المحاضرة الاولى

عزل الأحياء المجهرية :

ان المصادر الطبيعية الرئيسية للأحياء المجهرية الصناعية هي التربة والمياه والأغذية الطازجة و المتخمرة والحيوانات والنباتات الحية ومياه المجاري . والطريقة المثلى لعزل السلالات تبدأ بعزل المصادر الطبيعية كالتربة مثلا والتي قد تكون غنية بالأحياء المجهرية المرغوبة وعادة تصمم عملية العزل بحيث تشجع نمو الأنواع التي تحمل الصفة المرغوبة حيث تستخدم الصفة المرغوبة كعامل انتخاب ثم بعد ذلك يوفر لهذا النوع الأوساط الزرعية الانتقالية التي تسمح بنمو الأنواع الأخرى معه.

عزل الأحياء من التربة :-

١ – يتم اخذ 10 غم من تربة الحديقة .
٢ – توضع في 90 مل ماء معقم في زجاجة معقمة .
٣ – ترج القنينة بشكل جيد ثم تترك 15 دقيقة لتترسب التربة .
٤- يتم تحضير تخافيف من المحلول العلوي الرائق باستخدام أنابيب اختبار حاوية 9 مل ماء معقم حيث يضاف 1 مل من المحلول إلى 9 مل كي نحصل على التخفيف 1/10 وتكرر العملية إلى أن نحصل على تخفيف 1/1000000

1 مل← 1مل ← 1مل← 1مل

عينة تربة تحتوي احياء مجهريه يراد عزلها 9مل 9مل 9مل 9مل

٥ – يتم اخذ 1مل من التخفيفين الاخيرين وينقل إلى أطباق بتري معقمة بواسطة ماصة معقمة ويحرك حركة دائرية حتى يمتزج Nutrient Agar ويصب فوقه (15مل) تقريبا من الوسط الغذائي
الوسط مع 1 مل من العينة . ثم يترك الطبق حتى يتصلب وتحض على 30 ْ م / 48 ساعة. وتحضن على 22 – 25 م لمدة 5 أيام .
٦ – تكرر نفس العملية باستخدام بيئة PDA.

٧ – بعد انتهاء التحضين وظهور المستعمرات يتم اخذ لمسة من كل مستعمرة ويتم عمل شريحة منها وتصبغ بالطريقة البسيطة للتعرف على الصفات المورفولوجية ويتم تحديد المستعمرات المطلوبة.
٨ – تؤخذ لمسة من المستعمرات المرغوبة وتنقل إلى بيئة الاگار المائل N.A وتحضن على درجة 30 ْ م / 48 ساعة وبعدها يتم عمل شريحة وتصبغ بالتصبيغ البسيط أو بطريقة گرام للتأكد من نقاوتها .
ومثل ذلك 5 أنابيب تحتوي على وسط Malt extract Agar.

عزل الأحياء المجهرية من الماء .

١ – يؤخذ 50 مل من ماء الحنفية في قنينة زجاجية معقمة وتحضر منه التخافيف 1/10 ، 1/100 ثم تكرر نفس الخطوات في الطريقة السابقة .
٢ – تتبع الطريقة السابقة .

عزل الأحياء المجهرية من الأغذية الفاسدة أو الطازجة .

يؤخذ 10 غم من المادة الغذائية المطلوبة وتضاف إلى 90 مل ماء معقم في قنينة زجاجية وتحضر التخافيف وتتبع نفس العملية السابقة .

تحضير المحلول الفسيولوجي
9 ml Nacl + 1000 ml ماء مقطر فقط
4.5 Nacl + 500 ml ماء مقطرفقط
2.25 Nacl + 250 ml ماء مقطرفقط
0.9 Nacl + 100 ml ماء مقطرفقط
ويعقم

تنقية وتشخيص الأحياء المجهرية الصناعية :

١ – يتم اختيار المستعمرات من البكتريا أو الخمائر اوالاعفان من الأطباق الخاصة بالعزل من المصادر المختلفة .
٢ – تؤخذ لمسة باللوب من المستعمرة المختارة وتزرع على الاگار السائل إذا كانت بكتريا وإذا كانت أعفان تزرع على وسط وتحضن حسب الحرارة الملائمة والمدة المطلوبة (بالتجميد) .
٣ – تحضر شرائح من البكتريا وتصبغ بطريقة گرام ويلاحظ الشكل ونظام التجمع ونتيجة الصبغة سالبة او موجبة . مفردة – مستعمرات -

إذا كانت عملية تشخيص استمر .
- تأثير درجات الحرارة (اختبارات فسيولوجية)
10 ° م 20 ° م 30 ° م 40 ° م 50 ° م
المانيتول Maltose, Fructose - تخمير السكريات هل تخمر او تحلل سكر الكلوكوز
- - تحرير الامونيا - - تحليل البروتين - تحليل الدهن - Co2- إنتاج
واختبارات أخرى حسب نوع الميكروب واسجل النتائج
عملية التشخيص تتم بعد عملية التنقية التي تتم بعملية الزرع المتكرر على الاگار المائل عدة مرات ثم تحفظ العينات لحين إجراء عملية التشخيص بعد ذلك يحضر شرائح من الاعفان ويصبغ بالتحضير الرطب باستخدام صبغة اللاكتوفينول بلو وتسجل المعلومات وملاحظة السبورات داخلية أم خارجية والهايفات هل مقسمة ام غير مقسمة ولون السبور والهايفات متفرعة ام غير متفرعة وتسجيلها بالإضافة إلى الاختبارات المورفولوجية والفسيولوجية .

المحاضرة الثانية

حفظ الأحياء المجهرية :

إن عملية العزل للأحياء المجهرية مكلفة وتأخذ وقتا طويلا بالإضافة إلى أن عملية التصنيع تكون مستمرة وتحتاج في كل وجبة الى لقاح نشط يحتوي على اكبر قدر ممكن من الخلايا الحية وخالي من التلوث .
وهناك العديد من الأسباب التي تستدعي إيجاد أفضل الوسائل لحفظ الأحياء المجهرية منها :-

١ – ان عملية العزل مكلفة وتحتاج وقت طويل وعدم ضمان الحصول على نفس النوعية من الأحياء لكل عملية تصنيعية.
٢ – ان عمليات الزراعة المتكررة تكون عرضة للتلوث وكذلك تؤدي إلى إفقاد الخلايا صفاتها المرغوبة .
٣ – تحفظ الخلايا لتستعمل كمرجع لمقارنة إنتاجية المزارع المستعملة مع العزلات الأصلية .
٤ – تحفظ بنسخ متعددة لغرض تلافي الفقد الذي يحصل للسلالات .

ومن الأمور والشروط المهمة في حفظ الأحياء المجهرية :

١ – أن تكون السلالة مستقرة وراثيا .
٢ – أن تكون السلالة جاهزة للصيانة لفترات زمنية (تنشط مستمر) .
٣ – أن تنمو السلالة بسرعة بعد عملية التلقيح في وعاء التخمير .
٤ – أن تنتج السلالة خلايا خضرية وسبورية .
٥ – أن تكون نقية وخالية من التلوث .
٦ – أن تقاوم التلوث إذا كان محتمل .
٧ – أن تكون قابلة للتغيير من قبل الطفرات الوراثية .

هناك اكثر من طريقة للحفظ وتحدد بـ

١ – نوع الكائن الحي . ٢ – مدة او فترة حزن الكائن الحي .

* مدة او فترة خزن الكائن الحي تحدد بعوامل :-

١ – نوع الكائن . ٢ – العمر ٣ – المرحلة التي يعيش فيها الكائن. ٤ – طريقة الخزن. ٥ – الحاجة للكائن .

وتختلف طرق الحفظ حسب نوع الكائن الحي حيث لكل نوع طريقة ملائمة للحفظ ومنها :-

١ – الحفظ بالتجفيف : تستخدم لحفظ الخمائر حيث يضاف كربونات الكالسيوم الى معلق الخميرة وتترك الى ان تجفف بهيئة مسحوق ممكن حفظها لعدة سنوات .

2- حفظ السبورات في الماء المعقم : وتلائم هذه الطريقة البكتريا والفطريات حيث تؤخذ مزرعة من البكتريا او الفطريات (المكونة للسبورات وبعمر حوالي اسبوع واحد منماة على بيئة اكار البطاطا والدكستروز للفطريات والاكار المغذي للبكتريا) بحيث يلاحظ تكون السبورات على سطح المزرعة ثم يضاف 5 مل من الماء المعقم الى سطح المزرعة قرب لهب المصباح وتزال السبورات من السطح بطريقة الكشط باستعمال ابرة التلقيح المعقمة حيث يتم الحصول على معلق السبورات في الماء، ويحفظ في انبوبة اختبار معقمة.

ملاحظة : عملية الكشط هي عملية مهمة لخلط السبورات مع الماء وخروج السبورات من الحافظات السبورية.

3- حفظ السبورات في التربة المعقمة :

تستخدم عادة لحفظ سبورات الاعفان وفي بعض الأحيان لحفظ سبورات البكتريا ولفترات طويلة تصل الى سنة او سنتين.

طريقة العمل:-

١ – خذ حوالي 10 غم من تربة الحديقة المجففة في انبوبة اختبار واضف 2 مل من الماء المقطر لاعطاء نسبة رطوبة 20% .

٢ – تعقم الانبوبة على حرارة 121 °م لمدة ½ ساعة باستخدام الاوتوكليف وتكرر العملية ليومين متتاليين لضمان عملية التعقيم والفائدة من تكرار العملية هو عند التعقيم الاولي هناك احتمال وجود سبورات مقاومة للحرارة . فعند ترك الانبوبة وانخفاض حرارتها تنمو السبورات الى خلايا خضرية واثناء تكرار العملية يتم القضاء على الخلايا بشكل تام.

