Bull. Fac. Agric., Cairo Univ.,53 (2002): 161-196.

" Review article "

THE ROLE OF GENETIC ENGINEERING IN DEVELOPING MICROBIAL STRAINS FOR FOOD INDUSTRY

(Received: 27.5.2001)

By
W. A. Bazaraa

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza.

ABSTRACT

Microorganisms such as bacteria, yeasts and molds produce several metabolic products which might be used as food preservatives, colorents, texture and flavor improving materials. Such organisms are also known to produce several important enzymes. Techniques such as mutation and selection, transduction, transformation, conjugation and genetic engineering have been used to improve the genetic characteristics of the industrial strains.

In this review, the use of genetic engineering to improve the genetic characteristics of the industrial microorganisms, the use of the genetically modified microorganisms in several food applications (production of enzymes, dairy starters, organic acids, food addatives and baker's yeast), safety of the genetically engineered foods as well as the expected problems associated with, will be discussed.

Key words: *food biotechnology, food industry, genetically modified microorganisms, genetic engineering, transgenic microorganisms.*

" مقالة مرجعية "

دور الهندسة الوراثية في تطوير سلالات ميكروبية للتصنيع الغذائى

وائل أحمد بازرعة

قسم تكنولوجيا وعلوم الأغذية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة – الجيزة

ملخص

تنتج الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتريا والخمائر والفطريات العديد من نواتج التمثيل الغذائى التى تعمل كمواد حافظة أو محسنة للقوام أو كمواد ملونة أو كمكسبات لنكهة الأغذية. هذا بالإضافة لإنتاجها للعديد من الإنزيمات الهامة. توجد العديد من الطرق المستخدمة لتحسين مثل هذه السلالات الميكروبية للحصول على إنتاجيات افضل منها التطفير والانتخاب Mutation and selection والطرق الطبيعية لنقل الجينات مثل النقل بالفيروس (الاستنقال) Transduction و التحول Transformation والاقتران Conjugation. ويأتى كذلك التطور الهائل فى استخدام الهندسة الوراثية Genetic Engineering والتى عن طريقها تم التوصل لسلالات ذات قدرات فائقة لاستخدامات متميزة فى الصناعات المختلفة.

و تضمن البحث المرجعى مناقشة تحسين الصفات الوراثية للميكروبات باستخدام الهندسة الوراثية مع إعطاء أمثلة متنوعة عن تطبيقاتها فى إنتاج سلالات جديدة للاستخدام الغذائى (إنتاج إنزيمات وبادئات للألبان المتخمرة والأحماض العضوية وبعض المضافات الغذائية وخميرة الخباز) كذلك مناقشة سلامة الأغذية المهندسة وراثيا والمشاكل المتوقعة منها.

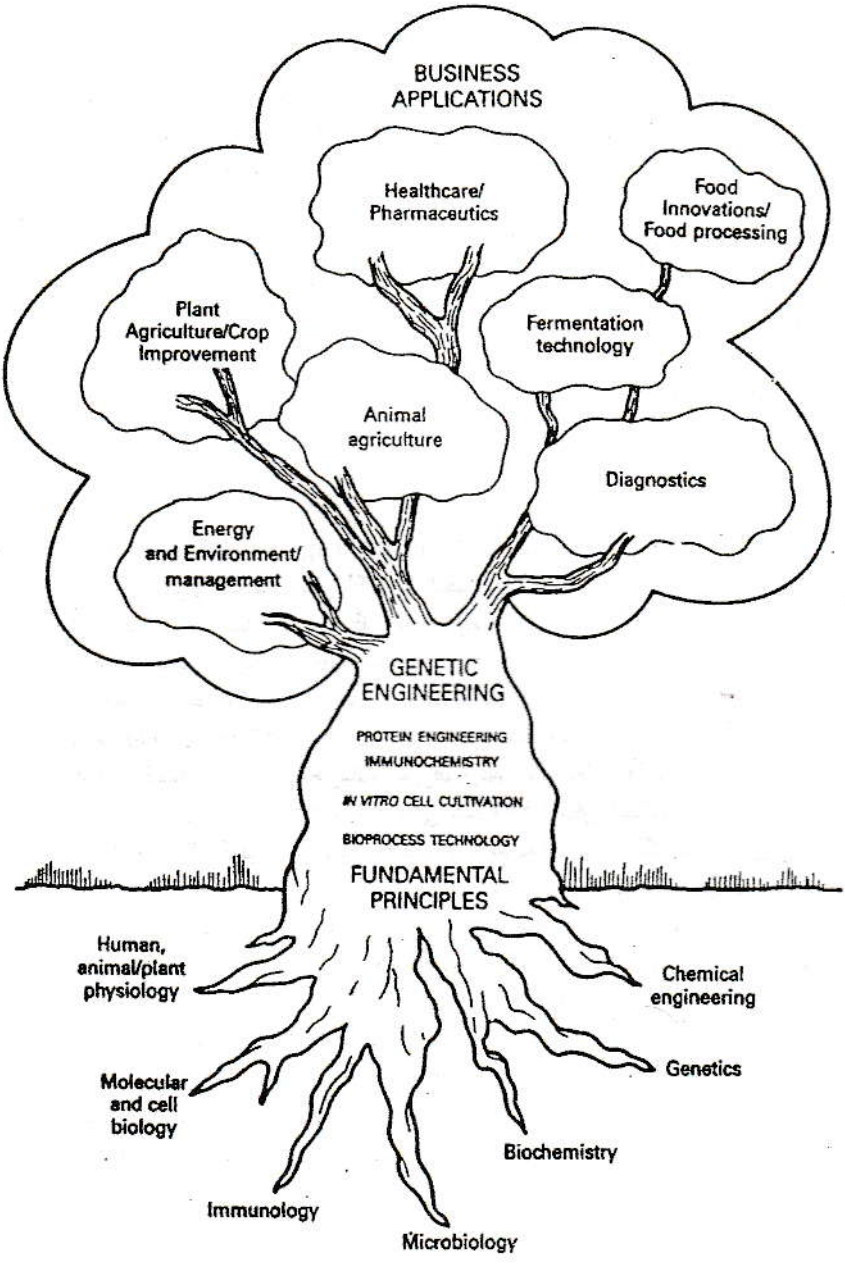
١. مقدمة

أستخدم مصطلح التكنولوجيا الحيوية Biotechnology كثيراً فى العقد الأخير من القرن العشرين وأجمع العلماء على الدور الكبير الذى يمكن أن تقوم به خلال القرن القادم فى حل الكثير من المشاكل التى تواجه البشرية. تعرف التكنولوجيا الحيوية بإنها استخدام الكائنات الحية أو أجزاء منها لإنتاج مواد نافعة يحتاجها الإنسان (مستجير ١٩٩٨). وبخلاف بعض الفروع العلمية الفردية فإن التكنولوجيا الحيوية ترتكز على تداخل علوم الميكروبيولوجى و الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية Molecular Biology والمناعة والوراثة وهندسة البروتينات والإنزيمات والهندسة الكيميائية والميكانيكية وفسيولوجيا النبات والحيوان والإنسان

وعلوم الكمبيوتر ويوضح الشكل رقم (١) تداخلات هذه العلوم المختلفة والتطبيقات المتوقع الحصول عليها فى مختلف المجالات (Smith, 1996). يمكن تشبيه التكنولوجيا الحيوية بمظلة كبيرة يقع تحتها تقنيات عديدة حديثة ومتطورة وواعدة فى الصناعة والإنتاج جعلت العالم يتطلع إليها لحل العديد من المشاكل المتعلقة بالغذاء، الكساء، العلاج ورفاهية البشر (Glazer and Nikaido, 1995a) . وتعد الهندسة الوراثية Genetic Engineering واحدة من اكثر فروع التكنولوجيا الحيوية إثارة للجدل والمناقشة منذ بدايتها الحقيقية فى السبعينات من القرن الماضى وذلك لما لها من تطبيقات حيوية فى التنمية البشرية والاقتصادية فى مجالات الطب والزراعة والبيئة والصناعة وغيرها. هذا بالإضافة لتقديمها تقنيات يمكن أن تحدث خللاً كبيراً فى خط الحياة المتوازن منذ قديم الزمن إذا ما اسيىء استخدامها فى التطبيقات المختلفة.

٢. الهندسة الوراثية Genetic Engineering

تحتوى خلايا جميع الكائنات الحية على الدنا DNA (Deoxyribonuclic acid) الذى يحمل جينات الصفات الوراثية الخاصة بهذا الكائن وتعتبر كبصمة له. وعموما يعتبر الجين Gene مسئولا عن صفة واحدة للكائن مثل إنتاج إنزيم معين. وعليه فإن صفات الكائن الحى تتحدد حسب المعلومات الوراثية الموجودة فى دناه (Fincham and Ravetz 1990). ويعود اكتشاف المادة الوراثية إلى عام ١٩٤٤ عندما أكتشف وجود المعلومات الوراثية على شرائط الدنا فى بكتريا الالتهاب الرئوى (Avery *et al.*, 1944). وفى عام١٩٥٣تمكن العالمان Watson and Crick من تصور التركيب الحلزونى لمادة الدنا. ثم توالت بعد ذلك العديد من الاكتشافات الهامة وخصوصاً فى أواخر السبعينات وللآن. ويمكن تعريف الهندسة الوراثية بأنها العملية التى يتم بها نقل جين أو جينات من كائن حى لأخر بهدف الحصول على صفات وراثية مرغوبة ومعدلة يمكن الاستفادة منها فى وقت اسرع وبصورة أدق وتكلفة أقل (سلامة ١٩٩٩). ويطلق عادة لفظ عبر الجينية Transgenic على السلالات الميكروبية والنباتات أو الحيوانات التى تم بها أى تعديل وراثى لتحمل صفات وراثية جديدة من مصدر خارجى(Snyder and Champness, 1997). وعلى هذا فإن الهندسة الوراثية للأغذية تشتمل على نقل جينات من نباتات أو ميكروبات أو حشرات أو اسماك أو حيوان أو إنسان إلى الدنا الخاص بكائنات أخرى للحصول على نوعيات جديدة ذات صفات مميزة مرغوبة.



شكل (١). شجرة التكنولوجيا الحيوية (مأخوذ من Smith, 1996)

٢. ١. الهندسة الوراثية والانتخاب الطبيعى

مارس الإنسان منذ قديم الأزل عملية انتخاب السلالات الممتازة من النباتات والحيوانات على مدى أجيال طويلة تنتقى خلالها الأفراد الحاملة للصفات المرغوبة جيلا بعد جيل للوصول للهدف المنشود. وقد كانت هذه الطريقة ولاتزال قاصرة على الأنواع التى بينها قرابة وراثية ويتم خلالها أيضا نقل بعض الجينات لصفات غير مرغوبة هذا بالإضافة لجدولها الزمنى الطويل وذلك لطول زمن جيل Generation Time الحيوان والنبات. ولقد جاءت الهندسة الوراثية بميزة هامة وتخطت عقبة كبيرة لم تستطع وسائل الانتخاب الطبيعية تخطيها ألا وهى إمكانية نقل الصفات الوراثية المرغوبة بين كائنات حية لا يمكن حدوث تزاوج بينها بالطرق الطبيعية (غير متقاربة وراثيا) فمثلا تم نقل جين إنتاج الأنسولين من الإنسان إلى بكتريا القولون *Escherichia coli* لإنتاج هذا المركب صناعيا للاستخدام فى علاج مرض السكر (سلامة ١٩٩٩). ونظراً للزيادة الشديدة فى عدد سكان العالم مع عدم زيادة المساحات المزروعة لإنتاج الغذاء فإنه من الضرورى أن تكون هناك زيادة كبيرة فى الإنتاج الغذائى لتواجه الزيادة السكانية المطرده. ومع أن طرق الانتخاب الطبيعى المستخدمة حاليا مع غيرها من التكنولوجيا قادرة للآن فى سد الاحتياجات الغذائية لكنها فى المستقبل القريب لن تفى بذلك (Roller and Harlander, 1998) . ولذلك يرى العديد أن للهندسة الوراثية القدرة الهائلة على زيادة إنتاجية الأغذية وعلى إنتاج محاصيل فى أماكن يصعب زراعتها حالياً هذا بالإضافة لاسهامها الكبير فى توفير الاحتياجات العلاجية والكسائية والتخلص من النفايات المتزايدة فى عالم يهدده الانفجار السكانى والتصحر ونقص مصادر الطاقة (Roller and Harlander, 1998).

