التقنية الحيوية ٢ Biotechnology2

المحاضرة ٥ Lecture 5

انتاج حامض الكلوتاميك Production of Glutamic Acid

المرحلة الرابعة – قسم علوم الاغذية

مقدمة:

يعد حامض الكلوتاميك اول حامض اميني ينتج على النطاق التجاري باستخدام التخمرات المايكروبية بسبب الطلب على ملحه كلوتامات احادية الصوديوم (Monosodium glutamate)، والذي هو مادة معجلة للنكهة (Flavor enhancer) اي انه يحسن ويقوي النكهة ويغطي على بعض النكهات غير المرغوبة مثل النكهة البقولية للبقوليات والنكهة الترابية للبطاطا. ويستخدم حامض الكلوتاميك في في تصنيع مواد كيميائية ذات تطبيقات كثيرة كما في صناعة الصابون والشامبو والمنظفات، وتستعمل مشتقاته كمواد مجلتنة في بعض الصناعات الغذائية.

ينتج حامض الكلوتاميك من قبل الفطريات والخمائر والستربتومايسز، لكن على النطاق التجاري تستخدم عدة انواع من البكتيريا في عملية الانتاج وهي :

١- جنس Corynebacterium

الانواع : *C. glutamicum , C. lillium*

٢- جنس Brevibacterium

الانواع : *B. aminogenes , B. divaricatum*

٣- جنس Arthrobacter

الانواع : *A. globiformis , A. aminofaciens*

٤- جنس Microbacterium

خاصة النوع *M. flavum*

ان هذه الاحياء متقاربة تصنيفيا وتتشابه في كثير من الصفات وتشترك مع بعضها في صفة مهمة جدا لانتاج حامض الكلوتاميك هي ضعف فعالية انزيم الفا كيتو كلوتاريت ديهايدروجينيز الذي يحول الفا كيتو كلوتاريت الى سكسنيت في دورة الحامض ثلاثي الكاربوكسيل، وهذا يعني تراكم الفا كيتو كلوتاريت وبالتالي تحوله الى حامض الكلوتاميك.

وهناك اجناس اخرى من البكتريا المنتجة لحامض الكلوتاميك هي :

Escherichia , Pseudomonas , Proteus

بالاضافة الى ذلك تستخدم عدد من الفطريات في انتاج حامض الكلوتاميك لكن بنطاق اقل مثل جنس الاسبرجلس لاسيما النوعان *A. niger* و *A. wentii* .

مسار بناء حامض الكلوتاميك:

يبنى حامض الكلوتاميك من الاضافة الاختزالية لمجموعة الامين الى حامض الفا كيتو كلوتاريك – الذي هو احد المركبات الوسطية في دورة الحامض ثلاثي الكاربوكسيل – بفعل نظام انزيمي متخصص، وعادة يمر مسار بناء حامض الكلوتاميك بالخطوات الاتية:

α- Ketoglutarate + NH4 ⟶ Glutmic acid

الانزيم المسؤول عن التفاعل هو Glutamic acid dehydrogenase

ان اغلب الاحياء تبني حامض الكلوتاميك من اندماج مجموعة امين مع حامض الكلوتاميك لاعطاء الكلوتامين ثم يتفاعل الكلوتامين مع الفا كيتوكلوتاريت لنقل مجموعة امين من الكلوتامين اليه لاعطاء جزيئتين من حامض الكلوتاميك:

Glutamic acid + NH4 ⟶ Glutamine

α-Ketoglutarate + Glutamine ⟶ 2 Glutamic acid

انواع عمليات انتاج حامض الكلوتاميك:

١- التخمر بمرحلة واحدة (Single – stage fermentation)

هناك بعض البكتريا والفطريات تمتلك المقدرة على تحويل الكلوكوز الى حامض الكلوتاميك بمرحلة واحدة، وفي هذه الكائنات تنشط بعض المسارات مثل التحلل اللاهوائي للكلوكوز (EMP) حيث يتحول الكلوكوز الى حامض البايروفيك، وينشط ايضا مسار السكريات السداسية احادية الفوسفات (HMP). وملخص هذا النوع من التخمرات هو:

Glucose ⟶ Glutamic acid

٢- التخمر بمرحلتين (Two – stage fermentation)

