الكلية	العلوم
القسم	التقنيات الاحيائية
المادة باللغة الانجليزية	Plant tissue culture technique
المادة باللغة العربية	تقنية زراعة الانسجة النباتية
المرحلة الدراسية	الرابعة
اسم التدريسي	أنمار كامل مبارك
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	Bioreactor
عنوان المحاضرة باللغة العربية	المفاعل الحيوي
رقم المحاضرة	السادسة
المصادر والمراجع	George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008).** *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer https://uodiyala.edu.iq/uploads/PDF%20ELIBRARY%20UODIYALA/EL34/Plant%20Propagation%20by%20Tissue%20Culture%203rd%20Edition.pdf
	Pierik, R. L. M. (1997).** *In Vitro Culture of Higher Plants*. Springer
	Reed, B. M. (2008).** *Plant Tissue Culture: Techniques *and Experiments
	https://biot202.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/plant-tissue-culture-third-edition-techniques-and-experiments-by-roberta-h-smith.pdf

المفاعل الحيوي
Bioreactor

اولاً. المقدمة

استخدمت مزارع الخلية والكالس على مدى ثلاث عقود بشكل واسع لاكتشاف امكانية انتاج مركبات أيض ثانوية مفيدة باستخدام التقانات البيولوجية. نتج عن هذه الطرق التجريبية معطيات مهولة حول أنواع النباتات المنتجة لمركبات الأيض الثانوية في المزارع النسيجية وحول العوامل الكيميائية والفيزيائية كالضوء والحرارة ومنظمات النمو النباتية والمغذيات التي تؤثر في الانتاج وبالتالي انتخاب خلايا ذات حاصل عالي من مركبات الايض الثانوية. من جهة ثانية لم تكن مزارع الانسجة التي درست من أجل انتاج مركبات الأيض الثانوية أنظمة قابلة للتطبيق على مستوى تجاري، عليه أعدت طريقتين هما :

1- خلق المهارة المطلوبة لانتاج مركبات الايض الثانوية.

2- تطوير طريقةالتقانة لمنتوج معين باستخدام نباتات مثل : *Catharanthus roseus* و *Berberis* و *Coptis* و *Panax* ....إلخ كنظام نموذجي.

ركزت الابحاث العلمية على تطوير طريقة مناسبة لهذه النباتات وكذلك الفهم الافضل للعملية اجمالاً. تنتج خلية النبات النامية في وسط سائل متحرك Agitated مركبات ايض ثانوية والتي تعد صفات مميزة لنباتات الابوين. والعملية تتحكم بها عدة جينات (مسيطرعليها وراثياً) وبالتالي فهي تفاعل يتضمن عدة خطوات. هناك بعض المتطلبات الاساسية لانتاج مركبات الايض الثانوية على المستوى التجاري مثل طلب عالي وسعرعالي للمنتج وتوفرمصدر للمواد الاولية الخام دون انقطاع. كما يجب أن تكون كلفة التقانة المستخدمة واقعية وخلافه سوف لن تكون عمليات الانتاج قابلة للتطبيق على المستوى التجاري. يوجد عدد قليل فقط من المركبات المنتخبة تفي بهذا الغرض بسبب ارتفاع كلفة الانتاج. ومن الحقائق المسلم بها امكانية تقليل كلفة الانتاج من خلال رفع حاصل مركبات الايض الثانوية وتحسين تقانة المفاعل الحيوي من أجل خفض كلفة رأسمال المواد الداخلة في عملية الانتاج. تجري حالياً محاولات جدية لرفع الحاصل عن طريق معالجة طرق البناء الحيوي والتخلص من العوامل المحددة المعيقة وادخال تقانات الهندسة الوراثية. ونعرض هنا تفاصيل منظومة المفاعل الحيوي ومزارع الانسجة المختلفة المستخدمة في انتاج مركبات الايض الثانوية من هذه المفاعلات تجاه تطوير طرقالتقانة من أجل الانتاج على المستوى الصناعي.

