية التحريك مما يؤدي الى خفض ميكانيكية مراوح التحريك.

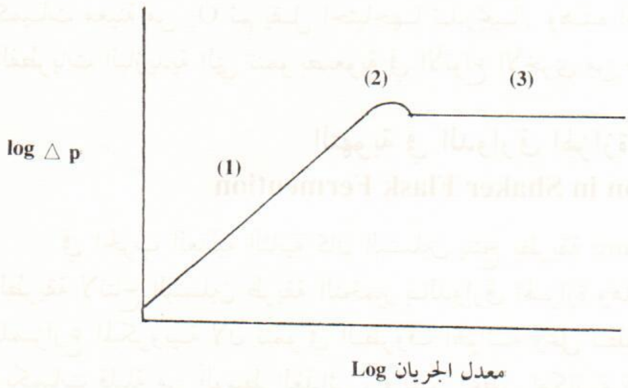
ولأجل عملية التصحيح بين التهوية في الدوارق الهزازة والفرمنتورات المهواة يمكن مقارنتها بالاعتماد على القيمة KLa.





شكل (16) يوضح المخمر البرجي .Tower F





تأثير معدل الجريان على الجزيئات في المخمر الأنبوبي

ولأجل الحصول على التمثيل الميكروبي تستعمل الكثير من المعدات والأجهـزة المختلفة ـ كخزانات للنمـو الميكروبي، ويمكن أن تكـون انبوبـة اختبار، دورق حجمي فـرمنتور، ان استعـمال Shaking Instrument واستعمال الأوسـاط الغذائيـة (Substrate) فـإن الحـاضنـات الهزازة تعطي تهوية ملائمة.

تهوية المزارع الساكنة

تستعمل هنا الطريقة في حالات التحضير المزارع الاعتيادية وخصوصاً عند انتاج بعض المنتجات العفنية، وهذه الطريقة تمتاز بعدم وجود مشـاكل تهـوية حيث تستعمـل فيها مختلف الـدوارق المختبريـة أو الأدوات الإنتاجيـة. وفي المختبر تستعمـل زجاجيـات خـاصـة كـما في الشكل.

التهوية والتغذية في هذه المزرعة تمتاز بصفات معينة والمثل عليها هو المايسليوم الفطري النامي في السطح العلوي حيث يحصل على كمية من O_2 أكبر مقـارنة بـالمايسليـوم النامي في الجزء السفلي. الا أنه من حيث التغذية فإن الجزء السفلي سيتغـذى بصورة اكـبر من المصادر الناتروجينية والكاربونية... الخ. وفي هذه الحالة هناك اختلافات في نمو المـايسليوم في نفس الدورق نظراً لاختلاف ظروف التهوية والتغـذية. وتمتـاز هذه الـطريقة من الـتربة بسهـولتها وسرعة نتائجها.

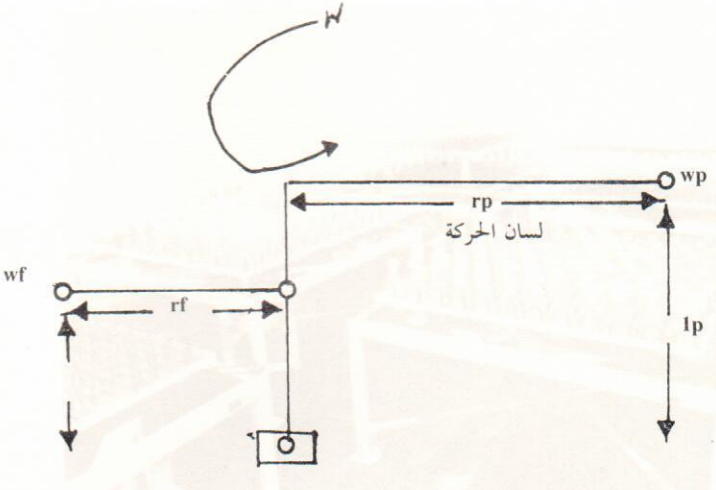
طريقة الـتربية السـاكنة Static Cultivation للعفن ولـلاحياء الأخـرى التي تنمو عـلى السطح. يجب أن نعلم أو أن نثبت الكثير من الأطوار للتربية وهي ضروريـة حيث تحتاج الى كميـات معينة من O_2 ثم يقـل احتياجهـا تـدريجياً. وهـذه الحـالـة هي ضروريـة في حـالـة الفطريات البازيدية التي تنمو بصعوبة في الأنواع الأخرى من طرق التربية.

التهوية في الدوارق الهزازة
Aeration in Shaker Flask Fermention

في الحرب العالمية الثانية كان البنسلين ينتج بطريقة Deep Culture، والمثال عـلى هذه الطريقة لانتاج البنسلين طريقة التخمير بـالدوارق الهـزازة وهذا بـدوره أعطى ظـروفاً جيـدة للمـزارع الميكروبيـة لأن تنمو في الـظروف الهوائيـة وعلى نـطاق مختبري وفي حجـوم صغـيرة وبكميات قليلة من الوسط الغذائي، والذي اعطى إمكانيـة كبيرة لـدراسة الفعـالية الحيـوية لكثـير من السـلالات المحـورة، ولهـذا كله استعملت الـدوارق بحجم 100, 250, 750 $سم^3$ والتي تم هـزها في جهـاز خاص وبـطريقة ميكـانيكية وبـدوران (اعتياديـاً 2,5 سم في القطر) وعموماً 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 الخمر ولذلك تهوى المزرعة بنتيجة الانتشار. حجم الوسط الغذائي في الدورق اعتيادياً يحدد التهوية وكذلك نسبة حجم الوسط الى حجم الدورق. إن ميكانيكية هز مثل هذه المزارع يعطي تأثيراً كاملاً وخصوصاً في الهزازات المدارية.

وإن الهزازات المدارية مجهزة بمثبتات لولبية والتي بدورها ترتبط بقاعدة من Orpital Shaker الألومنيوم الخفيف، وهذه القاعدة مستندة على أربع بولبرنات (ball-bearings in cups) وهذه بدورها متصلة بمحرك كهربائي. علماً بأن بولبرنات تقع مباشرة تحت مركز الدوران وكل نقطة في القاعدة الألومينية تقوم بحركة دورائية. ويعتمد قطر الحركة على قطر كل من طرفي القاعدة من مركز الثقل والشكل رقم (17) يبين أو يوضح العملية.



شكل (17) يوضح المخطط الحاضن الهزاز

WP = تأثير وزن طرف الأول من القاعدة والتي طول ذراعها rp من محور الدوران.

WF = تأثير وزن السحب على المسافة rf من محور الدوران.

LP = مسافة حركة القاعدة الدائرة من مركز الثقل.

LF = مسافة السحب 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.

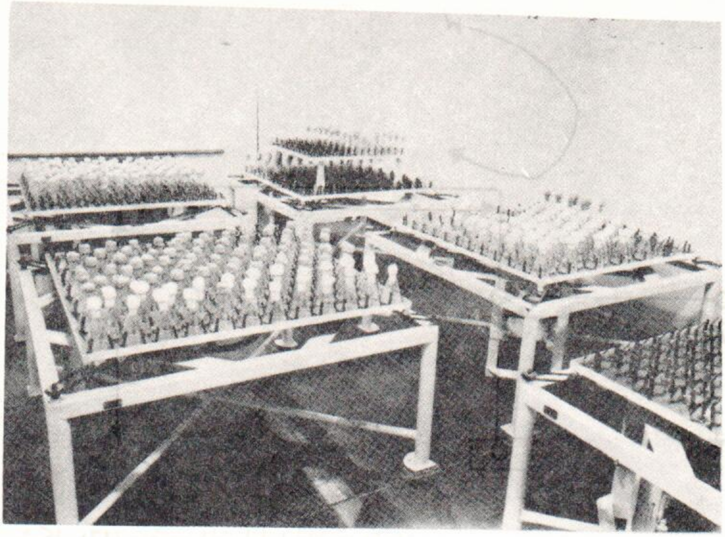
$$Wr^2f \quad \frac{WF}{g} = WrP = \frac{Wp}{g}$$

أما في حالات مراكز الثقل الحقيقي أو السطحية تعطي بشكل:

القوة الطاردة × (Lp - Lf)

عملية التهوية والتحريك في الدوران 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 التحريك والتهوية بسبب Turbulence.



التهوية والتحريك في مزارع الاحياء المجهرية الصناعية

إن الجزء الأكبر من الأحياء المجهرية هي هوائية، ونموها في الأوساط السائلة أو على الأوساط الصلبة مرتبطة ارتباطاً وثيقاً بكمية الأوكسجين اللازم والكافي لنمو المزارع، وبالتالي في تكوين المنتوج المايكروبي المرغوب أو الاثنين معاً.

إن كمية الاوكسجين اللازمة تحدد وتعين نوع الكائن المجهري المصنع اذا ما علمنا أنها

تختلف الواحدة عن الأخرى بكمية استهلاكها للأوكسجين. كذلك عمليات التمثيل الحيوي تحتاج أيضاً الى كمية معينة من الاوكسجين، علماً بأن العمليات الحيوية تنتج أوكسجين وهذا ما توصل اليه (Shu 1953) حيث قسم احتياج هذه الأحياء المجهرية للأوكسجين الى ثلاثة مجاميع:

أ ـ عمليات لديها احتياج للاوكسجين من أجل نمو الاحياء المجهرية نفسها وكذلك لأجل تأليف بعض المنتجات والمثل عليها هو انتاج الأحماض منها *Ustilage Zeae*.

ب ـ عمليات يكون فيها الاوكسجين ضرورياً جداً للاحياء المجهرية لأجل التمثيل الحيوي وكذلك لعملية التخليق ومثال ذلك تخليق α ـ amylase من قبل *Asp. niger*.

جـ ـ عمليات تحتاج الى كمية قليلة من الاوكسجين للحصول على اعلى انتاج، ومثال ذلك عند تخليق حامض الليمون Citric acid بفعل *Asp. niger*.

رغم معلوماتنا عن هذه المجاميع فلا يخفى علينا أهمية الوسط الخارجي وتأثيره، رغم معرفة جميع العوامل للكائن المجهري والتي تحدد الأوكسجين اللازم للوسط الخارجي ودوره وهذا ما اثبته (Johnson 1959) وحدد بذلك درجة التهوية فقد فرض احدى المعادلات لأجل حساب سرعة التهوية للاحياء المجهرية لغرض التخليق الحيوي Biosynthesis عند زرع الأحياء المجهرية في وسط كاربوهيدراتي.

$$A = \left(\frac{3333}{Y} - 41.8 \right) G$$

حيث أن:

A = الاوكسجين اللازم في $m\mu$/دقيقة.
Y = الانتاج للكتلة المايكروبية الجافة في غم / 100 غم كلوكوز.
G = ثابت النمو.

وانتهى بدراسة المادة المايكروبية في غم / دقيقة. هذه المعادلة طبقت وحصل على كتلة حيوية مايكروبية تحتوي على 47% من الكربون، 0.5% من الهايدروجين، 75% من النايتروجين، 8% رماد.

رغم هذه المحاولة كان هناك خطأ حاصل في حساب سرعة التهوية نظراً للتغيرات البسيطة في مكونات المادة المايكروبية ولكن الخطأ لم يكن كبيراً.

وهنا يتضح لنا بأن تجهيز أو إضافة الأوكسجين للاحياء المجهرية نظرياً لم تكن دراسته

متكاملة الا' أن تأثيره في الانتاج واضح وواقعي. ومن هذه العلاقة نرى أن هنالك بعض العقبات في مرور الاوكسجين في طوره الغازي في جسم الميكروب حيث أن هنالك عوامل مؤثرة على إذابة الاوكسجين في الوسط الغذائي. وأن هذه العوامل هي ضرورية لأجسام الاحياء المجهرية من الاوكسجين غير الذائب وقد عرف هذا العامل من قبل Barth- 1950) olo mew).

العوامل التي تؤثر على امتصاص الاوكسجين

من العوامل المعروفة هي علاقة امتصاص الاوكسجين من مزارع الاحياء المجهرية وهذا يحملنا الى دراسة الخواص الفيزياوية والكيمياوية لوسط التربة، ومن البديهي أن أجسام الأحياء المجهرية لها مختلف الخواص المورفولوجية واهمها هي التجمعات المايكروبية، حيث أن هذه التجمعات لها دور كبير في امتصاص وحمل الاوكسجين من خلال المايسليوم الذي يحمل كميات كبيرة، وقد أثبت هذا (Finn سنة 1954) حيث أوجد علاقة هذه التجمعات الميكروبية على حمل الاوكسجين.

ووجد (1954 Chain & Gualand) أن المايسليوم غير الحيّ يخفض تأثير التهوية، حيث أن الصفات الفيزياوية والكيمياوية لمزارع الأحياء المجهرية تتغير باستمرار في وقت نمو الاحياء. كذلك شكل الخزانات التخمرية (الفرمنتور) ايضاً لها علاقة مؤثرة على التهوية وهذا ما نراه فعلاً في الأوعية الهزازة وفي الفرمنتورات (1957, 1953 Carman & Shu) فقد نجحوا في أن يكتشفوا بأن عملية التهوية مبنية على أسس دورانية من شأنها زيادة سرعة امتصاص الاوكسجين من قبل مزارع الأحياء المجهرية.

كذلك من العوامل المؤثرة في عملية التهوية أو امتصاص O_2 هو نوع التحريك المستعمل، وعلى هذا الأساس هنالك نوعان من الأنظمة:

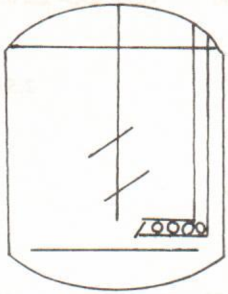
أ - نظام يمثل في جوهره سلسلة من الفتحات في قاعدة الفرمنتور والتي تعمل على توزيع ميكانيك الحركة بكفاءة عالية.

ب - نظام يعتمد على السيطرة المركزية والتي يمكن معرفتها من خلال أسطوانة 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 تكوّن الفقاعات الهوائية في هذا النظام قد درس من قبل & Davidson 1956) Amick) 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 1956) والتهوية الاعتيادية لأي عملية مايكروبيولوجية تجرى بالتحريك والتي تكون جزءاً 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 (finn 1954) وفي بعض الحالات الأخرى من التهوية يتوجب استعمال السرع العالية للمراوح (700-1500 دورة/دقيقة) حيث أن سائل المزرعة سيزداد حجماً لكي يعطي إمكانية كبيرة لتوزيع الهواء. الدراسات على هذا الموضوع قليلة جداً ولكن يمكن القاء الضوء عليها كعنصر أو كعامل مساعد.



شكل (18)
يوضح الحاضن المحوري الهزاز

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

إن الجدول رقم (1)يعكس لنا ظروف التهوية والتحريك للـ Deep Culture لمختلف الفطريات ومزاياها.

إن تقنية التخمر (انتاج وتحويل النواتج المختلفة بواسطة الاحياء المجهرية) قد تقدم بدرجة كبيرة خلال السنوات المنصرمة. بحيث أن تصاميم الأجهزة أصبحت لها أهمية بصورة متزايدة. والتخمر الصناعي كما هو الحال في انتاج المضادات الحيوية يحتاج الى 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 الانتاجية من جهة أخرى فالحالة الأولى (تحضيرية) والفكرة هي: 1) الاستفادة التامة، 2) معرفة كل الخطوات المستعملة، 3) سهولة الاستعمال مع القابلية لملاحظة كل شيء.

جدول رقم (1)

يبين ظروف التهوية والتحريك عند Deep Culture ويبين صفات وأشكال النمو

شكل النمو	درجة التحريك	درجة التهوية	نوع الخزان	نوع الاحياء
0.250 سم حجم الكتلة	80 دورة/دقيقة	250——	سم^3 دورق. فرمنتور هزاز	A garicus blazei
2,5 Cm	——	0.25-0.50 حجم هواء/ وسط/ دقيقة	فرمنتور 20L	
	دورة / دقيقة	13 mMo$_2$/dm^3/h	600Cm^3 دورق حجم الوسط 150 سم	Caricus campestricus
كريمية	172 دورة / دقيقة	1 حجم هواء / وسط / دقيقة	فرمنتور 7.5L	
كريمية	400 دورة/دقيقة	1-3 حجم /وسط/ دقيقة	فرمنتور .20L	
0.05 0.15-0.20m.	——	0.08-0.20 mM O$_2$/dm^3/min	فرمنتور .12L	Marchella mortensis

أما في الحالة الثانية (الانتاجية) الفكرة هي: 1) المحصول الكبير بكلفة قليلة، 2) انتظام واعتماد الانتاج، 3) الاعتماد على الفعاليات الاوتوماتيكية اكثر من الاستعمال اليدوي.

كل التجارب للفعاليات المايكربيولوجية تبدأ في الحاضنة الهزازة بعد ظروف الزراعة المختبرية المثالية تماماً مما يجعل تصميم أجهزة التخمر المختبري هدفاً رئيسياً. وبواسطة التخمر المختبري يمكن انتاج أو تجهيز أحياء مجهرية بشروط محيطية ومعيشية بحيث نحصل على الطاقة القصوى للنمو، وعند الحصول هذه الطاقة القصوى نستطيع من خلالها أن نصمم الأجهزة ونبنيها.

هناك عدة معامل للانتاج في الوقت الحاضر ولكنها غير اقتصادية، واشارة للحقيقة المذكورة اعلاه فإن التقنية المايكروبيولوجية في عدة حالات لم يركز عليها. ولهذا السبب فإن جهاز التخمر المختبري يجب أن لا يكون حاوياً 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 وللاحياء 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 كثيراً بصيغة تركيبته على غطاء الجهاز، علماً بأنه يجب الاهتمام بالنقاط التالية:

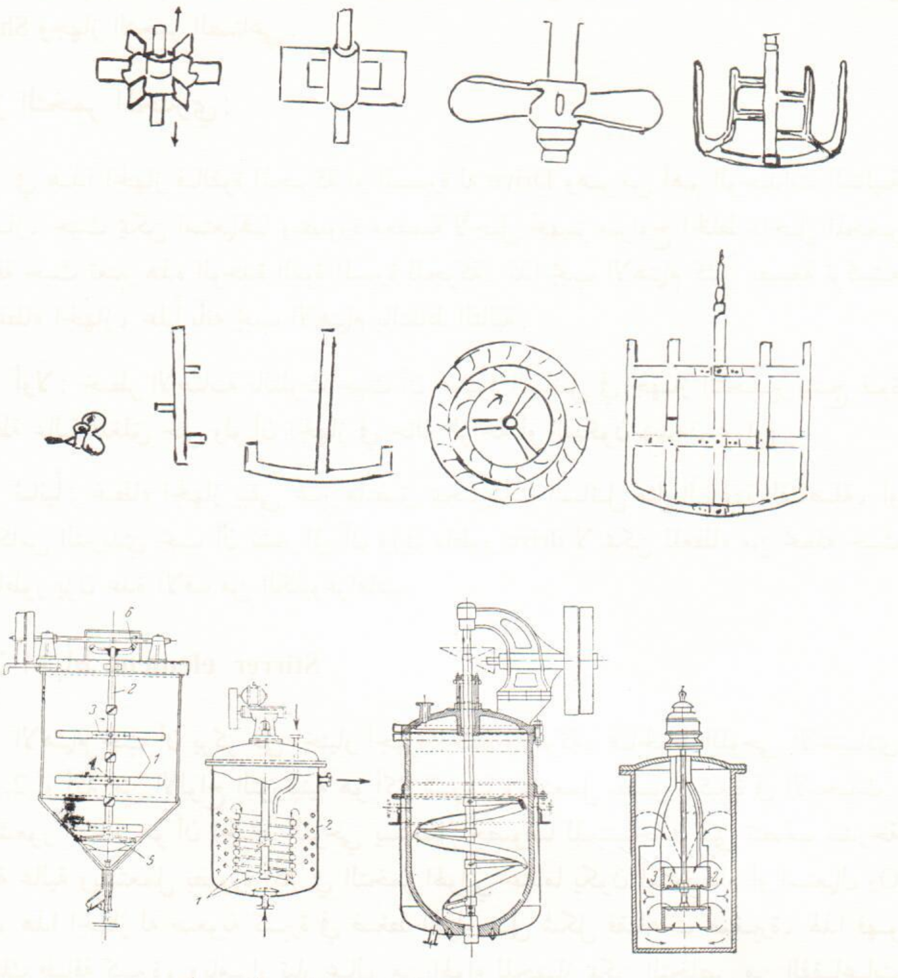
أولاً: خطر الاصابة بالتلوث حيث أن عمود السائل في جهاز التخمير ينتج قوة ضاغطة عالية للغلق حتى ولو أن الجهاز في حالة الراحة أو السكون (بدون عمل).

ثانياً: غطاء الجهاز يبقى غير ملتصق بمحتويات السائل مثل الوغفة الفاصلة، أو الانعكاس التبريدي يجب أن تشير الى أن وزن ماطور drive لا يمكن للغطاء من تحمله حيث أن الماطور يزن عدة آلاف من الكليوغرامات.

معدن الخباط Stirrer element

الاهتمام يجب أن يركز على اختيار أجهزة الخبط والحركة، فالخباط اللوحي الاعتيادي مع 2, 1 أو أكثر من الألواح الثوربينية 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، لهذا فهو يستهلك طاقة كبيرة، وبإمرار 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 تهيء دائرة كاملة يمكن التخلص من الهواء الموجود في الفقاعات الصغيرة. وهذه العملية يمكن استعمالها لمنتوجات متعددة، وذلك عندما تحكم وحدة الاستحلاب emultion unit تحت كمية كبيرة من الطاقة يمكن استعمالها في الدائرة، أو في عمل تكسير الفقاعات. سرعة الخباط هي



شكل (19) يوضح بعض أنواع الخباطات المستعملة

بحدود 3000 دورة/دقيقة. وهذا النوع من الخياط تم البرهنة على أنه ملائم لزراعة التورلا Torula خصوصاً اذا ربطت مع مزيل الرغوة ولهذه الطريقة خميرة التوريلا يمكن انتاجها في أجهزة التخمير الصناعية مع استهلاك طاقة نسبياً قليلة. وهنالك خباط آخر لزراعة الاحياء 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 كثيراً اذا 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 ادخال جهاز لقياس، الحرارة، pH والاوكسجين. . . الخ.

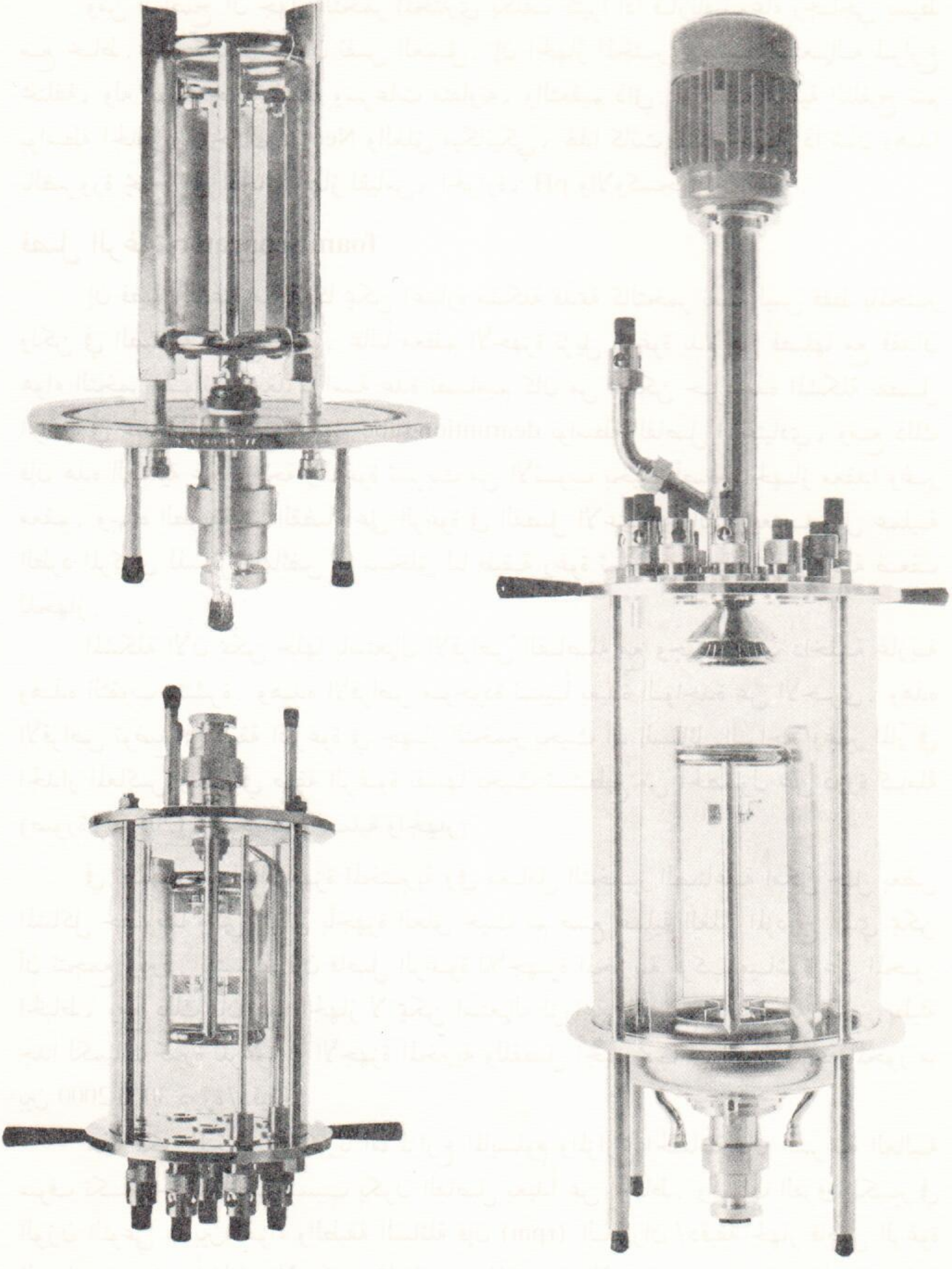
فصل الرغوة foam separater

إن فصل الرغوة ميكانيكيا يمكن اعتباره مشكلة قديمة كالتخمر نفسه ليس فقط بالمختبر ولكن في الصناعة كانتاج الخل. غالباً معظم الأجهزة تزيل الرغوة بدلاً من فصلها مع فقدان هواء التخمر الهوائي. بعد دراسة عدة تصاميم كان من الممكن حل هذه المشكلة بفصل الرغوة في عمود استخلاص الهواء dearuntion tube بواسطة الفاصل الاعتيادي، ومع ذلك فإن هذه العملية غير ناجحة والرغوة تسربت من الأنبوب بحيث أصبح الجهاز معقداً 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.

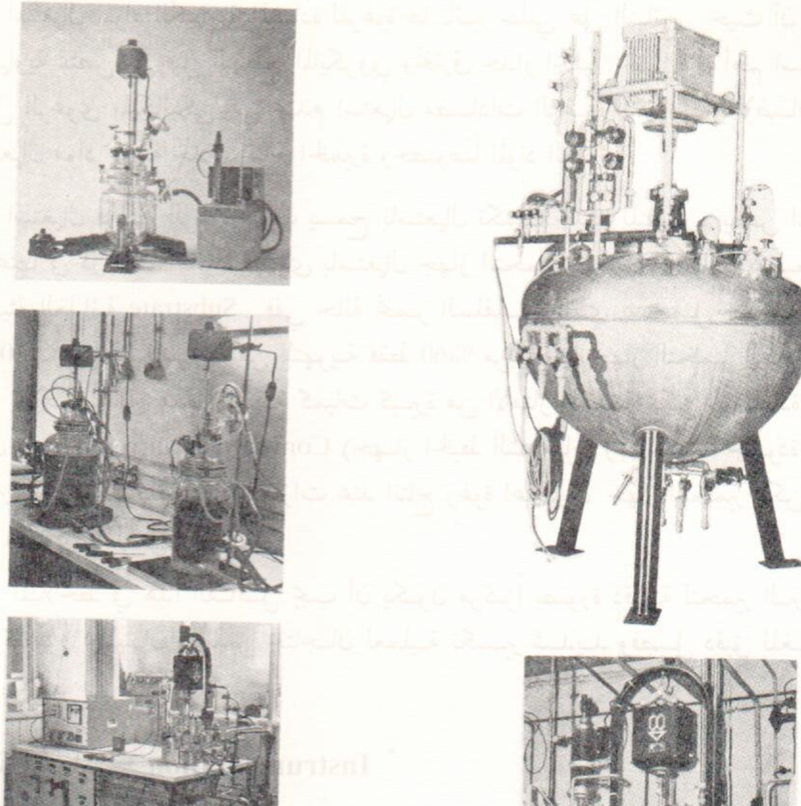
المشكلة الآن يمكن حلها باستعمال الأقراص الفاصلة مع وجود ثقوب داخلية غازية وهذه الثقوب منتشرة. وهذه الأقراص موجودة نسبياً بعيدة الواحدة عن الأخرى. وهذه الأقراص توضع في طبقة الرغوة في جهاز التخمير بحيث أن السائل الراجع وغير المارّ في الجدار المعاكس ولكن في طبقة الرغوة نفسها بحيث تستطيع من الحصول على دورة كاملة (صورة رقم (20) توضح هذه العملية والجهاز).

في تصميم وبناء الأجهزة المختبرية وفي معامل التخمير الصناعية أُمكن حل بعض المشاكل خصوصاً والتي تتعلق بأجهزة العلق حيث تم صنع عملية الغلق المزدوج الذي يمكن أن تتجمع وتبرد. للتبسيط فإن فاصل الرغوة للأجهزة المخبرية مركب مباشرة على المحور الخباط، ومع ذلك فإن هذا الجهاز لا يمكن استعماله لزراعة المايسليم لأن سرعة المحور بطيئة جداً لكميات كبيرة للرغوة في الأجهزة المخبّرية 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 بعيداً عن الخباط. وبسبب الفرق الكبير في الوزن النوعي ما بين الهواء والطبقة السائلة فإن (rpm) الدوران /دقيقة لجهاز فاصل الرغوة الصناعي هو نسبياً قليل ولا يمكن مقارنة rpm للفاصل الاعتيادي بسبب كبر الجهاز، لهذا فإن السرعة هي ما بين 500-1000 rpm.



شكل (20) يوضح مقاطع في مخمرات مختلفة



شكل (21) يوضح بعض أشكال المخمرات المخبرية الاعتيادية

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

إن استعمال فاصل الرغوة سوف يسمح باستعمال تكنيك جديد للتخمر، بعض المزارع يمكن زراعتها في درجات اكسدة قصوى باستعمال جهاز التخمر مملوء بصورة تامة بمزيج من الهواء والبيئة الغذائية Substrate. ففي حالة تخمر السلفايد والذي يستعمل خلالها جهاز سعته 1000 لتر وبهذه الدرجة من التهوية فقط 60% من حجم جهاز التخمر الكلي يمكن استعماله، بالاضافة الى هذه الحقيقة كميات كبيرة من الأمتار المكعبة يمكن الاستفادة منها باستعمال Conventinal Stirrer system (جهاز الخبط الشامل) ربما بسبب جودة نقل الاوكسجين وجودة التخلص من الغازات عند انتاج رغوة اعتيادية، جهاز التخمير يمكن ملؤه تقريباً الى مستوى الفاصل.

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

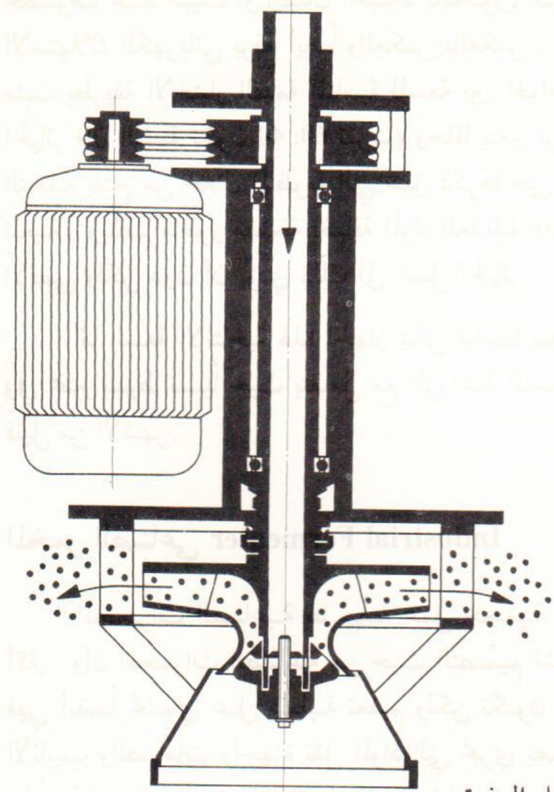
ميكانيكية الجهاز Instrumentation

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

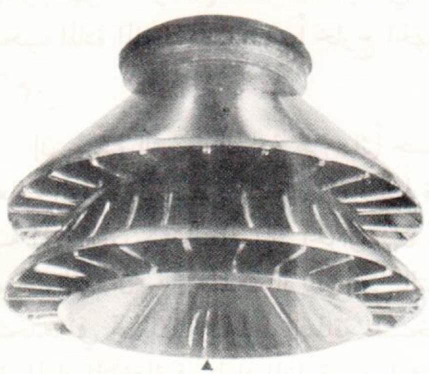
يستعمل جهاز منظم أو PID ولجهاز التخمر الزجاجي يستعمل المحرار مع لوحة تسجيل صغيرة. إن سرعة الخباط stirrer ودخول الهواء تنظم يدوياً. مرونة جهاز التخمر الزجاجي تؤمن بوجود جهاز إضافي وهذا يجهز بصورة جهاز مساعد.

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

هذه العملية تجري كالآتي: يثبت الفرمنتور مع الفاصل الرغوي ثم يملأ ويعقم ويلقح. وبعد وصول مرحلة Lag phase للنمو تضاف المادة الغذائية Substrate بصورة مستمرة وآلية باستعمال مضخة Pump تنظم عملية التهوية الى حد معين مع إمرار هواء خلال المستحلب وخروجه من قمة الفرمنتور ماراً بالفاصل الرغوي.



شكل (22) يوضح مخطط عمل جهاز فاصل الرغوة



أجزاء جهاز فاصل الرغوة الميكانيكي

إن الاستهلاك الكهربائي للخباط أو لماطور الخباط حساس جداً لتكوين الكيمياوي للمواد الغذائية Substrate وكذلك الهواء المار خلال المستحلب وخلال الفاصل الرغوي

خصوصاً عند تثبيت أو ايصال الخباط بالمحور، فإذا ازدادت كمية الجزء السائل فإن الاستهلاك الكهربائي يرفع أيضاً والعكس بالعكس. وهناك كشاف ضوئي على جهاز الفولتيه مثبت بطريقة الاختبار القيمة المناسبة للسعة بين الهواء والمادة الغذائية (في حالة البرافين أو الخمائر فإن النسبة تكون 40 :60 تقريباً) وحالما يتغير تركيب المواد الغذائية المضافة فإن صمام التخلية يفتح من خلال المنظومة التي سبق ذكرها حتى تعود حالة التوازن المحددة الى ظروفها المعينة، وينظم ماطور مضخة اضافة المواد الغذائية Subnstrate بحيث تكون دفعاته بحدها الأقصى ولكن دون أن يؤدي ذلك الى غسل الخمائر.

أما السعة الانتاجية لهذا الجهاز يمكن قياسها بطريقة بسيطة لهذه الطريقة من الممكن وفي مختبر بسيط نسبياً 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 الى 100.000 لتر وربما أكثر. وأن المخمرات الصناعية من حيث التصميم تشبه الى حد كبير المخمرات المختبرية، فهي أيضاً تحتوي على عملية تعقيم ولكن تكون عملية معقدة حيث يجب الانتباه الى الأنابيب والصمامات وأجهزة نقل المواد التي تجري بصورة كهربائية من خلال لوحة السيطرة، علماً بأن عملية التعقيم تنظم بموقتات خاصة، بحيث يمكن الوصول الى أي نقطة ضمن الجهاز بسهولة. والصمامات الغشائية في أنابيب الانتاج تعقم من كلا جهتيها بالبخار وتسحب المادة الماء المكثفة تباعاً خارج الجهاز وتنظيم الضغط بحيث تصل درجة الحرارة 121° م.

إن عملية التخمر الذاتية هي دائماً 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 الى 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. مساويء عملية التخمير مقارنة بالعمليات الكيماوية النقية هي أن العمل هنا يتعلق بمحاليل ذات تراكيز قليلة نسبياً واذا ما تمكن الانسان من رفع هذه التراكيز بخضاض اكثر كفاءة وتوفير تهوية كافية، فإن الوقت المخصص لعملية التخمير سيقلص وبذلك ترتفع أهمية هذه العملية البايولوجية.

الفصل السابع

نضوج ثمرة التمر والتركيب الكيمياوي لها

Dates Development and chemical composition

مكونات الثمرة

استعملت التمور منذ آلاف السنين كمادة غذائية رئيسية بسبب امتلاكها طاقة حرارية عالية High Energy Value وامكانية خزينة جيدة.

إن حوالى ثلاثة أرباع المواد الصلبة والجافة Dry matter في التمور هي السكريات وتحتوي التمور على كمية قليلة من الفيتامينات A_1. B_1, B_2 وكمية كبيرة من حامض النيكوتيك Nicotinic Acid وهي ذو مصدر جيد للحديد والبوتاسيوم، وكمية مناسبة من الكالسيوم والكلورين والنحاس والمغنيسيوم والكبريت، وعلى كمية قليلة من الفوسفور. كما تحتوي التمور على ستة عشر نوعاً من الأحماض الأمينية الحرة. إن نسبة كبيرة من السكريات في أصناف التمور الناضجة الجافة Dry Dates ونصف الجافة Semidry عادة هي السكروز والمتبقي هو السكر المقلوب .Invert Sug الذي هو مزيج من سكري الكلوكوز والفركتوز بكميات متساوية تقريباً. تمرّ التمور بعدة مراحل خلال فترة نموها ونضوجها ويمكن القول أن عملية نمو الثمرة هي المرحلة الأولى ثم تجمّع السكر بالثمرة هي المرحلة الثانية فهي مرحلة النضوج ويمكن أن تكون المرحلة مصنفة إلى مرحلتين (Vinson-1924) فيكون المجموع بذلك ثلاث مراحل اضافة إلى مرحلة النضوج، Ripening. اعتماداً على التغير الذي يحدث في تركيب الثمرة والتغيرات التي تحدث في اللون أيضاً. وأن الاصطلاحات العربية هي المستعملة في تسمية مراحل النضوج. وقد قسم بعض الدارسين مراحل نمو وتطوير ثمرة النخيل مثل (Mason 1927) إلى خمس مراحل، أما Brown & Bahghat فقد حدداهما من 3-5 مراحل أما حسن عشماوي 1957 فقد حددها بأربع مراحل أما دراسات مركز بحوث النخيل في القطر العراقي فقد حددها بخمس مراحل. إن الثمرة الناضجة تكون بيضوية الشكل يتراوح طولها بين 20-110 ملم وقطرها من 8-30 ملم ووزنها 5-15 ملغم وكثافتها أكثر من كثافة الماء بقليل ولها غلاف رقيق مغطى بطبقة شمعية وذو ألوان مختلفة بين الأصفر الباهت إلى الأحمر والأسود وذلك حسب الصنف. وتتكون الثمرة من الأجزاء الرئيسية التالية:

القشرة Skin :

وهي مادة سليلوزية مغطاة بطبقة شمعية سمكها باختلاف أصناف التمور، والقشرة منفصلة أو سهلة الفصل عن الجزء اللحمي من الثمرة.

اللب والجزء اللحمي Flesh :

وهو الجزء الطري من الثمرة الذي يتألف من السكريات الأحادية والألياف والماء بصورة رئيسية، اضافة إلى السكريات الثنائية في بعض الأصناف والبروتينات والحوامض العضوية والبكتين والأملاح غير العضوية والمواد الملونة. وهناك التمور الطرية التي تحتوي على نسبة عالية من السكريات الأحادية مع قليل من السكروز كأصناف تمور الحلاوي والخضراوي والساير، أما التمور الجافة أو نصف الجافة التي تحتوي على نسبة عالية من السكريات الثنائية كتمور صنف دكله نور (نصف جافة) والاشريسي أيضاً، تعتبر من التمور نصف الجافة.

النواة Seed :

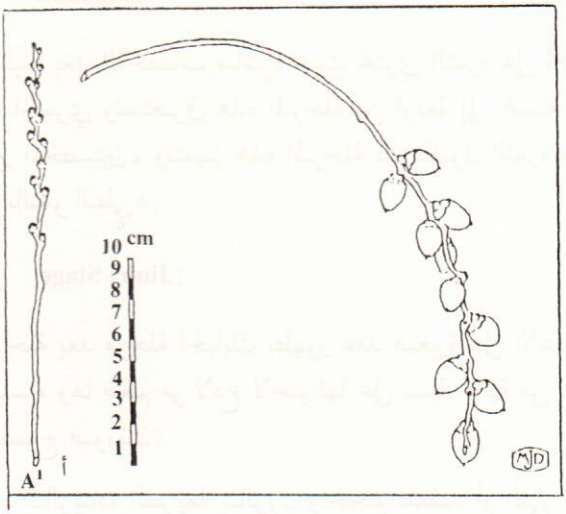
وهو القسم الصلب من الثمرة وتكون النواة محزوزة بأخدود طولي من جانب واحد. تتألف من مواد سللوزية وهي سللوز ومواد دهنية وسكرية وأملاح معدنية ومواد ملونة وماء، كما يوجد صنف من التمور منتشر في ايران يكون عديم النواة.

هناك القمع السللوزي الذي لا يعتبر جزءاً من الثمرة من الناحية المورفولوجية. يتصل القمع بأنسجة ليفية ترتبط قاعدة النواة به، كما يوجد الغشاء الداخلي الذي يكون على شكل طبقة رقيقة بيضاء يحيط بالنواة أو تغلف الجزء اللحمي من الداخل.

مراحل نضوج الثمرة :

إن نسبة الماء إلى المواد الصلبة Dry matter في التمور غير الناضجة تكون عالية، وتنخفض هذه النسبة بزيادة كمية المواد الصلبة في منتصف مرحلة النضوج وترتفع ثانية في نهاية المرحلة حيث تبقى المواد الصلبة ثابتة لكن الماء يفقد من سطح الثمرة بالتبخير. وبصورة عامة فإن الجزء اللحمي أو الطري للثمرة التامة النضج أي في مرحلة التمر يكون ثلثي مكوناتها من السكر وربعها ماء، أما باقي المكونات فهي مواد سللوزية وبكتينية ومواد معدنية وغيرها من المكونات التي تدخل في تركيبها التمور.

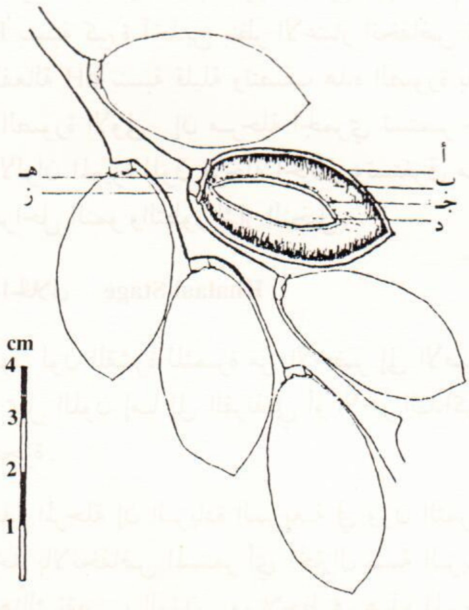
تتميز أربعة مراحل أثناء نضوج الثمرة. وتختلف هذه المراحل عن بعضها من حيث اللون والتركيب الكيمياوي وبعض الصفات الفيزيائية.



شكل (23) يمثل التطور والحاصل في النمو ففي

(أ) يظهر شكل الثمرة والشمروخ عمودي أما

(ب) فيظهر أن الثمرة نصف نامية والشمروخ منحني إلى الأسفل وزيادة في وزن الثمار



شكل (24) مقطع عرضي في ثمرة التمر توضح الأجزاء

(أ) الابيكارب
(ب) بنودكارب
(جـ) أندوكارب
(د) النواة
(و) القمع
(ز) الشمروخ

1 ـ مرحلة الحبابك **Hababuk** :

هذه المرحلة تبدأ بعد الاخصاب مباشرة حيث تحتوي الثمرة على ثلاث كرابل وتستمر حتى بداية مرحلة الجمري وتستغرق هذه المرحلة من أربعة إلى خمسة أسابيع تنتهي عند سقوط الكربلتن غير المخصبتين، وتتميز هذه المرحلة بأن تكون الثمرة مغطاة كلياً بالقمع وتتميز هذه المرحلة بالنمو البطيء.

2 ـ مرحلة الجمري **Jimri Stage** :

تبدء هذه المرحلة بعد مرحلة الحبابك بظهور عقد صغيرة على الأغصان خضراء اللون ذات قشرة صلبة ملساء ولها طعم مر لاذع لاحتوائها على نسبة عالية من التانين. وتتميز في هذه المرحلة من النضوج صورتان:

الأولى تتصف بالزيادة السريعة بالوزن والحجم للعقد أو الثمار الصغيرة المتكونة، والتجمع السريع للسكريات المختزلة وزيادة قليلة في نسبة تجمع السكريات الكلية Total Sugar، خاصة السكروز والمواد الصلبة Total Solids والحموضة الفعالة في هذه المرحلة تكون مرتفعة Active Acidity كما تكون نسبة الرطوبة Moisture فيها مرتفعة أيضاً وذات لون أخضر رغم أنها أخفض بقليل من نسبة الرطوبة في الصورة الثانية. وتتصف الصورة الثانية لهذه المرحلة باختزال نسبة الزيادة بالوزن والحجم كما تختزل نسبة السكريات المختزلة Red Sugar بنسبة كبيرة آخذين بنظر الاعتبار انخفاض نسبة تجمع السكريات الكلية، وتقل الحموضة الفعالة pH بنسبة قليلة وتتصف هذه الصورة بالنسبة العالية للرطوبة إذ تكون أكثر بقليل من الصورة الأولى. إن مرحلة الجمري تستمر حتى تبدأ الثمرة بالتحول من اللون الأحمر إلى الألوان المميزة للون مرحلة الخلاق وتستغرق من 9-14 أسبوعاً وتعتبر هذه المرحلة من أطول مراحل النمو والتطور لثمار النخيل.

3 ـ مرحلة الخلال **Khalaal Stage** :

يتحول لون القشرة للثمرة من الأخضر إلى الأصفر إلى أخضر كرومي أو إلى الأصفر المشوب ثم يميل اللون إما إلى القرنفلي أو الأحمر الداكن وذلك يعتمد على الصنف ومدى العناية بالشجرة.

في هذه المرحلة إن الزيادة السريعة في وزن الثمرة وحجمها التي لوحظت في مرحلة الجمري تأخذ بالانخفاض المستمر أي اختزال نسبة الزيادة، وفي نهاية مرحلة الخلال يمكن أن يكون هناك نقص بالوزن. ويلاحظ في هذه المرحلة الزيادة القليلة في نسبة تجمع

السكريات المختزلة Red Sugar والزيادة السريعة في نسبة تجمع السكروز Sucrose والسكريات الكلية والحموضة الفعالة Active Acidity ونقص في الرطوبة، ويلاحظ في هذه المرحلة من النضج أن معظم السكريات للثمرة تتجمع على شكل سكروز. وتستغرق هذه المرحلة من 3 إلى 5 أسابيع.

4 ـ مرحلة الرطب Rutab Stage :

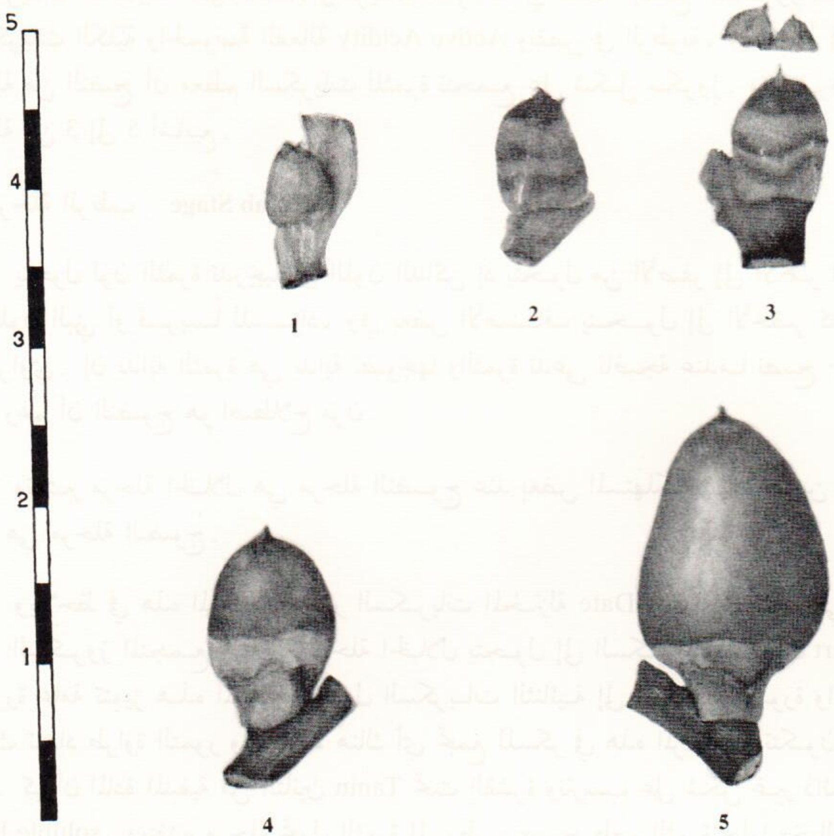
يتحول لون الثمرة تدريجياً إلى اللون الداكن إذ يتحول من الأصفر إلى الأحمر الداكن إلى اللون البني أو قريباً للسواد، وفي بعض الأصناف يتحول إلى الأخضر كصنف الخضراوي. إن بداية الثمرة هي بداية نضوجها والثمرة تدعى ناضجة عندما تصبح جميعها طرية رغم أن النضوج هو اصطلاح مرن.

وتعتبر مرحلة الخلال هي مرحلة النضوج عند بعض المستهلكين وللآخرين مرحلة التمر هي مرحلة النضوج.

ويلاحظ في هذه المرحلة في تحور السكريات المختزلة Red Sug Date كالبرجي. إن جميع السكروز المتجمع خلال مرحلة الخلال يتحول إلى السكر المقلوب Invert Sug، وبصورة عامة تتميز هذه المرحلة بتحول السكريات الثنائية إلى الأحادية بصورة واضحة وبذلك تزداد طراوة التمور ولا يوجد هناك أي تجمع للسكر في هذه المرحلة أو تتكون بنسبة قليلة. كما أن المادة المتبقية من التانين Tanin تحت القشرة وتترسب على شكل غير ذائب In-soluble From. وبتقدم مرحلة تحول الثمرة إلى رطب يصبح طعم الثمرة حلواً «خالياً» من المرارة الموجودة في مرحلة الخلال والمنقولة لها من مرحلة الجمري. وإن الثمرة تستمر في فقدها للرطوبة لكن ليست بنسبة كافية بحيث تحافظ على نفسها من التلف. وتستغرق هذه المرحلة من 2 إلى 4 أسابيع.

5 ـ مرحلة التمر Tamar Stage :

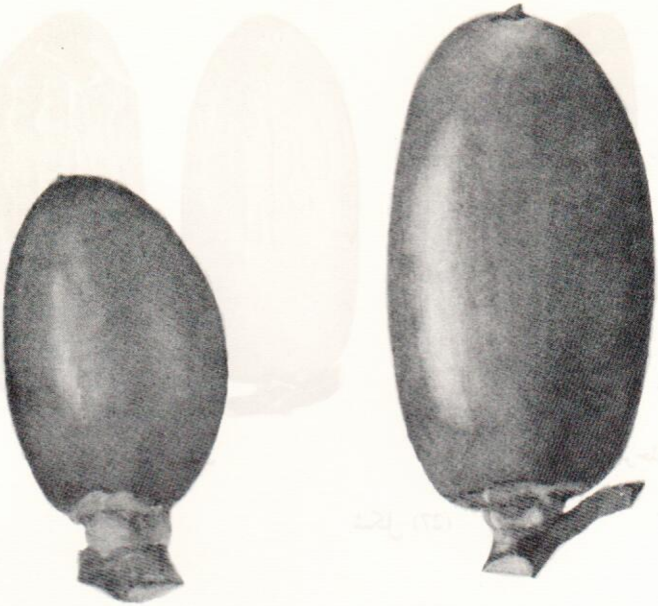
إن المرحلة النهائية لنضوج الثمرة يدعى بمرحلة التمر، ففي هذه المرحلة تفقد التمور كميات كبيرة من الماء تكون فيها نسبة السكر إلى الماء مرتفعة بصورة كافية بحيث يمنع التحمض والتخمر. وهذه المرحلة تقابل وتشابه مرحلة تكون الزبيب أي تحول العنب الطري إلى الجاف، وأن الجزء اللحمي من الثمرة في بداية هذه المرحلة يكون طرياً نسبياً، وتدريجياً يصبح صلب القوام. أما القشرة Skin في معظم أصناف التمور تلتصق بالجزء اللحمي من الثمرة وربما تتجمد وتتصلب قليلاً، وفي بعض الأصناف الأخرى ممكن إزالتها



شكل (25) يمثل مراحل النضوج لثمرة التمر

(1) حبابك (2) حبابك (3) جمري (4) حمري (5) حمري

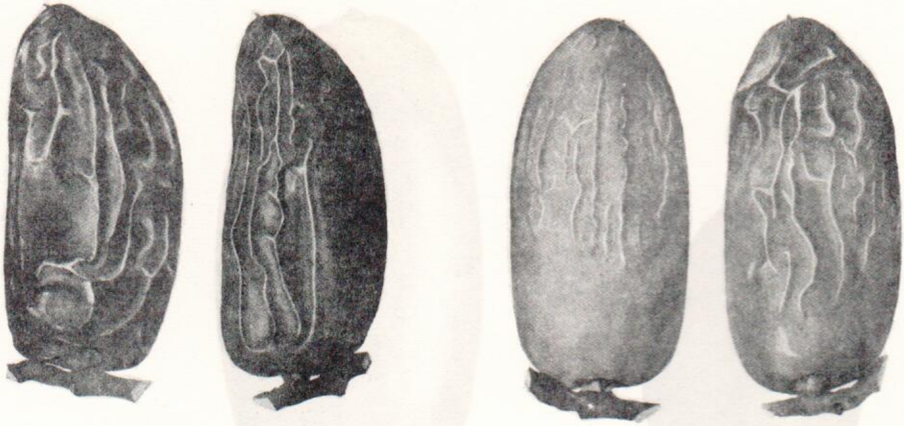
وتتشقق أحياناً وتتخلى عن الجزء اللحمي حيث يترك عارياً والذي يكون بدوره رطباً أو لزجاً فتدخل إليه الحشرات أو تلتصق به الأتربة بسهولة. وإن القشرة والجزء اللحمي الذي تحتها يصبح أغمق لوناً من المرحلة السابقة. إن التمور الطرية في مرحلة التمر ممكن حفظها لسنوات عديدة في درجات الحرارة الاعتيادية اذا حفظت بإحكام وبصورة جيدة، كما أن اللون يصبح أكثر غمقاً بمرور الزمن.



مرحلة الخلال ـ اللون أخضر

مرحلة الخلال

شكل (26)



مرحلة التمر　　　　　　　　　　مرحلة الرطب

شكل (27)

جدول رقم (2)

النسبة المئوية لمكونات بعض أصناف التمور العراقية في مرحلة الخلال

Aj. Gavel

نوع التمر	معدل وزن الثمرة غرام	النوى	السكريات الاحادية	السكريات الثنائية	السكريات الكلية	النسبة الكلية للمواد الصلبة
جبجاب	8.22	6.7	--	--	19.4	26.2
شكري	13.8	8.6	--	--	23.3	31.6
خضراوي	9.0	13.6	4.3	24.2	28.5	37.3
حلاوي	13.9	12.9	4.	28.5	32.5	39.3
زهدي	10.7	14.0	4.5	24.5	29.0	38.0
بريم	8.8	9.9	--	--	24.9	33.6
ديري	13.7	8.4	--	--	20.1	26.2
ساير	9.2	9.7	4.1	27.6	31.7	41.6
دكل	8.0	12.5	2.7	31.2	33.0	40.9

شكل (28) يوضح مراحل تطور ثمار النخيل Fruit

جدول رقم (3)
النسبة المئوية لمكونات بعض أصناف التمور العراقية في مرحلة الرطب

A.J. Gavel

نوع التمر	معدل وزن التمرة/غم	النوى	السكريات الاحادية	السكريات الثنائية	السكريات الكلية	النسبة المئوية للمواد الصلبة
جبجاب	14.3	7.0	18.9	32.3	51.2	61.8
شكري	7.6	14.1	32.6	11.9	44.5	53.1
خضراوي	12.7	8.7	19.9	24.8	44.7	54.0
حلاوي	8.0	13.5	9.6	37.9	47.5	58.5
زهدي	9.7	10.4	19.5	40.2	59.7	70.8
بريم	13.4	7.1	20.0	28.8	48.58	55.5
ديري	9.1	13.3	37.9	21.0	58.9	69.2
ساير	7.3	11.1	22.1	24.5	46.6	65.8
دكل	6.8	11.7	1.7	26.8	48.5	57.8

جدول رقم (4)
نسبة السكريات المئوية في أقسام الثمرة في مرحلة الرطب لصنف الحلاوي

حسن عشماوي

السكريات	النهاية السفلى	وسط الثمرة	النهاية العلوى منطقة القمع
السكريات الأحادية	50.2	33.8	15.0
السكروز	7.8	22.8	35.4
السكريات الكلية محسوبة كسكر منقلب	58.4	57.7	52.2
النسبة الكلية	68.8	65.3	58.2

جدول رقم (5)
النسبة المئوية لمكونات بعض أصناف التمور العراقية في مرحلة التمر

نوع التمر	معدل وزن التمرة/غم	النوى	السكريات الاحادية	السكريات الثنائية	السكريات الكلية	النسبة الكلية للمواد الصلبة
جبجاب	9.4	10.4	70.3	0	70.3	85.0
شكري	5.4	25.2	60.0	0	60.0	69.5
خضراوي	7.8	25.3	63.6	0	63.6	75.4
حلاوي	7.2	12.5	63.8	0	63.8	72.5
زهدي	7.9	10.9	57.5	9.6	67.1	77.8
بريم	10.9	8.0	55.0	0	55.0	63.3
ديري	8.9	16.1	54.1	11.5	65.6	76.2
ساير	9.4	8.3	61.8	0	61.8	70.8
دكل	6.1	14.8	61.2	0	61.2	70.4

جدول رقم (6)
التغيرات الرئيسية في تركيب تمور دكلة نور (كلفورينا) أثناء النضوج

تاريخ أخذ النموذج	مرحلة النضوج	الوزن الطري للثمرة غم	من الوزن الطري of fresh weight			من الوزن الجاف of dry weight	
			ماء	سكريات مختزلة Red Sug	سكروز suc	مجموع السكريات Tot. Sug	P.H
1936/5/17	جمري	0.2	78	5	8	13	5.5
6/14	جمري	2.6	83	25	4	29	5.1
7/12	جمري	9.8	85	34	6	40	5.3
8/16	خلال	15.1	79	20	40	60	5.7
9/13	50% رطب	14.4	41	13	61	74	6
9/27	9 % رطب	13.6	35	20	58	78	6
10/11	رطب تام	12.6	30	24	53	77	6.2

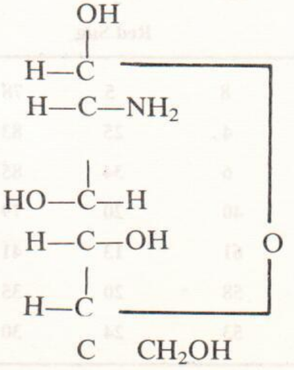
إن علاقة نشاط pG بمراحل النضوج المختلفة هي Hasegawa and others عندما تكون الثمرة خضراء اللون Green يكون نشاط الانزيم بسيطاً جداً Trace وعندما تكون الثمرة في بداية احمرارها early Red يكون نشاط الانزيم 0.18 وفي مرحلة الاحمرار المتأخر للثمرة يكون 2.3، وفي حالة 50% رطب Soft يكون 2.5 وعندما تكون الثمرة 100% طرية 2.5 تكون الثمرة طرية وناضجة Soft-Ripe يكون 0.81 وأن هذه المقادير مقاسة على أساس وحدات في الغرام الواحد كوزن جاف Unit per gram dry weight وأن التمور دون شك تحتوي على انزيمات اخرى غير المذكورة أعلاه.

السكريات في التمور **Sugars in Dates**

السكريات هي المادة الرئيسية الموجودة في التمور وتصنف كيمياوياً السكريات تحت اسم الكربوهيدرات، لذا وقبل الدخول في هذا الموضوع نلقي نظرة عامة عليه.

الكربوهيدرات موجودة بكثرة في النباتات اذ تكون أكثر من 90% من المواد الجافة وهي المادة الأساسية المدخرة فيها وتدخل في البناء الرئيسي لأنسجة النبات. تتكون الكربوهيدرات من الكربون والهيدروجين والأوكسجين والبعض يحتوي على النتروجين أيضاً مثل Glucosamine الذي يحدث في الفطر Fungi. إن الهيدروجين والأوكسجين موجودان في معظم الكربوهيدرات كنسبتها في الماء. فالكلوكوز $C_6H_{12}O_6$ والسكروز $C_{12}H_{22}O_{11}$ وغيرهما، كما أن البعض تكون هذه النسبة مختلفة مثل سكر Rhamnose $C_6H_{12}O_5$ يتكون السكر من هذه العناصر في جميع النباتات الخضراء تحت تأثير ضوء الشمس، وتسمى هذه العملية أو التفاعل بالتمثيل الضوئي Photosynthesis اذ يتحد ثاني أوكسيد الكربون من الهواء مع ماء النبات لتكوين الكربوهيدرات، وان التركيب الكيمياوي للسكروز هو نفسه فيما إذا تم الحصول عليه من التبخر السكري أو قصب السكر، كذلك يتشابه في الصفات الفيزياوية كالاذابة بالماء ودرجة الانصهار ودرجة الحلاوة.

D-glucosamine
C_2-amino-D
glucopyranrse



تصنيف الكربوهيدرات إلى مجموعتين هما: -

أولاً: السكريات الأحادية Monoses-or Monosaccharides

ثانياً: السكريات العديدة Polyoses or Polysaccharides

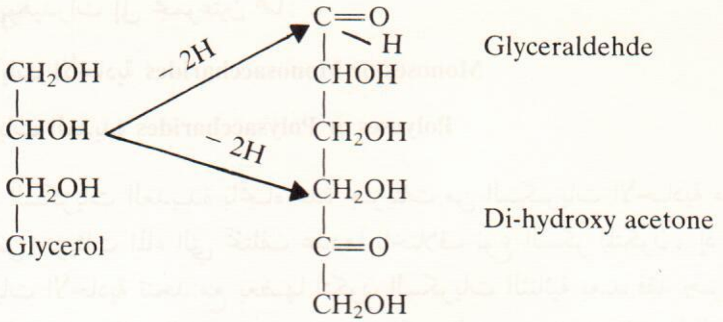
تتكون جزيئة السكريات العديدة باتحاد عدة جزيئات من السكريات الأحادية مع بعضها بعد فقد بعض جزيئات الماء التي تختلف عددها باختلاف نوع السكر المتكون، إذ أن جزيئتين من السكريات الأحادية تتحد مع بعضها لتكون السكريات الثنائية بعد فقد جزيئة ماء Disacch كالسكروز (سكر القصب Cane sug وسكر البنجر Beet sug) والمالتوز Maltose (سكر الشعير Malt sug) وباتحاد ثلاث جزيئات من السكريات الأحادية مع بعضها وباختزال جزيئتين ماء منهما تتكون السكريات الثلاثية Tri-Saccharides كسكر الرافنوز Raffinose وباتحاد أربعة جزيئات تسمى بالسكريات الرباعية Tetra-Sacch مثل Starch. إن السكريات الثنائية والثلاثية والرباعية DI-Tri-Tetri-Sacch تسمى بالسكريات العديدة (المجموعة الأولى) وتسمى أوليجوسكاريدات Oligosaccharides وأن جميع أجزاء هذه المجموعة تذوب في الماء، وعندما تكون نقية تكون على شكل بلوري الكربوهيدرات الأكثر تعقيداً تدخل ضمن المجموعة الثنائية Second order من السكريات العديدة Polysacch، وان هذه السكريات وزن جزيئي مرتفع أي أنها لا تذوب في الماء أو تعطي محاليل غروية لزجة وتشمل هذه المجموعة الصموغ Mulcilages والنشا Starch وسكر الكبد Glycogen والسللوز Cellulose والهمي سللوز Hemicellose والبكتين Pectins. معنى ذلك أن السكريات العديدة (بليوزات) Polyoses تقسم إلى:

أ - السكريات العديدة ذات الوزن الجزيئي المنخفض وتسمى أوليجوسكاريدات.

ب - السكريات العديدة ذات الوزن الجزيئي المرتفع.

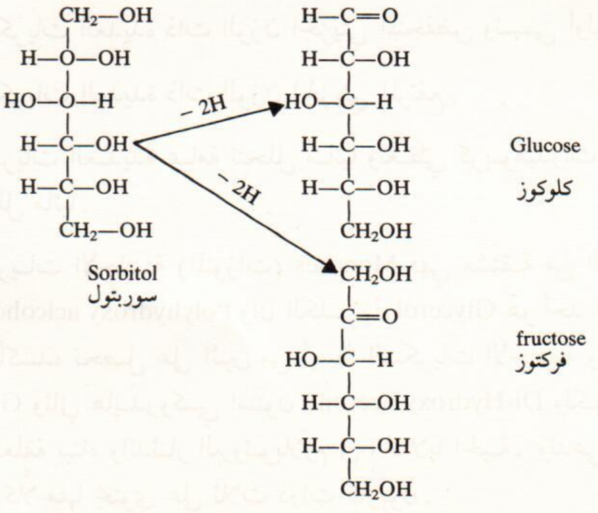
إن السكريات العديدة عامة تتحلل مائياً وتعطي كربوهيدرات أبسط تركيباً بينما الأحادية لا تتحلل مائياً.

أما السكريات الأحادية (المنوزات) Monoses فهي مشتقة من الكحولات العديدة الهيدروكسيل Polyhydroxy aclcohols وان الكلسرول Glycerol هو أحد الأمثلة البسيطة على ذلك، إذ عند تأكسده نحصل على اثنين من أبسط السكريات الأحادية وهي كلسر الدهايد Glyceraldehyde وثاني هايدروكسي استون Di-Hydroxy-acetone ولكل منهما أهمية كبيرة في العمليات المتعلقة ببناء واندثار البروتوبلازم في الخلايا الحية، وتدعى هذه السكريات بـ Trioses لأن كلاً منها يحتوي على ثلاث ذرات كاربون.

