المحاضرة الثانية / تقنية حياتية/1 **أ.م. د شيماء ذياب جدوع**

طرق التنمية المستعملة في التقنية الحياتية

تتم زراعة أو تنمية الأحياء المجهرية المستعملة في التقنية الحياتية في أوساط غذائية صلبة أو سائلة وباستعمال أنظمة مختلفة منها نظام الوجبات أو الوجبات المغذاة أو النظام المستمر.

أساسيات التنمية في الأنظمة السائلةPrinciples of cultivation in aqueous systems :

يعرف النمو في الكائنات الحية بأنه الزيادة في مادة الخلية والتي يعبر عنها بالكتلة الحيوية Biomass أو عدد الخلايا وهي نتيجة لخطوات بايولوجية متسلسلة ومتناسقة تحفز بواسطة الأنزيمات .ويعتمد النمو المثالي على انتقال العناصر الغذائية الضرورية الى سطح الخلية والمحافظة على الظروف البيئية المثالية مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والتهوية. يمكن تقدير الكتلة الحيوية في جهاز التخمر بطريقتين هما الطريقة الوزنية وتتم أما بقياس الوزن الجاف أو قياس الوزن الرطب والطريقة الثانية هي الطريقة العددية (عد الخلايا).يعرف زمن التضاعف Doubling time هو الزمن اللازم لتضاعف وزن الكتلة الحيوية بينما يعرف زمن الجيل Generation time هو الزمن اللازم لتضاعف عدد الخلايا.

أنظمة النمو في الاوساط السائلة

1- مزارع الوجبات (أنظمة الوجباتBatch cultures)

يعد نظام مزارع الوجبات نظاما مغلقا حيث يضاف اللقاح (البادئ) الى الوسط الغذائي وتوفر الظروف المثالية للنمو مثل الحرارة والرقم الهيدروجيني والتهوية .نادرا ما يكون معدل النمو ومعدل النمو النوعي ثابتا في مزارع الوجبات وهذا يعكس عدم ثباتيه ظروف التغذية والتي تعد من الصفات المميزة لهذا النظام. يمتاز نمو الاحياء المجهرية في نظام الوجبات بعدم وجود نمو في طور الركودLag phase ولكن التحليل الكيميائي أوضح عددا من الفعاليات الايضية غير الظاهرة والتي تبين أن الخلية تتأقلم على الظروف الجديدة وأن النمو سيبدأ في الفترة اللاحقة. الطور اللوغاريتمي وهذا الطور غير مفهوم جيدا سواء من الناجية الفسيولوجية أو الرياضية وذلك لأن الخلايا تكون غير متجانسة في العمر والتركيب والأيض ويكون نمو الكائن في الطور اللوغاريتمي غير محدود وتكون العناصر الغذائية موجودة بوفرة ولا وجود للمواد المثبطة لذلك يكون معدل النمو النوعي عند أقصاه .يعقب هذا الطور طور الثبات Stationary phase حيث يتوقف النمو بسبب نفاذ العناصر الغذائية ويظهر توازن الكتلة الحيوية حيث معدل النمو = معدل الموت .ويقال ان تسمية طور الثبات تسمية خاطئة من الناحية الايضية حيث تكون الخلايا فعالة من الناحية الايضية وتنتج المنتجات الثانوية مثل المضادات الحيوية والتي لا تنتج خلال الطور اللوغاريتمي.

الطور الاخير هو طور الهلاك أو الموت حيث يصبح معدل النمو النوعي سالبا .تتوقف عمليات التقنية الحياتية التي تعتمد على نظام الوجبات قبل الوصول الى هذا الطور بسبب تناقص الأيض وانحلال الخلايا، وتستعمل طريقة الوجبات لإنتاج الكتلة الحيوية وفي إنتاج المنتجات الأيضية الأولية primary metabolites (وهي المركبات الضرورية لنمو وإدامة الخلية مثل الفيتامينات والانزيمات) كذلك المنتجات الايضية الثانوية

Dr.Shaymaa Thyab Oddoa Al-Sahlany

secondary metabolites(وهي المركبات التي ليس لها دور في نمو الخلية مثل المضادات الحيوية ومنظمات النمو مثل حامض الجبريليك.) عادة تستعمل الظروف المزرعية التي تشجع إنتاج أقصى كمية من الخلايا عند الرغبة في إنتاج الكتلة الحيوية .وتستخدم الظروف الملائمة لإطالة الطور اللوغاريتمي عند إنتاج منتجات أيضية أولية .ولإنتاج المنتجات الأيضية الثانوية يجب توفير الظروف لإعطاء طور لوغاريتمي قصير وإطالة طور الثبات (طور الانتاج في هذه الحالة)أو استعمال ظروف تقلل معدل النمو في الطور اللوغاريتمي والذي ينتج عنه تكوين مبكر للمنتجات الأيضية الثانوية.