بدأت التطبيقات العملية لزراعة خلية أو نسيج أو عضو النبات من أجل انتاج مركبات الايض الثانوية عام 1947 عندما نشر James للمرة الاولى وجود المركبات القلويدية في مزرعة مرستيم

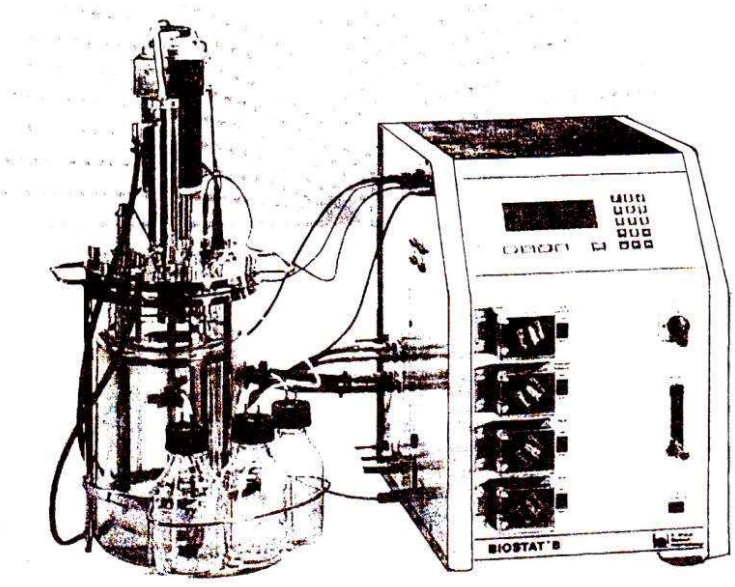
نباتات العائلة الباذنجانية. أن مشاكل الانتاج الواسع (scale-up) (وهي عملية انتاج واسعة النطاق مقارنة التي تجري في المختبر)، تعد مشاكل شائعة في كل انواع علوم الهندسة. طورت طرق مختلفة لحل هذه المشاكل بمدى يبدأ من الحلول الاساسية إلى عمليات تستخدم بها طرق التجربة والخطأ "Trial and error" والحكم المبني على التجربة العملية "Rule of thumb"، حيث طورت الطرق التقليدية لصناعة الخمور بطريقة التجربة والخطأ. تعد المفاعلات الحيوية أكثرفائدة من الدوارق المهتزة (Shake flasks) لأنها تضمن سيطرة أفضل على المنظومة (مثل pH وتركيز الغاز المذاب و نمو الخلايا ....الخ). وهناك أمثلة على زراعة خلايا النبات في جهاز تخمير كبير تبين امكانية التطبيق العملي لتقانة الانتاج على نطاق واسع في عمليات انتاج مركبات الايض الثانوية. طور Tulecke and Nickel عام 1959 وبنجاح نظام بسعة (10) لتر في دامجانة بسيطة Carboy (زجاجة كبيرة مكسوة بالخيزران) لزراعة خلايا النبات. ودرس Noguchi ومساعديه عام 1977 معلقات خلايا التبغ في مفاعل يتكون من خزان مهتز (Stirred tank) بسعة 20000 لتر. كما درس Schiel and Berlin عام 1987 خلايا *Catharanthus roseus* في مفاعل يتكون من خزان مهتز بسعة 5000 لتر. وفي أول عملية انتاج على المستوى التجاري استخدمت معلقات خلايا *Lithospermum erythrorhizon* في مفاعلات تتكون من خزانات مهتزة سعة 200 و750 لتر. تشير البحوث العلمية المختلفة الى امكانية تنمية الميكروبات، وبالتالي توحي هذه النتائج الى امكانية استخدام معدات التخمير الموجودة والمعدات التقليدية المستخدمة في الانتاج الصناعي لمنتجات النبات باستخدام تقانة مزرعة الخلية. وعلى عكس ما ذكر أعلاه، اقترح Archanbault وآخرون عام 1998 بأن المفاعلات الحيوية المصممة والمستغلة بشكل مخصوص ربما تكون أكثر ملائمة لمزارع خلايا النبات. ومن الجدير بالذكر تستخدم حالياً أنواع وتصاميم مختلفة من المفاعلات الحيوية وعمليات مختلفة في انتاج مركبات الايض الثانوية، جدول (17-1).

