كلية العلوم

القسم : علم الحياة

السنة : الثالثة

المادة : الانزيمات

المحاضرة : التاسعة/نظري/

{{ مكتبة A to Z }}

Facebook Group : مكتبة A to Z

كلية العلوم ، كلية الصيدلة ، الهندسة التقنية ، تكنولوجيا المعلومات والاتصالات

يمكنكم طلب المحاضرات برسالة نصية (SMS) أو عبر (What's app-Telegram) على الرقم 0931497960

Production of Food Additives Using Filamentous Fungi

Carsten M. Hjort

انتاج المضافات الغذائية عن طريق الفطريات الخيطية

4. 1: الفطريات الخيطية في إنتاج الأغذية

تعد الفطريات من الكائنات الحية الدقيقة حقيقية النواة التي تم استخدامها كأطعمة أو لتصنيع المواد الغذائية لأكثر من ألف سنة. وتشتمل المملكة الفطرية على الخمائر وحيدة الخلية والفطريات الخيطية التي تعد من الكائنات المتعددة الخلايا التي تنتظم خلاياها في سلاسل تعرف بالهيفات. ويمكن للهيفات التشعب (التفرع) بدرجات مختلفة. بعض الفطريات تأخذ الطرازين المختلفين للنمو (dimorphic)، وهذا يعني أنها قد تنمو على كلا الصورتين وحيدة الخلية والخيطية.

وقد استخدمت الخمائر على نطاق واسع لإنتاج الغذاء. فالـ *Saccharomyces cerevisiae* والتى تعرف بخميرة الخباز تستخدم في في صناعة وتجهيز المخبوزات، والعديد من عمليات التخمر الأخرى، وصناعة النبيذ. وفي كل هذه التطبيقات تعد القدرة على تخمر الجلوكوز إلى الايثانول وثاني أكسيد الكربون الخاصية الرئيسية للخميرة.

منذ ظهور تكنولوجيا الإنتاج معاد الصياغة، استخدمت مجموعة متنوعة من الخمائر لانتاج الانزيمات وبعض نواتج التمثيل الغذائي. وقد تم تطوير نظم للتعبير معادة الصياغة ملاءمة للانتاج على نطاق واسع للعديد من الخمائر مثل لـ *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pompe, Pichia pastoris, Pichia methanolica, Hansenula polymorpha, Klyveromyces lactis, Yarrowia lipolytica* وغيرها من الأنواع [1، 2]. ولانتاج الانزيمات الغذائية, تستخدم الفطريات الخيطية على نطاق أوسع بكثير من استخدام الخمائر.

وقد استخدمت الفطريات الخيطية في إنتاج الأغذية لفترة طويلة جدا. وأحيانا يستخدم الفطر نفسه كطعام. ويعد فطر عيش الغراب (*Agaricus bisporus*) المعروف بالمشروم أحد الأمثلة على ذلك؛ وفي الآونة الأخيرة تم تطوير الفطر الأسكى *Fusarium venenatum* كمصدر غذائى للخلية وحيدة البروتين (single-cell protein food source) والذى يسوق تحت أسم "Quorn"من قبل شركة مارلو (Marlow) للأطعمة [3]. أحيانا تمثل الفطريات أحد العناصر في الغذاء، على سبيل المثال في الجبن، حيث تمثل مجموعة متنوعة من أنواع البنسليوم (e.g. *P. roqueforti* and *P. camemberti*) جزء من الجبن المنتج. وأقدم الأمثلة على استخدام الفطريات الخيطية في إنتاج الأغذية كان استخدامها لإجراء عمليات التخمير للمواد الغذائية. وفي اليابان أستخدمت فطريات الـ *Aspergillus oryzae* (الشكل 4.1)، والـ *Aspergillus sake* والأنواع الأخرى ذات الصلة لتخمير الساكي والشيو والميسو. في هذه العمليات تقوم الفطريات بتخمير السكر إلى كحول، ولكن بنفس القدر من الأهمية تفرز الفطريات بعض الانزيمات مثل البروتييزات والأميليزات (proteases and amylases) والتى تقوم بتحويل المادة الخام إلى المنتج المطلوب. ولقد تم الاعتراف بقدرة المعقد الانزيمى الذى ينتجه فطر الـ *Aspergillus oryzae* في صناعة الأغذية في أواخر القرن التاسع عشر. في 1894 بدأ رائد الانزيمات اليابانى الأمريكى Jockichi Takamine- في مصنع صغير في شيكاغو- صناعة المعقد الانزيمى من فطر الـ *Aspergillus oryzae* والذى تم تسويقه تحت الاسم التجاري Takadiastase [4] في وقت لاحق، وفي الخمسينات، تم تطوير وأستخدام التخمرات المغمورة في الصناعة في الولايات المتحدة. وقد تم تطوير الـ *Aspergillus oryzae* لانتاج مجموعة مختلفة من المنتجات الانزيمية من خلال عملية التخمير المغمورة، مع التركيز على الـ proteases and amylases . والأنواع الأخرى من الـ *Aspergillus*، على سبيل المثال الـ black Aspergilli, *Aspergillus niger, Aspergillus awamori, Aspergillus fetidus, Aspergillus aculeatus,* and *Aspergillus japonicas* كانت تستخدم أيضا وذلك بصورة أساسية لانتاج انزيم الجلوكوأميليز [5]

وكان هذا الانزيم الأساس لثورة الإنزيمات في صناعة النشا. تقليديا، كان يتم تحلل النشا إلى جلوكوز باستخدام حمض الهيدروكلوريك، ثم إجراء عملية التعادل. خلال هذه العملية، كان يتم تكون العديد من المنتجات الثانوية وينتج كميات كبيرة من الاملاح أثناء هذه الخطوة. وعن طريق إدخال التحلل لأنزيمي تم تفادي النواتج الثانوية مما أدى إلى الحصول على نواتج ذات نوعية أفضل مع خفض سعر التكلفة.

كما تم أستخدام الـ *Aspergillus niger* لإنتاج كميات كبيرة من مركبات الأيض الأولية، على سبيل المثال حامض الستريك [5]. وكذلك تم تطوير عملية التخمير لانتاج الانزيمات وبعض نواتج التمثيل الغذائي. وتم أيضا إنتاج سلالات محسنة بشكل كبير من خلال المطفرات باستخدام المواد الكيميائية أو الأشعة ثم الفحص والانتخاب.