٣ – يضاف ½ مل من معلق السبورات السابق تحضيرة في الطريقة السابقة بالماصة المعقمة الى الانبوبة .

٤ – تحضن بدرجة حرارة 25 °م لمدة اسبوع .

٥ – تحفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 °م وتحفظ لحين الاستخدام .

4- طريقة الحفظ بالزيت :

١ – تؤخذ لمسة من مزرعة بكتيرية وتنقل الى بيئة اكار مغذي مائلة.
٢ – تحضن بدرجة حرارة 30 °م لمدة يومين .بعد ملاحظة النمو الجيد للبكتريا على سطح العينة المائلة يصب القليل من الزيت (البارافين) وهي مادة خاملة على سطح المزرعة .
٤ – تحفظ في الثلاجة على 4 °م .

ملاحظة : فائدة الزيت لمنع او تقليل التبخر والجفاف للوسط الغذائي .
ملاحظة : هذه الطريقة خاصة في حفظ العزلات البكتيرية لسنة او سنتين .

5. الحفظ بالتجفيد :

١ – تؤخذ مزرعة من الفطريات النامية على البطاطا او الدكستروز المنتجة للسبورات او مزرعة من البكتريا او الخمائر الحاوية على الخلايا الخضرية فهذه الطريقة تستعمل لحفظ جميع الاحياء المجهرية ويضاف اليها 5 مل من محلول يحتوي على 10% حليب فرز و 5% اينول ويجب ان يكون هذا المحلول معقم وتكشط المستعمرات باستخدام ابرة التلقيح للحصول على معلق من الخلايا او السبورات.
٢ – ينقل المعلق الى انابيب اختبار معقمة.
٣ – يجمد المعلق على درجة (– 20) °م مع التدوير بحيث نحصل على مساحة سطحية كبيرة ويكون التجميد على الجدران الداخلية للأنبوبة .
حيث تم تسامي الرطوبة بتأثير التفريغ Freeze dryer
٤ – توضع الانابيب في جهاز التجميد ولحين الحصول على مسحوق جاف .
والتسامي يعني تحول الماء من الحالة الصلبة الى الحالة الغازية دون المرور بالحالة السائلة .
٥ – تقفل الانابيب وتحفظ في الثلاجة ويمكن الحفظ بهذه الطريقة لفترات طويلة قد تصل الى 10 سنوات او اكثر.

المحاضرة الثالثة

Bioreacter المفاعل الحيوي :

جهاز التخمير

يستخدم لتوفير الظروف الملائمة لنمو الكائن الحي الذي يستخدم لإنتاج المنتوج المرغوب . و يختلف حجم المفاعل الحيوي الشائع حسب الاستخدام . فالمختبري الصغير (3 – 12) لتر ، بينما الصناعي فيتراوح حجمه الف لتر .

يتكون المفاعل من :

١ – الخزان او الوعاء (3 – 12) لتر مصنوع من . S.S او زجاج ويفضل الزجاج لمشاهدة العملية الحيوية من خلال الزجاج .

٢ – ادوات التهوية والتقليب . حيث يدخل الاوكسجين للنمو والتقليب لتجانس المادة الغذائية داخل الجهاز وكذلك توزيع الاحياء المجهرية ، وتشمل هذه الادوات :-

أ / الخلاط : حيث يتم خلط المحتويات داخل الجهاز وكذلك يعمل على تقليل الفقاعات الهوائية وزيادة المساحة السطحية .

ب / موزع الهواء : يعمل على توزيع الهواء داخل الجهاز .

ج / الحاجز : يوضع داخل الجهاز على هيئة صفائح قرها 0.1 قطر الجهاز فائدتها انها تمنع التصاق الوسط الغذائي بجدار المخمرة او الجهاز .

٣ – الاجهزة المساعدة . وهي مضادات الرغوة حيث تتكون الرغوة بسبب بعض المشاكل :-

أ / ترطيب مرشح الهواء فتعمل على اعاقة عمله .

ب / حدوث عملية سيفنة وبالتالي خسارة الوسط الغذائي وبالناتج تؤدي الرغوة وعدم تلامسها للغذاء ، والمواد المانعة اما كيمياوية او ميكانيكية .

٤ – المرشحات . يجب ان يكون الهواء الدخل والخارج نقي وخالي من التلوث وفي حالة حدوث التلوث فان المرشح غير جيد وعدم حصول التخمر . وعاء التخمر يجب ان يكون ممكن القفل .

والمحرر والتهوية . PH meter

٥ – ادوات السيطرة . وهي

وان السبب في استخدام المفاعل الحيوي انه دعت الحاجة الى انتاج مادة معينة قبل البنسلين تحت ظروف التعقيم لان التنمية في المزارع السطحية تكون عرضة للتلوث وتحتاج الى ايدي عاملة كثيرة ، حيث يمكن الوصول الى ظروف التعقيم باستخدام البخار في تعقيم الاجهزة والمعدات قبل زراعة الاحياء المجهرية فيها وذلك بالمحافظة على بقاء الضغط على الاجهزة اعلى من الضغط الجوي وتجهيزها في المزارع بالاوكسجين اللازم للنمو وذلك بضخ هواء معقم الى داخل الجهاز ويوزع بانتظام بواسطة ادوات التقليب .

فصل نو اتج التخمير:

Downstream يطلق مصطلح فصل المنتجات على جميع الخطوات اللازمة لفصل وتنقية المنتوج او المنتوجات المرغوبة من أي نوع من العمليات التصنيعية .

وتحتل هذه العملية اهمية خاصة في التكنولوجيا الحيوية نظرا للاختلاف الكبير بين الوضع النهائي للمنتجات ووضعها الاصلي في اجهزة التخمر ويجب اجرائها بعد انتهاء فترة التخمر وذلك لفصل هذه النواتج عن مكونات الوسط الذي استخدم لغرض الحضن والانتاج لكي يتسنى لنا فيما بعد الحصول على المادة المطلوبة بشكل نقي .

ومن طرق فصل نو اتج التخمر المعتمدة :-

١- التركيز : وهي من ابسط الطرائق المستخدمة ويعتمد في اساسها على ترك وسط النمو الحاوي على نواتج التخمر لفترة معينة بحيث يتم ملاحظة انفصال نواتج التخمر عن الوسط الحاوي لها . ويتم التخلص من الوسط بإجراء تفريغ للوسط الذي يكون في المنطقة العليا .

٢ – الترشيح : حيث تستخدم مرشحات معينة لغرض التخلص من الاوساط الحاوية للنواتج والحصول على المادة المطلوبة بشكل نقي حيث يعتمد الاساس العلمي في هذه الحالة على اقطار المرشحات المستخدمة لهذا الغرض حيث تسمح هذه المرشحات بمرور السائل فقط وحجز المواد التي لا تستطيع النفاذ وبذلك يتم عزلها .

٣ – الطرد المركزي : وهي احدى اهم التقنيات المستخدمة حيث تعتمد على تسليط قوة الطرد المركزي ، حيث تترسب النواتج في قعر الانبوبة بينما يكون الرائق هو الوسط الذي يتم التخلص منه .

المواد المطلوبة :

١ – خميرة الخبز

٢ – وسط مغذي سائل N . B .

٣ – دوارق زجاجية

٤ – بيكر زجاجي

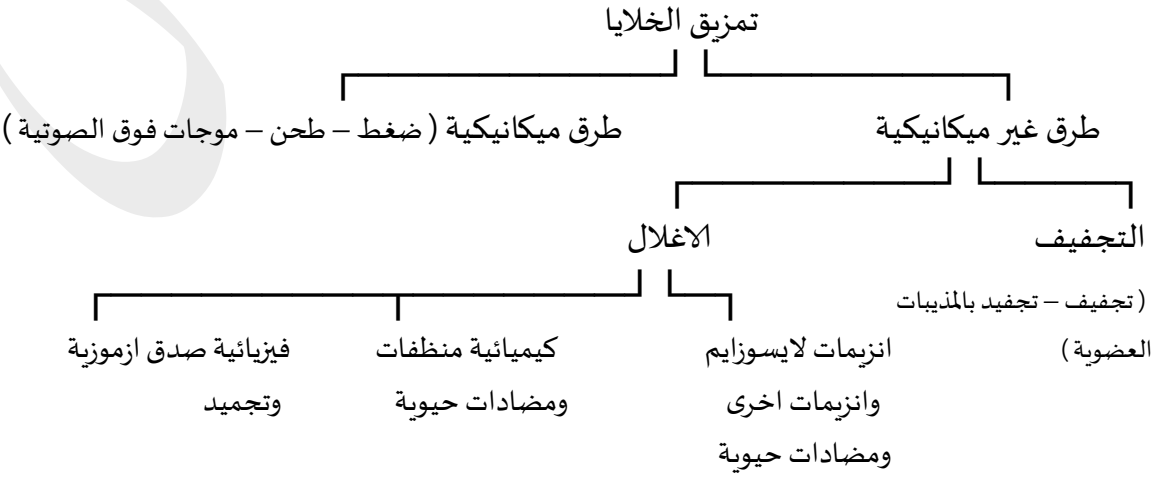
٥ – اوراق ترشيح
٦ – جهاز الطرد المركزي

فصل الجسيمات الدقيقة :

التلبيد والطفو : يحدث التلبيد بصورة عكسية في حالة معادلة الشحنات الموجودة على سطح الخلية بواسطة ايونات مغايرة الشحنة ، فتكون العوامل المساعدة على التلبيد عبارة عن املاح عضوية ومواد شبة غروية مائية ، تعتمد عملية التلبيد على طبيعة وعمر الخلايا والحالة الايونية ودرجة الحرارة .