٢. ٢. تطبيقات عامة للهندسة الوراثية

توجد تطبيقات عديدة ومتنوعة للهندسة الوراثية فى نواحى الحياة المختلفة فهى تغطى مجالات الصحة والدواء والزراعة والأغذية والإنتاج الحيوانى والصناعة والبيئة وغيرها من التطبيقات.

٢. ٢. ١. الطب والأدوية : أدى التطور الكبير فى تقنيات الهندسة الوراثية إلى تطور كبير فى طرق التشخيص على المستوى الجينى والذى ساعد على دقة وسرعة الكشف عن الكثير من الأمراض الوراثية (سلامة ١٩٩٩). واستخدم أيضاً العلاج بالجينات Gene Therapy لتعديل أو تعويض بعض الجينات المعطوبة أو المفقودة مثل علاج مرض أدا (مستجير ١٩٩٨). وبالنسبة لمجال الأدوية فيوجد العديد من الأدوية المصنعة بواسطة الهندسة الوراثية ومن أهم هذه المنتجات

الدوائية الأنسولين لعلاج مرضى السكر حيث يصنع بواسطة بكتريا *E.coli* الحاملة لجين الأنسولين من مصدر بشرى (Russo and Cove, 1995).

٢.٢.٢. الزراعة والغذاء : تم فى هذا المجال استنباط أصناف جديدة من النباتات المتحملة للجفاف والملوحة والمبيدات والحشرات والأمراض الفطرية . كما تم الحصول على أصناف جديدة ذات انتاجيات عالية بل وتحتوى على قيم غذائية أفضل وجودة أعلى (Peters, 1993 و Glazer and Nikaido ,1995a و Wilkinson , 1997 و مستجير ١٩٩٨ و Liu, 1999) . وبالنسبة للمجال الحيوانى فقد تم استنباط حيوانات عبر جينية ذات كفاءة كبيرة فى النمو ومقاومة الأمراض واكثر إدراراً للألبان كما تم التمكن من زيادة محصول الصوف من الأغنام. كذلك استخدمت الحيوانات كوسيلة لإنتاج الأمصال واللقاحات بطريقة اقتصادية كما أن هناك العديد من الدراسات لإجراء تعديلات وراثية على ميكروبات الكرش بالمجترات وذلك لتحسين الاستفادة من العلائق مما يترجم إلى زيادة فى إنتاج اللحوم الحمراء (Tiwari and Kumar, 1995 و Thulasi and Sampath , 1997 و مستجير ١٩٩٨) كما تم تطوير العديد من السلالات الميكروبية ذات صفات فائقة للتصنيع الغذائى سواء فى مجال بادئات الألبان المتخمرة (Gireesh, *et al*.,1992 و David ,1993 و Garvey *et al* .,1996) أو سلالات لإنتاج الإنزيمات (Wuxiang and Jeyaseelan,1993 و Roller *et al*., 1994 و Roller and Goodenough,1998) أو لإنتاج الاحماض الامينية (Malumbres *et al*., 1994) ومركبات النكهة الطياره (Berger, 1994) وإنتاج خميرة الخباز (Wiemken, 1990 و Tuite, 1992) وغيرها من الأمثلة العديدة الأخرى.

٢ . ٢ . ٣. تنظيف البيئة : تم تطوير العديد من سلالات الكائنات الدقيقة فى مجال تنظيف وتطهير البيئة من الملوثات الصناعية ومن الأمثلة هنا معالجة مياه المجارى وتكسير بعض الملوثات الكيماوية مثل البنزين والزيلين و PCB وأيضاً إزالة المعادن الثقيلة من المجارى المائية وغيرها من الأمثلة (Glazer and Nikaido ,1995b و Chen and Wilson, 1997).

٢. ٣. طرق التحسين الوراثى للسلالات الميكروبية

أستخدمت التخمرات الميكروبية منذ قديم الزمن فى حفظ العديد من الأغذية مثل الألبان المتخمرة واللحوم والخضر والفاكهة ومنتجات الحبوب. تنتج الميكروبات سواء كانت بكتريا أو خمائر أو فطريات مدى واسعاً من نواتج التمثيل

الغذائى والتى قد تستخدم كمواد حافظة ، محسنة للقوام ، محسنة للنكهة أو مواد ملونة (Harlander, 1992 و Klijn *et al.*, 1995) . كذلك تستخدم العديد من السلالات الميكروبية لإنتاج العديد من الإنزيمات الهامة والبروتين الميكروبى Single Cell Protein والأدوية والمضادات الحيوية والأحماض العضوية والأحماض الأمينية والفيتامينات واللقاحات والسكرات العديدة Microbial Polysaccharids. وتعتبر بصفة عامة صناعة المشروبات الكحولية فى مقدمة الصناعات الكبرى المعتمدة على استخدام الميكروبات تليها صناعة الأجبان فالمضادات الحيوية والكحولات ثم صناعة المحاليل الغنية بالفركتوز High Fructose Syrups (Glazer and Nikaido,1995a)

وللوصول لمنتج افضل وباقتصاديات أقل فهناك دائما محاولات لتطوير السلالات الميكروبية المستخدمة وهناك العديد من الطرق التقليدية وغير التقليدية لتحسين الخصائص الوراثية لمثل هذه الكائنات ومنها.

- **التطفير** (Maloy *et al.*, 1997a, Barer, 1993)
- **النقل للجينات** (النقل بالفيروس أى الاستنقال Transduction ، التحول Transformation، الاقتران Conjugation و التثقيب الكهربائى Electroporation) (Maloy *et al.*, 1997a)
- **الهندسة الوراثية**

تمنح الهندسة الوراثية طريقة بديلة وفعالة لتحسين الصفات الوراثية للسلالات الميكروبية سواء بكتيريا أو خمائر أو فطريات المستخدمة كبادئات فى التخمرات الغذائية المختلفة. ولقد تم نتيجة للتطور السريع فى علم الوراثة تطوير واستحداث طرق لعزل ونقل جينات فى صورة منفردة بدقة وتحكم شديدين وبالتالى يمكن نقل جين صفة خاصة مرغوبة من أى كائن حى سواء نبات أو حيوان أو ميكروب أو فيروس أو غيرها لكائن أخر. وتعتبر الهندسة الوراثية ثورة فى تطوير وإنتاج سلالات ميكروبية فائقة القدرات مما يعود بالنفع على صناعة التخمرات الغذائية. وبالرغم من أن أكثر الأبحاث فى هذا المجال منذ أوائل السبعينات تتركز على استخدام بكتريا القولون *E.coli* السالبة لجرام إلا أن هناك تطور كبير فى استخدام بكتريا حمض اللاكتيك (Von Wright and Sibakov, 1998) وغيرها من الميكروبات ذات الأهمية الصناعية، فلقد تم تطوير العديد من الخلايا المستقبلة للجينات Host cells كما تم تطوير وبناء العديد من نواقل الجينات Vectors وكذلك تطوير واستحداث طرق فعالة وسريعة لنقل الجينات.

٢. ٤. أدوات الهندسة الوراثية

من الأشياء الضرورية والأولية للهندسة الوراثية لأى ميكروب هو معرفة أساسيات التمثيل الغذائى Metabolism والكيمياء الحيوية الخاصة به. بالرغم من معرفتنا بأهمية بعض الميكروبات المستخدمة كبادئات فى التخمرات الغذائية فإن معرفتنا عن تمثيلها الغذائى وتنظيمه Regulation وكذلك العلاقة التركيبية والوظيفية للجينات المسئولة عن مثل هذا التمثيل قليلة جدا (Harlander, 1992). تكون مثل هذه المعلومات من الأهمية بمكان لتحسين الصفات الوراثية لهذه السلالات وأيضا لضمان التعبير Expression اللازم لهذه الجينات المضافة وأداء دورها على أكمل وجه.

٢. ٤. ١. السلالات المستقبلة :

يجب اختيار السلالات التى سوف ينقل إليها الجينات الجديدة بعناية شديدة ويجب توافر الشروط التالية بها (Harlander, 1992) :

- خالية من البلازميدات لأن وجودها يتعارض مع القدرة على التعرف على نواقل الجينات من نوع البلازميد والحاملة للجينات المراد استحداثها.
- مدروسة وراثيا ومعروفة التركيب الجينى Genetic Mapping
- تستقبل الجينات الجديدة بسهولة Highly Transformable
- سهولة ارتباطها مع نواقل الجينات متعددة الأغراض Multifunctional Expression Vectors
- تساهم فى سهولة تعبير Expression الجينات المنقولة وسهولة الحفاظ عليها من جيل إلى جيل.
- أن تكون من السلالات المسموح باستخدامها غذائيا Food Grade إذا كانت سوف تستخدم فى مجالات غذائية بأى صورة.

٢. ٤. ٢. ناقلات الجينات Vectors

ويمكن تعريف الناقل Vector بأنه الوسيلة التى يتم عن طريقها نقل الدنا من سلالة بكتيرية لأخرى (Snyder and Champness, 1997) ومن الضرورى توافر بعض الصفات بالناقل (Brock *et al.*, 1984) مثل :

- القدرة على التضاعف وتكوين نسخ متطابقة Replication
- سهولة حمله للدنا المرغوب نقله على مواضع مختلفة Multiple Cloning Sites
- صغير الحجم - سهولة ادخاله للخلايا البكتيرية المستقبلة.

- إحتواءه على واسمات خاصة Markers لسهولة الكشف عنه داخل الخلايا المستقبلة.

ويوجد عادة نوعان من النواقل :

أ- بلازميد Plasmid Vectors ب- بكتريوفاج Phage Vectors

وغالباً ما تستخدم الناقلات من نوع البلازميد حيث أن دناها دائرى صغير الحجم ولها القدرة على التضاعف خارج الكروموسوم كما أنها سهلة العزل وسهل التعرف عليها. والكثير من البلازميدات الموجودة بالطبيعة لا ترتقى لتصبح ناقلات ولذا تستخدم الهندسة الوراثية أيضاً لبناء ناقلات متعددة الأغراض Multifunctional Vectors وبالنسبة للناقلات المستخدمة لتطوير السلالات الميكروبية المختلفة والمستخدمة لأغراض غذائية لا بد أن تكون محضرة من سلالات مسموح باستخدامها غذائياً Food Grade Microorganisms ولا تحتوى على تركيبات خاصة بمقاومة المضادات الحيوية Antibiotic Resistance Markers (Harlander, 1992). ومن الممكن أيضا تحضير ناقلات للجينات بطرق بديلة وذلك عن طريق اجزاء مستقيمة من الدنا والتى لها القدرة على الاندماج المباشر مع الدنا الكروموسومى للخلايا المستقبلة وبالرغم من أن عملية الانتقال تكون بمعدلات بطيئة إلا أن ثبات الصفة المنقولة يكون أعلى حيث أن الارتباط مع الدنا الكروموسومى وليس البلازميد (Harlander, 1992).

والسؤال الآن كيف يتم فصل جين خاص من الدنا المحيط به ؟ وكيف يمكن ربطه بالناقل ؟ ثم كيف يمكن دمجه مع الدنا للخلايا الميكروبية المستقبلة ؟ ويمكن إجراء مثل هذه الخطوات باستخدام إنزيمات تقطيع خاصة تسمى Restriction Enzymes or Endonucleases .

٢ . ٤ . ٣. إنزيمات القطع أو بتر الدنا Restriction Enzymes or Endonucleases

هى مجموعة الإنزيمات المتخصصة فى قطع الدنا عند مواقع خاصة recognition sequences ويتعرف عليها الإنزيم عن طريق الترتيب المميز للقواعد النتيروجينية على الدنا ويتم القطع فى مكانين (قطع بكل شريط من شريطى الدنا) ويوجد حوالى ١٠٠٠ نوع من هذه الإنزيمات وتم عزلها وتنقيتها من مئات من الكائنات الحية وتتم تسمية هذه الإنزيمات بواسطة اختصار اسم الكائن الحى الذى تم منه العزل بالإضافة لتوضيح السلالة ورقمها (Maloy *et al.*,1997b). ويوجد ثلاثة أنواع من هذه الإنزيمات I و II و III والنوع الأول والثالث ليس لهما أهمية فى هذا المجال أما النوع الثانى فهو من أهم

أدوات الهندسة الوراثية. هناك نوعان من القطع يمكن التعرف عليهما بعد المعاملة بهذه الإنزيمات :

- القطع الذى ينتج عنه أطراف لزجة Cohesive or Sticky End Molecules ومثال ذلك إنزيم *Eco* RI.
- القطع الذى ينتج عنه أطراف مستوية Flush or Blunt End Molecules ومثال ذلك إنزيم *Hae* I.

