انتاج الاحماض العضوية من الاحياء المجهرية

تستطيع انواع مختلفة من الاحياء المجهرية تحويل الكاربوهيدرات الى حماض عضوية و توجد هذه الصفة في بعض انواع بكتريا ***Clostridium*** التي تنتج حامض البيوتريك و الخليك وبكتريا حامض اللاكتيك وبكتريا حامض الخليك كما تستطيع انواع معينة من الفطريات الخيطية (الاعفان) من انتاج احماض العضوية مثل الستريك و الفيوماريك و الكلوكونيك و الاوكزاليك و الجبريليك .

معظم الاعفان التي تنتج الاحماض العضوية تعود الى جنس ***Aspergillus*** و خاصة ***A.niger*** الذي ينتج احماض الستريك و الكلوكونيك و الاوكزاليك . واوضحت الدراسات الخاصة حول كمية الانتاج الاحماض العضوية من عفن ***Aspergillus*** بأنها عبارة عن منتجات رئيسية لعمليات الاكسدة البسيطة للسكريات الاحادية او هي عبارة عن مشتقات من دورة الحامض الثلاثي الكاربوكسيل و يمكن السيطرة على انتاج حامض الستريك و الكلوكونيك من عفن ***A.niger*** بواسطة تنظيم مستويات الايونات المعدنية في الوسط الغذائي ويعتبر حامض الاوكزاليك المركب الايضي الثالث لعفن ***A.niger*** و الذي يمكن ايقافه بالسيطرة على الـ **PH** و تركيزالعناصر المعدنية في الوسط الغذائي أذ وجد ان تخليقه كيميائيا يكون اقتصادياً اكثر من من انتاجه بواسطة الاحياء المجهرية .

حامض الخليك Acetic acid

يعد من الاحماض العضوية المهمة و كان ينتج سابقا بواسطة الاحياء المجهرية باكسدة الايثانول ولكن هذه الطريقة لاتستخدم في الوقت الحاضر لعدم جدواها الاقتصادية ما عدا في صناعة الخل وقد حلت محلها الطريقة الكيميائية و التي هي عبارة عن اضافة مجموعة كاربونيل الى الميثانول **carbonylation of methanol** و يتوقع ان تعود صناعة حامض الخليك بواسطة الاحياء المجهرية من خلال استخدام انواع من البكتريا المحبة للحرارة العالية التي لها القابلية على انتاج حامض الخليك من المواد السليلوزية واستخدام سلالات من بكتريا ***Acetobacter woodi*** و بكتريا ***Cl .aceticum*** التي لها القابلية على تحويل الهيدروجين و ثاني اوكسيد الكاربون الى حامض الخليك . ويستعمل حامض الخليك في صناعة المطاط و والبلاستيك و الالياف الصناعية و المبيدات الحشرية .

حامض اللاكتيك Lactic acid

ينتج هذا الحامض في الولايات المتحدة بطريقة التخليق الكيميائي اما في اوربا فان نصف الانتاج يتم بالتخليق الكيميائي و النصف الآخر بواسطة الاحياء المجهرية . بدأ الانتاج التجاري لحامض اللاكتيك في اواخر القرن التاسع عشر بأستخدام انواع مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك وهي ***Lactobacillus delbrukii , L.bulgaricus , L. leichmannii*** و تتم عملية التخمر تحت ظروف قليلة التهوية و درجة الحرارة عالية نسبيا **45-50**مْ و باستخدام مواد نشوية محللة انزيميا او حامضيا .

تستطيع بكتريا ***L.bulgaricus*** من تخمير سكر اللاكتوز بكفاءة عالية و يستخدم الشرش في هذه الحالة في تنمية هذه البكتريا و يستخدم في حالات اخرى السكروز بتركيز **12-18%** (وزن / حجم)

حيث يستهلك في فترة **3-4** ايام و تتحرر كميات كبيرة من ثاني اوكسيد الكاربون و التي تساعد في خلق ظروف قليلة التهوية . ان حامض اللاكتيك الطبيعي السائد **L**(+) اما الصورة غير الطبيعية فهي **D**(-) . ويستخدم حامض اللاكتيك في المشروبات الغازية وفي عصيرالفواكه و المربيات كمادة معطية للنكهة ويستخدم في ازالة الكالسيوم من الجلود في صناعة الدباغة ويستعمل في صناعة البلاستيك ايضا .