حيث يتم في المرحلة الاولى تحويل الكلوكوز الى حامض الفا كيتو كلوتاريك، ثم يتم تحويل هذا المركب في مرحلة ثانية الى حامض الكلوتاميك باستخدام نوع اخر من الاحياء المجهرية او باستخدام الانزيم المناسب. الكثير من الكائنات تمتلك النوع الاول من التفاعلات، لكن النوع الثاني من التفاعلات يمتلكه عدد قليل من الاحياء المجهرية. وملخص هذا النوع من التخمرات هو :

Glucose ⟶ α-ketoglutarate

α-ketoglutarate ⟶ Glutamic acid

علاقة النضوحية بانتاج حامض الكلوتاميك

هناك علاقة وثيقة بين النضوحية (Permeability) وانتاج حامض الكلوتاميك فكلما زادت النضوحية ازداد انتاج حامض الكلوتاميك وذلك لعدم تراكمه داخل الخلايا وبالتالي حدوث تثبيط لمسارات البناء.

ولغرض تحقيق زيادة معنوية في انتاج حامض الكلوتاميك ينبغي زيادة نضوحية الاغشية الخلوية عن طريق اجراء بعض المعاملات، ومن اهمها:

١- التلاعب بمستوى البايوتين في الوسط الغذائي

تحتاج الخلايا الى تراكيز عالية نسبيا من البايوتين (٥ ملغم / لتر) لغرض النمو الطبيعي، ويجب خفض هذا المستوى الى اقل من (٠,٥ ملغم / لتر) عند انتاج حامض الكلوتاميك، اذ يؤدي خفض مستوى البايوتين الى خلل في بناء الاغشية الخلوية لانه يمثل المرافق الانزيمي الذي يكون وجوده ضروريا لعمل انزيم Acetyl CoA-Carboxylase المسؤول عن الخطوة الاولى في بناء الاحماض الدهنية، وتكون النتيجة حدوث نقص في الدهون الفوسفاتية في الغشاء الخلوي واضطراب في بنية الغشاء وباتالي زيادة نضوحيته.

٢- اضافة الحوامض الدهنية المشبعة طويلة السلسلة

تؤدي اضافة الحوامض الدهنية طويلة السلسة C16 و C18 الى وسط النمو الى استخدامها من قبل البكتريا، وتقوم هذه الحوامض بتثبيط بناء الحوامض الدهنية غير المشبعة وبالتالي نقص الدهون الفوسفاتية في الغشاء وزيادة النضوحية.

٣- اضافة البنسلين او السيفالوسبورين

تضاف هذه المضادات الحيوية بتراكيز دون المستوى القاتل (٥ – ٣٠٠ وحدة دولية / مل) في وقت مبكر من طور النمو، وتؤدي هذه المركبات الى تثبيط تكوين الجدار الخلوي، لانها تعمل على منع تكوين الروابط العرضية بين سلاسل الببتيدوكلايكان المكونة لبنية الجدار الخلوي، فتنتج خلايا منتفخة ذات اشية خلوية ير متماسكة تتميز بنضوحية عالية.

٤- اضافة المواد المؤثرة في الشد السطحي

تسبب هذه المواد زيادة في النضوحية لانها تزيد من الفة الوسط للدهون الداخلة في تركيب الغشاء الخلوي، ومن الامثلة على هذه المواد Triton X-100.

العوامل المؤثرة في انتاج حامض الكلوتاميك

١- المغذيات (Nutrients)

أ. مصادر الكاربون: تستخدم مصادر الكاربون رخيصة الثمن كالمولاس والنشا في العمليات الانتاجية الكبيرة، ويستخدم الكلوكوز والسكروز والمالتوز وغيرها من السكريات، لكن يجب الانتباه الى تركيز البايوتين في وسط التخمر لما له من علاقة وثيقة مع النضوحية، فاذا كان تركيز البايوتين عاليا في الوسط وجب اضافة البنسلين او الحوامض الدهنية المشبعة او مركبات توين لاسيما Tween 80 لغرض زيادة

نضوحية الاغشية الخلوية، ويمكن استخدام الخلات والالكينات والايثانول كمصادر للكاربون في عملية انتاج حامض الكلوتاميك اعتمادا على نوع الكائن المجهري المستخدم في الانتاج.

