كلية الزراعة **تقنية حيوية**
قسم علوم الأغذية **المحاضرة الأولى**

عزل الأحياء المجهرية :

ان المصادر الطبيعية الرئيسية للأحياء المجهرية الصناعية هي التربة والمياه والأغذية الطازجة والمتخمرة 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 الزراعية 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 مجهرية يراد عزلها 9مل 9 مل 9 مل 9مل

٥ – يتم اخذ 1مل من التخفيفين الاخيرين وينقل إلى أطباق بتري معقمة بواسطة ماصه 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 A.N 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 mlماء مقطر فقط
4.5 Nacl + 500 mlماء مقطر فقط
2.25 Nacl + 250 mlماء مقطر فقط
0.9 Nacl + 100 ml ماء مقطر فقط

تنقية وتشخيص الأحياء المجهرية الصناعية :
١ – يتم اختيار المستعمرات من البكتيريا أو الخمائر او الاعفان 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 البكتيريا وتصبغ بطريقة گرام ويلاحظ الشكل ونظام التجمع نتيجة الصبغة سالبة او موجبة .
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 ومن ثم تسجيل النتائج.
ان 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 نقوم باحضار شرائح من الاعفان ويصبغ بالتحضير الرطب باستخدام صبغة اللاكتوفينول بلو وتسجل المعلومات وملاحظة هل ان السبورات داخلية أم خارجية والهايفات هل مقسمة ام غير مقسمة ولون السبور والهايفات متفرعة ام غير متفرعة وأسجلها بالإضافة إلى الاختبارات المورفولوجية والفسيولوجية .

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 وسبورات .
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 خزن 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 اگار البطاطا والدكستروز للفطريات والاگار 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 لإعطاء 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 تحضيره 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 اگار 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 .

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 اختبارمعقمة.
٣ – يجمد المعلق على درجة (– 20) °م مع التدوير بحيث نحصل على مساحة سطحية كبيرة ويكون التجميد على الجدران الداخلية للانبوبة .
حيث تم تسامي الرطوبة بتاثير التفريغ Freeze dryer
٤ – توضع الانابيب في جهاز التجميد ولحين الحصول على مسحوق جاف .
و**التسامي** 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.

المفاعل الحيوي Bioreactor:

جهاز التخمير

يستخدم لتوفير الظروف الملائمة لنمو الكائن الحي الذي يستخدم لانتاج المنتوج المرغوب . و يختلف حجم المفاعل الحيوي الشائع حسب الاستخدام . فالمختبري الصغير (3 – 12) لتر , بينما الصناعي فيصل حجمه الى 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 الجهلز 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 محكم القفل.

٥ – ادوات السيطرة . وهي.PH meter والمحرر والتهوية
وان السبب في استخدام المفاعل الحيوي انه دعت الحاجة الى انتاج مادة معينة قبل البنسلين تحت ظروف التعقيم لان التنمية في المزارع السطحية تكون عرضية للتلوث وتحتاج الى ايدي عاملة كثيرة , حيث يمكن الوصول الى ظروف التعقيم باستخدام النجار 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 نواتج التخمير :

على جميع الخطوات اللازمة لفصل وتنقية Downstream يطلق مصطلح فصل المنتجات 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 نواتج 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 منذي سائل B . N .
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 تلبدة 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 عذابه 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 بوتين 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 .

تمزيق الخلايا

- طرق غير ميكانيكية
  - التجفيف (تجفيف – تجفيد بالمذيبات العضوية)
  - الاغلال
    - انزيمات لايسوزايم وانزيمات اخرى ومضادات حيوية
    - كيميائية منضفات ومضادات حيوية
    - فيزيائية صدق ازموزية وتجميد
- طرق ميكانيكية (ضغط – طحن – موجات فوق الصوتية)

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 . B . N 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 باحدى 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 تاثير 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 دقيقه 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 ويتجفيف 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 الصدفه الازموزية او الانزيمات المحللة .