ويبين الجدول رقم (١) بعض الإنزيمات الهامة ومصدرها وأماكن تخصصها على الدنا. ويبين الشكل رقم (٢) نوعى القطع ويتبين أن الإنزيمات التى تسبب تكوين الأطراف اللزجة يكون القطع على جانبى محور تماثل القواعد النيتروجينية. أما الإنزيمات التى تكون الأطراف المستوية فيكون القطع على محور التماثل نفسه (Maloy *et al.*, 1997$_b$).

٢. ٤. ٤. وصل (لصق) جزئيات الدنا

وتعتبر عملية وصل جزئيات الدنا معا من أهم العمليات أو الخطوات اللازمة لاتمام نقل الجينات فهى مثلا ضرورية لربط جين معين أو جزىء من الدنا (بعد قطعه بواسطة إنزيمات القطع Endonucleases) بالناقل Vector الذى بدوره سوف ينقله للخلايا المستقبله وعادة يتم الوصل بطريقتين:

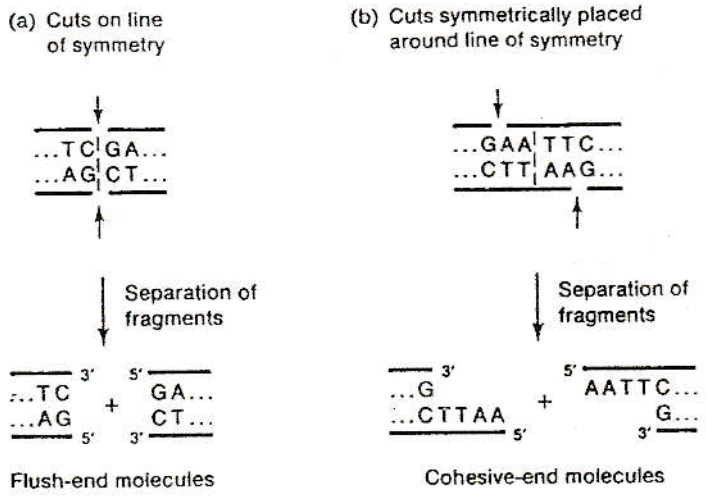
- الأطراف اللزجة Sticky Ends لجزيئات الدنا يتم عادة ربطها بأطراف أخرى لها تركيب مكمل Complementary لها عن طريق تكوين روابط ايدروجينية وهذا الربط من الممكن تدعيمه بواسطة فعل إنزيمات ربط خاصة تسمى ليجيز DNA Ligase وهى تقوم بتكوين رابطة فوسفاتية ثنائية الاستر.
- الأطراف المستوية Blunt End لجزيئات الدنا فيتم ربطها مباشرة بإنزيمات الليجيز Ligase.

ويمكن توضيح إستعمال إنزيمات القطع واللصق كما فى المثال التالى (شكل ٣) وفيه يتم عزل بلازميد من بكتريا *E.coli* ويعامل بإنزيمات القطع الخاصة ليحول هذا البلازميد الدائرى إلى قطعة دنا مستقيمة لزجة الأطراف لتستخدم كناقل لجين من ميكروب أخر. يتم قطع الجين أو الجزء من الدنا الحامل له و الخاص بالصفة المراد نقلها بواسطة نفس الإنزيم لينتج عن هذه الخطوة أيضا جزىء دنا مستقيم ذو أطراف لزجة لها تركيب مماثل لترتيب القواعد النيتروجينية بالناقل. وعند الخلط يحدث إرتباط تكاملى بين جزىء الدنا مع الناقل. وباستخدام إنزيمات اللصق Ligase يتم تثبت التركيب ويعود البلازميد مرة أخرى للشكل الكروى الدائرى ولكن حاملا لجين جديد معه (Maloy *et al.*, 1997$_b$).

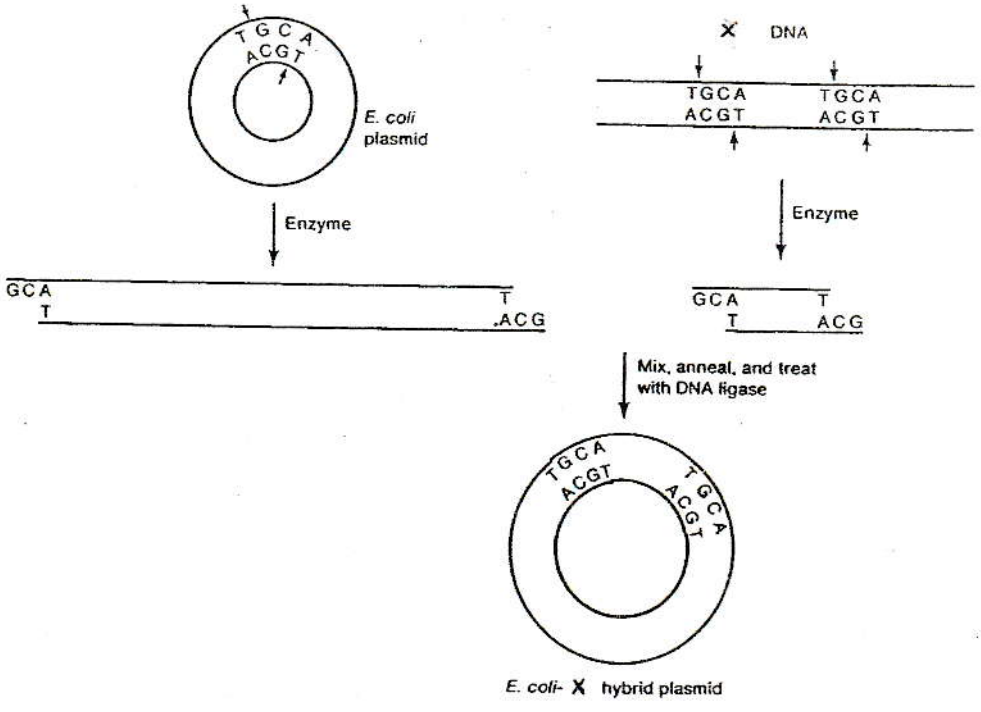
Microorganism	Name of enzyme	Target sequence and cleavage sites
Generates cohesive ends		
E. coli	*Eco*RI	G↓A A T T C C T T A A↑G
Bacillus amyloliquefaciens H	*Bam*HI	G↓G A T C C C C T A G↑G
B. globigii	*Bgl* II	A↓G A T C T T C T A G↑A
Haemophilus aegyptius	*Hae*II	Pu G C G C↓Py Py↑C G C G Pu
Haemophilus influenza	*Hind*III	A↓A G C T T T T C G A↑A
Providencia stuartii	*Pst* I	C T G C A↓G G↑A C G T C
Streptococcus albus G	*Sal* I	G↓T C G A C C A G C T↑G
Thermus aquaticus	*Taq*I	T↓C G A A G C↑T
Generates blunt ends		
Brevibacterium albidum	*Bal* I	T G G↓C C A A C C↑G G T
Haemophilus aegyptius	*Hae*I	(A/T) G G↓C C (T/A) (T/A) C C↑G G (A/T)
Serratia marcescens	*Sma* I	C C C↓G G G G G G↑C C C

Note: The vertical dashed line indicates the axis of dyad symmetry in each sequence. Arrows indicate the sites of cutting. The enzyme *Taq*I yields cohesive ends consisting of two nucleotides, whereas the cohesive ends produced by the other enzymes contain four nucleotides. The enzyme *Hae*I recognizes the sequence GGCC whether the adjacent base pair is A·T or T·A, as long as dyad symmetry is retained. Pu and Py refer to any purine and pyrimidine, respectively.

جدول (١). أنواع من إنزيمات بتر الـــدنا وأماكن تخصصها (مأخوذ من Maloy *et al.*,1997$_b$)



شكل (٢). أنـواع البتـر فى الـدنا باستخـدام انزيمـات البتـر (القطع)
(مأخوذ من Maloy *et al.*, 1997b)



شكل (٣). كلونة جين (x) على ناقل من نوع البلازميد (مأخوذ من Maloy *et al.*, 1997b)

٢ . ٤ . ٥. نقل الجين إلى الميكروب المستقبل

ينقل الجين الحامل للصفة الوراثية المرغوبة للميكروب المستقبل وذلك بعد عزل هذا الجين ودمجه مع ناقل مناسب فى أنبوبة اختبار. وحيث أن الناقل المحتوى على الجين المراد نقله يعتبر فى صورة حرة فإنه من السهل استخدام طرق مثل التثقيب الكهربائى لنقل هذا الدنا المطعوم للميكروب المستقبل وممكن الحصول على معدلات نقل عالية > ١٠^٤ – ١٠^٥ لكل كجم دنا (Harlander, 1992).

٢. ٤. ٦. تعبير الجين Gene Expression

ليس من الضرورى أن يؤدى نقل جين لميكروب مستقبل لظهور صفات هذا الجين فى الميكروب الجديد ولكى تكون عملية النقل جيدة ومتكاملة يجب نقل أجزاء أخرى من الدنا والتى تتحكم فى عمل الجين المنقول وتشمل هذه الأجزاء.

- البادىء Promoter وهو عبارة عن ترتيب خاص بالقواعد النيتروجينية ويرتبط به إنزيم بلمرة الرنا RNA Polymerase حيث تبدأ عملية النسخ Transcription لتكوين رنا حامل الرسالة m RNA من احدى شرائط الدنا.
- الناهى Terminator وهو أيضا عبارة عن ترتيب خاص بالقواعد النيتروجينية توجد بعد الجين مباشرة وعندها يتم إنهاء عملية النسخ . وعليه فمن الضرورى عند اجراء عملية نقل لجين معين أن يتم نقله مع بادىء قوى Strong Promoter و ناهى ويتم نقل المجموعة معا للبكتريا المستقبلة لضمان تعبير الجين بالميكروب الجديد. ويبين الشكل رقم (٤) خريطة توضيحية للجين التركيبى Structural Gene للاكتوز فى *E.coli* مع الاجزاء التى تتحكم فى فعل هذا الجين Control Sites وتسبقها الجين التنظيمى i الذى يقوم بإعطاء الضوء الأخضر أو الأحمر لعمل الجين (Stryer, 1981). يقوم الجين التنظيمى بتكوين بروتين مثبط يلتصق بالجين O (Operator) فى اوبرون اللاكتوز وبالتالى يمنع مرور وانتقال إنزيم بلمرة الرنا RNA Polymerase من الجين البادىءP (Promoter) لباقى الجين Structural Gene مانعا بذلك عملية النسخ Transcription ويمكن إلغاء هذا التثبيط بإضافة مادة محفزة Inducer لها جاذبية شديدة للبروتين المثبط فيلتصق بها تاركا الموقع O خالى فتتم عملية النسخ. يجب بالتالى نقل كلا من جين الـ Operator والجين البادىء Promoter مع الجين التركيبى للصفة المراد نقلها ويفضل عدم نقل الجين التنظيمى حيث أن عدم وجوده يعطى الضوء الأخضر تجاه استمرار عملية النسخ (Stryer, 1981).

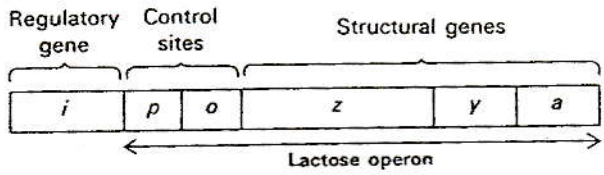
٢ . ٤ . ٧. عزل الخلايا الميكروبية الحاملة للجين الجديد

توجد العديد من الطرق الحساسة جداً للكشف عن الميكروبات المستقبلة الحاملة للصفات الجديدة المنقولة. ومن أهم هذه الطرق طريقة التهجين (إعادة التحام شريطى الدنا) Hybridization. وفى هذه الطريقة يتم الكشف عن ترتيب القواعد النيتروجينية المميزة للجين المضاف أو جزء منه عن طريق استخدام مسبر Probe خاص وهو عبارة عن تركيبة مكملة Complementary لقواعد الجين وتكون مميزة بعنصر مشع مثل الفوسفور ٣٢ (P^{32}) وفى هذه الطريقة (شكل رقم ٥) يتم نقل المجاميع البكترية المزروعة من طبق النمو إلى ورق نيتروسليلوز وتعامل بالقلوى لتحويل الدنا الحلزونى إلى شريطين منفصلين ثم يغمر بالمسبر المشع حيث يرتبط مع تركيب القواعد المكملة له إن وجدت بالبكتريا الحاملة للجين الجديد. وبعد الغسيل لإزالة الزيادة من المسبر ثم التجفيف يتم التعريض لفيلم حساس Autoradiography حيث يظهر الميكروب الحامل للصفة الجديدة كبقعة سوداء. يعزل هذا الميكروب وينمى للحصول على نسخ عديدة للجين المنقول أو نواتجه المرغوبة (Maloy *et al.*, 1997_b).