ويمكن استخدام الطفو في حالة عدم تكون كتلة متلبدة ذات كثافة عالية وفي هذه الحالة تقوم فقاعات الغاز الصغيرة بادمصاص وسحب الاحياء المجهرية ، وتعتمد عملية الفصل على حجم فقاعات الغاز ، ويمكن نشر الغاز في داخل الوسط او تكوين فقاعات صغيرة جدا من الغازات وذلك من خلال اطلاق الضغط الزائد ، ويمكن تشجيع تكوين رغوة ثابتة باستعمال مواد مجمعة غير ذائبة مثل الاحماض الدهنية طويلة السلسلة ثم تزال الدقائق المتجمعة في طبقة الرغوة ، وتستعمل عملية التلبيد والطفو مجتمعة في عملية انتاج بروتين أحادي الخلية وبكفاءة عالية في فصل الكتل الحيوية .....

تمزيق الخلايا : عمليات صعبة لقوة جدار الخلية والضغط الازموزي العالي في داخل الخلايا ويصعب استخدام الطرق الميكانيكية البسيطة قبل الطحن لتمزيق الخلايا نظرا لحجمها المتناهي في الصغر يجب ان تجري عملية التكسير دون تلف بعض مكونات الخلية المرغوبة .



طريقة العمل "

١ – يتم اضافة (5) غم من الخميرة الى 25 مل من البيتون ويترك لمدة نصف ساعة لغرض التنشيط .
٢ – يتم تحضير 500 مل من الوسط . N . B ويعقم .
٣ –اضافة الخميرة المنشطة الى الوسط المحضر ويتم وضعة في الحاضنة على حرارة 30 م / 48 ساعة لغرض اتاحة الفرص لنمو الخميرة .
٤ – بعد انتهاء مدة الحضن يتم اجراء عملية الفصل بإحدى الطرق :-

أ / طريقة التركيد : يترك الوسط الحاوي على الخميرة لمدة 24 ساعة لنلاحظ ترسب الخميرة في الجزء الاسفل من الدورق ويسكب السائل العلوي ويتم اضافة الماء المقطر وتركة لمدة اخرى وتكرر هذه العملية عدة مرات ليتم الحصول على الخميرة بشكل نقي .
ب / الترشيح : يتم استخدام اوراق الترشيح حسب ما هو متوفر من اوراق الترشيح ، اذا امكن تستخدم طريقة الترشيح تحت التفريغ حيث يتم الترشيح بشكل اسرع بسبب تأثير قوة الضغط المخلخل المسلط ، ويتم خلال الترشيح غسل الراسب بالماء المقطر لغرض الحصول على الخميرة بشكل نقي .

ج / استخدام الطرد المركزي : يتم وضع الوسط الحاوي على الخميرة في انابيب الطرد المركزي وتوزع بشكل متساوي والافضل ان يتم وزن الانابيب حيث يجب ان تكون الانابيب بنفس الوزن تقريبا حيث تتم عملية الطرد المركزي بافضل شكل وباستخدام سرعة 3000 دورة / دقيقة ولمدة نصف ساعة وبعدها فصل الرائق عن الراسب الذي يمثل نواتج التخمر والذي يجب ان يغسل لعدة مرات بالماء المقطر وتعاد عملية الطرد المركزي بنفس الظروف السابقة لعدة مرات لغرض الحصول على الخميرة بشكل نقي .

الطرق الميكانيكية :

مثل عملية الطحن فضلا عن استخدام الضغط واجهزة التجنيس والموجات فوق الصوتية . والطرق الواسعة الاستعمال الضغط العالي يعقبه ضغط منخفض وينتج عن ذلك جريان معلق الخلايا خلال باثق دقيق يحدث في هذه الحالة تكسر الخلايا نتيجة للتجزئة ، تاثير الموجات فوق الصوتية يكون من خلال تكوين التجاويف ، ويستخدم على النطاق المختبري فقط لان استخدامها على النطاق الصناعي يواجه مشكلة الحرارة المتولدة .

الطرق غير الميكانيكية :

مثل الطرق الحرارية او الكيميائية او الانزيمية والتجفيف من الطرق الواسعة الاستعمال حيث يسبب تغيرات في تركيب جدران الخلية والذي يسهل عملية الاستخلاص اللاحقة لمحتويات الخلية .

من الطرق الاخرى : هي تحضير مسحوق الاسيتون وذلك من خلال تعريف الخلايا الى كميات كبيرة من الاسيتون البارد ، ايضا يتم التكسير بالطرق الكيميائية مثل استعمال الاملاح او المواد الفعالة على السطح او استخدام الصدمة الازموزية او الانزيمات المحللة .

المحاضرة الرابعة

استخلاص البروتينات :

يؤدي استخلاص المنتجات الحيوية وظيفتين وهي الفصل والتركيز ، تستخدم هذه الطريقة للحصول على منتجات خلوية تفرز خارج الخلية او داخلها والتي تحرر بعد معاملتها بطريقة مناسبة ، تتلخص الطريقة في مزج المحلول او المعلق الذي يحتوي على المنتوج المرغوب مع مذيب غير قابل للامتزاج والذي يذوب فيه المنتوج بصورة جيدة ويسترجع منه بسهولة ، تتم عملية الاستخلاص بعدة طرق مثل الاستخلاص بوساطة خطوة منفردة او استخلاص متعدد المراحل او الاستخلاص بواسطة التيار المعاكس .

بعد الحصول على معلق الخلايا يجب اجراء عملية تكسير للخلايا لغرض الحصول على محتويات السايتوبلازم والتي تمثل البروتينات او الانزيمات المكونة للخلية ويتبع في هذا الخصوص بعض العمليات التي تؤدي الى الحصول على المستخلص البروتين فيها .

١ – الاستخلاص بالمذيبات العضوية :-

تعتمد هذه العملية على الفرق في قابلية الذوبان للمواد في مذيبات مختلفة ، فمثلا المواد المحبة للدهون تستخلص في مذيبات عضوية غير قابلة للاختلاط بالماء مثل البروبانول ثم تعاد الى الطور المائي في العمليات اللاحقة ، ان عملية الاستخلاص بالمذيبات يمكن ان تتم مباشرة على وسط التخمر أو بعد إزالة المواد الصلبة والخلايا منه ، ويمكن استخلاص المواد داخل الخلية مباشرة بواسطة المذيبات بعد تجميع الخلايا او تجفيفها بالمبخرات وهذا يشكل نقطة اقتصادية مهمة حيث تستعمل فيها كميات قليلة من المذيبات ، وتعمل المذيبات العضوية مثل الكلوروفوم والبنزين والتلوين على تحطيم جدار الخلية وذلك من خلال اذابة الدهون الموجودة في جدار الخلايا حيث ان اذابة الدهون تؤدي الى تكوين قنوات في جدار الخلية مما يتيح لمحتويات السايتوبلازم بالخروج منها والذي يؤدي بدوره الى تدمير الخلية ، وتعد هذه الطريقة من اقدم الطرق المستخدمة في هذا المجال ولكن من مساوئها غلاء الثمن للمذيبات العضوية اضافة الى تبخير المذيب من محلول الاستخلاص ، اما مزايا هذه الطريقة فاهمها انها سريعة جدا حيث يمكن استخلاص كميات كبيرة من بعض المواد مثل البنسلين اضافة الى امكانية استعمالها في أي مرحلة من مراحل الفصل والتنقية ، ويستخدم جهاز Soxhel Extractor في استخلاص المواد بالمذيبات السائلة .

١ – استخدام التجميد والتذويب والطحن مع الرمل :-

يتم في هذه العملية تجميد عالق الخلايا الذي بدوره يؤدي الى تجميد محتويات السايتوبلازم مما يؤدي الى حصول تمدد في حجم الخلايا نتيجة تكون البلورات الثلجية الكبيرة ، وعند الاذابة سوف يؤدي ذلك الى تخمر الخلايا وتصبح بحالة حرجة نتيجة حدوث تخلخل في جدران الخلايا بسبب البلورات الثلجية ولهذا يتم استخدام الرمل النقي لاجل طحن الخلايا حيث يعمل الرمل على تحطيم الخلايا عن طريق الاحتكاك الحاصل بين جزيئات الرمل وجدران الخلايا وهذا يؤدي الى تحرر محتويات السايتوبلازم الى محلول الاستخلاص .

ومن مساوئها تستخدم للكميات الصغيرة فقط . ويجب بعد الانتهاء من عملية الطحن التخلص من بقايا الخلايا المتكسرة والرمل عن طريق اجراء الطرد المركزي .

طريقة العمل " (الاستخلاص بالمذيبات العضوية)

١ – يؤخذ مللتر من عالق الخلايا ويضاف اليه 1 مل من الكلورفورم ويتم اجراء التحريك له لمدة نصف ساعة بواسطة المحرك المغناطيسي .

٢ – يتم اجراء الطرد المركزي للتخلص من بقايا الخلايا المتكسرة لمدة (15) دقيقة وبسرعة 3000 دورة / دقيقة ويتم اهمال الراسب والاحتفاظ بالرائق الذي يمثل محتويات الخلية .

٣ – يتم تبخير المذيب وذلك بتركة بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة .

٤ – المحلول المتبقي هو محلول بروتيني يمثل مستخلص الخلايا ويتم الاحتفاظ به لاجراء خطوة الترسيب بعد ذلك .

طريقة العمل " (التجميد والتذويب)

١ – يتم تجميد 5 مل من معلق الخلايا على درجة حرارة – 18 ْ م .

2 – يتم اخراج عالق الخلايا من المجمدة ويترك لكي يذوب .

3 – يخرج 1 غم من الرمل النقي مع معلق الخلايا ويوضع في هاون خزفي ويحرك لمدة 5 دقائق .