جدول (17-1): بعض الأمثلة على انتاج مركبات الأيض الثانوية من الخلايا النباتية على نطاق واسع

Plant species	*Capacity in litres*	*Compound produced*
Catharanthus roseus	85	Serpentine
Coleus blumei	450	Rosmarinic acid
Lithospermum erythrorhizon	750	Shikonin
Nicotiana tabacum	20,000	Biomass
Panax ginseng	200-20,000	Saponins

ثانياً. عملية الإنتاج في المفاعل الحيوي Bioreactor process

المفاعل الحيوي عبارة عن وعاء زراعة كبير مصنوع من الزجاج للاستعمال في المختبر (بسعة تصل الى 10 لتر) تصنع المفاعلات الحيوية المصممة للانتاج على نطاق واسع من الفولاذ الصامد. يمكن أن يصمم النوع الاول ويصنع في المختبر أو يمكن شراءه شكل (17-1).

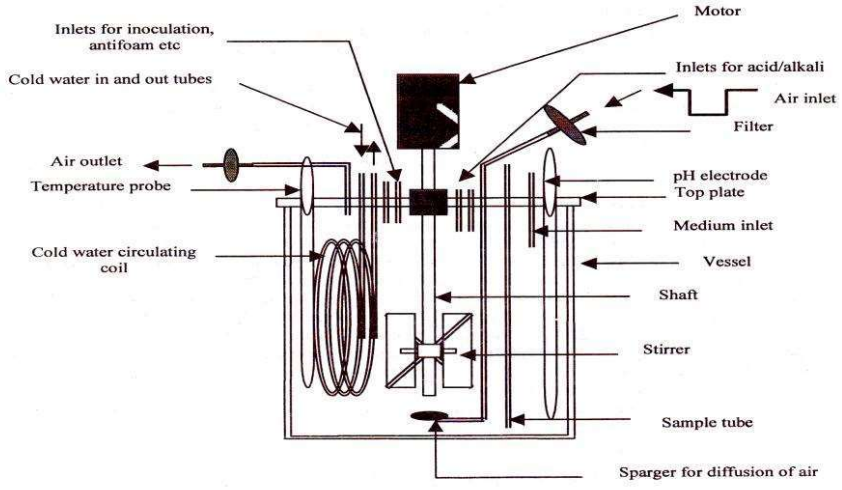


شكل (17-1): مفاعل حيوي ذات خزان هزاز مع جهاز السيطرة

المفاعلات الحيوية المتوفرة تجارياً عبارة عن معدات متطورة مزودة بمعالج دقيق (Microprocessor) ووحدة سيطرة (كومبيوتر) للتحكم في الـ pH والاوكسجين المذاب ومعدل تدفق الغاز وسرعة الاهتزاز (Agitation speed) والمغذيات ودرجة الحرارة داخل الوعاء وكثافة الخلايا للحصول على نمو مثالي أو انتاج عالي أو كلاهما. تحتوي جميع الوحدات على وعاء الزراعة ووحدة السيطرة. أن التفاصيل لمفاعل حيوي نموذجي من النوع المهتز (Stirred type) موضحة في (الشكل 17-2). تتوفر أنواع من الهزازات (Stirrers) لتناسب متطلبات جهد قص النسيج (Tissue shear pressure)وتوليد اهتزازمؤثر(Effective agitation). تزود المفاعلات الحيوية الحديثة بمتحسسات مختلفة لعوامل مثل pH ودرجة الحرارة والرغوة وتراكيز المغذيات. تقوم وحدة السيطرة بتسجيل التغيرات الحاصلة في مكونات الوسط ومن ثم تنقل المادة الكيميائية أو المغذي المطلوب لحين ضبط الوسط حسب المواصفات المطلوبة. تؤخذ العينات على فترات لدراسة سير النمو مع الوقت باستعمال انابيب حسب النموذج ومزودة بغشاء ترشيح معقم ومحقنة ماصة لسحب العينة. تعقم المفاعلات الحيوية صغيرة الحجم في المعقام الحراري بينما تعقم المفاعلات الحيوية المستخدمة في الانتاج على نطاق تجاري في مكانها بامرار البخار فيها على ضغط مناسب. كما يجب أن تولى العناية المناسبة لتعقيم المنظومة حسب حجمها. وقد صممت أنواع مختلفة من المفاعلات الحيوية اعتماداً على المتطلبات وعلى النظم المستخدمة، ستناقش لاحقاً في هذا الفصل. من ناحية ثانية تتطلب جميع المفاعلات الحيوية