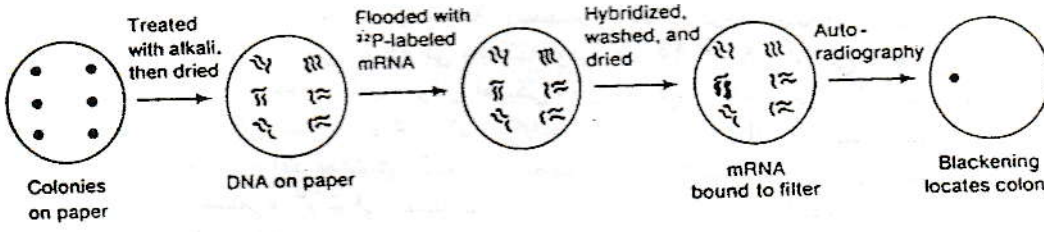
يطلق بصفة عامة مصطلح كلونة الجينات Gene Cloning على العملية التى يتم بها عزل جين من ميكروب معين ثم دمجه مع ناقل وإدخال الناقل بعد ذلك للخلايا المستقبلة حيث يمكن إنتاج هذا الجين بعد ذلك بكميات كبيرة (شكل رقم ٦). يعتبر إنزيم بلمرة الدنا DNA Polymerase من الإنزيمات الهامة فى مجال الهندسة الوراثية ويستخدم فى إجراء تقنية عالية تسمى (PCR) Polymerase Chain Reaction حيث يتم خلالها إنتاج نسخ عديدة لتركيبة خاصة من قواعد الدنا أو الرنا وممكن إيصالها إلى ١٠ ٦ ضعف. من هنا نجد أنه بعد إجراء عملية كلونة جين معين فى بكتريا مستقبلة فإنه يوجد فى صورة وحيدة وهذا فى حد ذاته إنجاز كبير ولكن باستخدام PCR يمكن استنساخ العديد من النسخ من هذا الجين و بالتالى زيادة الإنتاجية للعديد من المرات . (Maloy *et al.*,1997_b)

٣. تطبيقات الهندسة الوراثية فى مجال تحسين صفات السلالات الميكروبية الهامة للتصنيع الغذائى

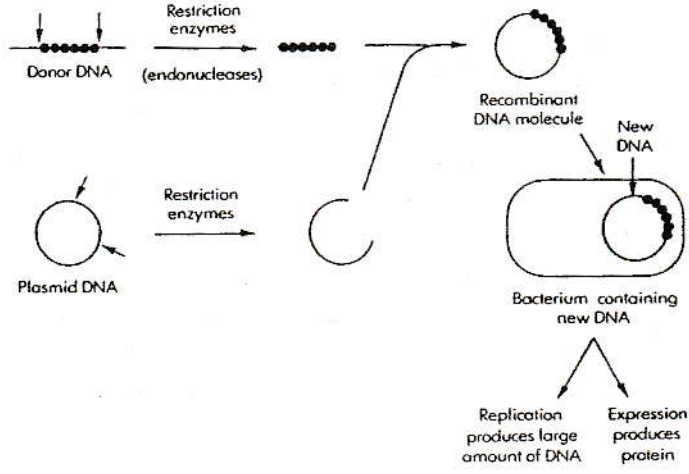
يمكن باستخدام الهندسة الوراثية إنتاج سلالات ميكروبية جديدة شبيهة بالآباء ولكنها تختلف عنها فى التركيب الجينى حيث يتم دمج جين أو أكثر حامل لصفة مرغوبة من ميكروب أخر وتنقل للخلايا المستقبلة عن طريق ناقل خاص فنحصل على سلالات ذات صفات خاصة ومرغوبة. ومن أهم المجالات التى تم تطوير سلالاتها باستخدام الهندسة الوراثية هى : سلالات لإنتاج الإنزيمات



شكل (٤). خريطة اوبيرون اللاكتوز مع الجين التنظيمى له (مأخوذ من Stryer, 1981)



شكل (٥). عزل الخلايا الميكروبية الحاملة لجين جديد باستخدام طريقة تطعيم الدنا Hybridization (مأخوذ من Maloy *et al.*, 1997b).



شكل (٦). استخدام الهندسة الوراثية لإنتاج سلالة ميكروبية تحتوى على جين من سلالة أخرى.
(مأخوذ من Pelczar Jr, *et al.*, 1988)

الغذائية ، بادئات للصناعات اللبنية، سلالات لإنتاج الأحماض العضوية ، سلالات لإنتاج بعض المضافات الغذائية و سلالات خميرة الخباز.

٣. ١. سلالات لإنتاج الإنزيمات الغذائية

تم دراسة الآلاف من الإنزيمات فى مختلف المجالات العلمية ولكن ٢٠ إنزيم منها فقط يتم استخدامها صناعيا و بكميات كبيرة (Roller and Goodenough, 1998). أصبح استخدام الإنزيمات كمساعدات فى الإنتاج الغذائى صناعة كبرى خلال الثلاثين عاما الماضية. ويبين جدول رقم (٢) الإنزيمات الغذائية شائعة الاستخدام ومادة التفاعل الخاصة بها وتطبيقاتها فى المجال الغذائى إضافة إلى مبيعاتها. وفى عام ١٩٩٥م كان إجمالي قيمة الإنزيمات المباعة حوالى بليون دولار أمريكى ومن المتوقع أن تصل إلى ١,٧ بليون دولار أمريكى بحلول عام ٢٠٠٥م (Godfrey and West, 1996). ابتدأ التطور فى صناعة الإنزيمات فى الخمسينات حيث انتشر استخدام المزارع المغمورة المستمرة. ثم تم فى السبعينات تطوير تقنية جديدة وهى استخدام الإنزيمات المحمولة على مواد دعامية Immobilized Enzymes فى مفاعلات خاصة للإنتاج المستمر كاستخدام إنزيم الجلوكوز ايزوميريز للإنتاج المستمر للمحاليل الغنية بالفركتوز. ثم جاء التطور الهائل للهندسة الوراثية لاستنباط سلالات ذات صفات إنتاجية عالية وجديدة (Roller and Goodenough, 1998). ومن أهم أمثلة الإنزيمات التى تم تطوير إنتاجها باستخدام الهندسة الوراثية إنزيم الكيموسين Chymosin و إنزيم الجلوكوز ايزوميريز Glucose isomerase.

٣. ١. ١ إنزيم الكيموسين

يعتبر أهم الإنزيمات المستخدمة فى الصناعات اللبنية ويستخدم فى تخثر بروتين اللبن أثناء صناعة الأجبان (Milk Clotting Enzyme). يعرف هذا الإنزيم أيضا باسم الرنين أو الرينت (Rennin or Rennet) ويستخلص عادة من المعدة الرابعة للعجول الرضيعة. يوجد عادة الكيموسين (E.C 3.4.23.4) مخلوطا بنسب مختلفة مع إنزيم الببسين (E.C 3.4.23.1) وذلك حسب عمر الحيوان. يفضل فى صناعة الأجبان استخدام الكيموسين لأن وجود الببسين يؤدى لوجود بعض الطعم المر فى الأجبان (Roller and Goodenough, 1998). ونظرا للزيادة الكبيرة فى إنتاج الاجبان مع النقص فى أعداد العجول المذبوحة فإن هناك عجز فى كميات إنزيم الكيموسين عالى الجودة والمطلوبة لإنتاج مثل هذه الاجبان (Roller *et al.*,1994). أدت مثل هذه الفجوة إلى الاتجاه لإنتاج هذا الإنزيم باستخدام الكائنات

Enzyme group	Common name	Substrates	Principal applications	World sales in 1990 (millions of US $)
Proteases	chymosin (animal and microbial)	milk protein	milk coagulation in cheese manufacture	75
	papain	vegetable proteins, meat	protein hydrolyzates, yeast extracts, meat tenderization	8
	trypsin	vegetable proteins, meat	protein hydrolyzates	8
Carbohydrases	amyloglucosidase	starch	sweetening syrups	75
	α-amylase	starch	sweetening syrups, maltodextrins	50
	invertase	sucrose	soft-centred chocolates	8
	pectinase	pectin	fruit juices	7
Isomerases	glucose isomerase	glucose	high fructose corn syrup (HFCS)	40
Others	β-glucanase	glucans	wine	20
	cellulase	cellulose	fruit juices	
	dextranase	dextran	sugar beet processing	
	glucose oxidase	glucose	treatment of egg whites	
	hemicellulase	hemicellulose	fruit juices, bread	
	lactase	lactose	hydrolysis of lactose	
	lipase	plant lipids	interesterification	
	pullulanase	starch	HFCS	

جدول (٢). الانزيمات الغذائية الشائعة – إستخداماتها ومبيعاتها

(مأخوذ من Roller and Goodenough, 1998)

الحية الدقيقة المهندسة وراثياً GMM ولقد تم بنجاح كلونة جين الكيموسين من العجول إلى البكتريا *E.coli* والخميرة *Kluyveromyces lactis* والفطر *Aspergillus niger var. awamori*.

ويتم حالياً استخدام هذه الإنزيمات صناعياً على نطاق واسع. فمثلاً تقوم شركة Pfizer بإنتاج هذا الإنزيم تحت اسم تجارى Chy–Max باستخدام *E.coli* المهندسة وراثياً. أما شركة Gist – Brocades فتنتجه تحت إسم Maxiren باستخدام الخميرة *Kluyveromyces lactis*. وأخيراً تنتج شركة Genecor الكيموسين تحت اسم Chymogen باستخدام فطر *Aspergillus niger var. awamori* (Heinsohn and Wegstein, 1990 و Roller and Goodenough, 1998). وينتج الإنزيم بواسطة بكتريا القولون *E.coli* فى صورة حبيبات مترسبة غير ذائبة وعليه فيجب معاملة الإنزيم بطرق خاصة لجعله فى صورة ذائبة ونشطة. ومن عيوب استخدام هذا الميكروب أنه من الميكروبات غير المسموح بتواجدها بالأغذية لارتباطها باحتمال إنتاج بعض السموم. ووجودها بصفة عامة يدل على عدم توافر الشروط الصحية اللازمة أثناء الصناعة. ومع ذلك ينتج هذا الإنزيم من هذا الميكروب صناعياً (FDA, 1990) مع إجراء عمليات تنقية عالية له (Heinsohn and Wegstein , 1990 و Roller and Goodenaugh, 1998).

أما إنزيم الكيموسين من *Kluyveromyces lactis* فلا توجد مشكلة فى استخدام الخميرة المستقبلة لجين الكيموسين حيث انها من الميكروبات المسموح باستخدامها فى الأغذية (FDA, 1984 and 1992). بالإضافة إلى أن الإنزيم يفرز من الخلايا فى صورة نشطة. ومن أهم مميزات هذا الإنزيم أن تعبيره ثابت جداً حيث انه تم دمج جين الإنزيم المحمول على ناقل بلازميدى فى كروموسوم الخميرة.

يعتبر فطر الاسبرجلس *Aspergillus niger var. awamori* من الفطريات المسموح بها غذائياً (Heinsohn and Wegstein 1990) . تم فى هذه الحالة إفراز الإنزيم فى صورة نشطة وبكميات كبيرة جداً وكما هو الحال فى استخدام الخميرة فإن جين الكيموسين يتم دمجه بكروموسوم الفطر فيكون الثبات الكبير فى تعبيره.

