الانتاج الحيوي للفيتامينات

تعرف الفيتامينات بانها المواد العضوية التي تحتاجها الكائنات الحية بتراكيز موزونة كي تؤدي وظائفها الحيوية، تنظم الفيتامينات تفاعلات كيميائية هامة تحول فيها خلايا الجسم مكونات الغذاء إلى طاقة ومركبات في الأنسجة الحية. ان اغلب الكائنات الحية لاتتمكن من تصنيعها لذلك تلجا للحصول عليها في اعتمادها على مصادر خارجية لها. لكل فيتامين استعمالات يختص بها دون غيره لدرجة ان أي فيتامين من هذه الفيتامينات لا يمكن ان يحل محل فيتامين آخر أو يعمل عمله، بيد أن افتقار الجسم لأحدها يمكن ان يسبب في عرقلة وظيفة لبفيتامين الآخر. يؤدي النقص أو الافتقار المستمر إلى فيتامين معين في حدوث مرض عوز الفيتامين، التي تتنوع كثيرا أعتمادا الى الى نقص انواع الفيتامينات، ومن الامثلة على تلك الامراض هي البري بري والبلاغرا والاسقربوط والكساح (لين العظام). ترافقت بداية اكتشاف الفيتامينات مع البحث عن أسباب الأمراض الناتجة عن نقصها، اذ ان اول استعمال لمصطلح الفيتامين كان عام 1911م من قبل العالم **FUNK** الذي اكتشف العامل المسبب لمرض البري بري **Beri–beri**، حيث وجد ان العامل المسؤول عن اعراض المرض هو فيتامين $\mathbf{B_1}$. من هذا الاكتشاف تم التعرف على مجاميع الفيتامينات التي تبين انها عوامل ضرورية يحتاجها الجسم بتراكيز واطئة وليس لها قيمة من ناحية انتاج الطاقة ولايتمكن الكائن الحي في الغالب من تصنيعها حيويا. ان الحالات المشار اليها تعد بانها الصفات الرئيسة التي تفرقها عن العوامل الاخرى كالانزيمات والعناصر الصغرى والهورمونات.

مصادر الفيتامينات

ان من أكثر العقاقير التى يتم تعاطيها دون وصفة طبية (Non–prescription medication) على الرغم من التحفظات الطبية على ذلك هي الفيتامينات إلا أنه اصبح أمر واقع على مستوى العالم . تعد المصادر الخارجية للفيتامينات هي الاساس في سد احتياجات الانسان وكذلك الحيوانات منها وذلك لعدم مقدرة جسم الكائن الحي في تصنيع اغلبها. تعد البكتريا المتواجدة في الامعاء بانها مصدرا لعدد من انواع الفيتامينات التي يحتاجها الانسان

لاسيما فيتامين K والبايوتين وفيتامين B_{12} ولكن الكميات المنتجة منها غالبا ما تكون غير كافية لسد الاحتياجات منها.

انتاج الفيتامينات

يعد انتاج الفيتامينات ذا اهمية بالغة نظرا للحاجة اليها في كثير من التفاعلات والتحولات الايضية وكونها ذا قيمة علاجية ومواد ضرورية للنمو في الجسم. تدخل الفيتامينات كمضافات في الكثير من الصناعات الغذائية كما تدخل في تدعيم الخبز الابيض فضلا عن استخدام النقية منها في الاغراض العلاجية. ان مصادر الحصول على الفيتامينات يكون اما من المصادر الطبيعية او من التخليق الكيميائي لها. **وان اهم المصادر الطبيعية لها:**