2- المزارع المستمرةContinuous cultures

في هذه الطريقة وعلى العكس من طريقة الوجبات يضاف الوسط الغذائي ويسحب جزء مساو له من حجم المزرعة بصورة مستمرة .تسمح الطريقة المستمرة بنمو الكائن المجهري تحت ظروف وحالة مستقرة حيث تبقى ظروف التخمر مثل الرقم الهيدروجيني وتركيز العناصر الغذائية والمنتجات الايضية ثابتة على العكس من طريقة الوجبات اذ تتغير هذه الظروف خلال فترة نمو الكائن المجهري ويمكن السيطرة على هذه الظروف بصورة منفردة أحدها عن الآخر وبذلك تسمح الطريقة المستمرة في الحصول على معلومات دقيقة حول دور كل عامل في نمو الكائن المجهري .وهناك معدات تقليب والتحريك لمزج مكونات الوسط الغذائي بصورة متجانسة داخل جهاز التخمر و يجب السيطرة على هذا النظام بعدة طرق :

1- استعمال المنظم الكيميائيChemo state

يكون عامل النمو المحدد هو أحد مكونات الوسط الغذائي الذي يتحكم في عملية النمو، وعادة يضاف الوسط الحاوي على عامل النمو بصورة مستمرة عندما ينفذ هذا العامل داخل جهاز التخمر ويسحب بالوقت نفسه حجما مساويا من المزرعة والذي يحتوي على أقصى كمية من الخلايا.

2- استعمال نظام العكارةTurbidostat

يبقى تركيز الخلايا ثابتا في المزرعة وذلك بالسيطرة على جريان الوسط الغذائي إلى داخل جهاز التخمر بحيث تبقى عكارة المزرعة في حدود معينة، ويمكن الوصول إلى ذلك عن طريق تنظيم الكتلة الحيوية بخلية ضوئية كهربائية تعطي إشارة إلى المضخة الخاصة بتجهيز الوسط الغذائي بحيث تفتح المضخة إذا تجاوزت الكتلة الحيوية الحد المثبت وتغلق إذا كانت الخلايا(الكتلة الحيوية)أقل من الحد المثبت.

3- استعمال المنظم الحيويBiostat

يتم قياس تركيز الكتلة الحيوية بمقدار CO_2 الناتج .إن أساس هذه الطريقة يعتمد على أنه تتكون أقصى كمية من الكتلة الحيوية عندما تصل كمية CO_2 أقصاها لذلك تتم عملية سحب المنتوج وإضافة وسط غذائي جديد. تعتبر طريقة المنظم الكيميائي هي أكثر الطرق شيوعا لكونها لا تحتاج الى أجهزة معقدة كما في المنظم الحيوي .

مميزات طريقة المزارع المستمرة

لم تعتمد صناعات التقانات الاحيائية طريقة المزارع المستمرة في عملية الإنتاج على الرغم من مميزاتها مقارنة بطريقة الوجبات من ناحية الانتاجية وتجانس عملية الانتاج وسهولة استخدام الطرق الأتوماتيكية لأن عيبها الوحيد هو كونها عرضة للتلوث أكثر من طريقة الوجبات والسبب يعود إلى الخبرة الطويلة مع طريقة الوجبات ونقص المعلومات والخبرة الخاصة بظروف السيطرة الدقيقة في النظام المستمر.

