أستاذ المادة : أ.م.د. آمال كاظم غضبان

تحضـير اللقـاح (البـادئ)

Inocula preparation

يجب أن تتوفر في المزرعة التي تستعمل في تحضير اللقاح لعمليات التقنية الحياتية الصفات التالية :

1- أن تكون المزرعة سليمة وبحالة نشطة وذلك لتقليل فترة طور الركود في عملية التخمر اللاحقة

2- يمكن تحضيرها بحجم كبير لتعطي حجما كافيا و مناسبا من اللقاح .

3- تكون ذات صفات مورفولوجية ملائمة

4- تكون خالية من التلوث

5- تحافظ على قابليتها في إنتاج المنتوج

إن العامل المهم في الحصول على لقاح يمتاز بالصفات السابقة الذكر هو عملية اختيار الوسط الغذائي المناسب لتحضير و تحديد مدى صلاحيته بواسطة الاستعمال اللاحق في مرحلة الانتاج . لذا قد يختلف الوسط المستخدم في انتاج اللقاح عن الوسط المستخدم في انتاج المنتوج المرغوب . عادة تقل فترة طور الركود اثناء عملية انتاج المنتوج المرغوب إلى الحد الادنى عند استعمال وسط غذائي في انتاج اللقاح يشابه الوسط المستخدم في انتاج المنتوج المرغوب، وهذا يعود الى تقليل الفترة الزمنية التي يحتاجها الكائن المجهري للتأقلم في الوسط المستخدم في الانتاج وبذلك يختزل طور الركود وبالتالي زمن التخمر. يمتاز الوسط الغذائي المستخدم في إنتاج اللقاح بأنه ذو محتوى غذائي وكمية من مصدر الكاربون أقل من الوسط المستخدم في انتاج المنتوج المرغوب . عادة تتراوح كمية اللقاح اللازمة للزراعة **3-10%** من حجم الوسط الغذائي وتبدأ عملية تحضير اللقاح من المزرعة الاصلية stock culture ثم تمر بمراحل عدة للحصول على الكمية الكافية من اللقاح لاستعماله في عملية الانتاج في أجهزة التخمر . وقد يحتاج ذلك الى أكثرمن مرحلتين اعتمادا على حجم وعاء التخمر مما قد يتسبب في تلوث المزرعة و تغير السلالة strain degeneration لذا يجب القيام بعمليات السيطرة النوعية الدقيقة على السلالة . يتم تحضير اللقاح بأخذ مسحة من المزرعة الاصلية وزرعها في أطباق بتري تحتوي على وسط غذائي مناسب وبعد التحضين يتم اختيار عشرة مستعمرات ذات صفات مورفولوجية ملائمة لإعطاء منتوج عالي الكمية. ثم تعاد زراعتها في أنابيب الأكار المائلة (سلانت)، وتعد كل واحدة منها بمثابة مزرعة ثانوية تستخدم لتحضير وجبات جديدة. وقد تزرع المزارع الثانوية في هذه المرحلة في دوارق هزازة لاختبار إنتاجياتها ويجب التأكد من الانتاجية قبل الوصول إلى مرحلة انتاج المنتوج المرغوب. وتستخدم عادة في تحضير المزارع الثانوية الدوارق الهزازة سعة 250-500 مل والتي بدورها تستعمل لتلقيح دوارق أكبر أو أجهزة التخمر المختبرية وهذه تستخدم في تلقيح أجهزة تخمر شبه الصناعية. يتم فحص نقاوة المزرعة عند كل مرحلة من أجل الكشف عن التلوث بصورة مبكرة قدر الامكان .وعلى الرغم من أن إجراء هذا الفحص قد لا يمكن الكشف عليها قبل وصول اللقاح إلى معامل الانتاج إلا إنه يمكن على الأقل معرفة المرحلة التي حدث فيها التلوث من مراحل

تحضير اللقاح . ويمكن تحوير عملية انتاج اللقاح بالنسبة للاحياء المجهرية المنتجة للسبورات وذلك لاجل تسهيل استخدام معلق السبورات كلقاح ، وقد طورت طريقة أكثر إحكام لتحضير لقاح بكتيري ويمكن استخدام هذه الطريقة لأي نوع من الأحياء المجهرية مع إجراء تحويرات بسيطة .