ولقد تم دراسة إنتاج العديد من الأجبان باستخدام الكيموسين المطعم Recombinant Chymosin. لم يكن هناك ثمة فروق مع الأجبان المنتجة بواسطة الكيموسين الحيوانى من النواحى التصنيعية والتركيب الكيماوى والميكروبى بالإضافة للصفات الطبيعية للأجبان المنتجة(Broome and Hickey, 1990 و Barbano and Rasmussen, 1991) . وقد وجد أيضاً عدم وجود أية

فروق تركيبية بين الإنزيم المنقى من *Kluyveromyces lactis* والإنزيم الحيوانى. كما أظهرت الدراسات التشابه التام بين الإنزيم من المصدر الميكروبى والحيوانى عند دراسة بلورات الإنزيم بأشعة إكس X-ray Crystalography (Roller and Goodenough, 1998) . كما تساوى تأثير كل من الحرارة ودرجة الاس الهيدروجينى والحساسية للكالسيوم لكل من الإنزيمين (McCaman *et al.*, 1985). وقد درست أيضا سمية هذا الإنزيم ووجد ان استهلاك بمعدل ٥جم كيموسين/كجم من وزن الفئران لم تظهر أعواض تسمم لفئران التجارب. كما أظهر الإنزيم نتيجة سالبة عندما اختبر كمادة مطفرة Mutagenic substance . كانت اختبارات الحساسية الناتجة عن استهلاك هذا الإنزيم افضل من نظيرتها للإنزيم من المصدر الحيوانى (Roller *et al.*, 1994). ونتيجة لأن الإنزيم المنتج بواسطة الميكروبات سواء كان *E.coli* أو *K.lactis* أو *Aspergillus niger var. awamori* أظهر أمانا تاما عند الاستخدام كما أوضحنا سالفا فإن الكيموسين المنتج بواسطة الميكروبات مسموح باستخدامه صناعيا بالولايات المتحدة الأمريكية والعديد من الدول الأوروبية ولا يتطلب استخدامه الإشارة لذلك على بطاقات العبوات المستخدمة.

٣. ١. ٢. إنزيم الجلوكوز ايزوميريز

تعتبر صناعة تحويل النشا ثانى اكبر صناعة مستهلكة للإنزيمات وذلك بعد صناعة المنظفات. وتعتبر المحاليل الغنية بالفركتوز High fructose syrups أهم ناتج لصناعة تحويل النشا. ويتم التحويل باستخدام الألفا اميليز والجلوكو اميليز ثم الجلوكوز ايزوميريز (Roller and Goodenough, 1998). ويعتبر إنزيم الجلوكوز ايزوميريز من أهم الإنزيمات المستخدمة صناعيا لإنتاج المحاليل الغنية بالفركتوز والمستخدمة فى العديد من الصناعات الغذائية. و يقوم هذا الإنزيم بتحويل سكر الجلوكوز إلى سكر الفركتوز وبالتالى يتم تحويل سكر أقل ثمنا وأقل حلاوة إلى سكر الفركتوز الأكثر ثمنا والأكثر حلاوة (Bazaraa and Hamdy, 1988 و Bazaraa and Hassan, 1996). هناك العديد من الأبحاث لتطوير إنتاج هذا الإنزيم الهام وتحسين صفاته مثل إنتاج سلالات تكون المادة المحفزة Inducer لها سكر الجلوكوز بدلا من الزيلوز أو إنتاج سلالات تنتج الإنزيم بصورة مستمرة Constitutively وليس عن طريق التحفيز Induction. وقد تم تحضير سلالة من *Actinoplanes missouriensis* والتى تقوم بإنتاج الإنزيم بدون تحفيز (Bhosale *et al.*, 1996) . ويتم عادة التعرف على جين الجلوكوز ايزوميريز GI وعزله ثم دمج عدة نسخ منه على ناقل ذى بادىء Promoter فعال مثل *Lac, tac or* P_L ثم النقل لميكروبات

مستقبلة بهدف زيادة إنتاج الإنزيم عن طريق زيادة عـــدد نســخ الجيــن Gene Dossage Effect . وقد تمكن العالمان Ho and Stevis (1985) من زيـــادة إنتاج الإنزيم ٢٠ مرة عن طريق كلونة جين GI فى ميكـروب *E.coli* . كمـا تمكن Kho (1984) من زيادة إنتاج الإنزيم لأكثر من ٥٠ مرة عند نقل جين GI من *Streptomyces phaeochromogenes* إلى *Streptomyces lividans*. لقد تم كلونة جين GI من أحد أنواع *Bacillus* المحبـــة للحـــرارة فـــى *E.coli* (Wuxiang and Jeyaseelan, 1993) وكان الإنزيم الناتج نشط جـــدا علـــى ٨٥°م. كما تمكن Lee *et al.* (1990). من كلونة جين GI المقاوم للحرارة مـــن *Clostridium thermosulfurogenes* فى *E.coli* وتم الحصول على إنتاجيـــة عالية جدا بالإضافة لتحويل نظام إنتاج الإنزيم من التحفيز إلى الطريقة المستمرة. توجد بالإضافة للأبحاث العديدة فى هذا المجـــال (Dekker *et al.*, 1991 و Bor *et al.*, 1992 و Bejar *et al.*, 1994) بعض الأبحاث المثيرة لنقل جيـــن GI إلى الخمائر حيث أن هناك العديد من الكائنات الحية الدقيقة تستطيع اســـتخدام الزيلوز ولكنها لا تخمره أو تحوله إلى كحول ايثانول. وحيث أن الزيلوز منتشـــر بكثرة فى الطبيعة (بعد الجلوكوز) وعلى هذا الأساس فوجود جين GI بـــالخميرة قد يلعب دورا هاما فى إنتاج الكحول من الخمـــائر باســـتخدام الزيلـــوز (Amore *et al.*, 1989 و Chan *et al.*, 1989). هذا وتوجد بـــالفعل بعـــض الإنزيمات المستخدمة حاليا صناعيا والمنتجة بواسطة ميكروبات معدلة وراثيا مثل إنزيم اسيتولاكتات ديكاربوكسيليز وإنزيم مالتوجينيك ألفا اميليز والبعض الأخر فى الطريق للتطبيق الصناعى بعد الحصول على الموافقات الخاصـــة مثـــل إنزيـــم الزيلانيز والهيميسيليوليز واللييز (Roller and Goodenough, 1998).

٣ .٢. بادئات الصناعات اللبنية

تعتبر البادئات الميكروبية من أهم العناصر فى صناعة الألبان المتخمـــرة مثل الأجبان والزبادى والألبان الرائبة والكريم الحـــامض.... الـــخ. إن الـــدور الأساسي لهذه الميكروبات هو تحويل سكر اللاكتوز إلى حمض اللاكتيـــك الـــذى يلعب دورا حافظا ضد العديد مـــن الميكروبـــات المســـببة للفســـاد بالإضافـــة للميكروبات المرضية. كما أن الانخفاض فى درجة الأس الـــهيدروجينى نتيجـــة لإنتاج حمض اللاكتيك تؤثر على خروج الماء من الخثرة المتكونة. هذا بالإضافـــة لإنتاج العديد من مركبات التمثيل الثانوية Secondary Metabolites والتى لها دور كبير فى تطور نكهة المنتجـــات اللبنيـــة (Hill and Ross, 1998). وتعتبر البادئات البكتيرية المستخدمة فى الصناعات اللبنية من مجموعة البكتريـــا

المنتجة لحمض اللاكتيك Lactic Acid Bacteria (LAB) وهذه المجموعة تشمل ١٢ جنسا ومن أهمها للتخمرات اللبنية: *Lactococcus* و *Leuconostoc* و *Streptococcus* و *Enterococcus* و *Lactobacillus* (Pot and Ludwig, 1994). ويعتبر جنس الـ *Lactococcus* أهم الأجناس التى تمت دراستها (Hill and Ross, 1998). وهناك خمسة أنواع من الـ *Lactococcus* وهى *L.garvieae* , *L.raffinolactis* ,*L.plantarum* , *L.piscium* ،*L.lactis* ويعتبر *L.lactis* فقط المستخدم فى الصناعات اللبنية (Rodrigues *et al.*, 1991). تعتبر إصابة البادئات بالبكتريوفاج من أهم المشاكل فى التخمرات اللبنية والتى يتسبب عنها خسائر إقتصادية عالية. هذا بالإضافة إلى أن هناك بعض المشاكل التى تواجه البادئات مثل اختفاء بعض الصفات الهامة (Hill and Ross, 1998). وعلى هذا الأساس تم توجيه العديد من الأبحاث لتطوير وتحسين السلالات المستخدمة كبادئات ومن أهم هذه الطرق استخدام الهندسة الوراثية فى :

٣. ٢. ١. إنتاج بادئات مقاومة للإصابة بالبكتريوفاج : يوجد طبيعيا بالـ Lactococci ثلاث ميكانيكيات لمقاومة البكتريوفاج.

- **البتر والتعديل Restriction and Modification** : حيث يوجد بالبكتريا إنزيمات بتر خاصة تتعرف على الدنا الغريب (الفاج) وتقوم إنزيمات التعديل بتمييز الدنا للبكتريا (Hill, 1993).
- **الإصابة المجهضة Abortive Infection**: يتم فى هذه الميكانيكية تقليل الأعداد الناتجة من الفاج الناتج بعد مهاجمة البكتريا وهنا تقل سرعة استنساخ الفاج داخل الخلية (Sing and Klaenhammer, 1990).
- **منع الالتصاق Prevention of Phage Adsorption** : يصعب فى هذه الميكانيكية على الفاج الالتصاق بالخلية البكترية، بالتالى لا يتمكن من حقن مادته الوراثية للبكتريا (Sanders, 1988) .

وقد تم التعرف على العديد من الجينات الحاملة لهذه الميكانيكيات وتم كلونتها فى العديد من السلالات الصناعية (Sanders *et al.*, 1986 و Klaenhammer, 1991 و Kim et al., 1992) ولكن وبالرغم من استخدام مثل هذه السلالات صناعيا فمن المتوقع جدا ظهور سلالات من الفاج الذكية والتى تحور من نفسها وتستطيع إصابة البادئات وهنا يكون دور الهندسة الوراثية فقط فى إطالة الفترات التى يعمل فيها البادىء دون إصابة (Hill *et al.*, 1991).

٣. ٢. ٢. إنتاج سلالات ذات نشاط عالى فى تحليل البروتين Proteolysis

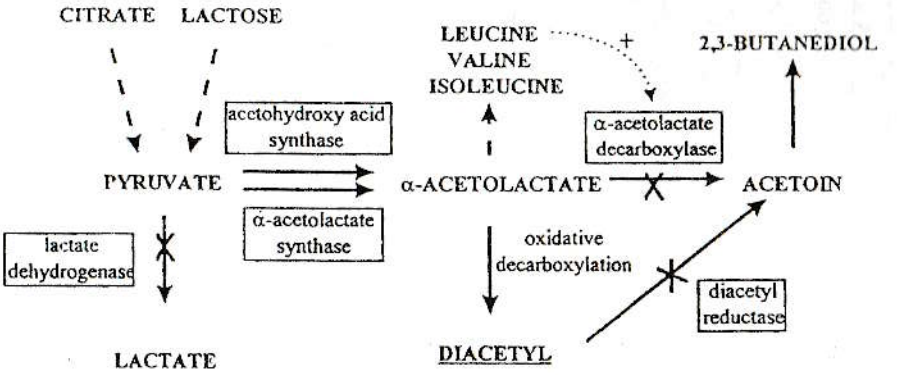
حيث أن كمية النيتروجين الحر باللبن محدودة وتستهلك بسرعة فإن نمو الـ *Loctococcus* يعتمد على قدرتها فى تحليل بروتينات اللبن. وبصفة عامة تعتبر هذه الميكروبات ضعيفة فى تحليل البروتين. وقد درس Kok (1993) الأنظمة الجينية المتحكمة فى إنتاج الإنزيمات المحللة للبروتين مثل Proteases و Peptidases فى الـ Lactococci وأوضح أن هذه الإنزيمات ضرورية لنمو الميكروب باللبن إضافة لأهميتها الكبيرة فى تطوير إنتاج مركبات النكهة بالجبن. وقد وجد أن نقص هذه الإنزيمات يؤدى إلى ظهور مرارة بطعم الأجبان الناتجة. وقد تم كلونة مثل هذه الجينات فى سلالات من *Lactococcus* وتم تحسين النشاط الإنزيمي لها (Leenhouts *et al.*, 1991 و Venema, 1993).