وعلى الرغم من تحقيق تحسينات كبيرة عن طريق التحسين الكلاسيكي للسلالات وضبط الظروف المثلى لعمليات التخمير، إلا أن تكنولوجيا الحمض النووي معاد الصياغة أحدثت ثورة في انتاج الانزيمات الميكروبية. ويوجد أسباب كثيرة لذلك. أولاً، من الممكن انتاج الانزيمات المعزولة من أي كائن حي تقريبا بكمية جيدة بنظام تعبير مطور وآمن بدرجة عالية. وقد أدى تراكم الدراسات الخاصة بالسمية والسلامة للوصول إلى منتجات بهذه النظم مع التوثيق الجيد لسلامة هذه المنتجات. وبهذه الطريقة يمكن إنتاج العديد من المنتجات الانزيمية المختلفة من خلال نفس عملية الإنتاج. ثانيا، يمكن تعديل الكائن المضيف (الكائن الحي الذي يتم إدخال الحمض النووي الخارجي إليه) ليتناسب مع مواصفات الجودة للانزيم المنتج. هذه التعديلات تشمل إزالة النشاط أو الانشطة الجانبى الغير مرغوب فيها، مما يؤدى إلى نقاء المنتج وهذا لا يمكن أن يتحقق عن طريق استخدام الأساليب الاخرى. ويمكن أيضا أن زيادة ناتج التخمير من الانزيمات، في كثير من الأحيان الى عدة أضعاف، بالمقارنة مع الناتج الذى يمكن الحصول عليها من الكائن الحي المعطى. وأخيرا، يمكن عن طريق استخدام تكنولوجيا الحمض النووي معاد الصياغة أن تنتج الانزيمات المهندسة وراثيا. وهذه الانزيمات المهندسة وراثيا عبارة عن مجموعة من الانزيمات تتراوح من الإنزيمات التي يتم استبدال واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية بها بواحد أو أكثر من الأحماض الأمينية الأخرى إلى الانزيمات الهجينة التي يتم إنتاجها بدمج جينين أو أكثر من الجينات المسئولة عن إنتاج الإنزيمات. بواسطة الهندسة الوراثية، وبالتالى يمكن الحصول على إنزيمات ذات خصائص محسنة بشكل كبير.

في فجر عصر الإنتاج معاد الصياغة، كان اختيار نظام التعبير واحد من أولى وأهم الخيارات التي كان لا بد من إنجازها. والخبرة الموسعة على الـ Aspergilli جعلتها من العوائل المضيفة المرشحة للاستخدام. حيث عرف عنها القدرة على إنتاج كميات كبيرة من البروتين خارج الخلية. مما يجعلها مناسبة للإنتاج في البيئات السائلة في تنكات من الفولاذ الذى لا يصدأ, وقد تم انتخاب الطفرات التى تتميز بقدرة أفضل على التكييف مع هذه البيئات. بسبب الاستخدام الطويل للـ *Aspergillus oryzae* [6] والـ *Aspergillus niger* [7] ككائنات حية لانتاج الانزيمات الغذائية، قد تم الاعتراف بآمان هذه المنتجات حيث يشار إليها بالـ GRAS (generally regarded as safe) لعدة سنوات من قبل ادارة الاغذية والعقاقير FDA.

على الرغم من أن أنواع الاسبرجلس مثل الـ *Aspergillus oryzae* [8]، والـ *Aspergillus niger*, and *Aspergillus awamori* [9] هي السائدة في انتاج الانزيمات، قد تم تطوير نظم فطرية أخرى لانتاج الانزيمات. وتعد الترايكوديرما *Trichoderma reesei* a.k.a. *Trichoderma longibrachiatum* من الفطريات التى تهدم الأخشاب والتي جذبت الانتباه أولا بسبب قدرتها على انتاج كميات ضخمة من السليوليزات والهميسليوليزات. ولقد ثبت أن الـ *T. reesei* مناسبة للتخمير وتم تطويرالعديد من نظم التعبير المعتمدة عليها [10].

ولقد تم مؤخراً تطوير نظام جديد للتعبير في فطر الفيوزاريوم (the *Fusarium venenatum* expression system) [11]. ويستخدم الفيوزاريوم *Fusarium venenatum* لإنتاج البروتين وحيد الخلية، على النحو المذكور أعلاه. واحد الخصائص الأساسية لهذا الفطر هى مناسبته الجيدة للتخمرات المغمورة. فمن السهل التهوية كنتيجة لخصائصه الريولوجية. واستخدام الفطر كغذاء شكل أساسا لوضع تاريخ الاستخدام الآمن.

تكنولوجيا الحمض النووي معاد الصياغة قد استخدمت كأداة لتحسين نظم انتاج الانزيمات. وقد أقترح التعامل مع عمليات التمثيل الغذائي للفطر لزيادة نواتج عمليات الأيض المطلوبة، كحامض الستريك سبيل المثال [12]، وللقضاء على نواتج الأيض غير المرغوب فيها، كحمض الأكساليك على سبيل المثال [13]، أو للتمكين من إنتاج بعض مركبات الأيض الغريبة عن الفطر، كالأستازانثين (astaxanthin) على سبيل المثال [14]. ويشار إلى مثل هذا النوع من التغيير في عملية التمثيل الغذائي بالهندسة الأيضية.

4. 2: المضافات لصناعة الأغذية

يستخدم في صناعة المواد الغذائية بعض المواد المضافة ذات المنشأ الميكروبى لأغراض عديدة مختلفة. اليوم، تعد الانزيمات أفضل مثال على ذلك والتى تنتج باستخدام الكائنات الدقيقة المعدلة وراثيا (GMMs) والتى تستخدم لإنتاج الغذاء. وقد استخدمت الانزيمات في صناعة المواد الغذائية لآلاف السنين. فالكيموسين (Chymosin) المعزول من العجول قد استخدم في صناعة الجبن، والأميليزات (amylases) المنتجة من الشعير استخدمت في عمليات التخمر (brewing)، واستخدمت الأميليزات amylases والبكتينيزات pectinases التي تنتج من العنب في صنع النبيذ، وهذه مجرد ثلاثة أمثلة فقط. الاستخدام المحدد للإنزيمات الميكروبية هو تطور أكثر حداثة والانزيمات المنتجة بفعل الكائنات الدقيقة المعدلة وراثياً (GMMs) لم يتم إستخدامها في صناعة المواد الغذائية حتى أواخر الثمانينات. اعتمادا على البلد الذي يتم فيه استخدام الإنزيمات، تصنف الإنزيمات على أنها مضافات غذائية أو مساعدات في عمليات تجهيز الأغذية.