وتختلف طرق تحضير لقاح البكتريا و الخمائر والأعفان و البكتريا الخيطية بعضهاعن بعض .

1- تحضير لقاح الخمائر

إن أهم العمليات التي تستخدم فيها الخمائر في التقنية الحياتية هي إنتاج الكحول وإنتاج الكتلة الحيوية مثل إنتاج خميرة الخبز وبروتين أحادي الخلية. بالنسبة لتحضيراللقاح للانتاج التجاري لخميرة الخبزيتضمن عدة مراحل المرحلة الاولى تتم باستخدام مزارع نقية وتحت ظروف التعقيم لتقليل التلوث خلال مراحل، النمو الاولى على الرغم من أن الانتاج التجاري لخميرة الخبز قد لايتم تحت ظروف التعقيم كاملة، وتم اقتراح نظام لتحضير لقاح خميرة الخبز والذي يتضمن خمسة مراحل، المرحلتان الأوليتان في أوعية تخمرمغلقة ودون تهوية وإضافات مستمرة من الوسط الغذائي.

2- تحضير لقـــاح الـبكتريا

إن الهدف الريئسي من تحضير اللقاح هو إنتاج لقاح نشط ليعطي طور ركود قصير قدر الامكان في مرحلة التخمير اللاحقة، حيث أن طور الركود الطويل غير مرغوب ليس لأنه يضيع وقت طويل فقط ولكن لأن الوسط الغذائي يستهلك في المحافظة على المزرعة الحية قبل النمو . ويتاثر طول طور الركود بحجم اللقاح وظروفه الفسيولوجية أيضا. وكما ذكرنا أن كمية اللقاح المستعملة **3-- 10 %** من حجم المزرعة. وينصح باستخدام اللقاح البكتيري عندما تكون الخلايا في الطور اللوغاريتمي أي فعالة من الناحية الأيضية . ويعد عمر اللقاح ذا أهمية خاصة في نمو البكتريا المكونة للسبورات حيث تنتج الخلايا السبورات في نهاية الطور اللوغاريتمي ويؤدي استعمال لقاح يحوي نسبة عالية من السبورات إلى إطالة طور الركود في أثناء عملية التخمر اللاحقة .

هنالك أمثلة على تحضير لقاح البكتريا منها لقاح بكتريا *Bacillus.subtilis* المستخدم في انتاج أنزيم البروتيز، حيث يحضر على مرحلتين ينمى اللقاح لمدة **1-2** يوم على وسط غذائي صلب أو سائل ثم ينقل إلى جهاز التخمر الخاص بإنتاج اللقاح وينمى لعشرة اجيال قبل ان يستخدم في عملية الانتاج . ويمكن التخلص كليا من طور الركود للبكتريا المستخدمة في انتاج الانزيمات باستخدام وسط غذائي في تحضير اللقاح يشابه الوسط المستعمل في عملية الانتاج واستخدام كمية كبيرة من اللقاح. أما إنتاج الخل فإنه يتطلب استخدام لقاح نشط جدا فسيولوجيا وبما أن بكتريا حامض الخليك هي هوائية وهي كثيرة الحاجة للاوكسجين وحساسة جدا لقلة الاوكسجين لذلك فان عدم تأخيرعملية الانتاج يتطلب استخدام الخلايا في نهاية عملية التخمر كلقاح للوجبة اللاحقة وذلك بأزالة 60 **%** من المزرعة ويحافظ على الحجم الاصلي للمزرعة بإضافة وسط جديد . ومن أهم مميزات استخدام لقاح نشط جدا هي منع تلوث وتغير السلالة، أما بالنسبة للبكتريا اللاهوائية مثل تحضير لقاح بكتريا *Clostridia* الخاص بتخمرات الاسيتون-بيوتانول حيث أن هذه التخمرات تستعمل فقط في جنوب أفريقيا وهي تعد من التخمرات المهمة التي ظهرت خلال الحرب العالمية الاولى ، وتتضمن عملية استرجاع المزرعة الأصلية إستعمال صدمة حرارية لتحفيز إنبات السبورات والتخلص من السبورات

الضعيفة ، ويستخدم فقط 10 لتر من اللقاح في تلقيح جهاز التخمر سعة 100 ألف لتر. و يستوجب استخدام هذه الكمية القليلة من اللقاح العناية الكاملة بظروف الانتاج منعا لإطالة طور الركود و التلوث.