وحدة تبريد (حمام ثلجي مع مضخة لدوران الماء) لتدوير الماء البارد (في المناطق الباردة يفي ماء الحنفية بالغرض) والى مضخة ضغط الهواء من النوع الغشائي لضخ الهواء الخالي من الزيت وعلى ضغط محدد، وكذلك الى معقام حراري بأبعاد مناسبة لتعقيم الوحدة، والى مرشحات هواء يمكن اعادة تعقيمها أو من النوع الذي يستخدم لمرة واحدة. كما تتطلب كذلك شبكة أنابيب لربط أجزاء المنظومة، إضافة الى المتطلبات العامة التي يحتاجها العمل مع زراعة الخلية أو النسيج، كما يتطلب العمل مع المفاعل الحيوي الى كمية كافية من وسط زراعة الخلايا الاصل (Stock of cell cultures) لتلقيح المفاعل.

تستخدم هذه المنظومة في تطوير تقانة انتاج مركبات ايض ثانوية مفيدة على نطاق صناعي أو لانتاج أعداد كبيرة من النبيتات من خلال تحفيز تكوين الأجنة (Embryogenesis). تتحرر مركبات الايض الثانوية التي تنتجها خلايا النبات الى الوسط أو قد تتراكم داخل الخلايا، واعتماداً على نوع النسيج يحصد الوسط المستهلك أو اجمالي الكتلة الحية (Biomass) بعد فترة من الحضن لاستخلاص المركبات.



شكل (17-2): مخطط توضيحي يمثل الاجزاء المختلفة للمفاعل الحيوي نوع الهزاز

علاوة على ذلك، عند تزامن النمو والانتاج في وقت واحد (أي الانتاج المرافق للنمو) ففي هذه الحالة يجب اعتماد اسلوب معالجة يعزز نمو الخلايا لفترة طويلة. اما اذا كان بناء المنتج يتبع فترة من النمو السريع (الانتاج غير المرافق للنمو) فيعتمد اسلوب معالجة يمكن معه المحافظة على المزارع في معدلات نمو واطئة أو غير نامية كما ويحافظ على انتاجيتها. تعتمد اساليب معالجات مختلفة على العوامل المؤثرة في تراكم مركبات الايض الثانوية في الخلايا أو تحررها الى الوسط منها الزراعة الكمية (Batch culture) والزراعة الكمية المغذاة (culture Fed batch) والزراعة الكمية السريعة Rapid fed batch culture (التغذية شبه المستمرة) والزراعة الكمية بمرحلتين Two-stage batch culture والزراعة المستمرة المسماة Continuous chemostat type cultures

والزراعة الغزيرة المستمرةContinuous profusion culture. ومن الضروري عدم استخدام المفاعل الحيوي الا عند اكمال الدراسات الاساسية المتعلقة بعمليات أمثلة (Optimization) حاصل المركب المنتج. وفي اغلب الحالات يستعمل وسط للنمو وآخر للانتاج من اجل الحصول على أعلى حاصل من نواتج الايض الثانوية.

ثالثاً. عوامل النمو في المفاعل الحيوي Factors for growth in bioreactor

أ- انتقال كمية الأوكسجين Gas-liquid mass transfer

تعد المحافظة على معامل انتقال ثابت لكمية الاوكسجين (K_L a) Constant oxygen mass transfer coefficient (حيث K_L هي معامل الطور السائل و a اجمالي المسافة بين السطحين) اساسياً في انجاز العديد من العمليات البيولوجية على نطاق واسع. تتطلب خلايا النبات المزروعة مستوى واطئ من الاوكسجين بخلاف خلايا الاحياء المجهرية الدقيقة، فإذا أريد لخلايا تتنفس بمعدل 0.2 mμ g/h حتى تنمو الى معدل 10 g/l، فيجب ان لا يسمح بخفض تركيز الاوكسجين المذاب الى اقل من 20% من حالة التشبع.