تستخدم صناعة النشا الكميات الأكبر من الأنزيمات من حيث الحجم. وتستخدم Alfa amylases والـ amyloglycosidase لتحويل النشا إلى جلوكوز. وجزءا من شراب الجلوكوز الناتج يتم معالجتة بعد ذلك باستخدام الـ glucose isomerase لتحويل الجلوكوز إلى فركتوز لإنتاج شراب الذرة عالي الفركتوز. ويستخدم الـ amylases and xylanases في صناعة الخبز لتحسين جودة الخبز من خلال إعطائه زيادة في الحجم وإنتفاخ أفضل وعمر أطول. وفي الآونة الأخيرة أدخل الليبيز في صناعة الخبز للمساعدة في تكوين الـ emulsifiers. وفي صناعة الألبان, تم أمداد الكيموسين المستخرج من العجول لإنتاج الجبن بالبروتييزات ذات المنشأ الميكروبي. والكيموسين المنتج بواسط الـ recombinant *Aspergillus niger* أصبح أيضا من المنتجات الهامة جدا. تستخدم بعض الإنزيمات الأخرى من غير البروتييزات المستخلصة من المجترات في صناعة الألبان. على سبيل المثال، يتم استخدام اللاكتيز لتحلل اللاكتوز. وهذا اللاكتيز الميكروبى ذو فائدة هامة بالنسبة للأشخاص الذين يعانون من عدم تحمل اللاكتوز. وتستخدم الـ amylases الميكروبية في صناعة الخمور لتحسين قوة وكفاءة عملية الهرس. كما تم تطوير بعض الإنزيمات لإزالة مركب الدى أستيل diacetyl ذو الطعم السيئ من البيرة. وحيث أنه ينظر إلى البيرة من قبل العديد على أنها من المنتجات التقليدية للغاية، فان العديد من البلدان تنظم بدقة أنواع المضافات التي يمكن استخدامها في عملية التخمر. صناعة النبيذ تعد مثال آخر على الصناعات المحافظة التي تغلغلت الإنزيمات الميكروبية فيها ببطيء. هذا ينطبق بشكل خاص على الانزيمات التي تنتجها الكائنات الدقيقة المعدلة وراثيا. تستخدم البكتينيزات (Pectinases) لزيادة الناتج من العصير أثناء الهرس. ويستخدم الـ Betaglucanases لإزالة الضباب الناجم عن نمو الـ *Botrytis* على العنب. ومن أغرب الانزيمات استخداما في هذه الصناعة أنزيم الـ laccases والذى يستخدم للحفاظ على سدادات الفلين، ولمنع خروج نكهة الفلين في الخمور الناتجة.

4. 3: تصميم الكائنات الدقيقة المعدلة وراثيا لإنتاج المضافات الغذائية والمساعدة في المعالجة:

تعد الانزيمات المنتجة بفعل الكائنات الدقيقة المعدلة وراثيا من أهم الأمثلة على المضافات الغذائية والمواد المساعدة في عمليات تجهيز الأغذية، لذلك في هذا القسم سوف يتم إعطاء وصفا شاملا لتطوير السلالات المضيفة وناقلات التعبير المستخدمة في انتاج الانزيمات. وأيضا سوف يتم إعطاء وصفا موجزا عن أدوات إنتاج بعض مركبات الأيض.

كما سبق ذكره، يعد الـ *Aspergillus oryzae* أحد الفطريات الخيطية الهامة المستخدمة لإنتاج الانزيمات معادة الصياغة (recombinant production of enzymes) . وقد تم اختيار الـ *Aspergillus*

oryzae كسلالة مضيفة بسبب التاريخ الآمن للمنتجات المستخدمة، وذلك بسبب الخبرة المكتسبة بالفعل جراء استخدام هذا الكائن للإنتاج، وكذلك نظرا للانتاج الضخم للبروتين من هذه الكائنات الحية الدقيقة.

- إنتاج الـ amylases and proteases , بصفة خاصة, من هذه الفطريات له عيوب رئيسية. هناك شرطين أساسيين عند إنتاج الأنزيمات هما نقاء المنتج وثباته. عند انتاج انزيم معين (باستخدام هذا الفطر) يعد وجود الـ amylases غير مرغوب فيه، حيث تعتبر هذه البروتينات (amylases) في هذه الحالة نوع من التلوث كما أن نشاط هذه الانزيمات (amylases) قد يعطي بعض التفاعلات الجانبية الغير مرغوبه. ووجود البروتييز الخاص بالسلالة المضيف أيضا غير مرغوب فيه، لأن هذه البروتييز لا يعد فقط مجرد بروتين مُلوث، بل قد يكون له تأثير سلبي كبير على ثبات الأنزيم المستهدف الناتج. هذه الأنشطة الانزيمية الغير مرغوب فيها قد تم إزالتها إلى حد كبير جدا وأهم أداة لذلك هو تعطيل الجينات (Gene disruption) [15] المسئولة عن إنتاجها. كما تم استخدام تعطيل الجينات على نطاق واسع لتحسين نظم التعبير في الـ *Aspergillus niger*, *Trichoderme reesei*, and *Fusarium venenatum* . وتتلخص الخطوات الأساسية لتعطيل عمل أحد الجينات في:

1- أستنساخ (Cloning) الجين المراد تعطيل عمله بالاضافة إلى حوالى 1-2 كيلو قاعدة من كلا التتابعات المحيطة به (السابقة واللاحقة) أي حوالى 1000-2000 زوج من القواعد السابقة للتابع الشفرى و 1000-2000 زوج من القواعد التالية لهذا التتابع المستهدف).

2- أستبدال التتابع الشفري جزئياً أو كليا بأحد الواسمات الانتخابية للحصول على البلازميد الخاص بالتعطيل الجينى (gene-disruption plasmid) .

3- قطع البلازميد بأحد أنزيمات القطع المحدد المناسبة لجعله في صورة طولية ثم نقله إلى الفطر العائل.

4- أنتخاب المتحولات الوراثية من خلال النظام الانتخابى المناسب للبلازميد المستخدم ثم فحص المتحولات الوراثية للوصول إلى الطراز التزاوجى المطلوب. ويلخص الشكل التوضيحى 4. 2. طريقة الـ gene-disruption .

- يعتبر الواسم *pyrG* (orotidine-5`-phosphate decarboxylase) المبين في المثال السابق إحد الواسمات الخاصة بالعوز الغذائى والذي يستخدم على نطاق واسع مع فطر الـ *Aspergillus oryzae* ومع بعض فطريات الاسبرجلس الأخرى لعمل تعطيل للجينات (gene disruption) [16]. وهو أحد جينات التخليق الحيوى المشتركة في المسار التخليقى للبيرميدين. ويقتضي ذلك أن تكون السلالة التى سيتم تحويلها وراثيا سالبة بالنسبة لهذا الجين (*pyrG* negative) . ويتميز هذا الواسم بأنه ثنائي الاتجاه، حيث يمكن الانتخاب لوجوده أو غيابه على حد سواء. ويتم الانتخاب لوجود هذا الواسم (*pyrG*) ببساطة عن طريق إجراء التحويل الوراثى لسلالة *pyrG* ثم الانتخاب على بيئة الحد الأدنى (Minimal Medium) للنموات ذاتية الاغتذاء (Prototrophy) للبيرميدين (فقط الخلايا التى تحتوى على الجين *pyrG* في حالة سليمة هى التى يمكنها النمو على البيئات من هذا النوع). ويمكن الانتخاب لغياب هذا الجين *pyrG* بواسطة النمو على بيئة الحد الادنى المحتوية على اليوريدين إلى جانب المركب الـ 5-fluoroorotic acid . وإضافة اليوريدين تمكن الخلايا من النمو دون الحاجة للجين *pyrG* ويعمل المركب 5-fluoroorotic acid على الانتخاب المضاد لهذا الجين *pyrG* حيث يتحول هذا المركب (5-fluoroorotic acid) إلى مادة سامة بواسطة الخلايا التى تحتوى على الجين *pyrG* في صورة وظيفية فعالة.