٣. ٢. ٣. إنتاج سلالات فائقة القدرة على إنتاج مركبات النكهة

يعتبر مركب الداى اسيتيل من مركبات النكهة الأساسية بالألبان المتخمرة وينتج بواسطة بكتريا اللاكتوكوكس *Lactococcus lactis subsp lactis var. diacetylactis*. ويعتبر إنزيم سترات البرمييز Citrate Permease الذى يساعد على نفاذية ودخول السترات للخلايا من العوامل الأساسية فى دورة تخليق مركب الداى اسيتيل. وجد أن نقل جين إنزيم Citrate Permease لبعض سلالات الـ Lactococci أدى لزيادة إنتاج هذا المركب (Kempler and Mckay, 1981). كما يمكن أيضا التحكم فى إنتاج الداى اسيتيل عن طريق التحكم فى الإنزيمات المشتركة فى دورة تخليق هذا المركب (شكل رقم ٧). وقد تم كلونة جين α- Acetolactate Synthase فى *Lactococcus lactis* مما أدى لزيادة إنتاج الداى اسيتيل. ووجد أيضا أنه بنزع الجين المسئول عن إنتاج إنزيم α- Acetolactate Decarboxylase المسئول عن تحويل الأسيتو لاكتات لأسيتوين قد أدى لزيادة فى إنتاج الداى اسيتيل (Hill and Ross, 1998).

٣. ٢. ٤. إنتاج سلالات لها القدرة على إنتاج البكتريوسينات Bacteriocins

البكتريوسينات مواد تعمل كمضادات ميكروبية وهى عبارة عن بروتينات أو ببتيدات تفرزها LAB وتقوم بتثبيط نمو العديد من البكتريا الموجبة لجرام مثل *Clostridium* و *Listeria* (Von Wright and Sibakov, 1998)



شكل (٧). هندسة التحكم فى إنتاج مركب الداى اسيتيل فى الـ Lactococci (مأخوذ من (Hill and Ross, 1998)

ومن أهم أنواع البكتريوسينات النيسين Nisin وينتج بواسطة *L.lactis subsp. lactis* ويستخدم حاليا على نطاق عالمى كمادة حافظة فى الأغذية وخصوصا ضد ميكروبات *Clostridium* (Sanders, 1994). لقد تم التعرف على بعض الجينات سواء بلازميدية أو كروموسومية مسئولة عن إنتاج مثل هذه المركبات وتم نقلها لسلالات من الـ *Lactococcus* لزيادة الإنتاج من هذه المضادات الميكروبية والتى تساعد اساسا فى زيادة فترة حفظ المنتجات (Von Wright *et al.*, 1990 و Von Wright and Sibakov, 1998). هذا وتوجد العديد من الدراسات الموجهة لتحسين إنتاج حمض اللاكتيك عن طريق زيادة نسخ الجين المسئول عنه (Sanders *et al.*, 1986 و Harlander, 1992). كذلك هناك اتجاهات لتحسين إنتاج بعض الفيتامينات والأحماض الأمينية والسكرات العديدة Exopolysaccharids (Bardowski *et al.*, 1992 و Van Kranenburg *et al*, 1995).

٣.٣. تطوير سلالات لإنتاج الأحماض العضوية

تعتبر الأحماض العضوية من المركبات الهامة جدا فى الصناعات الغذائية وهى تستعمل اساسا كمحمضات للأغذية. ومن أهم الأحماض المستخدمة الستريك واللاكتيك والجلوكونيك والماليك والخليك. (Bigelis and Tsai, 1994).

٣. ٣. ١. حمض الستريك : وهو من اكثر هذه الأحماض استعمالا فى الأغذية ويصنع أساسا عن طريق التخمرات الفطرية باستخدام فطر الأسبرجلس *Aspergillus niger* . ويستخدم الحامض بكثرة فى صناعة المشروبات الغازية ومن فوائده التحميض وتحسين وإظهار النكهة وتنظيم درجة الاس الهيدروجينى كما أن له فعل حافظ ويستخدم كمادة مخلبية ومثبتة بالإضافة كمادة مضادة للأكسدة. (Dziezak, 1990). ويعتبر معظم إنتاج الحامض من سلالات محسنة بالتطفير والانتخاب (Bigelis and Tsai, 1994). هذا بالإضافة لوجود أبحاث لتطوير السلالات الحالية باستخدام طرق الهندسة الوراثية. فمثلا نجح Visser (1991) فى زيادة إنتاج الحامض حوالى ٣٠ مرة بعد كلونة الجين الحامل لصفة إنتاج إنزيم Pyruvate Kinase وجين Phospho Fructo Kinase فى فطر *Aspergillus niger*.

٣. ٣. ٢. حمض اللاكتيك ويصنع هذا الحامض كيماويا أو عن طريق التخمرات الميكروبية وللحمض استعمالات عديدة سواء غذائية أو غير غذائية.

وبالنسبة للاستعمالات الغذائية فيستخدم كمحمض ومحسن للنكهة كما يدخل في إنتاج عوامل الاستحلاب مثل Stearoyl Lactylate (Bigelis and Tsai, 1994). يتم إنتاج الحامض عن طريق التخمرات باستخدام سلالات بكتريا من جنس *Lactobacillus* ذات معدلات إنتاج عالية تقترب من معدلات الإنتاج النظرية. ويجرى حالياً العديد من الأبحاث لتطوير السلالات وراثياً بحيث يمكنها استخدام العديد من مصادر الطاقة الرخيصة كالمواد النشوية والسليلوزية والتى لا تستطيع الـ *Lactobacillus* أساسا الاستفادة منها. وقد تم كلونة جين إنزيم الألفا اميليز من *Bacillus stearothermophilus* فى بكتريا *Lactobacillus plantarum* (Cocconcelli *et al*.,1991) يعمل بذلك على المواد النشوية لإنتاج حامض اللاكتيك. كما تم نقل جين تمثيل الزيلوز من *Lactobacillus pentosus* إلى *Lactobacillus acidophilus* للاستفادة من المخلفات المحتوية على سكر الزيلور واسعة الانتشار (Posno *et al*.,1997).

٣. ٤. تطوير سلالات لإنتاج بعض المضافات الغذائية Food Additives

٣. ٤. ١. المحليات: يعتبر الثوماتين من المواد البروتينية شديدة الحلاوة المعزولة من النبات الاستوائى *Thaumatococcus danielli* و يستعمل كمادة محلية وكمحسن للنكهة. وبالرغم من السماح باستخدام هذا المركب فى العديد من الدول فإن العائق الأكبر فى استخدامه هو المصادر المحدودة له مما دعا للاتجاه لكلونة جين الثوماتين النباتى فى بعض الكائنات الدقيقة مثل *Streptomyces lividans* و *Bacillus subtilis* و *Aspergillus oryzae* . وبالرغم من نجاح كلونة مثل هذا الجين فإن الإنتاجية لا تزال أقل من المرغوب (Zemanek and Wasserman, 1995).

٣ . ٤ . ٢. الأحماض الامينية : تستعمل الأحماض الأمينية فى تدعيم الأغذية سواء للإنسان أو للحيوان بالإضافة لدخولها فى بعض الصناعات الدوائية. وتنتج هذه الأحماض صناعياً بالاستخلاص أو بتحليل المواد البروتينية أو عن طريق التخمرات الميكروبية (Malumbres *et al*., 1994). وتعتبر بكتريا *E.coli* والـ *Corynebacteria* من اشهر الميكروبات المستخدمة صناعياً لإنتاج الأحماض الأمينية. و تتميز بصفة عامة البروتينات النباتية بنقص محتوى حمض الليسين ويوجد اتجاه عالمى لتدعيم الأغذية النباتية بهذا الحمض الامينى الضرورى خاصة فى البلدان النامية حيث النقص الشديد فى البروتينات الحيوانية. ويتم إنتاج هذا الحمض باستخدام سلالات بكتيرية مهندسة وراثياً وخاصة من

جنس *Corynebacterium* ذات قدرة على الإنتاج العالى جداً من الليسين (Hirao *et al.*, 1989 و Costa-Ferreira and Duarte, 1992).

٣. ٤. ٣. مركبات النكهة : تعتبر مركبات النكهة من المركبات الهامة المستخدمة فى التصنيع الغذائى لإضفاء الرائحة والطعم المرغوب للأغذية. وللعديد من الميكروبات القدرة على إنتاج مثل هذه المركبات سواء الطيارة أو غير الطيارة منها أثناء عمليات التمثيل المختلفة (Welsh *et al.*, 1989 و Belin *et al.*, 1992). ويعتبر مركب الداى استيل الذى سبق الحديث عنه من أهم مركبات النكهة فى صناعة الألبان المتخمرة وقد تم عرض كيفية زيادة انتاجه باستخدام الهندسة الوراثية. وقد تعرف Schnurr *et al.*, (1991) على الجينات المسئولة عن إنتاج المركبات الطياره 6-methyle-S-heptane-2-one والمسئول عن رائحة الفاكهة Fruity ومركب β-ionone المسئول عن رائحة البنفسج Violet – like ومركب dihydroactinidiolid الشبيه برائحة الشاى الأسود وذلك من بكتريا *Erwinia herbicola*. وتنتج هذه المركبات عن طريق أكسدة الكاروتينات وقد تم التعرف على ٦ جينات مسئولة عن إنتاج هذه المركبات والتى يمكن كلونتها فى سلالات غذائية Food Grade Strains والتى لها أيضاً القدرة على اكسدة الكاروتيات بالتالى يمكن الحصول على سلالات جديدة ذات قدرة خاصة على إنتاج مواد النكهة الطياره. وكمثال أخر فى هذا المجال فقد تم كلونة الجين المسئول عن إنتاج إنزيم Prephenate Dehydratase فى بكتريا *Brevibacterium lactofermentum* وذلك لزيادة إنتاج الحمض الأمينى L-phenyl alanine الفينيل الأنين وذلك على حساب التيروسين والانثرانيلات. ويعتبر الفينيل الأنين هو البادىء الرئيسى لمادة فينيل ايثانول والمسئولة عن الرائحة الشبية بالعسل Honey-like odor (Ho *et al.*, 1990) . وتوجد العديد من الميكروبات المسئولة عن بعض مركبات النكهة مثل رائحة الموز Banana-like والفراولة Strawberry - like Odor (Cormier *et al.*, 1991 و Spinnler and Dijan, 1991). وقد وجد أن العديد من السلالات المنتجة لهذه المركبات يتم تثبيطها بزيادة تركيز مركبات النكهة المنتجة مما فتح مجالاً أمام الهندسة الوراثية لزيادة قدرة هذه السلالات على تحمل تركيز عالى من المركبات المنتجة بالتالى تحسن اقتصاديات التصنيع (Fukaya *et al.*, 1990).

٣. ٥. تطوير سلالات خميرة الخبز Baker's yeast

ينتج حالياً اكثر من نصف بليون طن (على أساس الوزن الجاف) من خميرة الخبز عالمياً وتستخدم عالياً *Saccharomyces cerevisiae* فى الإنتاج.

وتوجد الخميرة فى صورة مضغوطة أو مجففة أو فى صورة كريمية (Van Rooijen and Klaassen, 1998). واستخدمت العديد من الطرق التقليدية لتحسين خميرة الخباز مثل التطفير بالإشعاع أو المواد الكيميائية. هذا بالإضافة لاستخدام التكاثر الجنسى بالخميرة بكثرة وبنجاح للحصول على سلالات محسنة. ومع ظهور تقنيات الهندسة الوراثية الحديثة من عزل وكلونة الجينات تضاءلت أهمية استخدام الطرق التقليدية فى تحسين السلالات بدرجة كبيرة (Tuite, 1992). ومن أمثلة السلالات المعدلة وراثيا ما يلى:

٣. ٥. ١. زيادة عدد جينات إنزيمات مالتوز البرمييز Maltose Permease و المالتييز Maltase (MAL genes)

تحول خميرة الخباز السكر الموجود بالعجائن لثانى اكسيد الكربون مما يساعد على رفع وانتفاخ العجين. تسمى العجائن المحتوية على سكر (سكروز) بنسب عالية Sugared Dough بينما العجائن Lean Dough تحتوى على المالتوز ومصدره هنا الدقيق المستخدم. ويحتاج كل نوع من العجائن لنوعين مختلفين من الخمائر. فنجد أن الخمائر التى تعمل جيدا فى وجود المالتوز تكون ضعيفة الفاعلية فى العجائن ذات المحتوى العالى من السكروز والعكس صحيح. ويمكن تفسير ذلك بوجود نسبة ضئيلة من الجلوكوز بالدقيق والتى تعمل على تثبيط جينين مسئولين عن تمثيل المالتوز فى الخمائر المتحملة للسكروز وهما جين MAL6T المسئول عن جين Maltose Permease والمسئول عن نقل المالتوز عبر الغشاء البلازمى للخلية وجين MAL6S المسئول عن تحليل المالتوز لجلوكوز داخل الخلية. وعلى ذلك فإنه بإضافة عدة نسخ من هذين الجينين يمكن الحصول على خميرة متعددة الفوائد حيث يمكن استخدامها مع نوعى العجائن إضافة إلى الحصول على زيادة مقدارها ٣٠% فى إنتاج غاز ثانى أكسيد الكربون وبدون حدوث أى تغيرات غير مرغوبة فى صفات الخبز الناتج (Van Rooijen and Klaassen, 1998).