4 – يتم اجراء الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة لغرض فصل بقايا الخلايا والرمل عن الرائق حيث يهمل الراسب ويؤخذ الرائق الذي يمثل المستخلص البروتيني الذي تم الحصول عليه وكذلك يحتفظ به لاجراء خطوة الترسيب اللاحقة .

طريقة السحق اليدوي بوساطة ذرات الرمل :

نوع الرمل :- يفضل رمل ذراته غنية بالسيليس Silice عبر مسامات (فتحات) غربال ذو قياس (1,4) مليميتر .

تحضير الرمل :- يحضر الرمل مسبقا بغسله بالماء الجاري لعدة مرات ، ثم يغلى مع حمض لمدة (30) دقيقة مع مراعاة التحريك المستمر، ثم يكرر غسله بالماء He7كلور الماء الجاري عدة مرات وحتى يزول اللون الاصفر (للحمض بعد الغليان) ، ثم يغسل بالماء العادي بغزارة ، ويليه الغسيل بالماء المقطر ، ثم يجفف الرمل على طبقات داخل فرن Pasteur Oven بدرجة حرارة قدرها (170 م) . يوزع الرمل بعد ذلك في انابيب اختبار ذات قياس (200 × 20) مليميتر على ان تسد بسدادات قطنية غير جذابة للماء او بسدادات (لولبية) .

بدرجة حرارة قدرها (121 م) يعاد تعقيم الرمل بالموصد Autoclave لمدة (30) دقيقة ، وجد انه رغم جميع هذه التدابير فان الرمل يحتفظ بين ذراته احيانا بابواغ (جراثيم) Spore مقاومة للحرارة .

طريقة العمل "

يوضع في كاس (المخروط الزجاجي) الخلاط المعقم من نوع (بيركس) مقدار (3 – 5) غرامات من نموذج او عينة المادة الغذائية ، ويضاف فوقها مقدار يتراوح ما بين (3 – 5) غرامات من الرمل الأنف الذكر مع حجم معلوم من المحلول او سائل التخفيف .

ترسيب البروتينات

بعد ان يتم الاستخلاص يجري ترسيب البروتينات في المستخلص الخام لغرض تخليصها من مختلف المواد غير البروتينية المرافقة لها كما تستعمل طريقة الترسيب للبروتينات بازالة الماء (المذاب) منها ، حيث تصبح البروتينات غير ذائبة وتستعمل لهذا الغرض انواع عديدة من الاملاح ككبريتات الامونيوم وقد تستعمل بعض الحوامض لهذا الغرض مثل.Hcl المركز

الية الترسيب بالاملاح :

تتكون البروتينات بصورة عامة من ارتباط عدد من الاحماض الامينية والتي تمل بعضها شحنة موجبة والأخرى شحنة سالبة ، فاذا كان عدد الاحماض الامينية الموجبة اكثر من السالبة امتلك البروتين شحنة موجبة والعكس صحيح أي اذا كان عدد الاحماض الامينية السالبة اكثر من الموجبة سوف يمتلك البروتين شحنة سالبة ، وهذه ما يعطي الاستقرار

للبروتينات في محاليل الاستخلاص ويجعلها تكون ذائبة ولآجل ترسيب هذه البروتينات يجب ان تستخدم مواد معينة تعمل على معادلة شحنة البروتين وتجعلها متعادلة (صفر) وبذلك لا يمكن للبروتين البقاء في المحلول بصورة ذائبة وتحصل عندها حالة الترسيب لذلك نستخدم الاملاح لهذا الغرض مثل ملح كلوريد الصوديوم وملح كبريتات الامونيوم حيث تعمل الشحنة الموجبة للامونيوم على معادلة الشحنة السالبة في مجموعة الكاربوكسيل في الاحماض الامينية بينما تعمل الشحنة السالبة للكبريتات على معادلة الشحنة الموجبة لمجموعة الامين وبذلك يتم الترسيب على هذا الاساس .

المواد المطلوبة :

1 – انابيب اختبار

2- محلول مشبع لكبريتات الامونيوم حيث يحضر باذابة الملح الى درجة الاشباع في الماء المقطر وغالبا ما يتم الاشباع باضافة 9 غم من الملح في 100 مل من ماء مقطر او يتم اضافة الملح بصورة تدريجية ، ويتم اذابته وتتكرر العملية الى ان لا تتم الاذابة بسبب الوصول الى حد الاشباع .

طريقة العمل "

1 – يؤخذ حجم معين من رائق الاستخلاص ، أي ان المستخلص الذي تم الحصول عليه يجري له طرد مركزي ويؤخذ الجزء الرائق فقط منه وليكن 25 مل او 50 مل .

2 – يضاف محلول كبريتات الامونيوم المشبع تدريجيا مع الرج البطيء .

3 – تبدا عملية الترسيب عند ظهور العكارة للبروتين المرسب في محلول الاستخلاص .

4 – يتم عزل البروتين المرسب بواسطة الطرد المركزي بسرعة مقدارها 3000 دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة .

آلية الترسيب بفعل الحامض

تستخدم الاحماض العضوية لغرض ترسيب البروتينات لكنها قد تكون ضارة للبروتين حيث تؤدي الاحماض الى تحطيم شكل البروتين وبالتالي تصبح غير قادرة على البقاء في المحلول بصورة ذائبة حيث تعمل الحوامض على تحطيم الاواصر الرابطة بين الاحماض الامينية وبالتالي يفقد البروتين شكلة الطبيعي وتستخدم هذه الطريقة احيانا لترسيب بروتين الحليب (الكازين) للحصول على الجين او في ترسيب البروتينات النباتية لادخالها في بعض الصناعات الغذائية .

المواد المطلوبة :

المركز. 1HCL – انابيب اختبار 2 – حامض
3 – حليب (مصدر بروتين حيواني) 4 – حمص (مصدر بروتين نباتي)

طريقة العمل "

1 – يؤخذ 25 مل من الحليب في بيكر زجاجي وتضاف اليه قطرات من الحامض لحين حصول تجبن الحليب ، وبعدها يتم اجراء الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة ½ ساعة ويتم اهمال الرائق والحصول على الراسب .
2 – يؤخذ 100 غم من الحمص ويضاف اليه 500 مل ماء مقطر ويغلى بعدها يتم عزل ماء الغلي والذي يحتوي البروتينات الذائبة التي تسربت من الحمص ويتم اضافة قطرات من الحامض اليه لحين حصول تعكر في المحلول وهذا يدل على ترسيب البروتينات ، بعدها يتم اجراء الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة ½ ساعة ويتم اهمال الرائق والحصول على الراسب .

المحاضرة الخامسة

Inocula Preparation تحضير اللقاح (البادئ)

ان مزارع الاحياء المجهرية التي تستعمل في تحضير اللقاح لعمليات التكنولوجيا الحيوية يجب ان تتوافر فيها الشروط الاتية :-

1 – ان تكون المزرعة سليمة وبحالة نشطة .
2 – يمكن تحضيرها بحجم كبير لتعطي حجما كافيا ومناسبا من اللقاح .
3 – تكون ذات صفات مورفولوجية ملائمة .
4 – تكون خالية من التلوث .
5 – تحافظ على قابليتها في انتاج المنتوج .

إن العامل المهم في الحصول على لقاح سلبي هو الاحتياجات او الصفات اعلاه هو اختيار الوسط الغذائي المناسب لتحضير اللقاح ، لذا قد يختلف الوسط المستخدم في انتاج اللقاح عن الوسط المستخدم في إنتاج المنتوج المرغوب .

تتراوح كمية اللقاح اللازم للزراعة عادة بين 3 – 10 % من حجم الوسط الغذائي وتبدا عملية اللقاح باسترجاع المزرعة الاصلية وزرعها في الاطباق الحاوية على الوسط الغذائي الصلب المناسب ، بعد التحضين يتم اختيار عشرة مستعمرات ذات صفات مورفولوجية ملائمة لاعطاء انتاج عال ويعاد زرعها في انابيب الاكار المسائل وتعد كل واحد منها بمثابة مزرعة ثانوية تستخدم لتحضير وجبات جديدة .

تحضير لقاح البكتريا

ان الهدف الرئيسي من تحضير لقاح البكتريا هو انتاج لقاح نشط ليعطي طور ركود قصير قدر الامكان في مرحلة التخمر اللاحقة ، طور الركود الطويل غير مرغوب ليس لانه يضيع الوقت فقط بل لان الوسط الغذائي يستهلك في المحافظة على المزرعة الحية قبل النمو ويتأثر طول طور بحجم اللقاح وظروف الفسيولوجية ، وينصح باستخدام اللقاح البكتيري عندما تكون الخلايا في الطور اللوغارتيمي ولا تزال فعالة من الناحية الايضية ، ويعد عمر اللقاح ذا اهمية خاصة في نمو البكتريا المكونة للسبورات حيث تنتج الخلايا السبورات في نهاية الطور اللوغارتيمي ، ويؤدي استعمال لقاح يحتوي على نسبة عالية من السبورات الى اطالة فترة الركود في اثناء عملية التخمر اللاحقة .

المستخدمة في انتاج انزيم البروتيز على مرحلتين Bacillus subtilisويحضر لقاح بكتريا، حيث ينمى اللقاح لمدة 1 – 2 يوم على وسط غذائي صلب او سائل ثم ينقل الى جهاز التخمير الخاص بانتاج اللقاح وينمى لعشرة اجيال قبل ان يستخدم في عملية الانتاج .

يمكن التخلص من طور الركود للبكتريا المستخدم في انتاج الانزيمات وذلك باستخدام وسط غذائي لتحضير اللقاح يشابه الوسط المستعمل في عملية الانتاج واستخدام كمية كبيرة من اللقاح حيث تقل الفترة الزمنية اللازمة للكائن المجهري للتأقلم في الوسط الغذائي المستخدم في الانتاج .