Dr.Shayma Thyab Gdoa Al-Sahlany

1- الإنتاجيةProductivity

يعود تفوق إنتاجية الكتلة الحيوية بالطريقة المستمرة مقارنة بطريقة الوجبات إلى الحفاظ على ظروف أقصى إنتاج خلال عملية التخمر فضلا عن انعدام تأثير الفترة غير الانتاجية المرتبطة بالطريقة المستمرة الطويلة الأمد مثل عمليات التحضير والتعقيم. نظريًا يكون إنتاج منتوج مرغوب غير الكتلة الحيوية بالطريقة المستمرة عالٍ أيضا مقارنة بطريقة الوجبات يعود ذلك إلى أن المزارع المستمرة قد تعمل عند معدل يحافظ على أقصى كمية من المنتوج بينما تكوين المنتوج بطريقة الوجبات عبارة عن ظاهرة عابرة خلال عملية التخمر .

2- تجانس العملية وسهولة عملها اوتوماتيكياً

الطريقة المستمرة تنظم نفسها بنفسها حيث ينظم معدل نمو المزرعة مع معدل الوسط المضاف لذلك توجد حالة استقرار، حيث يبقى تركيز كل من الخلايا والوسط الغذائي والمنتوج والسموم ثابتا خلال عملية التخمر ولهذا فإنه حال بدأ المزرعة وتكاملها فإن متطلبات عملية التخمر مثل عمليات السيطرة تبقى ثابتة ايضاً بينما تختلف متطلبات المزرعة خلال عملية التخمر بطريقة الوجبات حيث تكون حاجة الاوكسجين في البداية قليلة لكنها تزداد قرب انتهاء عملية التخمر نتيجة لزيادة الكتلة الحيوية ولزوجة الوسط الغذائي كما تزداد الحاجة للتبريد خلال العملية وكذلك السيطرة على الرقم الهيدروجيني لذلك تستخدم الطرق الاوتوماتيكية في المزارع المستمرة .كما تحتاج طريقة الوجبات إلى أيدي عاملة كثيرة في بعض الخطوات مثل تحضير الوسط الغذائي والتعقيم وتعبئة أجهزة التخمر وفصل المنتوج بينما تحتاج الطريقة المستمرة إلى عدد ثابت من الايدي العاملة حيث يجهز الوسط الغذائي المعقم بصورة مستمرة كذلك يستخلص المنتوج لذلك يكون الوقت اللازم لتحضير الأجهزة والتعقيم قليلا جدا.

3- حساسية الطريقة المستمرة للتلوث

تكون الطريقة المستمرة أكثر عرضة لدخول الاحياء المجهرية الملوثة بسبب طول مدة التخمر مقارنة بطريقة الوجبات .وقد يتلأم الكائن المجهري الذي يسبب التلوث مع هذه الظروف أسرع من الكائن المجهري الأصلي المستعمل في عملية التخمر. فاذا نمى الكائن المجهري الملوث بمعدل اعلى فانه يزيح الكائن الأصلي وقد تقود الطبيعة الانتقائية العالية للمزارع المستمرة إلى مشكلة انحلال السلالة strain degenerationوالتي يطلق عليها التلوث من الداخل حيث تتغير صفات السلالة الأصلية وحدوث طفرات وراثية في بعض أفراد السلالة الأصلية بسبب طول فترة الطريقة المستمرة تكون أكثر من طريقة الوجبات.

استعمالات طريقة المزارع المستمرة

1-انتاج الكتلة الحيوية

يطلق على الكتلة الحيوية التي تنتج لغرض الاستهلاك البشري أو الحيواني بروتين أحادي الخلية. وظهرت فكرة استخدام الكتلة الحيوية في تغذية الانسان بصورة كبيرة في الستينات على الرغم من إنتاجها واستخدامها من قبل الألمان خلال الحرب العالمية الأولى، وقد طورت شركات عديدة إنتاج بروتين أحادي الخلية من مصادر كاربونية مختلفة .وقد استخدمت طريقة المزارع المستمرة في جميع الدراسات والبحوث لتنمية الأحياء المجهرية وتعد الطريقة المستمرة مثالية لإنتاج الكتلة الحيوية .

Dr.Shayma Thyab Gddoa Al-Sahlany

2-عزل وتحسين السلالات

ان الطبيعة الانتخابية العالية الذي تستخدم في الطريقة المستمرة جعلته أداة مثالية في عزل الاحياء المجهرية وتحسين صفاتها.

3-الحصول على المعلومات الاساسية الخاصة بالأحياء المجهرية الصناعية

تعد الطريقة المستمرة من الأمور الجيدة التي تستخدم في بحوث الفسلجة والكيمياء الحيوية للأحياء المجهرية ومن مميزات هذه الطريقة مقارنة بطريقة الوجبات هي:

أ -الحصول على حالة مستقرة.