تتراوح قيم (K_L a) النموذجية لمزارع خلايا النبات في المفاعلات الحيوية بين10-30 /h يؤدي تشغيل المفاعل الحيوي على قيم (K_L a) عالية الى ضعف نمو الخلايا، أو قلة انتاج مركبات الايض الثانوية وربما يكون السبب هو زيادة قوى القص المرافقة لظروف قيم (K_L a) العالية أو زيادة فقدان Co_2 من الوسط. ولاجل الحفاظ على مستوى ثابت من الاوكسجين المذاب يجب أن تزود المفاعلات الحيوية بمجس الاوكسجين المذاب Dissolved oxygen probe لتنظيم التهوية ومعدل الاهتزاز (Agitation rate).

ب- قوى القص Shear

خلايا النبات حساسة ضد قوى القص، والقص يعني القوى المسلطة على سطح الجسم باتجاه موازي له، وتختلف عن القوى الطبيعية المسلطة على السطح والتي تكون عمودية عليه. رياضياً يمكن التعبيرعن القص بالمعادلة التالية:

$$\tau = \eta g$$

τ تمثل اجهاد القص (القوة في وحدة المساحة)

η تمثل معدل القص (التغير في السرعة ضمن مسافة ما)

g تمثل اللزوجة (المعامل الذي يعبر عن المقاومة ضد الجريان)

وفي وقت مبكر جرت محاولات للتعبير عن ضرر القص للخلايا حقيقية النواة (Eukaryotic) النامية في مفاعل حيوي يهتز آلياً بحساب سرعة طرف الدوار(Impeller tip speed) بالمعادلة التالية :

$$\text{Tip speed} = \pi \, N \, Di$$

حيث N تمثل سرعة الدوار (دورة بالدقيقة rpm) وDi تمثل قطر الدوار وقد افترض Sinskey وآخرون، 1981 أفضلية استخدام عامل القص المتكامل Integrated shear factor (ISF) لضبط ضرر القص الحاصل للخلايا بالمعادلة التالية :

$$ISF = \frac{\pi \quad N \, Di}{Dt - Di}$$

حيث Dt–Di تمثل مقدار المسافة بين الدوار وجدار الخزان و Dt تمثل قطر الخزان، عليه فأن ISF تمثل معدل القص الكاذب (Pseudo– shear rate) الموجود بين قمة الدوار وجدار الوعاء. وحتى في غياب الاهتزاز الآلي فأن ترشيح الغازGas sparging (انتشارفقاعات الهواء /كمية الغاز) يمكن أن يسلط قوة قص على الخلايا.

جـ - المزج Mixing

لاتشكل عملية مزج المغذيات المذابة في وسط الزراعة أي مشكلة في نظام المزارع المعلقة، ولكن الحجوم الكبيرة من خلايا النبات تؤدي إلى ترسب كتل الخلايا في المنطقة الميتة من الخزان أو في المناطق غير المخلوطة في قعر المفاعل الحيوي، علاوة على التصاق الخلايا على سطح جدار الخزان في منطقة أعلى من مستوى سطح الوسط الغذائي وحرمانها من المغذيات مما يشكل مشكلة جدية. وحديثاً يوجد ميل تجاه استعمال تراكيز عالية جداً من الخلايا (حجم الخلايا المضغوط Packed cell volume (PCV) بمقدار90%). وتحت هذه الظروف فأن عدم اكتمال الخلط يمكن أن يشكل مشكلة جدية.