تحضير لقاح الاعفان

1 – تحضير السبورات (انتاج السبورات على الوسط الصلب)

أ / يوضع 30 غم من الرز في دورق سعة 500 مل ويضاف له 50 مل ماء حنفية ويسد ويعقم بالاوتوكليف على 121 °م / 45 دقيقة .

ب / يبرد الوسط ثم تلقح السبورات العفن المأخوذة من مزرعة قديمة مائلة باستخدام ماء معقم او من مزرعة سائلة قديمة .

ج / تحضن على 30 °م / اسبوع حيث تنبت السبورات مكونة هايفات او خيوط مايسيليوم تتغلغل بين حبيبات الرز وتبدا بتكوين سبورات جديدة .

د / للحصول على سبورات يضاف 50 مل ماء معقم على الدورق ويرج جيدا ثم ترشح باستخدام ململ في قمع معقم حيث ينزل معلق السبورات او يترشح من خلال الململ ويجمع في دورق معقم او انابيب معقمة .

هـ / اجراء عملية الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق ثم تؤخذ السبورات ويضاف اليها كمية من الماء المعقم وتكرر العملية مرة اخرى لغرض غسلها وتجمع السبورات ويضاف اليها (400 مل) ماء معقم وتوضع في انابيب او قناني محكمة القفل وتحفظ في الثلاجة .

2 – تحضير لقاح المايسيليوم

في دورق مخروطي سعة 500 مل يوضع 100 من وسط البيئة Sabouroud broth تحتوي على مادة تمنع تكون السبورات .

ب . تلقح بكمية قليلة من المايسيليوم ثم تحضن على درجة 25 °م / 75 ساعة مع الرج بسرعة (200 دورة / دقيقة) والتهوية المستمرة .

ج . بعد اسبوع واحد يتم سحق وتكسير المايسيليوم النامي باستخدام خلاط معقم .

د . ينتقل اللقاح الى قناني معقمة وتقفل وتحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام

فائدة الرج : هي تخفيف كمية المايسيليوم المتراكمة وتجزئة المايسيليوم قبل استعماله كلقاح وكذلك توفر مغذيات اضافية تحيط به .

ان المشكلة الرئيسية في استخدام لقاح المايسيليوم الخضري هي صعوبة الحصول على لقاح متجانس وقياسي لذلك نلجأ الى عملية الرج . ويستخدم في هذه الطريقة العرهون Mushroom الذي يستخدم في الانتاج التجاري المنتظم النمو الجبريلين والعفن Gibbereila fujikuroi .

المحاضرة السادسة

التطفير Mutation

الطفرة الوراثية :- هي أي تغيير في عدد او ترتيب او تركيب الحامض النووي DNA و التي تؤدي الى تحويرDNA أي تغيير في تعاقب النيوكليوتايدات على جزيئة الحامض النووي (تغيير في تعاقب الاحماض النووية) ونتيجة لذلك فان البروتين قد تتحور وظيفته او قد يتعطل عمله .

انواع الطفرات :

1 – الطفرات الطبيعية (التلقائية) :-

وهي الطفرات الناشئة من دون أي معاملة مسبقة والتي تنتقل عبر الاجيال المتعلقة ، ويعتقد انها تحدث نتيجة خطا في عمل الانزيمات المشتركة في عمليات تضاعف الحوامض النووية ، ويتم الكشف عن هذه الطفرات من خلال وجود هذه الطفرات على اوساط حاوية على مادة كيميائية معينة سامة للعزلات الطبيعية غير المطفرة .

2 – الطفرات المستحدثة :-

وهي الطفرات التي تنشا من تداخل الانسان بتسليط احد المواد المطفرة Mutesens
مطفرة سواء كانت (فيزيائية مثل غاز الخردل و حامض النتروز ، او كيميائية او حياتية) على الكائن الحي مما يؤدي الى تغيير في التركيب الوراثي لذلك الكائن هذا التغير ينتقل عبر الاجيال المتعاقبة .

ومن العوامل المطفرة استعمال الاشعة فوق البنفسجية واشعة X والاشعة المأينة وتستخدم هذه الاشعة كعامل مطفر لغرض احداث الطفرات الوراثية والتي قد تؤدي الى تغير في صفات الكائن المجهري وهذه التغيرات قد تكون ايجابية كزيادة الانتاجية او مقاومة المواد الكيميائية او سلبية او مضرة بالنسبة للكائن الحي .

التطفير باستعمال الاشعة فوق البنفسجية

تستخدم الاشعة فوق البنفسجية كعامل مطفر لمعاملة الاحياء المجهرية لغرض اجراء التطفير بقصد احداث الطفرات الوراثية التي قد تؤدي الى تغير في صفقات الكائن الحي المجهري وقد تكون هذه التغيرات ايجابية او سلبية .

طريقة العمل "

1– يؤخذ 10 مل من معلق السبورات للفطر Aspergillus niger وتوضع في طبق بتري معقم.

2 – يعرض الطبق وهو مفتوح للاشعة .u.v لمدة خمس دقائق ومدة عشر دقائق على طول موجي 254 نانوميتر .

3 – يؤخذ 1 مل من المعلق عند الوقت صفر أي قبل التعريض وعند الوقت خمس دقائق وعند الوقت عشر دقائق ويوضع كل منهم في طبق بتري معقم ثم يصب فوق بيئة PDA.

4 – يترك الوسط ليتصلب الوسط الغذائي وتحصن الاطباق على 28 º م / 10 يوم .

5 – نختار المستعمرات ذات الاشكال والصفات الظاهرية المختلفة عن المستعمرات غير المعرضة للاشعة في انابيب مائلة وتصب الى بيئة PDA.

6 – ينقل بواسطة اللوب LOOP العينة من المستعمرات المنتجة لتحضير مزرعة نقية من الفطر المطفر .

7 – يحضر معلق السبورات وتستخدم نفس التجربة الخاصة بانتاج حامض الستريك وتقدر كمية الحامض المنتج وتقارن مع عينة السيطرة Control.

المحاضرة السابعة

إنتاج الكحول

ينتج كحول الايثانول أما بواسطة الأحياء المجهرية أو بالطريقة الكيميائية وينتج حوالي 80 % من الإنتاج العالمي للكحول بواسطة المجهرية .

من المصادر الأولية للتخمر الكحولي هي الذرة والشعير والعنب والمولاس ومصادر كربوهيدراتية أخرى . تحتاج بعض المواد الأولية إلى معاملتها كيمياويا أو فيزيائيا قبل عملية التخمير للحصول على السكر المقلوب .

الأحياء المجهرية المستعملة

إن الخمائر تمثل الاختيار الأول من بين الأحياء المجهرية في إنتاج الكحول تجاريا وذلك لأنها تنتج الكحول بكفاءة عالية مع كميات قليلة من النواتج العرضية

من الاحياء المستعملة هي خميرة *Saccharomyces Cerevisiae* او *Sacch . uvarmm* و *Kluyveromyces fragitis* و *Candida utilis* و *K. lactis*

عملية إنتاج الكحول :

تستخدم في إنتاج الكحول طريقة الواجبات أو الطريقة المستمرة أو طريقة الواجبات مع إعادة استعمال الخلايا . حيث يؤدي إعادة استعمال الخلايا إلى اختزال زمن التخمر ويقلل كمية الوسط الغذائي اللازمة لإنتاج المادة الخلوية حيث تجمع الخلايا بعد انتهاء عملية التخمر وتوضع في وعاء التخمر ويضاف إليها وسط غذائي جديد وتبدأ عملية التخمر ثانية .

يحتوي الوسط الغذائي الذي يستعمل في إنتاج الكحول على 16 – 25% مواد سكرية قابلة للتخمر والتي تعطي عند نهاية التخمر 6 – 12% ايثانول . تجري عملية التخمر عند درجة حرارة 25 – 33م وتكون دالة الحموضة 4 – 5 والتي تقلل من احتمالية التلوث . تبدأ عملية الإنتاج بطريقة الوجبات بنمو لقاح الخميرة على الوسط الغذائي تحت الظروف الهوائية في بداية الأمر . تنشط عملية التخمر نمو الاحياء المجهرية الأخرى وذلك لعدة أسباب منها قلة المادة الغذائية بعد استهلاكها من قبل الخميرة في أثناء عملية التخمر وانخفاض دالة الحموضة والعمل الأهم هو تكوين الكحول الذي ينشط نمو الأحياء المجهرية الأخرى تحتاج عملية التخمر الكحولي إلى تبريد وعاء التخمر من اجل المحافظة على الحرارة المثالية للخميرة . ولا تزود أجهزة التخمر الخاصة بالتخمر الكحولي بأدوات تهوية وتحريك حيث يساعد ثاني اوكسيد الكاربون الذي يتكون أثناء عملية التخمر على الخلط . ووجد مؤخرا أن الإنتاجية تزداد بمعدل 30 – 40% فيما إذا كانت هناك عمليات

خلط وتقليب لذلك تستعمل أحيانا مخمرات ذات خلط ميكانيكي تفصل الخلايا بعد انتهاء عملية التخمر ويمكن إضافتها بعدئذ إلى وسط غذائي جديد لتبدأ عملية التخمر ثانية . تستخدم في العملية الفصل أجهزة الطرد المركزي مزودة بفوهات ضيقة وتعمل بسرعة 5000 دورة/دقيقة وتستطيع هذه الأجهزة فصل واسترجاع حوالي 99,9% من خلايا الخميرة الحية في مرحلة واحدة .