ب - يتجدد نمو المزرعة بمعدل إضافة الوسط الزرعي.

ج -يتحدد معدل نمو الكائن المجهري بتركيز العنصر الغذائي المحدد.

3- مزارع الوجبات المغذاةFed-Batch cultures

يقصد بها مزارع الوجبات التي تتغذى بصورة مستمرة أو متتالية بالوسط الغذائي دون إزالة أية كمية من المزرعة وبذلك يزداد الحجم مع الوقت.

تطبيقات طريقة الوجبات المغذاة

من اهم مميزات هذه الطريقة المحافظة على تركيز واطئ جدا للعناصر الغذائية ومن فوائدها هي:

1- ازالة التأثير الكبحي لمصادر الكاربون سريعة التمثيل والمحافظة على الظروف الهوائية

لوحظ ومنذ عام 1915 أن زيادة المالت في الوسط الغذائي المستخدم في انتاج خميرة الخبز تؤدي إلى زيادة النمو وينتج عنه احتياج عالٍ من الاوكسجين فوق قدرة أجهزة التخمر المستعملة وبذلك تزداد الظروف غير الهوائية التي تؤدي إلى إنتاج الكحول على حساب الكتلة الحيوية لذلك ينمى الكائن المجهري في وسط غذائي ذي تركيز ابتدائي واطئ وتضاف له كميات من الوسط الغذائي بمعدل أقل من معدل الاستهلاك وبذلك يمكن الوصول إلى حالة شبه مستقرة.

2- منع التأثير السام لمكونات الوسط الغذائي

يمكن استخدام طريقة الوجبات المغذاة في منع التأثير السام لأحد مكونات الوسط الغذائي مثل مادة خلات فينيل الصوديوم sodium phenyl acetate ضد الكائن المجهري *P. chrysogenum* المستخدم في إنتاج البنسلين لذلك تتم المحافظة على مستوى أدنى من المستوى السام لتلك المادة اما بإضافتها بشكل دفعات صغيرة متتالية أو بالتغذية المستمرة، فضلا عن ذلك يعمل نظام التغذية بهذه الطريقة الى تقليل من عملية إضافة الهيدروكسيل إلى مادة الخلات والتي تعتبر تمهيدية لتكوين جزيئة البنسلين وبذلك تضمن أقصى دمج لها بالمنتوج. مثال آخر هو إنتاج حامض الكلوتاميك من بكتريا *Bacillus subtilis* حيث تساعد التغذية البطيئة على استعمال أوساط غذائية للكائن المجهري ولعملية الانتاج نفسها في حالة استخدامها بتراكيز عالية وبطريقة الوجبات التقليدية.

Dr.Shayma Tayab Gddoa Al-Sahlany

تخمرات الحالة الصلبةSolid state fermentation

عبارة عن نمو الكائن المجهري على مواد صلبة في حالة غياب أو شبه غياب الماء الحر .الاوساط الغذائية الشائعة الاستعمال في تخمرات الحالة الصلبة هي الحبوب والبقوليات ونخالة الحنطة والمواد السليلوزية مثل الخشب والقش، وتكون هذه المواد غير ذائبة أو قليلة الذوبان جدا في الماء ولكنها رخيصة ومن السهل الحصول عليها وتحتوي على تركيز عالي من العناصر الغذائية. وتستخدم في إنتاج بعض الاغذية الشرقية مثل صلصة فول الصويا والميزو وهي عبارة عن أغذية متخمرة ناتجة من تخمر فول الصويا والحبوب بواسطة الاعفان .كما تستخدم هذه الطريقة في انتاج الانزيمات وبعض الاحماض العضوية مثل حامض الستريك.