٣. ٥. ٢. خمائر ذات محتوى عالى من التريهالوز

يعمل التريهالوز بالخميرة على حمايتها ضد العديد من الظروف غير المناسبة سواء ضغط اسموزى عالى أو قلة الغذاء أو ظروف معاملات مثل تجفيف أو تجميد أو غيرها من الظروف (Wiemken, 1990). وعلى هذا الأساس فإن الخميرة ذات المحتوى العالى من التريهالوز يتوقع منها العمل بصورة أفضل فى ظل ظروف بيئية أشد قسوة. وقد تمكن Driessen *et al.* (1990) من استنباط سلالات من خميرة الخباز بها جين إنزيم التريهاليز (إنزيم محلل

للتريهالوز) غير فعال وبالتالى تم الحصول على سلالات عالية التركيز من التريهالوز.

٤. سلامة الأغذية المهندسة وراثياً

يعتبر المجال الغذائى من أهم تطبيقات التكنولوجيا الحيوية و الهندسة الوراثية. وبدون شك فإن المستهلك يعتبر من أوائل المستفيدين من هذه التكنولوجيا الحديثة حيث ستتوفر أصناف جديدة ومنوعة وبكميات كبيرة وبجودة أفضل وأسعار أقل. يبقى سؤال هام هو ما مدى سلامة هذه الأغذية؟ وحتى الآن لا يوجد نمط قياسى موحدّ مصرح به لتقييم سلامة الأغذية المهندسة وراثياً. ولكن نجد ثمة توصيات أو قواعد خاصة لتقييم السلامة بكل دولة وإن كان هناك بعض التشابه. تقوم المؤسسات التالية بالولايات المتحدة الأمريكية بتقييم الأغذية المهندسة وراثياً قبل وصولها للأسواق (Leopold, 1995).

١- إدارة الغذاء والدواء Food and Drug Administration , FDA
٢- وزارة الزراعة United States Department of Agriculture , USDA
٣- وكالة حماية البيئة Environmental Protection Agency, EPA

وعندما يراد تقييم سلامة الأغذية المهندسة وراثياً فإن المقصود بها الغذاء نفسه أو الإضافات الغذائية أو أى عوامل تساعد فى التصنيع والتى تم استخدام الهندسة الوراثية فى إنتاجها. ومن المهم التفرقة بين استخدام الميكروبات المعدلة وراثياً GMM كميكروبات منتجة للإنزيمات (الكيموسين والجلوكوز ايزوميريز... الخ) أو لبعض المواد الأخرى والمستخدمة كإضافات للغذاء وبين تلك التى تستخدم كجزء من الغذاء نفسه ويتم استهلاكها معه مثل البادئات فى صناعة الألبان المتخمرة. ويسمح حالياً باستخدام الميكروبات من النوع الأول حيث أن هذه الميكروبات لا يتم استهلاكها بأى حال من الأحوال (Klijn *et al.*,1995) . يتم دائما إجراء اختبارات عديدة وقاسية للمنتج الجديد مع مقارنته بالمنتج الأصلي والمُصنع بالطريقة التقليدية. يشتمل الاستخدام المباشر للميكروبات المهندسة وراثياً فى الأغذية استهلاك أعداد كبيرة من الميكروبات الحية ولذا يلزم هنا تقييم سلامة أكثر دقة وتعقيداً من النوع الأول (Klijn *et al.*,1995). ومن النقاط الهامة هنا مدى حيوية هذه الميكروبات وكيفية ومدى انتشارها وتأثيرها على البيئة الخارجية وعلى الكائنات الحية الدقيقة الأصلية Wild وهل سيتم تبادل معلومات وراثية معها Gene Transfer وهل سيؤثر ذلك على منظومة الحياة الطبيعية أم سيحدث اختلال ما؟ (Klijn *et al.*, 1995, Lenski, 1993). وبصفة عامة فإن استخدام الهندسة

الوراثية قد أثار الكثير من الجدل والمناقشات حول مدى الأمان لمنتجاتها والمشاكل المتوقعة والتى يمكن تلخيصها فى التالى:

٤. ١. مشاكل تتعلق بالصحة :

٤. ١. ١. التأثيرات غير المحسوبة Unintended Effects : وهى التى تنشأ عن تكنولوجيا نقل الجينات فمثلا قد تكون للجينات المنقولة قدرة التأثير على الجينات المحيطة بها وبطريقة غير معروفة. وهنا يحدث التأثير غير المحسوب ولكن مثل هذا التأثير يحدث أيضا عن استخدام طرق التطفير والانتخاب التقليدية (فرج ١٩٩٩).

٤. ١. ٢. الكائنات الحية Microorganisms: تستخدم دوما فى الصناعات الغذائية السلالات التى يثبت أمانها فى إنتاج الغذاء.ومن ثم فلا بد من أن تكون الميكروبات المهندسة وراثيا ذات درجة غذائية Food Grade Microoganisms كما أن من المطلوب أيضا أن يكون الجين المراد نقله وكذلك الناقل المستخدم من ميكروبات ذات درجة غذائية أيضا. وبالتالى نقلل من استخدام ميكروبات مرضية أو أجزاء منها . هذا بالإضافة لعدم استخدام دلائل مضادات حيوية بالنواقلات Antibiotic markers (Fincham and Ravetz, 1990).

٤. ١. ٣. انتقال المادة الوراثية Gene Transfer : إن من أهم مخاطر استخدام الأغذية المهندسة وراثيا هو انتقال موادها الوراثية إلى ميكروفلورا القناة الهضمية أو للخلايا الطلائية بالقناة الهضمية. وقد وجد أن انتقال المادة الوراثية إلى الخلايا الطلائية شىء محدود الاحتمال جدا وذلك لأن جينات الغذاء المهندس وراثيا غالبا ما تكون غير كاملة ولا تستطيع بلوغ الجزء السفلى من الأمعاء بصورة كاملة. وحتى عند حدوث ذلك فإن التجديد الدائم للخلايا الطلائية لا يعطى الفرصة الكافية لإتمام هذا الانتقال. أما بالنسبة لانتقال جينات من الغذاء المهندس وراثيا إلى ميكروبات القناة الهضمية فإنه محتمل بدرجة أكبر خاصة إذا احتوى الغذاء على خلايا حية. وعموما فإن فى الأغذية المهندسة وراثيا والتى تم تصنيعها بطرق ومعاملات معقدة يكون احتمال الانتقال للمواد الوراثية قليلا جدا نظرا لتكسر هذه الجينات (فرج ١٩٩٩).

٤ . ١. ٤. مسببات الحساسية Potential Allergenicity: إن احدى المحاذير التى تؤثر على سلامة الأغذية المهندسة وراثيا هو إدخال بروتينات جديدة قد ينتج عنها ظهور تفاعلات الحساسية لبعض الأفراد الحساسين (فرج ١٩٩٩).

ولتقليل خطر نقل البروتينات المسببة للحساسية فإن مصدر الدنا يجب ألا يكـــون من نوع معروف عنه تسبب الحساسية. وبالرغم من أنه من الممكن تمامـــا عـــدم استخدام مثل هذه البروتينات المسببة للحساسية فإنه دائما يتم إجراء تقييم الحساسية لجميع الأغذية المهندسة وراثيا.

٤. ٢. مشاكل بيئيـــة Environmental Problems: وتنشـــأ مثـــل هـــذه المشاكل عند تسرب الميكروبات المهندسة وراثيا للطبيعة ومدى تفاعلها مع البيئـــة حولها وهل تتأقلم معها وتؤثر فيها أم لا تستطيع التنافس ؟ (Lenski, 1993).

٤. ٣. مشاكل أخلاقية ودينية Ethical Problems: أثار استخدام الهندســـة الوراثية جدلا كبيرا فهناك من ينادى بوقف هذه التكنولوجيا على أساس أنها تتدخل فى خلق الله وأن اجراء مثل هذه الأبحاث على المستوى الجينـــى غـــير مـــأمون الجانب لأنه تدخل مباشر من الإنسان فى شأن الخلق و الخلق مـــن صفـــات الله سبحانه وتعالى. نجد أيضا أنه قد تكون هناك مشاكل لبعض الأديان فمثلا المسلمين واليهود سوف يرفضون كلونة جين من خنزير فى بكتريا لإنتـــاج منتـــج معيـــن وهكـــذا (Anonymous, 1997).

٥. البطاقات المميزة للأغذية المهندسة وراثيا

تزايد الاهتمام بأمر البطاقات المميزة للأغذية المهندسة وراثيا من جـــانب المستهلك. وبالرغم من ذلك نجد أن الولايات المتحدة الأمريكية وهيئاتها , EPA USDA , FDA قد أوضحت أنه لا يوجد حاليا ما يدعو للقول بأن مثـــل هـــذه الأغذية أقل أمنا من الأغذية المصنعة بالطرق التقليدية. بالتالى لا يلزم تمييز هـــذه الأغذية المهندسة الوراثية ببطاقات خاصة تدل عنها وذلك بعكس الدول الأوربيـــة التى تفضل تنبيه المستهلك لذلك. يتم فى بريطانيا إضافـــة تنبيـــه خـــاص علـــى البطاقات فى حالات خاصة فقط مثل احتواء الغذاء على جيـــن بشـــرى أو جيـــن حيوانى يكون استهلاكه محظورا على ديانة معينة. أما خلاف ذلك فلا يوجد تمييز خاص للعبوات (Anonymous, 1997).

٦. خاتمة

تزايد بصفة عامة الاهتمام بالهندسة الوراثية فـــى مصـــر فـــى الســـنوات الماضية. وبالنسبة لتطوير سلالات ميكروبية للإنتاج الغذائى باستخدام مثل هـــذه التكنولوجيا فقد أظهرت نتائج مسح قواعد البيانات قصورا شديدا فى مثـــل هـــذه الاتجاهات البحثية محليا . بينما كانت تطبيقات الهندسة الوراثية خاصة فى مجال

الإنتاج الدوائى أوفر حظا . وقد افتتح مؤخرا (٢٠٠١م) خطـــا جديـــدا بـــإحدى شركات الأدوية المصرية لإنتاج أدوية مهندسة وراثيا خاصة فى مجال الأدويـــة المضادة للسرطان والمضادة لفيروس C المســـبب للالتـــهاب الكبـــدى. وأخـــيرا وبالرغم من التطور العلمى الهائل فى مجال الهندســـة الوراثيـــة وأفـــرع العلـــم المصاحبة لها ودورها الكبير فى تطوير وتحسين العديد من السلالات الميكروبيـــة والمستخدمة لأغراض غذائية فإنه يجب فتح حوار مباشر مع المســـتهلك لإزالـــة الخوف من استخدام مثل هذه المنتجات وإعطاؤه فكرة كافية وافية مبسطة عن هذه التقنيات تمكنه من الحكم عليها. إن نجاح أو فشل هذه التقنيات فى مجال الأغذيـــة على وجه الخصوص سوف يعتمد لحد بعيد على قبول المستهلك محليـــا وعالميـــا لمثل هذه المنتجات الغذائية المصنعة بواسطة تقنيات الهندسة الوراثية.

٧. المراجع

سلامة، محمد سيد. ١٩٩٩. التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثيـــة وتطبيقاتـــها. مجلة العلميون. العدد (٢٢). سبتمبر. ص: ٥٢ – ٥٦.