يفصل الايثانول بعد انتهاء عملية التخمر بواسطة التقطير التي تقسم إلى مرحلتين يتم في الأولى عملية فصل مكونات المزرعة الطيارة عن المكونات الصلبة فتكون المرحلة الثانية عبارة عن عملية تكرير حيث يفصل الايثانول عن بقية المواد الطيارة . ويبقى الكحول حاويا على نسبة من الماء حتى عند إعادة تقطيره وعندما يراد الحصول على كحول نقي جدا أو خالي من الماء فيستخلص باستعمال مذيبات خاصة للايثانول والتي لاتخلط مع الماء مثل *Dibulyl phthalate* أو استعمال غاز Co2 أو استعمال أغشية ناضحة للايثانول وغير ناضحة للماء أو مواد لا عضوية خاصة للتجفيف أو امتزازه على مواد خاصة مثل السليلوز أو بعض المواد النباتية الجافة

والايثانول بدرجة نقاوة 92,4 – 95% يستعمل كمذيب وفي الصناعات الصيدلانية والكيمياوية . إما النقي جدا 99,85% فيستعمل لإغراض خاصة ويخلط مع غيرة من المواد يستعمل كوقود .

المحاضرة الثامنة

إنتاج الأحماض الامينية :

الأحماض الأمينية عبارة عن أحماض من النوع $L-X-Amino$ وهي ذات اهمية في التغذية وإعطاء نكهة أو كمر كبات تمهيدية للعديد من المواد الصيدلانية ومواد التجميل ومواد كيميائية أخرى .

تنتج الأحماض الأمينية بعضها من المنتجات الطبيعية مثل التحلل المائي للبروتين النباتي أو باستخدام التخليق الكيميائي أو الانزيمات أو الإحياء المجهرية إن الحامضان الرئيسيان اللذان ينتجان بواسطة الأحياء المجهرية هما حامض الكلوتامك واللاميسين . أما الميثونين والكلايسين والستين فأنها لا تنتج بواسطة الأحياء المجهرية بل بواسطة التخليق الكيميائي وينتج بعضها بالطرق الانزيمية .

حامض الكلوتاميك

وينتج هذا الحامض منذ عام 1909 بواسطة التحلل المائي الكلوتين الحنطة أو بروتين فول الصويا . ويستخدم بصورة رئيسية على هيئة ملح كلوتاميت أحادي الصوديوم في الصناعات الغذائية كعامل يعطي النكهة . حيث تمكن بعض المشتغلين في هذا المجال من فصل بعض الأحياء المنتجة لهذا الحامض في وسط غذائي يحتوي على الكلوكوز وتم تشخيص هذه الأحياء فكانت من النوع *Micrococcus glutamicus* وسلالة أخرى من نوع *Bacillus sp.* فالنوع الأول هي عصوية قصيرة موجبة لصبغة كرام مكونة للسبورات هوائية غير متحركة وليس لها اسواط وتحتاج إلى عنصر البايوتين عند نموها . ومن الأحياء الأخرى التي تنتج هذا الحامض *Pseudomonas fluorescans* و *Bacterium ketoglutarcum* و *Proteus sp.* و *Kluyvera cilrophila* و *Bacillus subtilis*

إنتاج الحامض من الأحياء المجهرية :-

إن السلالة *Micrococcus glutamicus* هي إحدى السلالات المشهورة في إنتاج هذا الحامض . ولأجل تحضير اللقاح نحتاج إلى وسط غذائي يحتوي على (2% كلوكوز ، 1% ببتون ، 0.5% مستخلص اللحم ، 0.5% Nacl) وعند ظروف حرارة حضن 28م وpH (7 - 7,2) وفترة حضن 24 ساعة وفي حاضنة ذات هزاز بسرعة 220 (دورة / دقيقة). ومن ثم يتم نقل اللقاح إلى وسط التخمير المحتوي على (10% كلوكوز ، 2% $(NH_4)_2SO_4$ ، 1% K_2HPO_4 ، 0,1% $MnSO_47H_2O$)

وباستخدام الحاضنة الهزازة يمكن الحصول على ناتج من حامض الكلوتاميك بعد (2 – 3) أيام من بدء التخمير سيصل هذا الناتج إلى 50% من وزن الكاربوهيدرات الموجود في الوسط الغذائي .

عملية فصل المنتوج .

تفصل الخلايا من المزرعة السائلة بطريقة الطرد المركزي ويبلور حامض الكلوتاميك بعد خفض pH الوسط بإضافة حامض الهيدروكلوريك الى 3,2 . ويجب العناية في أجزاء هذه العملية من اجل الحصول على النوع الفا من البلورات . وتجري عملية الترشيح والغسل عند الحصول على بلورات الحامض وبالتالي تعطي ناتجا ذا نقاوة عالية . ويؤدي بقاء كميات كبيرة من السكريات في المزرعة السائلة إلى تكوين بلورات ضعيفة.

المحاضرة التاسعة

إنتاج خميرة الخبز

تعد صناعة خميرة الخبز إحدى اكبر عمليات التكنولوجيا الحيوية حيث ينتج سنويا أكثر من (1,8) مليون طن من الخميرة . وتستعمل الخمائر منذ القدم في إعداد الخبز والنوع المستعمل هو *Saccharomyces cerevisiae* وكانت سابقا تستعمل جزء من عجينة سابقا نشطة تضاف إلى العجينة الجديدة .

العوامل المؤثرة على العملية الإنتاجية للخميرة:

1- تركيز السكر :- يجب ان تكون المواد الأولية الداخلة في الإنتاج كافية لتزويد الخلايا بتركيز ملائم من السكر .
2- عوامل النمو :- مثل الفيتامينات مثل البايوتين والثيامين .
3- تأثير درجة الحرارة :- إن للحرارة تأثير مباشر على معدل نمو الخمائر وطول فترة الجيل لها ، حيث وجد أن وقت الجيل لخميرة الخبز يصل إلى اقصر ما يمكن وهو حوالي 2,1 ساعة عند 36م ويطول وقت الجيل عند انخفاض درجة الحرارة .
4- تأثير الرقم الهيدروجيني :- تتحمل الخميرة مدى معين من pH بين (3,5 – 6,0) والرقم الأمثل (4,5 – 5,0) .
5- تأثير الضغط الازموزي :- لقد وجد ان الظروف التي تنمو فيها الخمائر تؤثر في قابليتها على تحمل الضغوط التنافذية . فقد وجد ان الخلايا النامية في أوساط يتم فيها إضافة المواد الغذائية بشكل متدرج تتحمل ضغوط ازموزيه عالية مقارنة بالخمائر التي تنمو في مستوى واحد من الضغط الازموزي .
6- تأثير تصميم المخمر وتركيز الخلايا في الوسط .
7- تأثير الهواء :- إن معدل نقل الأوكسجين يؤثر على معدل نمو الخمائر وتكاثرها حيث وجد إن غرام واحد من الخميرة يحتاج إلى غرام واحد من الأوكسجين لذلك تؤخذ هذه النقطة بنظر الاعتبار عند تصميم المخمرات للحصول على أفضل كمية من الأوكسجين .
8- الرغوة :- تتولد كميات كبيرة من الرغوة أثناء عمليات إنتاج الخميرة ويجب التخلص من الرغوة بإضافة السيليكون أو مشتقات الحوامض الدهنية وغيرها .

مراحل إنتاج الخميرة :

إن عملية إنتاج الخميرة تمر بعدة مراحل ويعتمد عدد المراحل على حجم الكمية الإنتاجية وتمتاز المراحل الأولى كونها تتم تحت تعقيم صارم وكذلك تتم على شكل مزارع متقطعة للحد من التلوث. أما المراحل النهائية فتكون بشكل مزارع متقطعة مع استمرار التغذية. وان عمليات إنتاج الخميرة من التمر تحتاج إلى بعض العمليات التصنيعية أهمها.

1- عمليات تخص المادة الخام نفسها لأجل استخلاص المادة السكرية منها وكذلك المواد الأخرى كالمعادن والأحماض الامينية ذات الأهمية لتنمية الخمائر . ويجب تثبيت أفضل الظروف للاستخلاص من حيث كمية التمر ونوعية الهرس للتمور ودرجة الحرارة و pH والوقت.
2- عمليات تحضير الخمائر.
3- عمليات تثبيت الظروف للتربية حيث يتطلب الدراية الكافية بالسرعة المستعملة . لذا يجب تثبيت درجة الحرارة و pH والتهوية وكمية اللقاح وتراكيز المصادر الأساسية كالنيتروجين والفسفور والكربون اللازم لنمو الخمائر .
4- تثبيت نقاوة العصير حيث إن استخلاص السكريات بالماء يحتاج إلى (80 – 90) °م.
5- التلقيح والتنمية.

حصد الخلايا :-

بعد الانتهاء من تنمية الخلايا وتركها للنضج تفصل الخلايا بالطرد المركزي أو الترشيح ويتم غسل الخلايا من المواد العالقة لأنها ستؤثر على لون خميرة الخبز الناتجة كما أن وجودها سيؤدي إلى عرقلة عمليات التجفيف والتعبئة وهذا سيؤثر على صفات الخميرة . وبعد انتهاء عمليات الطرد المركزي والترشيح والغسل تضاف المواد المستحلبة مثل الكليسيريدات الأحادية أو الثنائية أو الليسيثين بتركيز (0,1 – 0,2)% إلى الخميرة المركزة لتساعد على تشكيل الخميرة في المرحلة اللاحقة ثم تجرى عمليات تشكيل الخميرة والتعبئة.

المحاضرة العاشرة

إنتاج الفيتامينات

الفيتامينات : عبارة عن مواد عضوية تنتجها الكائنات الحية بكميات قليلة لكي تقوم بوظائفها الحيوية . ولا تستطيع عدد من الكائنات الحية تخليق الفيتامينات التي تحتاجها لذلك تحصل عليها من مصادر خارجية .

أهم مصادر الفيتامينات :

1- المنتجات الحيوية : مثل السمك والكبد وزيت الكبد والبيض .
2- المنتجات النباتية : مثل الخضراوات كالهانة والجزر والسبيناغ وقشور الرز والذرة .
3- الاحياء المجهرية : مثل خميرة الخبز وانواع اخرى من الخمائر .