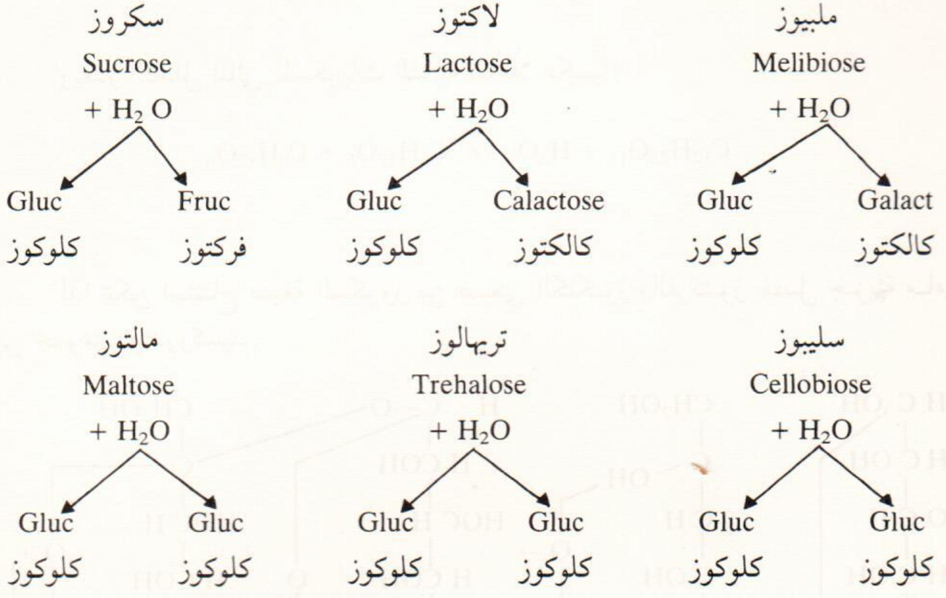


السكريات الأحادية التي تحتوي على أربعة ذرات كاربون في الجزيء تـدعى Tetroses وعنـد وجـود خمس ذرات تـدعى Pentoses ويـوجـد ست ذرات كـاربـون تسمى Hexoses وبوجود سبع ذرات تسمى Heptoses وان النوعـين الآخرين من السكـريات همـا الشائعتـان والعامتان ولهما أهمية كبيرة في الطبيعة.

السكريات الأحادية التي تحتوي على مجاميع كحولية (OH-) زائداً مجاميـع الدهيـدية (C-O/H-) تعرف بالألـدورات aldoses. إن السكريـات الأحاديـة التي تحتوي عـلى مجاميـع كحولية زائداً مجاميع كيتونية (C=O) تعرف بالكيتوزات Ketoses. أما السكريات الأحادية الأخـرى ممكن الحصول عليهـا بأكسـدة الكحـولات العـاليـة High polyhydrox alcohol، فـالسوريتـول Hexahydroxy alcohol الموجـود في بعض الفواكـه حيث يعطي الكلوكـوز والفركتوز بأكسدته.



ان السكريات الثنائية (disacride) فتعتبر من المجموعة الأولى من السكريات العديدة أو المعقدة ذات الوزن الجزيئي المنخفض وأن التحلل المائي لها بوجود الحامض والتسخين أو بوجود الانزيمات تعطي جزيئتين من السكريات الاحادية، والشكل العام للتحلل هو: ـ



ومن أمثلة السكريات الثنائية 1-Disacch سكر القصب أو سكر البنجر ويطلق عليه اسم السكروز -2 سكر الشعير أو المالتوز -3 سكر اللبنى أو اللاكتوز -4 السلوبيوز Celobiose وغيرها.

ويعبر عن تركيب كل هذه السكريات بصيغة واحدة هي $C_{12}H_{22}O_{11}$ ويتحلل السكروز مائياً ليعطي كلوكوز وفركتوز.

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

D-Gluc D-Fruct

ويعطي المالتوز والسلوبيوز عند تحللها بالماء كلوكوز فقط:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 2C_6H_{12}O_6$$

D-Gluc

ويتحول سكر اللبن بالتحلل المائي إلى كلوكوز وكلكتوز:

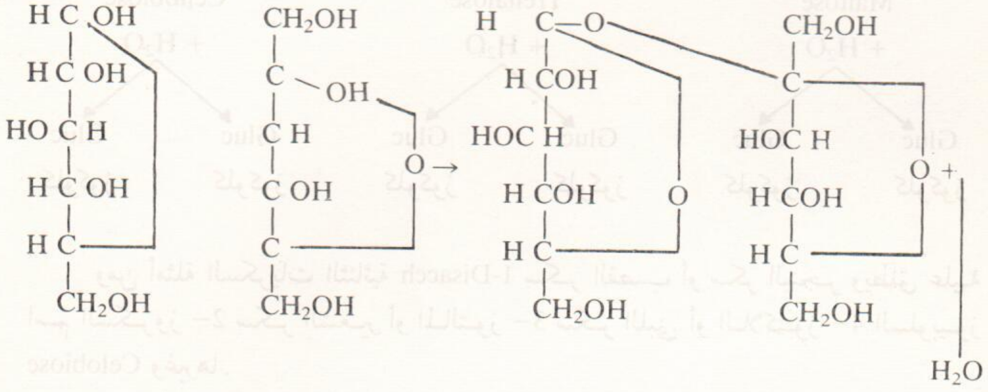
$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow \quad C_6N_{12}O_6 \quad + \quad C_6H_{12}O_6$$

D-Gluc D-Galact

ويعتبر التحلل المائي للسكريات الثنائية تفاعلاً عكسياً:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

لذا يمكن استنتاج صيغة السكروز من صيغتي الكلكوز والفركتوز بفصل جزيئة ماء من مجموعتي هيدروكسيد.



ماء سكروز فركتوز كلوكوز

وأن مجموعة السكريات المعقدة (المجموعة الثانية) معظمها غير قابلة للذوبان بالماء ويكون بعضها محاليل غروية فقط وتتحلل عند تسخينها دون أن تنصهر.

ولهذه المجموعة أوزان جزيئة عالية وعند تحلل السليلوز بوجود الحامض يوضح بأن السلوبيوز Cellobiose هو الأساس في تركيبه، كما أن التحلل الانزيمي للنشا يوضح بأن المالتوز هو الأساس في بناء النشا.

النشا يعتبر الغذاء الاحتياطي للنبات وهو من الأغذية المهمة للإنسان كالطحين والبطاطا والرز وغيرها، اما كون السليلوز هو المكون الرئيسي لجدران حجيرات النبات لذا

يكثر وجوده في الطبيعة ويستخدم في صناعات مهمة مختلفة كالورق والحرير والأفلام الفوتوغرافية وغيرها.

وبصورة عامة تقسم الكربوهيدرات كالآتي:

mono, di, tri, and polysaccharides:

1 Mono Saccharides	**1 ـ سكريات أحادية**
1 - Pentoses	1 ـ بنتوزات
arabinose	أ ـ اربينوزات
b - Xylose	ب ـ أكسايلوز
c - Ribose	ج - رايبوز
d - Desoxyribose	د ـ ديسوكسي رايبوز
e - Rhamnose	هـ ـ رامينوز
2 - Hexoses	2 ـ هكسوز
a - dextrose	أ ـ ديكستروز
b - Levulose	ب ـ ليفلوز
c - galactose	ج ـ كلاكتوز
d - mannose	د ـ مانوز
e - sorbose	هـ ـ سوربوز
II - Disaccharides	**II ـ سكريات ثنائية**
a - sucrose	أ ـ سكروز
b - lactose	ب ـ لاكتوز
c - maltose	ج ـ مالتوز
d - melibiose	د ـ ميلبيوز
polysaccharides	**III سكريات متعددة السكر**
1 - Trisaccharides	11 ـ تراي سكارايد
a - Raffinose	أ ـ رافنوز
b - melezitose	ب ـ ميلزاتيوز
2 - Dextrins	2 ـ دكسترين
a - amylodextrins	أ ـ أميلودكسترين
b - Maltodextrins	ب ـ مالتودكسترين
3 - Starch and Glycogen	3 ـ نشاء والكلايكوجين

ج - كلايكوجين	c - glycogen
4 - سكريات العديدة التسكر	4 - Micellaneous
أ - أصماغ	a - gums
ب - بكتين	b - pectins
ج - همسليلوز	c - hemicellulose
د - سليلوز	d - cellulose

مكونات الثمرة والتركيب الكيماوي لها

Constituent and chemical composition of Date

إن العناصر الكيمياوية الموجودة في النبات والحيوان متشابهة بصورة عامة لكن الجزيئات المكونة لأنسجة الحيوان تختلف عنها في النبات، وذلك لأن الحيوان عاجز عن تأليف العناصر البسيطة للاستفادة منها غذائياً عكس النبات، وهذا ينعكس على التركيب الكيمياوي لأنسجة كل منهما. إن أنسجة النبات اعتيادياً تكون غنية بالكربوهيدرات بينما الأنسجة الحيوانية غنية بالبروتينات. إن التركيب الكيمياوي للغذاء عادة يكون بالنسب المئوية للكربوهيدرات والبروتينات والدهون والرماد Mineral salts (Ash) والماء، وعموماً فإن المادة الغذائية تتألف من ثلاثة مجاميع رئيسية هي:

- الكربوهيدرات Carbohydrates والبروتينات Proteins والدهون Fats.

إضافة لذلك هناك مواد كثيرة موجودة في الماء الغذائية مثل B_{12} والفيتامينات الأخرى الذائبة في الدهون Fat. sol. Vit مثل فيتامينات A,D,E,K كذلك الذائبة بالماء water sol. Vit مثل فيتامين B-Complex, C وتوجد أيضاً الأحماض الأمينية الأساسية Essential A.A. والمعادن مثل/ الصوديوم Na والبوتاسيوم K والكالسيوم Ca والكلور Cl والفلور F واليود I والمغنيسيوم Mg والمغنيز Mn والزنك Zn والحديد Fe والكبريت S والكوبلت Co والفسفور P.

بصورة عامة إن أنسجة الحيوان والنبات عبارة عن نظام مائي للمجاميع الرئيسية الثلاثة المكونة للغذاء حيث تذوب في الماء فتكون البروتينات على شكل مادة غروية Colloidal والدهون على شكل مادة مستحلب Emulsion مذاباً فيها الفيتامينات Fat solu. Vit والمواد الصبغية Pigments والمواد الفسيولوجية الفعالة Physiologically act. comp. عموماً هناك اختلاف في التركيب الكيمياوي لأعضاء النبات أو الحيوان المختلفة. يلاحظ مثلاً أن ثمرة الطماطم في النبتة الواحدة تحتوي على حامض الاسكوربيك Ascorbic Acid

ولكن لا نتوقع أن يكون تركيز هذا الحامض متطابق أو متماثل في كل ثمار الطماطم لهذه الشجرة وان الاختلاف يكون موجوداً تبعاً للأصناف المختلفة وظروف النمو، كذلك نجد ذلك في أجزاء الحيوان المختلفة حيث يختلف تركيبها بالقيمة والكمية.

بجانب ذلك يلاحظ أن أنسجة النبات والحيوان تملك بعض الصفات المشتركة إذ أن كل خلية حية فيها تحتوي على عدد من البروتينات وهي ليست متماثلة أو متطابقة لكنها تملك بعض الصفات والتراكيب المشتركة، كذلك بالنسبة للعمليات الحياتية الخاصة ببناء البروتوبلازم واندثارها اذ أنها تكوّن سلسلة من التفاعلات موجودة في جميع خلايا النبات والحيوان.

التمور احدى المنتجات النباتية وتحوي على المركبات التالية:

1 ـ السكريات الأحادية Monosaccharides

إن السكريات الأحادية الموجودة في التمور تكون على شكل مزيج متساو تقريباً من الكلوكوز والفركتوز بنسبة 55:45 وهذا المزيج يسمى بالسكر المقلوب Inv. Sug.

وتؤلف السكريات الأحادية حوالى 70% من وزن الجزء اللحمي من الثمرة كما تؤلف 7% من وزن النواة وأن الكلوكوز والفركتوز هما مثالان للسكريات الأحادية ويعبر عنها بالصيغة الكيمياوية $C_6H_{12}O_6$. ان جزيء الكلوكوز يتألف من خمس مجموعات هيدروكسيلية ويدخل هذا السكر في بعض التفاعلات المميزة للالدهيدات وتتحد ذرة أوكسجين مع جزيء من الكلوكوز عند أكسدته بهدوء ويتكون حامض أحادي القاعدة إذ أنه يحتوي على مجموعة الدهايد ويمكن التعبير عن الكلوكوز بالصفة التالية:

$$CH_2OH\text{-}CHOH\text{-}CHOH\text{-}CHOH\text{-}CHOH\text{-}C\begin{matrix} // O \\ \backslash H \end{matrix}$$

فالكلوكوز إذاً هو الدهايد وكحول في نفس الوقت (هيدروكسي الدهايد) أما جزيء الفركتوز فإنه يحتوي على خمس مجموعات هيدروكسيلية فالكلوكوز أيضاً إلا أنه عند أكسدته يختلف عن الكلوكوز إذ أنه ينحل بأوكسيد الزئبق في وجود هيدروكسيد الباريوم إلى حامضين هما:

ثلاثي هيدروكسي ـ بيوتريك $CH_2OH—CHOH—CHOH—COOH$

وحامض الكليوكوليك $CH_2OH—COOH$ ان ذلك يدل على وجود مجموعة كيتون في جزيء للفركتوز تتصل بذرة الكاربون الثانية في بداية السلسلة لتركيبه.

$$C_6H_2(OH)—C_5H(OH)—C_4H(OH)—C_3H(OH)—C_2O—C_1H_2OH$$

ويعتبر الفركتوز كيتونا وكحولا عديد الهيدروكسيد في الوقت نفسه أي أنه كحول كيتوني يوجد في محلول الكلوكوز جزيئات ذات صيغة الدهيدية وأخرى حلقية (أكسيدية) أي أنه يكون في المحلول توازن ايزوميري ديناميكي:

$$^6CH_2(OH)—^5CH(OH)—^4CH(OH)—^3CH(OH)—^2CH(OH)—C_1H{=}O \rightarrow$$

$$\rightarrow \underbrace{CH_2(OH)—CH—CH(OH)—CH(OH)—CH(OH)—CH(OH)}_{O}$$

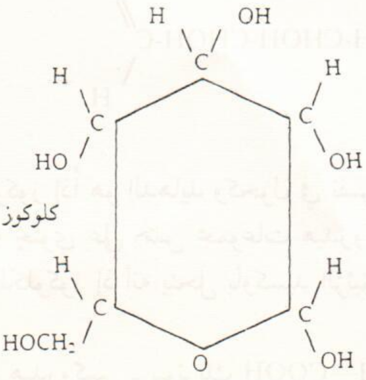
والفركتوز يتفاعل أيضاً على هيئة شكلين آيزومريين ديناميكين:

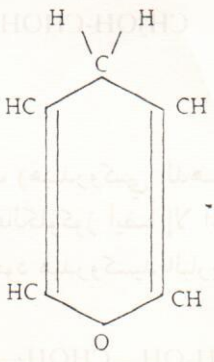
$$^6CH_2(OH)—^5CH(OH)—^4CH(OH)—^3CH(OH)—^2CO—^1CH_2OH \rightarrow$$

$$\rightarrow \underbrace{CH_2—CH(OH)—CH(OH)—CH(OH)—C(OH)}_{O}—CH_2OH$$

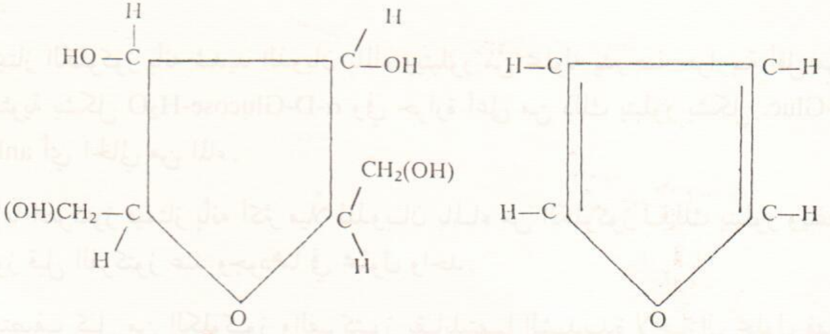
ويعبر عن بناء سكر الكلوكوز والفركتوز في الحالة الصلبة بالصيغة الأكسيدية لأن الشكل الأكسيدي هو الذي ينفصل من المحلول المشبع.

وعند مقارنة صيغة الكلوكوز الحلقية مع صيغة البيران نرى أن الكلوكوز يحتوي على نواة بيران مهدرجة، ولهذا يطلق عليه اسم كلوكوبيرانوز. وفي الأشكال الثابتة للكلوكوز والفركتوز تكون الحلقة من خمس ذرات كربونية وذرة واحدة من الأوكسجين.

كلوكوز 

بيران 

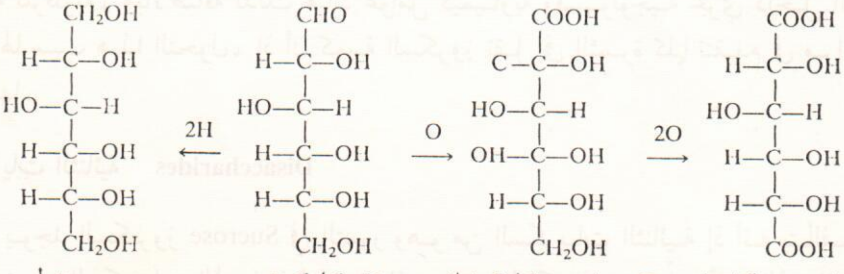
أمـا الأشكال غـير الثابتـة لهذين المـركبين تتكـون من حلقة خمـاسية ذات أربـع ذرات كربون وذرة واحدة من الأوكسجين كما حالة α-Fructose وهذه الحلقة مميزة لمركبات مجموعة الفوران، لذا يطلق على الفركتوز باسم فركتوفيرانوز.



α-Fructose

يحتوي النبات والحيـوان على كميـات كبيرة من الكلوكـوز إذ يوجـد في عصير العنب، ويسمى بسكر العنب كما يوجد في جميع الفواكه الحلوة كما يوجد في الحبوب والبذور والأوراق والأزهار، ويوجد في الدم وفي سائل النخاع الشوكي للحيوانات ويوجد في العسل وهو أحـد المكـونات الـرئيسية للمـولاس، وممكن الحصول عليـه على النـطاق التجاري بـالتحلل لنشـا البـطاطا بـوجود الحـامض. ان الكلوكوز يؤلف النشـا Starch والسللوز Cellulose والنصف سللوز Hemicellulos والكلايكوجين Glycogen والدكسترين Dextrins والسكروز Sucrose والمـالتـوز Maltose والـرافينـوز Raffinose يتبلور الكلوكـوز مـع جـزيء واحـد من المـاء $C_6H_{12}O_6+H_2O$ وينصهر اللامائي منه على درجة 146 درجة مئوية وهو سهل الذوبان بالماء وتقل حلاوته مرتين تقريباً بالمقارنة مع السكروز.

عند أكسدة الكلوكوز يعطي أولاً D- حامض الكلوكونيـك ثم D- حامض السكـاريك ويختزل الكلوكوز إلى كحول سداسي الهيدروكسيل تسمى السوربتول، كما أنه يتخمر بواسطة الخمائر.



سوربيتول D- كلوكوز D- حامض كلوكونيك حامض سكاريك

أما الفركتوز (سكر الفواكه) يوجد في كثير من الثمار الحلوة ويشكل مخلوطه مع الكلوكوز بنسب متساوية 80% من الجزء الأساسي لعسل النحل كما يدخل في تركيب سكر القصب، ويوجد في الأجزاء الخضراء من النباتات وفي رحيق الأزهار، والفركتوز يتخمر بالخمائر.

يمتاز الكلوكوز بأنه شديد الذوبان بالماء ويتبلور من محلوله بدرجة حرارية أقل من 50 درجة مئوية بشكل α-D-Glucose-H_2O وفي حرارة أعلى من ذلك يتبلور بشكل α-D-Gluc. anhydros أي الخالي من الماء.

أما الفركتوز فيمتاز بأنه أكثر ميلاً للذوبان بالماء من الكلوكوز لذلك يتبلور وينفصل الكلوكوز قبل الفركتوز عند وجودهما في محلول واحد.

يتصف كل من الكلوكوز والفركتوز بقابليتهما الشديدة لاختزال محلول فهلنك (كبريتات النحاس) وغيرها من الفلزات.

ويوجد كل من الكلوكوز والفركتوز في التمور بنسب متساوية تقريباً ويسمى بالسكر المقلوب .Inv. Sug، وحلاوة هذا السكر أقل من حلاوة السكروز بنسبة قليلة لأن حلاوة الكلوكوز أقل من حلاوة السكروز بنسبة كبيرة بينما الفركتوز فحلاوته أعلى من السكروز، لذا فحلاوة مزيجهما مساوية لحلاوة السكروز تقريباً.

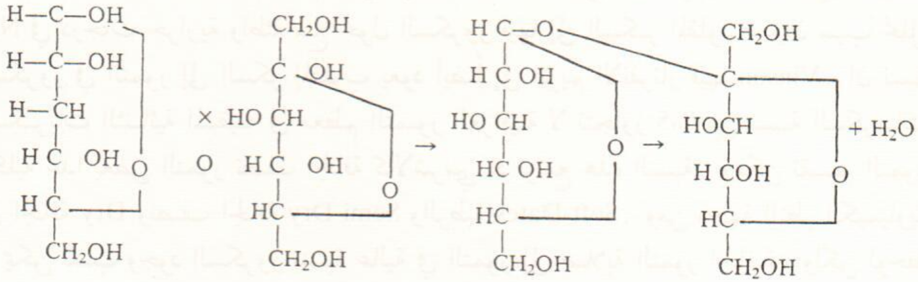
إن الثمرة في مرحلة الخلال تحتوي على سكريات ثنائية وأحادية تزداد نسبة السكريات الأحادية بتقدم نضوج الثمرة وذلك بتحول السكريات الثنائية إلى الأحادية، علماً بأن معظم السكريات الأحادية الموجودة في التمور يجب أن تمر في مرحلة السكروز (Vinson)، وبالنسبة للتمور التي تحتوي على نسبة عالية من السكروز كتمور دكلة نور فالتحول هذا يكون بطيئاً، أما في التمور الطرية فعملية التحول تكون سريعة.

ان عملية تحول السكروز إلى سكريات أحادية تعتمد على عوامل كثيرة منها درجات الحرارة ورطوبة الهواء إذ تتناسب سرعة التحول طردياً مع ارتفاع درجة الحرارة وكذلك بالنسبة للرطوبة، وبالاضافة لذلك هناك عوامل كيمياوية وفسيولوجية تجري داخل الثمرة يعود لها سبب هذا التحول، إذ أن كمية السكروز تقل في الثمرة كلما تتقدم في مراحل نضوجها.

السكريات الثنائية Disaccharides

يوجد السكروز Sucrose في التمور وهو من السكريات الثنائية إذ أنه يتألف من جزيئين من السكريات الأحادية لذا يتحلل جزيء السكروز مائياً بتأثير الأحماض أو

الانزيمات (الانفرتاز Invertase) ليعطي جزيئاً من D- كلوكوز وجزيئاً من D- فركتوز، بناء على ذلك أن جزيء واحد من كل من هذين السكرين متحدان بواسطة ذرة أوكسجين ليكونا جزيء السكروز.



كلوكوز فركتوز سكروز

إن السكروز يتحلل ليعطي خليطاً من الكلوكوز والفركتوز الذي يسمى بالسكر المقلوب أو المحلول Inv.Sug، وان هذا الاسم ناشيء من عكس أو قلب الدوران النوعي من اليمين إلى اليسار أثناء التفاعل. إن نسبة تحلل السكروز أكبر بألف مرة تقريباً من نسبة تحلل المالتوز (سكر الشعير) واللاكتوز (سكر الحليب) وهما من السكريات الثنائية أيضاً، إن البنجر وقصب السكر هما المصدران الرئيسيان للسكروز الذي ينتج منهما على النطاق التجاري.

يمتاز السكروز عن كل من الكلوكوز والفركتوز بقابليته على تكوين بلورات منتظمة الشكل Monoclinic-System نقية وعديمة اللون وشفافة، وان قابلية ذوبانه أقل من السكريات الأحادية وتزداد بارتفاع درجة الحرارة. وعند تسخين هذا السكر لدرجات حرارية عالية يكوّن مادة سمراء داكنة تسمى بالكراميل Caramel وعند رفع درجة الحرارة إلى أعلى يتحلل إلى كاربون وماء.

إن السكروز يتكون في المراحل الأولى لنمو الثمرة وبنسبة أعلى من السكريات الأحادية وتبدأ بالانخفاض بتقدم نضوج الثمرة الكلية في معظم أنواع التمور.

من الملاحظ أن عملية انقلاب السكروز إلى السكر المقلوب ليس متميزاً عن السكر المختزل الموجود في التمور الذي يحدث أثناء عملية التحلل ولكن ذلك بدرجة أقل. ففي مرحلة الخلال ان خمس السكر أو أقل بقليل من ذلك هو من نوع السكر المختزل والباقي ما

يزال على شكل سكروز. وعندما تكون الثمرة في مرحلة الرطب التام فإن ثلث إلى نصف مجموع السكر .Total Sug يتحول إلى سكر الانفرت. ان التحول يستمر أثناء عملية الخزن وبنسبة تعتمد على درجة حرارة الجو ورطوبته، اذ أنه في درجات الحرارة الواطئة يكون التحول بطيئاً كذلك الحال بالنسبة للرطوبة، لذا تحفظ تمور السكروز كدكلة نور Daglat Nur في درجات حرارية واطئة لمنع تحول السكروز فيها إلى السكر المقلوب، وان سبب تحلل السكروز في التمور إلى السكر المقلوب يعود أيضاً إلى انزيم الانفرتار فيها Vinson. ان نسبة السكريات الثنائية المتبقية في معظم التمور العراقية لا تتجاوز 5% من نسبة السكريات الكلية عدا بعض التمور تصف الجافة كالاشرسي اذ ترتفع هذه النسبة. ويمكن تقسيم التمور إلى الجافة Dry ونصف الجافة Semi-Dry والرطبة Soft-Dates. ومن وجهة النظر الكيمياوية لا يمكن نسب وجود السكروز بنسبة عالية في التمور إلى صلابة التمور الجافة، ولكن لوحظ رغم ذلك أن وجود السكروز في التمور له علاقة وثيقة بصلابة التمور سواء تم المرور بمرحلة الرطب كدكلة نور أم عدم المرور في هذه المرحلة كما في معظم التمور الجافة، علماً بأن جميع السكريات في التمور تكون اعتيادياً على شكل محلول وان درجة انصهار السكروز 180 مئوية، والكلوكوز 146 درجة مئوية والفركتوز 102 درجة مئوية وهي أعلى من الدرجات الحرارية الاعتيادية التي يعامل فيها التمور.

يمكن القول بصورة عامة بأن التمور الطرية تحوي السكر على شكل سكر مقلوب .Inv. Sug. والتمور الجافة تحتوي على السكر على شكل سكروز وهناك اختلاف بسيط في مجموع السكريات للمجاميع الثلاثة Cook and Furr. ويمكن القول ان حوالي ثلاثة أرباع المادة الجافة Dry matter من الجزء اللحمي للتمر وهو سكر في وضعه الثابت (أحادية) في التمور الطرية وبصورة عامة، وتحتوي على قليل من السكروز بينما في التمور الجافة حوالي ثلثها سكروز وثلثيها سكريات مختزلة Red. Sug (سكر مقلوب ـ .Inv. Sug) أما التمور نصف الجافة فهي تقع بين المجموعتين من التمور الجافة والطرية من حيث توازن نسبة السكر.

3 ـ الماء Water

من المركبات الموجودة دائماً في الغذاء وبوفرة هو الماء وحتى المواد البلورية التي هي نسبياً نقية كالسكر والملح تحتوي على كمية قليلة من الماء تتكثف على سطح البلورات وأحياناً يكون الغذاء خالياً من الماء كالزيوت Oils.

إن المواد المسامية النباتية والحيوانية تحتوي على كمية كبيرة من الماء، ففي الخضروات الورقية Leafy green vegetable هناك أكثر من 90% ماء واللحوم المطبوخة التي فقدت كمية من مائها تتراوح نسبة الماء فيها 50-65%. في الحيوان والنبات يكون الماء في دوران دائم مع

النسغ في النبات ومع الدم في الحيوان بين خلايا الجسم، ويلاحظ تقطر السائل من جسم الحيوان أو النبات عند قطعة ويوجد الماء في الغذاء على الشكل التالي: ـ

أ) سائل حر مذاب فيه بعض المواد Free Liquid وهو الماء الموجود في السايتوبلازم Cytoplasm وبين الخلايا والذي يدور بين الأنسجة.

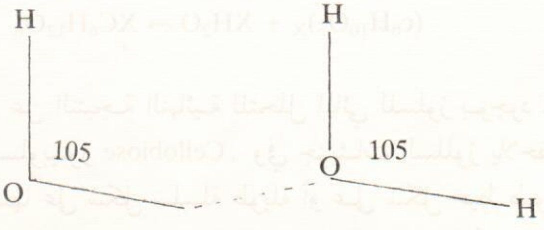
ب) الماء المتحد Hydrates form مع بعض المواد ويكون اما عند وجود أواصر هيدروجينية Hydrogen Bonds بين جزيئات الماء والأينات أو الجزيئات التي تحوي على الأوكسجين أو النايتروجين، أو عندما يكون الكترون الأوكسجين غير المشارك ليتناسق مع الايون، وان النشا والبروتينات وبعض المركبات العضوية والأملاح هي مهمة في الغذاء وفيها الماء على هذا الشكل.

جـ) يكون الماء متشرباً وعلى شكل هلامي osimibed water in gel اذ أن بعض المواد عند تماسها مع الماء تلتقطه أو تمتصه وتنتفخ هي بدورها، وهو يتكامل بواسطة الأواصر الهيدروجينية.

د) الماء الممتص على سطوح بعض المواد الصلبة adsorption on the surfaces of solids وهو موجود على جميع السطوح المعرضة للهواء والموجودة فيه بخار الماء.

ان جزيئة الماء تتألف من ذرة هيدروجين الموجبة الشحنة H^+ مع ذرة -O, الأوكسجين إذ تتصل هذه الذرات بزوج من الالكترونات التساهمية وان الزاوية بين هذه الذرات الهيدروجينية هي °105، وهذه الأصرة تدعى بالاصرة الكيمياوية Chemical-Bond. كما أن جزيئات الماء المتقاربة مع بعضها حيث تتصل كل جزيئة بأقرب جزيئة ماء لها باصرة ضعيفة تدعى بالاصرة الهيدروجينية Hydrogen-Bond وهذه الاصرة تشارك الالكترون الموجود بين الأوكسجين والهيدروجين.

بتسخين الماء تتحطم الأواصر الهيدروجينية ويتحول إلى بخار Steam وتوجد الأصرة الهيدروجينية أيضاً بين جزيئات الماء، وجزيئات من نوع آخر موجودة في المادة الغذائية، لذا من الصعوبة فصل الماء ما لم تتحطم الجزيئات الأخرى الموجودة في المادة المرتبطة مع الماء.



Chemical Bond Hydrogen Bond

إن المكونات الرئيسية للتمور هي السكر والماء ويمكن اعتبار الماء بأنه يحتل الدرجة الثانية بعد السكريات في نسبة وجوده بالتمرة، وتؤخذ هذه المركبات بنظر الاعتبار بالنسبة لمكبس التمور اذ بالنسبة لها يعتبر الماء أكثر أهمية لأن نسبة وجود السكر في التمور قد يثبت في المراحل الأخيرة لنضوج التمرة، لكن الماء يمكن تغير نسبته في التمور بواسطة التجفيف Dehdration والترطيب Hydration. ان نسبة الماء في التمرة تتغير تبعاً لمراحل نضوجها وكذلك تختلف باختلاف الأصناف وفترة جنيها وايصالها للمكابس. ففي أمريكا حيث أن تمور دكلة نور Daglat Nuur هو الصنف الرئيسي عندهم اذ يؤخذ بنظر الاعتبار الاهتمام لمنع تكون الفطريات mold والتخمر والتحمض، والظروف الجوية عندهم تجيز جني التمور بالسرعة الممكنة فتصل إلى المكابس وهي تحتوي على نسبة رطوبة تصل إلى 50%. بينما تستلم التمور العراقية في أمريكا وهي تحتوي على نسبة رطوبة لا تتجاوز 15% وفي الجزائر تصدر التمور دكلة نور إلى مركز تعبئتها في أمريكا وهي تحتوي على نسبة رطوبة 25% تقريباً.

ومن وجهة نظر تجار التمور ان من مصلحتهم تسويق تمورهم وهي تحتوي على نسبة عالية من الرطوبة، لكن ذلك يسبب مشاكل عديدة للتمور كتحللها وتلفها السريع وتشقق جدارها الخارجي بسهولة. ولتلافي ذلك تصدر التمور عندما تكون نسبة السكر فيها ضعف كمية الماء ولا يسمح بأن تكون نسبة الرطوبة في التمور التي تخرج من مكابس التمور أعلى من النقطة التي يبدأ فيها نشاط الأحياء الدقيقة.

4 ـ السللوز وأشباه السللوز Cellulose and Hemicelluloses

السللوز هو المكون الرئيسي لجدران خلايا النبات ويؤلف حوالى نصف المواد الجافة للخشب، وان ألياف القطن تعتبر أنقى أنواع السللوز الطبيعي اذ يؤلف أكثر من 90% منه. لا يذوب السللوز في الماء أو الايثر أو الكحول وهو ثابت في الظروف العادية بالنسبة لتأثير الأحماض والقلويات المخففة والمؤكسدات الضعيفة. وعند غليان السللوز مع حامض الكبريتيك المركز يتحول كلياً (95-96%) إلى D- كلوكوز.

$$(c_6H_{10}O_5)_X + XH_2O \rightarrow XC_6H_{12}O_6$$

وتعبر هذه المعادلة عن النتيجة النهائية للتحلل المائي للسلوز بوجود الحامض وعند التحلل الهادىء يتكون السلوبيوز Cellobiose. وفي جزيئات السللوز يلاحظ أن جزيئات السلوبيوز متصلة مع بعضها على شكل سلسلة طويلة أو على شكل خيط طويل متصل مع بعضه على شكل عنقود Clusters تسمى Micelles وكل واحدة منها تحتوي على حوالى 60

جزيئة سللوز، وأنها (Micelles) متصلة مع بعضها بآصرة هيدروجينية تكون بين مجموعة الهيدروكسيل للسليلوز وجزيئات الماء الممتصة من قبل السليلوز.

إن الأصرة الهيدروجينية اعتيادياً أقل ثباتاً من الأصرة الكيمياوية لكن وجودها بكميات كبيرة في السللوز يجعلها ثابتة ويمكن أن يتحلل السللوز بتأثير الكائنات الحية الدقيقة، ولهذه العملية أهمية كبيرة في الطبيعة.

يتغير السللوز بسهولة نسبياً بفعل الأحماض لكنه ثابت تماماً تجاه القلويات وينتفخ السللوز بشدة تأثير المحاليل الباردة القلوية ويمتص ليعطي مركباً كيمياوياً يطلق عليه اسم السللوز القلوي Alkali-cellulose.

يتأكسد السللوز تدريجياً بفعل العوامل المؤكسدة المختلفة كالكلور الرطب وأكاسيده وفوق أكسيد الهيدروجين وغيرها مكوناً الأكسي سللوزات الذي هو عبارة عن خليط من السللوز غير المتغير ونواتج أكسدته. وفي الظروف العادية لا يؤثر أوكسجين الهواء على السللوز تقريباً ولكن يزداد تأثيره في الوسط القاعدي وبدرجات الحرارة العالية، ويتأكسد عند صهره مع القلويات بوجود الهواء ليعطي حامض الأكزاليك Oxalic Acid.

إن كل مجموعة من $C_6H_{10}O_5$ تحتوي على ثلاث مجموعات هيدروكسيلية، ولهذا فإن أبسط صيغة للسليلوز $C_6H_7O_2(OH)_3$ لا يهضم عند الانسان لكن المجترات تملك بكتريا خاصة في المعدة لها القابلية لتحلل السليلوز وبتأثير انزيم السليلوز.

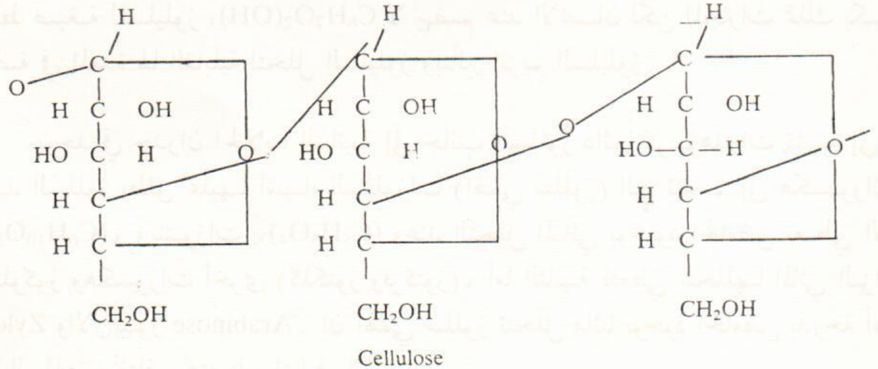
يوجد في جدران الخلايا النباتية إلى جانب السللوز دائماً كربوهدرات تشبه إلى حد بعيد السللوز يطلق عليها أشباه السللوزات (الهمي سللوز) التي تنقسم إلى هكسوزانات $(C_6H_{10}O_5)_x$، وبنتوزات $(C_5H_3O_4)_x$ وعند التحلل المائي بوجود الحامض تعطي الأولى الكلوكوز وهكسوزات أخرى (كلكتوز وفركتوز)، أما الثانية فتعطي بتحللها المائي الزايلوز Zylose والارابينوز Arabinose. ان الهمي سللوز تتحلل مائياً بوجود الحامض بدرجة أسهل من السللوز وتختلف عنه بذوبانها في القلويات.

يوجد الهمي سللوز بكميات كبيرة في الأنسجة الخشبية اذ يوجد في التبن أو القش Straws، والبذور Seeds والجوز والبندق Nuts والخشب وفي النخالة Bran.

وان بعض الدراسات تشير إلى أن جزيئات الكلوكوز متصلة مع بعضها بين ذرات الكاربون الأولى والرابعة لتعطي السللوز كما في الشكل.

جدول رقم (7)
تحليل تمور صنف الحلاوي العراقي
Dowson 1962

المكـــونـــــات	النسبة المئوية بالنسبة للوزن الرطب
الماء	19
الرماد	2.2
البروتين (N x 6.25)	1.7
الدهون (المستخلص الاثيري)	1.9
السكريات المختزلة كسكر محلول	73.5
الكربوهيدرات	73.7
الفايبر	2.2
سكروز	0



Cellulose

إن السللوز يؤلف بصورة رئيسية لجدران خلايا التمرة إذ أنه يؤلف مع المواد الصلبة غير الذائبة الأخرى Non soluble Solids حوالى 85% من وزن التمرة الجاف Drymatter عندما تكون الثمرة صغيرة جداً وخضراء (دور الجمري) لكن بزيادة نسبة السكر وبتقدم نضوج الثمرة فإن كمية السللوز تقل. أما بذرة التمرة (النوى) فتكون بصورة رئيسية من الهمي سللوز Hemicellulose والذي يتحول إلى الدكستروز Dextrose بتأثير الحرارة وبوجود

الحامض. وفي الجنين يوجد انزيم الذي له نفس التأثير عند انبات البذرة وتبقى الهمي سللوز عالية في البذرة (النواة) حتى آخر مراحل نضوج الثمرة. وعند تحليل عدة نماذج من التمور وفي مراحل نضوجها المختلفة ولأصناف مختلفة وجدت المواد الصلبة غير الذائبة فيها والتي يكون السللوز المادة الرئيسية منها، وجد أنه يتراوح ما بين 4.09% إلى 11.97% وبمعدل 7% من الوزن الطري أو 4.09% إلى 6.28% وكمعدل 5% من الوزن الجاف للثمرة (Vinson's analyses)، ووجد أن نسبة الفايبر Crude Fiber في تمور صنف الزهدي التامة النضج يتراوح بين 4.5% إلى 10.1% ويعتمد ذلك على المنطقة المزروعة فيها النخيل (تحسب كمية السللوز والهمي سللوز في التمرة بصورة تقريبية بتحديد نسبة الفايبر فيها) وان التمور الطرية Soft Date لا تحتوي على أكثر من 2% فايبر Crude Fiber أو سللوز.

5 ـ النشا Strach

يعتبر النشا المادة الغذائية الاحتياطية للنبات واحد المواد الغذائية الرئيسية للانسان أو الحيوان.

يوجد النشا في النبات ويخزن فيها على شكل حبيبات مختلفة الاشكال والأحجام وتختلف صفاتها وتركيبها الكيمياوي باختلاف مصادر النشا وأصنافه.

تحتوي البطاطس مثلاً على حوالى 20% نشا و 75% ماء، وفي حبوب القمح تصل النسبة إلى 70%. يمكن أن تكون حبيبات النشا بيضوية Oval أو كروية Spherical أو غير منتظمة Irregular يتراوح قطرها 0.002-0.15 ملم فحبيبات البطاطا تكون أوسع أو أكبر من حبيبات نشا الرز أو الحنطة. وهذا الاختلاف بين الحبيبات يسهل امكانية تميزها عن بعضها تحت المكوسكوب عند وجودها في مزيج واحد.

يمكن تصنيف حبيبات النشا إلى الحبيبات البسيطة Sample Grains والمعقدة أو المركبة Compound رغم عدم وجود اختلاف واضح بينهما. فالبسيطة تكون متجانسة الشكل كنشاء البطاطا والحنطة، أما الحبيبات المركبة فتكون صغيرة متحدة كنشاء الشوفان والرز، مثلاً يلاحظ في القمح الشيء الرئيسي فيه هو النشا البسيط كما يوجد أيضاً المركب وفي الشوفان تنعكس الصورة فالمركب هو الطاغي والبسيط موجود أيضاً بنسبة قليلة.

تتركب حبيبات النشا من مادتين مختلفتين هما الاميلوبكتين Amylopectin والاميلوز Amylose حيث يكون الأول غلاف الحبيبات، والثاني يكون القسم الداخلي للحبيبات وكميتها بنسبة 1:2 تقريباً على التوالي. وتختلف في صفاتها الكيمياوية والفيزياوية.

الوزن الجزيئي للاملوز يتراوح بين 50 ألف إلى 160 ألف يذوب حالاً في الماء الحار مكوناً محلولاً غروياً حقيقياً ذا لزوجة منخفضة نسبياً، وهذا المحلول غير ثابت حيث تتكنن وتترسب بلورات عند تركه. أما الاملوبكتين فله وزن جزيئي عال يصل إلى المليون أو أكثر ويذوب بالماء عند التسخين والضغط ويكون على شكل عجينة ذات لزوجة عالية ويكون محلوله ثابتاً جداً.

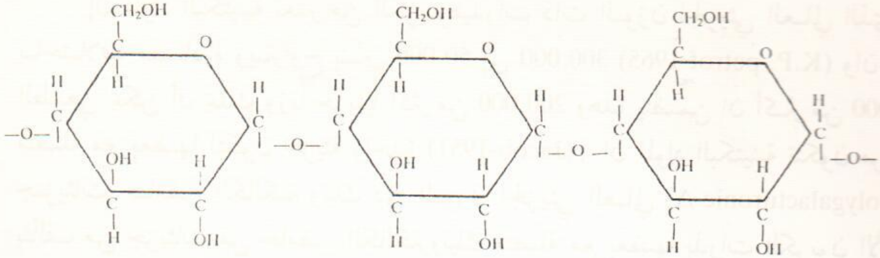
يعطي الأملوز مع اليود لوناً أزرق خالصاً في حين يعطي الاملوبكتين لوناً بنفسجياً يميل إلى الحمرة، ويتكون اللون نتيجة تكوين مركب كيمياوي معقد الذي فيه جزيئات اليود متصلة داخلياً بسلاسل حلزونية مع الأملوز، بينما في الأملوبكتين يتكون اللون نتيجة تكوين مركبات ممتصة.

يتحلل النشا مائياً عند تحليله مع الأحماض أو بفعل الانزيمات كانزيمات دياستيز الشعير وبيتالين اللعاب اللذين يحللان مائياً إلى الملتوز. ان النشا يتحلل مائياً بصورة تدريجية مكوناً كربوهيدرات أبسط تركيباً اذ يتحول في البداية إلى نشا قابل للذوبان بالماء (وهو الذي يذوب بالماء الساخن دون أن يكون عجينة). ثم يتحلل هذا النشا إلى الدكسترنيات Dextrine الذي بدوره يتحلل إلى المالتوز Maltose التي تتحلل جزيئته منه إلى جزيئتين من الكلوكوز D-Glucose وهو الناتج النهائي لتحلل النشا مائياً.

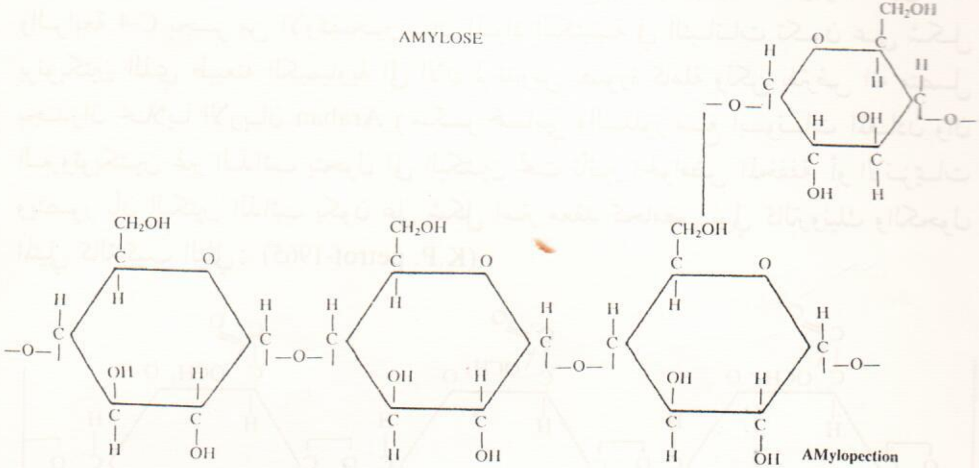
يمكن ملاحظة هذا التحلل التدريجي سواء بتأثير الأحماض أم الانزيمات بواسطة تفاعله مع اليود اذ في البداية يعطي لوناً بنفسجياً وبعد ذلك وأثناء تحلله يعطي لوناً أحمر بنياً.

إن هذا التكوين مميز للدكسترينات ذات الوزن الجزيئي العالي نسبياً اما التي لها وزن جزيئي منخفض فتعطي لوناً أصفر مع اليود أما الدكسترينات السفلى والملتوز والكلوكوز فلا تتكون مع اليود.

إن جزيئة الكلوكوز هي الأساس في تكوين النشا حيث تتصل هذه الجزيئات مع بعضها بآصرة ذرة الكاربون الأولى C-1 والرابعة C-4 حيث تكون الاملوز والتي تكون على شكل سلسلة طويلة، ووجد أن نتيجة الفحص بأشعة X-Ray تكون جزيئات الاملوز تكون متوازية ومتصلة بعضها مع البعض وان جزيئات الكلوكوز تكون منتظمة وتأخذ شكلاً حلزونياً. أما في الاميلوبكتين فالاتصال بين جزيئات الكلوكوز ليس فقط بين ذرتي الكربون الأول والرابعة فقط وانما أيضاً بين الأول والسادسة C-6, C-1 مكوناً شكل الغصن.



AMYLOSE



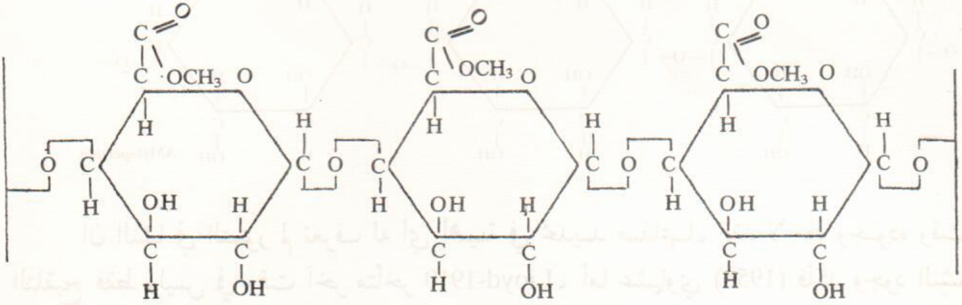
AMylopection

ان النشا في التمور لم تعرف له أي أهمية في تحديد صفاتها، فقد لاحظ وجوده وقت التلقيح فقط وليس في وقت آخر متأخر Lioyd-1910، أما عشماوي (1956) فأكد وجود النشا في تمور صنف الساماني التي تنتج في مصر في جميع مراحل نضوجه. ففي مرحلة الجمري 12.79% بالنسبة للمواد الصلبة للثمرة وفي مرحلة الرطب انخفضت النسبة إلى 3.1%.

6 ـ البكتين Pectin

توجد المواد البكتينية بكميات كبيرة في الثمار وبتراكيز عالية في أنسجة لبعض النباتات وأن الجزء الوسطي من قشرة خلايا النبات يتألف من البروتوبكتين Protopectin (مع بعض المواد الأخرى) الذي يعتبر أحد صور البكتين غير الذائب وهو كعامل ارتباط Binding Agent بين خلايا النبات النامية، فتحلله بتأثير الانزيمات إلى البكتين يسبب تقليل الفاكهة الخضراء عند النضج. لذا فالبكتين يلعب دوراً مهماً في عملية النضج وأثناء الخزن والعمليات الأخرى المختلفة للفاكهة والخضر في أثناء نمو الفاكهة. فالبكتين غير الذائب (البروتوبكتين) يتجمع في جدران خلاياها وعند نضجها فتتميز بتحول البروتوبكتين إلى البكتين الذائب.

إن المواد البكتينية تعتبر من الكربوهيدرات ذات الوزن الجزيئي العالي الذي يختلف باختلاف مصادره ويتراوح بين 50.000 إلى 300.000 (K.P. petrof-1965) وان البكتين الطبيعي يمكن أن يملك وزناً جزيئياً أكثر من 200.000 وهذا يتضمن ان أكثر من 1000 وحدة متصلة مع بعضها لتكون جزيئة واحدة (Jacob-1951). ان المواد البكتينية تتكون من سلسلة جزيئات حامض الكالكترونيك ذي الوزن الجزيئي العالي Polygalacturonic A. الذي يتألف من جزيئات من حامض الكالكترونيك متصلة مع بعضها بذرات الكربون الأولى C-1 والرابعة C-4 بجسر من الأوكسجين. ان المواد البكتينية في النباتات تكون على شكل برتوبكتين الذي طبيعته الكيمياوية الى الآن لم تدرس بصورة كاملة ولكن يفترض انه متصل بجدران خلايا الاربان Araban (سكر خماسي والسللوز مع ايونات المعادن وان البروتوبكتين غير الذائب يتحول الى البكتين تحت تأثير الحوامض المخففة أو الانزيمات ويتصور بأن البكتين الذائب يكون على شكل استر معقد كحامض بولي كالترونيك والكحول المثيلي كالتركيب التالي: (K.P. petrof-1965)



pectin

من الشكل أعلاه يلاحظ أن مجموعات الكاربوكسيل لجزيئات الحوامض المرتبطة بها يبقى قسم منها طليقاً بينما يتحد القسم الآخر مع مجموعة المثيل أستر فيتحلل في المحاليل الحامضية أو القاعدية، أو بفعل انزيمات خاصة فترجع مجموعات الكاربوكسيل طليقة لها القابلية للاتحاد مع الأيونات الفلزية الموجبة الشحنة الموجودة في المحلول فتكون بكتات الكالسيوم (بوجود الكالسيوم) قليلة الذوبان بالماء، ولهذه الخاصية أهمية كبيرة في إزالة البكتين من عصير الفواكه.

وبسبب وجود البكتين في الفواكه فإن عصيرها السكري المسخن لدرجة الغليان والمبرد يكون كتلة هلامية. وتستخدم هذه الخاصية لتحضير الجيلي والمرملاد. ويختلف البكتين باختلاف مصادره في قوة تكوينه للجيلي Jelly Grade التي تعرف بأن عدد باونات السكر الذي يحولها باون واحد من البكتين إلى حالة الجيلي تحت الظروف القياسية.

يلاحظ أن ظاهرة النضوج تتميز بتحول البكتين غير الذائب (Protoctin) إلى البكتين الذائب. في التفاح مثلاً يصل البكتين حده الأعظم تقريباً عند جنيه وعند خزنه في درجة حرارية 1° م، فالبكتين غير الذائب يقل تدريجياً ويتجمع البكتين وان النسب المئوية للبكتين في بعض الفواكه مثلاً في التفاح تصل 0.82-1.29% وفي المشمش 1.30% والخوخ 0.96-1.14% وفي الجزر 2.5% والبنجر السكري تصل نسبته إلى 2.5%.

وفي التمور وجد (Rygg-1946) ان البكتين الذائب Protoctin يتراوح بين 2% (من وزن التمر الجاف) في مرحلة الجمري الى حوالى 1% في مرحلة الرطب أما البروتوبكتين يتراوح بين 4.5% إلى 1% ومجموع البكتنات Total-pectic-Substances من 6.5% إلى 2% على التوالي في مرحلتي الجمري والرطب، اذ أن نسبة البكتين تنخفض بازدياد درجة نضوج الثمرة.

-إن وجود البكتين في عصير التمر له أهمية كبيرة لأنه بوجوده يعطي القوام الجلاتيني وعدم شفافيته والتي تسبب صعوبة ترشيحه، لذا يفضل ازالة البكتين من عصير التمر بغليانه وتنظيم الحموضة الفعلية (pH) وباضافة عامل مساعد للترشيح Filter aid أو بمعاملة العصير بمحلول هيدروكسيد الكالسيوم وبدرجة قاعدية معينة pH=8.8 فيترسب معظم البكتين على شكل بكتات الكالسيوم أو باستعمال انزيمات خاصة بعد تعديل درجته الحامضية pH=6.2 فتقوم بتحطيم جزيئات البكتين الكبيرة التي تعطي لعصير التمر القوام الجلاتيني. (فاروق باصات 1971).

7 ـ البروتينات والأحماض الأمينية Proteins and amino Acids

توجد البروتينات في جميع الكائنات الحية النباتية منها والحيوانية وهي المكون الأساسي لبروتوبلازم، وتعتبر الكائنات الحية الحيوانية أغنى بالبروتينات مقارنة بالكائنات الحية النباتية حيث يكون المكون الأساسي فيها الكربوهيدرات. توجد البروتينات في النباتات في البروتوبلازم والنواة والعصير الخلوي والحبوب والبذور وهي تلعب دوراً أساسياً في حياتها بسبب كونها الجزء الأساسي للبروتوبلازم وتخضع البروتينات الداخلة في تركيب الكائنات الحية لعمليات التحلل والأكسدة المستمرة.

البروتينات هي مركبات عضوية معقدة ذات وزن جزيئي عال يدخل في تركيبها الكربون والهيدروجين والأوكسجين والنتروجين وبعضها يحتوي على الكبريت والفوسفور. تكون البروتينات التي تذوب بالماء محاليل غروية وتتفحم عند حرقها فتعطي الرائحة المميزة لها.

وعند تحلل البروتينات مع الحوامض أو القواعد أو بتأثير الانزيمات المحللة لها تعطي بروتينات أبسط وتكون خليطاً من الأحماض الأمينية، لذا فإن حجر الأساس في تكوين البروتينات هي الأحماض الأمينية.

ان بعض الاحماض الأمينية مشتقة من الحوامض الدهنية التي فيها ذرة واحدة من الهيدروجين والمتحدة مع ذرة كربون يحل محلها مجموعة الامين (NH_2).

$$R-CH_2-COOH \rightarrow R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$$

حامض دهني　　　　　　حامض أميني

ان معظم الأحماض مواد متبلورة عديمة اللون وهي عادة سهلة الذوبان بالماء وغالباً ما تكون حلوة المذاق. تحتوي جزيئات الأحماض الأمينية على مجموعتين متناقضتين تماماً في الخواص، فمجموعة الكاربوكسيل ($-COOH$) ذات خواص حامضية ولمجموعة الأمين ($-NH_2$) خواص قاعدية ولذا فإن لهذه الأحماض خواص حامضية وقاعدية في آن واحد. اذ أنه بوجود القاعدة يكون تأثير البروتين حامضياً فيؤدي ذلك إلى تعادل مجموعة الكاربوكسيل السالبة ولكن بوجود الحوامض فمجموعة الأمين تتفاعل مع أيون الهيدروجين وتكون شحنة سالبة فتكون جاهزة للتفاعل.

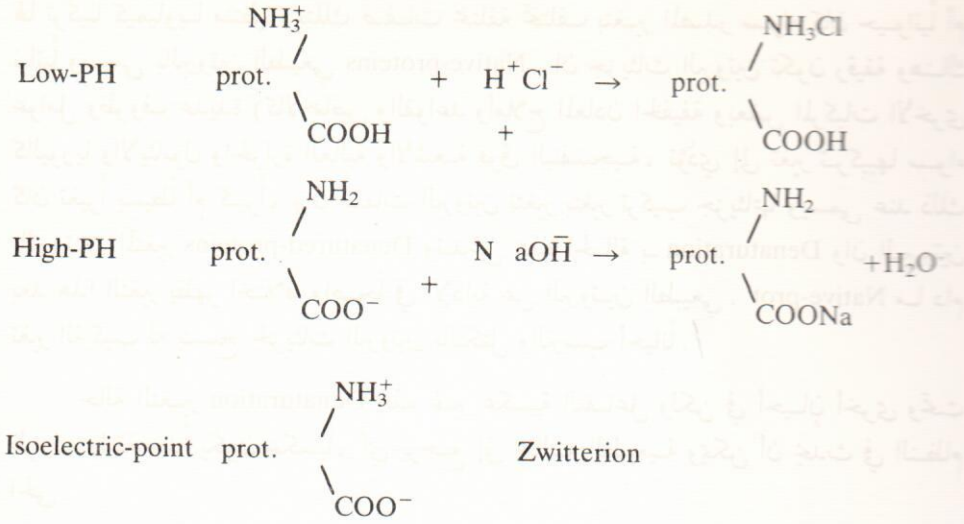
$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + NaOH \rightarrow R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COONa-H_2O$$

Sodium salt

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + HCl \rightarrow R-\underset{\displaystyle NH_3Cl}{\underset{|}{CH}}-COOH$$

Hydrochloride Salt

لذا يلاحظ عندما تكون قيمة الـ pH عالية (High-pH) تكون الشحنة سالبة وعندما تكون (Low-pH) تكون الشحنة موجبة، اما عندما تكون قيمة الـ pH في الوسط يكون عندئذ ذا شحنة سالبة وموجبة Zwitterions أي تكون الشحنة النهائية تقارب الصفر Isoelectic-point فتتعادل عندئذ كل من مجموعة الأمين والكاربوكسيل احدهما الآخر:



ان مجموعة الكاربوكسيل للبروتين تتـأين تأينـاً ضعيفاً جـداً ومع ذلـك فإنها قـادرة على التفاعل مع القواعد، وبجانب آخر فإن مجموعة الامين تتقبل الهيدروجين وتكون لها القـابلية للتفاعل مع الحوامض، وان التفاعل الحـامضي والقاعـدي لا يعتمد فقط عـلى عدد المجـاميع الحامضية أم القاعديـة وإنما يعتمـد أيضاً عـلى موقعهـا سواء كـانت حرة أو متحـدة مع مـادة أخرى.

يمكن تقسيم المواد البروتينية إلى مجموعتين كبيرتين هما:

الـبروتينات البسيـطة (Simple prot.) وهي التي تحتوي في تـركيبها الأحمـاض الأمينيـة بصـورة أساسيـة والبروتينـات المعقدة والمـتزاوجـة ـ Complex-port أو (conjugated-prot.) وتتـألف هذه الـبروتينات من جـزيئات الـبروتينـات البسيـطة وجـزيئـات مـواد لا تنتمي إلى البروتينات.

ويمكن تقسيم هـاتين المجمـوعتين ثـانية إلى أقسـام عـدة ولا يعتمـد ذلـك عـلى أسس كيمياوية مضبوطة.

الأحماض الأمينية يمكن تقسيمها إلى مجموعتين هما: ـ

الأحمـاض الأمينية الأسـاسيـة أو الضروريـة وعـددهـا ثـمان essential Amino Acids والأحماض الأمينية غير الأساسية وعددها اثنا عشر. Non-Essential Amino-A.

إن البروتينات الموجودة في الأنسجة سواء كانت في خلايـا الحيوان أم النبـات تمتاز بـأن

لها تركيباً كيمياوياً منتظماً ويمتلك صفات مختلفة تختلف بتغير المصدر سواء كان حيوانياً أم نباتياً ويسمى بالبروتين الطبيعي Native-proteins. ان جزيئات البروتين تكون رقيقة وهناك عوامل وظروف عديدة (كالأحماض والقواعد وأملاح المعادن الخفيفة وبعض المركبات الأخرى كاليوريا والايثانول والحرارة العالية والأشعة فوق البنفسجية، تؤدي إلى تغير تركيبها سواء كان تغيراً بسيطاً أم كبيراً، وان صفات البروتين تتغير بتغير تركيب جزيئاتها ويسمى عند ذلك بالبروتين المتغير Denatured-proteins وتدعى هذه الحالة بـ Denaturation وان البروتين بعد هذا التغير يظهر اختلافاً واضحاً في الإذابة عن البروتين الطبيعي. Native-prot ما دام تغير التركيب له يسمح لجزيئات البروتين بالتكتل والترسب أحياناً.

حالة التغير Denaturation هذه غير عكسية التفاعل ولكن في أحيانٍ أخرى وتحت ظروف وثيقة جداً يكون عكسياً، أي يرجع إلى حالته الطبيعية ويمكن أن يحدث في النظام الحي.

وإذا خففت درجة حموضة المحلول الفعالة pH إلى نقطة تقرب من نقطة التعادل Isoelectric-point للبروتينات والذي يكون فيه تغير الشحنات إلى أقل حد ممكن فيحدث ترسيب سريع للبروتينات بتكتلها على بعضها لفقدانها الشحنات الكهربائية التي كانت تحملها. لكن إذا كان المحلول فيه قيمة الـ pH تختلف عند نقطة التعادل الكهربائي Isoelectric-P. فتظهر عند ذلك الشحنة، وجزيئات البروتين تظهر أحدهما للآخر أو تبتعد عن بعضهما فيرجع إلى حالته الطبيعية علماً بأن الحالة غير العكسية هي أكثر انتشاراً. وعند تسخين البروتينات مع الكربوهيدرات خاصة السكريات الأحادية والثنائية فيحدث التفاعل بينهما، وعند الاستمرار بالتسخين يحدث الاسمرار في اللون وتهديماً للأحماض الأمينية مكونة مادة معقدة سمراء اللون يصعب إزالتها، ويسمى هذا التفاعل بتفاعل براونيك Browning-React تحتوي التمور على نسب مختلفة من البروتينات وتختلف باختلاف مراحل النضوج، اذ تحتوي الثمرة الناضجة على حوالي 2.2% من وزنها بروتينات محسوبة بشكل نتروجين (Mx 6.25) وتحتوي التمور على عدد من الأحماض الأمينية.

عند تحضير عصير التمر تبقى البروتينات عالقة ولا تتجمع على بعضها وتتكتل لتترسب لكونها تحمل شحنات كهربائية ويصعب فصلها بالطرق الميكانيكية، لذا تعدل درجة حموضة المحلول إلى نقطة تقرب من نقطة التعادل الكهربائي Isoelectric-P. للبروتينات فتتكتل على بعضها ويمكن فصلها بسهولة بالترسيب والترشيح، أما عند بقاء البروتينات في العصير فيعطيه ذلك مظهراً غير شفاف ويرفع من درجة لزوجته عند انتاج الدبس منه.

الأحماض الأمينية غير الأساسية (غير الضرورية)

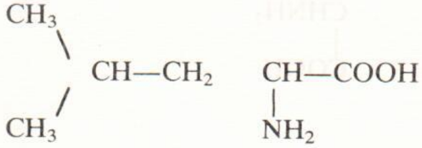
Non-Essential A.A.

1. Glycine	كلايسين
2. Alanine	الانين
3. Cysteine	سيستين
4. Tyrosine	تيروزين
5. Arginine	اركنين
6. Histidine	هستيدين
7. Aspartic Acid	حامض الاسبارتك
8. Glutamic Acid	حامض الكلوتامك
9. Proline	برولين
10. Hydroxy prolin	هيدروكسي برولين
11. Serine	سيرين
12. Amide	أمايد

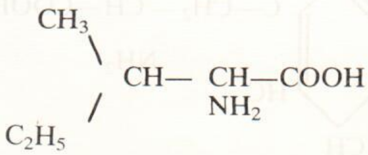
الأحماض الأمينية الأساسية

Essential Amine Acids

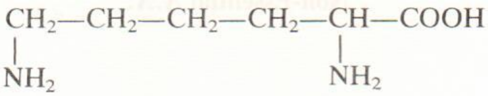
1. Leucine ليسين



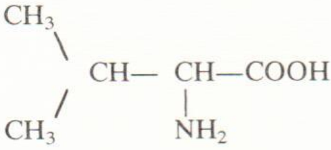
2. Isoleucine ايزوليسين



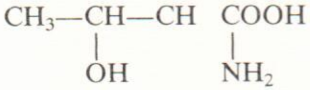
3. Lysine ليوسين



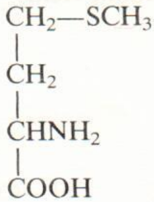
4. Valine فالين



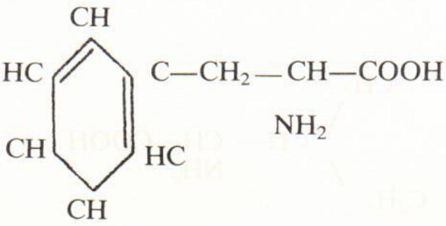
5. Threonine ثريونين



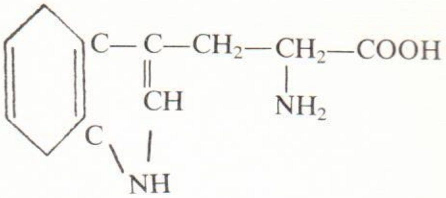
6. Methionine ميثونين



7. phenylalanine فينايل النين



8. Tryptophan تربتوفان



جدول رقم (8)

الحوامض الأمينية في التمور العراقية ملغرام/100 ملم.

الحوامض الأمينية	حلاوي	خضراوي	ساير
ألانين	105.6	96.2	78.5
أرجنين	38.9	42.7	44.8
حامض الاسبارتك	128.9	134.8	118.8
حامض الكلوتاميك	107.5	175.8	183.1
كلايسين	97.8	98.8	91.3
هيستيدين	21.0	22.3	19.2
برولين	110.4	93.9	99.3
سيرين	63.7	65.0	58.5
ايسوليوسين	42.9	42.7	40.7
ليوسين	83.9	81.9	77.8
ليسين	50.3	53.6	50.4
مثيونين	18.6	11.3	12.2
فنيل الانين	53.2	46.5	42.4

المصدر: أطروحة الماجستير الأمينية في التمور العراقية. نوال الراوي ـ 1965.