فرج، محمد ضياء الدين حامد. ١٩٩٩. تقييم سلامة الأغذية المهندســـة وراثيـــا. ورشة عمل الاتجاهات الحديثة لاستخدام النظائر المشعة والإشـــعاع فـــى التكنولوجيا الحيوية. المركز الدولى للزراعة- الدقى – مصـــر: ٢٧-٣٠ نوفمبر ١٩٩٩م.

مستجير، أحمد. ١٩٩٨. البيوتكنولوجيا فى الطب والزراعة. المكتبة الأكاديميـــة – مصر.

Amore R., Wilhelm M.. and Hollenberg C.P. (1989). Appl. Microbiol. Biotechnol. 30:351-357.

Anonymous (1997). Biotechnology: application in the food industry. Web site: www. ifis. org/hottopics / biotech a.html.

Avery O.T., Macleod C.M. and McCarty M. (1944). J. Exp. Med. 79: 137-158.

Barbano D.M. and Rasmussen R.R. (1991). J. Dairy Sci. 75: 1-12.

Bardowski J., Ehrlich S.D. and Chopin A. (1992). J. Bacterial. 147: 6563.

Barer S.J. (1993). In: *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design, and Equipment.* Vogel H.C. (ed.). PP. 1-47. Noyes Publications. New Jersy.

Bazaraa W.A. and Hamdy M.K. (1988). J. Ind. Microbiol. 4: 267-274.

Bazaraa W.A. and Hassan E.E. (1996). J. Ind. Microbiol. 17: 100-103.

Bejar S., Belghith K., Gargouri R. and Ellous R. (1994). Biotechnol lett. 16: 1259-1264.

Belin J.M., Bensoussan M. and Serrano-Carreon L. (1992). Trends Food Sci. Technol. 3: 11-14.

Berger R. (1994). In: *Food Biotechnology: Microorgansims.* Hui Y.H., and Khachatourians G.G. (eds). pp. 281-295. VCH, New York.

Bhosale S.H., Rao M.B. and Deshpande V.V. (1996). Microbiol. Rev. 60 (2): 280-300.

Bigelis R. and Tsai S.P.(1994). In: *Food Biotechnology: Microorganismas.* Hui Y.H., and Khachatourians G.G. (eds.). pp.239-280. VCH, New York.

Bor Y., Moraes C., Lee S., Crossby W.L., Sinskey A.J. and Batt C.A. (1992). Gene. 114: 127-131.

Brock T.D., Smith D.W. and Madigan M.T. (1984). *Biology of Microorganisms.* 4th ed. pp. 350-402. Printce- Hall. New Jersy.

Broome M.C. and Hickey M.W. (1990). Australian J. Dairy Technol. 45: 53-67.

Chan E., Ueng P.P. and Chen L.F. (1989). Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 524-528.

Chen S. and Wilson D.B. (1997). Biodegradation. 8: 97-103.

Cocconcelli P.S., Gasson M.J., Morelli L. and Bottazzi V. (1991). Res. Microbiol. 142: 643-625.

Cormier F., Raymond Y., Champagne C.P. and Morin A. (1991). J.Agric. Food Chem. 39 : 159-161.

Costa-Ferreira M. and Duarte J.C. (1992). Biotechnol. Lett. 14:1025-1028.

David S. (1993). Neth. Milk Dairy J. 47: 42-48.

Dekker K., Yamagata H., Sakaguchi K. and Udaka S. (1991). Agric. Biol. Chem. 55: 221-227.

Driessen M., Osinga K.A. and Herweijer M.A. (1990). Ep 451896, Au 9173782, No 9101232, CA 20393.

Dziezak J.D. (1990). Food Technol. 44: 76-83.

FDA. (1984). Code of Federal Regulation (CFR) 184.1388.49, Federal Register 47387, December 4.

FDA. (1990). Federal Register 55(57). 10932.

FDA. (1992). Code of Federal Regulation (CFR) 184. 1685. 57, Federal Register 6476-9, February 25.

Fincham J.R.S. and Ravetz J.R. (1990). *Genetically Engineered Organisms: Benefits and Risks* pp.7-22. University of Toronto Press. Toronto. Buffalo.

Fukaya M., Takemura H., Okumura H., Kawamura Y., Horinouchi S. and Beppu T. (1990). J. Bacteriol. 172: 2096-2104

Garvey P., Hill C., and Fitzgerald G.F. (1996). Appl. Environ. Microbiol. 62: 676-679.

Gireesh T., Davidson B.E. and Hillier A.J. (1992). Appl. Environ. Microbiol. 58: 1670-1676.

Glazer A.N. and Nikaido H. (1995_a). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology* pp. 9-48. W.H. Freeman and Company. New York.

Glazer A.N. and Nikaido H.(1995_b). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology.* pp. 561-620. W.H. Freeman and Company. New York.

Godfrey T. and West S.I. (1996). In: *Industrial Emzymology* 2nd ed. Godfrey T., and West S.I. (eds.). pp.1-8. Macmillan Press Ltd., London.

Harlander S.K. (1992). In: *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods. Report of an Ad Hoc Panel of The Board Of Science and Technology for International Development* pp.20-26. National Academy Press. Washington, D.C.

Heinsohn H. and Wegstein J. (1990). In : *Fermentation Technologies: Industrial Applications.* Yu P.L. (ed.). pp. 28-39. Elsevier Applied Science, New York.

Hill C. (1993). FEMS Microbial. Rev. 12: 87-88.

Hill C. and Ross P. (1998). In: *Genetic Modification in the Food Industry: A Strategy for Food Quality Improvement.* Roller S., and Harlander S. (eds.). pp.174-192. Blackie Academic & Professional. London.

Hill C., Miller L.A. and Klaenhammer T.R. (1991). J. Bacteriol. 173: 4363-4370.

Hirao T., Nakano T., Azuma T., Sugimoto M. and Nakanishi T. (1989). Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 269-273.

Ho H., Sato K., Matsui K., Sano k., Emei H. and Hirose Y. (1990). Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 190-195.

Ho N.W.Y. and Stevis P.E. (1985). Enzyme Microb. Technol. 7: 592-596.

Kempler G.M. and Mckay L.L. (1981). J. Dairy Sci. 64: 1527-1531.

Kho Y.H. (1984). Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 12: 253-259.

Kim S.G., Bor T.C. and Batt C.A. (1992). J. Dairy Sci. 75: 1761-1767.

Klaenhammer T.R. (1991). Food Biotechnol. 19: 675-681.

Klijn N., Weerkamp A.H., and De Vos W.M. (1995). Appl. Microbiol. 18: 486-492.

Kok J. (1993). J.Dairy Sci. 76: 2056 – 2064.

Lee C., Bhatnagar L., Saha B.C., Lee Y., Takagi M., Imanaka T., Bagdasarian M., and Zeikus J.G. (1990). Appl. Environ. Microbiol. 56: 2638-2643.

Leenhouts K.J., Gietema J., Kok J., and Venema G. (1991). Appl. Environ. Microbiol, 57: 2568-2575.

Lenski R.E. (1993). Experientia. 49: 201-209.

Leopold M. (1995). In: *Genetically Modified Organisms: A Guide to Biosafety* . Tzotzos G.(ed.). pp. 8-16. CAB International, UK.

Liu K. (1999). Food Technol. 53 (5): 42-48.

Maloy S.R., Cronan Jr J.E. and Freifelder D. (1997_a) *Micobial Genetics* 2nd ed. pp. 3-27. Jones and Bartalett Publishers, Boston.

Maloy S.R., Cronan Jr J.E., and Freifelder D. (1997_b). *Microbial Genetics* 2nd ed. pp. 377-434. Jones and Bartalett Publishers, Boston.

Malumbres M., Mateos L.M. and Martin J.F. (1994). In: *Food Biotechnology: Microorganisms.* Hui Y.H., and Khachatourians G.G. (eds). pp. 423-470. VCH, New York.

McCaman M.T., Andrews W.H. and Files J.G. (1985). J. Biotechnol. 2 : 177-184.

Pelczar JR, M.J., Chan E.C.S., and Krieg N.R. (1988). *Microbiology* 5th ed. 647. McGraw-Hill, New York.

Peters P. (1993). *Biotechnology: A Guide to Genetic Engineering* pp.220-231. Wm. C.Brown Publishers, IA. USA.

Posno M., Heuvelmans P.T., Van Giezan M.J., Lokman B.C., Leer R.J. and Pouwels P.H. (1997). Appl. Environ. Microbiol. 57: 2764-2766.

Pot B., and Ludwig W. (1994). In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* Van Damme E.J. and De Vuyst L.(eds.). pp.13-90. Blackie Academic & Professional. Glasgow.

Rodrigues U.M., Aguirre M., Facklam R.R. and Collins M.D. (1991). Appl. Bacteriol. 71: 509-516.

Roller S., and Goodenough P.W. (1998). In : *Genetic Modification in the Food Industry: A Strategy for Food Quality Improvement.* Roller S. and Harlander S.(eds.) pp.101-128. Blackie Academic & Professional. London.

Roller S., and Harlander S. (1998). In: *Genetic Modification in the Food Industry: A Strategy for Food Quality Improvement.* Roller S. and Harlander S. (eds.) pp.3-26 Blackie Academic & Professional, London.

Roller S., Praaning Van Daten D. and Andreoli P. (1994). In : *Food Industry and the Environment.* pp. 48-75. Dalzell J.M. (ed). Chapman & Hall.

Russo E. and Cove D. (1995). *Genetic Engineering: Dreams and Nightmares.* pp. 86-98. W.H. Freeman Spektrum. New York.

Sanders M.E. (1988). Biochimie. 70: 411-421.

Sanders M.E. (1994). In: *Food Biotechnology: Microoganisms.* Hui, Y.H and Khachatourians, G.G. (eds.). pp. 645-664. VCH, New York.

Sanders M.E., Leonhard R.J., Sing W.D. and Klaenhammer T.R. (1986). Appl. Environ. Microbiol. 52: 1001-1007.

Schnurr G., Schmidt A., and Sandmann G. (1991). FEMS Microbiol. Lett. 78:157-161.

Sing W.D. and Klaenhammer T.R. (1990). J. Dairy Sci. 73: 2239-2251.

Smith J.E. (1996). *Biotechnology*" 3rd edition pp. 1-18. Cambridge University Press. UK.

Snyder L. and Champness W. (1997). *Molecular Genetics of Bacteria.* pp.469-492. ASM Press. Washington, D.C.

Spinnler H.E. and Djian A. (1991). Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 264-269.

Stryer L. (1981). *Biochemistry* 2nd ed pp.669-684. W.H. Freeman and Company, New York.

Thulasi A. and Sampath K.T. (1997). Indian J. Dairy Sci. Biosci. 8 : 1-5.

Tiwari S.P. and Kumar N. (1995). Indian J. Dairy Sci. 48(4): 254-259.

Tuite M.F. (1992). Crit. Rev. Biotech. 12: 157-188.

Van Kranenburg M.J.D., Mendes S., Willem N.J. and De Vos W.M. (1995). Proc. Conference on Lactic Acid Bacteria: From Fundamental Research to Innovative Applications. Cork, Ireland, 22-26 October, Book of Abstracts, P.68.

Van Rooijen R. and Klaassen P. (1998). In. *Genetic Modification in the Food Industry: A strategy for Food Quality Improvement.* Roller S. and Harlander S. (eds.). pp. 158-173. Blackie Academic & Professional, London.

Venema G. (1993). J. Dairy Sci. 76: 2133-2144.

Vissser J. (1991). J. Chem. Technol. Biotechnol. 50: 111-113.

Von Wright A. and Sibakov M. (1998). In : *Lactic Acid Bacteria: Micobiology and Functional Aspects.* 2nd ed. Salminen, S. and Von Wright A. (eds.). pp. 161-209, Marcel Dekker, Inc. New York.

Von Wright A., Wessels S., Tynkkynen S. and Saarela M. (1990). Appl. Environ. Microbiol. 56: 2029-2035.

Watson J.D., and Crick F.H.C. (1953). Nature. 171 : 737-738.

Welsh F.W., Murrary W.D. and Williams R.E. (1989). Crit. Rev. Biotechnol. 9:105-165.

Wiemken A. (1990). Antonie Van Leeuwenhoek. 58 : 209-217.

Wilkinson J.Q. (1997). Food Technol. 51 (12): 37-42

Wuxiang L. and Jeyaseelan K. (1993). Biotechnol. Lett. 15: 1101-1106.

Zemanek E.C. and Wasserman B.P. (1995). Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 35 (5): 455-466.