إنتاج الفيتامين :

تنمى السلالة *Bacillus Subtilis* في وسط غذائي يتكون من (غم / لتر) سكروز (50) + (50) أخرى بعد 12 ساعة من إضافة اللقاح ، خميرة (20) ، يوريا (60) ، كبريتات المغنسيوم (2) ، KH_2PO_4 (1) . وباستعمال جهاز تخمر سعة 600 لتر مع تهوية وتحريك ثم الحصول على 5,4 غم / لتر بعد 24 ساعة من التحضين على درجة حرارة 39 - 41 ºم .

فصل وتنقية الرايبولافين :

في حالة استخدام للعلف الحيواني يجب أولا ضبط دالة الحموضة على 4,5 بعد انتهاء عملية التخمر ثم إجراء تركيز بسيط للمزرعة وتجفيفها . ويمكن الحصول على مركز الفيتامين الذي يحتوي على كمية من الفيتامين تتراوح بين 3 - 4 مرات أكثر من الاعتيادي. تعامل المزارع بانزيم البروتيز البكتيري القاعدي لمدة 3 ساعات على حرارة 60 ºم وتجرى عملية الطرد المركزي بعد تبريد المزرعة إلى 25 ºم وضبط دالة الحموضة على 7 ويؤخذ الجزء الصلب (الراسب) ويغسل بالماء ثم يجفف.

أما في حالة إنتاج الفيتامينات للاستعمالات الصيدلانية تبدأ عملية الفصل بضبط دالة الحموضة على 4,5 ثم التسخين على 121 ºم / ساعة واحدة وذلك لإذابة الفيتامين وبعد إزالة الأجزاء الصلبة بالطرد المركزي تجرى معاملة السائل المتبقي بعامل مختزل مثل كلوريد التيتانيوم حيث يترسب الرايبوفلافين المختزل والذي يكون اقل ذوبانا من الرايبوفلافين المتاكسد

ثم تعاد اكسدته في الهواء ويذاب في 10% حامض الهيدروكلوريك عند حرارة 60 °م ، وبعد إجراء عملية التبريد والتعادل تتم بلورة الفيتامين .

المحاضرة الحادية عشر

إنتاج بروتين أحادي الخلية :

يستعمل مصطلح بروتين أحادي الخلية للدلالة على الخلايا الجافة للأحياء المجهرية مثل الطحالب والبكتريا والخمائر والاعفان والفطريات والتي تنمو في انظمة مزرعية وعلى نطاق تجاري واسع باستعمالها مصدرا للبروتين في تغذية الإنسان والحيوان . استخدمت الأحياء المجهرية منذ القدم في تغذية الإنسان والحيوان لاستخدامها مصدرا للبروتين وتأكل خلايا هذا الجنس أو الطحالب نفسه الجافة إلى يومنا هذا من قبل شعوب منطقة تشاد .

الأحياء المجهرية المستخدمة في إنتاج بروتين أحادي الخلية:-

1- الطحالب : تعود معظم الطحالب المستخدمة في إنتاج بروتين أحادي الخلية الى أجناس (*Spirulina*) وجنس (*Cllorella*) وجنس (*Scenedesmus*)

طريقة العمل :

1- عزل الخميرة بشكل نقي وتنميتها لإيصالها إلى العدد الكافي للتنمية ويكون العدد متناسبا مع كمية المادة الأولية المستخدمة في التنمية .
2- تعقيم المادة الأولية وتعديل رطوبتها إلى 65% .
3- التلقيح بالخميرة وتنميتها على 35م المدة (12) يوم .
4- تعقيم الكتلة الحيوية على 121م ولمدة 15 دقيقة .
5- تقدير كمية البروتين والكتلة الحيوية بعد إجراء الترشيح .

يحضر الوسط الغذائي التالي

1- 5 g KH_2PO_4

2- 3g $(NH_4)_2 SO_4$

3- 0.5g $MgSO_4 . 7H_2O$

4- 0.5g KCL

ويضبط PH الوسط على 4.5 (بالتسحيح أو بأوراق عباد الشمس) وهو الأمثل لتنمية الخمائر . أي البكتريا لاتستطيع النمو .

يوزع الوسط 50 مل لكل دورق ويعقم بجهاز الاوتوكليف على 121 °م / ربع ساعة ثم يضاف 2% ايثانول او ميثانول ثم يضاف 1مل من معلق الخميرة . تستخدم 4 معادلات 2 (ايثانول) و 2 (ميثانول) . تحضن على 30م / 48 ساعة في الحاضنة الهزازة ويحسب الوزن الجاف للكتلة الحيوية الناتجة إما بالترشيح على ورقة الترشيح تم التجفيف والوزن . أو بأخذ 10 مل من المزرعة ووضعها في أنبوبة جهاز الطرد المركزي وإجراء الطرد المركزي على سرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق . ونتخلص من الراشح ويجفف الراسب في الفرن لمدة 18 ساعة على حرارة 105 °م ويحسب الوزن الجاف للبروتين الحيوي غم / لتر من الوسط الغذائي .

المحاضرة الثانية عشر

انتاج حامض الستريك Citric acid

(حامض الليمون)

كانت عمليات إنتاج حامض ألستريك خلال الفترة الماضية معتمدة على الفواكه ولكنها تحولت إلى استعمال الأحياء المجهرية مثل .

1- الفطريات مثل *Aspergillus wentii , Aspergillus niger , Mucor , Perillium*
2- الخمائر مثل *Candida , Saccharomycopses*
3- البكتريا مثل *Corynbacterium , Arthrobacter*

إنتاج الحامض بواسطة الفطريات:

إن أهم ميزة للأوساط التخمرية المستعملة في إنتاج حامض ألستريك هي احتوائها على تراكيز عالية من السكر تصل إلى 15-20% . ويأتي المولاس في المقدمة للحصول على الحامض .

وان طرق الزراعة المستعملة لإنتاج الحامض تبدأ بتحضير اللقاح البكتيري أو السبوري وان اللقاح السبوري هو المفضل عند استعمال الفطريات ويحضر بزراعة فطريات على الأوساط الصلبة وتترك لتكون كميات كبيرة من السبورات بتحضينها لفترات تتراوح من 10 – 14 يوما وبرجة حرارة 27م . ويجب أن يكون اللقاح حاوي على نسبة عالية من السبورات التي لها القابلية على الإنبات .

فمثلا تنمى مزرعة الفطر *Aspergillus niger* على الوسط الغذائي Malt Extract Agar لمدة 10 – 14 يوم بعد انتهاء المدة يتم تنشيط الفطر بأخذ لمسة من المزرعة الأولى وتزرع على طبق جديد يحتوي نفس الوسط السابق ويحضن لمدة أسبوع وبعدها يتم تحضير المعلق السبوري بأخذ محلول فسيولوجي (ماء مقطر + ملح مختبري) أو (ماء مقطر + ببتون) يتم تعقيمها بجهاز الاتوكليف على درجة حرارة 121م /15 دقيقة . ثم تؤخذ قشطه من الفطر الذي تم تنشيطه وبواسطة اللوب وتوضع في الدورق الحاوي على المحلول الفسيولوجي ثم تضاف إلية قطرات من مادة Tween 80 لغرض نشر السبورات ويحرك الوسط بسرعة جيدة . ثم تؤخذ مخلفات العنب (تلف العنب) المستخدم في صناعة العصير ويتم تجفيفه في فرن حراري لمدة 48 ساعة وعلى حرارة 40 °م ثم يتم طحنها وتفتيتها باستخدام منخل ويتم التأكد من نسبة السكر وتحفظ على درجة حرارة الغرفة لحين الاستخدام .

نأخذ 50غم من مخلفات العنب المطحون وتوضع في دورق حجم 500مل وترفع الرطوبة إلى 60% وتعقم بالاتوكليف على 121 °م/15 دقيقة لقتل جميع الأحياء المجهرية الموجودة عليها ثم يتم بعد ذلك تلقيحها بسبورات الفطر *Aspergillus*

niger باستعمال المعلق السبوري المحضر سابقا . ثم تحضن لمدة 4 – 7 أيام وبعد اكتمال عملية التخمر يتم استخلاص المادة المتخمرة وتقدير الحامض .

يمكن متابعة عملية التخمر من خلال تقدير pH . وبعد انتهاء فترة التخمر يفصل المايسيليوم من المزرعة بواسطة الترشيح . ثم يسخن الراشح الى 80 – 90 °م وتضاف كمية قليلة من كاربونات الكالسيوم لترسيب حامض الاوكزاليك ثم يرسب حامض الستريك على هيئة سترات الكالسيوم بعد اضافة جزء واحد من كاربونات الكالسيوم إلى كل جزء من الراشح على مدى ساعة وترفع الحرارة الى 95 °م وترشح سترات الكالسيوم وتغسل عدة مرات بالماء ثم توضع في خزانات التحميض حيث يضاف حامض الكبريتيك ويرشح المحلول لإزالة كبريتات الكالسيوم ثم يقصر الراشح الحاوي على حامض الستريك بالفحم النباتي ثم ينقى ويركزتحت التفريغ وبعد ذلك تتم بلورة حامض ألستريك الحاوي على جزيئه ماء واحدة وعندما تزداد درجة حرارة التبلور عن الحد الحرج 36,6م تنتج بلورات حامض الليمون خالية من الماء وتقدر الحموضة لحامض ألستريك بالتسحيح 5مل من الراشح مع محلول 0,1 N من NaOH باستخدام دليل فينولفثالين وتحسب كمية الحامض حسب المعادلة التالية :

1 سم2 NaOH 0,1 N = 7 ملغم حامض ستريك

ويزال حامض الاوكزاليك باستعمال الجير أو الكلس بأرقام هيدروجينية اقل من 3 حيث يرسب على شكل اوكزالات الكالسيوم وتزال بالترشيح .