رابعاً. أنواع المفاعلات الحيوية Types of bioreactors

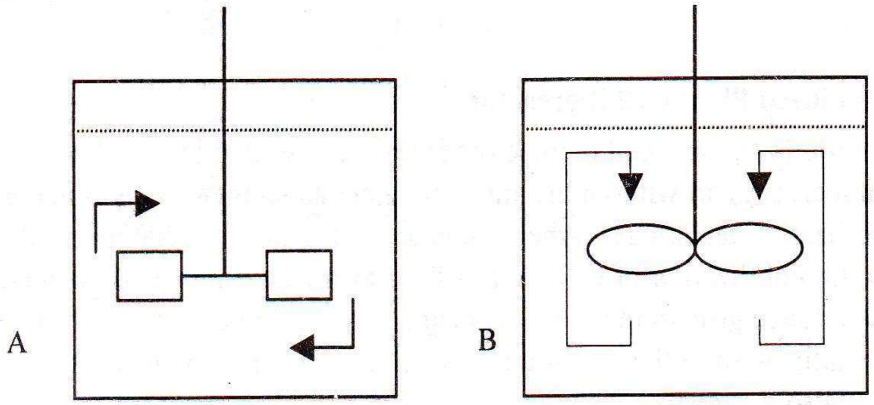
يمكن تصنيف المفاعلات الحيوية الى النوعين التاليين اعتماداً على اسلوب التهوية والاهتزاز:

أ- مفاعلات تهتز آلياً.

ب- مفاعلات تهتز بضغط الهواء.

أ- المفاعلات المهتزة آلياً Mechanically agitated bioreactors

وهي الأكثر استعمالاً في زراعة خلايا النبات والحيوان والميكروب على نطاق واسع. يهتز الوسط في هذا النوع بدوار يدور آلياً، حيث تستعمل أنواع مختلفة من الدوارات اعتماداً على الاحتياجات. يستخدم نوعين تقليديين من الدوارات في هذه المنظومة موضحة في (شكل 17-3).



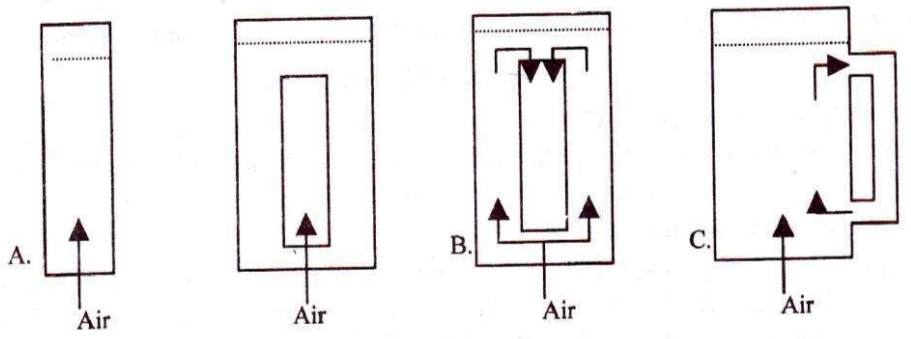
شكل (17-3): أنواع فقاعات الهواء حيث(A) تمثل الدوار التوربيني ذات النصل المستوي و(B) تمثل مايسمى بالدوار الملاحي.

يستخدم عادة الدوار التوربيني ذو النصل المستوي (Flat blade) عالي السرعة شكل) 17-A3) في زراعة البكتريا. يؤدي الاهتزاز السريع الى تكسرالهواء الداخل الى فقاعات صغيرة. وبما ان خلايا النبات لا يمكن أن تتحمل ظروف قوى القص العالية، وأن خلط الهواء قد يسبب مشكلة جدية في مزارع خلايا النبات، لذلك استخدم دوار بديل قادر على توليد قوة قص واطئة. يعتبر الدوار الملاحي الدافع (propeller impeller Marine) مناسباً حيث يولد قوة قص واطئة أثناء الخلط. من جهة ثانية ينشئ الدوار التوربيني ذو النصل المستوي اسلوب خلط نصف قطري. ولا يستخدم أي من هذين النوعين من الدوارات في نظم الانتاج على النطاق الواسع. وظهر ان الدوارات التي تولد قوة قص واطئة (الانواع المجذافية Paddle والحلزونية Helical) أكثر فائدة لخلايا النبات. وبما أن الاهتزاز الواطئ غير كافٍ لتكسير الغاز الوارد الى فقاعات صغيرة لذا ينشر تيار غاز وارد على شكل فقاعات دقيقة باستخدام موزع غاز مناسب، كما أن اغناء الغاز الوارد بالاوكسجين تعد عملية مفيدة.