ومن كل ما تقدم فإن التمور ومشتقاتها تعتبر مادة خام جيدة لتنمية الأحياء المجهرية ذات الدور الرائد في انتاج الكثير من المنتجات المهمة. خصوصاً وأن باحثي العالم يتسارعون في الوقت الحاضر لاستخدام الكثير من الخامات المتوفرة لدى دولهم. حيث أن التمور هي ثروة وطنية وقومية ويمكن تطويعها لأن تكون ذات أهمية في هذا المضمار.

تقنية انتاج البروتين من الاحياء المجهرية (الخمائر)

Single Cell Protein Technology

في أحقاب متباعدة من الزمن توصل علماء المايكروبيولوجيا الى انتاج عديد من أنواع الخمائر على نطاق صناعي كمصدر للبروتين.

وقد برزت امكانية تنمية الخميرة للاستهلاك المباشر كغذاء سنة 1910، بواسطة Delbruck ومساعديه، وقد نجح في ذلك بعد 20 سنة من اكتشاف باستور للغموض الذي كان يكتنف عملية التخمير. ولعل خميرة البيرة التي تسمى علمياً بـ Saccharomyces cerviceae هي أول ما استخدم من أنواع الخمائر لانتاج البروتين على نطاق صناعي وذلك لأنها أساس صناعة البيرة وصناعة الكحول منذ زمن بعيد. ففي الحرب العالمية الأولى انقصت المانيا ناتج البيرة الى نحو 60% من انتاجها قبل الحرب العالمية وذلك للتفرغ لانتاج الخميرة واستغلالها كغذاء.

وفي نفس الوقت أدى نقص الحبوب خلال الحرب الى ادخال المولاس كناتج عرضي من صناعة السكر الذي يعتبر غنياً بالفوسفات والامونيا ليكون بيئة صالحة للنمو.

بعد ذلك ساعد Hgyduok /1919 في توضيح أهمية اضافة المغذيات في خطوات الانتاج مع زيادة كمية اللقاح، وهذه المعلومات ساعدت في تطوير انتاج الخمائر لأجل التغذية.

ومن العوامل الأخرى التي شجعت لانتاج البروتين من الاحياء الدقيقة يمكن ايجازها بما يلي:

1 ـ يمكن تنميتها بكميات كبيرة.
2 ـ سرعتها الكبيرة على النمو.
3 ـ كفاءتها العالية في تحويل المواد الخام الى مواد ذات قيمة حيوية عالية Biomass.
4 ـ لها القابلية على استخدام أنواع كثيرة من المصادر الرخيصة والتي يعتبر قسم منها كفضلات معامل.

5 ـ انتاجها لا يحتاج الى مساحات كبيرة ولا يعتمد على الظروف الحيوية.

والجدول رقم (9) يوضح المقارنة بين البروتين النباتي وبروتين الاحياء المجهرية.

جدول رقم (9) 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 الى عالية	عالية جداً 60-85%
الفترة الزمنية للانتاج	طويلة جداً (2880 ساعة)	قصيرة جداً (24-48 ساعة)
كمية الحوامض الأمينية	متوسطة الى ناقصة.	عالية وبضمنها اللايسين وباستثناء المثيونين.
اليد العاملة المطلوبة	كبيرة.	قليلة.
امكانية التوسع والسيطرة في الانتاج	صعبة ومحدودة	سهلة وذات آفاق
المساحة المطلوبة لتوفير 1000 طن علف.	3629 دونم أو 907 هكتار.	1 دونم.
تأثر الانتاج بالتقلبات البيئية والموسمية	كبير	غير متأثر.
الاصابة بالأمراض	واسعة (مترشحات، بكتريا، قطريات، اكتنومايستز ـ حشرات)	الخمائر غير متأثرة. البكتريا قد تصاب بالمترشحات البكترية.
وجود بكتريا مرضية	مصدر عدوى (السالمونيلا)	لا توجد
فترة خزن الناتج	قصيرة	طويلة
كلفة انتاج 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 سنوياً	80 مليون دولار/100 ألف طن CH_4 200 مليون دولار/100 ألف طن برافينات سنوياً.

(*) باعتبار كلفة 25 سنت /مليون BTU (1000 قدم^3 من الغاز الطبيعي).

(**) نسبة البروتين في الناتج النباتي دون 20% وفي بروتينات وحيدة الخلية 60-85%.

تقنية إنتاج الخمائر:

تعتبر تقنية انتاج الخمائر جزءاً من التقنية الحيوية المايكروبيولوجية وذلك لأنها تعتمد على نوع الخلايا الخميرية، حيث أن كل نوع يكوّن منتوّجاً يختلف عن الآخر فمثلاً.

1 ـ خمائر العلف:

والتي تعتبر ذات أهمية كبيرة لاحتوائها على البروتين وتضاف الى الغذاء وذلك لحل مشكلة نقص البروتين لتغذية الانسان.

٢ ـ خمائر الخبز:

تستعمل لانتاج الخبز والتي عرفت قبل 6000 سنة وكانت تنتج خميرة الخبز كناتج عرض لانتاج الكحول أو الشراب. وفي سنة 1950 ابتدأ أول انتاج الخمائر للخبز في فينا Vienna.

الخواص المورفولوجية والبايولوجية للخمائر مع ربطها بالتقنية

حجم وشكل الخمائر:

عند الفحص الميكروسكوبي للخمائر تلاحظ باعداد كبيرة وهي إما أن تكون وحيدة أو متصلة بسلسلة. كل خلية تمثل كائناً حياً مفصولاً يمكنه أن يعيش بصورة مستقلة ويكون خلايا جديدة، ولا يمكن ملاحظة المايسليوم في الخمائر، وتظهر خلايا الخميرة عندما تكون مفردة وتكون عديمة اللون ولكن عندما تنمو على أوساط صناعية فإنها تكون مستعمرات قد تكون بيضاء أو كريمية اللون أو تكون محتوية على صبغات.

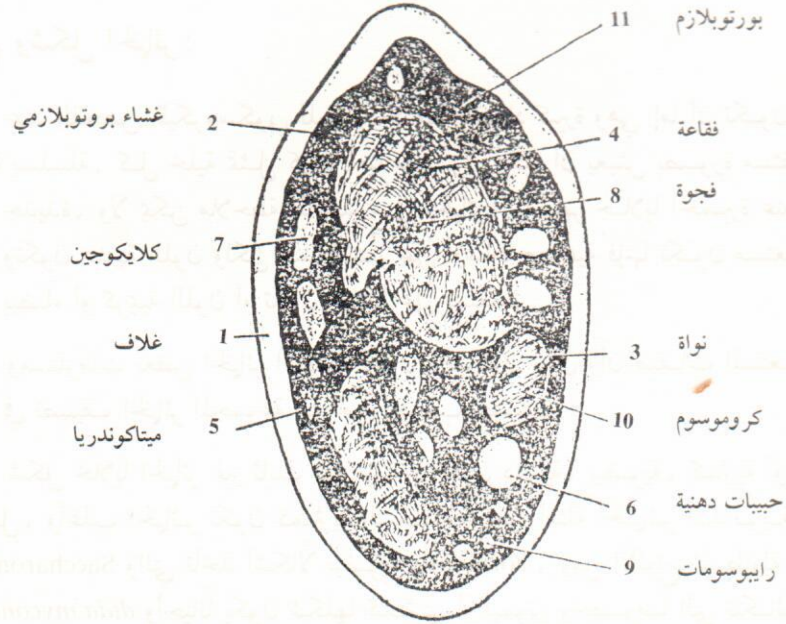
ومستلزمات بعض الخمائر الناقصة تكون ذات لون براق وأن صفات المستعمرة تكون مفيدة في تصنيف الخمائر المجموعة التي من الصعب تصنيفها.

شكل خلايا الخمائر غير ثابت فهي إما أن تكون دائرية، بيضوية، كمثرية أو اسطوانية الشكل، وأغلب الخمائر تكون كمثرية الشكل.. ومن أمثلة الخمائر الدائرية مجموعة Saccharomyces والتي تأخذ أشكالاً بيضوية Torulopsis، ومن الأنواع المتطاولة هي *Candida mycondrnia* وأحياناً يكون شكلها كمثري أو ليموني وخصوصاً التي تتكاثر بالتبرعم مثل *Sacaharomy ces Hanseniaspora*.

ان شكل خلايا الخمائر يتأثر بعمر المزرعة وظروف الوسط الغذائي والحرارة وPH وعلى

فسلجتها، وبعض الأنواع من الخمائر لها مايسليوم نوعي خصوصاً عند Candida وفي بعض الأحيان يكون شكلها شبيهاً بالبطل Pitynosporum أو على شكل ثلاثي الزاوية Trigonopsis. أما حجم الخمائر فهو غير ثابت ومتغير ويتراوح ما بين 4-10 مكرون طولاً و2-8 ميكرون سمكاً. أما البناء الخلوي للخمائر فهو أكثر تعقيداً من البكتريا. أما جدار الخلية فيتكون من طبقتين أو أكثر، الجدار الخارجي صلب وشفاف ومطاطي وسمكه قد يصل الى A1000. وتكون الطبقة الخارجية والوسطى من نوع Hydrophobic. أما الداخلية فتكون Asmophobic والوسطى لها الغالبية الالكترونية وHydrophilic سمكها في الخلايا الفتية قليل ويزداد في الخلايا الكبيرة، يلاحظ هذا في الخلايا الموجودة في الوغفة أو الحلقة المتكونة على سطح الوسط الغذائي للسائل.

والجدار الخلوي في الخمائر يحتوي على الكلايكوجين والمسافات وهو يشكل عموماً بحدود 90% من المادة الجافة. أما الـ 10% المتبقية تضم البروتينات 6-7%' مرتبط مع الكيموسللوز و3% كايتن ودهون وكلوكوز أمين.



شكل (29) 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 الى درجة معينة. ويتكون من مركب دهني بروتيني وبروتينات نووية ومركبات الكالسيوم ويتميز بنقاوية 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 نسبياً ويتراوح ما بين 3-6 ضغط جوي.

البروتوبلازم:

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

الرايبوسومات:

ان بروتوبلازم الخلية الخمائرية يحتوي على كمية كبيرة من الحبيبات الميكروجزيئية تدعى بالرايبوسوم، حجمها يتراوح بين 50-200 مل مايكرون يدخل في تركيبها الدهون والبروتينات والاحماض الأمينية (Ribonucleic acids). الأهمية الرئيسية لهذه الأجزاء تحت المجهرية هي دعم انتاج أو تكوين البروتينات على حساب الاحماض الامينية الفعالة التي تنتج من المايثوكوندريا.

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 الى 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 والميتاكروماتين يفرز في المحلول الغروي بشكل حبيبات ذات حجم 0,2-0,6 مل مايكرون. المحتوى الميتاكروماتين في الفجوة الغذائية للخمائر غير ثابت ويتراكم بكميات كبيرة وأحياناً يختفي في الخلايا الجائعة، وكذلك يقل الميتاكروماتين بسرعة وكثافة الميتاكروماتين هي أقل من كثافة البروتوبلازم. إن تراكم الميتاكروماتين والكلايكوجين في الخلية يحدث في آن واحد وأن تكوين هذه المادة يعتمد على وجود الفوسفات في المواد الغذائية، واحد مميزات الميتاكروماتين هي عدم تلونها بنفس اللون الذي يحوي الملونات.

النواة:

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

النواة تلاحظ بوضوح عند الخلايا الموضوعة في ماء معقّم لعدة أيام حيث يكون البروتوبلازم بحالة جائعة وشفافاً ومتجانساً حيث ان نواة الخلية لها شكل كمثري دائري وقليلاً ما تكون على هيئة شكل بيضوي ومحاطة بطبقتين رقيقتين تدعى بالأغشية النووية ويحتوي 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، واعتيادياً تتراوح بين 4-12.

المحتوى الكيمياوي للخمائر:

ان التحليل الكيمياوي أظهر بأن الخمائر تحتوي على أكثر من 70 عنصراً ومن أهمها الكربون، الهيدروجين، الاوكسجين، النيتروجين، الكبريت، الفوسفور، الكالسيوم، البوتاسيوم، المنغنيز. العناصر الأربعة الأولى هي التي تبني المواد العضوية.

والخلية الخمائرية تحتوي على محتوى مائي 75-80% و20-25% 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، الاحماض 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 ولتأليف المركبات المعقدة في الكتلة الحيوية.

وللخمائر اعضاء خاصة للتغذية. فهي تمتص المواد الغذائية وتفصلها تمثيلياً من خلال كل السطح. وان اذابة المواد الغذائية في الخلية هي عملية معقدة وهي تحت الدراسة حتى الآن.

خمائر العلف من مصادر أولية نباتية:

من المعروف أو المعلوم واحدة أو اثنتان من السلالات المعروفة على صعيد العلف التي وجدت بنطاق واسع وكبير في التغذية لحيوانات المزارع كمصادر مملوءة بالبروتين والثيامين والاملاح. ومن أبرز محتويات خمائر العلف أنها تحتوي على 48-52% بروتين و16/13% رماد. اضافة الى ما ذكر فإنها غنية بالأحماض الأمينية الأساسية والتي تعطي لها القيمة البايولوجية العالية.

إضافة الى 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 عرف الكثير من هذه الاحياء منها Candida utilis والمعروفة بـ Torula utilis أو *Candida tropicales, Candida Pulcherima, Torulopsis utilis, Hanscula suveolens, Hansenula amemale,* Zygosaccharmyces, Sacchoromyces cervisiae pichia polymorpha *Trichosporim pullulans.*
(Bunker 1961).

وتعتبر *Candida utilis* هي الأفضل والتي يمكنها من هضم السكريات أو المصادر الكربوهيدراتية السداسية والخماسية والاحماض العضوية Organic acid. ومن الخمائر ذات الكفاءة العالية بإنتاج البروتين *Candida utilis* var major حيث أنها سريعة النمو والتكاثر ويمكنها أن تستهلك السكر من الوسط بكفاءة 60%.

أما السلالة *Candida utilis* var thermophilis حيث أنها تنمو وتتطور في الأوساط ذات الحرارة العالية وتختلف الكانديدا من نوع لآخر في قابليتها على الهضم للمواد.

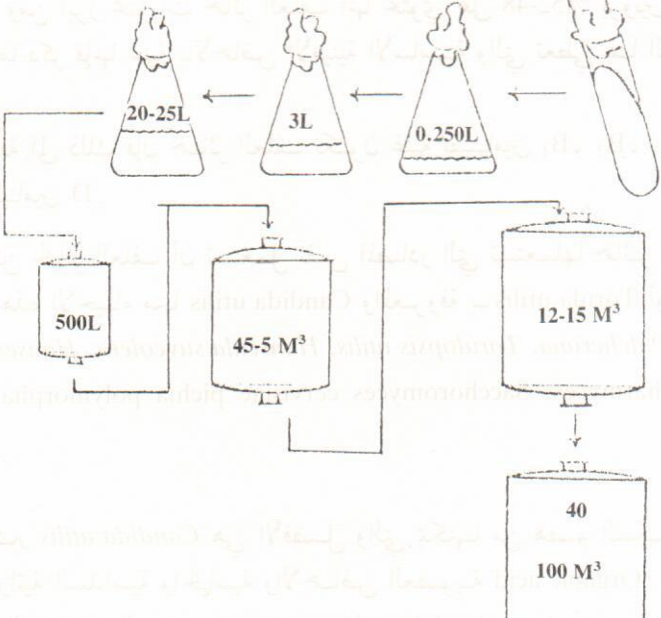
تحضير المزارع النقية للعملية الانتاجية :

إن تحضير المزارع الخمائرية النقية تعتمد على المراحل التالية، ويمكن تلخيصها بأربع مراحل :

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

1 ـ الحصول على المزارع النقية في المختبر:

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



الخطوات التقنية :

ان خطوات انتاج خمائر الخبز من قاعدة مولاسية أو عصير تمر تنتهي بالخطوات التالية :

1 ـ مشروع انتاج الخمائر

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

ب ـ قسم تهيئة المزرعة.

جـ ـ قسم تربية الخميرة.

د ـ قسم الفصل

هـ ـ قسم عمل القوالب والتعبئة والتغليف

و ـ قسم خزن المنتوج الجاهز

2 ـ مشروع المساعدة:

أ ـ قسم تهيئة الاملاح الغذائية

ب ـ قسم الترشيح

1 ـ مشروع انتاج الخمائر

قسم معاملة المولاس أو عصير التمر.

يجهز المولاس بحموضة وحرارة خاصة ويكون كالتالي:

جهاز التنقية يغطي ماء الى درجة حرارة 50-60 م وتضاف الكمية اللازمة من حامض الكبريتيك، حيث يضاف الحامض المركز بنسبة 0,6-1% الى المولاس غير المخفف، ان كمية البخار الناتجة هي 50-70% بعد اضافة حامض الكبريتيك. بعد الاضافة يسمح للمحور الدوار والمراوح بالعمل ويعطي 75% من الكمية الكلية المحسوبة من مادة السوبر فوسفات المضافة. وفي نفس وقت اضافة السوبرفوسفات يضاف ايضا المولاس. يسخن السائل الى حد الغليان بالبخار ويستمر بالغليان لمدة 30-60 دقيقة. ثم يضاف ماء بارد الى 20% من المواد الصلبة، وأخيراً يضاف الى المزيج الناتج 50% سلفات الامونيوم ثم يوقف المحور الدوار ويترك المولاس لمدة 6-8 ساعات.

بعد عملية تبريد المولاس، يستخلص المولاس النقي المعامل 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 أحياناً يتم معاملته للتخلص من بعض المواد الشائبة أو الالياف السليلوزية.

2 ـ تحضير المزرعة اللقاحية

ان اكثر معامل خميرة الخبز تستعمل النوع Saccharomyces cererisae وكل معمل له

سلالة ذات رقم معين مخزونة في انبوبة اختبار ونامية على سطح اكري والتي يعاد زراعتها مرتين في الشهر. ان عملية تجهيز اللقاح تنتهي بثلاث مراحل هي:

المرحلة الأولى:

تلقح دوارق مخروطية من المزرعة الخمائرية النقية وتغذي في المختبر في وسط غذائي صلب، وعند الظروف المعقمة يعمل التلقيح لثلاث دوارق ذات محتوى مالتي حجم (50) مل وبتركيز 10-11%. ان الدوارق المعقمة للمستخلص المالتي بعد هذا ستنمو في مدة 18-20 ساعة عند درجة حرارة 30 م.

المرحلة الثانية:

في هذه المرحلة يتم تلقيح دوارق ذات حجم أكبر ويحتوي على 450 مل مستخلص مالتي مع تركيز 9,5-10% المعقمة باللقاح الجاهز من المرحلة الأولى. وبعدها تبدأ عملية النمو لمدة 18-20 ساعة عند درجة حرارة 30-31 م.

المرحلة الثالثة:

في هذه المرحلة يتم بها تلقيح الدوارق ذات الحجم 4,5 لتر، والحاوية على المستخلص المالتي والمعقمة ثم تنقل محتويات المرحلة الثانية اليه وتجرى عملية النمو عند نفس الظروف السابقة.

3 ـ فصل المزرعة النقية

في هذه الخطوة يُهيّأ اللقاح لكي يتطبع بالوسط الغذائي وبذلك نحصل على لقاح وتتضمن عملية التهيئة طورين.

الوسط الغذائي يُهيّأ بشكل معقم والذي عنده يخفف المولاس بالماء الى حد 12% مواد جافة. وعلى سبيل المثال إذا كانت كمية الوسط 800 لتر يضاف اليها 60 لتر مستخلص مالتي بتركيز 12% مادة جافة و200 غم «داي ـ مونوفوسفيت ثم يعقم الوسط لمدة 30 دقيقة ومن ثم يبرد الى درجة 30 م.

1 ـ الطور الأول ـ 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 كغم من الخمائر.

2 ـ الطور الثاني ـ 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 الى الحاضن الكبير.

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

المرحلة الانتاجية

يعقم المولاس في كل المراحل الانتاجية وتحسب كمية الاملاح.

المخمر الام

وهو المخمر الانتاجي الاول والذي يتم فيه تعقيم المولاس وتبريده الى 30 م (والمحتوي على 13% مواد صلبة، وPH 4,5-5).

تنقل محتويات الحاضن (حجم 800 لتر) والذي يعتبر كلقاح للمخمر الأم وحجم المولاس الأساسي يكون 656 كغم، عملية التكاثر في هذه المرحلة هي حوالى 12 ساعة. بعد مرور 3 ساعات من العملية تعطى جرعة بسيطة من الهواء الى نهاية المرحلة وعندما تصل كثافة الوسط الى 4-4,5% مواد صلبة فإن المحتويات تنقل الى المرحلة التالية. الانتاج 60-80 كغم خمائر.

المخمر الوسطي

المخمر الوسطي له حجم 30 م^3 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 الى 30 م. وتنتهي عملية التلقيح من المرحلة السابقة بكثافة أولية للوسط هي 8% مواد صلبة. وتبدأ التهوية من بداية التلقيح بـ 30 م^3/1 م^3 وسط/ ساعة وتستمر العملية حوالى 8 ساعات. ويمكن معرفة نهاية العملية من خلال انخفاض تركيز المواد الصلبة الذائبة الى حدود 3-4% مواد صلبة.

المخمر الانتاجي للخمائر الجيل (أ)

وهذه العملية تمثل بجهاز أو بمخمر بحجم 140 م^3 وله نظام للتهوية. حجم المولاس

المستعمل بحوالى 6 طن وتجرى عملية التعقيم بصورة مفصولة. يوضع في المخمر 6% مولاس من حجم المخمر و10% سلفات الامونيا و17% سوبر فوسفات ثم تجرى عملية تلقيح للوسط. تبدأ عملية النمو مع ضبط جميع الظروف.

ويكون نظام اضافة المولاس او عصير التمر والاملاح على الشكل التالي:

الاضافة 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 الاومنيا	10	–	10	10	10	15	15	15	15	–	–	–	–
سوبر فوسفات	17	–	17	17	17	17	15	–	–	–	–	–	–

والخمائر الحاصلة أو المنتجة تفصل من خلال جهاز فصل وتخزن على شكل مستحلب خمائري في خزانات خاصة وعند درجة حرارة 2-4 م.

المخمر الانتاجي للخمائر الجيل (ب)

المخمر للجيل (ب) يتمثل بخزان حديدي ذي تبريد خارجي (الماء يجرى من خلال انابيب بطبقات رقيقة على جدار المخمر من الخارج، أما التهوية فتجرى من خلال حركة توربينية المرتبطة بنظام عمودي والذي بدوره يعطي التهوية للمولاس المعقم والاملاح المحسوبة من المرحلة السابقة وكذلك الخمائر المنتجة من المرحلة السابقة.

تنتهي عملية النمو بـ 12 ساعة (دورة) والتهوية من 1500-8000 م^3/ساعة، المحتوى العام لجهاز التخمير بعد عملية الفصل والغسل والخزن في خزان مبرد حجم (2-4) م. وهكذا تعتبر الخمائر الناتجة كمادة لقاحية للجيل جـ.

جهاز التخمير للجيل الثالث (جـ)

تستعمل أجهزة لأجل الجيل الثالث من نوع فوكل بوش Vogel Bosh وبحجم 135 م^3، وعند درجة حرارة 29-30 م. في اللتر الواحد حيث ستتراكم (90) غم كتلة حيوية.

ان الهواء المستعمل لهذه العملية هو 7 م^3/1 كغم هو خمائر جافة. أما التهوية فتكون عن طريق جهاز دوار، وتجرى عملية التهوية بصورة عمودية على عملية الدوران حيث تتكون فقاعات صغيرة جداً.

يضاف المولاس والاملاح بالموازنة مع وقت تراكم الخمائر وتكرر العملية بعد كل (12-14) ساعة (دورة). تنخفض لزوجة الوسط عند الجيل جـ مع رفع الانتاج. يلقح الوسط بالخمائر الحاصلة من الجيل ب، مع ضبط الـ PH وكذلك الاملاح الغذائية. أما مزيل الرغوة فيضاف اوتوماتيكياً بالتدريج وعند احتياج الحالة. وكذلك الحال بالنسبة الى اعطاء الهواء. يرسل المعلق الخمائري بتركيز 90 غم/لتر الى أجهزة الفصل المركزي.

قسم الفصل

فصل الاجيال أ، ب، جـ: لأجل فصل الخمائر من سائل التخمر، تجرى العملية بأجهزة فصل تحت تأثير قوة كطرد السائل حيث يفصل الى اتجاهين وبأوزان نوعية مختلفة. مسائل التخمر 1,0-1,002، والخمائر 1,08-1,12.

ان استمرارية اضافة الخمائر في سائل التخمر سيرفع من تأثير التحلل الانزيمي في الخلايا، وهذا بدوره سيقلل من قوة فعالية الخمائر وكذلك خزن الخمائر.

المرحلة التالية من الفصل تعرض زيادة لزوجة المستحلب الخمائري، حيث انه قبل الفصل بالطرد المركزي الثاني والثالث يجب تخفيفه اربع مرات بالماء لأجل غسل الخمائر. ان حجم الماء يعتمد على فتح لون الخمائر وكذلك على لون صبغة السائل فوق الخمائر بقايا صبغة المولاس أو عصير التمر أو أي مصدر آخر الى أن يظهر لون الخمائر المعروف، حيث انه من المعروف أن المواد الصبغية تنتشر فوق خلايا الخمائر حيث ان الامتصاص الالكتروني للشحنات الموجبة الميلاتين، على الشحنات السالبة لخلايا الخمائر.

قسم التبريد خزن الخمائر بعد درجات الفصل تنتهي في خزانات مبردة والخزن يتم عند درجة (2-4) م لأجل الخميرة الام و(6)° م لأجل الخميرة الباقية التي تنتج. تكون الخزانات المبردة مجهزة بأغلفة تبريد بالاضافة الى كونها مجهزة بمحور دوار لأجل تنظيم الحرارة. علماً بأنه يتم تعديل PH إلى (6-6,2(.

قسم عمل الأشكال والتعبئة

للجيل جـ وبعد عملية الفصل للخمائر تجرى عملية تشكيل للخمائر تحت مرشحات مفرغة. فهنا ستكون الخمائر متجمعة وتحت التأثير المستمر للعمل، ويجب ملاحظة ما يلي: كثافة مستحلب الخمائر يجب ان لا يقل عن 600-700 غم/لتر خمائر ويجب أن تكون المزرعة نقية صافية، كما يجب أن لا تكون الحرارة والسكروماييسيس Sacchromyces أعلى من 12 م.

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

ان عملية الترشيح بواسطة مرشح نوع (Vaccum filter) تجرى بالطريقة التالية: يوضع المستحلب الخمائري في حوض المرشح المفرغ (Vaccum filter) ويمرر من خلال سطح النسيج المرشح والتي ستترتب عنده. اما الراشح فيذهب من خلال قنوات. ان فصل خلايا الخمائر من الفلتر يكون بواسطة سكينة لذلك تكون الخمائر جاهزة لأجل عمل التشكيلات.

ولأجل عمل الأشكال كثيراً ما تستعمل مكائن عمل القوالب والأشكال حيث تشكل الخمائر في قوالب ذات وزن 500 غم أو 2500 غم حيث يتم ذلك من خلال:

1 ـ ماكنة عمل الأشكال والمجهزة بقوالب بحجم (150 كغم) خمائر.

2 ـ ماكنة صنع الاغلفة والتي يوضع فيها المنتوج (اغلفة) وعموماً يكون من غلاف ورقي ذي طبقتين تقفل. وتكون هذه الاغلفة معلمة باسم المنتوج. وتخزن عنه درجة حرارة (4-0)° م.

قسم الاملاح الغذائية:

يتم في هذا القسم تحضير الاملاح الخاصة بالعملية الانتاجية كالمحاليل الفوسفاتية، والكبريتية، والأمونية.

السيطرة على الانتاج:

العمليات الأساسية في معمل انتاج الخميرة يسيطر عليها بالسيطرة اللازمة (بالمعدات القياسية) وأكبر جزء منها يجرى أوتوماتيكياً ومن قسم معين ينظم السيطرة وينظم كافة العمليات ومنها عملية التهوية في جهاز التخمير ومن خلال مانومتر (Defferential manometer). أما القياس PH فهناك جهاز فوق جهاز التخمر يقيس درجة التفاعل الهايدروجيني أو تنظيم درجة التفاعل. كذلك هنالك جهاز آخر يقيس كثافة الوسط التخميري ومن خلال هذا الجهاز ينظم عملية دفع جرعات من الوسط الغذائي الى المخمر الرئيسي.

السيطرة التكنولوجية والمايكروبيولوجية:

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

وفي المعمل ككل يعمل التفتيش التالي:

1 ـ كل ساعتين يؤخذ نموذج من جهاز التخمر، وتدرس تحت المجهر لأجل تحديد درجة نمو خلايا الخمائر وتقرأ المؤشرات التالية: ملاحظة الخمائر، البرية الغريبة، المايكر فلورا الجانبية. طريقة التكاثر. التفرعات الجانبية للمنتوج التكاثري الاعتيادي.
2 ـ السيطرة على النظافة من حيث الخزن والأجهزة.
3 ـ السيطرة على نوعية المنتوج الجاهز.

أ ـ نقاوة ونظافة المزرعة الخمائرية
ب ـ نسبة الخلايا الميتة

4 ـ السيطرة على النظام الحراري في خزانات التبريد.
5 ـ السيطرة الميكروبيولوجية على المواد الخام والمواد المساعدة.
6 ـ السيطرة الميكروبيولوجية الصحية على الانتاج والأجهزة مرة واحدة كل شهر.
7 ـ السيطرة الكيمياوية تعطي شهادة للمواد الخام وللمواد الوسطية وللعملية وللمنتوج الجاهز تنتهي في المختبر الكيمياوي.

1 ـ تحاليل المواد الخام

1 ـ تحديد نسبة H_2SO_4
2 ـ تحديد نسبة P_2O_5 في محلول سوبرفوسفات.

2 ـ تحاليل المولاس أو عصير التمر

أ ـ يحلل المحتوى السكري
ب ـ الحموضة
جـ ـ نسبة القلويات
د ـ المحتوى الترميدي Ash

تقنية انتاج الخميرة الغذائية من عصير التمر:

ان عملية انتاج الخميرة الغذائية من التمر تحتاج الى بعض العمليات التصنيعية ومن أهمها:

1 ـ عمليات تخص المادة الخام نفسها وذلك لأجل استخلاص المادة السكرية منها وكذلك المواد الأخرى كالمعادن والاحماض الامنية ذات الأهمية لتنمية الخمائر. كذلك يجب

تثبيت أحسن الظروف للاستخلاص من حيث نسبة كمية الماء الى كمية التمر، نوعية هرس التمور، درجة الحرارة المستعملة، PH، الوقت.

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

3 ـ عمليات تثبيت الظروف للتربيه وهذا يتطلب الدراية الكافية بالسلالة المستعملة، لذا يجب تثبيت درجة الحرارة وPH والتهوية وكمية اللقاح وكذلك تراكيز المصادر الأساسية كالنايتروجين والفوسفور والكربون اللازمة لنمو الخمائر.

4 ـ عملية ثبوت ديناميكية نمو الخميرة في وسط عصير التمر لمعرفة زمن كل طور وأن هذه العملية لها دور كبير من الناحية الاقتصادية حيث يثبت ديناميكية السلالة على أن يثبت الوقت لانتهاء عملية التخمير.

5 ـ عملية تثبيت نقاوة العصر حيث أن عملية استخلاص السكريات بالماء يحتاج الى درجات حرارة عالية ما بين 80-90 م. وكذلك تعمد عملية ثبات نقاوة المستخلص على نسبة الماء: التمر. ويمكن قياس نقاوة العصير بالمعادلة التالية:

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

انتاج الخميرة الغذائية من التمر من النوع C. Utilis:

1 ـ تحضير المواد الأولية: يبخر التمر في جهاز بخاري من نوع Hense تحت ضغط 2,5 جو لمدة 3 دقائق. بعد ذلك يبخر تحت الضغط الجوي ثم يغسل الجهاز والمادة التي بخرت بالماء.

عجينة التمر التي تحصل عليها تضغط على مناخل ذات قطر 1/2 سنتيميكرون لازالة النوى. محتويات عجينة التمر من السكر هي 25 غم/100 مل.

2 ـ **التخمير:**

تبدأ العملية بوضع الوسط الغذائي في الفرمنتور على درجة حرارة 30 م وتلقيحها بـ 100 مل من معلق الخمير.

في منتصف الوقت تقاس نسبة السكر في الـ Mash بطريقة Schools أو بيولر يحفظ

PH الـ Mash بين 3-4,5 تبعاً لنوع الخميرة باضافة هيدروكسيد الامونيوم بكمية مناسبة عند الضرورة يستمر التخمر باضافة الماء الى المخمر. كمية السكر في الوسط Mash تحفظ بنسبة 0,5% بإضافة عجينة التمر. التخمير يستمر لمدة يومين 16 إلى 72 ساعة تجرى تهوية الـ Mash لمدة 8 ساعات/يوم بـ 20 لتر هواء معقم، يبدأ بتحريك الـ 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 الى 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 بمعدل 0,2 كغم عجينة تمر/ساعة.

خطوات صناعة الخميرة الغذائية تجارياً من التمر:

الرسم التخطيطي التالي يوضح خطوات صناعة الخميرة الغذائية والأجهزة التي تدخل بالتصنيع: الخطوة الأولى هو استخلاص مستخلص التمر بعد تصنيع التمر حيث يجب أن تكون محتويات العصير من السكر 10 بركس Bx، وتتم هذه الخطوة في (A) مع المحافظة على نسبة التمر الى الماء وهي 5:1 لكل مستخلص يدخل اليه الماء من عمليات الطرد المركزي لعجينة الخميرة الناتجة، وتعاد دورتها الى الخزان الاول لكي تعمل مرة أخرى:

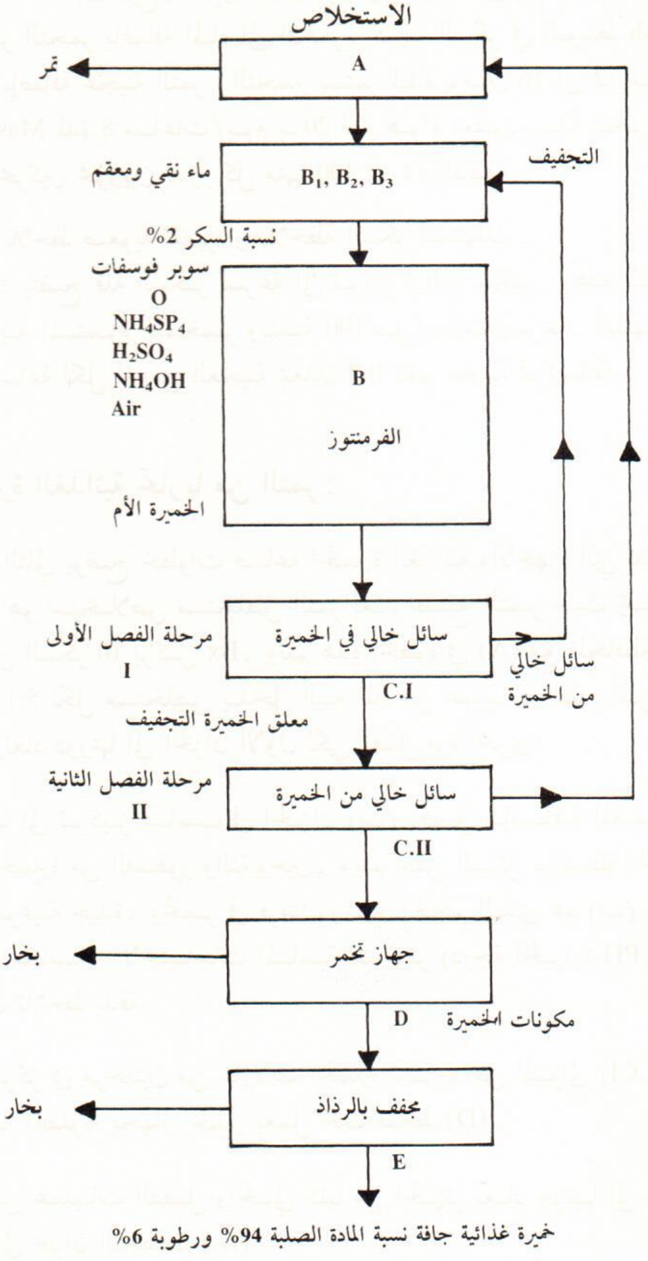
عصير التمر يخفف الى تركيز مناسب في الخزان (ب) يكمل بإضافة المغذيات الضرورية التي تحتاجها الخميرة من الفسفور والنتروجين، ويتم حقن السائل بواسطة الخميرة المحضرة أو الأم بكمية ونوعية جيدة، وتخمر في فرمنتور كبير الحجم الذي هو (ب) سعة 100-200 مع عملية تهوية مناسبة. الاحتياجات المناسبة للتخمر (درجة الحرارة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

العجينة المتخمرة تركز في مرحلتين من عازلات الخميرة تكرره على التوالي (CL, CI) بعد ذلك تركز الى الدرجة المطلوبة بجهاز تخمير يعمل تحت ضغط (D).

السائل المتخلف من عمليات الفصل والخالي كلياً من الخمائر يعاد جزئياً الى خزان استخلاص التمر (A) والى خزان التجفيف (B_1).

عجينة الخميرة المركزة تجفف بواسطة جهاز التجفيف بالرذاذ (E) فتكون الرطوبة النهائية في الخميرة الغذائية هي 6% التي تغلف وترسل الى غرف التخزين.

انتاج الخميرة الغذائية من التمر (رسم تخطيطي لعمليات التصنيع)



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

انتاج الخميرة الغذائية من: .S. C:

انتاج الخميرة الجافة الابتدائية من السلالة .S.C يوازي انتاج خميرة الخبز حتى مرحلة التركيز والغسل للخلايا حيث تصبح عجينة ثقيلة (كما يلاحظ في الرسم المقابل)، وبعد ذلك تؤخذ العجينة ويبستر وتجفف الى رطوبة 6% ثم تطحن، وبعدها تعبأ ثم تخزن. لون الخلايا المعلقة يكون لوناً فاتحاً. تدعى اعتيادياً بكريم الخميرة.

انتاج الخميرة من .C.U بعد تنميتها على السوائل المختلفة من معامل الورق

انتاج الخميرة الجافة من التمور لا بالتخمر المستمر من السائل المتخلف من معامل الورق، حوالي 20% من هذا السائل (المادة الصلبة) هي السكر ومواد عضوية جاهزة للاستفادة منها حيوياً بواسطة سلاسل مختارة من .C.U، مع ذلك فإن هذا النظام من الانتاج يختلف اختلافاً كبيراً عن تخمير المولاس كما يلاحظ من الرسم وهذا شرح مختصر للعمليات التي ينظمها.

تحضير وسط التخمر: يتضمن مزج السائل المكبرت من عدة معاجين مختلفة لازالة الزيادة من SO_2 بمعدل الـ PH بالامونيا، تحليل السكر والمواد الفسفورية اضافة البوتاسيوم والفسفور. المحللات الاوتوماتيكية تستمر بالتجهيز على شكل ضخ السكر.

ينتج من التحضير الدقيق والاقتصادي بإضافة الفسفور تبعاً لكمية السكر المتخمر تضاف الامونيا لتنظيم الـ PH خلال الانتاج وتسجل اوتوماتيكياً.

كفاءة التهوية يتحكم بها باستمرار بقياس كمية الاوكسجين الذائب خلال مراحل التخمير، تضاف المادة السائلة (البيئة) قريبة من القمة خلال انبوب متصل بالخزان يسحب من السائل الى الفران حوالي 60,000 كالون فران Waldhof يمزجها المحور بسرعة مع مستحلب الخميرة بنسبة 100 كالون في الدقيقة.

درجة حرارة الانتاج يحافظ عليها قريباً من 32 م بدورة مستمرة من المستحلب خلال مبرد خارجي يربط مع (1000) طن من جهاز التبريد، تسحب الخميرة بضخ المستحلب بنسبة توازن المادة الداخلة من البيئة، بعدها تغسل الى حوالى 15% مواد صلبة، تعقم وتجفف الى أقل من 6% رطوبة جوية بواسطة البخار او مجففات الدواليب المزدوجة. ثم تطحن الى بودر وتعبأ في أغلفة بلاستيكية مثل البولي اثيلين.

بعدها يقاس او يختبر البودر الناتج في مختبرات التحليل ويجب أن يكون البودر حاوياً على المواصفات القياسية.

استعمالات الخمائر المغذية:

1 ـ تستعمل كغذاء للانسان للتغذية المباشرة وتكون على شكل بودر او كبسولات او تكبس على شكل حبوب، وكذلك تخرج مع الأغذية لاحتوائه على البروتين والفيتامين خصوصاً مجموعة فيتامين B وغيرها من المغذيات التي تكون رخيصة الثمن في سني الحرب، وفي البلدان التي تقل فيها مصادر البروتين ورخص المواد الكربوهيدراتية فيمكن أن تصنع.

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

3 ـ تستعمل في المستشفيات على شكل حبوب أو كبسولات.

4 ـ تستعمل لتغذية الحيوانات مثل الفراخ كمجهز لفيتامين B في صورة مقبولة. والجدول رقم (10) والشكل رقم (30) يوضحان تأثير التراكيز المختلفة من سكريات التمور في الوسط الغذائي على انتاجية سلالات خمائرية مختلفة من الكتلة الحيوية، حيث يوضحان انتاجية هذه السلالات والمنسوبة الى 1% سكر. اما الجدول رقم (11) فيوضح التحاليل الكيمياوية للكتلة الحيوية الناتجة على عصير التمر. أما المخطط رقم (12) فيوضح التصميم الكامل لمعمل الإنتاج لبروتين الاحياء المجهرية من عصير التمر.

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

جدول رقم (10)

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

اسم السلالة ورقمها	عصير التمر تركيز 1%	عصير تمر تركيز 2% منسوب الى 1%	عصير تمر تركيز 3% منسوب الى 1%	عصير تمر تركيز منسوب الى
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	—
Rhodatorula y-28	27.21	15.15	9.58	7.73
Sacch. sp*. y-10	28.56	18.53	15.94	13.19
Sacch. sp*. y-11	3.86	0.87	-	0.83
Sacch. sp. y-20	9.83	11.68	10.89	8.65

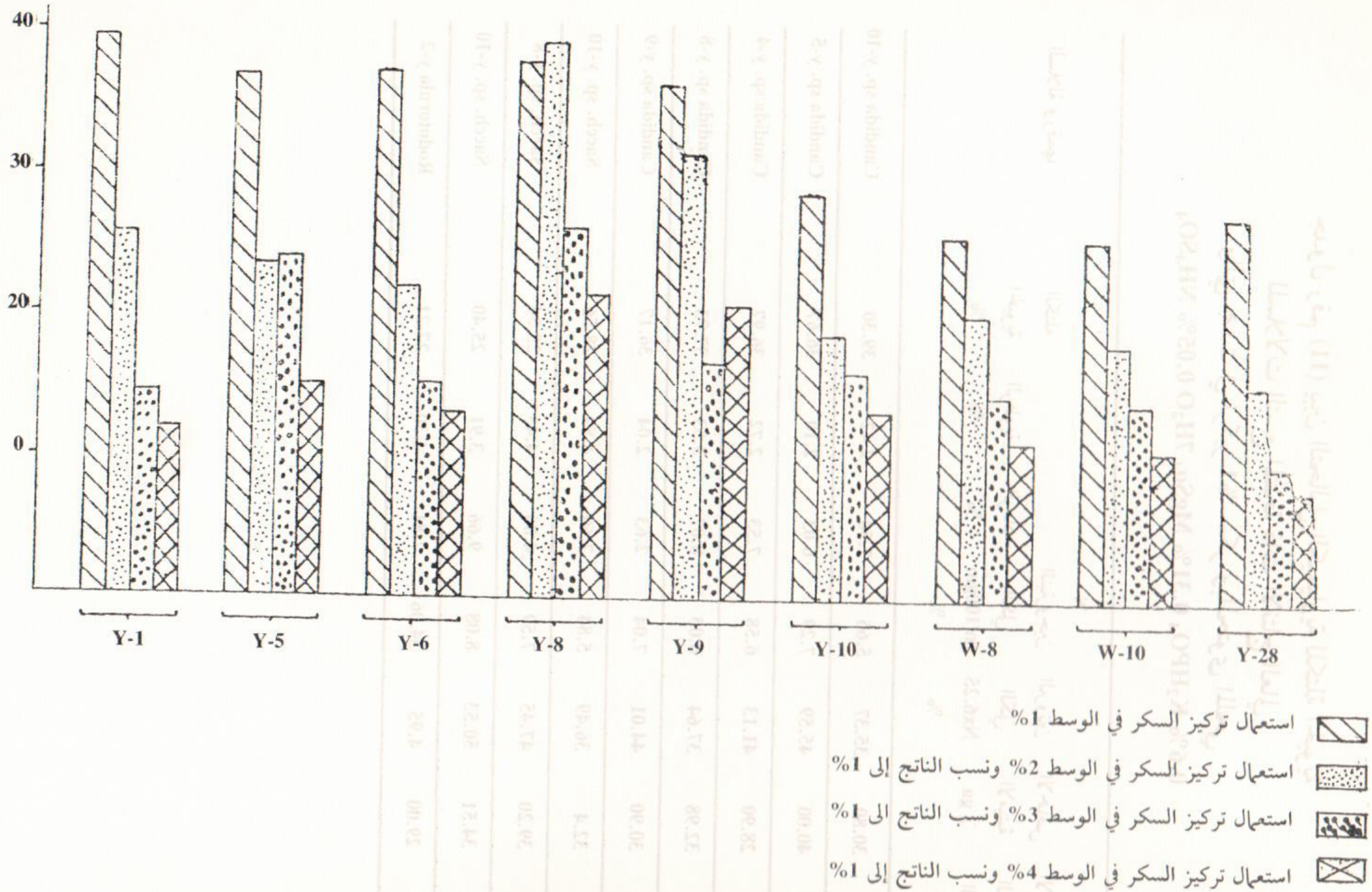
اسم السلالة ورقمها	عصير التمر تركيز 1%	عصير تمر تركيز 2% منسوب الى 1%	عصير تمر تركيز 3% منسوب الى 1%	عصير تمر تركيز منسوب الى
Sacch. sp. y-21	8.04	12.19	11.24	10.65
Sacch. sp. y-24	15.39	10.62	9.01	7.89
Sacch. sp. y-25	17.36	15.55	10.4	8.78
Sacch. sp. y-27	18.31	13.87	10.70	10.72
Sacch. sp. w-1	14.77	16.87	14.68	10.83
Sacch. sp. w-2	22.45	14.03	12.63	10.11
Sacch. sp. w3	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 (11) يبين التحاليل الكيمياوية للكتلة الحيوية للسلالات التسع المنتجة ذات الانتاج 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

الاحماض النووية الكلية 00	الاحماض الامينية ٪ ga	البروتين الكلي Nx6.25 %	N النيتروجين الكلي gn/100gm %	الرماد %	الرطوبة %	الكتله الحيوية %	السلالة ورقمها
00	30.80	35.37	5.66	7.50	2.42	39.30	Candida sp. y-10
00	40.00	45.59	7.29	6.03	2.10	36.67	Candida sp. y-5
00	28.90	41.13	6.58	7.53	2.72	36.97	Candida sp. y-4
20	32.98	37.64	6.03	8.07	3.53	37.73	Candida sp. y-8
50	30.90	44.01	7.04	2.63	2.04	36.17	Candida sp. y-9
40	32.4	36.49	5.84	7.60	4.89	28.56	Sacch. sp. y-10
40	39.20	47.45	7.59	4.86	4.43	25.54	Sacch. sp. y-8
40	34.51	50.53	8.08	9.66	3.91	25.40	Sacch. sp. y-10
50	29.00	4.95	34.06	7.81	4.30	27.21	Rodotorula y-2



شكل (30) يوضح تأثير التراكيز المختلفة من السكر على انتاج الكتلة الحيوية

1 - خزان لمحلول K_2HPO_4

2 - مضخة لرفع محلول NH_4SO_4

3 - خزان لمحلول NH_4SO_4

4 - مضخة لرفع محلول NH_4SO_4

5 - خزان لخلط المحلولين السابقين مع عصير التمر المخفف

6 - مضخة لنقل الوسط الغذائي

7 - التعقيم

8 - استلام التمور

9 - استخلاص عصير التمر بواسطة Exlraclor

10 - المستخلص المائي للتمور

11 - تخفيف المستخلص بالماء بشكل يتناسب ونوع الكائن المجهري ثم ينقل إلى الخزان رقم (5)

12 - المخمر Mermenter

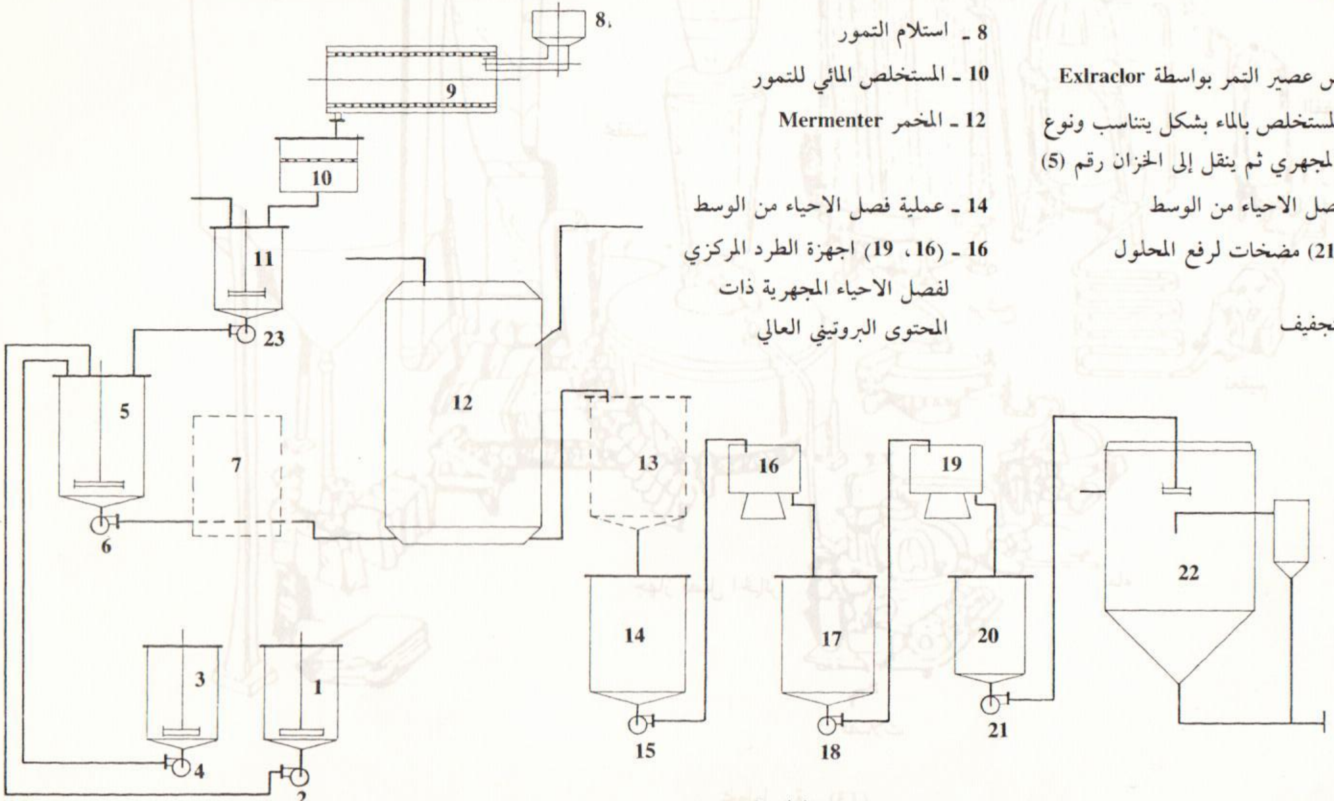
13 - عملية فصل الاحياء من الوسط

14 - عملية فصل الاحياء من الوسط

15 - (18)، (21) مضخات لرفع المحلول

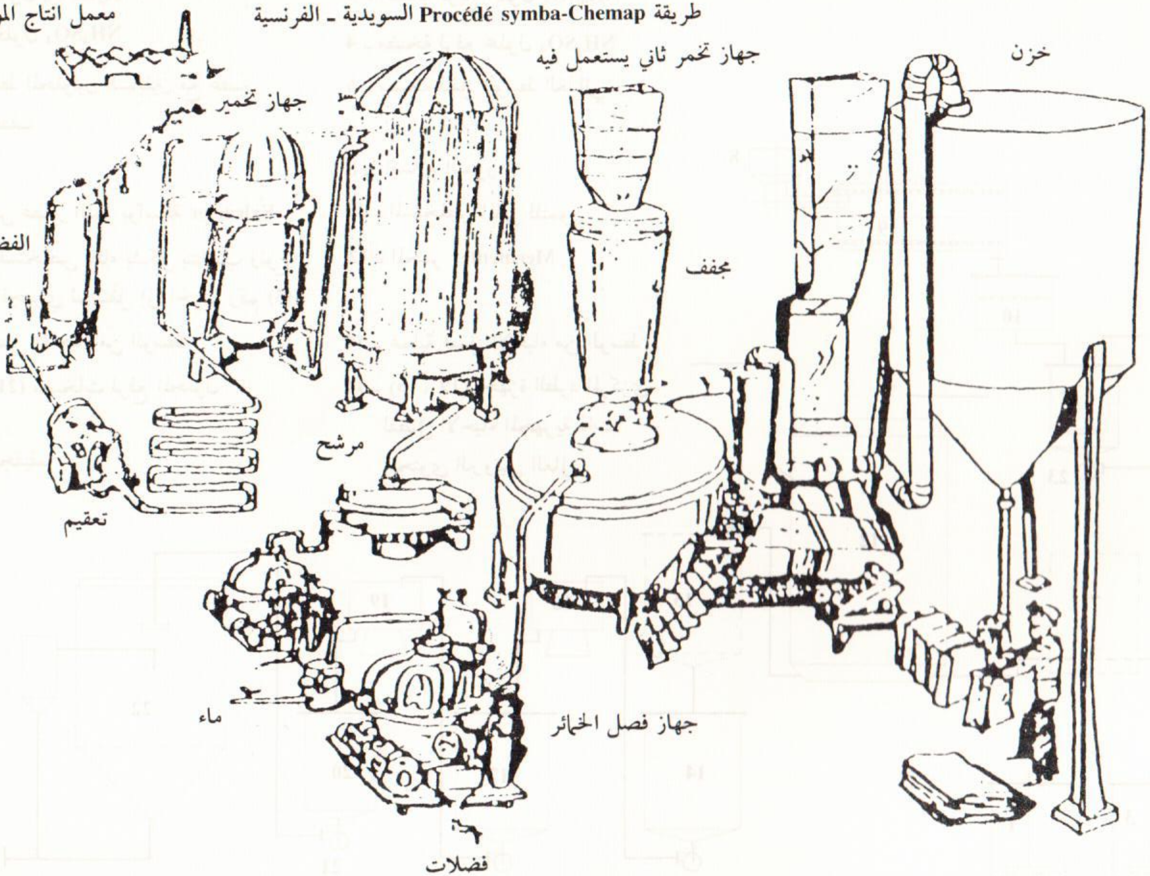
16 - (16، 19) اجهزة الطرد المركزي لفصل الاحياء المجهرية ذات المحتوى البروتيني العالي

17 - عملية التجفيف



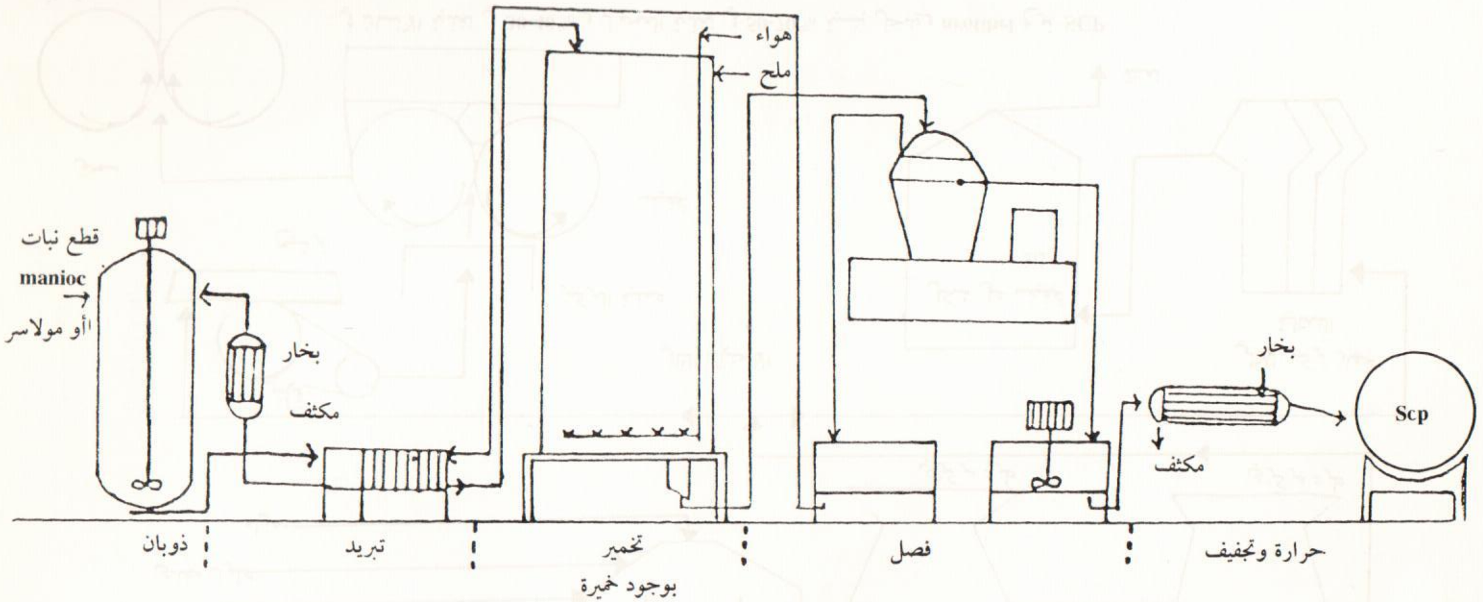
مخطط رقم (12)

طريقة Procédé symba-Chemap السويدية - الفرنسية



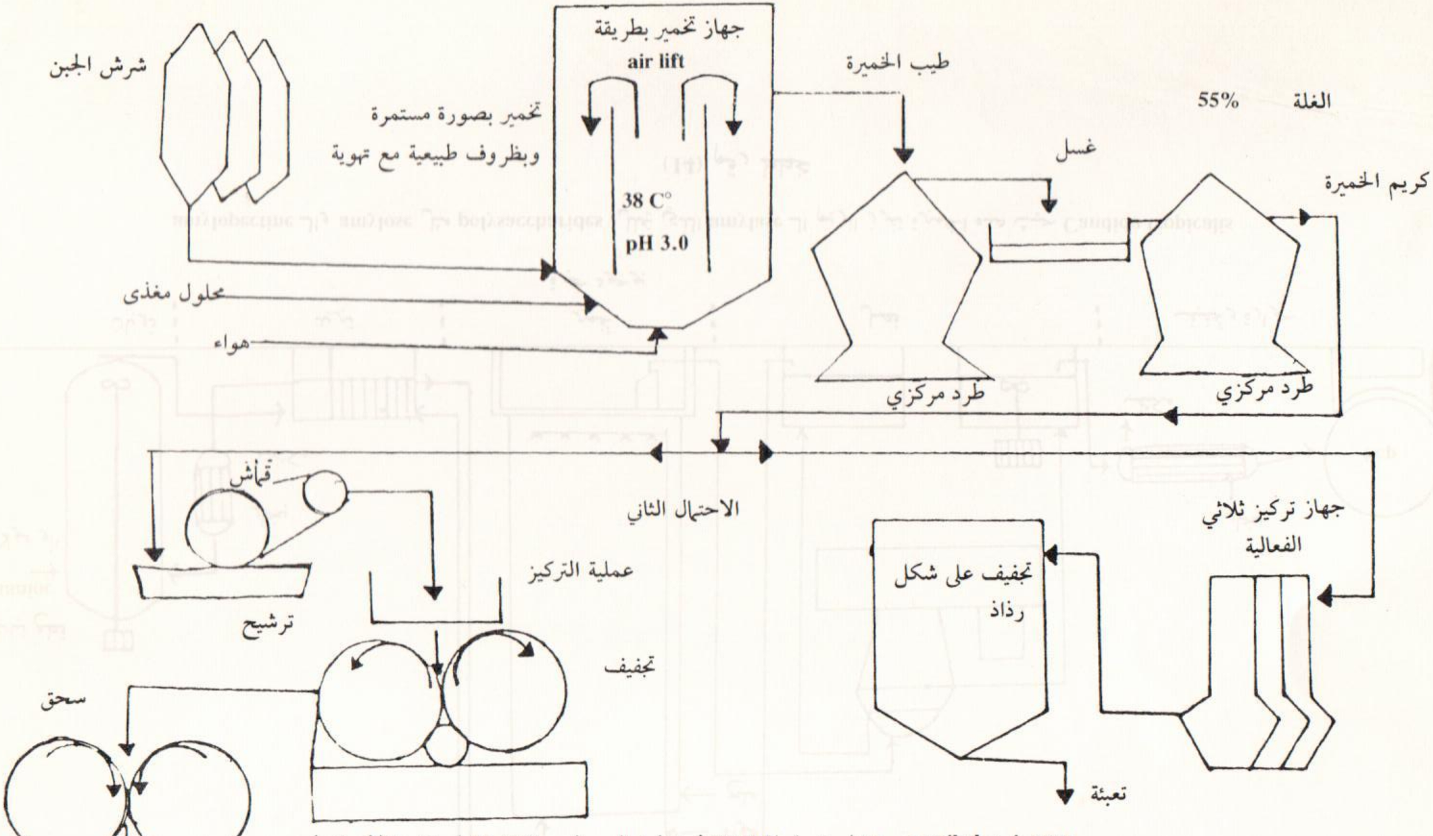
مخطط رقم (13)

طريقة **A Adour Speichim**



Candida tropicalis حيث هذه الخميرة تفرز انزيم الـ **amylase** الذي يحلل **polysaccharides** مثل **amylose** والـ **amylopectine**

مخطط رقم (14)

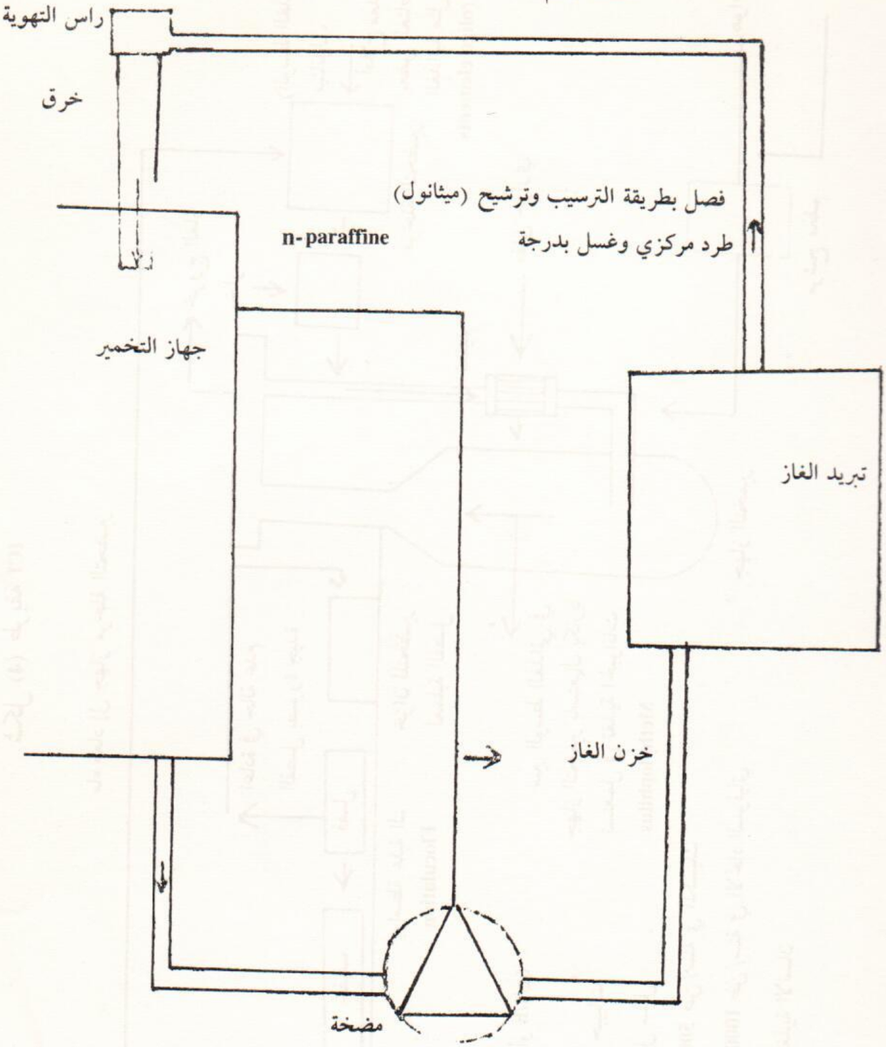


SCP نوع nrotibel ويدخل بنسبة %50-70 في تغذية العجول و %30-40 في تغذية الانسان في:

1 ـ البسكويت والتوست
2 ـ تغذية الرضع (علب التغذية)
3 ـ صناعة الصاص والحساء
4 ـ معجنات اللحوم و %20 في صناعة الهامبركر
5 ـ في تغذية الامهات الرضع وحالات الأمراض وفقر الدم

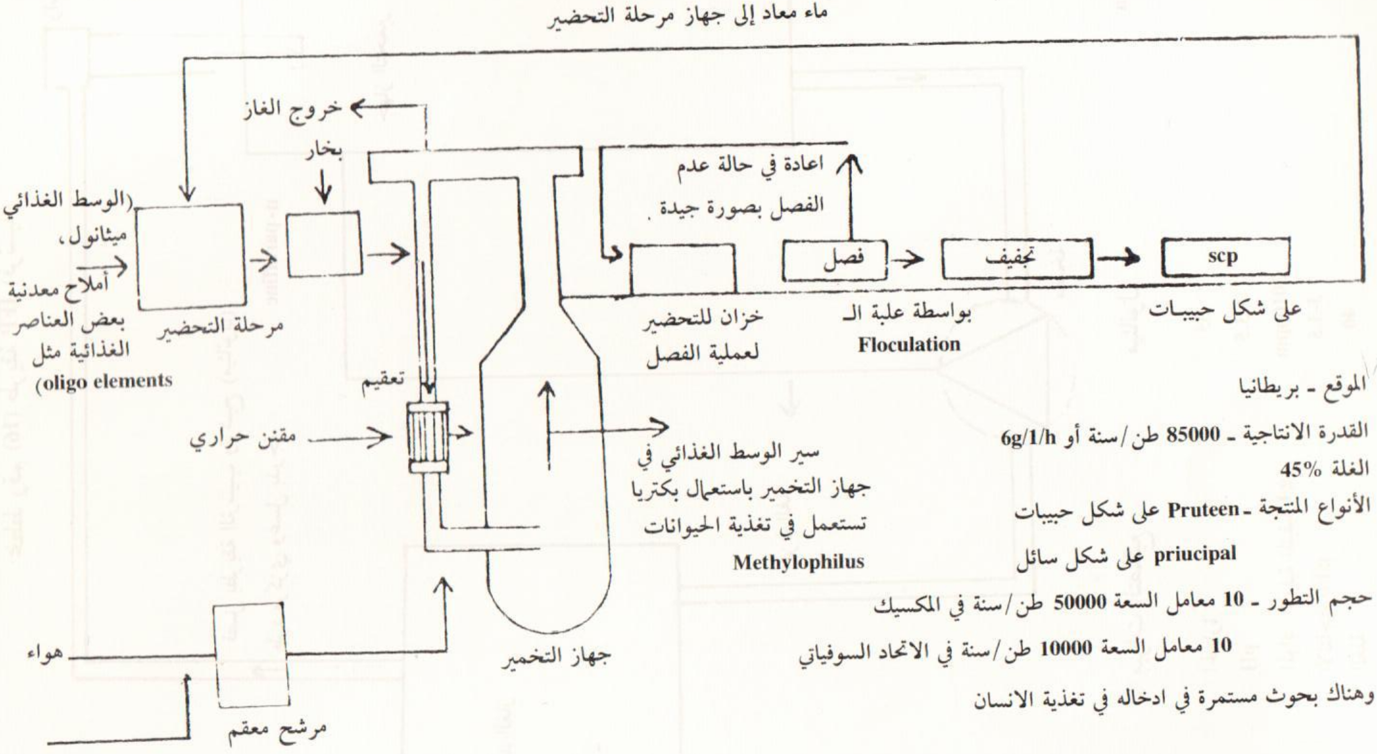
مخطط رقم (15)

مخطط رقم (16) طريقة IFP (فرنسية)



ميزات التصنيع	ميثانول	n-paraffin
الحرارة	35	38
pH	3-3.5	3-3.5
المواد الأولية المتبقية g/l	3010ppm	0.1-0.5
الانتاجية g/l/b	3-3.5	0.5-4
الغلة	40	95-97

شكل (4) طريقة ICI



الموقع - بريطانيا

القدرة الانتاجية - 85000 طن/سنة أو 6g/1/h

الغلة 45%

الأنواع المنتجة - Pruteen على شكل حبيبات

priucipal على شكل سائل

حجم التطور - 10 معامل السعة 50000 طن/سنة في المكسيك

10 معامل السعة 10000 طن/سنة في الاتحاد السوفياتي

وهناك بحوث مستمرة في ادخاله في تغذية الانسان

methylorophus

الفصل التاسع

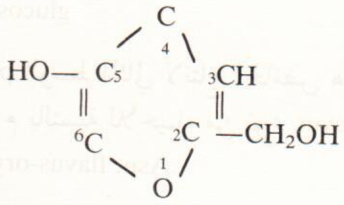
تقنية إنتاج الأحماض العضوية
Production Technology of Organic Acid

إن الأحياء المجهرية تتمكن من تكوين حوامض متنوعة وكنتيجة للتمثيل الأيضي والأكسدة للكاربوهيدرات كحامض اللبنيك والبروبيونيك وحامض الليمون وحامض الكوكونيك، وغيرها من الأحماض التي لها تطبيقات واسعة كحامض الفورميك وحامض الكوجيك.