ويعد الانتخاب ثنائي الاتجاه للجين *pyrG* أداة مريحة للغاية لإحداث تعطيل لعدد كبير من الجينات. يتم بناء البلازميد الخاص بتعطيل أحد الجينات المستهدفة (disruption plasmid) ثم يتم عزل الطفرات السالبة للـ *pyrG* (*pyrG* negative mutant) للسلالة المضيف باستخدام حامض الـ 5-fluoroorotic . ويتم التأكد من السلالات المحولة وراثيا ذات الطرز الوراثى المطلوب من خلال التحليل بالاستعانة بالـ Southern blot. ويمكن بعد ذلك أن يتم الانتخاب المضاد للـ *pyrG* [17]، وتصبح السلالة الناتجة جاهزة بعد ذلك لجولة جديدة من الـ gene disruption باستخدام أي من البلازميدات الخاصة بتعطيل أي من الجينات الأخرى.

وهناك بعض الواسمات الانتخابية الأخرى ثنائية الاتجاه، على سبيل المثال الـ *niaD* (nitrate reductase) system [18]، إلا أن الـ *pyrG* system هو الأكثر تطبيقاً.

ويتضح من الشكل 4. 2 أن عملية تعطيل الجينات تؤدي إلى تغييرات كبيرة في تسلسل الحمض النووي في الموقع المستهدف. هذه التغييرات غير رجعية، بمعني أنها سوف تكون موجودة في جميع السلالات التى ستنتج فيما بعد من تلك السلالة. وسوف تكون أيضا موجودة في المتحولات الوراثية (transformants) المحولة بأحد الجينات الخاصة والمكونة للسلالة المعدلة وراثيا GMM المستخدمة في الإنتاج. وبالتالي يعد موضع التعطيل الجينى (gene disruption locus) الهدف المحدد لتحليل الحمض النووي في الـ GMM الناتجة. وبهذه الطريقة قد يتم الكشف عن السلالات المضيفة المحتوية على الـ DNA معاد الصياغة، ولكن إذا تم استخدام هذه السلالة المضيفة لإنتاج المزيد من المنتجات، فإنه لا يمكن الكشف عن منتج معين في الـ GMM

عن طريق استخدام التعطيل الجينى قد أمكن تعطيل العديد من جينات الـ amylase, glycoamylase, and protease في سلالات الـ *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus awamori* . وقد استخدمت تقنية مشابهة لتعطيل جينات السليلوز في الـ *Trichoderma reesei* والمسارات الأيضية في الـ *Fusarium venenatum* [19]، والـ *Aspergillus niger* [13]. بدلا من تعطيل الجينات الفردية كلا على حده فانه من الممكن أيضا تعطيل المنشطات العامة (global activators) التي تنظم التعبير الجينى لفئات كاملة من الانزيمات. على سبيل المثال، في فطر الـ *Aspergillus niger* يوجد منظم عام للبروتييز (general protease regulator) ينشط تعبير مجموعة من البروتييزات الخارجية الاخرى. وعن طريق تعطيل هذا الجين فقط يمكن إسكات كل من هذه الجينات الخاصة بإنتاج هذه البروتييزات الأخرى [20]

أن تطوير السلالة المضيفة مهم جدا لكفاءة نظام التعبير وجودة المنتج النهائي، وتحسين السلالة المضيفة يولد تتابعات يمكن تتبعها (sequence tags) في الـ GMM النهائية تكون مناسبة للتحليل. ويعد الناقل التعبيرى (expression vector) أحد الـ Tags الأخرى في الـ GMM الناتجة، وهذا الناقل التعبيرى عادة يكون مخصص للمنتج الذي ينبغي التعبير عنه، وبالتالي يعد هدفا طبيعيا للتحليل عند تحليل المنتج المستهدف.

ناقلات التعبير بصفة عامة تتألف من العناصر التالية:

1- الجين الذى يشفر إلى المركب المراد إنتاجه
2- البروموتور الذى يقود تعبير الجين المستهدف ويمكن أن يكون هذا البروموتورز أحد البروموتورز المطورة لنظام تعبيرى أو قد يكون متخصص فقط للجين المستهدف (عادة يكون لكل جين مستهدف البروموتور الخاص به)
3- ترمينيتور لإنهاء عملية الترجمة (translational terminator) وهو أيضا قد يكون مطورة لنظام تعبيرى أو قد يكون متخصص فقط للجين المستهدف (عادة يكون لكل جين مستهدف الترمينيتور الخاص به)
4- ماركر انتخابى لإنتخاب العائل الذى يحتوى على التعبير المرغوب.
5- بعض العوامل الاضافية في الناقل (additional vector elements) والتى تستخدم لبناء هذا الناقل على سبيل المثال ماركر إنتخابى مناسب لـ *E. coli* ومنشأ للتناسخ أيضا في الـ *E. coli*.

يتم نقل الناقل التعبيرى إلى الخلاية الفطرية المضيفة حيث يحدث له إندماج في أحد كروموسومات هذه الخلية المضيفة عادة في عدة نسخ جنبا إلى جنب في واحدة مكان بالاندماج المتتالى [21، 22]. ويوضح الشكل 4. 3. الاندماج الأمثل لنسختين فقط.

وعادة ما يتم بناء الناقلات التعبيرية في بكتريا القولون (*Escherichia coli*)، والعناصر اللازمة لذلك غالبا ما تكون موجودة في ناقلات التعبير النهائية. ومن أكثر الواسمات استخداما في الانتخاب فى الـ *E. coli* جين البيتا لاكتاميز (beta lactamase gene) والذى يعطى المقاومة لمركبات البنسلين مثل الأمبيسلين. أهتمام وقلق العامة إزاء انتشار جينات مقاومة المضادات الحيوية لفت الانتباه إلى هذا الجزء من الناقل التعبيري على الرغم من عدم

العثور على أي من هذه الجينات المسئولة عن المقاومة والمستخدمة في انتاج الـ GMMs في الطبيعة، حتى عندما تم النشر بكميات كبيرة في الحقول المجاورة [23]. ولذا فقد تم استبدال جينات المضادات الحيوية بواسطة جينات أخرى مثل جينات العوز الغذائي من قبل معظم منتجي الانزيمات، وغالبا ما يتم إزالة الجزء الخاص ببكتريا القولون تماما من ناقلات التعبير قبل نقلها إلى السلالة المضيفة.