ب. المفاعلات المهتزة بضغط الهواء Pneumatically agitated bioreactors

وهي على نوعين؛ مفاعلات عمود الفقاعات Bubble column ومفاعلات الرفع بالهواء (Air – lift) شكل (17-4). هذا النوع من المفاعلات طويلة ونحيفة مقارنة بالمفاعلات المهتزة آلياً، وتكون نسبة الطول الى القطر فيها مرتفعة. تتحرك فقاعات الهواء في عمود الفقاعات عند قاعدة العمود فتسبب اهتزاز الوسط. أما في النوع الثاني فيتم دفع الماء الى القطاع الرافع وبعد تحرر الغاز عند قمة العمود يسيل الوسط باتجاه الاسفل نحو قطاع الزاوية السفلي، ويمكن فصل هذين القطاعين بعائق (Buffle) وهي اسطوانة متراكزة (Concentric cylinder) أو بعقدة خارجية External loop.

يساعد دوران الهواء في مفاعل نوع Air-lift على خلط أفضل وبالتالي له فائدة في تعليق الخلايا أو مجاميع الخلايا بانتظام وتناسق. أما في المفاعلات الحيوية نوع Air-lift واسعة النطاق فيكون معدل انتقال الاوكسجين في قطاع الزاوية السفلى واطئاً. ويجب التأكيد هنا على أن كفاءة المفاعل الحيوي نوع Air-lift تعتمد بشكل كبير على التصميم الهندسي للمنظومة حيث أن نسبة المقطع العرضي لمنطقة القطاع الرافع الى قطاع الزاوية السفلى ذات أهمية خاصة لانها تؤثر في كفاءة الخلط و في انتقال الاوكسجين.



شكل(17-4): المفاعلات المهتزة بضغط الهواء: (A) عمود الفقاعات، (B) انبوب رفع الهواء، (C) رفع الهواء بعقدة خارجية

ج. المفاعل الحيوي لخلايا النبات المثبتة على السطح

Surface – immobilized plant cell bioreactor (SIPCB)

يستخدم المفاعل الحيوي (SIPCB) في تثبيت خلايا النبات على السطح الخارجي لوسط ساند وخامل (Inert support) دون الحاجة لوجود قوى الارتباط التساهمي (Covalent attachment) وهي عملية تختلف عن باقي تقانات تثبيت خلايا النبات، حيث يجري هنا تقييد خلايا النبات في الجلاتين أو في مادة Calicium alginate (راجع الفصل 18). أن تثبيت الخلايا في مفاعل نوع SIPCB له فوائد أكثر من فوائد تقييد الخلايا في المادة الهلامية (Gel). بما أن النمو في مفاعل SIPCB يحدث على السطح الخارجي لوسط خامل لذا تسهل مراقبة ظروف العمل ومشاهدتها. من الميزات البارزة عند تركيب وتشغيل مفاعل SIPCB البساطة.

لقد تم ذكر المواصفات المهمة التي تجعل مفاعل SIPCB مفضلاً على مزارع الخلايا الحرة (المعلقة) في فقرة سابقة، حيث يمكن تفادي مشاكل القوى الهيدروديناميكية (Hydrodynamic أواجهاد القص (Shear stress) التي تلازم الخلايا المعلقة النامية في المفاعلات الحيوية المهتزة آلياً، كما تنشط عملية تثبيت الخلايا على سطح خارجي الميل الطبيعي لخلايا النبات للتكتل وبذلك ترفع مستويات تلامس الخلايا مع بعضها الى أعلى مستوياتها الامر الذي يحسن من بناء وتراكم مركبات الايض الثانوية. إضافة الى ذلك يسهل اجراء عمليات استبدال الوسط لغرض المراقبة الايضية وسد