إن للأحماض العضوية استعمالات عديدة في الصناعات الغذائية في 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 الـ 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. elavatus, A. awamori, A. Plavus, A. gymosardse, A. Aoryzae, A effusus.

وكذلك يمكن إنتاج هذا الحامض من قبل بكتريا الـ Acetobacter ومن عفن الـ peni-cilium daleae.

التربية الصناعية

من المصادر الكربوهيدراتية الأولية المستخدمة في تحضير هذا الحامض هي عصير التمر، السكروز، المالتوز، الكلوكوز، الفركتوز، الدكسترين. . . الخ، وإن التركيز المثالي للمصدر الكربوهيدراتي هو ما بين 15-33% وباستعمال السلالة Asp. flavus.

وكذلك تم الحصول على أعلى انتاج لهذا الحامض باستخدام الوسط الكلوكوزي ذي تركيز 20% وباستخدام الوسط الكسيلوزي ذي تركيز 10%.

مكونات الوسط الكلوكوزي المثالي لانتاج 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 كانت الـ pH الوسط المثالي لانتاج الحامض هو ما بين (2-5)، أما درجة الحرارة المثلى هي ما بين 29-35° م بالنسبة للأحياء من نوع A. flavus وما بين (30-35° م) بالنسبة للأحياء مجموعة الـ Asp. flavus-oryzae.

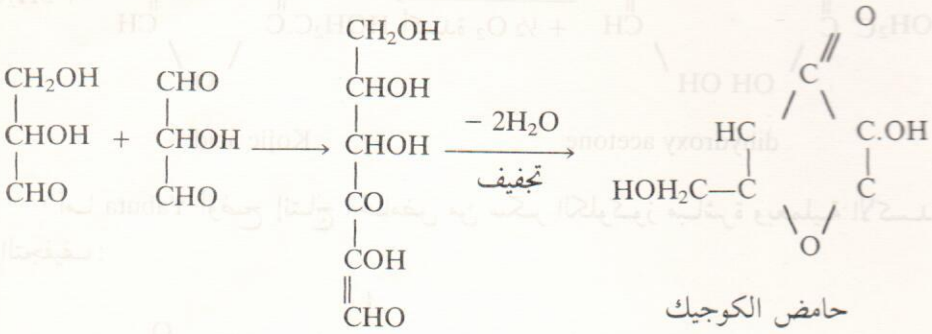
وأخيراً فإن أعلى انتاج لحامض الكوجيك من قبل السلالات المصنعة كان بحدود 50-60% محسوباً بالنسبة إلى المصدر الكربوني.

التخليق الحيوي للحامض Biosynthesis

إن ميكانزم التخليق الحيوي لحامض الكوجيك قد اقتُرنَ بقياس نشاط أحياء الـ Asp. oryzae والـ Asp. flavus-oryzae.

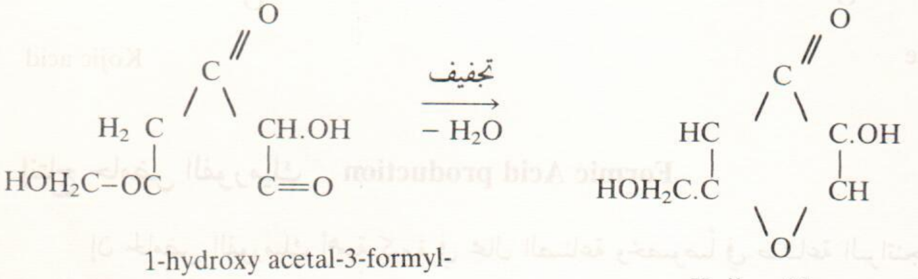
وهناك العديد من النظريات والاقتراحات لايضاح ميكانزم انتاج الحامض. ففي عام (1930) اقترح كل من (Corbellini و Gregorini) اقترح بأن نواة الـ pyrone تؤلَّفْ من

مركبات ثلاثية الكربون. وكمثال إلى ذلك جزئيتان من مركبات ثلاثية الكاربون تتحد لتكون جزئية واحدة، وبواسطة التجفيف تتحول إلى حامض الكوجيك.



حامض الكوجيك

أما (May) ومساعدوه أوضحوا بأن إنتاج هذا الحامض يتم من بعض المركبات التي تحتوي على 2-3 ذرات كاربون، حيث اقترحوا بأن مركب الـ -3- I-hydroxyacetyl-3 formyl hydroxy acetone يتحول بالتجفيف إلى حامض الكوجيك، ولكن واجهوا صعوبة فصل الحامض المتكون.

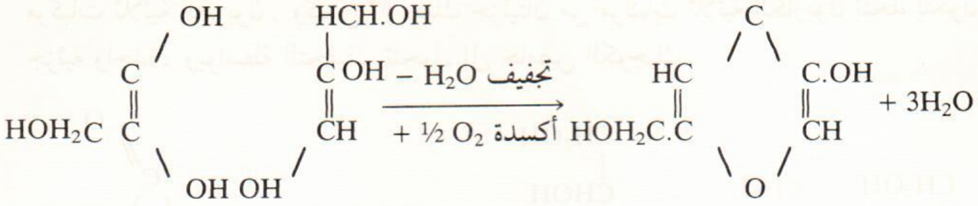


1-hydroxy acetal-3-formyl-
-3 hydroxy acetone

Kojic acid

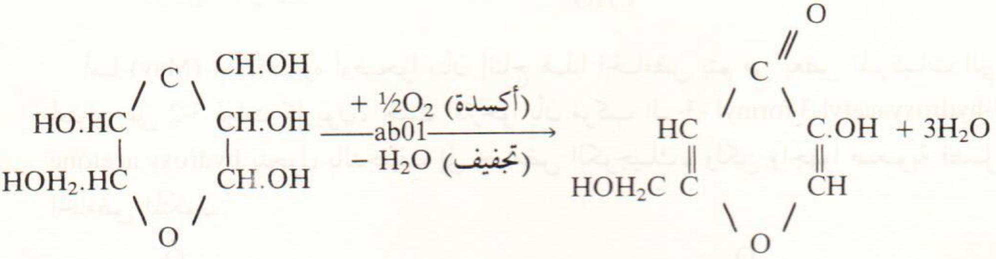
وفي عام 1931 (Raistrick ،Lilly ،Charlis ،Birkinshaw) إقترحوا نظرية إيضاح ميكانزم إنتاج الحامض. وهذه النظرية تعتمد على الحقيقة وهي إن الايثانول موجود إعتيادياً في التخمرات العفنية وخصوصاً في العمليات التخمرية لانتاج حامض الكوجيك، ويلعب (الايثانول) دور في إنتاج الـ Acetaldehyde وما لهذا الأخير من دور في تثبيت العديد من الأوساط الغذائية لعفن الـ (Asp. aryzae). وبذلك فإن الايثانول يزيد من تكون الكوجيك من المحلول الكلوكوزي باعتباره أحد المواد الوسطية للتخمير.

أما Challenger ومساعدوه فقد أعطوا اقتراحاً منطقياً لتحضير حامض الكوجيك من الـ dihydroxy acetone وبعملية الأكسدة والتجفيف.



dihydroxy acetone   Kojic acid

أما Yabuta أوضح إنتاج الحامض من سكر الكلوكوز مباشرة وبعملية الأكسدة والتجفيف:



glucose   Kojic acid

إنتاج حامض الفورميك **Formic Acid production**

إن لحامض الفورميك أهمية كبيرة في مجال الصناعة وخصوصاً في صناعة الراتنجات، (Resins) . . . الخ .

وفي سنة 1958 أعلن (جاكسن) عن أول تحضير صناعي لحامض الفورميك بطريقة مايكروبايولوجية .

الأحياء المجهرية المصنعة للحامض:

هناك الكثير من الأحياء المجهرية المصنعة لحامض الفورميك ومنها: mucor, Cunninghamella, Circinella, Rhizopus ولكن أهمها هو جنس الـ Rhizopus ومنه:

R. chiuniang, R. chinensic, R. nigricans, R. Formosensis, R. Japonicus, R. dellemar, R. Niveus, R. ton kenieniis, R. microsporus, R. arhizus, R. tritici.

وهناك الكثير من الدراسات والبحوث التي تشير إلى أحياء أخرى منتجة لهذا الحامض ومنها Asp fumaricus حيث أعطت منتوج 70% حامض فورميك من المصدر السكري.

التربية الصناعية:

إن التربية السطحية أو العميقة لانتاج حامض الفورميك بأعلى انتاج تتم باستعمال أحياء الـ R. Japonicus وباستخدام وسط غذائي متميز بمركباته، ومن المصادر الكربوهيدراتية المستعملة هي (الكلوكوز، الفركتوز، مانوز، كلاكتوز، مالتوز، سكروز، سليلوز، وتعتبر التمور مصدراً كاربوهيدراتياً جيداً لاحتوائها على السكريات المطلوبة لانتاج الحامض).

ومن العوامل الضرورية الأخرى والتي تؤثر على إنتاج الحامض هي نسبة الكاربون/النتروجين (C/N) في الوسط حيث وجد ان أحياء الـ R. nigricons تحتاج C/N بنسبة 1 : 5، أما أحياء الـ R. arrhizus فتحتاج C/N بنسبة 1 : 100.

وكذلك نسبة الـ (N) في الوسط تلعب دوراً كبيراً في انتاج 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. arrhizus، R. oryzal، R. nigricans) 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 لانتاج حامض الفورميك

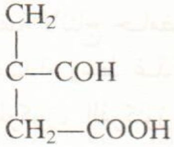
كلوكوز	150-50 غم
$(NH_4)\ SO_4$	2.5-1.2 غم
$MgSO_4.7H_2O$	0.5-0.25 غم
K_2HPO_4	0.5 غم
KH_2OP_4	0.3 غم
$CaCO_3$	60-25 غم

أما ظروف التربية للسلالة (R. delmar) من درجة حرارة وفترة حضن فهي (28-30° م) ولمدة 15-18 يوماً حيث تم الحصول على أعلى انتاج هو 58.8 غم حامض/ 100 غم كلوكوز. أما عند التربية العميقة للسلالة (R. nigricans) فكان أعلى انتاج هو 81.5 غم حامض /100 غم سكر.

إنتاج حامض الأيتاكونيك Itaconic Acid production

تم إنتاج هذا الحامض باستخدام السلالة *Asp. Itaconicus*.

وله التركيب البنائي التالي:



(حامض الايتاكونيك)

إن لحامض الايتاكونيك استخدامات عديدة منها استخدامه كراتنجات مغلفة، 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. Itaconieus*، فهناك إمكانيات أخرى لانتاج هذا الحامض من قبل السلالة *Asp. terreus* وبانتاج يتراوح ما بين 58 غم - 65غم /100 غم سكر، وباستخدام وسط غذائي يحتوي على 6% سكر وعند درجة حموضة 8%.

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 (الانتاج) بعدة عوامل: منها التهوية، التحريك، طرق التعقيم، طرق تحضير اللقاح، مكونات الوسط الغذائي المستخدم، وجود أيونات بعض الفلزات، الـ pH، درجة الحرارة... الخ. لذا فمن الأمور المهمة في إنتاج حامض الأيتاكونيك من هذه الأوساط هو - تأمين pH مثالي للوسط يتراوح ما بين (1.9-2.2). فإذا كان الـ pH أقل من 1.9 فإنه سيعمل على تثبيط نمو المايسليوم للأحياء، أما إذا كان الـ pH أعلى من 2.2 فإن النمو يتكيف نحو النمو الأعظم والأقصى ولكن على حساب انتاج الحامض.

- تأمين درجة حرارة مثلى للإنتاج وهي 30° م.

- الانتاج يتأثر بوجود أيونات بعض الفلزات، فإن وجود أيونات (النحاس، الزنك،

المغنسيوم، الكالسيوم) يزيد من إنتاج الحامض فكلما زادت نسبة تلك الأيونات يزداد إنتاج الحامض المحضر.

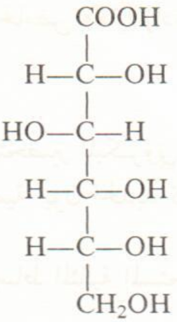
أما بالنسبة لأيون الحديد فإن التحضير الميكروبي لحامض الايتاكونيك له حساسية معينة نحو أيون الحديد، فكلما زادت كمية أيون الحديد كلما قلّ إنتاج الحامض:

والجدول التالي يبين مكونات الأوساط المثالية المستخدمة في انتاج الحامض

مكونات الوسط الغذائي لتحضير اللقاح		مكونات الوسط الغذائي للمرحلة الثانية لتحضير اللقاح		مكونات الوسط الانتاجي	
مستخلص الشعير 1 كغم		كلوكوز	275 غم	كلوكوز	165 غم
800 غم وسط سائل	يحتوي:	تراترات الصوديوم	5 غم	سلفات المغنيسيوم	4.4 غم
لاكتوز	10 غم	سلفات المغنيسيوم	0.024 غم	ترترات الأمونيوم	2.5 غم
كلوكوز	5 غم	كلوريد البوتاسيوم	0.005 غم	كلوريد الصوديوم	0.4 غم
KH_2PO_4	0.06 غم	حامض الفوسفوريك	0.003 غم	$ZnSO_4$	0.0044 غم
سلفات المغنيسيوم	0.05 غم	مستخلص الذرة	0.5 غم	مستخلص الذرة	4 مل
Kcl	0.01 غم			ماء	1 لتر
KaCl	5 غم				
ترترات البوتاسيوم	3 غم				
$CuSO_4.5H_2O$	0.004 غم				
مستخلص الذرة	5 مل				
ترترات الحديد	0.005 غم				
سلفات المنغنيز	0.005 غم				
أكر أكر	0.10 غم				

إنتاج حامض الكلوكونيك Cluconic Acid production

حامض الكلوكونيك هو المنتوج السريع لتأكسد الكلوكوز وله استعمالات واسعة في مجالي الطب والصناعات الغذائية. وله التركيب البنائي التالي: -



(Cluconic acid)

الأحياء المجهرية المصنعة للحامض

حـامض الكلوكونيـك يمكن أن يؤلف من عدد كبـير من الأحيـاء المجهـريـة كبكـتريـا الـ Pseudomonas والـ Acetobacter وعـفـن الـ *Aspergillus Sp.* وعـفـن الـ *penicillium Sp.*

التربية الصناعية :

إن إنتـاج حـامض الكلوكـونيـك يتم بـطريقـة الـتربيـة الصنـاعيـة العميقـة لعفن الـ Asp-niger وباستعمال الأوساط الغذائية الموضحة في الجدول التالي : ـ

المحتويات المختلفة في الوسط الغذائي غم/لتر

شمقومات الوسط الغذائي	وسط أكيري للتربة	وسط لتكوين السبورات	وسط للحصول على لقاح مايسلي	الوسط الانتاجي
كلوكوز	30	50	100	150-350
$MgSO_4.7H_2O$	0.10	0.12	0.25	0.156
KH_2PO_4	0.12	0.144	0.30	0.188
$(NH_4)HPO_4$	—	0.56	0.80	0.388
NH_4NO_3	0.225	—	—	—
Peptone	0.25	0.20	0.20	—
بطاطا	200.00	—	—	—
Agar	20	1.5	—	—
$CaCO_3$	4.0	—	37.5	26.0
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 (30° م) و pH 6.5 وفترة حضن لمدة 7 أيام، ثم ينقل اللقاح السبوري إلى المخمرات المحتوية على الأوساط الغذائية اللازمة وعند ظروف مثلى من درجة حرارة (30° م) وتهوية تحريك مع ضبط الـ pH.

ويمكن الاستدلال على نهاية العملية التخمرية بانخفاض تركيز الكلوكوز في الوسط الغذائي إلى 1% وبزيادة تركيز الحامض المنتج إلى 95%.

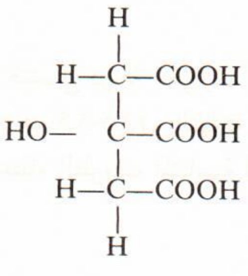
استعمالات الحامض:

1 ـ استعماله في تحضير الـ Resins.
2 ـ يستعمل في الصناعات العقاقيرية كمصدر علاجي للكالسيوم وخصوصاً لدى الحوامل والأطفال.
3 ـ 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 ولقلة سميته ولسرعة هضمه.

وله التركيب البنائي التالي:



Citric acid

(حامض الليمون)

الأحياء المصنعة للحامض:

هنالك الكثير من الأحياء المجهرية وأهمها عفن الـ *Asp. niger* وكذلك يمكن إنتاجه من قبل الـ *Asp. Carbonarius*، *Asp. glacucus*، *Asp Cinnamonens*. *Asp. awamori*، *Asp. fumaricus*، *Asp. auveus*، *mucor pyritormis*، *citromyces citrous*،

citromyces ptefferianus، *Citromyces glauber*، *pen. arenarium*، *pen. alivaceum*، *pen glaucum*.

التربية الصناعية:

يتم إنتاج حامض الليمون بالتربية السطحية أو المغمورة للأحياء (عفن) الـ *Asp. niger* لما تتميز به هذه السلالة من انتاجها العالي للحامض. لذا فهناك عوامل ثلاثة ومهمة تؤثر على إنتاج الحامض وهي:

1 ـ نوع السلالة المصنعة للحامض.

2 ـ مقومات الوسط الغذائي والذي يرى عليه العفن والذي تجرى من خلاله عملية التخمير. فالوسط الغذائي يجب أن يحتوي على المواد اللازمة لبناء جسم الكائن المجهري الحي وعلى المواد اللازمة لتأليف الحامض.

3 ـ ظروف التربية والتي لها دور كبير في إنتاج الحامض.

فبالنسبة لمقومات الوسط الغذائي فهي:

أ ـ المصدر الكربوني من (السكروز، الفركتوز، الكلوكوز. عصير التمر.. الخ).

ب ـ المصدر النتروجيني مثل ($NHNO_3$، KNO_3، NHCl، الكارامايد)، ولكن أفضل مصدر نيتروجيني هو الـ ($NHNO_3$، KNO_3).

جـ ـ الأملاح الاعتيادية مثل $FeSO_4$ بنسبة 0.15-0.75%، $ZnSO_4$ بنسبة 10%، $CuSO_4$ بنسبة 01..%.

أما ما يخص ظروف التربية فتشمل درجة الحرارة، الـ pH (فدرجة الحرارة المثلى لنمو المايسيليوم فهي 34-35° م والـ pH هو 2.5-3.5)، التهوية. فالتهوية بالأوكسجين النقي مهم جداً في انتاج حامض الليمون لاعطاء الظروف المناسبة للانتاج أحسن من التهوية بالهواء الاعتيادي.

المراحل التي يمر بها انتاج حامض الليمون عن طريق الأحياء المجهرية:

أ ـ تحضير المادة اللقاحية لانتاج حامض الليمون.

ب ـ عملية التخمير.

جـ ـ التنقية الكيمياوية.

أ ـ تحضير المادة اللقاحية :

تعتبر هذه المرحلة من المراحل المهمة في انتاج الحامض وهي عملية مستمرة لتحضير المزرعة النقية والتي تكون اسبوراتها سريعة النمو ومايسيلها ذا قابلية حيوية عالية لانتاج الحامض وتحت ظروف معقمة.

ولأجل استمرارية الثبات المورفولوجي والفسيولوجي والحيوي للمزرعة النقية تزرع في أنابيب اختبار ذات وسط غذائي مكون من malt ager وملح الطعام والكاربامید].

وبعد ذلك يتم نقل أسبورات هذه المزرعة النقية إلى المغمر وبحساب 70.000 سبور لكل/مل وسط غذائي والذي يمثل حوالى 1.5 غم سبورات جافة لكل /1 م^3 من محلول الوسط الغذائي في المخمر.

ب ـ عملية التخمير :

تبدأ هذه العملية بنقل اسبورات المزرعة النقية إلى المخمر المعقم والمحتوي على الوسط الغذائي المعقم أيضاً.

وهناك طوران لهذه العملية: الطور الأول هو طور النمو حيث يستعمل السكر بصورة رئيسية لتكوين المايسيليوم وفيه يكون انتاج الحامض قليلاً، 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 التخمير عند درجة حرارة 25° م ولمدة 9 أيام وعند درجة حموضة تتراوح بين 2.2-4.5) لكي نحصل على إنتاج جيد لحامض الليمون.

جـ ـ التنقية الكيمياوية :

إن الغرض من هذه المرحلة هو الحصول على بلورات حامض الليمون. وتكون كمية الحامض في سائل التخمير بحدود:

70-90% حامض الليمون

9 -25% حامض الأوكزاليك

5 -9 % حامض الكلوكوزيك وأحماض أخرى.

وتتضمن التنقية الكيمياوية لحامض الليمون ما يلي:

1 ـ عملية المعادلة للحامض:

وتتم المعادلة (للحامض) بواسطة كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$، $Ca(OH)_2$ (هيدروكسيد الكالسيوم) فيتحول حامض الليمون الحر إلى ملح كالسيومي (ملح سترات الكالسيوم) غير ذائب لأملاح مترسبة:

$$2\,C_6H_8O_7 + 3Ca(OH)_2 = Ca_3[C_6H_5O_7)_2 + 6H_2O.$$

2 ـ الترشيح وغسل سترات الكالسيوم:

ترشح المادة المتفاعلة وهي حارة بعد الانتهاء من عملية ترسيب سترات الكالسيوم من خلال مرشح Filter مع التفريغ ويغسل الراسب على الفلتر بالماء الحار وبدرجة حرارة لا تقل عن 90° م.

3 ـ معاملة سترات الكالسيوم مع حامض الكبريتيك H_2SO_4 ذي وزن نوعي 84% للحصول على حامض الليمون الحر في المحلول.

$$Ca_3(C_6H_5O_7)_2 + 3H_2SO_4 \longrightarrow 2C_6H_8O_7 + 3CaCO_4$$

حامض الليمون راسب الجبس

4 ـ ترشيح المحلول:

لفصل سائل الليمون الحر عن الراسب بواسطة مرشح ذي تفريغ Vaccum filter.

5 ـ عملية التكثيف:

ان عملية التكثيف لسائل الليمون الحر تتم بمرحلتي تبخير بينهما عملية ترشيح. ففي المرحلة الأولى يتم التبخر في مكثف تفريغي عند درجة حرارة (60-70° م) وبتفريغ قدره 600 mm، ومن هذه المرحلة نحصل على حامض ليمون ذو وزن نوعي قدره 1.24-1.26 والذي يقابل تركيز الحامض 700 غم/لتر. ثم ينقل المحلول المكثف الى خزان ويعامل بالفحم بنسبة (0.03-0.05)% محسوباً على كمية حامض الليمون.

بعد ذلك يتم الترشيح باضافة الـ filter aid (برلايت) بنسبة 1-4%.

أما المرحلة الثانية من التبخير فهي كالأولى إلى أن نحصل على حامض ذي وزن نوعي 1.39.

6 ـ عملية البلورة لحامض الليمون.

7 عملية الطرد المركزي للبلورات.

8 التجفيف للبلورات (باستعمال هواء درجة حرارته 30-35° م).

9 التعبئة.

انتاج الستريك ($C_6H_8O_7$) في التمور:

في هذا النوع من الانتاج يعتمد على نوع من الأحياء المجهرية التي هي Asp. niger الذي يعمل على تخمير السكريات وتحويلها إلى حامض الستريك. ان هذه العملية دقيقة جداً اذ تحتاج إلى نوع من الدراسة الكلية لأجل الحصول على الحامض نقياً غير ملوث بالأوكزاليك، وذلك في عامل reacter خاص ذي تهوية وضغط وحرارة و (pH). إن الناتج من هذه العملية لكل 100 جزء سكر عصير التمر حصل على 89% حامض ليمون (ريكي) وكذلك من كل 100 جزء سكر عصير التمر حصل على 74% حامض ليمون (العبيدي)، أما الانتاج العالمي فمن كل 100 سكر بلوري حصل على 112 جزء من حامض الليمون.

انتاج حامض الخليك:

منذ عرف الانسان فن انتاج البيره والنبيذ عرف الخل كمادة هامة تضاف لبعض المواد الغذائية. ويعرف الخل بأنه ناتج تخمر Acetification المحاليل الكحولية المستخرجة من السكر أو المواد النشويه. وهناك مواد عديدة لصناعة الخل الا أن الكحول يعتبر اقتصادياً هو الأساس في هذه الصناعة وبالرغم من أن التفاح والعنب وبعض الحبوب والمولاس تعتبر المواد الرئيسية في انتاج الخل الا انه يمكن انتاجه 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 انتاج الخل. وعموماً يجب التأكيد بأنه مهما كانت المواد الأولية المستخدمة في صناعة الخل فإنه لا بد من أن تمر هذه المواد بدور التخمر الكحولي أولاً ثم تحول على أساس صناعي الى حامض الخليك أو الخل.

وللحامض التركيب البنائي التالي:

الاحياء 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 Beijerinch له الصفات التالية : الخلايا بيضويه ellipsoidal الى شكال متطاول، وحيدة، أو مزدوجة أو بسلاسل قصيرة لها أشكال عديدة منها البيضوي والكمثري وعلى شكل جسور. . الخ .

الخلايا الفتية هي سالبة لصبغة كرام لا تكون اندوسبور اذا كانت متحركة فالخلايا لها Palor Flagelation (أسواط قطبية) إن أكثر أجناس هذا النوع هي اختيارية الى هوائية . وكل الأنواع هي Catalase Positive والجنس هذا هو Chemoheterotrophic مؤكسدة لكثير من المواد العضوية الى أحماض عضوية . والأكسدة العامة له هو انتاج حامض الخليك من الكحول وكلوكونيك .

أما تغذيتها فتبدأ من أبسط وسط الى اعقده . الحرارة المثلى تعتمد على النوع ، أما الأجناس فهي موجودة بكثرة في الطبيعة وهي مهمة خاصة في دورة الكربون بالطبيعة وفي انتاج الخل وكذلك في فساد الأغذية . أما أهم الأوساط فهي :

وسط فراتيير	Fratear 1960
مستخلص خميرة	3%
كاربونات كالسيوم	2%
أكراكر	2%
ماء مقطر	100 / مل
وسط وجدي	1966
مستخلص الخميرة	%3
كلوكوز	%1
آكر	%2
ماء مقطر	100 / مل
وسط هانسن	1948
%5	Beer Wort
100 / مل	ماء مقطر
وسط دي سلي	De-Ley
مستخلص الخميرة	%2
كلوكوز	%5
آكر	%2
ماء مقطر	100 / مل

وسط ستيفان وجبس	1968 Staphan & Gibbs
مستخلص الخميرة	%3
آكر	%2
بروموكربسول الأخضر	%2,2
ماء مقطر	100/مل
وسط هـ ـ جـ ـ هنس	H. J. Heinz Co.

المواد	**التركيز غم/لتر**
كلوكوز	0.280
مستخلص الخميرة	0.280
$(NH_4)_2\ HPO_4$	0.120
حامض الستريك	0.060
شرش	0.060
KCl	0.045
خل	10.000
ايثانول	55.000

وبالدراسات أظهرت بأن هناك تحورات لهذا الوسط وهي كما يلي:

المواد	**وسط لتحضير اللقاح غم/لتر**	**وسط البيئي للمخمر غم / لتر**
مستخلص الخميرة	10.0	5.0
$(NH_4)_2\ HPO_4$	0.24	0.24
$MgSO_4$	0.25	0.25
KH_2PO_4	0.25	0.25
حامض الستريك	0.12	0.12
شرش	0.12	0.12
KCl	0.09	0.09
حامض لاكتيك	1.00	1.00
ايثانول	30.00	Variable
مضاد الرغوة		0.50

وسط الخل الأبيض

سكر الذرة	9 باوند
Di ammonium phosphate	4 باوند
سلفات المغنسيوم	1 باوند
سترات البوتاسيوم	1 باوند
بانثونين الكالسيوم	5 غم

ميكانزم تكوين حامض الخليك :

إن أكسدة الكحول الى حامض الخليك هو نتيجة dehydration react والمتضمن نظام سايتوكرومي . استيل الديهايد هو الأساس الوسطي وأول من كتب هذا هو Hoyer والتحول الكحولي الى حامض الخليك يظهر بالتفاعلات التالية :

1 ـ تكوين الاستيل الديهايد

OH   O
$CH3-C-H$ alcohol $CH3-C+2H^{+}+2E$
OH   dehydrogenase   H

2 ـ هدرجة الاستيل الديهايد Hydration of actel sldhyt

O   OH
$CH3-C+H_2O$ $CH3-C-OH$
H   H

3 ـ تكوين حامض الخليك :

OH   O
$CH3-C-OH$ aldehyde $CH3-C+2H^{+}+2E$
H   dehydrogenase   OH

4 ـ الانتقال الالكتروني :

$4H^{+}+4E+O_2$ نظام ساتيو كروي $2H_2O$

ويجب أن تكون هذه التفاعلات مشدودة شداً محكماً .

وأن للخل الطبيعي هو الناتج من التخمر الكحولي والخلي للخامات الطبيعية دون أن يتخلل عمليات الصناعة عملية التقطير ويتم بتحول المواد السكرية الى مواد كحولية عن طريق التخمر الطبيعي بمساعدة خمائر معينة ومن ثم تحويل تلك المادة الكحولية الى حامض الخليك ضمن المحلول نفسه بواسطة بكتريا خاصة وبمساعدة أوكسجين الجو، أي أن المواد السكرية في 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 الى خل لفترة تتراوح ما بين 1-2 شهر وفق الطرق التكنولوجية الحديثة.

صناعة الخل : Acetification

يتم صناعة الخل بطريقتين:

أ ـ الطريقة البطيئة Slow process

ب ـ الطريقة السريعة generator process

أولاً: الطريقة البطيئة slow Process

هي طريقة قديمة لانتاج أفخر أنواع الخل وفيها تستعمل براميل سعة 50-54 جالون ويمكن تلخيص هذه الطريقة فيما يلي:

يملأ 1/4:1/3 البرميل بنوع من الخل الجيد المحتوي على مزرعة نشطة من بكتريا حامض الخليك ثم يضاف المحلول الكحولي vinegar stock الى أن يبلغ 1/2:2/3 حجم البرميل ثم يترك الخليط في البرميل حتى يصل الى أعلى نسبة من حامض الخليك ثم يسحب 2/3:3/4 محتويات البرميل ويضاف بدلاً منها محلول كحولي جديد وهكذا بتكرار العملية. ونظراً لبطء العملية والتي تستغرق من 1 :3 أشهر أو أكثر تبعاً لدرجة الحرارة فإن الخل الناتج يحتوي على كمية كبيرة من الاسترات 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.

ثانياً: الطريقة السريعة Generator Process

تستخدم هذه الطريقة حالياً لانتاج الخل صناعياً وقد صمم جهاز التخمر على أساس زيادة سطح المحلول الكحولي للحصول على أكبر نسبة من الهواء اللازم لبكتريا حامض الخليك

لأكسدة الكحول. وقد بدىء في استخدام هذه الطريقة في أوائل هذا القرن ويمكن تلخيصها فيما يلي:

يستخدم جهاز اسطواني الشكل يبلغ قطره (10) أقدام وطوله (20) قدماً يزود بفتحات تسمح بمرور الهواء وينقسم الجهاز الى ثلاث غرف العليا يوضع بها موزعات المحلول الكحولي وهي على شكل رشاش يتحرك حركة دائرية لتوزيع الكحول توزيعاً منتظماً والحجرة الوسطى يوضح 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 تجري عند الابتداء وغالباً لا تكرر ثم يمرر المحلول الكحولي من الموزعات على النشارة حتى يتم تحويله الى 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 وعموماً تكون درجة الحرارة بين 80 :85 ف.

ويتم فقد كثير من الكحول والخل في هذه الطريقة بالتبخير أو بتمام أكسدتها الى ثاني أوكسيد 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 قدماً ما بين 80 :100 جالون خل في اليوم. ويسحب الخل الى خزانات التخزين حيث يترك لمدة أسابيع أو أشهر وفي بعض الأوقات لفترة وجيزة أحياناً يترك للتعتيق أو النضج لفترة طويلة قبل اعداده للتعبئة.

تعتيق الخل: ـ Aging

هي عملية الغرض منها تحسين الخل وإكسابه مظهراً شفافاً خصوصاً الخل المصنوع من عصير العنب أو التفاح وفي هذه العملية يتكون استرات تكسب الخل رائحة وطعم خاصتين وتتم عادة أثناء التخزين وقد يضاف الكرامل الى الخل لاكسابه لون داكن. وتحدث عملية الـ esterification كما هو موضح بالمعادلة التالية:

CH3COOH+CH3CH2OH.............. CH3COOCH2CH3+H2O

حامض الخليك　　اثيل الكحول　　Ethyl acetate

ويجب أن يوضع الخل في براميل خشبية مملوءة أو خزانات للتعتيق فإذا لم يحفظ في أوعية بعيداً عن الهواء فإن بعض الخل يؤكسد بواسطة بكتريا الخل Aceto bacter aceti الموجودة في أجهزة التخمر وكذلك بواسطة Acetobacter xylinum الى ثاني اوكسيد كربون وماء.

بواسطة بكتريا الخل Aceto bacter aceti الموجودة في أجهزة التخمر وكذلك بواسطة Acetobacter xylinum الى ثاني اوكسيد كربون وماء

$$CH3COOH + O2 \xrightarrow{\text{acetobacter}} 2CO2 + 2H2O$$

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 الانتاج الجيد التي يستخدم فيها خامات طبيعية كالتفاح والعنب يجب ترويق الخل بامراره أو ترشيحه بعد اضافة مادة الفلتر سليكا أو أي Filter aid أو خلطها جيداً بالخل ثم تترك حتى ترسب مواد الترويق ويسحب السائل الرائق . (المواد المروقة هي البومين والبيض، كازين، جيلاتين . بانثونايت (تخثر المواد) وتترسب في القعر يعمل نظام غروي يتم فصلها بسهولة بواسطة المرشحات .

البسترة والتعقيم : Pasteurization and Sterilization

بعد اجراء عملية الترويق والتصفية غالباً ما يتكون ام 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 باحدى الطرق الآتية :

1 ـ In bulk يسخن الخل الى درجة 140 :150° ف لمدة نصف ساعة ثم يبرد الى 90 :100° ف ويعبأ في براميل أو زجاجات وتقفل .

2 ـ By continuous flash pasteurization يسخن الخل ثم يعبأ في زجاجات على درجة 150 :160° ف ثم تقفل .

3 ـ By bottle Pasteurization حيث يعبأ الخل في زجاجات وتسخن لدرجة 150 :160° ف لمدة كافية حتى يصل منتصف أو وسط الزجاجة الى هذه الدرجة ثم تقفل الزجاجات وتبرد . كما يستعمل المواد الحافظة الكيميائية للتأثير في بكتريا حامض الخليك مثل حامض البنزويك وثاني أوكسيد الكبريت .

13-6-5 كشف الغش في الخل :

يصعب أحياناً كشف الخل الصناعي في الخل أو الغش به 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 غالباً في جميع أصناف الخل التي من أصل بيولوجي أو حيوي. كذلك يوجد حامض الفورميك Formic في الخل الصناعي بكمية عالية بينما يوجد بنسبة صغيرة جداً في الخل الطبيعي كذلك يمكن بإجراء بعض التحليلات الطبيعية والكيميائية مثل specific gravity والرماد والكحول والحموضة الكلية والأحماض الطيارة وغير الطيارة، درجة الاستقطاب Total reducing substances قبل وبعد التحويل والسكريات ومركب الاستيل مثيل كربينول والمواد المختزلة الطيارة وحامض الفوسفوريك الذائب وغير الذائب والأحماض المعدنية و pentosaus-perman-ganate oxidation value حامض 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 وانتاج 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.

الفصل العاشر

تقنية انتاج الكحولات

Production Technology of Alcohol

المقـدمـة :

يعتبر التخمر الكحولي أكبر قطاعات التخمرات الصناعية بالنسبة الهائلة لكمية الانتاج وكذلك كثرة وحدات انتاجه وما يضمه من الاعداد الوفيرة من الأفراد الـذين يعملون في هذا القطاع. وتعتبر صناعة التخمر الكحولي في الـوقت الحاضر هي النمو المطرد لهـذه الصناعة القديمة والتي يرجع السبب الرئيسي لانتشارها لاستعمال الانسـان الكحول الاثيـلي النـاتـج في حفـظ المـواد الغذائية، وعندما تعددت المشروبات الكحـولية وازداد انتـاجها وجـدت معظم الحكـومات الفـرصة لفـرض ضرائب عديـدة على هـذا النوع من الانتـاج الـذي يـدخـل في أغراض عديدة.

وقد ازدادت أهمية الكحول الاثيلي في زمن الحرب العالمية الثانية وتضاعف الانتـاج من أربع أو خمس مرات للمـطلوب عادة، وذلـك لاستعمالـه في انتاج المـطاط الصنـاعي وصنـاعة المساحيق غير المكونة للدخان Smokeless.

المصادر الأولية :

من المصـادر الأولية للتخمـر الكحولي هي الـذرة، الشعير، المـولاس، العنب وكـافـة المصادر الكربوهيدراتية. . . الخ. وتحتاج بعض المواد الأولية الى معاملتها كيمياوياً وفيزيـاوياً قبـل عملية التخمـير للحصول عـلى السكر المقلوب. وقـد تستعمـل سكـريـات الـ Sulfite Liquior المنتج من نباتـات ذوات الفلقة الـواحدة حيث يحتـوي السائـل الكبريتي عـلى سكر الكلوكوز والكالكتوز، وان خمائـر Sacchromyces يمكنها من تخمـير هذه السكـريات لانتـاج الايثانول. وكذلك يمكن الاستفادة من أخشاب النبـاتات الـطرية منهـا والصلبة حيث تختلف فيما بينها باحتوائها على السكريات المختزلة، فالأخشاب الصلبة تحتوي عـلى نسبة سكـر أعلى من الطرية وكذلك يقل احتواؤها على مادة اللكنين.

- المجهرية :

في التخمر الكحولي المشاركة الوحيدة في العملية هي الخمائر وخصوصاً Sacchromyes Cerrisiae وقليلاً S. ellipsoideus. ومن مميزات السلالات المصنعة يجب أن تكون سريعة التكاثر ويقف نموها عند التركيز العالي للسكريات أو الكحولات. ولها القابلية بأن تحول الكربوهيدرات الى كحول مع انتاج مواد جانبية ذات حجم قليل، درجات الحرارة المثالية لها هي 32° م لا تتأثر بصورة شديدة لتغير المحيط.

وبالعمل الوراثي يمكن أن تصل الى خمائر ذات مزايا عالية من حيث انتاج الكحول، وفعلاً تم التوصل إلى سلالات من Sacchromyces التي لها الامكانية من تحويل 77-88% من الكربوهيدرات المحللة من الخشب و65-75% من كربوهيدرات الأخشاب الصلبة. أما الكربوهيدرات الباقية غير المتخمره هي بنتوزات.

ومن الاحياء المحللة للخشب Clostridum butylicum وكذلك a erobacter aerogenes Candida, Monilia, Torulopsis

انتاج الكحول وكفاءة التخمر:

تتكرر هذه المصطلحات في الصناعة بكثرة ويمكن تعريفها بالآتي:

$$\text{نسبة كفاءة التخمر} = \frac{\text{كمية الكحول المنتج فعلاً}}{\text{كمية الكحول الناتج نظرياً من السكر المتخمر}} \times 100$$

$$\%\ \text{fermentation efficiency} = \frac{\text{actual alcohol produced}}{\text{theoretical alcholfrom sugar fermented}} \times 100$$

% Plant efficiency or fermentation efficiency (plant basis) =

$$\frac{\text{actual alcohol produced}}{\text{theoretical alcohol from total carbohydrate used} \times 100}$$

(alcohol yield = gallons of alcohol of given concentration per standard unit of raw material to process).

ومن أهمية تقدير كمية الكحول المنتج صناعياً حيث يتضح نسبة الكحول الناتج بالنسبة لوحدة المادة الخام المستخدمة، كما 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 الخميرة للمولاس في الآتي:

1 - تخفيف محلول المولاس أو عصير التمر — Dilution of the molasses or Date juice

2 - اضافة الخميرة — inoculation with yeast

3 - عملية التخمر — Fermentation

4 - عملية التقطير لانتاج الكحول — Distillation

وتتجه الدراسة الآن في صناعة تخمر المولاس وعصير التمر لانتاج الكحول الى الاهتمام بما يلي:

1 - أنسب الطرق لزيادة نسبة الانتاج

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 تقريباً حتى تتجمع المواد العضوية غير السكرية والسكر المحول invert sugar. وتزداد لزوجة المولاس لدرجة تمنع بلورة السكروز من هذا العصير. وعلى ذلك يعتبر المولاس مزيجاً مركباً من السكروز والاملاح والسكر المحول والاجزاء 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:

83 :85% مواد صلبة	Solids
30 :40% سكروز	Sucrose
12 :18% سكر محول	Invert Sugar
7 :10% رماد	ash
20 :25% مواد عضوية غير سكرية	organic non sugars

وعادة يتم تخمر حوالي 90% من السكريات بالخميرة.

2 ـ High test molasses 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 انزيم الانفرتيز) وذلك لمنع تبلور السكروز وخصوصاً أثناء عملية التخزين. ويتكون هذا النوع من المولاس من:

80 :85% مواد صلبة، 15 :35% سكروز.
40 :60% سكر محلول، 2 :4% رماد.
4 :8% مواد غير سكرية.

وعادة يتم تخمر 95% من هذه السكريات بالخميرة. ومن المعروف أن المواد الكربوهيدراتية المتخمرة بواسطة الخميرة في المولاس هي السكريات ـ السكروز والسكر المحول

المزارع المستخدمة في التخمر الكحولي: Cultures

تتميز مزارع الخميرة المستخدمة في انتاج الكحول بما يلي:

1 ـ القدرة على سرعة التخمر وبكفاءة في التركيز العالي من السكر.
2 ـ احتمال درجة الحرارة العالية وكذلك التركيزات العالية من المواد الصلبة غير السكرية. وتستخدم عادة سلاسل من Sacchararomyces Cervisiae تحفظ في المختبرات التابعة للمصانع على بيئات معقمة من الاجار 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 التالية 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 Active Seed

Yeast لأوعية التخمر الأخيرة، ومن المرجح أن يتم بنجاح التلقيح بالخميرة قبل أن يتم تخمر 2/3 المحلول السكري في هذا الوعاء.

3 ـ عصير التمر راجع الفصل (السابع)

تحضير العصير Mash Preparation:

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 يمتلىء وعاء التخمر إلى ما يقرب من 8/1 :4/1 حجم تضاف الخميرة النشطة بنسبة 4:2% من هذا الحجم حتى يسمح ذلك بزيادة نشاطها عند تمام ملء الوعاء والذي يستغرق مدة ملئه حوالى 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 الهيدرولكلوريك أو اللاكتيك لضبط درجة الـ PH ويختلف رقم ال PH تبعاً لنوع المولاس المستخدم، الا 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 اضافة كمية قليلة من كبريتات الأمونيوم للعصير لزيادة سرعة وكفاءة التخمر. وتختلف هذه الكمية من 1:1/2 رطل لكل 1000 جالون من المولاس المستعمل، ونادراً ما يضاف املاح 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 تضاف 6:3 أرطال من كبريتات الامونيوم لكل 1000 جالون من العصير وكذلك كمية مناسبة من أملاح الفوسفات. ولكي يسهل تخمر المولاس المحول يضاف عصير بارد من تخمر سابق اليه قد يصل الى 50% من حجم العصير المستعمل.

درجة حرارة التخمر Fermentation Temperatures

عادة ما يتم التخمر على درجة بين (80:70)ف وقد تصل الحرارة إلى 92:90 ف. ونظراً لارتفاع درجة الحرارة أثناء التخمر الى ما يقرب من 30 ف، فإنه يستعمل رشاش من الماء البارد على أوعية التخمر أو يبرد العصير داخل Coils في وسط بارد ومن المفضل أن تبقى درجة الحرارة أثناء التخمر إلى أقل من 95 ف.

مدة التخمر Fermentation Time :

يبدأ التخمر بعد ملء التانكات Fermentation ويكون نشطاً بعد 4:2 ساعات، وتختلف المدة اللازمة لانهاء التخمر تبعاً لنوع المولاس المستعمل، ويتراوح الوقت اللازم لانهاء التخمر بين 72:36 ساعة، يكون بعدها العصير محتوياً على 9:6% كحول ويطلق عليه Beer يدفع في تانكات كبيرة للتخزين قبل تقطيره.

التلوث Contamination :

عند استعمال المولاس في التخمر الكحولي لا يعقم المحلول كما سبق القول. وان ضبط رقم الـ PH عند 5:4,8 يعتبر العامل الفعال ضد التلوث. فالعديد من المكروبات التي تسبب التلوث لا تنمو عند هذه الدرجة من الحموضة إذ يكون التخمر شديداً ولا تلبث أن تحول الظروف غير الهوائية، وكذلك الكحول الناتج من التخمر وتمنع هذه المكروبات من النمو والمعروف أن العديد من البتكريا لا تتكاثر في محلول سكري يبلغ 15% وفي بعض المصانع يستعمل Ammonium bifluoride كمادة مطهرة. إلّا أنه لا يجب استعمال المادة المطهرة في المصانع التي توجه ناتج التخمر لاستعماله كعلف حيواني.

أولاً: التخمير الصناعي:

إن الانتاج التخميري الصناعي لتحضير الكحولات مرتبط بدرجة كبيرة بتجهيز الوسط التخمري، والتجهيز يختلف لكل مادة أولية.

أ ـ فعند استعمال المواد الأولية مثل نشا الحبوب يجب اجراء بعض العمليات من طحن الحبوب، تحليلها الى مواد بسيطة باستعمال الأنزيم. ولتوضيح أكثر يجب أن تكون عملية الطحن جيدة جداً حتى يكون عمل انزيم الاميلز أكثر فعالية لتحويل النشا الى سكر، هذه العملية تنتهي اعتيادياً عند 5,5 PH = 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. الى أن ترتفع درجة الحرارة إلى 100 م.

ب ـ تجهيز المادة اللقاحية: ان لتجهيز المادة اللقاحية مرحلتين:
المرحلة الأولى مختبرية اما الثانية فمعملية.

الحالة الأولى: تحضر المزرعة على نطاق المختبر بواسطة زرعها على سطح أكرى مالتي Malt Agar Slant. وبعد عملية الحضن على درجة الحرارة المثالية يلقح دورق ذو وسط غذائي مالتي وبحجم معين ولقاح بنسبة 3-5% ويحضن لمدة يومين، وهكذا إلى أن تصل الى الحجوم

المختبرية المحددة وباستعمال وسط وعلى درجة مالتي Malt Extract وفترة حضن 24 ساعة وعلى درجة حرارة 30 م.

تعتمد الظروف المعملية على الظروف المختبرية، لذا عند تجهيز اللقاح في اليومين الأولين تهيأ 100 كغم من الكتلة الجبوبية مع 240 لتر ماء وكثيراً ما يستعمل مالت الشعير بنسبة 50% أو الشوفان بنسبة 50% أو 30% ذرة و30% مالت شعير. الوسط يجب أن يكون 4,0-3,6 وحموضة الوسط تعدل بـ H_2SO_4 أو باستعمال بكتريا حامض اللاكتيك. Lactobacillus delbruckii. تجرى عملية التعقيم ثم التبريد ومن ثم تبدأ عملية التلقيح بالمزرعة المختبرية المحضرة. وتبدأ عملية التخمر عند حرارة 27-29 م الى أن ينخفض تركيز المادة الكربوهيدراتية الى النصف، فبذلك يمكن تجهيز لقاح لعملية تخمرية أخرى منه حيث تحتوي على 2% ويمكن استعمالها للدور الثاني. وأخيراً استعملت طريقة أخرى لتحضير المزرعة اللقاحية وذلك باستعمال وسط غذائي بالنسب التالية 70% طحين ذرة، 30% مالت شعير مع 20% وسط تخمري قديم. ويمكن أن يضاف مادة الكارباميد بنسبة 0,64% كمصدر نايتروجيني في فرمنتور انتاجي والذي يحضن عند حررة 30 م وتهوية 8 حجم هواء /حجم وسط/ دقيقة، والخبط يكون بواسطة خباط ثوربيني وبعد 16 ساعة من تركيز الخلايا سيصبح حوالى 400-500 مليون خلية/مل

ثانياً: التخمير الانتاجي:

عملية التخمر ليست معقدة. فعند تخمير النشا يستعمل وسط المحتوى على حوالى 13% كربوهيدرات مع PH 4,8-5 والمحضرة بإضافة 20-25% من وسط تخمري سابق مع الأخذ بنظر الاعتبار حجم جهاز التخمري وتحري العملية عند حرارة 30 م والخبط (التحريك) لمدة 40-60 ساعة لأن تحول الدكستران الى مالتوز بطيء. السائل التخمري يحتوي على 6,5-8,5 كحول على فرض التقطير.

عملية انتاج الكحول من مولاس القصب أو عصير التمر:

لعملية انتاج الكحول من مولاس القصب. الوسط التخمري يجهز بـ 14-18% سكر، بسترة، لقاح تخمري نشط يضاف بنسبة 2-4% إذا كان الفرمنتور مملوءاً الى 4/1 أو 8/1، والذي يسمح للخمائر لأن تنمو في خلال ملء الفرمنتور فالـ PH المثالي للوسط التخمري 4,8-5,0 وبدلاً من H_2SO_4 يمكن أن يستعمل HCL أو حامض اللاكتيك وللوسط الغذائي يضاف 0,725/0,364 كغم سلفات الأمونيوم لكل 1 $م^3$ وسط غذائي. وكما هو معروف يمكن أن يضاف 10-20% مزرعة مستعملة = حرارة عملية التخمر في البداية 21-27 م، وبعد ذلك 32-33 م عملية التخمر تبدأ بعد ملء الفرمنتور بـ 24 ساعة وبحالة نشطة وستنتهي العملية

اعتيادياً بعد 48-72 ساعة، سائل التخمر يحتوي على 6-9% كحول. عند استعمال قصب السكر أو عصير التمر الذي هو غني أيضاً بالمصدر الكربوهيدراتي والأشكال من (31-37) توضح شأن المصادر الغذائية على انتاج الكحول من التمور والذي هو غني بالمواد الغذائية، لذلك عملية التخمر ستنتهي بحدود 36 ساعة .

أما عند عملية انتاج الكحول من Salfite Liquior فلا يلقح بالمزرعة اللقاحية النقية إلا بعد أن تنمو الاحياء (الخمائر) على وسط غذائي ومن ثم تنقل الخمائر بعد فصلها الى الوسط السلفاتي وبهذه الطريقة يرتفع انتاج المحول إلى 15%.

انتاج الكحول من التمور:

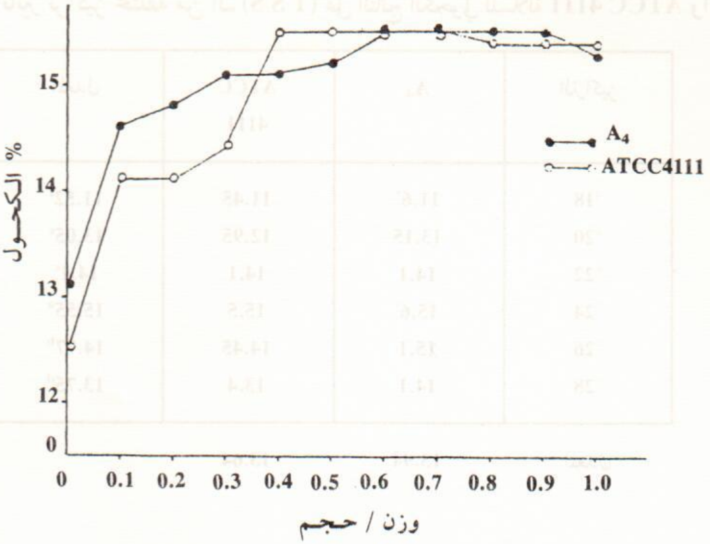
عزلت 72 عزلة خميرة من مصادر طبيعية تراوح ناتجها الكحولي على وسط عصير التمر (24° بركس) 2.4-14.1%.

T_3, S_{18}, G_5, D_2, D_1, A_6, A_4 حيث تميزت بكفاءتها العالية في انتاج الكحول وكانت نسبته 14.1, 13.0, 12.6, 13.9, 13.8, 13,1, 13.1% على التوالي. درست صفاتها المظهرية والمزرعية والبايوكيمياوية وشخصت على أنها تتبع الجنس *Saccharamyces* spp.

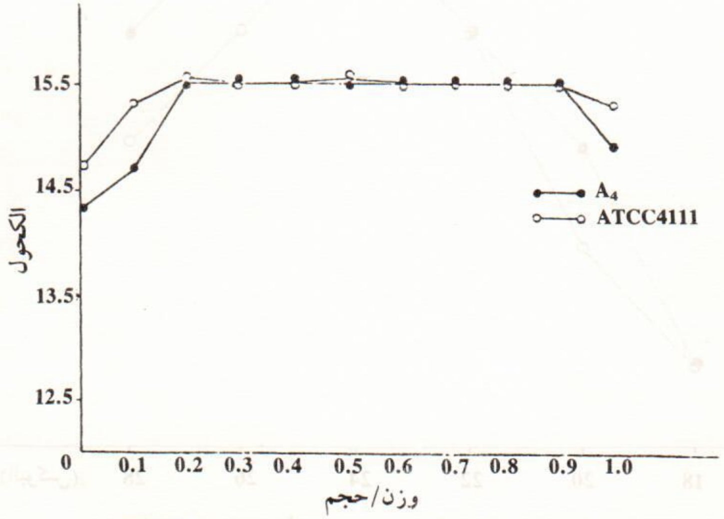
بدراسة الظروف البيئية الملائمة لانتاج الكحول من قبل هذه العزلات والسلالات الأجنبية المستخدمة كمقارنة، وجد أن درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني الأمثل 25° م 4.5. وقد اختيرت العزلة المحلية A_4 وسلالة المقارنة ATCC 4111 لإجراء التجارب اللاحقة، وبإضافة المدعمات الى وسط التخمير لوحظ أن أفضل تركيز مدعمات للعزلة المحلية في انتاج الكحول هو 0.6% و/ح من كبريتات الامونيوم و0.2% من فوسفات البوتاسيوم، أما بالنسبة لسلالة المقارنة فكان 0.4% و0.2% على التوالي من الملحين. وقد وجد أن التركيز 24° 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 انتاج الكحول من عصير التمر بتركيز سكر كلي 22% و/ح بطريقة المزرعة الساكنة، كان الناتج الكحولي 13.5% ح/ح وبمتبقي من السكر 4% و/ح للعزلة المحلية بعد 72 ساعة و12.1% كحول، 5.4% سكر لسلالة المقارنة الأجنبية، أما بطريقة المخمر المختبري كان الناتج الكحولي 15.0% والمتبقي من السكر 0.4% للعزلة المحلية 13.3% و3.6% على التوالي للسلالة الأجنبية بعد 24 ساعة.

وقد أنتجت العزلة A_4 عند استخدام المولاس لانتاج الكحول بطريقة المزرعة الساكنة 9.3% كحول وبمتبقي سكري 7.8%، أما السلالة الأجنبية فكان الناتج الكحولي والمتبقي من السكر 8.2%، 9.6% على التوالي بعد 72 ساعة.



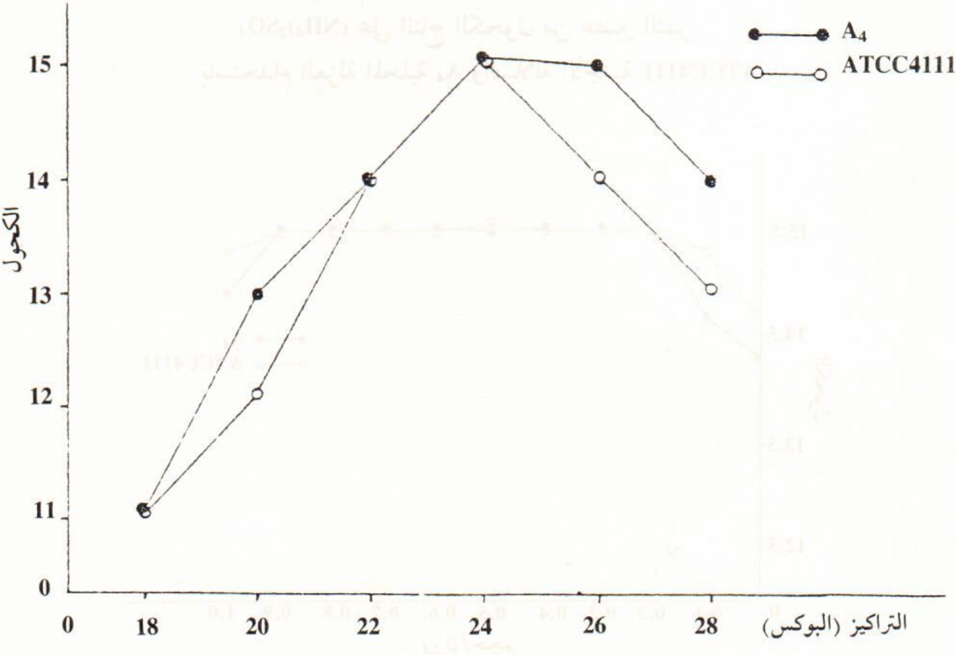
شكل رقم (31) تأثير المصدر النيتروجيني
$(NH_4)_2SO_4$ على انتاج الكحول من عصير التمر
باستخدام العزلة المحلية A_4 والسلالة الأجنبية ATCC4111



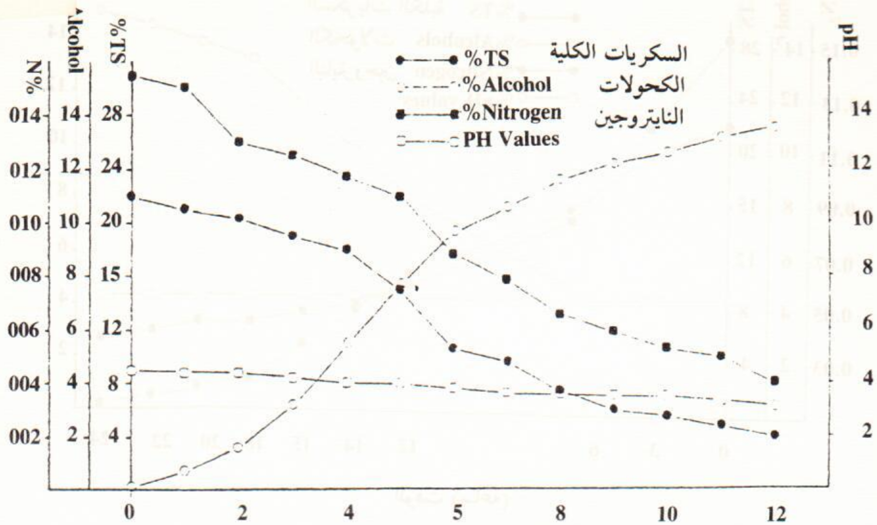
شكل رقم (32) تأثير المصدر الفسفوري KH_2PO_4
على انتاج الكحول من عصير التمر باستخدام
العزلة المحلية A_4 والسلالة الأجنبية ATCC4111

جدول (11) تأثير تراكيز مختلفة من الـ (T S S) على الناتج الكحولي للسلالة ATCC 4111 والعزلة A_4

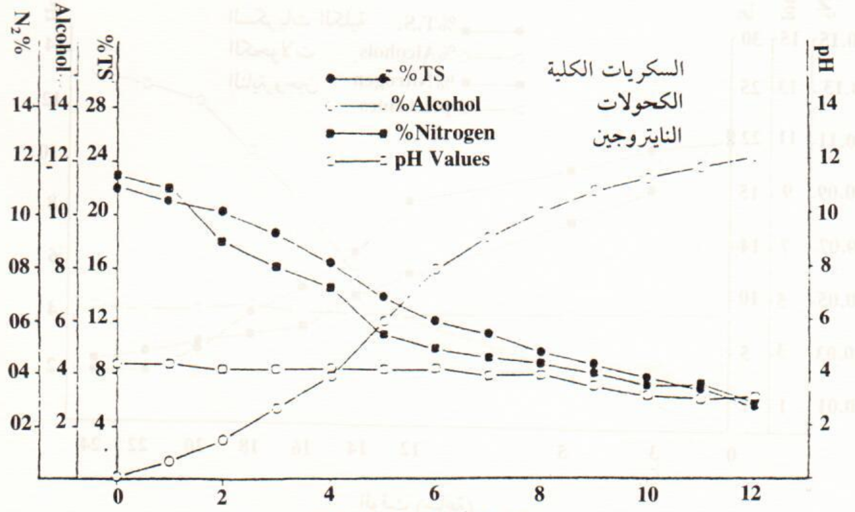
التراكيز	A_4	ATCC 4111	المعدل
°18	11.6*	11.45	11.52[f]
°20	13.15	12.95	13.05[e]
°22	14.1	14.1	14.1[c]
°24	15.6	15.5	15.55[a]
°26	15.1	14.45	14.77[b]
°28	14.1	13.4	13.75[d]
المعدل	13.94	13.64	



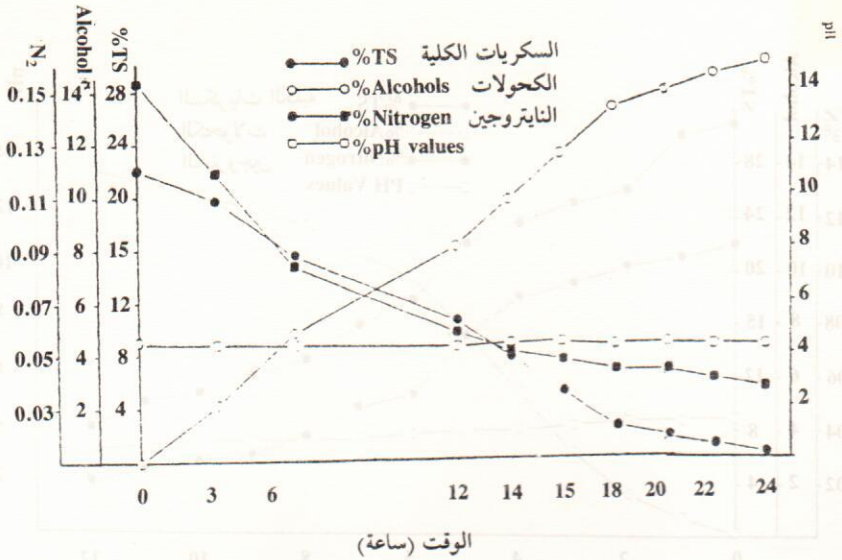
شكل رقم (33) تأثير تراكيز متصاعدة من المواد
الصلبة الذائبة الكلية (البركس) على انتاج الكحول من عصير التمر
باستخدام العزلة المحلية A_4 والسلالة الأجنبية ATCC4111



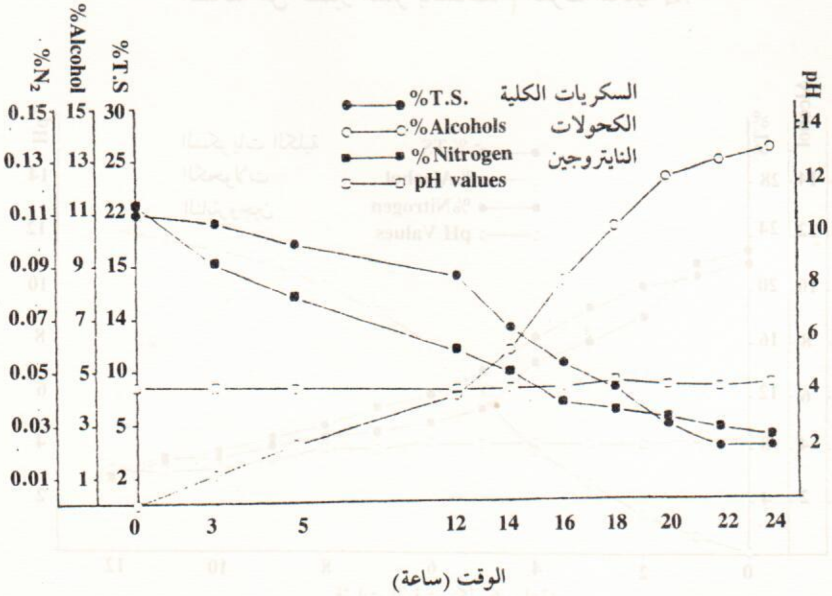
شكل رقم (34) ديناميكية انتاج الكحول بطريقة المزرعة الساكنة من عصير التمر باستخدام العزلة المحلية A_4



شكل رقم (35) ديناميكية انتاج الكحول بطريقة المزرعة الساكنة من عصير التمر باستخدام السلالة الأجنبية ATCC 4111



شكل (36) ديناميكية انتاج الكحول بطريقة المخمر المختبري
من عصير التمر باستخدام العزلة المحلية A_4



شكل (37) ديناميكية انتاج الكحول بطريقة المخمر المختبري
من عصير التمر باستخدام السلالة الأجنبية ATCC4111

الفصل الحادي عشر

تكنولوجيا انتاج الانزيمات عن طريق الاحياء المجهرية

Technology of Enzyme production Using Microorganism

المقدمــة

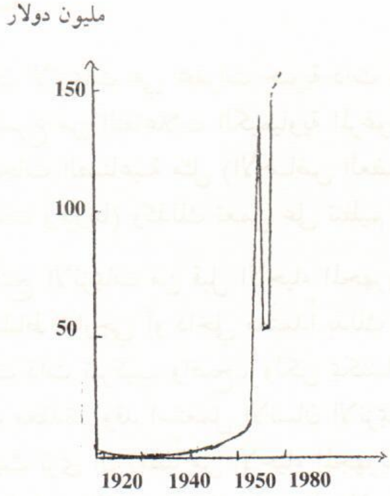
ان الانزيمات هي محفزات حيوية ذات طبيعة بروتينية موجودة في جميع خلايا الانسجة الحية وتسرع من التفاعلات الكيمياوية المرغوبة، وتدخل الانزيمات في تركيب العدد الكبير من المنتجات الصناعية مثل (الأحماض العضوية، الأحماض الأمينية، المضادات الحيوية، الفيتامينات وغيرها) وكذلك تعمل على تنظيم التفاعلات.