أن الواسم الانتخابى المستخدم للانتخاب في الفطريات مهم جدا، حيث أن الأنواع المختلفة من الواسمات تتباين من حيث عدد النسخ المندمجة في ناقلات التعبير. يستخدم أحيانا الجين *pyrG* لانتخاب الناقل التعبيرى، عادة عندما تكون الاستراتيجية المستهدفة هى إدخال الجينات الهجينة في موضع معين. ويمكن أن يكون هذا الموضع موضع الـ amyloglycosidaseفي فطر الـ *Aspergillus awamori* . ويمكن أيضا أن يستخدم الواسم *pyrG* عندما تكون الاستراتيجية المستخدمة تستهدف إزالة هذا الواسم من خلال الاتحادات الوراثية الجديدة في خطوة لاحقة لخطوة التحول، بطريقة مماثلة الى حد كبير جدا للطريقة المستخدمة لتعطيل الجينات [24]. والعيب في هذه الاستراتيجيات هو أنه عادة ما تندمج نسخة واحدة فقط من الناقل التعبيرى في الجينوم، مما يؤدى إلى إنخفاض الإنتاج للناتج المستهدف.

والجين *amdS* (acetamidase) الخاص بفطر الـ *Aspergillus nidulans* [25] غالبا ما يستخدم كماركر انتخابى في أنواع الاسبرجلس وحتى في غيرها من الفطريات. ويعتمد الانتخاب على أن هذا الجين (acetamide gene) يمكن الخلايا المحولة وراثيا من التحلل المائى للأسيتاميد، وخلال هذا التحول تستخدام الأمونيوم المتكونة كمصدر وحيد للنيتروجين أو الخلات المتكونة كمصدر وحيد للكربون. وميزة هذا الواسم هي الحصول عليه في كل من الـ *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* بأعداد عالية من النسخ، وبالتالى يمكن الحصول على نواتج عمليات التخمر بكميات عالية الإنتاج.

ويعد اختيار البروموتور من الامور الحاسمة بالنسبة لكمية المنتج المستهدف وهو يمثل أحد أهم العناصر التى تم دراستها وتطويرها على نطاق واسع. للتعبير في أنواع الاسبرجلس يعد بروموتور الأميليز الاختيار الطبيعي كنقاط بداية لتطوير البروموتور. وهناك أنواع قوية جدا من البروموتورز والتى يمكن تنظيم عملها في الإنتاج، حيث أنه يمكن تفعيلها باستخدام النشا والملتودكسترين (maltodextrins) والملتوز. واحد سلبياتها هو أنها، تثبط هدم الكربون (carbon-catabolite-repressed) مما يضع قيود على الانتاج. لتجنب انخفاض الإنتاجية، يجب أن يكون معدل التغذية أثناء أستمرار عملية التخمر تحت السيطرة بعناية. وينظم بروموتور الأميليز في أنواع الاسبراجلس بالطريقة نفسها، وثبت أنه يُفعل من قبل نفس المنشط [26].

ويعتبر الـ TAKA amylase أحد جينات الأميليز التى يتم التعبير عنها بصورة جيدة في الـ *Aspergillus oryzae*، وبالتالي فإنه يمثل أحد أكثر البروموتورز استخداما على نطاق واسع [8]. وبروموتور الأميليز الطبيعى في الـ *Aspergillus niger* مشابه إلى حد كبير للـ TAKA promoter الخاص بالـ *Aspergillus oryzae* وبالتالى فهو أيضا يستخدم على نطاق واسع [27]. ويشترك هاذين البروموتورين في درجة كافية من التشابه النيكلوتيدى مما يساعد في وضع طرق تحليلية من شأنها الكشف عليهما على حد سواء.

وبروموتور الأميلوجلوكوسيديز (amyloglycosidase) الخاص بالـ *Aspergillus niger or Aspergillus awamori* لهما نفس درجة القوة. وتتابعهما بعيد تماما عن تتابع الـ TAKA وبروموتور الأميليز الطبيعي ولكن عملهما ينظم بنفس المنشط. وبروموتر الـ amyloglycosidase يستخدم أيضاً على نطاق واسع [9].

اختيار الـ terminator ليس بالصورة الحاسمة كاختيار البروموتور. في الاسبرجلس يستخدم على نطاق واسع الـ amyloglycosidase terminator المأخوذ من الـ *Aspegillus niger* [8].

الناقلات التعبيرية للـ *Trichoderma reesei* تختلف نوعا ما عن ناقلات التعبير في أنواع الاسبرجلس. ومن أكثر البروموتورز أستخداما الـ cellobiohydrolase I promoter أو بدائل منه [28]. هذا البروموتر، مثل الـ sophorose ، يتم تفعيله بواسطة السليلوز وأيضا باى من مصادر الكربون الأكثر توافرا. وهذا البروموتر يعد

أيضاً من الـ carbon-catabolite-repressed، وتم وصف بدائل من هذا البروموتور تم إزالة الموقع *creA* المثبط لهدم الكربون منها [29].

وتستخدم العديد من الواسمات المختلفة في الانتخاب في التريكودرما. وغالبا ما تسود الواسمات الانتخابية المقاومة للعقاقير، على سبيل المثال المقاومة للهيجروميسين أو البليوميسين.

وتم أيضا تطوير مجموعة متنوعة من النظم في الخميرة لانتاج الانزيمات، على سبيل المثال الـ *Klyveromyces lactis, Hansenula polymorpha,* and *Pichia pastoris*، (30) . وأحد أهم الاختلافات بين نظم الخميرة والفطريات الخيطية هو أن معظم الخمائر تحتوى على البلازميدات ذاتية التناسخ، أي أنه ليس بالضرورة حدوث اندماج للحمض النووي المنقول في جينوم السلالة المضيفة. الثبات الوراثى الناتج عن أستخدام البلازميدات التى تتناسخ ذاتياً عادة يكون أقل بكثير من أن الثبات في حالة الاندماج في كروموسومات العائل المضيف. ولذا يفضل الناقلات التعبيرية التى تندمج في جينوم العائل في الخمائر أيضا. وتم تطوير السلالات المضيفة بلطريقة مشابهة الى حد كبير لتلك المستخدمة مع الفطريات الخيطية. ويتم إزالة البروتيز، بصفة خاصة، عن طريق التعطيل الجينى. والـ methylotrophic yeasts مثل الـ *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* تنتج كميات كبيرة من جينات أستخدام الكحول عند التفعيل بالميثانول. وتم تعطيل كل أو بعض هذه الجينات في بعض السلالات المضيفة، أو يتم دمج البلازميد التعبيرى في أحد هذه الجينات عند الحصول على الـ GMMالنهائي، وبالتالي تعطيل الجين.