3- تـحضير لـقاح الأعفــان

يعد تحضير لقاح الاعفان أكثر شيوعيا من تحضير لقاح البكتريا و الخمائر نظرا لكثرة استعمال الأعفان في عمليات التقنية الحياتية . تستطيع معظم الاعفان ذات الأهمية الصناعية إنتاج السبورات اللاجنسية، لذا يعد تحضير معلق السبورات هي الطريقة الشائعة في تحضير لقاح الاعفان و توجد ثلاث طرق لتحضير السبورات:

أ- انتاج السبورات على الأوساط المتصلبة :

كما هو الحال في انتاج سبورات *penicillium chrysogenum* حيث يستعمل في هذه الطريقة 300 مل من الوسط الغذائي الذي يحتوي على 3 % أكارفي قناني اسطوانية سعة 1 لتر ويبرد إلى حرارة 45 مْ وتدور القنينة على اسطوانة متحركة، حيث يتكون غلاف اسطواني رقيق من الأكار داخل القنينة ثم تلقح بمعلق سبورات من مزرعة أكار مائلة (سلانت) وتحضن على درجة حرارة 24مْ لمدة 7 أيام. من مميزات هذه الطريقة تعطي مساحة سطحية كبيرة لتنمية السبورات بالإضافة إلى أن حجم القناني مناسب للاستخدام المختبري .

ب-انتاج السبورات على اوساط صلبة

ينتج عدد من الأعفان سبورات بصورة غزيرة على سطح الحبوب ثم تجمع السبورات من الحبوب. يعد الشعير والذرة المجروشة ونخالة الحنطة أوساطاً غذائية ملائمة لإنتاج سبورات عدد كبير من الأعفان، وتؤثر كمية الماء المضافة للحبوب (الترطيب) قبل التعقيم على تكوين السبورات إضافة إلى تأثير الرطوبة النسبية يجب ان تكون عالية قدر الامكان خلال تكوين السبورات .

ج- إنتاج السبورات في المزارع المغمورة

ينتج عدد من الاعفان سبورات في المزارع المغمورة عند تنميتها على أوساط غذائية مناسبة. وتتلخص عملية إنتاج السبورات بطريقة المزارع المغمورة لإنتاج المضاد الحيوي كريسيوفولفين من عفن *P. patulum* باستعمال 600 مل من الوسط الغذائي المعد لهذا الغرض في دوارق هزازة سعة 2 لتر وتلقح بسبورات متكونة على مزارع مائلة تحتوي وسط يدعى آكار زابك –دوكس وتحضن على حرارة 25 مْ لمدة 7 أيام. يستخدم معلق سبورات الناتج بنسبة 10% لإنتاج لقاح خضري في جهاز التخمر ويستخدم 10% من اللقاح الخضري لمرحلة الانتاج.

تحضير اللقاح الخضري للاعفان

لا تستطيع بعض الأعفان انتاج سبورات لاجنسية لذلك يحضر لقاح خضري من المايسيليوم لهذه الأعفان مثل فطر العرهون mushroom وعفن *Gibberella fujikuroi* والذي يستخدم في إنتاج منظم النمو (جبرلين) وتتلخص طريقة تحضير لقاحه بالخطوات التالية :