تنتج الانزيمات من قبل الاحياء المجهرية، والانزيم المنتج من قبل الاحياء المجهرية يتميز بنشاط خارجي أو داخلي معتمداً بذلك على الظروف البيئية التي تكون خلالها بعض الانزيمات ذات تركيب واضح، ولكن يمكننا القول بأن البعض الآخر من الانزيمات يمتاز بتراكيب معقدة. وقد استعمل الانسان الانزيمات منذ قديم الزمان ولكن بدون معرفة حقيقية بها، حيث نرى أن بعضاً من الاحياء المجهرية لعبت دوراً في تسهيل وتغيير أو تبديل الكثير من التفاعلا ، الكيمياوية مما أدى الى الاستفادة من هذا التغير في انتاج نماذج مختلفة من المنتجات الغذائية مثل الخبز، الجبن، الشراب. . . . . الخ).

وسنذكر بالتتابع بعض المشاكل التي تسرع في صناعة الانزيمات اليوم والقوى والمؤشرات لتطور هذه الصناعة.

لقد صدرت الكثير من البحوث والنشرات في موضوع انتاج الانزيمات عن طريق الاحياء المجهرية، وقليلاً جداً ما نجد في هذه الدراسات المعطيات الاقتصادية للمنتوج وكمؤشر للسوق العالمي في انتاج الانزيمات عن طريق الاحياء المجهرية. وكما هو معروف بدأت أولى الدراسات لانتاج الانزيم Takadiastase في امريكا عام 1894 وكما هو موضح في الشكل رقم (38) حيث يظهر القسم الأول من الشكل أن الانتاج موجود ولكن خدماته قليلة حيث لم تظهر أهميته الاقتصادية في ذلك الوقت حتى سنة 1965، حيث ظهرت الأهمية الاقتصادية للأنزيمات وخصوصاً Detergent Enzyme التي استعملت لأغراض عامة.

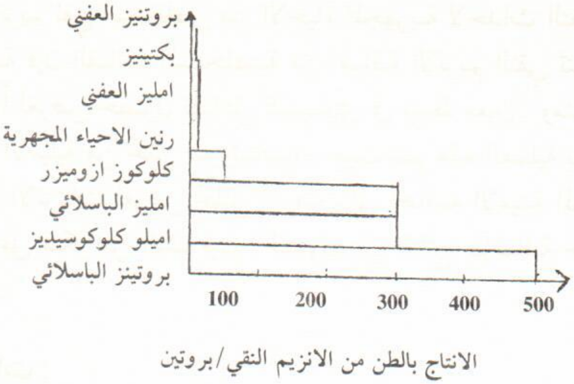
هذا التطور أعطى للمنتجين معطيات اقتصادية ذات مردود عالٍ ولكن في عام 1971 تردت هذه الصناعة وانخفض الانتاج بسبب ظهور الاعراض الجديدة (الحساسية Allergic Symptom التي اكتشفت من قبل بعض العاملين في حقل العناية بالأنزيمات في معامل Detergent Enzyme. هذا الأثر العام أدى الى انخفاض المبيعات، لذا وجب الحذر والاحتراس في هذه الصناعة مما جعل العناية بصناعة الأنزيمات والتحقق عليها باعتناء من الأمور المهمة، الى 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 انتاج انزيم α امليز واميلو



شكل (38) يوضح قيم انتاج الانزيم من الاحياء المجهرية في العالم خلال الأعوام

كلوكوسيديز في بعض الصناعات. وخلال السنوات الأخيرة وجدنا التطور الحقيقي في انتاج الكلوكوز ازوميرز الذي يعمل على انتاج فركتوز من الكلوكوز، وكذلك ظهور التطبيقات الجديدة في عالم انتاج الانزيمات من الاحياء المجهرية فإن انتاج انزيم rennet وظهوره في سوق الانزيمات والذي وصلت مبيعاته في سنة 1971 بحدود 150 مليون دولاراً بالسنة، هذه الأرقام هي قليلة للذين يهتمون بقيم الانتاج الانزيمي وان شكل رقم (39) يعطي الحجم الفيزياوي لانتاج الانزيمات في العالم بالسنة محسوبة بالأطنان نقاوة/انزيم حيوي بروتيني.

وكما يظهر من المنحنى البياني رقم (39) ان انتاج البروتينز الباسلائي هو المتغلب ويتبعه اميلو كلوكوسيديز والفا امليز، وكما يظهر من المنحني بأنه يعكس الانتاج حيث أن انزيم كلوكوز ازوميرز يشكله Immobilized Form أعلى بعدة مرات من الانزيمات الأخرى. وأود



شكل رقم (39) يوضح انتاج العالم من الانزيم

أن اشير إلى أن لا علاقة هناك ما بين كمية ونقاوة الانزيم البروتيني والأسعار. وغالباً ما يتوارد الى الأذهان لماذا بعض الانزيمات هي مهمة.

والجواب عليها سهل جداً حيث أن الاقبال على أي انزيم يعتمد على المام الناس بالأنزيم، معرفة فائدته الاقتصادية، مجالات استعمال الأنزيم، معرفة التقنية لانتاج الانزيم حيث يجب أن تكون متاحة. وعلى سبيل المثال فلو أخذنا انزيم كلوكوز ازوميريز فيجب أن نلمّ بأسعار السكر والنشا مع حساب الفارق بينهما، كذلك توافر التقنيات الحديثة لانتاج الانزيم بحيث يسهل ملاحقة التطور الحاصل في هذه الصناعة.

أنزيمات الاحياء المجهرية:

ان انزيمات الاحياء المجهرية يمكن استعمالها بطريقتين هما:

1 - استعمال الاحياء المجهرية لكي تلعب دور العامل المساعد بما تنتجه من انزيمات لاحداث التغيرات المطلوبة في تلك التفاعلات الكيمياوية المعينة مثل استعمال الخمائر في صناعة النبيذ، ونرى في هذه الحالة أنه بالإضافة الى أحداث التغير في ذلك التفاعل فهناك ميزات أخرى لهذه العملية كأحداث تغير حيوي، تحسين النكهة والطعم للمنتوج، وذلك نظراً لوجود مركبات أخرى في تكوين أجسام تلك الاحياء المجهرية نتيجة لعمليات التمثيل الحيوي المعقد والحاصل نتيجة لنمو هذه الاحياء في تلك الأوساط، ومن هذه المنتجات (تصنيع الخبز، الجبن، النبيذ، البيرة).

2 ـ استعمال انزيم نقي مستخلص من الاحياء المجهرية لاحداث التغيرات المطلوبة، في هذه الحالة فإن الفائدة المستخلصة من اضافة الانزيم النقي تتم بأحداث تغيرات محددة جداً لغرض حصول تفاعل كيمياوي في وسط معين. ومثال على ذلك (انتاج الاحماض الامينية من تحلل البروتينات)، حيث تتم هذه العملية بخلط انزيم معين أو خليط من الانزيمات لغرض تحليل البروتين الى احماضه الامينية المختلفة وكذلك عند الحصول على سكر من النشا فيتم الحصول على الناتج بإضافة خليط من انزيمات α وβ أميلز.

صفات الانزيمات:

تمتاز الانزيمات بصفة رئيسية في استخدامها كمواد أو عوامل مساعدة في كثير من العمليات الصناعية والكيمياوية ويقصد بالعمليات الصناعية هو تصنيع المنتجات الغذائية، ومن الصفات المهمة للأنزيمات التي تدخل في تصنيع المنتجات الغذائية هي:

1 ـ ان تكون غير سامة عند ارتباطها بأي من المواد الغذائية.

2 ـ يجب مراعاة الظروف المثالية مثل الحرارة وPH وذلك لأهمية هذه الظروف في نشاط الانزيم وكما نرى ذلك في حالة بناء السكوريتال حيث يجب توفير درجة الحرارة العالية بتركيز عالٍ للحموضة (PH)، فمثلاً في صناعة البيرة نستخدم الانزيمات المحطمة للبروتين، ونتيجة لنشاط هذه الأنزيمات فإنها ستعطي للبيرة لوناً داكناً عند التبريد.
ومن الدراسات العلمية الأولى لأنزيمات الاحياء المجهرية نلاحظ بأن البداية كانت في سنة 1894 من قبل العالم (تاكامين وآخرون) وذلك بحصوله على أنزيم الاملیز من الطحالب، وتعتبر هذه البداية نقطة الانطلاق لانتشار الدراسات والأبحاث المتعلقة بانتاج الانزيمات من الاحياء المجهرية وعلى نطاق صناعي، وقد انتشرت هذه الدراسات في السنوات الأخيرة وخاصة في فرنسا من قبل (Baiden بويدن وافروتت).

مصادر الانزيمات:

ان الانزيمات هي حصيلة المصادر الطبيعية التالية:

- النباتات: مثل انزيم مالت امليز، دايستيز، بايبين، بروميلين.
- الحيوانات: مثل انزيم البنكرياس، بيسين.
- الكائنات المجهرية: مثل انزيم امليز، امينوبتيديز، بولي كلاكترونيز، كلوكواوكسيدز، فركتوفورابيز، دكسترينيز، كلوكوسيديز.

ومن الملاحظ أن الأنزيمات المستخلصة من النباتات تكون بكمية كبيرة جداً ولكن لهذا الانتاج محاذير معينة، لأننا نحتاج فيه إلى توفير كمية كبيرة من النباتات والتي من الممكن أن لا تعطي المردود المطلوب من الانزيمات قياساً الى التكاليف التي استخدمت في توفير هذه النباتات وهذا يعتبر جانباً سلبياً من الناحية الاقتصادية.

أما امكانية الحصول على الأنزيمات من الاحياء المجهرية فهي غير محدودة، وبالإضافة إلى تميزها عن المصدرين السابقين بأنها متنوعة وغير منتهية حيث يمكن السيطرة عليها وعلى عوامل الانتاج. ونتيجة للدراسات الكثيرة التي تم بواسطتها معرفة العلاقات لتخليق الأنزيمات الميكروبية فإن انتاج الأنزيمات من الاحياء المجهرية أصبح ذا نطاق صناعي قائم وكبير.

المزارع الصناعية لانتاج الأنزيمات:

استطاع Pollock 1963 من تقسيم الأنزيمات الميكروبية الى:

1) Endoenzyme التي ترتبط في بناء محدد ومعين في جسم الأحياء.

2) Exoenzyme التي لا ترتبط مع بناء جسم الاحياء ولكن تنتج من تأثير الاحياء المجهرية في الوسط الغذائي.

ان انزيمات المجموعة الأولى يكون موقعها في بروتوبلازم الاحياء أو في البناء الخلوي لها (Pollock 1963).

ويمكن الحصول على الأنزيم من جسم الكائن المجهري الحي بعد موته وتفسح الخلية، أو خروجه نتيجة وجود عطب في نفاذية غشاء الخلية.

إن عملية الحصول على أنزيمات الاحياء المجهرية بنطاق صناعي تكون مرتبطة مع ميكانيكية فصلها عن جسم الكائن المجهري النامي في الأوساط الزراعية. كذلك يجب الالمام بأسباب وعوامل التطبيق العملي للأنزيمات في مزارعها من حيث تهيئة الظروف الملائمة والمناسبة للانتاج حيث لهذه الظروف أهمية كبيرة، لأن هناك الكثير من الاحياء المجهرية الثنائية الغرض حيث يمكنها تأليف أنواع أخرى من المواد أو الأنزيمات ولكن ليس بوقت واحد، بل ترتبط مع نمو جسم الكائن المجهري وظروف الوسط الغذائي والذي يعتمد على هذا أي أنزيم نريد أن نحصل عليه وبأي درجة من النقاوة، وتعتمد كل عملية ما يكروبيولوجية للحصول على انزيمات 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 سموماً.
3) يجب أن لا تتأثر ببعض العوامل البيولوجية أي بمعنى أن لا تكون حساسة جداً.
4) يجب أن تعتمد وسطاً غذائياً لثبات انتاج الانزيم المطلوب.
5) تثبيت الظروف المثالية بشكل منفرد للكائن المجهري التي لها علاقة بالانتاج ومنها، التهوية - التحريك - PH - الحرارة - الخ . . . .

طرق انتاج الأنزيمات:

ان الانتاج الصناعي للأنزيمات 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 فسيكون 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 انتاجها العالي وسهولة عملها والسيطرة عليها.

أ - التربية المغمورة (B. Subtillus):

انتاج انزيم (amylase)

ان هذه التربية كأي عملية ميكروبيولوجية صناعية تعتمد أولاً على تجهيز اللقاح مختبرياً لـ (B. Subtillus) وباستعمال الطرق المختبرية من أنبوبة اختبار إلى مخمر بحجم (200-1000) لتر وسط غذائي. تنتقل هذه المادة اللقاحية إلى المصنع في خزانات سعة 4 م^3 إلى 100 م^3 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 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 نفقد 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 لانتاج الانزيم.

التربية على الأوساط نصف الصلبة:

إن هذا النوع من التربية لانتاج الانزيم وعلى سبيل المثال انتاج انزيم البروتينز (amylae أو protenase) من (Asp. oryzae) حيث يتم اعداد اللقاح على مستخلص اللحم (مرق اللحم) كمصدر كربوني وبعض الأملاح المعدنية في أواني الومينيه وعلى شكل أفقي وذات محاور دوارة. الحضن يبدأ بجهد كبير لانتاج السبورات بشدة وعلى أوساط غذائية تحتوي على مستخلص لحم الدواجن مخلوطة مع مصادر كربوهيدراتية وأملاح معدنية ومحاليل منظمة (Buffer) مع رطوبة 50%. يجهز هذا الوسط الغذائي ويعقم قبل عملية التلقيح التي تتم في الأواني أو الخزانات. ومن ثم تتم عملية تلقيح الوسط الغذائي بالسبورات النامية (اللقاح) (Asp. oryzae) للحصول على انزيم الامليز والبروتينز وعند درجة حرارة 20 م، فترة النمو لـ (Asp. oryzae) هي 48-24 ساعة وقد تمتد لأنواع أخرى إلى (7-8 أيام)، وبعد هذه العملية تبدأ عملية استخلاص الأنزيم.

عوامل ذات العلاقة بتخليق الأنزيمات:

ان العوامل التي لها علاقة بتخليق الأنزيمات من الاحياء المجهرية يمكن أن تكون موضوعة في مجاميع:

(1) مكونات الوسط الغذائي:

ان الوسط الغذائي يجب أن يؤمن النمو الأمثل للسلالات المنتجة للأنزيمات، ومن المعروف أيضاً بأنه ليس أفضل نمو للمزارع الميكروبيولوجية يعطي دائماً أعلى انتاج للأنزيمات ولكن على العموم أعلى انتاج للأنزيمات يحصل في الأوساط الصناعية والمتضمنة المواد التي تؤمن نمو الأحياء، ومن هذه المواد اللازمة والقادرة على احداث التخليق (الجيني) لعمل الأنزيمات، وهي الأحماض الأمينية: الفيتامينات، العناصر المعدنية، تركيز المادة الكربوهيدراتية، التهوية المناسبة، وتحديد بعض مقومات الوسط. ففي مزارع نظام الدفعة هناك تعقيدات وذلك بسبب التغيرات الكثيرة التي تحصل على الوسط بالاعتماد على العلاقات، فمثلاً تغير مصدر نترات البوتاسيوم بدلاً من سلفات الأمونيوم ففي هذه الحالة استعماله من قبل الاحياء المجهرية سوف يغير من حموضة الوسط وبهذا سيبقى الكتيون (K^+)، أما في الحالة الثانية (سلفات الامونيوم) فسيبقى فقط الانيون (anion) (SO_4)، هذه العلاقة تكون واضحة عند انتاج انزيم الامليز من (Asp. oryzae) فانسكوما 1957) حيث اكتشف بأن انتاج هذا الانزيم في الوسط يقدر بـ (95%) عند استعمال سلفات الامونيوم. أما عند استعمال نترات البوتاسيوم في المحيط فإن الانتاج يقل الى النصف ويكون داخل

الخلايا، (في المايسليوم). أما إذا استعملنا (PH) قاعدي مع نترات البوتاسيوم حيث تعطي الحموضة المثالية للمزرعة فإن 85% من الانزيم يكون في الوسط وليس داخل الخلايا ويمكن الاشارة الى كثير من الأمثلة لعلاقة الوسط الغذائي بتخليق الأنزيمات . وعموماً فإن المواد الخام المستعملة للتغذية والانتاج يجب أن تكون متوفرة وبحجم كبير لأجل ديمومة الانتاج 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 انتاج الأنزيمات وذلك بتنمية الاحياء المجهرية المتخصصة بانتاج الانزيم على عصير التمر، ولا يخفى بأن عصير التمر غني بالمواد الكربوهيدراتية وبعض الأحماض الأمينية الضرورية للاحياء المجهرية حيث أن عصير التمر يحتوي أيضاً على الفيتامينات والعناصر المعدنية اللازمة لنمو هذه الاحياء، لذا فمن المتوقع أن يكون للتمور شأن كبير في هذا المجال.

أ ـ المصادر النايتروجينية (N):

يلعب المصدر النايتروجيني دوراً محدداً عند انتاج الأنزيمات، فعند اضافة المصدر النايتروجيني يشكل مركباً معقداً فإنه يدخل في انتاج الانزيم ولكن لا يساعد في نمو الاحياء، فمثلاً عند تأليف الانزيم من (Clostrindium septicum, Staphylococcus aureus) حيث يعمل على التحفيز أو التنشيط الذاتي (1945 Rogers) ولكن يمكن لمرق الرز من التنشيط لانتاج انزيم (Protase) من (B. Subtillus) (1945 Tsuchihira) وكذلك انزيم (Piptidase من Cl. Hystolytieum (1961 Warren). وهنالك الكثير من المصادر النايتروجينية البسيطة منها والمعقدة والتي هي مصدر جيد لعمليات انتاج الأنزيمات مثل نترات الامونيا، سلفات الامونيا وخصوصاً لعمليات انتاج الأنزيمات السيليلوزية من Trichoderma Viride، وعند عدم توفر هذه المصادر النايتروجينية فإن الانتاج ينخفض (1958 Toyame) ويجب أن لا ننسى أهمية العناصر الأخرى النايتروجينية مثل الببتون Peptone وعناصر بعض الأملاح أيضاً.

ب ـ المصادر الكربوهيدراتية:

ان المصادر الكربوهيدراتية هي المصدر الأساسي للكربون الذي تحتاجه الاحياء المجهرية في عملية التأليف والتخليق الحيوي اضافة إلى كونه مصدراً للطاقة. اضافة الى ذلك فإن المصدر الكربوهيدراتي يمكن أن يلعب دوراً كحاثٍ بعلاقته لتكوين الأنزيمات، النشا بعلاقته لتكوين الامليز، الدكسترين بعلاقته لتكوين الدكستريز، المالتوز بعلاقته لتكوين كلوكوسيديز. . . . . الخ.

إذاً فإن الكائن المجهري يتكيف بالنسبة الى نوعية وكمية مصدر الطاقة. حيث ان الكائن المجهري لا يمكنه من استعمال مصدر الطاقة في الوسط الغذائي في بداية الأمر الى أن يتطبع على هذا المصدر، لذلك فكمية الطاقة لأجل تأليف الانـزيم تأتي اعتيادياً من عمل التركيب الجيني للاحياء المجهرية وكذلك من تمثيل الوسط، والمثال عليها Clostridium flarum أو Cl. Laniganii) حيث لا يمكنها أن تنمو في الوسط المحتوي على 0.5% ببتون و0.5% مستخلص خمائر، 0.5% سلفات الصوديوم وبدون اضافة مصدر كربوني (كلوكوز 2%) لتصنيع الأنزيم (Ianigan 1959).

ووجد أيضاً بأن تكوين انـزيم (Kitinase) من streptomyces يثبط من اضافة الكلوكوز الى وسط التربية والمحتوى griseus على مصدر الكايتين (Jeuniaux 1955). وكذلك وجد بأن انتاج انزيم (B.Fructofuranase) يزداد عشر مرات عند استعمال الرافينوز كمصدر كربوني بدلاً عن السكروز وثبط انتاج هذا الأنـزيم عن 10% كلوكوز Davies) 1956). أن التأثير التثبيطي لانتاج الأنزيمات من قبل المصدر الكربوهيدراتي يعتمد اعتماداً وثيقاً بتركيزاتها في الوسط، وهناك الكثير من الدراسات التي تثبت بأن التراكيز الواطئة من الكلوكوز يمكنها من تنشيط انتاج الانزيم (Del Castillo, Castaneda-Agullo 1958) وكمثال عليها فالكلوكوز يمكن أن يكون منشطاً لتأليف انزيم B-Fructofuranase من S. fragilis وعند تركيز 0.1 ملغم/سم[3] (Davies 1953). وأحسن مثل على ذلك هو المصدر (Sacchromonopalmatat) الذي هو أحسن محث لتأليف انزيم B-Eructofuranase من قبل Penicillium Sp. وخاصة من P.quadritineatum QM 1871 P. brefeldionum QM 1875. ولكن يحتاج إلى وقت بينما نستطيع أن نحصل على نفس الأنـزيم وبنفس النسبة عند استعمال السكروز بتراكيز واطئة (Reese 1962).

وكذلك بالنسبة لأنزيم البروتيز حيث هنالك عد مؤشرات تشير إلى أن التركيز العالي للكربوهيدرات في الوسط يؤدي إلى تثبيط انتاج الأنزيم (1918 Berman Rettger) وكذلك من قبل (1953 Quntelberg) حيث أثبتوا بأن انتاج انزيم بروتيز من قبل (B. Subtilis) في وسط يحتوي على 6-8% كلوكوز. أما (Watanabe وآخرون 1959) فقد أثبت انتاج انزيم البروتيز من قبل (B. natto) عند تركيز كلوكوزي 4%.

ج ـ محتويات المركبات الكربوهيدراتية في الوسط:

يعتمد انتاج المستحضر الانزيمي اعتماداً على محتوى المركب الكربوهيدراتي والذي له تأثير على انتاج الانزيم. فمثلاً الأنـزيم المبلور amylase ـ α والمستحصل من الوسط المحقد الحاوي على 2,73% كربوهيدرات. والأنزيم المنتج من قبل Asp. oryzae والمربى على وسط

محتوى على 0.25% كربوهيدرات والانزيمان يحتويان على مصدر نايتروجيني هو الالنين alanin (Hanafusa 1955).

أما انزيم الانفرتيز من B.Subtilis، فاحسن PH هو (7) مقارنة بـ (PH8). أما عند (PH4) فيكون غير مستقر (Negoro Fukumoto 1954). ويمكن الحصول على المستحضر الانزيمي بشكل متبلور كمركب معقد مع الكربوهيدرات (Negoro, Fukumoto 1957). وعند تربية (Leuconostoc mesenteroides) في وسط (10%) سكروز فالمستحضر الناتج ديكستران سكروز يحتوي (70% الى (80%) ديكستران. أما إذا استعمل وسط يحتوي على 10% مالتوز مع 2% سكروز فصل ديكستران سكروز المحتوى فقط على 7.5% ديكستران (Bailey et. 1957) وكذلك أيضاً بالنسبة الى *(Streptococcus bovis)* المرباة على وسط 4% سكروز، فالديكستران سكروز احتوى على 70% بولي سكرايد و1.79% نايتروجين فقط. أما عند تربيته على وسط كلوكوزي فنحصل على 4% بولي سكرايد و9.06% نايتروجين.

د ـ حيوية الاحياء المجهرية المنتجة للأنزيمات:

ان الاحياء المجهرية المنتجة للأنزيمات هي مختلفة فيما بينها من حيث انتاج الأنزيمات وكذلك من حيث حساسيتها الى بعض المواد في الوسط الغذائي حيث أن الاحياء تثبط عملها بوجود بعض المواد المثبطة أو بعض العوامل التي تثبط عملها. فمثلاً أن انزيم البروتيز ينتج من احياء مختلفة فهو ينتج من (Pencillum eyaneoflavem) (Singh 1960) وكذلك ينتج من B.Subtilis (Fukumoto 1959) وكذلك من Asp. oryzae (Muiro 1958) فهنا يعتمد تثبيط انتاج الأنزيم على مثبطات نمو الاحياء.

هـ ـ العناصر المعدنية **Co, Cu, Zn, Mg, Ca, Mo, Microelements**

وهذه العناصر ضرورية لنمو الاحياء المجهرية ولكن بعضها ضروري لأن يكون انزيماً 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 انه بحدود 60% من (Ca) الضروري لبلورة انزيم (amylase) من (Asp. oryzae)، ويمكن تعويضه بالبروم (Br) بدون أي تغيير في حيويته، ويمكن أيضاً أن يعوض بـ (Mg)، (oikaw 1959) أما إذا كانت المحتويات الكالسيومية (amylase) المنتجة من (Bac. amyloliquefaceoinens) يمكن تعويضها بالعنصر (Sr) فإن حيويته ستزداد اربع مرات /لكل ملغم بروتين (N).

أما أيون الحديد فهو يثبط الكثير من الفعاليات الحيوية، وعلى سبيل المثال أيون الحديد يثبط انزيم (Protase, gelatinase) أما ايون (Fe^{++}) وZn^{++} فمنشطة لانزيم فايبروزين من (Asp. oryzae) وكذلك فإن لايون (Zn) دوراً ضرورياً في تنشيط البروتينز. وهنالك أمثلة كثيرة في هذا المجال.

و ـ عوامل النمو Growth Factor :

1) ان محتويات الوسط الغذائي لها علاقة في تكوين الأنزيمات فمثلاً ان عدم كفاية بعض العناصر الغذائية الأساسية في الوسط الغذائي لا يعطي انتاجاً جيداً من الأنزيم وذلك بسبب استهلاك هاتين المادتين في النمو وليس النمو الأقصى.

2) (PH) ـ درجة التفاعل الهيدروجيني :

يختلف (PH) انتاج الأنزيمات من كائن مجهري لآخر ويعتمد اعتماداً كاملاً على نوعية الأنزيم المنتج، ولأجل استقرارية الأنزيم وخصوصاً الأنزيمات (ExoEnzyme) التي تتحدد كثيراً بالرقم الهيدروجيني (PH) حيث تكون عنده نشطة. وهنالك الكثير من الاحياء المجهرية المنتجة لأنزيمات (ExoEnzyme) يتقارب الرقم الهايدروجيني لنموها مع الرقم الهايدروجيني لنشاط الأنزيم ولكن هناك بعض الحالات التي يكون فيها الاختلاف كبيراً.

3) درجة الحرارة :

إن لدرجة الحرارة دوراً كبيراً في تأليف وتخليق الأنزيمات وكذلك في سرعة الانتاج، لذا فمن الصعب جداً توافق الاثنين معاً. لذا فيمكن أن تثبت درجة حرارة معينة لأجل النمو المثالي، ومن ثم تغيير درجة الحرارة لتأليف الأنزيم. وهنالك حالات كثيرة بحيث تكون درجة الحرارة المثلى للنمو عالية فمثلاً درجة الحرارة المثالية لـ Asp. niger 30 م° بينما لتأليف انزيم بكتين استيريز (Polygalactronase, pectin Estrase) يحتاج إلى درجة مثالية هي 12° م (Gaumamn of Nef 1948).

وهنالك علامة أخرى حيث أن درجة الحرارة اضافة الى أنها تؤثر على النمو لكنها تؤثر أيضاً على خواص الأنزيم المنتج، فمثلاً انزيم α ـ amylase من Bac. coagulans حيث تكون درجة حرارة الأنزيم مرتبطة ومعتمدة على درجة حرارة المزرعة.

4) التهوية :

إن دور التهوية وأهميتها في التأليف البيولوجي للانزيمات مهم وهنالك أراء مختلفة حول

درجة التهوية وتكون مرتبطة مع أنواع الأنزيمات، فمثلاً عن تاليف البروتينز القاعدي (alka- line protase) من (B. sabtilis) تحتاج الى الظروف الخاصة والتهوية الشديدة، بينما الحصول على البروتينز المتعادل من (B. stearothermophiluscs) لا يحتاج الى تهوية شديدة بل بالعكس فإنه بالتهوية سيثبط تأليف الأنزيم (1957 O. Brient Compbell). وهنالك امثلة عديدة حول تأثير التهوية على انتاج الانزيمات. وهنالك بعض الأنواع من الأحياء التي تحتاج الى تهوية، فمثلاً *Asp. foetidus* تؤلف انزيم البكتينيز Pectinase ولكن عند التحريك لا يمكن أن تؤلفه. أما الأنواع Botytis cinerea و Asp. Sp. Rhizopus و Mucor. Sp. و Pecullium تؤلف انزيم Polygalactrona عند المزارع الساكنة (Nyeste 1960).

الاستقلالية بين النمو وتأليف الأنزيمات:

إن تحديد بعض المؤشرات كالوقت، النمو، الانتاج، وخصوصاً انزيمات (Exoenzyme) هي غير مثبتة وهي تتغير بالاعتماد على نوع الانزيم وظروف نمو الاحياء. فمثلاً لتخليق انزيم (Phospholipase) من (CL. Perfringens) تحتاج من 6-17 ساعة ويختفي بعد 60 ساعة من التربية.

وهنالك انزيمات أخرى تحتاج الى وقت أو فترة 100-120 ساعة (Ryer 1949) وان الانتاج الأعظم لانتاج الانزيم يكون مرتبطاً بايقاف النمو اضافة الى توفر المواد الخاصة في الوسط وخصوصاً B. Indcutor والذي هو ضروري لتأليف الانزيم.

إن انخفاض الانتاج يكون سببه تقسيم الأحياء بعد أن تصل الى مرحلة من النمو. وهناك امثلة كثيرة على الانتاج الأعظم والانخفاض الذي يحصل عند B. Subtilis عندما ينتج أعظم انتاج عند (6) ايام وبعدها ينخفض (1945 Reynold) (Stachybotrys atra) ينتج أعظم انتاج سيليلوز عند (12-18 يوم) ويمكن اختصاره الى 7 أيام (1958 Yonatt) (ASp. oryzae) ينتج اعظم (amylase) (2-3 أيام) وبعدها ينخفض.

أما عند (Asp. niger PPL 558) ينتج أعظم كمية (amylase) (2-3 يوم) وبعدها ينخفض الى الصفر وعندها ينتج كلوكوزسيديز (1952-1951 Shu, Black Wood). أما Sporotrictuum puunosoly am 126 ينتج أعظم كمية من انزيم سيليوليز في فترة (3-4 يوم) (1959 Resse Mandels).

ومن هذا يظهر أن انتاج الانزيم كما يطرحه بعض الباحثين يعتمد على نوعية الوسط وتركيبه، وكذلك على الظروف.

الاحياء التي تؤلف انزيم البروتيز Protase

هنالك مجموعة كبيرة من الأحياء المجهرية التي يمكنها تأليف انزيم البروتيز. ومن هذه الانزيمات هي: انزيم كاربوكسي ببتديز (2 .4 .3) وداي ببتديز (3 .4 .3) وبروتينز (4 .4 .3) وهذا النوع من الانزيمات يساعد في تحليل البروتينات والكاربوكسي ببتديز والداي تيدات، وكذلك يساعد في كسر الأواصر الببتيديه.

الاحياء:

1) البكتريا: ان البكتريا المؤلفة لانزيم البروتينز تكون بالأشكال التالية:

أ ـ بكتريا تؤلف انزيم البروتينز ولا يثبط ببعض العوامل. ومن هذه المجموعة (10-11) (B. Subtilis) وكذلك (B. Corevs Fg) وكذلك الأحياء التالية:

Micrococcus treudenreichii PH (5,7)

Proteus vulgaris PH (9,5)

ب ـ بكتريا تؤلف الأنزيم البروتينز ولكن تثبط من قبل بعض العوامل. ويمكن أن تثبط ببعض المعادن الايونية، ومن هذه الأحياء:

Bac. amyloliguelaciens PH (6-8)

Bac. Subtlis

أما البروتينز الذي يكسر الكرياتين والهيموغلوبين وبروتين فول الصويا والجلاتين مثلا تثبط من (EDTA) وتثبط من Zn و Co و Mn و Mg و Cs، ومن هذه الأحياء:

Bac. Cereus (6,8 - Ca)

Bac. Stearothermophilus (6, 9 - 7, 2) Ca, Mn

جـ ـ بكتريا تؤلف انزيم كلوستريدي ببتيديز A (19 .4 .4 .3) ومن هذه الأحياء:

CL. Capitovale (6, 5 - 7) Ca^{++}

وهذا الأنزيم يحلل الكلايكوجين وقد تحتاج بعض الاحياء الى بعض مثل:

Cl. Perfringens

د ـ Creatine Kinase يحلل الكارين ويثبط من EDTA في تركيز 23M وتؤلف من قبل Streptomyces fradial (9-8,5) PH وبوجود Ca^{++} Mg^{++}

هـ ـ وهنالك الكثير من الاحياء البكتيرية كلها تصنع البروتينز، ومنها:

Streptococcus sp.

Staph. sp.

2) الأعفان:

ان هنالك الكثير من الطحالب التي يمكنها تأليف انزيم البروتينيز بالاعتماد على PH المثالي للطحالب ويمكن تقسيمها الى ثلاثة مجاميع:

أ ـ النوع الحامضي:

هذا النوع من البروتينيز تؤلف من

(3,5) Asp. oryzae

Penicillium Janthinellum. (PH3)

ب ـ النوع المتعادل:

هذا النوع من البروتنيزي تؤلف من Asp. oryzae و Asp. ochraceus و PH المثالي 7,6-7,4 وهذا النوع من البروتينيز يحلل كل البروتينات.

جـ ـ النوع القاعدي:

هذا النوع من البروتينيز تؤلف من قبل Asp.sojae (PH) (9,5-8) Pen. eyanlofulam وكذلك من قبل Asp. oryze Mortiorclla remispora

الاحياء التي تؤلف انزيمات أخرى:

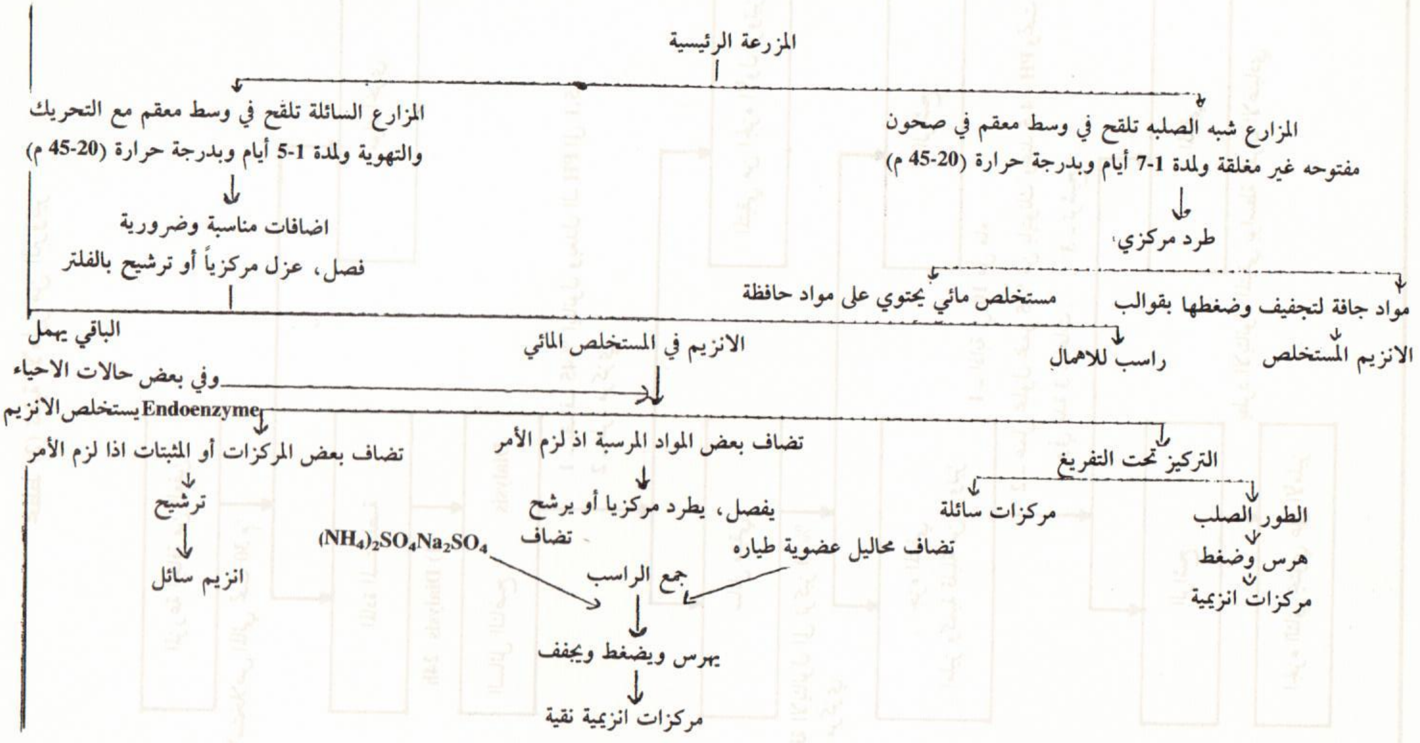
لبعض البكتريا والطحالب يمكنها من تأليف Enzyme Estrase واللايبيز والمثال عليها:

Cl. novyi - Estrase
Cl. oedematiens Estrase
Asp. awamori - Lipase
Rhizopus nigricans - Lipase
Asp. Flavus
Cl. Perfringens - phaspholipase

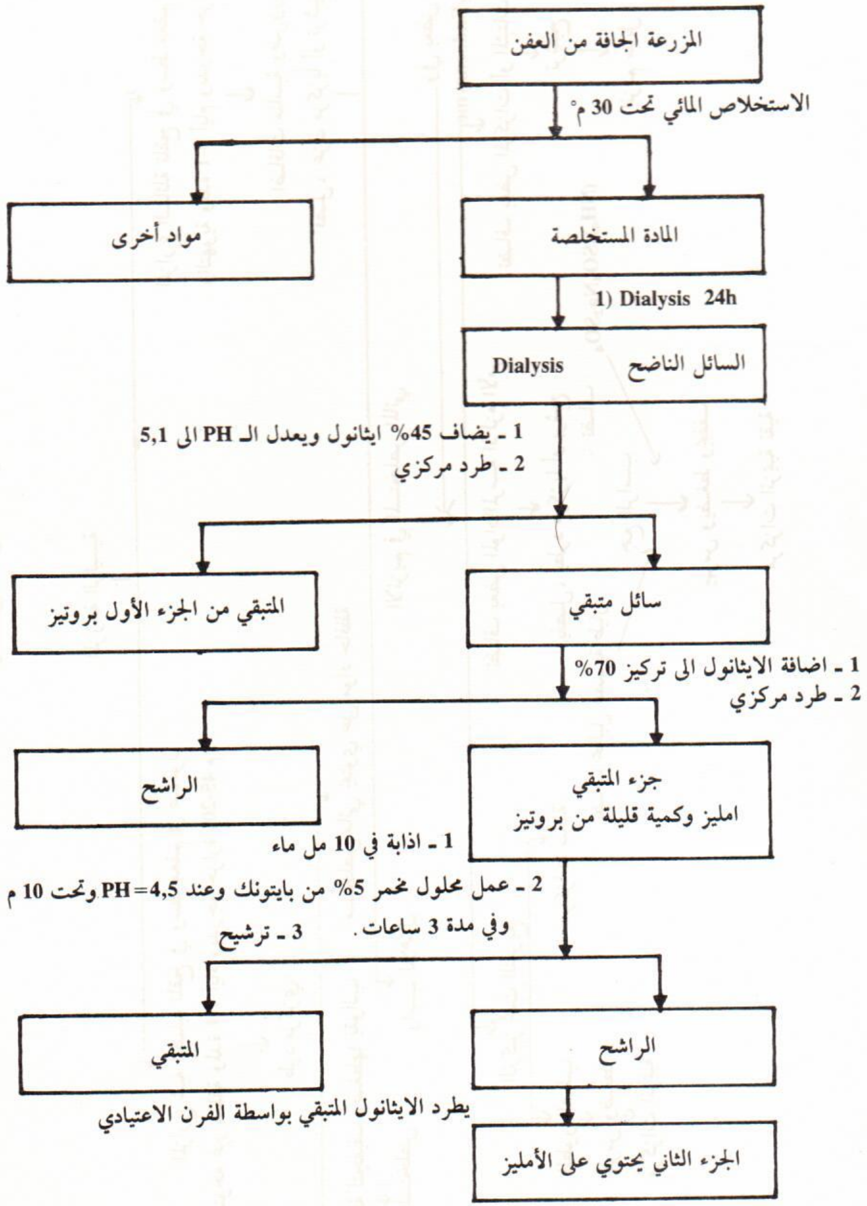
Bacullus. cereus B. subtilis B. megaterium	Pencilinase

وهنالك بعض مخططات لكيفية الحصول على الانزيمات.

مخطط (1) للحصول على الانزيمات من الأحياء المجهرية

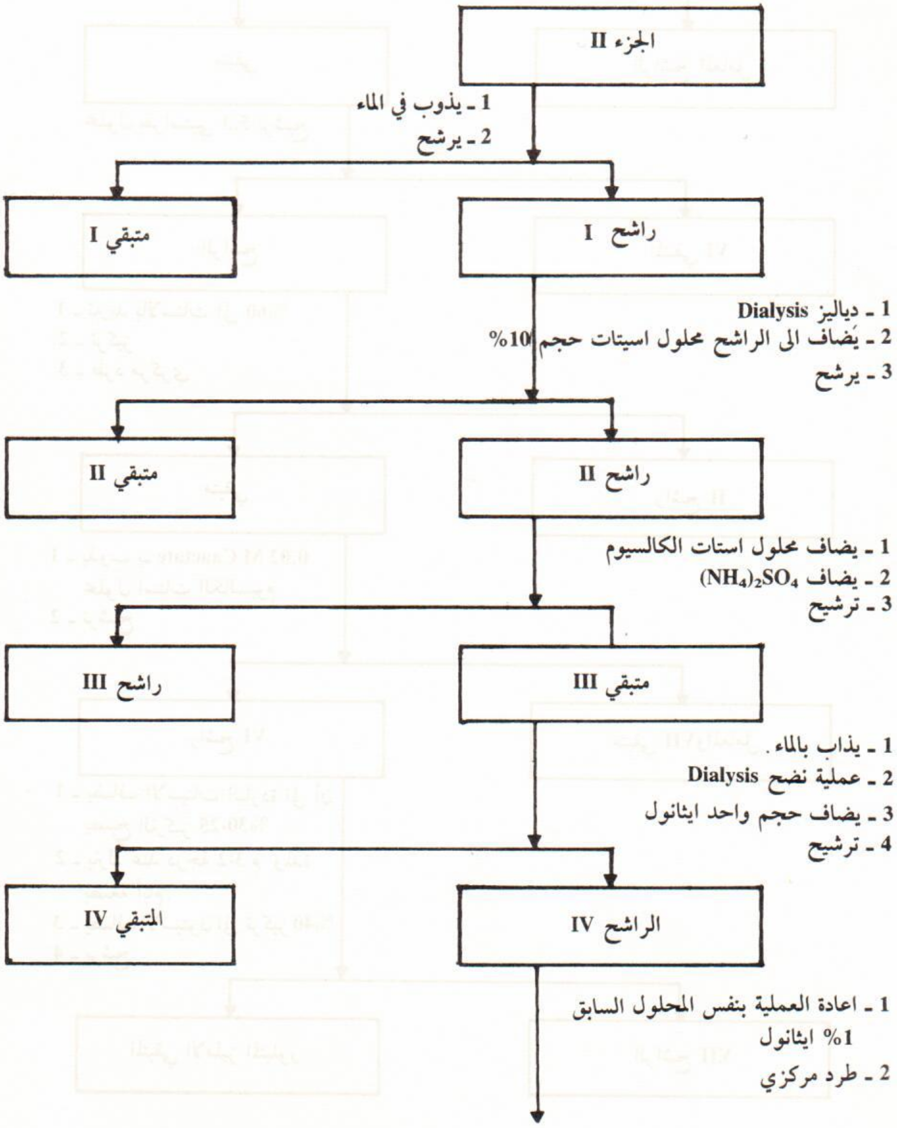


مخطط (2) تنقية الامليز من البروتيز

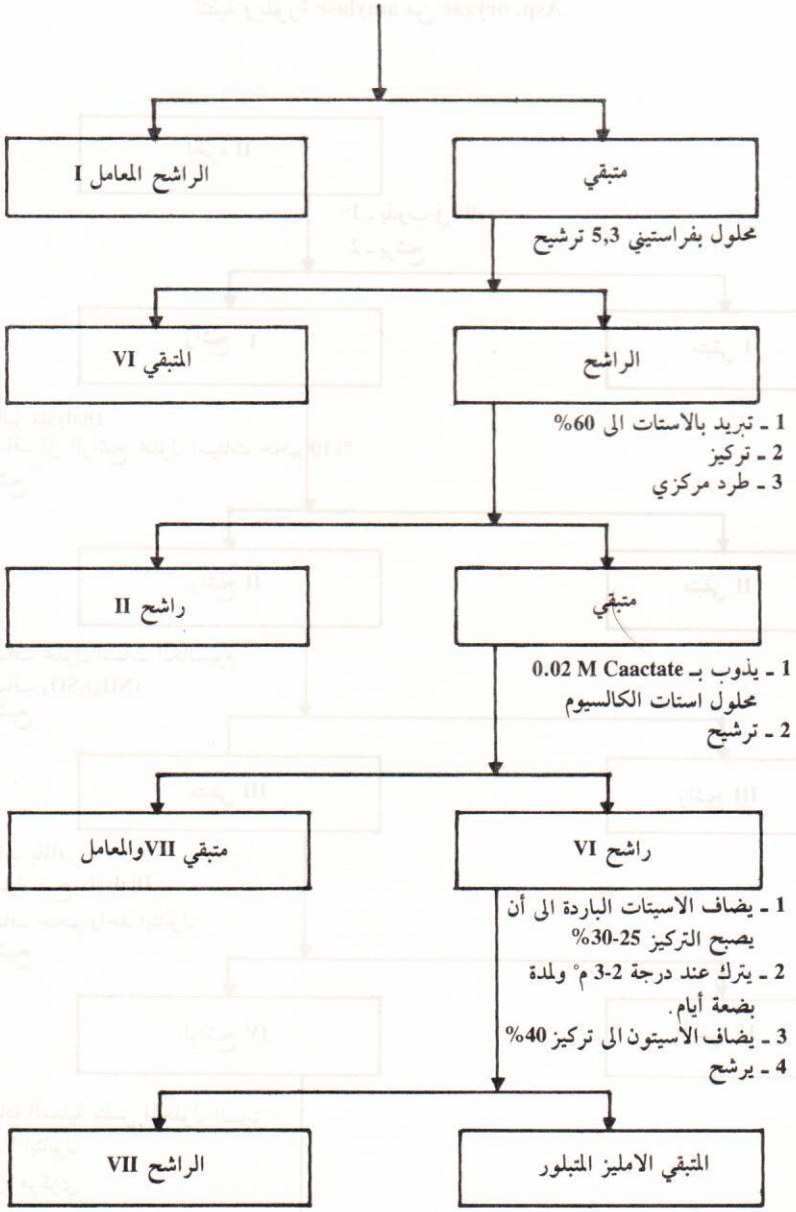


تابع مخطط رقم (2)

تنقية وبلورة amylase من Asp. oryzae

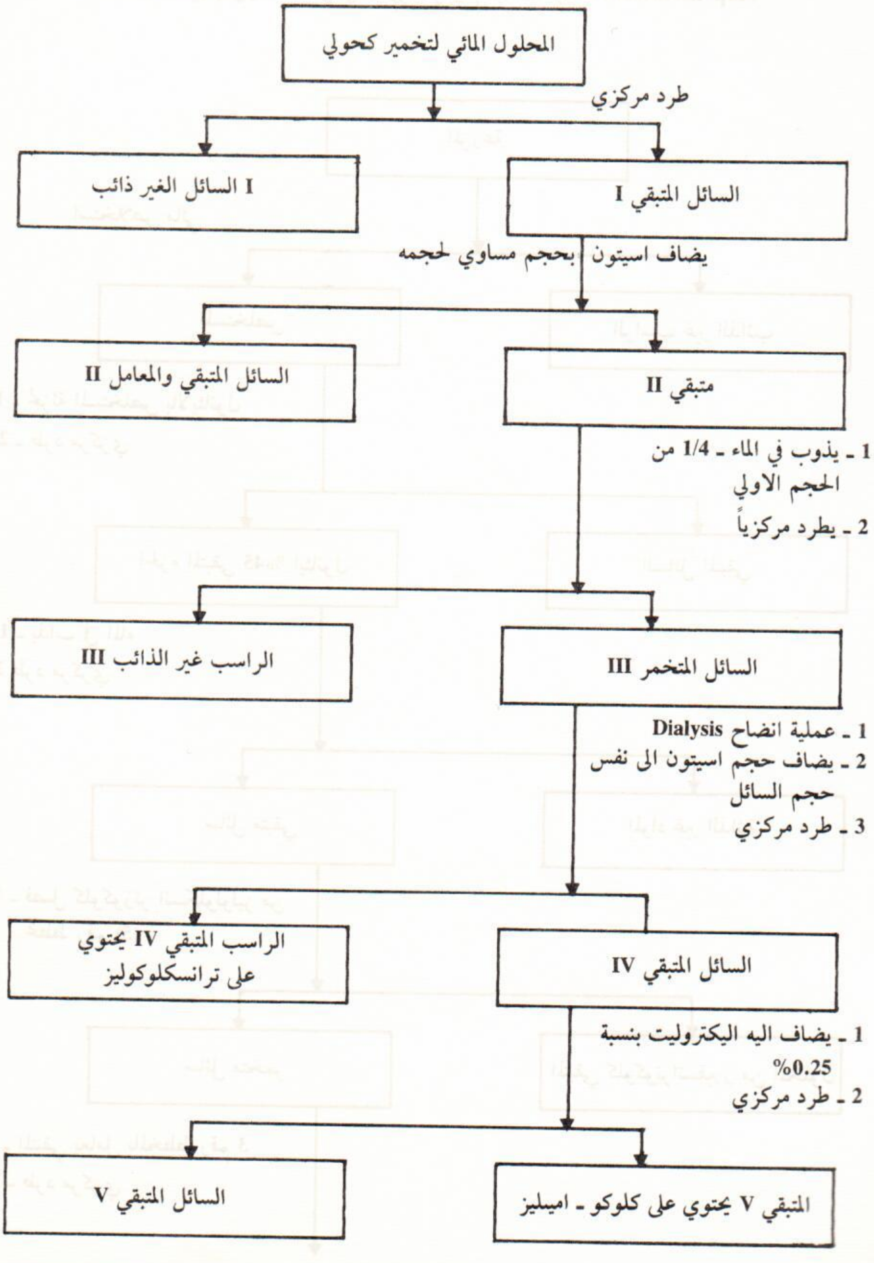


تابع مخطط رقم (2)



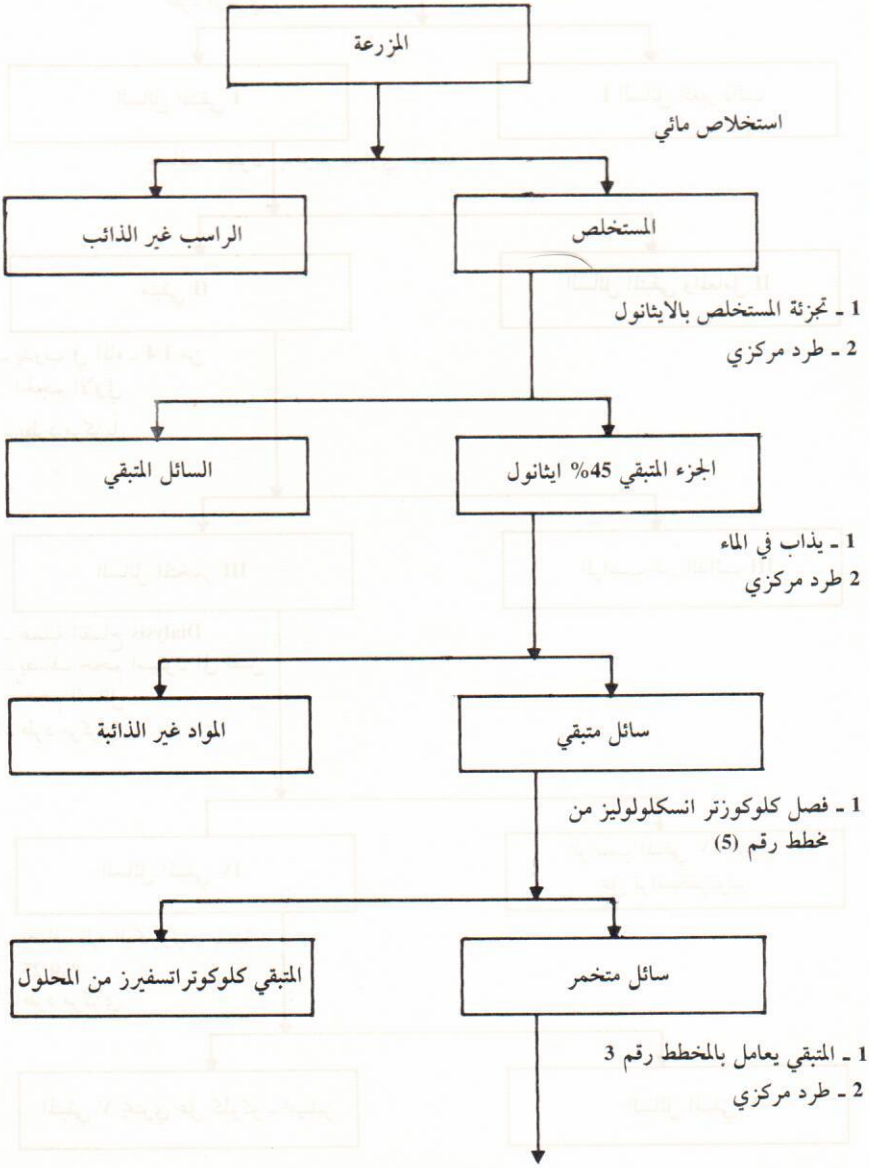
مخطط رقم (3)

تحرير الكلوكو امليز من كلوكو تراتسفيريز

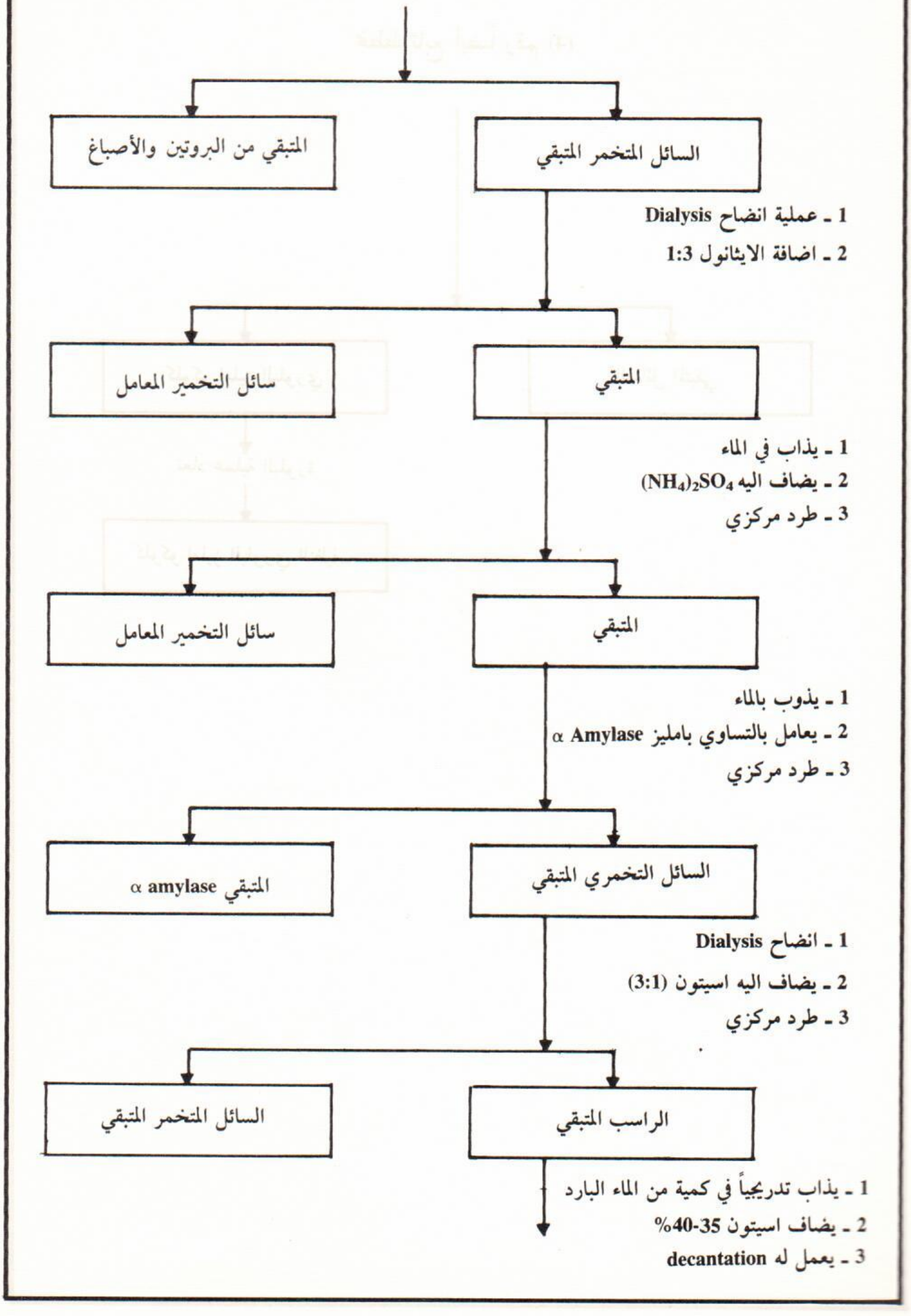


مخطط رقم (4)

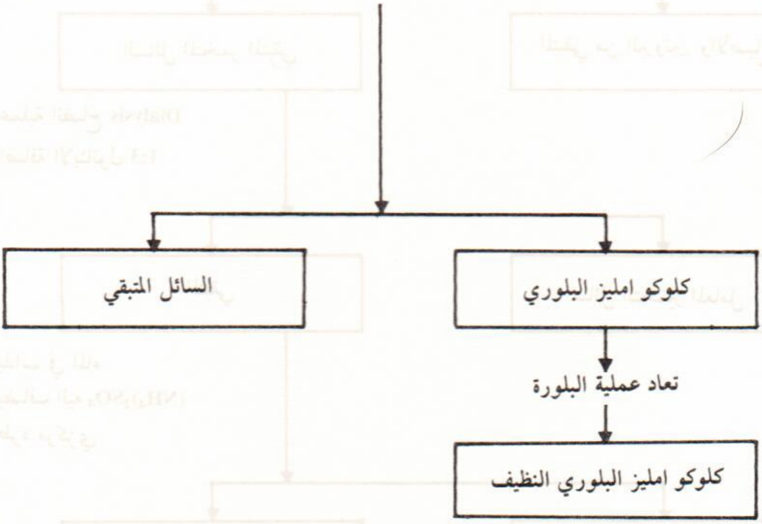
تحضير بلورات كلوكو امليز المزارع السطحية لـ **Asp-awamori**



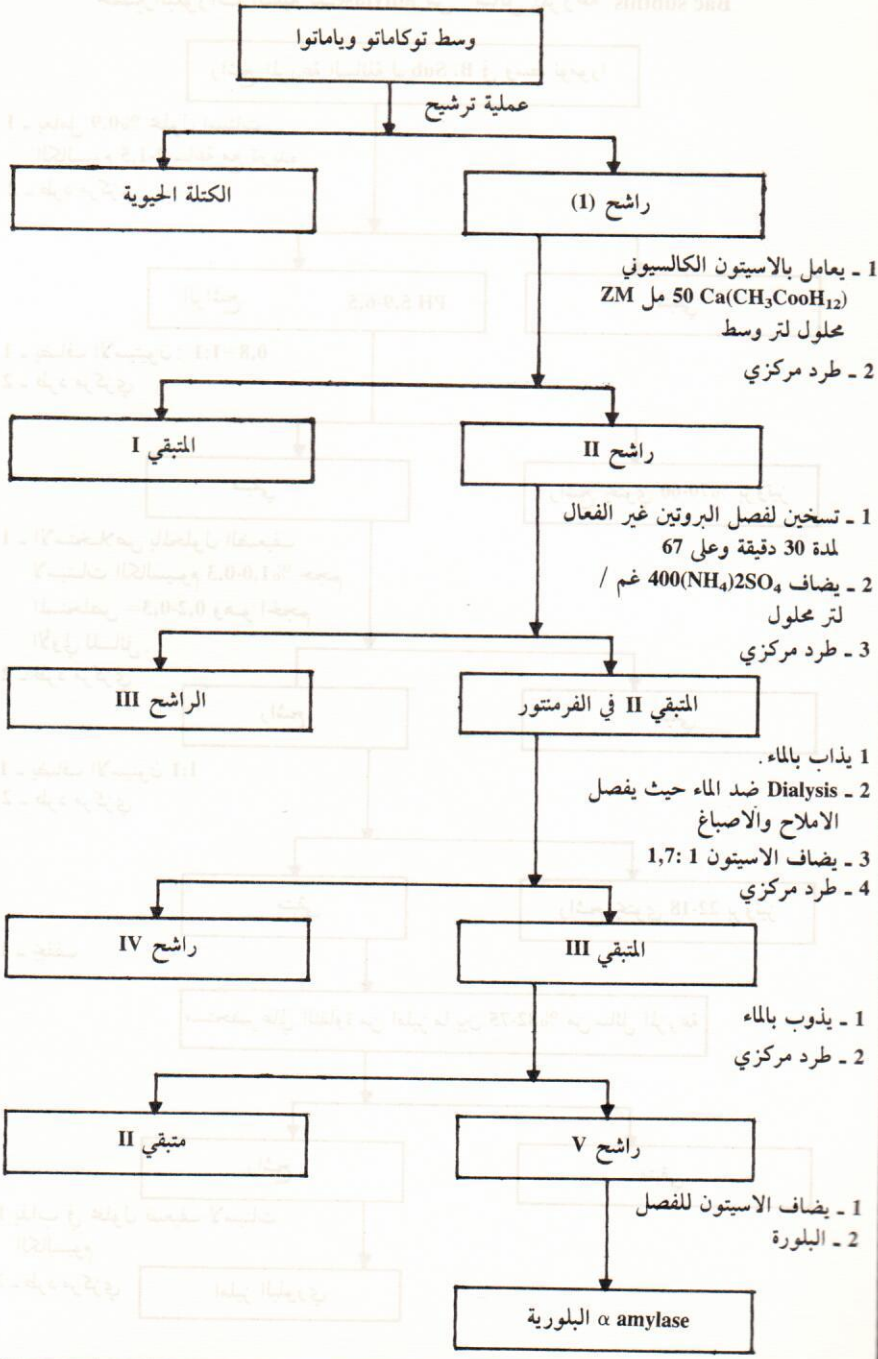
تابع مخطط رقم (4)



مخطط تابع أيضاً رقم (4)

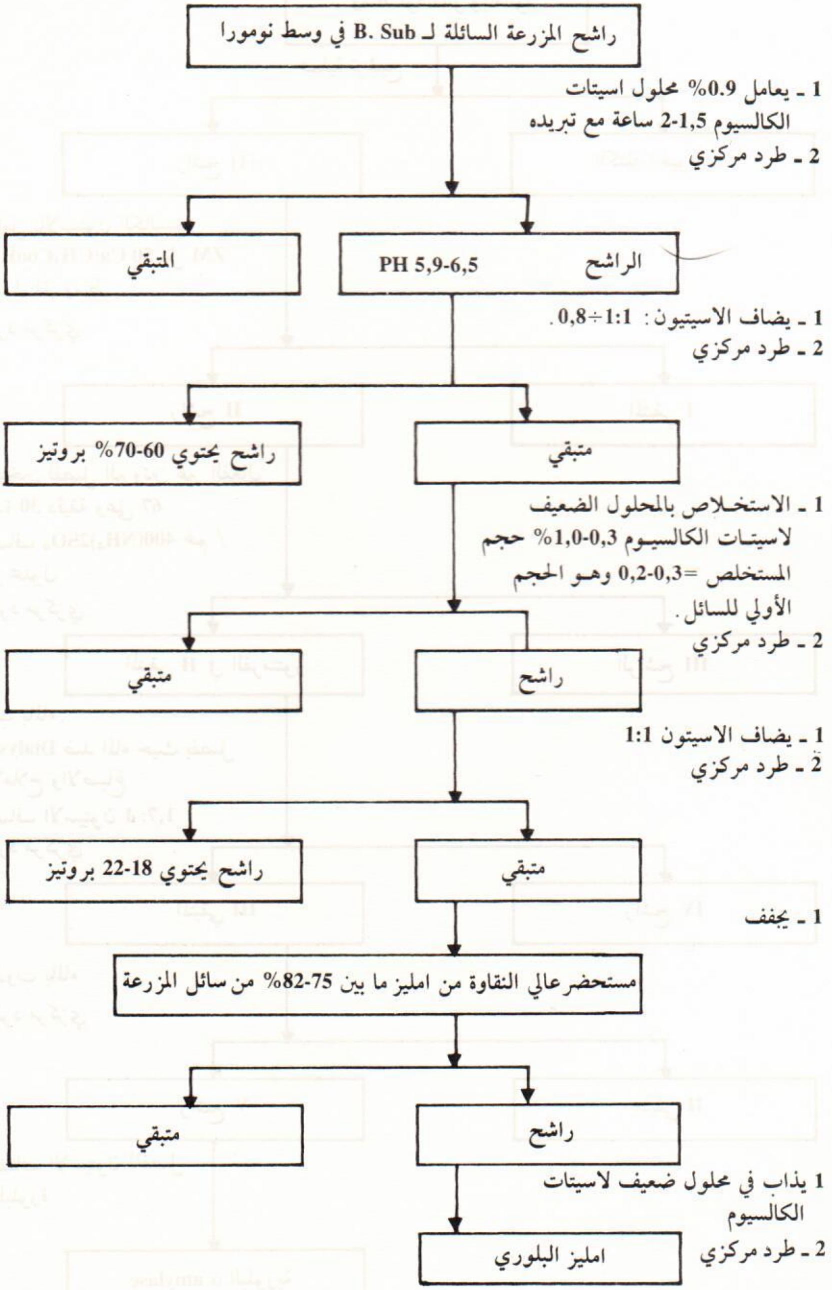


مخطط رقم (5) تحضير بلورات amylase من المزارع الغاطسة لـ Bacllus subtilis



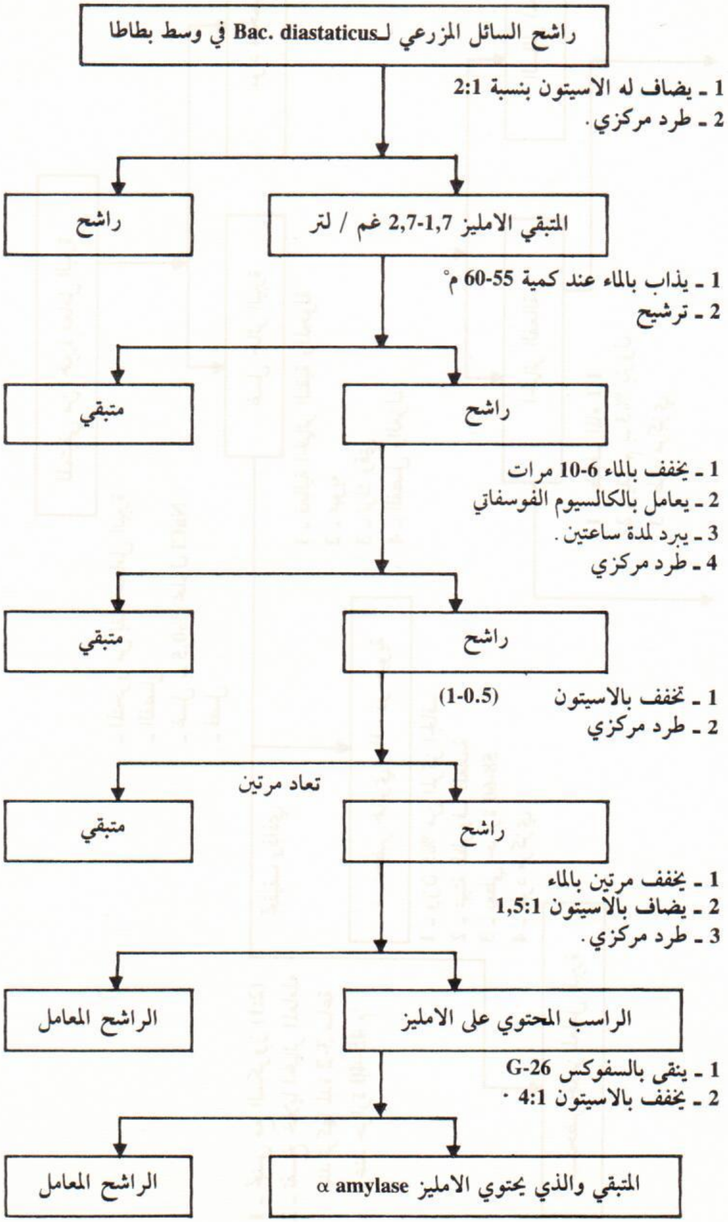
مخطط رقم (6)

تحضير البلورات النقية للـamylase من سائل المزرعة Bac subtilis



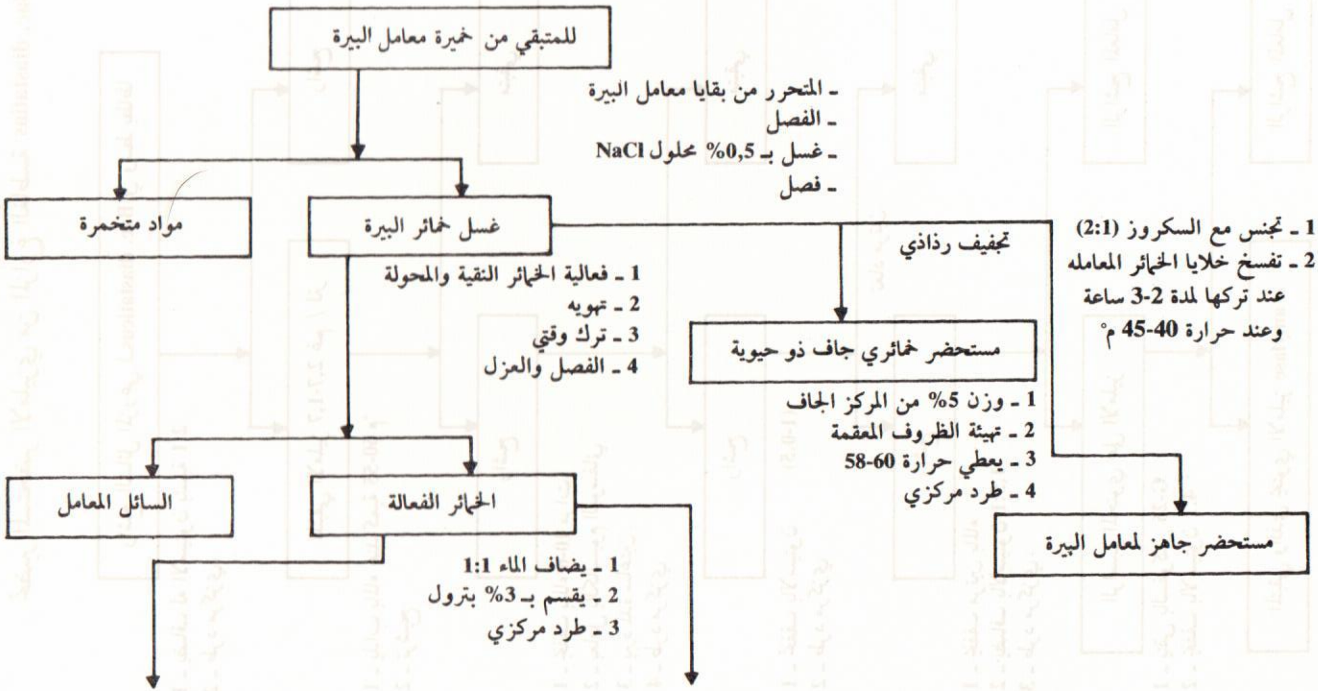
مخطط رقم (7)

تحضير المستحضر الامليزي من المزارع الغاطسة Bac. diastatias



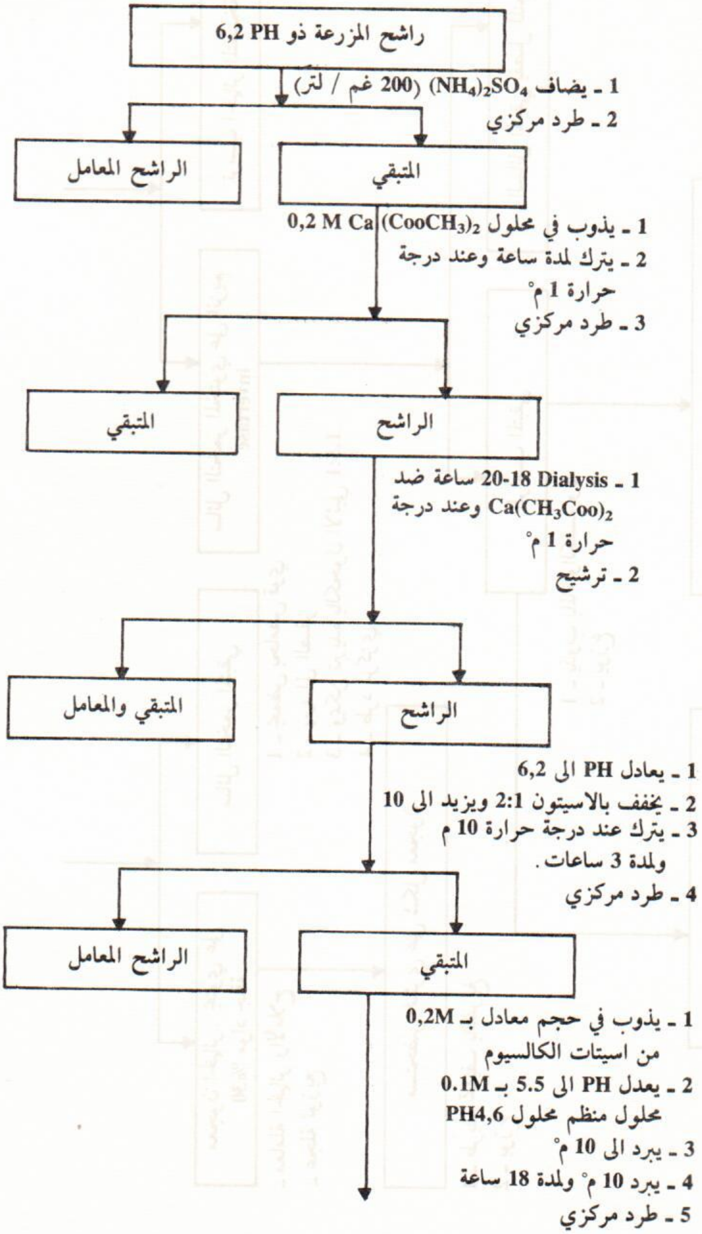
مخطط رقم (8)

تحضير مستحضر B-Fructo furanase في درجات مختلفة من النقاوة

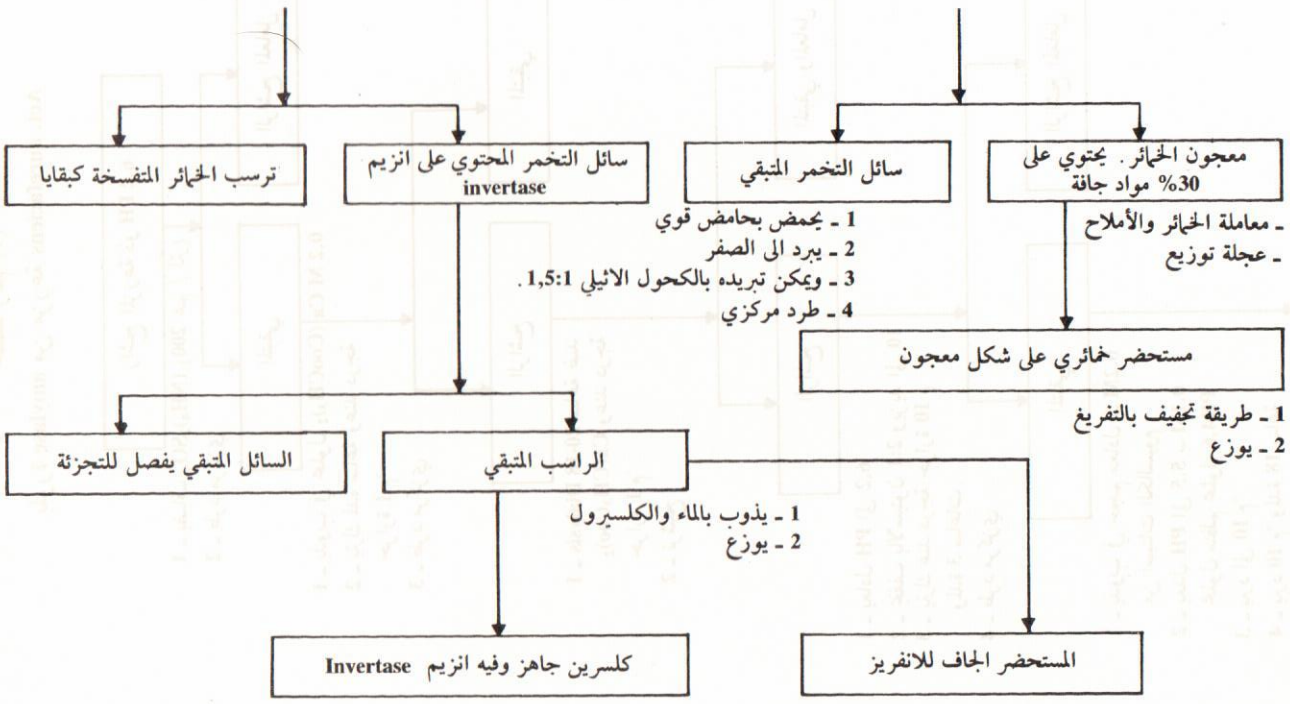


مخطط رقم (9)

بلورة amylase من مزرعة Act. aurefaciens

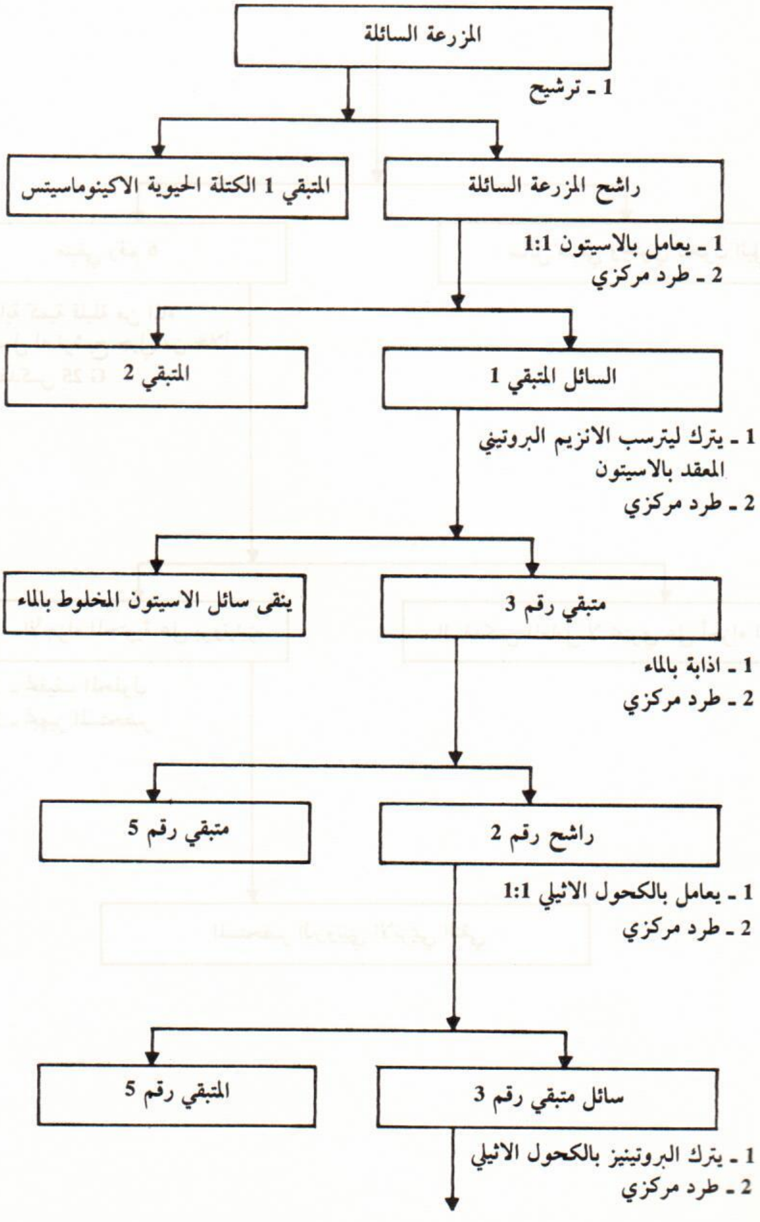


تابع مخطط رقم (9)

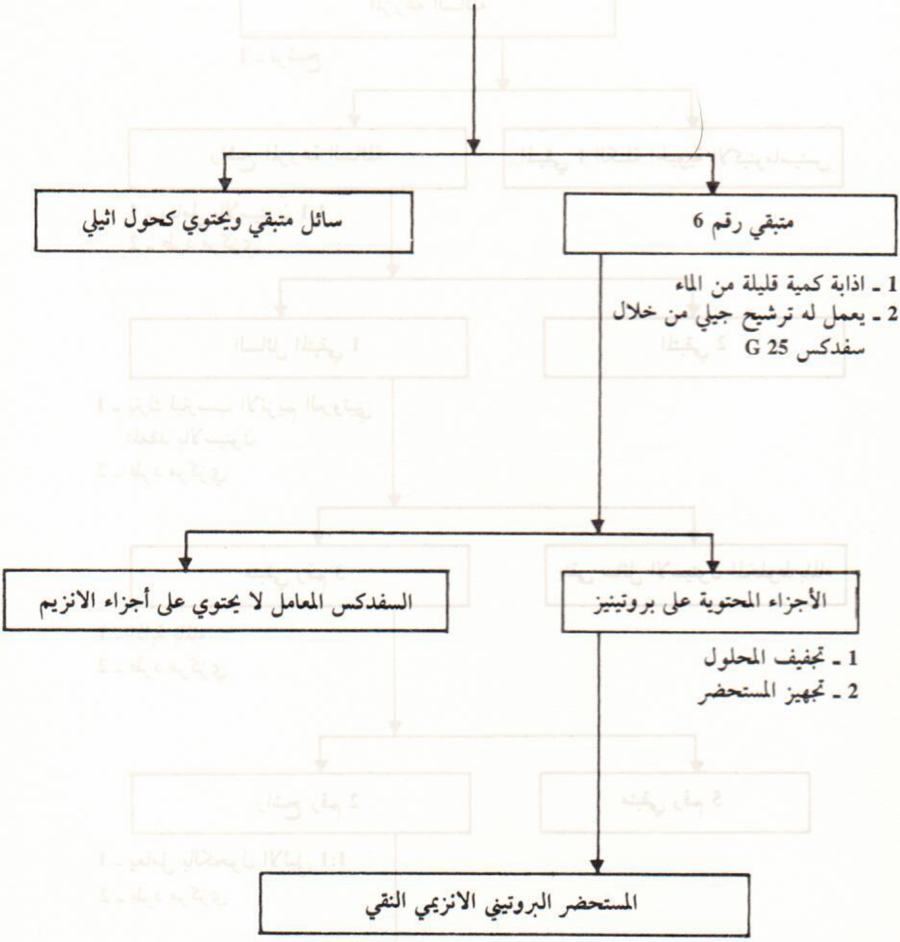


مخطط رقم (10)

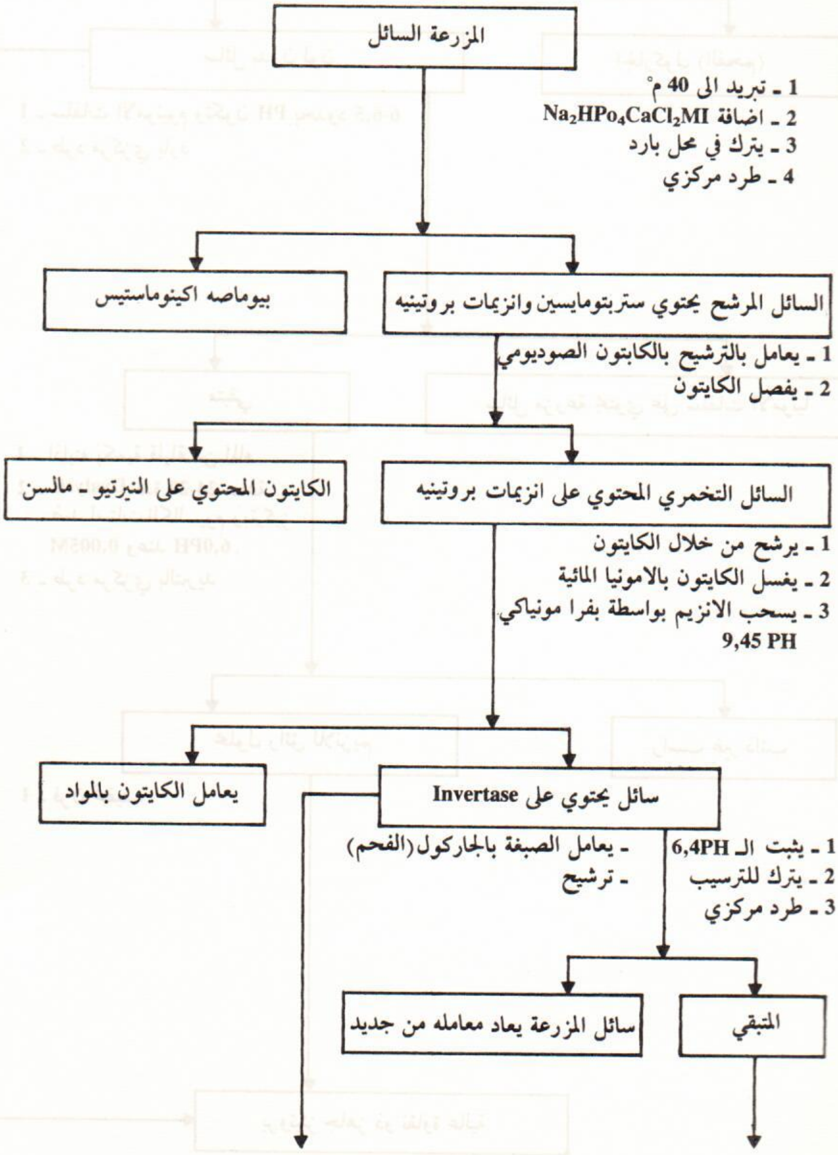
تنقية المستحضر الانزيمي من سائل المزرعة لـMicromonospora vulgaris



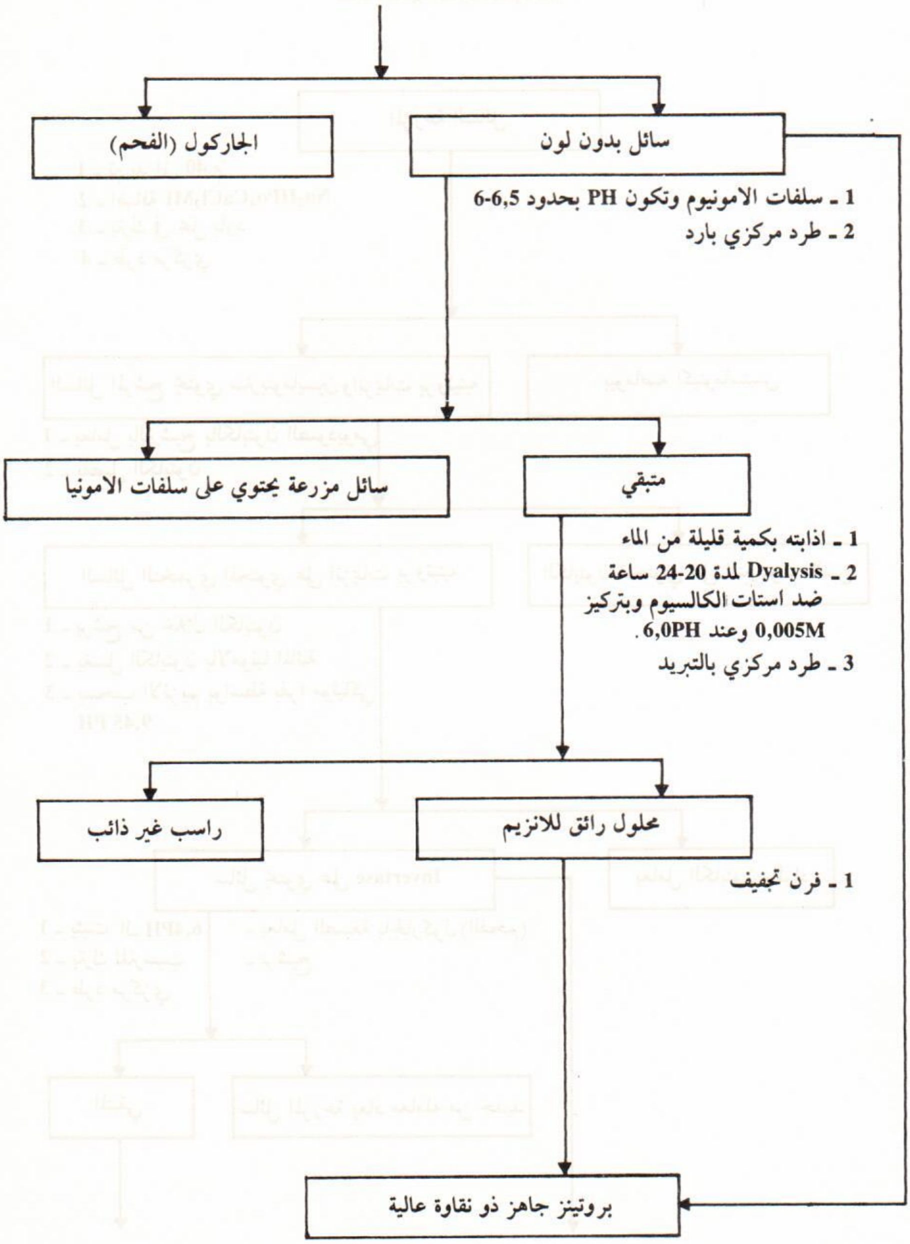
تابع مخطط (10)


متبقي رقم 6
سائل متبقي ويحتوي كحول اثيلي
1 ـ اذابة كمية قليلة من الماء
2 ـ يعمل له ترشيح جيلي من خلال
سفدكس G 25
الأجزاء المحتوية على بروتينيز
السفدكس المعامل لا يحتوي على أجزاء الانزيم
1 ـ تجفيف المحلول
2 ـ تجهيز المستحضر
المستحضر البروتيني الانزيمي النقي

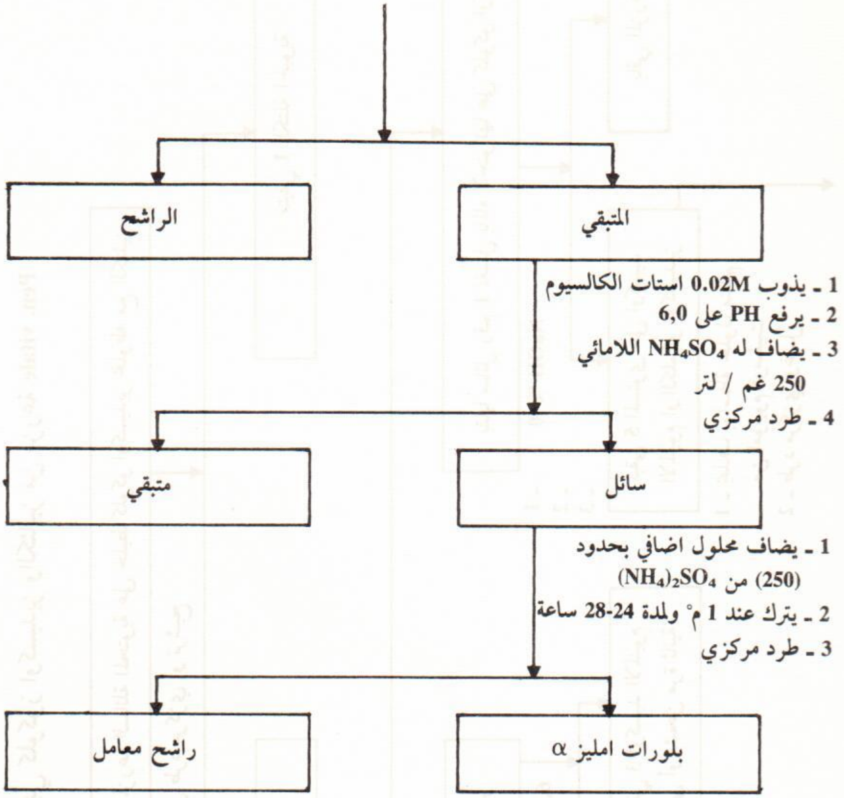
مخطط رقم (11)
تحضير انزيم البروتينيز من مزرعة غاطسة
لـstreptomyeis griseus



تابع مخطط رقم (11)

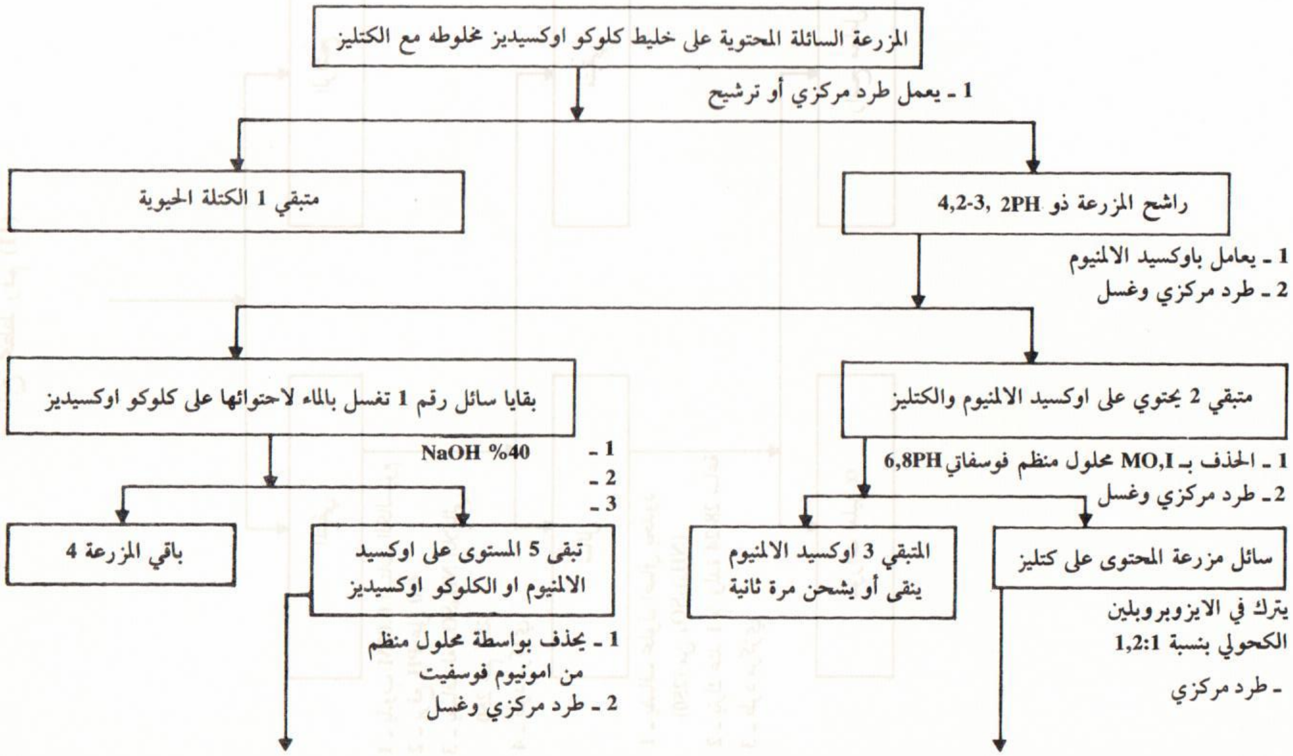


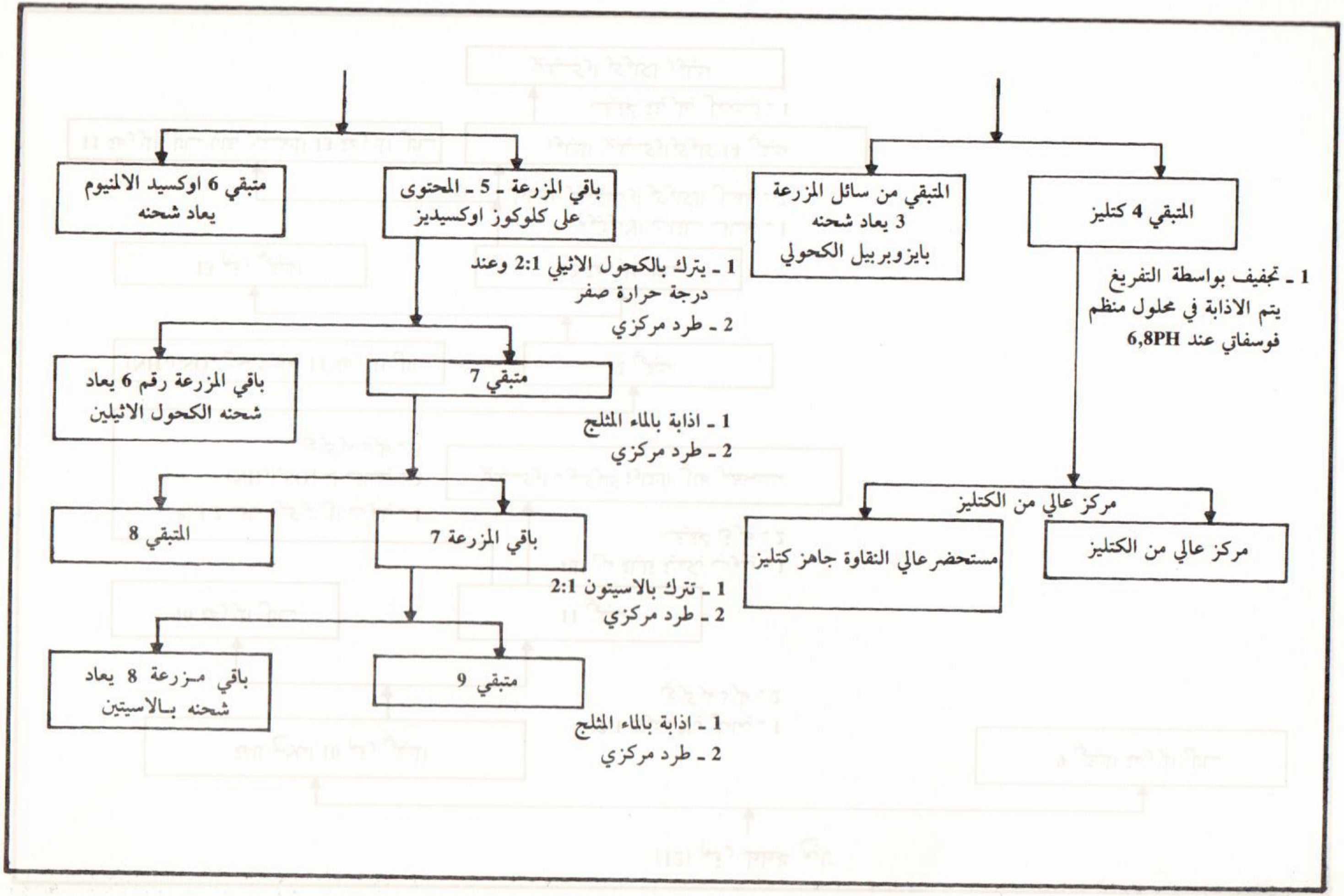
تابع مخطط رقم (11)



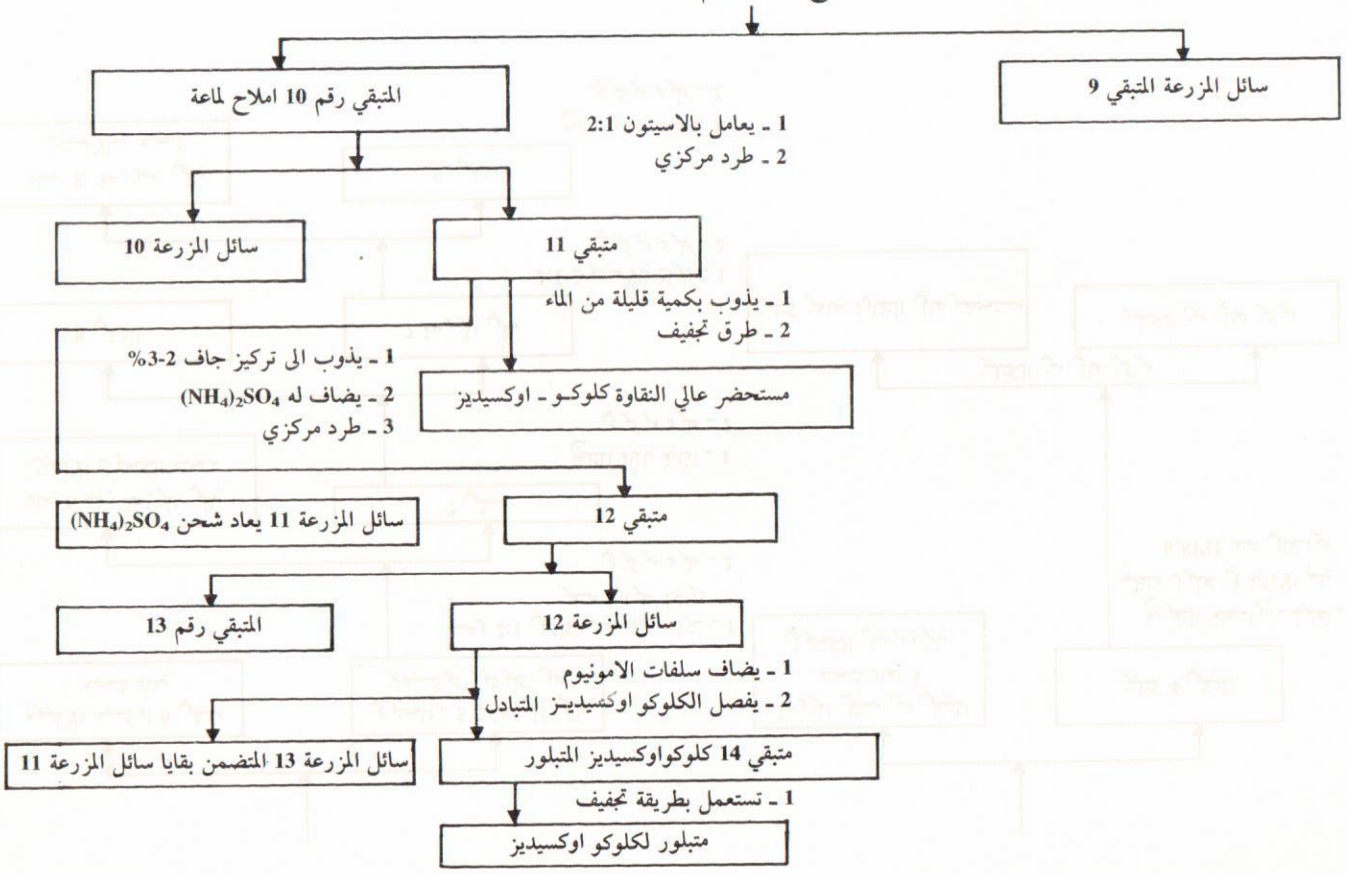
مخطط رقم 12

تحضير انزيمي كلوكوز اوكسيديز والكتاليز من مزرعة Pen. vitale




المتبقي 4 كتليز
1 ـ تجفيف بواسطة التفريغ
يتم الاذابة في محلول منظم
فوسفاتي عند 6,8PH
مركز عالي من الكتليز
مركز عالي من الكتليز
مستحضر عالي النقاوة جاهز كتليز
المتبقي من سائل المزرعة
3 يعاد شحنه
بايزوبربيل الكحولي
باقي المزرعة ـ 5 ـ المحتوى
على كلوكوز اوكسيديز
متبقي 6 اوكسيد الالمنيوم
يعاد شحنه
1 ـ يترك بالكحول الاثيلي 2:1 وعند
درجة حرارة صفر
2 ـ طرد مركزي
متبقي 7
باقي المزرعة رقم 6 يعاد
شحنه الكحول الاثيلين
1 ـ اذابة بالماء المثلج
2 ـ طرد مركزي
باقي المزرعة 7
المتبقي 8
1 ـ تترك بالاسيتون 2:1
2 ـ طرد مركزي
متبقي 9
باقي مزرعة 8 يعاد
شحنه بالاسيتين
1 ـ اذابة بالماء المثلج
2 ـ طرد مركزي

تابع مخطط رقم (12)

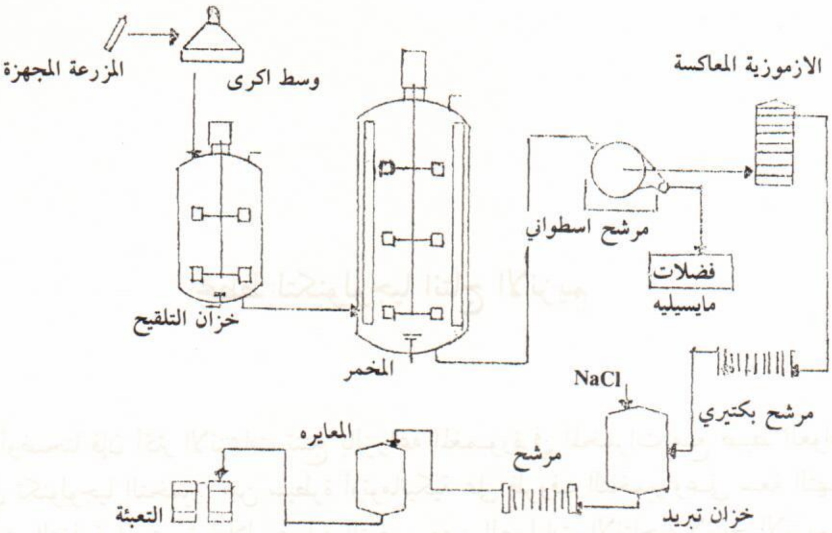


مخطط لتكنولوجيا انتاج الانزيم

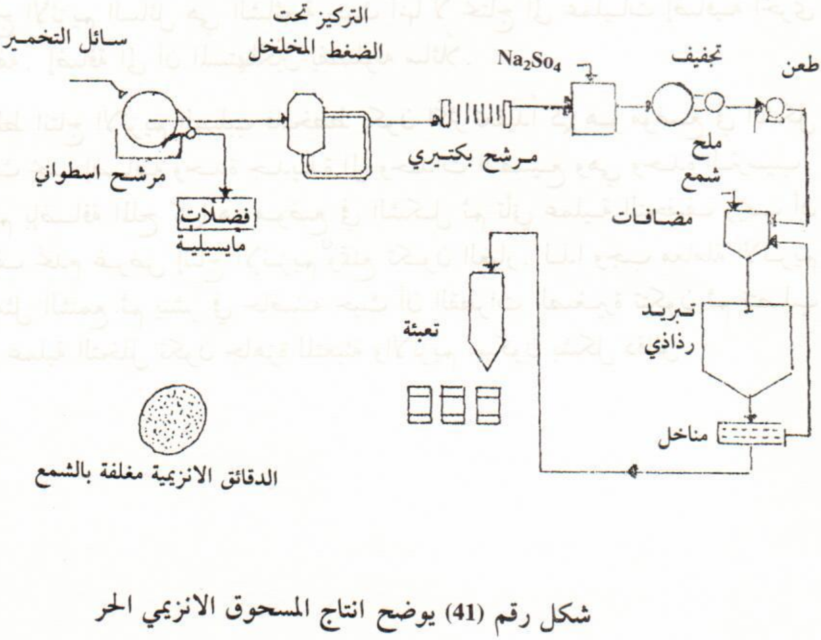
وكما أوضحنا فإن أكثر الانزيمات تنتج بالزراعة المغمورة في المخمرات مع ضبط العوامل المهمة في تكنولوجيا التخمير. من سيطرة أوتوماتيكية على ظروف التخمير وعلى سعة التهوية واحتمالات التغذية المستمرة خلال عملية التخمير ومن العمليات الانتاجية لانتاج الانزيم من مرق التخمير هي موضحة في الشكل رقم (40) حيث يتم عن طريق هذا المخطط انتاج الانزيم السائل.

إن الخطوات الرئيسية تبدأ بعد عملية التخمير. حيث يتم فيها عزل المايسيليوم ثم التركيز بواسطة الازموزيه المعاكسة، ثم عملية الترشيح ومن خلال مرشح بكتيري، ومن ثم تبدأ عملية اضافة المادة الحافظة Na Cl ومن بعد ذلك تبدأ معايرة سائل التخمر ثم التعبئة. إن عملية إنتاج الأنزيم السائل هي الشائعة حيث أنها لا تحتاج الى عمليات إضافية أخرى تزيد من الكلفة. إضافة الى أن المستهلكين يفضلونه سائلاً.

أما مخطط انتاج الانزيم الصلب فالمخطط يكون اكثر تعقيداً كما هو موضع في الشكل رقم (41) حيث يجب إضافة وحدة جديدة الى وحدات التصنيع وهي وحدة الترسيب. والترسيب يتم بإضافة الملح كما هو موضع في الشكل ثم تأتي عملية التجفيف ويجب أن عملية التجفيف تخدم غرض إنتاج الإنزيم وتمنع تكون الغبار. لذا وجب معاملة الانزيم بمواد مضافة مثل الشمع ثم ينشر في حاضنه حيث أن القطرات الصغيرة تتكون ثم تتصلب بالتبريد وبعد عملية التخلل تكون جاهزة للتعبئة والانزيم سيكون بشكل دقائق.



شكل رقم (40) يوضح انتاج المستحضر الانزيمي السائل



شكل رقم (41) يوضح انتاج المسحوق الانزيمي الحر

الفصل الثاني عشر

تقنية انتاج الأحماض الأمينية بواسطة الاحياء المجهرية

Production Technology of Amino Acid by Microorganism

ان التأليف البيولوجي للأحماض الامينية من قبل الاحياء المجهرية أعطى أهمية كبيرة في السنين الأخيرة، خصوصاً بعد انتاج حامض الكلوثامين 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 الاحياء المنتجة للأحماض الامينية هي من نوع Auxotrophic.

الخاصية الثانية: اكتشاف كيفية السيطرة على ميكانيكية التأليف. لذا كان الاهتمام متزايداً لانتاج الأحماض الامينية خصوصاً ولأن للأحماض الامينية أهمية كبيرة في تغذية الانسان والحيوان والتي كان متناولها عن طريق النباتات البروتينية وبتراكيز قليلة. وسنأتي بهذا الفصل ببعض التفصيلات عن انتاج بعض الحوامض الامينية.

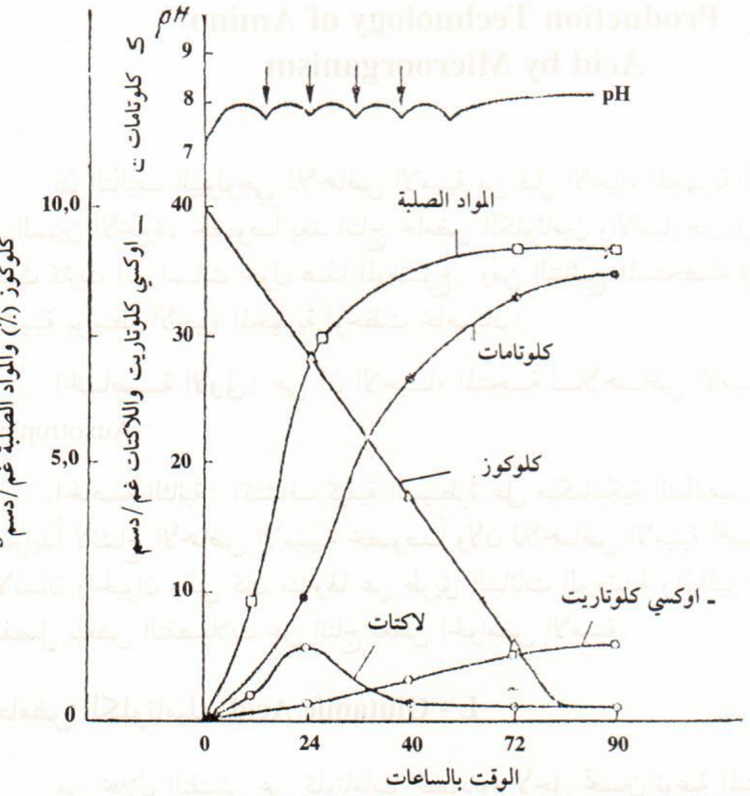
حامض الكلوتاميك L - Glutamic Acid

من خلال التفتيش عن كلوتامات الصوديوم لأجل تحسين نوعية المنتجات الغذائية فقد يتم الحصول على حامض الكلوثاميك بواسطة تحلل بعض بروتينات النباتات.

وفي عام 1956 بدأت أول الدراسات للتقنية المايكرويولوجية في هذا المجال تأخذ محلها لانتاج حامض الكلوثاميك. حيث تمكن بعض المشتغلين من فصل بعض الاحياء المنتجة لهذا الحامض في وسط غذائي Substrat تحتوي على كلوكوز وأمونات الأمونيا وتم تشخيص هذه الأحياء فكانت من نوع *Micrococcus glutamicus*. واكتشفت أيضاً سلالة أخرى من نوع *Bacillus sp.*

ومن دراسة بعض صفات السلالة *Micrococcus glutamius* من حيث الشكل فكانت عضوية قصيرة، موجبة لصبغة كرام، تكون السبورات، هوائية، غير متحركة وليس لها

أسواط وتحتاج الى عنصر البايوتين Biotein عند نموها. وعموماً هذه السلالة يمكنها النمو على المواد الكربوهيدراتية وأيونات الأمونيا ومع التهدية المناسبة لانتاج هذا الحامض. والمنحنى التالي يوضح اعتماد الكائن المجهري على ظروف المزرعة. وعند توفر الظروف المناسبة فإنه يستطيع انتاج 50 غم حامض كلوتاميك / من كل 100-150 مم كلوكوز.



شكل (42) يوضح التغيرات الحاصلة في المكونات الكيمياوية للوسط الغذائي لتأليف حامض لـ ـ كلوتامات في السلالة M. Glutanicus

طرق الحصول على حامض الكلوتاميك:

لأجل الحصول على حامض الكلوتاميك فهناك طريقتان رئيستان وهي:

1 ـ بطريق الوجبة الواحدة (Single stage) وفيها الاحياء تنمى على مصدر كربوهيدراتي ومصدر تاتيروجتني.

2 ـ بطريق الوجبتين (double stage) وهذه الطريقة تعتمد على تحضير المايكروبيولوجي لـ α - Keto glutamic Acid بواسطة الأحياء أو بواسطة مستحضرات انزيمية. وهنالك عدد كبيرمن الاحياء التي تنتج α - keto glutamic Acide ومنها :

Pseudomonas fluorescans
Bacterium Ketoglutarcum
Proteus Sp.
Kluyvera Cilrophila

وعندها تحدث عملية Diamination لمجموعة الأمين. حيث تم دراسة العديد من الأحياء وفي وسط يحتوي على α - Keto glutamic acid وأملاح الأمونيا فكان انتاج حامض الكلوثاميك من السلالة *pseudomonas ovalis* عالياً. 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 انتاج يقدر بـ 30% حامض الكلوثاميك من الكلوكوز المستعمل. ان هذه الطريقة يمكن أن تطبق على الأنواع التالية أيضاً *Aspergillus sp, Sac-chromyces sp., Xanthomonas sp., Psedomonas sp* وعند pH (8,5-6,8) ودرجة حرارة (45-20) م. علماً بأن حامض الكلوتاميك يمكن أن ينتج من α - Keloglutamic acid بواسطة trans amination ويستعمل لهذا السلالة E. Coli في البروتين المتحلل مع حامض الاسبارجين.

كذلك يمكن انتاج حامض الكلوتاميك بطريقة اختزال مجموعة الأمين لحامض - α Keteglutamic acid. حيث يكون انزيم Dihydro kinase عاملاً مهماً لحامض الكلوثاميك في الانواع Eschrichia, Pseudomonas, Bacterium, Erwina, Serratia, Debaryomyces, *Pseudomonas ovalis protens vulgatis*.

أما السلالة *Micrococcus glutamicus* فتعطي أعلى حيوية للانزيم الذي يعمل على مجموعة الأمين.

كما أنه يمكن الحصول على حامض الكلوتاميك من مصدر فورمايت Format وباستعمال الأحياء التالية:

B. Pumillus, B. Subtillus, B. natto. B. mesentericus, B. Cercus, E. coli Serratia marcescens, psudomonas aesognosa xanthemonas prnui.

تقنية انتاج حامض الكلوتاميك من الاحياء المجهرية المنتجة والعمليات الصناعية :

أن السلالة المصنعة *micrococcus glutamicus* هي احدى السلالات المشهورة في إنتاج هذا الحامض، ولأجل تحضير اللقاح يحتاج الى وسط غذائي Substrate الذي يحتوي على 2% كلوكوز، 1% ببتون، 0,5% مستخلص اللحم، 0,5% Nacl ، وعند ظروف حرارة حضن 28 م و pH (7-7,2) وفترة حضن 24 ساعة وفي حاضن هزاز ذي سرعة 220 دورة / دقيقة. ومن ثم يتم نقل اللقاح الى وسط التخمير المحتوى على المكونات التالية 10% كلوكوز، $MnSo_4 . 7H_2O$0.001, K_2HPO_4, 0.01, $(NH_4)_2 SO_4$, 0.2

، وعند ظروف تبريد على درجة حرارة 25 م مع تعديل حموضة الوسط (pH) بإضافة 10% محلول كارمايد وعند إضافة 2,5 ملغم / دسم^3 وفي حاضن هزاز وبعد فترة 48 ساعة سنحصل على 42 عم / دسم^3 حامض كلوتاميك، أما إذا أستخدم تركيز 15% كلوكوز فسنحصل على 52 عم / دسم^3.

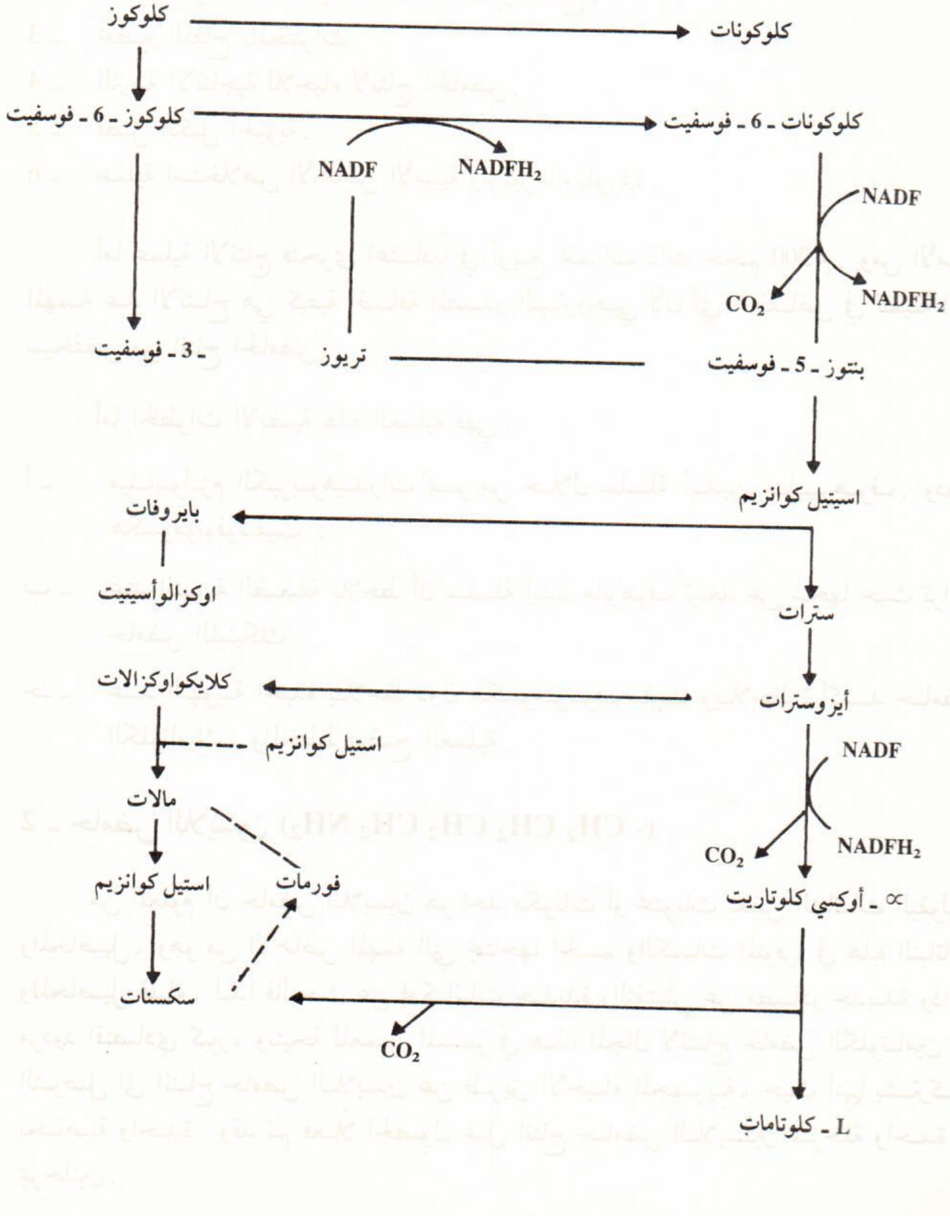
أما بالنسبة للسلالة *Brivibacterium divanicatum* التي تعمل في وسط كلوكوزي تركيزه 10%، كارمايد 0,3، $MgSO_4 . 7H_2O$0,05 ،$K_2HPO_4$0,2، مستخلص اللحم 0,2 مستخلص الشعير 3% مستخلص الدرة 0,15. فإن السلالة ستنتج في الساعة الثلاثين من الحضن 44,2 عم / دسم^3 حامض كلوتاميك.

وهنالك العديد من السلالات التي تنتج هذا الحامض. أما المخطط العام لتحضير الحامض من السلالة *Micrococcus glutamicus* والسلالة *Brivibacterium flavum* فقد تم تحديده، علماً بأن 75% من انتاج هذا الحامض ينتج بطرق مايكروبيولوجية و 20% بالطرق الكيماوية و 5% ينتج بواسطة التحلل. أما العمليات التكنولوجية المستخدمة لتحضير هذا الحامض فهي بالتربية الغاطسة ولظروف هوائية وبنظام الوجبة. وعموماً فان الأوساط المستعملة للانتاج تحتوي على كلوكوز 100 عم وبيوتين 2 ملم، وثيامين، ومستخلص الذرة.

وقد يستبدل المصدر الكربوني بالاستات. فيكون الوسط كالتالي:

آستات الامونيوم 1,5%
آستات الصوديوم 3%
$K_2HPO_4$0,2%
Fe و 0,00002Mn
pH الوسط 8
ماء لتر

مخطط يوضح تكوين حامض الكلوتامك من Micro Coccus glutamicus



خطوات انتاج الحامض:

1 ـ التحضير المخبري للقاح.
2 ـ تحضير الأوساط الغذائية الخاصة بتحضير اللقاح.
3 ـ تحضير اللقاح بالمخمرات.
4 ـ التربية الانتاجية للاحياء لانتاج الحامض.
5 ـ فصل الكتل الحيوية.
6 ـ عملية استخلاص الأحماض الأمينية وتركيزها وبلورتها.

أما عملية الانتاج فتجرى اعتيادياً في أربع مخمرات ذات حجم 200 م. ومن الأمور المهمة عند الانتاج هي كيفية إضافة المصدر النيتروجيني لأن أي انخفاض في كمية (N) سيخفض من انتاج الحامض.

أما الخطوات الايضية لهذه العملية فهي:

أ ـ ميتابولزم الكربوهيدرات يمر من خلال سلسلة أبدين مايرهوف. ودورة هكسومونوفوسفيت .

ب ـ عند التهوية الضعيفة يلاحظ أن سلسلة أيدن مايرهوف تبتعد عن نهجها حيث تراكم حامض اللبنيكك.

حـ ـ عند التهوية الجيدة يلاحظ دون هكسومونوفوسفيت ويلاحظ تأكسد حامض الكلوتاميك، والمخطط يوضح العملية.

2 ـ حامض اللايسين ($- CH_2 CH_2 CH_2 CH_2 NH_2$)

من المعلوم أنّ حامض اللايسين هو احد مكونات أو محتويات بعض النباتات البقولية والمحاصيل، وهو من الأحماض المهمة التي يحتاجها الجسم والكميات المتوفرة في هذه النباتات والمحاصيل قليلة، لذا فالبحث عن إمكانيات جديدة والتفتيش عن مصادر جديدة وذات مردود اقتصادي كبير، ونتيجة للعمل المستمر في هذا المجال لانتاج حامض الكلوتامين تم التوصل الى انتاج حامض اللايسين عن طريق الاحياء المجهرية، حيث أنهما يشتركان بخاصية واحدة. وقد تم فعلاً الحصول على انتاج 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 كلوكوز، يوريا، وقد تم انتاج (15-5) ملغم حامض اللايسين/لتر.

أما السلالة *Ustilago Maydis* فقد انتجت (300-200) ملغم/لتر في الظروف الاعتيادية للزراعة. كما تم تحديد السلالة Ustilago maydis وكذلك السلالة Cliodadium roseum والتي تنتج بحدود 700-800 ملغم / لتر عند ظروف حاضن هزاز.

أما عند زراعة U. maydis في مخمر ذي حجم خمسة ليترات فقد تم الحصول على انتاج (1.95) غم / لتر لايسين و 1.9 غم / لتر حامض كلوتامين وفي غم / لتر ارجينين.

ومن العمل الوراثي تم الحصول على بعض التحويرات للسلالة *M. glutamicus* بواسطة العوامل الفيزياوية للأشعة فوق البنفسجية ultra volite ray. حيث ازداد الانتاج الى 20 غم / لايسين / لتر في وسط بيئي معين.

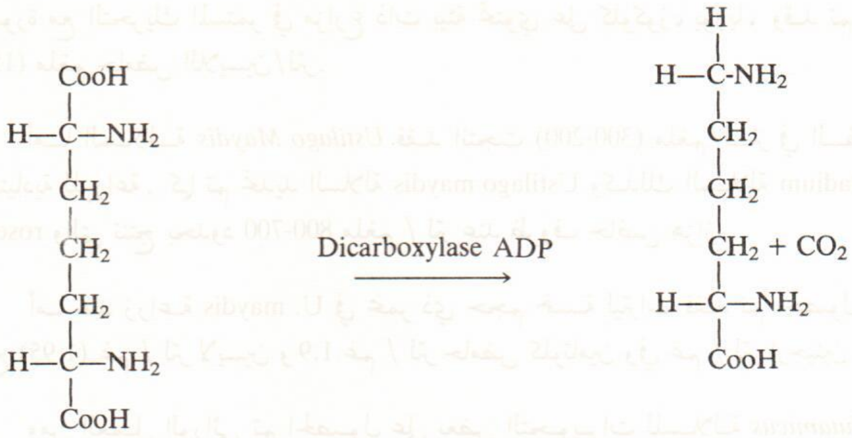
إن بقاء L. Lysin من السلالة *M. glutamicus* يختلف من حيث طبيعة تأليف الكلوتامات، حيث أن السلالة *M. glutamicus* تحتاج الى بيوتين وهوموسيرين لأجل النمو في وسط المولاس.

وعموماً فإن السلالات الصناعية للانتاج تعتمد الوسط التالي للـ *M. glutamicus*.

كلوكوز	%7.5	$CaCo_3$		%1	
NH_4SO_4	%1.5	بايوتين		1.0 كغم / لتر	NH_4SO_4 %1.5
K_2HpO_4	0.05				

وقد حصل اليابانيون على انتاج يقدر بـ 70 غم / دسم^3 على وسط يحتوي حامض الخليك وانتاج حامض اللابسين يتم بمرحلتين ومن خلال عملية مايكروبية وباستعمال α. E Diamino pelinic acid كعامل مساعد في الانتاج.

حيث يتبين أيضاً بأن المرحلة الأولى هي عملية تحضير السلالة E coli، أما المرحلة الثانية فهي عملية كربوكسيلية من قبل انزيم DAP dicarboxlasc (الكاريوكسبيليز). الحامض α E. diamino pelinic acid يكون من قبل بكتريا Acrobacter areogenase وحسب الميكانزم التالي:



وهذا الخليط المتفاعل يحضن لمدة 24 ساعة عند درجة 28 م مع اضافة كمية قليلة من فيتامين B_2 وحامض الليمون ليساعد عملية الكريوكسلة.

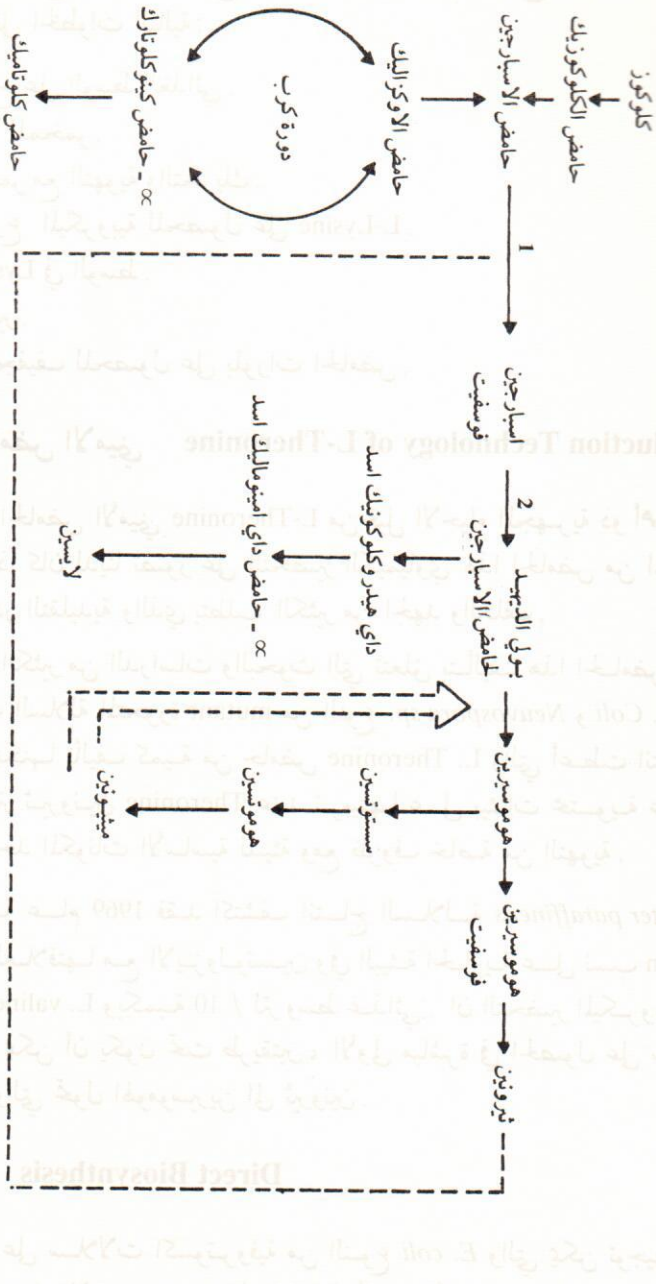
ميكانيكية بناء اللايسين

إن الحصول على متحورات اكسوتروفية ليس فقط تعمل على زيادة امكانية بناء اللايسين ميكروبيولوجياً بل سمحت هذه المتحورات باعطاء المجال لاكتشاف درجات منفصلة لبناء هذا الحامض، وهي كما موضحة في الشكل ( ).

حيث يبين الشكل بناء حامض اللايسين من حامض الاسبارجين. ان المتحور الاسكوتروفية من نوع Micsococcus و Brivibacterium تحتاج الى الهوموسبرين، الميثوين، بتروسين، ايسولوسين كذلك أن هذه المتحورات تحتاج أيضاً الى أموين الفوسفات وبالحدود المثلى وكذلك اليابوثين.

الخطوات التقنية لانتاج اللايسين

إن انتاج الحامض يعتمد على طورين. الطور الأول هو المتحور E-coli المنتج الى الحامض d'aminopenitic acid الضروري لبناء حامض اللايسين، أما الطور الثاني فهو لـ Dicarboxylation للحامض وتحويله الى L-Lysine بواسطة الاحياء المجهرية المحتوية على Dicarboxylase. ويعتبر الوسط التالي مثالاً للسلامه E-coli وهي $(NH_4)_2$ HpO_4 0.5%، مستخلص الذرة 0.5%، مكسرول 0.5% وعند 7.5pH) وعند فترة حضن (72) ساعة وعند درجة حرارة 28 م مع التحريك. وسرعة تهوية 1 حجم هواء/1 حجم وسط / دقيقة اعطت انتاج 9 ملغم / لتر من الحامض.


كلوكوز
حامض الكلوكونيك
حامض الاسبارجين
حامض الاوكزاليك
دورة كرب
∝ - حامض كيتوكلوتارك
حامض كلوتاميك
1
اسبارجين فوسفيت
2
سمي الديهيد حامض الاسبارجين
داي هيدروكلوكونيك اسد
∝ - حامض داي امينوباليك اسد
لايسين
هوموسيرين
سستوثيونين
هوموسستين
ميثيونين
هوموسيرين فوسفيت
ثيرونين

أما بالنسبة للسلالة *Micrococcus glutamicue* الاكسوتروفيه والسلالة *Brivibacterium sp.* اعطت نتائج مشجعة لانتاج هذا الحامض والذي تراوح ما بين 18-25 م/ لتر والانتاج يعتمد على الخطوات التالية:

1 ـ تنمية اللقاح على الوسط الغذائي.
2 ـ انتاج لقاح للمخمر.
3 ـ تلقيح المخمر مع التهوية والتحريك.
4 ـ انتاج المزارع الميكروبية للحصول على L-Lysine.
5 ـ تثبيت Lysine في الوسط.
6 ـ عملية تبخير.
7 ـ الخلط والتجفيف للحصول على بلورات الحامض.

تقنية انتاج الحامض الاميني Production Technology of L-Theronine

إن تحضير الحامض الأميني L-Theronine من قبل الاحياء المجهرية ذو أهمية كبيرة في مجال الصناعة. اذا كان لدينا تصور على التحضير الكيمياوي لهذا الحامض من المصادر الخام الطبيعية أو المصادر التقليدية والذي يتطلب الكثير من الجهد والكلف.

وقد صدر الكثير من الدراسات والبحوث التي تتعلق بتأليف هذا الحامض. وفي سنة 1951 تم اكتشاف السلالة المتحورة mutant من النوع *Neuvospora sp.* و *Bacillus E. Coli substilus* والتي يمكنها تأليف كمية من حامض L. Theronine والتي أعطت انتاجاً يقدر بـ (2-3) غم / لتر ثيرونين Theronine عند تربيتها على بيئات محتوية على D. L. Homoserine كأحد المكونات الأساسية للبيئة ومع ظروف خاصة من التهوية.

وفي بداية عام 1969 فقد اكتشف انتاج السلالة *Arthrobacter paraffineus* الاسكوتروفية لعلاقتها مع الايزولوتسين وفي البيئة الحاوية على نسب n-paraffin، L. valine, L. Theronine وبكمية 10 / لتر وسط غذائي. ان التحضير الميكروبايولوجي لـ L-Theronine يمكن أن يكون تحت طريقتين، الأولى مباشرة في الحصول على سلالة ذات ميزة اكسوتروفية والتي تحول الهوموسيرين الى ثيرونين.

البناء المباشر: Direct Biosynthesis

للحصول على سلالات اكسوتروفية من النوع *E. coli* والتي يمكن توجيهها بعملية ايقاف عملية التمثيل الايضي عند نقاط مختلفة لتأليف الأحماض. الارجنين، تريتوفان،

هستدين، ميثوثين ـ أيزولوتسين، ليثرين، فالين. حيث يتم تأليف L-Theronine من سلالة بكترية من نوع D. E-coli وبحدود انتاجية 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 انتاج للأحماض الأمينية خصوصاً الثيرونين مرتبطاً مع DAP وعند البيئة ذات المكونات التالية مانيتول 2%، 1.3% (NH_4) HpO_4، 0.15% $(NH_4)_2$ SO_4، 0.7% K_2HpO_4، 0.1% $MgSo_4$-$7H_2O$، DAP 120 ملغم/لتر.

وعند ظروف حضن 37م° ولكن عند زيادة تركيز DAP يقل كمية الثيرونين.

أما عند التربية على بيئة حاوية على السوربتول وعند درجة حرارة حضن 28 م° انتجت الكمية القصوى للثيرونين بعد فترة حضن دامت (42-48) ساعة، وعند محتوى ميثونيني تقدر بـ 50 ملغم/لتر وكمية DAP 175 ملغم/لتر في البيئة الغذائية.

تحويل الحامض الاميني الهوموسيرين:

بعض الأجناس من الأحياء المجهرية يمكنها تحويل الهوموسيرين الى B-L-Theronine، واعلى 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% كلوكوز، 1,2% DL ـ هوموسيرين، فالسلالة *B Subtilus* انتجت 3.7 غم/لتر L-Theronine.

وإن أعلى انتاج تم الحصول عليه من السلالة *xanthomonas citri* وفي الوسط الغذائي والمكونات 10% كلوكوز و 2% $(NH_4)_2$ SO_4، 0,2% K_2HPO_4 و 0,3% Mg $So_4.7H_2O$، 20% 1% $CaCo_3$ هوموسيرين، كان 5 غم/لتر من L-Theronine.

ويمكن الاستفادة من تحويل 50% من الهوموسيرين الى L-Theronine حيث يكون دور الهوموسيرين عاملاً مساعداً في بناء الثيرونين والميثونين.

إن بعض أنواع الخمائر تحول الهوموسيرين الى ثيرونين بواسطة انزيمات 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 احدى المزارع كمية تقدر بـ 1,5 غم/لتر.

أما السلالة الاكسوثروفية للتربتوفان *E. coli* فقد أعطت انتاجاً 10 غم/لتر L. Treptophane في بيئة تحتوي على الاندول والسيرين. وهنالك أنواع أخرى من الخمائر التي اعطت انتاجاً يقدر بـ 1.4 غم/لتر وفي وسط يحتوي على antherlic acid كجزء أساسي في الوسط.

والدراسات جارية في مجال تحضير الثربتوفان مايكروبيولوجياً والتي تعتمد على تحويل الانتراليك، الاندول والسيرين الى حامض التربتوفان: -

تحويل حامض الانثرليك:

إن تحويل حامض الانثرليك الى حامض التربتوفان وبغياب السيرين والسكر يكون من قبل الخميرة *Candida* وكذلك من النوع *Hansenula sp* والتي يمكنها من تأليف 3 ملغم/لتر تربتوفان عند البيئة الحاوية على حامض الانثرليك.

تحويل الاندول والسيرين:

يمكن استعمال مايسليوم من مزرعة *claviceps purpurea* والتي تعزل من مرض صدأ الحنطة والتي لها القابلية على انتاج حامض التربتوفان من الاندول والسيرين ومع المكونات البيئة التالية:

كلوكوز 1%، كلوريد النترات 0.5%، N-Z-amine 0.5%، ببتون 0.5%، مستخلص اللحم 0,5% وتم الحضن عند درجة حرارة 26م° 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 حجم وسط/دقيقة وسرعة خلط 400 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 28 م.

أما مكونات الوسط الغذائي فتكون كالآتي:

كلوكوز 2%، (NH_4) SO_4 0,4%، كلايسين 0,15%، KH_2 po_4 0,88%، 1,54% $NaHPO_4$. $12H_2O$، مستخلص الذرة 1%، وأثناء عملية التخمير وبعد مرور 30 ساعة من الحضن يتم اضافة الاندول وبنسبة 0,01% ويتم تعديل الـ pH للبيئة ما بين (6,5-5) وإن

اضافة الاندول هو لانتاج التريتوفان. وقد أعطت هذه السلالة انتاجاً يقدر بـ 1,5 غم / لتر تريتوفان.

أما عند خلط الاندول والسيرين وبوجود السلالة *E. Coli* وفي بيئة غذائية مكونة من النسب المئوية التالية: كليسرول 1,0، $(NH_4)_2$ Hpo$_4$ 0,35، KHpO$_4$ 1,-، MgSo$_4$. 0,002 7H$_2$O، حامض الانثرليك 0,005، pH 7,5، حيث يتم تهيئة هذه المواد في وعاء حجم 100 مل لأجل تحضير اللقاح وبعدها يتم تلقيح المخمرات ذات الحجم الأكبر ويتم الحضن 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 التريتوفان «L» التي ستتكون هي بحدود 10,4 غم.

ومن الطرق المستعملة للحصول على التريتوفان هي تحويل حامض الـ 3-Indolylucosic حيث يعمل كمنشط بيولوجي للاحياء المجهرية حيث استخدمت الكثير من الاحياء المجهرية والمختلفة وعلى الوسط ذي المكونات التالية وبالنسب المئوية:

كلوكوز	0,4	MgSo$_4$. 7H$_2$O	0,02
NH$_4$Cl	0,2	CaCl$_2$-2H$_2$O	0,0065
KH$_2$PO$_4$	0,15	Fe SO$_4$-7H$_2$O	0,00005
NH$_2$HPO$_4$	0,22	pH	7,6

بعد عملية الحضن لمدة 18 ساعة وعند درجة حرارة 30م° وعند ظروف تهوية جيدة في حاضن هزاز، أجسام الأحياء المجهرية تغسل بمحلول فسيولوجي وتجفف بدرجات حرارة منخفضة وتحت التفريغ، بعد ذلك تنقل في احدى الدوارق الكبيرة والتي تحتوي على 1,5 من الحجم النهائي ملغم/مل (15% من حجم المنتوج الكبير ومع وجود مادة 3-Indol glucosic acid ستات L كلوتامات، L-aspargine، ومع pH 7,6 وفترة حضن لمدة 6 ساعات وعند درجة حرارة حضن اعطت السلالة *Bac megaterium* اعلى كمية من حامض التريتوفان تقدر بـ 7,9 غم/لتر. ولكن السلالة E. *coli* K$_{12}$ انتجت 7,86.

حامض الالنين:

الالتين حامض اميني آخر يمكن أن يؤلف من قبل الاحياء المجهرية ـ كالبكتريا والخمائر والطحالب المايسلية، حيث تحتاج الى بيئات غذائية تحتوي على احدى المفاتيح الخاصة لتأليف الالنين، ومن هذه الأحياء السلالة *psedomonas 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 الى حامض الالنين. بواسطة السلالات : *Achromobacter Alcaligenus, Micrococus flavobacterium Bacillus sp, Aerobacter sp, Escherichia sp*.

والتي تحتاج الى بيئة غذائية ذات محتوى بنتوزي ومع المكونات التالية :

كسيلوز	%3	NH_4Cl	0,7
$KHPO_4$	%0,1		
$MgSO_47H_2O$	%0,05		
كارباميد	%0,4		
KNO_3	%1,3		

ويمكن اضافة مستخلص اللحم الى الوسط، كذلك يمكن إضافة مستخلص الخمائر. أو مستخلص الذرة الصفراء ونسبة (0,2%) مع اضافة (1%) $CaCo_3$ 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,-aminoacidieum nov. sp. Brevibacterium pentoso-alanicum* nov. sp. فالنوع الأول يؤلف في البيئة الكلوكوزية ليس فقط حامض الالنين ولكن ايضاً حامض الكلوتامين. وعموماً البيئة العامة هي : -

كلوكوز 10%، سلفات الامونيا 2%، ببتون 0,2% مستخلص الخمائر 0,05%، 2,0% K_2HPO_4 %0,1 $MgSO_4$. $7H_2P$ %0,03 $CaCO_3$.

كذلك فإن إضافة الأملاح الامونية للأحماض العضوية كالاكتيك، والكلوكوزيك يزيد من انتاج حامض الالنين الى 17-18 غم / لتر. وكذلك فإن دور مستخلص الخمائر يساعد في تنمية المزرعة ولانتاج الحامض. ويمكن ايضاً أن يستعمل الثيامين، والبايوتين خصوصاً للسلالة *Bacillus lentus* أما السلالات الأخرى من الأحياء التي تنتج هذا الحامض فهي :

Brevibacterium monoflagelum

Brevinacterium amylolyticum

Corynebacterium gelatinosum

إن انتاج حامض الالنين من السلالة *Corynebacterium gelatinosum* يحتاج الى حامض الكلوكوزيك و α كيتوكلوتارات وكمية قليلة من حامض الكلوتاميك. وإن عملية انتاج حامض الالنين معقدة جداً. أما إنتاج حامض الالنين من السلالة *Uslilago maydis* الاكسوثرومية والتي تحتاج لتنشيطها الى مواد تكون ضرورية لعملها. حيث أنها تحتاج الى حامض النيكوتين لتؤلف 20 غم / لتر ألنين عند استهلاكها حامض الكلوكوزيك.

وبعد تحوير هذه السلالة ascotrophic mutant وبعلاقتها بحامض الالنين والميثوتين وحامض النيكوثين، فإن هذا المتحور انتج كمية عالية من حامض الالنين وبتركيز عالٍ. ومن السلالات الأخرى التي يمكنها تأليف هذا الحامض هي *Fusarium moniliforme* التي اعطت انتاجاً يقدر بـ 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 انزيم B-dicarboxylase يؤثر على L-aspartic acid وإن كثيراً من الأحياء المجهرية تحتوي على هذا الانزيم خصوصاً السلالات: .,*xanthomonas* sp *pseudomonas* sp. والسلالة *xanthomonas oryzue* التي عند الرقم الهيدروجيني (4.6) تقوم بتحويل حامض الاسبارجين الى L-alanin وعند درجة حرارة 40 م°، وعند المحيط القاعدي فإن L-alanin سيكون D-L alanin. وبهذه الحالة يمكن انتزاع الكاربوكسيل من قبل الكثير من الأنواع المجهرية مثل:

Acetobacter sp., *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. *Oospora* sp., *Torulopsis* sp., *Absidia* sp. *Asp.* sp., *Mucor* sp.

انتاج حامض الميثيونين

ان حامض الميثيونين هو أحد اثنين من الاحماض الامينية 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 انتاجه من الأحياء التالية.

Torula lactis, Pseudomonas xanthe, Streptomyces erythrus, Serratia marces-

cens, Penicillium Islandicum. حيث يمكنها من تحويل methyl - marcanto-L-hydroxymacleulta، الى ميثيوتين، واعلى انتاج تم الحصول عليه من السلالة pseudomonas (13,2) غم ميثيونين.

انتاج 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 الى حامض الاسبارجين.

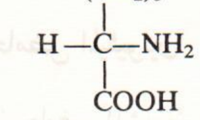
أما السلالات Pseudomonas Fluorescensea, E coli K_{12} فإنها ايضاً تنتج حامض الاسبارجين من حامض الفورميك وبنسبة 95%.

ولتطور علم البيوتكنولوجي فقد تم تحويل 99% من الفورمات الى حامض اسبارجين من السلالة *E coli* ومن نسبة لقاح «1%» وفي بيئة غذائية تحتوي على «5%» فورمات الامونيا وعند pH «7,2-7,4» ودرجة حرارة 37 م° وفترة حضن دامت 24 ساعة.

حامض السترولين

يمكن للسلالة الاكسوثروفية *Bacillus subtilus* والتي تحتاج الى منشط لعلاقتها مع حامض الارجنين حيث تؤلف حامض السترولين وبكمية 16,5 غم / لتر وفترة حضن تقارب 72 ساعة وعند درجة حرارة 34 م°، ومقومات الوسط الغذائي هي النسب المئوية التالية:

كلوكوز	%13
KH_2PO_4	%0,3
$MgSo_4.7H_2O$	%0,04
NH_4Cl	%3,0



الصيغة البنائية للحامض

محلل من فول الصويا 1,0%، امونات الحديد 2 ملغم / لتر، امونات المنغنيز 2 ملغم / لتر، بيوتين 4 ملغم/لتر، ثيامين 200 ملغم / لتر.

+ خليط من أحماض امينية 0,3% وبعد فترة الحضن يضاف 50% $CaCo_3$.

حامض L ـ هوموسيرين

يمكن للسلالة الاكسوتروفية *micrococcus glatamicus* التي تصنع الثيرونين أن تصنع L ـ هوموسيرين وبحدود 7 غم/لتر في البيئة الغذائية وعند حاضن هزاز Incubater shaker ودرجة حرارة حضن 28 م° وفي بيئة ذات المكونات التالية: كلوكوز 10%، NH_4SO_4 2%، مستخلص الخمائر 0,5%، $MgSO_4.7H_2O$ 0,3%، K_2HPO_4 0,1%، $CaCo_3$ 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 Bioteine بكمية (3-30) ملغم / لتر وكمية من الثيرونين بحدود «400-500» ملغم / لتر.

فإن انتاج الهوموسيرين سيكون بحدود 13-15 غم / لتر واللابسين 9 غم / لتر. ولكن ظهور أي كمية من الميثونين في الوسط سيعمل على منع بناء الهوموسيرين.

حامض L ـ أيزوليوتسين

إن حامض L ـ ايزوليوتسين هو احد أعلى الأحماض الامينية، والكميات المنتجة من هذا الحامض قليلة. ويعتمد انتاجه على مكونات البيئة الغذائية المستخدمة، ونوعية الاحياء المنماة. حيث هنالك الكثير من الأحياء المجهرية التي تؤلف L ـ ايزولوتسين مثل *Pseudomonas* sp. والتي تنتج بحدود 12 غم / لتر عندما تزرع على بيئة معقدة تحتوي على 20 غم/لتر احماض امينية ودهنية وعند ظروف تهوية ملائمة والمحضونة في حاضن هزاز، أما السلالة *B. Subtilis* فانها تؤلف L ـ ايزولوتسين عند وجود L و D احماض امينية دهنية.

لقد تم تنميتها في بيئة غذائية تحتوي على 10% كلوكوز، كارباميد، مستخلص فول الصويا، ببتون، املاح لا عضوية 1% انتجت 6 غم/لتر ايزولوتسين.

أما الأنواع الأخرى من الأحياء المجهرية *Micrococous glutamicus*، *E-Coli*, *Breivibacterium ammoniager* فهي منتجة لهذا الحامض ولكن بحدود معينة.

- أما السلالات *Streptomyces rimosus*، *Serratia marcescens* فتحتاج الى حامض الثيرونين في البيئة لأجل تأليف حامض L ـ ايزولوتسين ـ وعند الظروف الهوائية وبكمية تقدر 4-6 غم/لتر.

حامض L-Ornithin

إن تأليف حامض L-Ornithin من السلالات المتحورة كالسلالة *Micrococcus glutamicus* ـ وعند توفر السترولين، الارجنين، أوكسي تروفين في البيئة الغذائية وعند ظروف حضن 28 م° وفترة حضن 72 ساعة انتجت كمية من هذا الحامض L-ornithin تقدر بـ 26,2 غم / لتر من بيئة غذائية ذات المكونات التالية :

كلوكوز 10%، K_2HPO_4 0,1%، $MgSO_4.7H_2O$ 0,025%، NH_4Cl 1,0%، كارياميد 0,3%، مستخلص الذرة الصفراء 0,5%، N-Z-amine 1%، pH 6-7.

وميكانزم الانتاج يعتمد على تحويل الارجنين بعد استهلاكه من قبل الكائنات المجهرية الى كلوتامات ومنع فسفرة N-acetylglytamat والتي تعتبر من المنتوجات الوسطية في سلسلة العمليات الانتاجية الايضية لتكوين الاورثين من الكلوتامات.

حامض L-Therosine و L-phenylalanin

بدأ انتاج هذه الأحماض الامينية من الاحياء المجهرية في سنة 1960 بعد دراسات تكنولوجية ومايكروبيولوجية، وقد حدد الانتاج بـ (500-900) ملغم/لتر فنيل النين.

ولكن في السنوات الأخيرة ونتيجة التطور البيوتكنولوجي تم التعرف على سلالة متحورة من *E coli* ذات الصيغة الاكسوثروفية لعلاقتها مع L-Therosine حيث تم الحصول على 2 غم/لتر فنيل النين.

وقد تم العثور على متحور آخر من نوع *Micrococcus glutamcus* انتجت 2,5 غم/لتر فنيل النين.

وهنالك سلالات اخرى مثل *Alealigenes Facecalis* امكنها من تحويل 63,5 من حامض الى فنيل النين.

أما السلالات *Aerobacter aerogenus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *p. eruciviae*. فقد انتجت 53% من هذا الحامض. ويمكن للسلالات المتحورة *E. coli* و Micrococcus glutamucus من تصنيع Thirosine بدل الفنيل النين ولكن في ظروف تختلف عن ظروف انتاج فنيل النين.

انتاج حامض L-Valine

الفالين حامض اميني الذي كثيراً ما درس من قبل العاملين في حقل التأليف الميكروبيولوجي، حيث تم تأليفه من قبل الاحياء المجهرية عام 1960 من السلالات: *Aerobacter cloacae*، *Aerobacter aerogenus*، التي تعتبر من السلالات ذات الانتاجية العالمية من حامض L-Valine وفي بيئة ذات المكونات التالية:

كلوكوز 10%، NH_4Cl 1,2%، $MgSO_4.7H_2O$ 0,04%، Kd 0,31%، 0,2% KH_2PO_4، K_2HPO_4 0,1%، $CaCO_3$ 3,5%.

و 10 غم / لتر كل من $Ni\ SO_4$-$6H_2O$، $MnSO_4.7H_2O$، $NaMoO_4$. وتحضن عند درجة حرارة 30 م مع التهوية حيث انتجت 13 غم / لتر L-Valine.

كما أن السلالة *Paracolobacterium Californa* تنتج 15 غم/لتر L ـ فالين. وان السلالة *E. Coli* تنتج 7,5 غم/لتر L-Valine. وقد اظهرت السلالة *Brevibaclerium ammonagenus* انتاجية تقدر بـ 6 غم/لتر، أما من السلالة المتحورة *M. glutamicus* فقد اعطت انتاجاً منه بحدود 3,7-8,75 غم/لتر.

حامض البرولين

هنالك عدد كبير من الاحياء المجهرية التي تؤلف حامض البرولين ولكن يمكن القول بأن السلالة *Brevibacterium Flavium* هي السلالة المتخصصة ذات الانتاج العالي وبعد معاملة هذه السلالة بالعوامل الوراثية الفيزياوية كالاشعة فوق البنفسجية، حصل على المتحور *B. Flavium* ATcc 14067 حيث اعطى انتاجاً يقدر بـ 11,4 غم / لتر برولين وعند درجة حرارة حضن 31 م° وعند فترة حضن 72 ساعة وعلى البيئة الغذائية التالية:

كلوكوز 10%، $(NH_4)_2SO_4$ 5,5%، KH_2PO_4 0,1%، $MgSO_4.7H_2O$ 0,04، $CaCO_3$ -,0%، ببتون 0,45، L-Isolysine 0,015 ثيامين 0,28%، Fe^{++}, Mn^{++} 28.

إن تركيز ايزولوتسين والبايوتين مهم لتأليف البرولين، فعند التركيز الواطىء تتيح السلالة حامض palmatic، ولكن عند التركيز العالي فإنها ستؤلف البرولين.

التوقعات المايكروبيولوجية لتأليف الأحماض الأمينية

إن الانتاج المايكروبيولوجي بدأ ينتشر ويتوسع نطاق انتاجه في كل العالم وخصوصاً في

إنتاج حامضي الكوتامين واللايسين، أما انتاج حامض الفالين والايزولتسين فإنه ينتج بحدود معينة في اليابان.

أما الأحماض الامينية كالهوموسيرين، اوزيثين، تسترولين، فطرق انتاجها أصبحت معروفة ولكن تحتاج الى دراسات مستفيضة من الناحية الاقتصادية. كذلك عن التوقف عند بعض التحولات كتحويل حامض الفورميك الى اسبارجين أو phenyl pregluasic acid الى فنيل النين، كذلك يجب دراسة الطرق التكنولوجية لانتاج الميتوثين، ثيرونين، تريتوفان، حيث أنها تحتاج الى دراسات أوسع والعمل على إيجاد مصادر خام لها. كذلك أن الاحياء المجهرية من خلال عملها فإنها تنتج بعض المركبات الوسطية وبكمية كبيرة. وأهميتها كبيرة لذا فالحصول عليها صعب لانها تحتاج الى السيطرة على الميكانزم وعلى الدالات الوظيفية للاحياء المجهرية (أجسامها).

كذلك من الضروري معرفة الناحية الفسلجية وكذلك ديناميكية نمو هذه الأحياء، ومعرفة مزايا السلالة هل هي اكسوثروفية ام لا.

ثم إذا كانت السلالة اكسوثرفية المستعملة فإن التمثيل الايضي سيؤثر على الطريقة. وتحتاج الطريقة الى تنظيم للروابط المستعملة لكي نحصل على أحماض امينية بصورة مستمرة.

وكذلك تحتاج بعض العمليات الى مواد لانتاج الالنين والكلايسين واللزين. ويعتبر عصير التمر مادة خام وجيدة لانتاج الاحماض الأمينية، خصوصاً وأن القطر العراقي من الأقطار ذات الانتاج الكبير لهذه المادة الخام وأن التوجه الى استخدامها أصبح من الضرورة بمكان.

الفصل الثالث عشر

انتاج المضادات الحياتية

production Technology of Antibiotics

تعرف المضادات الحياتية أو المضادات الحيوية بأنها المواد الكيمياوية العضوية التي تنتجها أحياء مجهرية كنواتج أيضية ولها تأثير مبيد أو موقف لنمو غيرها من الأحياء المجهرية. وقد أشار الى ذلك Waksman 1942 حيث اعتبر المواد الكيماوية الحاصل عليها من الأحياء المجهرية والتي لها تأثير مثبط للنمو أو لها تأثير قاتل لاحياء 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 الى مادة الكنين واللوزيما. وفي عام 1929 استطاع Fleming من اكتشاف الجزء الأكبر من المضادات الحيوية التي لها تأثير قاتل للاعفان 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 ـ الأحماض الأمينية والسكريات. وعلى العموم فإن المشكلة في تأليف المضاد الحيوي تقف عند حالتين. وهي الارتباط مع خواص الصفات الكيمياوية للمواد مثل البولي سكرايد Polysacchride والبناء البتيدي 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 التغيير في التمثيل الايضي، هذه الأخطاء الايضية يمكن أن تكون عميقة بعد تثبيتها وراثياً بواسطة الانتخاب الوراثي (Mutant) للسلالات، وطبيعي أن مثل هذا العمل سيحسن من صفات السلالة الرئيسية Original strain وبهذا سنحصل على الكثير من السلالات ذات الانتاج العالي للمضاد الحيوي، فمثلاً انتاج البنسلين كان

تحت 1000 وحدة/مل وباستعمال السلالة Penicillum Chrysogenum Q 176 وبعد عملية الانتخاب الوراثي (Genetic Selection) للسلالة NRRL 1951 اعطت انتاج 2000 وحدة/مل. أما انتاج المضاد بنزل بنسلين كان يتزايد بنفس الطريقة الى Mg (8) (التي تكافي 13000 وحدة اوكسفوردية/مل).

وفي خلال 20-25 سنة الأخيرة تم اكتشاف أكثر من 1200 مضاداً حيوياً، 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 التسفالوسبورين والريفومايسين، والديهايدروستربتومايسين Dihydrostreptomysin، والأخيرة يتم الحصول عليها نتيجة التركيب أو خلط أحد المخلفات الميكروبيولوجية مع التحويرات الكيمياوية. فمثلاً الكلور فينكول يحصل عليه صناعياً بواسطة التركيب الكيمياوي. لذا وجب إضافة المركبات الكيمياوية لكي يحصل على البنسلين، التسافلوسبورين، بولي ميكسن، الكرامسيدي، والكريزوفلافين. . . الخ. وكذلك مجموعة التراسايكلين، مجموعة البنسلين. والجدول التالي يوضح الأحياء التي تؤلف المضادات الحيوية على نطاق صناعي:

الجدول رقم (13) يبين الأحياء المجهرية المستعملة لتحضير المضادات الحيوية صناعياً

الكائن المجهري الحي	المضاد الحيوي	النوع الكيمياوي	المؤشر الحيوي
Streptomyces Canus	امفومايسين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces nodosus	امفوتربسين	بولي ببتايد	طحالب، خمائر
B. Subtilis	اثرومين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
B. Subtilis	باستروتسيا	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces griseochromogenes	بلاستدين	بولي ببتايد	طحالب
Streptomyces griseus	كانديستين	بولي ببتايد	طحالب، خمائر
Bacillus colistinus	كوليستن	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces griseus	تسكلوهكساميد	بولي ببتايد	طحالب
Streptomyces orchidaceus	تسكلوسيرين	احماض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces erythreus	ارثرومايسين	مايكروليد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Fusidium coccineum	حامض الفوزدنيك	سيترويد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Microsporium purpurea	كنفامايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Bacillus brives	كرامايسين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام

الكائن المجهري الحي	المضاد الحيوي	النوع الكيمياوي	المؤشر الحيوي
Pencillum griseofulvum	كريزوفلافين	بولي ببتايد	طحالب
Streptomyces hydroscopicus	هيكرومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام
Streptomyces kanamycetieus	كنامايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام
Streptomyces kitasoensis	لفكومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام
Streptomyces fradiae	بتومتسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces nivens	نوفوبتوتسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces noursei	نيستالين	بولي ببتايد	طحالب، خمائر
Streptomyces antibioticus	أوليوندمايسين	مايكروليد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces rimosus	بارومومانسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام وبروتوزوا
Bacillus polymyxa	بولي ميكسن B	بولي ببتايد	بكتريا سالبة لصبغة كرام
Streptomycen sp.	ستربتومايسين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomycen mediteranei	ريفوماتسين SV	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Wocardia lurida	ريستوتسين	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces ambotaceim	سيرامايسين	مايكروليد	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام والركتسيا
Streptomyces virginae	ستافيلومايسين	ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces endus	ستندومايسين	ببتايد	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام
Streptomyces griseus	ستربتومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام TB
المنتوج الكيمياوي للستربتومايسين	داي هايدرومايسين	كاربوهيدرات	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام TB
Streptomyces azureus	ثيوتربتون	بولي ببتايد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces fradiae	ثيلوزين	مكايكروليد	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Streptomyces hachjoin	تري هوموسيرين	بولي ببتايد	طحالب، خمائر
		النبسلين	
Pencillum chrysogenum	بنسلين G	منتوج حوامض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Pencillum Chrysogenum	بنسلين V	منتوج حوامض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
Pencillum chrysogenum	بنسلين O	منتوج حوامض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
المنتوج الكيمياوي لـ 6-amino pencillic acid	كلوكوساتسيلين	منتوج حوامض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
	ديكلوساتسيلين	منتوج حوامض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
	نافتسلين	منتوج حوامض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام

الكائن المجهري الحي	المضاد الحيوي	النوع الكيمياوي	المؤشر الحيوي
	اوكساتسلين	منتوج حوامض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
	فينسليلين	منتوج حوامض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
	امبسلين	منتوج حوامض امينية	بكتريا موجبة لصبغة كرام
	التراسايكلين		
Streptomyces aureofacienus	كلورانتراسايكلين	انتراتسايكلين	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام
Streptomyces aureofacienus	G ـ داي مثيل ـ 7 كلوروتداسايكلين	انتراتسايكلين	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام
Streptomyces rimose	5 ـ هيدروكسيا تتراسايكلين	انتراتسايكلين	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام
Streptomyces aureofacienus	تتراسايكلين	انتراتسايكلين	بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام والركتسيا

الطرق العامة لتحضير المضادات الحيوية:

إن أكثر المضادات الحيوية المتوفرة حالياً في السوق العالمية هي نتيجة الانتاج 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 والانتاج رغم أن المنتجين الكبار يعتبرون هذه التفصيلات عن طرق التحضير سراً ولا يمكن الاعلان عنه لاسباب احتكارية وتجارية. ولكن لسبب التقدم العلمي والتكنولوجي في أكثر دول العالم جعل المخطط العام لطرق التحضير والانتاج 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 الانتاجي Production Fermenter لكثير من المواد له حجم يقارب 110-135 م^3 حيث يكون ارتفاعه اعتيادياً ضعف العرض وهي أجهزة على العموم تكون معلقة وذات تخصص للانتاج المعقم من كائن مجهري معين. وتصنع هذه المخمرات من حديد الصلب غير القابل للصدأ أو من صفائح الكروم ـ النيكلية. 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 الانتاجية للمضادات الحيوية تشبه أي عملية مايكروبايولوجية صناعية ولكن عملية التعقيم تكون ملاحقة للانتاج في المخمر الانتاجي، ابتداءاً من المخمر المختبري ومن الضروري مراقبة العملية بعد توفير كل شروط التعقيم منعاً للتلوث بالاحياء 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 مقارب 1% والموجود في طور النمو اللوغارتمي log phase مع التحريك والتهوية والحرارة المناسبة للسلالة.

تحضير اللقاح Preparation of Inoclum Culture

إن من أولى الأمور في أي عملية مايكروبايولوجية انتاجية صناعية تبدأ بعملية اعداد اللقاح من المختبر بالاعتماد على أنبوبة الاختبار الى الفلاسك الى 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 الى المخمر الانتاجي. وتوجد نشريات عديدة عن نماذج لخزانات التخمير الكبيرة الحجم للقاح والتي فيها يمكن أن يعد اللقاح والذي يمثل بحدود 10% من حجم الوسط الانتاجي. كما أن حامضية الوسط (pH) وإضافة المواد الغذائية يكون حسب المتطلبات القياسية المناسبة للسلالة. ويجب أن نعلم بأن طرق انتاج المضادات الحيوية المختلفة لها خصائص معينة والتي يجب أن تلاحظ باستمرار.

طرق التربية المستمرة Continuous Culture

لتحضير المضادات الحيوية بالطريقة المستمرة Continuous Culture، ولهذا الموضوع نشريات وامتيازات Patent ولكن أكثرها تعود الى التقنيات المختبرية أو العمليات شبه الإنتاجية. فعند العملية الميكروبيولوجية لتخليق أي مضاد حيوي يجب أن نعلم بأنه ليس دائماً يكون نمو المزرعة وتأليف المضاد الحيوي في وقت واحد، لأن ظروف نمو المزرعة من (مقومات الوسط، تهوية، pH) تكون مختلفة عن تلك التي تؤدي الى التخليق الأعظم -Max

imum production للمضـاد الحيوي. وهنـاك حالات تشـذ عن هذه القـاعدة، ففي حـالـة التخليق الحيـوي للكلورفينكول Chlorophenicol من السـلالـة Streptomyces venezulae حيث تكون عملية النمو تتماشى مع عملية التأليف الحيوي (كرهارت دبـارليس 1959) ولكن تحضير الكلورفينكول على نطاق صناعي اعتمد الآن فقط على طريقة (التركيب الكيمياوي).

وتوجد نشريـات عديـدة لاستعمال نـظام One stage Fermentation للتحضير المستمـر للمضـادات الحياتيـة وبشكـل خـاص (البنسلين) (كلوشـوف وآخـرون 1952)، وفي حـالـة استعمال الأجهزة مع التحريك والتهويـة، وعلى وسط يحتـوي على سكـر اللاكتـوز والكلوكوز ومستخلص الذرة وعند نمو المزرعة. هؤلاء المؤلفون استطاعوا من تحضير وجبة إنتاجية بمقدار 360 ملغم/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 ايضاحه من قبل (جاكسن 1950 وغيره) واعتبر امتيـازاً انكليزياً باسم جاكسن. علماً بأن اكثر البحوث للتحضير المستمر تعود للأنظمة الثنائية الوعاء double stage system التي يتم في احدى الأوعية حيث تعطي الظروف الملائمة لنمو المزرعة وفي الخزان الثاني حيث يتم فيها التخليق الحيوي للمضاد الحيوي.

وعند توفر الظروف الجيدة للسلالة فتعطي انتـاجاً عـالياً عـلى النطاق المختـبري، ففي حالة البنسلين Penicillin اعطى 1500 وحدة/مل (بيرت وآخرون 1960). لكن بيرت وكـالو استطاعا 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 السابـع للاحيـاء المجهريـة عن الظروف شبه العملية لانتاج الستربتومايسين من السلالة Streptomyces griseus وبالـطريقة المستمـرة وفي مخمر ذي حجم 3000 لتر حيث حصل على انتـاج 75-80% ستربتـومايسـين وقد شخص بعض الصعوبات التي وجدها من حيث الكلفـة وأشار إلى أن المصـانع الضخمـة لا يمكن أن تكون مؤهلة لعملية الانتاج المستمر للمضادات الحيوية.

الأحياء المجهرية ـ المجاميع الاساسية للمضادات الحيوية:

المضادات الحيوية يمكن ترتيبها من حيث الانتاج على الأسس التالية:

أ ـ اذا أخذنا بنظر الاعتبار الاحياء المصنعة فيمكن تقسيمها الى بكترية، اكتيوماستينس، طحلبية.. الخ.

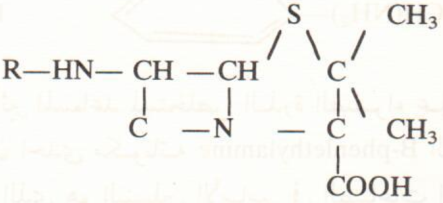
ب ـ اما اذا أخذنا بنظر الاعتبار خاصية التأثير فيمكن تصنيفها ضد الطحالب، ضد البكتريا، ضد الفيروسات.

جـ ـ اما إذا أخذنا بنظر الاعتبار التركيب الكيمياوي فيمكن تصنيفها حسب التركيب الكيمياوي لأن ميكانيكية التأثير مربوطة بالتركيب الكيمياوي.

المضادات الحيوية ذات الحوامض الأمينية Amino Acid Antibiotics

البنسلين Penicilin

منتج حيوي وهو أحد المجاميع ذات التجانس من حيث التركيب والذي يمتلك تقريباً نفس الصفات للمضاد الحيوي. المنتوجات المتفرقة لهذه المجموعة يتميز الواحد عن الآخر بالأصرة الاميدية amide bond في مختلف السلاسل الجانبية والتابعة لنظام عام لمجموعة نواة (B-lactonituazolidenic) المكثفة والمعروفة كحامض 6-amino penicillic acid.



التركيب العام لحامض الامينوبنسلين Amino penicillic acid

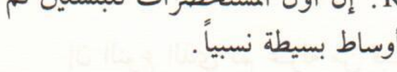
البنسلينات تتميز في الطبيعة بمجموعة R-group. إن أول المستحضرات للبنسلين تم تحضيرها من سطح مزارع Penicillum notatum على أوساط بسيطة نسبياً.

بنسلين N (تسافلوسبورين) D-α aminoadinel-Penicillin — $R{=}CO(CH_2)_3\ CN(NH_2)\ COOH$

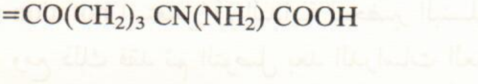
بنسلين F ($\triangle^2$-pentenl penicillin) — $R{=}-COOH_2\ OH{:}CH.CH_2CH_3$

بنسلين K(n-heptal-penicillin) — $R{=}-CO(CH_2)_6\ CH_3$

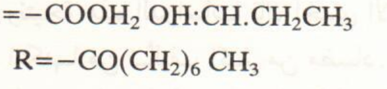
بنسلين G(benzel-penicillin)

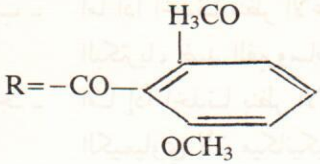


بنسلين X(p-hydroxybenzel-penicillin)

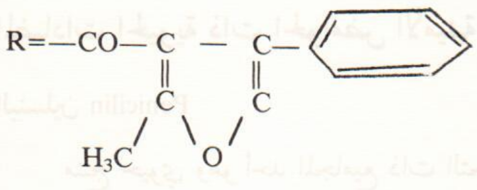


بنسلين V(phenoxy methyl-penicillin)





بنسلين [6-(2,6 Dimetoxy benzamid penicillin]

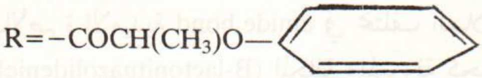


كلوكسيد تسلين

[6-(5-methyl-3-orthochlorophynel

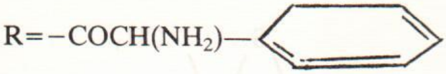
Iso gasol-carbamile pencillin-]

فينوكسي اثيل بنسلين



(α-phenoxy ethel penicillin)

امبسلين



D-aminophenol acidamid penicillin

وفي سنة 1941 تم اكتشاف التأثير المساعد لمستخلص الذرة الصفراء على التخليق الحيوي للبنسلين وفي ذات الوقت تكون احدى مكوناته B-phenlethylamine الذي يوجه التخليق الحيوي نحو تحضير G بنسلين الذي هو البنسلين الأساسي في الصناعات البنسلينية .

الاحياء المجهرية Mictoorganism

إن النوع الذي تم عزله من قبل فلمنك Flaming والذي عرف باسم Penicillum notation استعمل في البداية لتحضير البنسلين الا أن هذه السلالة كانت واطئة الانتاج، ومع ذلك فقد تم التوصل بعد الدراسات العديدة لانتخاب سلالات جديدة اكثر انتاجية . ونتيجة هذه الدراسات فإن احدى الاحتمالات الطبيعية لسلالة فلمنك (NRRL-1249-B-21) امكنها من تأليف اكثر من مضاد. ونتيجة لهذا العزل المستمر للسلالات تم ابتكار التحسينات التطويرية على الطريقة المستعملة لتحضير البنسلين وتبعاً لذلك فقد ارتفعت منتوجات البنسلين الى 200 وحدة / مل (الوحدة الاوكسفوردية الواحدة 0.6 Mg) مع توفير الظروف. ومع العمل الوراثي للسلالات التي استعملت من النوع P. notatum تم اكتشاف انواع 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 الانتاج في الظروف العميقة. ان هذا التطور وتكوين المضاد الحيوي اثناء هذه التقنيات أمكن عزل

عفن البطيخ. وهي سلالة من نوع Penicellium chrysogenum التي عرفت بسلالة (NRRL-1951) والتي أظهرت حيوية في تصنيع البنسلين في التربية العميقة.

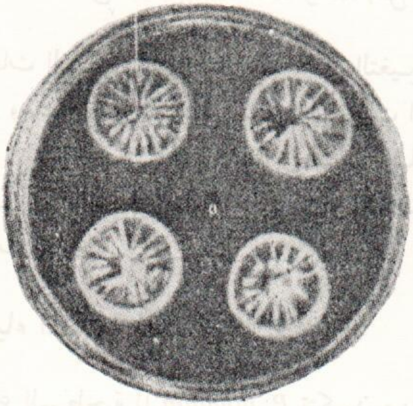
Penicillium chrysogenum

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 ـ دوكسن.

السلالة P. chrysogenum تكون مستعمرات بعد 10-12 يوم وبأقطار 4-5,5 سم وذات نصف قطر أخدودي، وتكون المستعمرة مغطاة بالكونيدات المرصوفة بشكل كثيف. ولكن عند بعض السلالات يمكن أن تكون هذه الظاهرة ضعيفة جداً.

المايسليم لهذه السلالة ذو لون مائل الى الاصفرار مع فوارق مختلفة في اللون، في حين أن السطح المغطى بالكونيدات يكون ذا لون أصفر ـ مخضر أو أزرق ـ مخضر. أن الحافة الخارجية يكون لونها ضارباً الى البياض بعرض 1-4 ملم (شكل 42).

شكل (43)



Penicillium chrysogenum Q176.

حاملات الكونيديا تكون متناظرة وبشكل مختلف وتكون ذات ارتفاع (150-350) ميكرون وذات سمك 3-3,5 ميكرون، بعد تحضير التشعبات الأولية تحضر العينة بـ 3-5 تفرعات. والتفرعات تكون حاملة للسترجمات stregma.

تكون سلاسل من الكونيديا وبأطوال تصل الى 15-20 ميكرون وذات سمك 3-3,5.

والعينة (10-12)×(3,5-5) ميكرون والسترجمات (6-10)×(2-2,5) ميكرون. الكونيدات تكون ذات شكل اهليجي أو بيضوي أو حلقي ولها أبعاد (3-4)×(2,8-3,5) ميكرون وذات سطوح ملساء وتبدو تحت الميكروسكوب عديمة اللون. وبواسطة الانتخاب الوراثي للسلالة NRRL 1951 تم عزل السلالة NRRL 1951-B-25 وبمؤشرات افضل بكثير من السلالة الأساسية. في معهد كارايكي هذه السلالة الجديدة تم تعريضها لأشعة X (X Rays). وأن أحد المستعمرات التي بقيت على قيد الحياة ظهرت بأنها اكثر فعالية وأكثر انتاجية مرتين.

ديمرس 1948 استطاع انتاج 300 وحدة/مل من السلالة X-1612 بعد تعريضها الى عمل اضافي بأشعة X والأشعة فوق البنفسجية.

باسكي وآخرون 1955 استطاعوا من تشكيل عائلة كاملة من الضروب دعيت بعائلة ويسكونسن (شكل 43) احدى هذه الضروب من عائلة ويسكونسن Q 176 اعطت انتاجاً بـ 1200 وحدة/مل. وبنفس الطريقة تم عزل السلالة NRRL 49-133 بفعالية عالية ومن أسبور واحد وهي الآن مستعملة بكثرة في الصناعة. كما أن السلالة NRRL-49-133 وكذلك السلالة (Wis Q-176) وأجناسهم لها صفات كثيرة لم تكن موجودة في المزارع الأصلية. فمثلاً أنها لا تصنع الصبغة الصفراء Yellow pegment ولا الكريزوكنين ولكنها تصنع benzel-penicillin. كذلك وصل الحد الأعلى للانتاج بـ 13000 وحدة/مل (جايين 1966).

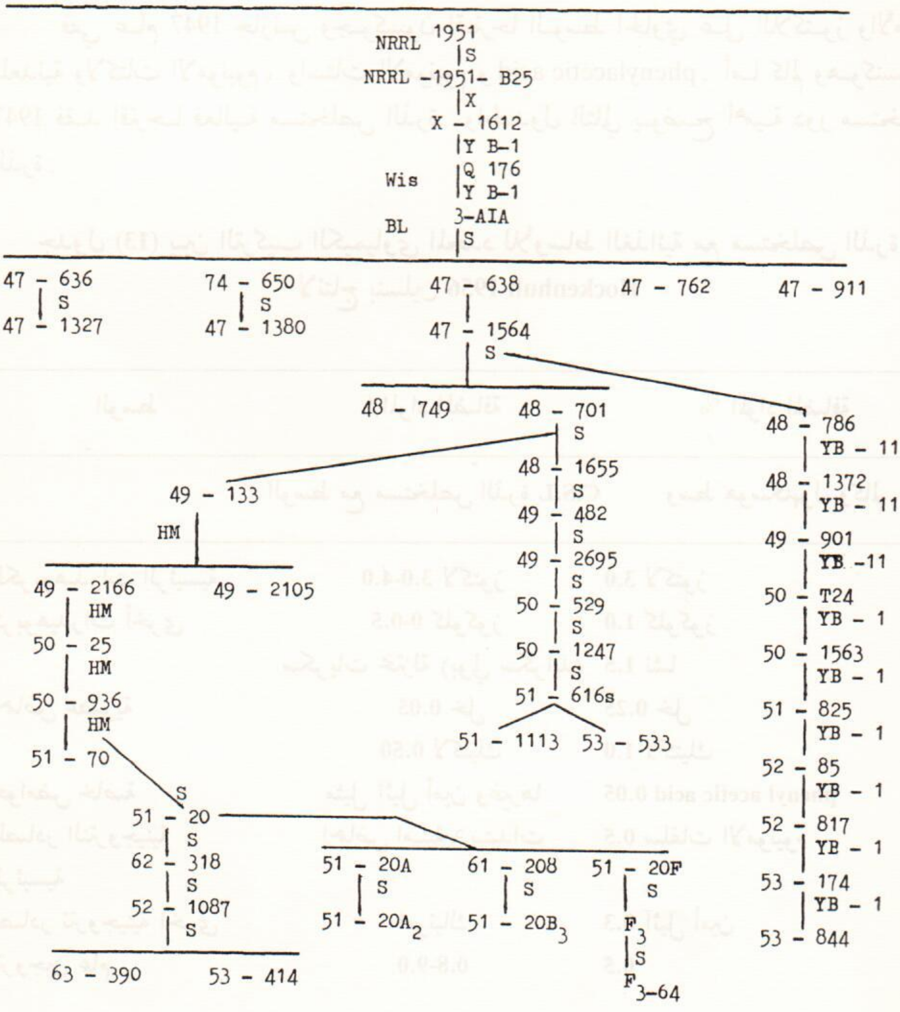
ولكن على العموم ان مشتقات البنسلين تمتاز بقابليتها على التغيير حيث كلما كان انتاجها اعلى كلما ظهرت أقل ثباتاً. وهذه الصفة لها تأثير كبير على تثبيت الاشكال النهائية لهذه السلالات العالية التصنيع، تزرع على Slant agar في تربة جافة أو بالتجفيد lifolization أو مثل الأشكال الأسبورية أو عمل انتشار خلوي. أو إحاطتها بالنايتروجين السائل. وأكثر المزارع تعرضاً لتأثيرات خارجية.

التربية على نطاق صناعي للإحياء المصنعة للبنسلين

إن الأوساط الغذائية للمزارع السطحية للـ*P. notatum* تتكون من مكونات بسيطة نسبياً وتكون شبيهة بأوساط جابك ـ دوكس. وبالتجارب تم معرفة دور سكر اللاكتوز لهذه الأوساط بحيث يساعد في نمو وتطور المزرعة اكثر نتيجة لبنائها البطيء الذي يحتاجه المصدر الكربوهيدراتي بشكل أكثر توازناً. كذلك إن اضافة المصادر النيتروجينية الى الوسط الغذائي هو الآخر فمثلاً اضافة الكازين المتحلل، مستخلص الخمائر، مستخلص الذرة الصفراء، مستخلص المحاصيل الزيتية ـ القطن، الفستق، الفول... الخ يزيد من انتاج البنسلين. كذلك دور مستخلص الذرة مثلاً له دور آخر حيث يؤدي الى المساعدة في تكوين حامض

شكل (44)

الروابط الوراثية لضروب P. chrysogenum من عائلة (وسكونسن) فاسك وستافر (١٩٥٥)



phenylacetic acid الذي يعتبر كوحدة اساسية لتأليف benzel penicillin. لذا فإن انتقاء وتركيب الوسط الغذائي لمرحلة انتاجية هو مسألة ضرورية وفي غاية الأهمية. فبالرغم من أن سر تركيب هذه الأوساط اصبح احتكاراً للشركات المنتجة، إلاّ تركيبها العام أصبح الآن واحداً نسبياً.

ففي عام 1947 جارنس وجوكسون اقترحا الوسط الحاوي على اللاكتوز والأملاح المعدنية ولاكتات الامونيوم، واستات الامونيوم و phenylacetic acid. أما كالم وهوكنسهول 1947 فقد اقترحا فعالية مستخلص الذرة. والجدول التالي يوضح أهمية دور مستخلص الذرة.

جدول (13) يبين التركيب الكيمياوي المحدد للأوساط الغذائية مع مستخلص الذرة لانتاج بنسلين Hockenhull 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	**0-0.5 كلوكوز**	**1.0 كلوكوز**
	سكريات مختزلة (بولي سكرايد)	**1.5 نشا**
احماض عضوية	**0.05 خل**	**0.25 خل**
	0.50 لاكتيك	**1.0 لاكتيك**
حوامض خاصة	**مثيل آثيل أمين وغيرها**	**phenyl acetic acid 0.05**
المصادر النتروجينية الرئيسية	**احماض امينية، ببتيدات**	**0.5 سلفات الامونيوم**
مصادر نتروجينية اخرى	**امونياك**	**0.3 آثيل أمين**
نتروجين عام	**0.8-9.0**	**0.5**

ولأجل موازنة pH يضاف كميات من كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ بحدود (0.05%) الى الوسط الغذائي حيث ان 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 الايونات (PO_4^{-3}) وكذلك على دور الحوامل الحامضية كاللاكتات والاستات، وعلى المنتجات الوسطية نتيجة الميتابولزم، لذا يجب أن يكون pH بحدود (7,4-6,8).

وقد تضاف الزيوت النباتية والحيوانية الى الوسط الغذائي ليس فقط كمواد مانعة ولكن كمصادر كاربونية وللطاقة. ونتيجة لذلك فقد ارتفع الانتاج (برمان 1949، كورسورت 1951) وقد ثبت تأثير هذه الزيوت يعود الى استرات الحوامض الدهنية. كذلك فإن العامل المثالي المؤثر على الانتاج هو لزوم وجود سلاسل كاربونية ذات (14) ذرة، علماً بأن oxidation له دور كبير في حالة الحوامض الدهنية المتواجدة في الطبيعة وخصوصاً C_{14-15} كذلك، أثبتت التجارب بأن التراكيز القليلة للثايوسلفات Thiosulfate تلائم التخليق الحيوي للبنسلين حيث تحدد سمية الحامل phenyl acetic acid للطحالب (هوسكنهول وآخرون 1953).

وعموماً فإن تركيب الوسط الانتاجي المميز هو الآتي:

لاكتوز	%3,5
كلوكوز	%1
مستخلص الذرة (مادة جافة)	%3,5
كاربونات الكالسيوم	%1
KH_2PO_4	%0,4
الدهون النباتية والحيوانية	%0,25
pH	6

تحضير اللقاح والمزارع الانتاجية

يتم تحضير اللقاح في دورق حجم 500 مل يحتوي على 100 مل وسط غذائي وتوضع فيه 1,5% كونيدات منتشرة (Suspention) من السلالة *P. chrysogenum* والنامية في وسط الحاوي على 2,5% كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ الملائم لتكوين الاسبورات والمحضونة عند درجة حرارة 25° م في حاضن هزاز وعند 250 دورة/دقيقة.

وفي نهاية الطور اللوغارتمي بعد فترة حضن اربعة أيام تنقل المزرعة الى دورق ذي حجم أربع لترات والحاوية على 2 لتر وسط، ويتم الحضن بنفس الظروف لمدة يومين في حاضن هزاز، وتتم ايضاً عملية نقل المزرعة الجديدة الى مخمر (Fermenter) حجم 800 لتر

والحاوي على وسط 500 لتر، ويكون المخمر معمولاً من صلب غير قابل للصدأ ومجهزاً بأجهزة تهوية وتحريك ومنظماً لدرجات الحرارة النموذجية (مثالية). ويستمر الحضن لمدة ثلاثة أيام ثم تنقل محتويات هذه المزرعة والتي هي في طور النمو expotentional phase الى مخمر ثانٍ حيث تتم التربية فيه بنفس الشروط. وتتم عملية تلقيح الفرمتورات الثانية بنسبة 10% (من اللقاح). وان الوسط الغذائي لتحضير اللقاح ولتحضير المخمرات الانتاجية متشابهة. الا أن المخمرات الانتاجية تحتوي على الحامل، وعلى سكر اللاكتوز بنسبة 2-3% بدلاً من السكر الاعتيادي.

والمخمر (الفرمنتور) الانتاجي يكون بحجم 50 م^3 ويحتوي على وسط غذائي بحجم 30 م^3 ومجهز بأجهزة تهوية وتحريك، وضبط الـ pH بواسطة القواعد والحوامض ومانع الرغوة. علماً بأن وسط الغذائي يكون معقماً مع phenyl acetic acid والعملية الانتاجية تستمر لمدة (5-6) أيام وخلال هذه المدة يتراكم البنسلين في الوسط.

العملية الميكروبيولوجية المحدودة لانتاج البنسلين

إن عملية تحضير البنسلين تتضمن ثلاثة اطوار 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 النتروجينية المعقدة وكذلك قسماً من المصدر الكربوهيدراتي ايضاً وتتراكم الامونياك، كذلك فإن حامض الخليك هو الآخر يختفي بسرعة حتى ولو كانت كمياته قليلة، وفي هذه الحالة ينضب 20% من اللاكتوز (هانك وآخرون 1954).

أما pH الوسط فيرتفع الى 7,5، وفي هذه الفترة يتكون الجزء الأكبر من المايسليم.

أما الطور الثاني، طور النضوج Ripping phase الذي يبدأ بحدود الساعة 48-60 من عملية الحضن عندما ينتهي تقريباً الطور الأول حيث يهضم بسرعة سكر اللاكتوز، والأمونياك اللازم لتأليف المايسليم.

ولأجل عملية تأليف البنسلين فاللاكتات عادة لا تهضم طالما أن السكر موجود في الوسط.

تطور النضوج هو أساس التخليق الحيوي للبنسلين، ومن المهم جداً في هذا الطور أن يكون pH (7) لأنه في حالة pH فوق 7,5 وبوجود املاح الأمونيا فأن البنسلين المتكون ينهدم بسرعة، وكذلك يجب السيطرة على درجة حرارة الطور بحدود 25° م ± 0.5° م (أون وجونسون 1955).

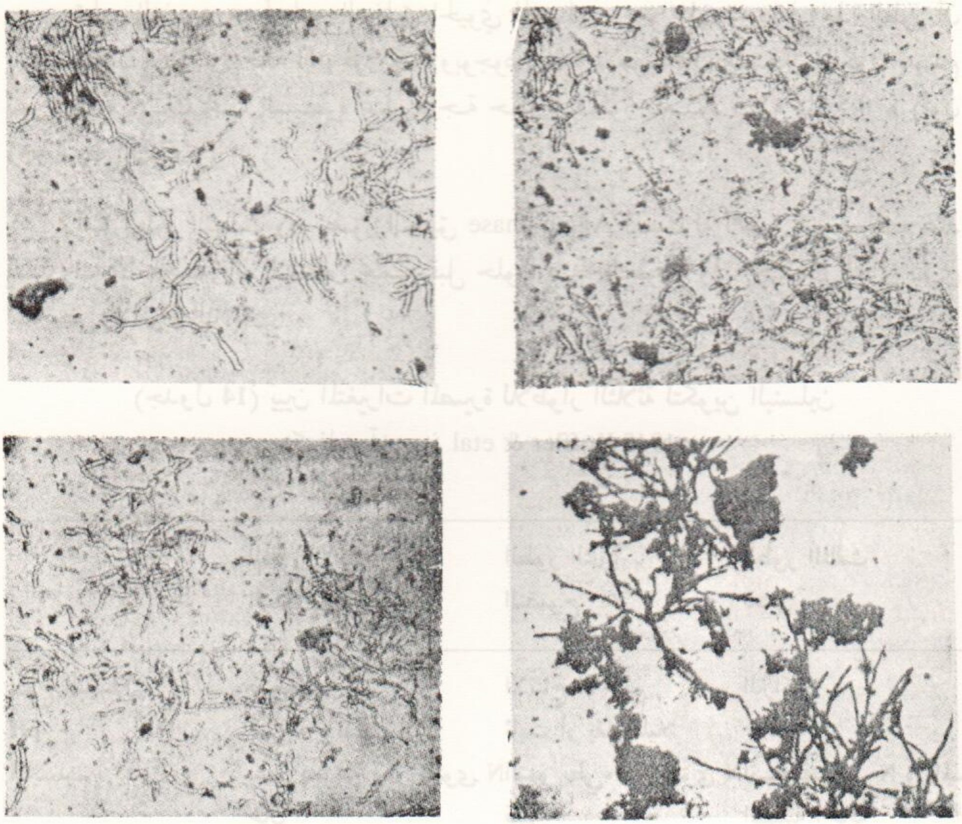
أما الطور الثالث وهو طور التعتيق Aging phase ليست له أهمية كبيرة، لأنه عند الظروف الانتاجية فإن البنسلين يجمع قبل حلول هذا الطور، وفي الجدول التالي نرى تشخيص الأطوار الثلاثة:

(جدول 14) يبين المتغيرات المصيرة للاطوار الثلاثة لتكوين البنسلين

(كوفلر وآخرون Koffler & etal 1945)

	الطور الاول النمو	الطور الثاني النضوج	الطور الثالث تعتيق
انتاج البنسلين	ضعيف	الانتاج الاعظم	التراكم
pH	بسرعة يرتفع	ثابت أو يقل قليلا	——
المايسليم	ينمو بسرعة وذو محتوى N عالٍ	النمو بطيء ذو محتوى N قليل	انخفاض N في المواد الصلبة الجافة
اللاكتوز	يستهلك بطيء	بسرعة يستهلك	ينضب
اللاكتيك	ينضب بسرعة	——	——
الامونيا	يتحرر في الوسط	يستعمل	يتحرر في الوسط
النترات	يستعمل ببطء	يستعمل ببطء	يستعمل ببطء وينضب
N ـ الاموني	يستعمل بشدة	تركيزه ثابت	تركيزه يزداد
الفوسفات اللاعضوية	يستعمل بحده الأقصى وببطء	يستعمل ببطء	لا يستعمل ويتحرر
$Qo_2(N$	حده الاعظم	ينخفض	الى حده الأدنى

أما بالنسبة الى (ليفيوف ولوري 1971) فقد حددا اطوار الانتاج بستة اطوار للسلالة *P. chrysogenum* تبعاً للتغيرات المورفولوجية النوعية (شكل 44).



شكل (45)

Penicilum 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 تدريجياً وفي نهاية الطور تتكون قطرات دهنية.

الطور الثالث: يتضمن تكوين قطرات كبيرة من الدهون وبداية Citrophilic protoplasm.

الطور الرابع: يتضمن هذا الطور بأن تكون الفقاعات مع الحبيبات الدهنية بشكل

قطرات صغيرة وواضحة واضعف 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 ولكنها بدون حبيبات والفراغات المركزية كبيرة، ولا يوجد حبيبات زيتية حيث تستفيد بعض الهايفات ذات التركيب الزيتي. وتبدأ مرحلة التفسخ.

التغيرات الكيموحيوية أثناء التربية:

إن الكثير من خصائص الأوساط الغذائية تكون مرتبطة بطبيعة البنسلين ذا السلاسل الببتدية ووجود كمية كبيرة من الفوسفات والذي هو ضروري للحصول على درجة عالية من phosphoglycen aldehyde phosphologyceric acid مع تراكم البايروفات، وزيادة كمية الفوسفات الكبيرة يضغط على تجميع منتجات السكريات المتفسفرة ويزيد من تكوين ATF حيث يعطي الجو الملائم لاستعمال السكريات والتي تكون المنتجات الحامضية من البايروفات والتي قد تثبط العملية بعدم وجود السكريات، لذا يضاف اللاكتوز الذي يهضم ببطىء. وكمية البايروفات ضرورية لتخليق الفالين Valine. ويمكن توجيهه الى acetate ومع التجميع لتكوين Aceto acetate وحوامض دهنية أو بواسطة اكسدته 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 ايونات الامونيوم عالياً، وخلال الطور الثاني يساعد عمليات الاختزال للـ α-ketoglutarat الى L-glutamic acid ويظهر ميلها لتحديد التأثير على دورة السترات (كرب سايكل) بسبب انعدام C_4 حيث أن المنتوجات الوسطية أو البينية عند مثل هذه الظروف يجب أن تقلل الأكسدة للـ acetyl-CoA بواسطة دورة السترات والتي عندها يدرس تحويل البايروفات الى α-acetic lactat التي هي من المركبات الوسطية لتخليق Valine .

التخليق المتعدد للبنسلين Polyesynthesis of Penicillin

إن التخليق المتعدد للبنسلين يلزم وجوب 6-amino penicillic- والتي يمكن أن يكون

أما اذا كان الغرض لاسباب صيدلانية (عقاقير) فإنه يسحب من المزرعة عن طريق الاستخلاص بواسطة n-butanal ومن ثم تجري عليه عملية غسل بنفس الطريقة. وغالباً ما يستعمل الباسترين الحاوي على الزنك كمنتوج عالي الفعالية وقابليته مرتفعة عند الحفظ. وجدول رقم (16) يبين بعض الخصائص النوعية للعمليات الميكروبيولوجية لتحضير الباسترين.

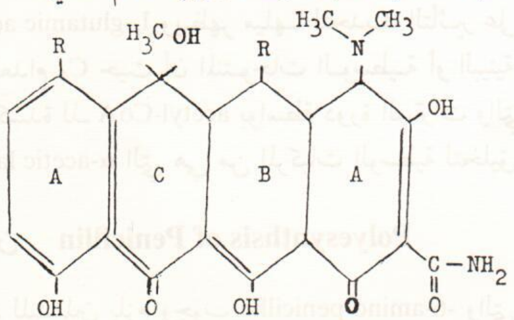
جدول رقم (16) يوضح بعض الخصائص النوعية لتحضير الباسترين

الباسترين وحدة/مل	مدة الحضن	طرق التهوية	مكونات الوسط
26-10	(5-3) يوم	على سطح المزرعة	تربتون، مستخلص اللحم Broth
88	(7) يوم	على سطح المزرعة	طحين الصويا، نشا، لاكتات الكالسيوم
90-80	(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 1024 :1 يثبط (مانع) النمو لمجموعة خاصة هي Streptoccocus وعند ظروف معينة.

التتراسايكلين

المضادات الحيوية التتراسايكلينية تشكل أو تكوّن مجموعة متقاربة جنسياً وهي ذات تأثير واسع وذو أهمية صناعية عظيمة ولها التركيب العام التالي:



تتراسايكلين ($R_1=R_2=H$)

أوكسي تتراسايكلين (ترامايسين) $=(R_1=H; R_2=OH)-$

كلوروتتراسايكلين (أورمايسين) $= (R_1=C_1; R_2=H) -$

بروموتتراسايكلين $R_1=Br;R_2=H$

الذرات الكربونية asemetric والتتراسايكلينات يملك عموداً عاماً هو Hydro Naphtazenic وهي فعالة (invivo) ضد الكثير من الأحياء المجهرية الـ g+ve, G−ve وضد بعض الركتسيا المرضية والكثير من الفايروسات وتأثيرها قبل كل شيء Bacterostatic ولكن عند التراكيز العالية يكون Bacterocide وعدا ذلك فالكلورتتراسايكلين والأوكسي تتراسايكلين لها القابلية على تثبط نمو النباتات، الطيور، الخنازير، ولذلك وجد لها بعض التطبيقات في المخاليط الغذائية.

وفي عام 1948 تمكّن داكر من عزل السلالة *Streptomyces aureefaciens* من التربة والتي لها القابلية على تأليف الكلورتتراسايكلين. وبعد سنة من العمل المتواصل استطاع (فاتيلي وآخرون 1950) من عزل *Streptomyces rimosus* من التربة والتي لها القابلية على تأليف اوكسي تتراسايكلين. وخلال العشرين السنة الأخيرة تم عزل العديد من الخطوط من *Streptemyces sp.* المؤلفة للمضادات. والجدول التالي يوضح الأحياء المصنعة للتتراسايكلين.