وتحسب كفاءة الإنتاج = كمية حامض ألستريك الناتجة / كمية السكر المستهلك * 100

ويضاف إلى الوسط الغذائي عدد المواد التي تشجع إنتاج حامض ألستريك ومن هذه المواد :-

1- الميثانول : حيث يضاف بنسبة 3 – 4% حيث يؤدي إلى تقليل نمو المايسيليوم ويؤخر تكوين السبورات وبالتالي يزود من كمية حامض ألستريك الناتجة . ويعتقد ان سبب الزيادة يعود إلى دور الميثانول في تكييف المايسيليوم حيث يزيد نفاذية جدار خلية المايسيليوم من دون أن يضعف مينابولزم الفطر وبذلك يسمح بإفراز السترات من الخلية . وتستجيب الخلية الى هذه الحالة عن طريقة زيادة إنتاجها من السترات من اجل أن تحافظ الخلية على مستوى كافي من السترات في داخلها .
2- التهوية والتحريك : يتجهز الفطر بالكمية الكافية من الأوكسجين . وتعتمد على الكائن الحي والبيئة وحجم المخمر .
3- العناصر المعدنية : مثل Mg – Mn – Zn – Cn – Fe وهي ضرورية لإنتاج حامض ألستريك لكن عملية الإنتاج تكون حساسة لتركيز هذه العناصر ويمكن التغلب على التراكيز العالية من العناصر المعدنية في الوسط الغذائي باستعمال :-

أ- انتخاب سلالات تتحمل تراكيز عالية من العناصر المعدنية الصغرى خاصة Fe وذات إنتاجية عالية من حامض الستريك .

ب- إضافة مادة *Potassium Ferro Cyanide* إلى الوسط من اجل ترسيب بعض العناصر خاصة الحديد .

ج- استخدام المبادلات الأيونية لسحب هذه العناصر من الوسط الغذائي .

إنتاج حامض الستريك :

1- يحضر الوسط الغذائي

أ – سكر السكروز 140غم أو دبس مخفف أو مولاس 14%

ب – فوسفات البوتاسيوم الأحادي KH_2PO_4 1غم

ج – نترات الامونيوم NH_4NO_3 2,3غم

د –كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4 . 7H_2O$ 0,25غم

العناصر النادرة :

$FeSO_4 . 4H_2O$ 0,15ملغم

$ZnSO_4 . 7H_2O$ 0,1ملغم

$CuSO_4 .$ 0,01ملغم

تضاف جميع هذه المكونات في لتر ماء واضبط PH الوسط على 2 باستخدام حامض HCl 0,1 عياري .

2- يؤخذ 50 مل من الوسط الغذائي في فلاسك 250مل ويعقم بالاوتوكليف على 121 ºم /15 دقيقة ويبرد ثم يضاف 1مل من الميثانول لبعض العينات . ثم تلقح بسبورات الفطر *A. niger* وذلك بأخذ 1مل من معلق السبورات إلى أن يصل عدد السبورات 10 ويحضن لمدة أسبوع على 22 – 25 ºم .

3- ترشح المزارع بواسطة ورق الترشيح معلومة الوزن ونحسب الوزن الجاف للمايسليوم . حيث نحسب وزن ورقة الترشيح + المايسليوم ونحسب الفرق . ثم نقدر كمية حامض الستريك في الراشح بالترشيح مع قاعدة NaOH كما يلي :-

يؤخذ 5مل من الراشح ويسحح مع NaOH 0,1 عيار بوجود دليل الفينولفثالين قطرات ثم تحسب كمية الحامض على أساس كل 1مل من NaOH تعادل 0,007غم من حامض ألستريك .

حامض	قاعدة
0,007	1مل
س	3مل

ثم تحسب كمية حامض ألستريك في لتر من الوسيط الغذائي .

استخلاص الحامض :

يسخن الراشح الى 70 – 90م ويضاف إليه كربونات الكالسيوم فتترسب سترات الكالسيوم على شكل أملاح . يقصل الراسب بالترشيح فنحصل على سترات الكالسيوم التي تعامل مع حامض الكبريتيك المركز مع التسخين فتترسب كبريتات الكالسيوم وينتج حامض ألستريك ويفصل بالترشيح ويجفف .

المحاضرة الثالثة عشر

إنتاج الانزيمات

اهم الانزيمات التى تنتج من الأحياء المجهرية هي .

1- الاميليز *Amylase* أ- بكتيري *Bacillus amyloliquefaciens*
ب- فطرية *Aspergillus oryzae*
2- البروتيز *Protase* *Rhizopus*
3- اللايبيز *Lipase* *Penicillium requetorti*
4- كلوكوزايسوميريز *Glocose Isomerase* البكتريا الخيطية *Streptomyces*
5- البكتينيز *Pectinase* *Aspergillus niger*
6- الانفرتيز *Invertase* *Saccharomyces cerevisiae*
7- اللاكتيز *Lactase* *Kluyveromyces fragilis*
8- السليلوليز *Cellulase* *Trichoderma ressei*

إنتاج انزيم السليلوليز

ينتج انزيم السيلولوز من بعض الاعفان التابعة للجنس *Aspergillus* وبعض انواع البكتريا التابعة للجنس *Bacillus* وينتج على النطاق التجاري من العفن *Trichoderma reesei* وبعض سلالاته المتطفرة باستخدام تخمرات الحالة الصلبة . حيث يتكون الوسط الغذائي من نخالة الحنطة أو مواد سليلوزية مثل التبن ومخلفات المحاصيل الحقلية نسبة الرطوبة فيها منخفضة جدا . حيث تضاف 10غم من النخالة إلى 10مل ماء مقطر لاجل ترطيبها لتنمية العفن ثم يضاف 0,3% من مادة Tween 80 لزيادة انتاج الانزيم حيث يعتقد أنها تزيد من نفاذية غشاء الخلية مما يؤدي إلى إفراز كميات إضافية من الانزيم . ثم تعقم في الاوتوكليف على حرارة 121 °م / 15 دقيقة . ويتم بعد ذلك تلقيح الوسط بالعفن *Trichoderma reesei* ويحضن على 28 °م / أسبوع ويضاف 100 مل من Buffer citrate (4.8 pH) إلى الوسط وتستخدم الحاضنة الهزازة أو الرج لغرض المزج.

تغسل المزرعة وتجفف بعد انتهاء فترة التخمر للحصول على الانزيم الخام بمجففات الرذاذ .

أو يستخلص الانزيم النقي بإحدى طرق الاستخلاص مثل الطرد المركزي او الترشيح وينقى الانزيم عند استخدامه في الاغذية لاحتوائه على مواد غير مرغوبة بعدة طرق منها الترشيح الفائق والترسيب . ويركز الراشح تحت التفريغ او بواسطة الترشيح الفائق للحصول على الانزيم المركز والذي يحتوي على حوالي 50% من الانزيم الفعال. ويحضر مسحوق الانزيم من خلال ترسيب الانزيم بواسطة املاح متعادلة مثل كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2 SO_4$ أو المذيبات مثل الاسيتون أو الايثانول أو Isopropanol .

المحاضرة الرابعة عشر

انتاج المضادات الحياتية :

تعرف المضادات الحياتية (الحيوية) بأنها المواد الكيميائية العضوية التي تنتجها أحياء مجهرية كنواتج ايضية ثانوية ولها تأثير مبيد أو موقف لنمو غيرها من الأحياء المجهرية عند استعمالها بتراكيز قليلة.

الأحياء المنتجة للمضادات الحيوية :

1- الاكتينومايسينات	*Sreptomyces erythreus*	ارثرومايسين
	Sreptomyces aureofacienus	تتراسايكلين
2- الفطريات	*Penicillium chrysogenum*	بنسلين
	Cephalosporium	سيفالوسبورين
3- البكتريا	*Pseudomouas melanogenum*	امبسلين
	Bacillue hrevis	كرامايسين

إنتاج البنسلين :

عملية التخمر:-

يستخدم العفن *P. chrysogenum* عادة في إنتاج البنسلين وتحفظ المزرعة الأولى على هيئة سبورات مجفده أو تحفظ بالنتروجين السائل .

يتم تكاثر المزرعة في دوارق هزازة لمدة أربعة أيام ثم تضاف إلى خزان اللقاح. يمكن استخدام هذا اللقاح بعد ثلاثة أيام من النمو لتلقيح خزان لقاح آخر .

يتكون الوسط الغذائي المثالي لإنتاج البنسلين من الكلوكوز وخلات فنيل الصوديوم وسائل منقوع الذرة وكبريتات الامونيوم وفوسفات البوتاسيوم . وتتراوح دالة الحموضة 6,8 – 7,4 خلال عملية التخمر وذلك بإضافة NaOH أو حامض الكبريتيك ودرجة الحرارة المثالية لعملية التخمر هي 25 °م . وتعد التهوية مهمة جدا في عملية إنتاج البنسلين حيث يعتمد معدل انتقال الأوكسجين على معدل التهوية وسرعة التحريك ولزوجة السائل . الوقت اللازم لإتمام عملية التخمر والحصول على أقصى كمية من البنسلين (8 – 10) أيام. يتم ترشيح المزرعة بعد انتهاء عملية التخمر ويزال المايسليوم

والمواد الصلبة الاخرى ويضاف حامض إلى الراشح حتى يصل pH إلى 4 ويستخلص الراشح بسلسلة من اجهزة الاستخلاص بواسطة المذيبات مثل خلات البيوتيل. يرسب البنسلين من المذيب بإضافة خلات البوتاسيوم ثم يفصل بالترشيح. ثم تعاد بلورته.