حامض الستريك Citric acid

هو حامض ثلاثي الكاربوكسيل وينتج تجاريا في الوقت الحاضر بواسطة سلالات معينة من عفن ***A.niger*** وحديثا اكتشفت انواع من الخمائر التي تنتج حامض الستريك بتنميتها على البرافينات . تعزل سلالات عفن ***A.niger*** عادة من التربة أو من النباتات أو يتم الحصول عليها من مراكزتجميع السلالات ثم يتم تحسينها بالتطفير الوراثي ، يستعمل المولاس البنجر عادة في الوسط الغذائي الخاص بتنمية العفن ويمكن ايضا استعمال السكروز أو المولاس القصب أو شيرة الذرة أو عصيرالتمر .

التخليق الحيوي لحامض الستريك من عفن *Aspergellus niger*

يعتقد ان تخليق حامض الستريك من هذا العفن هي عبارة عن حالة غير كاملة لحامض ثلاثي الكاربوكسيل الطبيعية ،حيث يتجمع حامض الستريك نتيجة لعملية التكثيف لمركب **oxalo acetic acid** مع المرافق الانزيمي **acetyl Co A enzyme** وينتج كلاهما من البايروفيت ، يحتاج الانتاج العالي من حامض الستريك الى عملية اضافة الكاربوكسيل الى جزيئة بايروفيت واحدة بواسطة ثاني اوكسيد الكاربون الذي يتحرر خلال نزع الكاربوكسيل من جزيئة بايروفيت اخرى لكي تعطي مرافق انزيمي **acetyl Co A** . يعود توقف الدورة عند انتاج حامض الستريك الى نفاذ الاسبارتيت الذي يثبط في حالة عدم نفاذه فعالية الانزيم المسؤل عن اضافة الكاربوكسيل الى البايروفيت . يبطل تثبيط السترات لانزيم فوسفوكاينيز وهذا الانزيم ضروري لتحويل الكلوكوز او الفركتوز الى بايروفيت بواسطة تجمع ايونات الامونيوم في الخلايا. يتم الوصول الى هذه الحالة عن طريق نقص المنغنيز الذي يؤثر بصورة عكسية على تخليق و فعالية انزيم اكونتيز وانزيم ايزوستريت ديهايدروجينيز والتي تحفز عادة عملية هدم حامض الستريك .

تأثير العناصر المعدنية على انتاج حامض الستريك

تعد بعض العناصر المعدنية مثال الحديد ، النحاس ، الخارصين ، المنغنيز و المغنسيوم ضرورية لنمو وانتاج حامض الستريك من عفن ***A.niger*** الا ان عملية انتاج حامض الستريك حساسة جدا لتركيز هذه العناصر ويختلف التركيز المثالي باختلاف السلالة و لكن عموما يجب ان يكون التركيز واطئ في الوسط الغذائي ويمكن التغلب على مشكلة التراكيز العالية لهذه العناصر في الوسط الغذائي باستخدام احدى الطرق التالية :

أ- انتخاب سلالات تتحمل التراكيز العالية للعناصر المعدنية الصغرى و ذات انتاجية عالية من حامض الستريك.

ب- اضافة فيروسيانيد البوتاسيوم الى الوسط الغذائي لاجل ترسيب بعض العناصر مثل الحديد.

ج- استخدام المبادلات الايونية لسحب هذه العناصر من الوسط الغذائي . وتعد هذه المعاملات ضرورية جدا خاصة عند استخدام اوساط طبيعية مثل المولاس وعصير التمر التي تحتوي على تراكيز عالية من العناصر المعدنية .

طرق انتاج حامض الستريك

توجد ثلاثة طرق لانتاج حامض الستريك و تفاصيل هذه الطرق محفوظة بسرية تامة لدى الشركات المنتجة و هذه الطرق هي:

1- طريقة المزارع السطحية Surface culture method

يوضع الوسط الغذائي الحاوي على السكر المعقم في صواني ضحلة ومصنوعة من الحديد غير قابل للصدأ او الالمنيوم وتوضع في هيئة طبقات في غرفة التخمر المعقمة و المجهزة بوسائل السيطرة على الحرارة و الرطوبة النسبية ودوران الهواء . يتم تلقيح الوسط الغذائي بسبورات عفن ***A.niger*** ويحضن على درجة حرارة **28-30**مْ ورطوبة نسبية **40-60%** لمدة من **8-12**يوم حيث ينمو العفن في الوسط ويمكن متابعة انتاج الحامض من خلال تقدير الـ **PH** و الحموضة الكلية للوسط ، يفصل المايسليوم عن الوسط بالترشيح ثم يفصل حامض الستريك من الراشح . يعاد استخدام المايسليوم بوجبة واحدة او وجبتين من الوسط الغذائي . تعقم الصواني التخمر بعد الانتهاء بالفورمالديهايد المخفف و ثاني اوكسيد الكبريت

2- طريقة المزارع المغمورة submerged culture method

يعرض الوسط الغذائي في هذه الطريقة بعد تلقيحه الى تحريك و تهوية قوية و مستمرة في اجهزة تخمر كبيرة و تستقرق عملية التخمر 3-5 أيام و هي اقل من الطريقة السابقة ،ترشيح المزرعة بعد انتهاء عملية التخمر ويفصل حامض الستريك من الراشح ويمكن استعمال كرات المايسليوم مرة ثانية في الوجبة القادمة . وقد استعمل طريقة المزارع المغمورة على مرحلتين . يطلق على المرحلة الاولى مرحلة النمو و المرحلة الثانية مرحلة الانتاج حيث يلقح الوسط الغذائي في المرحلة الاولى بواسطة السبورات وبعد **3-4** أيام من النمو يفصل

المايسليوم من المزارع ويضاف الى الوسط الغذائي الجديد والخاص بالإنتاج وتستمر عملية التخمر **3-4** أيام عند درجة حرارة **25-30**مْ مع اضافة الاوكسجين للمزرعة.

3- طريقة المزارع الصلبة Solid state cultures

وتعد من الطرق البسيطة ولا تحتاج الى اجهزة ومعدات و قد نشأت هذه الطريقة في اليابان و لم تنتشر لحاجتها الى ايدي عاملة كثيرة . وتستخدم في هذه الطريقة الاوساط الغذائية الصلبة مثل نخالة الحنطة أو مخلفات البطاطا (القشور) ويمكن استخدام المخلفات الصلبة للفواكه .تفرش المادة الخام المرطبة و المعاملة بالحرارة في صواني وبسمك قليل وتلقح بسبورات فطر ***A.niger*** وتحضن على درجة حرارة **25-30**مْ لمدة **6-7** أيام حيث يتحول النشاء في تلك المادة الى سكر بواسطة انزيمات الاميليز التي يفرزها العفن ثم يتحول السكر الى حامض الستريك ويتم استخلاص الحامض بالماء بعد انتهاء فترة التخمر ثم يفصل الحامض من السائل الاستخلاص و تختلف نسبة الرطوبة في الوسط الغذائي حسب نوع المادة الخام والظروف المزرعية حيث تتراوح **50-60%** تحتوي بعض المواد مثل نخالة الحنطة وقشور البطاطا وغيرها على تراكيز عالية نسبيا من العناصر المعدنية التي تثبط انتاج حامض الستريك لذلك تم انتخاب سلالات خاصة من عفن ***A.niger*** تكون حساسيتها قليلة تجاه بعض العناصر المعدنية

الظروف المزرعية Cultural conditions

تختلف الظروف المزرعية حسب السلالة و طريقة الإنتاج. الاحتياجات الرئيسية لعملية التخمر هي مصادر الكاربون و النتروجين و الفوسفات و المغنسيوم . يتكون الوسط المثالي لإنتاج حامض الستريك من السكريات (المولاس أو السكروز أو عصير التمر) **14-15%** و مصدر نتروجين **0.25%** وفوسفات البوتاسيوم **0.1-0.15%** و كبريتات المغنسيوم **0.02-0.025%** ويختلف الـ **PH** حسب نوع الوسط الغذائي ففي حالة المولاس يكون الـ**PH 5-6** لأجل تسهيل انبات السبورات و تسهيل عملية النمو بينما يكون الـ**PH 2-3** في حالة استخدام السكروز أو الكلوكوز النقي مع الاملاح غير العضوية وعند انتهاء التخمر ينخفض الـ**PH** الى **2** او اقل . وتضاف بعض المواد التي تشجع انتاج الحامض من عفن ***A.niger*** مثل الميثانول الذي يستخدم في حالة المزارع السطحية و المغمورة و الصلبة .

ان اضافة **3-4%** ميثانول الى الوسط الانتاجي يؤدي الى تقليل المايسيليوم و يؤخر تكوين السبورات وبالتالي يزيد كمية حامض الستريك الناتجة و يعتقد ان سبب الزيادة يعود الى دور الميثانول في تكييف المايسيليوم حيث يزيد نفاذية جدارخلية المايسيليوم دون ان يضعف ميتابولزم العفن وبذالك يسمح بأفراز السترات من الخلية وتستجيب الخلية الى هذه الحالة عن طريق زيادة انتاجها من السترات من اجل ان تحافظ الخلية على مستوى كاف من السترات بداخلها . وتختلف كمية الميثانول المضافة حسب نوع الوسط الغذائي ففي حالة استخدام السكروز يكون اقصى انتاج لحامض الستريك عند اضافة **1%** ميثانول بينما في عصير التمر تكون النسبة **2%** وتختلف فترة التخمر حسب نوع السلالة و طريقة التخمر حيث تكون فترة التخمر في المزارع السطحية **7- 10** ايام بينما في المزارع المغمورة **4-5** ايام وفي المزارع الصلبة **6-7** ايام . وتتراوح حرارة الحضن بين **25-30**مْ ويؤدي ارتفاع درجة الحرارة اكثر من **30**مْ الى اسراع عملية التخمر ويحدث نمو غزير للمايسيليوم مما يسبب تاكسد كمية كبيرة من السكر و الذي يتحول الى ثاني اوكسيد الكاربون مما يقلل من كمية حامض الستريك الناتجة ويزداد انتاج حامض الاوكزاليك و الكلوكونيك على حساب حامض الستريك .

وتعد عملية التهوية و التحريك مهمة في انتاج حامض الستريك لكونها عملية تخمر هوائية لذلك تزود المزرعة بالهواء و تختلف درجة التهوية حسب نوع سلالة العفن و الوسط الغذائي وحجم جهاز التخمر. وتكون الظروف ساكنة في طريقة المزارع السطحية حيث ينتشر الاوكسجين خلال سطح السائل لان المساحة السطحية المعرضة للهواء تكون كبيرة ويحصل العفن على الاوكسجين الكافي لانتاج الستريك . ويكون الوسط الغذائي في طريقة المزارع الصلبة ذات هيئة حبيبية وذات مساحة سطحية كبيرة مما يسهل تجهيز العفن بالأوكسجين اللازم . اما في المزارع المغمورة فيتم ضخ الاوكسجين بصورة مستمرة داخل جهاز المخمر اضافة الى عملية التحريك ويقل الانتاج في حالة توقف اضافة الاوكسجين او الهواء الى المزرعة .

استخلاص حامض الستريك

ترشح المزرعة بعد انتهاء عملية التخمر ويفصل المايسيليوم ويعصر للحصول على اكبر كمية من الراشح ، ثم يسخن الراشح الى حرارة **80-90**مْ وتضاف كمية قليلة من كاربونات الكالسيوم لترسيب حامض الاوكزاليك ثم يرسب حامض الستريك على هيئة سترات الكالسيوم بعد اضافة جزء واحد من كاربونات الكالسيوم لكل جزء من الراشح على مدى ساعة وترفع درجة الحرارة الى **90**مْ . ترشح سترات الكالسيوم وتغسل عدة مرات بالماء ثم توضع في خزانات التحميض حيث يضاف حامض الكبريتيك بعد ذلك يرشح المحلول لازالة كبريتات الكالسيوم ثم يقصر الراشح الذي يحتوي على حامض الستريك بالفحم النباتي و يمررمن خلال اعمدة التبادل الايوني لتنقيته ثم يركز تحت التفريغ الى **35-40** بوميه وأخيراً تتم بلورته(حامض الستريك) الذي يحتوي على جزيئة ماء واحدة وعند ازدياد درجة حرارة التبلور عن الحد الحرج **36.6**مْ تنتج بلورات خالية من الماء