جدول رقم (17) يوضح مصنعات التتراسايكلين O.TC, TC, CI. TC

الاحياء المجهرية		TC	O.TC
Streptomyces alboflavus	CI.TC	TC	O.TC اكتومايتسين
Streptomyces antibioticus	–	TC	O.TC
Streptomyces aureifacienes	Cl.TC	TC	–
Streptomyces aureus	–	TC	–
Streptomyces Calfernicus	–	TC	اكتومايتسين
Streptomyces cellulosae	–	–	O.TC اكتومايتسين
Streptomyces flaveolus		TC	O.TC
Streptomyces flavus	Cl.TC	TC	O.TC
Streptomyces fuscofaciens	–	–	O.TC

بتحضيره أسهل بطريق كيمياوي. ونتيجة للدراسات تم الكشف عن عدد كبير من المواد المتعددة لتخليق البنسلين 6-amino penicillic acid الذي يمكن أن يحضر بواسطة تهديم Degradation لـ penicillin G_1 من الأنزيم (benzel penicillin-acetalase) وهذه الانزيمات يمكن أن تحضر من الأنواع البكترية المنتجة لصبغة كرام penicillin-amidase الأعفان، الخمائر. والجدول التالي يوضح الأحياء المنتجة للبنسلين.

جدول رقم (15) يوضح الخطوط المكتشفة لانتاج بنسلين اميديز
Penicillin amidase

نوع الاحياء المجهرية	الاحياء التي تؤلف
البكتريا	Pseudomenas, Xanthomonas, Alcaligenus, Flavobacterium, Escherichia, Aerobacter, Erwina, Serratia, Protus, Bordetella, Microceccus, Sarcina, Corynebacterium, Cellomonas, Nocardia, Bacillus.
الفطريات والطحالب	Alfernaria, Aspergillus, Epicoccum, Fasarium, Mucor, Penicillium, Phoma, Trichoderma.
الخمائر	Cryptococcus, Saccharomyces, Trichosporon
الاكتنوماستس	Streptomyces

سافيلوسبورين **Cephalosporium**

السافيلوسبورين مضاد حيوي من أنواع البنسلين. ويتألف أو يصنع 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 نواحٍ للتي تستعمل في تحضير البنسلين Polysynthesis of Antibiotics from Bacteria.

التأليف الحيوي للمضادات من البكتريا

المضادات الحيوية شبه ببتدية من أصل بكتري:

تنسب الى هذه المجموعة المضادات الحيوية الباسلائية مثل كراماسين، بولي ميكسين، التايروساندين.

المجموعة الباسلائية Bacillis group

السلالة الرئيسية والمصنعة للباسترين تعزل من تكسير أو تجزء السلالة حيث في البداية كانت تنتج من الـ Bacillis subtilis ولكن بعد الاكتشافات تم انتاجها من *B. Licheniformis* . و B. licheniformis تؤلف مجموعة مختلطة من المضادات الحياتية شبه ببتدي متجانسة وخاصة الباسترين A، A_1، B، C، D، E، F، F_1، F_2، F_3، G ومن كل هذه المضادات فقط باسترين A له تأثير مضاد للاحياء المجهرية وبشكل عالٍ جداً. ولأجل تحضير الباسترين تطبق التربية العميقة المتقطعة (نظام الدفعة) انكيب 1951 والتي حققت نجاحاً في عدة معامل في امريكا. وتتم العملية بحفظ السبورات في تربة جافة ومطحونة بدقة. وعند عملية التحضير ينقل الى دورق حجم 4 لتر مع وسط غذائي ذي محتوى ببتون، peptone broth وتحضن في حاضن هزاز عند درجة حرارة 37° م ولمدة 18-14 ساعة ومن ثم ينقل هذا اللقاح الى مخمر لقاحي (Fermenter) حجم 800 لتراً والحاوي على 600 لتر وسط حيث يتم حضن هذه المحتويات عند درجة حرارة 37° م ولمدة 18-14 ساعة ومن ثم ينقل هذا اللقاح الى مخمر لقاحي (Fermenter) حجم 800 لتر والحاوي على 600 لتر وسط حيث يتم حضن هذه المحتويات عند درجة حرارة 37° م وعند تهوية شديدة ولمدة ستة ساعات. ثم ينقل اللقاح الى مخمر (Fermenter) الحاوي على 3000 لتر وسط ذو التركيب التالي:

4% طحين

0,5 كاربونات الكالسيوم

0,5 نشا

والحضن يكون بنفس الظروف كما في المخمر ذو الحجم 800 لتر واللقاح يجب أن يكون في طور expotentional phase ويستعمل للمخمر الانتاج ذو الحجم 100 م^3. الحضن يجري عند 37° م وتهوية شديدة وتحريك. وفي نهاية عملية الحضن فالوسط يعامل حسب الغرض الذي انتج منه الباسترين. فلتغذية الحيوان يجب تبخر المزرعة وتجفف وتخلط بالمركزات الغذائية.

O.TC	TC		الاحياء المجهرية
-	TC	Cl.TC	*Streptomyces lusitanus*
اكتومايتسين O.TC	TC	-	*Streptomyces parvas*
O.TC	-	-	*Streptomyces platensis*
اكتومايتسين O.TC	TC	-	*Streptomyces rimosus*

Cl.TC = كلورتتراسايكلين
TC = تتراسايكلين
O.TC = أوكسي تتراسايكلين

وقد تم عزل العديد من السلالات بشكل نقي وخصوصاً

S. aureefaciens ، *S. feofaciens* ، *S. Fuscofaciens* ،
S. Lusifanus ، *S. platenasis* ، *S. rimosus* ،
S. sayamaensis ، *S. Vendorgensis* ، *S. Viridofaciens* .

المصنعات للبنسلين والستريتومايسين والتراسايكلين. ومن خلال العمل الوراثي على السلالة *S. aureofaciens* استطاع راكس 1954 وداكر 1954) من الحصول على متحور mutant والتي لها القابلية على تأليف الكلورتتراسايكلين 50 مرة أكثر من المزرعة الأصلية. واستطاع دايون 1959 ومتري 1954 وآخرون 1956) في تربية نفس السلالة في وسط غذائي ذي كمية محدودة من أيون الكلور فانتجت الكلورتتراسايكلين والتتراسايكلين. والآن ينتج فقط التتراسايكلين في وسط حاوي على الكلوريدات (دورشك وجماعته 1956-1959). ولكن هنالك بعض المتحورات الأخرى التي تنقل البروميد بدل الكلوريد حيث تنتج بذلك 7-Bromotetracyclin (ليند 1957) كذلك بعض المتحورات من نفس السلالة والحاوية على عدد قليل من Methyl group فإنها تؤلف 6-dimethyl tetracyclin (ماسكوريك 1959).

الاحياء المجهرية Microorganisim

لأجل انتاج الكلورتتراسايكلين على نطاق صناعي يستعمل النوع *Streptomyces au-*

وهـذا 11654, 11653, 11652 12416-C, ATCC وخـاصـة السـلالات *reofaciens* Dagger النوع يكون على سطح الأوساط الغذائية الصلبة مستعمـرات عديمـة اللون في البدايـة ولكن بعد يومين أو ثلاثة أيام يتحول اللون إلى قهوائي مصفر والمايسليم الهـوائي ذو اللون الأبيض عند تكوين الاسبورات يتلون بلون قهوائي أو قهوائي رصاصي. والاسبـورات تكون دائـرية أو بيضوية (اهليجية) والمايسليم يكون ذو سمك 0,8-0,7 ميكرون في المزارع الفتيـة ولكن في المزارع القديمة يكون ذو سمك 1,3-1,6 ميكرون.

النوع *S. aureifaciens* لا يكون على الوسط التأليفي الاكري Synthesis Agar media اسبـورات ولكنه يفصـل الصبغة القهـوائية الصفـراء، وفي المستعمرات النـامية عـلى الوسط MPA لا يكون مايسليم هـوائي وتنفصل الصبغـة الخضراء المصفرة. ويعـزي بعض المؤلفين الى أن شدة التلون تكون مربوطة بالتأليف الحيوي للمضاد الحيوي ويمكن أن يستفاذ من هذه الصفة كعلامة لعزل السلالات الصناعية.

إن كل السلالات الصناعية من نـوع *S. aueofacencis* يمكن أن تستعمل الكلوكـوز، السكـروز، النشا كمصـادر كربـونية. أمـا المصادر النـتروجينيـة تمكنهـا من هضم الكثير من الأنواع: املاح الأمونية، نترات، كارباميد ولكن للعمليات التصنيعية يفضل وجود طحـين، فول الصويا، بذور القطن، مستخلص الذرة واعتيادياً إن افضل السلالات المصنعة هي التي تكون مستعمراتها ضعيفة الاسبورات ولكنها قوية الصبغـات وان السلالات *S. aurofacenis* يمكن أن تصنيف تبعاً لنوعياتهم (قابليتهم على هضم الكلوريدات والبروميدات) حيث بوجود الكلوريـدات في الـوسط تؤلف بـالـدرجـة الأولى الكلوروتـتراسـايكلين وكميـات قليلة من التراسايكلين. وفي غياب الكلوريدات تستعمل البروميدات حيث يكون بروموتتراسايكلين. علماً بأن اذا احتوى الوسط الغذائي ايونات الكلوريد والبرومـيـد في وقت واحد فـإن ايونـات البروم لا تستعمل لانتاج بروموتتراسايكلين ولكنها تعمـل كمثبط لانتاج الكلوروتـتراسايكلين ونتيجة لذلك سيكون انتاج التراسايكلين هو المنتوج الرئيسي لهذه العملية.

أما الاحياء المجهـرية المصنعـة للأوكسي تـتراسايكلين فهي *S. gilvus* ،.S، *S. platensis*، *S. rimosus*، *S. griseaflavua*، *S. armillatus*. ولكن للانتاج الصنـاعي تستعمل السـلالة *S. rimosus*.

إن السلالة *S. rimosus* تكـون مستعمرات ذات سـطوح صفيحية ملسـاء أو خشنة أو سـطوح منحية ملونـة باللون الأصفـر والمايسليم الهـوائي لهذه السـلالـة لـه لـون بنفسجي - رصاصي مميز وهايفاته الهوائية تكون ذات شكل حلزوني أما كونيداته فتكون اسطوانية الشكل تقريباً وذات قياسات 0,8–1,4×0,6–0,7 ميكرون ومن الخواص الأخرى لهذه السـلالة بـأن

مستعمراتها في بعض الأحيان تكون مغطاة بأغطية طولية والتي تكون فيها أجزاء المستعمرة ذات شقوق أو انفلاع. 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 الكلوكوز، اللاكتوز، المالتوز، النشا، الكليسرول، وإن كل السلالات المتحورة من هذا النوع من الأحياء، والعالية الانتاج، 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. وهايفاته الهوائية ليست حلزونية أما السلالة *S. armilatus* فإنها تنمو على الأوساط التأليفية وتكون صبغات كما أن السلالة *S. griseoflavus* والتي تختلف عن السلالة *S. rimosus* بأنها لا تحلل السكوربياك 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 الاسبورية (السبورات) حيث يستعمل الوسط ذو المحتوى التالي:

%0.2 مستخلص اللحم
%1 كلوكوز
%0.05 اسبارجين

ومصدر فوسفاتي واملاح معدنية أخرى. أو يحتوي على النسب التالية:

%0.3-0.2 سكروز
%0.5-0.1 دكستران
%0.2-0.1 مستخلص اللحم
أملاح معدنية و pH 7-6.8.

أما الأوساط النوعية لتحضير اللقاح فتحتوي على النسب التالية:

%1-0.5 مستخلص الذرة

%0.2 كلوكوز

%0.2 سلفات الامونيوم.

املاح معدنية وهنا يمكن أن يستعمل بدل الكلوكوز السكروز أيضاً وكذلك يمكن أن يضاف فول الصويا بنسبة 1-2% ومولاس 0.2%.

أما الأوساط الانتاجية فيكون لها التركيب التالي: (وسط فان دوشك ودي سومر 1952):

%3-2.5 سكروز

%0.3-0.2 سلفات الامونيوم

%0.6-0.4 كاربونات كالسيوم

%2-1.5 طحين الفستق

%0.3-0.2 مستخلص الذرة

%0.4-0.2 كلوريد الصوديوم

%0.2 مولاس القصب

أو وسط روكنيفيا وآخرون 1959

%50 مستخلص الذرة 1% مادة جافة

%0.5 نترات الامونيوم

%0.2 كلوريد الصوديوم

%0.4 كاربونات الكالسيوم

%2 نشا

pH=.6.6−6.8

وقد أمكن انتاج 1250 ملغم / كلورتتراسايكلين من السلالة *S. aurefaciens* من وسط يحتوي على سكروز، طحين الفستق، مستخلص الذرة، المولاس، سلفات الامونيوم، كاربونات الكالسيوم، نترات الصوديوم. وقد امكن تحضير 1000 ملغم / مل أوكسي تتراسايكلين (ريكنا وآخرون 1951 وسوين وآخرون 1950). وقد استطاع ميلاخ (1965) من انتاج 2000-4500 ملغم / مل تتراسايكلين.

أما الوسط الغذائي المثالي الذي امكن عقده من تحضير 2500 ملغم / مل كلورتتراسايكلين. فيجب أن يتحوي على: مستخلص الذرة 3%، نشا 1,5-8%، $CaCO_3$،

0.9%، $(NH_4)_2SO_4$ 0.33%، NH_4Cl 0.1%، $MgCl_2\ 6H_2O$ 0.2%، 0.005 $FeSO_4.4H_2O$، $ZnSO_4.8H_2O$ 0.01%، $CoCl_2.6H_2O$ 0.0005، دهن خنزير 0.5-3%.

(دهن خنزير يضاف بين وقت وآخر) ويجب أن تكون حموضة الوسط الغذائي (pH) ما بين 6.6-6.8 قبل التعقيم لكي تحصل بعد ذلك على pH (7).

من المصادر الكربونية التي تهضم بشكل جيد هي السكريات الأحادية والثنائية والنشا والدكستران. 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 (اورلونو 1961، زانيفسا 1961). حيث اعطى الوسط المؤلف من دهن خنزير ودهن فول الصويا وزيت الخروع اضافة الى المواد الأخرى كمية جيدة من التتراسايكلين (كورنيلس وآخرون 1955). أما المصادر النتروجينية المستعملة في التربية أملاح الأمونيوم، بولي ببتايد، بروتينات، الأحماض الأمينية، مستخلص الذرة، طحين الصويا، كلوتين وغيرها. ويمكن الاستفادة من المصادر الخام كمصادر فوسفورية ومعدنية بنفس الوقت. حيث إن تركيز الفوسفور في الوسط له أهمية كبيرة في عملية التخليق الحيوي للتتراسايكلين.

فالـ KH_2PO_4 وبتركيز 0.03% يخفض من تحضير الكلورتتراسايكلين الى النصف أما benzel thiosulfate وبتركيز 0.0004% يؤثر تأثيراً جيداً على انتاج الكلورتتراسايكلين حيث يفترض أن يلائم طور غير معروف لحد الآن في التخليق الحيوي للكلورتتراسايكلين.

أملاح الكالسيوم والمغنيسيوم لها وظيفة مزدوجة حيث إن أيوناتها هي من العوامل الضابطة للحموضة (pH). وكذلك يقلل من سمية المضاد الحيوي. كما هو معلوم حيث إن الكميات الصلبة من الكلورتتراسايكلين بحدود 100 ملغم / لتر تعمل على تقليل بنفس مزرعة عمرها (10) ساعات وبحوالى 73% وعملية التثبيط هذه يمكن معادلتها بسحب ايونات المواد العطرية واضافة ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم.

درجة الحرارة:

إن الدرجة الحرارية المثلى للسلالات تختلف حسب نوع السلالة. فالسلالة S. aureofaciens ATCC 11652 يكون نموها افضل 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 للاحياء المجهرية المختلفة للمضادات الحيوية.

التهوية :

عموماً يكون انتاج المضادات الحيوية من الأحياء المجهرية الهوائية لذا فإن تموين المزرعة الانتاجية في وقت العمليات الانتاجية بالأوكسجين الكافي يكون من الخواص الضرورية .

كذلك يجب أن نعلم بأن السلالة *S. aureofaceins* حساسة جداً تجاه قلة الاوكسجين .

تحضير المادة اللقاحية :

المزرعة الاسبورية (البوغية) ← المزرعة الرحمية الامية ← المزرعة اللقاحية ← النامية على وسط النشا، سلفات الامونيوم ← تلقيح المخمرات ذات الوسط مستخلص الذرة، كربونات الكاليسيوم، كلوريد الصوديوم و pH 7-6.8 .

المزرعة الرحمية والمزرعة اللقاحية تحضن في الحاضن الهزاز. وعند سرعة 200-250 دورة/دقيقة وعند درجة الحرارة 27-28° م وفترة 48-72 ساعة .

أما المزرعة الانتاجية فتزرع بنسبة لقاح 5-10% لقاح وتجري عملية الحضن عند درجة حرارة 27-28° م مع تهوية 0.77 دورة/دقيقة للاوكسي تتراسايكلين. علماً بأن وقت التربية وتحضير اللقاح يختلف حسب السلالة المستعملة .

المضادات الحيوية الكلوكوزيدية والمتعددة التسكر :

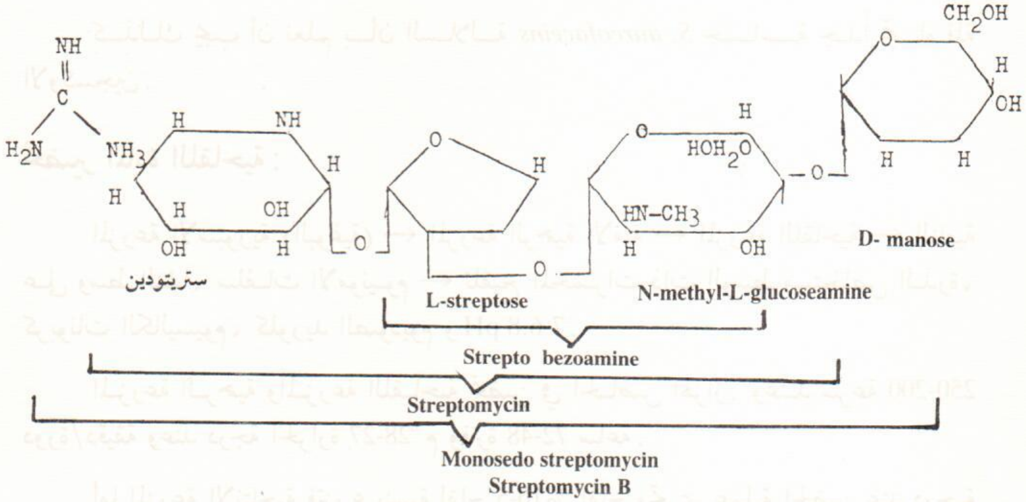
إن أهم مثل لهذه المجموعة هو الـ Streptomycin الذي اكتشف من قبل (فاكسمان 1944) كناتج للـ *Streptomyces griseus* .

الستريبتومايسين Streptomycin

الستريبتومايسين يظهر كمادة فعالة ضد مرض السل كذلك له تطبيقات واسعة ضد بعض أمراض النباتات. علماً بأن الستريبتومايسين و manozide streptomycin وكلوكوزيد الستربتودين (شكل 4) الكلوكونات، الستربتودين، يكون مربوطاً بأصرة α-glucoside مع مادة سكرية sugar methylation .

L. streptose التي تكون آصرة α glucoside N-methyl-L-glucoseamine . وهكذا فالجزيئة المتخصصة الستربتومايسين يمكن أن تربط بواسطة آصرة α-glucoside

بـ D-mannose وتكـون mannosedo streptomycin . وعنـد تكييف بـاقي الـstreptoside بواسطة تكوين مجموعات كحولية أولية يمكن أن تكون مضادات حيوية متجانسة وأن تـأكسد مجموعة المثيل تؤدي الى تكوين هيدروكسي سبتريتومايسـين. أما اختزال مجموعـة الالديهـايد فتؤدي الى تكوين هيدروكسي سبترومايسين أيضاً.



شكل (46) يوضح تركيب الستربتومايسين والمانوزيد ستربتومايسين

الاحياء المجهرية :

لأجل التخليق الحيوي للسبتريتومـايسين تستعمـل السلالات ذات الانتـاجية العـالية. ويستعمـل لأجل ذلـك *S. griseus*، **والاكتينـومـايسيس** Actinomyces, globisporus فعنـد تربية *S. griseues* فوق الأوساط الغـذائية الصلبـة تكون مستعمـرات ذات سطوح ملسـاء أو خشنة والتي تكون في البداية عديمة اللون تقريباً بعد ذلك تتخـذ لونـاً دهنياً أزرق مصفـراً أو لوناً قهوائياً حيث يكون مايسليم هوائياً متطوراً جداً وغنيـاً ويملك شكلاً عبـارياً وملونـاً بلون أبيض، أصفـر، رصاصي، رصـاصي مزرق، هـايفـاتـه تصـل الى سمـك 1.3-0.5 ميكـرون والمايسليم يكون مقسماً. الاسبورات تكـون على شكـل سلاسـل ولها شكـل دائري اهليجي (ضعيفة الاستطالة) وذو قياسات X0.7-1.9-0.7-0.9 ميكرون عند النمو في الأوساط التأليفيـة ويكـون طبقة رقيقـة والتي في المراحـل الأخيرة تتلون بللون الأخضر. وكـذلك مـايسليم هذا النوع يكون هوائياً وينمـو على مـرق اللحم الاكري بصـورة جيدة ويكـون مستعمرات بلون الكريم والمايسليم يكون لوناً أبيض أو رصاصياً فاتحاً.

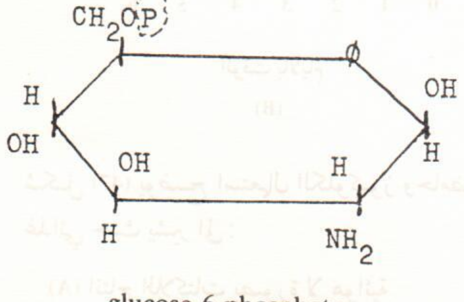
هـذا النوع من الاحيـاء يميع الجـلاتـين، يحلل بـروتينـات الحليب ويخـثره، يحلل السكوربيال، يختزل النترات، (فاكسمان وجماعته، شاكيس ويوكي دكسمان 1944) استطاعـوا من عزل سلالتين من *S. griseus* والمطابقـة مع السـلالة التي تم عـزلها عـام 1915 (فاكسمان وكوريس 1916) المزرعة التي عزلت عام 1915 من قبل فـاكسمان بعـد أن تم تثبيت الصفات المحتوية لها وتشخيصها لم تظهر أي فعالية مضـادة ولها مقـاومة للضـوء (رايلي 1947). وعنـد تثليـث 3 △ 2 العملية بواسطة الأشعة فوق البنفسجية (كلنر 1949) نجح حيث حصـل على سلالة متحورة تنتج Streptomycin.

S. rimosus نـوع منتشر هو الآخـر في الطبيعـة وتوجـد عليـه دراسـات كثيرة لانتـاج Streptomycin (ريفر 1952).

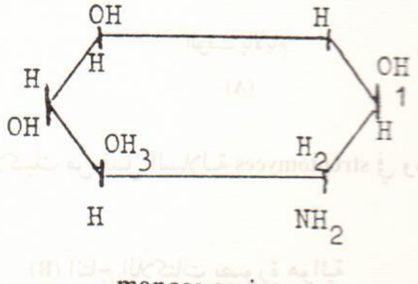
أما السلالة *Streptomyces grisecarnus* كما أشـار (كارنـدي 1951) فإنها تؤلف أوكسي تتراسايكلين على وسط MPA حيث يكون مستعمرات بلون الكريم وبـدون مايسليم هـوائي مع صبغة صفراء قهوائية فاتحـة قابلة للذوبـان. أما اذا زرعت عـلى وسط تأليفي فـإن نموهـا يكون ضعيفاً ويكون نمو المـايسليم هوائيـاً ويكون أبيض اللون كـما أنه لا يكـون اسبورات. وكذلك لا يكـون الصبغات، ويحلل الجـلاتين، يحلل الببتـون. ولكنه لا يخثر الحليب ولكنه يحلل النشا، ولا يختزل النترات وهايفاته ليست حلزونية.

العوامل المؤثرة على تخليق الستربتومايسين.

كـما هـو معلوم في الستـربتـوزين والستـربتـوزين والتي تعتمـد عـلى L. streptose و N-methyl-L-glucoseamine. كذلك يعتبر الارجنين مصدراً نباتياً أيضاً للستربتوزين حين إن مجـمـوعـة N-methyl في N-methyl-L-glucoseamine والـتي يـتـكـون بـواسـطة N-methylation وذلـك نـتـيـجـة مـسـاهـمـة streptonic acid حـيـث يـتـكـون glucoseamine-6-phospate بواسطة غلق الحلقة حيث يتكون manose amine الذي يأخـذ مجموعة الأمين بعد ذلك.



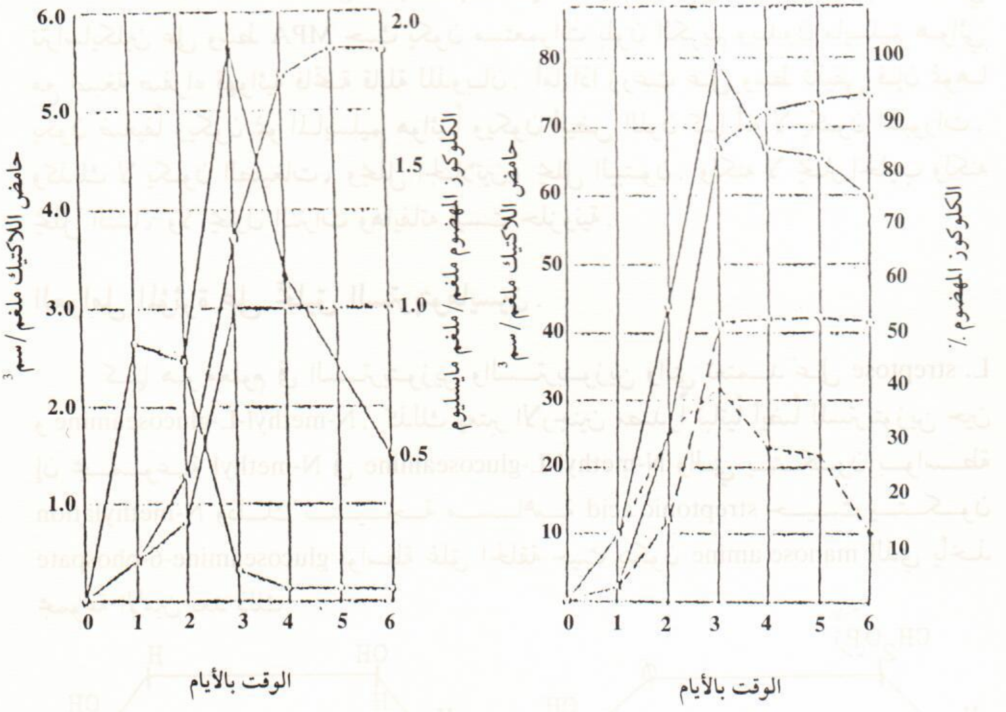
glucose-6-phosphate



manose amine

ولم يعـرف حتى الآن مـاهيـة التخليق الحيـوي لعمـود streptose والـذي مصـدره الكلوكوز.

وعموماً فلو أخذنا بعين الاعتبار الأوساط الغذائيـة المعتمدة للتحليق الحيـوي نرى أنها تتركب من أكبر جزء أساسي هي الكلوكوز كمصدر للكربون للسلالة *streptomyces griseus* وهذا ما يجعلنا ندرس ميتابولزم هذا المصدر لدى هذه السلالة والذي يتضمن عمليـات هدم للكربوهيدرات (منك وجماعته 1958) وظـروف الوسط تتحـدد أو تتعين في أي سلسلة سيتم هدم الكلوكوز ومهما كانت عملية الهدم فإن الكلوكوز غير المستعمل لتخليق السبتريتومـايسين سيتحـول الى Triso-phosphate الذي بـطريق عكسي يتحول الى Pyruvic ومن هنـاك تـأتي



شكـل (47) يوضـح استعمال الكلوكـوز وحامض الـلاكتيك من قبـل السلالـة streptomyces في وسط غذائي حيث يشير الى :

(A) انتاج اللاكتات بصورة لا هوائية .   **(B)** انتاج اللاكتات بصورة هوائية

عملية التأكسد من خلال دورة Tricarboxyli acid وفي حالة قلة الاوكسجين فالبايروفات يمكن أن تختزل الى لاكتات (فوكسهل وجماعته 1954) وأن التهوية تؤثر على ميتابولزم الكلوكوز. فالتهوية الزائدة تقلل سرعة استعمال الكلوكوز من قبل *S. griseus* وتكون اللاكتات (بروفولوميو وجماعته 1950) والعامل المؤثر الآخر هو الفوسفور 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).

جدول (18) يبين التغيرات في الأطوار الثلاثة عند نمو
S. griseus (Garner وجماعته 1950)

	الطور الاول للنمو النمو	الطور الثاني للنمو النضج	الطور الثالث الهرم
الستربتومايسين	انتاج ضعيف	الانتاج الاعظم	الكمية لا تزداد
	يرتفع تدريجياً	ينخفض ببطء جداً	ترتفع
المايسليم	ينمو بسرعة	يزداد وزنه تدريجياً	تكسر المايسليم
	الكلوكوز	يهضم ببطء	متعادل الهضم من
	بنضب اعتيادياً	قبل كل الجسم	
الامونيا	يتحرر في الوسط	يستهلك	يتحرر
الفوسفات اللاعضوية	تتحرر	تستهلك	تتحرر
كمية امتصاص الاوكسجين	عالية	وسط	قليلة

كما أن الزرنيخ أيضاً يظهر تأثيراً مشابهاً. وقد أثبتت التجارب بأن الفوسفات لها تأثير على هدم الكلوكوز وعلى تخليق الستربتومايسين حيث ظهر أن المايسليم النظيف والمغسول يزداد استهلاكه للاوكسجين وسرعة تهديم الكلوكوز عند اضافة الفوسفور اللاعضوي وان

استرة الفوسفور اللاعضوي تكون على أشدها عند 7,6 pH عندما تكون عملية التنفس على أشدها وهذه الشروط محفزة للتخليق الحيوي للستربتومايسين (فوكسهول 1954) والجدول التالي يوضح تأثير الفوسفور على انتاج الستربتومايسين.

جدول (19) يبين تأثير الفوسفور والزرنيخ على انتاج الستربتومايسين

المواد المضافة	الوقت بالأيام	كمية الستربتومايسين ملغم/مل	pH
ماء (كونترول)	6	1,530	7,10
	—	1,180	7,620
K_2HPO_4 (0.005M)	—	580	8,08
		510	8,08
		420	8,06
ماء كونترول	6	1,120	8,28
	—	1,020	8,26
	—	0,980	8,28
ارسينات (زرنيخ)	—	645	7,22
	—	640	7,62
	—	595	7,48

تلقح المزارع المجهرية في وسط غذائي مع الصويا 40 مل وسط في دورق حجم 250 مل وتحضن في حاضن هزاز عند درجة حرارة 28° م وبثلاث مكررات (بوكسر وآخرون 1947 فوكسهل 1957). أما خونكن هول 1960 فلقد اعطى تصوراً للأواصر أو الروابط يبين تخليق الستربتومايسين ومتطلبات الأوكسجين، والكلوكوز، والفوسفات. وعملية الفسفرة تجري كما في المخطط التالي:

الفسفرة الافتراضية للمركبات الوسطية + المستقبل ـــــ حامل

Olego sugar streptomycinic acid + P_L

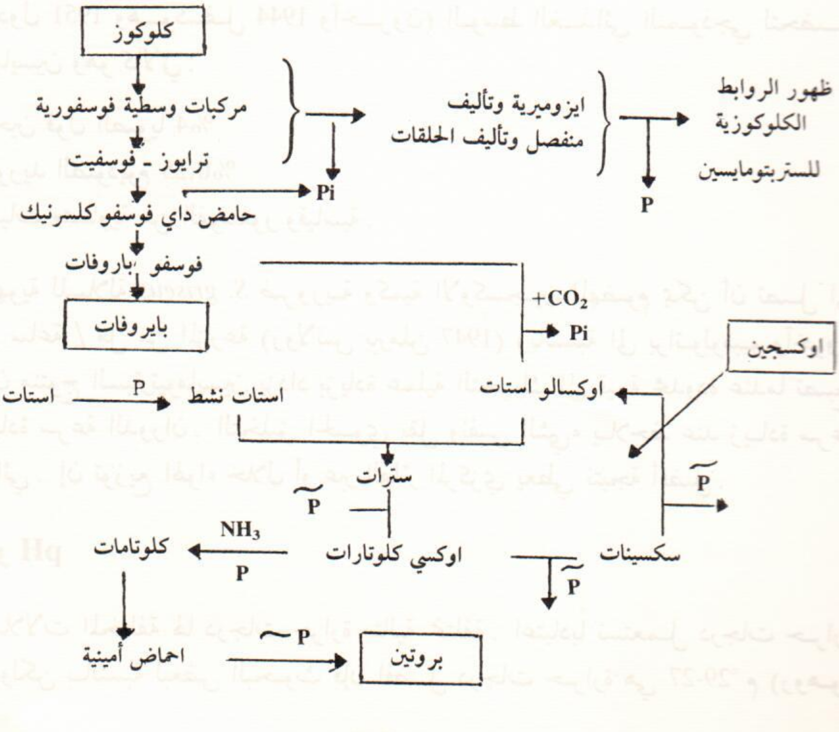
ولأجل التأليف الحيوي يلزم:

أ ـ تثبت تركيز منخفض للفوسفات غير العضوية.

ب ـ أن يوجد الكثير من المركبات الفوسفورية.

ومستوى الفوسفور غير العضوي يمكن أن يضبط عن طريق تركيزه في الخلايا بواسطة تركيز الوسط. حيث عندما يحمل الوسط ايونات 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 هايدروكاربونية أو مركبات أخرى مشابهة. هذه العملية تترك مركبات فوسفورية وسطية كما يوضح ذلك في الشكل رقم (6) حيث تبدو الأواصر تتبادل بين الكلوكوز وتأليف السبترتيومايسين والبروتينات عند *S. griseus*. الهضم اللاحق للكلوكوز تعتمد على ميتابولزم Triso phosphate حيث تأثير الفوسفور يظهر في عودة تكثيف المركبات الفوسفورية الوسطية الى حامض العنبيك. وعند التهوية الجيدة سوف يرجع الى CO_2 في دورة الحامض الثلاثي الكربون وبهذه الطريقة ستحول اكثر الفوسفور غير العضوي الى عضوي. ومن ذلك يفهم أن تجهيز الاوكسجين هو لربط الفوسفور غير العضوي لشكل عضوي هو من أهم العوامل. والعامل الآخر المهم هو تجهيز المزرعة بالكربوهيدرات الكافية لأجل تكوين المركبات الوسطية.

شكل (48) يوضح الروابط التبادلية للكلوكوز والستربتومايسين والبروتين عند S. griseus



لـذا فلتأليف السبـترتيومـايسين يلزم: تـوفير المصـدر الاوكسجيني وتركيـزات منخفضة للفوسفور غير العضوي، وتركيز الكلوكوز والتركيزات المشابهة للمواد النيتروجينية في الـوسط والتي تؤدي بالنتيجة الى التأليف السريع للبروتينات. بعد تأليف المايسليوم وأن اختبار مصادر النيـتروجين يجب أن يكـون بشكل ومن نـوع N ـ المهضوم وأن يكـون وهنا تـأليف البروتيني سيكون بطيئاً ونتيجة ذلك فالكاربوهيدرات سوف يستعمل في المايسلومـات الناضجـة لتأليف السبترتيومايسين وليس لتكوين الكتلة الحيوية.

التربية الصناعية للاحياء المصنعة للسبترتيومايسين

إن التربية الصناعية للسلالة *S. griseus* المصنعـة للسبـترتيـومايسـين تتأثـر بالعـديد من العوامل أهمها هو تركيب الوسط الغذائي. لقد اقترح الكثير من الأوساط الغذائية للسلالة *S. griseus* حيث تستعمـل الكثير من المصـادر الكربـوهيدراتيـة المختلفة كـالفركتـوز والكلوكوز والسكـريات وهـذه تضمن اعلى انتـاج من السبترتيـومايسـين ومع النمـو المـرتفـع. إن أكـثر السلالات تتطلب أيضاً مصادر نـايتروجينيـة ويجب أن تكون المصـادر النيتروجينيـة المستعملة بشكل متساوي وبأقل تراكيز، وهضمها يجب أن لا يؤدي الى تغيير كبـير في حامضيـة الوسط الغذائي. ومن ذلك استعمال الأملاح الأمونية للحوامض القوية وقد اقترح (واكسمان وحارس 1945، ودول 1951 وهـوكسفـل 1944 وآخـرون) الـوسط الغـذائي النمـوذجي لتحضـير السبترتيومايسين وهو كالآتي:

1 ـ طحين فول الصويا 4%
2 ـ كلوريد الصوديوم 0,25%
3 ـ كميات متساوية من الفوسفور وقياسية.

التهوية للسلالة *S. griseus* ضروريـة وكمية الاوكسجين المهضوم يمكن أن تصـل الى 120 لتر / ساعة / مل من المزرعة (رولانس بيرملن 1947) وبالنسبة الى براتـولومبـو وآخرون 1950) فإن منتوج السبترتيومايسين يزداد بزيادة عملية التحريك الى قيمة محدودة عندما تصبح ثابتة. بزيادة سرعة الدوران. التخليق الحيـوي يقل ونفس الشيء يـلاحظ عند زيـادة 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 تستعمـل درجات حـرارة 24-26° م ولكن بـالنسبة لبعض البحـوث فإن افضـل درجات حـرارة هي 27-29° م (روهـود

وفلشر 1966) وبالنسبة لاحدى الدراسات للسلالة *S. griseus* اعطى انتاجاً يقدر بـ 1180 ملغم / لتر ولمدة (118) ساعة، وعند درجة حرارة 27° م اعطى انتاج 2041 ملغم / لتر لمدة 118 ساعة وعند درجة حرارة 29° م اعطى انتاج 2194 ملغم / لتر لمدة 104 ساعة، وعند درجة حرارة 31° م اعطى انتاج 414 ملغم / لتر لمدة 72 ساعة، (دولانس 1951) ومن هنا تم تثبيت درجة حرارة 18,5° م كدرجة حرارة مثالية. وكل هذه النتائج كانت تحت pH (7-8).

المزرعة اللقاحية والانتاجية **Inoculam Culture & Production Culture**

عملية التخليق الحيوي للستربتومايسين في الظروف العميقة للتربية *S. griseus* تتكون من المراحل التالية. اعداد المادة اللقاحية في دوارق هزازة، وفي جهاز حاضن صغير، وفي جهاز لقاحي كبير وفي النهاية التربية الانتاجية. المادة اللقاحية في الدوارق تحضر كوسط ليربى فيها المادة الاسبورية في الحاضن الهزاز وعند درجة حرارة 26-28° م ثم ينقل الى جهاز (مخمر) صغير حيث تبقى التربية لمدة 30-70 ساعة بالتهوية والتحريك. ومن ثم ينقل الى الجهاز الكبير (مخمر) وعند نفس الشروط لمدة 20-40 ساعة ـ التربية في المخمر الانتاجي تستمر لمدة 168-192 ساعة.

فعند التربية الانتاجية لـ *S. griseus* توجد هناك ثلاثة أطوار. الطور الأول يمتاز بالهدم والاستعمال الكبير للمكونات الغذائية في الوسط ونمو المايسليوم الى تحضير حجم اقصى. تركيز المكونات الغذائية (P, C, N) يقل، وتتحرر الامونياك والـ pH يرتفع من 6,7-7,6 عند نهاية الساعة 20,0- امتصاص الاوكسجين يحصل بشدة (QO_2 D_o 150) فتكون بذلك كميات ضئيلة من الستربتومايسين. نمو المايسليوم يتم بنفس وقت استعمال الكلوكوز. والنايتروجين يمنع الارتفاع الكبير في الحامض pH خلال هذا الطور الذي يستمر 48 ساعة.

الطور الثاني:

يتميز الطور الثاني بالهضم البطيء لبقية المواد الغذائية مع النمو المتأخر للمايسليوم والذي يتفسخ بعد ذلك. ونتيجة ذلك يتراكم في الوسط الامونياك والفوسفور غير العضوي ويهبط الاوكسجين الى الصفر. تأليف RNA يتوقف تقريباً والبروتوبلازم تبدأ بالاختلاف. ويظهر تكوين الاسبورات. وأن أهم خصائص هذا الطور هو الارتفاع السريع للستربتومايسين pH الوسط يهبط اعتيادياً في اليوم الثالث والرابع الى 6,7-6,8 حيث في اليوم الخامس يرتفع من جديد الى 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 ـ مونوزية مرتبطة بآصرة α ـ كلوكوز وكذلك بـ C_4 للـ N-methyl-glucose amine ويحضر هذا المضاد من تربية *S. griseus* وفعالية هذا المضاد للاحياء المجهرية تكون واطئة بحدود 20% من فعالية الستربتومايسين. لذا فالعملية تجري للمونوزيد ستربتومايسين بحيث (α-manose) لا يرتفع عن 10% من الحجم العام في نهاية التربية ويمكن أن يهدم أو يتحول الى الستربتومايسين بواسطة انزيم المانوزدايستيز. ويمكن الحصول على هذا الانزيم باضافة مانات الخمائر. ومكونات بعض الأعشاب أو 0.1% من α-methyl mannose وإن هذا الانزيم غير مستقر (قلق) وبسهولة جداً يثبط. وهنالك الكثير من العوامل التي تؤثر على عمل هذا الانزيم وهي:

أ ـ الفلزات الثقيلة والتهوية غير الكاملة تثبط عمل الانزيم.

ب ـ pH المثالي لنشاط هو بحدود (8) ولكن مثل هذا الـ pH لا يمكن الحصول عليه الا في الطور الثالث أي بعد أن تنتهي عملية التخليق الحيوي للستربتومايسين.

جـ ـ تركيز سكر الكلوكوز فوق 0.5-1.0% يثبط عمله نهائياً.

د ـ درجة الحرارة بحدود 32° م تعمل على نشاط الانزيم ولكن مثل هذه الدرجة لا يسمح بها بعد انتهاء التخليق الحيوي للستربتومايسين. حيث الوقت الذي خلاله يجب أن يتم تأليف المانوزيد ستربتومايسين يكون محدوداً جداً لأنه يقع بين لحظتين قريبتين وبالذات بين اللحظة التي يقل الكلوكوز فيها تحت 0.5-1.0% واللحظة التي ينتهي بها تأليف البروتينات وبالتالي الانزيمات.

النيومتسين

مضاد حيوي صناعي هام آخر هو النيومتسين والذي تم انتاجه من السلالة *Streptomyces fradiae* (واكسمان وليد 1949) وفي هذا المضاد الحيوي المعقد والمركب توجد ثلاثة مضادات حيوية متجانسة هي نيومتسين C, B, A. ولكن الانتاج في المصانع الكبيرة يوجد بشكل رئيسي النيومتسين B. والذي يحضر صناعياً من *Streptomyces fradiae*. ويمكن كذلك أن يؤلف من *streptomyces albergriseadus* السلالة *streptomyces fradiae* تكون هايفات ملساء للمايسليم الهوائي. فعند النمو في الوسط التأليفي يكون مستعمرات ملساء عديمة اللون مع مايسليوم هوائي وردي، وعلى MPA المستعمرات تكون صفراء أو برتقالية ويذوب الجلاتين ويحلل الببتون الحليب ويختزل ويحلل النشا ولا يختزل النترات.

S. fradiae تنمو جيداً كما في الوسط ذي المصادر النتروجينية المعدنية كذلك الحاوية على مستخلص الذرة. مستخلص اللحم، ببتون الكازين المحلل، طحين الصويا، وغيرها. ولكن استعمال مختلف المصادر الكربونية - كربوهيدرات، كحولات، احماض عضوية، دهون.

تحضير اللقاح والمزارع الانتاجية

المزارع اللقاحية يتم تحضيرها في دوارق لقاحية بواسطة المزارع الرحمية (الام) mother culture وبنسبة 5% وهذا اللقاح بنسبة 0,2-1% ينقل الى مخمر لقاحي ولهذه المزارع ستعمل اوساط حاوية على طحين الصويا، السكوربيال، سلفات الامونيوم، KH_2PO_4 - كلوريد الصوديوم، كاربونات الكالسيوم، تحضن المزارع حاضن هزاز عند درجة حرارة 28-30° م لمدة 36-48 ساعة. أما المزرعة في المخمر فإنها تحضن لمدة 18-24 ساعة وتجري عملية التهوية والتحريك. أما المزارع المسقرة 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، الكلوكوز، سلفات الامونيوم، وعند الأوساط التأليفية تؤلف السلالة S. fradiae 3000 وحدة / مل، أما في الأوساط المعقدة مع الكربوهيدرات وطحين الصويا ينتج 12000 وحدة نيومتسين / مل وسط.

التربية تتم عند درجة حرارة 28-30° م وعند التربية نلاحظ ثلاث مراحل:

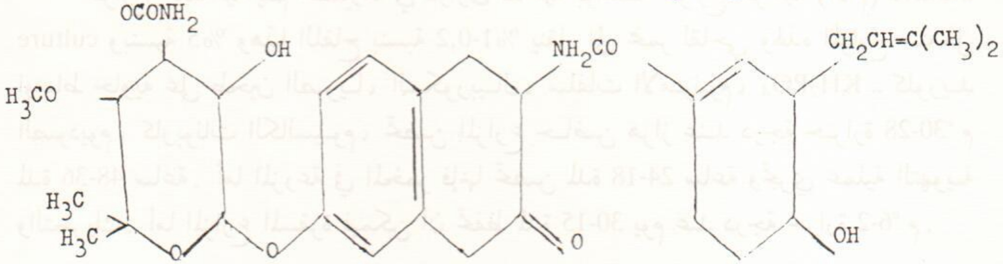
المرحلة الأولى: تشمل اليوم الأول، والذي فيه تنمو الاسبورات ويتراكم المايسليم الفتي المتشابك نتيجة المتانة غير المتساوية للهايفات.

تعتبر هذه هي المرحلة الثانية. أما المرحلة الثالثة بعد اليوم الثاني وتمتاز هذه المرحلة بقلة Basophilic haphae وباختلاف البروتوبلازم. وبعدها تشكل هايفات مستطيلة رفيعة وغير متشعبة. وخلال كل مرحلة نمو المايسليوم (2-3 يوم) pH الوسط يهبط من 6,5-6,8 الى 6 وذلك يعود لتحضير الحوامض الكيتونية. كمية الكربوهيدرات، الفسفور غير العضوي، الأملاح الأمونية تقل وبنهاية اليوم الثالث نمو المايسليوم يبدأ بالتباطؤ، وينتهي هضم الكربوهيدرات، ويرتفع pH وتبدأ مرحلة تفسخ الخلايا. ومحتويات الأحماض الكيتونية. أما في اليوم الرابع والخامس فيرتفع الـ pH الى 7,2-7,6. النيومتسين يؤلف أكبر كمية بعد أن ينتهي نمو المايسليوم عند تركيز واحد للفسفور غير العضوي بحدود 6-10 ملغم %.

نوفوبيوتسين

المضاد الحيوي نوفوبيوتسين يؤلف من *Streptomyces spheroides* (سمث 1956) و *Streptomyces niveus* (والك 1955-1956).

وقد تم اكتشاف منتوج من *Streptomyces spheroides* وقد سمي بمختلف الأسماء منتومتسين (والك وجماعته 1955) ستربتوميوتسين (سمث 1956) وكارديلومتسين (ولكس درايت 1955) وله الشكل التالي:



شيوبيوتسين

الاحياء المجهرية وشروط التربية

النوفوبيوتسين يؤلف من *Streptomyces spharoides* (سمث واعوانه 1956) ومن *Streptomyces niveus* (والكر وجماعته 1955, 1956) ومنذ اكتشافه أثبت بأن اضافة 0,5 غم من حامض نوفوبيوتسين / لتر وسط غذائي يزيد من المنتوج من 190-257 ملغم / لتر.

وواحد غم / لتر من حامض P-amino oxalic acid يزيد المحصول الى 396 ملغم / لتر و 0,05 غم / لتر من hydroxy-3 methyl-2-butal-benzoic acid يزيد المحصول من 123 ملغم الى 203 ملغم / لتر. وفي الفترة الأخيرة ظهرت اعلانات بأن L-Thirosine يمكن أن يكون كحامل عند التخليق الحيوي للنوفوبيوتسين (جامبرز وجماعته 1960).

وقد اقترح الكثير من الأوساط الغذائية للتربية *S. spheroides* و *S. niveus* وأن أبسط وسط مقترح من قبل (سمث 1956) يحتوي على الكلوكوز، نباتات عشبية 40,20 غم / لتر على التوالي. وقد تم الحصول على انتاج 475 غم / لتر. وبالنسبة لدراسات سمث لكثير من المصادر الغذائية فكان أحسن مصدر كاربوني للسلالة *S. niveus* هو السكروز. ثم الكلوكوز والنشا أما المصادر غير المناسبة كزيت الكبد، والمولاس واللاكتوز. حيث للمصدر الكربوني تأثير على انتاج النوفوبيوتسين المحضر. وكذلك النباتات العشبية والكلوكوز والنشا حيث

يتكـون ايضاً مضـادات حيويـة أخـرى مضـادة وبكميـة 1065 و 1040 ملغم / لـتر منـه فقط (70-75%) بينما عند المالتوز كمصدر كربـوهيدراتي يكـون 750-820 ملغم / لتر. ولكن نسبـة النـوفوبيـوتسين تحتـل 94-95% منها (أون 1961) هـذه المنتوجـات يمكن أن تزداد اذا كـان في الوسط نباتات عشبية وكذلك باضافة احماض عضوية بكمية 0,5-2 غم / لتر (نوساما وسمث 1961) وفي هذا المجال عـلاقة اكـثر لحامض التفـاحيك حيث يعـطي انتاجـاً 835 ملغم / لتر وكـذلك حـامض الفورميـك يعطي انتـاج بـ 570 ملغم / لتر. وتحسينـات ملمـوسة تحصـل باضافة الخل، السترات، السوكسينات الكلوكونات. أما بالنسبة (سمث 1956) فعنـد تربيـة السلالة *S. niveus* على وسط يحتوي على مستخلص اللحم، الببتون. فـإن الكمية القصـوى للمايسليـوم يمكن الحصـول عليهـا بعـد (60) سـاعـة من عمليـة الحضن. وبعـدهـا تبـدأ بـالانخفاض. أمـا تأليف المضـاد الحيوي فـإنه يبـدأ في السـاعـة (30) بعـد عمليـة الحضن. ويستمر حتى الساعة (90).

الـ pH الوسط يرتفع من 6,8 الى 7,6 عند (24) ساعة الأولى ويستمر في هذا المستـوى حتى الساعة (80) ومن بعدها يـرتفع الـ pH الى (8) وفي كـل الأحوال والاحتـمالات وبنتيجة التفسخ الحاصلة في بداية العملية تستعمل الكربوهيدرات بكمية قليلة.

المضاد الحيوي سيصنع من المايسليوم الناضـج. وعند عمليـة تأليف المضـاد يبدأ تـأثير الـ pH. حيث عنـدما يكـون الـ pH بحدود 7,5 والتسحيـح للنوفـوبيوتسـين يكون أقـل من وسط يكون الـ pH فيه (8). وهنا يفسر التأثير السمي للنوفـوبيوتسـين عند الـ pH 7,5 حيث يتوقع عند هذه القيمة للـ pH إن المضاد الحيوي ينفذ بسهولة في خلايا المـايسليوم. حيث إذا اضيف 1000 ملغم / لتر نوفوبيوتسين الى مزرعة عمرها 2-3 بمايسليـوم نشط النمو وعنـد 7,5 pH فإن المايسليوم سوف يتحلل خلال 24 ساعـة أما عنـد الـ pH 8,5 فإنـه يبقى كامـلاً غير مهدم أما في التجارب السرية انتاجية فقد تم تحضير أكبر كمية من منتوج نوفوبيوتسين عند 8-7,9 pH (أون 1961). ولكن عنـد هذه القيمـة ايضـاً يمكن أن يـرجـع النـوفـوبيـوتسـين الى Decarbamel الوجه غير الفعال للنوفوبيوتسين. أمـا درجة الحـرارة المثاليـة لنمو المـزرعة هي 26-28° م. أما تحضيره فيحضر المايسليوم اللقاحي في دوارق هزازة بواسطة زرع السلالة على وسط فول الصويا، كلوكوز، سلفـات الامونيـوم. وعند درجـة حرارة 26-28° م ولمـدة ثلاثـة أيـام. أما المصـادر الخام الأخـرى فيمكن استعمال طحـين الـذرة بـدل فـول الصـويـا. وفي الأوساط الانتاجية يتوخى غياب مركب سلفـات الامونيـوم حيث غياب هـذا المركب سيؤدي الى تكوين pH غير مساعد ومنخفض لـذا فيمكن الاستعـاضـة ايضـاً بمصـادر أخرى كنـترات الامونيوم، نـترات البوتـاسيوم، ولكن لا يفضـل استعمال نـترات الصوديـوم أو الكالسيـوم. كذلك يجب أن لا يجمع بين السكروز والنشا في وسط واحـد حيث أن تأليف المضـاد الحيوي

سوف يقل مرتين أقل مما لو كان الكلوكوز وحده. والى هذه المجموعة أيضاً ينتمي الكانامايسين.

الكانامايسين Kanamycin

إن هذا المضاد الحيوي تم اكتشافه من قبل (اومنازاما 1957) ومن السلالة Streptomyces Kanamyceteus وعلى الأوساط المستعملة لتحضير الستربتومايسين والتيومايسين. درجة الحرارة المثلى لانتاج هذه السلالة هي 27-28° م. أما الرقم الهايدروجيني (pH) 7,1-7,6 واكبر مضاد حيوي يحضر بوسط حاوي على النشا وباضافة دهون طيارة. أما كمية الفوسفور غير العضوي يجب أن يكون في حدود 2-4% ملغم. ومع تهوية قوية. أما التربية الانتاجية فتكون في وسط فول الصويا، نشا. وبفترة حضن 120 ساعة. الكمية القصوى والمنتجة للكانامايسين كانت عند حدود 90-120 ساعة.

المضادات الحيوية المايكروليدنية

المضادات الحيوية المايكروليدنية هي احدى أهم المجاميع من وجهة نظر كيمياوية لانها تملك دائرة كبيرة وبدرجة كبيرة وله حلقة لاكتونية ومنها ترتبط Dimethyl-amino saturated sugar (برمكاد هرمان 1958).

المضادات الحيوية المايكروليدنية تحضر من قبل مختلف أنواع *streptomyces sp* والى هذا النوع من المضادات الحيوية تنتمي المضادات الحيوية التالية. ارثومايسين (ماي كيوري وجماعته 1952)، بكرامايسين (برول مان وهانكل 1951)، كاربومايسين (ماكنامايسين) (وكنر وجماعته 1953) متمايسين (دوتن وجماعته 1953)، سيرامايسين (نورم اتسدين) (بترت ستدانكو وجماعته 1954) كورياس وجماعته 1956 أوليان دورومايسين (موي وجماعته 1954) ناربومايسين (كوريز واعوانه 1955)، تيلوزين (ستاركو وجماعته 1961).

وكل هذه المضادات تنتج عند حدود pH مثالي والتخليق الحيوي للمضاد الحيوي يعتمد على ظروف الوسط حيث إن املاح الحديد تقلل من فعالية المايسليوم الفطري. أما الفسفور المعدني والمغنيسيوم فإنها تسهل تحضير الارثرومايسين. ولكن زيادة كمية الفوسفور تؤدي الى تقليل المنتوج. وهكذا في وسط فول الصويا 25% ملغم والفوسفور المعدني يقلل المنتوج بـ 25%.

التهوية والحرارة

يزداد انتاج الاثرومايسين في كل الأوساط التأليفية، والفتية بزيادة سرعة التهوية ولكن

في حالة استعمال أوساط فقيرة فإنها لا تتأثر (ريدرك 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 الانتاج لدى تربية *S. erythreus* عدا المنتوج الارثرومايسين A. أما الاثرومايسين C, B فينتج بكميات قليلة بالاعتماد على السلالة ونوعيتها وشروط التربية ومكونات الوسط. أما في حالة وجود فائض من الفسفور المعدني في الوسط. وحينما يثبط تخليق الارثرومايسين A في الوسط فنلاحظ تراكم تراكيب بيولوجية غير فعالة.

اولنيدومايسين،

إن المضاد الحيوي اولنيدومايسين يحضر من السلالة streptomyces antibioticus ATCC 11841 (سوين وجماعته 1946) حيث تحفظ المزارع بشكلها الاسبوري على slant أو على أوساط صلبة لتحضير المايسليوم. والتربية تكون أما أحادية أو ثنائية المرحلة.

أما في جهاز التربية (جهاز التلقيح) ذي الحجم حيث تتزايد فترة الحضن في اجهزة التربية الأولى بحدود 50-70 ساعة. وفي التربية الثانية تحتاج الى 8-12 ساعة وعند درجة حرارة 26-28° م. وعند ظروف التحريك المستمر والتهوية. فالمايسليوم ينمو بسرعة جداً ويغتني ويكون لونه قهوائياً - رصاصياً. وفي بعض الأحيان باللون البرتقالي أما الوسط فيكون لونه قهوائياً. هذا المايسليوم النامي يتم نقله الى الوسط الانتاجي وبنسبة 20% والتربية تتم عند درجة حرارة 27-28° م مع التهوية (دورة هواء / دورة وسط / دقيقة) أما سرعة الحركة فتكون 180-200 دورة / دقيقة. ويضاف الى الوسط قطرات من زيت مانع الرغوة. وفي عملية التربية الصناعية يلاحظ طورين.

الطور الأول: وفيه يتم النمو السريع للمايسليوم وهضم المواد الغذائية.

أما الطور الثاني فيتميز بالنمو البطيء وبالتفسخ الجزئي وتأليف المضاد الحيوي. وفي 48-72 ساعة من عملية التخمير تتكون كتلة حيوية Biomass كبيرة وحول المنطقة المتعادلة والتخليق الحيوي للـ أوليان دومايسين يبدأ من الساعة 60 الى الساعة 72 ويستمر بالنمو الى 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 الانتاجية ذات خواص معقدة. فالأوساط النموذجية تحتوي على (غم/لتر): نشا 25، كلوكوز 25، طحين فول الصويا 47، مستخلص الذرة مادة جافة 10، خمائر 5، 5Nacl، 2 $CaCO_3$، $CoCl_2$ رقائق أو شظايا بسيطة (بريك برك 1959) أو الوسط التالي نشا 15، طحين الصويا 15، 1 $COCl_2$، دهن خنزير 20 غم/لتر. (ابون 1956). وان اضافة دهن الخنزير إلى الوسط حقق انتاجاً قدره 585 ملغم/لتر. في حين أن الوسط الأول أعطى انتاجاً قدره 249 ملغم/لتر وان الدراسات في هذا المجال مستمرة حيث أضيفت بعض المواد الى الوسط حققت انتاجاً قدره 938 ملغم/لتر. (هوكسما واخرون 1958) ويمكن أن تستعمل المصادر الكربوهيدراتية كالسكروز، النشا، الدكسترين، الفركتوز. وكذلك يمكن أن يستعمل المصادر النتروجينية المعقدة والتي تهضم بشكل أفضل.

اللقاح يجهز بالدوارق وبالحاضن الهزاز وعند درجة حرارة 30-32° م - وبعد 2-3 يوم ثم يتم النقل إلى المخمر الانتاجي.

التربية الانتاجية

التربية الانتاجية 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 الانتاجية تخفض درجة الحرارة الى 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 تقريباً كافة المصادر الكاربوهيدراتية ولكن تزداد الحوامض الكيتونية. وفي اليوم الثالث تصل الدرجة القصوى وفي اليوم الخامس تهبط كميتها إلى الصفر. أما الـ pH ويكون حامضياً ضعيفاً أو متعادلاً ولكن باختفاء الأحماض الكيتونية فإن pH يرتفع. وهذا يعود من جهة أخرى لتحضير الأمونياك بنهاية التربية. حيث تكون قد بدأت عمليات التفسخ للمايسليوم الفطري. أما عنصر الفوسفات الموجود فإنه يهضم 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 المايكروليدنية وهو ينتج من السلالة *streptomyces erythreus* في عام 1952، من قبل م. كندي. ولكن على مستوى انتاجي صناعي تم تصنيعه من قبل هنري عام 1955 وعلى وسط غذائي اعتيادي يكون مستعمرات ذات حواف خارجية مائلة. نامية ومتداخلة يعيق في

الوسط وفي البداية تملك المستعمرات أو المزارع لوناً أبيض ولكنها بعد ذلك ومن الجانب والجهة السفلى تتلون بلون وردي أو أصفر. يكون صبغه قابلة للذوبان وتنتشر بسهولة في الوسط. الهايفات الهوائيات تكون حلزونية على الأكثر. وفي الأوساط التأليفية تكون مزارع بيضاء اما على مرق اللحم الاكري فتكون مستعمرات كريمية. الجلاتين يذوب يحلل ببتون الحليب، يحلل النشا، يختزل النترات.

التربية الصناعية لمصنعات الاثرومايسين

المصنعات الفعالة المستعملة والتي تكون أشكالها اسبورية ومنها تحضر المزارع اللقاحية. والمزرعة تتميز بالبداية في الوسط الاكري وضمن فترة 12-14 يوماً وتحضيرها يتم بطورين حيث يتم التلقيح في جهاز التربية لتحضير المزرعة الرحمية حيث تنمو الهايفات الخيطية وكفرق عن كثير من العمليات الأخرى لتحضير المضادات الحيوية وهنا فقط يتكون الاوليندومتسين وتبعاً لدرجة نمو الكتلة الحيوية ويتلون الوسط إلى لون أسود - فهوائي الشكل المورفولوجي للمايسليوم يتغير بمرور العملية التربوية وخلال 12-24 ساعة في الوسط البيئي تتراكم كتلة حيوية كبيرة مكونة مستعمرات مفككة وزغبية. والهايفات تكون سميكة جداً ومتفرغة 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 الانتاج الشديد للاوليندومتسين ونمو المايسليوم يستمر حتى اليوم الرابع بالتغلب على هايفات الطور الثاني النحيفة، وتحلل متزايد لهايفات الطور الأول السميكة. 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 ينمو في وسط تأليفي أيضاً والحاوي على نترات الكالسيوم أو سلفات الأمونيوم. من المصادر الكربونية يستعمل الكلوكوز، النشا، مالتوز، كليسرين، طحين الذرة، دهون، كحولات منخفضة، ومن المصادر النايتروجينية المساعدة لنموه 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 للاوليندومتسين. أما الوسط الجيد لنمو S. antibioticus ATCC 11891 فيحتوي غم/لتر: طحين الصويا 15، كلوكوز 20، نشا 10، 5، طحين 5، نايتروجين أميني N_2-amin 5، (سوير وجماعته 1956) ويضاف إلى هذا الوسط 30 ملغم/لتر اكردين البرتقالي فالمنتوج يرتفع مرتين تقريباً من 260 إلى 450 ملغم/لتر (ربتماكس وتوبل 1958).

تلوزين

التلوزين يؤلف من السلالة streptomyces fradiae السلالة M-84-z-2724 في وسط مكوناته غم/لتر كلوكوز 35، $5MgSO_4.7H_2O$، 2.3 K_2HPO_4، 3 $CaCO_3$، النين 2، 1L-valine، ببيوتين 5، كلوتسين 7، مثيل أوليت 25، فإنها ستؤلف فوق 2000 ملغم/لتر، تلوزين ينتج عند درجة 30° م المصادر الكربونية الجيدة هي الكلوكوز والمالتوز، زيت فول الصويا عند تركيز 20 مل/لتر أعطى انتاج 1600 ملغم/لتر مثيل methyl alitat 1900 ملغم/لتر ويمكن أن يكون هذا المصدر خليطاً من methyl palmatat و methyl stearat بأجزاء متساوية عند الاضافة للوسط حوالى 25% methyl caprat أو capelerate تثبط كلياً تأليف المضاد الحيوي. الفوسفات K_2HPO_4 يمكن أن تحتوي على 2.4 غم/لتر وهو التركيز المثالي. ولكن عند الوصول إلى 5 غم/لتر سلفات المغنيسيوم. تركيز الفوسفات يمكن أن يرتفع (سنارك 1961).

متمايسين

لتحضير هذا المضاد الحيوي يمكن استعمال الوسط المحتوي على غم/لتر طحين الصويا 30، كلوكوز 50، 0.5 K_2HPO_4، 1 $CaCl_2.2H_2O$، ويمكن أن يستعمل مستخلص الخمائر 22.5 غم/لتر وببتون 15 غم/لتر والانتاج يكون ما بين 400-700 ملغم/لتر.

خاتمة

أن من كل ما تقدم من تقدم تقني في المايكروبايولوجي الصناعي يعطي آفاقاً جديدة وكبيرة لاستخدام سكريات التمور في الانتاج وإن المستقبل لكفيل بهذا العطاء.

المصادر العربية

1 ـ الـدورة التدريبية لسكريـات التمور 1982. مجلس البحث العلمي. مـركـز البحـوث الزراعية والموارد المائية. قسم النخيل والتمور.

2 ـ العكيدي، حسن خالد 1982. انتاج بـروتين الخليـة الواحـدة من عصير التمـر. مجلة علوم الحياة. العدد 13/1.

3 ـ العكيدي، حسن خالد 1981. دراسة عن إمكـانية انتـاج حامض الليمـون من التمور العراقية.

4 ـ العكيدي، حسن خالد 1979. تصنيع الانزيمات عن طريق الاحياء المجهـرية. تقـرير علمي. مجلس البحث العلمي.

5 ـ العكيدي، حسن خالد 1985. تصنيع التمـور ومنتجات النخلة السيليلوزيـة. الاتحاد العربي للصناعات الغذائية.

6 ـ العكيدي، حسن خالد 1982 تكنولوجيا إنتاج الخمائر. دراسة مقدمة الى الاتحاد العربي للصناعات الغذائية.

المصادر الأجنبية

1 — Aunstrup, K., 1977. production of Industerial Enzyme.

2 — Bardarof, c. 1964. Antibiotics. Sofia.

3 — Beshkov, M.,. 1974. Industerial Microbiology-Cresto danal-Bulgaria-plovdiv.

4 — Breed, R.S., E.G.D. Murray, N.R. Smith 1957. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore.

5 — Casida, L.E., JR John Wiley and Sons. 1964. Industerial Microbiology.

6 — chain, E.B., 1958. Chemistery and Biochemistrey. 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 Industerial. Microbiology, Vol. 1.

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 Louts.

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 Bioengeneering. vol. VIII.

17 — Peppeler, H.J., 1967. Microbial Technology. New York.

18 — Perscott, S.C., Dunn, 1959. Industeral 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. Anual 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. Principles 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., Gorin. 1965. progress in Ind. Microbiology, Vol-7.

28 — Stark, W.M. and K.L. Smith. The erythromycin fermentation. in progress in Industerial 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 Industriale. Firenze.

31 — Young G.G., 1961. Witton's Microbiology. New York.

DATES AND MICROBIAL BIOTECHNOLOGY

By

Dr. Hassan K. Hassan Al Ogaidi

Director

Regional Project for Palm & Dates Research Centre

in the Near East & North Africa

Baghdad 1987

DATES AND MICROBIAL BIOTECHNOLOGY

By

Dr. Hassan K. Hassan Al Ogaidi

Director

Regional Project for Palm & Dates Research Centre

in the Near East & North Africa

PRINTED IN LEBANON BY: AL-WATAN PRINTING PRESS CO.
BEIRUT, MSAYTBEH, AL ISTIKLAL STR., RIFAE'E Bldg. Tlx: 22624 BARGOT LE