استخلاص البروتينات :

يؤدي استخلاص المنتجات الحيوية وظيفتين وهي الفصل والتركيز , تستخدم هذه الطريقة للحصول على منتجات خلوية تعرز خلرج 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 الساينوبلازما 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 , والبنزين والتلوين وتعمل المذيبات العضوية مثل الكلوروفوم Chloroform على تحطيم جدار الخلية وذلك من خلال اذابة الدهون الموجودة في جدار الخلايا لذ يتالف جدار الخلية حيث ان اذابة الدهون تؤدي الى تكوين قنوات في جدار الخلية Lipo poly sacharide 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 :

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

تحضير الرمل :-
يحضر الرمل مسبقا بغسله بالماء الجاري لعدة مرات , ثم يغلى مع حامض He7 لمدة (30) دقيقة مع مراعاة التحريك المستمر, ثم يكرر غسله بالماء 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 بدرجة حرارة قدرها (170 م) . يوزع الرمل بعد ذلك في Pasteur Oven باستور انابيب اختبار ذات قياس (200 × 20) مليميتر على ان تسد بسدادات قطنية غير جذابة للماء او بسدادات (لولبية) .

بدرجة حرارة قدرها (121 م) لمدة (30) دقيقة ويعاد تعقيم الرمل بالموصد Autoclave, وجد انه رغم جميع هذه التدابير فان الرمل يحتفظ بين ذراته احيانا بابواغ (جراثيم) 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 تركيز كاليل البروتينات 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 تحمل بعضها شحنة موجبة والاخرى شحنة سالبة , فاذا كان عدد الاحماض الامينية الموجبة اكثر من السالبة فأن البروتين يمتلك 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 في درجة الاشباع في المقطروغالبا 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 العكاره 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 بعذها 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 .

Inocula Preparationتحضير 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 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 وتبدأ عملية اللقاح باسترجاع المزرعة الاصلية وزرعها في الاطباق الحاوية على الوسط الغذائي الصلب المناسب , بعد التحضين يتم اختيار عشرة مستعمرات ذات صفات مورفولوجية ملائمة لإعطاء انتاج عال ويعاد زرعها في انابيب الاگار المسائل وتعد كل واحد منها بمثابة مزرعة ثانوية تستخدم لتحضير وجبات جديدة .

تحضير لقاح البكتيريا

ان الهدف الرئيسي من تحضير لقاح البكتيريا 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 الانصية , 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 .

ويحضر لقاح بكتيريا Bacillus subtilis المستخدمة في انتاج انزيم البروتيز على مرحلتين, 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 .
ه / 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

أ . يوضع 100 من وسط البيئة تحتوي على Sabouroud broth في دورق مخروطي سعة 500 مل فائدة 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 قبل استعماله كلقاح وكذلك توفر مغذيات اضافية تحيط المايسيليوم .

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 Gibbereila fujikuroiوالعفن.

التطفير Mutation

الطفرة الوراثية :- هي أي تغيير في عدد او ترتيب او تركيب الحامض النووي DNA, أي هي التي تؤدي الى تحوير في تعاقب النيوكليوتايدات على جزيئة الحامض النووي DNAأي تغيير المعلومات الوراثية وتكوين بروتين محور (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 الغير مطفرة .

2 – الطفرات المستحدثة :-

وهي الطفرات التي تنشا من تداخل الانسان بتسليط احد المواد المطفرة Mutesens او أي مادة 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 الماينة كاي 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 اليجابية او سلبية .

طريقة العمل "

1 – يؤخذ 10 مل من معلق السبورات للفطرAspergillus niger وتوضع في طبق بتري معقم.
2 – يعرض الطبق وهو مفتوح للاشعة .v.u لمدة خمسة دقائق ومدة عشرة دقائق على طول موجي 254 نانوميتر .
3 – يؤخذ 1 مل من المعلق عند الوقت صفر أي قبل التعريض وعند الوقت خمسة دقائق وعند الوقت عشرة دقائق ويوضع كل منهم في طبق بتري معقم ثم يصب فوق بيئة PDA.
4 – يترك الوسط ليتصلب الوسط الغذائي وتحضن الاطباق على 28 º م / 10 يوم .
5 – نختار المستعمرات ذات الاشكال والصفات الظاهرية المختلفة عن المستعمرات غير المعرضة للاشعة Contror
6 – ينقل بواسطة اللوب LOOP العينة المائلة في انابيب من المستعمرات المنتجة الى بيئة PDA تحضير 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.