البروموتورز التى تستخد لقيادة التعبير في الـ methylotrophic yeasts عادة عبارة عن البروموتورز المأخوذة من جينات استخدام الكحول، على سبيل المثال alcohol oxidase 1 or formate dehydrogenase promoter in *Pichia pastoris*, or the methanol oxidase 1 or formate dehydrogenase promoter *in Hansenula polymorpha*. في الـ *Klyveromyces lactis* تم تحديد بروموتور البيتا جلكتوسيديز (*LAC4*) beta galactosidase promoter كاحد البروموتورز القوية. وفي جميع نظم الخميرة تم تطوير العديد من الواسمات الانتخابية المختلفة، بما في ذلك الواسمات السائدة والخاصة بالعوز الغذائي، وكثيرا ما يستخدم الـ *URA3* marker في الخميرة والمشابه للـ *pyrG*.

التصميم المختار للحصول على الـ GMM لا يتم تحدده فقط بمعايير دقة التقنية، على سبيل المثال ارتفاع الناتج وارتفاع درجة النقاوة. بل ان المتطلبات والإجراءات القانونية للموافقة على المنتج أيضا تلعب دورا رئيسيا عند إجراء التصميم.

كما سبق ذكره، يتم عادة تجنب الجينات المسئولة عن مقاومة المضادات الحيوية بسبب القلق من العامة، وربما بسبب التوقع بأن المنتجات المحتوية على جينات المقاومة للمضادات الحيوية قد تكون محظورة في نهاية المطاف. ومن التصميمات الأخرى التي اكتسبت أهمية متزايدة في بعض المناطق، في أوروبا واليابان مثلا، ما يعرف بالـ self cloning" concept " . وأصطلاح الـ "self cloning " "الاستنساخ الذاتي" يتفاوت بين المناطق. في الاتحاد الأوروبي ورد هذا التعريف في الـ EU Directive 98/81/EC بالنص التالى:

"الاستنساخ الذاتي يتمثل في إزالة تسلسل الحمض النووي من خلية من كائن حي والذى قد يكون أو لا يكون متبوع بإعادة إندماج كل أو جزء من هذا الحمض النووي (أو ما يعادله أصتناعياً) مع أو بدون خطوات أنزيمية أو ميكانيكية مسبقة للخلايا من نفس النوع أو الأنواع الاخرى من الخلايا شديدة القرابة التطورية (phylogenetically closely related) والتي يمكنها أن تتبادل المواد الجينية من خلال العمليات الفسيولوجية الطبيعية، حيث من غير المرجح أن تسبب الكائنات الحية الدقيقة الناتجة المرض للبشر أوالحيوانات أو النباتات .الـ *Selfcloning* قد يشمل على استخدام ناقلات هجينة لها تاريخ طويل من الاستخدام الآمن في الكائنات الحية الدقيقة بالذات" .

وهناك مزايا للمنتج إذا كان يمكن الاستناد إلى الـ "selfcloned" في تقييم الـ GMM. وعملية الموافقة على المنتج والإنتاج باستخدام الـ GMM ربما تكون أسرع وأقل في الاجراءات والمتطلبات القانونية وهى تختلف من بلد إلى

آخر. وفي بعض البلدان، على سبيل المثال ألمانيا وفنلندا، والنمسا، لا تعد الـ GMM "self-cloned" من الكائنات المعدلة وراثياً. وقد يكون لهذا تأثير كبير على متطلبات وضع العلامات المميزة للمنتج اعتمادا على لوائح الاتحاد الأوروبي في المستقبل.

التعامل الوراثى مع نواتج عمليات الأيض يشبه إلى حد كبير ما ذكر عن التعامل مع إنتاج الانزيمات. ويعتبر التعطيل الجينى من الأدوات الرئيسية في هندسة العمليات الأيضية ، كذلك استبدال الجينات، وزيادة التعبير (overexpression) الجينى، على سبيل المثال من خلال زيادة عدد النسخ أو إدخال جينات جديدة. ويعد استبدال الجينات البديل المستخد لتعطيل الجينات. نتيجة لاستبدال الجينات يتم استبدال الجينات المستهدفة بجين آخر، ويتم ذلك عادة في استراتيجية ثنائية الخطوات مشابهة جدا لاستراتيجية تعطيل الجينات التي سبق وصفها. التحدي الحقيقي في هندسة الأيض هو وضع الاقتراحات لإجراء التغييرات الوراثية، ووضع النماذج التي يمكن من خلالها التنبؤ بنتيجة هذه التغييرات الجينية. عدد الجينات ضخم للغاية وشبكة مسارات التمثيل الغذائي معقدة للغاية بحيث لا يمكن أن تعتمد على التوقعات السيطة أو طريقة التجربة والخطأ. و تطوير نماذجة رياضية جنبا إلى جنب مع الأساليب التجريبية في مرحلة ما بعد الجينوم، مثل الـ transcriptomics, proteomics, and metabolomics أدت إلى بزوغ ما يعرف بعلم "بيولوجيا الأنظمة" [31]

ومن الشروط الأساسية للـ "بيولوجيا الأنظمة" إما لتحسين انتاج الأنزيمات أو بعض مركبات الأيض في الكائنات الحية أن تم معرفة التتابع النيكلوتيدى لجينومها بالكامل بطريقة مفصلة بدرجة كفاية. وتسلسل الجينوم للنظم الفطرية المستخدمة لانتاج الانزيم أو الأيض إما قد أتيح على التو او سيتم توفره في وقت قصير. أكتمال تسلسل معظم الجينومات الجينوم لا يزال غير كامل، وسوف يبقى نادرا لسنوات قادمة. على الرغم من أن الـ systems biology تم أستخدامه بصورة جيدة بالنسبة للخميرة (*Saccharomyces cerevisiae*) [32] فهو ما زال في مراحله الأولى بالنسبة للفطريات الخيطية. على الرغم من عدم وجود بيانات تسلسل مشروحة بشكل جيد، قد بدأت مجموعة من الاعمال التجريبية لتحسين نظم الـ Aspergillus systems باستخدام الحمض النووي [33] ، وتم الإبلاغ عن بعض النظم البيولوجية لتحسين إنتاج بروتينات [34]. ومن المرجح أن تمكن النظم البيولوجية من إنتاج بعض مركبات الأيض الجديدة من الفطريات أو في التحسين الكبير في انتاج السلالات للمركبات الأيضية وتحسين القدرة على انتاج الانزيمات.

4. 4. العمليات الاننتاجية للانزيمات الصناعية.

تقريبا جميع منتجات الانزيمات الصناعية عبارة عن تركيبات من الإنزيمات التى تفرز من الفطريات خلال عمليات التخمير. بعد التخمير تتم إزالة الكتلة الحيوية للفطريات ويتم أسخلاص الانزيم من البيئة. وتتم إزالة الحمض النووي المعدل وراثيا مع إزالة الكتلة الحيوية للفطريات المعدلة وراثيا والمستخدمة في عملية الانتاج. ويظل فقط الحمض النووي المعدل وراثيا المتحرر إلى بيئة النمو نتيجة لتحلل بعض الخلايا أثناء عمليات التخمروالذى لا يتم التخلص منه أو تحطمه أثناء عمليات أستخلاص الانزيمات اللاحقة وعمليات إعداد المستحضرات الانزيمية على الصورة التجارية موجود في المنتج النهائي. وهذا يعني أن تحليل المنتج النهائي للكائنات المعدلة وراثيا وسوف يعتمد اعتمادا كليا على عملية الإنتاج. وسوف نقدم هنا موجز لعمليات التخمير الصناعي.

تقليديا، انتاج الانزيمات باستخدام الفطريات الخيطية يعتمد على كل من التخمر السطحى وكذلك عمليات التخمير المغمورة. ويتم إنتاج الانزيمات اليوم على وجه الحصر تقريبا من عمليات التخمير المغمورة. عمليات التخمير لانتاج الانزيمات الصناعية باستخدام الفطريات المعدلة وراثيا تبدأ بعملية التلقيح لقارورة صغيرة تحتوي على بيئة أجار وذلك بباده من الفطر المعدل وراثيا والمحفوظ في أنبوبة حفظ صغيرة. يتم وضع القارورة في حاضنة لتوفير درجة الحرارة المثلى للتجرثم ثم تنقل الجراثيم لمخمر البادئ (جهاز تخمير صغير يتم به تحضير الكتلة الحيوية اللازمة لعملية التخمير الرئيسية). وعملية تخمير البادئ هذه تمكن الخلايا على التكيف مع البيئة والمواد الغذائية التى ستنمو بها في وقت لاحق.

بعد تخمير البادئ يتم نقل الخلايا إلى المخمر الرئيسى، حيث يتم التحكم في درجة الحرارة المثلى بدقة، وكذلك درجة الحموضة، والأوكسجين المذاب لانتاج الانزيمات. ويمكن اجراء عملية التخمير إما على دفعات أو بالصورة المستمرة. في عملية التخمير على دفعات تضاف جميع مكونات بيئة التخمر في بداية عملية التخمر. ويتم التغذية بالفطر مع مزيد من البيئة خلال عملية التخمير. في حالة التخمير المستمر يتم الوصول لمرحلة الثبات أو الاستقرار من خلال الامداد المتواصل بالبيئة الطازجة مع العزل المتواصل من تنكات النمو. مدى تحلل خلايا الفطر المستخدم يعتمد أساسا على الفطر المعدل وراثياً المستخدم ومدة عملية التخمير وتصميم المخمر نفسه (أي على درجة الإجهاد الكلى الذى سوف تواجه الكتلة الحيوية للفطر). والخطوط العريضة لعملية التخمير النموذجية موضحة في الشكل 4.4. وعندما تكتمل عملية التخمير الرئيسية يشار إلى الخليط من الخلايا، والعناصر المغذية، والإنزيمات، باسم المرق أو الحساء (Broth) والذى يصبح جاهز لعمليات الترشيح والاستخلاص والتنقية والتي يشار إليها مجتمعة التجهيز النهائي.

يتم في البداية فصل الـ Broth الذى يحتوى على الانزيم عن الكتلة الحيوية للفطر ويتحقق ذلك من خلال المعاملات الكيميائية المختلفة للحساء المتخمر لضمان كفاءة الفصل، ويلى ذلك إزالة الكتلة الحيوية باستخدام الطرد المركزي أو الترشيح. بعد فصل يتم تركيز الانزيم عن طريق الأغشية شبه المنفذة أو التبخير. بالنسبة للمنتجات المطلوبة على الصورة عالية النقاوة, ، تتطلب عملية التجهيز النهائية خطوات خاصة لإزالة الشوائب غير المرغوبها. ويتم ذلك غالبا عن طريق عمليات الترسيب الانتقائية أو الادمصاص للشوائب أو بالتبلور والتي يمكن من خلالها الحصول على الانزيم المنتج بصورة نقية جدا. وفي حالات نادرة قد يستخدم الفضل الكروماتجرافى العمودى والذى يكون مكلف بصورة كبيرة. ويوضح الشكل 4.5 عملية الاستخلاص الانزيمى.

الخطوة النهائية في عملية تجهيز الانزيم المنتج. يمكن وضع الانزيمات المنتجة اما في صورة منتجات سائلة أو على صورة حبيبات اعتمادا على الصور المناسبة لاستخدام هذا المنتج الانزيمى. ومن العمليات الحرجة في عمليات التجهيز ضمان ثبات الأنزيم في المنتج النهائى وعمليات تحرر الانزيم أثناء الاستخدام، ومنع تكون الغبار الانزيم الذي يمكن أن يسبب الحساسية.

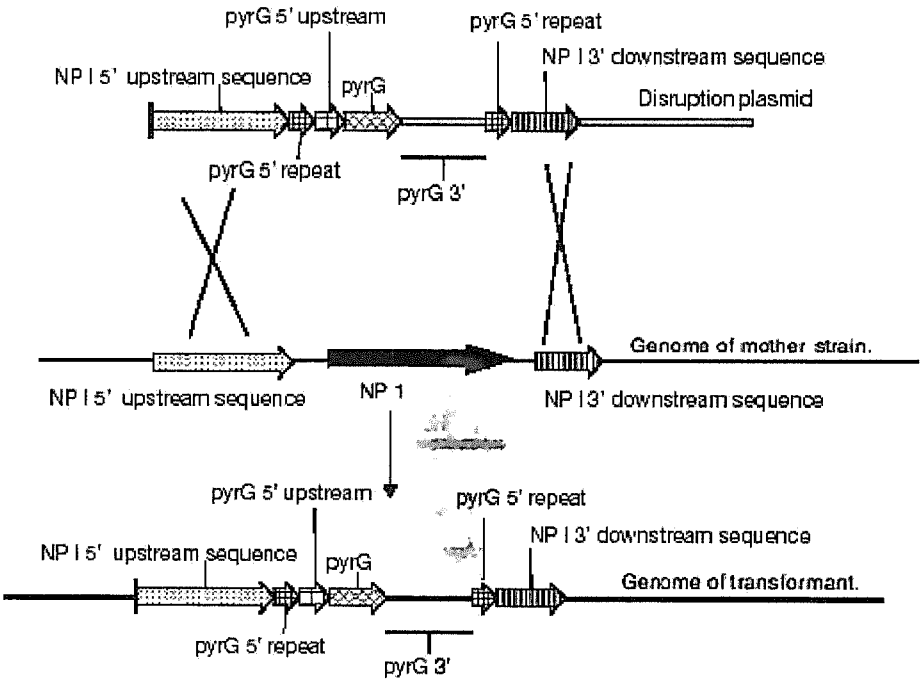

Fig. 4.2 Gene disruption in filamentous fungi. The principle is illustrated by disruption of the gene NP I. A disruption plasmid was made by replacing the coding part of the NP I gene with the selectable marker *pyrG* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase). The details of the components involved are described in the main text. In this example a repeating sequence flanking the *pyrG* selection cassette has been included (*pyrG* 5' repeat). Recombination between the repeats results in the loss of the *pyrG* gene, and so these repeats greatly facilitate selection of a *pyrG* negative strain with a predictable genotype for subsequent gene disruption.