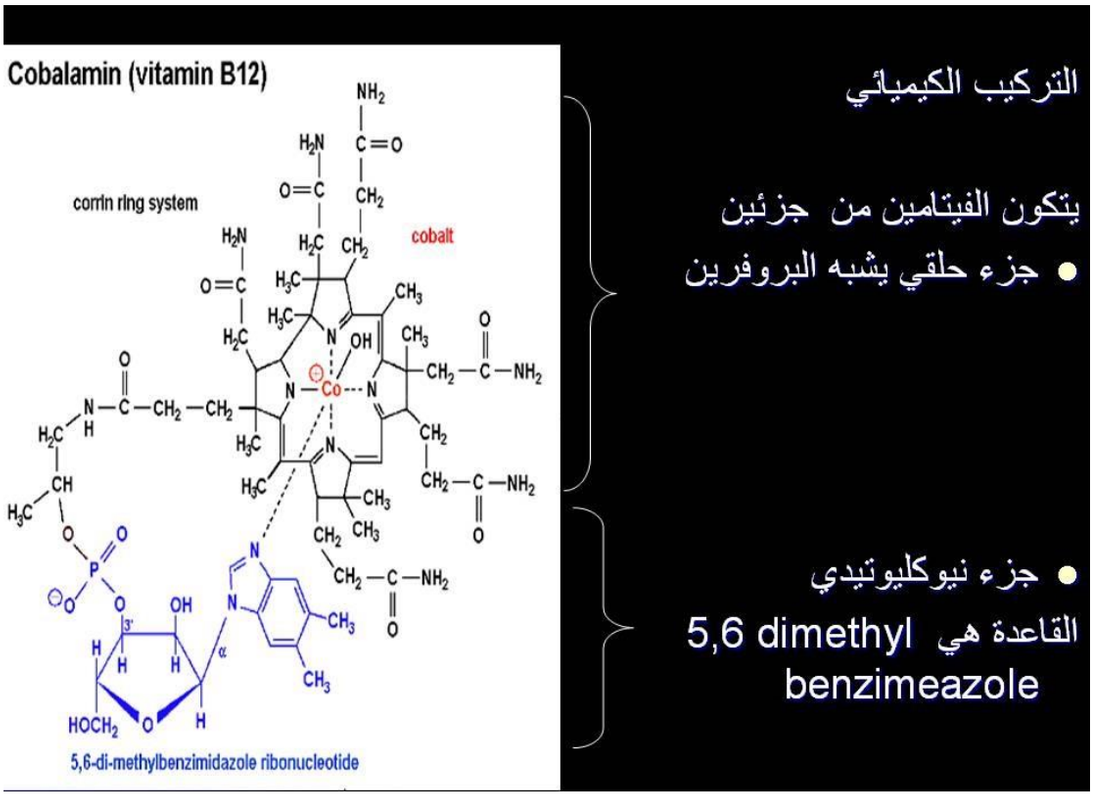
1) **المصادر الحيوانية: كما في السمك والكبد والبيض وغيرها.**
2) **المصادر النباتية: كالخضراوات لاسيما الداكنة والملونة كاللهانة والسبيناغ والجزر وغيرها الكثير.**
3) **الاحياء المجهرية: كما في خميرة الخبز والانواع البكتيرية المختلفة.**

كما تم انتاج بعض الفيتامينات باستخدام التخليق الكيميائي ولكن خطوات الانتاج تعد بانها معقدة في اغلب حالات الانتاج كما انها تتضمن خطوات متعددة. لذلك فان الاتجاه الى الانتاج الحيوي من خلال استعمال الاحياء المجهرية يعد مقبولا اقتصاديا وانتاجيا حيث أثبتت مقدرتها على إنتاج الثيامين B1 والريبوفلافين B2 وحمض الفوليك والبانتوثينيك والبيرودوكسيل والبايوتين . كذلك سجلت لتلك الاحياء إسهاماتً كبيرة فى إنتاج فيتامينات A و K من غير الذائبة في الماء. كما تلعب عمليات التحول الكيميائى ذات الطابع البيولوجي biotransformation دور هام فى إنتاج حامض الأسكوربك Vitamin C والتوكوفيرول.Vitamin E . ان من اهم الفيتامينات التي يتم انتاجها تجاريا باستعمال الاحياء المجهرية هي كل من فيتامين B12 والرايبوفلافين B2.

فيتامين B12

ان بدايات التعرف على فيتامين B_{12} كانت بعد اكتشاف علاقته مع **حصول حالات فقر الدم الخبيث** في الانسان حيث توصل العلماء Minot and Murphy في العام 1926 الى ان فقر الدم الخبيث يمكن علاجه عند

التغذية على الكبد الطازج. توالت الابحاث بعد ذلك لاجل التوصل الى العامل الرئيس في العلاج حيث تم عزله في العام 1948 من كبد الثور ومن الاحياء المجهرية المنتجه له. كما تم التعرف على تركيبة الفيتامين في العام 1955 وذلك من خلال استعمال الاشعة السينية وفي العام 1973 (الشكل 1).