انواع تخمرات الحالة الصلبة

يوجد عدة أنواع من تخمرات الحالة الصلبة اعتمادا على نوع الأحياء المجهرية السائدة:

1- تخمرات الحالة الصلبة بواسطة الفلورا الطبيعية

تتضمن عملية انتاج السايلج Silage وعملية تحلل المواد العضوية، إن عملية انتاج السايلج Silage هي عملية لاهوائية تستخدم فيها النباتات الخضراء ويتم التخمر عند حرارة 25 - 30 م لمدة 1- 2 أسبوع والبكتريا السائدة هي *Lactobacillus bulgaricus* حيث تنتج حامض اللاكتيك وبذلك تمنع بكتريا التفسخ او التعفن Putrefaction bacteria ولا تستطيع الاعفان أن تنمو بسب غياب الأوكسجين، الرطوبة المثالية لهذه العملية 50 - 65 % وعند هذه الرطوبة تنشط فقط بكتريا حامض اللاكتيك التي تتحمل الضغط الأزموزي وتحول الكربوهيدرات إلى حامض اللاكتيك بينما عملية تحلل المواد العضوية (المخلفات النباتية والحيوانية) فإنها تتضمن تعاقب أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية مثل البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة والخمائر والأعفان الخيطية وكذلك البكتريا الخيطية والاعفان المحبة للحرارة العالية. ويعد تكوين الحرارة نتيجة للفعاليات الحيوية لهذه الاحياء المجهرية مشكلة كبيرة لذا يجب تقليب المادة العضوية ميكانيكيا لتجنب هلاك الاحياء المجهرية بفعل الحرارة المرتفعة الناتجة من التخمر. وتعد عملية تحلل المادة العضوية الخاصة بإنتاج فطر العرهون من أهم العمليات الناجحة للاستفادة من المخلفات السيليلوزية .

2- تخمرات الحالة الصلبة باستخدام مزارع نقية

تعد صناعة الكوجي Koji مثالا لهذه التخمرات وهي من العمليات القديمة التي تستعمل فيها الحبوب مثل الرز الاحمر وحبوب فول الصويا التي يتم تخميرها بواسطة عفن *Aspergillus oryzae* كما تعد طريقة كوجي الأساس في عمليات تخمر أخرى مثل إنتاج الأنزيمات على نطاق تجاري وإنتاج الاحماض العضوية والايثانول وقد طورت عملية كوجي لإنتاج الكتلة الحيوية من المواد النشوية والمواد السيليوزية.

3 -تخمرات الحالة الصلبة باستخدام مزارع مختلطة : تستخدم مزارع مختلطة في تخمرات الحالة الصلبة للحصول على أقصى كمية من المنتوج المرغوب حيث وجد أن القش يمكن ان يتحول إلى كتلة حيوية بصورة أكفأ عند استخدام مزارع مختلطة تتكون من العفن *Chaetomium cellulolyticum* وخميرة *Candida lipolytica* مقارنة مع مزرعة تستعمل العفن فقط. والسبب يعود إلى استخدام الخمائر السكريات الزائدة التي تحرر من فعل إنزيم السيليلوز Cellulase enzyme الذي ينتجه العفن والذي يحلل السيليلوز

Dr. Shayma Thyab Ghaida Al-Sahlany

الى سكريات بسيطة وبالتالي يمنع العفن من تكوين السبورات نتيجة نقص المغذيات في وسط النمو. وتعد تخمرات الحالة الصلبة رخيصة عامة ولا تحتاج الى تكنولوجيا عالية.

إيجابيات وسلبيات تخمرات الحالة الصلبة

الإيجابيات	السلبيات
1-الوسط الغذائي بسيط وطبيعي ورخيص مقارنة بالأوساط التركيبية العالية الكلفة.	1- يقتصر استعمال الطريقة على الاعفان التي تتحمل رطوبة واطئة.
2- يساعد مستوى الرطوبة المنخفض على استخدام أجهزة تخمر صغيرة الحجم ويقلل من فرص التلوث وقد لا يحتاج غالبا إلى عملية التعقيم.	2- إنتاج حرارة عالية نتيجة الفعاليات الحيوية والتي تعد أحدى مشكلات هذه الطريقة.
3-تحتاج طاقة أقل مقارنة مع عمليات الخلط التحريك في التخمرات السائلة.	3- يمكن إنتاج منتوجات محدودة.
4- يكون تركيز المنتوج المرغوب عاليا	4- صعوبة السيطرة على الظروف التخمر بدقة مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وكمية الأوكسجين.
5- يمكن تلبية متطلبات المزرعة من الاوكسجين عن طريق انتشار الغازات من خلال الفراغات بين جزيئات المادة الصلبة.	5- يكون معدل نمو الاحياء المجهرية واطئاً

Dr.Shayma Thyab Gdaoa Al-Sahlany