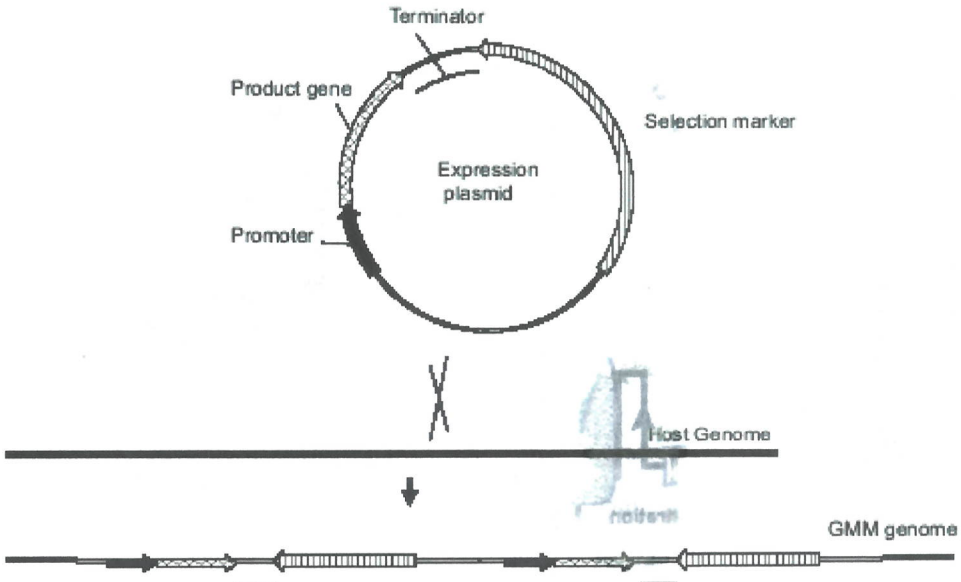

Fig. 4.3 Integration of an expression plasmid into the genome. Tandem integration of an expression plasmid featuring a promoter, a product gene, a terminator, and a selection marker into the genome of a filamentous fungus is illustrated. The integration shown is a head-to-tail integration in one locus with no further recombination.

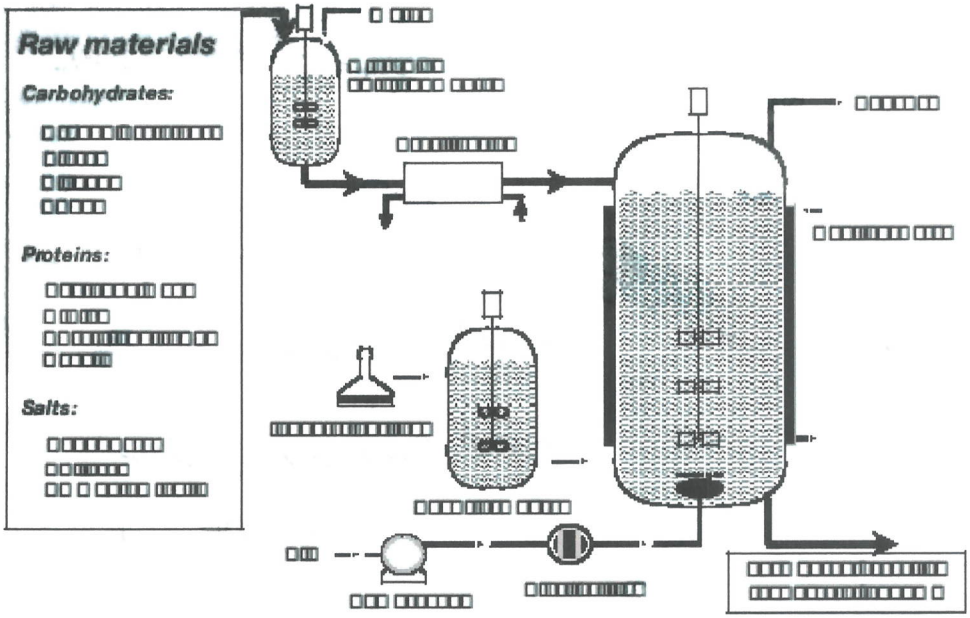

Fig. 4.4 Outline of a fermentation process. A typical process flow is demonstrated. Spores from an inoculation flask are used to inoculate a seed fermenter, and this in turn is used to inoculate the main fermenter. The fermenter can be aerated, and large propellers in the fermenter stir the fermentation broth. Additional medium components can be prepared and added during fermentation.

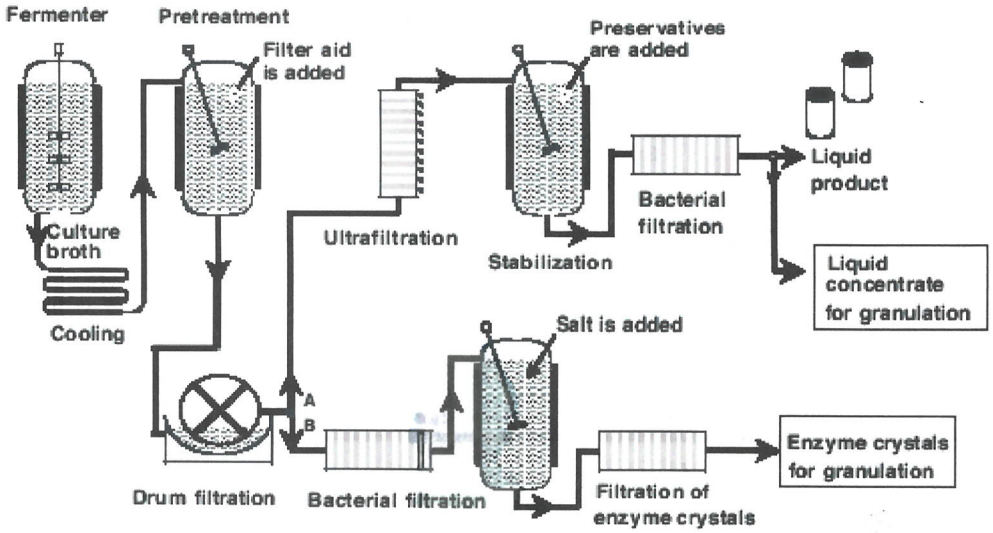

Fig. 4.5 Outline of a recovery process. Typical process flows are shown. The biomass is separated from the broth by filtration. The broth is then concentrated and sterile filtered. Alternatively the enzyme is recovered by crystallization.

مكتبة A to Z