شكل 1. التركيب الكيميائي لفيتامين B_{12}

ان من اهم الاعراض الناتجة عن نقص الفيتامين هي الاتي:

فقر الدم كبير الكريات (Macrocytic anemia) ، تعب ووهن عام ، فقدان الشهية للطعام، تشنجات عصبية التي قد تصل إلى حالة الغيبوبة وإن فقر الدم بعوز فيتامين $\mathbf{B_{12}}$ هو فقر الدم الوحيد الذي يترافق مع أعراض عصبية. كما يمكن ان يكون عاملا مسببا لامراض اخرى، مثل زيادة احتمال الإصابة بتصلب الشرايين، بسبب حصول فرط هوموسيستينيميا الدم (Homocysteinemia) الناجمة عن نقص الفيتامين لذلك ينصح ان تكون فحوصات قياس مستويات $\mathbf{B_{12}}$ جزءًا من الفحوصات الروتينية، كما هو حال فحوصات السكر والدهنيات.

شكل لبعض حالات نقص فيتامين B12

إن المصدر الرئيس لهذا الفيتامين في الطعام هي اللحوم، البيض ومنتجات الحليب. ترتبط مستويات الفيتامين وحالات امتصاصه مع العامل المَعِدي الداخلي (Gastric intrinsic factor) في المعدة ومعدلات افرازه ليتم امتصاصهما معًا كمركب بتاثير العامل الداخلي في أقصى الأمعاء الدقيقة اللَّفائِفِيَّة (Terminal ileum) . لذلك فان جميع العوامل التي تؤثر في افراز العامل الداخلي تسبب في نقص امتصاص الفيتامين.

شكل يوضح بعض الاغذية التي تحتوي فيتامين B12.

ان الكميات الموصى بتناولها من هذا الفيتامين هي عند 2.4 ميكروغرام يوميا.

تم انتاج B_{12} كيميائيا في اكثر من 70 خطوه لذلك لم تستعمل هذه الطريقة في الانتاج التجاري كذلك لم تستعمل تجاريا طريقة استخلاصه من كبد الثور كونها غير اقتصادية حيث يتركز الفيتامين عند 1 ملغم/ كغم من الكبد. لذلك اتجهت الانظار الى استعمال الاحياء المجهرية في عملية انتاج الفيتامين وكانت البدايات مع بعض انواع بكتريا Streptomyces حيث تم استخلاصة من متبقيات الوسط المستعمل في انتاج المضادات الحيوية.

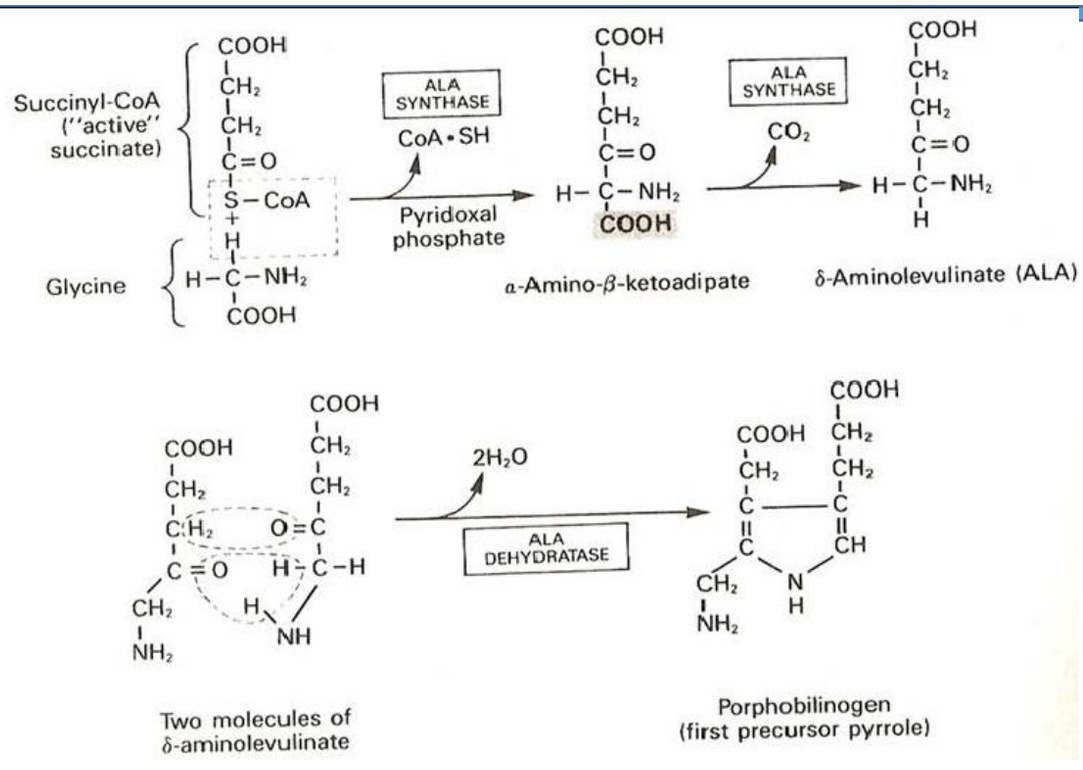
انتاج فيتامين B_{12}

استعملت انواع متعددة من الاحياء المجهرية في انتاج فيتامين B12 ولكن الانواع الاكثر استعمالا هي بكتريا *Pseudomonas dentrificans* ونوع من بكتريا جنس البروبيونك هي *Propionibacterium freudenreichii subsp shermanii* بعد تنميتها على وسط المولاس او المصادر الاخرى الغنية بالكاربوهيدرات. وقد فضلت الانواع في اعلاه على الانواع البكتيرية الاخرى لاسيما بكتريا Streptomyces وذلك لكون تلك الانواع ذات انتاجية عالية فضلا عن سرعة نموها مقارنة مع الانواع من جنس Streptomyces

1. انتاج فيتامين B12 باستعمال بكتريا *Pseudomonas dentrificans*

استعملت انواع متعددة من جنس بكتريا Pseudomonas في انتاج فيتامين B12 الا ان بعض السلالات المحورة وراثيا من النوع البكتيري *Pseudomonas dentrificans* الذي عزل في العام 1960 كانت الاكثر انتاجا مقارنة مع الانواع البكتيرية الاخرى. وبعد اجراء التحسينات الوراثية على السلاله البكتيرية اعلاه تم تحسين الانتاج ليصبح في العام 1970 عند 60 ملغم من الفيتامين لكل لتر من الوسط المستعمل للانتاج.

ان افضل وسط لانتاج الفيتامين باستعمال هذه البكتريا هو مولاس البنجر السكري Sugar cane molasses وذلك لاحتوائه على 5-10% من مادة **Betaine** التي يتركب بشكل كلايسين ثلاثي المثيل (Tri-methyl glycine). يتم انتاج الفيتامين من خلال التحفيز لتخليق انزيم **Ala-synthetase** الذي له دورا رئيسا في انتاج حامض **β-aminolevulinic acid** الذي يعد المادة الاساس في تكوين فيتامين **B12**. اذ تتكون عنه مادة **Porphobilinogen** وان اتحاد اربعة وحدات من هذا المركب يتكون الجزء الحلقي من الفيتامين الذي يرتبط مع الجزء النيوكلوتيدي ليتكون الفيتامين الكامل **(الشكل 2)**. لاتقتصر اهمية وجود مادة البيتين **Betaine** في التحفيز على الانتاج انما يكون تاثيرها ايضا في زيادة نفاذية جدر الخلايا المايكروبية المنتجة مما يسبب في سهولة تناضح الفيتامين خارج الخلايا الى وسط الانتاج. ان عملية انتاج الفيتامين من النوع البكتيري *Pseudomonas dentrificans* تتم تحت الظروف الهوائية كما ان اضافة **ملح الكوبلت** ومركب **5,6 dimethyl benzimidazole** تعد ضرورية لاتمام عملية الانتاج كون النوع البكتيري يستعمل المضافين اعلاه في اتمام عملية تخليق الفيتامين.



شكل 2. مراحل تكون فيتامين B12 حيويا

ان درجة الحرارة المثالية لتنمية البكتريا وانتاج الفيتامين هي عند **29** ° م وتستمر التنمية على الوسط لمدة **3** ايام ويستعمل التحريك عند سرعة لاتقل عن 150 دورة/ دقيقة، كما ان قيمة الاس الهيدروجيني كانت عند **7.4** .

2. انتاج فيتامين B12 باستعمال بكتريا *Propionibacterium shermanii*

ينتج فيتامين B12 من النوع البكتيري Propionibacterium shermanii في ظروف قليلة التهوية على وسط غذائي يتكون من الكاربوهيدرات لاسيما مولاس البنجر السكري مع اضافة عنصر الكوبلت الى الوسط الغذائي. يعتمد انتاج الفيتامين على مقدار تكون مركب 5,6 dimethyl benzimidazole داخل الخلية التي تتمكن من تخليقه. ان توفير الظروف اللاهوائية يؤدي في الحصول على انتاج عال من الفيتامين على الرغم من ان التهوية تسبب في تشجيع تكوين مركب DBI الضروري لانتاج الفيتامين. مع العلم بانها تسبب في كبح احدى خطوات تخليق الفيتامين. **لذلك يفضل اجراء المرحلة الاولى من عملية التخمر تحت الظروف غير الهوائية التي تؤدي في استهلاك جميع كمية السكر الموجودة في الوسط الغذائي وكذلك تكوين مركب Cobinamide دون تاثير كابح**. وعندما تتبعها تزويد المزرعة بالهواء فان الحالة تسبب في التحفيز لتخليق المركب **DBI** وتحويل المركب **Cobinamide** الى **Cobalamin** الذي يعد بانه فيتامين B12 . تتم التنمية على الوسط الغذائي عند 30 ° م تحت ظروف لاهوائية ومستوى اس هيدوجيني عند **6.5** لمدة ثلاثة ايام يتبعها ادخال كميات قليلة من الهواء مع التحريك عند نفس الظروف مع تغيير مستوى الاس الهيدروجيني الى 7 في الثلاثة ايام الثانية وتستعمل هيدروكسيد الامونيوم لضبط مستوى الاس الهيدوجيني. ان كمية الانتاج تحت الظروف المشار اليها يمكن ان يصل الى 50 ملغم/ لتر من الوسط.

فيتامين الرايبوفلافين B2

فيتامين (Vitamin B2) المعروف أيضاً بالريبوفلافين، يعد بانه احد اهم مجموعة فيتامينات B التي تذوب بالماء ويمكن تناوله مع أو بدون وصفة طبيب. اذ يتواجد في عدد من الأطعمة.

يعد الفيتامين اساسيا في إنتاج الطاقة من الكاربوهيدرات كذلك في انتاج الأحماض الأمينية. كما يساعد في الحفاظ على سلامة الأغشية المخاطية لاسيما تلك في بطانة الفم. ويعزز حالات ابيض الخلايا، مما يجعله عنصراً غذائياً ذا اهمية كبيرة .

يستعمل في علاج اليرقان لدى المولودين حديثاً. كما يمكن أن يفيد الفيتامين الأشخاص الذين يعانون من بدايات الارتعاش، فقر الدم، داء الشقيقة، اضطرابات الأكل، الملاريا، سرطان المريء والاكتئاب.

شكل يوضح نماذج لبعض الاغذية التي تحتوي فيتامين B2

يعتبر اللبن ومنتجاته كذلك بعض الخضروات والخميرة من المصادر الأساسية لهذا الفيتامين حيث تحتوي عليه بنسب كبيرة. هذا الفيتامين لاتؤثر الحرارة في تركيبه ولكنه يتاكسد بوجود الضوء. لا يستطيع جسم الإنسان الاحتفاظ به مما يستلزم الحصول عليه من مصادر خارجية باستمرار. تم فصل الفيتامين لاول مرة بصورة نقية من الحليب في 1879 ولم يتم التعرف عليه كفيتامين الا في العام 1920 وتم تشخيص تركيبة الكيميائي في العام 1930 كما تم تخليقه لاول مرة في العام 1935.

ان اعراض نقص الفيتامين تظهر بشكل تشققات مؤلمة في زوايا الفم وعلى الشفتين، تقرحات في الفم واللسان وقد يصبح لون اللسان أرجواني، كذلك في ظهور بقع حمراء دهنية ومتقشرة تظهر على الأنف، بين الأنف والشفتين، على الأذنين والجفنين، وان استمرار نقصه يسبب في حصول فقر الدمّ.

ان الجرعات الموصى بها من الفيتامين هي 1.0 الى 1.6 ملغم يوميا.

تركيب الفيتامين B2

يتم انتاج الفيتامين من اتحاد Flavin مع Isoalloxazine و Polyol و D–ribitol الذي يشتق من سكر الرايبوز Ribose . ومن مركباته اشتق اسمة الرايبوفلافين. اذ انه يوجد في الطبيعة بهيئة Flavin mononucleotide (FMN) و Flavin adenine dinucleotide(FAD)

انتاج فيتامين B2

ينتج الفيتامين على النطاق التجاري من خلال التخليق الكيميائي او الطريقة شبه الحيوية من خلال التخليق الحيوي لسكر الرايبوز ثم التحول الكيميائي الى الفيتامين او التخليق الحيوي الكامل لانتاج فيتامين B2.

1. الطريقة شبه الحيوية لانتاج الفيتامين

تستعمل السلالات المتطفرة من بكتريا *Bacillus subtilis* وبكتريا *B. pumilus* في انتاج سكر الرايبوز من خلال تنميتها على المولاس. ان انتاجه بهذه الطريقة يعد اقل كلفه من انتاجه بالطرق الكيميائية. تتميز السلالات المطفرة بانها لاتتجهه الى تكوين السبورات وينقصها انزيم **transketolase** ولها فعالية عالية من انزيم **2-deoxy-d-glucose oxidase** . تنتج السلالتين مايقارب **75** غم/لتر من الرايبوز. بعد انتهاء مدة التخمر يتم فصل خلايا البكتريا بواسطة الترشيح وبعد تركيز الراشح الى نصف الحجم يضاف **الايثانول** بمقدار **25%** من حجم الراشح الاصلي. يزال الراسب ويمرر الراشح المتبقي خلال مبادلات ايونية وكاتيونية للتخلص من الاملاح ويقصر اللون من خلال الامرار بالفحم المنشط. بعدها يضاف 4 امثال حجم السائل من الايثانول لبلورتة حيث يتبلور مايقارب من 70% من الرايبوز. يتم انتاج نصف الانتاج العالمي من الرايبوز بهذه الطريقة.

2. الطريقة الحيوية لانتاج الرايبوفلافين

يتم انتاج مايقارب من 30% من الانتاج العالمي بهذه الطريقة من خلال استعمال الاحياء المجهرية. يوجد فيتامين B2 في الاحياء المجهرية باحدى الصيغتين FMN او FAD يتم تصنيف الاحياء المجهرية المنتجة للفيتامين اعتمادا الى قابليتها للانتاج اذ تصنف الى الاتي:

1) الاحياء المجهرية التي تنتج 100 ملغم/لتر مثل بكتريا ***Clostridium acetobutylicum*** اذ تنتج مايقارب 100 ملغم من الفيتامين/ لتر خلال مدة 4 ايام. الانتاج البكتيري في هذه الحالة يكون حساسا لوجود بعض الايونات لاسيما الحديد Fe^{+2}.
2) الاحياء المجهرية التي تنتج اكثر من 500 ملغم/لتر وتشمل الخمائر ***Candida flareri*** اذ انها تنتج مايقارب 600 ملغم/ لتر خلال 7 ايام وكذلك في ان الخمائر تتحسس للايونات المعدنية الذي يسبب عدم استعمالها في الانتاج التجاري.
3) الاحياء المجهرية التي تنتج في مستوى عدة **غرامات** من الفيتامين اذ تزيد في بعض الاحيان عن **10 غم/لتر** التي تضم انواع من الفطريات الكيسية المتطفرة من الانواع ***Eremothecium ashbyii*** و ***Ashbya gossypii*** وسلالة من النوع البكتيري ***Bacillus subtilis*** المتحصل عليها من الهندسة الوراثية. ان الانواع المشار اليها في اعلاه لاتتاثر بوجود الحديد في الوسط الغذائي. استعمل الفطر ***Eremothecium ashbyii*** في الانتاج منذ العام 1935 وبلغت قابليته في الانتاج عند 5.3 غم/لتر ولكن هذا الفطر يبدي تغيرات وراثية مما يسبب في مشاكل عند الانتاج.اما الفطر ***Ashbya gossypii***

فانه اكثر ثباتا على الرغم من انتاجه عند 0.5 غم/لتر وان شركة Merck تستعمله في الانتاج بعد ان حسنت كمية الانتاج.

1- انتاج الرايبوفلافين من الفطر *Ashbya gossypii*

ان قابلية سلالة الفطر *Ashbya gossypii* على انتاج الفيتامين قد حسنت لتصل بين 10 الى 15 غم/لتر، وقد اعتمد تحسينها من خلال التطفير وكذلك توفير الوسط الغذائي للتنمية المثالية. يعد الزيت هو المصدر الكاربوني المفضل لتنمية سلالة الفطر لاسيما من **زيت فول الصويا او الذرة** فضلا عن انواع السكريات من الكلوكوز والسكروز والمالتوز اما المصدر النتروجيني فان **الببتون** يعد المفضل في التنمية وكذلك سائل نقيع الذرة ومستخلص الخميرة. كما وجد ان اضافة 1–3 غم من الكلايسين لكل لتر من الوسط الغذائي تسبب في زيادة الانتاج من 10–30% ومنها يمكن ان تكون زيادة الانتاج عند 14–20 غم/لتر من الرايبوفلافين.

2- انتاج الرايبوفلافين من البكتريا *Bacillus subtilis*

ان السلالة من النوع البكتيري اعلاه المنتجة لفيتامين الرايبوفلافين قد تم الحصول عليها من خلال استعمال الهندسة الوراثية وتتميز عن استعمال الفطريات الكيسية في انها تحتاج الى زمن اقصر للانتاج. تتم التنمية باستخدام الوسط الملائم والمتوفر عند 37 ° م لمدة يومين مع التحريك حيث يكون الناتج عند 4.5 غم/ لتر.

فصل وتنقية الرايبوفلافين

تعتمد طريقة فصل الرايبوفلافين على الغرض من استعماله حيث يمكن ان يستعمل كعلف حيواني او للاستعمال الصيدلاني. فعند استعماله للعلف الحيواني يتم ضبط الاس الهيدروجيني عند 4.5 بعد انتهاء عملية التخمير يتبعها اجراء تركيز للمزرعة ثم التجفيف.

يمكن الحصول على مركز الفيتامين من خلال معاملة المزرعة بانزيم البروتييز القاعدي لمدة 3 ساعات عند حرارة 60 ° م ثم تجرى عملية الطرد المركزي مع التبريد عند 25 ° م واس هيدروجيني 7.0 بعدها يتم اخذ الراسب ويغسل بالماء ثم يجفف.

اما في حالة الحاجة اليه للاستعمالات الصيدلانية فان عملية الفصل تبدأ بضبط الاس الهيدروجيني عند 4.5 ثم التسخين عند 121 ° م لمدة ساعة حيث تتم اذابة الفيتامين. يجرى بعدها ازالة الراسب باستعمال الطرد المركزي عند 3000 دورة/ دقيقة تجرى معاملة السائل بغاز مختزل مثل كلويد التيتانيوم اذ يترسب في هذه الحالة الرايبوفلافين المختزل الذي يكون اقل ذوبانا من المتاكسد. يتم اعادة الاكسدة للفيتامين بالهواء ويذاب في 10% من حامض الهيدروكلوريك عند حرارة 60 ° م ، اذ تتم بلورة الفيتامين بعد التبريد ومعادلة الاس الهيدروجيني للوسط الموجود فيه الفيتامين.