تنمى مزرعة العفن في أنابيب أكار مائل تحتوي على وسط PDA لمدة اسبوع وعلى درجة حرارة 25 مْ، يكشط النمو من ثلاثة أنابيب وينقل إلى قنينة سعة 9 لتر تحتوي على 4 لتر من وسط غذائي سائل لإنتاج اللقاح. وتحضن المزرعة على 28 مْ لمدة 75 ساعة مع تهوية مستمرة قبل ان تنقل إلى جهاز تخمر سعة 100 لتر لإنتاج اللقاح ويحتوي على الوسط الغذائي نفسه. المشكلة الرئيسية في استخدام لقاح المايسيليوم الخضري هي صعوبة الحصول على لقاح متجانس وقياسي ويمكن التغلب على هذه المشكلة بتجزئة المايسيليوم في جهاز تجنيس مثل الخلاط قبل استعمال المايسيليوم لقاحاً حيث أن هذه الطريقة تعطي أعداد كبيرة من جزيئات المايسيليوم مما يؤدي الى تكوين أعداد كبيرة من نقاط النمو .

أما طريقة إنتاج لقاح المايسيليوم للعرهون *Agaricus biosporus* تتضمن زراعة العفن في قناني زجاجية تحتوي على حبوب مثل الشوفان أو الحنطة أو الذرة البيضاء أوالدخن مضافا إليها ماء وحجرالجير(كاربونات الكالسيوم). ينتج الآن لقاح المايسيليوم للعرهون على الحبوب وباستعمال طرق ميكانيكية متكاملة وتحت ظروف التعقيم ويمكن توزيع هذا اللقاح إلى أية منطقة في العالم من قبل شركات متخصصة في إنتاج هذا اللقاح . ويعتقد أن الحبوب تمثل خزيناً جيداً من المواد الغذائية إذ تجهز المايسيليوم بالغذاء اللازم وتستعمل هذه الحبوب الحاوية على المايسيلوم في تلقيح الوسط الغذائي الخاص بإنتاج العرهون، وهذه الحبوب تسرع من نمو المايسيليوم بعد زراعتها على الوسط الغذائي فضلاً عن طبيعة الحبيبة للحبوب التي تساعد على مزج اللقاح بصورة جيدة مع الوسط الغذائي في مرحلة إنتاج العرهون.

تأثير اللقاح على الصفات المورفولوجية للأعفان في المزارع المغمورة

يختلف نوع النمو عند تنمية الأعفان في المزارع المغمورة أما يكون على شكل كرات صغيرة pellets تحتوي على كتل من الهايفات القصيرة والمشوهة المرزومة أو تكون بشكل خيطي الذي تكون فيه الهايفات على هيئة معلق متجانس منشرة خلال الوسط الغذائي . ويعد شكل العفن في المزارع المغمورة من الصفات المهمة في العديد من صناعات التخمر. ويحدد شكل العفن النامي عاملين هما تركيب الوسط الغذائي وتركيز السبورات في اللقاح السبوري حيث يؤدي استعمال كمية كبيرة من اللقاح السبوري إلى إنتاج نمو منتشر خلال الوسط الغذائي بينما تشجع كمية اللقاح القليلة على تكوين نموعلى هيئة كرات صغيرة . وتتاثر عملية انتاج بعض المنتوجات المرغوبة بشكل العفن المنتج كما هو الحال مع انتاج البنسلين من عفن البنسيليوم فإن الشكل المثالي للنمو هو الخيطي بينما حامض الستريك من عفن *A. niger* فالشكل المثالي هو كرات صغيرة وكذلك الحال مع المزارع المغمورة للعرهون بينما إنتاج البروتين الفطري فالشكل المثالي هو الخيطي.

4- تحضير لقاح البكتريا الخيطية

تنتج أغلبية البكتريا الخيطية ذات الأهمية الصناعية سبورات لاجنسية كماهو الحال مع الأعفان فإن الطريقة الشائعة لتحضير اللقاح هي معلق السبورات. ويعد إنتاج السبورات على أوساط الأكار من الطرق الشائعة في انتاج كميات كبيرة من السبورات وقد وجد ان الأكار المستخدم في تصليب الاوساط الغذائية قد يحتوي على مواد مثبطة لنمو البكتريا الخيطية وتكوينها السبورات، ويمكن التقليل من هذا التاثير بغسل الأكار لإزالة المواد المثبطة.