ب. مصادر النتروجين: تستخدم املاح الامونيوم بصورة عامة بتراكيز قليلة، ويمكن استعمال الامونيا بشكل سائل اذ تعمل الامونيا كمصدر للنتروجين وكذلك لمعادلة الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر، ويمكن استعمال اليوريا مع عدد كبير من السلالات، وذلك لان معظم السلالات التجارية تمتلك انزيم اليوريز.

ج. متطلبات اخرى: تحتاج عملية تخمر حامض الكلوتاميك الى اضافة بعض عوامل النمو مثل الثايمين والسيستين، ويجب ملاحظة تركيز البايوتين حسب مرحلة الانتاج بحيث يكون بادنى تركيز ممكن خلال طور الانتاج الفعلي.

٢- الاوكسجين

يجب توفير الاوكسجين عن طريق التهوية الجيدة لان الاحياء المجهرية المستخدمة في انتاج حامض الكلوتاميك هي احياء هوائية، ويتم توفير الاوكسجين اما بتجهيز المخمر باداة مزج وتقليب او بضخ الهواء المعقم داخل وسط التخمر.

٣- درجة الحرارة

عادة يتم بدء التخمر في درجة حرارة ٣٢ – ٣٣ م ثم يتم زيادتها بعد ١٤ ساعة لتصل الى حوالي ٣٨ م ، ويعود ذلك الى متطلبات كل طور من اطوار النمو، اذ ان طور التطبع وبداية الطور اللوغارتمي لاتكون فيه الحاجة كبيرة لزيادة درجة الحرارة، اما في منتصف الطور اللوغارتمي وهو وقت الانتاج فان زيادة درجة الحرارة تكون ضرورية للحصول على زيادة معنوية في الكمية المنتجة.

٤- الرقم الهيدروجيني (pH)

ان افضل رقم هيدروجيني لانتاج الاحماض الامينية بصورة عامة هو مابين ٧ و ٨ ، وفي انتاج حامض الكلوتاميك يفضل هذا المدى من الارقام الهيدروجينية، وعادة ينخفض الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر باستمرار بسبب انتاج الحوامض لذلك يجب رفع الرقم الهيدروجيني عن طريق اضافة الامونيا.

٥- نسبة اللقاح

يستخدم اللقاح المحضر من مزرعة خزينة (Stock culture) بنسبة ٦% من وسط التخمر، وهذه النسبة تعتمد على عدة عوامل اهمها نوع الكائن المجهري المستخدم في الانتاج.

٦- مدة التخمر

تبلغ مدة التخمر مابين ٣٠ الى ٣٥ ساعة، ويؤدي استمرار العمل بعد هذه المدة الى انتاج مركبات الايض الثانوي التي تعمل على اعاقة عمليات الاستخلاص والتنقية اللاحقة.

الاستخلاص والتنقية

تبدأ خطوات استخلاص حامض الكلوتاميك من وسط الانتاج باجراء الترشيح او النبذ المركزي لاستبعاد الخلايا، وعادة يتم اضافة هيدروكسيد الصوديوم لتحويل الحامض الى ملح كلوتامات احادية الصوديوم (MSG). يلي ذلك خطوات التركيز ثم التجفيف تحت التفريغ للحصول على المنتج المطلوب.

اما عملية تنقية حامض الكلوتاميك فتتكون من سلسلة من الخطوات قد يكون من ضمنها استعمال كروماتوغرافيا التبادل الايوني بهدف الحصول على الحامض باعلى درجة من النقاوة.

المصادر

١- الخفاجي زهرة محمود. (١٩٩٠). التقنية الحيوية. مطابع جامعة الموصل، العراق.

٢- العاني، فائز. (١٩٩٥). التكنولوجيا الحيوية. مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، بغداد، العراق.

٣- Kinoshita,S. (1986). Microbial Production of Glutamic Acid. Elsevier Applied Publishers, NY., USA.

٤- الحديثي، حسين جاسم. (٢٠٠٤). انتاج حامض الكلوتاميك من بكتريا Corynebacterium glutamicum HM16 المعزولة محليا. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد.