משרד החינוך, התרבות והספורט
האגף הבכיר למדע ולטכנולוגיה

תהליכים ביוטכנולוגיים

פרופ' עמיחי פרימן
סימונה אברמוב

מ פ ט
מרכז פדגוגי טכנולוגי
עמל 1

ייעוץ ועיצוב דידקטי:
אילת אברהם

עימוד ממוחשב:
איילת תורג'מן

עיצוב גרפי ואיורים:
סיסי דגן, איילת תורג'מן

עיצוב כריכה:
בוקה כהנוב-גרינפלד

הפקה:
מפ"ט-עמל

המוציא לאור עשה כמיטב יכולתו לאתר את בעלי זכויות היוצרים
של כל החומר שנלקח ממקורות חיצוניים, שנכלל בספר זה.
פנינו בכתב לכל הגופים הנוגעים לדבר כדי להשיג את אישורם לשימוש בחומר.
אנו מתנצלים מראש על כל השמטה או טעות.
אם יובא הדבר לידיעתינו, נפעל לתקנו בהפקות הבאות של הספר.

©
כל הזכויות שמורות

מהדורה ראשונה: 1996
מהדורה שניה: 1999
מהדורה שלישית: 2000
מהדורה רביעית : 2001/2

המרכז הפדגוגי-טכנולוגי
רח' קהילת קיוב 15, תל-אביב 64910
טל': 03-6450876, פקס': 03-6472717.

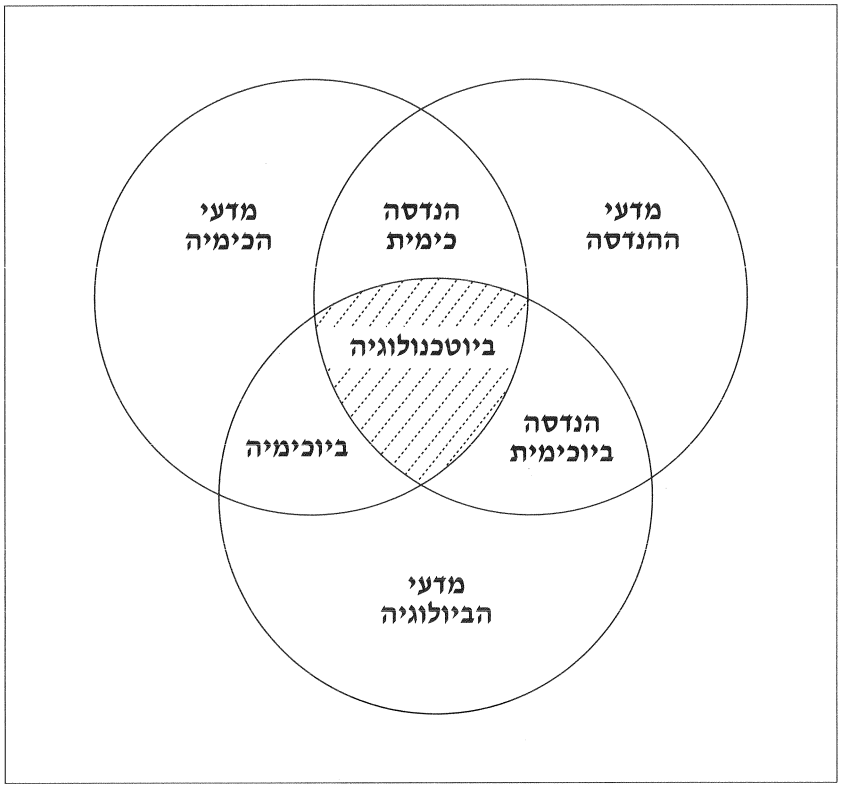
תוכן העניינים

		עמוד
מבוא		**5**
פרק 1	**תהליכי תסיסה**	**11**
1.1	רקע היסטורי והגדרת המהות של תהליך התסיסה	11
1.2	השלבים העקריים בתהליך התסיסה	14
1.3	תפקודם של תאים מיקרוביאליים בתהליכי תסיסה	36
פרק 2	**תוצרים של תהליכי תסיסה**	**49**
2.1	ייצור שמרים ושימושיהם	49
2.2	ייצור אנזימים מיקרוביאליים	75
2.3	ייצור חומצות אורגניות	85
2.4	ייצור חומרים אנטיביוטיים	96
פרק 3	**נוגדנים ואימונודיאגנוסטיקה**	**109**
3.1	מבוא	109
3.2	מבנה הנוגדן ומנגנון היווצרותו	109
3.3	תהליך היקשרות הנוגדן לאנטיגן	112
3.4	ייצור של נוגדנים	117
3.5	אבחון בעזרת נוגדנים	122
3.6	ריפוי מחלות בעזרת נוגדנים	144
3.7	שימוש בנוגדנים כאמצעי הפרדה	149
פרק 4	**תרביות תאים ושימושיהן**	**153**
4.1	תרביות תאים מבעלי חיים	153
4.2	תרביות תאים מצמחים	193
ביבליוגרפיה		**219**

מבוא

המחקר, הפיתוח והשימוש במערכות ביולוגיות, לתהליכי ייצור או אנליזה בתחומי התעשייה, הרפואה והחקלאות, נקרא ***ביוטכנולוגיה***. מערכות אלו כוללות בעיקר מערכות תאים (חיידקים, שמרים, פטריות, אצות, ותאים ורקמות מצמחים ומבעלי-חיים) או אנזימים וחומרים אחרים המופקים מהם.

בביוטכנולוגיה נעשה שילוב של שטחי מדע משלימים מתחומי הביולוגיה, ההנדסה והכימיה (ראה איור 1).



איור 1
האופי הבינתחומי של הביוטכנולוגיה

הביוטכנולוגיה נשענת בעיקר על מקצועות היסוד של מדעי החיים: ***ביוכימיה, מיקרוביולוגיה, גנטיקה, ואימונולוגיה.*** מקצועות אלה מספקים את בסיס הידע לפיתוח האמצעים הדרושים לשם הזיהוי, האפיון והבקרה של המערכות הביולוגיות, בעיקר ברמה התאית והמולקולרית. בסיס ידע נוסף הוא ***הכימיה,*** המסייעת בהכנה ובעיבוד של חומרי הגלם לתהליך, מספקת שיטות אנליטיות הדרושות למעקב אחר התקדמות התהליך, שיטות לזיהוי מבנה התוצר ושיטות לניקויו והפרדתו בסיום התהליך. ***ההנדסה*** תורמת את הבסיס הטכנולוגי לפיתוח, ליישום ולהפעלה של התהליך מבחינה טכנית, בגודל הנדרש לייצור ולהפקת התוצר. בנוסף לכל אלה יש צורך בתחשיב כלכלי לקביעת הכדאיות הכלכלית של התהליך, על-פי המאזן שבין עלויות הייצור ובין ההכנסות הצפויות.

שטחי הפעילות העיקריים של הביוטכנולוגיה הם:

א. **ביוקטליזה** - השימוש באנזימים ובמערכות אנזימטיות.

ב. **תהליכי תסיסה** לייצור תרופות, תוספי מזון, אנזימים וביוכימיקלים על-ידי מיקרואורגניזמים כגון חיידקים, שמרים ופטריות.

ג. **הנדסה גנטית** ושימושיה לפיתוח מוצרים חדשים ולשיפור תהליכי ייצור קיימים.

ד. **ייצור נוגדנים** ושימושיהם למטרות רפואיות (אבחון, ריפוי והכוונת תרופות) ואחרות (כגון תהליכי הפרדה).

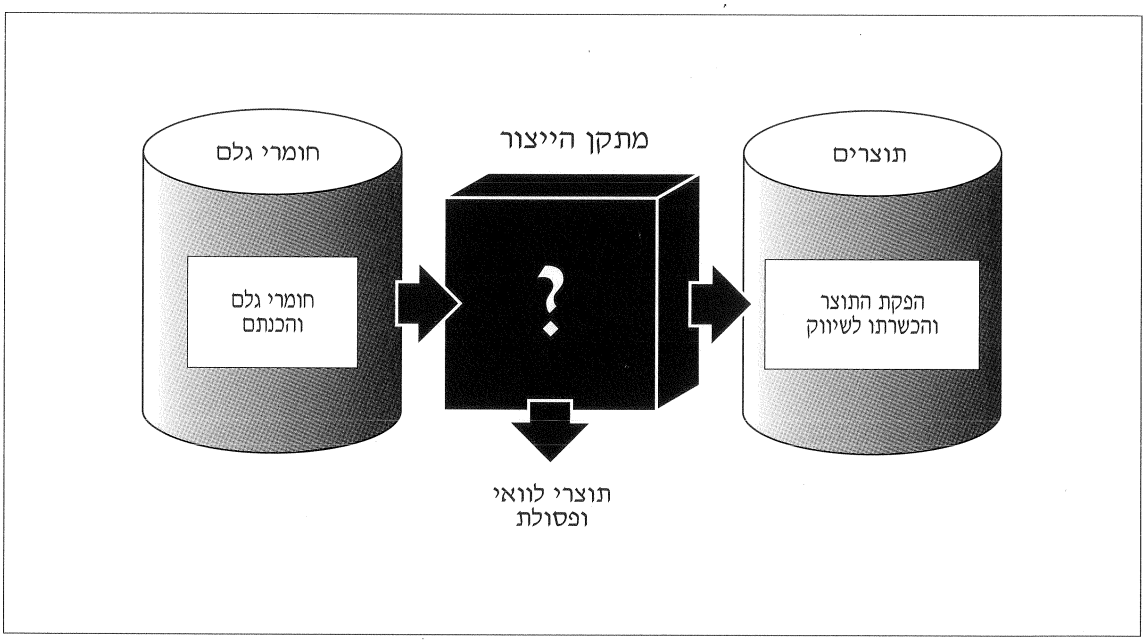
ה. **תרביות תאים** מבעלי-חיים ומצמחים ושימושיהן ליצירת תרופות, תכשירי חיסון ולהחדרת שינויים מוכוונים בצמחים ובבעלי-חיים.

ו. **ביוטכנולוגיה סביבתית** - לפיתוח תהליכי ניצול וניטרול של פסולת חקלאית ותעשייתית, במגמה לצמצם ולפתור בעיות הקשורות בזיהום הסביבה.

בספר זה נעסוק בעיקר בשלושה משטחי הפעילות שהזכרנו לעיל: תהליכי תסיסה, תרביות תאים וייצור נוגדנים. אך לפני שנעבור ללימוד תחומים אלה, נכיר תחילה את שלבי היסוד של תהליך תעשייתי בכלל, ונעמוד על אחדים מן המאפיינים הייחודיים לעבודה באמצעי ייצור ביולוגיים.

שלבי היסוד של תהליך תעשייתי

תהליך תעשייתי בנוי בדרך כלל משלושה שלבים עיקריים, כמתואר באיור 2.



איור 2
תרשים סכימתי של תהליך ייצור תעשייתי כללי

בשלב הראשון מתבצעת הכנת חומרי הגלם. בשלב השני, תערובת חומרי הגלם מועברת לביצוע התהליך במתקן הייצור (***ריאקטור***), בתנאים מבוקרים כגון לחץ, טמפרטורה, ערבול וכו'. שלב זה מאופיין בבקרה ושליטה פעילה בתהליך, תוך מעקב אחר השינויים החלים בריכוזים של חומרי הגלם והתוצרים. עם התקדמות התהליך עד לקבלת התוצר במידה הרצויה, מתחיל השלב השלישי: הפרדה של התוצר המבוקש מתוצרי לוואי וחומרי פסולת והכשרתו לשיווק.

ניתן להפעיל את תהליכי הייצור בשני אופנים עיקריים: כתהליך מנתי או כתהליך רציף.

בתהליך מנתי חומרי הגלם מוזנים אל הריאקטור, שלב הייצור מופעל, והוא נמשך עד לקבלת הרמה הרצויה של התוצר. אז התהליך מופסק, ותכולת הריאקטור מועברת כולה לביצוע שלב ההפרדה של התוצר. מתקן הייצור עובר תהליך ניקוי והכשרה לביצוע מחזור נוסף של התהליך. הזמן העובר מהפעלת תהליך הייצור ועד הפסקתו מכונה ***זמן מחזור***.

בתהליך רציף מבוצעת הזנה רציפה של תערובת חומרי גלם במהירות מבוקרת דרך מתקן הייצור, והתהליך מתבצע במתקן הייצור במהלך השהייה של תערובת חומרי הגלם בתוכו, בדרך כלל בסיוע קטליזה או חימום. הזרם, היוצא מהריאקטור, ובו התוצר, מוזן למתקן הפרדה, הפועל גם הוא באופן רציף, או מועבר למיכל איסוף, לביצוע שלב ההפרדה מאוחר יותר.

ההבדל העיקרי בין תהליך מנתי לבין תהליך רציף מתבטא בכך שבתהליך המנתי הריכוזים של המגיבים והתוצרים במתקן הייצור משתנים עם הזמן במהלך התגובה, והשינוי בריכוזים מתרחש באופן אחיד בכל חלקי מתקן הייצור; בתהליך רציף, לעומת זאת, הריכוזים של המגיבים והתוצרים משתנים תוך תנועת החומרים דרך המתקן, כך שבאזור הכניסה ריכוזי המגיבים גבוהים ואין עדיין תוצרים, ואילו באזור היציאה ריכוזי התוצרים גבוהים ולא נותרים מגיבים כמעט. כך נוצר ***מפל ריכוזים*** בכיוון התנועה, ואין אחידות בריכוזי המגיבים והתוצרים בחלקים השונים של מתקן הייצור.

בין שתי צורות התפעול העיקריות (המנתית והרציפה), יש גם צורת ביניים הנקראת ***תהליך מנתי מוזן*** או ***תהליך חצי רציף***. בתהליך זה הייצור מתבצע כללית באופן מנתי עם הזנת מנות קצובות של חומרי גלם לריאקטור בצורה הדרגתית ומבוקרת במהלך התהליך.

הצלחתו של כל תהליך ייצור תעשייתי תלויה לא רק ביכולת לבצעו מבחינה טכנולוגית אלא גם בעמידתו במבחן תחשיב כלכלי של רווח והפסד.

הכדאיות הכלכלית תלויה במידה רבה בעלויות הייצור. המרכיבים העיקריים של עלויות הייצור הם:

א. **עלות חומרי הגלם:** מחיר רכישתם והעברתם למקום הייצור, עלות האחסון ועלות הטיפול הנדרש להכנסתם לתהליך הייצור.
ב. **עלות תהליך הייצור עצמו:** הוצאה ראשונית לרכישת הציוד (מתקן הייצור, אמצעי השליטה והבקרה וציוד עזר נוסף), עלות אחזקתו ותפעולו, הוצאות לאנרגיה הדרושה (חשמל, דלק) ולשכר עבודה.

ג. **עלות תהליך הפקת התוצר והכשרתו לשיווק:** העלות של תהליכי ההפרדה (ניקוי, ריכוז, עיבוד ואחסון של התוצר עד לשיווקו), עלות הטיפול בתוצרי לוואי, בחומרי פסולת, בטיהור מי-שופכין ומניעת זיהום הסביבה.

החלק היחסי של מרכיבים אלה בעלות הכוללת של תהליך ייצור שונה מתהליך לתהליך בהתאם לסוג התוצר.

מאפיינים ייחודיים לעבודה באמצעי ייצור ביולוגיים

לשם שימוש בחומר ביולוגי מבודד, כגון חלבונים (אנזימים, נוגדנים) וחומצות גרעין, או בתאים שלמים, כאמצעי לייצור ולאנליזה ביולוגיים, יש ליצור תנאים מתאימים של הפעלה, שימוש ואחסון, השונים מאוד מן המקובל בתעשיות אחרות (כגון התעשייה הכימית).

תנאי מרכזי ליכולת ההפעלה והשימוש בחומר ביולוגי הוא שמירת תנאי סביבה אשר אינם פוגעים במבנהו הטבעי. תנאי ההפקה, האחסון והשימוש - הן במרכיב מבודד (כגון אנזים) והן בתא שלם - חייבים להיות מתונים ומבוקרים יותר בהשוואה למערכות ייצור אחרות. חשיפה לגורם, העלול לפגוע במבנה התלת-ממדי הטבעי והמדויק של מקרומולקולות ביולוגיות, פירושה אובדן פעילות.

מן הראוי להתחשב במיוחד בגורמים הבאים:

* **טמפרטורה**: מרבית המערכות הביולוגיות פעילות היטב בטווח טמפרטורות של 25°C - 37°C. לפיכך - למעט מקרים של מערכות טבעיות שעברו הסתגלות והתאמה לתנאים חריגים - אין לחשוף אותן לטמפרטורות קיצוניות (45°C ומעלה) אשר ישרו תהליכים של דנטורציה על מבניהם של אנזימים ומרכיבים חיוניים אחרים. יתר על כן, מאחר שגם בטמפרטורות מתונות חלה דעיכה איטית של הפעילות, הרי שאחסון ממושך דורש, בדרך כלל, קירור החומר (4°C) ולעיתים שמירתו בהקפאה (-18°C).

* **ממיסים אורגניים וריאגנטים כימיים פעילים**: מרבית הממיסים האורגניים - המשמשים בתעשיות הכימיה, הפרמצבטיקה והמזון להמסה, לתגובה ולמיצוי של חומרי גלם ותוצרים - הם גורם הרסני למִבנה ביולוגי טבעי ופעיל. חובה להימנע מהשימוש בהם, או להשתמש בהם רק במינונים נמוכים שפגיעתם מזערית.

* **ערכי pH ומליחות קיצוניים**: תנאי חומציות או בסיסיות קיצוניים, החורגים במידה ניכרת מתחום ה- pH הפיזיולוגי (pH=7±2), או הוספת ריכוזים גבוהים של מלח, יש להם השפעה הרסנית ומהירה על המבנה והפעילות של מרבית המערכות הביולוגיות.

בנוסף על תנאי סביבה כלליים אלה, יש לשים לב לגורמים נוספים, המסכנים את הפעילות הרצויה של חומר ביולוגי, והם:

* **זיהום** החומר במיקרואורגניזמים, המוצאים בו מצע מזון לגידול, ואגב כך הורסים ומשנים אותו.

* **עיכול עצמי** או **עיכול על-ידי מערכות אנזימטיות מזהמות**, הנגרם בשל נוכחות כמויות - ואפילו קטנות - של אנזימים בעלי יכולת לפרק ביופולימרים ביולוגיים (כגון פרוטאזות).

* **הרעלה או עיכוב** של הפעילות הרצויה על-ידי פגיעה סלקטיבית וספציפית (כגון: באתר פעיל של אנזים על-ידי מעכב ספציפי) בפעילות הרצויה.

על אף קשיים וחסרונות אלה, מציעות המערכות הביולוגיות מספר יתרונות ייחודיים כאמצעי ייצור, היוצרים בסיס לשימוש מוצלח בהם:

* **קטליזה ספציפית**: מערכות ביולוגיות מסוגלות לבצע פעולה קטליטית ייחודית אפילו על חומר מוצא, הנמצא בתערובת עם חומרים רבים אחרים, ביניהם גם כאלה הדומים לו מאוד במבנה. כך נחסך הצורך בבידוד וניקוי מרכיב לתגובה וניתן להשתמש במרכיבים הזמינים מתעשיות המזון ועיבוד תוצרת חקלאית. לשילוב של זיהוי מדויק של הסובסטרט עם היכולת לביצוע של תגובות מורכבות - מתגובות חמצון וחיזור ועד ביוסינתזה או פירוק של חומרים מורכבים - יתרונות רבים בהשוואה לחלופות כימיות (אם הן אפשריות), במיוחד עקב ביצועם בתנאים מתונים מבחינת השקעת אנרגיה. יתר על כן: ביוקטליזה ספציפית מתבטאת גם במספר מצומצם ביותר - אם בכלל - של תוצרי לוואי בתהליך, בהשוואה לתהליכים כימיים רבים, שיש בהם תוצרי לוואי לרוב.

* **כושר ריבוי עצמי**: למערכות תאיות - ולחלק מן המערכות האל-תאיות - כושר ריבוי ושחזור עצמי: ממספר זעיר של חיידקים ניתן לגדל בתנאים מתאימים טונות רבות של חיידקים, הזהים זה לזה ולכולם אותה פעילות רצויה. כך נוצר מצב ייחודי בו "מכונת הייצור" מסוגלת "לרבות" את עצמה, קודם להפעלתה ולשימוש בה. יתר על כן, אם נגרם נזק לתא, תוך פעולתו, יש ביכולתו - אם יינתנו לו חומרי מזון מתאימים - לשחזר את הפעילות שנפגעה ולתקן את עצמו. תופעה זו ייחודית למערכות ביולוגיות, ובהכוונה מתאימה עשויה להפוך לכלי רב-עוצמה.

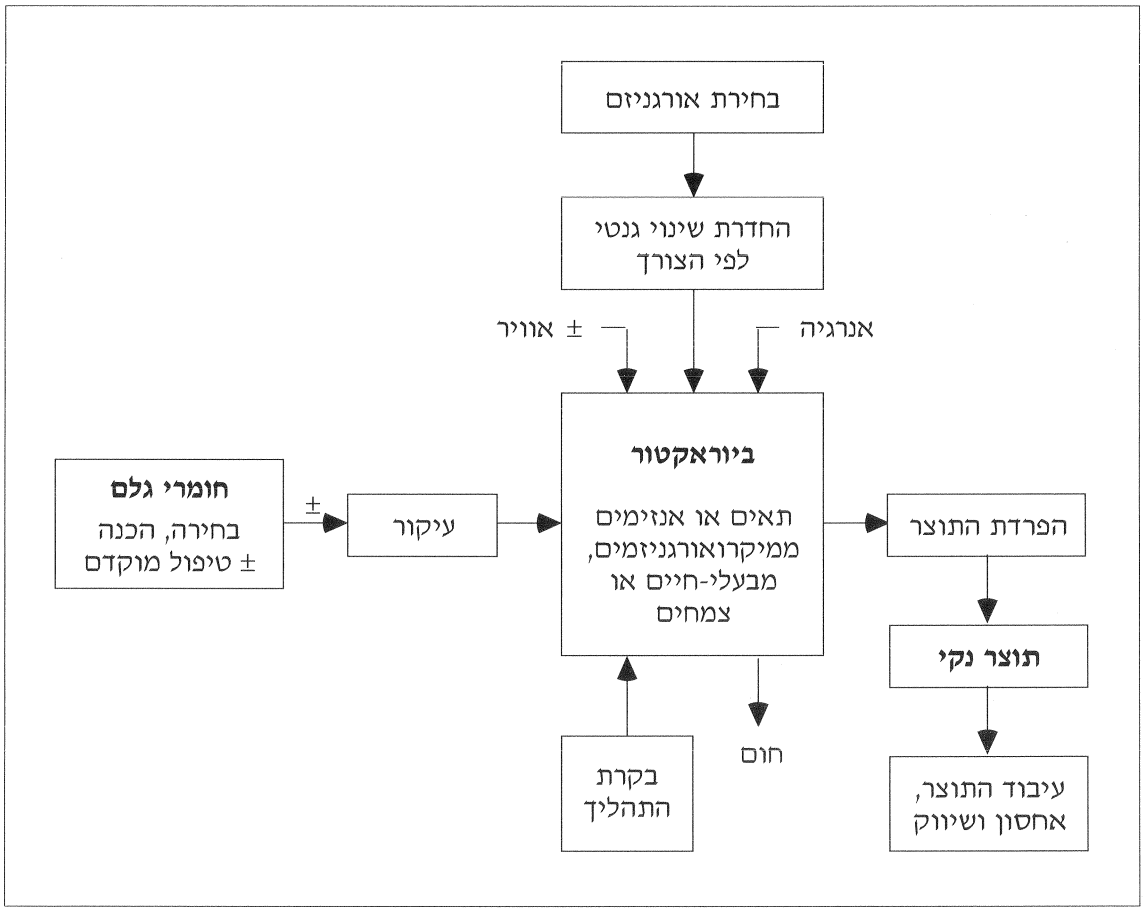
* **תהליך טבעי**: בשנים האחרונות גוברת הנטייה הכללית להעדיף מוצרים שיוצרו בתהליכים טבעיים כלומר באמצעות מערכות ביולוגיות, על-פני מוצרים שיוצרו בתהליכים כימיים, ואשר "חשודים" בנוכחות שאריות של כימיקלים מסוכנים העלולים לגרום למחלות (בעיקר סרטן לסוגיו). כך ישנה העדפה גוברת למוצר מביוטכנולוגיה על פני מוצר זהה מכימיה. התופעה בולטת בעיקר בתחום תוספי-המזון.

כאמור, הפעלתם של אמצעי ייצור ביולוגיים דורשת יצירת סביבה תומכת ומבוקרת מאוד, במתקן הייצור (הביוריאקטור). בסביבה כזו צריכים לשרור תנאים, הדומים ככל שניתן לתנאי הפעולה והקיום הטבעיים של המערכת הביולוגית, מבלי שיווצרו זעזועים וישתנו תנאים במהלך התהליך, אשר עלולים לגרום לשיבוש חלקי או לאובדן מלא של הפעילות הרצויה. יצירת סביבה תומכת כזו מורכבת ותלויה באופי המערכת ובתגובה הרצויה. כך הביצוע של תגובה אנזימטית פשוטה יחסית (כגון הידרוליזה של אסטר) ידרוש בעיקר שמירה ובקרה של הטמפרטורה, של ה-pH והחוזק היוני, ערבול מתון והימנעות מתוספים

(כגון ממס אורגני) העלולים לגרום לדנטורציה של האנזים. הביצוע של תהליך מורכב על ידי תא חי ידרוש תנאים תומכים מבוקרים הרבה יותר, ביניהם: קיום תנאים סטריליים מבוקרים, אספקת מצע מזון המתאים לריבוי וגידול, אספקת אוויר, בקרת pH, ערבול תואם, ודרכים להרחקת תוצרי פסולת.

בצד תנאי האחסון והשימוש, השימוש בחומר ביולוגי מציב קשיים גם בחלקו האחרון של התהליך התעשייתי: שלב הניקוי של התוצר, הכנתו לשיווק ואחסונו עד לשימוש המיועד. כאשר התוצר הוא חומר ביולוגי מורכב יחסית (כגון חלבון), הפקתו מהמערכת המייצרת, המכילה גם היא חלבונים דומים, עלולה להיות משימה מורכבת ורב-שלבית בפיתוח תהליך ניקוי מתאים. למורכבותו של תהליך זה תהא, כמובן, גם השלכה על העלות הכוללת של התהליך.

לסיכום, ניתן לתאר את האפשרויות השונות לשימוש במערכות ביולוגיות בתהליך תעשייתי בתרשים הבא:



איור 3
תיאור סכימתי של קו ייצור ביוטכנולוגי

פרק 1: תהליכי תסיסה

1.1 רקע היסטורי והגדרת המהות של תהליך התסיסה

המונח ***תסיסה (פרמנטציה)*** מקורו במילה הלטינית fervere, שפירושה רתיחה או התססה, ואשר שימשה בעבר לתיאור הפעולה של השמרים על מיצי פירות או של שעורה מונבטת במסגרת יצירת משקאות אלכוהוליים. תופעה זו שימשה במשך אלפי שנים לייצור ולעיבוד של מוצרי מזון ומשקאות באופן אמפירי, כגון: הכנת בירה, התססת יין, אפיית לחם, ייצור של גבינות ויוגורטים מחלב, והכנת ירקות ופירות כבושים ומוחמצים. שימושים ביוטכנולוגיים חיוניים אלה נעשו ללא כל מודעות לקיומם של יצורים חיים זעירים אשר ביצעו בפועל את תהליכי התסיסה.

רק במאה ה-17 גילה המדען ההולנדי לבנהוק קשר זה, אשר מאוחר יותר (במאה ה-19) בוסס על-ידי המדען הצרפתי פסטר. ממצאיהם של לבנהוק ופסטר הראו כי תהליכי התסיסה מתבצעים על-ידי ***תאים מיקרוביאליים*** (חיידקים, שמרים או פטריות). בעקבות אבחנה זו החלו בסוף המאה ה-19 ובתחילת המאה ה-20 להשתמש בתהליכי תסיסה לייצור תעשייתי של כימיקלים כגון אתאנול, אצטון, וחומצת חומץ. תהליכים ראשונים אלו בוצעו בצורה פשוטה, ללא אוורור מתאים ובתנאים לא-סטריליים.

בשנות הארבעים של המאה ה-20 חל מפנה משמעותי: הצורך בייצור המוני של פניצילין ותרופות אנטיביוטיות אחרות הביא למעבר מעבודה עם תערובות תסיסה "מסורתיות" לפיתוח של מערכת ייצור, המבודדת מן הסביבה ומבוקרת, ואשר התסיסה בה מתרחשת במתקן מיוחד: ***פרמנטור***, בתנאים סטריליים, על-ידי אוכלוסיה אחידה ומוגדרת של מיקרואורגניזמים נבחרים, במחזורים של תהליך מנתי.

כל מחזור במערכת הייצור החדשה כלל: הטענת מצע מתאים המכיל חומרי מזון לתוך הפרמנטור, ביצוע עיקור בחימום, הזנת תרבית מוצא של מיקרואורגניזמים, ריבוים, ויצירת תנאים להתפתחות של תהליך תסיסה בתנאים מבוקרים של: טמפרטורה, אוורור, ערבול ו- pH. בסיומו של שלב זה בוצע שלב ההפרדה של התוצר, והכנת הפרמנטור לביצוע מחזור נוסף של התהליך בתנאים זהים.

המעבר לביצוע של תהליך התסיסה בתנאים מוגדרים ומבוקרים איפשר ייעול של התהליך ויכולת לשחזרו במדויק פעמים רבות, לקבלת כמות זהה של תוצר על-ידי שימוש באותו צירוף של מרכיבים, תאים ותנאי הפעלה.

השימושים הראשונים במיקרואורגניזמים החלו, כאמור, בתהליכים אנארוביים שהתרחשו ספונטנית במהלך האחסון של חומרי מזון בכלים, שהאוורור בם היה מוגבל ביותר. לכן נהגו במשך תקופה ארוכה להגדיר את המונח תסיסה כתהליך שבו מיקרואורגניזמים מפרקים תרכובות אורגניות לשם הפקת אנרגיה בתנאים אנארוביים (בהיעדר חמצן מולקולרי, O_2).

לאחרונה מקובל לייחס לתהליך התסיסה הגדרה רחבה יותר: תסיסה היא כל תהליך של חילוף חומרים המתרחש על-ידי מיקרואורגניזמים בנוכחות חמצן מולקולרי או בהיעדרו.

המגוון העצום של המיקרואורגניזמים הקיים בטבע, ויכולתם לנצל טווח רחב של סובסטרטים ליצירת תוצרים רצויים, מהווה מאגר לפיתוחם של תהליכי תסיסה מבוקרים חדשים. יתר על כן, ההתפתחות של הביוטכנולוגיה החדשה, ובמיוחד של טכניקות ההנדסה הגנטית, הובילה לשיטות ואפשרויות חדשות להגדלת מספר התוצרים וסוגיהם ולייעל את ייצורם באמצעות מיקרואורגניזמים.

ניתן לסווג את תהליכי התסיסה לשש קטגוריות עיקריות:

א. **ייצור של ביומסה מיקרוביאלית**

תוצר התהליך הוא ***ביומסה***; דהיינו התאים עצמם, המשמשים כתאים חיים לביצוע תהליכי תסיסה אחרים (לדוגמה: שמרי אפייה), או כתוסף מזון, ובעיקר כמקור לחלבון, הקרוי על-כן "חלבון מחד-תאים" ומשמש כתוספת מזון לבעלי-חיים.

ב. **ייצור ביופולימרים**

תוצר התהליך הוא חלבון או ביופולימר אחר (כגון רב-סוכר) המופרש מהתא או נאגר בתא. דוגמה נפוצה לתוצרים השייכים לקבוצה זו היא אנזימים מיקרוביאליים. היישום המסחרי העיקרי של אנזימים אלה הוא בתעשיית המזון והמשקאות, ובמידה לא מבוטלת גם בתחומי המחקר והרפואה ובתעשיית חומרי הניקוי.

ג. **ייצור מטבוליטים מיקרוביאליים**

תוצר התהליך הוא חומר ביוכימי נמוך-מולקולרי, המיוצר בעקבות תהליכי פירוק או בנייה הנובעים ממהלך חילוף החומרים - טבעי או מכוון - של המיקרואורגניזם ומופרש בדרך כלל מן התאים לסביבה לאחר היווצרותו. לקטגוריה זו שייכים שני סוגי תוצרים: ***תוצרים ביוסינתטיים*** הנבנים במכוון על-ידי המיקרואורגניזם, לדוגמה: אנטיביוטיקות, ויטמינים, חומצות אמיניות, חומצות אורגניות, ***ותוצרים קטבוליים*** הנוצרים על-ידי המיקרואורגניזם כאשר הוא מפרק את חומרי המזון לשם הפקת אנרגיה, לדוגמה: אתאנול, מתאן, חומצה לקטית.

ד. **ייצור תערובות מותססות**

התוצר הוא מצע התסיסה בסיום התהליך, לאחר שהופרדו ממנו התאים, אשר בהרכבו חלו שינויים כתוצאה מתהליך התסיסה (לדוגמה: תהליכי הייצור של משקאות אלכוהוליים כמו בירה).

ה. **תהליכי היפוך ביולוגי (ביוקונברסיה, ביוטרנספורמציה)**

תוצר התהליך הוא מרכיב מצע שהוחדר בו שינוי מבני ספציפי על-ידי פעילות אנזימטית (אחת או יותר) של המיקרואורגניזם. דוגמה לכך היא הכנסת קבוצות (כגון הידרוקסיל או קשר כפול) במבנה של סטרואידים המשמשים כתרופות. התגובות האנזימטיות הנפוצות בתהליכי היפוך אלה כוללות תהליכים של: חימצון, חיזור, דחיסה, איזומריזציה, והרחקה או הוספה של מימנים ושל קבוצות שונות- מתיליות, קרבונילית, הידרוקסיליות, קרבוקסיליות ואמיניות.

ו. **טיפול בחומרי פסולת**

בנוסף לייצור של חומרים בעלי ערך מסחרי, לתהליכי התסיסה הארוביים והאנארוביים חלק חשוב במיחזור פסולת ובשמירה על איכות הסביבה בתהליכים: לטיהור מים, ולסילוק של פסולת חקלאית (כגון הפרשות של בעלי-חיים), של פסולת צמחית (קש, גבעולי כותנה, קלחי תירס) ושל פסולת מתעשיית המזון (שאריות ירקות, קליפות, שאריות של בתי-מטבחיים ומשחטות).

הטיפול בחומרי פסולת על-ידי תהליכי תסיסה יש לו שני היבטים:

א) היבט אקולוגי, הקשור לסילוק חומר אורגני זמין שריכוזו גבוה ואשר גורם לזיהום הסביבה.

ב) היבט כלכלי של מיחזור, תוך ניצול מקור חומר ואנרגיה מתחדש העשוי להיות חומר גלם מדרגה ראשונה בעתיד.

כך לדוגמה, מתבצעת תסיסה אנארובית של זבל פרות, הנעכל בתסיסה ויוצר ***ביוגז*** המכיל את הגז מתאן, שיש לו ערך אנרגטי כתחליף לגז בישול בשימושים שונים (כגון: ייצור קיטור, חימום, וייצור חשמל). השארית המוצקה של תהליך עיכול זה משמשת מזון חלבוני לבעלי-חיים (דגים) ודשן לחקלאות אינטנסיבית.

בטבלה 1-1 מפורטים תוצרים של תהליכי תסיסה עיקריים לפי ענפי התעשייה שבהם הם משמשים:

טבלה 1-1

סקירה של תוצרי תסיסה לפי ענפי התעשייה

ענפי התעשייה	תוצרי תסיסה
כימיקלים	אצטון, אתאנול, בוטאנול, חומצות אורגניות (חומצה ציטרית).
ביוכימיקלים	אנזימים, בשמים, פולימרים (בעיקר רב-סוכרים).
חומרים פרמצבטיים	אנטיביוטיקות, חומרים המשמשים לדיאגנוסטיקה (אנזימים, נוגדנים חד-שבטיים), מעכבי אנזימים, סטרואידים, תרכיבי חיסון.
אנרגיה	אתאנול (גזוהול), מתאן (ביוגז), ביומסה.
מזון	מוצרי חלב (גבינות, יוגורטים), מוצרי דגים, מוצרי בשר, משקאות (אלכוהוליים, תה וקפה), שמרי אפייה, תוספי מזון (מונעי חימצון, חומרי צבע, טעם וריח וחומרים מייצבים), חומצות אמיניות, ויטמינים, תוצרי עמילן, ממתיקים.
חקלאות	מזון לבעלי-חיים (חלבון מחד תאיים), תרכיבי חיסון וטריניריים, חומרי הדברה המיוצרים על-ידי מיקרואורגניזמים, תרבית מזרע של ריזוביום וחיידקים מקבעי חנקן אחרים.

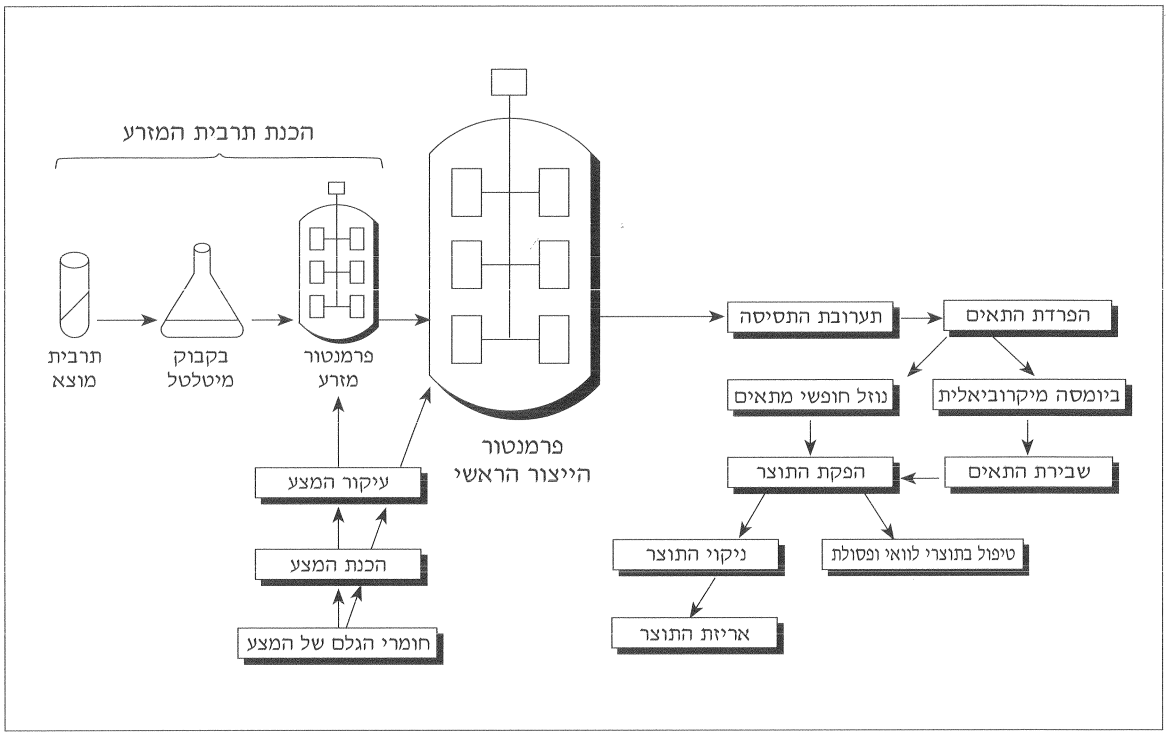
1.2 השלבים העיקריים בתהליך התסיסה

מרבית תהליכי התסיסה התעשייתיים דומים במאפיינים הבסיסיים הכלליים שלהם, על אף המגוון של סוגי המיקרואורגניזמים והתוצרים. לפיכך ניתן לחלק את תהליך התסיסה באופן כללי לשלושה שלבים עיקריים (ראה איור 1-1):

א. **שלב ההכנות**: הכנת המצע, הכנת תרבית המזרע (אינוקולום), ועיקור המערכת.

ב. **שלב הביצוע** של תהליך תסיסה מבוקר בביוריאקטור (פרמנטור).

ג. **שלב ההפרדה** והניקוי של התוצר.



איור 1-1

תיאור סכימתי של השלבים העיקריים של תהליך תסיסה כללי

1.2.1 שלב ההכנות

א. הכנת המצע

המצע המשמש בתהליך התסיסה חייב לספק את כל המרכיבים הדרושים לגידול אופטימלי של התאים ולקבלת תפוקה מירבית של התוצר. יתר-על-כן, המצע מהווה גם את הסביבה בה מתבצעת הבקרה על משתנים חיוניים כגון: ערבול, טמפרטורה, pH, ורמת החמצן המומס, בתחום הערכים הדרוש לגידול ולפעילות מירבית.

על אף שהדרישות התזונתיות, הנחוצות לגידול ולריבוי התאים ולייצור התוצר, עשויות להשתנות באופן משמעותי ממיקרואורגניזם למיקרואורגניזם, יש כמה מרכיבים עיקריים המשותפים לרובם

המכריע של המצעים, המשמשים בתהליכי תסיסה. המרכיב הכמותי העיקרי הוא המים, המהווים בין 80% ל-90% מהמסה הכוללת של תא מיקרוביאלי. הרכב החומרים המומסים או מורחפים במצע המימי כולל מקורות זמינים של אנרגיה, פחמן, חנקן, זרחן, גופרית, מלחים ויסודות קורט. באופן כללי, מקורות אלה מנוצלים הן לצורך שלב הגידול והתרבות התאים והן כחומרי מוצא ומקור ליצירת אנרגיה הנדרשים לתהליך ייצור התוצר המבוקש.

התפקידים הפיזיולוגיים העיקריים של כמה יסודות כימיים שכיחים וחלקם היחסי בחומר התאי של תא מיקרוביאלי מסוכמים בטבלה 2-1.

טבלה 2-1:
ההרכב והתפקיד הפיזיולוגי של היסודות העיקריים בתא מיקרוביאלי

יסוד		% משקלי מחומר תאי יבש	פעילות פיזיולוגית
מימן	(H)	8	מרכיב של מים תאיים וחומרים אורגניים של התא.
חמצן	(O)	20	מרכיב של מים תאיים וחומרים אורגניים של התא; בתור O_2 פועל כקולט סופי של אלקטרונים בשרשרת הנשימה של מיקרואורגניזמים ארוביים.
פחמן	(C)	50	מרכיב של חומרים אורגניים של התא.
חנקן	(N)	14	מרכיב של חלבונים, חומצות גרעין וקואנזימים.
גופרית	(S)	1	מרכיב של חלבונים (מופיע בחומצות האמיניות ציסטאין ומתיונין) ושל מספר קואנזימים (כגון CoA).
זרחן	(P)	3	מרכיב של חומצות גרעין, פוספוליפידים וקואנזימים.
אשלגן	(K)	1	אחד הקטיונים העיקריים בתא, קופקטור של אנזימים מסוימים.
מגנזיום	(Mg)	0.5	קטיון תאי חשוב; קופקטור אנאורגני בתגובות אנזימטיות רבות (כולל אלה הקשורות ל-ATP); פעיל בקישור האנזימים לסובסטרט; מרכיב של כלורופילים.
סידן	(Ca)	0.5	קטיון תאי חשוב; קופקטור של אנזימים מסוימים (כגון פרוטאזות).
ברזל	(Fe)	0.2	מרכיב של ציטוכרומים וחלבונים אחרים, קופקטור של מספר אנזימים.
קובלט	(Co)	0.3	מרכיב של ויטמין B_{12} ושל קואנזימים שהם נגזרות שלו.
נחושת	(Cu)		מרכיבים אנאורגניים של אנזימים מיוחדים.
אבץ	(Zn)		
מוליבדן	(Mo)		
מנגן	(Mn)		קופקטור אנאורגני של אנזימים מסוימים, לעיתים מחליף את המגנזיום.

כאשר בוחרים מקורות לאספקה של מרכיבי מצע בתהליך מסחרי, יש להביא בחשבון את עלותם ולבדוק אם הם זמינים באופן מסחרי בקנה-מידה גדול לאורך זמן. על הרכב המצע לאפשר קצב גידול מהיר של ביומסת התאים וגם לעודד ייצור מירבי של התוצר המבוקש.

כ***מקור פחמן***, המהווה לרוב גם את מקור האנרגיה, משתמשים בדרך-כלל בתרכובות אורגניות - בעיקר פחמימות או שומנים.
הפחמימות, המשמשות כמקור פחמן ואנרגיה בתהליכי תסיסה, הן בדרך-כלל: עמילן תירס ומולסה (תוצר לוואי של תעשיית הסוכר). במקרים רבים נדרש טיפול מכין (כגון פירוק אנזימטי) לפחמימות, על-מנת להופכן למקור פחמן זמין לתאים. לכן כאשר המיקרואורגניזם, המשמש בתהליך, אינו מסוגל לפרק תרכובות אלו, מבוצע שלב מקדים של טיפול בחומרי הגלם בעזרת תכשירי אנזימים מסחריים, המייקר את התהליך.

עמילן תירס ניתן לפירוק בקלות יחסית, על-ידי עמילאזות, לגלוקוז, אותו מסוגלים מיקרו-אורגניזמים רבים לנצל ביעילות, ולכן הוא משמש במרבית המקרים כמקור עיקרי לפחמן ואנרגיה.
מולסה היא תמיסת סוכר מרוכזת, המתקבלת כתוצר לוואי לתהליך מיצוי הסוכר בתעשית הסוכרוז (סוכר השולחן) ומהווה תערובת של סוכרוז (40% משקלי), תוצרי פירוק חלקי שלו (גלוקוז ופרוקטוז), מלחים ושאריות חומרים אורגניים שונים. הסוכרוז הוא דו-סוכר, הזמין לתאים כמקור פחמן ואנרגיה, רק לאחר פירוקו בתהליך אנזימטי על-ידי האנזים אינברטאז לגלוקוז ופרוקטוז.

בשנות השישים, כאשר מחירי הדלק היו זולים בהשוואה למחירי התבואה, היה נפוץ השימוש ב***תרכובות שומניות*** מסוימות ובפחמימנים, שמקורן בנפט. היום משתמשים בשמנים צמחיים (כגון שמן סויה ושמן חמניות) כמקורות פחמן ואנרגיה.

למרות שקיימים מיקרואורגניזמים, היכולים להתקיים על תרכובות כאלו, הודות להפרשת אנזימים ספציפיים (כגון ליפאזות המפרקות טריגליצרידים), לשימוש בהם יש כמה חסרונות: שומנים מכילים פחות אטומי חמצן מפחמימות, ולכן יש צורך בהספקת חמצן מוגברת; הפירוק של תרכובות אלה מלווה בשחרור של חום מוגבר, המצריך יותר קירור. אבל הבעיה העיקרית שלהם היא מסיסותם הנמוכה במים, דבר המחייב את שבירתם לטיפות קטנטנות ויצירת תחליב, כדי להגדיל את שטח המגע בינם לבין התאים המיקרוביאליים המורחפים במצע המימי. פעולה זו מקשה, כמובן, את הפעלת המערכת.

מקורות פחמן ואנרגיה המנוצלים בתדירות נמוכה יותר בתעשיית התסיסה הם: גליצרול, כוהלים אחרים (כגון מתאנול ואתאנול) ותוצרי לוואי של תעשיות המזון (כגון מי-גבינה).

מרכיבי המצע, המשמשים כמקורות חנקן, זרחן וגופרית, מהווים חומרי מוצא לסינתזה של מקרו-מולקולות מורכבות, החיוניות לפעילות ולמבנה תקינים של התא (כגון: דנ"א, רנ"א וחלבונים) ולעיתים גם לבניית מולקולות התוצר.

כמקור חנקן משמשים חומרים אנאורגניים כמו אמוניה (NH_3), מלחי אמוניה ומלחי ניטראט, או לחילופין חומרים אורגניים כמו חומצות אמיניות ופפטידים שמקורם בתערובות עתירות חלבון, כגון: שאריות פולי סויה לאחר מיצוי השמן, חלבוני תירס המתקבלים כתוצרי לוואי לתעשיית עמילן התירס, תוצרי לוואי של תעשיית הבירה ותעשיית השמרים, וכיוצא באלה. שימוש בחלבונים כמקור חנקן מספק, בנוסף על החנקן, גם מקורות פחמן, גופרית ואנרגיה. אבל השימוש בחלבונים דורש לפרקם פירוק מוקדם לחומצות אמיניות על-ידי פרוטאזות, ממקור עצמי המופרש מהתאים או מתוספת של אנזימים מסחריים לתערובת.

כמקור זרחן משמשים מלחי פוספט מסיסים, אשר במקרים רבים מספקים גם את הבופר לשמירת ה-pH של המצע.

כמקור גופרית עשויים לשמש חומרים אנאורגניים כמו סולפיד ומלחי סולפאט, או לחילופין תרכובות אורגניות, המכילות קבוצות סולפהידריליות כמו החומצה האמינית ציסטאין.

בנוסף למקורות שהזכרנו עד כה, מצעי התסיסה מכילים גם כמויות קטנות של מלחי ברזל, סידן, מגנזיום ואשלגן, וריכוזים נמוכים עוד יותר של ***יסודות קורט*** הכוללים: אבץ, קובלט, נחושת, מוליבדן ומנגן. היסודות הללו לרוב מסופקים למצע כמלחים אנאורגניים בכמויות זעירות.

במקרים מסוימים יש להעשיר את המצע בתערובת, שהיא עשירה במיוחד במרכיבים המהווים פקטורי גידול. ***פקטור גידול*** הוא כל תרכובת אורגנית שהמיקרואורגניזם דורש כחומר מוצא לבניית מרכיבי התא, אולם לא יכול לייצרה בעצמו ממקורות המזון הבסיסיים שבמצע. פקטורי גידול אלה נדרשים בדרך כלל בכמויות קטנות יחסית, וכוללים בעיקר שלוש קבוצות של תרכובות:

* תערובת של חומצות אמיניות הדרושות לסינתזה של חלבונים.
* פורינים ופירימידינים הדרושים לסינתזה של חומצות גרעין.
* ויטמינים הדרושים לבנייה של קבוצות פרוסטטיות וקואנזימים מסוימים.

בהתאם לסוג המקורות המשמשים לאספקת הדרישות התזונתיות של המיקרואורגניזם, מבחינים בין ***מצע פשוט***, בעל הרכב כימי מוגדר וידוע, לבין ***מצע מורכב***, המכיל חומרי מזון שהרכבם הכימי אינו ידוע במדויק והם עשויים לספק במקביל מספר דרישות תזונתיות של התא (לדוגמה: תמצית שמרים, תמצית לתת או קמח סויה).

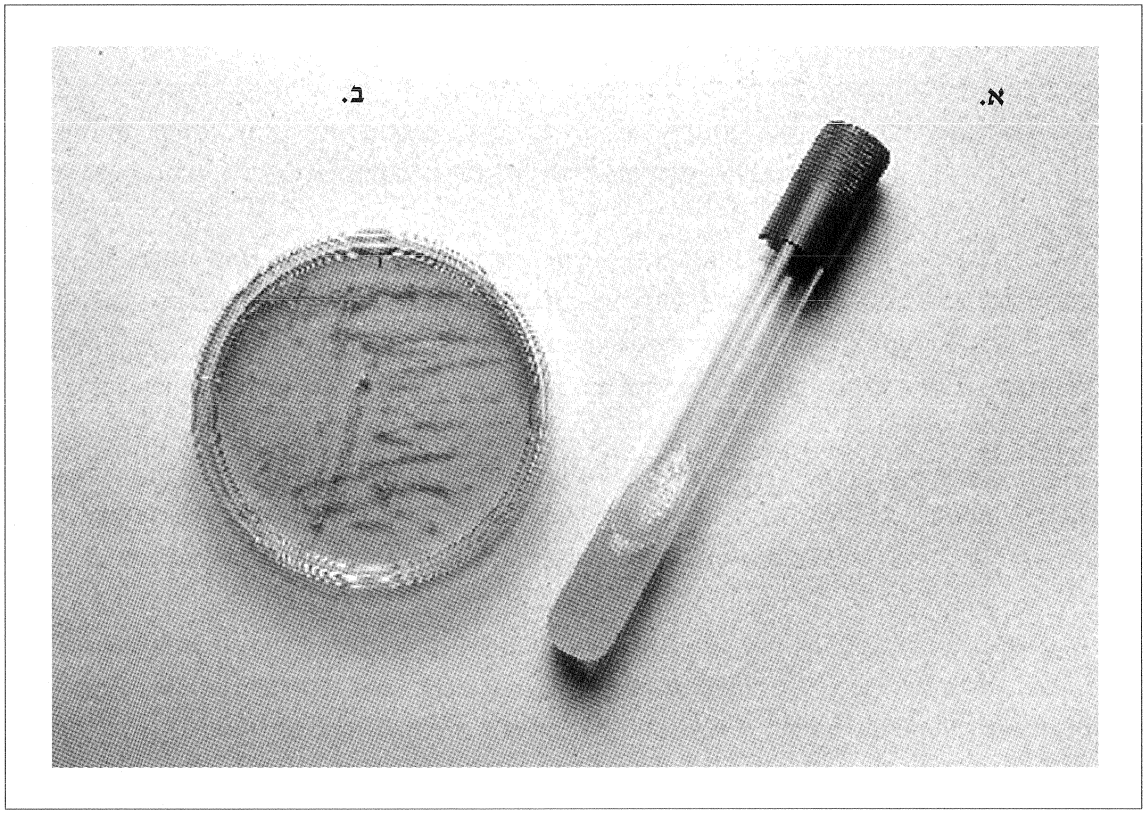
בנוסף על ההרכב הכימי של מרכיבי המזון במצע, ישנה חשיבות רבה לריכוזם וליחסים שבין ריכוזי המרכיבים השונים. למשל: עודף של חומרים אורגניים מסוימים כמו מלחי חומצות שומן וסוכרים או של חומרים אנאורגניים כמו מלחי פוספט, עלול לגרום לעיכוב או אף מניעה של הגידול ו/או יצירת התוצר.

ב. הכנת תרבית המזרע (אינוקולום)

תרבית מזרע, המשמשת כמוצא לאוכלוסית התאים בתהליך, מיוצרת מ***תרבית מוצא*** מאוחסנת, הנשמרת בתנאים קפדניים, שמטרתם למנוע את זיהומו של הזן במיקרואורגניזמים זרים ולשמר את חיוניות התאים ואת כושר הייצור הפוטנציאלי של התוצר המבוקש.

השיטות הנפוצות ביותר לאחסון תרביות המוצא הן:

* ייבוש בהקפאה של התאים, ושמירתם לזמן ממושך בתנאי ואקום באמפולות זכוכית אטומות בטמפרטורות נמוכות (-20°C עד -70°C).
* שמירה לפרקי זמן קצרים יותר על-ידי אחזקת התרבית ב-4°C, לאחר גידול על מצע מזון מוצק מתאים (בצלחת פטרי או במבחנה עם מצע אגר משופע - ראה איור 2-1), תוך העברת התרבית לכלי חדש מעת לעת.



איור 2-1

אחסון תרבית מוצא במצע מזון מוצק ב-4°C:

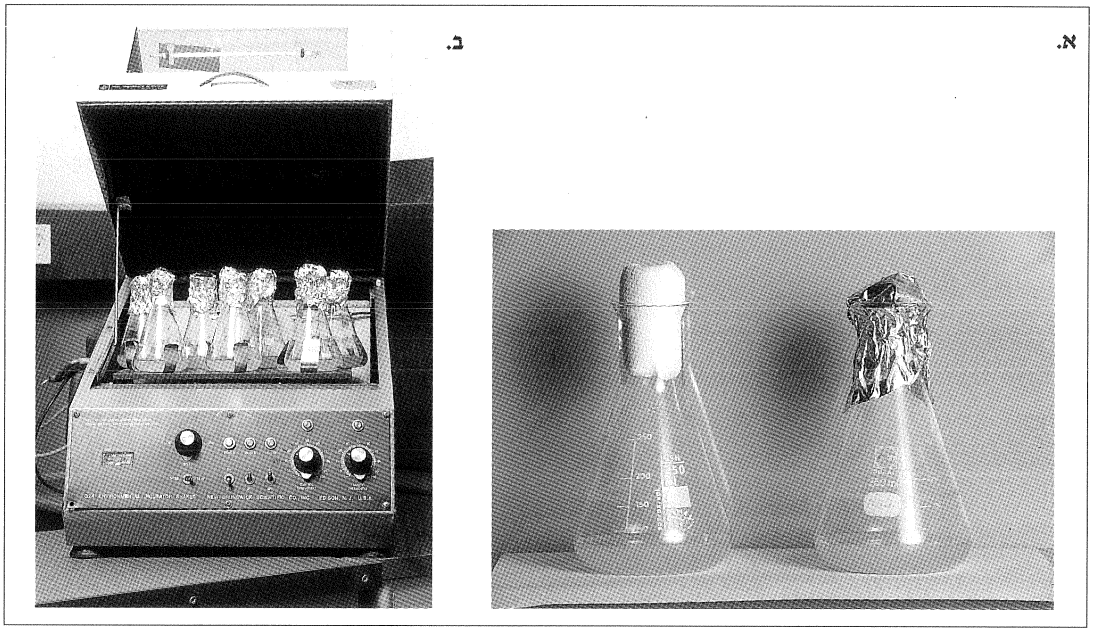
א. אחסון במבחנה עם מצע אגר משופע.

ב. אחסון בצלחת פטרי.

להכנת תרבית המזרע שתי מטרות עיקריות: האחת, "החיאת" התרבית המאוחסנת, אשר תאיה נמצאים במצב של תרדמה, למצב של חיוניות, גידול והתרבות. השניה, קבלת אוכלוסית תאים אחידה וטהורה הנמצאת בשלב של תהליך התרבות, שכמותה מספקת לזריעת מצע התסיסה בתרבית, אשר תתרבה בו במהירות לכמות הביומסה הרצויה בפרמנטור הייצור.

לשם השגת מטרה זו, ההכנה של תרבית המזרע מתבצעת בתהליך רב-שלבי מבוקר (ראה איור 1-1), תוך שמירה קפדנית ביותר על סטריליות ומעקב כמותי אחר גידול התאים.

בשלב הראשון נזרע נפח קטן מתרבית מוצא נקייה ל***בקבוק מיטלטל*** ***(Shake flask)***, המכיל מצע מזון נוזלי עשיר. הבקבוק המיטלטל סגור בפילטר סטרילי, המאפשר מעבר של גזים דרכו, אך מונע חדירה של מיקרואורגניזמים חיצוניים (ראה איור 3-1). בבקבוק המיטלטל מתבצע הגידול הראשוני של התאים בתנאים מבוקרים של טמפרטורה וטלטול, עד לקבלת אוכלוסיה הנמצאת במצב של גידול מואץ.



איור 3-1

גידול תרביות בבקבוק מיטלטל

א. בקבוק מיטלטל

ב. טלטלה שבה מתבצע הגידול

בשלב השני התרבית ההתחלתית שהתקבלה מועברת ל***פרמנטור מזרע*** קטן (שנפחו ליטרים אחדים), וממשיכה לגדול בו בתנאים מבוקרים עד לקבלת תרבית מזרע במצב פיזיולוגי מתאים, הנזרעת כולה ל***פרמנטור הייצור הראשי***.

ההרכב של המצע, המשמש לגידול תרבית המזרע בפרמנטור המזרע, דומה או זהה לזה של מצע הייצור שבפרמנטור הראשי, על מנת לקצר את תקופת ההסתגלות למינימום ולאפשר המשך רציף של הגידול המואץ של התאים בפרמנטור הראשי.

נפחה של תרבית המזרע נע בין 0.1% ל-5% מנפח העבודה של הפרמנטור הראשי.

גודלו של התהליך המתוכנן לביצוע בפרמנטור הראשי, קובע את מספרם של שלבי הביניים שיידרשו לגידול, עד שיתקבל הנפח הנדרש של תרבית המזרע הסופית.

ג. עיקור המערכת

רוב תהליכי התסיסה מבוצעים על-ידי תרבית טהורה, כלומר כל התאים באוכלוסיה שייכים לאותו זן של מיקרואורגניזמים. זיהום התרבית במיקרואורגניזמים זרים עשוי להפריע למהלך התסיסה בכמה דרכים. הנה שלוש מהן:

* תחרות על מרכיבי המצע, וכתוצאה מכך עיכוב של הגידול ופעילות הייצור הרצויים.
* הרס התוצר המבוקש מתהליך התסיסה על-ידי הזיהום.
* יצירת תוצרי לוואי שיקשו על הפרדת התוצר המבוקש.

לכן, השמירה על תנאים סטריליים קפדניים היא תנאי הכרחי לביצועם של תהליכי תסיסה באופן מבוקר, שניתן לחזור עליו פעמים רבות. תנאי זה פירושו שכל מה שבא במגע עם התרבית (כולל ציוד, חומרי המצע ואף האוויר המוחדר למערכת) חייב להיות נקי ממיקרואוגניזמים ונבגים, העלולים להתרבות ולהשתלט על המערכת.

השיטה הנפוצה ביותר לביצוע עיקור (סטריליזציה) של המערכת היא באמצעות חימום ל-121°C על-ידי אדי קיטור. משך העיקור של תמיסות תלוי בנפח הנוזל; לנפחים של עד שלושה ליטרים נוזל, למשל, מספיקה חשיפה של 20 דקות ל-121°C, לשם השמדה מוחלטת של תאים ונבגים שהיו בתמיסה.

תמיסות מימיות המכילות מרכיבים הרגישים לחימום (לדוגמא ויטמינים), וכן האוויר המוחדר למערכת, עוברים עיקור על-ידי סינון תת-מיקרוני, כלומר מועברים דרך חומר דמוי רשת, שעבר עיקור מוקדם ופועל כמסננת תת-מיקרונית (מסננת המאפשרת כניסה ויציאה של נוזלים וגזים, אך מונעת מעבר של מיקרואורגניזמים).

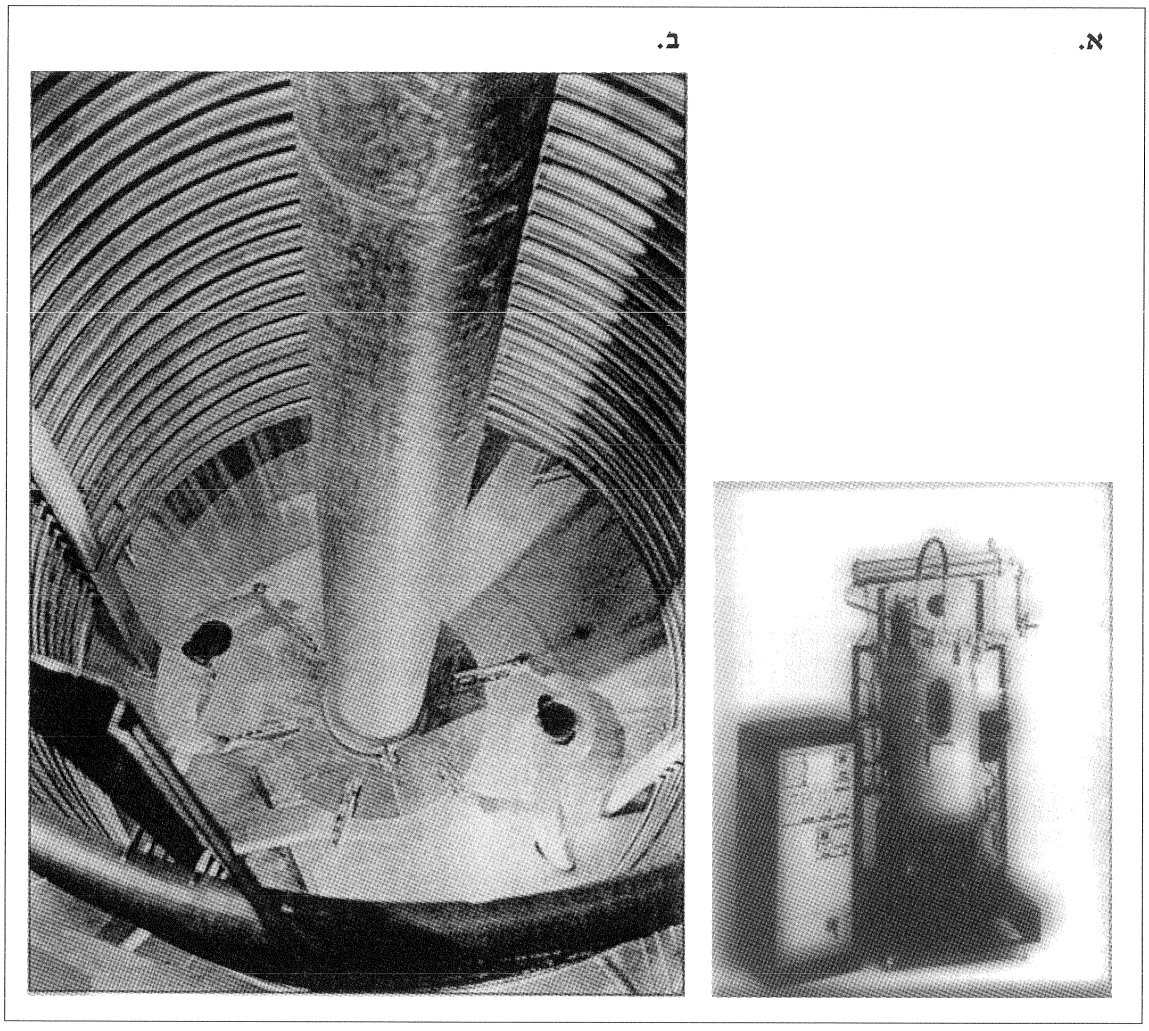
1.2.2 ביצוע תהליך התסיסה בפרמנטור

השלב השני והעיקרי בתהליך התסיסה הוא ביצוע תהליך תסיסה מבוקר בפרמנטור הראשי. הפרמנטור הראשי הוא כלי הקיבול, שבתוכו המצע ותרבית המזרע של המיקרואורגניזם מעורבבים ובו הם שרויים בתנאי סביבה אופטימליים ומבוקרים, כנדרש ליצירת התרבית ולקבלת תפוקה מירבית של התוצר.

לפני שנעבור ללימוד תהליך התסיסה עצמו, נכיר תחילה את מבנהו של מתקן התסיסה - הפרמנטור, ואת האמצעים להפעלה, לשליטה ולבקרה של תהליך התסיסה המתרחש בו.

א. מבנה הפרמנטור ואמצעי השליטה והבקרה בו.

פרמנטור תעשייתי הוא מיכל, הבנוי מפלדת אל-חלד. הקיבולת שלו נעה ממאות ליטרים (ראה איור 1-4 א) ועד עשרות אלפי ליטרים (ראה איור 1-4 ב).



איור 1-4

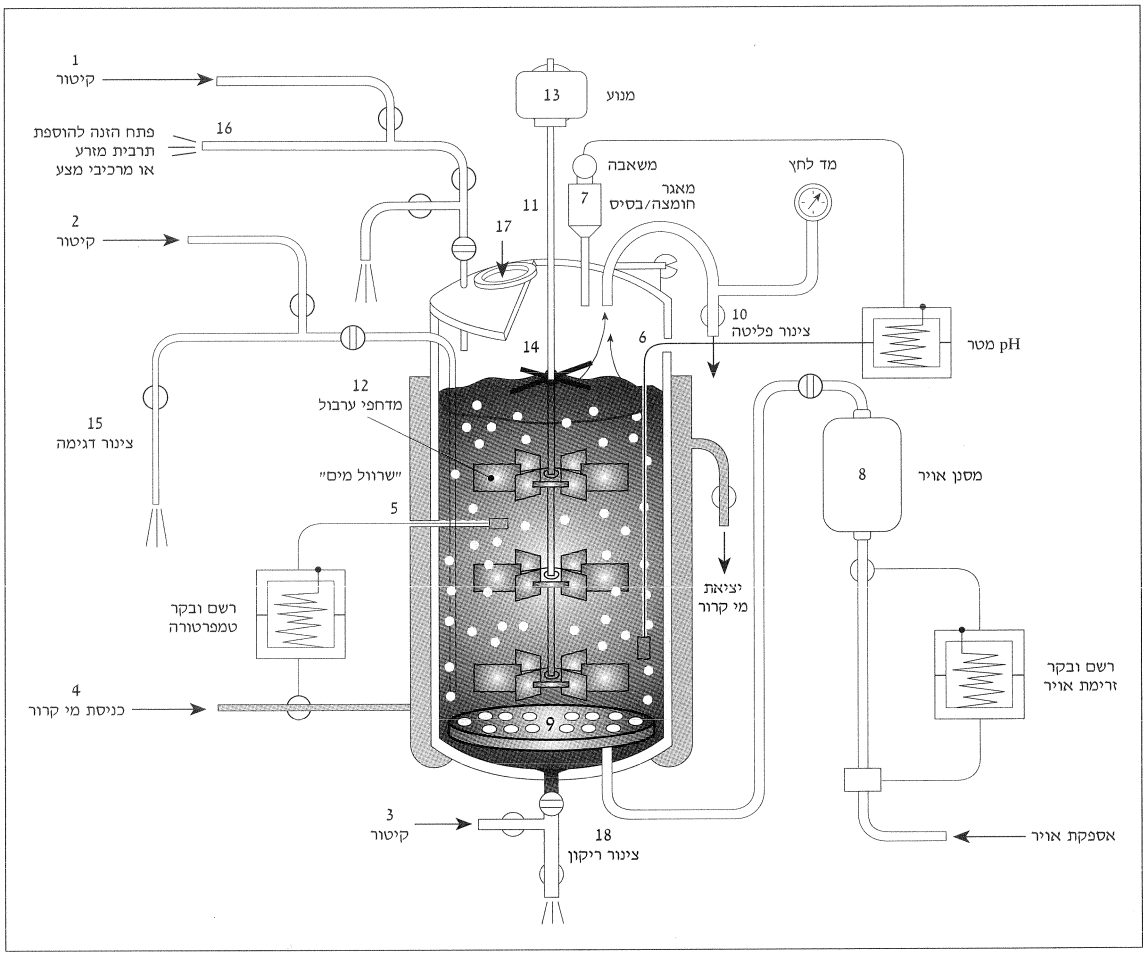
דוגמאות של פרמנטורים תעשייתיים בגדלים שונים:

א. מבט מבחוץ מהצד.

*ב. מבט מלמעלה אל תוך פרמנטור (שים לב לגודל האנשים בתוך הפרמנטור).**

* Reprinted from **Measurement & Control**, Vol. 31, May 1988, courtesy of Novo A/S, Denmark.

במיכל זה מותקנים פתחים וציוד עזר (ראה איור 1-5), המאפשרים הזנה ובקרה של תהליך התסיסה.



איור 1-5

תיאור סכימתי של מבנה פרמנטור תעשייתי המשמש בתהליך מנתי *

להלן נתאר את הפעולות הכרוכות בהפעלתו של פרמנטור תעשייתי:

עיקור המערכת: מתבצע על-ידי הזרמת אדי קיטור לצנרת, המחוברת לפתחי הכניסה והיציאה של הפרמנטור (חלקים 1, 2 ו-3 באיור 1-5).

ויסות הטמפרטורה: מתבצע על-ידי הזרמת מי-קירור או מי-חימום במעטפת חיצונית, המכונה ***שרוול מים*** ומקיפה את מיכל הפרמנטור (חלק 4 באיור 1-5), או באמצעות צנרת של ***מחליף-חום*** סלילי, הממוקם בתוך המיכל (כמו באיור 1-4 ב). הטמפרטורה של המים מבוקרת במיכל אספקה חיצוני, על-פי נתוני המדידות של מד-חום, הטובל במצע שבתוך הפרמנטור (חלק 5 באיור 1-5).

* Adapted from "Production Methods in Industrial Biotechnology," Elmer L. Goden, Copyright © September 1991, by **Scientific American, Inc.** All rights reserved.

בקרת pH: מתבססת על מעקב רציף אחר ערך ה-pH של המצע במהלך תהליך התסיסה בעזרת אלקטרודת pH, הטובלת במצע ומחוברת ל-pH מטר (חלק 6 באיור 1-5). ביצוע תיקוני ה-pH, בעת הצורך, נעשה על-ידי הוספה של חומצה או בסיס באמצעות משאבות מתאימות (חלק 7 באיור 1-5).

אוורור: מתבצע על-ידי הזרמה רציפה של אוויר סטרילי, המתקבל על-ידי העברתו דרך מסנן אוויר (חלק 8 באיור 1-5), לטבעת הפיזור (חלק 9 באיור 1-5) שבתחתית המיכל. העברת האוויר דרך טבעת הפיזור גורמת לשבירתו לבועות קטנות בחלק התחתון של הפרמנטור, בועות המתפזרות לאחר מכן בכל נפח הפרמנטור באמצעות פעולת הערבול. הבקרה על מידת האוורור נעשית, בהתאם, על-ידי ויסות משולב של קצב זרימת האוויר ומהירות הערבול.

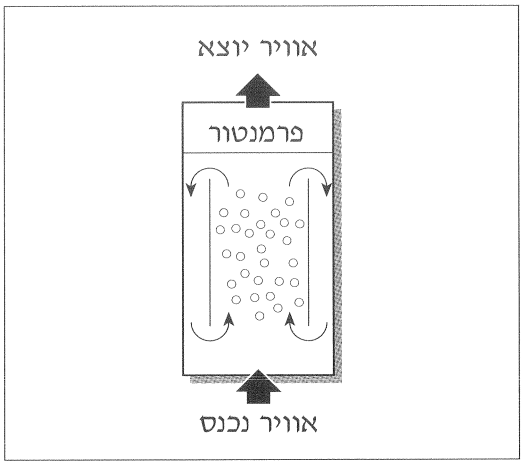
האוויר המוזרם לפרמנטור, והגזים הנוצרים במהלך התסיסה, נפלטים החוצה דרך צינור פליטה (חלק 10 באיור 1-5), הממוקם בחלקו העליון של הפרמנטור ("חלל הראש"). השסתומים המצויים בצינור זה מווסתים את זרימת האוויר דרכו, וכך משמשים לויסות הלחץ הפנימי בפרמנטור. במהלך התסיסה נהוג לשמור על לחץ פנימי גדול יותר מהלחץ האטמוספירי, כדי למנוע כניסה בלתי-מבוקרת של אוויר מבחוץ העלול לזהם את המצע.

ערבול: מתבצע בדרך כלל באמצעות מערבל הבנוי ממוט אנכי מסתובב, הממוקם במרכז הפרמנטור (חלק 11 באיור 1-5) ונושא כמה מדחפי ערבול, המותקנים עליו במרווחים קבועים (חלק 12 באיור 1-5) . המוט המרכזי מופעל על-ידי מנוע הנמצא בחלקו העליון (חלק 13 באיור 1-5), ובקרת הערבול נשלטת על-ידי ויסות של מהירות המנוע.

הערבול נועד ליצור פיזור אחיד של חומרי המזון ושל תרחיף התאים במצע. הוא גם מסייע למעבר חום, הנחוץ לוויסות הטמפרטורה של המצע, ומגביר את מידת האוורור, על-ידי פיזור בועות האוויר במצע ועיכוב יציאתן מהפרמנטור.

יש לציין, יחד עם זאת, שערבול מכני נמרץ מייקר משמעותית את עלות התהליך ושהפעלה של כוחות גזירה ושבירה חזקים עלולה לגרום נזק לתאים ולפגוע בתוצרי התסיסה. לכן במקרים של תאים או תוצרים הרגישים במיוחד לערבול, או כשמעוניינים לחסוך בעלות האנרגיה הנדרשת לערבול, ניתן להשתמש באספקת האוויר כאמצעי ערבול עדין, כאשר בועות האוויר העולות מתחתית הפרמנטור גורמות לערבול המצע ויצירת תנועה שלו בפרמנטור שעבר שינוי מבני מתאים (ראה איור 1-6 בעמוד הבא).

שבירת קצף: במקרים רבים נוצר במהלך התסיסה קצף רב, המצטבר בחלקו העליון של הפרמנטור. מקור הקצף הוא בתהליכים של דנטורציה של פולימרים ביולוגיים (כגון חלבונים), המתרחשים כתוצאה מתגובות כימיות, מהפעלת כוחות פיזיקליים או מפעילויות אנזימטיות. שבירת הקצף נעשית בצורה מכנית על-ידי תוספת של לוחות, המותקנים בחלקו העליון של המוט המרכזי של המערבל (חלק 14 באיור 1-5) או על-ידי הוספת כימיקלים מונעי קצף למצע.



איור 1-6
ערבול פרמנטור באמצעות אוורור.
האוויר מוזרם דרך טבעת פיזור לצינור מרכזי פנימי.

דגימה: ביצוע יעיל של תהליך התסיסה (כלומר קבלת תפוקה מירבית של תוצר בפרק זמן קצר יחסית), דורש מעקב במהלך העבודה אחר התהליך, אחר השינויים המתרחשים בכמות התאים ובמצבם הפיזיולוגי, ואחר השינויים החלים בהרכב המצע - הופעת תוצר (תוצרים) והיעלמות של חומרי מזון וחומרי מוצא. לשם כך מוציאים באופן סטרילי ובפרקי זמן קצובים, דגימות מצע מהפרמנטור בעזרת צינור מיוחד, הטובל במצע (חלק 15 באיור 1-5). דגימות אלה מועברות לאנליזה כימית וביולוגית.

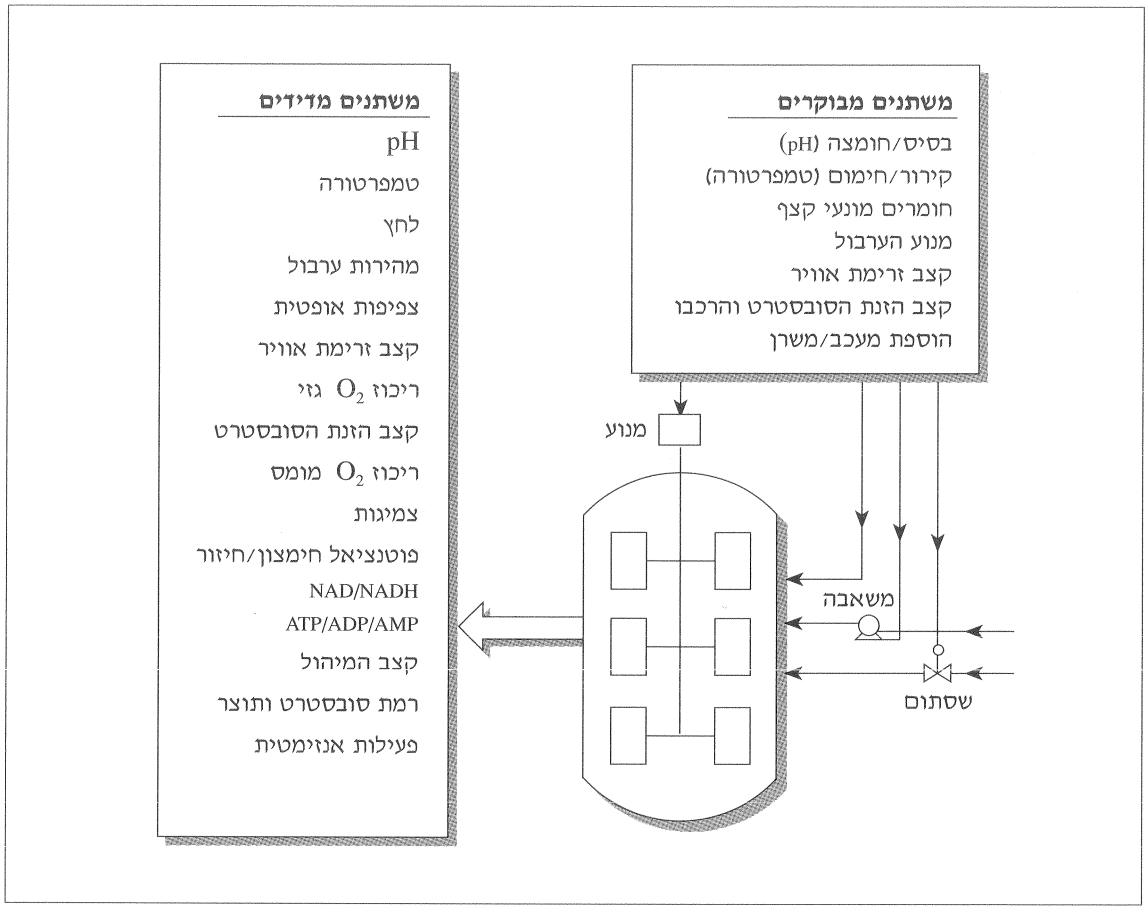
הזנה: בתהליכי תסיסה רבים ניתן לסייע לתהליך על-ידי הוספה הדרגתית של מרכיבי מצע או של חומרי מוצא ליצירת התוצר לפרמנטור במהלך התסיסה.
הוספת מרכיבים אלה לפרמנטור נעשית, בדומה לזריעת תרבית המזרע בפרמנטור, דרך פתח הזנה מיוחד (חלק 16 באיור 1-5). מובן שחייבים להקפיד באופן מיוחד על ביצוע סטריליזציה מוקדמת של החיבורים והמעברים, שדרכם מתבצעת הזנה זו.

מעקב חזותי אחר התפתחות תהליך התסיסה, לשם גילוי תופעות חריגות ותקלות, מתבצע דרך חלון הצצה בעל תאורה פנימית, הנמצא בחלק העליון של הפרמנטור (חלק 17 באיור 1-5).

ריקון: בסיום התהליך מרוקנים את תוכן הפרמנטור דרך פתח איסוף, הנמצא בקרקעית המיכל (חלק 18 באיור 1-5).

היעילות של תהליך התסיסה המתרחש בפרמנטור היא תוצאה משולבת של טיב המערכת הביולוגית, טיב תנאי ההפעלה, איכות הבקרה ויכולת השליטה במספר רב של משתנים (ראה איור 1-7). המשתנים האלה נחלקים לשלוש קבוצות עיקריות:

1) **פרמטרים פיזיקליים** כגון טמפרטורה, לחץ, צמיגות, מהירות ערבול, קצב זרימת אוויר.
2) **פרמטרים כימיים** כגון pH, ריכוז חמצן מומס, ריכוז חומרי מזון, ריכוז חומרי מוצא, ריכוז תוצר (תוצרים).
3) **פרמטרים ביולוגיים** כגון ריכוז התאים ומצבם הפיזיולוגי ופעילות אנזימטית.



איור 7-1

דוגמאות של משתנים הניתנים למדידה ומשתנים הניתנים לשינוי ובקרה בתהליכי תסיסה המתרחשים בפרמנטור תעשייתי

מדידה של פרמטרים אלה יכולה להתבצע ישירות במשך התהליך בצורה רציפה הנקראת ***ON LINE***, בעזרת ***חיישנים*** מתאימים (כמו: מד חום, אלקטרודת pH, אלקטרודת חמצן, מד לחץ), או על-ידי הוצאת דגימות בפרקי זמן שונים ובדיקתן באמצעות מבחנים כימיים וביוכימיים בנפרד מתהליך התסיסה, צורה הנקראת בדיקות ***OFF LINE***.

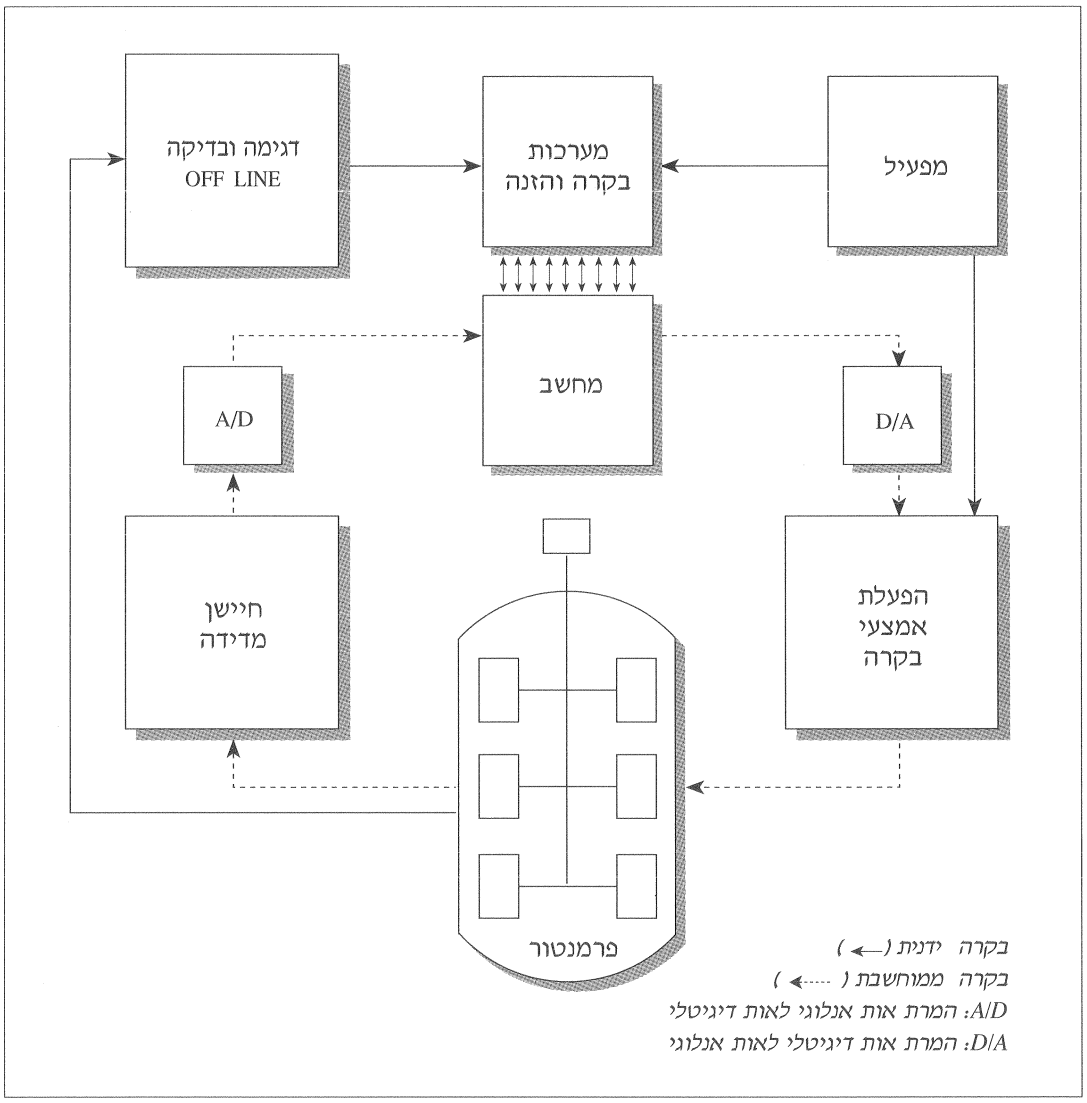
עבור פרמטרים מסוימים עדיין לא פותחו חיישנים מתאימים, ולכן מדידתם מתאפשרת רק לאחר הוצאת הדגימה ובדיקתה במעבדה. קביעת ריכוז התאים, למשל, נעשית במקרים רבים על-ידי קביעת מסתו הרטובה או היבשה של המשקע המתקבל לאחר הסרכוז, באמצעות מדידה ספקטרלית של עכירות הדגימה באורך הגל המתאים או באמצעות ספירה מיקרוסקופית של התאים בדגימה.

הערכת המצב הפיזיולוגי של התאים שנדגמו מתאפשרת באמצעות תצפית מיקרוסקופית במורפולוגיה שלהם ובאמצעות סדרה של קביעות הרכב ביוכימיות לתכולת רנ"א, דנ"א, חלבונים ופעילויות אנזימטיות שונות.

אם מדידת ON LINE מצביעה על שינוי, החורג מערכי סף מוגדרים, מבוצעת פעולת תיקון להחזירו לתחום הרצוי. כך ניתן לשנות את מהירות המדחף, כדי לשנות את מהירות הערבול; או להפעיל/לכבות משאבות ולפתוח/לסגור שסתומים מתאימים, כדי לבצע או להפסיק הזנה של מרכיבים לפרמנטור כגון חומצה/בסיס, חומר משכך קצף, מרכיבי מצע וחומרי מוצא.

פעולת התיקון יכולה להתבצע באופן ידני או על-ידי הפעלה אוטומטית באמצעות יחידת בקרה דיגיטלית (מחשב) או יחידת בקרה אנלוגית (ציוד אלקטרוני); המחשב מאפשר שליטה משולבת בכל מערכת הפרמטרים, בעוד שמכשיר אלקטרוני מסוים מפקח על פרמטר אחד בלבד.

השוואה בין גישות הבקרה השונות מובאת באיור 1-8.



איור 1-8

בקרה ידנית של תהליכי תסיסה מול בקרה ממוחשבת שלהם

השימוש במחשב לבקרת תהליכי תסיסה מאופיין במספר יתרונות: חסכון בכוח אדם, שליטה מתואמת במספר רב של משתנים, בעת ובעונה אחת, ביצוע מיידי של תגובות תיקון בעקבות איתור תקלות תפעול, ותיעוד מכלול המידע המאפשר מעקב להפקת לקחים.

ב. ביצוע תהליך התסיסה וייצור התוצר.

שלב התסיסה מתחיל, כאמור, לאחר קירור המצע (אשר עוקר בחום) לטמפרטורה המתאימה, זריעת תרבית המזרע וריבוי התאים בתנאים אופטימליים בקצב מואץ, להשגת ריכוז הביומסה, הנדרש לביצוע יעיל של תהליך התסיסה.

כאמור, תהליכי התסיסה משמשים בעיקר לייצור של ביומסה מיקרוביאלית, ביופולימרים, מטבוליטים מיקרוביאליים טבעיים, ותוצרי הנדסה גנטית.

בתהליכי הייצור של מטבוליטים מיקרוביאליים טבעיים מבחינים בין שני סוגי תוצרים: (ראה טבלה 3-1 בעמוד הבא).

* **מטבוליטים ראשוניים** הנגזרים מחילוף החומרים של התאים, המכוון לביוסינתזה של מרכיבי תא או יצירת אנרגיה. במקרה כזה מופיע התוצר בתרבית במהלך ההתרבות של אוכלוסית התאים.

* **מטבוליטים משניים** המופיעים בשלב מאוחר יותר, לאחר שהגידול העיקרי של התרבית הסתיים, ומיוצרים במקרים רבים בהשראת עקה סביבתית, הידלדלות מרכיבי המצע, ועלייה בצפיפות התאים.

יצירתם של מטבוליטים משניים מבוקרת, בין היתר, על-ידי ריכוזם של מרכיבי מצע מסוימים, כגון עיכוב על-ידי ריכוזים גבוהים של גלוקוז ואמוניה. כדי להתגבר על בעיה זו, ניתן להזין את הסובסטרט המעכב לפרמנטור במשך התהליך באופן הדרגתי (כלומר ביצוע התהליך באופן מנתי-מוזן), וכך להבטיח שריכוזו במצע לא יעלה על ערך סף מסוים, או לחילופין להשתמש במקורות פחמן וחנקן אחרים, הזמינים לתאים, אך אינם מעכבים את התהליך (לדוגמה החלפת הגלוקוז בלקטוז היא אחת האפשרויות למניעת עיכוב בייצור פניצילין).

הזנה הדרגתית של חומרי מצע לפרמנטור מסייעת גם ביצירת ההפרדה הדרושה בין שלב הגידול לשלב הייצור ביצירה של מטבוליטים משניים. בשלב הראשון - בשלב הגידול - כמות חומרי המזון המוספת לפרמנטור גדולה יחסית, כדי לאפשר גידול מהיר של הביומסה. לעומת זאת בשלב הייצור התאים מוחזקים במצב של מנוחה או גידול איטי על-ידי הוספת כמויות קטנות יותר של חומרי מזון, או שינוי הרכבם.

טבלה 3-1
דוגמאות של מטבוליטים מיקרוביאליים ראשוניים ושל מטבוליטים מיקרוביאליים משניים וחשיבותם המסחרית

	מטבוליטים	תחומי שימוש מסחרי
מטבוליטים ראשוניים	אתאנול	משקאות אלכוהוליים
	חומצה ציטרית	שימושים שונים בתעשיית המזון
	אצטון וביוטאנול	ממסים אורגניים
	חומצה גלוטמית	חומר טעם וריח
	ליזין	תוסף מזון
	רב-סוכרים	שימושים שונים בתעשיית המזון
מטבוליטים משניים	פניצילין	אנטיביוטיקה
	צפלוספורין	אנטיביוטיקה
	טטרציקלינים	אנטיביוטיקה
	סטרפטומיצין	אנטיביוטיקה
	אקטינומיצין	טיפול במחלות סרטניות
	פפסתטין	טיפול בכיבים
	ציקלוספורין A	דיכוי הפעילות של מערכת החיסון
	גיברלין	מווסת צמיחה בצמחים

בנוסף לתוצרי תסיסה הנוצרים על-ידי פעילות של המערכות האנזימטיות הטבעיות של המיקרואורגניזמים, מאפשרות כיום השיטות של הנדסה גנטית להחדרת גנים, לנצל מיקרואורגניזמים גם ליצור של חלבונים ופפטידים המיוצרים בטבע על-ידי תאים עילאיים (של צמחים או של בעלי-חיים) ווירוסים, באמצעות השיבוט של הגן - או קבוצת גנים - בתא מיקרוביאלי (חיידק או שמר). היישומים העיקריים של שיטה זו בתעשייה הם ייצור של אינסולין, של אינטרפרון, של אנזימים שונים ושל חלבונים ויראליים המשמשים לחיסון.

יעילות יצרנית (פרודוקטיביות)

מקובל להעריך את יעילותו של תהליך התסיסה בעזרת פרמטר המכונה ***יעילות יצרנית (פרודוקטיביות)***. פרמטר זה מבטא את היחס בין כמות התוצר המתקבלת בתהליך לזמן הדרוש לביצועו, בדרך כלל ביחידות של גרם לליטר לשעה:

$$\text{פרודוקטיביות} = \frac{\text{כמות התוצר ביחידת נפח}}{\text{זמן הפרמנטציה}}$$

זמן הפרמנטציה - המכונה גם ***זמן מחזור*** בתהליך מנתי - כולל, בנוסף על משך תקופת ייצור התוצר עצמו, גם את הזמן הנדרש לניקוי ולהכנה של המערכת, מילוי הפרמנטור, עיקורו וגידול התאים. כדי להגדיל את יעילות ניצול הפרמנטור הראשי לייצור, יש להקטין ככל שניתן את פרק הזמן הנדרש להכנות מוקדמות אלה. זמן הפרמנטציה של תהליכי תסיסה נע ממספר שעות ועד מספר ימים.

שיפור הפרודוקטיביות של תהליך התסיסה מתאפשר בעיקר על-ידי הגברת קצב גידול התאים וקצב ייצור התוצר. שני פרמטרים אלה תלויים בעיקר בשלושה גורמים:

* איכות הגזע המיקרוביאלי שמשתמשים בו.
* הרכב המצע.
* בקרה מדוייקת של תנאי הסביבה (כגון: pH, טמפרטורה, אוורור וערבול) השוררים במהלך התסיסה.

היעילות היצרנית של התהליך מוכתבת בעיקרה על-ידי הפוטנציאל הגנטי של הגזע המיקרוביאלי, כאשר בכל תהליך תסיסה מבוצעת אופטימיזציה של תנאי הסביבה והרכב המצע, ונקבע צירופם האופטימלי, כדי לאפשר קצב גידול וייצור מירביים.

המצע המשמש בתהליך מכיל את כל החומרים הדרושים לגידול ולייצור של התוצר. הריכוז של מרכיבי המצע הולך ומידלדל במשך התהליך, לכן נהוג לספקם במצע ההתחלתי בריכוז גבוה מספיק, כדי לאפשר פעילות ייצור מירבית גם לקראת סוף התהליך. אם מרכיב מסוים של המצע מהווה גורם מעכב, בהיותו בריכוז גבוה, נהוג לספקו במצע ההתחלתי בריכוז נמוך (מתחת לערך הסף המעכב), ולשמור על ריכוז זה במהלך התהליך, על-ידי מעקב והוספתו ההדרגתית לפרמנטור כאשר ריכוזו יורד.

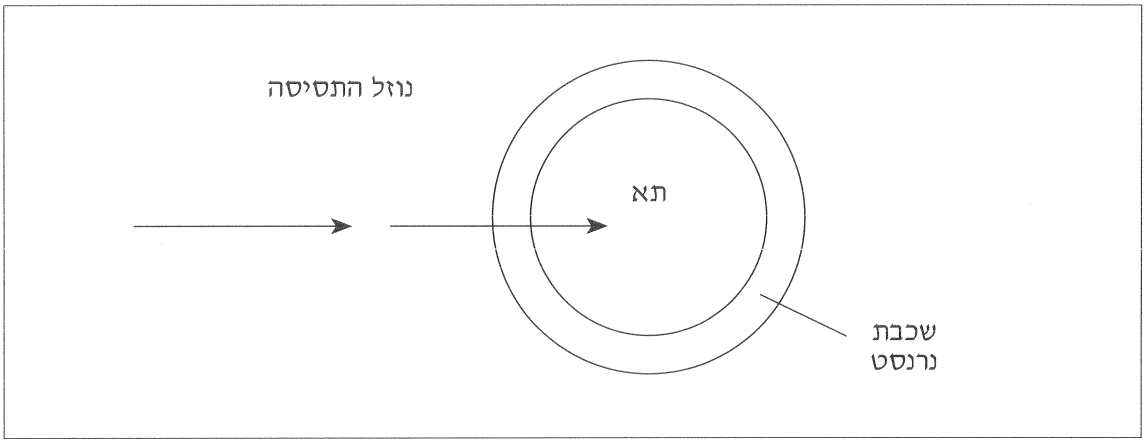
מרכיב מצע חיוני, הקשה לשליטה, לבקרה ולאספקה, הוא החמצן. רוב האורגניזמים התעשייתיים הם ארוביים, כלומר מנצלים חמצן מולקולרי (O_2) כגורם מחמצן סופי, כדי לספק את הצרכים האנרגטיים שלהם. לכן ברוב תהליכי התסיסה נדרשת אספקה מתמדת של חמצן לתאים.

אספקת החמצן כאוויר מסונן-סטרילי מתבצעת, כאמור, מתחתית הפרמנטור בצורת בועות. על מנת להגיע אל התאים על מולקולת החמצן לחדור בעד הקרום של פני הבועה ולהתמוסס במצע המימי. מסיסותו של החמצן במצע המימי היא נמוכה יחסית ונוכחותם של אחדים ממרכיבי המצע (כגון סוכרים) מקטינה מסיסות זו עוד יותר. לכן, על מנת לספק את דרישת החמצן של התאים, יש צורך לאוורר את הפרמנטור אוורור נמרץ, ולפזר את האוויר המוזן למצע בצורת בועות קטנות, וכך ליצור שטח מגע מירבי בין בועות האוויר לבין הנוזל, באמצעותו מתבצע התהליך הקריטי של מעבר החמצן מהבועית אל המצע שבו מורחפים התאים. תוספת של ערבול מכני חזק מסייעת לשמור על אחידות הריכוז של החמצן המומס בכל חלקי הפרמנטור.

שיטה נוספת לייעול אספקת החמצן לתאים היא בעבוע של אוויר מועשר בחמצן (כלומר אוויר המכיל מעל 20% חמצן - תכולת החמצן של אוויר רגיל), מה שמאפשר להקטין את קצב האוורור והערבול וכך לחסוך באנרגיה.

אך גם כאשר המצע מכיל את כל המרכיבים החיוניים בריכוז המתאים, עדיין קינטיקת הגידול והייצור מוגבלת על-ידי ***מעברי מסה*** של מרכיבי מצע אל התאים ומהם בתהליך דיפוזיה, המונע בכוח מפל הריכוזים בין המצע לבין פנים התא.

חומרי מזון, חומרי מוצא וחמצן, המומסים במצע, חייבים לעבור שני מחסומי דיפוזיה עד שהם חודרים לתוך התא ומנוצלים על-ידי המערכות התוך-תאיות: דיפוזיה בנוזל החיצוני עד הגיעם אל פני התא, ודיפוזיה דרך ***שכבת נרנסט*** - שכבה דקה "עומדת" של נוזל, הספוחה סביב כל תא וחלקיק בתמיסה, ואינה מתערבבת עם הנוזל החיצוני (ראה איור 9-1).



איור 9-1
מעבר של מרכיבי מצע מומסים מנוזל התסיסה לתוך התא

כדי שמעברי מסה לא יהפכו לגורם מגביל בתהליך הייצור, קצב הדיפוזיה של המרכיבים השונים אל התא דרך שני מחסומים אלה צריך להיות מהיר דיו, כדי לאזן את קצב צריכתם על-ידי התאים.

יתר על כן, גם התוצר (התוצרים) והגזים הנוצרים בתא צריכים לנוע, לשם פינוים מן התא, בכיוון ההפוך - מהתא לנוזל החיצוני, תוך מעבר אותם מחסומי דיפוזיה. כך המגבלות של מעבר מסה עלולות להיות "צוואר בקבוק" לביטוי מלוא הפעילות הפוטנציאלית של התאים, הן בשל אי אספקת ריכוז חומרי המזון וחומרי המוצא, הדרושים לאתר הקטליטי, והן בשל הצטברות התוצר ותוצרי לוואי (פסולת) בתוך התאים ובסביבתם. תופעה זו משמעותית במיוחד במקרים בהם התוצר מעכב את הגידול או את תהליך הייצור.

כדי להתגבר על מגבלות הדיפוזיה של מעברי מסה, וכדי לאפשר מעבר יעיל ומהיר של מולקולות חומר מומס אל התאים ומהם, מופעל ערבול מכני חזק, המזרז מצד אחד את הגעת החומרים אל שכבת הנרנסט והרחקתם ממנה, ומצד שני מגביר את מהירות זרימת הנוזל ביחס לתאים, דבר הגורם להקטנת העובי של שכבת הנרנסט.

לאורך כל תהליך התסיסה צריך לשמור על טווח ערכים אופטימלי קבוע של טמפרטורה ושל pH, כפי שנדרש לפעילות מירבית של מכלול האנזימים של התא:

* **שמירת טמפרטורה.** במשך תהליך התסיסה נוצר חום בתהליכי חילוף החומרים של המיקרואורגניזם ובתהליכים המכניים של ערבול ואוורור. כדי לשמור על טמפרטורה בתחום הרצוי, קצב ייצור החום בתהליכים אלה חייב להיות מאוזן על-ידי קירור המערכת באמצעות מערכות קירור, המותקנות בפרמנטור ונשלטות על-ידי מערכת בקרה מתאימה.

* **שמירת ערך ה-pH** בתחום הרצוי. לשם כך על המצע ההתחלתי להכיל בופר מתאים, שתפקידו לנטרל את שינויי ה-pH, המתרחשים במצע במשך התהליך. בתהליכי תסיסה רבים מקובל להשתמש בבופר פוספט, שבנוסף לחיוניותו כמרכיב מצע, ניחן בטווח קיבולת בופר יעילה סביב תחום ערכי pH ניטרלי (7.6-6), המתאים לפעולתם של רוב המיקרואורגניזמים. בתהליכי תסיסה, שנוצרים בהם חומצה או בסיס בכמות גדולה מעבר ליכולת הקיבולת של הבופר (לדוגמה היווצרות של חומצות אורגניות בפירוק אנארובי של גלוקוז או היווצרות אמוניה כתוצאה מפירוק של חלבונים וחומצות אמיניות), מבוצעים תיקוני pH, על-ידי הוספת חומצה או בסיס באמצעות מערכת הבקרה המתאימה.

פרודוקטיביות מירבית מושגת אם כן על-ידי שילוב של יצרני יתר יעילים, אופטימיזציה של הרכב המצע ותנאי הסביבה, בשילוב עם עבודה במערכת נבחשת בעלת הרכב חומרים ותנאים אחיד בכל נפח המצע. במצב זה ניתן להגביר עוד את היעילות היצרנית רק על-ידי שינוי או שיפור גנטי נוסף של המיקרואורגניזם. במסגרת זו נבחנים כל העת גזעים מיקרוביאליים מוטנטים או רקומביננטים חדשים, אשר יתגלו כיצרני יתר יעילים במיוחד של התוצר המבוקש.

1.2.3 הפקת התוצרים

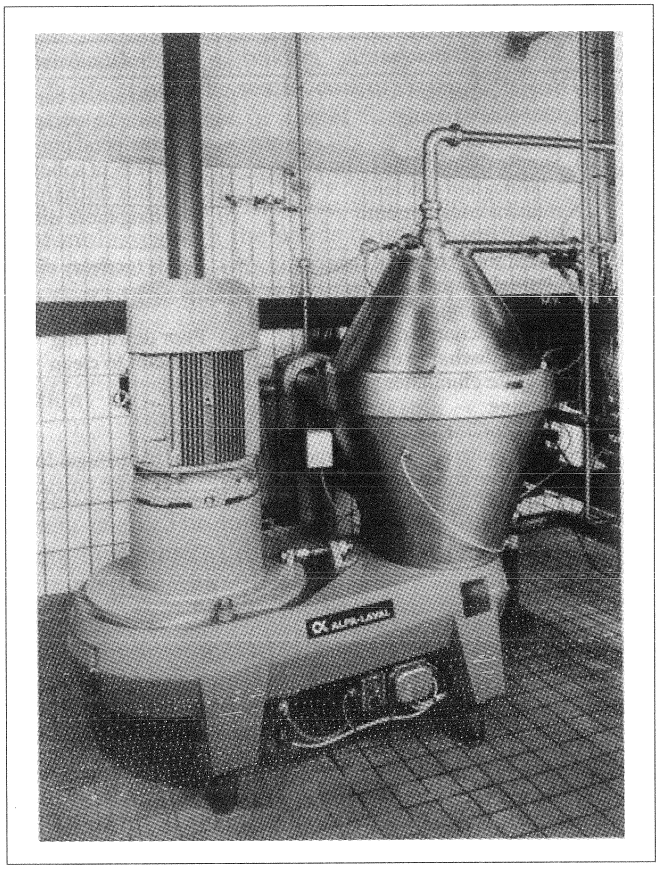
תהליך התסיסה מופסק, כאשר קצב ייצור התוצר יורד מאוד או נפסק לחלוטין, וריכוזו של התוצר מגיע לרמתו המירבית. בשלב זה מועבר תוכן הפרמנטור אל מיכל אחסון, וממנו מועבר להמשך תהליכי ההפרדה והניקוי של התוצר. תהליך הפקת התוצר הוא חלק אינטגרלי של תהליך התסיסה ומהווה מרכיב חשוב בניצולת ובתחשיב של עלות הייצור הכוללת של התוצר.

תערובת התסיסה בסיום התהליך מורכבת בעיקרה ממים בהם מורחפים או מומסים התוצר המבוקש, תוצרי הלוואי, התאים המיקרוביאליים ושאריות של חומרי מוצא ומרכיבי מזון. התוצר המבוקש מצוי בתערובת זו בדרך-כלל בריכוז נמוך יחסית (פחות מ-20% משקלי). גם חלק מהחומרים "המזהמים" אותו עשויים להיות דומים לו בגודל, בטעינה או במבנה הכימי, ומכאן נובע הקושי הכרוך בהפקתו, כלומר הפרדתו מהתערובת עם איבוד מזערי של חומר, והפקתו הסופית בדרגת נקיון גבוהה.

באופן כללי, הפקת התוצר כרוכה במספר שלבים עיקריים, כאשר השלב הראשון של מרבית תהליכי ההפקה הוא ההפרדה של תרחיף הביומסה המיקרוביאלית ומרכיבים לא מסיסים נוספים מנוזל התסיסה

לקבלת ***עוגת תאים*** או ***משחת תאים***. למטרה זו זמינות שתי שיטות עיקריות: סרכוז וסינון, ביניהן מקובלת בעיקר השיטה הראשונה כאמצעי ל"קצירת" התאים, בעוד שהשיטה השניה מיועדת לניקויו של נוזל התסיסה מתרחיף התאים.

סרכוז של תערובת התסיסה מתבצע על-ידי שימוש בצנטריפוגה (ראה איור 1-10). במהלך הסרכוז התאים שוקעים בנוזל התסיסה, ומתקבלים: משקע של תאים ונוזל צלול. לשם הגדלת מהירות השקיעה, נהוג לעיתים ליצור קודם צברים גדולים של תאים, בהשראת חומרים כמו מלחים אנאורגניים או פוליאלקטרוליטים אורגניים.



איור 1-10
צנטריפוגה תעשייתית *

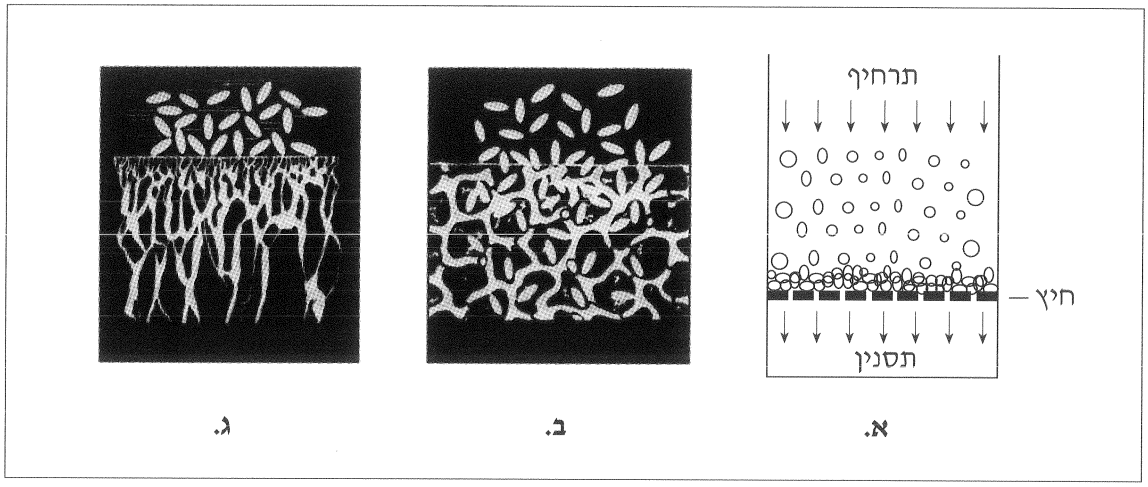
סינון תערובת התסיסה מתבצע על-ידי העברתה דרך חיץ, שאינו מאפשר מעבר של חלקיקים מורחפים גדולים ומאפשר מעבר חופשי של נוזל (התסנין) וחומרים המומסים בו (ראה איור 1-11 א'). קיימים שני טיפוסי חיץ המשמשים למטרה זו: פילטרים וממברנות.

* Reprinted from **Comprehensive Biotechnology: The Principle, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine**, Murray Moo-Young, Vol. 2, p. 337, Fig. 7. Courtesy of Elsevier Science Ltd. © 1985, All rights reserved.

* ***פילטר*** הוא חומר סיבי (כגון זכוכית, נייר, בד ועוד), המכיל מחילות מפותלות בעלות קוטר משתנה. פעולת הסינון של הפילטר מקורה בלכידת החלקיקים בפיתולי המרווחים שבתוכו, גם כאשר קוטרם גדול מגודל החלקיקים (ראה איור 1-11 ב').

* ***ממברנה*** בנויה משכבה דקה של מבנה נקבובי של פולימר מצולב, שגודל הנקבים בו קטן מגודל החלקיקים המופרדים. לכן הסינון דרך ממברנה מתרחש תודות לעצירת החלקיקים המופרדים על פני שטחה העליון (ראה איור 1-11 ג').

כך הפילטרים משמשים בעיקר לסינון של פטריות חוטיות והממברנות לסינון של חיידקים.



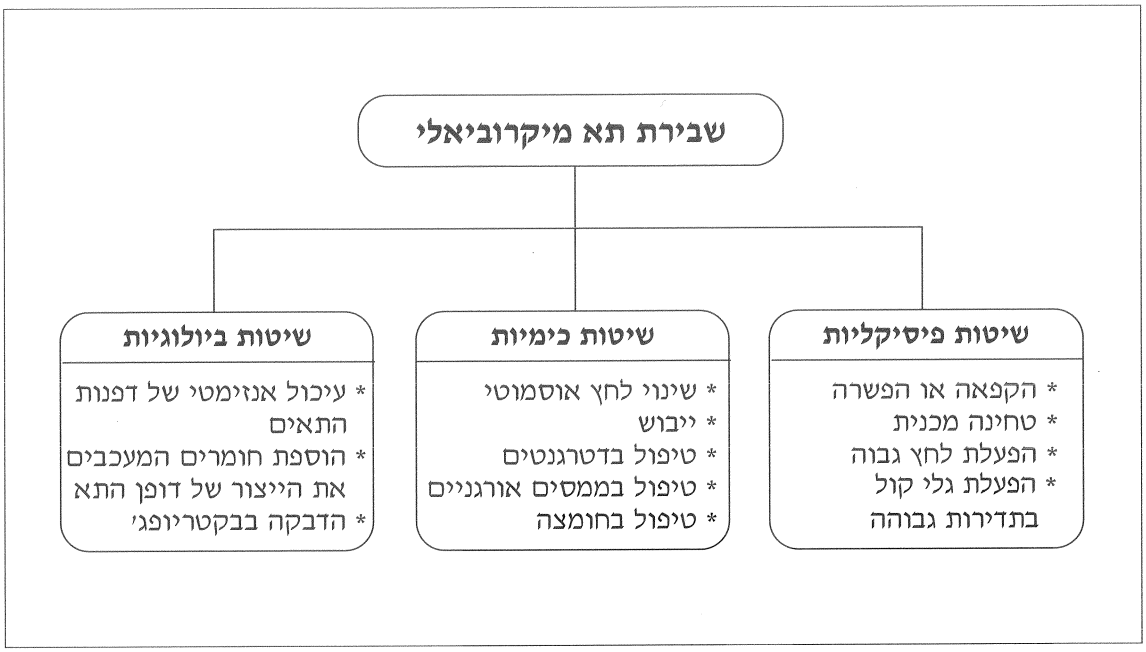
איור 1-11

סינון: *א. תיאור כללי של התהליך.*
*ב. סינון דרך פילטר.**
*ג. סינון דרך ממברנה.**

בתהליך שבו הביומסה של תאי המיקרואורגניזם עצמו היא התוצר הסופי, מסתיים שלב הפקת התוצר לאחר הפרדת התאים. בשאר המקרים המשך תהליך ההפקה תלוי בסוג התוצר ובדרישות הייחודיות של התהליך. במקרה של ***תוצרים חוץ-תאיים*** מסיסים, המופרשים על-ידי התאים לנוזל במהלך הפרמנטציה (כמו: חומצות אמיניות, חומצה ציטרית, אתאנול, אנזימים מסוימים ורוב האנטיביוטיקות), מבוצעת ההפקה ישירות מתוך נוזל התסיסה בעזרת שיטות ההפרדה המתוארות בהמשך.

לגבי ***תוצרים תוך-תאיים*** (כמו: חומצות גרעין, ויטמינים, אנזימים ואנטיביוטיקות מסוימות) הפקת התוצר דורשת שחרור מוקדם שלו מתוך התאים על-ידי שבירת התאים באמצעים כימיים, ביולוגיים או פיסיקליים, כמתואר באיור 1-12.

* Reprinted from **Comprehensive Biotechnology: The Principle, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine**, Murray Moo-Young, Vol. 2, p. 369, Fig. 2. Courtesy of Elsevier Science Ltd. All rights reserved. © 1985.



איור 12-1
שיטות שונות לשבירת תאים מיקרוביאליים

היעילות של הפעלת אמצעי שבירה מסוים תלויה בסוג התאים ובמצבם הפיזיולוגי: חיידקים גרם-חיוביים ושמרים הם קשים יותר לשבירה מחיידקים גרם-שליליים ופטריות חוטיות. הבחירה של שיטת השבירה תלויה אם כן, בנוסף לשיקולי עלות, גם באופי התאים ובסוג התוצר המבוקש (כאשר יש למנוע פגיעה בתוצר במהלך תהליך השבירה). לדוגמה: פתיחת התאים על-ידי טיפול בחומצה מנוצלת רק כאשר התוצר נשאר יציב בנוכחותה.

לאחר שבירת התאים מתבצע תהליך של הפרדת התוצר המבוקש על-פי תכונותיו הפיסיקליות (כמו: גודל, מסה, צפיפות ונקודת רתיחה), על-פי תכונותיו הכימיות (כמו: מסיסות ומטען חשמלי) או על-פי תכונותיו הביולוגיות (כמו: זיקת קישור ספציפית), באמצעות השיטה המתאימה לכך:

* הפרדת התוצר על-פי גודל מתבצעת באמצעות סינון דרך פילטר או ממברנה, באמצעות כרומטוגרפיית סינון בג'ל או בדיאליזה.

* הפרדת התוצר על-פי מסה או צפיפות מתבצעת בעזרת סרכוז צנטריפוגלי.

* הפרדת התוצר על-פי המטען החשמלי שלו מתבצעת באמצעות שיטות כמו השקעה איזואלקטרית, אלקטרופורזה וכרומטוגרפיה על-פני מחליפי יונים.

* תוצרים רבים ניתנים להפרדה על-פי מידת מסיסותם בממסים שונים. הפרדה על-ידי מיצוי בממס מבוססת לרוב על יצירת מערכת דו-פזית של שני ממסים, שאינם מתערבבים זה בזה: התמיסה

המימית, המכילה בין היתר את התוצר, וממס נוסף (למשל ממס אורגני שאינו מתערבב במים) בעל כושר המסה טוב יותר של התוצר המבוקש. התוצר יתרכז, במקרה זה, בפזת הממס ויופק ממנה בהמשך. שאר המרכיבים יישארו מרביתם בפזה המימית.

* הפרדת התוצר על-פי נקודת הרתיחה שלו מבוססת על זיקוק: אידוי התוצר על-ידי העלאת הטמפרטורה מעל לנקודת הרתיחה, הפרדת הפזה הגזית ועיבויה מחדש על-ידי הורדת הטמפרטורה. לחילופין, תוצרים מסוימים ניתנים להפרדה בדרך של גיבוש והשקעה על-ידי קירור התערובת.

* חלק מתוצרי התסיסה ניתנים להפרדה על-ידי ניצול יכולת קישור ספציפית שלהם לליגנדים ייחודיים באמצעות כרומטוגרפיית זיקה.

הפקה יעילה של התוצר דורשת לרוב שילוב של מספר שיטות הפרדה המבוצעות ברצף, כך שבכל שלב עולה ריכוז התוצר או דרגת נקיונו. בחירת שיטות ההפרדה וסדר ביצוען תלויה במספר גורמים:

1) תכונות התוצר.
2) מידת יציבותו וריכוזו ההתחלתי.
3) הסוג והריכוז של תוצרי הלוואי "המזהמים" את התוצר המבוקש.
4) דרגת הנקיון הסופית הנדרשת של התוצר.
5) העלות של השיטה והניצולת של מכלול תהליך הניקוי.

באופן כללי נהוג בשלבי ההפרדה הראשונים להגדיל את ריכוז התוצר על-ידי הקטנת נפח העבודה, ובהמשך לנקותו מחומרים אחרים לדרגת הנקיון הנדרשת. בדרך-כלל השלבים האחרונים בהפקת התוצר כוללים השקעה, גיבוש ו/או ייבוש.

חלקו של שלב הפקת התוצר בעלות הכללית של תהליך הייצור נע בממוצע סביב 20%, אולם במקרים קיצוניים של הפקת תוצרים תוך-תאיים בדרגת נקיון גבוהה במיוחד עלול חלק זה להגיע גם ל 70-80%. בכל מקרה, ליעילות תהליך ההפרדה של התוצר השלכה רבה על הכדאיות הכלכלית של התהליך, לכן הכרחי להפיקו בניצולת גבוהה ככל שניתן.

הניצולת של תהליך ההפקה מוגדרת כיחס שבין כמות התוצר בתערובת בתום שלב הייצור ותחילת שלב ההפקה, לכמות התוצר הנקי הסופי בגמר תהליכי ההפרדה והניקוי. איבוד תוצר במהלך ההפקה תלוי הן במידת הרגישות שלו לשיטת ההפרדה והן ביעילות ובמספר של שלבי ההפרדה והניקוי המבוצעים. לעיתים בגמר ההפקה נדרש עיבוד נוסף של התוצר לשם הכשרתו לשיווק.

רוב תוצרי התסיסה נשמרים באחסון בצורתם היבשה עד השימוש, ולכן בגמר ההפקה והעיבוד (אם נדרש) מבוצע ייבוש של התוצר הסופי, באופן שאינו פוגע במבנהו ובפעילותו. תהליך הייבוש מתבצע במגוון שיטות, שרובן מבוססות על העברת חום לתוצר הרטוב והרחקת הלחות ממנו על-ידי זרם של גז. כאשר התוצר רגיש לחימום משתמשים בשיטת הייבוש בהקפאה.

1.3 תפקודם של תאים מיקרוביאליים בתהליכי תסיסה

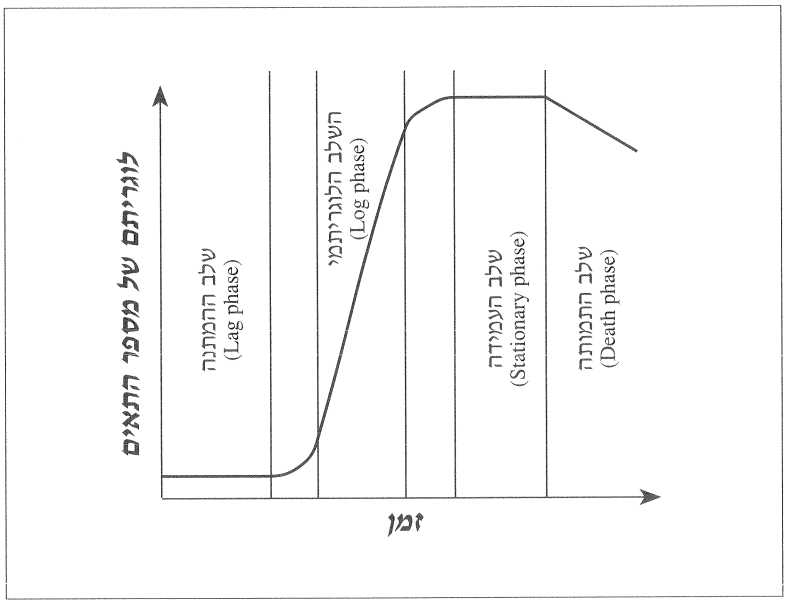
הגורם המרכזי והחיוני ביותר לביצועם של תהליכי תסיסה הם המיקרואורגניזמים, המהווים את "מכונות הייצור" ומבצעים תהליכי פירוק, שינוי ובנייה מוכוונים של ביוכימיקלים. לפיכך היכולת שלנו להפעילם לצרכינו בצורה היעילה ביותר תלויה בהבנה של תהליך התרבותם ובהכרת מנגנוני הבקרה הביוכימיים של התהליכים שאנו מעוניינים בביצועם.

1.3.1 שלבים בהתפתחותה של אוכלוסיה מיקרוביאלית

השימוש במיקרואורגניזמים בתהליכי תסיסה מחייב בראש ובראשונה קבלת הכמות הנדרשת של תאים. לשם כך נכיר את מאפייני קינטיקת הגידול של מיקרואורגניזם, את התלות שלה בתנאי הסביבה ואת הקשר הקיים בינה ובין יצירת התוצר והופעתו.

הגידול והריבוי של מיקרואורגניזמים, עד קבלת אוכלוסיה בעלת גודל ופעילות רצויים, הם תוצאה של סדרה מתואמת ומבוקרת של תגובות אנזימטיות בתוך התא. זו מביאה להתחלקות התא ולריבוי מספרם של התאים במערכת, המבוטא כגידול במסה או כשינוי במספר התאים ביחידת נפח עם הזמן. תיאור זה של התפתחות תהליך הריבוי כתלות בזמן נקרא ***עקומת גידול***.

אוכלוסיה ראשונית של תאים מיקרוביאליים המועברת למצע המכיל חומרי מזון המתאימים לצורכי התרבותם, מתפתחת בדרך-כלל בארבעה שלבים עיקריים, כמתואר בעקומת הגידול שבאיור 13-1.



איור 13-1

עקומת גידול טיפוסית של אוכלוסיית תאים מיקרוביאליים (תאים של חיידקים, שמרים ופטריות)

בתחילת התהליך לא מתרחש גידול משמעותי, פרק זמן ראשוני זה מכונה על כן ***שלב ההמתנה*** ***(Lag phase)*** ומייצג מעין תקופת הסתגלות, שבמהלכה התאים שהוכנסו למצע עוברים שינויים בהרכבם הביוכימי, המאפשרים להם לנצל את חומרי המזון שבמצע לביצוע תהליך הריבוי. אורכו של שלב זה שונה ממערכת למערכת ותלוי בסוג התאים המיקרוביאליים, במצב ובתנאים שבהם הם היו שרויים לפני העברתם למצע הגידול החדש, ובהבדלים שבין הרכב חומרי המזון במצע הגידול לבין אלה שבמצע ממנו התקבלו. כללית נראה, שככל שאוכלוסיית התאים תעבור שינוי סביבתי קטן יותר כך תתקצר תקופת ההמתנה.

בתום שלב ההמתנה מתפתח בהדרגה שלב ריבוי מהיר של התאים, כאשר קצב הגידול עולה במהירות עד שהוא מגיע לשיאו. שלב זה בעקומת הגידול נקרא ***השלב הלוגריתמי*** ***(Log phase)***. בשלב זה מתרחש גידול אקספוננציאלי מואץ של התאים לפי המשוואה הבאה:

$$\ln \frac{Xt}{Xo} = \mu (t - to)$$

כאשר: Xt ו- Xo הם ריכוז התאים בזמן to ו-t, בהתאמה.

μ הוא קצב הגידול הספציפי: קצב העלייה בריכוז התאים ליחידת ריכוז;

μ הוא גודל קבוע ויחידותיו $\frac{1}{\text{זמן}}$.

לפי משוואה זו הצגת הלוגריתם של העלייה בריכוז התאים עם הזמן נותנת קו ישר (ראה תיאור פזת ה- Log באיור 1-13), ששיפועו שווה לקצב הגידול הספציפי . בעזרת קצב הגידול הספציפי ניתן לחשב את ***זמן הדור*** הממוצע (g) של התרבית, המוגדר כזמן הדרוש להכפלת מספר התאים:

אם נציב במשוואה: $t - to = g$ כאשר $\frac{Xt}{Xo} = 2$

נקבל: $$\ln \frac{Xt}{Xo} = \mu g$$

ומכאן: $$\boxed{\frac{\ln 2}{\mu} = g}$$

זמן הדור הממוצע נשאר קבוע במהלך שלב הגידול האקספוננציאלי ותלוי בהרכב ובכמות של חומרי המזון במצע, בתנאי הסביבה (כגון pH, טמפרטורה וקצבי הערבול והאוורור) ובסוג המיקרואורגניזם. באופן כללי, זמן הדור הממוצע עולה עם העלייה בגודל התא ובמורכבות מבנהו, והוא נע בין 15 ל-60 דקות עבור חיידקים, בין 70 ל-120 דקות לשמרים, ובין שעתיים לשבע שעות בפטריות.

אורכו של השלב הלוגריתמי תלוי בעיקר בזמן הדור של התאים. ככל שהגידול המואץ מתקדם, כן הכמות והצפיפות של התאים גדלה, ובהתאם הכמות של חומרי המזון פוחתת, טיב הערבול והאוורור יורד, ולעיתים אף מופיעים תוצרים רעילים מעכבי-גידול. כל אלה גורמים לירידה בקצב הגידול עד לעצירה מוחלטת של הגידול ומעבר ל***שלב העמידה*** ***(Stationary phase)***.

בשלב הביניים, שבין השלב הלוגריתמי ובין שלב העמידה, מתרחש גידול בלתי-מאוזן. במהלך גידול זה מרכיבים תאיים שונים (רנ"א, דנ"א וחלבונים) מיוצרים בקצב שונה. כתוצאה מכך לתאים "הנחים" בשלב העמידה הרכב ביוכימי שונה מזה שהיה לתאים בשלב הלוגריתמי. בדרך-כלל, התאים בשלב העמידה קטנים יותר (היות שחלוקת התאים נמשכת זמן-מה לאחר שהעלייה בביומסה נפסקה) ועמידים יותר להשפעות כימיות ופיסיקליות מזיקות (כמו חום, קור וקרינה).

בהמשך לשלב העמידה מתפתח בהדרגה השלב האחרון בעקומת הגידול - ***שלב התמותה*** ***(Death phase)***, שבמהלכו התאים מתים ומתפרקים. תאים מיקרוביאליים, המוחזקים במצב של הרעבה, מתים לבסוף בעיקר כתוצאה מהידלדלות מקורות האנרגיה התוך-תאית. תמותת התאים מלווה ***בפירוק עצמי*** שלהם ***(אוטוליזיס)*** על-ידי ***אנזימים ליטיים***.

בדומה לגידול בשלב הלוגריתמי, הירידה בכמות התאים החיים בשלב התמותה היא תהליך אקספוננציאלי, כאשר קצב התמותה תלוי הן בהרכב המצע ובתנאי הסביבה והן בסוג המיקרואורגניזם. באוכלוסיית מיקרואורגניזמים בעלי כושר ***יצירת נבגים*** - ספורות (פטריות וסוגים מסוימים של חיידקים) מתרחש בשלב זה, במקביל לתמותה, תהליך של ***ספורולציה*** של חלק מהאוכלוסיה. חלק מהתאים הוגטטיביים הופכים לנבגים, המצויים במצב של תרדמה כמעט מוחלטת (חסרי פעילות מטבולית מדידה) ונשמרים במצב זה כל עוד תנאי הסביבה אינם מאפשרים גידול.

קינטיקת הגידול של תאים מיקרוביאליים לא תואמת בהכרח את קינטיקת הייצור והעלייה בריכוזו של התוצר המבוקש במערכת התסיסה. כך, לדוגמה, הקצב והאיכות של חילוף החומרים של התאים, המצויים בשלב העמידה, שונים משמעותית מאלה של תאים המצויים בשלב הלוגריתמי. לכן הוצע מינוח נפרד לתיאור ההתנהגות של אוכלוסיה מיקרוביאלית, מינוח המתייחס לסוג חילוף החומרים המתרחש בשלבי הגידול השונים. לפי המינוח הזה ניתן להבחין בשני שלבים שונים:

1. **טרופופזה** - שלב זה מקביל לשלב הלוגריתמי של הגידול. במהלך הטרופופזה מתרחש חילוף החומרים הדרוש לתהליך הגידול והריבוי, הכולל תהליכי בנייה של תוצרים, החיוניים לגידול (כגון: חומצות אמיניות, נוקלאוטידים, חלבונים, חומצות גרעין), ותהליכי פירוק, הנדרשים להפקת אנרגיה ואשר במהלכם נוצרים תוצרי לוואי שונים (כגון: אתאנול, אצטון, בוטאנול). התוצרים הנוצרים במהלך הטרופופזה מכונים ***מטבוליטים ראשוניים***.

2. **אידיופזה** - שלב המתייחס לחילוף החומרים, המתרחש במהלך גידול איטי של התאים, או בהיעדר גידול כלל (בשלב העמידה) בתנאי סביבה מסוימים. במהלך האידיופזה נוצרים תוצרים, שאינם חיוניים למהלך חיי התא ולריבויו, כגון חומרים אנטיביוטיים וויטמינים מסוימים. התוצרים הנוצרים במהלך האידיופזה מכונים, בהתאם, ***מטבוליטים משניים***.

המטבוליטים המשניים מסונתזים מתוצרי ביניים ומתוצרים סופיים של תהליכי המטבוליזם הראשוני. תפקידם המדויק אינו ברור תמיד באופן מוחלט; לרבים מהם תכונות אנטימיקרוביאליות, ועל-כן אפשר שהם אחראים להישרדות המיקרואורגניזם, המייצר אותם ומשחרר אותם לסביבתו לשם דיכוי או השמדה של מיקרואורגניזמים אחרים.

בעוד ששבילי המטבוליזם הראשוני משותפים לרוב המיקרואורגניזמים, רבים מהמטבוליטים המשניים מסונתזים על-ידי מספר מועט של זנים מיקרוביאליים (בעיקר זנים של פטריות חוטיות וחיידקים יוצרי ספורות), וייצורם תלוי בתנאי סביבה וגידול ייחודיים ומבוקר על-ידי התא באופן השונה משמעותית מזה של המטבוליטים הראשוניים.

להבנת הקשר שבין קצב התרבות האוכלוסיה המיקרוביאלית ובין קצב הופעתו של התוצר המבוקש השפעה מכרעת על יעילות תהליך התסיסה, כפי שנראה בהמשך.

1.3.2 גישות עיקריות לאיתור יצרנים פוטנציאליים של תוצרים חדשים

השונות הרבה של מיקרואורגניזמים בטבע ויכולתם לייצר מגוון כה רחב של ביוכימיקלים, ביניהם בעלי פעילות תרופתית, עשויים לשמש מקור בלתי נדלה לאיתור, לאיפיון, לייצור ולשימוש של מוצרים בעלי ערך מסחרי.

הגישה העיקרית לאיתור של תוצרים מיקרוביאליים טבעיים חדשים היא ביצועם של ***מבחני סריקה***, המתבססים על בידוד זנים חדשים של מיקרואורגניזמים, המהווים יצרנים פוטנציאליים, בשילוב עם פיתוח שיטות בדיקה וזיהוי חדשות, לגילוי ולאיפיון של מטבוליטים מיקרוביאליים לא-מוכרים שעשויים לשמש כתרופות, תוספי מזון וכימיקלים שונים.

בטבע קיים עושר מדהים של מיקרואורגניזמים מסוגים שונים, שמתוכם נחקרו עד היום פחות מאחוז אחד בלבד. בידוד של זנים חדשים מתבסס על עקרונות של ברירה והעשרה: בידוד וגידול מבוקר של אוכלוסיה מיקרוביאלית טבעית, אשר אותרה בסביבה אקולוגית מוגדרת (כמו על-פני צמח, סלע, דגימת קרקע וכו'). הגידול מתבצע בתנאים בררניים, המאפשרים גידול של אוכלוסיה מיקרוביאלית מסוימת בלבד או העשרה שלה, כתוצאה מגידול יחסי מהיר שלה תודות לניצול יעיל יותר של חומרי המזון בהשוואה לאוכלוסיות אחרות.

תנאי הברירה מופעלים בתהליך הבידוד בעיקר באמצעות הרכב מצע הגידול (מקור האנרגיה, מקורות פחמן, חנקן וזרחן, ערך ה-pH והחוזק היוני) והכוונה של הפרמטרים הסביבתיים של תנאי הגידול (טמפרטורה, ומידת הערבול והאוורור). בטבלה 1-4 בעמוד הבא, מובאות דוגמאות אחדות לסוגים של מיקרואורגניזמים שניתן לבודדם בשיטות העשרה שונות.

בתכנון של שיטת בידוד, לאיתור יצרן ותוצר בעל פעילות מסוימת, חשוב להביא בחשבון את הסביבה האקולוגית, שבה ביטויה של פעילות זו נותן לתא היצרן יתרון יחסי בסביבתו. כך, לדוגמה, אם התוצר המבוקש הוא אנזים הפעיל גם בטמפרטורות גבוהות, יש לחפשו בין אוכלוסיות מיקרואורגניזמים אשר בודדו מסביבה שהטמפרטורה בה גבוהה במיוחד, כגון מעיינות חמים, מדבריות וגיזרים.

נישות אקולוגיות, שבהן שוררים תנאים חריגים (כמו מליחות גבוהה, טמפרטורות קיצוניות, היעדר חמצן וכד'), מהוות בסיס פוטנציאלי לבידוד גזעים, אשר יהוו מקור לייצורם של חומרים ייחודיים חדשים.

טבלה 4-1

העשרה של מיקרואורגניזמים על-ידי ברירת תנאי תרבית מתאימים

שיטות העשרה	סוג המיקרואורגניזם המבודד
ערכי pH קיצוניים (2 - 4)	חיידקים המסוגלים לגדול בסביבה חומצית
טמפרטורות גבוהות (42°C - 100°C)	טרמופיליים
ריכוזים גבוהים של NaCl	הלופיליים
גידול תחת חנקן	אנארוביים
קליפת עץ או שורשים כמצע גידול	מיקסובקטריה

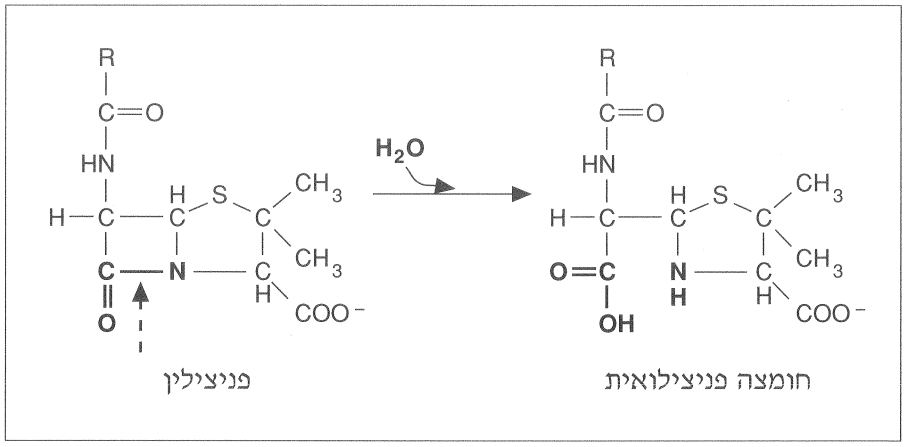
לאחר בידוד, גידול ואיפיון ראשוני של זנים מיקרוביאליים חדשים, מתבצע תהליך בדיקה לזיהוי מטבוליטים ייחודיים בעלי פעילות ביולוגית, המיוצרים על-ידי זנים אלה. הצלחתה של פעולת החיפוש תלויה בקיומו של מבחן נוח, המאפשר סריקת מספר גדול של דגימות ומאופיין בדרגת סלקטיביות ורגישות גבוהה, כלומר מזהה נוכחות של המטבוליט המבוקש גם כשהוא בריכוזים נמוכים ביותר וגם בנוכחות חומרים דומים. סיבה עיקרית לכך היא - תא מיקרוביאלי מייצר תערובת עשירה של מטבוליטים בטווח רחב של ריכוזים, הנע מננוגרמים (10^{-9} גר') ועד למיליגרמים (10^{-3} גר') למיליליטר.

מערכות המבחן לסריקת תוצרים מיקרוביאליים, שיש להם פעילות תרופתית, מתבססות על אחת משלוש מערכות המודל הבאות: בעלי-חיים, תאים בודדים או תכשירים תת-תאיים.

הגישה הישירה ביותר היא בדיקת הפעילות ***in vivo*** - שימוש במודל של בעל-חיים שלם. השימוש בשיטה זו אינו נפוץ, בשל המספר המוגבל של דגימות שניתן לבדוק, בשל העלות הגבוהה ובשל חוסר רגישות יחסי של השיטה.

מקובל יותר להשתמש בשתי הגישות האחרות. על-פי הגישה התאית מתבצעת סריקה על-ידי זריעה או הוספה של דגימות לצלחת פטרי, המכילה את המערכת התאית המשמשת לבוחן, בהרכב מצע ובתנאים המתאימים לקביעה של פעילות ביולוגית רצויה של התוצר המיקרוביאלי. לחילופין, כאשר מערכת הבדיקה מוכרת וידועה ברמה הביוכימית, ניתן לבחון בעזרתה השפעת דגימות באופן ישיר בתכשירים תת-תאיים (לדוגמה: עיכוב של פעילות אנזימטית).

כדוגמה לזיהוי ראשוני של יצרנים באמצעות מבחני סריקה, נתאר סריקה לאיתור מעכבים מיקרוביאליים לאנזים β-לקטאמאז. לאנזים זה יכולת לפרק קשר מרכזי במבנה של חומרים אנטיביוטיים דוגמת הפניצילין (ראה איור 14-1).



איור 14-1
פירוק פניצילין על-ידי β-לקטאמאז (פניצילינאז)

תאים בעלי רמה גבוהה של β-לקטאמאז מפגינים יכולת הישרדות גבוהה גם בנוכחות חומרים אנטיביוטיים ממשפחת התרכובות ה-β-לקטאמיות. על-מנת להילחם בחיידקים אלה ולהדבירם, נדרש טיפול משולב של אנטיביוטיקה ומעכב ייחודי, אשר ינטרל את פעילות ה- β-לקטאמאז.

במסגרת סריקה לגילוי מעכבים מיקרוביאליים של β-לקטמאז, הונחו נוזלים עליונים של תרביות בידוד שונות על צלחות מצע אגר, המכיל פניצילין. על צלחות אלה גודלו מושבות של מיקרואורגניזם, הידוע בכושרו לייצר כמות רבה של β-לקטמאז. במקרה שבדוגמה הנבדקת מצוי המעכב המבוקש ל- β-לקטאמאז יתבטא הדבר, במערכת בדיקה זו, בעיכוב גידולן של מושבות המיקרואורגניזם, אשר מייצר β-לקטאמאז.

לעיתים ניתן לזרז ולקצר את תהליך הסריקה על-ידי בידוד התרבית ובעת ובעונה אחת ביצוע בדיקות לאיתור מושבות המציגות את הפעילות הביולוגית הרצויה: דגימות מהולות של אדמה או מים מבית גידול מסוים נזרעות ישירות לתוך צלחות אגר, המכילות מצע המאפשר התפתחותן של מושבות, המגלות את הפעילות הביולוגית הנדרשת בלבד. מושבות אלה מבודדות ומאופיינות בהמשך.

הצלחתה של תכנית סריקה תלויה בעיקר בשני גורמים עיקריים: סוג המיקרואורגניזם המבודד, והשיטות המשמשות לאבחון הפעילות הביולוגית של התוצר שהוא מייצר.

בארבעים השנים האחרונות, המאמץ העיקרי של מבחני הסריקה התמקד באיתור פעילויות אנזימטיות רצויות, בזיהוי חומרים המעכבים פעילות של אנזימים ייחודיים, בבידוד מיקרואורגניזמים המסוגלים לפרק כימיקלים מזהמי סביבה, ובחיפוש אחר תוצרים מיקרוביאליים בעלי ערך רפואי, לטיפול במחלות של בני-אדם ושל בעלי-חיים. ביניהם בלטו תרופות אנטיביוטיות ותרופות לטיפול בסרטן ובמחלות ויראליות. לאחרונה הורחב טווח הסריקה לחיפוש אחר תרכובות בעלות פעילות פרמקולוגית של הורדת לחץ דם, הורדת רמת הכולסטרול בדם, השפעה על מערכת החיסון (באופן מדכא או ממריץ), והקניית עמידות לטפילים שונים.

דוגמאות אחדות למבחני סריקה מסוג זה מופיעות בטבלה 1-5:

טבלה 1-5

מערכות מבחן עבור סריקה של מטבוליטים מיקרוביאליים

התוצר המבוקש	מערכת המבחן
אנטיביוטיקות	צלחות אגר עם גזעי מבחן של מיקרואורגניזמים. אזורים של עיכוב גידול מצביעים על הפעילות הרצויה.
אנטיביוטיקות עמידות ל- β-לקטאמאז	צלחות אגר עם גזעי מבחן של מיקרואורגניזמים בתוספת β-לקטאמאז.
פרוטאזות	צלחות אגר עם קזאין. בררת מושבות המיצרות איזורים צלולים על הצלחות העכורות.
עמילאזות	צלחות אגר עם עמילן. בררת מושבות לאחר צביעה עם יוד.
ליפאזות	צלחות אגר עם תרחיף שמן. בררת מושבות לאחר השקעת חומצות שומן חופשיות על ידי Ca^{2+}.
פוספטאזות	צלחות אגר עם פנולפתלאין-דיפוספט ואינדיקטור ל-pH. הבררה מבוססת על שינויי צבע.
NAD	צלחות אגר עם מיקרואורגניזמים אוקסוטרופיים ל-NAD.

מיקרואורגניזמים מהווים מקור מרכזי וחשוב לאיתור ולייצור של חומרים חדשים, הן של מטבוליטים ראשוניים והן של מטבוליטים משניים, כאשר הדרישה לתרכובות חדשות מתמקדת בעיקר בתוצרים של מטבוליזם שניוני. כך, לדוגמה, עד סוף שנות ה-80 נתגלו כ-10,000 תרכובות חדשות בעלות פעילות אנטיביוטית. המקור ל-67% מתוכן היו מיקרואורגניזמים. רבים מבין אלה היו פטריות וחיידקים קוריים, המייצגים מאגר טבעי ופוטנציאל נרחבים, המוכרים לנו באופן חלקי ביותר.

1.3.3 דרכים להגדלת כושר הייצור של תוצר מבוקש

איתורו של מיקרואורגניזם, המייצר תוצר בעל ערך מסחרי, מהווה שלב ראשון והכרחי בתהליך פיתוחו של מוצר חדש. אבל להפקה מסחרית של התוצר ברמה תעשייתית נדרש שלב נוסף: הגדלה מירבית של כושר הייצור של התוצר.

רוב המסלולים המטבוליים במיקרואורגניזמים מבוקרים בשני מישורים:

א. **המישור הגנטי**, המתייחס למנגנונים, המווסתים את רמת הייצור של אנזימים, ובהתאם, את כמותם בתא על-ידי הפעלה או דיכוי של המידע הגנטי, המקודד לאנזימים אלה.

ב. **המישור הביוכימי**, המתייחס למנגנונים, המבקרים את מידת הפעילות של אנזימים קיימים.

במצב טבעי, שתי מערכות הבקרה - הגנטית והביוכימית - מוכוונות לייצור מטבוליטים ותוצרי ביניים בריכוז נמוך יחסית, שהוא הריכוז המינימלי, הנדרש כדי לספק את צורכי התא, בלא לגרור בזבוז של אנרגיה וחומרי מוצא. מכאן נובע, שהגדלת כושר הייצור תתאפשר רק במידה מוגבלת על-ידי השפעה על התהליך במישור הבקרה הביוכימי, כלומר, חשיפת התרבית להרכב או לתנאי סביבה המעודדים ייצור מירבי של התוצר המבוקש על-ידי הסטה של מערכת הבקרה הביוכימית לכיוון של ייצור-יתר.

השינוי המשמעותי בכושר הייצור יתאפשר על-ידי הכנסת שינוי של ממש בבקרה במישור הגנטי; על מנת להגיע לייצור של מטבוליט ברמות, הגבוהות בסדרי גודל מהרמה הטבעית, תידרש הכנסה של שינוי משמעותי לגידול ברמת המערכות האנזימטיות המייצרות, ובמקביל הקטנת הרמה של המערכות האנזימטיות המנצלות את התוצר הדרוש, על-ידי החדרת שינויים גנטיים בגנום של התא. החדרה כזו של שינויים גנטיים במיקרואורגניזמים מושגת בשתי שיטות: מוטציה ורקומבינציה.

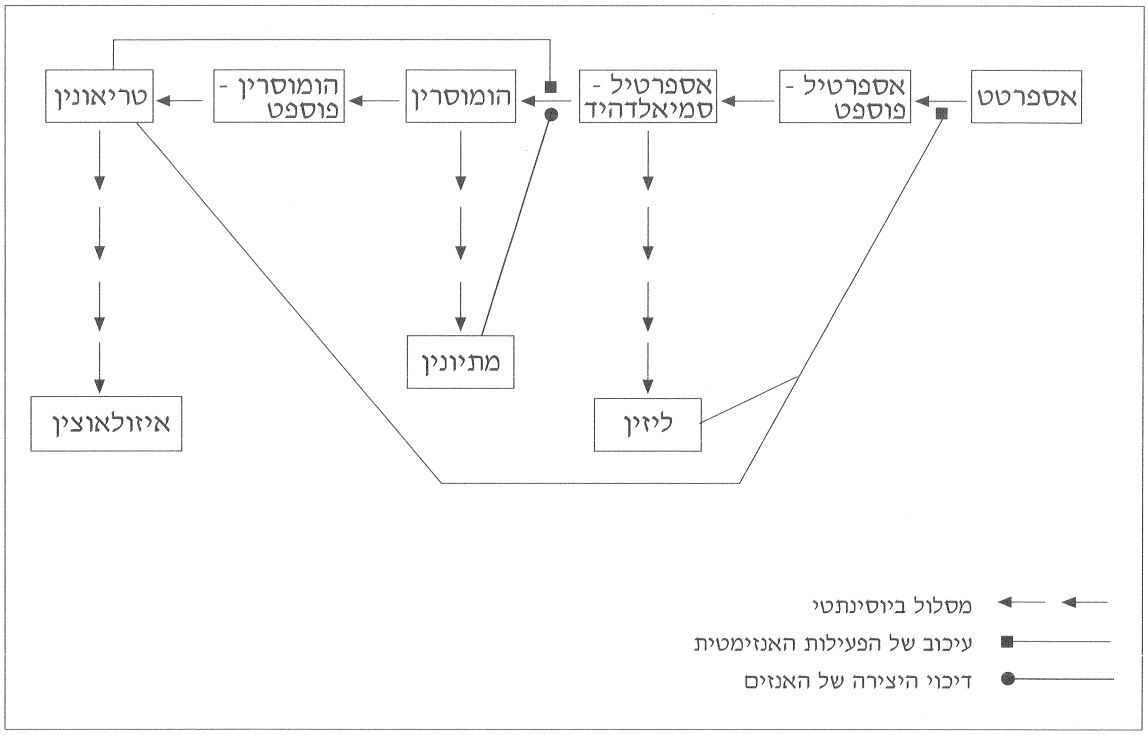
מוטציה מוגדרת כשינוי גנטי המתרחש במהלך חלוקת התאים, עקב טעויות בהכפלת החומר התורשתי (הדנ"א). תהליך זה מתרחש ספונטנית בתדירות נמוכה ביותר, אולם ניתן להגדיל משמעותית את תדירותו על-ידי חשיפת התאים לגורם מוטגני פיסיקלי (כמו אור אולטרה סגול וקרינה מיוננת) או לגורם מוטגני כימי (כמו ניטרוזואנידין או אתידיום ברומיד).

חשיפתה של אוכלוסית תאים מיקרוביאלית למנת מוטגן מסתיימת בתמותה של רוב התאים. חלק מהתאים השורדים הם מוטנטים, שמתוכם אחוז קטן בלבד עשוי להוות מקור ליצרני-יתר של התוצר הרצוי ואותם צריך לבודד ולאפיין.

מידע מפורט על המנגנון של המסלול המטבולי והבקרה שלו ברמה הביוכימית והגנטית עשוי לסייע רבות לתהליך הברירה של מוטנטים שעברו שינוי גנטי, המכשיר אותם לייצור מוגבר של תוצר מוגדר. מידע כזה קיים בעיקר לגבי מסלולים של מטבוליזם ראשוני, ולכן קל יותר לבודד יצרני-יתר של מטבוליטים ראשוניים מאשר של מטבוליטים משניים.

רוב המסלולים הביוסינתטיים של המטבוליזם הראשוני מבוקרים על-ידי ***היזון חוזר שלילי***, שבמסגרתו ריכוז גבוה של התוצר הסופי, או של תוצרי ביניים, מעכב את הפעילות, או מדכא את היצירה של אנזימים ייחודיים במסלול. פגיעה במערכת הבקרה תבטל את השפעתה ותאפשר ייצור מוגבר של התוצר הסופי. פגיעה כזו במערכת הבקרה עשויה, למשל, להתרחש כתוצאה ממוטציה, הפוגעת ביכולת היצירה של תוצר בקרה סופי, או לחילופין, כתוצאה ממוטציה, המשנה את האנזים המבקר, כך שהוא אינו מושפע יותר מתרכובת הבקרה. לכן נחפש יצרני-יתר של מטבוליטים ראשוניים בין מוטנטים שאיבדו את הכושר לייצר תוצר בקרה סופי, כלומר ***מוטנטים אוקסוטרופיים*** (תלויים באספקתו ממקור חיצוני) לגביו, או בין מוטנטים אשר מערכותיהם אינן מושפעות עוד מנוכחותה של תרכובת הבקרה.

ייצור-יתר של ליזין על-ידי מוטנט אוקסוטרופי של החיידק Corynebacterium glutamicum מהווה דוגמה, הממחישה כיצד שילוב של מוטציה עם הרכב מצע מוגדר מוליכים לקבלת ייצור-יתר, כתוצאה מעקיפה של מערכת הבקרה הביוכימית הטבעית. המסלול הביוסינתטי של יצירת ליזין בחיידק הנ"ל מבוקר על-ידי היזון חוזר שלילי מורכב (ראה איור 15-1 בעמוד הבא); האנזים הראשון במסלול - אספרטוקינאז, מעוכב רק כאשר גם ליזין וגם טריאונין מיוצרים מעל רמת סף.



איור 1-15

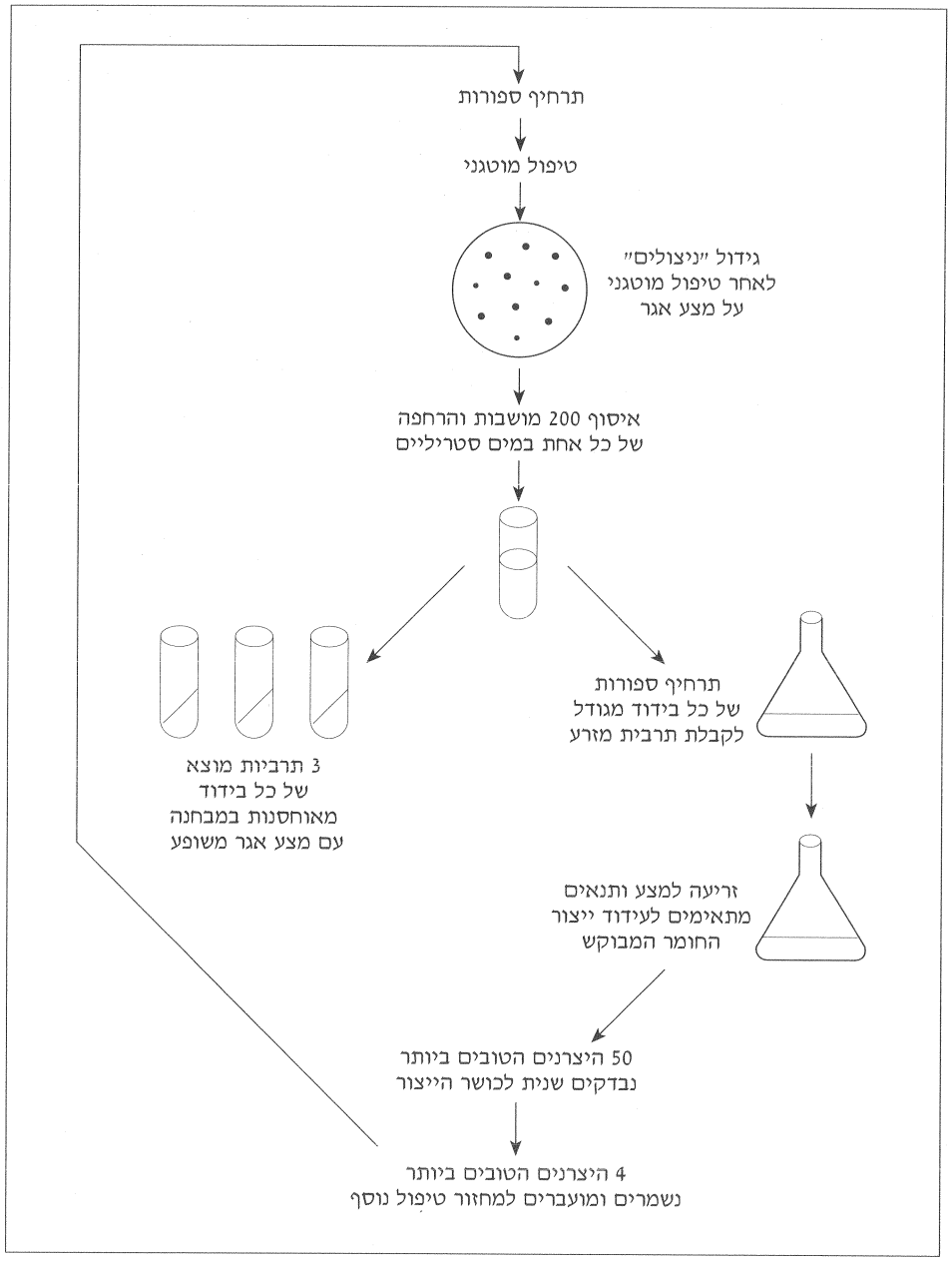
בקרת הביוסינתזה של ליזין בחיידק Corynebacterium glutamicum
במנגנון של היזון חוזר שלילי מורכב

מוטנט של חיידק זה שאיבד את היכולת האנזימטית לזרז את ההפיכה של אספרטיל-סמיאלדהיד להומוסרין יוכל לגדול רק במצע המכיל הומוסרין מוסף (כלומר הינו אוקסוטרופי להומוסרין). אם מוטנט כזה יגדל בנוכחות ריכוזים נמוכים ומבוקרים של הומוסרין, כמות הטריאונין שהוא ייצר לא תעבור את רמת הסף המעכבת, וכך תבוטל בקרת הפעילות של האספרטוקינאז והאספרטט יהפוך לליזין ללא הגבלה. עודפי הליזין יופרשו מהתא, וכתוצאה מכך יצטברו במצע כמויות ניכרות של ליזין.

ניתן לבודד מוטנטים אוקסוטרופיים ממקור חיידקי בעזרת ***שיטת העשרה***, המבוססת על שימוש בפניצילין, מאחר שפניצילין פוגע רק בתאי חיידקים, הנמצאים בתהליך של גדילה והתרבות. כך כאשר מנסים לאתר ולבודד מוטנט, שהוא אוקסוטרופי לחומר מסוים, מגדלים את התאים ששרדו לאחר הטיפול המוטגני במצע, המכיל פניצילין - ללא תוספת של החומר. במצב זה תאים שאינם אוקסוטרופיים לחומר ייפגעו על-ידי הפניצילין, עם תחילת ריבוים, בעוד שהתאים המבוקשים, שאינם מסוגלים להתרבות בתנאים אלה, ישרדו. העברתם, בהמשך, למצע חדש המכיל את החומר לו הם אוקסוטרופיים תאפשר קבלת תרבית מועשרת שלהם. בשיטה זו הצליחו לבודד מוטנט של Corynebacterium glutamicum שהוא אוקסוטרופי להומוסרין, ובעל כושר ייצור של כמויות ניכרות של ליזין.

תכנון שיטה לברירת מוטנטים, שהם יצרני-יתר של מטבוליטים משניים, קשה יותר מזו של מטבוליטים ראשוניים, בשל מיעוט המידע על מנגנוני הבקרה הספציפיים ליצירתם של מטבוליטים משניים. לכן,

מערכת לבידוד מוטנטים מסוג זה התבססה בעיקר על סריקה אמפירית של תאים ששרדו לאחר טיפול מוטגני, במגמה לאתר רמת ייצור גבוהה של המטבוליט המשני, ללא סלקציה מכוונת או ידיעת המנגנון הביוכימי. תכנית סריקה טיפוסית מסוג זה מתוארת באיור 16-1.



איור 16-1

תכנית סריקה לבידוד יצרני-יתר של מטבוליטים משניים

בשנים האחרונות, עם התווספות מידע חדש על המנגנונים הביוכימיים המעורבים בתהליכי ייצור של תוצרים משניים מסוימים, גדל מספרם של תהליכי העשרה מכוונים.

בנוסף, הגברת התפוקה של מטבוליטים משניים מתאפשרת במידה מסוימת על-ידי הכנסת שינויים והתאמת הרכב המצע, שבו מצוי ופועל המיקרואורגניזם במגמה לעודדו לייצור מירבי של המטבוליט המשני. כך נמצא, שמרכיבי מזון (מקורות פחמן, חנקן וזרחן) מקובלים, המסייעים לגידול של התאים בקצב מוגבר, הם דווקא בעלי השפעה מעכבת על המטבוליזם המשני. נראה, כי הרקע לכך הוא ייצורם והופעתם של המטבוליטים המשניים בתנאי הרעבה, שיש בהם גידול איטי או אף מצב סטציונרי של אוכלוסית התאים. כנגד זאת, הוספת מטבוליטים ראשוניים מתאימים, המשמשים חומרי מוצא למטבוליזם המשני, עשויה לעודד את היווצרותם של המטבוליטים המשניים. כך, בתכנון של הרכב המצע המיועד לשמש לייצור של מטבוליטים משניים על-ידי מיקרואורגניזמים, יש לספק את חומרי המוצא המתאימים ולדאוג לכך שהמינון של מרכיבי המזון המקובלים יהיה ברמה אשר תאפשר גידול איטי או קיום סטציונרי של אוכלוסית התאים.

הגברת הייצור של תוצרים מיקרוביאליים על-ידי התערבות במישור הגנטי מתאפשרת לא רק על-ידי השראת מוטציות אלא גם על-ידי ביצוע רקומבינציות.

רקומבינציה היא תהליך של יצירת צירופים חדשים של גנים שמקורם מפרטים שונים. בהשוואה להיקף השימוש במוטנטים לשם שיפור גזעים תעשייתיים, השימוש במיקרואורגניזמים שעברו תהליכי רקומבינציה מבוקרים היה עד כה מוגבל יחסית. זאת בשל הקלות היחסית שבה ניתן היה לקבל מוטנטים, שהם יצרני-יתר באמצעות השראת מוטציות על-ידי גורמים מוטגנים וכן עקב היעדר מידע גנטי בסיסי על הגזעים המיקרוביאליים התעשייתיים, הנחוץ לשם ביצוע מכוון של תהליכי הרקומבינציה.

קיימים שני סוגים של תהליכי רקומבינציה: in vivo ו-in vitro:
רקומבינציה in vivo מתרחשת על-ידי ***איחוי פרוטופלסטים*** של גזעים קרובים. פרוטופלסטים הם תאים חסרי דפנות הנוטים לעבור ביניהם איחוי, כלומר מתמזגים לתא כלאיים אחד.
איחוי של פרוטופלסטים הוא תהליך טבעי המתרחש במחזור החיים של פטריות מסוימות, אולם ניתן לכוונו באופן מלאכותי לשם איחוד של תכונות ייחודיות, המאפיינות גזעים יצרנים שונים, במיקרואורגניזם אחד, במגמה ליצור חומרים חדשים או לשפר את הייצור של תוצרים ידועים.

תהליך האיחוי המכוון מתחיל בטיפול לעיכול אנזימטי של דפנות התאים בתמיסות איזוטוניות להסרת השכבות החיצוניות. בהמשך, מעודדים את ההתלכדות של שני תאים סמוכים על-ידי הוספת כימיקלים מיוחדים (כגון פוליאתילן גליקול). ההתלכדות מתחילה בהיצמדות של התאים, איחוי הקרומים ומיזוג התוכן, כולל איחוי ציטופלסמתי ואיחוי של הגרעינים. ההתלכדות מסתיימת בשחזור של דופן התא ליצירת תא כלאיים, המסוגל לגדול ולהתרבות כתא רגיל.

השימוש באיחוי של פרוטופלסטים לשם שיפור והרחבה של טווח הייצור של מטבוליטים מיקרוביאליים, הולך וגובר. שיטה זו יושמה בהצלחה בפטריות, בשמרים ובחיידקים מסויימים, ומנוצלת לייצור משופר של מטבוליטים ראשוניים ומטבוליטים משניים.

כך, לדוגמה, השיגו הגברת ייצור של ליזין באמצעות איחוי פרוטופלסטים משני גזעים שונים של Brevibacterium flavum, שאחד מהם הוא יצרן-יתר של ליזין, והשני אינו מייצר ליזין אולם מפרק גלוקוז

(מקור פחמן ואנרגיה) בקצב מוגבר. מתוך תאי הכלאיים שהתקבלו בודדו גזע חדש, המאופיין בפירוק מואץ של גלוקוז - וכתוצאה מכך בייצור מוגבר של ליזין - בהשוואה ליצרן המקורי.

רקומבינציה in vitro מתייחסת להחדרה של מידע גנטי לתאים מיקרוביאליים באמצעות שיטות של הנדסה גנטית. על אף שרוב ההישגים בשטח זה התמקדו בייצור של חלבונים מתאים עילאיים באמצעות חיידקים ושמרים, ההנדסה הגנטית הביאה גם להישגים משמעותיים ביותר בשיפור הייצור של תוצרים מיקרוביאליים טבעיים, בעיקר הייצור של מטבוליטים ראשוניים כמו חומצות אמיניות, אנזימים וחלבונים אחרים. להלן נפרט שתי דוגמאות.

* רמת הייצור של טריאונין בחיידק Escherichia coli שופרה בסדר גודל באמצעות שיבוט ***האופרון*** השלם של טריאונין (המקודד לאנזימים, הדרושים לביוסינתזה של החומצה האמינית טריאונין) ממוטנט בו לא נתקיימה בקרת היזון חוזר שלילי, לפלסמיד, אשר הוחדר חזרה לחיידק והוכפל בתוכו, עד כמות של 20 עותקים לתא. כתוצאה מכך גברה פעילות אנזימי האופרון פי 40-50.

* ניתן להגביר באופן משמעותי את הייצור של אנזימים בעלי ערך מסחרי על-ידי שיבוט של הגן המקודד לאנזים בפלסמיד, והחדרתו למיקרואורגניזם (לגזע המקורי או לגזע שונה) לשם ריבוי והתבטאות. במסגרת גישה זו שיבטו גן מהחיידק Bacillus coagulans המקודד לאנזים α-עמילאז משופר (עמיד לטמפרטורות גבוהות יחסית) לתוך החיידק E. coli, שבו הוא הוכפל ונשמר במספר רב של עותקים, וכתוצאה מכך חלה הגברה ניכרת בייצור של האנזים.

פרק 2: תוצרים של תהליכי תסיסה

תהליכי התסיסה הם משטחי המחקר ושטחי הייצור העיקריים בביוטכנולוגיה. באמצעותם מייצרים מגוון של תוצרים, הן ברמת התא השלם (ביומסה), והן פולימרים ביולוגיים (חלבונים ופוליסכרידים) ומגוון רחב של ביוכימיקלים אחרים, מתרופות ותוספי מזון ועד לממסים אורגניים.

לאחר שהכרנו באופן כללי את המאפיינים העיקריים של תהליך התסיסה ואת השלבים העיקריים בביצועו, נעבור בפרק זה להכרת הקבוצות העיקריות של התוצרים המיוצרים בתהליכי תסיסה, ורובם משמשים אותנו בחיי היום יום.

2.1 ייצור שמרים ושימושיהם

2.1.1 רקע כללי

השימוש בשמרים להתפחת לחם ולייצור בירה היה השימוש הביוטכנולוגי הקדום ביותר, והוא תועד בכתובות קיר בבבל ובהרוגליפים מצריים כבר אלפי שנים לפני הספירה. שימוש אמפירי זה בשמרים בחיי היום יום נעשה בלי לדעת שיצורים זעירים מעורבים בתהליך, וזאת עד המאה ה-17 לספירה.

הבה נזכיר כמה ציוני דרך עיקריים שהביאו להבנת תפקידם של השמרים בתהליכים שימושיים אלה:

ב-1676 המדען ומלטש העדשות ההולנדי ואן-לבנהוק איבחן לראשונה את נוכחותם של יצורים מיקרוסקופיים חד-תאיים בשאריות מזון.

ב-1837 מילן אישר שהמיקרואורגניזמים המצויים בבירה הם יצורים חיים, המתרבים על-ידי הנצה ומזרזים ייצור של אלכוהול.

ב-1860 פסטר הוכיח בבירור כי תהליך התסיסה נגרם על-ידי מיקרואורגניזמים חיים, והראה כי האנזימים האחראים לתהליך קשורים למבנה ולחיים של תא השמר.

ב-1897 בוכנר הצליח להפיק את האנזימים המזרזים את התסיסה הכוהלית.

השימוש המסורתי בשמרים בתעשיית המזון התמקד, בעיקר, בניצול כושרם לבצע בתנאים אנארוביים תסיסה כוהלית (המסתיימת בייצור של אתאנול ו-CO_2, כפי שנראה בהמשך) לתהליכי אפייה ולייצור משקאות אלכוהוליים (בירה ויין).

כיום קיימת מגמה לפתח שימושים נוספים בשמרים כתוספי מזון טבעיים, שישפרו את הערך התזונתי של המזון המיועד לבני-אדם ולבעלי-חיים. מגמה זו מתבססת על סגולותיהם התזונתיות כחומרי טעם וריח העשירים יחסית בחלבונים ובויטמינים.

השמרים הם פטריות חד-תאיות השייכות לשלוש מחלקות של פטריות (מתוך הארבע הקיימות): פטריות שק, פטריות בסיסה ופטריות בלתי-שלמות. השמרים כוללים 39 סוגים בעלי 349 מינים, הנבדלים זה מזה בתכונותיהם המורפולוגיות, הביוכימיות והגנטיות. מתוך אוסף מגוון זה של אורגניזמים נעשה שימוש מסחרי בשלושה סוגים עיקריים: Saccharomyces, Candida ו- Kluyveromyces (ראה טבלה 1-2). הבולט והנפוץ משלושתם הוא ה-Saccharomyces (ממחלקת פטריות השק), שאליו משתייכים שמרי האפייה, שמרי הבירה והשמרים המשמשים להכנת יין.

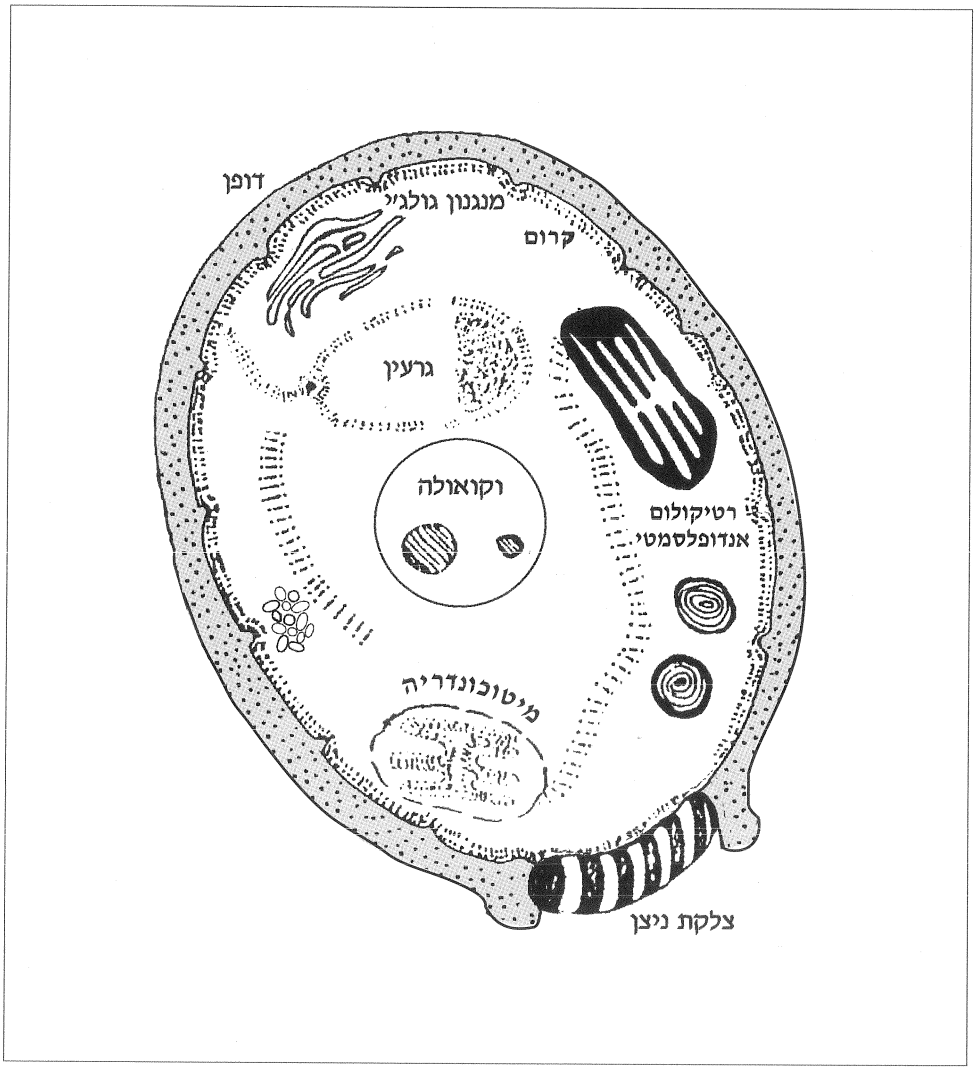
טבלה 1-2

השמרים העיקריים המשמשים בתעשייה והשימוש בהם

מין השמרים	מוצר / יישום
Saccharomyces cerevisiae	מוצרי לחם לסוגיו; ייצור בירה, יין ומשקאות מותססים אחרים; ייצור אתאנול; שמרים כתוסף מזון לבעלי-חיים ובני-אדם; תוצרים תוך-תאיים משמרים (ביוכימיקלים, אינברטאז).
Saccharomyces uvarum	ייצור בירה.
Saccharomyces sake	ייצור שיכר אורז.
Saccharomyces bayanus	ייצור יינות מותססים.
Saccharomyces lactis	לקטאז.
Kluyveromyces fragilis	שמרים כתוסף מזון לבעלי-חיים ובני-אדם; ייצור אתאנול.
Candida utilis	שמרים כתוסף מזון לבעלי-חיים ובני-אדם; הפקת חומצות-גרעין משמרים.
Candida tropicalis	שמרים כתוסף מזון לבעלי-חיים ובני-אדם.
Candida lipolytica	שמרים כתוסף מזון לבעלי-חיים.

השמרים מתקיימים כתאים בודדים, העטופים בדופן עבה ומכילים, ככל האורגניזמים האאוקריוטיים, גרעין מובהק ואברונים תת-תאיים, כגון רטיקולום אנדופלסמטי ומיטוכונדריה (ראה איור 1-2). צורת התא כדורית, ביצתית או אליפטית, בעלת רוחב בתחום של 2.5µ-10µ ואורך בתחום של 4.5µ-21µ.

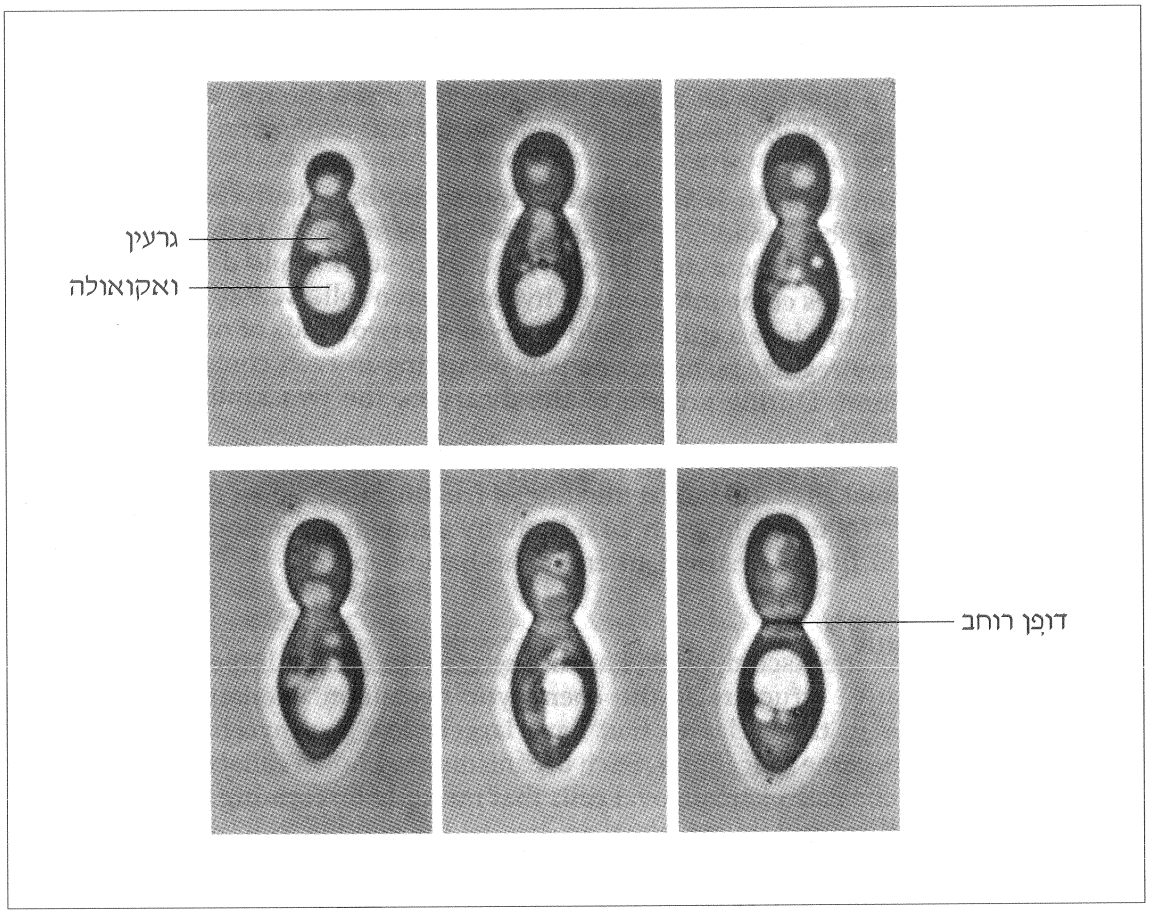
בטבע נמצאים השמרים בכל מקום, אולם רובם הסתגלו לחיות בסביבה בעלת תכולת סוכר גבוהה, כמו צוף של פרחים, פני השטח של פירות וזרעוני דגניים, דבש וכד'.



איור 1-2
תיאור סכימתי של מבנה תא שמר

רוב השמרים מתרבים ***באופן וגטטיבי*** (אלמיני) בתהליך של ***הנצה*** (ראה איור 2-2), במסגרתו נוצרים צאצאים הזהים לתא האם. ההנצה מתחילה בבליטה מקומית של דופן התא כלפי חוץ, בהמשך זורמת הציטופלסמה לתוך בליטה זו, הגרעין מוכפל על-ידי מיטוזה, ואחד מגרעיני-הבת הנוצרים נע אף הוא לתוך הבליטה, ההולכת ומתנפחת ויוצרת את הניצן.

הניצן המתפתח ממשיך לגדול, עד שגודלו משתווה כמעט לתא האם המקורי. בשלב זה נוצרת דופן רוחב, המפרידה בין שני התאים, והניצן ניתק מתא האם. "צלקת ניצן" נשארת - על דופן תא האם (ראה איור 2-1) ו"צלקת לידה" - על דופן תא השמר החדש שנוצר. "צלקת הניצן" מונעת, בדרך-כלל, הנצה נוספת באותו האתר.



איור 2-2

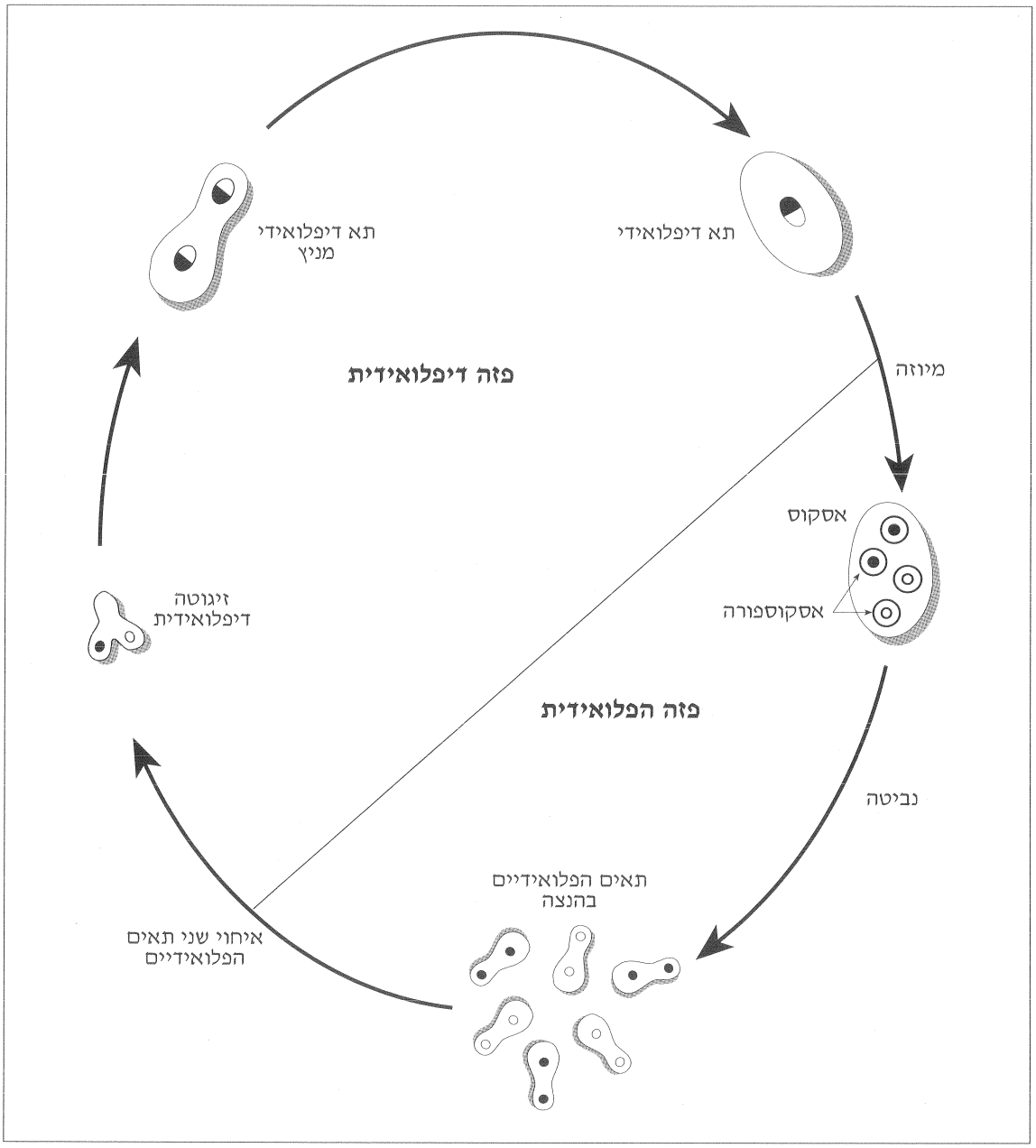
תצלום מיקרוסקופי של רצף האירועים, המתרחשים במהלך ההנצה של תא שמר *

לאחר תהליך של התרבות והבשלה, מתחיל גם התא החדש שנוצר לעבור תהליכי הנצה, ליצירת ניצנים חדשים נוספים. תא שמר אחד יכול להניץ כ-9 עד 43 ניצנים, לפי תנאי הסביבה: מחסור בחומרי מזון או צפיפות יתר של תאים במצע גורמים להפסקת ההנצה. משך הזמן הנדרש להשלמת תהליך ההנצה נע בין שעה וחצי עד שש שעות ותלוי בתנאי הסביבה, בזמינות חומרי המזון, ובגיל התאים - ככל שהתא זקן יותר, ההנצה ארוכה יותר.

בנוסף להתרבות הווגטטיבית, שמרים השייכים למחלקת פטריות השק (Ascomycetes) יכולים גם ***להתרבות מינית*** במחזור חיים, הכולל מעבר בין מצבים הפלואידיים ודיפלואידיים (ראה איור 2-3). תאים דיפלואידים בוגרים מתרבים בדרך-כלל על-ידי הנצה, אולם בתנאי סביבה מסוימים מושרה תהליך מיוזה, המוביל ליצירה של ארבעה נבגים מיניים הפלואידיים - ***אסקוספורות*** - הכלואים בתוך דופן התא הישן המהווה מעין שק שקוף ומכונה ***אסקוס***. האסקוספורות נובטות ליצירת תאים הפלואידיים בוגרים, המתרבים על-ידי הנצה. בהמשך מתרחש איחוי של שני תאים הפלואידיים, המלווה בהתלכדות גרעינים

* **General Microbiology**, Stanier, et al., p114, fig 4.23, © Prentice Hall, Inc, Fourth Edition, 1976.

ליצירת תאים דיפלואידיים, המתרבים על-ידי הנצה, או עוברים מיוזה ליצירת אסקוספורות, על-פי תנאי הסביבה (ראה איור 3-2).



איור 3-2

מחזור החיים של שמרים השייכים למחלקת פטריות השק

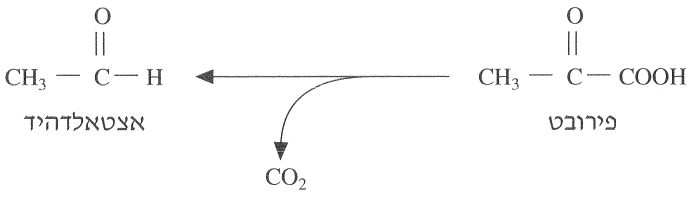
(במחזור המתואר עשויים לחול שינויים לפי המין)

השמרים הם אורגניזמים ***כמוסינתטיים***, המסוגלים לנצל מגוון של תרכובות אורגניות כמקור פחמן ואנרגיה ולהתקיים בסביבה ארובית ובסביבה אנארובית על-ידי הפעלה של מסלולים מטבוליים שונים.

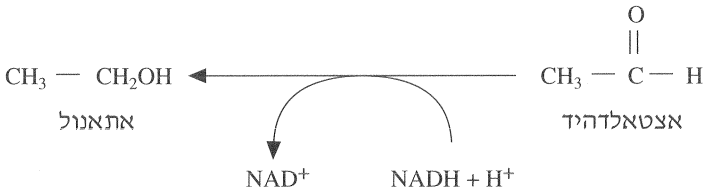
בסביבה אנארובית השמרים מפיקים אנרגיה (ATP) באמצעות תהליך התסיסה הכוהלית ומייצרים כוח מחזר (NADPH) על-ידי מסלול פנטוז פוספט.

תהליך התסיסה הכוהלית מתחיל בפירוק גלוקוז לפירובט ***במסלול הגליקוליזה***. בהמשך הפירובט הופך לאתאנול ול-CO_2, בתהליך אנזימטי דו-שלבי:

בשלב הראשון מתבצעת דקרבוקסילציה ליצירת אצטאלדהיד:

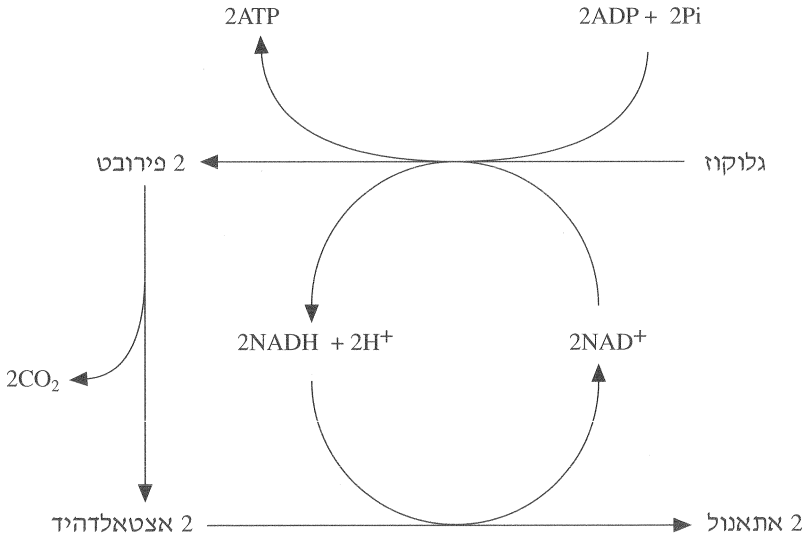


בשלב השני אצטאלדהיד מחוזר לאתאנול, כאשר ה-NADH, שנוצר במהלך הגליקוליזה, משמש ככוח מחזר:

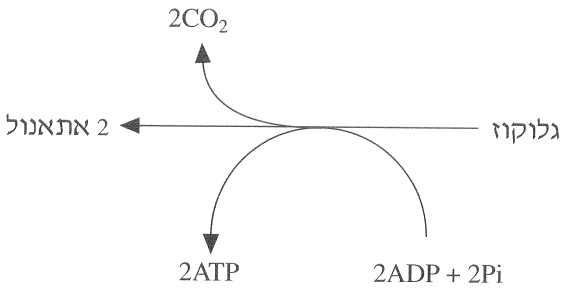


שלב זה חיוני לשם שחזור של NAD^+ המשמש בשלבי החמצון של המסלול הגליקוליטי, על-פי המאזן המסכם הבא:

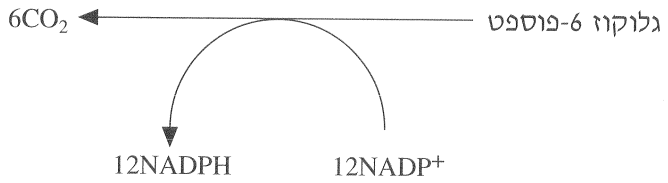
גליקוליזה



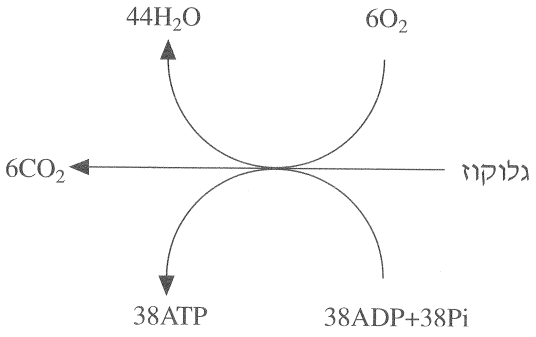
כך, בתסיסה כוהלית של גלוקוז נוצרים בסיכום, שני תוצרים סופיים: אתאנול ו-CO_2, והם מופרשים מהתא. רק כ-25% בלבד מהאנרגיה המשתחררת בפירוק הגלוקוז נשמרת במלאי התא כקשרים עתירי אנרגיה של ATP - שתי מולקולות ATP על כל מולקולת גלוקוז, כאשר רוב האנרגיה (75%) משתחררת כחום.



מסלול הפנטוז פוספט הוא מסלול מעגלי של תגובות אנזימטיות שחל בו חימצון מושלם של גלוקוז 6-פוספט ל-CO_2 תוך חיזור $NADP^+$ ל-NADPH:



בסביבה מאוורת (ארובית) מפיקים השמרים אנרגיה במסלול שונה: תחילה מתבצע פירוק של הגלוקוז לפירובט בתהליך הגליקוליזה, אחריו מתרחשת דקרבוקסילציה חימצונית של פירובט לאצטיל-CoA וחמצון מושלם של האצטיל-CoA ל-CO_2 במעגל קרבס. הקואנזימים המחוזרים, שנוצרו במסלול הגליקוליזה ובמעגל קרבס, משמשים ליצירה של ATP, על-ידי זרחון חימצוני בשרשרת מעבר האלקטרונים. התהליך המתבצע בסביבה מאוורת מהווה מסלול יעיל יותר להפקת אנרגיה בהשוואה לתהליך התסיסה הכוהלית, ובמהלכו מניב פירוק מושלם של מולקולת גלוקוז אחת 38 מולקולות ATP:



כזכור, בתנאים האנארוביים נתקבלו רק שתי מולקולות ATP במהלך פירוק מולקולה אחת של גלוקוז. בתנאים ארוביים מתרחש גם מסלול הפנטוז פוספט, שנוצר בו NADPH , המשמש ככוח מחזר לביוסינתזה או מנוצל לייצור של ATP.

2.1.2 תהליך ייצור השמרים

ייצור מסחרי של ביומסת שמרים, לשימושיה השונים, מתבצע בתנאים ארוביים, היות שבתנאים אלה קצב הגידול של התאים מהיר יותר והניצולת גבוהה יותר בהשוואה לתנאים האנארוביים; בנוכחות חמצן מולקולרי ***הניצולת*** - כמות הביומסה התאית המיוצרת ליחידת גלוקוז נצרכת - גדולה פי 5-10 מזו המתקבלת בגידול ללא חמצן.

בנוסף לאספקת חמצן, דרישות הגידול של השמרים כוללות: טמפרטורה ו-pH מתאימים (30°C ו- pH=4-6 בהתאמה), ומקורות זמינים של פחמן, חנקן, זרחן, מינרלים, ויטמינים ופקטורי גידול נוספים. כל השמרים יכולים לנצל גלוקוז, מנוז ופרוקטוז כמקור פחמן ואנרגיה, כאשר מינים מסוימים מנצלים גם גלקטוז. חומרי הגלם העיקריים, המשמשים לייצור שמרים בתעשייה, כוללים: סוכרים נקיים, מולסות, מי-גבינה, וסוכרי עץ טבעיים לא מנוקים המתקבלים בתהליך ייצור הנייר.

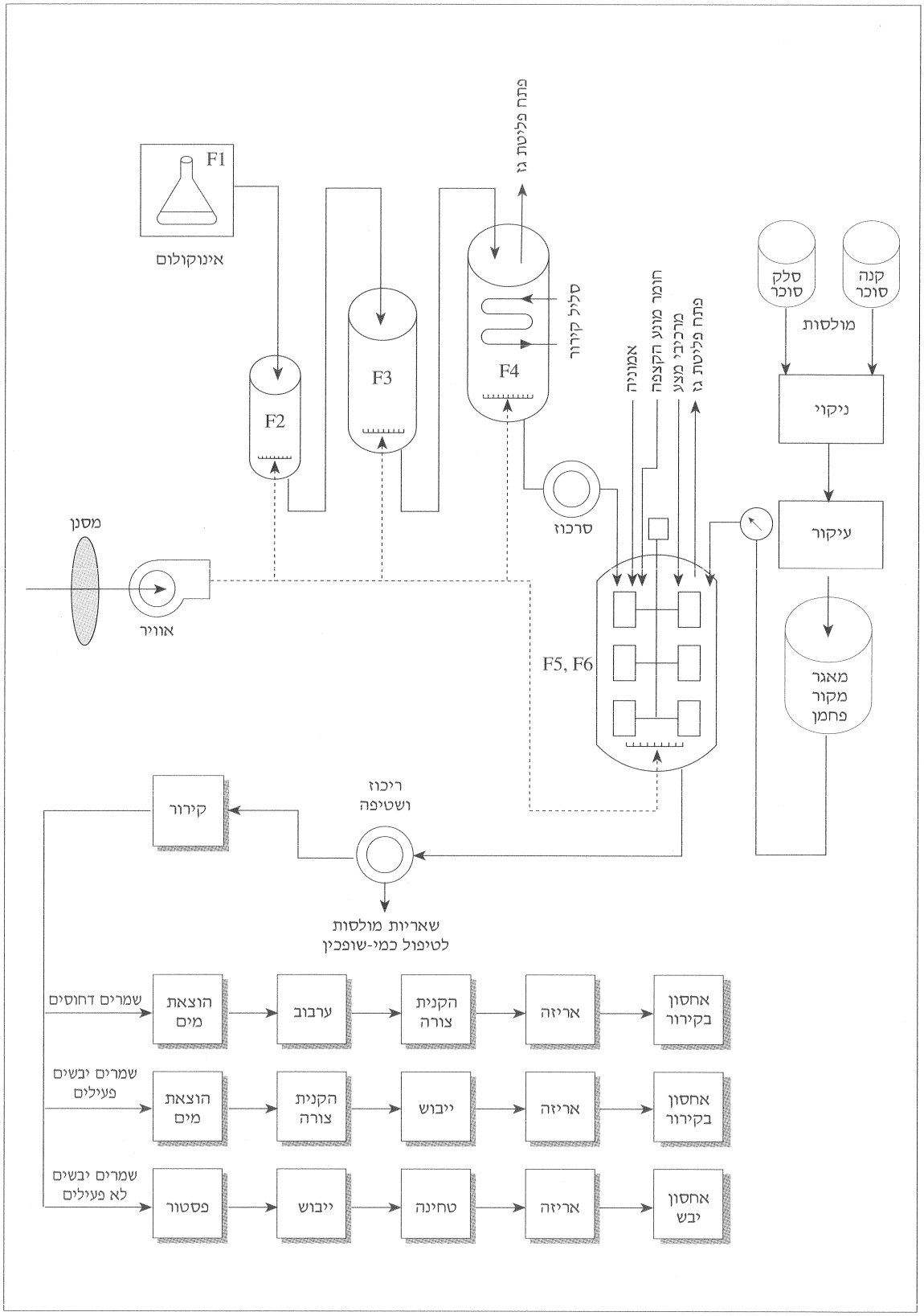
שמרים ממין Saccharomyces cerevisiae (שמרי אפייה בשמם העממי) נחשבים לשימושיים ביותר, והם התוצר העיקרי של תהליכי הייצור מבחינת היקף הכמויות: יותר מ- 1.8 מיליון טון של שמרים בשנה.

תהליך הייצור מבוסס על תהליך מנתי מוזן שיש בו הוספה הדרגתית מבוקרת של מקור הפחמן בתיאום עם מידת האוורור של המצע. צורת הפעלה זו נועדה להגביל את כמות הסוכר במצע ולמנוע התפתחות תנאים לקיום תסיסה כוהלית, שהיא בבחינת "בזבוז משאבים" בתהליך המכוון להפקת התאים עצמם.

ריכוז גבוה התחלתי של מקורות פחמן עשוי לעודד גידול מהיר של השמרים, שבמהלכו נצרך החמצן המומס שבמצע בקצב, העולה על קצב אספקתו. כך עלולים להיווצר תנאים אנארוביים, שבהם קצב הגידול יורד, וקיים חשש מפני מעבר לביצוע תסיסה כוהלית. תהליך מנתי מוזן מאפשר שמירה על ריכוז נמוך וקבוע של מקורות הפחמן במצע, דבר המגביל את קצב הגידול לערך התואם את הקצב של אספקת החמצן, ומכוון על-ידי כך את התהליך לגידול בלבד.

כמזרע לתהליך משמשות תרביות טהורות של S. cerevisiae, כאשר משתמשים בגזעים נבחרים שעברו סלקציה מכוונת לגידול מהיר, לניצולת גבוהה, ליציבות אחסונית ולפעילות משופרת.

תהליך הייצור התעשייתי של שמרי אפייה מתואר באיור 2-4.



איור 4-2

שלבים בתהליך הייצור וההפקה של שמרי אפייה

תיאור התהליך:

תרבית מוצא של הגזעים הנבחרים נשמרת על מצע אגר במצב דיפלואידי, ומשמשת בעת הצורך להכנת תרבית המזרע (אינוקולום - F1 באיור 2-4), המשמשת לזריעת הפרמנטור הראשון (F2 באיור 2-4) בסדרה של פרמנטורים בעלי נפח עולה.

התכולה של כל פרמנטור, לאחר שלב של ריבוי ארובי, משמשת לזריעת הפרמנטור הבא בסדרה, לשם הגדלה הדרגתית של נפח הגידול של אוכלוסית השמרים. התכולה של הפרמנטור האחרון בסדרה זו (F4 באיור 2-4) מרוכזת, על-ידי צנטריפוגציה של התאים, ל"משחת" תאים המשמשת לזריעת הפרמנטור הראשי (F5-6 באיור 2-4) שמימדיו גדולים ביותר (עד 200 מ"ק). פרמנטור זה מוזן תחילה במצע, המכיל מקורות חנקן, זרחן ומלחים בכמויות המתאימות ליבול הצפוי של השמרים. מקור הפחמן מוזן בהדרגה לאחר הזריעה, ומקפידים שריכוזו במצע יישמר הרבה מתחת ל-0.1% משקל לנפח (1.0 גרם לליטר). מקור הפחמן המקובל בייצור שמרי אפייה הוא מולסות, שמקורן בתעשיית סלק סוכר וקנה סוכר (ראה פרק 1), המכילות בנוסף לסוכרים, גם מינרלים חיוניים, חומצות אמיניות ויטמינים. האוורור מתבצע בתיאום עם קצב הזנת המולסות, על-ידי הזרמת אוויר סטרילי דרך טבעת פיזור, הנמצאת בתחתית הפרמנטור, ומהווה גם את אמצעי הערבול של המצע.

ויסות בו-זמני ומתואם זה, של רמת הסוכר וקצב האוורור, מכוון את האוכלוסיה לגידול וליצירת ביומסה, תוך ניצול מירבי של מרכיבי המצע, ומונע ככל שניתן התפתחות של תהליכים נלווים לא-רצויים.
ניצולת מירבית מושגת, כאשר קצב הגידול מוגבל לעלייה של 20% עד 25% בכמות השמרים לשעה. קצב גידול מהיר יותר גורם למחסור בחמצן, להתפתחות תנאי מטבוליזם אנארובי, וכתוצאה מכך לירידה בניצולת.

תהליך הייצור בפרמנטור נמשך בין 10 ל-20 שעות, תלוי בכמות ההתחלתית של השמרים שנזרעה במצע. עם סיום התהליך, מקררים את תרחיף השמרים, התאים נקצרים באמצעות סרכוז ונשטפים במים להרחקת שאריות המצע. לאחר סרכוז נוסף של התאים השטופים, מתקבלת "משחת" שמרים המכילה כ-17% עד 19% מוצקים. "משחת" השמרים נשמרת בקירור (ב-0°C) עד לשלב העיבוד לתוצר סופי.

השמרים משווקים באופן מסחרי בשתי צורות עיקריות: כביומסה חיה של שמרים פעילים (תאים לחים דחוסים או תאים יבשים) או כשמרים יבשים לא-פעילים. צורות אלה נבדלות בתהליך העיבוד של "משחת" השמרים (ראה איור 2-4), ביציבות האחסונית ובפעילות של התוצר הסופי.

השלב הראשון בתהליך קבלת שמרים פעילים (דחוסים או יבשים) הוא הוצאה של המים מ"משחת" התאים על-ידי סינון בלחץ או בואקום לקבלת "עוגת" שמרים בעלת 27%-30% מוצקים, המכונה ***עוגת לחץ***.

שמרים דחוסים, המאופיינים ביציבות אחסונית נמוכה (כלומר נוטים "להתקלקל" מהר יחסית), משווקים כחומר מוצק למחצה בצורת בלוקים אחידים, או כתפזורת של "פירורי" שמרים, לשימוש ביתי או לשימוש תעשייתי.

להכנת הבלוקים, מערבבים את עוגת הלחץ עם כמות קטנה של מים, המכילים חומר מתחלב (כגון שמנים צמחיים מסוימים), וחותכים את העוגה הרכה, המתקבלת בצורת בלוק, לגודל רצוי. החומר המתחלב מסייע בהקנית מרקם אחיד, שטח פנים חלק ומקל על ביצוע חיתוך באופן אחיד. הבלוק המתקבל נארז בנייר שעווה וניתן לאחסון במקרר (7°C-2°C) במשך 4-5 שבועות. כדי להגדיל את זמן האחסון, מוסיפים לעיתים לעוגה הרכה עמילן וחומרים המעכבים התפתחות עובש.

פירורי שמרים מתקבלים משבירה של עוגת הלחץ לחתיכות קטנות ולא אחידות על-ידי העברתה בכוח דרך חיץ מחורר. פירורי השמרים נארזים בתפזורת בשקים בגודל הרצוי וניתן לאחסנם בקירור במשך 3-4 שבועות.

שמרים דחוסים מהווים את צורת השיווק העיקרית של שמרי אפייה, כתוצר סופי המכיל 30% שמרים (משקל יבש), בהיקף ייצור עולמי שנתי המתקרב לשני מיליון טון. שמרים דחוסים משמשים, בעיקר, בתהליכי תסיסה בתעשיית המזון (כגון: אפיית לחם, ייצור יין והכנת בירה), כאשר מוסיפים אותם לתהליך כמות שהם או לאחר הרחפתם במים.

שמרים יבשים פעילים מיוצרים מגזעים נבחרים המאופיינים בשימור גבוה של הפעילות (95%-99%) גם לאחר ביצוע תהליך הייבוש. תהליך הכנתם מתחיל בהעברת עוגת הלחץ דרך רשת להקנית מבנה של צינורות דקיקים. אלה עוברים בהמשך ייבוש הדרגתי באוויר חם (45°C-25°C). לתוצר הסופי מבנה של חלקיקים גליליים נקבוביים המכילים כ-8% לחות. תוצר זה מאופיין ביציבות אחסונית טובה יותר משל השמרים הדחוסים: באריזה באוויר הוא יכול להישמר עד שלושה חודשים ללא קירור, ובאריזת ואקום ניתן להאריך את יציבותו האחסונית עד שנה.

שמרים יבשים פעילים משמשים הן בתהליכי תסיסה והן כמקור של מרכיבים תזונתיים ומוצרים תוך-תאיים. תוצר זה זמין מסחרית הן לשימוש הצרכן הביתי והן לשימוש בתעשייה במארזים המתאימים.

שמרים יבשים לא-פעילים הם שמרים מתים, אשר איבדו את יכולת ההתססה ומשמשים כתוסף מזון לבני-אדם, לבעלי-חיים או כמקור להפקת תוצרים תוך-תאיים. מכינים שמרים יבשים אלה משמרים, שהתקבלו בתהליך הייצור שתואר לעיל, או משמרים שנתקבלו כתוצר לוואי בתעשיית הבירה, על-ידי ביצוע תהליך פסטור (חימום של 2-5 דקות ב- 90°C-70°C) לתרחיף שטוף של שמרים, הממית את התאים. לאחר ייבוש התאים וטחינתם, מתקבל תוצר סופי בעל תכולה גבוהה של מוצקים (95%-96%), המשווק כפתיתים או כאבקה, ומאוחסן במקום יבש עד השימוש.

2.1.3 השימושים התעשייתיים של השמרים

לשמרים שימושים תעשייתיים רבים, מרביתם קשורים בעיבוד מוצרי מזון באמצעות תהליך התסיסה הכוהלית. בין תהליכים אלה בולטים, כאמור, תהליכים מסורתיים עתיקים ביותר, כגון אפיית לחם, ייצור בירה, יין ומשקאות מותססים אחרים; התוצר העיקרי (אתאנול) בתהליכים אלה נשאר כמרכיב בתערובת התסיסה הסופית, שממנה, בדרך-כלל, מופרדים השמרים לאחר סיום פעולתם.

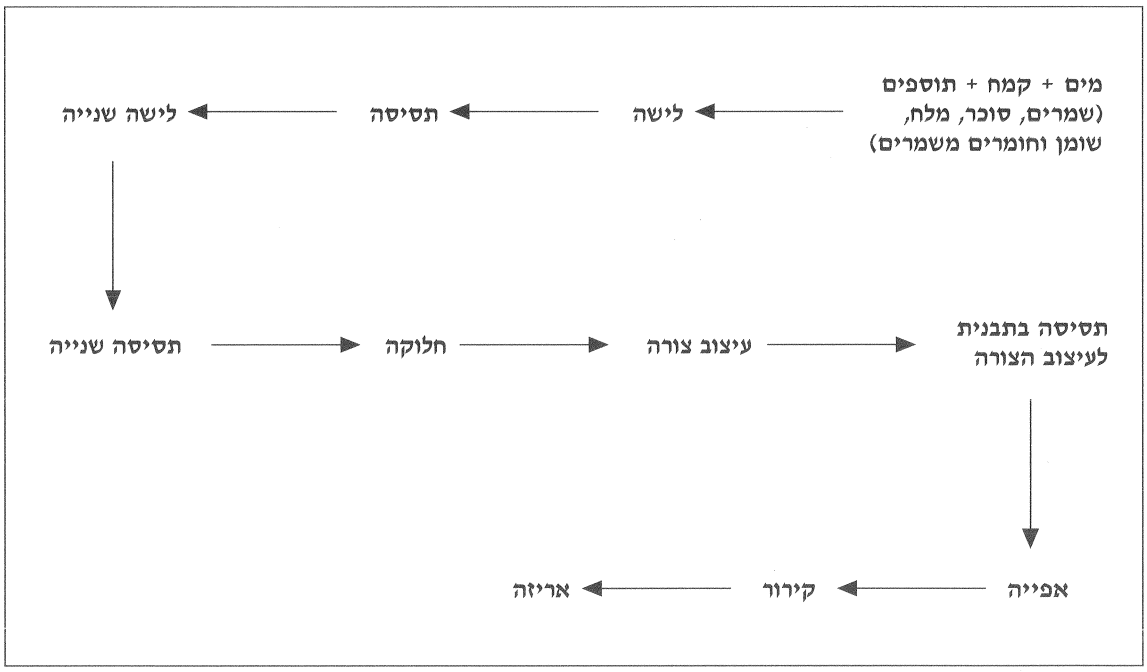
שימושים אחרים בשמרים כוללים ייצור אתאנול, המופק מתערובת התסיסה בסיום התהליך, והפקה של מוצרים תוך-תאיים, המשמשים כתוסף מזון. בהמשך נפרט ונכיר מקרוב אחדים מהתהליכים החשובים האלה.

עתה נפרט כמה מהתהליכים המסורתיים שמשתמשים בהם בשמרים.

א. אפיית לחם

הלחם משמש מרכיב חשוב ומרכזי בתזונת האדם. חומרי-הגלם העיקריים להכנתו כוללים: קמח (חיטה בדרך-כלל), מים, שמרים ומלחים; בסוגים מיוחדים של לחם כלולות גם תוספות משפרות שונות, כגון שומן, ביצים וחלב.

מוסיפים את השמרים ללחם כדי להתפיח אותו, כדי "לבנות" את המרקם האופייני לו, כדי לתת לו טעם וריח ולשפר את ערכו התזונתי.
תהליך אפיית הלחם מתואר באיור 2-5.



איור 2-5

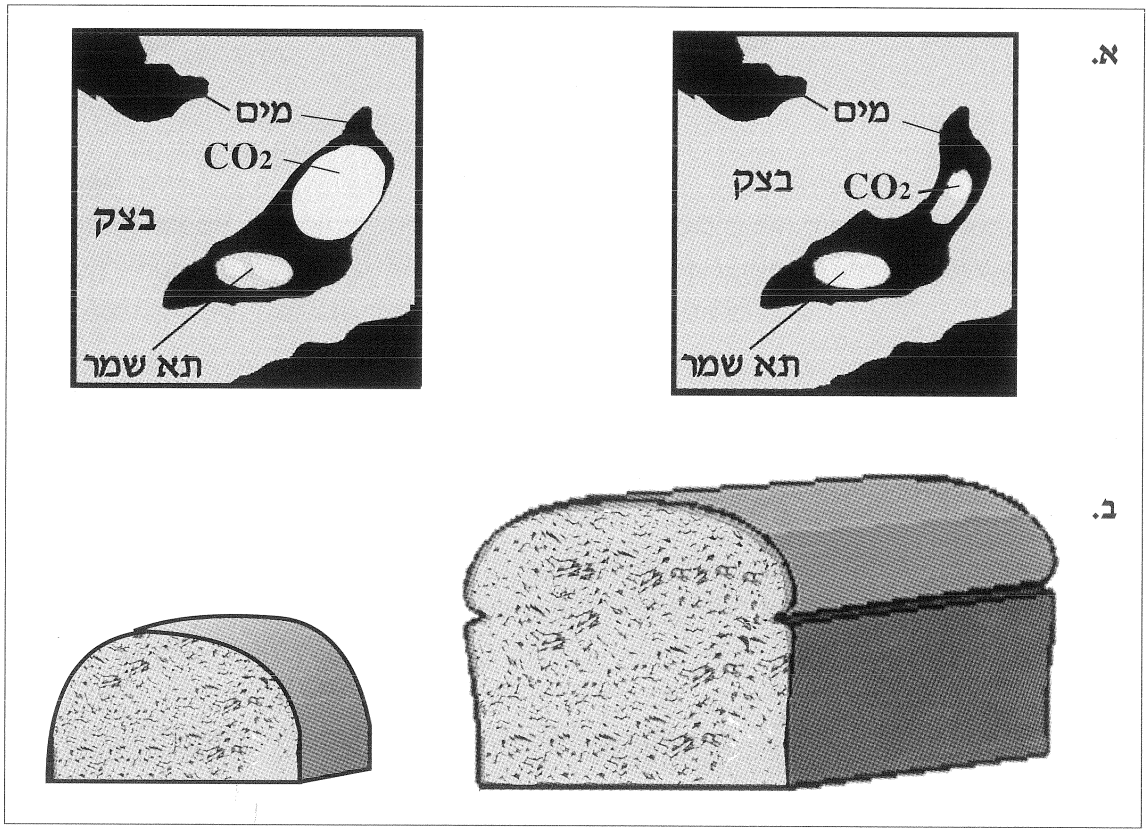
תיאור סכימתי של אחת מהשיטות המקובלות לאפיית לחם (שיטת "הבצק הישיר")

תיאור התהליך:

מוסיפים את השמרים לתערובת של קמח, מים, מלחים, חומרים משמרים ותוספות אחרות. לאחר לישה להכנת בצק אחיד, מניחים את הבצק שנוצר במקום חם לשעות אחדות, כדי לאפשר לשמרים להתסיס את המרכיבים הסוכריים הזמינים הנמצאים בתערובת.

הקמח עצמו מכיל כמויות קטנות בלבד של סוכר זמין, העשוי לשמש כסובסטרט לתהליך התסיסה הכוהלית. עמילאזות המצויות בקמח מפרקות את העמילן שבו, ויוצרות סוכרים זמינים (כגון מלטוז וגלוקוז); ניתן להגביר פעילות זו על-ידי הוספת עמילאזות או סוכר זמין לתערובת.

כזכור, התוצרים העיקריים של תהליך התסיסה הכוהלית הם הגז CO_2 ואתאנול. בועות הגז הנוצרות נלכדות בבצק ומתפיחות אותו, תוך יצירת ה"כיסים" והמבנה הספוגי האופייני של הלחם (ראה איור 2-6 א). לבועות הגז הנוצר בסביבת השמרים תפקיד מרכזי בעיצוב המבנה והצפיפות של הלחם המתקבל (ראה איור 2-6 ב). הנפח של הגז הנוצר ואיכות פיזורו תלויים בפיזור אחיד של השמרים בעיסת הבצק, בריכוז הסוכרים הזמינים לתסיסה ובתנאים מתאימים לביצוע ההתססה (טמפרטורה, זמן, ריכוז המלח ורמת החומציות).



איור 2-6

התפחת בצק על-ידי שמרים בתהליך אפיית הלחם:

א. היווצרות "כיסי" CO_2 בבצק בתהליך התסיסה הכוהלית.

ב. השפעת השמרים על המרקם הסופי של הלחם (משמאל - לחם שנאפה מבצק ללא שמרים; מימין - לחם מבצק מותפח).

לאחר מספר שלבי תסיסה ולישה, המבוצעים לסירוגין, מעבירים את הבצק לתבנית - לעיצוב הצורה והגודל - מתסיסים אותו בפעם האחרונה ומעבירים לתנור לשלב האפייה, שבמהלכה מתנדף רוב האתאנול שנוצר בתהליכי התסיסה.

יצוין, כי בניגוד לתהליך ייצור הבירה והיין, אשר יתוארו בהמשך, השמרים אינם מופרדים מן הלחם עם סיום שלב התסיסה בתהליך, אלא נשארים בתוכו כמרכיב תזונתי.

כאמור, לשמרים תפקיד חשוב נוסף בתהליך האפייה: עיצוב איכות הלחם מבחינת הטעם והניחוח. הדבר תלוי במידה רבה בתהליכים שהשמרים שבתערובת מבצעים, או עוברים, במהלך הכנת הלחם ואפייתו; למשל: יצירת מרכיבים ארומטיים אשר חלקם הופך בתגובות משניות לחומרי טעם וריח או יצירת מרכיבי טעם האופייניים ללחם כתוצאה מהתפרקות ביומסת השמרים במהלך האפיה.

לנוכחות השמרים במוצר הסופי יש גם חשיבות תזונתית, כמקור לחלבון ולויטמינים, על אף תכולתם הנמוכה יחסית בלחם (פחות מ 1% משקלי).

ברוב השיטות הנקוטות היום לאפית לחם משמשים שמרים השייכים למין S. cerevisiae (מכאן שמם העממי - שמרי אפיה).

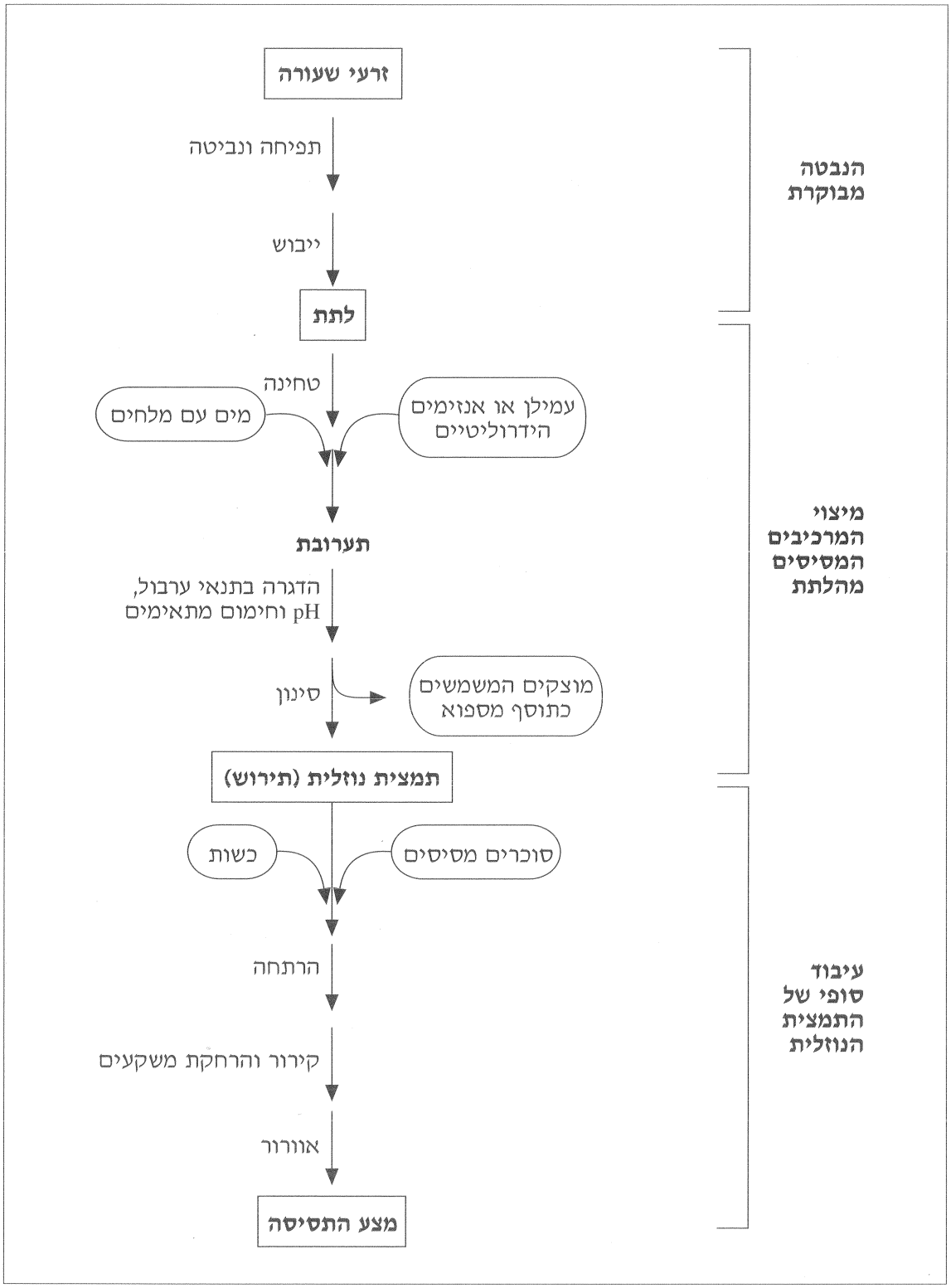
ב. ייצור בירה

הבירה היא משקה אלכוהולי, שתכולת האלכוהול (האתאנול) בו נעה לרוב בין של 4% ל-6%. ריכוז זה נמוך יחסית מן המקובל ביינות שולחניים (9%-12%) או במשקאות חריפים (מעל 40%). בנוסף לאלכוהול מכילה הבירה תערובת ייחודית של חומרי טעם שונים.

תהליך ייצור הבירה מתבסס על תסיסה כוהלית של הפחמימות המצויות בזרעי דגניים. שלושה סוגים עיקריים של דגניים משמשים לייצור הבירה: שעורה, אורז ותירס. במבט היסטורי השעורה שימשה כחומר גלם באירופה, האורז נוצל בארצות המזרח הרחוק, והתירס היה נפוץ בשימוש באמריקה.

זרעי הדגניים הם גרגרים יבשים וקשים, שאינם מכילים סוכרים זמינים להתססה מידית על-ידי השמרים, אלא בעיקר עמילן - רב-סוכר שהשמרים חסרים את היכולת האנזימטית לפרקו. לפיכך על מנת להשתמש בדגניים כחומר גלם לתהליך התסיסה הכוהלית, נדרש שלב מקדים של הכנת המצע לתהליך התסיסה, שבמהלכו חומר הגלם הראשוני עובר מספר שלבי עיבוד והוספה של מרכיבים משלימים. תהליך ההכנה מותאם לסוג הדגניים שמשתמשים בו.

כאשר שעורה משמשת כחומר המוצא לתהליך ייצור הבירה, תהליך הכנת המצע כולל שלושה שלבים עיקריים, כמתואר באיור 7-2.



איור 7-2

תרשים זרימה לתהליך הכנת מצע תסיסה מזרעי שעורה המשמש בייצור הבירה

תיאור התהליך:

הנבטה מבוקרת

תחילה מופרדים זרעי השעורה מהגבעולים ומהמוץ ומושהים ימים אחדים בתנאי טמפרטורה ולחות, (45%-50%) המעודדים התחלת תהליך נביטה. במהלך הנביטה הזרעים תופחים, מתרככים ומייצרים כמות גדולה של עמילאזות, פרוטאזות ואנזימים אחרים הפועלים לפירוק סוכרים וחלבונים של חומרי התשמורת (בעיקר עמילן). תהליך הנביטה מופסק בזמן קצוב באמצעות ייבוש הזרעים המונבטים בחימום. במהלך הייבוש נוצרים חלק מחומרי הטעם והצבע האופייניים לבירה בסדרה של תגובות כימיות וביוכימיות מורכבות. התוצר של הנבטה מבוקרת זו נקרא ***לתת***.

מיצוי המרכיבים המסיסים מהלתת

הגרעינים היבשים של השעורה המונבטת (הלתת) נטחנים, ולתוצר הטחון מוסיפים מים, המכילים מלחים (בין היתר גם בופר) ולעיתים גם תוספים, שנועדו להגדיל את מקורות הסוכר במצע, כגון עמילן או אנזימים הידרוליטיים. התערובת מושרית בתנאים מתאימים של ערבול, חימום ו-pH, להמשך מבוקר של תהליכי הפירוק האנזימטיים, שהחלו בתהליך ההנבטה: פירוק חלבונים וסוכרים הבונים את דפנות התאים וסוכר התשמורת עמילן למרכיבים מסיסים. במקביל לתהליך זה, מתרחשים תהליכי פירוק ושינוי רבים בתערובת הלתת בעקבות חימום ותגובות כימיות ספונטניות. כתוצאה מכל אלה מתקבלת תמצית נוזלית, המכונה ***תירוש*** ואשר מופרדת משארית המוצקים בתהליך סינון. שארית המוצקים, המכילה את קליפות הזרעים וחומרים בלתי מסיסים אחרים, משמשת להזנת בקר.

עיבוד סופי של התמצית הנוזלית

לתמצית שנתקבלה מוסיפים ***כשות*** - פרחים מיובשים של הכישותית (צמח מטפס השייך למשפחת הקנביים), או תמצית כשות, כדי להקנות את הטעם המריר האופייני לבירה.
לעיתים "מחזקים" את התמצית על-ידי הוספה של סוכרים מסיסים, שנועדו להעלות את שיעור האלכוהול המתקבל. (במדינות מסוימות אסורה הוספה של מקורות סוכר חיצוניים, וייצור הבירה מבוסס אך ורק על תסיסה של הסוכרים, הניתנים למיצוי מגרעיני השעורה המונבטים.)

התמצית הנוזלית עם התוספות עוברת בשלב הבא הרתחה. ואלה מטרות ההרתחה:

* עיקור להשמדת מיקרואורגניזמים, לפני ביצוע תהליך התסיסה בפרמנטור.
* הרס האנזימים ההידרוליטיים, ובהתאם עצירת הפעילויות האנזימטיות ו"הקפאת" רמת הסוכר הזמין לתסיסה בשיעור הרצוי לקבלת רמת האלכוהול הסופית הרצויה.
* השקעת חלבונים, שנתמצו לתערובת, על-ידי תהליכי דנטורציה בחימום ותהליכי צילוב כימיים בינמולקולריים בין החלבונים ומרכיבים אחרים (שמקורם בלתת או בכשות) ליצירת צברי מולקולות שמסיסותם במים נמוכה.
* מיצוי מרכיבי טעם מן הכשות, הכוללים בעיקר שמנים, שרפים מסיסים ונגזרות הנוצרות מהם במהלך תהליך ההרתחה, להקניית הטעם האופייני.

* פיתוח הצבע האופייני לבירה: במהלך ההרתחה מתרחשות תגובות כימיות (כגון חמצון של תרכובות פנוליות, הגבה של סוכרים עם חומצות אמיניות ועוד), הגורמות להתפתחות משלימה של כ-2/3 מהצבע של התמצית הנוזלית הסופית, הנוסף לצבע שהתפתח במהלך שלב הנביטה.
* הגדלת הריכוז של מרכיבי המערכת על-ידי נידוף חלק מהמים.

לאחר ההרתחה המצע מקורר לטמפרטורה של 8°C עד 16°C, ומורחקים ממנו משקעים לא-מסיסים. כהכנה לשלב התסיסה מוחדר אוויר למצע המקורר, כדי לרוות אותו בחמצן הנדרש, לשלב ההתחלתי של גידול השמרים בתהליך התסיסה.

מצע התסיסה המתקבל מאופיין ב-pH חומצי (5.4-5.1) ומספק את כל מרכיבי המזון הדרושים לגידול אוכלוסית שמרי הבירה וביצועה של התסיסה הכוהלית, ביניהם סוכרים זמינים, חומצות אמיניות, נוקלאוטידים שונים, מינרלים וויטמינים.

לאחר הקירור והאוורור, המצע מועבר לפרמנטור, הנזרע בשמרים ממין S. uvarum (carlsbergensis) או S. cerevisiae - שני מיני השמרים המשמשים בייצור בירה משעורה, שמקורם בתסיסה קודמת או בתרבית חדשה. ככל שהריכוז ההתחלתי של השמרים גדול יותר, התסיסה הכוהלית תתחיל מוקדם יותר ותתרחש בקצב מהיר יותר.

באיור 2-8 מתואר מהלך אופייני של תהליך תסיסה מנתי.



איור 2-8

שינוי בתכולת התאים ובטמפרטורה במהלך תהליך מנתי של ייצור בירה קלה (lager)

לאחר תקופת lag של כ-12 שעות, הדרושה לשם התאקלמות השמרים לתנאי הסביבה החדשים, מתחילה התרבות נמרצת שלהם. החמצן שבמצע מספיק כדי לאפשר עלייה של פי 4 עד 5 בכמות התאים במשך 3-4 ימים, ללא אוורור נוסף. כאשר כל החמצן המומס במצע נצרך, מתהווים תנאים אנארוביים במערכת, והשמרים עוברים לביצוע תסיסה כוהלית, שבמהלכה נוצרים אתאנול ו-CO_2, ובמקביל נמשך תהליך גידול איטי של אוכלוסית השמרים.

תהליך התסיסה מתבצע בטמפרטורות נמוכות יחסית (12°C-7°C) בעיקר מסיבות של אבטחת התפתחות ושמירת מרכיבי הטעם של הבירה. במהלך גידול השמרים נוצר חום, הגורם לעלייה בטמפרטורה, כאשר בשלב הארובי משתחרר חום רב יותר מאשר בשלב האנארובי. בהתאם נדרש קירור מבוקר של המערכת, לשמירת הטמפרטורה הרצויה (ראה איור 8-2).

כ- 12-26 שעות לאחר זריעת השמרים, המצע הופך לרווי ב-CO_2 ומופיעות בו בועות קטנות של גז העולות אל פני השטח של המצע תוך יצירת קצף. תנועת הבועות מספקת את הערבול הנדרש להרחפה עדינה של השמרים ופיזור אחיד של מרכיבי המזון במצע.

כדי לשפר את הערבול, נהוג להשתמש בפרמנטורים ארוכים, שבהם תנועת הבועות כלפי מעלה נמשכת יותר זמן, או במערבל מכני המותקן בפרמנטור. במהלך התסיסה כמות הקצף הולכת וגדלה, והוא הולך ומצהיב, עקב שקיעה של מרכיבי לתת, כשות ותאי שמר מתים.

לאחר 4-5 ימים מסתיים חלק הארי של תהליך התסיסה. חלק מהתאים מתפרקים, וחלקם עוברים אגרגציה ליצירת צברים. כתוצאה מכך יורד קצב ייצור ה-CO_2 וחלה "נפילה" מסוימת של הקצף. במצב זה המצע עדיין מכיל סוכרים זמינים להתססה, ונדרשים כ-12 יום נוספים לניצולם המושלם.

בסיום התסיסה מופרדים צברי השמרים מהמצע באמצעות סרכוז. חלקם משמש כתרבית מזרע למחזורים נוספים של תהליכי תסיסה, לאחר ששוטפים אותם להרחקת שאריות של מרכיבי מצע ולאחר שמטפלים בהם בטיפול חומצי להשמדת זיהום חיידקי, אם הוא קיים. כך ניתן לבצע מיחזור של השמרים 6-7 פעמים. שאר השמרים, המהווים תוצר לוואי לתהליך ייצור הבירה, נמכרים לתעשיית המזון כתוסף מזון להכנת מספוא להזנת בהמות. לשם כך השמרים מופרדים מהבירה על-ידי סרכוז, נשטפים, מרוכזים, מועברים פסטור וייבוש ומעורבבים עם שאריות גרגרי השעורה שנותרו מתהליך הכנת המצע.

במקביל ליצירת אתאנול, CO_2 וביומסה, שהם התוצרים העיקריים, נוצרים במהלך התסיסה מרכיבי טעם וריח רבים, שמקורם בתהליכים ביוכימיים המתרחשים בשמר, בתהליכי ההתפרקות שלו ובתגובות הכימיות בין מרכיבי המצע. בין אלה בולטים: דיאצטיל ($CH_3COCOCH_3$), התורם את הטעם דמוי חמאה או טופי האופייני לבירה, כוהלים ארוכי שרשרת יותר מאתאנול, חומצות אורגניות, חומצות שומן, אסטרים שונים, ותרכובות המכילות גופרית.
כך נקבעים הטעם והריח האופייניים לבירה על-פי הרכב מגוון של כמה עשרות רכיבים שונים.

הקצף האופייני של הבירה מקורו בעיקר בתהליכי דנטורציה של חלבונים, המתרחשים עקב פעילויות אנזימטיות, הפעלת כוחות פיסיקליים ותגובות כימיות ספונטניות. היציבות הפיסיקלית ואיכות הקצף של הבירה משפיעות מאוד על איכות הבירה.

בהתאם לכך יש חשיבות גדולה לכמות ולסוג החלבונים במצע התסיסה. אם תכולת החלבונים נמוכה מדי, נוצרת בירה בעלת קצף דל וטעם תפל. לעומת זאת עודף של חלבונים גבה-מולקולריים גורם להיווצרות בירה עכורה ובלתי-יציבה, כתוצאה משקיעה של חלבונים יחד עם מרכיבי מצע נוספים במהלך האחסון. כדי לווסת את כמות החלבונים במצע, לעיתים מוסיפים לתוכו אנזימים פרוטאוליטיים ממקורות שונים, המפרקים את מולקולות החלבון הגדולות למרכיבים מסיסים קטנים יותר. היווצרות הקצף ומידת יציבותו מושפעות, בנוסף לחלבונים, גם מבועות ה-CO_2, ממרכיבי כשות פעילי-שטח ומהצמיגות של הבירה.

לשם שיפור איכות הטעם של הבירה מאוחסנת הבירה הגולמית, לאחר הרחקת השמרים, בכלים סגורים בטמפרטורות נמוכות (6°C-2°C) למשך 2-6 שבועות. שלב סופי זה בייצור הבירה מכונה ***התייישנות***, והוא נועד בעיקר לשתי מטרות:

* הבשלה סופית של הטעם והריח האופייניים, המתרחשת כתוצאה מפירוק חלק מתרכובות הגופרית, שנוצרו במהלך התסיסה על-ידי סדרת תגובות כימיות ואף תסיסה משנית, המתבצעת על-ידי כמות קטנה ומבוקרת של שמרים.
* השבת מקצת גז ה-CO_2 שנפלט במהלך שלב התסיסה העיקרית - באמצעות גז הנוצר במהלך התסיסה המשנית או על-ידי איסוף הגז שנפלט במהלך התסיסה העיקרית, ניקויו והשבתו לבירה.

בסיום שלב ההתיישנות, עוברת הבירה תהליך של סינון להרחקת מיקרואורגניזמים ומשקעים שונים, נארזת בבקבוקי זכוכית או בפחיות מתכת ועוברת פסטור. מכאן ואילך היא מוכנה לאחסון ולשווק.

כאשר השעורה משמשת כחומר המוצא, מבחינים בין שני סוגים עיקריים של בירה: שיכר (ale) ובירת ה-lager:

שיכר ***(ale)*** - בירה חזקה המיוצרת בעיקר באנגליה על-ידי שמרים ממין *S. cerevisiae*, הפועלים בטמפרטורות גבוהות יחסית (20°C) ומבצעים תסיסה נמרצת ביותר, המאופיינת בייצור מוגבר של CO_2 ובתכולה גבוהה יחסית של אתאנול בסיום התהליך (6%).

בירת ה-lager - בירה קלה המיוצרת בעיקר בארה"ב על-ידי שמרים ממין *S. uvarum*, הפועלים בטמפרטורות נמוכות יותר (15°C-12°C) ומבצעים תסיסה איטית יחסית (ראה איור 2-8), המסתיימת בריכוז נמוך יחסית של אתאנול (4%).

השעורה מהווה, כאמור, את חומר הגלם העיקרי להכנת הבירה בעולם המערבי. יש לציין, עם זאת, כי בארצות המזרח נפוץ עדיין השימוש באורז להכנת בירה, הנקראת ***שיכר אורז*** ***(sake)***. במקרה זה, להבדיל מתהליך ייצור הבירה מגרעיני שעורה, מפורק העמילן של האורז באמצעות עמילאזות המיוצרות על-ידי עובש ממין *Aspergillus* במקביל לתהליך התסיסה עצמו. זורעים נבגי עובש על אורז מאודה, ומאפשרים להם לגדול עליו, עד שהתפטיר שנוצר חודר ומתפשט בכל גרגרי האורז.

החומר שמתקבל מכונה ***Koji***, ומשמש הן כמקור לעמילאזות והן כמזרע של שמרים וחיידקים המצויים בו באופן טבעי. ה-Koji מוסף למנה גדולה יותר של אורז מאודה, המעורב עם מים. בהדרגה ובתנאים מתאימים מתרחשת הידרוליזה של העמילן, ובנוכחות ריכוז מספיק של גלוקוז, מתחילים תהליכי תסיסה ספונטניים, הכוללים תסיסה כוהלית, המתבצעת על-ידי שמרים ממין S. sake, ופירוק אנארובי בקטריאלי של גלוקוז לחומצה לקטית.

באמריקה וכן באזורים המרכזיים של המזרח-התיכון הייצור המסורתי של הבירה על-ידי שמרים התבסס על פירוק מוקדם של עמילן תירס על-ידי עמילאזות, שמקורן ברוק של בני-אדם. אינדיאנים באמריקה המרכזית והדרומית הכינו בירה על-ידי לעיסת גרגרי התירס ויריקת התערובת למיכל, שבו מתרחשת תסיסה כוהלית ספונטנית על-ידי שמרים, המצויים בתירס באופן טבעי.

ג. ייצור יין

הכנת היין מבוססת על התססת סוכרים מסיסים (בעיקר גלוקוז ופרוקטוז) של מיץ ענבים על-ידי שמרים ממין S. cerevisiae בתהליך של תסיסה כוהלית. לאחר איסוף הענבים, מעיכתם והפרדת הקליפות והגרעינים, מתקבל מיץ גולמי, חומצי יחסית, המכיל לרוב 18%-25% סוכר, ומכונה ***תירוש***.

התירוש מהווה את המצע הבסיסי לתהליך התסיסה. הוא מספק את רוב הצרכים התזונתיים של השמרים לגידול בתנאים אנארוביים, אך לעיתים יש צורך בהוספה של כמות קטנה של מלחי אמוניה, להעשרת הריכוז של מקור החנקן.

כתרבית מזרע לתהליך תסיסת היין עשויה לשמש האוכלוסיה הטבעית המעורבת של שמרים, המצויה על-פני הענבים. במהלך התהליך, עם העלייה בריכוז האתאנול, הפועל כמעכב גידול ופעילות של השמרים בריכוז נפחי מצטבר של מעל 4%, חלים שינויים באוכלוסיה זו, ובשלבים המאוחרים של תהליך התסיסה משתלטים גזעי S. cerevisiae בעלי סיבולת גבוהה יחסית לנוכחות אתאנול.

עם המעבר לתהליכי ייצור מבוקרים יותר, מטופל התירוש, לפני תחילת תהליך התסיסה, בגופרית דו-חמצנית (SO_2), המשמידה את אוכלוסיות השמרים והחיידקים הטבעיות. אחר-כך מתבצעת זריעה מבוקרת באמצעות שמרים מתרבית טהורה של הגזע הרצוי של שמרי היין.

תהליך התסיסה מתרחש במקביל לגידול השמרים, ומסתיים בדרך-כלל בתוך מספר ימים, כאשר ריכוז האתאנול מגיע ל-9% עד 12%. בנוסף לאתאנול מיוצרות כמויות קטנות של תוצרי לוואי, המשפיעים על הטעם והריח של היין, כגון: גליצרול, חומצה אצטית, חומצה לקטית, אצטאלדהיד, סוקצינט, כוהלים ארוכים יותר מאתאנול, אסטרים שונים ועוד. הכמות וההרכב של תוצרי הלוואי תלויים בהרכב המצע, בגזע השמר המשמש בתהליך ובתנאי הסביבה.

לטמפרטורת התהליך השפעה רבה על התפתחות הטעם והריח של היין: יין המתקבל בתסיסה ארוכה ואיטית, המתבצעת בטמפרטורה נמוכה, יהיה בעל ניחוח טוב יותר מאשר יין המתקבל בתסיסה מהירה בטמפרטורה גבוהה.

במהלך התסיסה הכוהלית נוצרת כמות ניכרת של חום, ובהתאם נדרש קירור מבוקר, כדי לשמור את הטמפרטורה בטווח הרצוי. בייצור יינות לבנים מועדפת טמפרטורה של 16°C-7°C לתחילת התסיסה, וטמפרטורה של 20°C-19°C לקראת סיומה.

להכנת יין לבן משמש התירוש המתקבל מענבים לבנים, בעוד שלהכנת יינות אדומים מתבצע תהליך התסיסה בנוכחות הקליפות של ענבים אדומים, ללא הפרדתן. הכוהל המצטבר במהלך התסיסה מסייע במיצוי הצבע האדום מהקליפות לתוך היין.

בסיום תהליך התסיסה, השמרים שוקעים - יחד עם משקעים נוספים - לקרקעית הפרמנטור ומופרדים מהיין. שמרי היין, בניגוד לשמרי בירה, לא ממוחזרים.

היין הנוצר חייב לעבור תהליך הבהרה והתיישנות, לקבלת תוצר סופי איכותי. הבהרה ראשונית מתבצעת על-ידי סינון, להרחקת משקעים, ובהמשך היין מזוכך על-ידי הוספת גורמים, הנספחים לחומרים מורחפים ביין ומסייעים להרחקתם, באמצעות סינון נוסף.

היין המזוכך עובר "התיישנות" על-ידי אחסון, בדרך-כלל במיכלי עץ. משך האחסון נע משבוע ועד שנתיים או יותר, על-פי סוג היין ואיכותו.

עיבוד נוסף של יינות שולחניים בעלי תכולת אלכוהול של 12%-9% מאפשר הרחבה של מגוון המוצרים לתחומים משיקים. הנה כמה דוגמאות:

* **יינות תוססים** (כגון שמפניה) - מתקבלים על-ידי תסיסה כוהלית שניונית של יינות שולחן, המתבצעת בבקבוקים סגורים, לאחר הוספת סוכרים ושמרים ממין S. bayanus. את השמרים מרחיקים מן היין המותסס בשיטה מיוחדת, בלי לפתוח את הבקבוק.

* **יינות מחוזקים** - אלה הם יינות שולחן בתוספת אלכוהול עד ריכוז של 21%-14% ביינות כמו ורמוט, פורט ושרי, או אף 40% ויותר במשקאות חריפים כמו ברנדי, ויסקי וודקה. בנוסף לאלכוהול נהוג להוסיף ליינות אלה תבלינים שונים לשיפור הטעם והריח.

למרות תכולת האלכוהול הגבוהה וה-pH הנמוך (ראה טבלה 2-2 בעמוד הבא), היינות חשופים ל"קלקול" מיקרוביאלי, הנגרם על-ידי שמרים וחיידקים שגדלים על האלכוהול, על חומרי הטעם או על סוכרים שנשארו ביין וגורמים לכך שהיין יחמיץ ויעכיר. ניתן למנוע "קלקול" של יין על-ידי פסטור (הפוגע במידת-מה באיכות היין), על-ידי סינון תת-מיקרוני או על-ידי טיפול בכימיקלים מתאימים ביין לפני אריזתו.

עד כה דנו בתהליכי עיבוד של מוצרי מזון, המכילים אתאנול, הנוצר על-ידי שמרים בתסיסה כוהלית כמרכיב בלתי נפרד של תערובת התסיסה, שהיא המוצר הסופי (ראה טבלה 2-2).

טבלה 2-2

נתוני הפעלה ורמת תוצר אופייניים לשימוש תהליך התסיסה הכוהלית בעיבוד של מוצרי מזון

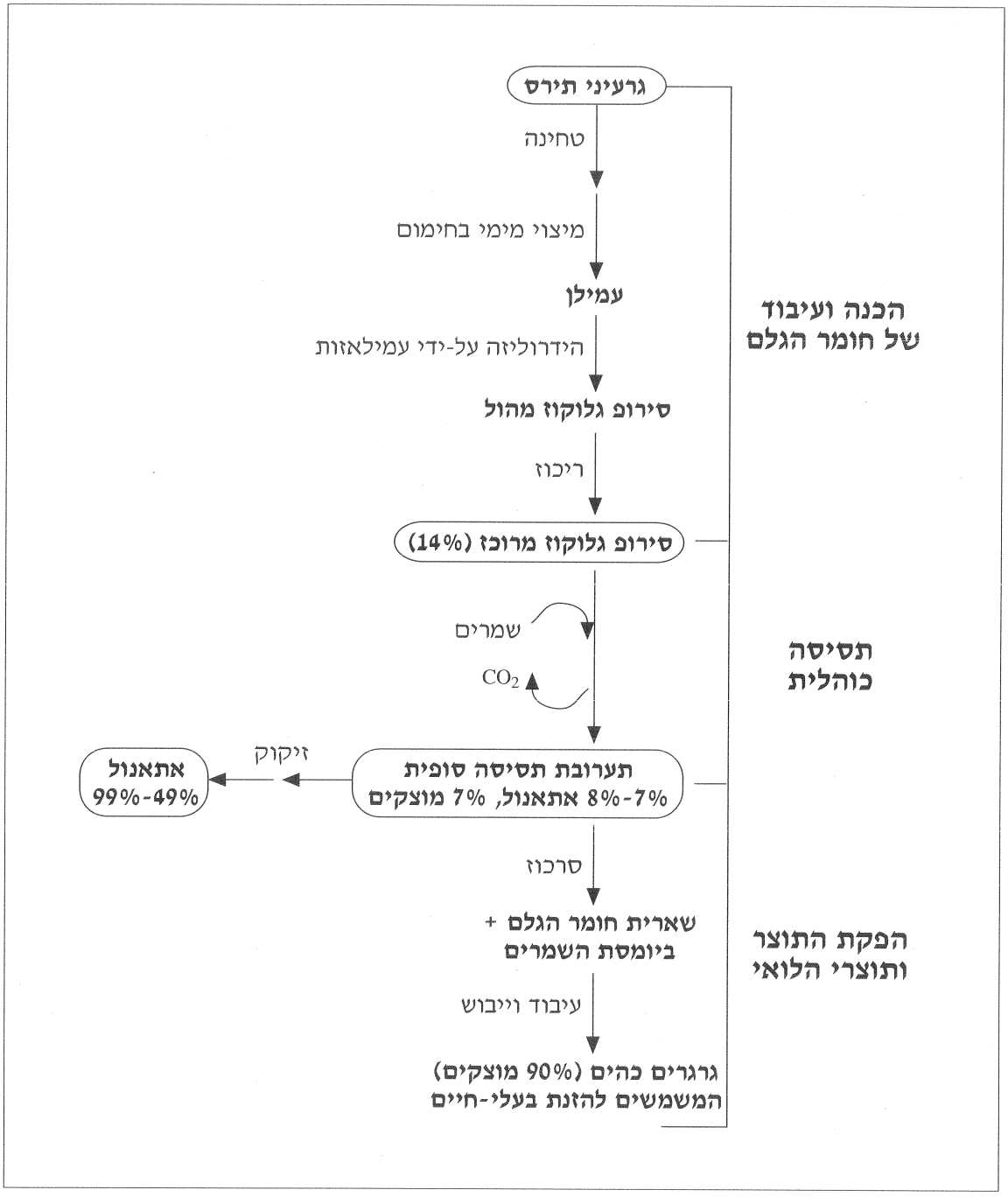
תוצר / נתונים	בצק של לחם	בירת ה-lager	שיכר (ale)	יין	שיכר אורז (sake)
חומר הגלם	קמח, סוכר	תירוש	תירוש	מיץ פירות או ענבים	אורז מאודה
תנאי התסיסה * משך * טמפרטורה * pH	 3-1 שעות 35°C-30°C 5.2-4.7	 10-8 ימים 15°C-10°C 5.2-4.2	 6-2 ימים 20°C 5.2-4.0	 10-5 ימים 27°C-15°C 3.5	 28-21 ימים 15°C-7°C
ריכוז אתאנול סופי (% משקל לנפח)	3%-2%	4%	4%	13%-11%	18%
מספר תאים (מיליון למ"ל) * התחלתי * סופי	 275 300	 15-6 90-30	 15-6 90-30	 10-5 150-50	 100

במקביל לתהליכים חשובים אלה, פותחו תהליכי תסיסה לייצור אתאנול כתוצר סופי נקי, המופרד מהתערובת לאחר גמר התסיסה. האתאנול הנקי משמש כממס אורגני, כחומר מחטא, כחומר מוצא אפשרי לסינתזה של מספר רב של כימיקלים שונים, כתוספת כוהל ליינות מחוזקים וכחומר דלק המהווה תחליף לחלק (10%-15%) מנפח הדלק הקל המיועד למכוניות נוסעים.

ד. ייצור אתאנול

חומר המוצא העיקרי, המשמש לתהליכי תסיסה לייצור אתאנול, הוא גלוקוז, המופק בעיקר מגידולים חקלאיים עתירי עמילן כגון תירס ותפוחי-אדמה, או מגידולים המיועדים לייצור סוכר כגון קנה סוכר וסלק סוכר. מתוך אלה, המקור המקובל ביותר להפקת גלוקוז הוא עמילן תירס, העובר תהליך עיבוד, שהופך אותו לסירופ גלוקוז זמין לתהליך התסיסה.

התהליך הכולל של ייצור אתאנול מעמילן תירס מתואר באיור 2-9.



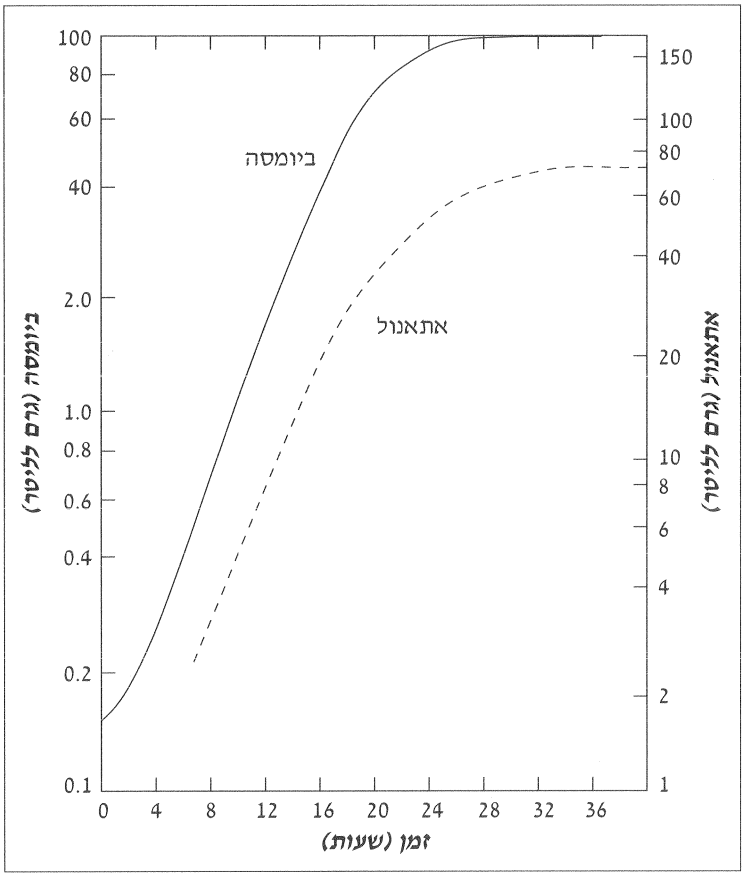
איור 2-9

תרשים זרימה של תהליך הייצור של אתאנול מעמילן תירס

שלושה מיני שמרים עיקריים משמשים לתהליך הייצור המסחרי של אתאנול:
S. carlsbergensis, *S. cerevisiae* ו-*K. fragilis*, כאשר הנפוץ ביותר בשימוש הוא שמר האפייה.

שלב התסיסה מתבצע בתנאים אנארוביים, בהם מייצרים השמרים אתאנול ו-CO_2 בתהליך התסיסה הכוהלית, המתבצע במקביל לגידול איטי של השמרים (ראה איור 10-2), כאשר 46% ממסת הגלוקוז הנצרכת הופכים לאתאנול, כמות דומה משתחררת כגז (CO_2) וכמות קטנה בהרבה (10% משקלי) הופכת לביומסת שמרים, כמתואר להלן:

1 גרם גלוקוז ⟵ 0.46 גרם אתאנול + 0.44 גרם CO_2 + 0.1 גרם ביומסה.



איור 10-2

מהלך אופייני של קצב העלייה בריכוז האתאנול והביומסה בתהליך מנתי של תסיסה כוהלית, המתבצע בטמפרטורה של עד 35°C ובריכוז גלוקוז התחלתי של 150 גרם לליטר

הקצב של תהליך התסיסה ויעילותו תלויים בהרכב המצע, בריכוז הגלוקוז, בתנאי ההדגרה, בגזע השמר המנוצל, בריכוז התאים ובריכוז התוצר הסופי - האתאנול. בריכוזי סוכר מעל 0.3% מושגת רוויה של המערכת הגליקוליטית בתאים, והייצור מתבצע בקצב מירבי וקבוע.

הבעיה המרכזית בתהליך היא ***עיכוב על-ידי תוצר*** (אתאנול). עיכוב הגידול והייצור מתחיל כבר בריכוזי אתאנול נמוכים יחסית של כ-4%, כאשר בריכוז של 7% ומעלה האתאנול רעיל וגורם להאטה ניכרת, עד כדי עצירת תהליך התסיסה. כתוצאה מכך במערכת מנתית (ראה איור 10-2) תפוקת האתאנול השכיחה בתהליך התעשייתי היא כ-70 גרם לליטר (7%), ולכן לפי היחס הכמותי של היפוך

הסוכר לאתאנול, ל-CO_2 ולביומסה, משתמשים בריכוזי גלוקוז התחלתיים בתחום של 15%-20%.
יש מספר גישות לצמצום בעית העיכוב שיוצר האתאנול, (ובכך הגדלת תפוקתו הסופית). ואלה העיקריות שבהן:

* שימוש בגזעי שמרים בעלי סיבולת ועמידות גבוהים, יחסית, לאתאנול.
* הרחקה רציפה של אתאנול מהפרמנטור באמצעים שונים, כגון על-ידי מערכת ואקום, הגורמת לנידוף של האתאנול שנוצר והרחקתו כגז.

תהליך תסיסה מנתי, שבמהלכו מעובדת תמיסת גלוקוז בריכוז התחלתי של כ-14% לאתאנול בריכוז סופי של כ-7%-8%, נמשך 30-36 שעות (ראה איור 2-10) ומתבצע תוך שמירה על טמפרטורה של 30°C-35°C, על-ידי שימוש במי קירור למניעת התחממות יתר, העלולה לגרום נזק לתאים וכתוצאה מכך להפסקת התסיסה.

בתום שלב זה מזוקק האתאנול מן המערכת עד לרמת הנקיון הנדרשת (התלויה בייעודו המסחרי) (ראה איור 2-9). הזיקוק מבוסס על כך שנקודת הרתיחה של האתאנול (78°C) נמוכה ביחס למים. שארית החומר הלא-מותסס מהתירס וביומסת השמרים מופרדים ממצע התסיסה ויוצרים יחד, לאחר עיבוד וייבוש, תוצר לוואי המשמש כתוסף מזון לבעלי-חיים (ראה איור 2-9).

תהליך תסיסה לייצור אתאנול, כגון זה המתואר באופן כללי באיור 2-10, מתבצע בקנה-מידה גדול יחסית: מפעל בגודל בינוני לייצור אתאנול מעמילן תירס מייצר אתאנול בהיקף של 190 מיליון ליטר לשנה. עלויות הייצור נחלקות כלהלן:

* המרכיב העיקרי בהוצאות הייצור של תהליך זה הוא חומר הגלם (תירס) המהווה כ-70% מעלות הייצור.
* המרכיב השני בגודלו הוא תהליך הזיקוק, המשמש לניקוי ולהפקת האתאנול מתוך התמיסה המימית, שבה הוא מצוי בריכוז קטן יחסית. זיקוק האתאנול צורך אנרגיה רבה ומהווה כ-10% מעלות הייצור.
* ב-20% הנותרים נכללות הוצאות תשתית, עבודה, תחזוקה, פחת, מיסים וכו'.

בשנים האחרונות התרחב השימוש בתהליך התסיסה לייצור אתאנול, הן לשימוש כממס והן כתוסף דלק, משום שעלות הייצור שלו היא ברת-תחרות לעומת ייצורו האלטרנטיבי הכימי מחומרי לוואי של התעשייה הפטרוכימית. באמריקה הצפונית כ-60% מן האתאנול מיוצר כיום בתהליכי תסיסה. נראה, כי ככל שהפער בין מחיר התירס למחירי הנפט והדלק יגדל, כן יהיה כדאי יותר לייצר אתאנול בתהליך התסיסה.

ה. שמרים כתוסף מזון וכמקור להפקת מוצרים תוך-תאיים

קצב גידול מהיר, תכולה גבוהה של חלבון, ויטמינים וחומצות גרעין, ייצור חומרי טעם וריח ייחודיים ויכולת לנצל חומרים אורגניים בעלי עלות נמוכה, כל אלה הן תכונות המכשירות את השמרים לשמש כתוסף מזון וכמרכיב מזון לבעלי-חיים ולבני-אדם וכמקור להפקת תוצרים תוך-תאיים שונים.
השמרים המשמשים בתחום זה משווקים בעיקר כשמרים יבשים בלתי-פעילים, ושייכים לשלושה מינים עיקריים (ראה טבלה 2-1): *S. cerevisiae*, *C. utilis* ו-*K. fragilis*.

התוצרים המסחריים הראשונים בתחום זה כוונו ליצירת ביומסה, המשמשת כתוסף מזון עתיר-חלבון (המכונה גם "חלבון מחד-תאיים" - SCP) להזנת בעלי-חיים כגון עופות ובקר. מאחר שמרכיב חומרי הגלם (בעיקר מקור הפחמן) הוא מרכיב עיקרי בעלות הייצור של ביומסה מיקרוביאלית, התמקדו רוב המאמצים בפיתוח טכנולוגיה של תהליכים לייצור חלבון מחד-תאיים תוך ניצול תוצרי לוואי ופסולת של תעשיית הדלק והפטרוכימיה, תעשיית הנייר ותעשיות מזון שונות. השימוש בשמרים כתוסף מזון מוגבל על-ידי דרישות איכות, שקובעות רשויות ממשלתיות בתחומי הבריאות. דרישות האיכות הן חמורות במיוחד עבור תוספי מזון המיועדים לבני-אדם.

תכונות כגון צבע, טעם, ריח, נטייה ליצור צברים, וכיו"ב, אינן מוגדרות בדרישות הרשמיות, אולם הן בעלות חשיבות רבה לתעשייה וגם הן משפיעות השפעה רבה על שילובם של השמרים ותוצריהם במוצרי מזון.

שמרים משמשים כתוספי מזון כתאים שלמים או כתמצית שמרים, כאשר בדרך-כלל תאי שמרים יבשים מהווים מרכיב תזונתי, המיועד להשלמה ולהעשרה של תפריט התזונה (בעיקר בחלבונים וויטמינים). ואילו תמציות השמרים משמשות כחומרי טעם וריח, המיועדים לתיבול המזון, להקנית טעם וריח בשרי (שמקורו בתכולה גבוהה של גלוטמט) למרקים, לרטבים, לירקות, לחטיפים, לנקניקיות, למזון לחיות-בית, וכתחליף זול לתמציות בשר במוצרים נוספים.

תוצרים תוך-תאיים רבים מופקים משמרים באופן מסחרי ומשמשים למטרות מחקר אנליטי וביוכימי, בתעשית מזון ומשקאות, בתהליכי תסיסה וביישומים רפואיים. תוצרים אלה כוללים אנזימים, קואנזימים (כגון CoA ו-NAD), חלבונים, חומצות גרעין, חומצות אמיניות, בסיסים פוריניים ופירימידיניים, ויטמינים ועוד.

בין המרכיבים המיוצרים בכמויות גדולות במיוחד בולטים שני האנזימים אינברטאז ולקטאז וחומצת הגרעין - רנ"א, המיועדים לשימוש בעיקר בתעשיית המזון.

* **אינברטאז**, המזרז את פירוקו של הדו-סוכר סוכרוז למרכיביו (פרוקטוז וגלוקוז), מיוצר בעיקר משמרי אפייה בשתי צורות מסחריות: כשמרים יבשים מועשרים באינברטאז, המשמשים ליצירת מולסות מקנה סוכר, וכתמיסה נוזלית מרוכזת שהופקה משמרי אפייה ומשמשת בתעשיית הממתקים.

* **לקטאז**, מזרז את פירוקו של הדו-סוכר לקטוז למרכיביו (גלוקוז וגלקטוז), מופק בעיקר מהשמר S. lactis ומשווק מסחרית כאבקה לבנה, המשמשת לשינוי התכונות הכימיות והפיסיקליות של חלב, מוצרי חלב ומי-גבינה.

* **רנ"א (RNA)** מופק מתאים יבשים של גזעי C. utilis מסוימים, המאופיינים בתכולה גבוהה יחסית של רנ"א (10%-15%) ובתכולה נמוכה של דנ"א. אבקת רנ"א גולמית עוברת היפוך אנזימטי לחומרי טעם וריח ייחודיים, המשמשים בתעשיית המזון.

* **גליקן** הוא תוצר נוסף המיוצר משמרים ונפוץ לשימוש בתעשיית המזון. הגליקן בנוי מהחומר הבלתי-מסיס (בעיקר הדפנות) של תאי השמרים. לאחר פתיחה מכנית של התאים, מופרד החומר הבלתי-מסיס ועובר כתישה, שטיפה, פסטור וייבוש, עד שהוא הופך למשחה לבנה, המורכבת בעיקר מפחמימות (לפחות 85% משקלי מחומר יבש) ומשמשת כחומר מתחלב, מייצב או מסמיך במערכות מזון נוזליות, כגון רטבים, קרמים וממרחים.

2.2 ייצור אנזימים מיקרוביאליים

2.2.1 מבוא כללי

האנזימים מופקים משלושה מקורות עיקריים: צמחים, בעלי-חיים ומיקרואורגניזמים. הייצור של אנזימים מיקרוביאליים בתהליכי תסיסה יש לו עדיפות מובהקת, הן מבחינת המגוון הרב של אנזימים ממקור זה והן מבחינת האפשרות להפקתם בתעשייה בקנה-מידה גדול. יתר-על-כן שיטות ההנדסה הגנטית פתחו אפשרויות חדשות לייצר אנזימים ממקורות של צמחים ובעלי-חיים על-ידי ביטויים במיקרואורגניזמים וייצורם בתהליכי תסיסה.

האנזימים משמשים כקטליזטורים בשלוש רמות הפעלה עיקריות:

א. אנזים בודד המבצע תהליך חד-שלבי ללא חומרי עזר.
ב. אנזים הדורש לפעילותו נוכחות של קופקטור ושחזורו.
ג. אנזים הפועל כשלב במסגרת פעולתן של מערכות רב-שלביות.

אופן הפעלתם של האנזימים והשימוש בהם תלויים ברמת ההפעלה ובמחיר האנזימים. כך, לדוגמה, אנזים "פשוט", המבצע פעולה ללא צורך בגורמי עזר, משמש לעיבוד מזון פשוט, על-ידי הוספתו למזון וביצוע השריה לתקופה מתאימה. אנזים "מתוחכם" יותר ויקר יותר דורש אופן הפעלה, אשר יאפשר ניצול מירבי ובמידת האפשר שימוש רב-פעמי בו. אנזימים הפועלים במסגרת שרשרת תגובות יופעלו מתוך סביבתם הטבעית, דהיינו מתוך התא השלם, ללא הפרדה וניקוי.

בטבע ניתן לאתר מגוון רב של אנזימים בעלי פעילות ביולוגית דומה. בחירת האנזים המתאים ביותר לשימוש בתהליך תעשייתי מסוים נעשית תוך בחינת השיקולים האלה:

* **דרגת הספציפיות** - באנזימים בעלי פעילות דומה מבחינים בהבדלים גדולים מאוד במידת הספציפיות שלהם לסובסטרט: חלקם מאופיינים בטווח פעולה רחב ומסוגלים לפעול על מגוון רב של סובסטרטים דומים, וחלקם - ספציפיים מאוד ופועלים על סובסטרט יחיד או על מספר מצומצם של סובסטרטים.

* **המאפיינים הקינטיים של האנזים (Vmax-ו Km)** - אלה קובעים את עוצמת הפעילות האנזימטית, כלומר את מספר מולקולות הסובסטרט ההופכות לתוצר ביחידת זמן על-ידי מולקולת אנזים אחת.

* **פעילות ספציפית** - מבטאת את מידת הניקיון והיעילות של תוצר אנזימטי: כמה יחידות פעילות כלולות ביחידת מסה של אנזים.

* **יציבות תפעולית ואחסונית** - אנזימים בעלי פעילות דומה עשויים להיות שונים מאוד בעמידותם לאחסון ולשימוש בתנאי סביבה שונים.

* **טמפרטורה ו-pH אופטימליים** - לרוב האנזימים תחום מוגדר של ערכי pH וטמפרטורה, אשר סטייה ניכרת מהם עלולה לגרום לאינאקטיבציה של האנזים. בתחום זה מושגת פעילות אנזימטית מירבית.

* **קיום אמצעי בקרה ביוכימיים** - אמצעים אלה מאפשרים ויסות של הפעילות האנזימטית או עצירתה על-ידי הפעלה או עיכוב באמצעות חומרים ספציפיים.

* **קיומן של שיטות אנליטיות** - לקיומן וזמינותן של שיטות אנליטיות נוחות למעקב אחר רמת הפעילות לפני התהליך ובמהלך התהליך חשיבות רבה. שיטות אלו משמשות גם לבדיקה שגרתית של מלאי האנזים באחסון.

* **עלות האנזים** - תלויה בעיקר בתהליך הפקתו בדרגת הנקיון הנדרשת. באופן כללי, עלות הפקתם של אנזימים תוך-תאיים גבוהה במידה ניכרת מזו של אנזימים חוץ-תאיים, כאשר העלות גדלה ככל שדרגת הנקיון הנדרשת גבוהה יותר.

* **זמינות האנזים** - קיימת עדיפות לאנזימים אשר אספקתם בהיקף מסחרי שוטפת ואיכותם ורמת פעילותם קבועות.

* **קיומו של מידע טכני על האנזים** - מידע על מידת בטיחותו לשימוש מסחרי, מפרטים על אופן ההכנה שלו והשימוש בו - לשם הפעלתו היעילה, מידע על תנאי אחסון, וכיו"ב.

2.2.2 סוגי האנזימים המיוצרים בתעשייה ושימושיהם המסחריים

מתוך אלפים רבים של אנזימים הקיימים בטבע בודדו ואופיינו עד היום כ- 5,000-4,000, ורק כ-15% מביניהם ניתנים לרכישה מחברות מסחריות. מבין כ-750 האנזימים הניתנים לרכישה מסחרית, רק כ-20 מיוצרים בקנה-מידה גדול (בכמויות של טונות רבות לשנה) ומיועדים לשימוש תעשייתי בהיקף גדול. שוק זה נשלט על-ידי מספר מצומצם של חברות בינלאומיות, כאשר היקף השוק העולמי השנתי של אנזימים לתעשייה נאמד בכ- 500-600 מיליון דולר.

הרוב הבולט של אנזימים המשמשים בתעשייה הם ***אנזימים חוץ-תאיים*** ממקור מיקרוביאלי (פטריות, חיידקים או שמרים), המופעלים בדרך-כלל באופן חד-פעמי כתכשיר גולמי של אנזים בודד ברמת ניקיון נמוכה, המבצע תהליך חד-שלבי. רוב האנזימים הללו (יותר מ-80%) הם אנזימים הידרוליטיים (ראה איור 2-11 בעמוד הבא), המשמשים בעיקר לפירוק של ביופולימרים בתעשיית המזון והטקסטיל (ראה טבלה 2-3 בהמשך) וכוללים בעיקר:

* **פרוטאזות** - מפרקות חלבונים לפפטידים קצרים וחומצות אמיניות, ומשמשות להגבנת חלב בתעשיית הגבינה, לריכוך בשר, להרחקת שאריות מעורות מעובדים וכתוסף חשוב לאבקות כביסה "ביו", להסרת כתמים שמקורם בחלבון (כגון כתמי דם וביצה).

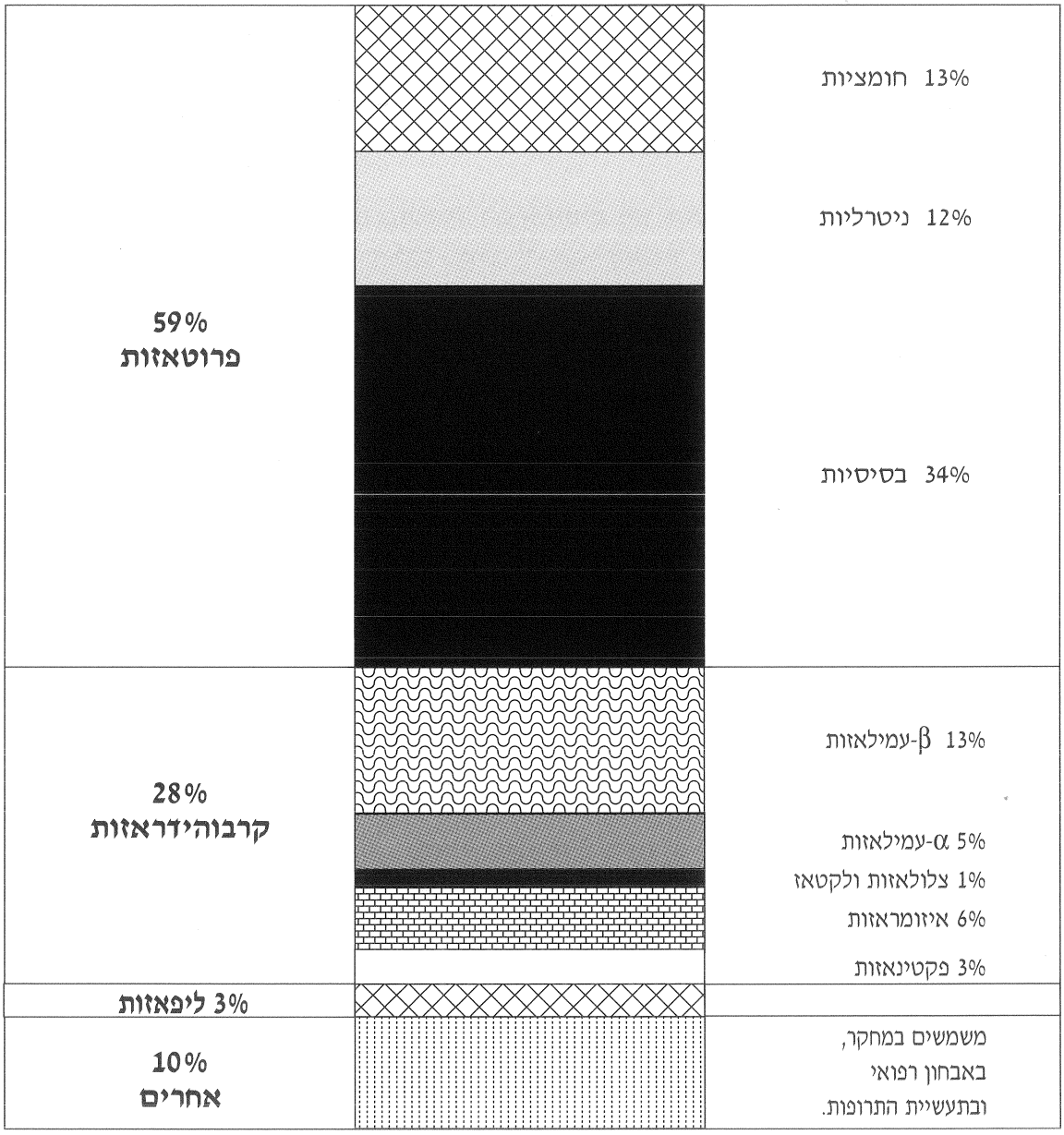
* **קרבוהידראזות** - פועלות על סוכרים וכוללות בעיקר: ***עמילאזות*** המפרקות עמילן ומשמשות בתהליכים כגון אפייה, בישול בירה, ייצור אתאנול והורדת דבק עמילני מבדים, ***פקטינאזות*** המשמשות להצללת מיצי פירות, ו***איזומראזות*** - בעיקר גלוקוז-איזומראז המשמש להיפוך של גלוקוז לפרוקטוז, בתעשיית המשקאות הקלים ודברי מתיקה.

* **ליפאזות** - המפרקות שומנים לחומצות שומן ומרכיבים נוספים ומשמשות בתעשיית הגבינה, בייצור תוספי מזון לאדם ולהזנת חיות, וכתוסף לאבקות כביסה "ביו" המיועדות לכיבוס בדי כותנה ופשתן.

האנזימים המיקרוביאליים המסחריים העיקריים מיוצרים על-ידי מספר מועט יחסית של מיקרואורגניזמים: כ-11 סוגי פטריות, 8 סוגי חיידקים ו-4 סוגי שמרים, כשהעיקריים שבהם הם:

1. מינים שונים של העובש Aspergillus,
2. החיידקים Bacillus ו-Streptomyces
3. השמרים Candida ו-Saccharomyces.

איור 2-11 שלהלן מתאר את ההתפלגות של האנזימים המשמשים בתעשייה לפי סוג הפעילות שלהם.



איור 2-11

התפלגות - לפי סוג הפעילות - של אנזימים ממיקרואורגניזמים המשמשים כמכשיר ביוטכנולוגי בתעשייה

טבלה 3-2 שלהלן מפרטת את השימושים התעשייתיים של אנזימים מיקרוביאליים מסחריים.

טבלה 3-2

דוגמאות לשימושים התעשייתיים של אנזימים מיקרוביאליים מסחריים

תעשייה	אנזים	שימוש
אפייה	α-עמילאז פטרייתי פרוטאז פטרייתי	שיפור כללי. עיבוד הבצק.
בירה	α-עמילאז חיידקי פרוטאז חיידקי עמילוגלוקוזידאז פטרייתי β-גלוקנאז	לשימוש בשעורה לא-מונבטת ובפירוק של תוספים עמילניים. הרחקת דקסטרנים מתירוש או המתקת בירה. הפחתת הצמיגות של תירוש או של בירה.
סירופים	α-עמילאז חיידקי עמילוגלוקוזידאז פטרייתי אינברטאז גלוקוזאיזומראז	פירוק עמילן בטמפרטורות גבוהות. פירוק עמילן לגלוקוז. סוכרוז ← גלוקוז ופרוקטוז גלוקוז ← פרוקטוז
גבינה	פניצילינאז	הרחקת אנטיביוטיקות ממשפחת הפניצילינים מהחלב אם קיימות.
גלידה	לקטאז	הרחקת לקטוז שעלול להתגבש ולשקוע.
פירות	פקטינאז	הצללת מיצי פירות.
ירקות	צלולאזות	ריכוך ושיפור הטעם.
ביצים	גלוקוז אוקסידאז ליפאזות	הרחקת הגלוקוז לפני הייבוש. שיפור תכונות ההקצפה של חלבון הביצה.
טקסטיל	α-עמילאז חיידקי	הורדת דבק עמילני מבדים.
כביסה	פרוטאזות מחיידקים	הסרת כתמי חלבון.
רפואה	שונים	פיתוח ערכות אבחון.

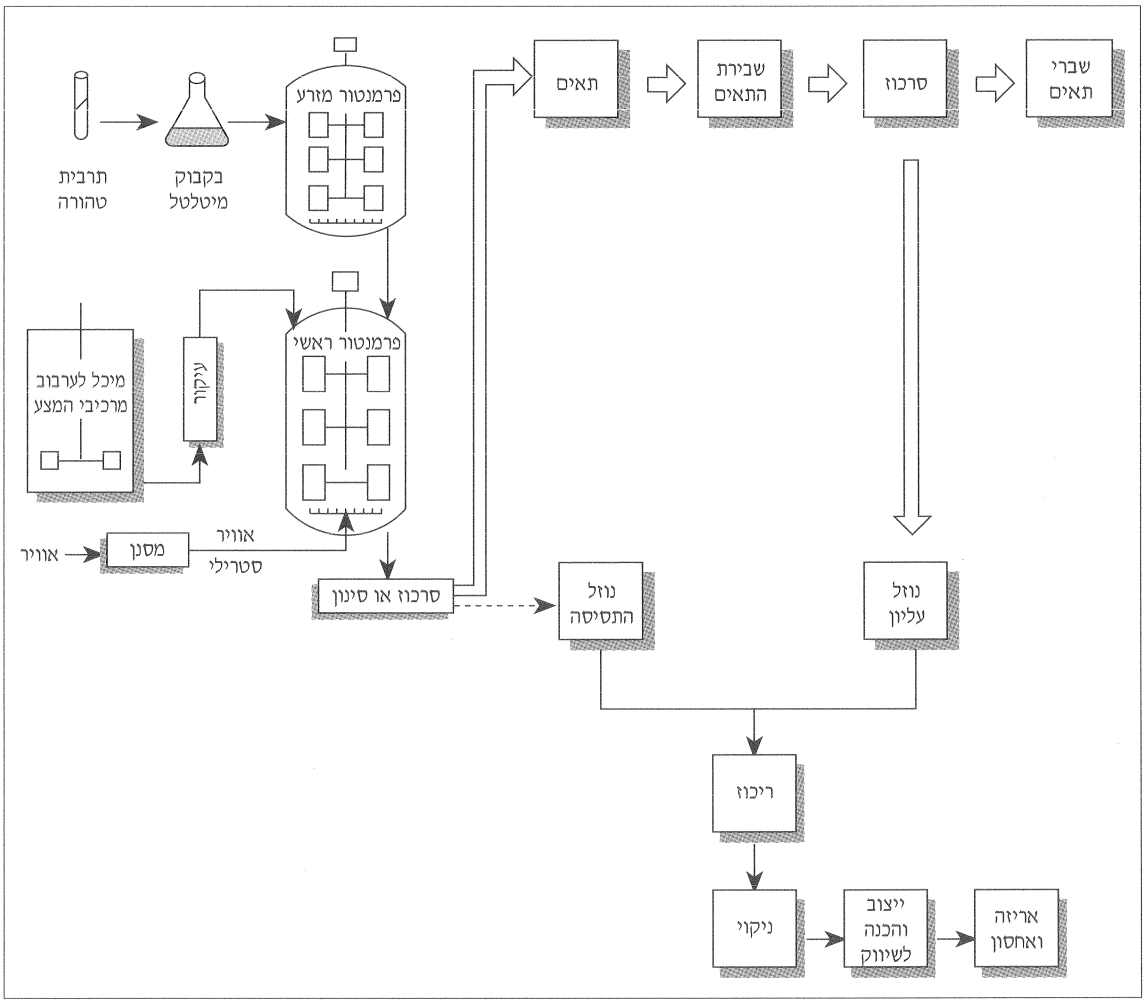
2.2.3 ייצור והפקה של אנזימים בתהליכי תסיסה

ייצור מסחרי של אנזים מיקרוביאלי בתהליך תסיסה חייב לעמוד בדרישות הבאות:

1. על המיקרואורגניזם המייצר להיות בעל קצב גידול מהיר במצע זול יחסית ובתנאים נוחים.
2. על המיקרואורגניזם לייצר את האנזים המבוקש ברמה גבוהה של ביטוי, ריכוז וניצולת.
3. הפקת האנזים אפשרית מבחינה טכנית בתהליך פשוט יחסית ולא יקר.
4. תהליך הייצור והתוצר (האנזים) אינם מהווים סיכון לאדם (הן ליצרן והן למשתמש).

כדי להשיג תפוקה מירבית של אנזים מבוקש, משתמשים בתהליכי הייצור בגזעים מיקרוביאליים נבחרים (יצרני-יתר - ראה פרק 1) בשילוב עם אופטימיזציה של משתני התהליך, בעיקר הרכב המצע ותנאי הגידול.

איור 2-12 מתאר באופן כללי תהליך ייצור והפקה של אנזימים.



איור 2-12

תרשים זרימה כללי של תהליך ייצור והפקה של אנזימים חוץ-תאיים (⇠) ושל אנזימים תוך-תאיים (⇦).

הכנת המזרע לתהליך התסיסה מתחילה בגידול תרבית טהורה של גזע נבחר של מיקרואורגניזם בבקבוק מיטלטל. התרבית המתקבלת משמשת לזריעת פרמנטור מזרע, שבו מיוצרת תרבית המזרע העיקרית. תרבית זו משמשת לזריעת הפרמנטור הראשי, שבו מתרחש תהליך הייצור (ראה איור 12-2). תרבית המזרע מכילה בעת העברתה תאים השרויים בשלב הלוגריתמי (כדי לצמצם למינימום את תקופת ה-lag של הגידול בפרמנטור הראשי) ונפחה מהווה 2%-10% מהנפח הכולל של מצע הייצור.

רוב האנזימים המסחריים הם ***חוץ-תאיים***, כלומר מופרשים מהתאים למצע במהלך התסיסה, בעיקר במהלך השלב הסטציונרי של הגידול. אנזימים ***תוך-תאיים*** בעלי ערך תעשייתי (כגון גלוקוז איזומראז, גלוקוז אוקסידאז, לקטאז, אינברטאז וקטלאז) מיוצרים ונאגרים בתא בעיקר במהלך השלב הלוגריתמי. תהליך הייצור של אנזימים תוך-תאיים ושל אנזימים חוץ-תאיים נבדל בעיקרו בשלב הפקת האנזים בגמר התסיסה (ראה איור 12-2).

התנאים האופטימליים (מבחינת הרכב המצע, הטמפרטורה, ה-pH וקצבי האוורור והערבול של המצע), לייצור תעשייתי של אנזימים, נקבעים באופן אמפירי עבור כל תהליך תסיסה בנפרד, כדי לאפשר גידול ראשוני טוב של התאים וייצור מירבי של האנזים המבוקש.

א. הרכב המצע

מצע אופייני המשמש לייצור אנזימים מכיל:

1) **פחמימות** - מהוות בדרך-כלל את מקור הפחמן והאנרגיה ונגזרות בעיקר מתוצרי לוואי של תעשיות מזון ועיבוד תוצרת חקלאית, כגון: מולסות, הידרוליזאט של עמילן תירס, זרעי דגניים (שעורה וחיטה), סלק, לקטוז, מוך של פרי-הדר ורסק תפוחים.
2) **מקורות חנקן מורכבים** - מהווים נוזלים עתירי חלבון מתהליך ייצור עמילן תירס, תמצית שמרים, תמצית בשר, מי-גבינה, פולי סויה טחונים, זרעי כותנה טחונים, חלבון בוטנים, ג'לטין, קזאין (חלבון המופרד מהחלב), וכיו"ב.
3) **מינרלים ופקטורי גידול** - מצויים ברובם בחומרי הגלם, המהווים את מקור הפחמן או החנקן. בדרך-כלל מוסיפים למצע גם מלחים, המהווים מקורות נוספים ומעשירים של חנקן, זרחן, גופרית, סידן, יסודות קורט, ואף פקטורי גידול עשירים כגון חומצות אמיניות חיוניות וויטמינים.
לאספקת יסודות הקורט חשיבות רבה בייצור של אנזימים, משום שהם מהווים בין היתר מרכיבים חשובים של קואנזימים (ראה פרק 1). מבין יסודות הקורט, הסידן הוא לרוב החיוני ביותר לקבלת פעילות גבוהה ויציבות טובה של אנזימים חוץ-תאיים רבים.

בנוסף למרכיבים אלה, במקרה של ייצור ***אנזימים אינדוקטיביים***, צריך לכלול במצע גם ***אינדיוסר*** מתאים להשראת הסינתזה של האנזים המבוקש. לעיתים קרובות מקורות הפחמן או תרכובות החנקן האורגניות, המצויים במצע, משמשים גם כאינדיוסר ומשרים יצירה של אנזימים, הדרושים לשם פירוקם בתהליכים קטבוליים. כך מלטוז משמש כאינדיוסר לייצור של מלטאז, עמילן - לייצור של עמילאז, וחלבונים - לייצור של פרוטאזות.

במקביל לאספקה של אינדיוסרים, צריך לדאוג לכך שהמצע לא יכיל ריכוז גבוה של חומרים, העלולים לעכב או לדכא את היצירה של אנזימים אינדוקטיביים, גם אם הם מזרזים את גידול התאים עצמם, ביניהם חומצות אמיניות ופפטידים קצרים המעכבים ייצור של פרוטאזות.

ב. טמפרטורה

במהלך התסיסה נשמרת טמפרטורה קבועה, שהיא הטמפרטורה האופטימלית לייצור האנזים. במקרים רבים של ייצור אנזימים חוץ-תאיים נצפתה עלייה בתפוקה, כאשר המיקרואורגניזם המייצר גודל דוקא בטמפרטורה נמוכה מזו הדרושה לגידול מירבי.

ג. pH

רוב האנזימים המיקרוביאליים החוץ-תאיים מיוצרים בתפוקה מירבית, כאשר המיקרואורגניזם גדל בתחום ערכי pH הקרוב לערך האופטימלי עבור הפעילות האנזימטית. אולם קיימים גם מקרים שבהם ה-pH של הגידול, הנחוץ עבור תפוקה מירבית של אנזים, שונה משמעותית מה-pH הדרוש לפעילות מירבית של האנזים המבוקש.

ד. אוורור

רוב המיקרואורגניזמים המשמשים בייצור אנזימים הם ארוביים, כלומר, דורשים נוכחות של חמצן מולקולרי לשם הפקת אנרגיה בתהליכים הקטבוליים. אספקת החמצן לתאים מתבצעת באמצעות אוורור המצע, על-ידי הזרמת אוויר סטרילי לפרמנטור ופיזורו במצע באמצעות הערבול (ראה איור 12-2). דרגת האוורור, הדרושה לשם ייצור מירבי של האנזים המבוקש, תלויה במיקרואורגניזם או בסוג האנזים: מיקרואורגניזמים מסוימים דורשים אוורור נמרץ מאוד, בעוד שייצור של אנזימים חוץ-תאיים אחרים מעוכב על-ידי אוורור נמרץ.

משך התסיסה נע בין 1-5 ימים והוא תלוי במיקרואורגניזם ובאנזים המיוצר. הפסקת תהליך התסיסה מתבססת על מספר שיקולים: כמות האנזים שנוצרה, מידת יציבותו, היווצרות אנזימי לוואי לא-רצויים, העלות היחסית של חומרי הגלם, עלות שלבי ההפקה ועוד. כך במקרים רבים התהליך מופסק עוד בטרם התקבל ייצור מקסימלי של האנזים הרצוי. מצב זה מתרחש במקרים שבהם האנזים אינו יציב ונפגע תוך זמן קצר יחסית לאחר שנוצר, או כאשר נוצרים אנזימי לוואי לא-רצויים, שכמותם מוגברת מאוד, כאשר קצב הייצור של אנזים המטרה כבר נחלש ומרבית תפוקתו כבר הושגה.

תפוקה טיפוסית של אנזים מסחרי בסיום תהליך התסיסה נעה בין 1% ל-5% ממסת החומר היבש של המצע ההתחלתי. כמות התאים המתקבלת נעה בין 2%-10% מן המצע. בגמר תהליך הייצור תערובת התסיסה הסופית מקוררת במהירות לטמפרטורה של כ-5°C, ומתבצעת הפרדה של התאים המיקרוביאליים ומוצקים מורחפים אחרים מנוזל התסיסה באמצעות סרכוז או סינון.

בחירת שיטת ההפרדה תלויה בסוג האנזים המיוצר ובסוג התאים המיקרוביאלי: להפקת אנזימים תוך-תאיים עדיף השימוש בסרכוז לשם קצירת התאים. בהפקת אנזימים חוץ-תאיים נהוג להפריד את תאי השמרים על-ידי סרכוז ואילו את תפטיר הפטריות הקוריות - על-ידי סינון. חיידקים, שהם קטנים משני אלה במידה ניכרת, מופרדים בדרך-כלל לאחר השראת תנאים שבהם הם מתאגדים ליצירת צברים, שניתן להרחיק על-ידי סרכוז. הסרכוז מתבצע בדרך כלל בקירור.

לאחר הפרדת התאים מהמצע הנוזלי, המשך תהליך הפקת האנזים תלוי בסוג האנזים המיוצר (ראה איור 12-2). במקרה של אנזימים חוץ-תאיים מופק האנזים מתוך הנוזל, כפי שיתואר בהמשך.

במקרה של אנזימים תוך-תאיים, נוזל התסיסה מורחק, הביומסה המיקרוביאלית מופרדת ונמהלת במים, המכילים בופר מתאים, לקבלת משחה דלילה.

ביישומים רבים, מופעל האנזים ישירות מתוך התאים, ללא שלב של ניקוי. חסרונו העיקרי של אופן שימוש זה נובע מנוכחות מגוון רב של אנזימים אחרים בתוך התא, העלולים לגרום לתגובות לוואי בלתי-רצויות. במקרים כאלה, הכרחי להפיק את האנזים מהתא ולנקותו.

הפקת האנזים המבוקש מהתאים מצריכה בשלב ראשון שבירת או פתיחת התאים באמצעים כימיים או באמצעים פיסיקליים שונים. השיטות המשמשות לפתיחת התאים בייצור מסחרי של אנזימים מסוכמות בטבלה 4-2, כולל פירוט עקרון הפעולה של כל שיטה, יתרונותיה וחסרונותיה. בייצור תעשייתי בקנה-מידה גדול קיימת עדיפות מובהקת לשימוש בשיטות הפיסיקליות.

טבלה 4-2

שיטות המשמשות לפתיחה של תאים מיקרוביאליים בייצור תעשייתי של אנזימים

	השיטה	עקרון הפעולה	יתרונות	חסרונות
שיטות פיזיקליות	טחינה מכנית	ערבוב מהיר עם חרוזי זכוכית	יעיל כנגד דפנות תאים חזקות. שימור טוב יחסית של הפעילות האנזימתית. השיטה מתאימה לייצור אנזימים בקנה מידה גדול.	הצורך בהרחקת חרוזי הזכוכית מהתאים השבורים.
	הפעלת כוחות גזירה במוצק	העברה בלחץ של חומר קפוא דרך פתח צר. שבירת התאים נגרמת על-ידי עיוות התא המשובץ בקרח.	מתקבלות תפוקות אנזים גבוהות. אחוז גבוה של התאים נפתח.	היעדר ציוד מסחרי זמין לעבודה בקנה-מידה גדול. הצורך בהקפאה של התאים לפני השבירה.
	הפעלת כוחות גזירה בנוזל	העברה בלחץ גבוה של תרחיף התאים דרך פתח מוגבל.	יעיל עבור חיידקים ובמידה פחותה עבור תאי פטריה. שיטה מאוד נפוצה לשימוש ומתאימה לייצור אנזימים בקנה-מידה גדול.	היווצרות של חום. העברה בודדת לרוב לא מספיקה. גודל חלקיקים לא-אחיד (חוטים או גושים) מפחית את יעילות שבירת התאים.
שיטות כימיות	טיפול אנזימטי	עיכול אנזימטי של דפנות התאים על-ידי ליזוזים מביצה. בהיעדר דפנות תאים חזקות, הפרוטופלסט או הספרופלסט שנוצר עובר ליזיס, בשל הלחץ האוסמוטי הגבוה בתוך התא.	שיטה עדינה וברורנית.	חשש להרס אפשרי של האנזים על-ידי פרוטאזות של התא. שיטה יקרה. האנזימים מתערבבים עם תכולת התא הכללית שהשתחררה, דבר שמסבך את תהליך הניקוי.
	טיפול בדטרגנט	המסת קרום התא באמצעות דטרגנטים.	שיטה עדינה יחסית ונוחה לביצוע.	חשש לאינאקטיבציה של האנזים. עקב נוכחות של הדטרגנטים. שאריות של הדטרגנטים מקשות על המשך הניקוי.
	שוק אוסמוטי	שינוי מהיר בריכוז מלח.	משתחררות רק כמויות קטנות של חלבונים מסיסים, דבר שמקל על הניקוי בהמשך.	דפנות תאים חזקות פחות רגישות לשיטה זו.

לאחר שבירת התאים והרחקת חומצות גרעין ושברי תאים על-ידי סרכוז, ניגשים לשלב ההפקה והניקוי של האנזים מהנוזל העליון. הבחירה של שיטת ההפקה תלויה בדרגת הנקיון הנדרשת של התוצר הסופי, הנקבעת לפי השימוש המסחרי המיועד של האנזים, כאשר לשימושים אנליטיים או פרמצבטיים נדרשת דרגת נקיון גבוהה במיוחד.

מן הראוי לציין כי כדי לקבל תוצר סופי פעיל, על תהליך ההפקה של אנזימים להתבצע בתנאים מבוקרים, כלומר בטווח ערכי pH ובטמפרטורות נוחים לאנזים ובהיעדר כימיקלים העלולים לגרום לדנטורציה של האנזים.

באופן כללי, לתהליך הפקה כזה של אנזים שני שלבים עיקריים: שלב ריכוז ושלב ניקוי.

שלב הריכוז:

הריכוז פירושו הקטנת נפח התמיסה המימית, שבה מומס האנזים, על-ידי הרחקת חלק מהמים. הריכוז מתבצע בדרך-כלל באחת מהשיטות הבאות (או בשילוב שלהן): נידוף בואקום, אולטרפילטרציה ואוסמוזה הפוכה.

* **נידוף בואקום** מתבצע בטמפרטורה נמוכה מ-40°C, כדי לצמצם סיכוני דנטורציה על-ידי חום, תוך שמירת טווח ערכי ה-pH בעזרת בופר מתאים. החסרון העיקרי של גישה זו הוא העלייה בריכוז של מומסים אחרים בתמיסה (כגון מלחים) במקביל לעלייה בריכוז של האנזים, העלולים לגרום לדנטורציה של האנזים.
* **אולטרפילטרציה ואוסמוזה הפוכה** מבוססות על העברה בלחץ של התמיסה דרך ממברנה חדירה למחצה בעלת גודל נקבים קטן מאוד, המאפשר מעבר של מים ומלחים (אולטרפילטרציה) או של מים בלבד (אוסמוזה הפוכה) ומונע מעבר של חלבונים ומומסים גדולים אחרים. שיטות אלו נפוצות לשימוש בהפקת אנזימים בקנה-מידה גדול, כאשר מעדיפים את האולטרפילטרציה, בגלל השילוב של הרחקת עודף המים יחד עם מלחים, דבר המסייע לשמור על יציבות האנזים.

שלב הניקוי:

תמיסת האנזים המרוכזת עשויה לשמש כמות שהיא בחלק מן היישומים התעשייתיים. לקבלת אנזים בדרגת נקיון גבוהה יותר, נדרש תהליך של ניקוי, כלומר הפרדת האנזים מביוכימיקלים אחרים המצויים בתמיסה. הניקוי מתבצע בעזרת השיטות המשמשות באופן כללי להפרדה של חלבונים על-פי תכונותיהם הכימיות, הפיסיקליות או הביולוגיות, ביניהן ניתן למנות: שיקוע, אלקטרופורזה, כרומטוגרפיה על-פני מחליפי יונים, כרומטוגרפיית זיקה, כרומטוגרפיית סינון בג'ל, דיאליזה ואולטרפילטרציה.

מספרם וטיבם של השלבים בתהליך הניקוי תלויים במקור של האנזים, בתכונותיו הספציפיות של האנזים ובדרגת הנקיון הנדרשת. לעיתים קרובות נדרש שילוב של מספר שיטות הפרדה שונות ברצף מסוים, או חזרה על אותם שלבי ניקוי מספר פעמים, עד שמתקבל תוצר בדרגת הנקיון הרצויה. מובן כי עקב כך תהליך ההפקה והניקוי של אנזימים תוך-תאיים מורכב ויקר יותר ביחס להפקתם של אנזימים חוץ-תאיים.

בגמר הניקוי מוסיפים לעיתים לתכשיר האנזימטי שהתקבל חומרים מייצבים, כגון סוכרים ומלחים אנאורגניים, התורמים ליציבות האחסונית של התוצר במהלך האחסון והשיווק.

אנזימים מסחריים זמינים במספר דרגות של ניקיון סופי ומשווקים כתוצר סופי בצורת אבקה יבשה או תמיסה נוזלית, כאשר בדרך-כלל התוצר היבש יציב יותר ורגיש פחות לזיהום מיקרוביאלי. בשני המקרים שמירה בתנאי קירור מאפשרת אחסון של התוצר לזמן ממושך יותר ללא פגיעה ביציבות האנזים: בטמפרטורת החדר (מקסימום 25°C) נשמר תוצר יבש למשך שישה חודשים בעוד תוצר נוזלי ניתן לשמירה למשך שלושה חודשים בלבד. בקירור ל-4°C נשמר התוצר היבש למשך כשנה והתוצר הנוזלי שישה חודשים.

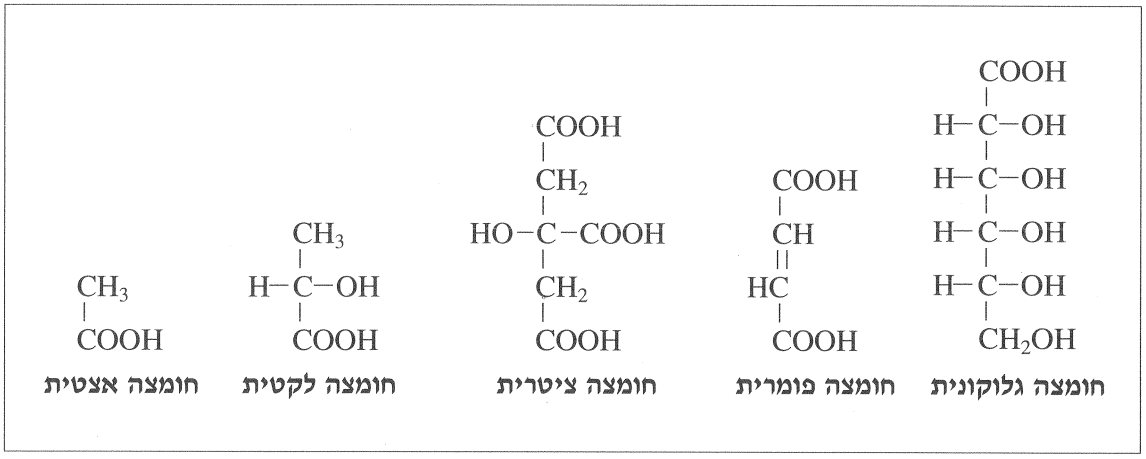
תכשיר אנזימטי גולמי-תעשייתי טיפוסי מכיל אנזים פעיל בשיעור של 2%-5% בלבד ממשקלו היבש. את השאר מהווים חומצות אמינו וחלבונים אחרים (10%-15%), פחמימות מורכבות (5%-12%), חומרים מייצבים כגון סוכרים פשוטים (2%-40%), מלחים אנאורגניים (3%-40%) וחומרים משמרים (0%-0.3%). ברוב היישומים מוסף התכשיר האנזימטי לתהליך בכמות קטנה יחסית, כ- 0.1%-0.5% מהמסה היבשה של הסובסטרט עליו הוא פועל, ולכן ההשפעה של מרכיבי הלוואי שבתכשיר על התהליך היא זניחה.

2.3 ייצור חומצות אורגניות

2.3.1 רקע כללי

ייצור חומצות אורגניות על-ידי מיקרואורגניזמים בתהליכי תסיסה הינו אחד הענפים המרכזיים בתחום זה. עם קבוצה זו נמנות חומצות אורגניות, המהוות תוצרי ביניים של מעגל קרבס (כגון חומצה ציטרית, חומצה פומרית וחומצה מלית או נגזרותיהן), חומצות אורגניות הנוצרות ישירות מגלוקוז (כגון חומצה גלוקונית) וחומצות אורגניות הנוצרות מפירובט או מאתאנול ומהוות תוצר סופי של מסלול קטבולי (כגון חומצה לקטית וחומצה אצטית). לחומצות אלה תחום שימושים נרחב, בעיקר כתוסף מזון (הן לבני-אדם והן לבעלי-חיים) וככימיקל לתעשייה.

באיור 2-13 מתוארות נוסחאות מבנה של החומצות האורגניות העיקריות המיוצרות בתהליכי תסיסה.



איור 2-13

נוסחאות מבנה של החומצות האורגניות העיקריות המיוצרות בתהליכי תסיסה

חלק מהחומצות האורגניות, כגון חומצת החומץ (חומצה אצטית), ניתן לייצר באמצעות סינתזה כימית כחלופה לתהליכי תסיסה מיקרוביאליים. למרות זאת במקרים רבים תהליך התסיסה יעיל יותר ומוצריו שולטים בשוק.

כדוגמה מייצגת לתהליכי תסיסה אלה נתאר להלן את תהליך הייצור של החומצה הציטרית (חומצת לימון בשמה העממי), המיוצרת כמעט בלעדית בתהליכי תסיסה.

2.3.2 ייצור חומצה ציטרית (חומצת לימון)

חומצה ציטרית מצויה בטבע בפירות ובזרעים של צמחים שונים. בעבר הופקה בעיקר מפרי הדר. ב-1922 כ-90% מהתצרוכת העולמית של חומצה ציטרית סופקה על-ידי בידודה והפקתה מלימונים ומכאן נגזר שמה העממי - חומצת לימון. ב-1923 החלו לראשונה לייצר חומצה ציטרית בתהליכי תסיסה באמצעות מיקרואורגניזמים. מאז ייצור זה נמצא במגמת עלייה ביחס להפקת החומצה ממקורות טבעיים, וכיום 99% מהתפוקה העולמית של חומצה ציטרית מיוצרים בתהליכי תסיסה, בהיקף של כ-350,000 טון בשנה.

חומצה זו משמשת בתחומים רבים, כאשר המגוון וההיקף של השימושים בה הולכים ומתרחבים בשנים האחרונות. בשל היותה בלתי-רעילה, נוחה לעיכול וטעימה, השימוש העיקרי בה (כ-60% מהתפוקה הכללית) נעשה בתעשיות המזון - כחומר משמר או כתוספת חומר טעם במזון, כגון חומרי מתיקה (סוכריות, גלידות, מרמלדות ועוד) ומשקאות קלים (בעיקר מיצי פירות ותמצית מיצי פירות).

כ-10% מהתפוקה הכללית של חומצה ציטרית משמשים בתעשיית הפרמצבטיקה - כמרכיב מונע קרישת דם, כמרכיב משמר ומסייע להרחפה בכמוסות ובמשחות שונות, וכמרכיב בופר המווסת pH בתכשירים רפואיים וקוסמטיים. השאר, כ-30% מהתפוקה הכללית, מופנים לשימושים תעשייתיים שונים, כגון קשירת יוני מתכות, טיפולי שטח במתכות, טיפול בבדים, מרכיב בחומרי צילום, בחומרי הרחפה, בחומרים מרככים, בחומרים מונעי הקצפה, בחומרי ניקוי ועוד.

גזעים רבים של פטריות, חיידקים ושמרים מייצרים ומפרישים חומצה ציטרית כמטבוליט ראשוני - אחד מתוצרי הביניים של מעגל קרבס, במסגרת הקטבוליזם הטבעי של פחמימות או פחמימנים.

בייצור מסחרי של חומצה ציטרית משמשים כיום מוטנטים יצרני-יתר של העובש **Aspergillus niger**. מוטנטים אלה מצטיינים בייצור מוגבר של חומצה ציטרית יחד עם האפשרות לדכא ביעילות יצירה של תוצרי לוואי בלתי-רצויים (כגון חומצה אוקסאלית וחומצה איזוציטרית) על-ידי הכנסת שינויים ספציפיים בהרכב המצע (ראה בהמשך).

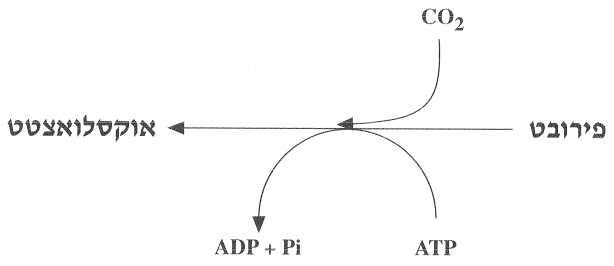
בתהליך יצירת חומצת הלימון מפורקים פחמימות (בעיקר סוכרוז), אצטט, חומצות שומן או פחמימנים, המשמשים כמקור פחמן ואנרגיה לתאים, ליחידות של אצטיל-CoA, המוסר את קבוצת האצטיל שלו למעגל קרבס, כמתואר באיור 14-2 בעמוד הבא.

החומצה הציטרית מיוצרת בשלב הראשון של המעגל על-ידי קישור האצטיל לאוקסלואצטט, תגובה המקוטלזת על-ידי האנזים ***ציטרט סינתטז***. הציטרט הנוצר הופך בתנאים רגילים לאיזוציטרט על-ידי האנזים ***אקוניטאז*** (המסומן * באיור 14-2), אנזים הדורש יוני Fe^{++} לשם פעילותו.

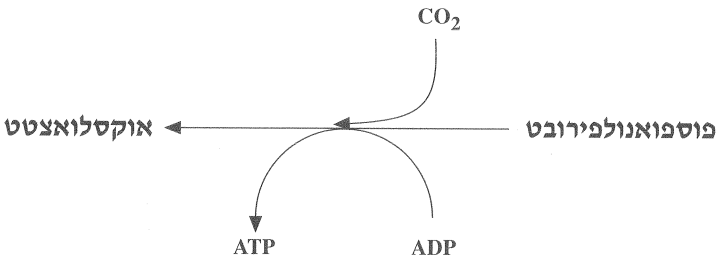
על-מנת שהתאים ייצרו ויפרישו כמות גדולה של ציטרט נדרש, על כן, לחסום את תהליך ההמשך לניצולו במעגל קרבס, דהיינו לדכא את פעילות האנזים אקוניטאז. דבר זה מתאפשר בקלות יחסית על-ידי הורדת ריכוז יוני הברזל הדו-ערכי במצע בשלב הייצור. כתוצאה מכך, במקביל להצטברות הרצויה של חומצה ציטרית, עלול לחול גם דלדול במלאי המולקולות האחרות המשתתפות במעגל קרבס.

המשך פעולה תקינה של המעגל בתנאים אלה מתאפשרת תודות לקיומם של ***תהליכים אנאפלורטיים*** משלימים (ראה איור 14-2). תהליכים אלה מאפשרים ייצור של תוצרי ביניים שונים, המתקבלים כרגיל במעגל קרבס בדרכים עוקפות מחומצות אמיניות או מתוצרי ביניים של המסלול הגליקוליטי. ואלה העיקריים שבהם:

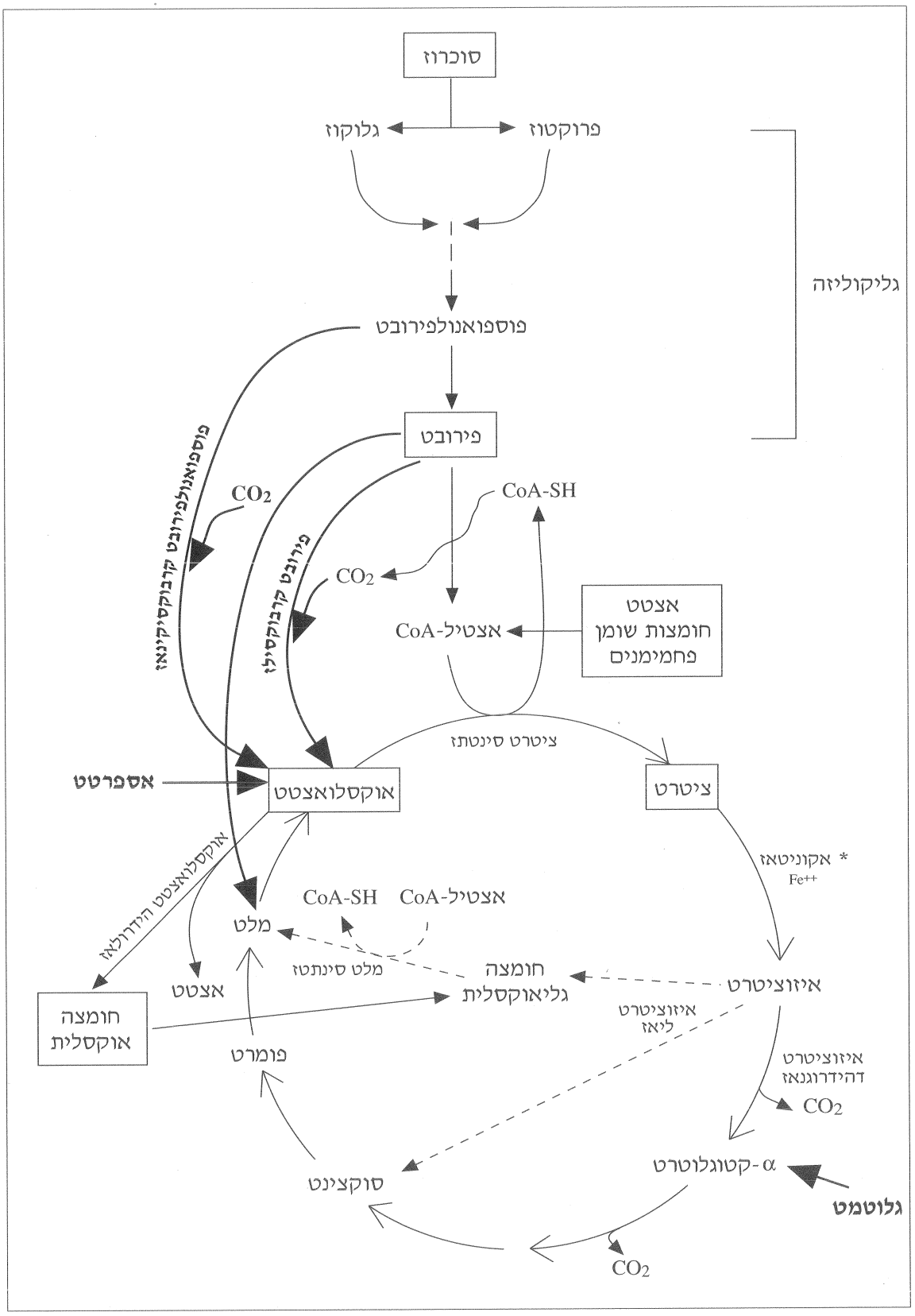
* ייצור אוקסלואצטט מפירובט על-ידי ***פירובט קרבוקסילאז***, הדורש יוני מגנזיום (Mg^{++}) ואשלגן (K^+) לשם פעילותו, כמתואר להלן:



* ייצור אוקסלואצטט מפוספואנולפירובט על-ידי ***פוספואנולפירובט קרבוקסיקינאז***, הדורש יוני מגנזיום (Mg^{++}) או מנגן (Mn^{++}) ואשלגן (K^+) או אמוניה (NH_4^+) לשם פעילותו, כמתואר להלן:



* ייצור של מלט מפירובט, של אוקסלואצטט מאספרטט ושל α-קטוגלוטרט מגלוטמט.



איור 2-14

תרשים זרימה של ייצור של חומצה ציטרית

(התהליכים האנאפלורטיים מודגשים וה"מעקף" של מעגל גליאוקסילאט מקווקו)

כאשר פחמימנים משמשים כחומר מוצא בלעדי לתהליך, מתרחשת, בנוסף למעגל קרבס, גם מודיפיקציה ספציפית שלו, המכונה ***מעגל גליאוקסילאט*** (ראה איור 2-14). במעגל זה עוקפים חלק מהמסלול של מעגל קרבס באמצעות שתי תגובות אנזימטיות אחרות, המתרחשות ברצף, ללא שחרור של CO_2: תחילה איזוציטרט מבוקע לסוקצינט ולחומצה גליאוקסלית על-ידי האנזים ***איזוציטרט ליאז***, ובשלב השני נקשרת החומצה הגליאוקסלית לשייר אצטיל, שמקורו באצטיל-CoA ליצירת מלט - תגובה המקוטלזת על-ידי ***מלט סינתטז***. מכאן כי אצטיל-CoA , הנגזר מתרכובות אליפטיות, מוסר את קבוצת האצטיל שלו למעגל בשני אתרים: לאוקסלואצטט ולגליאוקסילאט. מעגל גליאוקסילאט מיועד להגביר את הייצור של אוקסלואצטט בהיעדר יכולת לייצרו מפירובט, ולכן הוא מעוכב בנוכחות גלוקוז ומושרה בהיעדרו.

כפי שניתן לראות באיור 2-14 עשויה להיווצר כמות מסוימת של ***חומצה אוקסאלית*** כתוצר לוואי, במקביל ליצירה ולאגירה של החומצה הציטרית. מאחר שהחומצה האוקסאלית רעילה, צריך לצמצם את יצירתה במהלך התסיסה, ולנקוט באמצעים לסילוקה ולהפרדתה מן התוצר בסיום התסיסה.
הגבלת הייצור של חומצה אוקסאלית במהלך התסיסה נעשית על-ידי שילוב של מספר גורמים:

א. ריכוז נמוך של יוני ברזל במצע גורם לעיכוב של אקוניטאז, וכתוצאה מכך לירידה בריכוז של האוקסלואצטט, המהווה את חומר המוצא לייצור החומצה האוקסאלית (ראה איור 2-14).
ב. ה-pH ההתחלתי במצע (5) יורד מתחת ל-3 ב-48 השעות הראשונות של התסיסה, כתוצאה מתהליך הגידול. ערכי pH מתחת ל-3 מדכאים יצירה של חומצה אוקסאלית. מידת חומציות זו אף מקטינה ומצמצמת את הסיכון לזיהום מיקרוביאלי של המצע.
ג. טמפרטורה מתחת ל-33°C מדכאת אף היא את הייצור של חומצה אוקסאלית.

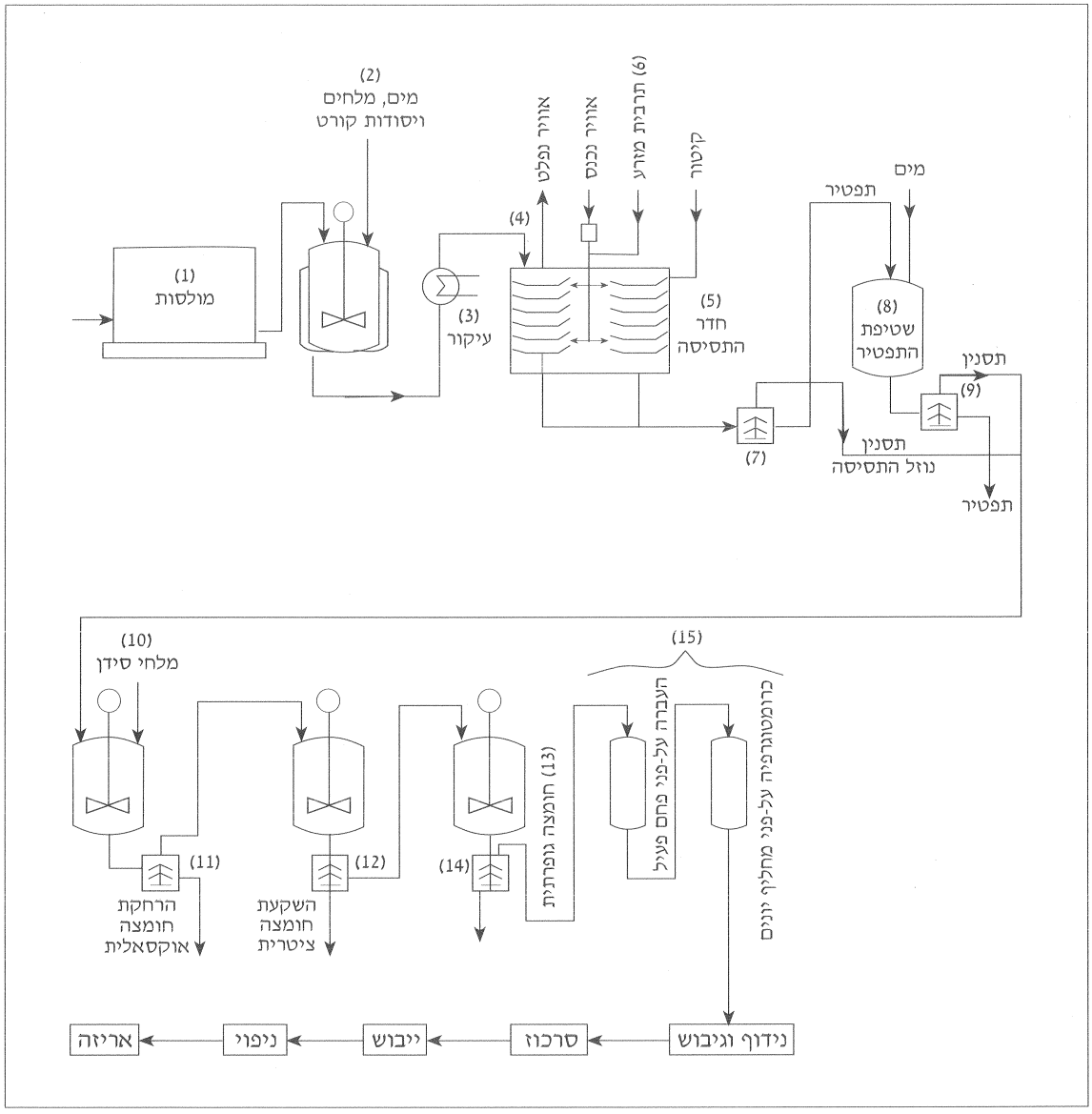
בייצור של חומצה ציטרית קיימת חשיבות רבה לריכוז מבוקר של יסודות הקורט במצע (בעיקר נחושת, מנגן, מגנזיום, ברזל ואבץ), היות שהם מהווים קופקטורים או מעכבים של אנזימים, הלוקחים חלק בתהליך הייצור. הוספתם למצע תלויה בכמותם בחומר הגלם שמשתמשים בו בתהליך.

ניתן לייצר את החומצה הציטרית במספר חלופות טכנולוגיות השייכות לשתי גישות עיקריות: ***תסיסת שטח*** המתבצעת בשכבה דקה על-פני משטחים של מצע נוזלי או מוצק, ***ותסיסת עומק*** המתבצעת במצע נוזלי מעורבל בפרמנטור.

תסיסת שטח

תסיסת שטח שימשה בעבר כצורה העיקרית לייצור חומצה ציטרית בתהליכי תסיסה. השימוש בה הלך והצטמצם וכיום הוא מהווה כ-20% בלבד מהייצור העולמי. הגישה מבוססת בעיקר על גידולה של הפטריה המייצרת על-פני משטחים של מצע מזון נוזלי, המצוי בתוך מגשים מיוחדים. תסיסת שטח כזו מתוארת באיור 2-15.

מצע המזון, המשמש בתהליך, מורכב בדרך-כלל ממולסות (1 באיור 2-15) בתוספת מים, מינרלים ויסודות קורט מסוימים (בעיקר סידן ואבץ) (2 באיור 2-15). המולסות, שמקורן בסלק סוכר, מספקות את הסוכרוז, המהווה מקור פחמן ואנרגיה בתהליך, וכן חומצות אמיניות, מינרלים וויטמינים. ה-pH ההתחלתי של המצע מווסת ל-5. מצע המזון עובר עיקור (3 באיור 2-15), ומוזרם בעזרת מערכת פיזור אוטומטית (4 באיור 2-15) למגשי הגידול שבחדר התסיסה (5 באיור 2-15).
כאינוקולום לתהליך משמשים הנבגים של הפטריה, והזריעה מתבצעת על-ידי הזרמה של נבגים יבשים באמצעות מערכת האוורור (6 באיור 2-15) או על-ידי התזה בריסוס של תרחיף נבגים נוזלי.

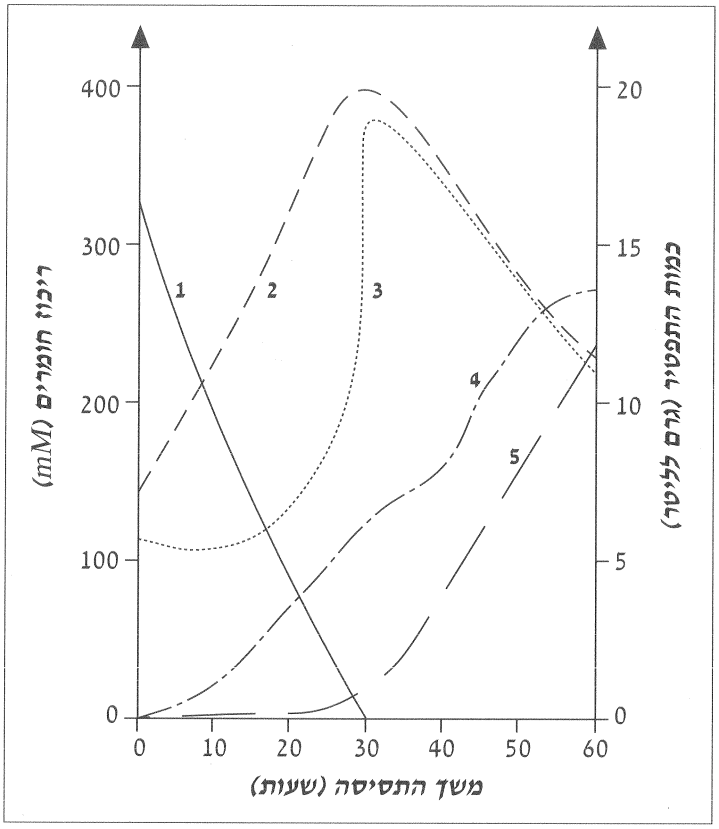


איור 2-15

תרשים זרימה של תהליך ייצור והפקה של חומצה ציטרית בתסיסת שטח

אוויר, המוזרם לחדר התסיסה, מספק את התנאים הארוביים הדרושים לתהליך, וכן מסייע לשמור על טמפרטורה קבועה (30°C) במהלך התסיסה באמצעות תהליך האידוי. בתוך 24 שעות מתחילת ההדגרה, נובטות הספורות, ויוצרות שכבת כיסוי דקה של תפטיר על-פני שטח הנוזל. התהליך נמשך בין 8 ל-14 ימים, ובמהלכו הולכת ומתעבה שכבת התפטיר שעל-פני המצע עד למצב של פקעת לבנה עבה הצפה על פני תמיסת המזון בסיום התהליך.

מהלך אופייני של תהליך התסיסה ב-60 השעות הראשונות מוצג באיור 2-16. לאחר שכל הדו-סוכר (סוכרוז) פורק ונוצרה כמחצית מהביומסה (30 שעות מתחילת התהליך), מתחיל ייצור מואץ של חומצה ציטרית, המלווה במקביל בירידת הריכוז של החד-סוכרים (גלוקוז ופרוקטוז).



איור 2-16

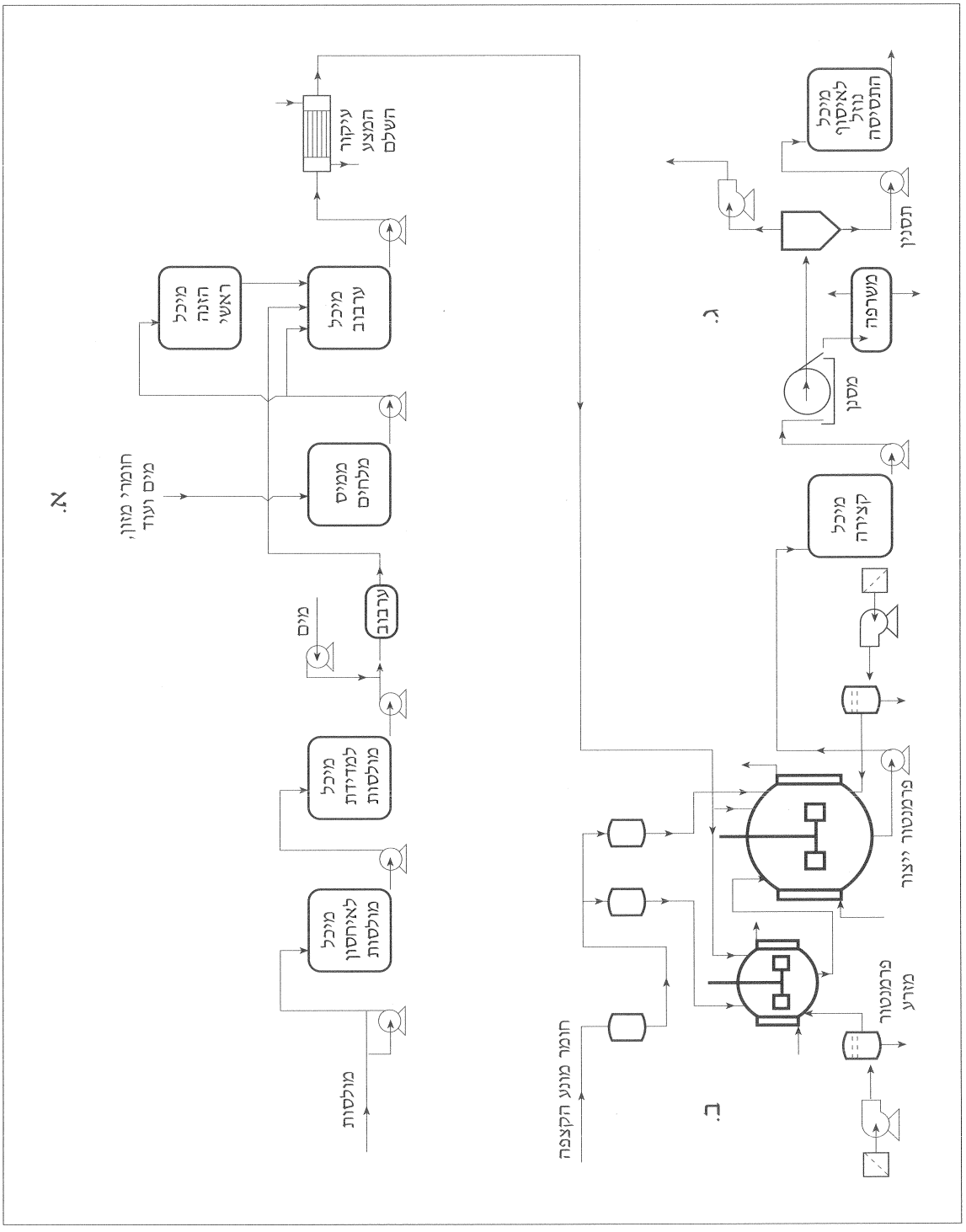
הקינטיקה של ייצור חומצה ציטרית בתהליך תסיסת שטח:

1 - סוכרוז; 2 - גלוקוז; 3 - פרוקטוז; 4 - תפטיר; 5 - חומצה ציטרית

בגמר תהליך התסיסה מרחיקים את התפטיר מנוזל התסיסה על-ידי סינון (7 באיור 2-15), שוטפים אותו במים (8 באיור 2-15) ומסננים שוב (9 באיור 2-15), לעיתים בליווי לחץ מכני (סחיטה), כדי להפיק את מירב החומצה הציטרית מהתאים. תהליך ההפקה של החומצה מן התסנין זהה הן לתהליך תסיסת שטח והן לתהליך תסיסת העומק, ונתארו בהמשך. תפוקה אופיינית של תהליך שטח, המנצל מצע מזון נוזלי, מגיעה ל- 1.5-1.0 ק"ג של חומצה ממוימת (המכילה מים ביחס מולרי של 1:1) לשטח של מטר מרובע של תפטיר פטריה.

תסיסת עומק

תסיסת עומק היא השיטה המקובלת ביותר כיום לייצור של חומצה ציטרית - כ-80% מהתפוקה העולמית של חומצה ציטרית מיוצרים בתסיסת עומק. תהליך זה מתבצע בפרמנטור רגיל, מהסוג שתיארנו בפרק 1. הפטריה גדלה ומייצרת חומצה ציטרית בנוזל כולו בתהליך מנתי, בדרך כלל בנפח עבודה גדול של כ- 120 מ"ק - 220 מ"ק. השלבים העיקריים של התהליך והתנאים לביצועו מוצגים באיור 2-17 ובטבלה 2-5 בהתאמה. חומרי הגלם המשמשים בתסיסת עומק כוללים: סוכרוז בדרגות שונות של נקיון, גלוקוז, הידרוליזאט של עמילן ומולסות מקנה סוכר או סלק סוכר, בתוספת המינרלים ויסודות הקורט החיוניים.



איור 2-17

תרשים זרימה של ייצור חומצה ציטרית ממולסות בתהליך תסיסת עומק:

א. הכנת המצע ועיקורו

ב. הכנת תרבית מזרע ושילובה עם המצע לביצוע תהליך התסיסה בפרמנטור הראשי

ג. תהליך מכין להפקת התוצר (שים לב לצורך לשרוף את הביומסה בסוף התהליך)

טבלה 2-5

התנאים הדרושים לתסיסת עומק המשמשת בייצור של חומצת לימון על-ידי A. niger

pH	2.8 - 1.5	אופטימלי
	ערכים גבוהים מ-2.8	ייצור חומצה אוקסאלית, סכנת זיהום, ירידה בייצור חומצה ציטרית
	ערכים נמוכים מ-1.5	קצב גידול איטי של התפטיר
טמפרטורה	33°C- 28°C	אופטימלית
	מעל 33°C	ייצור חומצה אוקסאלית
	מתחת ל- 28°C	האטה בייצור חומצה ציטרית
משך התסיסה	6 - 15 ימים, תלוי בריכוז הסוכר בחומר הגלם	
יסודות קורט	חשיבות מיוחדת לברזל, למנגן ולאבץ	

שלושה גורמים חשובים במיוחד בייצור חומצה ציטרית בתסיסת עומק:

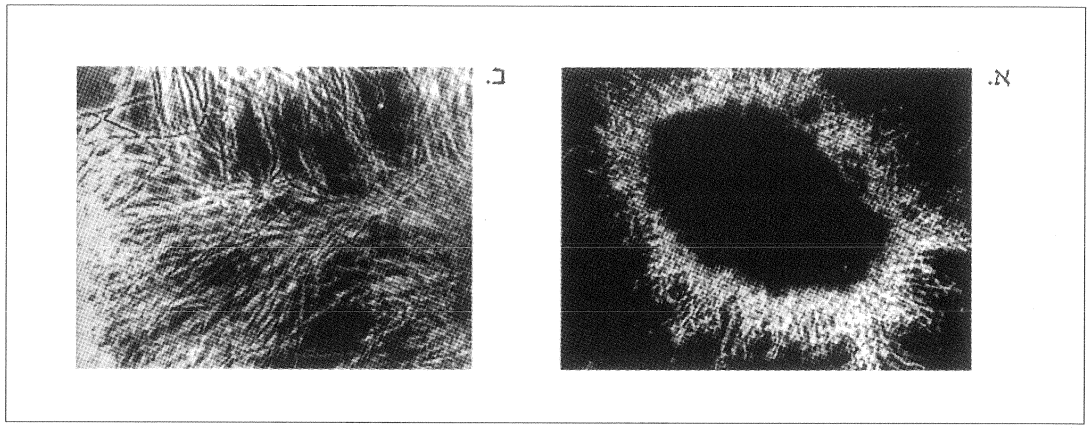
1. **איכות החומר המשמש לבניית הפרמנטור**

פרמנטורים המשמשים לייצור חומצה ציטרית צריכים להיות מוגנים מחומצה, מאחר שבערכי pH נמוכים (1-2) יונים של מתכות מתמצים מהדפנות של פרמנטור מתכתי רגיל ומעכבים את היצירה של חומצה ציטרית. כדי למנוע תופעה זו, משתמשים בפרמנטורים, הבנויים ממתכת אל-חלד בשילוב עם ציפוי פלסטי של הדפנות הפנימיים.

2. **מבנה תפטיר הפטריה**

ייצור מירבי של חומצה ציטרית מתקבל, כשהפטריה A. niger גדלה בצורת מבנים של "גושישים" (pellets) קטנים (בעלי קוטר של 0.2 מ"מ - 0.5 מ"מ), הבנויים מצבר תפטיר בעל קורים מסועפים קצרים ומעובים הארוזים בצפיפות בתוך הגוש (ראה איור 18-2 א). נוזל התסיסה שבין ה"גושישים" האלה, המורחפים במצע, חופשי מתפטיר או משברי תפטיר של הפטריה. גידול הפטריה בצורת תפטיר בעל קורים דקים, ארוכים ובעלי הסתעפויות מועטות (ראה איור 18-2 ב), המפוזרים בנוזל התסיסה כולו, מסתיים ביבול דל ביותר של חומצה ציטרית. יצירת ה"גושישים" בגודל המתאים,

שכאמור הינה קריטית להשגת רמת ייצור גבוהה, תלויה בהרכב המצע (בעיקר ביחס שבין יוני הברזל ובין הנחושת) ובתנאי התהליך (pH, ערבול ואוורור).



איור 2-18

שני סוגי מבנה של תפטיר הפטריה המייצרת A. niger:

א. קורים קצרים, נפוחים מעט, מסועפים ומסובכים זה בזה - מאופיינים בייצור מירבי של חומצה ציטרית.

*ב. קורים ארוכים ודקים - מאופיינים בייצור דל של חומצה ציטרית.**

3. הספקת חמצן

למרות שהפטריה A. niger דורשת מעט חמצן יחסית לשם גידול וייצור, היא רגישה מאוד למחסור בחמצן. אספקה לא-סדירה של החמצן גורמת להפסקת הייצור באופן בלתי-הפיך, ולכן במשך כל התסיסה חייב להיות ריכוז מינימלי של חמצן במצע (20%-25% מערך הרוויה). כדי להבטיח זאת, מוזרם אוויר למצע, בצורה מבוקרת וברציפות, דרך מערכת פיזור, הנמצאת בתחתית הפרמנטור. בגלל שהצמיגות של המצע היא נמוכה בדרך-כלל, לא נדרש ערבול, ובועות האוויר העולות כלפי מעלה מערבלות את המצע. כאשר האוורור משמש כאמצעי ערבול יחיד, משתמשים ***בפרמנטורים גבוהים*** ***(airlift reactor)*** בעלי יחס קוטר: גובה של 4:1-6:1, כדי להאריך את הדרך שעושות בועות האוויר. בכל זאת במפעלים מסוימים משתמשים לייצור חומצה ציטרית, ***בפרמנטורים מעורבלים*** ***(stirred reactor)*** שבהם ערבול המצע מתבצע, בנוסף על האוורור, גם על-ידי בוחש מכני המותקן בפרמנטור (ראה ב באיור 2-17).

אחת הבעיות המרכזיות בתסיסת עומק היא היווצרות קצף במהלך התהליך. לשם כך משאירים כשליש מנפח הפרמנטור ריק, כדי שיוכל לקלוט את הקצף הנוצר. כדי לצמצם בעיה זו נהוג להוסיף לפרמנטור, בפרקי זמן קצובים, חומר מונע הקצפה (ראה ב באיור 2-17), או לשבור את הקצף באופן מכני על-ידי מתקן המיועד לכך (ראה איור 1-5 בפרק 1).

* Reprinted from Brown, C.M., **Process Biochemistry**, Vol. 16, p. 11, with kind permission from Elsevier Science Ltd, Langford Lane, Kidlington OX5, IGB, UK. All rights reserved. © 1994.

תהליך הייצור נמשך 6-15 ימים, על-פי הרכב חומר הגלם המנוצל והריכוז ההתחלתי של הסוכר בתערובת (בדרך-כלל 15%-25%). ניתן לקצר את משך התסיסה, על-ידי זריעת פרמנטור הייצור בספורות מונבטות או ב"גושישי" תפטיר ראשוני, המיוצרים בתסיסה מוקדמת בפרמנטור מזרע (ראה ב באיור 2-17), במקום שימוש בתרחיף ספורות כמזרע. הדבר גורם לקיצור משמעותי של ***השלב הלא-יצרני*** - שלב הגידול הראשוני של התפטיר, אולם מגדיל משמעותית את עלות התהליך ולכן מנוצל בתהליכי ייצור בקנה-מידה גדול בלבד.

בסיום התהליך (ג באיור 2-17) מופרדים "גושישי" הפטריה מהמצע על-ידי סינון, הביומסה מושמדת על-ידי שריפה, והתסנין נאסף ומטופל להפקת הציטרט, כפי שנתאר בהמשך.

השוואה בין תהליכי תסיסת שטח ובין תהליכי תסיסת עומק (ראה טבלה 2-6) מראה, כי היתרונות של תסיסת שטח מסתכמים בהפעלה פשוטה מבחינה טכנולוגית ובדרישות אנרגטיות נמוכות יחסית. לעומת זאת תסיסת עומק מאופיינת ביתרונות רבים, ואלה העיקריים שבהם:

* מגוון רב יותר של חומרי גלם הניתנים לניצול.
* ייצור חומצה ציטרית בניצולת גדולה ביחס לסוכר המנוצל.
* בקרת תהליך משופרת.
* הפחתה משמעותית במרחב הדרוש למערכת הייצור.
* הפחתה בעבודה ידנית ומעבר לבקרה אוטומטית ממוחשבת, וכתוצאה מכך ירידת העלות של מרכיב העבודה.
* שמירה קלה יותר על סטריליות, וכתוצאה מכך הפחתת הסיכון של זיהום מיקרוביאלי.
* השקעה כוללת נמוכה יותר (בכ-25%).

טבלה 2-6

השוואה בין תהליכי תסיסת שטח ובין תהליכי תסיסת עומק

הגורם המושווה	תסיסת שטח	תסיסת עומק
יעילות יצרנית (פרודוקטיביות)	0.85 Kg/m^2 - 1.0 Kg/m^2 ליום	16.5 Kg/m^3 - 18.0 Kg/m^3 ליום
ניצולת (מחושבת על בסיס דו-סוכרים הזמינים בתהליך התסיסה): בשלב התסיסה בתום התהליך	 75% - 65% 70% - 58%	 92% - 87% 88% - 81%
דרישות אנרגטיות (חשמל)	1,400 KWh/mt - 1,600 KWh/mt	2,500 KWh/mt - 2,800 KWh/mt
המקום הנדרש לביצוע שלב התסיסה	370 m^2/mt ליום	~8 m^2/mt ליום

תהליך הפקת התוצר

לאחר הפרדת קורי הפטריה, מופקת החומצה הציטרית מנוזלי התסיסה על-ידי השקעתה כמלח סידני קשה תמס. תהליך ההפקה, המתואר באיור 2-15, זהה הן לתהליך תסיסת השטח והן לתהליך תסיסת העומק. במקרים בהם נוצרת החומצה האוקסאלית כתוצר לוואי בריכוז נמוך בתהליך התסיסה, צריך להרחיקה מהתמיסה בשלב הראשון של ההפקה. הדבר מושג על-ידי הוספת מלחי סידן (סידן פחמתי) לתסנין נוזלי התסיסה (10 באיור 2-15) וכתוצאה מכך ב-pH נמוך חל שיקוע של החומצה האוקסאלית כמלח סידני קשה תמס (סידן אוקסלאטי).

לאחר הפרדת משקע הסידן אוקסלאטי מהתמיסה על-ידי סינון או סרכוז (11 באיור 2-15), מבוצע שיקוע של מלח סידני של החומצה הציטרית על-ידי העלאת ה-pH (ל: 7.0-7.4) והטמפרטורה (ל: 70°C- 90°C) של התמיסה. המשקעים המתקבלים מופרדים משאר מרכיבי התמיסה על-ידי סינון (12 באיור 2-15) ומשמשים, לאחר ייבוש, כתוצר בעל דרגת נקיון נמוכה.

עבור יישומים הדורשים דרגת נקיון גבוהה יותר (בעיקר בתעשיית המזון), מתבצעת המסה מחדש של המשקע על-ידי חומצה גפרתית מרוכזת (13 באיור 2-15) תוך יצירת משקעי סידן גפרתי וטיפול משלים של ניקוי לחומצה ציטרית שהתקבלה (15 באיור 2-15) לאחר הפרדת המשקעים הנ"ל על-ידי סינון (14 באיור 2-15).

בסיום שלבי הניקוי מרוכזת תמיסת החומצה הציטרית שנתקבלה על-ידי אידוי בואקום עד למצב של התגבשות כחומצה ציטרית בלתי ממויימת בטמפרטורה מעל 40°C או כחומצה ממויימת (המכילה מים ביחס 1:1) בטמפרטורה מתחת ל-36.5°C.
התוצר הגבישי מופרד, מיובש ב- 50°C-60°C , מנופה ונארז בשקים המאוחסנים בתנאי אוורור עד לשיווק.

2.4 ייצור חומרים אנטיביוטיים

2.4.1 מבוא

חומרים אנטיביוטיים הם תוצרים מיקרוביאליים טבעיים בעלי מסה מולרית קטנה יחסית, המיוצרים במסגרת המטבוליזם השניוני של התא, ומעכבים באופן ספציפי גידול של מיקרואורגניזמים אחרים, גם בריכוזים נמוכים מאוד. מכאן נובעת חשיבותם המעשית של החומרים האנטיביוטיים בתחום הרפואה והווטרינריה, בעיקר לשם טיפול בדלקות הנגרמות על-ידי חיידקים.

נקודת המוצא של תהליך ההכרה, המחקר והייצור של חומרים אנטיביוטיים היתה התגלית המפורסמת של פלמינג ב-1929. הוא ראה במקרה, כי גידולם של חיידקי סטפילוקוקוס בצלחת פטרי עוכב על-ידי זיהום

בפטרית הפניצילליום. מאוחר יותר התברר, שהדבר נבע כתוצאה מייצור של חומר אנטיביוטי, שכונה פניצילין. בזמן מלחמת העולם השנייה הדרישה לחומרים אנטיביוטיים לטיפול בזיהומי פציעות הובילה, באמצע שנות ה-40, לפיתוח תהליך ייצור תעשייתי של פניצילין על-ידי הפטריה Penicillium בתהליכי תסיסה.

מאז, במשך השנים, בעקבות הפעלת תכניות סריקה אינטנסיביות בכל המדינות המתועשות, עלה בהתמדה מספרן של התרכובות האנטיביוטיות: מ-513 תרכובות שהיו ידועות עד 1961 ל-4076 תרכובות ב-1972 ו-7650 תרכובות ב-1985. גם כיום מספר התרכובות מוסיף לעלות, כאשר מדי שנה מתגלות עוד מאות אחדות של תרכובות פעילות חדשות.

החיפוש אחר חומרים אנטיביוטיים חדשים נמשך, במגמה לאתר תרכובות בעלות תכונות משופרות, כגון פעילות ספציפית מוגברת, מתן פתרונות לבעיות עמידות, רעילות נלווית נמוכה, צמצום תופעות לוואי, טווח פעולה רחב יותר ויציבות טובה יותר.

בניגוד לעלייה המתמדת במספר התרופות האנטיביוטיות החדשות המתגלות כל שנה, מספר התרכובות החדשות המגיעות לשיווק מסחרי הולך ויורד משנת 1950. בין הסיבות לכך בולטת העלות הגבוהה של תהליך הרישוי והאישור לשימוש בתרופה חדשה, והעובדה, שקשה לבודד חומר אנטיביוטי חדש, שיהיה יעיל יותר מן התרכובות הקיימות במידה כזו שתצדיק את המאמץ והעלות של החדרתו לשימוש רפואי. בשל כך, וכתוצאה מהעובדה שהחיידקים נוטים עם הזמן לפתח עמידות לחומר האנטיביוטי, התמקד המחקר מאמצע שנות ה-60 בביצוע שינויים במבנה של חומרים אנטיביוטיים קיימים, לשם שיפור פעילותם בצד שיפור הגנתם מפני פירוק על-ידי תאי המטרה. החדרת שינויים כאלה מתאפשרת באמצעים כימיים, אנזימטיים או גנטיים.

לאחרונה פותחה גישה משולבת המכונה ***מוטסינתזה***, המשלבת בתוכה אמצעים גנטיים וכימיים. שיטה זו מבוססת על יצירת מוטציה ספציפית במיקרואורגניזם המייצר, כך שאינו מסוגל לייצר את אחד מחומרי המוצא של האנטיביוטיקה. הוספה מבחוץ של חומר מוצא שעבר שינוי כימי מסתיימת לפיכך בייצור של אנטיביוטיקה "חדשה" שבה הוחדרו שינוי או תוספת בבסיס המבנה הרגיל.

מתוך אלפי התרכובות הידועות כיום, רק כ-120 מיוצרות באופן מסחרי כתוצר מטבוליטי משני בתהליכי תסיסה. כ-50 תרכובות אחרות מיוצרות כחומר סינתטי למחצה בשילוב תהליך תסיסה ושלבים נוספים אנזימטיים או כימיים.

2.4.2 מאפיינים כלליים של חומרים אנטיביוטיים

החומרים האנטיביוטיים הידועים נבדלים זה מזה במבנה הכימי, באופן פעולתם (כלומר במסלול שנפגע ומעוכב על-ידם), בטווח פעולתם (הנקבע לפי מגוון המיקרואורגניזמים השונים המושפעים מהם), בגזע המיקרוביאלי שמייצר אותם, במסלול ייצורם ובשימוש בהם בחיי היום יום (ראה טבלה 7-2 בעמוד הבא).

טבלה 2-7

מאפיינים עיקריים של מספר חומרים אנטיביוטיים נפוצים

הקבוצה הכימית	דוגמאות נפוצות	היצרן העיקרי	טווח פעולה	מנגנון הפעולה
אמינוגליקוזידים	סטרפטומיצין	Streptomyces griseus	חיידקים גרם-חיוביים וגרם-שליליים	עיכוב הפעילות של תת היחידה הקטנה של הריבוזום בחיידקים.
	נאומיצין	S.fradiae		
לקטונים מעגליים	אריתרומיצין	S. erythreus	חיידקים גרם-חיוביים	עיכוב הפעילות של תת היחידה הגדולה של הריבוזום בחיידקים.
	פוליאנים	S. nodosus S. neuresii	פטריות	פגיעה בחדירותה הבררנית של ממברנת התא.
תרכובות קינוניות	טטרציקלינים	S. aureofaciens	חיידקים גרם-חיוביים וגרם-שליליים; ריקטסיות	עיכוב הקישור של אמינו אציל - tRNA לריבוזום.
	אנטרציקלינים	S. galilaeus S. peucetius	משמשים לטיפול בגידולים סרטניים	עיכוב הכפלת הדנ"א.
פפטידים	בציטרצין	Bacillus subtilis	חיידקים גרם-חיוביים	עיכוב סינתזה של דופן תא החיידק (פפטידוגליקן).
	פולימיקסין G	B. polymyxa	חיידקים גרם-שליליים	הרס קרום התא.
	בליאומיצינים	S. verticillus	משמשים לטיפול בטיפולים סרטניים	עיכוב הכפלת הדנ"א.
תרכובות β-לקטאמיות	פניצילינים	Penicillium spp.	חיידקים גרם-חיוביים	עיכוב סינתזה של דופן תא החיידק (פפטידוגליקן).
	צפלוספורינים	Cephalosporium spp.	חיידקים גרם-חיוביים וגרם-שליליים	
תרכובות ארומטיות	כלורמפניקול	S. venezuelae	חיידקים גרם-חיוביים וחיידקים גרם-שליליים; ריקטסיות	עיכוב שלב התרגום בריבוזום.

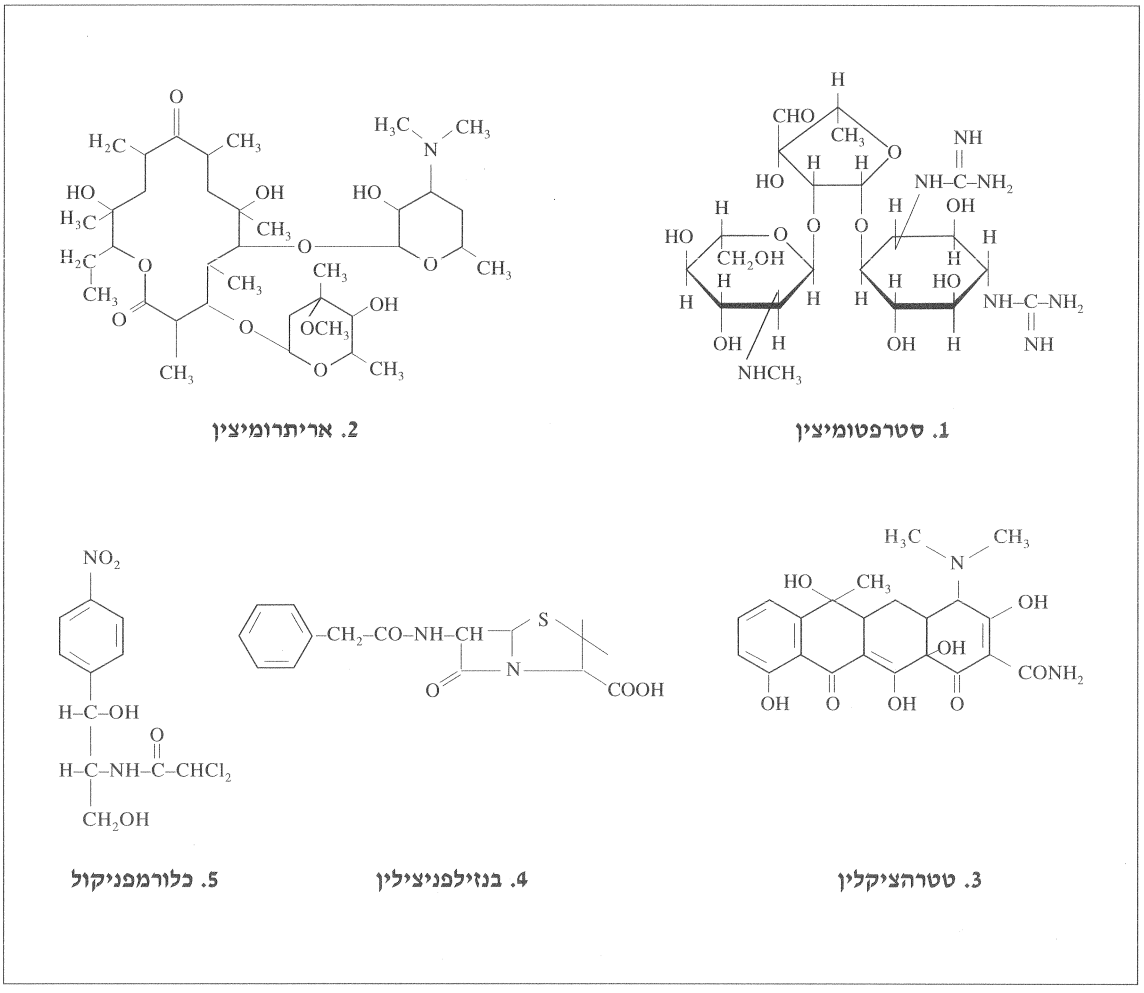
א. מבנה כימי

ניתן למיין את החומרים האנטיביוטיים על-פי המבנה הכימי למספר קבוצות. ואלה העיקריות שבהן:

* **חומרים אנטיביוטיים המכילים שייר סוכרי** - למשל: סוכרים בשילוב קבוצות אמיניות (אמינוגליקוזידים) כגון הסטרפטומיצין (1 באיור 2-19).
* **חומרים אנטיביוטיים המבוססים על לקטון מעגלי** - כגון אריתרומיצין (2 באיור 2-19), ריפמיצינים ופוליאנים.
* **חומרים אנטיביוטיים המבוססים על תרכובות קינוניות** - כגון טטרהציקלינים (3 באיור 2-19) ואנטרציקלינים.
* **חומרים אנטיביוטיים המבוססים על חומצות אמיניות ופפטידים** - לקבוצה זו שייכות

התרכובות המכילות טבעת β-לקטאמית, כגון פניצילינים (4 באיור 19-2) וצפלוספורינים; תרכובות שהן נגזרות של חומצות אמיניות כגון ציקלוסרין; ופפטידים, כגון בציטרצין, פולימיקסין G ובליאומיצינים.

* **חומרים אנטיביוטיים המבוססים על תרכובות ארומטיות** - לקבוצה זו שייכות, בין היתר, נגזרות של בנזן כמו הכלורמפניקול (5 באיור 19-2).



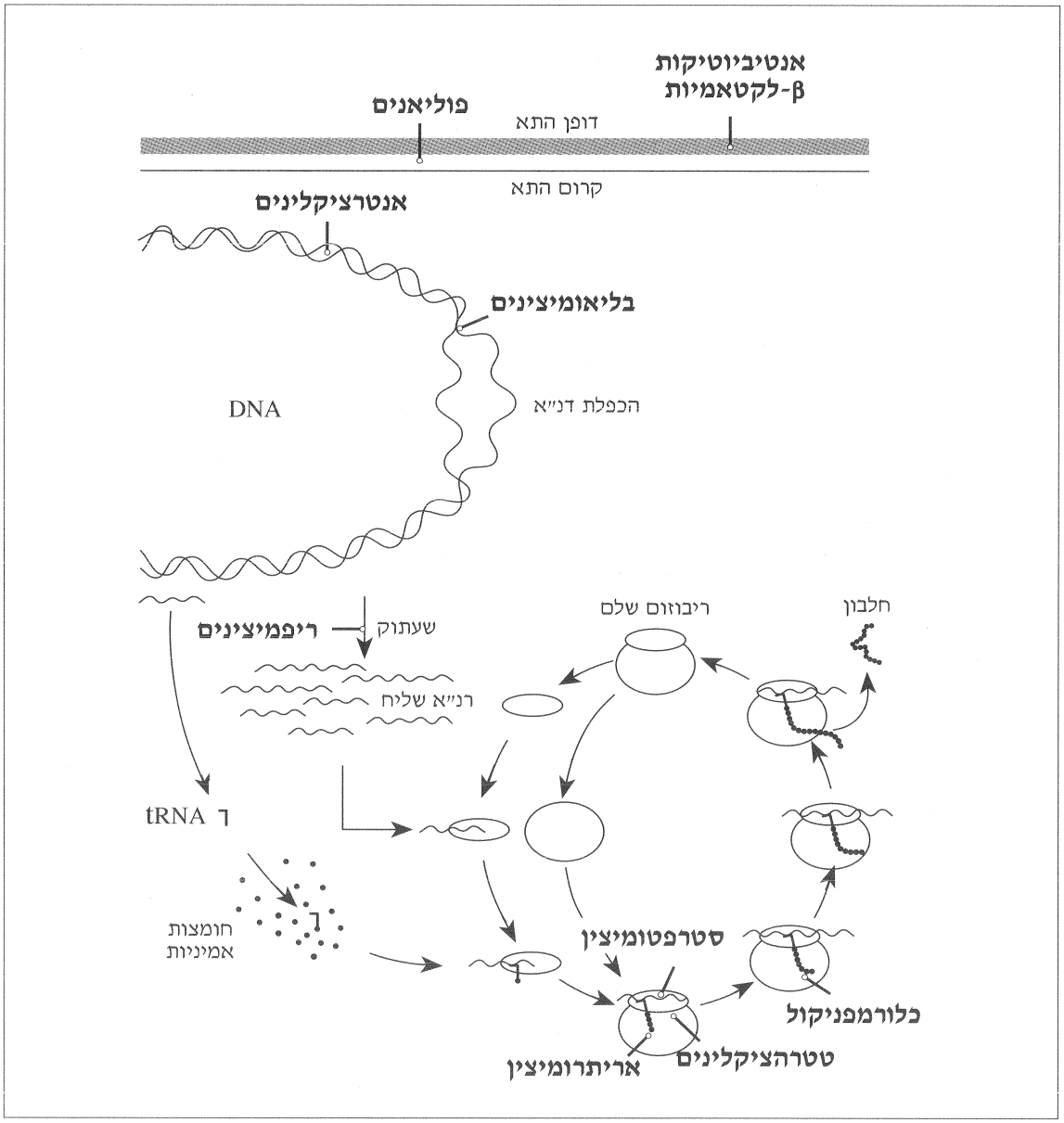
איור 19-2

דוגמאות מייצגות של חומרים אנטיביוטיים עיקריים

מתוך מגוון רחב זה של חומרים אנטיביוטיים, ארבעה סוגים נפוצים מבחינה מסחרית: פניצילינים, צפלוספורינים, טטרציקלינים ואריתרומיצין. תרכובות אלה מיוצרות בכמויות גדולות: כולם יחד, למעלה מ-100,000 טון לשנה בשווי של כ- 4-5 ביליון דולר. ביניהם בולטת במיוחד בחשיבותה והיקפה קבוצת התרכובות המבוססת על מבנה הטבעת ה- β-לקטאמית.

ב. מנגנוני פעולה

הפעילות של האנטיביוטיקות השונות מגוונת ביותר ומשפיעה כמעט בכל תהליך ביוכימי חשוב במחזור החיים של התא המיקרוביאלי (ראה איור 2-20):



איור 2-20

אתרי הפגיעה של תרכובות אנטיביוטיות עיקריות במסלולים ביוכימיים שונים החיוניים לקיום ולהתרבות התא המיקרוביאלי

כך, הפניצילינים והצפלוספורינים מעכבים את בנית דופן תא החיידק (פירוט על כך יובא במשך); הבליאומיצינים והאנטרציקלינים מעכבים הכפלת הדנ"א; הריפמיצינים מעכבים שעתוק דנ"א ליצירת רנ"א שליח; אריתרומיצין, טטרציקלינים וסטרפטומיצין מחלישים את הקומפלקס הריבוזומלי (אתר סינתזת החלבון) בחיידקים, וכלורמפניקול מעכב את תהליך התרגום של רנ"א שליח לחלבונים בריבוזום החיידקי.

בנוסף, קיים גם מספר מועט של חומרים אנטיביוטיים שתוקפים תאי פטריה, כגון פוליאנים, שמפריעים ספציפית לפעילות קרום תא הפטריה על-ידי קישור לסטרולים (סוג של סטרואידים) בממברנת התא. כתוצאה מכך נפגעת החדירות הבררנית של הממברנה, וחלה זליגה של מטבוליטים חיוניים מתוך התא החוצה (תאי פטריה מאופיינים בתכולה גבוהה יחסית של סטרולים בממברנה, ולכן הם רגישים לאנטיביוטיקה מסוג זה).

ג. היצרן המיקרוביאלי

מיקרואורגניזמים המייצרים חומרים אנטיביוטיים בתהליכי תסיסה שייכים לשלוש קבוצות עיקריות:

1) **פטריות** - שישה סוגי פטריות עיקריים מאפשרים, עקרונית, ייצור של כ-1,600 חומרים אנטיביוטיים שונים. מתוך אלה רק כעשר תרכובות מיוצרות מסחרית, ביניהן הפניצילינים המיוצרים בעיקר על-ידי עובש מסוג פניציליום, וצפלוספורינים המיוצרים על-ידי עובש מסוג צפלוספוריום.
2) **אקטינומיצטס (חיידקים חוטיים)** - שלושה סוגי אקטינומיצטס אחראים לייצור של רוב החומרים האנטיביוטיים הקיימים (כ-4,600 תרכובות שונות), כאשר רובם מיוצר על-ידי מינים שונים של הסוג סטרפטומיצס, ביניהם: אריתרומיצין, סטרפטומיצין, טטרהציקלין, כלורמפניקול, ועוד.
3) **חיידקים אחרים (חד-תאיים)** - בין החיידקים הלא-חוטיים, שני סוגים מייצרים כ-950 תרכובות אנטיביוטיות שונות, ביניהם בולט הבצילוס המייצר תרכובות אנטיביוטיות פפטידיות.

תפקידו של החומר האנטיביוטי בקיום ובגידול של המיקרואורגניזם המייצר אותו עדיין לא ברור לחלוטין. ההנחה המקובלת היא, כי חומרים אנטיביוטיים הם בעלי משמעות אקולוגית, כלומר, פועלים בעיכוב הגידול של מיקרואורגניזמים מתחרים. קיימת סברה, שהם לוקחים חלק גם בבקרת הגידול וההתמיינות של התא.

בשל היעדר מידע על תפקידם המדויק של החומרים האנטיביוטיים בתא המייצר, החיפוש אחר חומרים אנטיביוטיים חדשים נעשה לרוב בשיטה של סריקה אמפירית של זנים מיקרוביאליים חדשים, המהווים יצרנים פוטנציאליים.

בדומה למטבוליטים משניים רבים אחרים, המסלול הביוסינתטי של ייצור האנטיביוטיקה הוא מורכב ביותר, ובמקרים רבים טרם פוענח בשלמות. בהתאם, בוצעה עד כה ברירת מוטנטים שהם

יצרני-יתר באופן אמפירי על-ידי השראת מוטציות באמצעות מוטגן וסריקת הכושר של התאים ששרדו לייצר כמויות גדולות של האנטיביוטיקה. על-ידי חזרה על התהליך מספר פעמים בצורה עוקבת הצליחו לבודד מוטנטים, שבהם תפוקת התוצר גדולה פי 10,000 ויותר מזו של זן הבר המקורי.

לאחרונה חלה התקדמות משמעותית בחקר המסלולים הביוסינתטיים של חומרים אנטיביוטיים. כתוצאה מכך הופיעו גישות רציונליות יותר לפיתוח זנים מיקרוביאליים חדשים, בעלי יכולת ייצור מוגברת של האנטיביוטיקה. אחת מהן מבוססת על בידוד של גזעים מוטנטים שפגועים במנגנון הבקרה המווסת את הייצור של חומרי המוצא של החומר האנטיביוטי, וכתוצאה מכך הם מייצרים כמות גדולה מהם, ובהמשך גם כמות מוגדלת של התוצר האנטיביוטי הסופי.

ד. תחומי יישום

כאמור, היישום העיקרי של חומרים אנטיביוטיים הוא בתחום הרפואה והווטרינריה, בעיקר בריפוי ובמניעה של דלקות בקטריאליות. התכונה המכשירה אותם לשמש ביעילות בתחום זה היא ***הרעילות הבררנית*** שלהם, כלומר פעילות ייחודית כנגד חיידקים על-ידי עיכובן של מערכות, שאינן קיימות בתאים של בעלי-חיים, כולל האדם.

הרעילות הבררנית מקורה בעובדה, שלמרות שהתהליך הבסיסי של חילוף החומרים דומה בתאים עילאיים וחיידקים, קיימים בכל זאת הבדלים ביוכימיים ומבניים בין תאים ממערכות חיים שונות. כך, החומרים האנטיביוטיים פועלים ספציפית על אתרי מטרה בתא החיידק, אשר חסרים או שונים מאוד במבנם בתאים עילאיים, כגון: דופן התא של החיידק אשר אינה קיימת במבנם של תאים מבעלי-חיים או הריבוזום של החיידק השונה במבנהו מהמקביל לו בתאים עילאיים.

בנוסף לחומרים האנטיביוטיים, המשמשים לריפוי דלקות, שנגרמות על-ידי חיידקים, קיימים גם מספר חומרים אנטיביוטיים הפועלים כנגד פטריות (כגון פוליאנים) או גידולים סרטניים (כגון אנטרציקלינים ובליאומיצינים). אולם חומרים אנטיביוטיים אלה יעילים פחות מבחינה רפואית משום שהם רעילים במידה מסוימת גם לבני-אדם, השימוש בהם נעשה במנות קטנות ותחת בקרה קפדנית, כדי לצמצם את הנזק שנגרם לתאי הגוף.

יישומים נוספים של חומרים אנטיביוטיים כוללים:

* טיפול במחלות צמחים שנגרמות על-ידי חיידקים ופטריות.
* תוספת למזון האדם כחומר משמר, העוזר למנוע זיהום מזון.
* תוספת מבוקרת של חומרים אנטיביוטיים ספציפיים בריכוז נמוך למזון בעלי-חיים גורמת לזירוז גידולם, כנראה כתוצאה משינויים בהרכב המיקרופלורה במערכת העיכול.
* שימוש במחקר בתחום הביוכימיה והביולוגיה המולקולרית. הניצול של חומרים אנטיביוטיים כמעכב בררני תרם רבות להבנה של פעילויות ביוכימיות רבות ומרכזיות, כגון: הכפלת דנ"א, שעתוק, תרגום וסינתזת דופן תא.

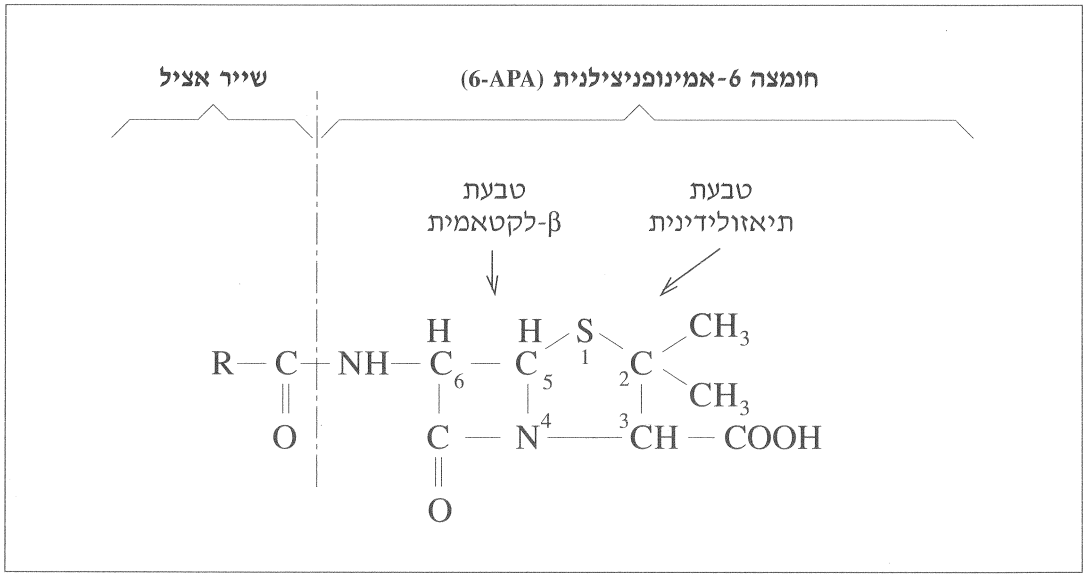
כאמור, הקבוצה החשובה ביותר של חומרים אנטיביוטיים היא קבוצת התרכובות המבוססות על מבנה הטבעת ה- β-לקטאמית. תרכובות אלה מאופיינות בטווח רחב יחסית של פעילות אנטיבקטריאלית והן בעלות דרגת רעילות נמוכה יותר לבני-אדם, ולכן השימוש בהם אפשרי גם במנות גדולות יחסית.

החשובים ביותר בקבוצת התרכובות ה-β-לקטאמיות הם הפניצילינים והצפלוספורינים. להיכרות קרובה יותר עם תהליך הייצור של קבוצה זו, נתמקד עתה בקבוצת הפניצילינים; הפניצילינים מהווים תרופות יעילות ביותר לריפוי מחלות זיהומיות נפוצות, הנגרמות על-ידי הדבקה בקטריאלית (כגון דלקת גרון ודלקת ריאות) וכן מחלות זיהומיות קטלניות (כגון דלקת קרום המוח ודלקת פנים הלב).

2.4.3 הפניצילינים

א. מבנה ואופן פעולה

המבנה הבסיסי המשותף לכל הפניצילינים הוא של חומצה 6-אמינופניצילנית (6-APA), הבנויה משתי טבעות דחוסות: טבעת תיאזולידינית מחומשת וטבעת β-לקטאמית מרובעת. הפניצילינים השונים נבדלים זה מזה בשייר האציל, הקשור בקשר אמידי אל עמדה 6 של הטבעת הלקטאמית (ראה איור 2-21), המשפיע רבות על עוצמת פעילותם, על יציבותם ועל תכונותיהם הפרמקולוגיות.



איור 2-21

המבנה הכללי של הפניצילינים (R - הקבוצה המשתנה)

הפניצילינים, כשאר התרכובות האנטיביוטיות ה- β-לקטאמיות, מעכבים ספציפית את הסינתזה ואת ההרכבה של הפפטידוגליקן - המרכיב העיקרי של דופן התא בחיידקים. הם נקשרים ספציפית לשלושה אנזימים לפחות (המכונים גם חלבונים קושרי פניצילין - PBP): טרנספפטידאז,

קרבוקסיפפטידאז ואנדופפטידאז, המזרזים את יצירת קשרי הצילוב בין שרשרות הפפטידוגליקאן וכן את החדרתו ומיקומו בדופן, ומעכבים את פעילותם האנזימטית. כתוצאה מכך נבלמת יצירה של דפנות חדשים, ותאים חדשים אינם נוצרים.

הימצאותו של מבנה הפפטידוגליקאן בדפנות תאי חיידקים בלבד, והיעדרו ממבנה דופן תאי יצורים עילאיים, היא המאפשרת את הרעילות הבררנית הגבוהה של החומרים האנטיביוטיים מסוג β-לקטאם.

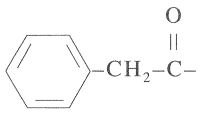
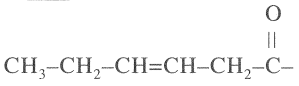
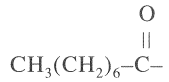
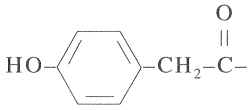
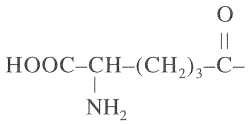
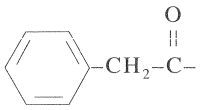
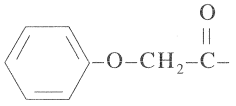
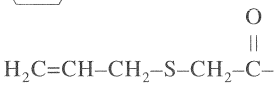
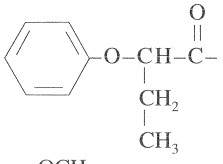
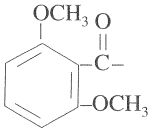
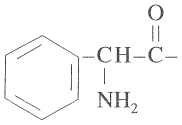
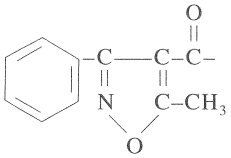
הפניצילינים מיוצרים בטבע על-ידי סוגים רבים של פטריות (בעיקר זני פניציליום ואספרגילוס). הפניצילינים הטבעיים, הפועלים היטב כנגד סוגים רבים של חיידקים גרם-חיוביים, אינם יציבים ביותר בנוכחות חומצה, ומתפרקים בנקל על-ידי האנזים המיקרוביאלי פניצילין β-לקטמאז (פניצילינאז), המבקע את הטבעת ה- β-לקטאמית וגורם בכך לאיבוד יכולתם להתקשר לפפטידאזות בקטריאליות ולפיכך לאיבוד פעילותם האנטיביוטית.

מתוך מגוון ***הפניצילינים הטבעיים*** (ראה איור 22-2) - המיוצרים על-ידי הפטריה ללא תוספת חיצונית של חומרי המוצא של השייר האצילי - הפניצילין G (בנזילפניצילין) הוא המשמש לטיפול תרופתי, בעוד ששאר התרכובות האחרות הנוצרות (כגון פניצילין F, פניצילין K, פניצילין X, פניצילין N ועוד) מורחקות בשלב הפקת התוצר.

כדי לייעל את תהליך הייצור וההפקה, מוסיפים למצע התסיסה את חומר המוצא, המהווה את השייר האצילי, וכך מתקבלת תרכובת פעילה עיקרית אחת ורצויה. בדרך זו מיוצרים ***הפניצילינים הביוסינתטיים*** , כאשר העיקריים שבהם המשווקים מסחרית הם פניצילין G, V ו-O (ראה איור 22-2).

כדי לשפר את התכונות הכימיות ואת טווח הפעילות של הפניצילינים פותח גם ייצורם של ***פניצילינים סינתטיים למחצה (סמיסינתטיים)*** (ראה איור 22-2). פניצילינים אלה מיוצרים מבנזילפניצילין, המתקבל בתהליכי תסיסה, על-ידי הסרה כימית או אנזימטית של קבוצת הבנזיל ליצירת 6-APA, שאחריה מבוצע קישור כימי של שייר אציל אחר לקבלת הנגזרת הסמיסינתטית הרצויה.

הפניצילינים הסמיסינתטיים נפוצים יותר בשימוש רפואי, משום שהם בעלי עמידות גבוהה יחסית לתנאים חומציים. חלקם (כגון מתיצילין) אף עמידים יחסית לפעילותן של β-לקטאמזות בקטריאליות. לאחרים (כגון אמפיצילין) טווח פעולה אנטימיקרוביאלי רחב יותר, כולל פעילות כנגד חיידקים גרם-שליליים.

פניצילינים טבעיים	פניצילין G	
	פניצילין F	
	פניצילין K	
	פניצילין X	
	פניצילין N	
פניצילינים ביוסינתטיים	פניצילין G	
	פניצילין V	
	פניצילין O	
פניצילינים סמיסינתטיים	פרופיצילין	
	מתיצילין	
	אמפיצילין	
	אוקסצילין	

איור 22-2

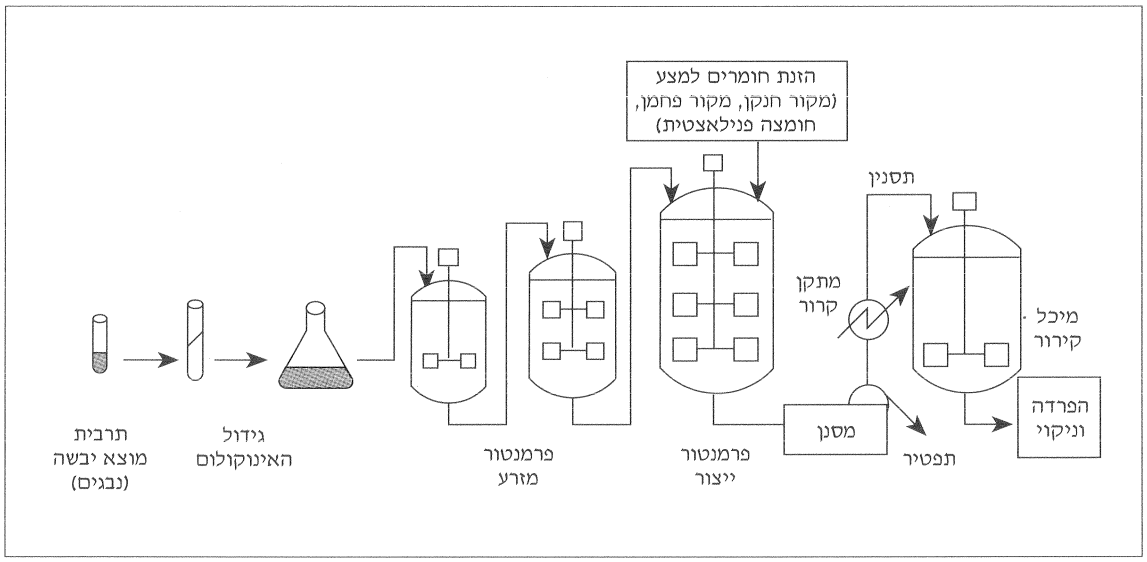
המבנה של שייר האציל במספר פניצילינים טבעיים, בפניצילינים ביוסינתטיים ובפניצילינים סמיסינתטיים

ב. תהליך ייצור הפניצילין

כאמור הפניצילינים מיוצרים בתהליכי תסיסה בהיקף תעשייתי כבר משנות הארבעים. כיום הייצור המסחרי בעולם של פניצילין בתהליכי תסיסה מסתכם בכמויות של כ-15,000 טון לשנה, כאשר למעלה ממחציתו משמשת כחומר מוצא להכנת נגזרות סינתטיות למחצה. כשליש משמש כתרופות לבני-אדם והיתר לרפואה וטרינרית.

תהליך ייצור הפניצילין עבר שיפורים רבים במהלך השנים. כמות הפניצילין המיוצרת בתהליכי הייצור המסחרי עלתה, מאז תגליתו של פלמינג, מרמה של מספר מיליגרמים לליטר מצע עד 50 גרם לליטר מצע היום. הישג מרשים זה נובע מתהליך מתמשך ורב-שלבי של בידוד מוטנטים שהם יצרני-יתר יחד עם אופטימיזציה של תנאי תהליך התסיסה והרכב המצע.

תיאור כללי של תהליך תסיסה תעשייתי המשמש לייצור פניצילין מופיע באיור 2-23.



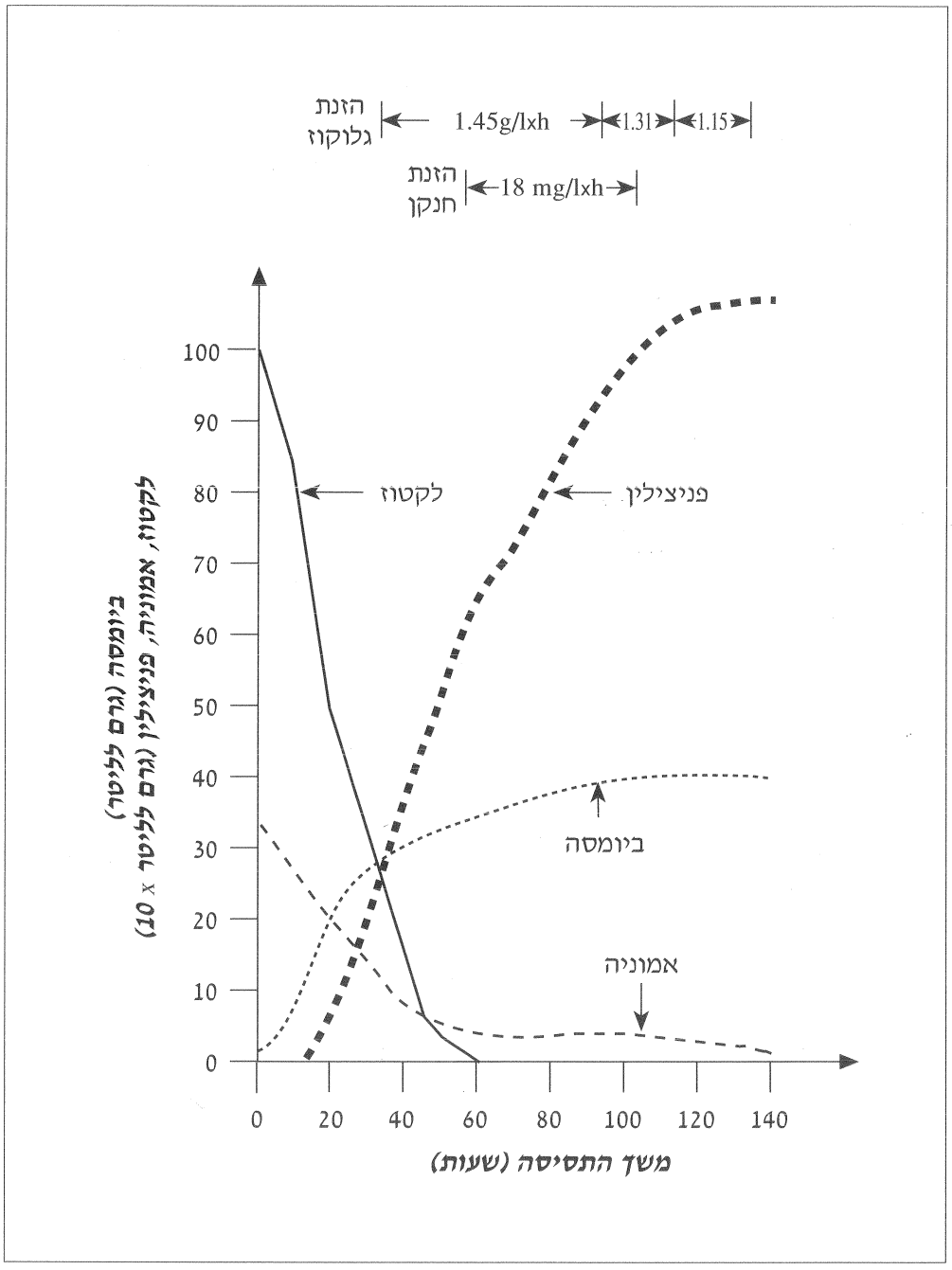
איור 2-23

תרשים זרימה אופייני לייצור תעשייתי של פניצילין בתהליך תסיסה

המיקרואורגניזם המשמש בתהליך הוא מוטנט, יצרן-יתר של הפטריה Penicillium chrysogenum. כתרבית מוצא לבניית האינוקולום משמשים בדרך-כלל נבגים יבשים של הפטריה.

הייצור מבוצע על-ידי תסיסת עומק, המתבצעת בתהליך מנתי מוזן בפרמנטור מאוורר ומעורבל, שגודלו בין 40,000 ליטר ובין 200,000 ליטר, תוך שמירה על טמפרטורה של 27°C-25°C, על pH=6.5 ועל תנאים סטריליים קפדניים.

בתהליך התסיסה בפרמנטור הייצור ניתן להבחין בשני שלבים עיקריים: שלב הגידול ושלב הייצור (ראה איור 2-24), תופעה המאפיינת ככלל את הייצור של מטבוליטים משניים (ראה פרק 1).



איור 2-24

קינטיקת הייצור של פניצילין בתהליך תסיסה

בשלב הראשון, הנמשך כ-40 שעות, חל עיקר הגידול של הביומסה. הגידול מתרחש בקצב איטי יחסית עם זמן דור של כ-6 שעות, ומאופיין בהיווצרות צברי תפטיר (גושישים) קטנים, כאשר להשגת קצב ייצור מירבי בהמשך עדיפים גושישי תפטיר רפויים על-פני גושישים דחוסים.

בשלב הגידול חשובה ביותר הבקרה על אספקת החמצן. אספקה מספקת וסדירה של חמצן מאפשרת את התנאים הארוביים, הדרושים לגידול מירבי של הפניציליום. כמו כן חיוני ביותר לשמור על תנאים סטריליים כדי למנוע את זיהום התרבית במיקרואורגניזמים מייצרי האנזים פניצילינאז הגורמים לפירוק הפניצילין שנוצר.

בשלב השני, לאחר שהגידול הואט לרמה מינימלית, מתבצע עיקר הייצור של הפניצילין הביוסינתטי הרצוי, באמצעות אספקה של חומר המוצא המתאים עבור שייר האציל: חומצה פנילאצטית לייצור פניצילין G, חומצה פנוקסיאצטית לייצור פניצילין V, וחומצה אלילמרקפתואצטית לייצור פניצילין O. נמצא שריכוזים גבוהים של אמוניה וגלוקוז גורמים לעיכוב הביוסינתזה של הפניצילין. על-כן מצע התסיסה ההתחלתי מכיל לקטוז (ולא גלוקוז) כמקור פחמן ואנרגיה. האמוניה, המהווה את מקור החנקן, נצרכת ברובה בשלב הגידול, וריכוזה נשמר נמוך וקבוע בשלב הייצור, על-ידי הזנה מבוקרת. בשלב הייצור מסופקת למצע גם אספקה מדורגת של רמת גלוקוז נמוכה (ראה איור 2-24), הגורמת להארכה של שלב הייצור עד 120-180 שעות.

הפניצילין הנוצר הוא חוץ-תאי, כלומר מופרש למצע במהלך התסיסה. בסיום התהליך מפרידים על-ידי סינון את תפטיר הפטריה ממצע התסיסה, ומפיקים מהתסנין את הפניצילין בתהליך של מיצוי קר (ב-3°C-0°C) על-ידי ממס אורגני ב-pH חומצי (2.5-3.0). בהמשך משקיעים את הפניצילין כמלח אשלגן גבישי, מסננים ומייבשים את המלח, ומתקבל תוצר בניצולת גבוהה (כ-90%) ובדרגת ניקיון גבוהה (למעלה מ-99%).

פרק 3: נוגדנים ואימונודיאגנוסטיקה

3.1 מבוא

הנוגדנים הם גליקופרוטאינים, הממלאים תפקיד מפתח בפעילות ההגנה של המערכת החיסונית. מולקולות הנוגדן מיוצרות על-ידי ***לימפוציטים מסוג B***, בהשראת חדירה פולשנית של גורם זר (אנטיגן) לגוף. תפקידם הביולוגי העיקרי של הנוגדנים הוא לזהות באופן ספציפי את האנטיגן שגרם ליצירתם, להיקשר אליו ליצירת תצמיד יציב, ולהפעיל שורה של מנגנונים, שיביאו בסופו של התהליך לניטרול האנטיגן ולהרחקתו.

מערכת החיסון מאופיינת ביכולת לייצר מספר עצום של נוגדנים בעלי ספציפיות גבוהה למגוון רחב מאוד של מבנים כימיים - טבעיים וסינתטיים. מבנים אלו עשויים להיות חלק ממולקולה קטנה יחסית או ממקרומולקולה (כגון חלבון או פוליסכריד), במצב מסיס או על-פני תא או רקמה.

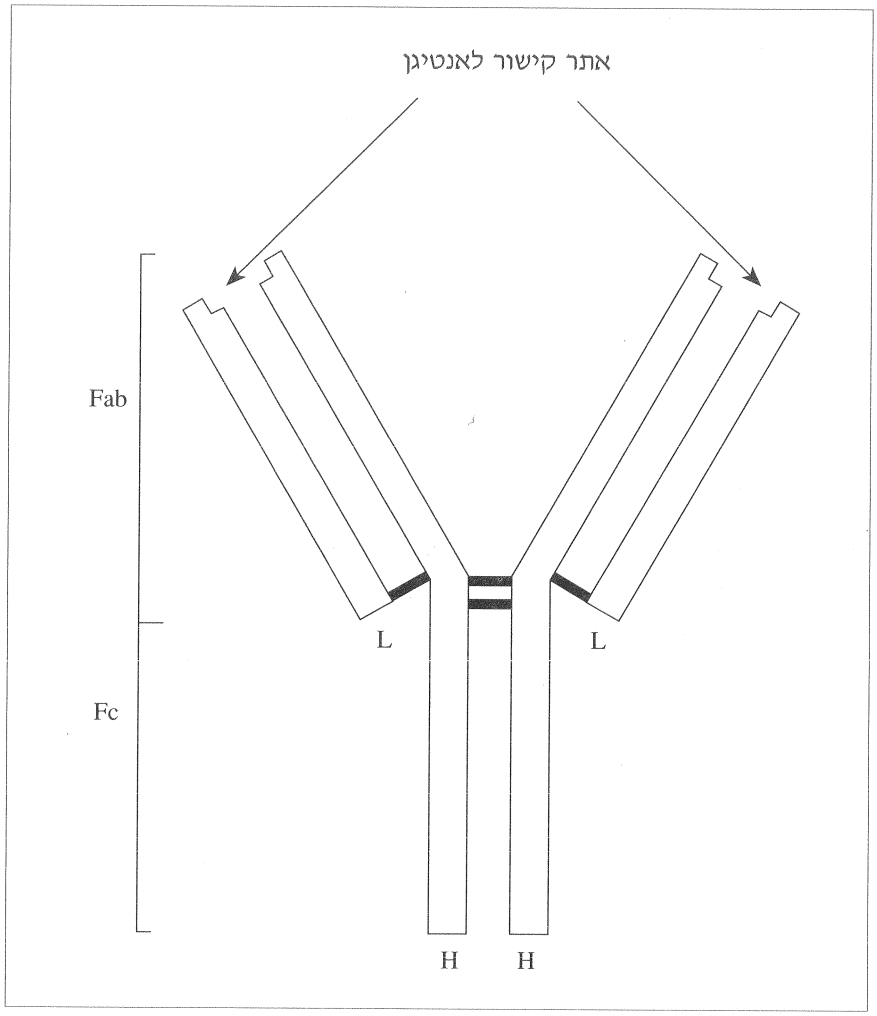
מרשימה במיוחד יכולתם של הנוגדנים לזהות ולהיקשר לתצורת האנטיגן הייחודית המזוהה על-ידם, גם בנוכחות חומרים דומים בתערובת מורכבת. יכולת זו היוותה בסיס לפיתוח מגוון רחב של שימושים ביוטכנולוגיים המבוססים על נוגדנים.

בטרם נכיר את השימושים העיקריים שעושים בנוגדנים, בעיקר בתחומי הרפואה והמחקר, נעיין תחילה במאפיינים העיקריים של מבנה הנוגדן, של מנגנון היווצרותו בגוף ושל תהליך היקשרותו לאנטיגן.

3.2 מבנה הנוגדן ומנגנון היווצרותו

הנוגדנים הם חלבונים בעלי מבנה, המזכיר בצורתו הכללית את האות Y (ראה איור 3-1 בעמוד הבא). במבנה זה ארבע שרשרות פוליפפטידיות - שתי שרשרות זהות קטנות יחסית (המסומנות L ומכונות "קלות"), ושתי שרשרות זהות גדולות יותר (המסומנות H, ומכונות "כבדות"). ארבע השרשרות מחוברות ביניהן הן בקשרי -S-S- קוולנטים והן בקשרים לא-קוולנטים ויוצרות יחידה בעלת מבנה דמוי Y.

במבנה זה שתי זרועות זהות, שנהוג לסמנן ***Fab***, אשר בקצה כל אחת מהן ממוקם ***אתר קישור לאנטיגן***, השונה מנוגדן לנוגדן. הזרוע השלישית במולקולת הנוגדן, שנהוג לסמנה ***Fc***, היא בעלת מבנה קבוע, שאינו משתנה מנוגדן לנוגדן, ואין לה יכולת להקשר לאנטיגן, אם כי היא אחראית להפעלתם של תהליכים ביולוגיים שונים אחרים, הקשורים בתפקוד הנוגדן בתהליך הניטרול וההרחקה של האנטיגן.

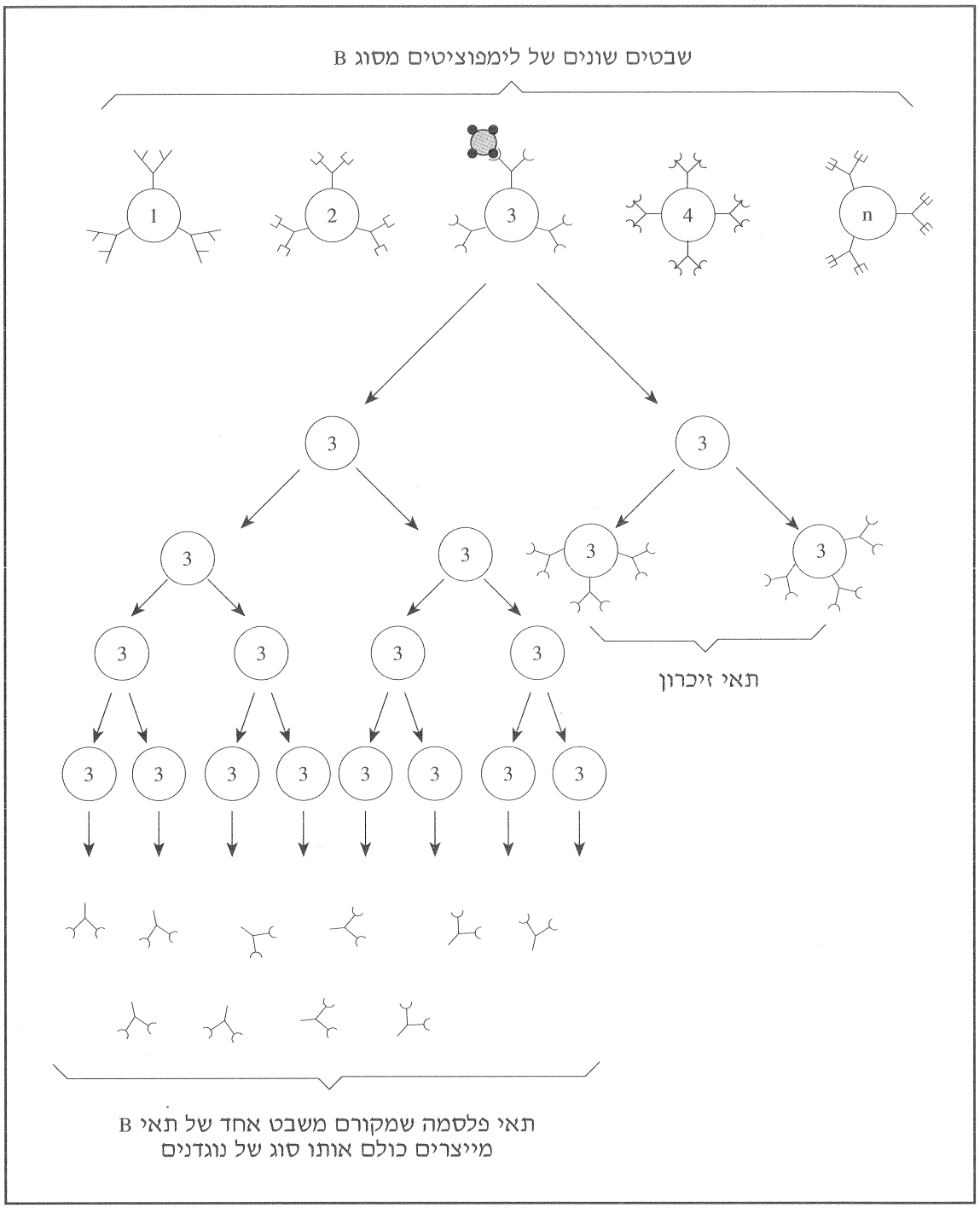


איור 3-1

המבנה הבסיסי של מולקולת הנוגדן

הכושר הבסיסי לפיתוחה של תגובת חיסון, הספציפית לאנטיגן מסוים, קיים פוטנציאלית בגוף, לפני המפגש בפועל עם מולקולות האנטיגן. הייצור המוגבר וההפרשה של נוגדנים ייחודיים מתרחשים רק לאחר חדירת האנטיגן לגוף והשראת תהליך המכונה ***ברירת שבטים (קלונים).***

על-פי תאוריית ברירת השבטים, אוכלוסית הלימפוציטים בגוף מתחלקת ל***שבטים של תאים*** (קלונים). כל שבט של תאי B בגוף "מתוכנת" לייצר סוג אחד, מסוים וייחודי, של נוגדן הממוקם על-פני ממברנת התא כקולטן (רצפטור) לאנטיגן. האנטיגן נקשר אל התא הנושא את הקולטן התואם לו ("בורר" אותו). קישור זה של האנטיגן לרצפטור גורם להפעלת התא, ומעורר סדרה של תהליכי חלוקה והתמיינות, המסתיימים ביצירה של תאי זכרון האחראים לזכרון החיסוני ותאי פלסמה המייצרים ומפרישים החוצה נוגדנים ייחודיים לאנטיגן הנדון, כפי שמתואר סכימתית באיור 3-2.



איור 2-3

ייצור נוגדנים בהשראת חדירת אנטיגן על-פי תיאורית ברירת השבטים

בגוף קיים מספר גדול מאוד של שבטים, אך מספרם של התאים בכל שבט הוא קטן. לימפוציטים משבטים שונים נבדלים במבנה ***הקולטן*** המצוי על-פניהם. במנגנון זה מחולל האנטיגן תהליך ברירה של השבט המתאים, ומשרה בו תהליכי ריבוי והתמיינות. ההתמיינות של תאי B מתרחשת במיח העצם, ומובילה תחילה ליצירה של ***תאי זיכרון***, המכילים על-פניהם את הקולטנים האופייניים של השבט. קולטנים אלה הם בעלי מבנה דמוי נוגדן, המעוגנים על-פני התאים כך שזרועות ה-Fab שלהם פונות כלפי חוץ. תאי הזיכרון, המאופיינים בתוחלת חיים ארוכה, מצטרפים לאוכלוסיית הלימפוציטים ה"מפטרלת" בגוף. באופן זה, כאשר האנטיגן חודר לגוף פעם נוספת, גוברים סיכוייו לפגוש לימפוציטים בעלי רצפטורים מתאימים.

בהמשך תהליך ההתמיינות נוצרים גם ***תאי פלסמה***, שאינם מכילים קולטנים על פניהם ואינם מסוגלים עוד להתחלק ולהתרבות; אולם תאי הפלסמה מייצרים בקצב מוגבר ומפרישים לסביבתם מולקולות נוגדן חופשיות, המסוגלות לזהות את מולקולות האנטיגן, שהישרה את היווצרותן, ולהיקשר אליהן באופן ספציפי בתמיסה. כל תאי הפלסמה שנוצרו משבט אחד של תאי B, מפרישים מולקולות נוגדן זהות, שכולן בעלות אותם אתרי קישור ספציפיים לאנטיגן; המבנה של אתרי הקישור האלה זהה למבנהו של הרצפטור הממברנלי המקורי, המאפיין את השבט מתחילתו.

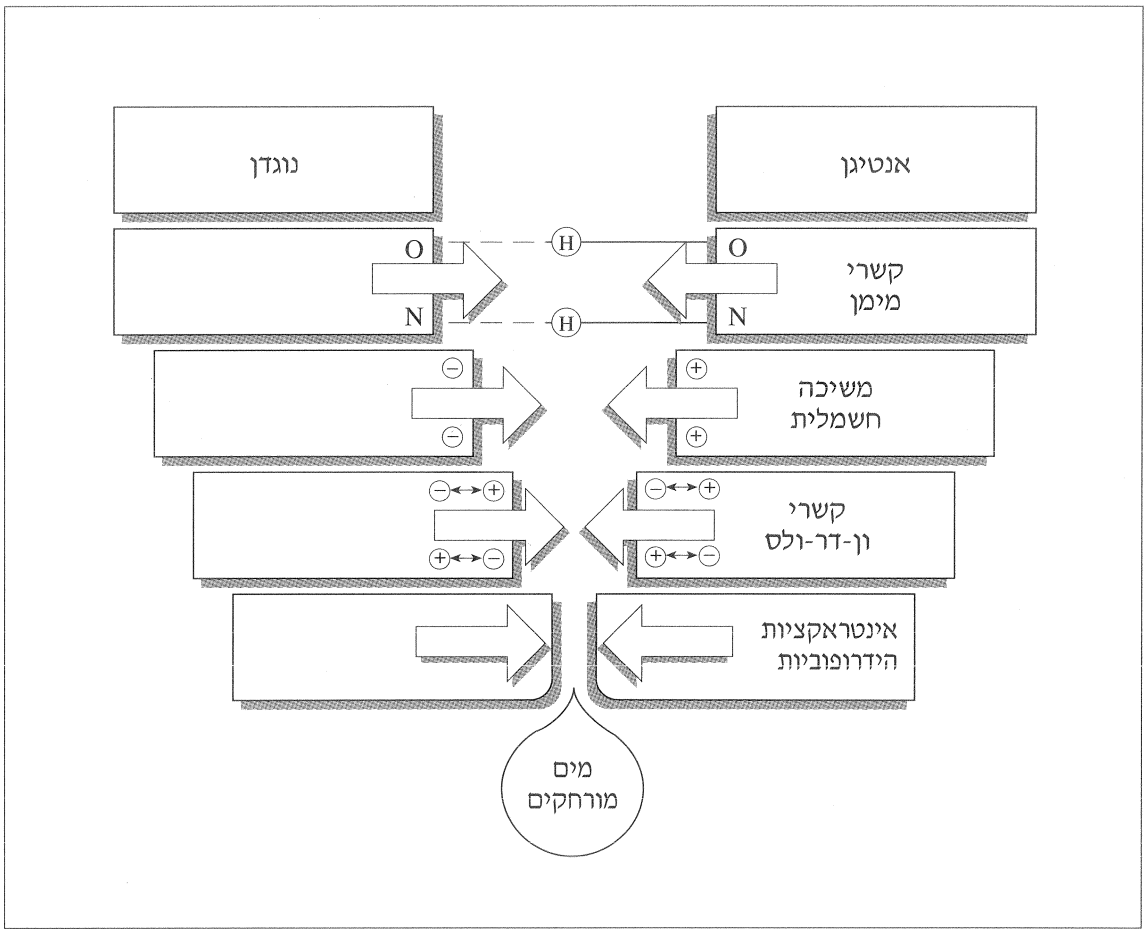
כפי שנראה בהמשך, להבנת המנגנון של תהליך זה השלכה חשובה על יכולתנו להכין ולהפיק נוגדנים.

3.3 תהליך היקשרות הנוגדן לאנטיגן

לאחר שהנוגדנים נוצרים, הם מתפזרים בגוף דרך מערכת הדם ומערכת הלימפה. כאשר הם פוגשים באנטיגן שהשרה את יצירתם, הם מזהים אותו באופן ספציפי, ונקשרים אליו בקשר חזק ליצירת ***תצמיד אנטיגן-נוגדן***.

חשוב לציין, כי במקרים שבהם האנטיגן הוא מולקולה גדולה (כגון חלבון), הנוגדן אינו מזהה את האנטיגן השלם אלא מבנה מולקולרי קטן יחסית שעל-פניו, הקרוי ***דטרמיננטה אנטיגנית*** (או ***אפיטופ***). היקשרות הנוגדן לדטרמיננטה האנטיגנית מתרחשת באמצעות אתר הקישור, המצוי כאמור בקצה זרועות ה-Fab של הנוגדן, ולו צורה מרחבית של בקע. הספציפיות של הקשר נובעת מקליטת "תבליט" מבנה מרחבי משלים של הדטרמיננטה האנטיגנית ב"בקע" של אתר הקישור.

הקשר בין האנטיגן לנוגדן מיוצב על-ידי כוחות משיכה, היוצרים קשרים לא-קוולנטיים בין קבוצות ספציפיות של הדטרמיננטה האנטיגנית ובין שיירים מסוימים הממוקמים באתר הקישור של הנוגדן (ראה איור 3-3). כוחות אלה כוללים קשרי מימן, משיכה חשמלית בין מטענים מנוגדים, קשרי "ון-דר-ולס" ובעיקר אינטראקציות הידרופוביות (שעשויות לתרום עד מחצית מהחוזק הכולל של הקשר בין האנטיגן לנוגדן).



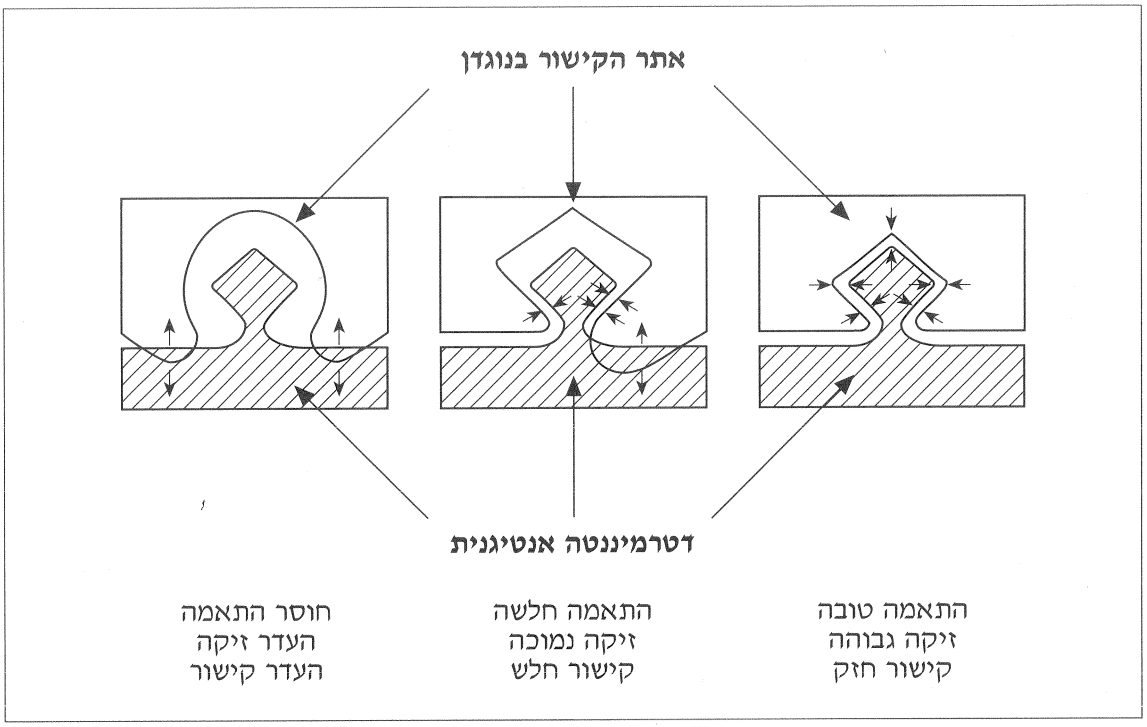
איור 3-3

סוגי קשרים וכוחות משיכה בינמולקולריים המייצבים את תצמיד האנטיגן-נוגדן

(שים לב כי המרחק בין הקבוצות, המאפשר קישור אופטימלי, משתנה בסוגי הקשרים השונים)

עוצמת הקישור בין אתר הקישור בנוגדן לבין הדטרמיננטה האנטיגנית מכונה ***זיקה***, והיא תלויה במידת ההתאמה המרחבית בין אתר הקישור בנוגדן ובין הדטרמיננטה האנטיגנית (ראה איור 3-4 בעמוד הבא). ככל שההתאמה ביניהם מדויקת ושלמה יותר, כך נוצרים כוחות משיכה חזקים יותר, וכתוצאה מכך מתרחש קישור ספציפי בעוצמה גבוהה.

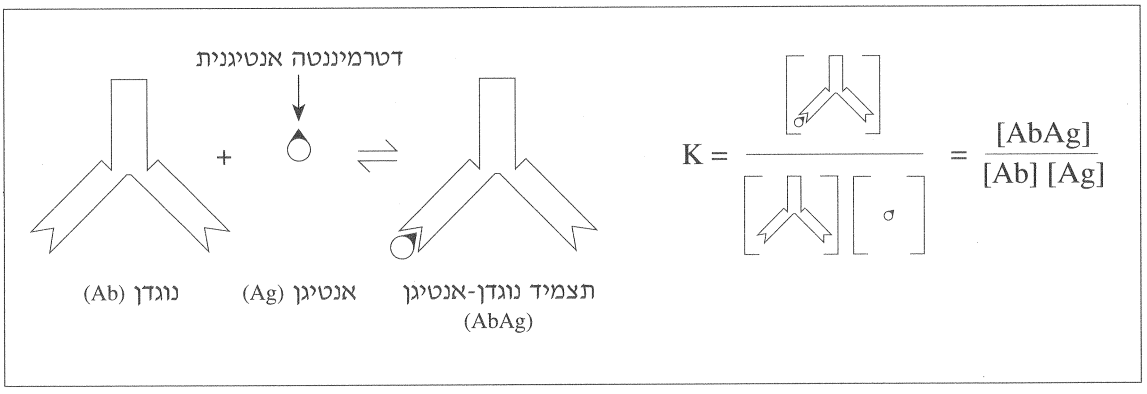
יודגש כי על אף שהקשר הנוצר הוא ספציפי וחזק יחסית, הוא אינו קשר קוולנטי; הקשר בין הנוגדן לאנטיגן הוא הפיך, מאחר שניתן לרופף את הקשר בתצמיד, ואף להביא להתפרקותו בתנאים מסוימים. שינוי בתנאי הסביבה, כגון שינוי pH והוספת מלח להחלשת משיכה חשמלית, הוספת ממס אורגני להחלשת אינטראקציות הידרופוביות וכד', כל אלה עשויים לגרום להחלשת הקשרים, המייצבים את התצמיד, ולפירוקם.



איור 3-4

הקשר שבין מידת ההתאמה המרחבית לבין כוחות הדחייה (← ←) וכוחות המשיכה (→ ←) הפועלים בין אתר הקישור בנוגדן ובין הדטרמיננטה האנטיגנית

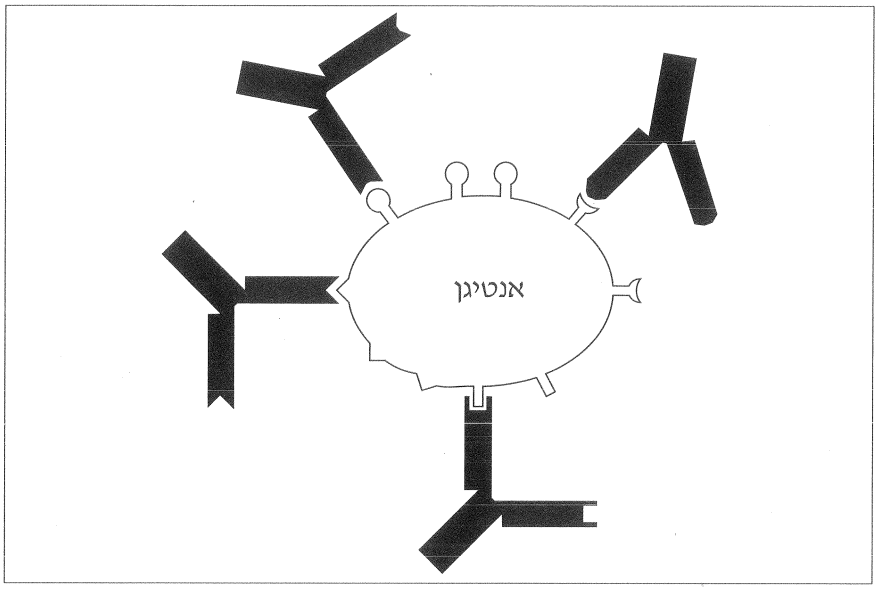
יתר על כן, גם בתערובת, המכילה נוגדן ואנטיגן בתנאים נוחים לקישור, מתקיים מצב של שיווי משקל בין התצמיד לבין מרכיביו החופשיים (ראה איור 3-5). נטיית התצמיד להתפרק למרכיביו תלויה בעוצמת הזיקה שבין אתר הקישור של הנוגדן לבין הדטרמיננטה האנטיגנית ובריכוז המרכיבים החופשיים בסביבה. כך נוגדנים שזיקתם לאנטיגן גבוהה יוצרים תצמידים יציבים, ואילו נוגדנים בעלי זיקה נמוכה יוצרים תצמידים לא יציבים, הנוטים להתפרק בקלות.



איור 3-5

שיווי משקל הנוצר עקב קישור הפיך בין נוגדן לאַנטיגן ליצירת התצמיד נוגדן-אַנטיגן
(K - קבוע שיווי המשקל המבטא את עוצמת הזיקה בין הנוגדן לאנטיגן)

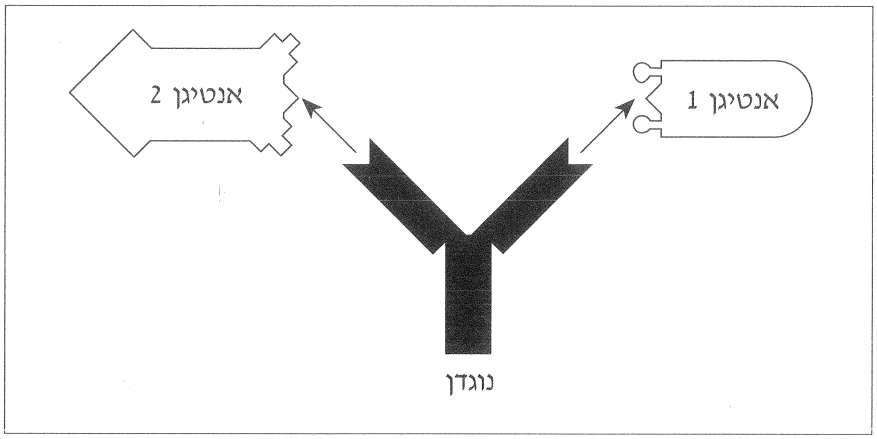
רוב האנטיגנים הביולוגיים (חלבון, וירוס, חיידק) מכילים על-פניהם דטרמיננטות אנטיגניות רבות ושונות, כאשר בדרך-כלל כל סוג של דטרמיננטה אנטיגנית מופיע על-פני האנטיגן מספר פעמים. כתוצאה מכך, חיסון של בעל-חיים באנטיגן כזה מוליך לכך שנוצרים בגופו ומופיעים בדמו טווח רחב של נוגדנים בעלי אתרי קישור שונים, הנבדלים בספציפיות שלהם ומכוונים כנגד דטרמיננטות אנטיגניות שונות, כמתואר באיור 3-6.



איור 3-6

אוכלוסית נוגדנים המתקבלת מחיסון של בעל-חיים באנטיגן ביולוגי

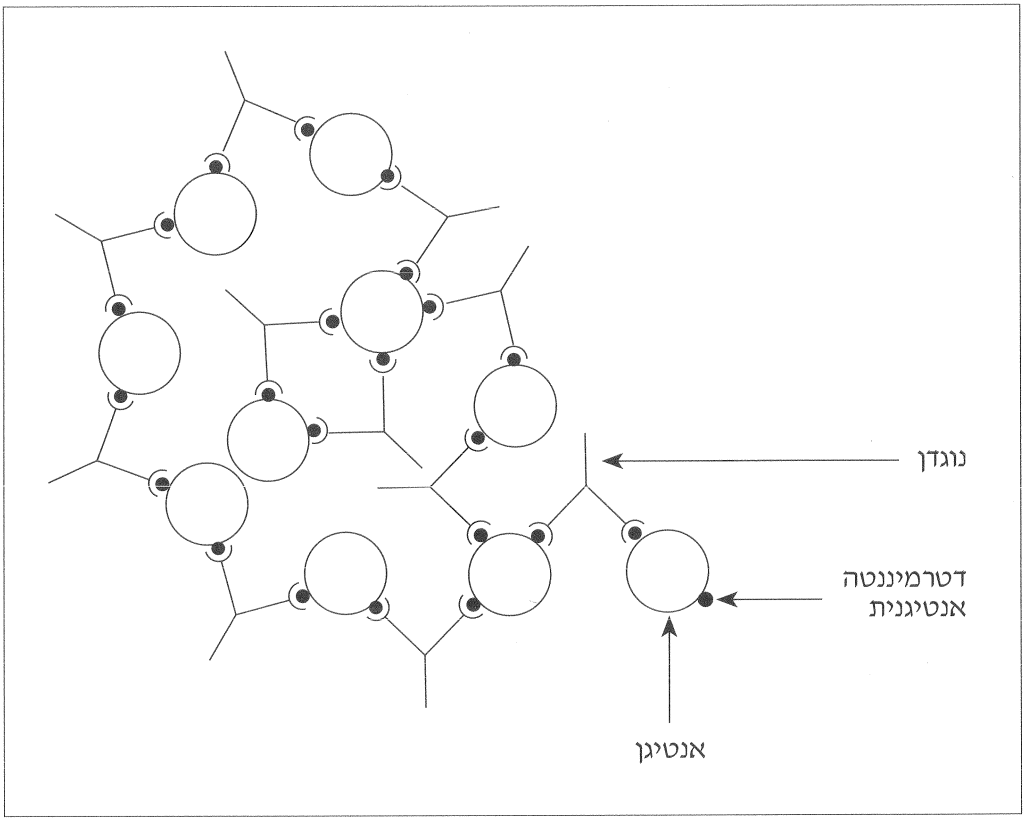
לעיתים מצויה אותה דטרמיננטה אנטיגנית על-פני אנטיגנים שונים. כך יתכן כי נוגדן, שנוצר בהשראת אנטיגן מסוים, עשוי להיקשר באמצעות שני אתרי הקישור שלו וליצור "גשר" בין שני אנטיגנים הנושאים דטרמיננטה אנטיגנית משותפת. תגובה זו של נוגדנים עם אנטיגנים שונים נקראת ***תגובה צולבת***, והיא מתוארת באיור 3-7.



איור 3-7

תגובה צולבת של נוגדן עם שני אנטיגנים שונים, הנושאים דטרמיננטה אנטיגנית משותפת

ביחסים כמותיים מסוימים בין מולקולות אנטיגן, אשר על-פניהן מספר אפיטופים, ובין מולקולות נוגדן, עשוי תהליך הקישור לגרום ליצירת ***תלכידים***, המורכבים ממספר רב של מולקולות אנטיגן-נוגדן הקשורות זו בזו (ראה איור 8-3).



איור 8-3

היווצרות תלכיד של מולקולות אנטיגן-נוגדן

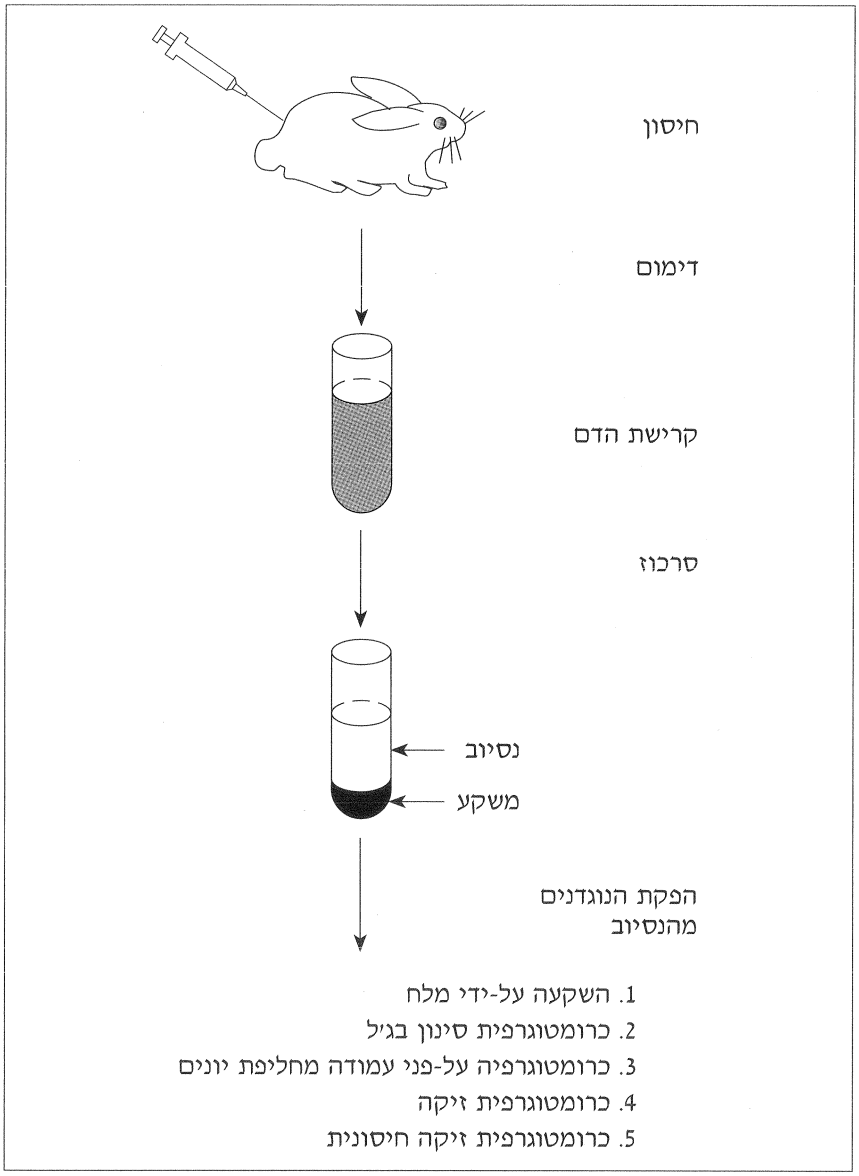
התופעה של יצירת תלכיד על-ידי נוגדנים קרויה ***הצמתה (אגלוטינציה)***, והיא מתאפשרת תודות לעובדה שהנוגדן והאנטיגן הם רב-ערכיים: כל יחידת מבנה בסיסית של הנוגדן מכילה שני אתרי קישור זהים, ועל-פני רוב האנטיגנים הטבעיים מצויות לפחות שתי דטרמיננטות אנטיגניות זהות המסוגלות להיקשר לאתרים אלה.

יצירת התצמיד נוגדן-אנטיגן נועדה - במישרין או בעקיפין - להביא לסילוקו של האנטיגן או לנטרל את פעולתו. כך כאשר הנוגדנים נקשרים לרעלים ולנגיפים, הם מביאים ישירות לניטרולם, ובהיקשרם לחיידקים הם גורמים להצמתתם, וכתוצאה מכך לעיכוב בתנועתם. אולם חשיבותם הביולוגית העיקרית של הנוגדנים היא בסיוע להשמדתו של הגורם הזר, על-ידי הפעלת המערכות המתאימות בגוף (דהיינו: מקרופאגים, תאי הרג ומערכת המשלים) באמצעות זרוע ה-Fc במולקולת הנוגדן. פעילות זו של הנוגדנים קרויה ***פעילות ציטוטוקסית***, משום שהיא מובילה להרס תאי-המטרה.

3.4 ייצור של נוגדנים

התנאי ההכרחי לפיתוח שימושים ביוטכנולוגיים בנוגדנים הוא היכולת להפיקם בכמות נדרשת ובדרגת נקיון גבוהה. ייצורם של נוגדנים מתבצע לרוב בשתי שיטות עיקריות; בשיטה הראשונה מפיקים אותם מדמם של בעלי-חיים לאחר השראת חיסון, ובשיטה השנייה מייצרים אותם בתרבית תאים ייחודית בעלת כושר ייצור של נוגדן ספציפי. נכיר תחילה את השיטה הראשונה.

באיור 3-9 נתונה סכימה, המתארת את תהליך ההפקה של נוגדנים מבעל-חיים מחוסן.



איור 3-9
השלבים העיקריים בתהליך הפקת נוגדנים מדמו של בעל-חיים מחוסן

התהליך נפתח בהזרקת האנטיגן לחיה מתאימה (בדרך כלל עכבר, חולדה, ארנבת, עז או סוס), כדי להשרות התפתחות נוגדנים כנגדו בדמה. כעבור פרק הזמן הנדרש להתפתחות התגובה החיסונית הרצויה, מדממים את החיה ומניחים לדם להיקרש. לאחר מכן מפרידים מן הדם הקרוש את תאי הדם וגורמי הקרישה על-ידי סרכוז, כאשר בנוזל העליון הנותר, הקרוי ***נסיוב*** או ***סרום***, מצויים הנוגדנים במצב מסיס.

בהמשך התהליך מפיקים מן הסרום את אוכלוסית הנוגדנים הרצויה בשיטות הביוכימיות המקובלות להפרדה וניקוי של חלבונים. תהליך ההפקה מורכב ממספר שלבי הפרדה וניקוי עוקבים, שהראשונים שבהם נועדו להפריד את מקטע הנוגדנים מסך חלבוני הסרום, והאחרונים נועדו לבודד את אוכלוסית הנוגדנים הרצויה. מהלך אופייני של תהליך הפקת הנוגדן מתמיסתו בסרום כולל: השקעה ב-30% עד 50% אמוניום סולפט, כרומטוגרפית סינון בג'ל, כרומטוגרפיה על-פני עמודה מחליפת יונים וכרומטוגרפית זיקה.

לייצור נוגדנים בשיטה זו יש שני חסרונות עיקריים:

א. **אי אחידות של הנוגדנים**
כאשר מזריקים לבעל-חיים אנטיגן מורכב (כגון וירוס או חיידק), הוא מגיב בייצור של מגוון רחב של נוגדנים, המכוונים נגד דטרמיננטות אנטיגניות שונות שעל-פני האנטיגן. אוכלוסיות אלה של נוגדנים נבדלות זו מזו במבנן כחלבון במידה מעטה בלבד, ולכן ההפרדה ביניהן קשה.
יתר על כן, אם האנטיגן אשר שימש לחיסון אינו נקי לחלוטין, ייווצרו בבעל-החיים גם נוגדנים נגד המזהמים הנלווים אליו. מכאן, שבהפקה של נוגדנים מדמו של בעל-חיים תתקבל תמיד אוכלוסיה הטרוגנית מגוונת של נוגדנים.

ב. **חוסר הדירות בהרכב תערובת הנוגדנים המתקבלת מסרום**
תערובת הנוגדנים, המתקבלת בחיסון מסוים של בעל-חיים מסוים, היא במקרים רבים ייחודית ולא ניתנת לשחזור מדויק באמצעות חיסון חוזר של אותו בעל-חיים או של פרטים אחרים מבני מינו, ואפילו לא בדימומים חוזרים של אותו בעל-חיים שחוסן.

במגמה להתגבר על שני החסרונות האלה, פותחה שיטה, המאפשרת להכין ולייצר תכשירי נוגדנים באופן המספק תמיסה של נוגדן רצוי, שבה כל מולקולות הנוגדן זהות ואחידות הן במבנה והן בספציפיות ובזיקה שלהן לדטרמיננטה האנטיגנית. פיתוח שיטה זו מבוסס על העובדה, שכל תא פלסמה בודד, המייצר נוגדנים, מייצר רק סוג אחד של מולקולות נוגדן זהות. כך אם נדע לבודד תא יחיד כזה, לרבותו בתנאים מבוקרים ולהשרות עליו תנאים שבהם הוא ייצר ויפריש נוגדנים, נוכל להגיע להפקת אוכלוסיה הומוגנית של נוגדנים רצויים.

הבעיה העיקרית במימוש קו מחשבה זה היא, שתאי הפלסמה מפרישי הנוגדנים איבדו את כושר החלוקה, ולכן לא ניתן לגדלם בתרבית, כמקור לכמויות גדולות של נוגדנים זהים. פתרון לבעיה זו נמצא על-ידי שימוש בתאים סרטניים של מערכת החיסון, הקרויים ***מילומות***, המתרבים במהירות ומאופיינים בכושר התחלקות והתרבות בתרבית תאים מלאכותית כמעט ללא הגבלה. כושרם זה של תאי המילומה נוצל לצורך ייצור נוגדנים על-ידי פיתוח טכניקה אשר אפשרה מיזוג ואיחוי בין תא המייצר נוגדן מסוים רצוי (להלן: תא הפלסמה) ובין תא מילומה.

כתוצאה מאיחוי בין תא פלסמה ותא מילומה, נוצר תא כלאיים הנקרא ***היברידומה***. תא ההיברידומה מבטא שתי תכונות רצויות של שני סוגי התאים שמהם נוצר: הכושר לייצר ולהפריש נוגדן מסוים שמקורו בתא הפלסמה, וכושר לא-מוגבל להתחלק ולהתרבות בתרבית שמקורו בתא הסרטני. על-ידי שימוש בתא כלאיים בודד כזה וריבויו בתרבית לאוכלוסית תאי בת, ניתן לפתח שורה של תאים זהים המייצרים כולם את הנוגדן הרצוי המסוים. אוכלוסיה כזו של תאים, הזהים מבחינה גנטית, נקראת ***שבט*** או ***קלון***, והנוגדנים שהיא מייצרת נקראים בהתאם ***נוגדנים חד-שבטיים*** או ***מונוקלונליים***. הנוגדנים המופקים מסרום של חיה מחוסנת, מיוצרים על-ידי תאי פלסמה שמקורם במספר שבטים שונים של תאי B, ולפיכך הם נקראים ***נוגדנים רב-שבטיים*** או ***פוליקלונליים***.

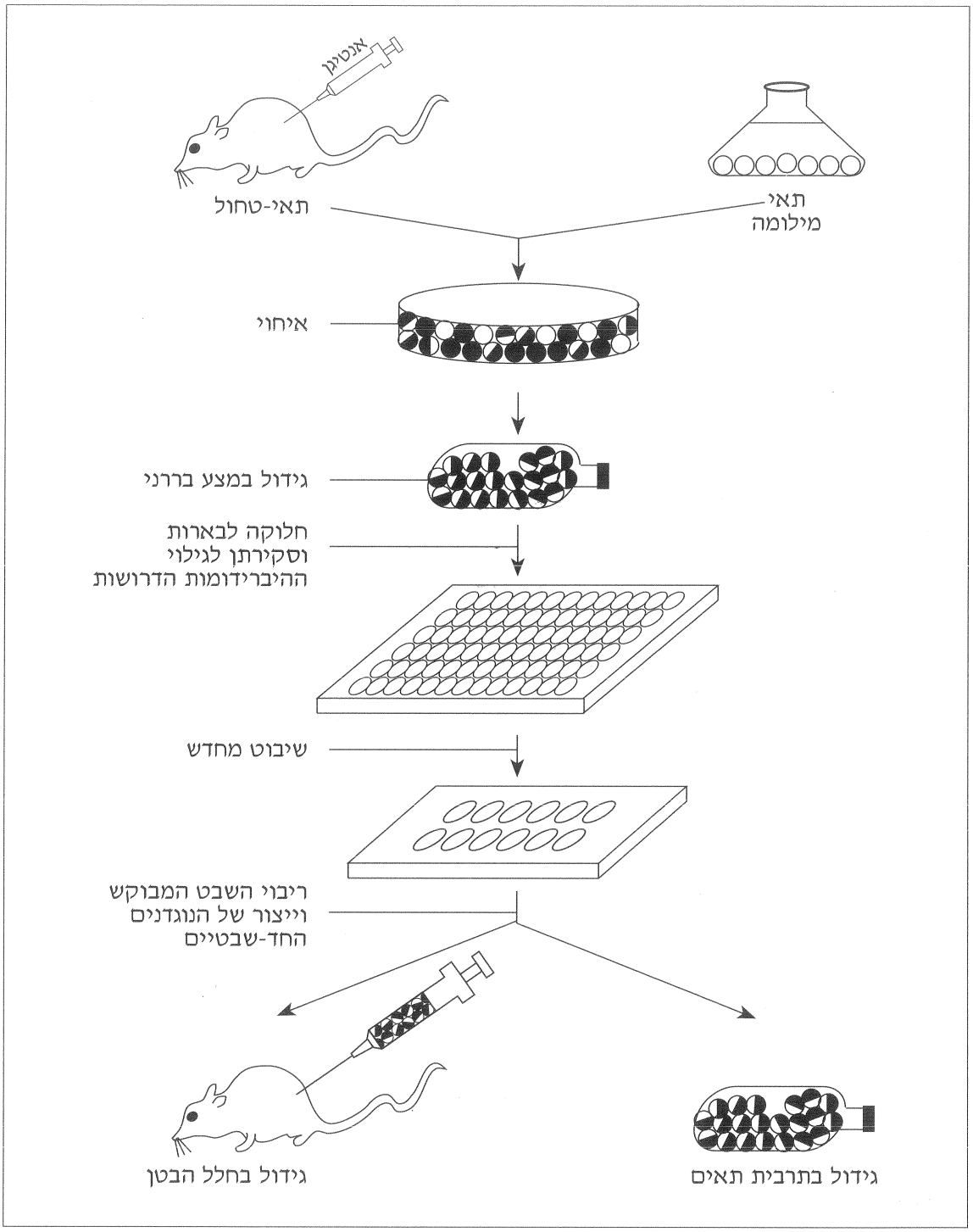
תהליך ההכנה של הנוגדנים החד-שבטיים מאופיין במספר שלבים (ראה איור 3-10 בעמוד הבא).
להלן נתאר אותם:

תחילה מחסנים חית מעבדה (בדרך-כלל עכבר) באנטיגן הרצוי, עד להופעת רמת נוגדנים גבוהה די הצורך בדמה של החיה. בשלב זה מוציאים את הטחול מהחיה ומכינים תרחיף של תאי טחול בודדים.
במקביל מגדלים תרבית מתאימה של תאי מילומה מעכבר. במקור, תאי מילומה, שהנם גידול סרטני של לימפוציטים מסוג B, מייצרים אף הם אימונוגלובולינים מסוימים בעלי ספציפיות לא-ברורה הנקראים ***חלבוני מילומה***.

הכלאת תאי מילומה אלה עם תאי פלסמה מסתיימת בייצור של נוגדני כלאיים, המורכבים משרשרות שהוכתבו על-ידי שני תאי המוצא. היות שמעוניינים בנוגדנים מוגדרים, שמקורם בתאי הפלסמה בלבד, מבצעים את תהליך האיחוי עם תאי מילומה מוטנטים, המסוגלים להתרבות בתרבית ללא הגבלה, אך איבדו את כושרם לייצר שרשרות נוגדן. לכן בהכלאה עם תאי הטחול הם תורמים את "חיותם" בלבד ולא "מתערבים" בתהליך ייצור הנוגדנים.

האיחוי מתבצע על-ידי ערבוב תאי הטחול בעודף עם תאי מילומה מתאימים, המצויים בשלב הלוגריתמי של הגידול, בנוכחות החומר פוליאתילן גליקול - חומר המשרה תהליך איחוי של קרומי תאים. כדי לברור מתוך תערובת התאים את תאי הכלאיים שנוצרו, מגדלים את תוצרי האיחוי במצע בררני, המאפשר את גידולם וריבויים של תאי כלאיים בלבד ומדכא את הגידול של תאי המוצא. תאי הטחול הם בעלי טווח חיים מוגבל בתרבית רקמה, ומתים מאליהם לאחר מספר ימים. התמותה של תאי מילומה במצע הבררני מושגת על-ידי שימוש במוטנטים, הפגומים בכושרם לייצר אנזים מסוים החיוני לגידול במצע הבררני. כך רק תאי המילומה, שהתאחו עם תאי טחול שיכולים לייצר אנזים זה, דהיינו תאי ההיברידומה הרצויים, יוכלו לגדול ולהתרבות במצע זה.

בין תאי הטחול המוכלאים יש לימפוציטים רבים, שרק חלק קטן מהם הם תאי הפלסמה המייצרים את הנוגדן בעל הספציפיות הרצויה. במהלך האיחוי חלה התחברות אקראית בין תאים מכל הסוגים, ולכן לאחר ברירת תאי הכלאיים, יש לבצע תהליך סריקה לגילוי אותם תאי היברידומה "מוצלחים", המייצרים ומפרישים את הנוגדנים הרצויים. תהליך הסריקה מתבצע על-ידי חלוקת תוצרי האיחוי - תאי ההיברידומה שנתקבלו - כתאים בודדים בבארות, קבלת מושבת תאים מכל תא, ובדיקת כושר ייצור הנוגדנים על-ידי כל מושבה הממוקמת ב"באר" (ראה איור 3-10) עד זיהויה של מושבה שלתאיה כושר ייצור טוב של הנוגדן המבוקש.



*איור 10-3 **

שלבים בתהליך ההכנה של נוגדנים חד-שבטיים

* **תורת החיסון - שיטות אימינולוגיות לזיהוי אנטיגנים ונוגדנים**, יחידה 13, עדנה יפה, מהדורה שניה, האוניברסיטה הפתוחה 1992, עמ' 69.

הסריקה, לגילוי נוכחות הנוגדן הייחודי במצע שב"באר", מתבצעת בדרך-כלל על בסיס הכרת האנטיגן תוך שימוש בשיטות בוחן, שנפרט בהמשך.

תהליך הכרחי זה, של קבלת תרבית תאים טהורה המייצרת נוגדנים אחידים ובעלי ספציפיות מוגדרת, המבוסס על הפרדת תאי ההיברידומה לתאים בודדים הגדלים מחדש בנפרד ליצירת שבט של תאים זהים, נקרא ***שיבוט***.

לאחר הכנת שבט רצוי של תאי היברידומה, ניתן לאחסן אותו בהקפאה עמוקה לתקופה ממושכת של חודשים ואף שנים, מבלי לפגוע בחיוניותו. בעת הצורך מופשרים התאים ומשמשים כמקור בלתי-מוגבל להכנת כמות גדולה של נוגדנים חד-שבטיים.

ייצור של נוגדנים חד-שבטיים על-ידי שבט נבחר של תאי היברידומה מתבצע בשתי שיטות אפשריות (ראה איור 10-3):

א. הזרקה של תאי ההיברידומה לחלל הבטן של עכבר, בו הם מתרבים במהירות, הודות לרקע הסרטני שלהם ויוצרים גידולים המפרישים את הנוגדנים המבוקשים לנוזל שבחלל הבטן. לשיטה זו שני חסרונות עיקריים: הקושי לעבוד עם מספר רב של עכברים, וזיהום הנוגדנים המתקבלים בנוגדנים אחרים המיוצרים על-ידי לימפוציטים של העכבר.

ב. גידול של תאי היברידומה בתרבית תאים מלאכותית ומבוקרת, כאשר במהלך הגידול הם מפרישים נוגדנים המצטברים במצע התרבית. באופן זה ניתן כיום לייצר כמויות מסחריות בקנה-מידה גדול של נוגדנים ספציפיים (על טכנולוגיות גידול תאים בתרבית מלאכותית נעמוד מקרוב בפרק הבא).

בגמר הייצור אוספים את נוזל התרבית או את הנוזל מחלל הבטן של העכבר, מרחיקים ממנו את התאים על-ידי סרכוז, ומשתמשים בו כתכשיר גולמי של נוגדנים חד-שבטיים. עבור יישומים הדורשים דרגת נקיון גבוהה יותר של נוגדנים, מפרידים ומנקים את הנוגדנים החד-שבטיים מהנוזל בשיטות מקובלות להפרדת חלבונים ובאמצעות עמודות זיקה.

יתרונותיהם העיקריים של הנוגדנים החד-שבטיים הם: היותם אוכלוסיה אחידה של נוגדנים, והיכולת לייצרם בכמויות בלתי-מוגבלות בעת הצורך. לעומתם הנוגדנים הרב-שבטיים, המופקים מסרום של בעל-חיים מחוסן, מהווים תערובת הטרוגנית שאינה ניתנת לשחזור מדויק בחיסונים חוזרים.

כיום מחליפים נוגדנים חד-שבטיים את תכשירי הנוגדנים הרגילים ברוב היישומים הקיימים במחקר הביולוגי, ברפואה הקלינית ובתהליכי ייצור תעשייתיים.

3.5 אבחון (דיאגנוסטיקה) בעזרת נוגדנים

כושרם של הנוגדנים להגיב באופן ייחודי עם אנטיגן ואגב-כך ליצור תצמיד אנטיגן-נוגדן נוצל לפיתוח שיטות מעבדה פשוטות לזיהוי ולמדידה כמותית (קביעת ריכוז מוחלט או יחסי) של חומרים שונים בתמיסות, המכילות דגימות מנוזלי גוף, כגון דם ושתן, ואף על-פני רקמות. שיטות אלה קרויות ***שיטות סרולוגיות*** או ***שיטות אימונולוגיות***, והן מצטיינות בפשטות, בספציפיות וברגישות גבוהות, ומאפשרות אבחון נוכחותו של גורם, הנושא דטרמיננטה אנטיגנית, גם בתערובות מורכבות ובריכוז נמוך ביותר.

מן הראוי לציין כי גם הנוגדנים עצמם עשויים לתפקד כאנטיגנים ולעורר יצירת נוגדנים נגדם בבעל-חיים אחר, ולכן ניתן להשתמש בשיטות סרולוגיות גם לזיהוי ולקביעה של נוגדנים.

בעשורים האחרונים פותחו שיטות סרולוגיות רבות המשמשות בעיקר לאבחון רפואי ולמחקר ביולוגי. בפרק זה נציג את עקרונות פעולתן של אחדות מן השיטות הנפוצות ביותר. צריך לזכור כי הן מהוות מדגם קטן בלבד מאוסף גדל והולך של שיטות סרולוגיות.

קיימים שני תנאים עיקריים ליישום מוצלח של שיטה סרולוגית:

א. תנאי ראשון והכרחי ליישום כל שיטה סרולוגית הוא היכולת להכין ולהפיק נוגדנים ייחודיים ונקיים ככל האפשר כנגד האנטיגן הנבדק.

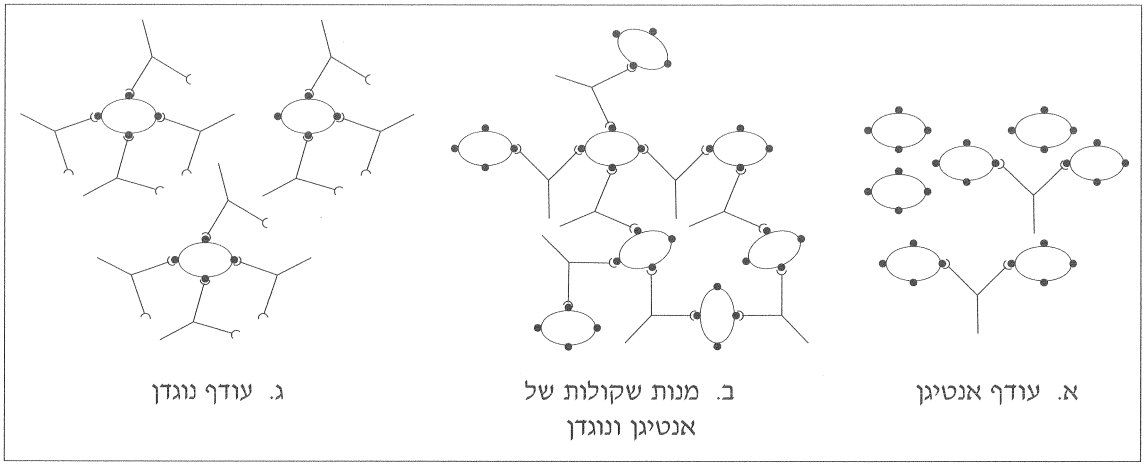
ב. תנאי שני הוא היכולת לזהות את היווצרות התצמיד נוגדן-אנטיגן, באופן כמותי ככל שניתן. ההבדל העיקרי בין השיטות הסרולוגיות השונות הוא אופן הזיהוי של התצמידים שנוצרו.

מחלקים את השיטות הסרולוגיות לכמה קבוצות על-פי ההבדלים באופן הזיהוי של התצמיד נוגדן-אנטיגן. נתאר עתה את הקבוצות העיקריות של השיטות הסרולוגיות.

3.5.1 שיטות המבוססות על שקיעת תלכידי אנטיגן-נוגדן

ביחסי ריכוזים מתאימים של אנטיגן ונוגדן בתמיסה נוצרים תלכידים גדולים, הבנויים ממספר רב של תצמידי אנטיגן-נוגדן הקשורים זה לזה. תלכידים אלה שוקעים בדרך-כלל מן התמיסה עם היווצרותם, וקל לאבחן את היווצרותם.

תחום יחסי הריכוזים של נוגדן ואנטיגן, המוביל ליצירת תלכידים גדולים די הצורך לשקיעה, הוא תחום צר למדי, הנקרא ***תחום המנות השקולות*** (ראה איור 3-11 ב). בתחום יחסי הריכוזים שיש בו עודף גדול של אנטיגן ביחס לנוגדן (ראה איור 3-11 א), האנטיגן "מרווה" את אתרי הקישור של הנוגדן, ולא נוצר תלכיד רב-מולקולרי, מאחר שלא נוצרים "גשרים" בין מולקולות האנטיגן באמצעות מולקולות הנוגדן. בתחום יחסי הריכוזים שיש בו עודף של נוגדן על-פני האנטיגן (ראה איור 3-11 ג), גם-כן נמנעת יצירת התלכיד, בשל מניעת היווצרות "גשרים".



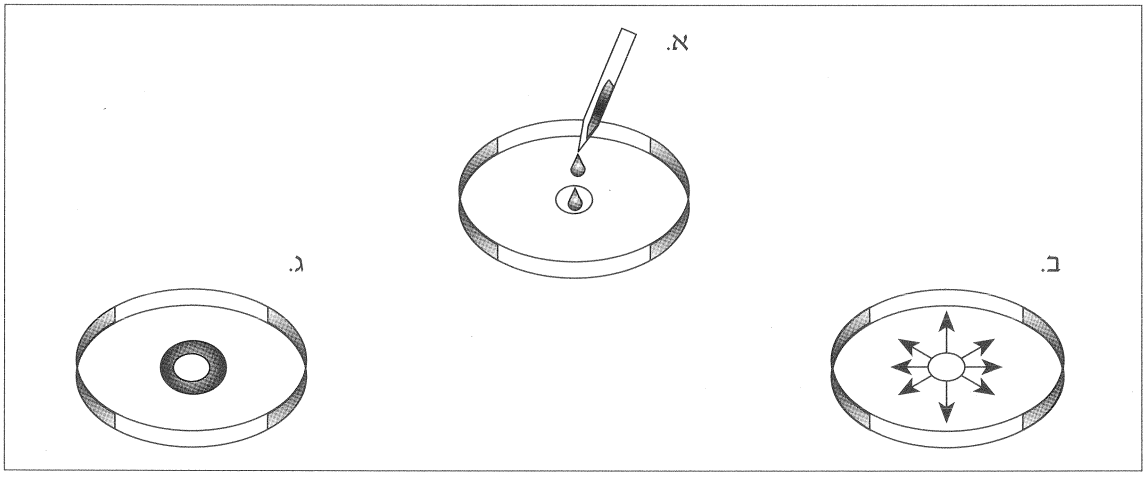
איור 3-11

השפעת היחס שבין ריכוז מולקולות האנטיגן ( ) ובין ריכוז מולקולות הנוגדן ( )
על היווצרות תלכיד ששוקע

תופעת השקיעה של תלכידי אנטיגן-נוגדן מנוצלת במעבדות מחקר ובמעבדות קליניות, לצורך הפרדה של אנטיגנים או נוגדנים, זיהוי ראשוני שלהם והערכת כמותם. זאת באמצעות שיטות שונות, כגון: אימונודיפוזיה רדיאלית בג'ל המשמשת לקביעה כמותית, אימונודיפוזיה כפולה בג'ל המשמשת לזיהוי איכותי, ואימונואלקטרופורזה. הבה נתאר את שלוש השיטות שהזכרנו כאן.

אימונודיפוזיה רדיאלית בג'ל

שיטה זו משמשת בעיקר לקביעת ריכוז לא-ידוע של אנטיגן או של נוגדן בתמיסה. עקרון פעולתה מוצג באיור 3-12.



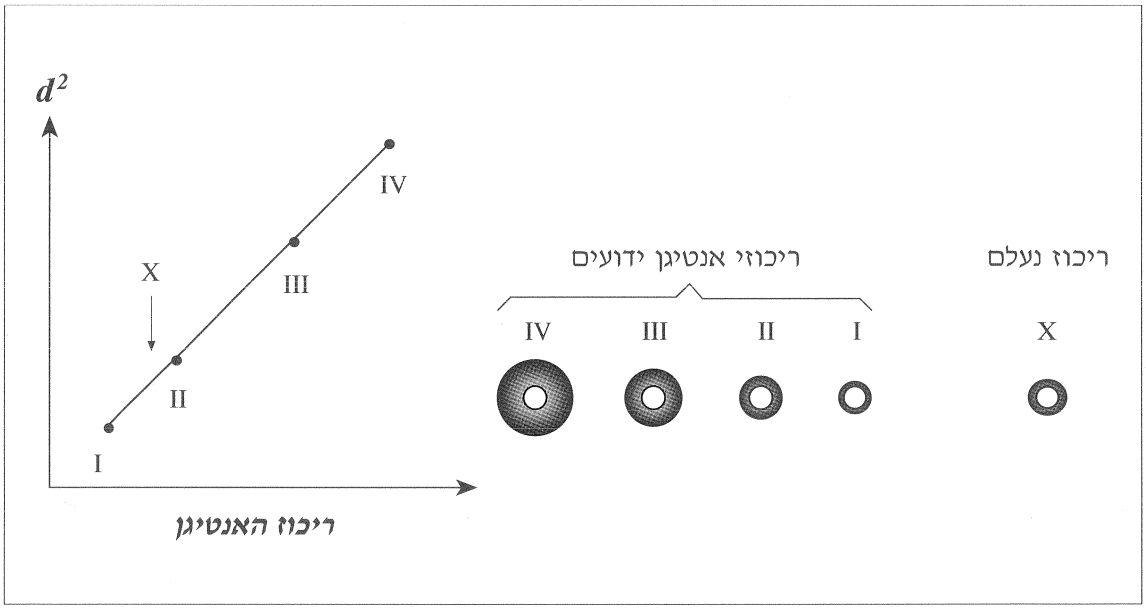
איור 3-12

שלבי הביצוע של אימונודיפוזיה רדיאלית בג'ל:
א. הוספת אנטיגן לג'ל המכיל ריכוז קבוע ואחיד של נוגדנים
ב.-ג. האנטיגן מתפשט בג'ל בדיפוזיה רדיאלית ויוצר טבעת משקע

תיאור השיטה:

ממלאים תבנית (כגון "צלחת פטרי") בתמיסה, המכילה נוגדנים ופולימר הנקרש בקירור. מניחים לתמיסה להתקרר. כשהתמיסה מתקררת, נוצרת בה שכבה דקה של ג'ל, שבתוכה מפוזרים הנוגדנים באופן אחיד. מכינים גומה עגולה במרכז הג'ל, מוסיפים אליה נפח ידוע מתמיסת האנטיגן הנבדק (ראה איור 12-3 א), ומניחים למערכת לעמוד כ-24 שעות. במהלך תקופה זו האנטיגן נע בדיפוזיה רדיאלית מן הגומה (בכיוון מן המרכז החוצה) אל תוך הג'ל (ראה איור 12-3 ב). כאשר ריכוז האנטיגן גבוה והוא עולה על הריכוז של הנוגדן בג'ל, ייווצרו תצמידים מסיסים. אלה ממשיכים לנוע בדיפוסיה בתוך הג'ל, מן הגומה החוצה, ובמהלך תנועתם הם קושרים יותר ויותר נוגדנים. תהליך זה נמשך, עד שנוצר איזון ריכוזים בין האנטיגן לנוגדן (תחום המנות השקולות); אז תלכידי אנטיגן-נוגדן שוקעים בצורת טבעת של משקע לבן, המקיפה בבירור את הגומה (ראה איור 12-3 ג).

נמצא כי קיימת תלות לינארית בין d^2 (d - הקוטר של טבעת המשקע) לבין ריכוז האנטיגן בתמיסה הנבדקת. תלות לינארית זו משמשת לבנית עקומת כיול לריכוזם של אנטיגנים, שעל-פיה ניתן לקבוע ריכוז לא-ידוע של האנטיגנים (ראה איור 13-3).



איור 13-3

קביעת ריכוז לא-ידוע של אנטיגן בשיטה של אימונודיפוזיה רדיאלית בג'ל בעזרת עקומת כיול

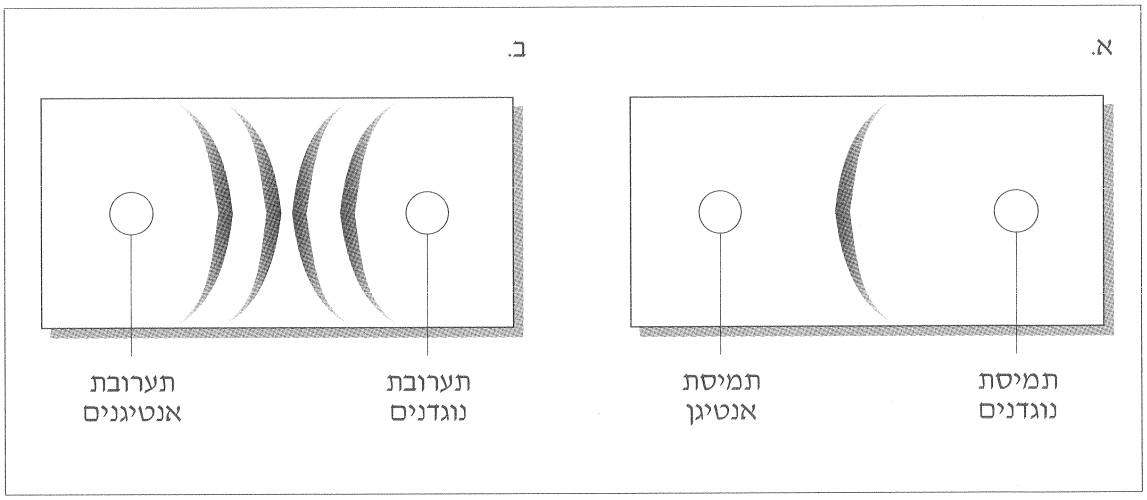
עקומת הכיול נבנית על-פי התוצאות של אימונודיפוזיה רדיאלית של סדרת ריכוזים ידועים של האנטיגן ומשמשת לקביעת ריכוז בלתי-ידוע שלו (X)

בשיטה זו ניתן לקבוע גם ריכוז בלתי-ידוע של נוגדנים בתמיסה, אם מבצעים את התהליך בצורה הפוכה, כלומר, מערבבים בג'ל את האנטיגן המתאים ומוסיפים לגומה את תמיסת הנוגדן הנבדקת.

אימונודיפוזיה כפולה בג'ל ("מבחן אוכטרלוני")

שיטה זו משמשת לבדיקת נוכחות של אנטיגנים בתמיסה, לבדיקת נוכחות של נוגדנים מסוימים בתוך תערובת, ולקביעת מידת הדמיון בין אנטיגנים שונים.
לשם כך מכינים בג'ל שתי גומות זו מול זו. בגומה אחת שמים תמיסת אנטיגן, ובשנייה - תמיסה של נוגדנים שייצרו נגד האנטיגן שבגומה הראשונה. מרכיבי התמיסות שבכל אחת מהגומות נעים בדיפוזיה רדיאלית בתוך הג'ל, ומסביב לכל גומה מתהווה מפל ריכוזים. כך שבסמוך לגומה ריכוזם גבוה, והוא יורד והולך ככל שהמרחק מהגומה גדל. בין שתי הגומות, במקום שבו האנטיגן והנוגדן הייחודי לו נפגשים בריכוזים יחסיים מתאימים ליצירת תלכיד (תחום המנות השקולות), נוצר פס לבן של משקע (ראה איור 3-14 א). מיקומו של פס זה תלוי בריכוזי המגיבים ובמשקלם המולקולרי.

כאשר שמים בגומה אחת תערובת של אנטיגנים ובגומה השנייה תערובת נוגדנים, שהופקה בעקבות חיסון חיית מעבדה כנגד אותה תערובת אנטיגנים, כל סוג של נוגדנים ייקשר לאנטיגן הייחודי לו, תוך יצירת פס של משקע במרחק אופייני מגומות המוצא. כך יתקבלו בין שתי הגומות כמה פסי שקיעה, שמספרם כמספר האנטיגנים שבתערובת (ראה איור 3-14 ב).



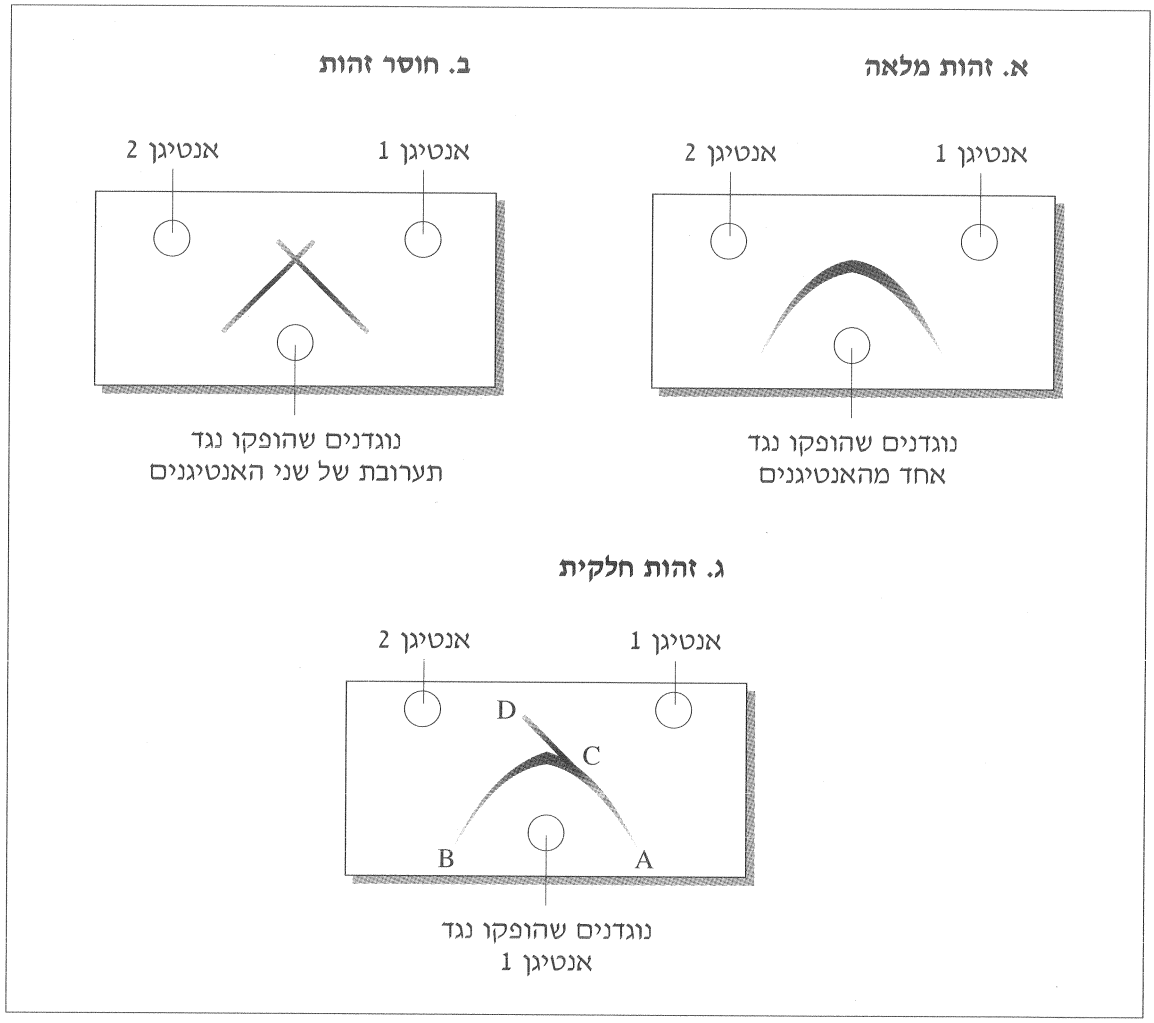
איור 3-14

תוצאות אימונודיפוזיה כפולה בג'ל

א. במקרה של אנטיגן יחיד ב. במקרה של תערובת אנטיגנים

לבדיקת מידת הדמיון בין שני אנטיגנים בעזרת שיטה זו, מכינים בג'ל שלוש גומות. בשתיים מן הגומות שמים את תמיסות האנטיגנים הנבדקים ובגומה השלישית תערובת של נוגדנים, שהופקה כנגד אחד מן האנטיגנים הללו, או כנגד תערובת של שניהם.

לפי צורת פס המשקע המתקבל בין גומות האנטיגן לגומת האנטיסרום, ניתן לקבוע אם האנטיגנים זהים לגמרי מבחינה אימונולוגית (כלומר מכילים אותן דטרמיננטות אנטיגניות), זהים חלקית (כלומר רק חלק מהדטרמיננטות שלהן זהות ואילו האחרות שונות), או שונים לחלוטין (לא מכילים אף דטרמיננטה אנטיגנית משותפת) כפי שמתואר באיור 3-15 בעמוד הבא.



איור 3-15

קביעת מידת הזהות האימונולוגית של שני אנטיגנים בעזרת השיטה של אימונודיפוזיה כפולה בג'ל

כאשר שני פסי המשקע מתלכדים באזור המפגש ויוצרים פס משקע אחד רציף בין גומות האנטיגן לגומת האנטיסרום (ראה איור 3-15 א), הדבר מעיד על זהות אימונולוגית מלאה בין האנטיגנים.

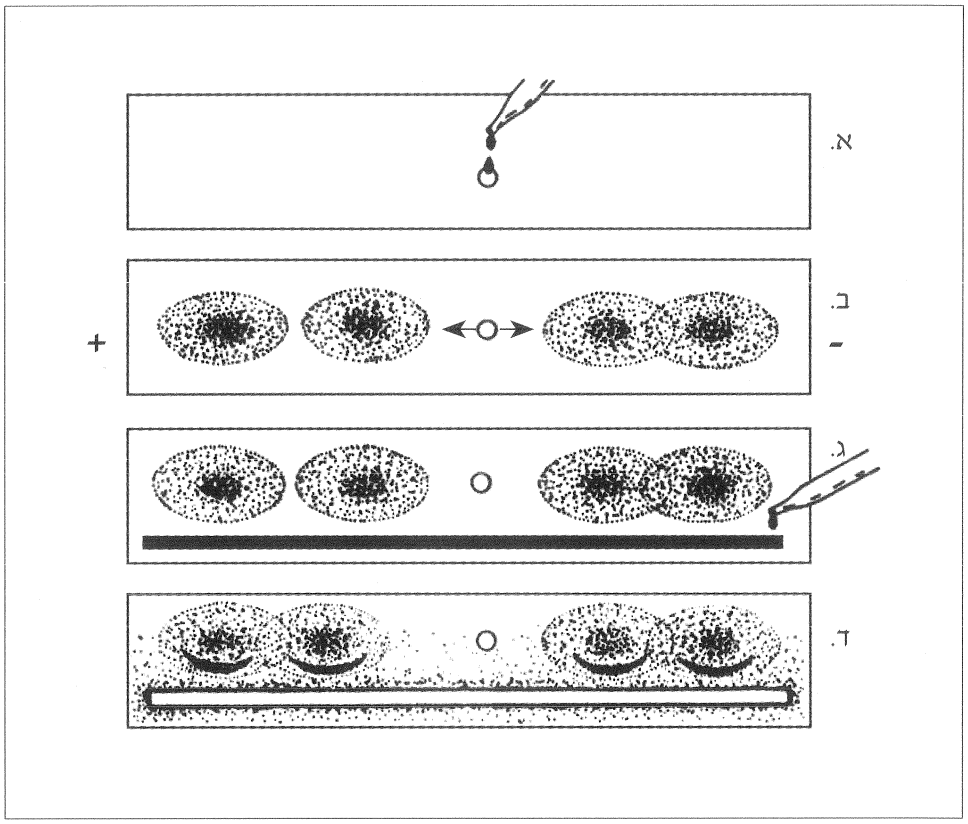
היווצרות של שני פסי משקע מצטלבים (ראה איור 3-15 ב) מעידה על חוסר זהות מוחלטת בין שני האנטיגנים, כך שכל סוג של נוגדנים מגיב בנפרד ובאופן בלתי-תלוי ויוצר משקע עם האנטיגן הייחודי לו, בלא להתערב ביצירת משקע עם האנטיגן האחר.

היווצרות שני פסי שקיעה - האחד כפוף (B-A באיור 3-15 ג), והשני ישר ומחובר אל הראשון באזור הכיפוף (D-C באיור 3-15 ג), מעידה על שותפות אימונולוגית בין שני האנטיגנים. הפס הכפוף מתקבל מתגובת הנוגדנים עם דטרמיננטות אנטיגניות המשותפות לשני האנטיגנים. הפס הישר מתקבל מתגובה של נוגדנים ייחודיים עם דטרמיננטות אנטיגניות, המופיעות באנטיגן אחד ואינן מופיעות באנטיגן השני.

השיטה של אימונודיפוזיה כפולה בג'ל אינה מתאימה למקרים של תערובת מורכבת, המכילה אנטיגנים רבים, זאת מכיון שבמצב זה מתקבלים פסי משקע צפופים רבים, שיש ביניהם חפיפה. במקרים כאלה עדיף להשתמש בשיטה הנקראת אימונואלקטרופורזה.

אימונואלקטרופורזה

שיטה זו משלבת שני אמצעי הפרדה: אלקטרופורזה ודיפוזיה כפולה בג'ל (ראה איור 3-16).



*איור 3-16 **

אימונואלקטרופורזה

א-ב הפרדה באמצעות אלקטרופורזה

ג-ד הפרדה וזיהוי באמצעות דיפוזיה כפולה בג'ל

תיאור השיטה:

תחילה מופרדים האנטיגנים שבתערובת על-פי מטענם החשמלי באמצעות אלקטרופורזה: מכניסים את תערובת האנטיגנים הנבדקת לגומה בג'ל (ראה איור 3-16 א), מפעילים שדה חשמלי, והאנטיגנים נודדים בג'ל לפי מטענם (ראה איור 3-16 ב).

* **תורת החיסון - שיטות אימינולוגיות לזיהוי אנטיגנים ונוגדנים**, נספח, עדנה יפה, מהדורה שניה, האוניברסיטה הפתוחה 1992, עמ' 11.

בגמר האלקטרופורזה, מפסיקים את הזרם החשמלי, ועוברים לביצוע השלב הבא, שבו מגלים את נוכחות האנטיגנים שהופרדו. לשם כך מגיבים אותם עם הנוגדנים הספציפיים באמצעות דיפוסיה כפולה בג'ל: מכינים בג'ל תעלה דקה במקביל לציר תנועת האנטיגנים, וממלאים אותה בנוגדנים, שהופקו כנגד תערובת האנטיגנים הנתונה (ראה איור 3-16 ג). הנוגדנים שבתערובת חודרים בדיפוזיה לג'ל שסביב לתעלה, ובמקום שבו הם פוגשים באנטיגן הספציפי בריכוז מתאים, נוצר פס משקע בצורת קשת (ראה איור 3-16 ד). המרחק של פס המשקע מהתעלה תלוי בריכוז האנטיגן המסוים ובמשקלו המולקולרי. כך פסי המשקע המתקבלים מצביעים על נוכחות האנטיגנים השונים בתערובת הנבדקת.

כיוון שהאימונואלקטרופורזה משלבת שני אמצעי הפרדה היא יעילה מאוד בזיהוי נוכחות של אנטיגנים או של נוגדנים ייחודיים, המצויים בתערובת מורכבת: אם בשלב הראשון לא הושגה הפרדה מלאה של האנטיגנים בהרצה האלקטרופורטית, יש סיכוי גדול להשלמת ההפרדה בשלב השני - שבו יתגלו כולם כפסי משקע נפרדים, הממוקמים במרחקים שונים מן התעלה.

3.5.2 שיטות המבוססות על כושר ההצמתה של נוגדנים

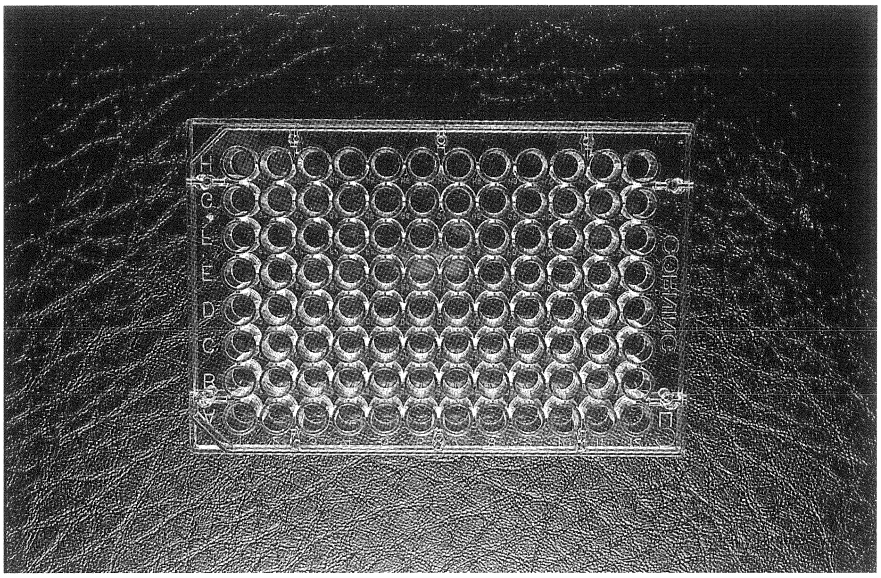
הצמתה (אגלוטינציה) היא התקבצות של חלקיקים שונים (כגון חלקיקים סינתטיים מזכוכית או מפלסטיק, חיידקים, ותאי דם אדומים) ליצירת חלקיק-על בעזרת נוגדנים, המגשרים בין דטרמיננטות אנטיגניות זהות, המצויות על-פני חלקיקים שונים. בתהליך ההצמתה נוצר בדרך כלל תלכיד (או תצמיד) גדול יחסית, שניתן לראותו במיקרוסקופ אור, או אף בעין בלתי מזוינת, כשכבת משקע דקה בתחתית המבחנה ועל צדדיה.

רגישותה ומהירותה של שיטת ההצמתה הפכו אותה לאמצעי בדיקה נפוץ במעבדה לגילוי ולזיהוי נוכחותם של נוגדנים ייחודיים או של אנטיגנים, גם בכמויות זעירות ביותר.

לעיתים קרובות החלקיקים המוצמתים בשיטה זו הם תאי דם אדומים, משום שקל להבחין בתוצר של הצמתתם. הצמתה של תאי דם אדומים מכונה ***המאגלוטינציה.***

ניתן לקשור בשיטות כימיות שונות אנטיגנים על-פני חלקיקים סינתטיים או על-פני תאי דם אדומים ולהשתמש בהצמתה שלהם להדגמת נוכחותם של נוגדנים ייחודיים לאנטיגנים אלה. הצמתה כזו, הנגרמת על-ידי אנטיגנים "מקובעים", נקראת ***אגלוטינציה פסיבית.***

מבחני הצמתה פשוטים מתבצעים בדרך כלל במבחנות או על-פני זכוכיות נושא. כאשר יש לבדוק מספר רב של תערובות ריאקציה, נהוג להשתמש בתבניות מיוחדות, העשויות חומר פלסטי ומכילות כמה שורות של "בארות" בעלות נפח אחיד, כאשר כל "באר" משמשת כמבחנת ניסוי (ראה איור 3-17).



איור 3-17

תבנית המשמשת לביצוע מספר רב של מבחני הצמתה

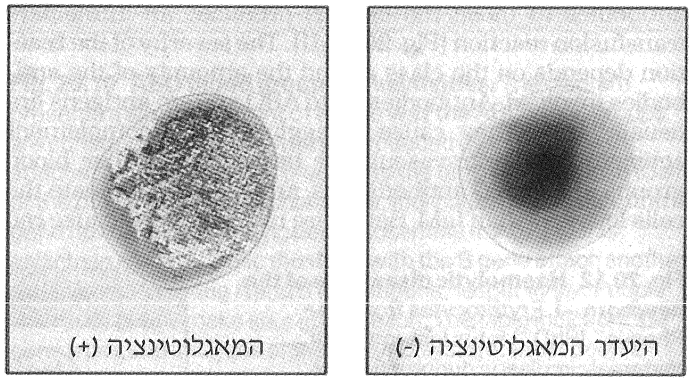
השימושים הנפוצים המתבססים על כושר ההצמתה של הנוגדנים כוללים מבחנים לזיהוי חיידקים, קביעת סוג הדם והמבחן לקביעת הריון.

מבחן לקביעת סוג הדם (ראה איור 3-18 בעמוד הבא) מבוסס על קביעת סוג האנטיגנים, המצויים על-פני תאי הדם האדומים, בעזרת נוגדנים ייחודיים: שמים על גבי זכוכית נושא כמות קבועה של תמיסות סטנדרטיות של נוגדנים כנגד אנטיגן A ונוגדנים כנגד אנטיגן B, אליהן מוסיפים טיפה מהדם הנבדק, ולאחר ערבוב והדגרה, בודקים אם התרחשה המאגלוטינציה.

מבחן לקביעת הריון מבוסס על נוכחות ההורמון human Chorionic Gonadotrophin (hCG) בשתן. הורמון זה מופרש מהשליה מיד בתחילת ההריון, ומופיע בדם ובשתן כבר בשבוע השני לאחר ההפרייה. במבחן לקביעת הריון (ראה איור 3-19 בעמוד הבא) מערבבים יחד תאי דם אדומים (או חלקיקים סינתטיים) המצופים ב-hCG עם נוגדנים ל-hCG - המשווקים כיום באופן מסחרי - ודגימה מהשתן הנבדק.

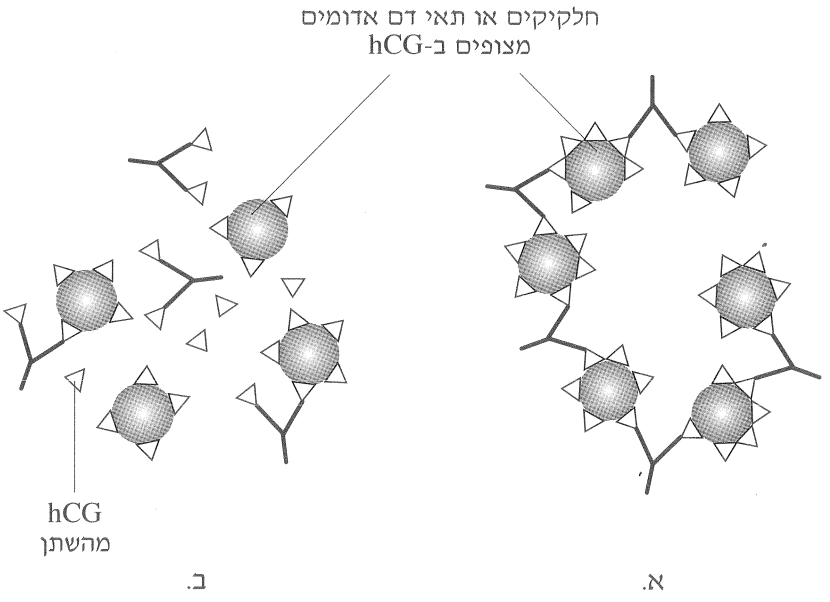
כשהאישה אינה מעוברת, אין בשתן hCG, ולכן הנוגדנים יתקשרו להורמון שעל תאי הדם האדומים ויגרמו להצמתתם (ראה איור 3-19 א). כאשר האשה הרה, השתן מכיל hCG. ה-hCG מתחרה עם תאי הדם האדומים על הקישור לנוגדנים ומונע את תגובת ההצמתה (ראה איור 3-19 ב).

סוג הדם	אנטיגנים על-פני כדוריות אדומות	תגובה עם נוגדנים מסוג אנטי A	תגובה עם נוגדנים מסוג אנטי B
A	A	+	–
B	B	–	+
AB	B , A	+	+
O	O	–	–



איור 3-18

מבחן לקביעת סוג הדם



איור 3-19

מבחן לקביעת הריון על פי נוכחות ההורמון hCG בשתן:

א. כאשר האישה אינה מעוברת (יש הצמתה)

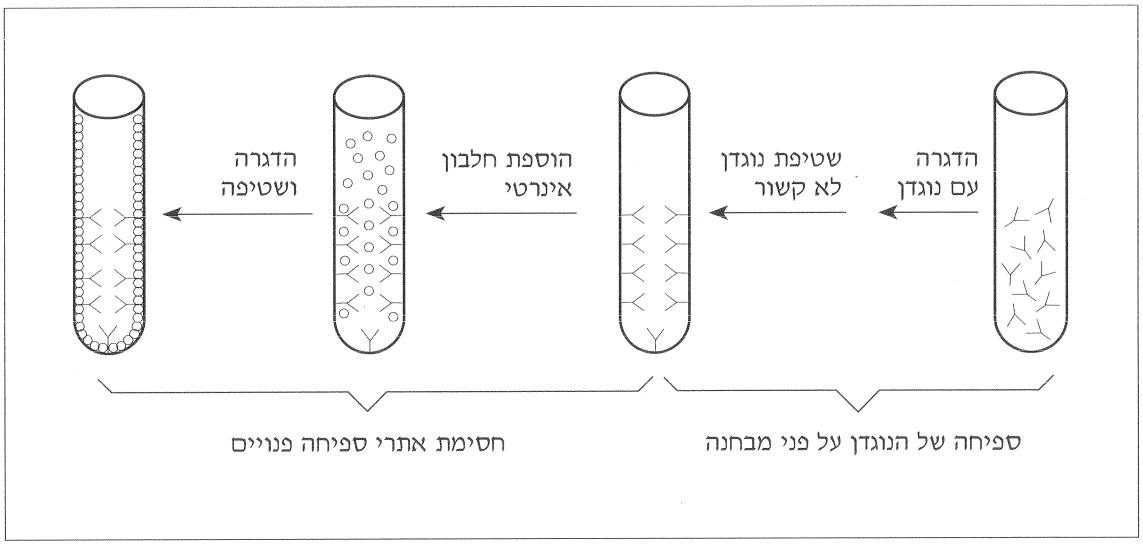
ב. כאשר האשה הרה (אין הצמתה בהשואה לביקורת)

3.5.3 שיטות המבוססות על סימון האנטיגנים או הנוגדנים

העיקרון הכללי של שיטות אלה הוא סימון האנטיגן - או הנוגדן - בסמן, המאפשר לעקוב אחריו ולמדוד את כמותו, בלי לפגוע בתכונות הקישור שלו ליצירת התצמיד נוגדן-אנטיגן. כדי לזהות את התצמיד, שאחד ממרכיביו מסומן, ולקבוע את כמותו, יש צורך להבחין בינו לבין המולקולות החופשיות המסומנות, דבר שאינו קל כאשר כל מרכיבי התגובה במצב מסיס.

הפרדת התצמיד מעודפי מגיבים בתמיסה מתבצעת בשיטות המקובלות להפרדה בין מולקולות על-פי גודלם או על-פי הטעינה החשמלית שלהם, ביניהן: אלקטרופורזה, השקעה על-ידי מלח, העברה על-פני עמודה של מחליפי יונים וכרומטוגרפיה בג'ל.

אפשר להשתמש גם בשיטה אחרת, שבה הנוגדן קשור בקשר יציב אל פני נשא פולימרי בלתי-מסיס, כגון: שטח פני מבחנות או בארות מפלסטיק שבתוכן מתבצעת התגובה (ראה איור 3-20).



איור 3-20

תהליך הכנת מבחנה ה"מצופה" בנוגדנים "מקובעים"

הקישור של הנוגדן אל פני הנשא מתבצע בדרך-כלל באמצעות ספיחה לא-ספציפית, ולכן לאחר הרחקת הנוגדן שלא נספח בשטיפה, מדגירים את הנשא עם חלבון אינרטי לחסימת אתרי ספיחה פנויים (ראה איור 3-20). בהמשך, לאחר שטיפה, מוסיפים את האנטיגן המסומן הנקשר לנוגדן ה"מקובע" ומתקבל תצמיד מסומן בלתי-מסיס, הקשור למצע המוצק. עודפי האנטיגן מורחקים באמצעות שטיפות. באופן דומה ניתן לקשור אנטיגן אל פני מצע מוצק, ולהגיבו עם נוגדן מסומן, לקבלת תצמיד מסומן, הקשור למצע מוצק.

שיטות, המבוססות על יצירת תצמידי אנטיגן-נוגדן מסומנים, מאופיינות ברגישות גבוהה יחסית, המכשירה אותן לזהות חומרים גם בכמויות מזעריות של מיקרוגרמים ואף פיקוגרמים, זאת תודות לשימוש בסמנים אחריהם ניתן לעקוב ברגישות גבוהה על-ידי מדידה פשוטה יחסית. ככל שההפרדה בין התצמיד המסומן ובין המגיב החופשי המסומן טובה יותר, רגישות השיטה עולה.

שלושה סוגי סמנים מקובלים כיום במחקר:

1. סמנים רדיואקטיביים - בבוחן הרדיואימוני (RIA).
2. סמנים אנזימיים - בבוחן האימונואנזימי (EIA).
3. סמנים זוהרים (פלואורסצנטיים) - בבוחן האימונופלואורסצנטי (FIA).

בוחן רדיואימוני (RIA)

הבוחן הרדיואימוני (RIA) הוא בין הרגישים ביותר, ומשמש לזיהוי ולקביעה כמותית של חומרים כגון הורמונים, רעלים, תרופות, נוגדנים מקבוצות שונות, ועוד.

בוחן זה מבוסס על סימון של האנטיגן או של הנוגדן באיזוטופ רדיואקטיבי, כאשר האיזוטופים המקובלים הם של יוד (^{125}I, ^{131}I), של מימן (^{3}H) ושל פחמן (^{14}C).

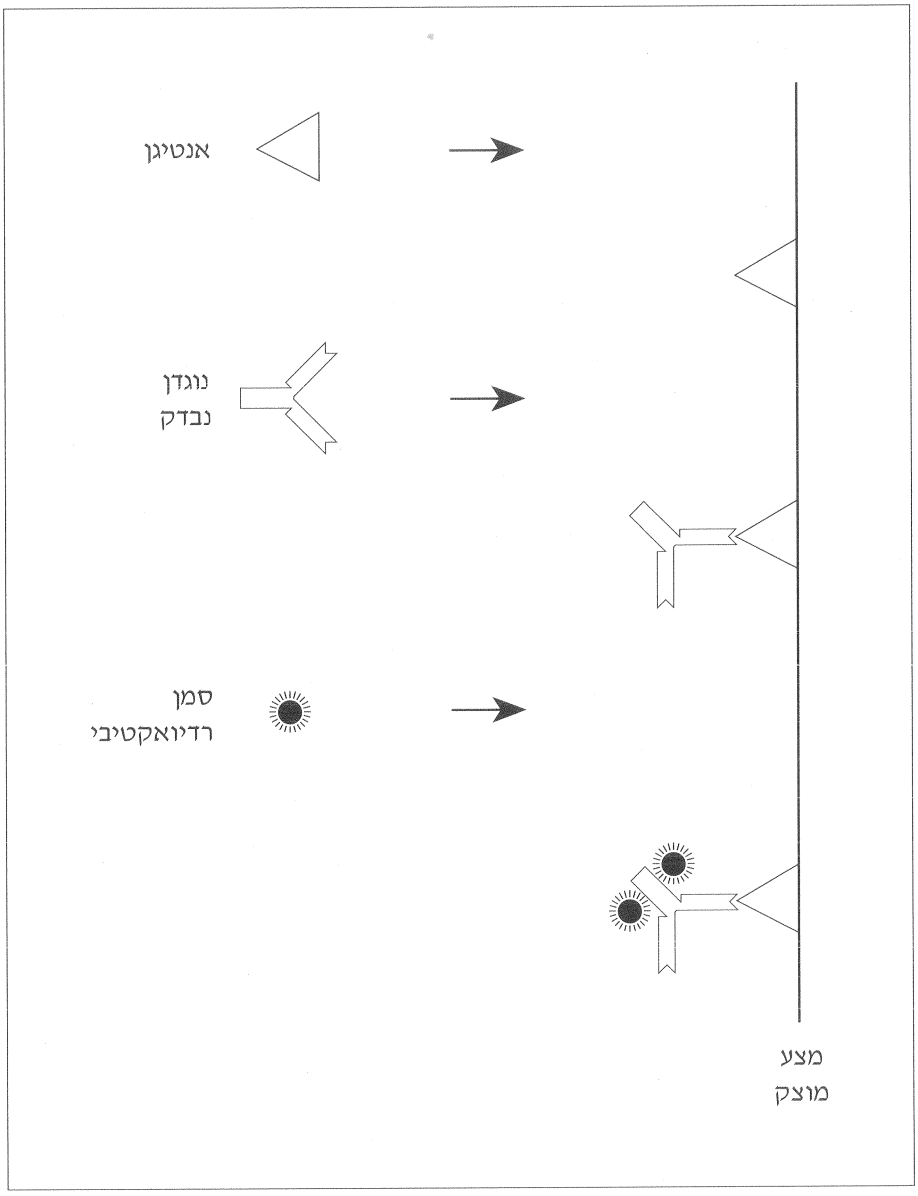
הביצוע של בוחן רדיואימוני אפשרי במספר שיטות, אנו נתאר כאן שתיים מהן.

א. השיטה הפשוטה ביותר לקביעת ריכוזו של נוגדן בתמיסה באמצעות בוחן רדיואימוני מתוארת באיור 3-21.

תחילה סופחים את האנטיגן המתאים על-פני מצע מוצק. לאחר שטיפת האנטיגן החופשי, שלא נספח, וחסימת אתרי ספיחה פנויים, מוסיפים תמיסה, המכילה נוגדן, שמעוניינים לקבוע את כמותו. הנוגדן נקשר לאנטיגן, תוך יצירת תצמידי אנטיגן-נוגדן ספוחים.

בהמשך מוסיפים מולקולה חלבונית, המסומנת רדיואקטיבית, ואשר מסוגלת להתקשר לאתר Fc של הנוגדנים (למשל: נוגדנים מסומנים אחרים, המזהים ונקשרים אל דטרמיננטות אנטיגניות באזור ה-Fc של נוגדנים).

לאחר שטיפות, להרחקת עודפי סמן שלא נקשר, מודדים את עוצמת הקרינה הרדיואקטיבית שמקורה במבחנה. מכינים עקומת כיול על-פי מדידות, המבוססות על סדרה של תמיסות, המכילות ריכוזים ידועים של הנוגדן הנבדק. משתמשים בעקומת כיול זו כדי לקבוע את ריכוזו של נוגדן ייחודי בתמיסה נבדקת.

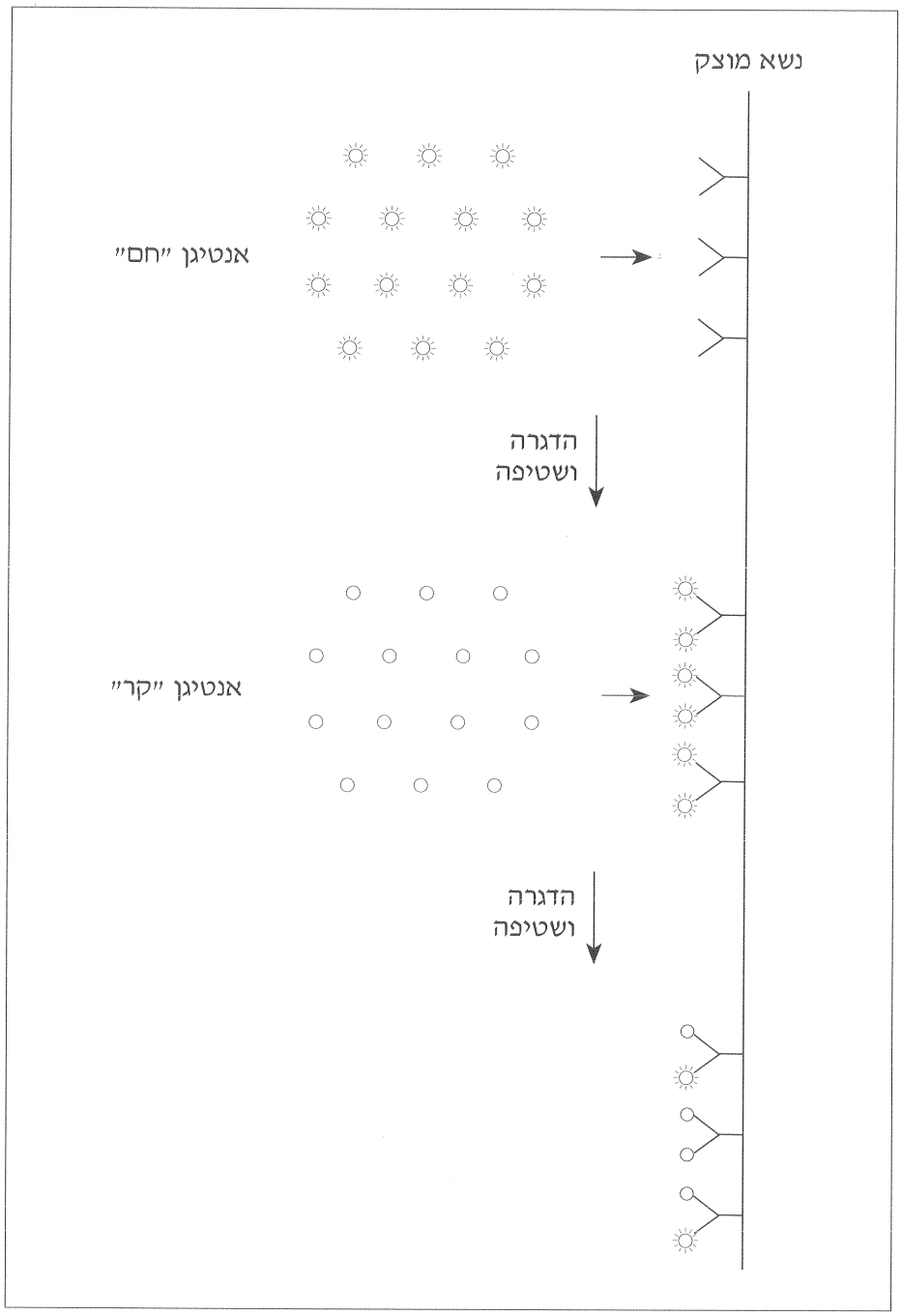


איור 21-3

שימוש בבוחן רדיואימוני לקביעת הנוכחות והריכוז של נוגדנים ייחודיים בתמיסה

ב. שיטה אחרת לקביעה כמותית של אנטיגן או של נוגדן בתמיסה היא ***שיטת התחרות.*** שיטה זו מתבססת על תחרות בין מולקולות מסומנות של אנטיגן או של נוגדן (במקרה של בוחן רדיואימוני, מולקולות "חמות" כתוצאה מסימון בחומר רדיואקטיבי) לבין מולקולות בלתי-מסומנות ("קרות") בתצמיד אנטיגן- נוגדן.

להדגמת שיטה זו נתאר להלן את קביעת הריכוז של אנטיגן בתמיסה נבדקת (ראה איור 3-22).



איור 3-22

קביעת ריכוזו של אנטיגן ייחודי בתמיסה בעזרת שיטת התחרות של הבוחן הרדיואימוני

תחילה סופחים את הנוגדן המתאים על-פני מצע מוצק. בהמשך מדגירים את הנשא המוצק עם תמיסה, המכילה עודף של אנטיגן מתאים, המסומן רדיואקטיבית. האנטיגן המסומן נקשר לנוגדן, ומתקבל תצמיד

מסומן, הנשאר קשור למצע המוצק. היות שהאנטיגן מצוי בעודף ביחס לנוגדן הספוח, הרי שכל התצמידים שייווצרו יהיו מסומנים. שוטפים להרחקת עודפים של האנטיגן המסומן, שלא נקשר, ומוסיפים לתצמידים המסומנים הספוחים תמיסה, המכילה אנטיגן לא-מסומן, אשר את כמותו מעוניינים לקבוע. מאחר שהקשר בין האנטיגן לנוגדן בתצמיד הוא הפיך, מתקיימת תחרות בין האנטיגן ה"קר" ובין האנטיגן ה"חם" על אתרי הקישור בנוגדנים, וכתוצאה ממנה מחליפות מולקולות האנטיגן הקרות חלק ממולקולות האנטיגן המסומנות שבתצמידים. לאחר הרחקת מולקולות האנטיגן החופשיות, קובעים את עוצמת הרדיואקטיביות של התצמידים, הספוחים לנשא. ככל שריכוז האנטיגן ה"קר" בתמיסה הנבדקת גבוה יותר, כן יורדת מידת הסימון של התצמידים. כך ניתן, אפוא, בעזרת עקומת כיול מתאימה לקבוע את ריכוז האנטיגן בדוגמה הנבדקת.

למרות הרגישות הגבוהה המאפיינת את הבוחן הרדיואימוני, קיימת מגמה לעבור לשימוש בשיטות סימון חילופיות, בעיקר בגלל הסיכון הטמון בשימוש מתמשך בחומרים רדיואקטיביים, ובשל העלות הגבוהה יחסית של הציוד והמכשור המשמשים בשיטה זו.

בוחן אימונואנזימי (EIA)

הבוחן האימונואנזימי נכנס לשימוש מאוחר יותר מהבוחן הרדיואימוני. הוא מאופיין בהפעלה פשוטה, זולה וחסרת סיכונים, ושימושו נרחב במעבדות מחקר ובמעבדות קליניות לזיהוי ולקביעה כמותית של מגוון רחב של חומרים, ביניהם הורמונים סטרואידיים, נוגדנים לחיידקים ולנגיפים, סמים, חומרים גורמי אלרגיה, ועוד. מערכת הבדיקה בבוחן האימונואנזימי דומה בעקרון פעולתה לזו של הבוחן הרדיואימוני, אך שונה ממנה בכך שהסמנים בה הם אנזימים, הקשורים לאנטיגן או לנוגדן באופן, שאינו פוגע ביכולת הקישור הייחודית שלהם ליצירת התצמיד אנטיגן-נוגדן. הפעילות האנזימטית של האנזים, הבאה לידי ביטוי עם הוספת סובסטרט מתאים, מאפשרת מעקב אחר היווצרות התצמיד.

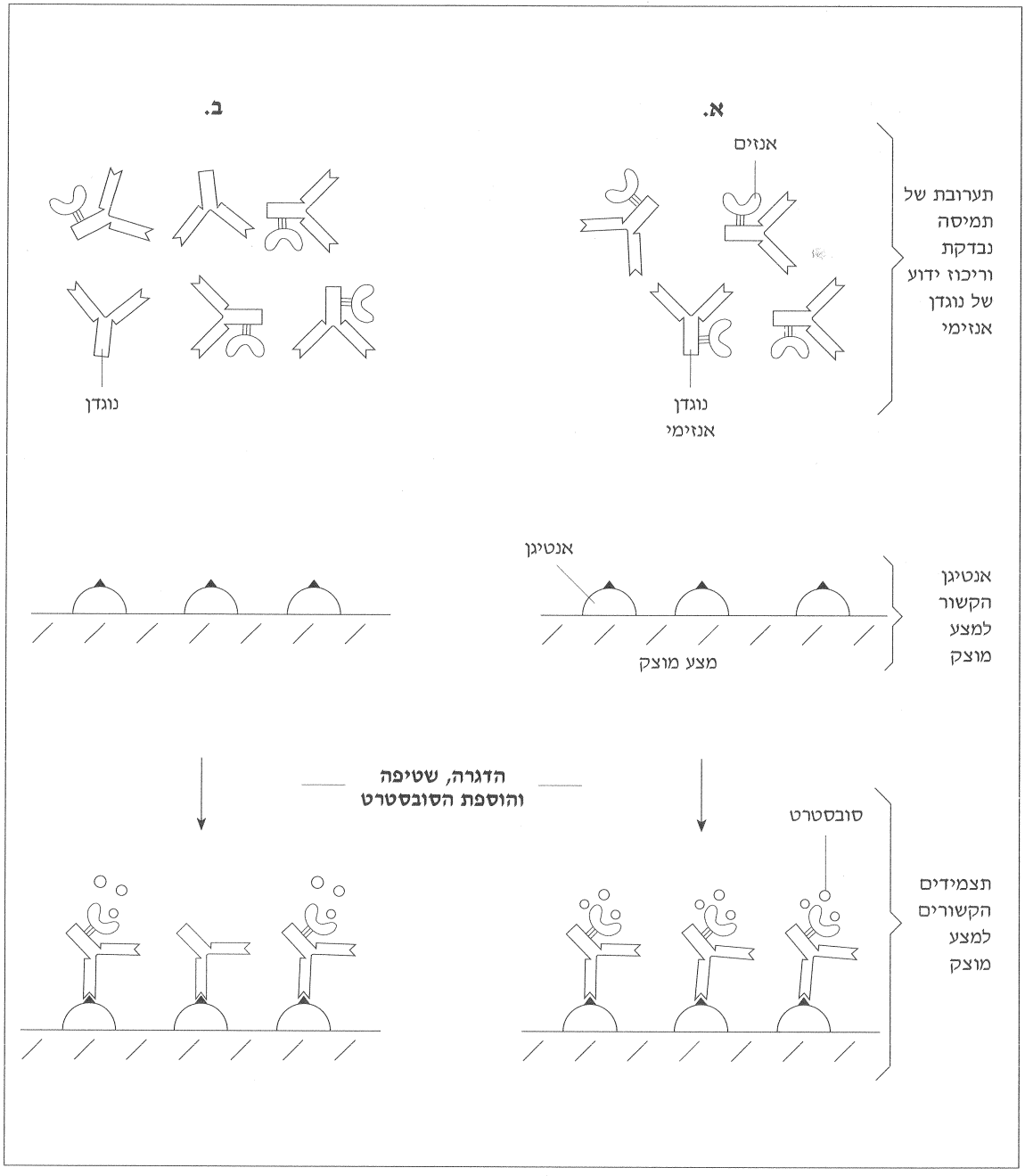
בבוחן האימונואנזימי בדרך-כלל משתמשים באנזימים המזרזים תגובה, שתוצריה צבעוניים. תגובה כזו היא נוחה יותר למעקב ולמדידה כמותית (למשל על-ידי מדידת שינויים בבליעת אור בספקטרופוטומטר).

בדומה לבוחן הרדיואימוני מכיילים את המערכת באמצעות סדרת תמיסות, שיש בהן ריכוזים ידועים של אנטיגן או של נוגדן, ועל-פיהן מכינים עקומת כיול מתאימה.
קיימות שתי דרכים עיקריות לביצוע הבוחן האימונואנזימי - על-פני מצע מוצק או בתמיסה.

א. בוחן אימונואנזימי על-פני מצע מוצק (ELISA)

בוחן אימונואנזימי כזה (שלהלן נקרא לו ELISA) מבוסס על קישור של נוגדן או של אנטיגן למצע מוצק (בארות או מבחנות), כך שהתצמיד המסומן, המתקבל לבסוף, קשור אף הוא למצע. את מבחן ה-ELISA ניתן לבצע באופן תחרותי או באופן לא-תחרותי.

נדגים את עקרון פעולתו של ***מבחן ELISA תחרותי*** בקביעת הריכוז של נוגדנים ייחודיים בתמיסה (ראה איור 3-23).



איור 3-23

שימוש במבחן ELISA תחרותי לקביעת ריכוז של נוגדנים ייחודיים בתמיסה:

א. בהיעדר נוגדנים בתמיסה הנבדקת

ב. בנוכחות נוגדנים בתמיסה הנבדקת

תיאור התהליך:

במבחן ELISA תחרותי לקביעת ריכוז נוגדנים בתמיסה, התהליך נפתח בקשירת האנטיגן המתאים בכמות מוגבלת (לא בעודף) אל מצע מוצק.

לתמיסה, המכילה את הדוגמה הנבדקת, מוסיפים ריכוז ידוע של נוגדנים, הקשורים לאנזים המסמן. לאחר הדגרת תערובת זו עם המצע המוצק ושטיפה להרחקת עודפי הנוגדנים החופשיים, מוסיפים את הסובסטרט של האנזים, ועוקבים אחר יצירת התוצר.

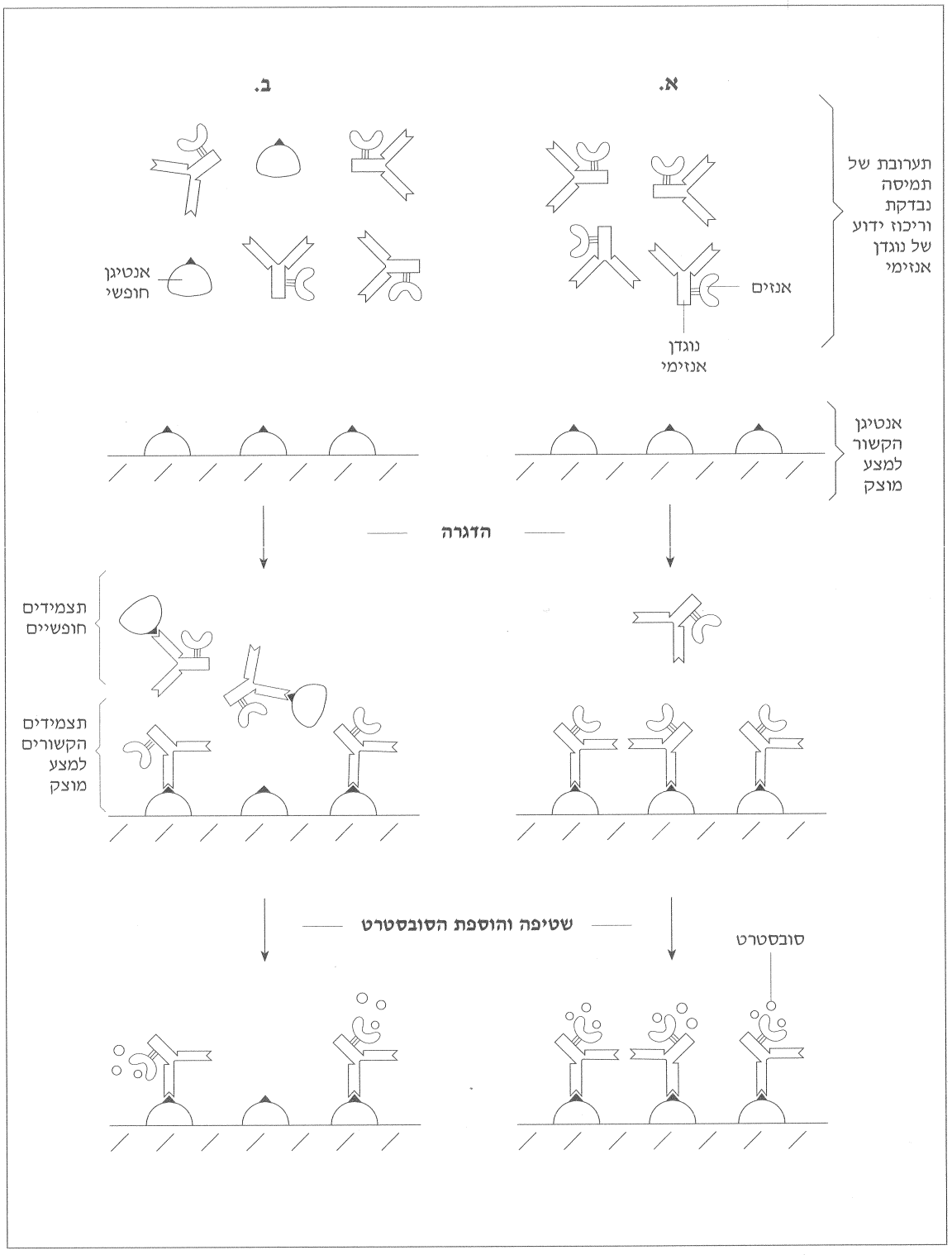
אם אין בתמיסה הנבדקת נוגדנים לאנטיגן (ראה איור 3-23 א) יתקשרו רק הנוגדנים ה"אנזימיים" לאנטיגן; כל התצמידים הבלתי-מסיסים שייווצרו יהיו בעלי פעילות אנזימטית, ותאובחן התפתחות צבע חזקה.

כאשר דוגמת התמיסה הנבדקת מכילה נוגדנים לאנטיגן (ראה איור 3-23 ב), תתרחש בינם לבין הנוגדנים המוספים הנושאים את הסמנים האנזימטיים, תחרות על הקישור לאנטיגן המקובע. כתוצאה מכך, מידת הפעילות האנזימטית הנמדדת של התצמידים הקשורים למצע, לאחר הוספת הסובסטרט, תהיה נמוכה מזו שנמדדה במקרה הקודם וביחס ישר לכמות הנוגדנים שבתמיסה הנבדקת.

שיטה זו משמשת, לדוגמה, לאיתור נוגדנים לנגיפי האדמת בדמה של אשה הרה - בדיקה בעלת חשיבות רבה מפני שאדמת בזמן הריון עלולה לגרום נזקים קשים ליילוד.

בעזרת מבחן ELISA תחרותי ניתן גם לקבוע ריכוז לא-ידוע של אנטיגן בתמיסה (ראה איור 3-24 בעמוד הבא).

נוכחות האנטיגן הנבדק תתבטא בתחרות עם האנטיגן, הקשור למצע, על הקישור של נוגדנים המסומנים באנזימים, ובכך תגרום לירידה בכמות הפעילות הנמדדת של האנזים שבתצמידים ה"מסומנים" הקשורים למצע. הירידה תהיה ביחס ישר לכמות האנטיגן שהייתה בדוגמה.



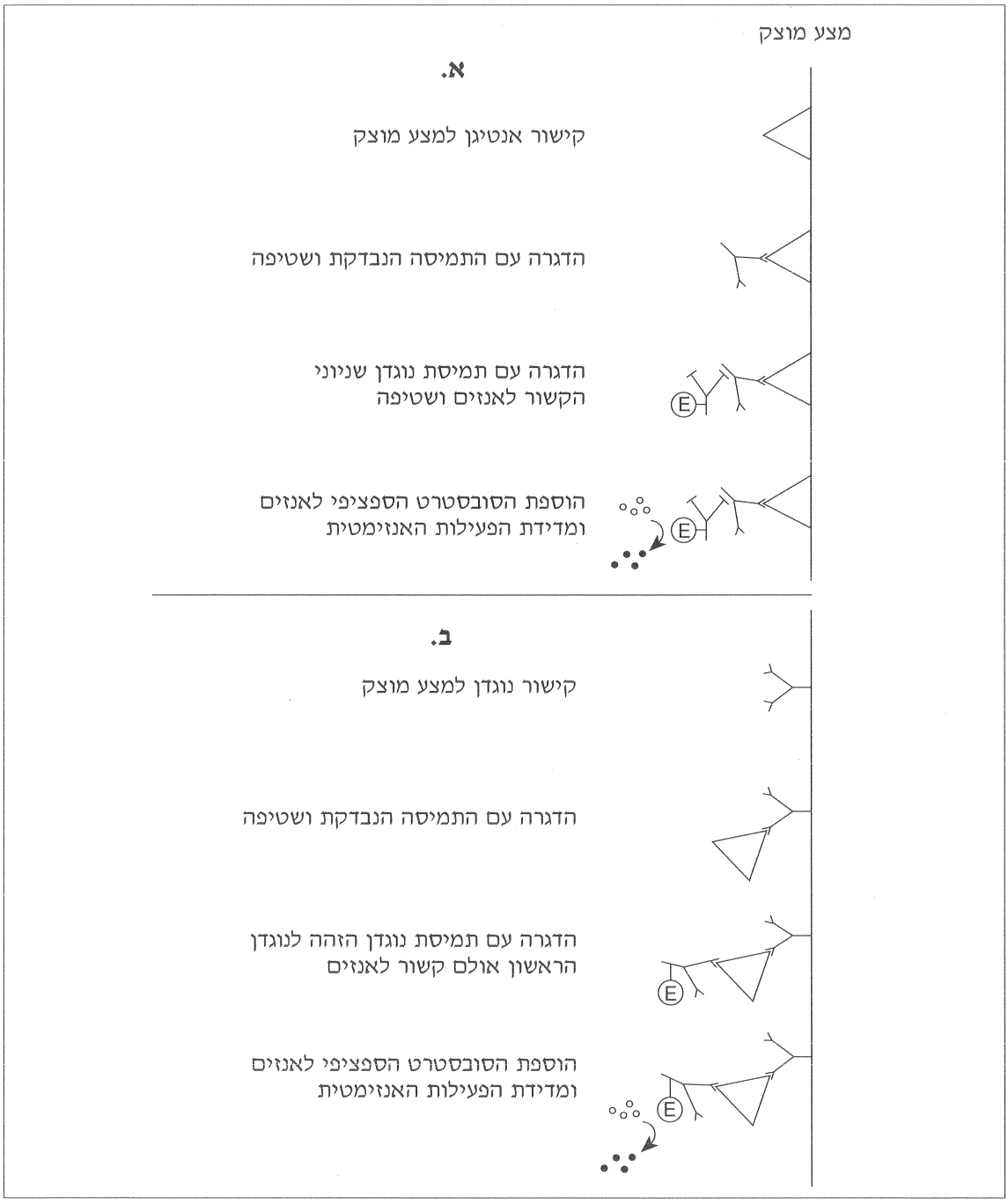
איור 3-24

שימוש במבחן ELISA תחרותי לקביעת ריכוז של אנטיגן ייחודי בתמיסה:

א. בהיעדר אנטיגן בתמיסה הנבדקת

ב. בנוכחות אנטיגן בתמיסה הנבדקת

נדגים את המהלך האופייני של ***מבחן ELISA לא-תחרותי*** לקביעת ריכוז נוגדנים ואנטיגנים בתמיסה (ראה איור 3-25)



איור 3-25

השלבים העיקריים במבחן ELISA לא-תחרותי:

א. קביעת נוגדן בתמיסה נבדקת

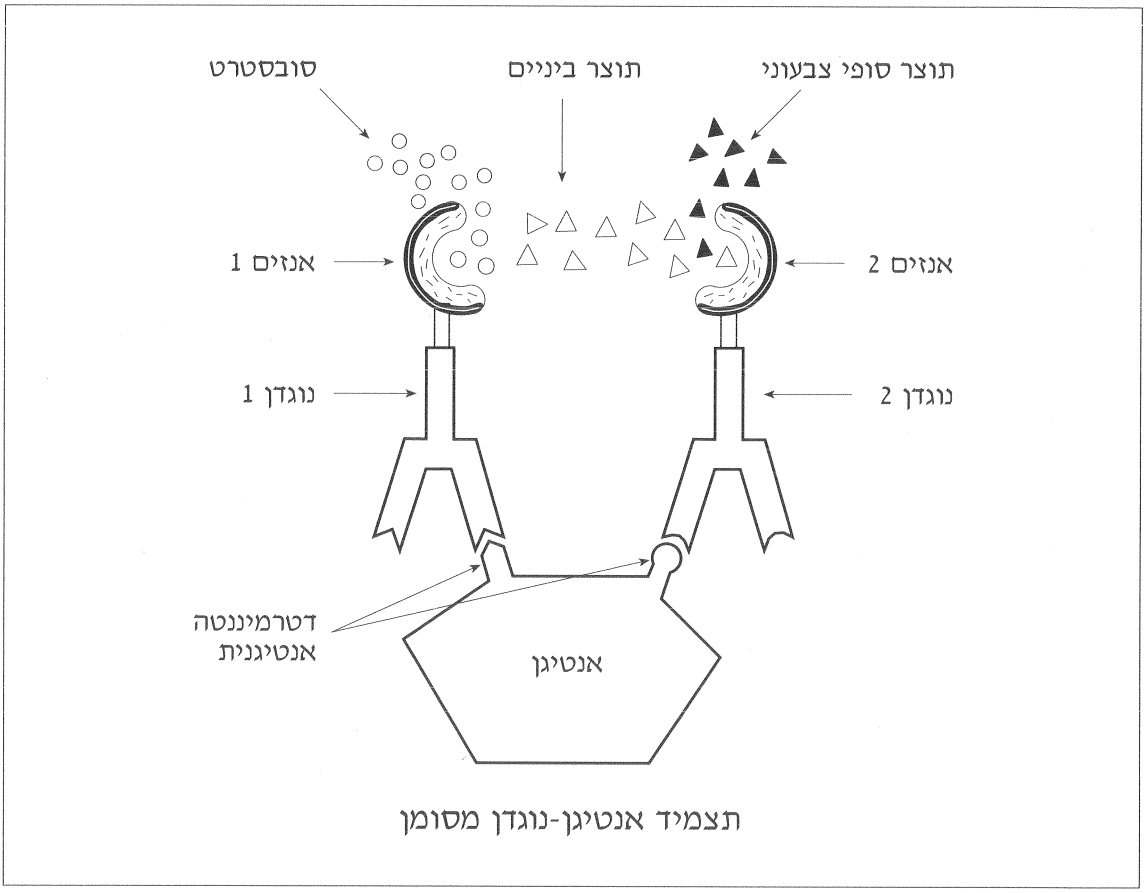
ב. קביעת אנטיגן בתמיסה נבדקת

(△- אנטיגן, Y- נוגדן, Ⓔ- נוגדן אנזימי, ○ - סובסטרט, ● - תוצר)

ב. בוחן אימונואנזימי בתמיסה

במקביל לביצוע בוחן אימונואנזימי על-פני מצע מוצק, ניתן לבצע בוחן מסוג זה גם בתמיסה, ללא הפרדה בין המגיבים החופשיים המסומנים לבין התצמיד המסומן, לשם קביעת הפעילות האנזימטית של התצמיד. גם את המבחן האימונואנזימי בתמיסה ניתן לבצע באופן תחרותי ובאופן לא-תחרותי.

במבחן הלא-תחרותי, המשמש לזיהוי ולקביעה של אנטיגן בתמיסה, משתמשים בשתי אוכלוסיות של נוגדנים מסומנים באנזימים, המכוונים כנגד שתי דטרמיננטות אנטיגניות שונות, הקיימות על-פני האנטיגן. נוגדנים אלה נושאים שני אנזימים שונים, כאשר תוצר פעולתו של הראשון משמש כסובסטרט עבור פעילותו של השני. כתוצאה מכך, תתפתח הופעת צבע מן האנזים השני באופן משמעותי, רק כאשר שני סוגי האנזימים יימצאו קרובים מאוד זה לזה - מצב אשר יתרחש, רק כאשר שני סוגי הנוגדנים נושאי האנזימים יימצאו קשורים אל אותה מולקולה של אנטיגן נבדק (ראה איור 3-26). בשל מנגנון זה, אין צורך בהפרדת התצמיד המסומן משאר המרכיבים במערכת, לפני קביעת הפעילות האנזימטית, באמצעות הוספת סובסטרט לאנזים הראשון.

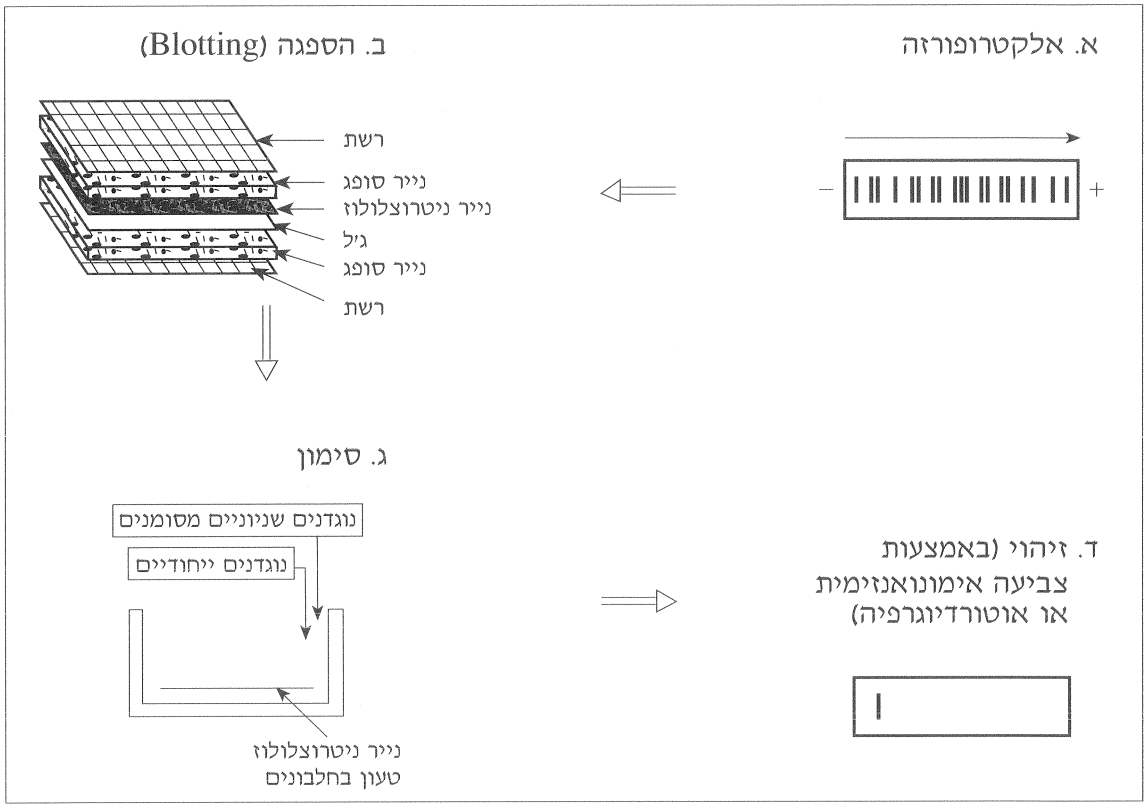


איור 3-26

עקרון פעולתו של מבחן אימונואנזימי לא-תחרותי המבוצע בתמיסה

תספיג אימונולוגי (Immunoblotting)

נוגדנים המסומנים באיזוטופ רדיואקטיבי או באנזים משמשים גם לזיהוי נוכחותם של חלבונים ספציפיים בתוך תערובת מורכבת בשיטה הקרויה תספיג אימונולוגי (Immunoblotting). בשיטה זו מספר שלבים עיקריים והם מתוארים באיור 3-27.



איור 3-27
שלבים עיקריים בשיטת התספיג האימונולוגי

תיאור השיטה:

תחילה מופרדים החלבונים שבתערובת באמצעות אלקטרופורזה (ראה שלב א באיור 3-27). בשלב הבא החלבונים המופרדים שבג'ל מועברים אל נייר ניטרוצלולוז, שטופל קודם באופן כימי כדי שחלבונים ייקשרו אליו. העברה מעין זו מכונה ***"הספגה"*** (blotting) והיא מתבצעת כמתואר בשלב ב באיור 3-27: מניחים את הנייר על הג'ל ומכניסים את שניהם בין שתי רשתות, המחוברות למקור מתח. מעבירים זרם חשמלי בין הרשתות כך שהחלבונים יעברו מן הג'ל אל הנייר ויתקשרו אליו, תוך שמירה על מיקומם היחסי בג'ל.

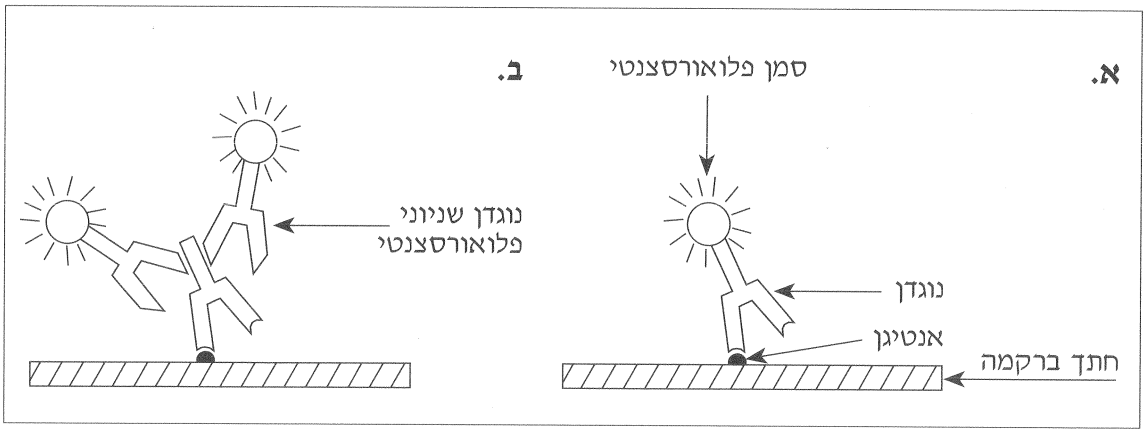
בגמר ההספגה, מבוצע סימון של החלבונים, הקשורים לנייר הניטרוצלולוז, על-ידי הדגרה עם נוגדנים ספציפיים לחלבון המבוקש, שטיפת העודפים שלא נקשרו, והדגרה נוספת עם נוגדנים שניוניים מסומנים על-ידי אנזים או איזוטופ רדיואקטיבי, הנקשרים אל הנוגדן הספציפי, הצמוד לחלבון המבוקש (ראה שלב ג באיור 3-27).

לאחר שטיפת עודפי הנוגדן השניוני המסומן, עוברים לביצוע השלב האחרון, שבו מזהים את החלבון המבוקש (ראה שלב ד באיור 3-27). במקרה שהנוגדנים השניוניים מסומנים באנזים, מתבצע הזיהוי על-ידי ***צביעה אימונואנזימית***, שבה מדגירים את הנייר עם סובסטרט מתאים, כך שנוצר תוצר צבעוני, שהוא בלתי-מסיס, ולכן שוקע כפס על הנייר, במקום שבו נמצא הנוגדן האנזימי. כאשר הנוגדנים השניוניים מסומנים רדיואקטיבית מתבצע הזיהוי על-ידי ***אוטורדיוגרפיה***: חושפים את הנייר לסרט צילום מיוחד. הקרינה המשתחררת מאזור הסימון גורמת להשחרת הסרט בצורת פס, המופיע על הפילם לאחר הפיתוח. בשני המקרים הפס המסומן המתקבל מעיד על נוכחות החלבון המבוקש ומצביע על מיקומו על גבי הנייר, ומכאן גם על מיקומו המקורי בג'ל. כך ניתן לעקוב אחר נוכחותם של חלבונים שונים בתערובת ולהפרידם זה מזה.

בוחן אימונופלואורסצנטי (FIA)

בשיטה זו מסומנים האנטיגנים או הנוגדנים על-ידי הצמדת קבוצות כימיות פלואורסצנטיות אליהם. ***תרכובות פלואורסצנטיות*** אלה פולטות אור בתחום הנראה, בתגובה להקרנתן באור בעל אורך גל קצר יותר.

הסמנים הפלואורסצנטיים משמשים כצבעים ספציפיים, המאפשרים זיהוי של אנטיגנים ונוגדנים וקביעת מיקומם על-פני תאים ורקמות (ראה איור 3-28).



איור 3-28

עקרון הבוחן האימונופלואורסצנטי:

א. סימון ישיר של אנטיגן על פני תא או רקמה

ב. סימון עקיף של אנטיגן על פני תא או רקמה

לשם זיהוי נוכחותם של אנטיגנים ספציפיים ברקמה מכינים חתך מן הרקמה הנבדקת. משרים את החתך בתמיסת נוגדנים ייחודיים, המסומנים פלואורסצנטית, שהופקו כנגד האנטיגן, שמבקשים לאתר על-פני הרקמה הנבדקת. מדגירים למשך הזמן הנדרש לקישור, ושוטפים את העודפים שלא נקשרו לרקמה.

מתבוננים בתכשיר שהתקבל בעזרת מיקרוסקופ מיוחד, שהוסב למטרה זו. מיקרוסקופ זה כולל מקור אור, היכול לספק אנרגיה גם באורכי גל קצרים מאלה של האור הנראה (גם באזור האולטרה-סגול) ומסנן,

הממוקם בין המתקן הנבדק לעין הצופה ומסנן את כל אורכי הגל המגיעים לעין, חוץ מאורכי הגל של האור שהחומר הפלואורסצנטי פולט.

מקרינים על התכשיר אור אולטרה-סגול, וכתוצאה מכך החומר הפלואורסצנטי נראה זוהר בצבע מסוים על רקע כהה של השדה. מקומות זוהרים בתכשיר מצביעים אפוא על נוכחותו של הנוגדן המסומן, ולפיכך גם על קיום האנטיגן במקום זה ברקמה (הקביעה של המיקום המדויק של האנטיגן ברקמה נעשית על-ידי השוואת תמונה זו לתמונה שמתקבלת במיקרוסקופ ללא מסנן).

ניתן לסמן נוגדנים שונים בחומרים פלואורסצנטיים שונים (הזוהרים בצבע שונה), וכך לבדוק בו-זמנית את נוכחותם או את מיקומם של מספר אנטיגנים ברקמה מסוימת.

החסרון העיקרי של שיטה זו, המבוססת על סימון ישיר של האנטיגן בנוגדן הפלואורסצנטי (ראה איור 3-28 א), הוא הרגישות הנמוכה (יחסית) שלה. אפשר להגדיל את הרגישות במידה מסוימת, על-ידי שימוש בתהליך דו-שלבי: במקום לבצע סימון ישיר של האנטיגן שברקמה באמצעות נוגדן מסומן, מדגירים את חתך הרקמה הנבדקת עם נוגדנים ספציפיים - לא מסומנים - לאנטיגן הרקמתי הנבדק. לאחר שטיפת העודפים, מוסיפים נוגדנים המסומנים פלואורסצנטית, אשר מזהים ונקשרים אל הנוגדן הלא-מסומן. הנוגדן, הקשור אל האנטיגן שעל-פני הרקמה, קושר מספר נוגדנים שניוניים פלואורסצנטיים, וכתוצאה מכך מתקבל סימון מוגבר של המיקום ברקמה של האנטיגן הרצוי.

הבוחן האימונופלואורסצנטי משמש בעיקר לזיהוי של אנטיגנים על-פני תאים ורקמות - דבר הנחוץ, למשל, לאיפיון רקמתי של גידולים סרטניים או לחקר תופעות שונות בפיזיולוגיה של התא (כגון התמיינות התא ואינטראקציות בין תאים).

ברוב השיטות הסרולוגיות שהכרנו משתמשים כיום בנוגדנים חד-שבטיים. השימוש בנוגדנים אלה נפוץ בעיקר בשיטות, המבוססות על סימון של נוגדנים למטרות זיהוי וקביעה כמותית של האנטיגן (הבוחן הרדיואימוני, הבוחן האימונואנזימי והבוחן האימונופלואורסצנטי). בשיטות המבוססות על שקיעת תלכידי אנטיגן-נוגדן נהוג עדיין להשתמש בנוגדנים רב-שבטיים, המופקים מסרום של חיה מחוסנת.

3.6 ריפוי מחלות בעזרת נוגדנים

ניתן לנצל את יכולת הקישור הברנרי של נוגדנים לאנטיגנים ייחודיים, המצויים על-פני תאים ורקמות, גם לשם אבחון וריפוי של מחלות של בני-אדם. תהליך ריפוי של מחלות בעזרת נוגדנים שייך לתחום ***האימונותרפיה***, וכולל טיפול במחלות זיהומיות (ויראליות ובקטריאליות), במחלות אוטואימוניות, במחלות של אלרגיה, מחלות ממאירות (סרטן) ומניעת דחייה של השתל בהשתלות של רקמות ואיברים.

דרך אחת לנצל את היכולת ליצור ולהפיק נוגדנים בכמויות היא מתן נוגדנים לחולה; דרך זו נקראת ***חיסון סביל*** (בניגוד ל***חיסון פעיל*** המתפתח באופן טבעי בגוף כתוצאה מחשיפה לגורם פולשני זר).

נהוג להשתמש בחיסון הסביל בעיקר לטיפול במחלות זיהומיות בחולים, שהמנגנון הטבעי של התפתחות תגובה חיסונית לקוי אצלם או במקרים של הדבקה בגורמים זיהומיים שונים, העלולים לגרום לנזקים חמורים, לפני שתגובת החיסון הנורמלית תוכל להתבטא (למשל במחלות כמו טטנוס, בוטוליזם, דיפטריה, כלבת, ועוד). החדרה של נוגדנים ייחודיים, המכוונים באופן ספציפי נגד אנטיגן של הגורם הזר, מובילה לקשירתם לגורם הזר או לתאים שקלטו אותו ומבטאים על פניהם אנטיגן הייחודי לו (כמו במקרה של הדבקה ויראלית). בעקבות הקישור מופעלים ***מנגנוני פעולה ציטוטוקסיים*** (כגון הפעלת מערכת המשלים וקישור לתאי הרג ומקרופאגים) המובילים לבסוף להשמדת הגורם הזר.

בנוסף לכך נודעת חשיבות רבה לשיטת החיסון הסביל במקרים של הכשות על-ידי נחשים ארסיים. ארס הנחשים הוא רעל קטלני מהיר ביותר, והדרך היחידה לטפל באדם שהוכש על-ידי נחש ארסי ולהקטין את נזקי פעולתו ההרסנית של הארס היא להזריק לו נוגדנים ייחודיים לארס.

צורת חיסון זו קיימת למעשה גם בטבע. נוגדנים של האם מועברים דרך השליה ודרך החלב לצאצאיה ומגינים עליהם כאשר עדיין אין בכוחם לקיים תגובת חיסון יעילה.

הרס ספציפי של תאים מסוימים בגוף, בתיווך של נוגדנים, מתאפשר תודות לקיומם של אנטיגנים ייחודיים על-פני התא, המבדילים אותו מתאים אחרים בגוף.

תופעה זו קיימת במקרים רבים של תאים סרטניים. מחלת הסרטן מאופיינת בהופעת גידולים ממאירים הנוצרים על-ידי תאים, שעברו התמרה סרטנית ורכשו כושר חלוקה בלתי-מוגבל. התברר, שתאים סרטניים אלה מבטאים לרוב על-פניהם אנטיגנים ייחודיים, השונים מאלה השכיחים על-פני תאים נורמליים של אותו הפרט. נוגדנים המזהים אנטיגנים אלה עשויים לסייע לריפוי של חולי סרטן, כאשר הם משמשים לחיסון סביל של נושא הגידול. עד עתה הנסיונות לטפל בחולי סרטן על-ידי הזרקת נוגדנים ייחודיים כאלה, כמו שהם, לא הוכחו כיעילים במיוחד; אמנם במקרים אחדים נצפתה נסיגה מסוימת של הגידול, אולם לא הושג ריפוי מלא.

ניתן לייעל את השימוש בנוגדנים כאמצעי ריפוי במסגרת זו של אימונותרפיה, אם הם ישמשו ככלי תובלה ספציפי המוביל אל אתר התאים הסרטניים חומר נלווה שיפגע בתאים הסרטניים באופן מקומי. דבר זה

מתאפשר על-ידי קישור כימי של חומרים ציטוטוקסיים (כגון רעלנים, חומרים רדיואקטיביים ותרופות שונות) לנוגדנים, המכוונים לאנטיגנים ייחודיים, המצויים על-פני תאי המטרה. בדרך זו הנוגדנים הם נשאים של חומרים ציטוטוקסיים, והם מובילים חומרים אלה ***כתרופות מונחות*** עד הפגיעה הספציפית בתאי המטרה.

שימוש יעיל בגישה זו של אימונותרפיה צריך לענות על כמה דרישות:

* איפיון מוקדם של האנטיגנים הייחודיים שעל-פני תא-המטרה, ויכולת לייצר נוגדנים ספציפיים כנגדם.
* קישור של החומר הציטוטוקסי לנוגדן בקשר יציב, בלי לפגוע ביכולת הקישור הייחודי של הנוגדן לאנטיגן או לשנות את כושר הניידות ואת כושר הפירוק של הנוגדן בגוף.
* התצמיד המתקבל צריך לפעול באופן בררני ולהרוס ספציפית את תאי-המטרה, בלי לגרום לנזק משמעותי לתאים ולרקמות אחרות בגוף.

הצמדת החומר הציטוטוקסי לנוגדן מתבצעת על-ידי קישור כימי ישיר, או באמצעות זרוע מגשרת (למשל פפטיד קצר). בכל שיטות ההצמדה צריך להקפיד, שהחומר הציטוטוקסי יהיה קשור לנוגדן בקשר יציב, כדי שלא ישתחרר בגוף לפני שהגיע לתא-המטרה. תופעה כזו תגרום לירידה בעוצמת הפעילות הציטוטוקסית הספציפית ובמקביל תוביל לפגיעה לא-רצויה ולא-ספציפית ברקמות ובתאים אחרים בגוף.

כעת נתאר שלושה טיפוסים של תרופות מונחות:

א. נוגדנים הקשורים לרעלנים.
ב. נוגדנים הקשורים לחומר רדיואקטיבי.
ג. נוגדנים הקשורים לאנזימים ייחודיים.

א. נוגדנים הקשורים לרעלנים (אימונוטוקסינים)

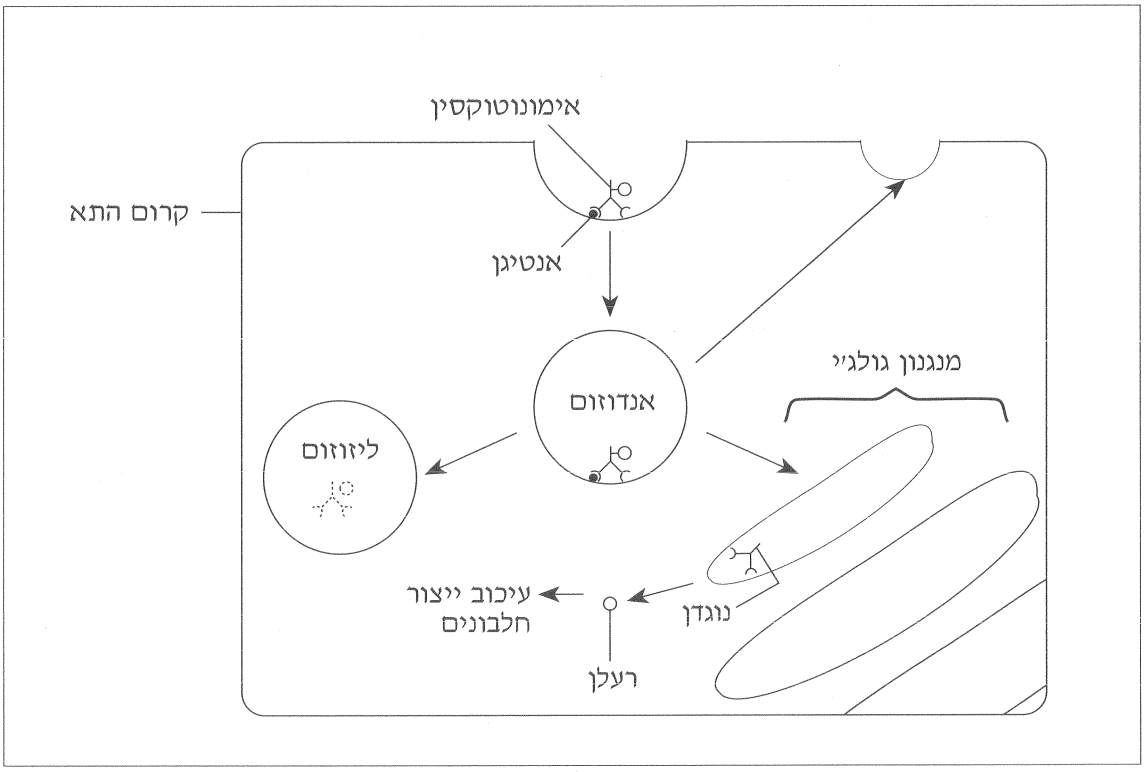
מגוון רב של אורגניזמים, כולל חיידקים, פטריות וצמחים עילאיים, מייצרים רעלנים חלבוניים, שרובם הם אנזימים, המעכבים את שלב התרגום בייצור של החלבונים על-ידי שינוי מבני (וכתוצאה מכך פגיעה בפעילות) של הריבוזום או של פקטורי האלונגציה.

הרעלנים הנפוצים ביותר לשימוש בבניית אימונוטוקסינים הם ***טוקסינים בקטריאליים*** כגון טוקסין הדיפטריה, ***וטוקסינים צמחיים*** כגון ריצין. שני רעלנים אלה בנויים בטבע משתי שרשרות פוליפפטידיות בעלות תפקידים שונים: שרשרת A האחראית לפעילות האנזימטית הציטוטוקסית של הרעלן, ושרשרת B האחראית לקישור של הרעלן אל פני שטח התא וכנראה מעורבת גם בהחדרת המרכיב הפעיל של הרעלן (שרשרת A) אל פנים התא. שתי השרשרות קשורות ביניהן בקשר דיסולפידי.

כדי ליצור אימונוטוקסינים יעילים, צריך לצמצם, או לבטל, את יכולת הקישור של הרעלן לתאים נורמליים בגוף, שלא מעוניינים לפגוע בהם. הדבר נעשה על-ידי הרחקת תת-יחידות, או מקטעים, של הרעלן האחראים לקישור לפני שטח התא, או לחילופין על-ידי הכנסת שינוי כימי, הגורם להפחתה ביכולת הקישור שלהם לתא.

במקרה של רעלן הדיפטריה ושל הריצין מפרידים בין שתי השרשרות של הרעלן וקושרים אל הנוגדן רק את שרשרת A, הפעילה קטליטית. כך מבטיחים שהאימונוטוקסין המתקבל ייקשר אך ורק לתאים, המבטאים על-פניהם את האנטיגן המזוהה על-ידי הנוגדן נושא הרעלן, ויהרוס תאים אלה בלבד.

לאחר שהאימונוטוקסין נקשר באמצעות הנוגדן לאנטיגן ייחודי, המצוי על-פני תא-המטרה, הוא חודר לתוך התא על-ידי ***מנגנון אנדוציטוזה***, ופוגע בו בדרך-כלל על-ידי עיכוב תהליכי ביוסינתזה של חלבונים (ראה איור 29-3).



איור 29-3

אופן הפעולה של אימונוטוקסין:

לאחר חדירת האימונוטוקסין לתא-המטרה, הוא מועבר מהאנדוזום למנגנון גולגי, שבו מתרחש שחרור של הרעלן לתוך הציטופלסמה, ושם הוא מעכב ייצור של חלבונים

חלק ממולקולות האימונוטוקסין, שחדרו לתא, מובלות חזרה לפני שטח התא ומורחקות החוצה, או מועברות לליזוזום, שבו הן מפורקות ומאבדות את פעילותן הציטוטוקסית.

הפעילות של אימונוטוקסין תהיה טובה, אם יתקיימו מספר גורמים, וביניהם: צפיפות גבוהה של האנטיגן הייחודי על-פני תא המטרה, זיקה גבוהה של הנוגדן לאנטיגן זה, אנדוציטוזה יעילה לאחר הקישור של האימונוטוקסין, ולבסוף פעולה יעילה של רוב מולקולות האימונוטוקסין שחדרו לתא. השימוש בנוגדנים, המכוונים לאנטיגנים על-פני שטח התא, בעלי נטייה טבעית לאנדוציטוזה, עשוי לכן להגביר את יעילות "הבליעה" של האימונוטוקסין, ולפיכך גם את עוצמת הפעילות הציטוטוקסית שלו.

מתוצאות של ניסויים מוקדמים נראה, שצפויה הצלחה רבה לשימוש באימונוטוקסינים לשם טיפול במחלות זיהומיות, במחלות אוטואימוניות, במחלות אלרגיה, בזיהומים פטרייתיים ופרזיטיים, ולשם הרחקה של תאים דוחי שתל מאיברים לפני השתלה. אבל מידת התאמתם של האימונוטוקסינים לריפוי מחלת הסרטן עדיין לא ברורה. נסיונות לטפל בסרטן בעזרת אימונוטוקסינים הסתיימו רק במקרים בודדים בריפוי מלא של המחלה, עקב נסיגה מוחלטת של הגידול, אולם ברוב המקרים הושג ריפוי חלקי בלבד, שהתבטא בעיכוב הצמיחה של הגידול, וכתוצאה מכך בהארכת חייו של החולה.

מידת היעילות של הטיפול תלויה בין היתר בסוג מחלת הסרטן. במחלות כגון לויקמיה, סרטן השד, מלנומה, וסרטן המעי הגס נצפתה יעילות נמוכה יחסית. פעילות נמוכה של אימונוטוקסינים בטיפול בסרטן נובעת בחלקה מהקושי של אימונוטוקסינים גדולים לחדור לגידולים מוצקים ולהגיע לכל התאים של הגידול. בנוסף חלק מתאי הגידול עשויים להפסיק לבטא את האנטיגן המזוהה, על-פני שטח הפנים שלהם, ולכן לא ייקשרו אליהם אימונוטוקסינים.

שתי מגבלות נוספות, המאפיינות שימוש באימונוטוקסינים, הן: הקושי במעבר שלהם דרך הקרום לציטופלסמה ששם מתבטאת פעילותם הטוקסית, והשראת ייצור של נוגדנים כנגד הטוקסין בגופו של החולה, כאשר הללו נקשרים לאימונוטוקסין וגורמים לניטרול פעולתו הטוקסית.

על חלק מבעיות אלה עשויים לענות נוגדנים, הנושאים חומר רדיואקטיבי למטרות ריפוי.

ב. נוגדנים הקשורים לחומר רדיואקטיבי

בנוסף לשימוש בנוגדנים המסומנים בחומר רדיואקטיבי למטרות אבחון (למשל איתור מוקדם של גידולים ממאירים בגוף בעזרת נוגדנים רדיואקטיביים הייחודיים לגידול הסרטני), הולך ומתרחב השימוש בהם למטרות ריפוי, בעיקר של גידולים סרטניים.

היתרון של שימוש בנוגדנים, הקשורים לחומר רדיואקטיבי, על-פני שימוש באימונוטוקסינים מקורו בעובדה, שהנוגדן הרדיואקטיבי לא צריך לחדור לתוך תא המטרה, כדי להורגו, אלא די בקישור שלו אל פני השטח של התא. יתר על כן החומר הרדיואקטיבי יכול להרוג תאים גם ממרחק של מספר קוטרי תא, ולכן לא נדרש מגע ישיר בין הנוגדן הרדיואקטיבי לבין כל תאי הגידול. כתוצאה מכך הרס הגידול יתרחש גם כשהניידות של הנוגדן - ובהתאם מידת חדירותו לגידולים מוצקים - היא מוגבלת יחסית. תכונה זו מבטיחה גם הרג של תאים ממאירים חסרי אנטיגן, במקרה שהם מצויים בגידול קרוב לתאים ממאירים, המכילים את האנטיגן המזוהה.

בבניית נוגדנים רדיואקטיביים למטרות ריפוי מועדף השימוש ***באיזוטופים פולטי חלקיקי*** α. קרינת α מאופיינת באנרגיה גבוהה ובמידת חדירות מוגבלת למרחק קצר יחסית. בשל כך מתקבל אפקט ציטוטוקסי רב-עוצמה שהטווח שלו מתרכז בטווח הגידול הסרטני והוא נושא עמו פגיעה מינימלית ברקמות בריאות המרוחקות מהגידול. קרינה מסוג זה יעילה גם בהרג של תאי סרטן בודדים, כגון אלה המאפיינים את מחלת הלויקמיה, ללא חדירה משמעותית לרקמות שמסביב.

בנוסף, נעשה לעיתים שימוש גם ***באיזוטופים פולטי קרינת*** β, המאופיינת בטווח חדירה ארוך יותר. במקרים אלה נדרש להשתמש במינון קטן יותר של נוגדנים רדיואקטיביים, כדי להקטין את הפגיעה הלא-ספציפית ברקמות בריאות.

ג. נוגדנים הקשורים לאנזימים ספציפיים

דרך נוספת לטיפול בגידולים סרטניים באמצעות נוגדנים בעלי פעילות ציטוטוקסית מתוגברת, היא שימוש בנוגדנים, הנושאים אנזימים ייחודיים אל פני תא-המטרה (כגון פני השטח של תא סרטני). לאחר שהאנזימים מוקמו על-פני תאי-המטרה, מזריקים לחולה תרכובת לא-רעילה, המשמשת סובסטרט לאנזים זה. לאחר שהאנזים פועל על הסובסטרט, חל בסובסטרט שינוי, והוא הופך מחומר מוצא לא-מזיק לתרופה בעלת פעילות ציטוטוקסית מקומית. כך מאפשרים תצמידי נוגדן-אנזים יצירה מקומית של חומר, הפוגע בתאי הגידול הסרטני וגורם למותם, ללא השפעות לוואי.

אמנם השימוש בתרופות מונחות באמצעות תצמידי נוגדן-חומר ציטוטוקסי למטרות ריפוי הוא תחום מבטיח, אבל יש להמשיך ולפתח אותו במגמה להתגבר על מגבלות, שעדיין מפחיתות את יעילות הטיפול, כגון: הניידות המוגבלת של התצמידים בשל גודלם (דבר המקשה על חדירתם לרקמות מוצקות) והתפתחות של תגובה חיסונית כנגד התצמידים בגופו של החולה.

השימוש בנוגדנים כאמצעי ריפוי בחיסון סביל ולבנית תרופות מונחות מתבסס על נוגדנים חד-שבטיים. הסיבה לכך היא שנוגדנים חד-שבטיים הם בעלי דרגת נקיון גבוהה ואפשר לייצר נוגדנים חד-שבטיים בעלי זיקת קישור ספציפית גבוהה לדטרמיננטה אנטיגנית מסוימת.

השימוש בנוגדנים חד-שבטיים, שמקורם בלימפוציטים של עכבר, לריפוי מחלות של בני-אדם מאופיין ביעילות נמוכה. הסיבה לכך היא, שהאדם המטופל מפתח מהר מאוד כנגד נוגדנים אלה תגובה חיסונית, הגורמת לניטרול פעולתם הרפואית, זמן קצר לאחר החדרתם לגוף. במקרים מסוימים עלולה תגובה זו אף לגרום לתופעות של אלרגיה ולמחלות קשות אחרות. בנוסף, נוגדנים מעכבר אינם גורמים להפעלה של מנגנוני פעולה ציטוטוקסיים באדם, ולכן השימוש האימונותרפי בהם מוגבל לייצור של תרופות מונחות. מכאן שעדיף להשתמש כאמצעי ריפוי בנוגדנים חד-שבטיים, שמקורם מלימפוציטים של בן-אדם ולא של עכבר או של בעל-חיים אחר.

ניסיונות ליצור נוגדנים חד-שבטיים אנושיים נתקלו במספר קשיים. התברר שהיברידומות הנוצרות מתאי מוצא, שמקורם במינים שונים של בעלי-חיים, כגון לימפוציטים של בן-אדם ותאי מילומה של עכבר, אינן יציבות מבחינה גנטית ונוטות לאבד מהר יחסית בעיקר את הכרומוסומים ההומניים. מצד שני עדיין לא נמצאו גידולי מילומה, שמקורם בבן-אדם, אשר ניתנים לגידול בתרבית ומתאימים לשמש כשותף לאיחוי עם לימפוציטים, שמקורם בבן-אדם, ליצירת ההיברידומה.

כדי להתגבר על קשיים אלה החלו לבדוק כמה גישות, ואלה שתיים מהן:

א. ייצרו בשיטות של הנדסה גנטית גן, המקודד לנוגדן כלאיים, שאתרי הקישור בו מקורם בעכבר ושאר חלקי הנוגדן מקורם בבן-אדם. לאחר שהחדירו את הגן ללימפוציטים של עכבר וביצעו איחוי של הלימפוציטים עם תאי מילומה מעכבר, הצליחו ליצור היברידומות יציבות, המייצרות נוגדני כלאיים חד-שבטיים. נוגדנים אלה, המכונים ***נוגדנים מואנשים***, הם פחות אימונוגניים, כלומר, משרים תגובת חיסון חלשה יותר באדם המטופל, וכן מסוגלים להפעיל מנגנוני פעולה ציטוטוקסיים בגופו.
גישה זו התמקדה עד-כה בעיקר בייצור של נוגדני כלאיים חד-שבטיים, המכוונים לאנטיגנים ייחודיים של גידולים סרטניים מסוימים.

ב. בודדו מתאי B שמקורם בבן-אדם, גנים המקודדים לנוגדן הרצוי או למקטע ה-Fab שלו, הקושר את האנטיגן, ושיבטו אותם בחיידקים בשיטות של הנדסה גנטית. בעקבות ביטוי של הגנים המשובטים בחיידק התאפשר ייצור של כמות גדולה של נוגדנים או של מקטעי נוגדנים אחידים שמקורם בבן-אדם, ללא שימוש בשיטת הייצור של נוגדנים חד-שבטיים.
גישה זו היא עדיין בשלבי מחקר וטרם יושמה למטרות רפואיות. אחד השימושים האפשריים בה הוא ייצור של מקטעי נוגדן קצרים, שהם קושרי אנטיגן. מקטעים אלה עשויים לשמש לבניית אימונוטוקסינים קטנים יותר. בכך יושג שיפור בכושר הניידות שלהם, והם יוכלו לחדור גם לגידולים סרטניים מוצקים, ולגרום להריסתם. קיימת גם עדיפות להשתמש במקטעי Fab של נוגדנים, מסומנים רדיואקטיבית, לאבחון מחלות בגוף האדם. זאת משום שהקישור שלהם לאתר המטרה והניתוק ממנו הוא מהיר יחסית לזה של הנוגדן השלם, ולכן הגוף "מתנקה" מהסימון מהר יחסית.

3.7 שימוש בנוגדנים כאמצעי הפרדה

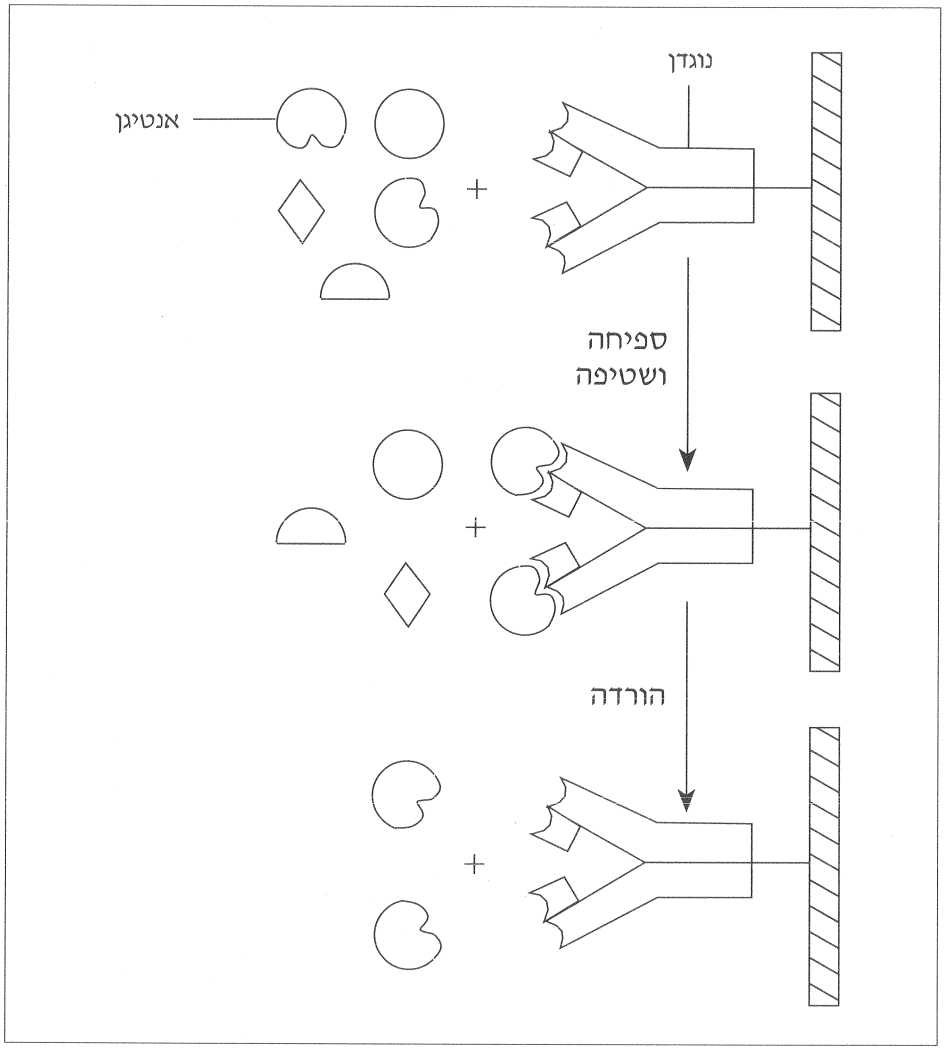
השימוש בנוגדנים להפרדה ולניקוי של אנטיגנים בתערובת מבוסס על הגישה של כרומטוגרפית זיקה, לפיה הליגנד הקשור לעמודה הוא נוגדן, והבסיס להפרדה הוא הקישור הספציפי של אנטיגן לנוגדן, ליצירת התצמיד נוגדן-אנטיגן.

כרומטוגרפית זיקה שמשתמשים בה באנטיגנים או בנוגדנים מקובעים, לניקוי של חומרים בעלי פעילות ביולוגית, מכונה ***כרומטוגרפית זיקה אימונית*** (Immunoaffinity Chromatography).

לשימוש בנוגדנים כליגנדים בכרומטוגרפית זיקה אימונית מספר יתרונות:

א. זוהי גישה כללית, לפיה ניתן להפיק נוגדנים בעלי ספציפיות גבוהה כנגד כל תרכובת או אף קטעים מוגדרים שלה.
ב. לנוגדנים ספציפיות גבוהה ביותר לקישור האנטיגן בצד אפשרות סבירה לשחרורו על-ידי שינוי תנאים.
ג. הנוגדנים הם חלבונים יציבים יחסית, וניתן לקשור אותם אל נשא מתאים בלי לפגוע משמעותית בכושרם לקשור את האנטיגן.

מהלך אופייני של כרומטוגרפית זיקה אימונית, המשמשת לבידוד של אנטיגן מתערובת באמצעות נוגדן ייחודי מקובע, מתואר באיור 3-30.



איור 3-30
עקרון הפעולה של כרומטוגרפית זיקה אימונית

תיאור התהליך:
לביצועה של כרומטוגרפית זיקה אימונית מבצעים, כשלב ראשון, קישור כימי של הנוגדן אל פני נשא בלתי-מסיס במים. ה"שרף האימוני" המתקבל נארז בתוך עמודה, שעליה מטעינים ומריצים את התערובת המיועדת להפרדה, בתנאים המעודדים קישור של האנטיגן לנוגדן.

האנטיגן המבוקש נקשר לעמודה באמצעות הנוגדן המקובע, בעוד ששאר המרכיבים של התערובת נשארים בתמיסה, עוברים דרך העמודה, ונשטפים החוצה.

בשלב הבא מורידים את האנטיגן המבוקש מהעמודה על-ידי החלשה וניתוק של הקשר שבין האנטיגן ובין הנוגדן המקובע, באמצעות שינוי התכונות הכימיות, או הפיסיקליות, של התמיסה המועברת דרך העמודה. הנוזל היוצא מן העמודה נאסף, ומתקבלת תמיסה נקייה, יחסית, של האנטיגן המבוקש, ממנה ניתן להשלים את תהליך ניקויו.

העיקרון של כרומטוגרפית הזיקה האימונית עשוי לשמש גם להפרדה וניקוי של נוגדנים. במקרה זה יימצא על-פני העמודה האנטיגן, ואילו הנוגדן יהיה בתמיסה.

הנשא, המשמש לבניית עמודת זיקה אימונית, צריך להיות בלתי-מסיס במים, הידרופילי, בעל חדירות טובה, בעל אופי כימי המקטין ספיחה לא-ספציפית למינימום, בעל יציבות מכנית טובה, ובעל קבוצות מתאימות להפעלה וקישור.

הנשאים העיקריים המשמשים בכרומטוגרפית זיקה חיסונית הם פולימרים טבעיים או פולימרים סינתטיים, כגון אגרוז, סיליקה ופוליאקרילאמיד.

כדי ליצור שרף אימוני יעיל, הקישור של הנוגדנים לנשא לא צריך לפגוע ביכולת הקישור הספציפי שלהם לאנטיגן. כמו כן הקשר בין הנוגדן לנשא צריך להיות יציב דיו, כדי שהוא לא יינתק ויזלוג מן העמודה במהלך ההרצה, דבר שיגרום הן לירידה בקיבולת הקישור של העמודה והן ל"זיהום" של האנטיגן המבודד בנוגדן.

יעילות ההפרדה בכרומטוגרפיית זיקה אימונית תלויה גם בצפיפות של מולקולות הנוגדן המקובע על-פני השטח של הנשא. כאשר צפיפות הנוגדן נמוכה מדי, מתקבלת עמודה בעלת קיבולת נמוכה; צפיפות גבוהה מדי של נוגדן יוצרת הפרעות סטריות לקישור של האנטיגן. לכן, כדי לבנות עמודת זיקה חיסונית יעילה יש לקבוע מראש באופן אמפירי, עבור כל מערכת, את הריכוז האופטימלי של הנוגדן המקובע.

האנטיגן הספציפי שבתערובת נקשר לנוגדן המקובע שבעמודה בקשר חזק יחסית, המורכב בעיקר משילוב של משיכה חשמלית, של קשרי מימן ושל אינטראקציות הידרופוביות. שינוי ה-pH של התמיסה המוזרמת או הזרמת תמיסות של מלחים או מומסים אחרים המחלישים כוחות אלה, גורמים לפירוק התצמיד אנטיגן-נוגדן ולשחרורו של האנטיגן המבוקש מהעמודה.

להחלשת הקישור החזק של האנטיגן לנוגדן נדרשים לעיתים תנאים קיצוניים. תנאים אלה עלולים לגרום לדנטורציה בלתי-הפיכה של מרכיבי התצמיד, וכתוצאה מכך לאיבוד הפעילות הביולוגית של האנטיגן המבודד ושל הנוגדן המקובע כאחד, ובהתאם ירידה בקיבולת הקישור של העמודה. לפיכך, הלימוד של תנאים אלה ושימוש מבוקר בהם הם תנאי לשימוש חוזר ויעיל בשיטה זו.

באופן כללי כרומטוגרפית הזיקה האימונית מהווה שיטת הפרדה יעילה מאוד, תודות לספציפיות הגבוהה שלה וליכולת ליישמה כאמצעי הפרדה לבידוד ולניקוי באופן נרחב. בשיטה זו מקובל להשתמש בנוגדנים חד-שבטיים - שוב בשל האפשרות לייצרם בדרגת נקיון גבוהה ובאופן ספציפי לכל חומר קיים, גם אם הוא מצוי בתערובת מורכבת.

כרומטוגרפית הזיקה האימונית משמשת כיום גם במעבדה וגם בתעשייה לבידוד של הורמונים, נוגדנים, רצפטורים ממברנליים, אנזימים, מקטעי דנ"א ופפטידים שונים.

בתעשייה משתמשים בשיטה זו כשלב סופי בניקוי של מספר חלבונים בעלי שימוש רפואי, המיוצרים באופן מסחרי בתהליכי תסיסה, באמצעות תרביות תאים או על-ידי הפקה מנוזלי גוף. הנה כמה מחלבונים אלה:

* אינטרפרון - משמש לטיפול במחלות ויראליות ובגידולים סרטניים.
* גורמי קרישה - משמשים להקרשת דם.
* גורמים מונעי קרישה - משמשים להמסת קרישי דם בגוף.
* הורמון הגדילה האנושי.
* תרכיבי חיסון שונים כגון: טוקסין הטטנוס, וירוס הגורם לשיתוק ילדים, אנטיגן שטח של וירוס הגורם לצהבת מסוג B, ואנטיגן של וירוס האדמת.

כרומטוגרפית הזיקה האימונית משמשת גם להרחקת תרכובות רעילות מהדם במקרי הרעלה מסוימים.

פרק 4: תרביות תאים ושימושיהן

בפרקים הקודמים עמדנו מקרוב על הפוטנציאל הגלום במיקרואורגניזמים (חיידקים, שמרים, פטריות) ועל הדרכים לממשו בקנה-מידה תעשייתי, לייצור תוספי מזון, תרופות וכימיקלים.

עם פיתוחן ושכלולן של טכניקות ההנדסה הגנטית עשוי פוטנציאל זה אף לגדול, באמצעות הביטוי והייצור של חלבונים ואנזימים על-פי מידע גנטי שהועתק אל המיקרואורגניזם מתאים של יצורים עילאיים, דהיינו מבעלי-חיים ומצמחים. יחד עם זאת, למערכות המיקרוביאליות אין עדיין יכולת לייצר מגוון רחב של מוצרים נדרשים, שמקורם בתאים של בעלי-חיים ותאי צמח.

הצלחת פיתוחן של מערכות ייצור ביוטכנולוגיות, המבוססות על מיקרואורגניזמים, והעניין הרב בייצורם של חומרים נוספים, שמקורם בתאים עילאיים, הביאו לפיתוחן של מערכות ייצור ביוטכנולוגיות, המתבססות על תרביות תאים, שמקורם בבעלי-חיים ובצמחים, המופעלות בתנאים מלאכותיים, תוך ניצול הידע והנסיון שנצבר במערכות המיקרוביאליות.

4.1 תרביות תאים מבעלי חיים

4.1.1 מבוא

ההחזקה והריבוי של תאים, שמקורם ביצורים עילאיים, בתרבית מלאכותית מחייבת יצירת סביבה תומכת לתא, אשר תספק לו את כל צרכיו באופן זהה לאספקתם במערכת הביולוגית הטבעית ממנה נלקח. דרישה בסיסית זו מעמידה אתגר קשה לביצוע, במיוחד במערכות המבוססות על תאים שמקורם בבעלי-חיים.

בהשוואה לתאים מיקרוביאליים, תא שנלקח מרקמת בעל-חיים הוא בעל דרישות מורכבות יותר מסביבתו במידה ניכרת. הבדלים אלה מסוכמים בטבלה 4-1 (בעמוד הבא).

עיון בטבלה 4-1 מלמד, כי לתת מענה לדרישות של תא המבודד מרקמת בעל-חיים פירושו משימה מורכבת, שמאפייניה ייחודיים, ועלויותיה גבוהות. מובן אפוא, כי המוצרים הצפויים משימוש בטכנולוגיה זו יהיו יקרים ומורכבים יחסית וקשים להשגה בדרך אחרת.

טבלה 4-1
התכונות והדרישות מהסביבה של תא מיקרוביאלי ושל תא שמקורו בבעל-חיים

גורם	תא מיקרוביאלי	תא שמקורו בבעל-חיים
גודל	1.5 מיקרון (חיידק); 5-8 מיקרון (שמר)	כ-10 מיקרון
מבנה	דופן קשיח כמעטפת הגנה חיצונית	חסר דופן ורגיש לפגיעה
זמן חלוקה	עשרות דקות (חיידקים); עד מספר שעות (שמרים, פטריות)	48-36 שעות
מצע גידול	דרישות בסיסיות למקורות פחמן, חנקן, זרחן ומלחים. כושר אספקה עצמי של רוב החומרים החיוניים (כגון חומצות אמינו ונוקליאוטידים).	מצע עשיר הכולל אספקת מקור פחמן, חומצות אמינו, ויטימינים, מינרלים וחומרים משרי חלוקה וגידול. חסר כושר בנייה עצמי של חומרי יסוד.
קצב צריכת חמצן	מהיר יחסית - נדרש אוורור נמרץ.	מתון - נדרש קצב איטי תוך בקרה של רמת ה-CO_2.
מקום התא בתרבית	מורחף במצע גידול נוזלי.	גדל בדרך-כלל כשכבה חד-תאית הצמודה על פני מצע מוצק.
בקרה של pH ושל טמפרטורה	נחוצה בגבולות גמישים.	חייבת להיות קפדנית.

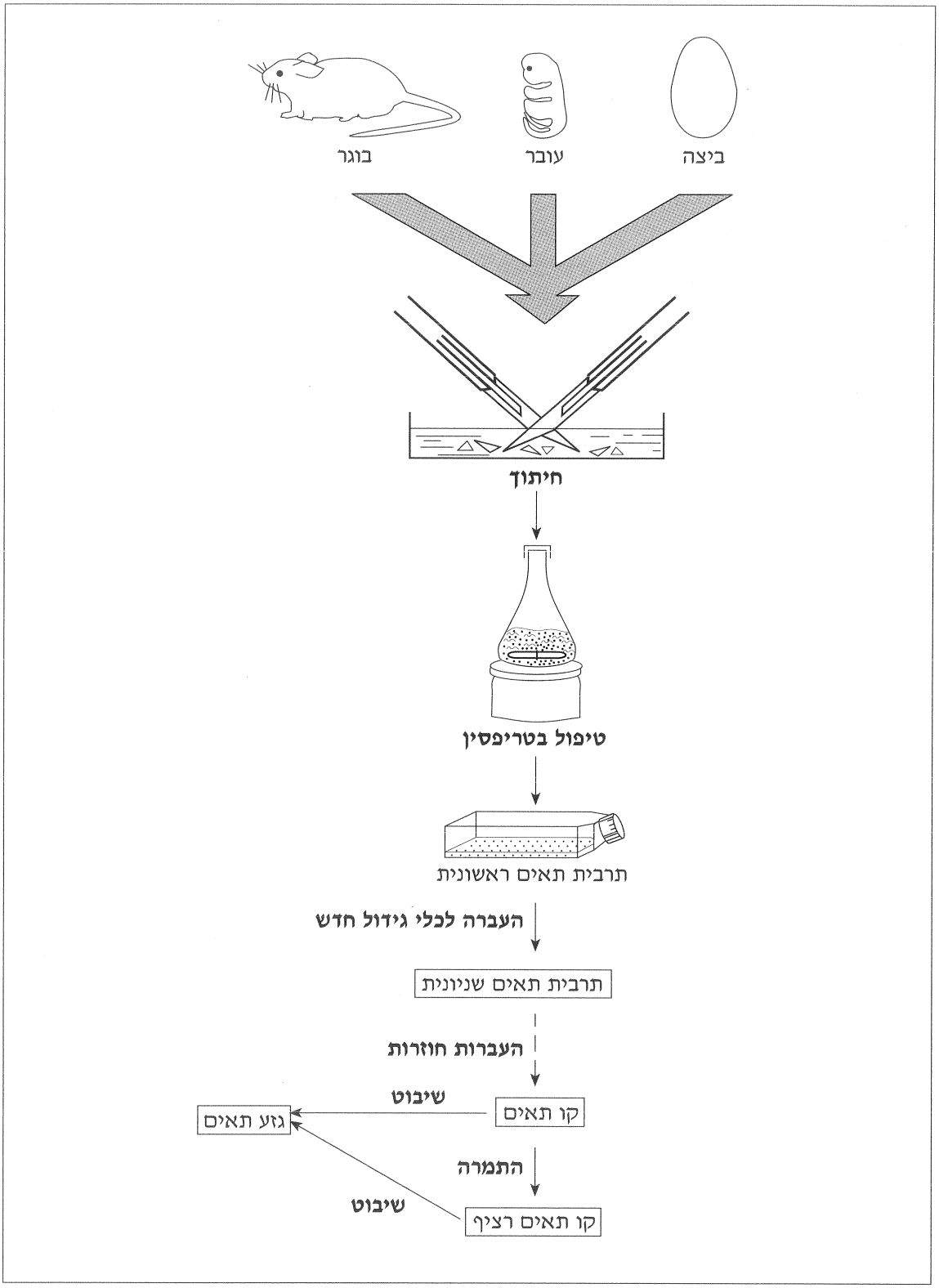
בהמשך הפרק נכיר את המאפיינים של גידול בתרבית של תאים שמקורם בבעלי-חיים, ואת שימושיהם העיקריים.

4.1.2 גידול בתרבית של תאים שמקורם בבעלי-חיים

א. סוגי תרביות

גידול בתרבית של תאים שמקורם בבעלי-חיים פירושו פעולת האחזקה, הגידול והריבוי בתנאי סביבה מבוקרים של תאים בודדים, שנלקחו מרקמה של יצור מסוים. רוב טיפוסי התאים שמקורם ביונקים הניתנים לגידול וריבוי בתרבית בקלות יחסית מקורם ברקמות חיבור (פיברובלסטים, מיובלסטים, תאים אנדותליאליים) או ברקמת האפיתל החופה שטח חיצוני של הגוף ומרפדת צינורות וחללים בו.

מבחינים בין מספר רמות התפתחות של תרביות תאים שמקורם בבעלי-חיים (ראה איור 4-1):



איור 4-1

שלבים עיקריים בהכנה ובהתפתחות של תרביות תאים שמקורם בבעלי חיים

תרבית תאים ראשונית מכילה תאים, שנגזרו ישירות מאיבר, מרקמה או מדם של בעל-חיים (בוגר או עובר), והתרבו ליצירת אוכלוסיה מגוונת של תאים, מבחינה מורפולוגית ופונקציונלית, הכוללת בדרך-כלל תערובת תאים פיברובלסטיים, מקרופאגיים, תאים אפיתליאליים, תאים אנדותליאליים ותאים אחרים.
יצירה של תרבית תאים ראשונית מרקמה או מאיבר דורשת תחילה חיתוך מכני של הרקמה לחתיכות קטנות, טיפול אנזימטי באנזים הפרוטאוליטי טריפסין, הגורם לניתוק התאים ממבנה של רקמה, ליצירת תרחיף תאים חופשיים. התרחיף המתקבל נזרע לכלי הגידול, שבו מגדלים אותו לתרבית תאים ראשונית. במהלך הגידול משתנה הרכב התאים של התרבית משום שרק טיפוסים מסוימים של תאים מסוגלים להתרבות בתנאי תרבית, השאר מתים או שורדים ללא חלוקה.

תרבית תאים שניונית מתקבלת כתוצאה מהעברה של תאים מן התרבית הראשונית לכלי גידול חדש. גידול התאים נמשך, ובמהלכו ממשיך להשתנות הרכב התאים. רוב תאי החולייתנים אינם מסוגלים להתרבות בתרבית זמן ממושך, ומתים לאחר מספר מוגבל של חלוקות תאים (בדרך-כלל 30-50 חלוקות). חלק קטן מאוכלוסית התאים שורד וממשיך להתחלק, גם בהעברות נוספות של התאים.

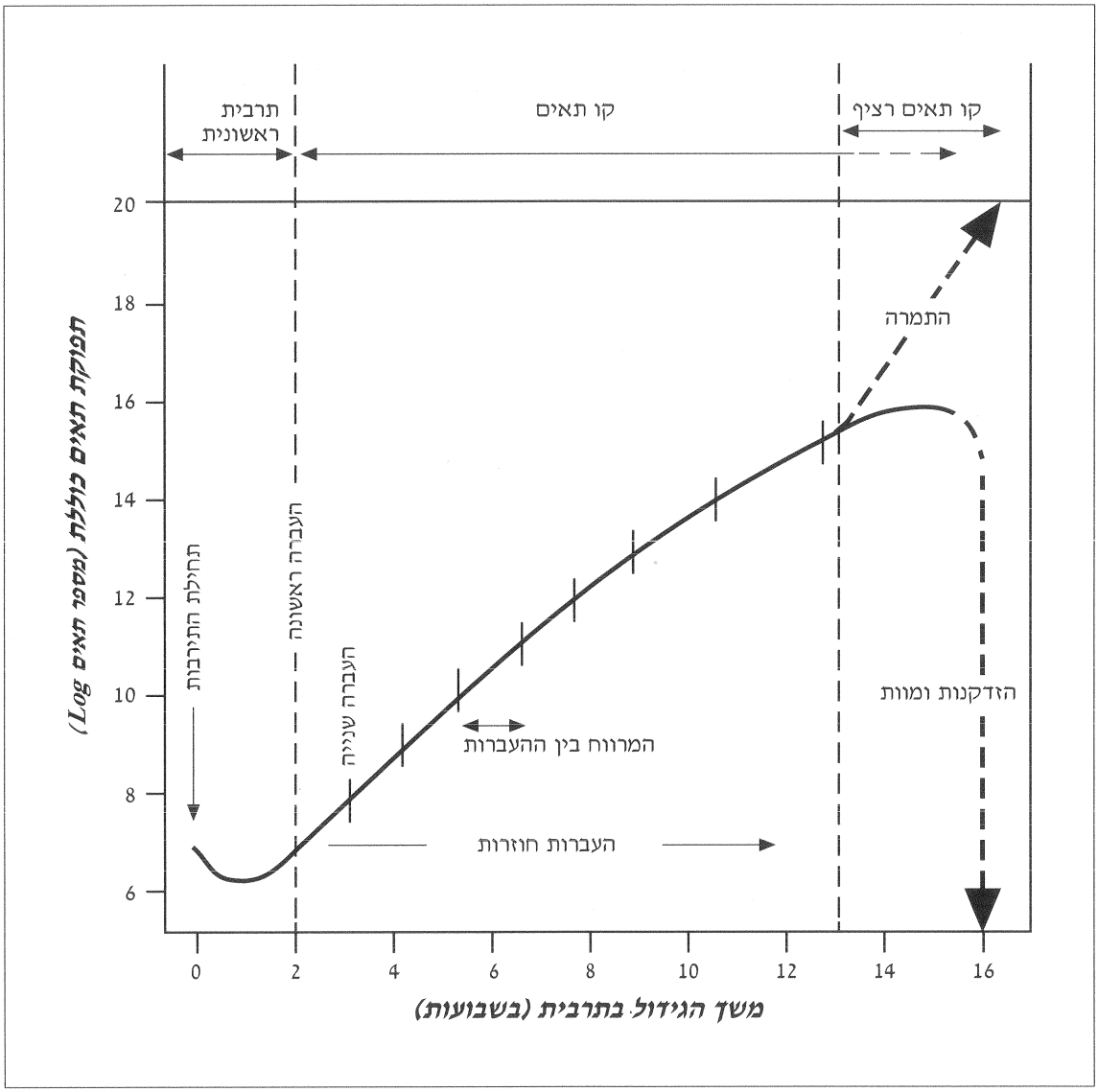
במהלך ההעברות החוזרות, התאים המתרבים מהר יותר בתנאי הגידול משתלטים על האוכלוסיה, ואילו כמותם היחסית של התאים שאינם מתרבים, או מתרבים לאט, הולך וקטן. באופן זה נוצרת תרבית תאים יציבה ואחידה יותר, המכונה ***קו תאים.***

על-ידי הפעלת תנאי גידול שונים, ניתן ליצור סביבה, המעודדת סלקטיבית גידול של טיפוסי תאים מסוימים ומעכבת גידול של אחרים, וכך ליצור מאותה תרבית ראשונית קווי תאים שונים. כך, לדוגמה, תנאי תרבית רגילים מעודדים בדרך-כלל התרבות מהירה של פיברובלסטים. אם מעוניינים לעודד התרבות של תאים אפיתליאליים ולדכא גידול של תאים פיברובלסטים, מגדלים את התאים במצע, המכיל D-ולין כמקור יחיד של חומצה אמינית זו. מאחר שהתאים האפיתליאליים הם היחידים המסוגלים לנצל D-ולין לבנייה של חלבונים (על-ידי הפיכה אנזימטית שלו ל L-ולין), רק הם יתפתחו בתנאים אלה.

אף-על-פי שקו תאים מאופיין באוכלוסית תאים הטרוגנית פחות בהשוואה לתרבית ראשונית, אוכלוסית התאים בו אינה אחידה לגמרי. יצירת אוכלוסיה אחידה של תאים, המכונה ***גזע תאים,*** מתאפשרת על-ידי תהליך של ***שיבוט***, כלומר הפרדת תא בודד מהתרבית וריבויו בנפרד, כך שכל התאים המתקבלים הם צאצאים של אותו תא מקור, ולכן זהים זה לזה מבחינה גנטית.

קו התאים המתקבל מתקיים בתרבית במשך מספר מוגבל של העברות, ובשלב מסוים רוב תאיו מזדקנים ומתים. אבל חלק קטן מהתאים הוא בעל יכולת ריבוי אינסופית. מתאים אלה מתקבל ***קו תאים רציף*** הניתן להעברה בלי הגבלה. התהליך שבו קו תאים הופך לקו תאים רציף נקרא ***התמרה (טרנספורמציה)***, והוא עשוי להתרחש ספונטנית בתדירות נמוכה יחסית, או בתדירות גבוהה יותר - בהשראת וירוס או חומר כימי. ההתמרה מלווה בין היתר בשינוי גנטי, שבעקבותיו התאים מכילים, בדרך-כלל, עודף של כרומוזומים בהשוואה לתא רגיל.

תהליך היצירה של קווי תאים רציפים מסוכם באיור 2-4.



איור 2-4

תיאור כללי של היווצרות קו תאים רציף בתרבית תאים שמקורם בבעלי-חיים

(תפוקת התאים הכוללת היא תיאורטית - בהנחה שאין איבוד תאים במהלך ההעברות)

משך הזמן, הדרוש לגידול התאים בתרבית עד להיווצרות קו תאים רציף, משתנה ותלוי בסוג הרקמה, ששימשה כמקור להכנת התרבית, ובתנאי התרבית. קו תאים מזוהה כרציף, רק לאחר שהוכח, שניתן להעבירו בתרבית לפחות 70 פעמים.

קווי תאים רציפים נוצרים ספונטנית בעיקר מתאים סרטניים. רוב התאים הנורמליים יוצרים בתרבית קווי תאים שאורך חייהם מוגבל. תאים נורמליים, העשויים לפתח ספונטנית קו תאים רציף בתרבית הם תאי האפידרמיס (עילית העור), המאופיינים גם בגוף ביכולת ריבוי מוגברת בהשוואה לתאים אחרים.

בטבלה 2-4 נתונות דוגמאות של מספר קווים תאיים נפוצים.

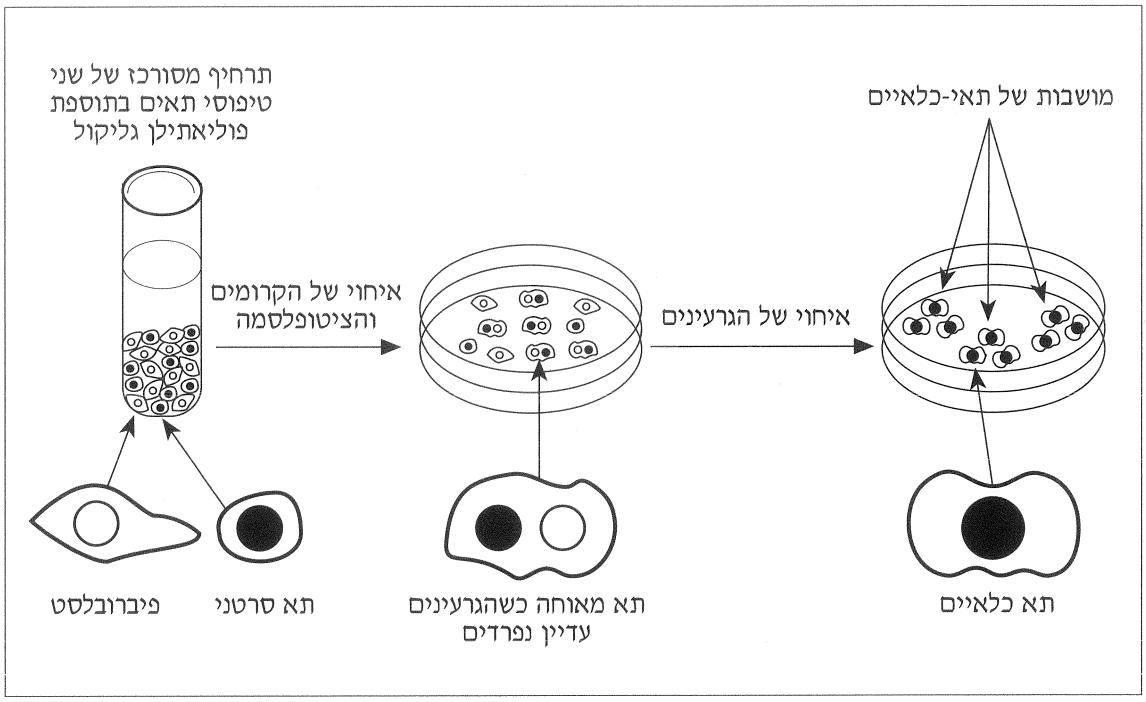
טבלה 2-4

המקור והמאפיינים של כמה קווי תאים נפוצים

כינוי קו התאים	מקור		מאפיינים	
	בעל-החיים	רקמה	מורפולוגיה	צורת הגידול
3T3	עכבר	רקמה אנדותליאלית	פיברובלסט	בתאחיזה למשטח מוצק
CHO	אוגר סיני	שחלות	אפיתל	בתרחיף
BHK 21	אוגר סורי	כליות	פיברובלסט	בתרחיף
BSC	קוף	כליות	אפיתל	בתאחיזה למשטח מוצק
RPH	צפרדע	ביצים	אפיתל	בתאחיזה למשטח מוצק
HeLa	אדם	גידול בצוואר	אפיתל	בתרחיף

בנוסף לסוגים של תרביות תאים המתוארים באיור 4-1, יש צורה נוספת של גידול בתרבית של תאים שמקורם בבעלי-חיים, והיא יצירה של גזע תאי-כלאיים באיחוי של שני סוגים שונים של תאים (ראה איור 4-3). מגדלים את התאים המאוחים בתרבית במצע מזון בררני, המאפשר רק לתאי-הכלאיים להתרבות.

תא-הכלאיים הנוצר מאופיין בתכונות הייחודיות של שני סוגי התאים. דוגמה לתאים מסוג זה הם תאי ההיברידומה (שלמדנו עליהם בפרק 3) המייצרים נוגדנים חד-שבטיים.



איור 4-3

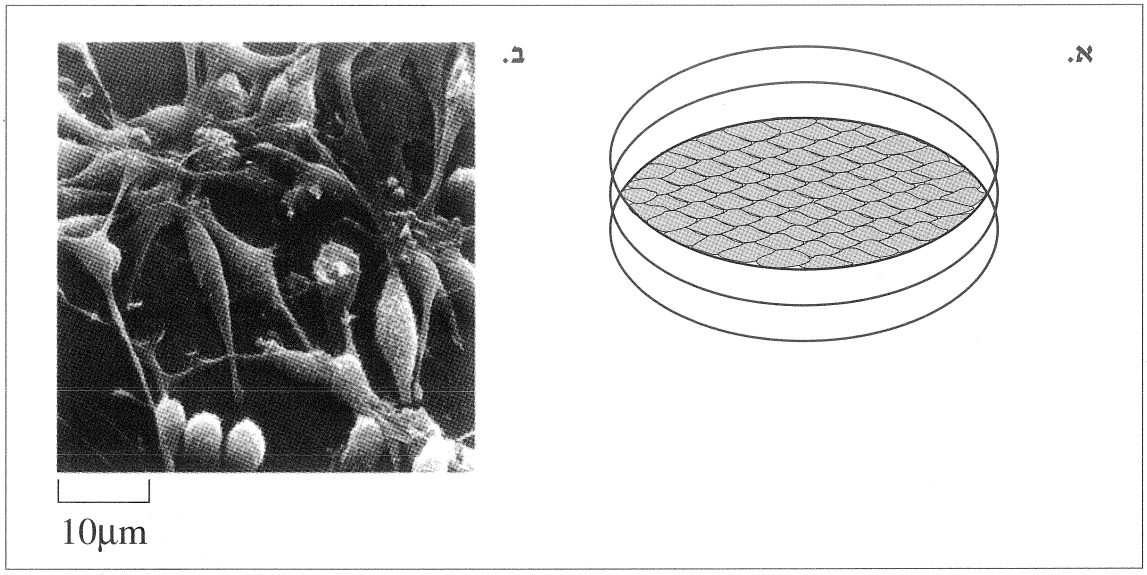
שלבים עיקריים בתהליך היצירה של תאי-כלאיים על-ידי איחוי בין שני סוגי תאים

ב. צורות גידול

בניגוד למיקרואורגניזמים, תאים נורמליים (לא-סרטניים) של בעלי-חיים, אינם מסוגלים בדרך-כלל, להתרבות באופן חופשי בתרחיף, ויש לספק להם תמיכה מכנית של מצע מוצק (להלן: ***משטח תומך***). הם נצמדים אל פני המשטח התומך, ומתחלקים עד ליצירת שכבה רציפה, בעובי של תא אחד, המכסה את כל שטח הפנים של המשטח (ראה איור 4-4 בעמוד הבא). במצב זה הגידול נפסק, תופעה הקרויה עיכוב חלוקת תאים על-ידי מגע או צפיפות.

תאים המסוגלים להתרבות רק על-פני משטח מוצק נקראים ***תאים דורשי תאחיזה***, ורובם, כאמור, יוצרים בתרבית שכבה אחת של תאים. אבל טיפוסי תאים מסוימים (כגון תאי אפידרמיס) יכולים ליצור בתרבית שלוש ואף ארבע שכבות של תאים.

התמיכה המכנית, המשמשת להיצמדות התאים, היא בדרך-כלל שטח הפנים של דפנות כלי הגידול עצמו, העשויים מזכוכית, מפלסטיק, או ממתכת. במקרים רבים ציפוי של פני השטח בקולגן מסייע לתאחיזה.



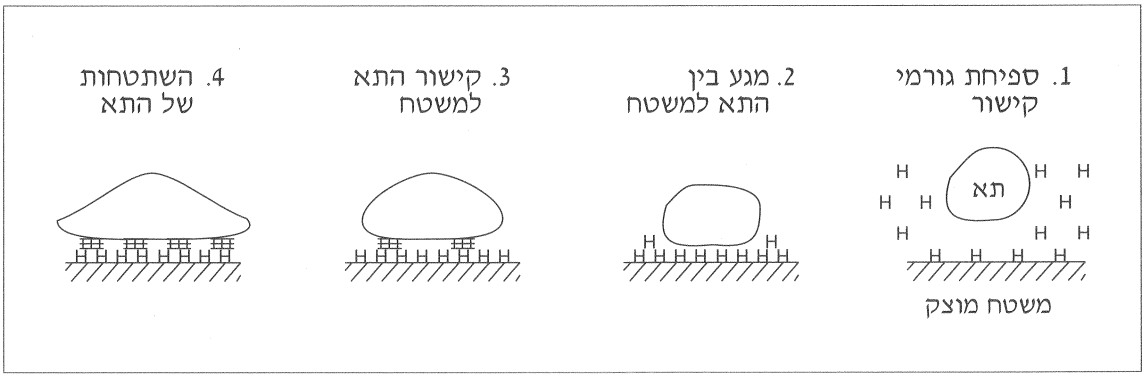
איור 4-4

גידול תאים דורשי תאחיזה על פני משטח מוצק:

א. תיאור סכימתי של גידול תאים על-פני הקרקעית של צלחת פטרי ליצירת שכבה חד-תאית רציפה

ב. צילום במיקרוסקופ אלקטרוני סורק של פיברובלסטים מחולדה, הגדלים על-פני תמיכה מפלסטיק בתרבית תאים

תהליך ההיצמדות של תאים דורשי תאחיזה למשטח מוצק כולל מספר שלבים (ראה איור 4-5).



איור 4-5

שלבים בתהליך ההיצמדות של תאים אנימליים דורשי תאחיזה למשטח מוצק

(H - גורם קישור, ≡ - גורם מתווך)

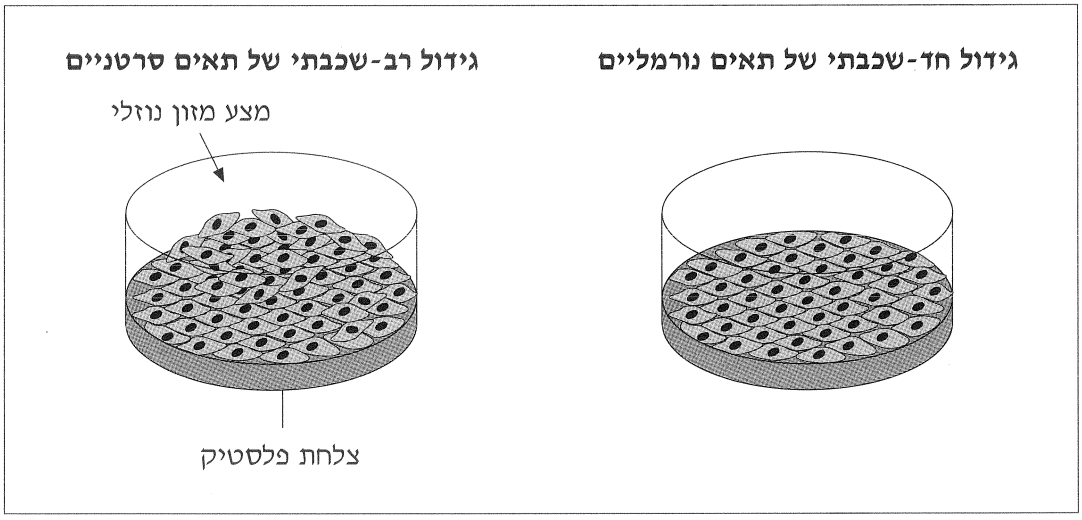
תחילה מתרחשת ספיחה של גורמי קישור אל פני המשטח. גורמי הקישור הם קטיונים דו-ערכיים וגליקופרוטאינים, הכלולים בדרך כלל במצע הגידול. תאים מסוימים מפרישים בעצמם גליקופרוטאינים "קושרים", ולכן אין צורך לכלול אותם במצע.

לאחר שהתא בא במגע עם המשטח המוצק, הוא נצמד אל פניו באמצעות גורמים מתווכים, הנקשרים בו-זמנית לגליקופרוטאינים שעל פני שטח התא ולגורמי הקישור שנספחו אל פני המשטח המוצק. הגורמים המתווכים מופרשים בדרך כלל מהתאים עצמם.

בעקבות הקישור של התא למשטח, התא משתטח על-פני המשטח, ורק לאחר מכן מתחיל להתחלק. בסיום שלב הגידול ניתן, במידת הצורך, לנתק את התאים מהמשטח המוצק על-ידי טיפול באנזים הפרוטאוליטי טריפסין.

יש גם סוגים של תאים נורמליים, שגידולם בתרבית אינו דורש תאחיזה למשטח מוצק. אלה הם רוב התאים הנגזרים מדם או מאיברים לימפאתיים. תאים אלה גדלים היטב במצע נוזלי כתרחיף של תאים בודדים או בצורת גושים זעירים של תאים, המורחפים במצע.

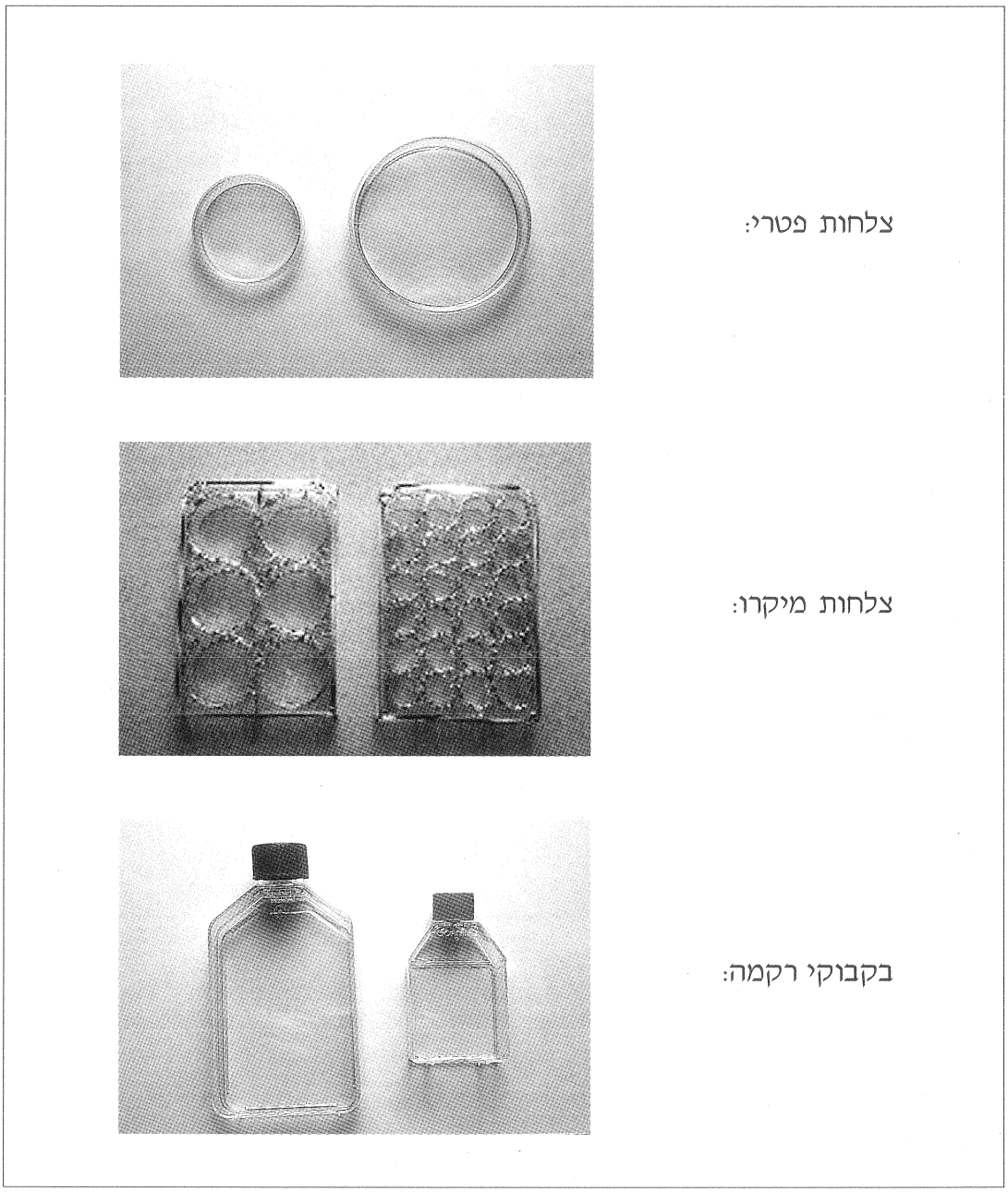
בניגוד לתאים נורמליים, תאים סרטניים מאופיינים ב"חיי נצח", בדרך-כלל אין הם דורשים תאחיזה למשטח מוצק, וניתן לגדלם בתרבית כתרחיף. נסיון לגדלם על-פני משטח מוצק יאופיין על-פי-רוב בהיווצרות גוש לא-מאורגן, המכיל כמה שכבות לא-סדירות של תאים. שכבות אלה נוצרות כתוצאה מגידול התאים כלפי מעלה, שבו הם נערמים זה על זה, בנוסף על גידולם לצדדים (ראה איור 4-6).



איור 4-6
השוואה סכימתית בין גידול של תאים נורמליים ובין גידול של תאים סרטניים על-פני משטח מוצק

אם כן ניתן לגדל בתרבית תאים שמקורם בבעלי-חיים באחת משתי צורות: כ***תרבית חד-שכבתית*** או כ***תרחיף תאים***, על-פי סוג התאים. כאמור, רוב התאים של בעלי-חיים דורשים תאחיזה למשטח מוצק כתנאי מוקדם להתרבותם. גידול של תאים דורשי תאחיזה תלוי בשטח הפנים הזמין של המשטח המוצק: עם כיסויו המלא בשכבה אחת של תאים, הגידול ייפסק. כדי להמשיך ולגדל את התאים יש לנתקם מהמשטח על-ידי טיפול פרוטאוליטי בטריפסין, ולחלקם לכלי גידול חדשים. כתוצאה מכך כמות התאים, שניתן לגדל במחזור אחד של תרבית חד-שכבתית, היא מוגבלת ותלויה ביחס שבין שטח הפנים הזמין להיצמדות התאים לבין נפח התרבית.

לשם גידול של תרבית חד-שכבתית בקנה-מידה קטן, משתמשים בצלחות מיקרו עם בארות, בצלחות פטרי ובבקבוקי רקמה שוכבים בגדלים שונים (ראה איור 7-4). בכל כלי הגידול האלה גדלים התאים כשהם צמודים לקרקעית הכלי. גידול בקנה-מידה גדול יותר מתבצע בדרך כלל בבקבוקים סובבים, עליהם נרחיב את הדיבור בהמשך.



איור 7-4

כלים המשמשים לגידול בקנה-מידה קטן של תרבית חד-שכבתית של תאים שמקורם בבעלי-חיים

ג. הרכב המצע ותנאי הגידול

גידולם בתרבית של תאים שמקורם בבעלי-חיים מורכב יותר לאין ערוך מגידולם של תאים מיקרוביאליים. התאים המיקרוביאליים הם אורגניזמים חד-תאיים קטנים, עצמאיים מבחינה מטבולית, מוגנים מסביבתם על-ידי דופן עבה וקשיחה, ודרישותיהם התזונתיות פשוטות יחסית. בהשוואה אליהם התאים שמקורם בבעלי-חיים הם גדולים יותר, חסרי דופן, עדינים, ורגישים יותר לתנאי הסביבה, ומעבר לכל אלה מציגים גם דרישות תזונתיות מורכבות, האמורות להוות תחליף יעיל לאספקתן במערכות של בעל-החיים השלם.

בגוף בעל-החיים מתקיימים רוב התאים כחלק מרקמה מאורגנת, ותלויים בפעילות מתמחה של תאים רבים אחרים ובמערכת הדם, היוצרים סביבה תומכת יציבה, המותאמת במיוחד לקיומם, על-ידי הספקה רציפה של חמצן וחומרי מזון והרחקה רציפה של פחמן דו-חמצני וחומרי פסולת. לפיכך גידולם כתאים נפרדים במצע מלאכותי בתרבית מאופיין בקשיים רבים. קושי נוסף הוא דרישות גידול ייחודיות שמציגים טיפוסים שונים של תאים.

למרות שההרכב המדויק של המצע, המשמש לגידול תאים שמקורם בבעלי-חיים, תלוי בסוג התאים, רוב המצעים מכילים: חומצות אמיניות, ויטמינים, מלחים אנאורגניים, גלוקוז, מרכיב סרום וחומרים אנטיביוטיים. חומרים אלה מומסים במים שעברו תהליך טיהור קפדני.

* **החומצות האמיניות** משמשות כמקור חנקן הדרוש לבניית חלבונים וחומצות גרעין.

* **הוויטמינים** דרושים לפעילות של אנזימים ולקיום של תהליכים מטבוליים מסוימים.

* **המלחים** משמשים, בין היתר, לבניית מערכת הבופר שנועדה לשמור את רמת ה-pH של המצע בטווח של 7.2-7.6, על-פי סוג התאים.

* **הגלוקוז** משמש כמקור אנרגיה עיקרי.

* **הסרום** מופק בדרך כלל מדמו של סוס או של עגל עוברי, והוא מרכיב חיוני בגידול של רוב התאים הנורמליים. הסרום מהווה בין 5% ל-20% מנפח המצע. תאים סרטניים מאופיינים בדרישה מופחתת לסרום לשם התרבותם. הרכבו המלא ותפקידו המדויק של הסרום עדיין לא ברורים לחלוטין, אבל נראה שהוא מהווה מקור להספקה של: הורמונים (כגון אינסולין), פקטורי גידול פוליפפטידיים המזרזים גידולם של טיפוסים מסוימים של תאים, חלבונים המהווים נשאים של חומרי מזון בעלי מסה מולרית נמוכה (כגון טרנספרין, המחדיר יוני ברזל Fe^{3+} לתוך התאים), וכן חומרים הדרושים להיצמדות של תאים דורשי תאחיזה על-פני משטח מוצק (כגון גליקופרוטאינים מסוימים).

מרכיב הסרום לא רק שהוא מייקר מאוד את המצע אלא שהוא גם אינו מאפשר לייצר מצע בעל הרכב ידוע וקבוע. הסיבה לכך היא שהרכב הסרום משתנה בפרטים שונים, והוא תלוי בגיל, במין

ובמצב התזונתי של התורם. מנות סרום שונות עשויות לכן להיבדל ביכולתן לאפשר גידול בתרבית של תאים שמקורם בבעלי-חיים. קשיים אלה הובילו לנסיונות לפתח מצעים חסרי סרום, בעלי הרכב כימי מוגדר, שמרכיב הסרום הוחלף בהם על-ידי תוספת מוגדרת וידועה של חומרים שונים כגון: הורמונים, פקטורי גידול, חלבונים נשאים, גליקופרוטאינים ספציפיים.

* **האנטיביוטיקות** (כגון פניצילין וסטרפטומיצין) מיועדות למנוע זיהום מיקרוביאלי של המצע העשיר, המתאים כמובן גם לגידולם של רוב המיקרואורגניזמים הנפוצים. מאחר שהמיקרואורגניזמים עמידים יותר ומתרבים בקצב מהיר הרבה יותר מתאים עילאיים הם עלולים להשתלט בנקל על התרבית. מניעת ריבויים היא אפוא חיונית.

לאחר המסת המרכיבים השונים במים מזוקקים, המצע המתקבל עובר עיקור, בדרך כלל באמצעות סינון דרך ממברנה מתאימה (ולא באמצעות חימום, למניעת פגיעה במרכיבים הרגישים שבמצע).

באופן כללי המצע המורכב, המשמש לגידול בתרבית של תאים שמקורם בבעלי-חיים, יקר במידה ניכרת בהשוואה לזה המשמש לגידול של תאים מיקרוביאליים. מחירו הגבוה של המצע מחייב עבודה בקנה-מידה לא גדול יחסית, תוך ניצול מירבי שלו.

* **טמפרטורת הגידול** האופיינית היא 37°C, והיא מושגת על-ידי הדגרת כלי הגידול באינקובטור או על-ידי וויסות הטמפרטורה בעזרת ציוד עזר המותקן בכלי הגידול (כגון שרוול מים).

* **האוורור** מסופק בדרך-כלל על-ידי גידול התאים באוירת 95% אוויר ו-5% פחמן דו-חמצני. ברוב המקרים הגז מוזרם על-פני שטח התרבית, ומאפשר חילופי גזים איטיים, ואינו מבועבע לתוך המצע, כדי למנוע תופעה של הקצפה, העלולה לפגוע בתאים.

* **בקרת ה-pH** מתבצעת על-ידי שינוי הריכוז של הפחמן הדו-חמצני בתערובת הגז, או לחילופין על-ידי הוספת בסיס או חומצה למצע.

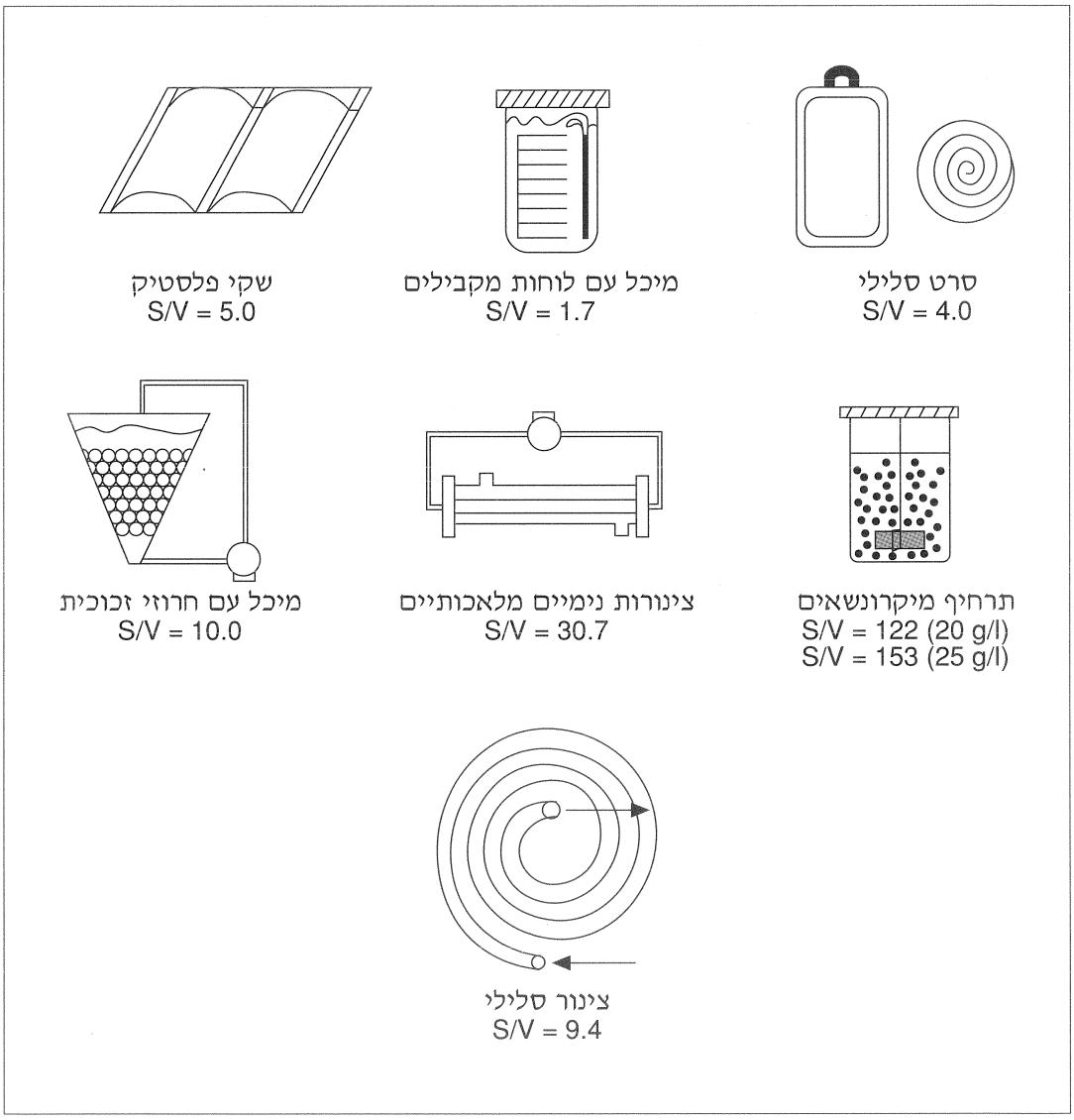
כדי למנוע זיהום מיקרוביאלי (בעיקר של חיידקים, עובש או שמרים) במהלך העבודה, הכנת המצע והגידול מתבצעים תוך הקפדה יתירה על תנאי סביבה סטריליים בעזרת עיצוב מתאים של חדר העבודה וכלי הגידול.

ד. פתרונות טכנולוגיים ליצירת משטחי גידול

דרישתם של מרבית התאים למצע יקר והתפתחותם כשכבה חד-תאית מציבים תנאי מרכזי לפיתוחן של מערכות ייצור המבוססות על תאים שמקורם בבעלי-חיים: יצירת שטח גידול מירבי, העושה שימוש במצע גידול בכמות מינימלית.

במגמה להגדיל את שטח הפנים ביחס לנפח המצע ונפח הכלי, פותחו אמצעי גידול ייחודיים עבור תאים דורשי תאחיזה. איור 8-4 מתאר את הסוגים העיקריים של אמצעי גידול אלה: מערך של לוחות דקים או של מגשים במארז רב-שכבתי, צורות שונות של צינורות או של סיבים חלולים, חרוזי זכוכית הארוזים בצפיפות בתוך מיכל, ועוד.

ברוב השיטות הללו דואגים שהתאים הספוחים למשטח יכוסו באופן תמידי בשכבת מצע דקה באמצעות הזרמה רציפה של המצע דרך המערכת.



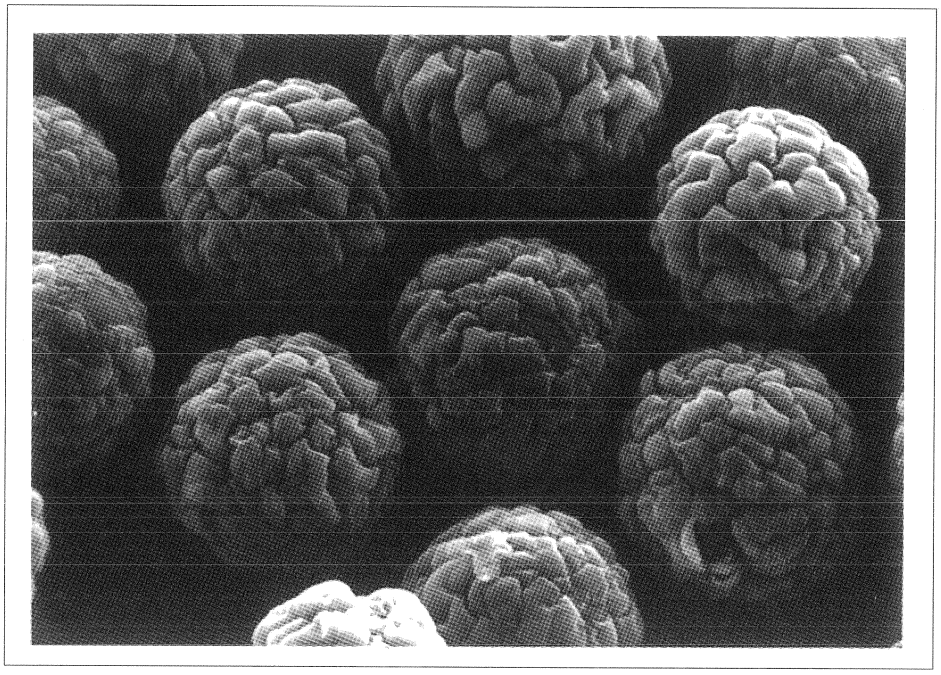
איור 8-4

מערכי גידול שונים לשיפור היחס שבין השטח לנפח, המשמשים לגידול תאים שמקורם בבעלי-חיים, ואשר דורשים תאחיזה למשטח מוצק

(S/V - היחס בין שטח הפנים הזמין להיצמדות ונפח התרבית, יחידותיו: 1/cm)

נראה שמבחינה טכנולוגית גידול של תאים במערכות המבוססות על תרחיף במיכל נבחש, המהווה מערכת אחידה, עדיף על-פני מערכת של תרבית חד-שכבתית המבוססת על משטחים. במערכת הראשונה ישררו תנאים אחידים בכל אזורי הביוריאקטור, בדומה לגידולם של תאים מיקרוביאליים. צפוי שמערכת כזו תהיה קלה יותר לשליטה ולוויסות מבוקר של משתני התהליך, וניתן יהיה לגדל בה את התאים בצפיפות גדולה יחסית ובאופן יעיל.

לאור שיקולים אלה, פותחה מערכת, המאפשרת לגדל בתרחיף תאים, דורשי תאחיזה, שמקורם בבעלי-חיים; במערכת זו הם גדלים כשכבה חד-תאית, הצמודה על פני השטח של חרוזים זעירים, הנקראים ***מיקרונשאים***, ואשר מורחפים במצע מזון נוזלי (ראה איור 4-9).



*איור 4-9 **

תמונה של תאי כליית חזיר, הגדלים על-פני מיקרונשאים, כפי שהתקבלה במיקרוסקופ אלקטרוני סורק

המיקרונשאים שמקובל להשתמש בהם עשויים מחומרים טבעיים, כגון: סיבי צלולוז מטופלים, דקסטרן (פולימר טבעי של גלוקוז) מצולב המותמר בקבוצות טעונות-חיובית, או מצופה בשכבת קולגן, ופולימרים סינתטיים שונים. על חומרים אלה לענות על הדרישות הבאות: חוסר רעילות, גמישות מבנית להקטנת נזק אפשרי כתוצאה מהתנגשויות, תכונות אופטיות המאפשרות מעקב מיקרוסקופי נוח אחר גידול התאים, וצפיפות הגדולה רק במקצת מזו של מצע הגידול. הדרישה האחרונה נועדה כדי שהרחפתם המלאה תתאפשר באמצעות ערבול עדין בלבד, ומצד שני כדי שיהיה ניתן להפרידם בקלות מהמצע על-ידי שקיעה עם הפסקת הערבול.

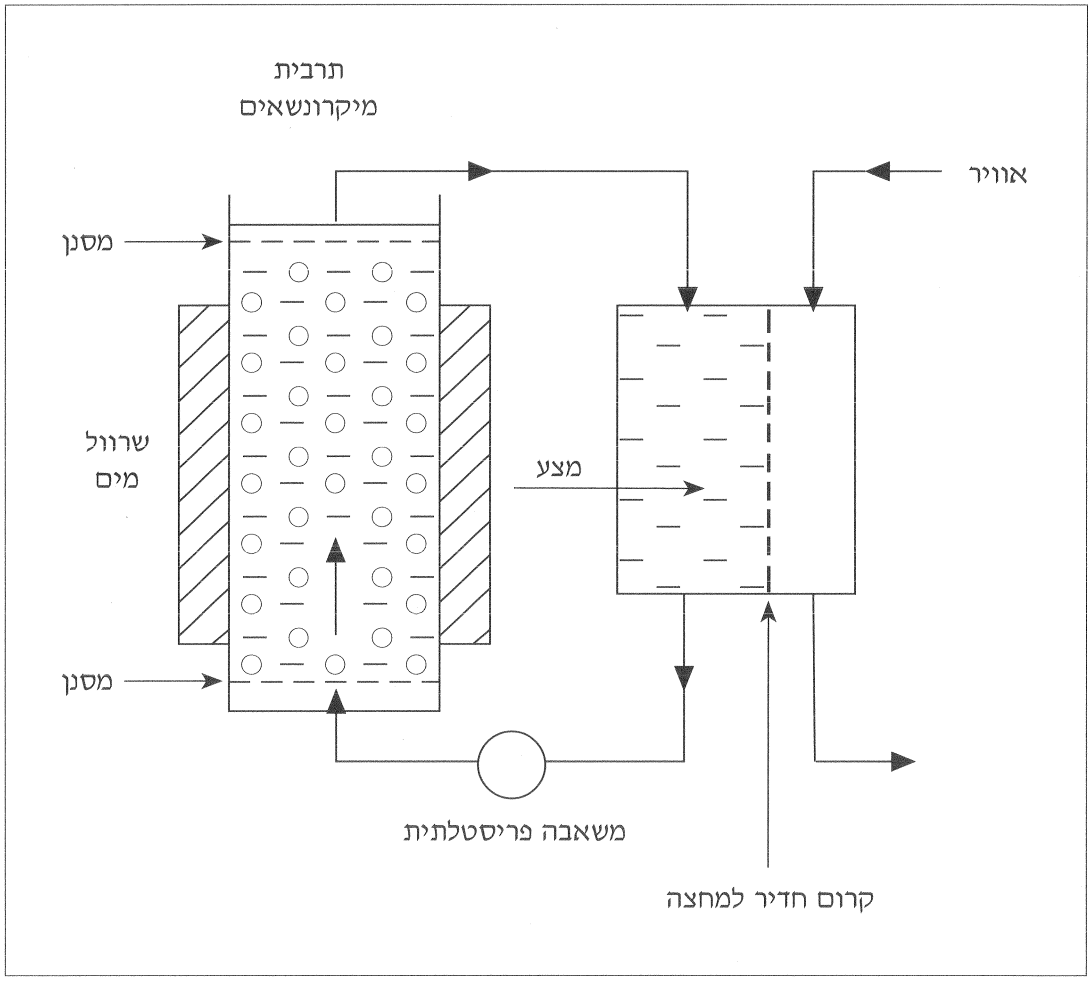
* Reprinted from **Microcarrier Cell Culture: Principle & Methods,** G. Charlier, 1981, p. 5. by courtesy of Pharmacia Biotech AR, Sweden. All rights reserved.

רוב סוגי המיקרונשאים הם בעלי צורה כדורית ושטח פנים אחיד ורציף, המאפשר קישור טוב וגידול הומוגני של התאים על-פניהם. קוטרם נע בטווח של 0.1 - 0.25 מ"מ.

גידול תאים על-פני מיקרונשאים בתרחיף מתבצע בשתי צורות עיקריות:

א. גידול במיכל מעורבל, שבו המיקרונשאים מוחזקים בתרחיף באמצעות ערבול עדין (איור 4-8).

ב. גידול במיכל, שדרכו מתבצעת זרימה רציפה של מצע ממוחזר, מלמטה כלפי מעלה. זרימה זו גורמת להרחפת החרוזים בכל נפח הנוזל. מסננים, הממוקמים בקצות המיכל, מונעים יציאה של החרוזים מתוכו כשהמצע זורם (איור 4-10).



איור 4-10

תרשים סכימתי של תרבית מיקרונשאים, שבה החרוזים מוחזקים בתרחיף על-ידי הזרמה רציפה כלפי מעלה של המצע בכלי הגידול

מערכת המבוססת על מיקרונשאים מאופיינת ביתרונות רבים, ואלה העיקריים שבהם:

א. בקרה פשוטה ויעילה של משתני התהליך.

ב. שטח פנים גדול ביחס לנפח, בהשוואה לתרביות חד-שכבתיות אחרות (ראה איור 4-8). דבר זה מאפשר:
1. ייצור כמות גדולה של תאים בתרבית שנפחה קטן (למעלה מ-10^9 תאים לליטר - שזה פי 2-4 יותר ממה שמושג בתרביות חד-שכבתיות אחרות).
2. הקטנת נפח כלי הגידול ונפח המצע הדרוש לגידול.
3. צמצום מספר ההעברות החוזרות, הדרושות לייצור כמות התאים הרצויה.
4. גמלון קל ומהיר יותר של המערכת.

ג. הסיכון לזיהום מיקרוביאלי נמוך יותר, עקב ירידה בכמות ההעברות החוזרות.

ד. הפרדה קלה של התאים ממצע הגידול. לאחר הפסקת הערבול, החרוזים המצופים בתאים שוקעים לקרקעית כלי הגידול בהשפעת כוח הכובד, ללא צורך בסרכוז.

ה. גידול תאים בקנה-מידה גדול

כדי להשתמש בתאים שמקורם בבעלי-חיים למטרות מסחריות, יש להפיקם בכמויות גדולות. בשנים האחרונות פותחו כמה שיטות לגידול בתרבית של תאים שמקורם בבעלי-חיים בקנה-מידה גדול. בשל המחיר הגבוה של המצע, נפח כלי הגידול מצומצם בהשוואה למקובל במערכות המבוססות על תאים מיקרוביאליים.

גידול כמויות גדולות של תאים, הדורשים תאחיזה למשטח מוצק, מבוסס בדרך-כלל על מערכות הבקבוק הסובב או על שימוש במערכות תרחיף של מיקרונשאים, המספקים שטח פנים גדול ביחס לנפח מצע, כנדרש עבור גידול בקנה-מידה גדול.

מערכות הבקבוק הסובב מבוססות על שימוש בסדרות של בקבוקי זכוכית שנפחם כ-2 ליטר. ציר האורך של הבקבוקים מכוון בצורה אופקית, והם מחוברים למתקן מיוחד, המאפשר לסובבם סביב ציר האורך (ראה איור 4-11). התאים גדלים על-פני כל שטח הפנים הפנימי של הבקבוק, תוך סיבוב רציף שלו, החושף את התאים לשכבה דקה של מצע ולאוויר, לסירוגין.



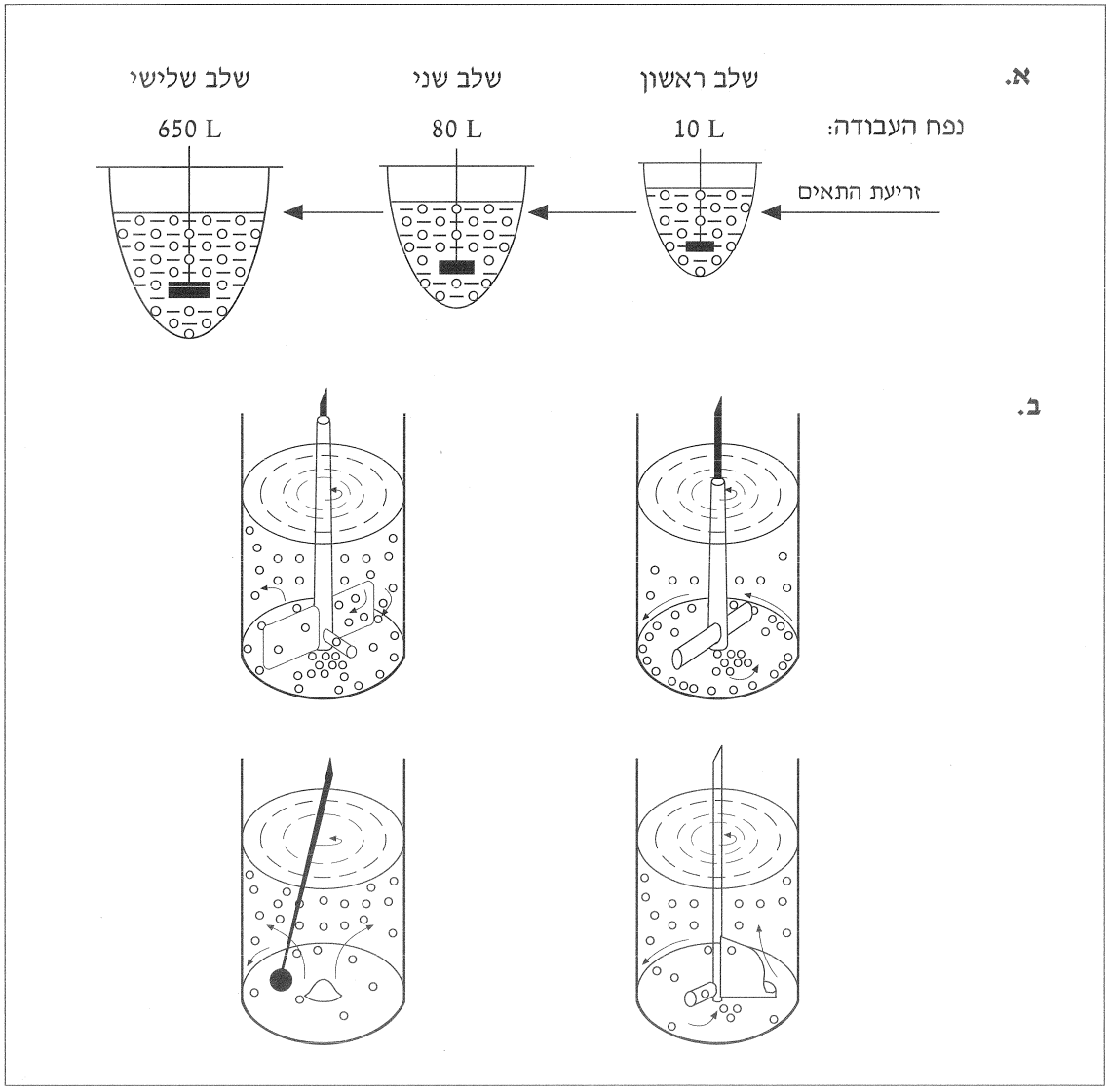
איור 4-11 *

מתקן ייצור שבו ממוקמות סדרות של בקבוקים סובבים, המשמשים לגידול כמויות גדולות של תאים שמקורם בבעלי-חיים הדורשים תאחיזה למשטח מוצק

* Reprinted from Anthony S. Lubiniecki, **Large Scale Mammalian Cell Culture Technology,** 1990, p. 210, by courtesy of Marcel Dekker Inc., New York. All rights reserved.

גידול תאים בקנה-מידה גדול ***במערכות תרחיף של מיקרונשאים*** מבוסס על הגדלה הדרגתית של נפח העבודה עד כמה מאות ליטרים (ראה איור 4-12 א).

מיכל הגידול מכיל מצע גידול, שבתוכו מורחפים חרוזי המיקרונשאים. לאחר זריעת התאים לתוך המצע, הם נצמדים לחרוזים וגדלים על-פניהם בשכבה אחת, העוטפת את החרוז. למערכת מותאם מערבל עדין, היוצר מנגנון ערבול עדין. מנגנון זה מאפשר שמירה על ריכוז גבוה של חרוזים בתרחיף, ללא ניתוק של התאים מהחרוזים ותוך פגיעה מינימלית בחרוזים ובתאים הספוחים אליהם כתוצאה מהתנגשויות בין החרוזים (למבני מערבלים כאלה ראה איור 4-12 ב).



איור 4-12

גידול תרביות תאים על מיקרונשאים בקנה-מידה גדול:

א. מערכת הגידול

ב. סוגי מערבלים במערכת נבחשת

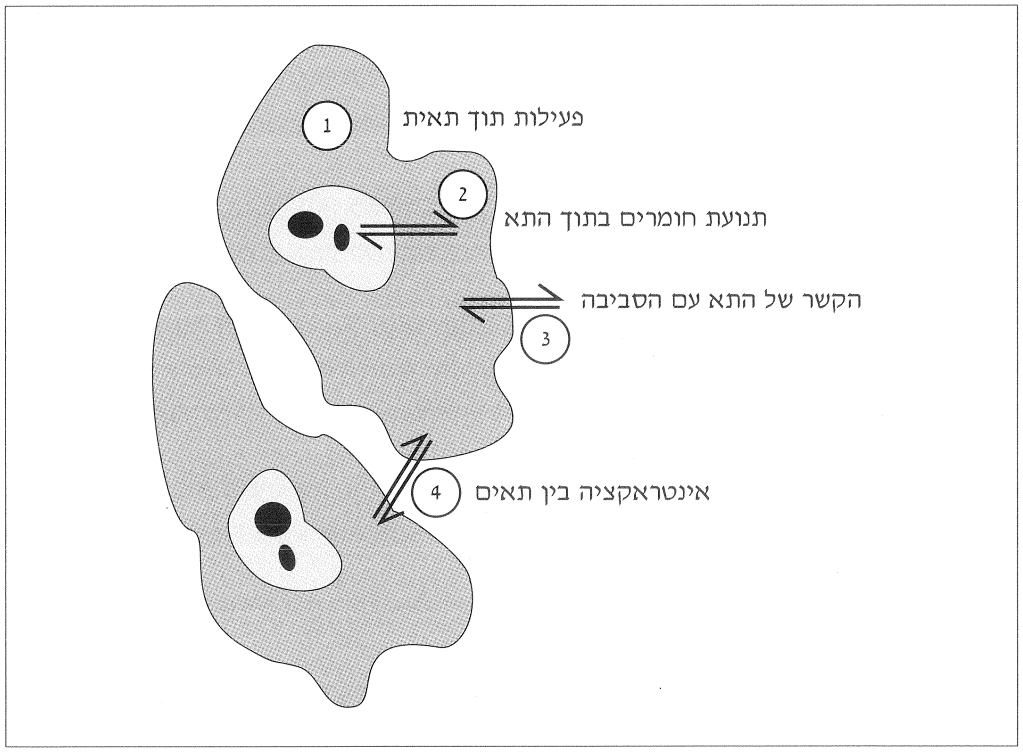
4.1.3 תחומי שימוש בתרביות תאים מבעלי חיים

תרביות תאים שמקורם בבעלי-חיים משמשות בשלושה תחומים עיקריים: חקר המבנה והפעילות של תא של בעל-חיים, הפקת מוצרים חיוניים שמקורם בבעלי-חיים, אבחון וריפוי של מחלות (בעיקר של בני-אדם).

א. חקר המבנה והפעילות של תאי בעלי-חיים

בשטחי מחקר רבים (כגון: חקר הסרטן, וירולוגיה, אימונולוגיה, ציטולוגיה) נעשה שימוש בתרביות תאים שמקורם בבעלי-חיים. אלה הם נושאי המחקר העיקריים (ראה איור 13-4).

1) **פעילות תוך-תאית**, כגון: הכפלה ושעתוק של דנ"א, סינתזת חלבון ותהליכים קטבוליים מפיקי אנרגיה.
2) **תנועת חומרים בתוך התא**, כגון: מעבר של רנ"א מהגרעין לציטופלסמה, ותנועה של הורמונים ומטבוליטים שונים.
3) **הקשר של התא עם הסביבה**, כגון: כניסת חומרי מזון לתוך התא ויציאה של תוצרי פסולת החוצה, הדבקה ויראלית והשפעה של תרופות שונות על התא.
4) **אינטראקציה בין תאים**, כגון: היצמדות של תאים אלה לאלה, שיתוף פעולה מטבולי, עיכוב התרבות על-ידי מגע או על-ידי צפיפות, ותהליך ההתמיינות.



איור 13-4

שטחי מחקר עיקריים הנחקרים בעזרת תרביות של תאים שמקורם בבעלי-חיים

להלן שתי דוגמאות הממחישות את החשיבות של שימוש בתרביות תאים למטרות מחקר:

א) ההוכחה הישירה הראשונה, כי חלבוני ממברנה יכולים לנוע במישור קרום התא, נבעה מתצפיות שנעשו בתרביות תאי-כלאיים, שנוצרו כתוצאה מאיחוי בין תאי עכבר ובין תאי אדם. זמן קצר לאחר האיחוי, התערבבו חלבוני הקרום משני סוגי התאים והתפזרו על פני השטח הכולל של תא-הכלאיים.

ב) תאי-כלאיים שנוצרו כתוצאה מאיחוי בין תאי עכבר ובין תאי אדם מאבדים באופן מועדף ואקראי כרומוסומים של האדם, כך שנוצרים מגוון של גזעי תאי-כלאיים, המכילים כרומוסום אחד או מספר מועט בלבד של כרומוסומים מאדם. תופעה זו מנוצלת למיפוי ולמיקום של גנים בגנום של האדם. בעזרתה ניתן לקבוע באיזה כרומוסום ממוקם גן מסוים לפי יכולת הביטוי של הגן בתא-הכלאיים. כך לדוגמא תאי כלאיים שהכילו רק כרומוסום מספר 11 מאדם ייצרו אינסולין, מה שמלמד שגן, המקודד לאינסולין, ממוקם בכרומוסום מספר 11 בגנום האנושי.

בנוסף להיותן אמצעי מחקר בסיסי, משמשות תרביות של תאים שמקורם בבעלי-חיים גם לקביעת דרגת הרעילות של חומרים שונים (כגון תרופות, מזון, מוצרים קוסמטיים, חומרי ניקוי, שמן, צבע ומזהמים סביבתיים פוטנציאליים) וכאמצעי סריקה בחיפוש אחר תרופות לריפוי סרטן, מחלות ויראליות שונות ומחלות אחרות.

מחקר שמבצעים בו ניסויים בתרביות של תאים שמקורם בבעלי-חיים נקרא ***מחקר in vitro*** והוא עדיף על-פני שימוש בבעל חיים שלם ***(מחקר in vivo)*** מהבחינות הבאות:

א) בתרבית תאים ניתן לחקור באופן ישיר אוכלוסיה מסוימת של תאים מתוך מכלול סוגי התאים הנמצאים בגוף. זאת ללא השפעות לואי של מגוון התהליכים המתרחשים בגוף.

ב) בלימוד ההשפעה של חומר מסוים על התאים, מאפשרת תרבית תאים חשיפה ישירה של התאים לריכוז מוגדר ונמוך יותר של החומר, בעוד שאם נזריק אותו לחיה, יותר מ-90% מהחומר יבוזבז בגופה, כתוצאה מהפרשתו מהגוף ופיזורו ברקמות שאינן נחקרות.

ג) בתרבית תאים קל יותר לחזור על הניסוי במדויק מספר רב של פעמים, במידת הצורך, למשל לשם ביצוע מבחן סטטיסטי.

ד) ביצוע ניסויים בתרביות תאים מפחית את הצורך לבצע ניסויים בבעלי-חיים.

יחד עם זאת צריך לזכור, שגידול של תאים בתרבית מלאכותית לא תמיד מייצג באמת את מצבם ופעילותם בגוף. זאת משום שבניתוקם מהמבנה התלת-מימדי של הרקמה מתבטלות אינטראקציות שונות שמתקיימות בין התאים ברקמה, ומשום שבתרבית מלאכותית לא פועלות מערכות הבקרה הפועלות בגוף כגון: מערכת העצבים ומערכת ההפרשה הפנימית.

ב. הפקת מוצרים שמקורם בבעלי-חיים

ייצורם של מוצרים מועילים, המשמשים בתחומי המחקר, ברפואה ובתעשיות שונות, אפשרי במספר גישות: מיצוי מנוזלים או מרקמות צמחים ובעלי-חיים, סינתזה כימית או ביוכימית, תסיסה מיקרוביאלית, וייצור בתרביות של תאים שמקורם בבעלי-חיים או בצמחים.

הייצור של מוצרים על-ידי מיקרואורגניזמים מאופיין, כאמור, ביתרונות של גידול מהיר ופשוט יחסית בתרבית, דרישות פחות בררניות לגבי הרכב המצע ולכן מצע הגידול זול יותר, יציבות טובה יותר בתנאי אחסון וגידול ורגישות נמוכה יותר לזיהום. החסרון העיקרי בגישה זו מתבטא בעת ייצור מוצרים המשמשים לריפוי (כגון אנזימים, הורמונים), והוא: התפתחות של תגובת חיסון טבעית כנגדם בגוף.

בשנים האחרונות החלו לפתח אמצעים חדשים לייצור של מוצרים חלבוניים מבעלי-חיים בתהליכי תסיסה, כתוצאה מהחדרה וביטוי של גנים מבעלי-חיים במיקרואורגניזמים בשיטות של הנדסה גנטית. אבל על אף מספר הצלחות, במקרים רבים לא ניתן בדרך זו לקבל תוצר, הזהה לגמרי למקור הטבעי, ויש כורח להפיק מוצרים אלה במיצוי מרקמות או מתאים שגודלו בתרבית. הסיבה העיקרית לכך היא העובדה כי רק חלבונים מאופיינים היטב, שיש מידע מלא על הגן המקודד עבורם ועל המסלול הביוסינתטי שלהם, ניתנים לביטוי ולייצור במיקרואורגניזמים מהונדסים. אך גם אז קשה לעיתים להשיג ביטוי של הגן ליצירת תוצר פעיל, עקב המגבלות הבאות:

1) חלק מהחומרים הביולוגיים שמייצרים תאים של בעלי-חיים הם חלבונים, המכילים קבוצות נוספות (כגון שיירי סוכר, זרחן, גופרית, קבוצות הידרוכסיל וקרבוקסיל) החיוניות לפעילותם הביולוגית. תהליך הוספתן של קבוצות אלה מתרחש במסגרת "עיבוד" של החלבון לאחר תהליך התרגום, ואינו מתבצע בחיידקים בשל היעדר מערכות אנזימטיות מתאימות.

2) חומרים ביולוגיים מסוימים נוצרים בתאים של בעלי-חיים על-ידי מעורבות של מספר גנים או יסודות גנטיים אחרים (כגון פרומוטורים, רצפי בקרה), לכן ביטוים בחיידקים הוא תהליך מורכב מאוד ובמקרים רבים לא התאפשר עד היום.

3) במקרים מסוימים הפעילות הביולוגית של החומר (כגון: פעילות הורמונלית, פעילות אנזימטית, פעילות הקישור של נוגדנים ואימונוגניות של אנטיגן) תלויה בקונפורמציה תלת-מימדית מדויקת של המולקולה, שלא תמיד מושגת במהלך ייצורה בחיידקים מהונדסים, בשל היעדר תנאי סביבה ספציפיים או תהליכים של עיבוד משלים, המתרחשים בתא המקורי של בעל-החיים לאחר התרגום.

וכך, אף-על-פי שחלה התקדמות רבה בשטח ההנדסה הגנטית במיקרואורגניזמים, עדיין הרבה מוצרים חשובים מיוצרים בלעדית על-ידי תרביות תאים שמקורם בבעלי-חיים. משתמשים כאמצעי ייצור בסוגים שונים של תאים, על-פי הצורך: תרבית תאים ראשונית, קווי תאים, קווי תאים רציפים, גזעי תאים, היברידומות או תאים שעברו טיפול גנטי (כגון זנים מוטנטיים שונים ותאים מהונדסים של בעלי-חיים).

קבוצות התוצרים העיקריות, המיוצרות כיום על-ידי תרביות של תאים שמקורם בבעלי-חיים, כוללות: תרכיבי חיסון ויראליים, לימפוקינים, נוגדנים חד-שבטיים, פקטורי גידול פוליפפטידיים, הורמונים, אנזימים, אנטיגנים ספציפיים לגידולים סרטניים, וקוטלי חרקים ויראליים.

* **תרכיבי חיסון ויראליים** - תרכיבים כאלה, המשמשים לשימושים רפואיים ווטרינריים, הם התוצר הנמכר ביותר בשוק מבין כל התוצרים של תרביות תאים מבעלי-חיים. ייצורם מבוסס על ריבוי של הוירוסים בתאים והזרקתם לגוף בצורה מומתת, או מוחלשת, לשם השראת התפתחות תגובה חיסונית כנגדם. התאים משמשים בתהליך הייצור כמצע וכפונדקאים לריבוי הוירוסים. באופן זה מיוצרים תרכיבי חיסון מפני: דלקת קרום המוח, שפעת, שיתוק ילדים, חזרת, חצבת, אדמת, כלבת ומחלת הפה והטלפיים.

* **לימפוקינים** - אלה הם שורה של חומרים הפועלים כמתווכים ומבקרים של תגובות שונות במערכת החיסון. רובם מופרשים על-ידי תאי T מרוגשים, שנחשפו לאנטיגן, ומזרזים התחלקות של לימפוציטים (תאי B ותאי T) והפעלה של מקרופאגים. ל ימפוקינים אלה משמשים למחקרים, העוסקים בלימוד התפקוד של מערכת החיסון, ואף לטיפול בהפרעות אימוניות.

אחד הלימפוקינים הידועים והחשובים ביותר הוא ***האינטרפרון***, שהוא חלבון גליקופרוטאיני נמוך-מולקולרי, המיוצר על-ידי תאים שונים בגוף (כגון: תאי אפיתל, פיברובלסטים, לימפוציטים, מקרופאגים), בתגובה להדבקתם בנגיפים, והוא מסוגל למנוע הדבקה של תאים שכנים בנגיף. האינטרפרון משמש כאמצעי ריפוי של מחלות ויראליות ושל סוגים מסוימים של סרטן.

* **נוגדנים חד-שבטיים** - מיוצרים על-ידי היברידומות ומאופיינים בטווח רחב של שימושים, שהיכרנו בפרק הקודם.

* **פקטורי גידול פוליפפטידיים** - אלה הם שורה של חלבונים הנחוצים לגידול של תאים ספציפיים של בעלי חיים בתרבית.

* **הורמונים** - רוב ההורמונים הם חלבונים או גליקופרוטאינים, המיוצרים בתרבית על-ידי תאי יונקים, הדורשים תאחיזה למשטח מוצק, והם משמשים בעיקר למטרות ריפוי. העיקריים שבהם הם הורמוני הגדילה המשפיעים על גידול הרקמות והגוף, וההורמונים המפקחים על פעילות בלוטות המין (השחלה והאשך).

* **אנזימים** - מתוך אלפי האנזימים המיוצרים בתרבית על-ידי תאים שמקורם בבעלי-חיים, רק בודדים מיוצרים בקנה-מידה מסחרי לצורכי ריפוי. ביניהם בולטים כמה אנזימים פרוטאוליטים, הנקראים באופן כללי פלסמינוגן אקטיבטור, וכמשתמע משמם, מבצעים הפעלה של אנזים הנקרא פלסמין ואחראי להמסה במנגנון טבעי של קרישי דם, הגורמים הצרה או סתימה של כלי דם, ומכאן חשיבותם הרפואית.

* **אנטיגנים ספציפיים לסרטן** - אלה הם גליקופרוטאינים, המופיעים בלעדית על-פני השטח של תאים סרטניים, או מופרשים מהם ומופיעים בנוזלי הגוף. אנטיגנים אלה משמשים בכמה תחומים: במחקר בסיסי, בחיפוש אחר חומרים שישמשו לטיפול בסרטן, באבחון מוקדם של גידולים ממאירים בבני-אדם באמצעות שיטות סרולוגיות, ובמעקב אחר יעילות הריפוי של חולי סרטן.

* **קוטלי חרקים ויראליים** - הם וירוסים הפוגעים בחרקים ומנוצלים להשמדה של חרקים מזיקים. השימוש בהם יש לו שני יתרונות: הם משמידים חרקים מזיקים מסוימים, בלי לפגוע בחרקים מועילים, וכמו כן אין הם גורמים לנזק אקולוגי כמו חומרי ההדברה. הקוטל העיקרי בקבוצה זו הוא ***הבקולווירוס***, המשמש למניעת מחלת הדבר, הנגרמת על-ידי חיידק ומועברת לבני-אדם ולבעלי-חיים, בין היתר, באמצעות פרעושים.

הפקת התוצר מתרבית של תאים של בעלי-חיים, המשמשים לייצור של חומרים ביולוגיים, מתבצעת על-פי חלוקה ל***תוצרים חוץ-תאיים ותוצרים תוך-תאיים***.

כאשר התוצר המבוקש מופרש על-ידי התאים למצע במהלך הגידול, כדוגמת הנוגדנים החד-שבטיים, הוא מופק ישירות ממאגר המצע המנוצל על-ידי תהליכי ריכוז וניקוי.

כאשר התוצר המבוקש נשאר קשור לתאים, כדוגמת אנטיגן על שטח הפנים של תאים סרטניים, הפקתו דורשת תחילה קצירה של התאים, מיצוי שלו מן התאים, ולבסוף ריכוז וניקוי בשיטות ביוכימיות סטנדרטיות.

במקרים מסוימים נדרש לאחר הגידול שלב נוסף של טיפול בתאים, המיועד להשרות את הייצור של התוצר המבוקש, כמו במקרה של ייצור אינטרפרון. לשם כך מעבירים את התאים לכלי חדש עם מצע מתאים, ובו מתבצע הייצור של התוצר, בעקבות הוספה של גורם משרה. בהמשך עובר התוצר מיצוי, ריכוז וניקוי כמו במקרים האחרים.

ג. אבחון וריפוי של מחלות

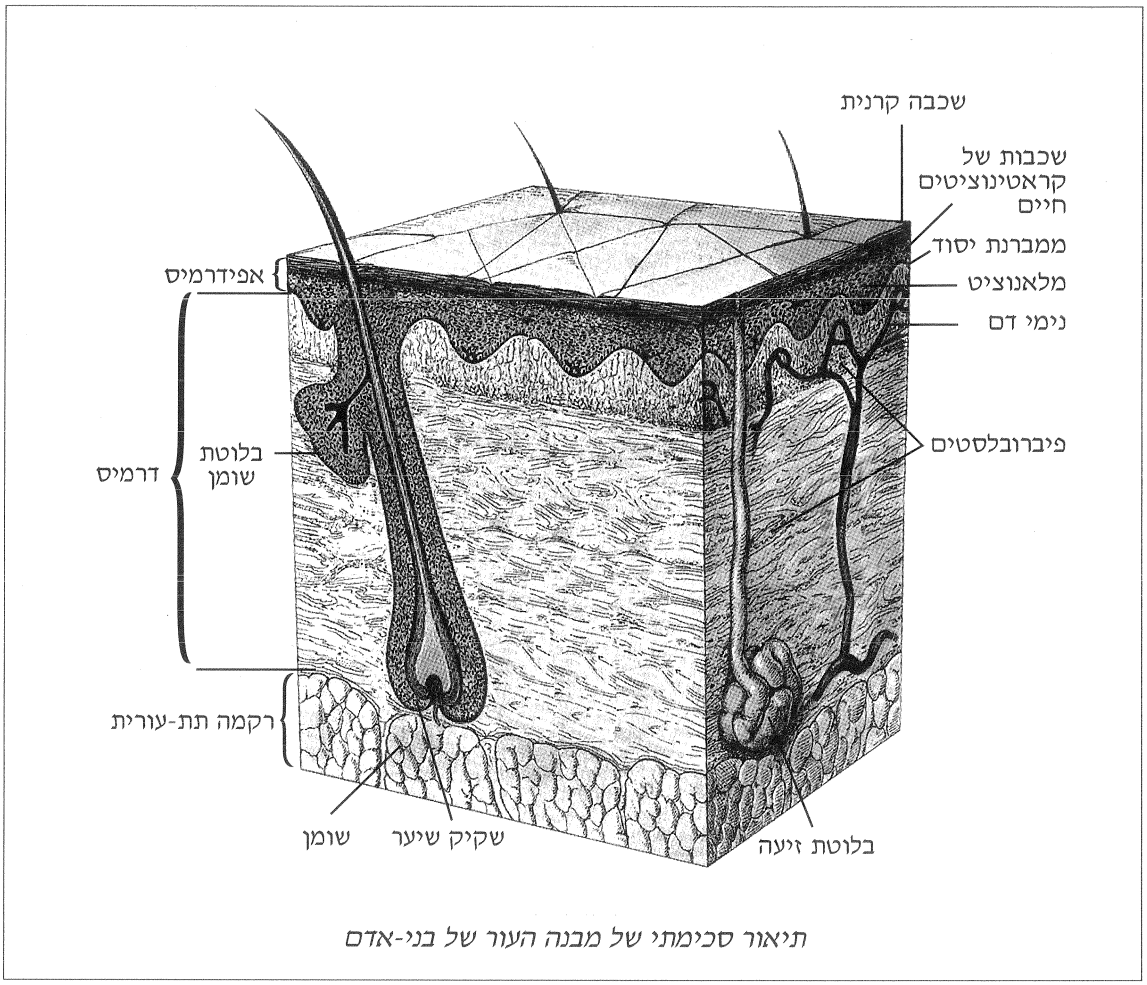
תרביות של תאים שמקורם בבעלי-חיים משמשות כיום לאבחון רפואי בעיקר בשני תחומים:

1) גילוי של פגמים גנטיים מסוימים בעובר באמצעות דיקור מי השפיר בחודש החמישי להריון. מי השפיר מכילים מעט תאי עור של העובר. גידול של תאים אלה בתרבית מאפשר לקבל כמות של תאים, הגדולה דיה כדי לביצוע בדיקת כרומוסומים.

2) אבחון איכותי וכמותי של זיהומים ויראליים באמצעות תרביות חד-שכבתיות של תאי מאכסן מתאים.

יישום מעניין של תרביות תאים לצורכי ריפוי מתבצע בתחום של ***משתלי עור***.

עור האדם עשוי משני סוגי רקמות: רקמה אפיתליאלית הנקראת אפידרמיס ורקמת חיבור הנקראת דרמיס (ראה איור 14-4).



תיאור סכימתי של מבנה העור של בני-אדם

האפידרמיס מהווה את השכבה החיצונית של העור ובנוי בעיקר מ***קראטינוציטים*** - תאים אפיתליאליים המכילים קראטינים (קבוצה של חלבונים סיביים) ואחראים ליצירת המבנה האופייני של האפידרמיס. הקראטינוציטים באפידרמיס מוחזקים יחד על-ידי ***דסמוזומים*** - בליטות דקות היוצאות מהתאים ומחברות בין תאים שכנים. בנוסף לקראטינוציטים מכיל האפידרמיס גם טיפוסים אחרים של תאים, המהווים יחד פחות מ-10% מכל תאיו, ביניהם ***המלאנוציטים*** - התאים היוצרים את הצבען מלאנין שבעור האדם.

במבנה האפידרמיס ניתן להבחין בשני חלקים עיקריים: בחלק פנימי ובחלק חיצוני (ראה איור 4-14). החלק הפנימי בנוי מקראטינוציטים חיים המסודרים בשכבות. בתחתית החלק הפנימי מצוי אזור של התחלקות תאים הנקרא ***שכבה בסיסית***, ומכיל קראטינוציטים קטנים שהולכים ומתחלקים ליצירת תאים חדשים שנדחפים כלפי חוץ אל עבר פני העור. במהלך תהליך זה גדלים הקראטינוציטים ומתמיינים, תוך שינויים מתמידים בהרכב הציטופלסמה, עד שלבסוף הם מתים והופכים ל"שלדים" תאיים יבשים הנקראים ***קורנאוציטים***.

החלק החיצוני של האפידרמיס, המכונה ***שכבה קרנית***, בנוי ממספר שכבות של קורנאוציטים כאלה, והם הגורמים לכך שהעור אינו חדיר למים ולכך שהוא עמיד בפני פגיעות כימיות ופיסיקליות.

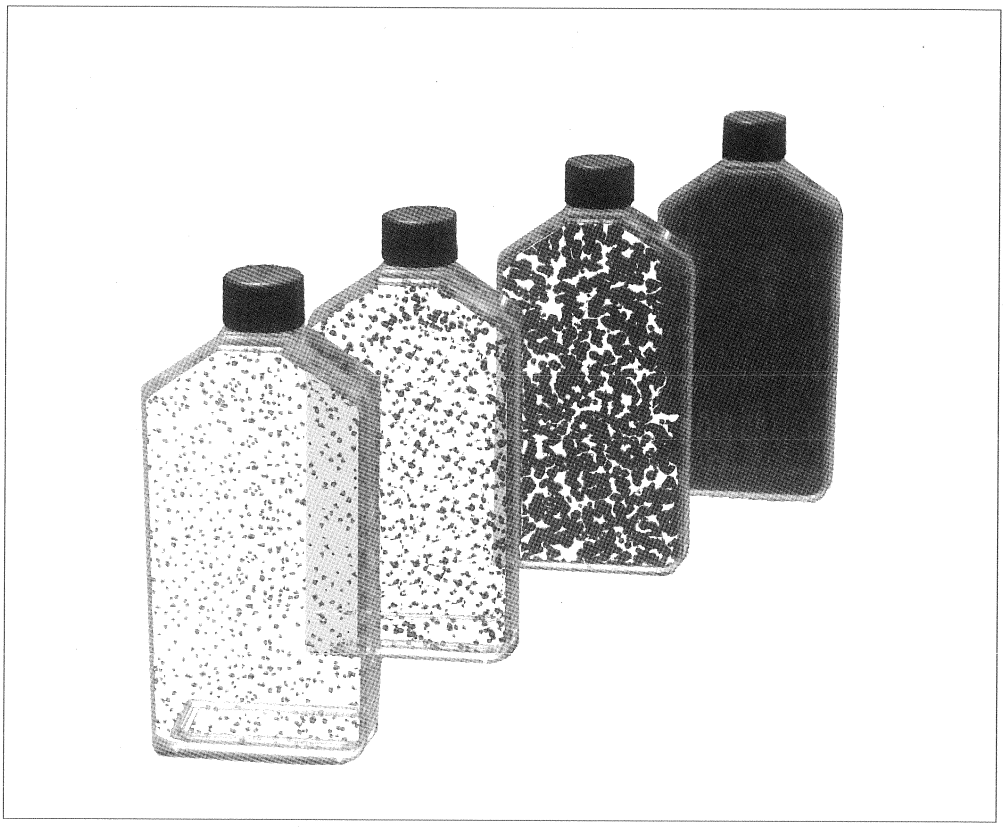
מתחת לשכבה הבסיסית של האפידרמיס מצויה ***ממברנת יסוד*** המפרידה בין האפידרמיס לדרמיס. ***הדרמיס*** הוא רקמת חיבור, המצויה מתחת לאפידרמיס, ואשר עשויה בעיקר מפיברובלסטים. אלה מייצרים את החלבונים קולגן ואלסטין, המשמשים כיסודות מבנה חוץ-תאיים. בנוסף לפיברובלסטים מכיל הדרמיס שקיקי שיער, בלוטות זיעה, בלוטות שומן ומערך מסודר של נימי דם (ראה איור 4-14).

הנוזל שמזין את תאי האפידרמיס מקורו בנימי הדם שבדרמיס, והוא זורם בדיפוזיה מנימי הדם דרך הדרמיס, עובר את ממברנת היסוד ומגיע לאפידרמיס. כשהוא עובר דרך הדרמיס, הוא נטען בתוצרים, המופרשים על-ידי הפיברובלסטים, ואשר דרושים להתרבות אופטימלית של הקראטינוציטים.

קראטינוציטים אפידרמליים של בני-אדם גדלים מהר בתרבית, ובאמצעות העברות חוזרות ניתן לגדלם בכמויות גדולות וליצור שתלים של אפידרמיס, שישמשו נפגעים של כוויות בדרגה חמורה.

הגידול מתבצע בכלי, שתחתיתו מכוסה בתאים פיברובלסטים מקור רציף. תאיו של קו רציף זה הוקרנו ולכן אין הם מסוגלים להתחלק, אולם עדיין פעילים מטבולית ומשמשים תאי הזנה, המספקים לקראטינוציטים פקטורי גידול לזירוז התרבותם, בדומה למתרחש בגוף. כמזרע לתהליך משמשים תאי אפידרמיס מעור של בן-אדם, שהופרדו זה מזה באמצעות טריפסין. מרביתם של תאים אלה לא יוכלו לגדול בתרבית, מאחר שהחלו בתהליך ההתמיינות ליצירת קורנאוציטים ואיבדו בכך את כושר החלוקה. רק 1% עד 10% מתאי האפידרמיס יתרבו ויצרו מושבות על-פני הקרקעית של כלי הגידול.

בשלב הבא מושבות אלה נאספות, והתאים מופרדים באמצעות טיפול בטריפסין. התאים נזרעים לכלי גידול חדש. הפעם כ-70% מהם מתרבים ויוצרים מושבות, שהולכות ומתפשטות, עד שבתוך שבעה עד תשעה ימים הן מתלכדות ליצירת שכבה אפיתליאלית רציפה (ראה איור 4-15 בעמוד הבא), המכילה כ-600 תאים, המחוברים זה לזה בחוזקה באמצעות דסמוזומים.

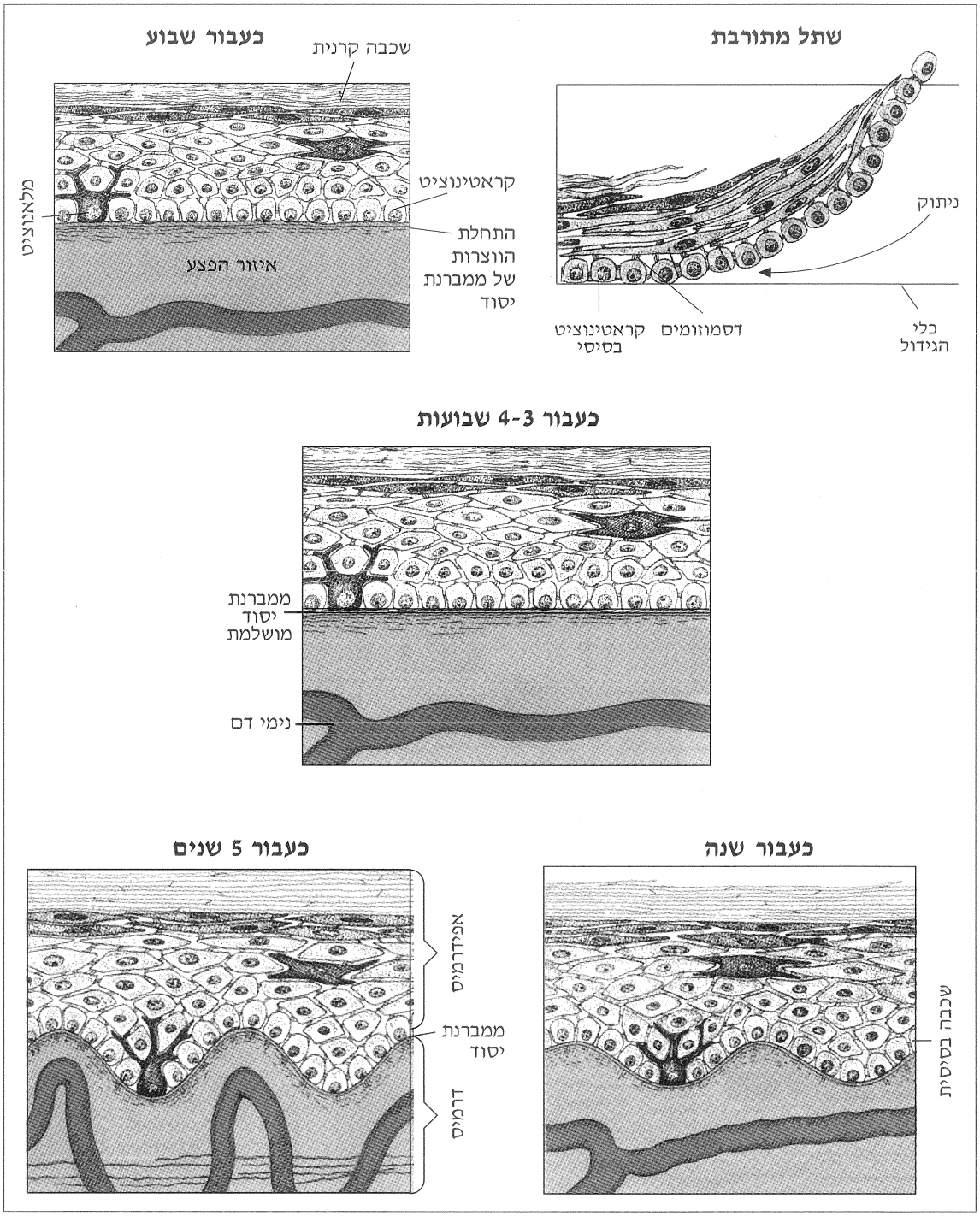


איור 4-15
גידול של תאים אפידרמליים של בני-אדם בבקבוקי רקמה.
ניתן לראות כיצד המושבות הצבועות של קראטינוציטים הולכות
ומתרחבות עד להתלכדותן ליצירת שכבה רציפה של אפיתל

במהלך היוצרות השכבה האפיתליאלית חל ניתוק של הפיברובלסטים מקרקעית כלי הגידול והאפיתליום המתורבת נצמד על פניה בחוזקה.

בהמשך, התאים במרכז השכבה האפיתליאלית ממשיכים להתחלק ומתחילים להסתדר בשכבות ולהתמיין ליצירת קורנאיצ'יטים. באופן זה נוצרת רקמה אפיתליאלית רב שכבתית בעלת סידור תאים הדומה לזה של האפידרמיס שבעור: התאים המתחלקים נמצאים על פני הקרקעית של כלי הגידול ומקבילים לשכבה הבסיסית של האפידרמיס המצויה על פני ממברנת היסוד, והתאים שעברו התמיינות נמצאים בחלק העליון הגובל עם המצע ומקבילים לשכבת הקרנית של האפידרמיס.

תהליך ההשתלה וההשתרשות של רקמת האפיתל המתורבתת לשם שחזור העור באדם באיזורי פציעה, מתואר באיור 4-16.



*איור 4-16 **

שחזור של עור באזורי פציעה באמצעות שתל מתורבת של אפידרמיס

* Reprinted from "Cultured Cells for the Treatment of Disease," by Howard Green, Copyright © November 1991, **Scientific American, Inc.** All rights reserved.

תחילה האפיתליום המתורבת מנותק בעדינות מפני השטח של כלי הגידול, בלי לפגוע בדסמוזומים המחברים בין תאים שכנים. לאחר הניתוק, שוטפים את האפיתליום המתורבת, כדי להרחיק מתוכו שרידים של מרכיבי המצע. במצב זה ניתן להקפיאו ולשמור אותו בחנקן נוזלי כמקור זמין להשתלה. בעת הצורך האפיתליום מופשר, ומונח על-פני אזור הפצע. עם הזמן השתל המתורבת הולך ומשתרש באזור הפצע, כאשר הוא ניזון ישירות מכלי הדם שבו. במהלך ההשתרשות מתרחשים בשתל שינויים ביוכימיים ומבניים בהרכב ובארגון התאים, עד שמתקבל המבנה האופייני של האפידרמיס הטבעי.

יצירה של שתלי עור בתרבית מאופיינת בייצור מהיר יחסית של כמויות גדולות של עור "מתורבת", הזהה מבחינה אנטיגנית לעור המקורי, וניתן לקבלו תוך פגיעה מינימלית בפרט החולה, שהוא המקור לתאים, בהשוואה לניתוחי השתלה של עור שנלקח מאברים אחרים.

שתלי אפיתל מתורבתים משמשים בעיקר לשחזור העור במקרים של כוויות מדרגה שלישית, בהם הפצע שנוצר לא יכול להבריא מאליו. הכמות של האפידרמיס התקין, הדרוש לשם זריעה ויצירה של שתלי עור בתרבית, היא קטנה יחסית (כ-3 סמ"ר) ובתוך 3-4 שבועות ניתן לייצר ממנו אפיתליום מתורבת בכמות שתספיק לכיסוי מלא של פני שטח הגוף של אדם מבוגר (כ-1.7 מ"ר).

אבל השימוש המוצלח בשתלי עור מתורבתים לטיפול באנשים, שנכוו קשות, הוא מוגבל, בעיקר משום שפני השטח של אזור הכוויה הם בדרך-כלל מאוד מזוהמים במיקרואורגניזמים. כדי שההשתלה תצליח, יש צורך בהרחקה מוחלטת כמעט של מיקרואורגניזמים מאזור הכוויה, כדי ליצור משטח סטרילי אשר על-פניו נשתל האפיתליום המתורבת.

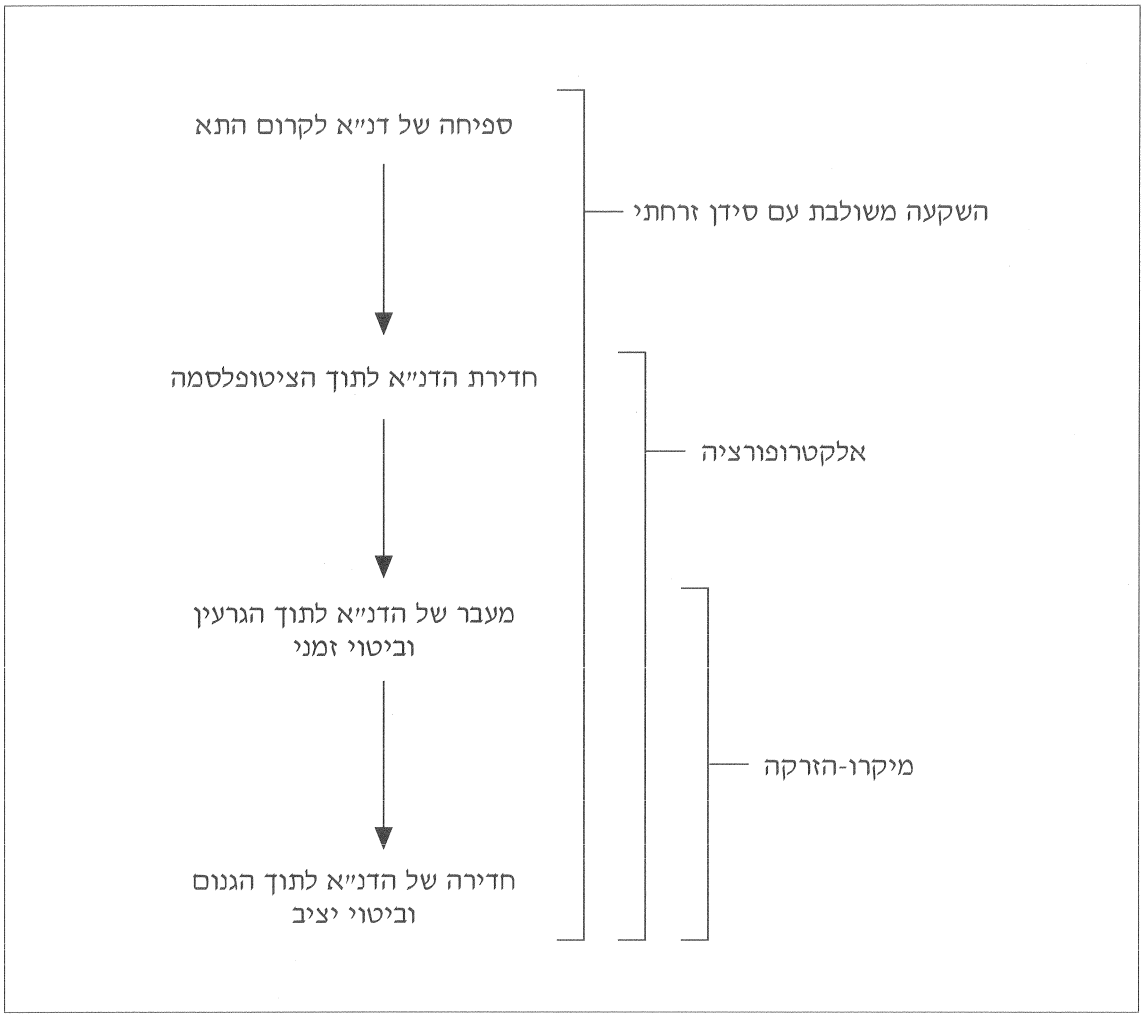
4.1.4 החדרת גנים לתאים של בעלי-חיים

כפי שראינו, האפשרות להחדיר ולבטא גנים מבעלי-חיים במיקרואורגניזמים היא מוגבלת, ולכן הולך ומתרחב השימוש בגישה דומה בתאים של בעלי-חיים.

החדרה של גנים לתאים של בעלי-חיים באמצעות שיטות של הנדסה גנטית נועדה להקנות להם תכונות רצויות על-ידי שינויים בתכולה של אנזימים ושל חלבונים ייחודיים בתא.

א. שיטות החדרה

תהליך ההחדרה של דנ"א זר לתאים של בעלי-חיים נקרא ***טרנספקציה***, וניתן להחדיר באמצעותו לתאים דנ"א כרומוזומלי הקשור לחלבונים, דנ"א גנומי ערום, או דנ"א המשובט בתוך פלסמיד המשמש ***כווקטור***.
באיור 4-17 מתואר באופן כללי תהליך טרנספקציה.



איור 4-17

תרשים זרימה כללי של תהליך טרנספקציה, כולל השלבים הנכללים בשיטות ההחדרה השונות

תיאור התהליך:

תחילה מתרחשת ספיחה של הדנ"א אל קרום התא.

בהמשך הדנ"א חודר לתוך התא - כנראה על-ידי מנגנון של בליעה (פאגוציטוזה). בתוך התא הדנ"א נודד מהציטופלסמה לגרעין. רוב העותקים של הדנ"א נשארים בגרעין זמן-מה (כ-48 שעות), בלי לחדור לכרומוסום. בזמן זה הם עשויים לשמש תבנית ליצירה של חלבונים בתהליך הנקרא ***ביטוי גנים זמני***, משום שהוא מסתיים לאחר מספר ימים, עקב "מיהול" ואיבוד העותקים החוץ-כרומוסומליים של הדנ"א (שהם חסרי יכולת הכפלה עצמית) במהלך החלוקות של התאים.

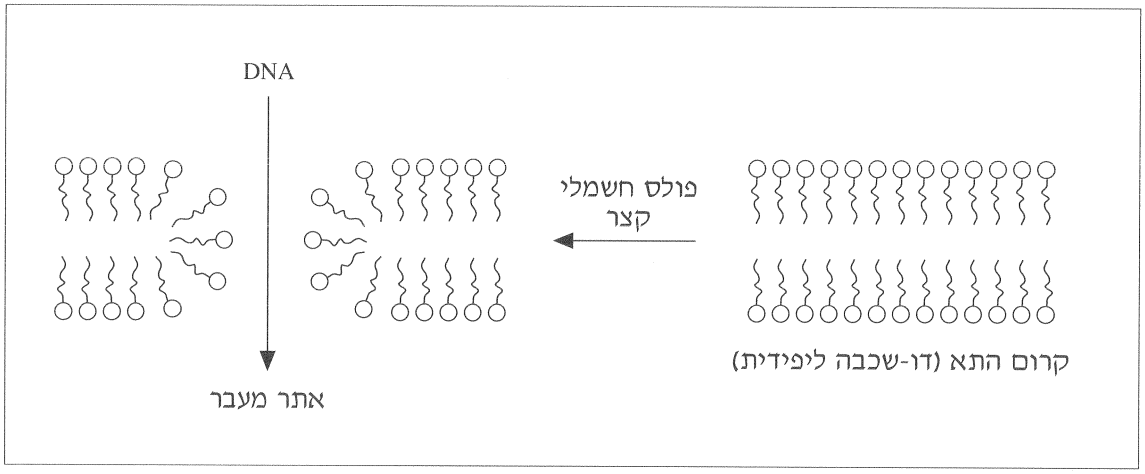
חלק קטן מהעותקים של הדנ"א הזר משתלבים בתוך הדנ"א הכרומוסומלי והופכים כתוצאה מכך לחלק מהגנום של התא המאכסן; הם מוכפלים יחד איתו בזמן חלוקת התאים, ומשמשים תבנית לייצור של חלבונים בתהליך של ***ביטוי גנים יציב***.

השתלבות הדנ״א הזר בכרומוסום מתרחשת באתרים אקראיים ובתדירות נמוכה ביותר - רק ב-10%, לכל היותר, מהתאים שקלטו במקור את הדנ״א חלה אינטגרציה שלו לתוך הגנום התאי. בידודם של תאים אלה אפשרי רק באמצעות שיטות ברירה מתאימות.

על מנת להקל על החדירה של הדנ״א הזר לתוך התאים בתהליך הטרנספקציה פותחו כמה שיטות כימיות ושיטות פיסיקליות.

השיטות הכימיות מבוססות בדרך-כלל על ערבוב של הדנ״א שרוצים להחדיר עם חומר טעון (בדרך כלל ***סידן זרחתי***) ליצירת משקע משולב המוסף לתאים, וגורם כנראה לריכוז של הדנ״א על-פני קרום התא ובכך מסייע בהמשך להחדרתו לתוך התא בפאגוציטוזה.
לעיתים נהוג לערבב את הדנ״א עם ליפידים מסוימים, המסייעים כנראה להעברתו דרך קרום התא על-ידי התמוססות בשכבה הליפידית של הקרום.
השיטות הכימיות הן זולות ופשוטות, אולם מאופיינות ביעילות נמוכה יחסית - רק 10% מהתאים לכל היותר עוברים טרנספקציה יציבה.

השיטות הפיסיקליות הן בעיקר שתיים: אלקטרופורציה ומיקרו-הזרקה.
אלקטרופורציה מבוססת על ייצור של אתרי מעבר בתוך קרום התא, כתוצאה מתגובה בין דיפולים ליפידיים בממברנה בהשראת שדה חשמלי (ראה איור 18-4):



איור 18-4
העקרון של אלקטרופורציה כשיטה להחדרה של דנ״א לתוך התא

אמנם בשיטה זו אין צורך בספיחה של הדנ״א לקרום התא כתנאי מוקדם להחדרתו, ולכן היא מהירה יותר, אולם היא עשויה לגרום במקרים רבים למות התא.

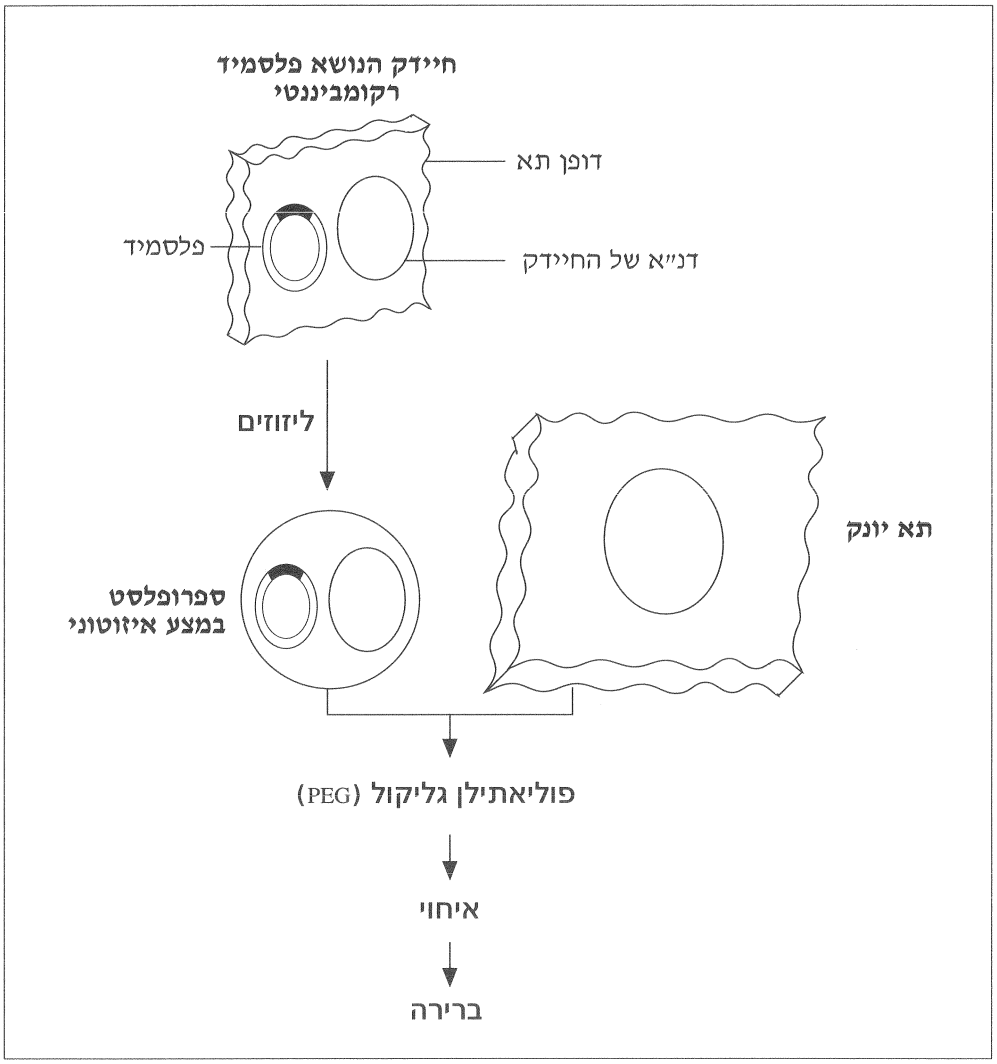
מיקרו-הזרקה מבוססת על החדרה ישירה של הדנ״א לתוך הגרעין של התא באמצעות פיפטת זכוכית זעירה, תוך מעקב מיקרוסקופי. כך נחסכים השלבים שבהם הוא חודר לציטופלסמה ועובר לגרעין. שיטה זו מאופיינת ביעילות גבוהה מאוד של טרנספקציה (בין 10% ל-30% מהתאים עוברים טרנספקציה יציבה), אולם כיוון שהיא דורשת טיפול בנפרד בכל תא ותא, היא מורכבת יחסית.

בחירת השיטה לביצוע הטרנספקציה תלויה, בין היתר, בסוג התאים. קווי תאים רציפים נבדלים מאוד ביכולתם לקלוט דנ״א באמצעות שיטות הטרנספקציה השונות, כך שיש לקבוע אמפירית עבור כל קו תאים, מהי שיטת ההחדרה המתאימה לו.

בנוסף לטרנספקציה, ניתן להחדיר דנ״א זר לתאים של בעלי-חיים באמצעים ביולוגיים: איחוי פרוטופלסטים או הדבקה ויראלית.

* **איחוי פרוטופלסטים**

זוהי שיטה כללית להחדרת מקרומולקולות לתוך תאים ואין היא מוגבלת להחדרה של דנ״א בלבד. עקרון השיטה מתואר באופן סכימתי באיור 4-19.



איור 4-19
החדרת דנ״א זר לתוך תאי יונקים באמצעות איחוי פרוטופלסטים

בשלב הראשון חיידקים, הנושאים פלסמיד רקומביננטי, המכיל את הדנ"א המיועד להחדרה, עוברים טיפול בליזוזים, לשם פירוק הדופן. מתקבלים תאים עגולים חסרי-דופן, הקרויים ***ספרופלסטים***. הספרופלסטים נשמרים במצע איזוטוני, כלומר במצע שהלחץ האוסמוטי בו זהה לזה שבפנים התא.

בהמשך מערבבים את הספרופלסטים עם תאי יונקים (בדרך כלל ביחס של 10^4 ל-1, בהתאמה) ומוסיפים לתערובת פוליאתילן גליקול - חומר המעודד איחוי של קרומי תאים. לאחר האיחוי, בוררים באמצעות שיטה מתאימה את תוצרי האיחוי, המכילים את מקטע הדנ"א המשובט.

* **הדבקה ויראלית**

החדרה של דנ"א לתאים עילאיים באמצעות הדבקה ויראלית נקראת ***טרנסדוקציה***, והיא מבוססת על היכולת הטבעית של וירוסים להחדיר את החומר התורשתי שלהם לתוך התאים במהלך ההדבקה. הגנום של הוירוס משמש במקרה זה כווקטור, שלתוכו משובט הדנ"א שברצוננו להחדיר. ניתן לארוז מלאכותית את הגנום הרקומביננטי המתקבל בתוך מעטפת חלבונית מתאימה, ליצירת וירוסים, המשמשים בהמשך להדבקה של קווי תאים בתרבית או של רקמות (תהליך שיתואר בפירוט בסעיף הבא).

בין הוירוסים של בעלי-חיים, המשמשים למטרה זו, הנפוצים ביותר הם: SV40, אדנווירוס, וקציניה, הרפס ורטרווירוס. ברוב המקרים נדרשת הרחקה של חלק מן הגנום הויראלי, כדי לשבט את הדנ"א בתוכו, מאחר שגודל הגנום, הניתן ל"אריזה" במעטפת החלבונית הויראלית, הוא מוגבל.

לאחר שהדנ"א הזר הוחדר לתאים באחד מן האופנים שתיארנו (איחוי פרוטופלסטים או הדבקה ויראלית), צריך לברור מתוך אוכלוסית התאים הכללית את אותם התאים, שבהם הוא מבוטא באופן יציב. כדי להקל על תהליך הברירה, הווקטורים, המשמשים כנשאים להחדרת הדנ"א, מכילים גן נלווה, המקנה לתאים המהונדסים עמידות לנוכחותם של חומרים רעילים שונים, או גן נלווה, המתקן פגם מטבולי מסוים הקיים בתא המאכסן המותמר ומאפשר לו לגדול במצע בררני מותאם.

הגידול במצע בררני נמשך 10-14 יום מזמן החדרת הדנ"א לתאים. המושבות המתקבלות מייצגות תאים מהונדסים יציבים.

באופן כללי היעילות של תהליך החדרה של גנים לתאים של בעלי-חיים תלויה ביעילות הקליטה של הדנ"א על-ידי התאים, בשילובו בגנום התאי וברמת הביטוי של הגן המוחדר ליצירת החלבון המתאים.

רמת הביטוי של הגן בתאים המהונדסים תלויה בראש וראשונה ביכולת ויעילות השעתוק של תבנית הדנ"א שחדרה לגנום. באופן כללי בתאים עילאיים יש שלושה סוגים של רצפי דנ"א, המשפיעים על תהליך השעתוק:

1) **פרומוטור** המכיל את אתר הקישור של רנ"א פולימראז.
2) **רצף מגביר שעתוק** האחראי להגברה של התחלת השעתוק מהפרומוטור ומסוגל להשפיע גם על פרומוטורים, המרוחקים ממנו ברצף הקווי.
3) **רצף בקרה** המגיב עם חלבונים ספציפיים וכתוצאה מכך מפעיל (בקרה חיובית) או מעכב (בקרה שלילית) שעתוק של גן סמוך, הנמצא בהמשך לו.

השימוש בווקטורים פלסמידיים או בווקטורים ויראליים להחדרת דנ"א לתאי יונקים מאפשר, בנוסף לברירה פשוטה יותר של התאים המהונדסים, גם שליטה טובה יותר ביעילות השעתוק של הגנים המשובטים. וקטורים המשמשים לביטוי מכילים בדרך-כלל פרומוטור יעיל לפני אתר השיבוט, כך שהשעתוק של הגן המשובט בווקטור מתחיל מפרומוטור זה. בנוסף הם יכולים להכיל גם רצפים מגבירי שעתוק ורצפי בקרה.

בנוסף לשעתוק נדרשים לעיתים תהליכים משלימים לתהליך היצירה של חלבון פעיל מסוים, כגון: עיבוד של רנ"א שליח לאחר השעתוק, תרגום יעיל של הרנ"א לחלבון, והחדרה של שינויים ייחודיים בחלבון לאחר התרגום. במקרה זה הכרחי שהתאים, שלתוכם מוחדר הדנ"א, ידעו לבצע תהליכים אלה.

ב. תחומי יישום

החדרה של גנים לתאים של בעלי-חיים מנוצלת בכמה תחומי יישום. להלן נפרט את התחומים האלה.

1) **בתחום המחקר** - היישום של החדרת גנים לתאים של בעלי-חיים בתחום המחקר נועד בעיקר לאיפיון ובידוד של גנים וללימוד מנגנוני הבקרה המווסתים את הביטוי של גנים ביונקים.

2) **הגברת תפוקת הייצור בתרבית של מוצרים מבעלי-חיים בעלי ערך מסחרי** - תוך שמירה על פעילות מירבית של המוצר. תא שמקורו בבעל-חיים, גם כשהוא גדל בתרבית, הוא בעל כושר לספק את מכלול הקופקטורים והאנזימים הספציפיים, הדרושים לעיבוד תוצר חלבוני, לאחר שלב התרגום.

בנוסף הוא מספק סביבה ציטופלסמתית מתאימה, שבה החלבונים מתקפלים בהליך הטבעי ויוצרים את הקשרים הדיסולפידיים הנאותים ליצירת המבנה התלת-מימדי הייחודי, הדרוש לשם פעילות ביולוגית של התוצר (כגון פעילות אנזימטית, פעילות הורמונלית ופעילות אימונולוגית). מכלול זה יוצר אף בסיס לאפשרות של הנדוס תאים שמקורם בבעלי-חיים, במקום תאים מיקרוביאליים, במטרה להופכם ליצרני-יתר של התוצר המבוקש.

התוצרים המסחריים העיקריים המיוצרים כיום על-ידי תאים שמקורם בבעלי-חיים מהונדסים בתרבית הם: פלסמינוגן אקטיבטור, גורמי קרישת דם, סוגים מסוימים של אינטרפרון והורמון גדילה של בני-אדם.

יש לציין שרוב התוצרים האלה הם חלבונים, העוברים תהליך של שינוי ועיבוד, לאחר היווצרות שרשרת החלבון בריבוזומים. האינטרפרונים הם גליקופרוטאינים בעלי שייר סוכרי, ולגורם קרישת דם מוספות למולקולה קבוצה קרבוקסילית וקבוצה הידרוקסילית, לאחר שלב התרגום.

ייצור מוגבר של תוצר מסוים לא דורש בהכרח השתלבות של הגן המוחדר בתוך הגנום התאי, והוא יכול להתקיים גם מחוץ לכרומוסום, בתנאי שהוא נמצא בתוך וקטור בעל יכולת הכפלה עצמית בתאים של בעלי-חיים.

הגברת התפוקה של התוצר בתאים המהונדסים מתאפשרת על-ידי ריבוי מספר העותקים של הגן המתאים בתא, או על-ידי הגברת הביטוי של הגן באמצעות רצפי בקרה חיובית ורצפים מגבירי שעתוק.

החדרה של רצף בקרה חיובי לפני הגן (בווקטור או בדנ"א עצמו) מאפשרת לפתח תהליך ייצור יעיל המבוסס על מערכת דו-שלבית. בשלב הראשון מגדלים את התאים בתרבית. כאשר כמות התאים מספקת, מדכאים את הגידול (למשל על-ידי הרחקת פקטורי גידול), ומפעילים את הביטוי של הגן המוחדר באמצעות גירוי מתאים של רצף הבקרה החיובי. באופן זה, בשלב השני של התהליך, כל המשאבים של התא מכוונים בלעדית לייצור של התוצר הרצוי.

רצפים מגבירי שעתוק מגבירים בדרך-כלל את ביטוי הגן ללא גירוי כלשהו, ולכן משמשים לפיתוח מערכת ייצור חד-שלבית בעלת רמה גבוהה של ביטוי קבוע של הגן.

3) **ריפוי מחלות תורשתיות בבני-אדם** - ריפוי זה פירושו תיקון פגמים גנטיים ***(ריפוי גנים)***. כיום ידועות לנו למעלה מ-4000 מחלות תורשתיות, שרובן עדיין לא ניתנות לריפוי מלא. בשנים האחרונות הופיע שטח חדש ברפואה, העוסק בניסיון לרפא מחלות תורשתיות על-ידי החדרה של גנים תקינים לחולים. תחום זה נמצא עדיין בחיתוליו, אולם צופים לו הצלחה ויישום נרחב בעתיד.

החדרה של גנים תקינים יכולה להתבצע לתוך ***תאי נבט*** (תאי רבייה מיניים, כגון: תאי זרע, ביציות או עוברים מוקדמים) או לתוך ***תאים סומאטיים*** (תאי הגוף שאינם תאי רבייה מיניים). החדרה של גנים לתאי נבט תתבטא בשינוי, שיעבור בתורשה לצאצאים, ולכן החדרה כזאת מעלה בעיות מוסריות שונות, כגון: שימוש שנועד "לשפר" את הצאצאים, החדרת שינויים במאגר הגנים העשויים להתגלות בעתיד כמזיקים למין האנושי, התערבות באבולוציה של האדם, ועוד. בשל כך, הנטייה כיום היא להחדיר גנים לתאים סומאטיים בלבד, כך שהטיפול ישפיע על החולה בלבד ולא יעבור בתורשה לצאצאיו.

התאים בגוף האדם מכילים 23 זוגות של כרומוסומים הומולוגיים, כאשר בכל זוג של כרומוסומים אחד מהכרומוסומים מקורו מהאב והשני - מהאם. כל כרומוסום עשוי מרצף ארוך של דנ"א וכולל אלפי גנים. החדרת גנים תקינים לתאים סומאטיים למטרות ריפוי עשויה להיות

מוצלחת בתיקון ליקויים, שנגרמו כתוצאה ממוטציה שפגמה בגן יחיד. מחלות הנגרמות מליקויים כאלה קל יותר לתקן מאשר מחלות הנגרמות כתוצאה מפגם במספר רב של גנים או ממצבים של עודף, או חוסר, של כרומוסומים שלמים.

לשם ריפוי מלא צריך להחליף את הגן הפגום שבכרומוסום בגן תקין, שיתבטא בתא הסומאטי במשך כל חיי החולה. קשה להשיג מטרה זו, היות שהחדירה של דנ"א זר לכרומוסום נעשית באקראי באתרים שונים, ולא ניתן לכוונה בדייקנות לאתרים הנדרשים בלבד. לכן מתרכזים החוקרים, כשלב ראשון, בפיתוח שיטת ריפוי, שבה מוחדר לתא גן תקין, שאינו מחליף פיסית את הגן הפגום, אך מאפשר ליצור את החלבון, שהגן הפגום היה אמור ליצור. שיטת ריפוי זו אפשרית רק כאשר הליקוי הגנטי מתבטא בייצור מופחת, או בחוסר ייצור מוחלט, של החלבון ולא במקרים שבהם הליקוי נגרם כתוצאה מייצור-יתר של תוצר תקין, או כתוצאה מייצור של תוצר הרסני.

החדרה של גן תקין לתאים לשם ריפוי גנים מחייבת שילובו לתוך הכרומוסום, כדי שהוא יעבור לתאי הבת במהלך חלוקות התאים, ויתבטא בגוף באופן יציב במהלך כל חיי החולה. שיטת ההחדרה העונה על דרישה זו, והנפוצה ביותר כיום בריפוי גנים, היא באמצעות הדבקת התאים ברטרווירוס מהונדס (ראה איור 4-20 בעמוד הבא).

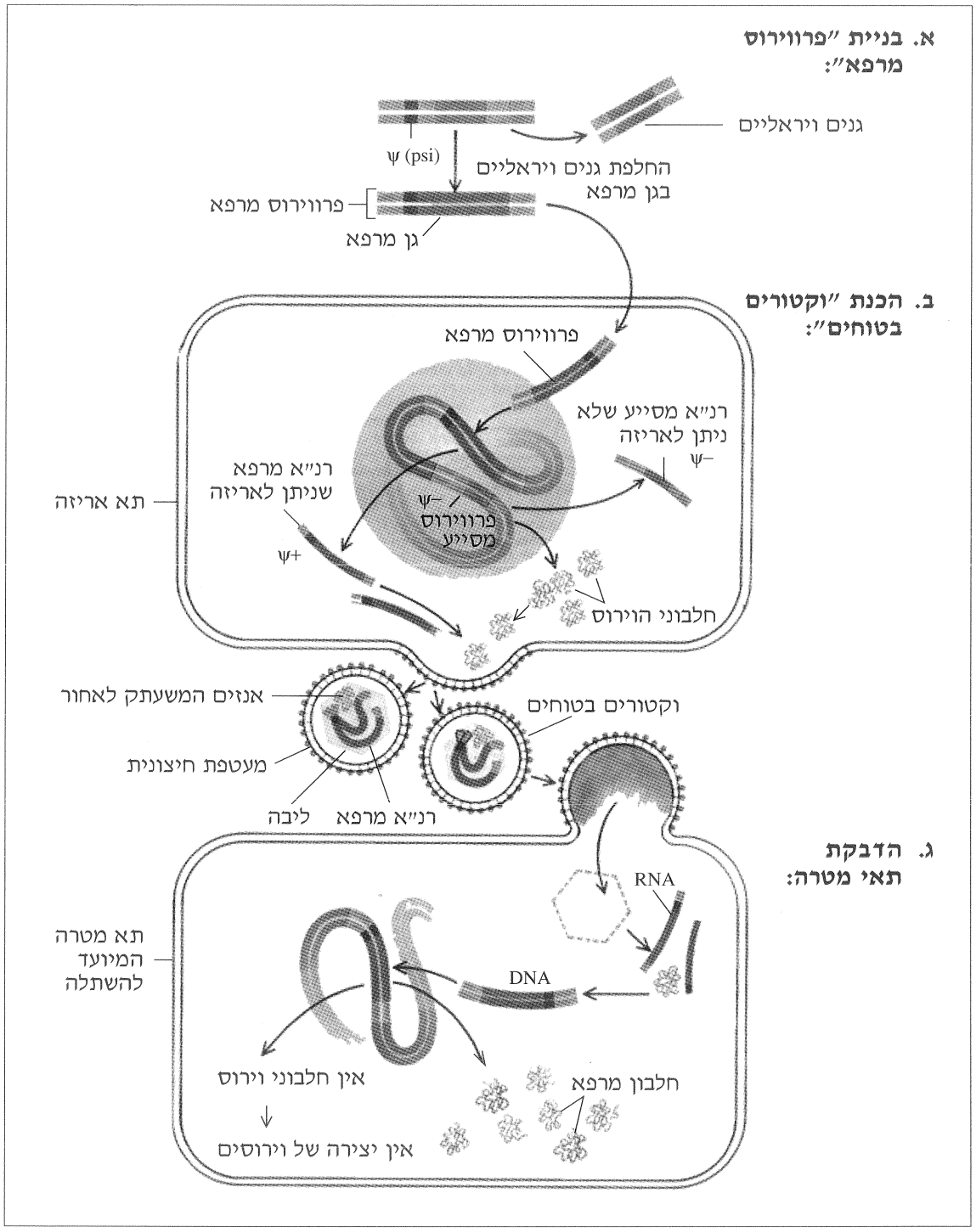
רטרווירוסים נושאים חומר גנטי בצורת רנ"א המצוי בתוך ליבה חלבונית המכילה גם אנזים המשעתק לאחור. הליבה מוקפת בחלבונים נוספים, הבונים את המעטפת החיצונית (עם משפחת וירוסים זו נמנה גם נגיף האיידס).

מחזור החיים של רטרווירוס כולל קישור של הוירוס לתא המטרה והזרקה של הליבה החלבונית, על כל הכלול בה, לתוך הציטופלסמה של התא. בהמשך האנזים המשעתק לאחור הופך את הרנ"א הויראלי לדנ"א, המשתלב בתוך הדנ"א התאי ליצירת ***הפרווירוס***. הפרווירוס מכתיב את הייצור של רנ"א ושל חלבוני הוירוס. הרנ"א הויראלי נעטף בחלבונים ליצירת חלקיקי הוירוס, המניצים מן התא כוירוסים חדשים.
באופן זה רטרווירוסים יכולים להדביק טווח רחב של טיפוסי תאים ולאכסן כמות גדולה יחסית של דנ"א זר, להחדירו לתאים ולשלבו בגנום התאי. אבל השימוש בהם כאמצעי להחדרה של גנים לתאים של בעלי-חיים יש לו גם שני חסרונות:

א) הם מסוגלים להחדיר את הדנ"א שלהם לתוך הכרומוסום רק בתאים המתחלקים באופן פעיל.

ב) הם עשויים - בתדירות נמוכה - לגרום להתמרה סרטנית של התא המאכסן, כאשר הסיכוי לכך יורד, אם מונעים מהוירוס להתרבות ולהתפזר בגוף.

מכאן, שכדי לנצל רטרווירוסים כנשא בטוח של דנ"א במסגרת ריפוי גנים, יש לבטל את יכולת הריבוי שלו בתא המטרה. לשם כך יצרו במעבדה "***פרווירוס מרפא***", שמתוך הדנ"א שלו הוצאו גנים ויראליים, המקודדים לחלבוני הוירוס, ואת מקומם תפס גן מרפא. הפעלתו של "רטרווירוס בטוח" זה מתבצעת בתהליך תלת-שלבי כמתואר באיור 4-20 בעמוד הבא.



*איור 4-20 **

שימוש ברטרווירוס כאמצעי להחדיר גן תקין לתא מטרה ובטויו לייצור חלבון נדרש במסגרת ריפוי גנים

* Reprinted from "Gene Therapy," by Inder M. Verma, Copyright © November 1991, **Scientific American, Inc.** All rights reserved.

בשלב הראשון בונים את הפרווירוס המרפא (שלב א באיור 4-20).

בשלב השני מכינים מן הפרווירוס המרפא חלקיקי "וירוס בטוח" (שלב ב באיור 4-20). מחדירים את הפרווירוס המרפא לתוך תא פונדקאי מתאים (המכונה ***תא אריזה***), שבו נוצר הרנ"א הויראלי, ובמקביל מיוצרים חלבונים ויראליים, שבהם הרנ"א נארז ליצירת ***חלקיקים אינפקטיביים***, הנדרשים בהמשך להחדרתו לתא המטרה. חלבונים אלה מיוצרים על-פי "פרווירוס מסייע", המצוי בגנום של התא הפונדקאי וכולל דנ"א של הרטרווירוס, שממנו הוצא איזור (psi) ψ, החיוני לאריזת הרנ"א בחלקיקים הויראליים. כתוצאה מכך רק הרנ"א של הוירוס המרפא יארז יחד עם חלבונים ליצירת חלקיקים ויראליים, המשמשים כוקטורים בטוחים.

בשלב השלישי משתחררים חלקיקים אלה מתוך תא האריזה ומשמשים להדבקת תאי מטרה (שלב ג באיור 4-20). הם "מזריקים" את תכולתם לתוך תא המטרה, המשלבת, בהמשך, את הפרווירוס המכיל את הגן המרפא בדנ"א של תאי המטרה, בלי להתרבות בתוך התא או להדביק תאים נוספים. כתוצאה מכך הוירוס למעשה נעלם מהתא, והוא משאיר אחריו בגנום התאי רק את הגן הזר ואת רצף הנוקלאוטודים המשמש לזרז את ביטויו.

למרות שכל התאים הסומאטיים בגוף נושאים אותו מכלול של גנים, ביטויו לא נדרש בהכרח ובאותה המידה בכל התאים. כך פגיעה בגן מסוים משפיעה, בדרך-כלל, בעיקר על תפקוד של אוכלוסית תאים מסוימת בגוף, והיא תהווה, בהתאם, אוכלוסית יעד עבור ריפוי גנים.

שיטת הטיפול הנהוגה כיום מבוססת על הפקת התאים הספציפיים מחולים, גידולם בתרבית תאים, והחדרה של גן "תקין" לתוכם. התאים "המתוקנים" מוחזרים לגוף החולה ומבטאים בו את החלבון החסר. בעתיד מקווים, שיהיה ניתן להזריק לחולה ישירות את הגן התקין כשהוא קשור לנשא שיוביל אותו לתאי המטרה הייחודיים בגוף. כך ייחסך הצורך בניתוח, בהוצאה ובהחזרה של התאים.

תאים המיועדים לשמש כתאי מטרה לריפוי גנים צריכים לעמוד בקריטריונים הבאים:

א) יציבות וחוזק רב המאפשרים להם להישרד במהלך הטיפול.

ב) הוצאתם מהגוף והחזרתם בסיום הטיפול צריכים להתבצע בקלות יחסית.

ג) טווח חייהם צריך להיות ארוך, כך שהם או צאצאיהם ישרדו בגוף לפחות חודשים או שנים - רצוי כמובן לאורך כל חיי החולה.

התאים העונים היטב על דרישות אלה הם תאי מח העצם (תאי מוצא, היוצרים את תאי הדם האדומים והלבנים, ותאים הנגזרים מהם), תאי עור ותאי כבד. לכן מחלות, שנגרמות כתוצאה מליקוי גנטי בתאים אלה, מתאימות ביותר לריפוי גנים (ראה טבלה 3-4 בעמוד הבא).

טבלה 4-3

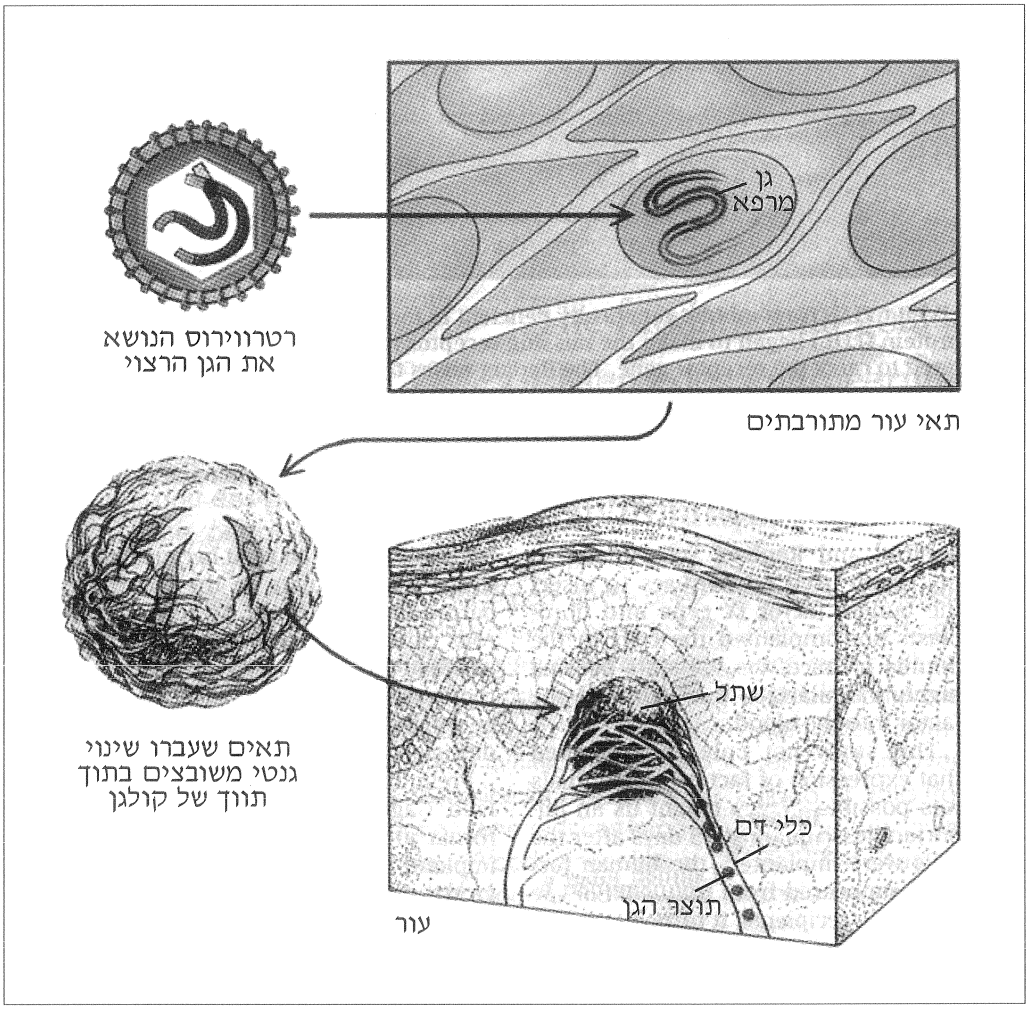
מחלות תורשתיות המיועדות לטיפול באמצעות ריפוי גנים

שם המחלה	הליקוי הגנטי ותוצאותיו	שכיחות	תאי המטרה
תלסמיה	הפרעות בייצור המוגלובין עקב ייצור מופחת או חוסר ייצור של אחד מסוגי שרשרות הגלובין (α או β). הליקוי עלול לגרום לאנמיה חמורה.	1 מתוך 600 אנשים בקבוצות אתניות מסוימות.	תאי מח העצם
המופיליה	חוסר ייצור של גורמים מסוימים של קרישת דם. הליקוי עלול לגרום לדימומים ממושכים עקב פציעה קלה ביותר.	1 מתוך 10,000 או 30,000 גברים לוקים בהמופיליה מסוג A או מסוג B, בהתאמה.	תאי כבד או תאים פיברובלסטים
היפר-כולסטרמיה משפחתית	חסר רצפטור בתאי כבד המשמש לקישור של ליפופרוטאין מסוים. הליקוי גורם להצטברות של שומנים וכולסטרול בדם, וכתוצאה מכך עולה הסיכון לסתימה של כלי דם בגיל צעיר.	1 מתוך 500 אנשים.	תאי כבד
סיסטיק פיברוזיס	חוסר ייצור של חומר הדרוש להרחקת ריר מהסימפונות בריאות. הריר המצטבר גורם לדלקות-ריאות חוזרות ולקשיי נשימה.	1 מתוך 2,500 אנשים, בעיקר ממוצא קווקזי (כולל אירופה, דרום-מערב אסיה וצפון אפריקה).	תאי ריאות

עד כה דנו בגישה הישירה של ריפוי גנים, המבוססת על החדרת שינוי גנטי בתאי מטרה (כגון: תאי מח עצם, לימפוציטים, תאי כבד), לשם תיקון פגם מסוים בתאים הללו עצמם או בצאצאיהם. קיימת גם שיטה אחרת, המבוססת על שינוי גנטי של תאים מסוימים בגוף, כך שייצרו ויפרישו לדם חלבון, המיוצר בגוף באופן נורמלי על-ידי טיפוס אחר של תאים. מחזור הדם מעביר את החלבון המופרש לתאים ולרקמות, הזקוקים לו לשם פעילותם התקינה אולם אינם יכולים לייצרו בשל פגם גנטי.

התאים המתאימים ביותר לשיטה זו הם פיברובלסטים מרקמת הדרמיס - השכבה התחתונה של העור, משום שקל יחסית להרחיקם מהגוף ולהחזירם, משום שהם חזקים ומתרבים היטב בתרבית ומסוגלים להפריש חומרים למערכת הדם.

השימוש בפיברובלסטים מהונדסים לריפוי של ליקויים גנטיים בתאים אחרים בגוף מתואר באיור 4-21.



*איור 4-21 **

שימוש בפיברובלסטים מהונדסים לשם ריפוי של פגמים גנטיים בתאים אחרים בגוף

תחילה מחדירים באמצעות רטרווירוס את הגן הרצוי לתאי עור מתורבתים. אחר-כך משבצים אותם בתוך קולגני, המושתל ברקמת הדרמיס של העור. השתל נקלט ומתמלא במהרה בנימי דם רבים. הפיברובלסטים המהונדסים מייצרים את התוצר של הגן המשובט ומפרישים אותו לנימי הדם, משם הוא נודד במחזור הדם ונקלט על-ידי תאים אחרים בגוף.

ניתן ליישם שיטה זו במחלות תורשתיות, כגון: המופיליה הנגרמת כתוצאה מהיעדר גורמים של קרישת דם המיוצרים בכבד, מחלות הנגרמות על-ידי ייצור נמוך מדי של הורמונים מסוימים (כגון הורמון גדילה), ומחלות אחרות.

* Reprinted from "Gene Therapy," by Inder M. Verma, Copyright © November 1991, **Scientific American, Inc.** , All rights reserved.

ניתן להשתמש בתהליך של ריפוי גנים לא רק כדי לתקן פגמים גנטיים בתאים, אלא גם כדי להקנות לתאים תכונות חדשות, שיגבירו את יכולתם להילחם במחלות שונות. כבר היום יש מחקר מתקדם בתחום של החדרת גנים, המקודדים לחומרים בעלי פעילות אנטי-סרטנית, ללימפוציטים, כדי להגביר את יכולתם להילחם בגידולים ממאירים.

4) **ייצור של זנים טרנסגניים של בעלי-חיים** - ייצור זה נעשה על-ידי החדרה ישירה של גנים זרים לתאי עובר. החדרת הגן מתבצעת בדרך כלל באמצעות מיקרו-הזרקה של הדנ"א לגרעין של ביצית מופרית. הבוגר המתפתח מן העובר מבטא את הגן באופן יציב בכל תאיו ומוריש אותו לצאצאיו. שיטה זו מנוצלת בעיקר לפיתוח של זנים טרנסגניים של חיות משק (כגון: בקר, כבשים, עזים) המבטאים גנים רצויים, ואף גנים שונים של בני-אדם. כל זה במסגרת שני תחומי יישום עיקריים:

א) שימוש בבעלי-חיים טרנסגניים כ"ביוריאקטורים" לייצור של חלבונים פרמצבטיים חשובים. תוצר הגן המוחדר מופרש בכמויות גדולות בחלב ומופק ממנו.

להלן שתי דוגמאות של בעלי-חיים טרנסגניים המשמשים כ"ביוריאקטורים":

(1) עזים המפרישות בחלב פלסמינוגן אקטיבטור הומני פעיל.

(2) פרות המפרישות בחלב לקטופרין (HLF) הומני, שהוא חלבון המיוצר באופן נורמלי בחלב אישה ומאופיין בתכונות חשובות כגון פעילות אנטיבקטריאלית, כושר הובלה של ברזל ועוד.

השימוש בבעלי-חיים טרנסגניים כ"ביואקטורים" עשוי להתחרות בשימוש בתרבית תאים לייצור מוצרים מבעלי-חיים, בעיקר עקב יצרנות נפחית גבוהה (החלב המופק עשוי להכיל כמה גרמים של חלבון מבוקש לליטר) ועלות הפעלה נמוכה יחסית.

ב) השבחת זנים חקלאים של בעלי חיים, על-ידי הקניה של תכונות רצויות (כגון קצבי גידול מוגברים ועמידות למחלות) לחיות משק בעלות חשיבות מסחרית.

במסגרת זו נעשים ניסיונות לשיפור יעילות הייצור והאיכות של הצמר בכבשים, לייצור דגים טרנסגניים המאופיינים בקצב גידול מוגבר ולשיפור עמידותם של בעלי-חיים למחלות.

הפיתוח של שיטות חדישות לריבוי המוני של תאים מבעלי-חיים בתרבית יחד עם ההישגים בתחום של החדרת גנים לתאי בעלי-חיים הניחו בסיס מוצק להרחבת השימוש בתרביות תאים שמקורם בבעלי-חיים בתחומי יישום חדשים בעתיד.

4.2 תרביות תאים מצמחים

4.2.1 מבוא

עולם הצומח היווה מאז ומתמיד מרכיב חיוני ביותר בקיומו של האדם. בצד השימושים החקלאיים המוכרים, עולם הצומח הוא מקור חיוני לשורה ארוכה של חומרים בעלי ערך רב בעיקר לתעשיית התרופות והמזון.

שימושים אלה, המבוססים על-פי-רוב על מיצוי חומרים מחלקי צמח, היו הגורם הראשוני להתעניינות באפשרות לריבוי, לאחזקה ולהכוונה של תאי צמח בתרבית, בהנחה, שיהיה ניתן להפיק ממנה, בתנאים מבוקרים, את החומר הרצוי, כתחליף למקורות אספקה שלעיתים קרובות נתגלו לא-יציבים.

גורם שני, חשוב לא-פחות, היה הרצון לבחון אפשרויות חדשות לשיפור ולהחדרת תכונות רצויות בצמחים כדי לקצר את הזמן הנדרש לכך בתהליכים הטבעיים של מחזורי ההתרבות, שהם איטיים בדרך-כלל.

מן הראוי לציין, כי לתא צמח, בדומה לתא שנגזר מבעלי-חיים, דרישות מורכבות מסביבתו התומכת. על התרבית המלאכותית לספק לו, בצורה אופטימלית ומבוקרת, תנאים הדומים לאלה שקיבל מסביבתו ברקמה הטבעית בצמח. אמנם בהשוואה למערכות מיקרוביאליות דרישות אלה הן מחמירות מאוד, אך הן פחותות במידה רבה מאלה הנדרשות לתמיכה בתאי בעלי-חיים בתרבית.

בפרק זה נתוודע אל הטכנולוגיה, של גידול, ריבוי ואחזקה של תאי צמח בתרבית מלאכותית ומבוקרת, ונכיר את מגבלותיה, את הישגיה ואת שימושיה העיקריים.

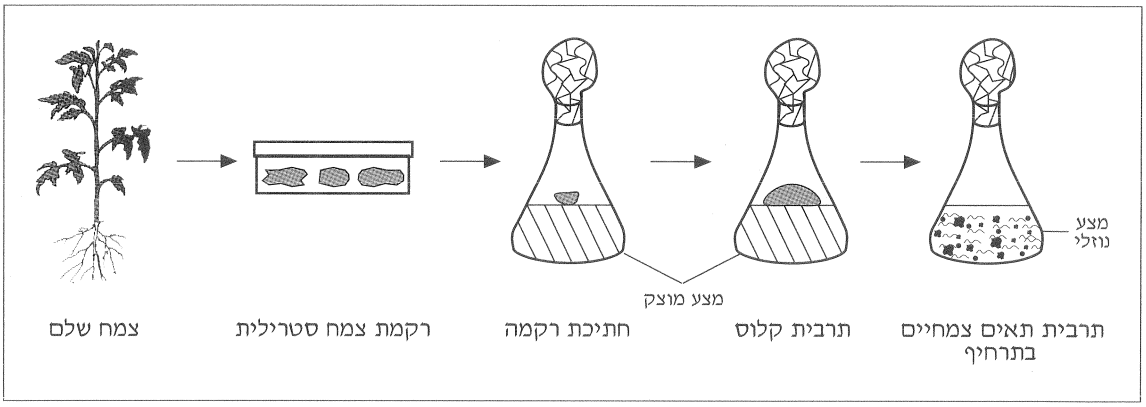
4.2.2 הכנת תרביות צמחיות

מבחינים בשני סוגים של תרביות צמחיות - תרבית רקמה צמחית ותרבית תאים צמחיים.

תרבית רקמה צמחית מוגדרת כרקמה, שהוצאה מסביבתה הטבעית וגודלה בתנאים סטריליים במצע מלאכותי. מרבית עבודת המחקר על תרביות הרקמה של צמחים עילאיים נעשתה ***בתרביות קלוס***. רקמת קלוס היא מסה של תאים, שלא עברו התמיינות, והיא נוצרת בצמח, בתנאים רגילים, כרקמת איחוי וסגירה של פצע.

ניתן לקבל תרביות קלוס בקלות יחסית, כמעט מכל חלק של הצמח (שורש, גבעול או עלה), על-ידי הדגרה של חתיכת רקמה צמחית סטרילית (בגודל 2-5 ס"מ) על-פני מצע אגר מוצק, המכיל מרכיבי מזון וחומרים מעוררי צמיחה, המתאימים - בסוג ובכמות - להשראת תנאים הנדרשים לחלוקה ולגידול של התאים. כך נוצר גוש לא-מאורגן של תאים לא-ממויינים (ראה איור 4-22 בעמוד הבא). ניתן להעביר גוש זה למצע מוצק טרי, ולגדלו באותו האופן כמה פעמים, עד שמתקבלת רקמת קלוס אחידה, פחות או יותר.

ניתן להעביר חתיכות מתרבית רקמת קלוס למצע מזון נוזלי, הנמצא בערבול, או בטלטול, מתמיד. עקב הטלטול המתמיד, המלווה בעת הצורך בתוספת הורמונים מתאימים, מושרית הפרדה עדינה בין תאי הקלוס ומתקבל תרחיף, הכולל צברים קטנים של תאים ותאי צמח בודדים, אשר ממשיכים להתרבות על-ידי חלוקה (אך בדרך כלל ללא התמיינות) במצע הנוזלי, עד שנוצר תרחיף של ***תרבית תאים צמחיים*** (ראה איור 22-4). באופן זה ניתן ליצור תרבית תאים מורחפת של רוב מיני הצמחים הקיימים.



איור 22-4

תרשים סכימתי של יצירת תרבית תאים בתרחיף מצמח שלם

תאי צמח, בניגוד לתאים מבעלי-חיים, אינם דורשים תאחיזה למשטח מוצק. כמו כן תאי הצמח הם בעלי דופן, והם גדולים במידה ניכרת (גודלם כ-100 מיקרון) מתאים של בעלי-חיים (שגודלם כ-10 מיקרון).

תרבית תאים צמחיים ניתנת לטיפול ולגידול בהיקף כמותי גדול באמצעות העברות חוזרות של התאים למצע מזון נוזלי טרי. מחזור הגידול של תאי צמח בתרבית מורחפת מתחיל בתקופת lag, עובר לשלב של גידול הקרוב לגידול אקספוננציאלי (עם זמן הכפלה של 20-40 שעות בדרך-כלל) הנמשך מספר ימים, ומסתיים בשלב הסטאציונרי.

המצע המשמש לגידול תרביות צמחיות הוא יקר ומורכב יותר מזה המשמש לגידול מיקרואורגניזמים, אולם זול ופשוט יותר מזה המשמש לגידול של תאי יונקים בתרבית.

ההרכב המדויק של המצע תלוי במין הצמח ובשימוש המיועד של התרבית, אולם באופן כללי הוא מכיל בין 20 ל-30 מרכיבים, ביניהם: מקור פחמן (בדרך כלל גלוקוז או סוכרוז), מקור חנקן (כגון ניטרטים, מלחי אמוניום או חומצות אמינו), מלחים אנאורגניים, יסודות קורט, ויטמינים, חומרים מווסתי צמיחה (בעיקר הורמונים צמחיים כגון אוקסינים, ציטוקינינים וג'ברלינים) ולעיתים גם תרכובות אורגניות ספציפיות ותוספות מורכבות כגון: חלב קוקוס, תמצית שמרים ותמצית לתת.

בחירה נכונה של הרכב המצע קובעת במידה רבה את הסיכויים לקבלת התרבית, להצלחת גידולה וליכולת השימוש בה. חשיבות מיוחדת ישנה לסוג ולכמות של ***מווסתי הצמיחה***, המוספים למצע, ואשר ואחראים לקביעת קצב ואופן הגידול של התרבית.

מצע הגידול חייב לעבור עיקור לפני השימוש, ולעיתים מוסיפים לו גם חומר אנטיבקטריאלי כאמצעי מנע. הגידול עצמו מתבצע בתנאים סטריליים כדי למנוע זיהום מיקרוביאלי.

מאחר שתאים צמחיים הם ארוביים, יש לספק לתרבית חמצן או אוויר בעת הגידול. אלה מהווים במקרים אחדים גם אמצעי לערבוב תרביות במצע נוזלי (זאת בשל רגישות התאים לערבוב מכני העלול לגרום לשבירתם).

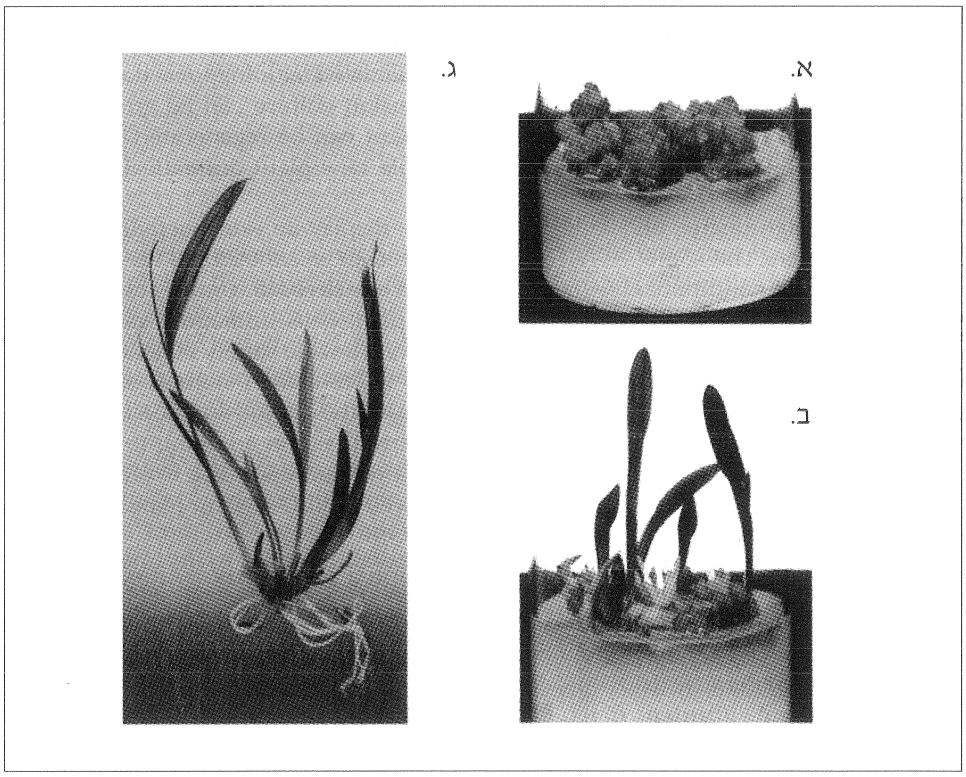
תחום הטמפרטורות המשמש לגידול תרביות צמחיות הוא 20°C -28°C.

תאורה - את התרביות ניתן לגדל באור או בחושך, לפי הצורך.

דרגת החומציות של המצע נעה לרוב בין pH=5 ובין pH=6.5.

בבניית תרביות צמחיות ישנה חשיבות רבה גם לגודל, למקור ולאיכות של הרקמה הנזרעת במצע ***(האינוקולום)***.

שילוב מתאים של חומרי מזון ומווסתי צמיחה (כמו אוקסין וציטוקינין) במצע יכול להשרות תהליכי התמיינות על תרבית הקלוס, המסתיימים בהתפתחות של ניצרונים ושורשים (ראה איור 23-4). במרבית המינים ניתן לשחזר באופן זה צמח שלם.



*איור 23-4 **

יצירה של צמח שלם מתרבית קלוס של פרסיה (פרח נוי ממשפחת האירוסים):

א. קלוס

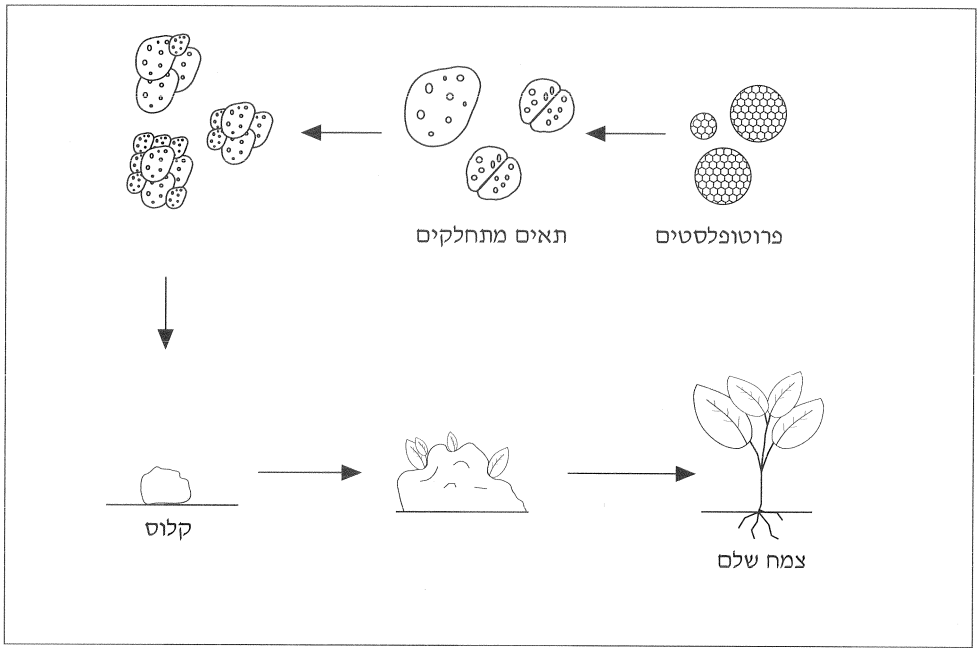
ב. התפתחות ניצרונים

ג. התפתחות שורשים

* Reprinted from Bruce Alberts, et. al. **Molecular Biology of the Cell**, Second Edition, Garland Publishing Inc., New York, 1989, p. 1182.

במיני צמחים רבים, כגון: טבק, פטוניה, גזר ותפוחי-אדמה, ניתן לגדל מתא בודד (חסר דופן - פרוטופלסט) בתרבית מורחפת שבט קטן של תאים בצורת תרבית קלוס, ולשחזר ממנה צמח שלם (ראה איור 4-24).

יכולת זו, של תא סומאטי יחיד בתרבית, לפתח צמח שלם חדש אופיינית בלעדית לתאי צמחים, ונובעת מיכולתם של הצמחים בטבע "לתקן" את עצמם, לאחר שניזוקו. התאים הסומאטיים שבאזור הפגיעה מתחילים להתחלק ולהתמיין לטיפוסים אחרים של תאים, הדרושים לשחזור האיבר שנפגע.



איור 4-24
שלבים בשחזור של צמח שלם מפרוטופלסטים צמחיים בתרבית מורחפת

צמחים, ששוחזרו מתרבית קלוס או מפרוטופלסטים, מגלים דרגה גבוהה של שונות גנטית. תופעה זו מכונה ***וריאציה סומאקלונלית***, ומקורה במגוון רחב של שינויים גנטיים, המתרחשים בתאים במהלך גידולם ברקמת הקלוס. שינויים אלה עשויים להקנות לצמחים תכונות מועילות שונות, כפי שנראה בהמשך.

4.2.3 תחומי השימוש העיקריים בתרביות צמחיות

ניתן לחלק את השימוש בטכנולוגית הגידול של תרביות תאים ושל תרביות רקמה צמחיות לארבעה תחומים:

א. ייצור מטבוליטים משניים (בעיקר חומרים בעלי ערך פרמקולוגי).
ב. תהליכי היפוך ביולוגיים (ביוקונברסיה או ביוטרנספורמציה), המתייחסים להחדרה של שינוי אנזימטי כלשהו בחומר, כדי לשפר או לשנות את פעילותו הביולוגית.
ג. שימושים חקלאיים, כגון: ריבוי וגטטיבי, ריבוי משוחרר מוירוסים, השבחת זנים.
ד. שימושים במסגרת מחקר בסיסי של עולם הצומח.

אנו נתמקד כאן בשני תחומים בלבד - בייצור ביוכימיקלים באמצעות תרביות צמחיות, ובשימושים החקלאיים של תרביות צמחיות.

א. ייצור ביוכימיקלים באמצעות תרביות צמחיות

צמחים עילאיים מהווים מזה זמן רב מקור להספקה של מגוון גדול של כימיקלים בעלי ערך מסחרי. כימיקלים אלה מתחלקים לחמישה תחומי יישום עיקריים: תרופות, תבלינים, בשמים, פיגמנטים וכימיקלים לשימוש חקלאי (ראה טבלה 4-4).

טבלה 4-4

דוגמאות אחדות לביוכימיקלים טבעיים, הנגזרים מצמחים, ושימושיהם

התוצר הצמחי	מין הצמח המייצר	תחומי השימוש
אטרופין	Atropa belladonna	הרחבת אישונים לשם בדיקה של קרקעית העין, נטרול השפעה של רעלים אורגנו-זרחניים, ושימושים רפואיים נוספים.
וינקריסטין	וינקה ורודה Catharanthus roseus	טיפול במחלות סרטניות.
דיגוקסין	מיני אצבעונית Digitalis spp.	הסדרת הקצב של פעימות הלב.
דיאוסגנין	דיאוסקוריאה משולשת Dioscorea deltoidea	חומר מוצא לייצור גלולות למניעת הריון.
מורפיום	מיני פרג Papaver spp.	סם הרדמה, משכך כאבים.
קודאין	מיני פרג Papaver spp.	סם הרדמה, משכך כאבים.
כינין	עץ הכינין הרפואי Cinchona officinale	ריפוי מלריה, תבלין.
אנטוציאנין	מינים שונים	צבען.
זעפרן	כרכום הגינה Crocus salivus	צבען צהוב, תבלין.
שיקונין	גלעינית אדומת השורש Lithospermum erythrorhizon	צבען אדום.
שמן ורדים	מיני ורד Rosa spp.	בושם.
שמן גרניום	מיני גרניום Geranium spp.	בושם.
שמן יסמין	מיני יסמין Jasminum spp.	בושם.
זנגביל	זנגביל רפואי Zingiber officinale	תבלין.
פירטרינים	החרצית החריפה Chrysanthemum cinerarifolium	חומרים קוטלי חרקים.

מבחינה ביוכימית רוב התרכובות הללו הן מטבוליטים משניים, המיוצרים רק במינים מסוימים של צמחים, בדרך כלל בתוך איבר או בתוך רקמה מסוימת של הצמח או בשלב מסוים של התפתחותו. תרכובות אלה מאופיינות במבנה כימי מורכב יחסית וקשה לסינתזה כימית. הסינתזה שלהן נמצאת

תחת בקרה משולבת של מספר גנים, כך שייצורם על-ידי מיקרואורגניזמים מהונדסים אינו מעשי. לפיכך המקור הבלעדי, כמעט, להפקתם הוא הצמח, המייצרם באופן טבעי. האספקה של חומר צמחי גולמי מסוים עשויה להיות מוגבלת מסיבות אקלימיות או פוליטיות, לכן חשוב לפתח אמצעי ייצור חילופי, שיאפשר הספקה סדירה של התוצר הדרוש.

במהלך 30 השנים האחרונות, נעשה מאמץ מרוכז לעקוף את השימוש בצמח השלם וליצור מטבוליטים משניים ספציפיים באמצעות תרביות צמחיות (תרביות קלוס, תרביות תאים בתרחיף או תאים מקובעים). גישה זו מאופיינת ביתרונות שלהלן:

1) **ייצור בתנאי סביבה מוגדרים ומבוקרים**
תאי צמח בתרבית מגודלים במצע מוגדר עם הספקה קבועה של חומרי גלם ובתנאי סביבה מבוקרים, חופשיים ממחלות ומזיקים. בניגוד לכך גידולי שדה חשופים לגורמים, שלא תמיד ניתנים לשליטה ולבקרה, כגון: שינויים עונתיים בכמות חומרי הגלם, שינויי אקלים, הופעה של מזיקים.

2) **אפשרות להשפיע על רמת הייצור**
בתרבית צמחית ניתן לנסות ולהגביר את הייצור על-ידי השראת שינויים גנטיים בתאי הצמח או הכנסת שינויים בהרכב המצע, המעודדים ספציפית את הגברת הייצור של התוצר המבוקש.

3) **אפשרות להפעיל את תהליך הייצור על בסיס רציף**
ניתן להפעיל תאי צמח חופשיים בתרחיף או תאי צמח מקובעים לייצור רציף של התוצר הרצוי על-ידי הזרמה רציפה של מצע מתאים דרך הריאקטור, המכיל את התאים. התוצר הרצוי מופק מהמצע ביציאה מהריאקטור.

4) **יצירה של תרכובות חדשות**
בתרביות צמחיות יש לעיתים יצירה ספונטנית של תרכובות חדשות, שאינן קיימות בצמח המקורי. בנוסף ניתן להשרות יצירה של תרכובות חדשות בתרביות צמחיות על-ידי הכנסת שינויים גנטיים מכוונים בתאי הצמח או הזנה של אנאלוגים של תוצרי ביניים טבעיים, המשתלבים במסלולים הביוסינתטיים של התא, וגורמים כך להיווצרות תוצרים סופיים חדשים.

למרות כל היתרונות הללו, הניצול התעשייתי של תרביות צמחיות לייצור של ביוכימיקלים הוא מצומצם ביותר כיום, עקב המגבלות שלהלן:

1) **גידול איטי של התאים בתרבית**
תאי צמח מתרבים בתרבית בקצב איטי (זמן ההכפלה נע בטווח של 20-40 שעות). כתוצאה מכך יצירת כמות גדולה של ביומסה, לשם הפקה של התוצר המיוצר, היא תהליך יקר, וכדאי להשתמש בו רק במקרים שבתרבית נוצר תוצר בעל ערך רב במיוחד. קצב הגידול האיטי של תאי צמח בתרבית מקשה גם על הגמלון של המערכת, היות שנדרש ריאקטור בעל נפח גדול יחסית והקפדה יתרה על תנאים סטריליים כדי למנוע זיהום מיקרוביאלי.

2) **רגישות גבוהה לכוחות גזירה**

כאמור תאי צמח מתורבתים הם גדולים יחסית (קוטרם עשוי להגיע עד 100 מיקרון), וכתאים בודדים בתרחיף הם חסרים דופן נוקשה שתגן עליהם. לפיכך הם מאופיינים ברגישות גבוהה לכוחות גזירה, שמקורם בערבול מכני, ומחייבים ערבול עדין ומבוקר יותר (כגון הרחפת המצע על-ידי אוורור). תנאי זה מקשה על השליטה במערכת בקנה-מידה תעשייתי.

3) **הצטברות של התאים לצברים**

תאי צמח בתרבית מורחפת גדלים לעיתים קרובות בצברים בגדלים שונים, דבר היוצר מגבלות של מעברי מסה, שכתוצאה מהם תאים, הנמצאים במרכז הצבר, שונים מאלה, הנמצאים על-פני השטח שלו, וחשופים לסביבה שונה. תופעה זו והפיזור הרחב של גודל צברי התאים בתרבית, יוצרים מערכת הטרוגנית, שקשה לבצע בה גמלון ואופטימיזציה של תהליך הייצור.

4) **התארגנות והתמיינות של התאים**

בכמה מקרים נמצא, שדרושה התארגנות או התמיינות של התאים המתורבתים, לייצור התוצר. השראה של התמיינות וגידול של תאים ממוינים בתרבית עלולה להיות תהליך מסובך בקנה-מידה תעשייתי.

5) **תפוקה נמוכה של התוצר**

ברוב המקרים תאי צמח בתרבית מייצרים כמויות קטנות של מטבוליטים משניים; כמויות אלה נמוכות במקרים רבים מאלה המיוצרות בצמח השלם שהתאים נגזרו ממנו.

6) **חוסר יציבות גנטית של התאים**

יכולת הייצור של קווי תאים יצרני-יתר (שבודדו במטרה להגביר את תפוקת התוצר) פוחתת במהלך העברות חוזרות של התאים למצע טרי, לשם המשך הגידול. הדבר נובע משינויים גנטיים ספונטניים המתרחשים בתאים.

7) **קשיים בהפקת התוצר**

ברוב המקרים התוצר, המיוצר בתרביות צמחיות, הוא תוך-תאי ומיוצר בכמות קטנה יחסית. לכן, תהליך הפקת התוצר, הכולל שחרורו מהתא, ריכוזו וניקויו, הוא מסובך ומייקר את התהליך.

הגברה של תפוקת התוצר בתרביות צמחיות מבוססת על שתי גישות, המופעלות בנפרד או במשולב: בידוד קווי תאים יצרני-יתר, והגברה של תהליך הייצור על-ידי הוספה של חומרים מסוימים למצע הגידול ויצירת תנאי סביבה מתאימים.

השיטה הנפוצה ביותר המשמשת לקבלת תרביות צמחיות, המייצרות כמויות גדולות יחסית של התוצר הרצוי, מבוססת על תופעת הוריאציה הסומאקלונלית, כלומר על שינויים גנטיים המתרחשים ספונטנית, כאשר תאי צמח מגודלים בתרבית קלוס. כמקור לתאים עשויה לשמש תרבית קלוס או תרבית תאים מורחפים.

כאשר תרבית קלוס משמשת כמוצא לתהליך, מחלקים את הקלוס למספר חתיכות, ומגדלים אותן שוב על מצע אגר מוצק בכלים נפרדים. בסיום הגידול קובעים את רמת הייצור של התוצר המבוקש בתרביות הקלוס שנוצרו. על תהליך זה - של חלוקה, הפרדה, גידול וסריקה - חוזרים כמה פעמים, עד אשר מאתרים תרבית קלוס, המייצרת תפוקה גבוהה דיה של התוצר הרצוי.

כאשר תרבית תאים מורחפים משמשת כמוצא לתהליך, מפרידים תחילה את צברי התאים לתאים בודדים, על-ידי הכנת פרוטופלסטים באמצעות פירוק אנזימטי של דופן התא. הפרוטופלסטים שנוצרו נזרעים בריכוז נמוך למצע מוצק ומגודלים לתרביות קלוס נפרדות, המהוות בעצם שבטים של תאים, שכל אחד מהם נגזר מתא בודד. תרביות הקלוס נסרקות לגילוי ייצור מוגבר של התוצר המבוקש.

בטבלה 4-5 מובאות כמה דוגמאות של תרביות צמחיות, שבודדו בשיטות אלה ומאופיינות בתפוקת תוצר הדומה לזו של הצמח המקורי, או גבוהה ממנה, על בסיס מסת חומר יבש.

טבלה 4-5

דוגמאות של תוצרים טבעיים המיוצרים בתרביות צמחיות על-ידי קווי תאים נבחרים, בתפוקת תוצר דומה לזו שקיימת בצמח המקורי, או גבוהה ממנה

מין הצמח	סוג התרבית	התוצר	% משקלי של חומר יבש	
			בתרבית	בצמח
גלעינית אדומת השורש Lithospermum erythrorhizon	תרבית תאים בתרחיף	שיקונין	14	1.5
הטבק המצוי Nicotiana tabacum	תרבית קלוס	ניקוטין	3.4	2.0
דיאסקוריאה משולשת Dioscorea deltoidea	תרבית תאים בתרחיף	דיאוסגנין	2.0	2.0
הקפה הערבי Coffea arabica	תרבית קלוס	קפאין	1.6	1.6

כאמור, במקרים רבים תפוקת התוצר של קווי תאים יצרני-יתר נוטה לרדת במהלך העברות חוזרות של התאים, ולכן צריך לבצע לעיתים קרובות בידוד מחדש של הקווים.

בנוסף הגברת הייצור של התוצר בתרביות צמחיות מתאפשרת במקרים מסוימים על-ידי הזנה של חומרי מוצא מתאימים, על-ידי הוספת חומרים ממריצים ממקור מיקרוביאלי או על-ידי חשיפת התרבית לגורמים סביבתיים כגון מליחות ואור.

במקרים רבים נמצא, כי קיים יחס הפוך בין קצב חלוקת התאים ובין רמת הייצור של המטבוליטים המשניים בתרביות צמחיות. כך הייצור העיקרי של התוצר מתרחש, לאחר שהתאים עברו את שלב הגידול המואץ ונכנסו לשלב הסטאציונרי.

הדבר נובע כנראה בשל קיומם של חומרי מוצא, המשותפים למסלולים המטבוליים הראשוניים (הקשורים לחלוקות תאים) ולמסלולים המטבוליים המשניים (הקשורים להתרחבות התא והבשלתו). לכן הפסקה בחלוקות התאים מאפשרת הזרמה של חומרי המוצא לכיוון המסלולים המטבוליים המשניים.
עוד נמצא, שארגון רב-תאי בתרבית צמחית עדיף לייצור של מטבוליטים משניים מסוימים, אולי כתוצאה מהגבלה של חלוקות התאים במצב זה.

מכאן שאופטימיזציה משולבת של פרמטרים גנטיים, פיזיולוגיים וביוכימיים, עשויה לאפשר פיתוח של מערכת ייצור יעילה של ביוכימיקלים ספציפיים על-ידי תרביות צמחיות, בקנה-מידה גדול.

הגישה המקובלת לגידול תאי צמח בקנה-מידה גדול, לשם ייצור של ביוכימיקלים ייחודיים היא להשתמש במערכת פרמנטורים, שבה התאים גדלים בתרחיף בתהליך חד-שלבי או דו-שלבי עד לשלב הסטאציונרי, בו מתרחש עיקר הייצור. בסיום התהליך התאים נקצרים ומפיקים מהם את התוצר.

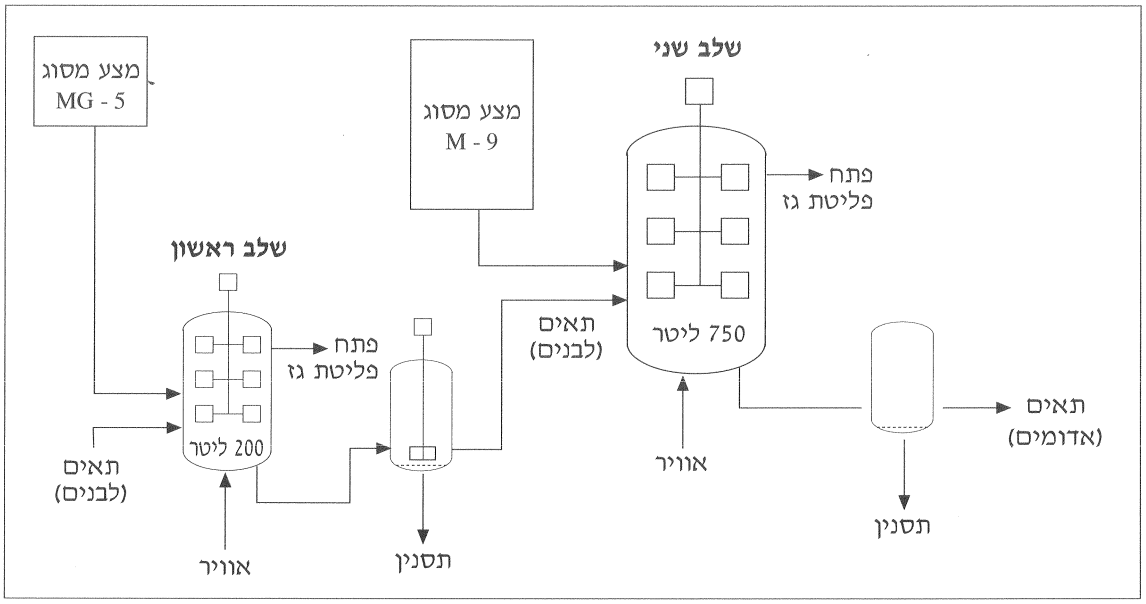
הערבול של המצע במערכת כזו מתבצע במקרים רבים על-ידי אוורור, המוזן בהזרמה רציפה של בועות אוויר מתחתית הפרמנטור כלפי מעלה. זאת משום שתאי הצמח מגלים רגישות גבוהה לכוחות גזירה, הנוצרים עם הפעלת ערבול מכני, ועמידות טובה יותר, יחסית, לכוחות, הנוצרים כתוצאה מתנועת בועות אוויר כלפי מעלה.

על מערכת מסוג זה מבוסס תהליך הייצור התעשייתי הראשון, שהכניסה לשוק חברה יפנית. בתהליך זה מייצרים בייצור מסחרי שיקונין על-ידי תרבית מורחפת של תאים יצרני-יתר של גלעינית אדומת השורש (Lithospermum erythrorhizon).

שיקונין הוא פיגמנט אדום, המשמש ביפן כחומר צבע בתכשירים ביוקוסמטיים (כגון "ביושפתון") וכן כחומר פרמצבטי בעל השפעות אנטיבקטריאליות ואנטידלקתיות.

ייצור תעשייתי של שיקונין על-ידי תרביות תאי צמח מתבצע בתהליך דו-שלבי, כמתואר באיור 4-25 בעמוד הבא. בשלב הראשון התאים מגודלים בפרמנטור, כשהם מורחפים במצע מתאים עד לפזה הסטאציונרית. בתום הגידול הם נקצרים ומועברים לפרמנטור אחר שבו הם נחשפים למצע בעל הרכב שונה, המעודד ייצור של שיקונין יותר מאשר חלוקה של התאים.

בסיום שלב הייצור, התאים הנקצרים מהפרמנטור הם אדומים, בגלל השיקונין המצוי בתוכם, ולא לבנים כמו התאים ששימשו כמזרע לשלב זה מן השלב הראשון.



איור 4-25

תרשים זרימה סכימתי של תהליך ייצור תעשייתי של שיקונין על-ידי תרבית של תאי Lithospermum erythrorhizon

האופטימיזציה של תהליך הייצור בוצעה בעיקר על-ידי שילוב של שני גורמים: שימוש בקווי תאים יצרני-יתר, וביצוע התהליך בצורה דו-שלבית תוך הפרדת הייצור מהגידול על-ידי שינוי הרכב המצע. בעקבות זאת בתהליך ייצור יחיד בקנה-מידה בינוני (כגון זה המתואר באיור 4-25), הנמשך שלושה שבועות, הושגה תפוקה גבוהה של תוצר - 1.2 ק"ג שיקונין. השיקונין המיוצר במערכת כזו נמכר במחיר של כ-4,000 דולר לק"ג, הרבה מעל לגבול התחתון (1,000 דולר לק"ג), הנחשב למחיר כלכלי כדאי לייצור תוצר על-ידי תרביות תאי צמח בטכנולוגיה הקיימת.

ב. שימושים חקלאים של תרביות צמחיות

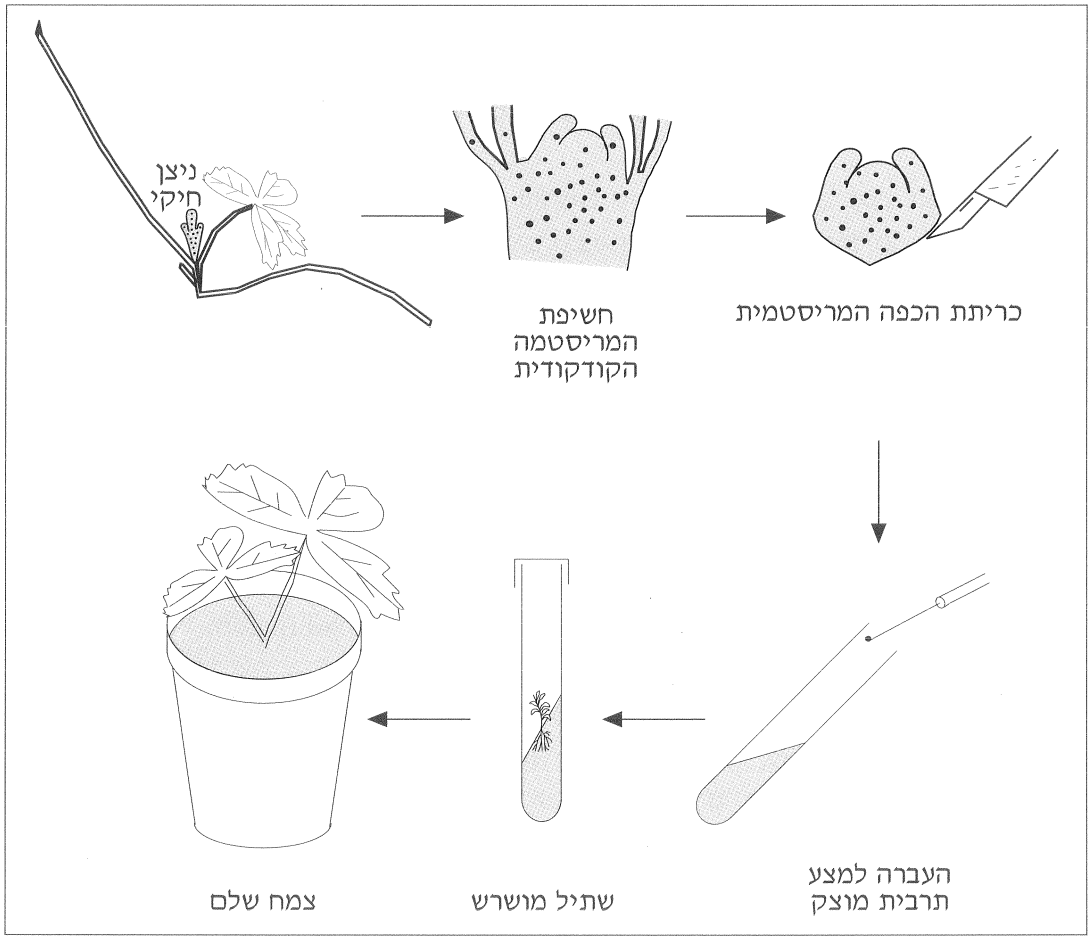
1) ריבוי וגטטיבי של צמחים בתרבית רקמה

כאמור, מינים רבים של צמחים עשויים לעבור שחזור מתאים בודדים או מקטעי רקמה באמצעות תרביות קלוס. הדבר כרוך במקרים רבים בהופעה של שינויים גנטיים בצמח המשוחזר, עקב תופעת הוריאציה הסומאקלונלית, המאפיינת תרביות קלוס. לכן כאשר מעוניינים לשמר את המערך הגנטי של הצמח המשוחזר, משתמשים בתרביות רקמה מסוג אחר, הנקראות ***תרביות מריסטמיות***.

מריסטמה היא רקמה עוברית בצמחים, המכילה תאים, המתחלקים באופן תמידי ומוסיפים לגוף הצמח תאים; תאים אלה מתמיינים והופכים לתאי רקמות קבועות. מריסטמות בצמחים נמצאות בין היתר בקודקודי הצמיחה (מריסטמות קודקודיות) שבקצות הגבעולים, והשורשים העיקריים והצדדיים (שם הן אחראיות להתארכות של הגבעול, הצמחת עלים והתארכות השורשים), וכן בחיקי עלים (שם הן מהוות מוצא להיווצרות של ענפים חדשים המסתעפים מהגבעול). קודקודי הצמיחה

בגבעול יחד עם העלים הצעירים המתפתחים מהווים את הניצנים, שאינם אלא נצרים זעירים המצויים על הגבעול. הניצן שבקצה הגבעול קרוי ניצן ראשי, והניצנים שבחיקי העלים - ניצנים חיקיים.

גידול של רקמה מריסטמית על-פני מצע מוצק בתרבית מאפשר שחזור של הצמח המקורי בתוך זמן קצר יחסית (ראה איור 4-26), זאת בלי לעבור דרך שלב של תרבית קלוס, המאפיין גידול של רקמות צמחיות אחרות בתרבית.



*איור 4-26 **

שחזור של צמח תות-שדה באמצעות תרבית מריסטמית

ריבוי וגטטיבי של צמחים במבחנה באמצעות תרביות רקמה מכונה ***מיקרו-ריבוי*** ומשמש כבר זמן רב בקנה-מידה מסחרי בתחום הגננות (לשם יצירה של צמחי נוי) ובתחומי חקלאות אחרים. הוא מאופיין ביתרונות הבאים: ריבוי מהיר וזול במרחב קטן יחסית, ריבוי רציף במשך כל השנה, ריבוי מהיר של זנים חדשים שהתקבלו על-ידי הכלאות גנטיות, ריבוי חופשי ממחלות, ועוד.

* Reprinted from Moo-Young, Murray, **Comprehensive Biotechnoogy: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry and Medicine**, p.175, with kind permission from Elsevier Science Ltd., The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, England.

2) ריבוי משוחרר מוירוסים

רוב העצים והצמחים בטבע נגועים בוירוסים (לעיתים אף ביותר מסוג אחד של וירוס) וכתוצאה מכך הם גדלים לאט יותר ומניבים פחות פירות.

לאור העובדה שהוירוס הופך למעשה לחלק בלתי-נפרד מתאי הצמח, קשה מאוד לרפא מחלות ויראליות בצמחים על-ידי חומרים כימיים, בלי לפגוע בתאי המאכסן עצמם. זאת בניגוד למחלות הנגרמות על-ידי חיידקים או פטריות. לכן אף-על-פי שטיפול בכימיקלים מסוימים יכול להקטין את כמות הוירוסים בצמחים מודבקים, הרחקה מוחלטת של הוירוס אינה אפשרית בשיטה זו.

וירוסים המדביקים צמחים מתפזרים ברוב החלקים הוגטטיביים של הצמח, ונשארים בהם במשך כל חיי הצמח. כתוצאה מכך הם מועברים לצאצאים במהלך ריבוי וגטטיבי של הצמח - מבצל, מפקעת, בייחור או בהרכבה.
ברוב המקרים הוירוסים אינם חודרים לזרעים של הצמח המודבק, ולכן הבעיה של הדבקות ויראליות חמורה יותר בצמחים רב-שנתיים ובצמחים המתרבים וגטטיבית, מאשר בצמחים חד-שנתיים המתפתחים מזרעים כל שנה מחדש.

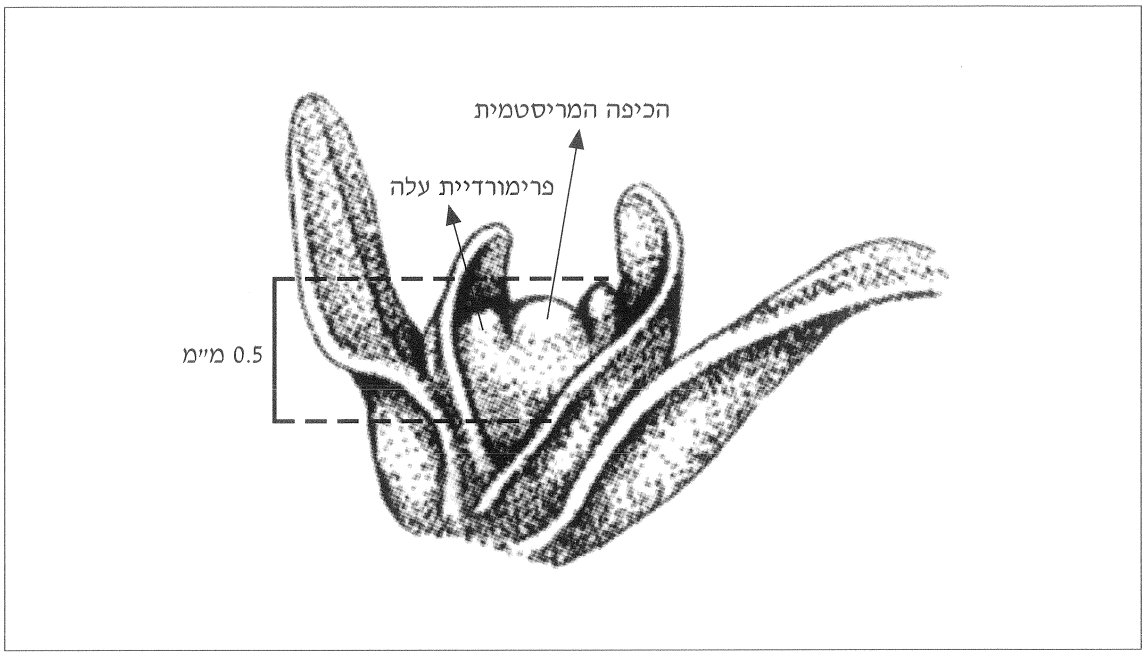
השימוש בתרביות רקמה צמחיות, לשם ריבוי של צמחים שאין בהם וירוסים, מבוסס על שתי תגליות:

א) חשיפה של הצמח לטמפרטורה הגבוהה מ-30°C גורמת לירידה משמעותית בכמות הוירוסים שבצמחים מודבקים. אולם בדרך כלל לא חל ריפוי מוחלט, ולכן ברגע שהצמח מוחזר לתנאי גידול רגילים הוירוס, ששרד בטיפול, מתרבה ומתפזר שוב בצמח.

ב) רוב הוירוסים אינם מצליחים לחדור ל***רקמות המריסטמיות***, הנמצאות בנקודות הצמיחה של הגבעול, והקצוות שלהן בדרך-כלל לא-מכילות וירוסים.

לאור זאת, השיטה הנפוצה ביותר כיום, לקבלת צמחים שלא מכילים וירוסים, היא שילוב של שוק חום ושחזור של הצמח מתרבית מריסטמית, כפי שתואר באיור 4-26. תחילה מוחזק צמח המוצא כמה שבועות בטמפרטורה של 37°C - 36°C (הטמפרטורה המירבית שרוב הצמחים מסוגלים לשאת בלי להינזק). בהמשך חושפים בצמח זה את הניצנים מקצה גבעול (ניצן ראשי) או מחיק עלה (ניצן חיקי), שבהם כבר החלה ההתמיינות ליצירת הנצר, וחותכים מהם את הקצה העליון (באורך של 0.5-0.2 מ"מ). קצה זה כולל בדרך-כלל את הכיפה של המריסטמה הקודקודית ואת ***פרימורדיית העלה*** (עלים ראשונים דמויי קשקש המגינים על המריסטמות הקודקודיות שבגבעול), כמתואר באיור 4-27.

הרקמה המריסטמית שנחתכה מועברת למבחנה עם מצע גידול מוצק. כאן מתרחשת התארכות של הנצרון והופעה של שורשים. כל זה מבוצע בתנאים סטריליים, כך שנוצר שתיל חופשי מוירוסים שניתן לאחסנו ובעת הצורך לשתול אותו לקבלת צמח שלם בריא (ראה איור 4-26), הזהה מבחינה גנטית לצמח המוצא.



איור 4-27 *

ציור של ניצן חיקי של תפוח-אדמה, לאחר פרישה של העלים הצעירים, החושפת את הכיפה המריסטמית הקווקוו מורה על החלק שנלקח לגידול בתרבית מריסטמית

צמחים שאין בהם וירוסים, המיוצרים בדרך זו, משמשים בעיקר בתחומי היישום האלה:

א) כחומר מוצא לגידול בקנה-מידה גדול של תרביות צמחיות.

ב) הספקת מלאי של צמחים בריאים, המאופיינים בגידול ובתפוקה טובים יותר (בכ-10%-20%) מאלה של צמחים המודבקים בוירוס, לשימושים חקלאיים שונים.

ג) ביצוע ניסויים מבוקרים, שמטרתם לקבוע כיצד ההתפתחות והגידול של הצמח מושפעים מוירוסים מסוימים או משילוב של כמה וירוסים שונים.

3) השבחת צמחים

השבחת צמחים מתייחסת להקנייה של תכונות רצויות מבחינה חקלאית, כגון: תפוקה מוגברת, איכות משופרת מבחינה תזונתית (למשל על-ידי שינוי מאגרי השומן, העמילן והחלבון של הזרעים) ומבחינה טכנולוגית, עמידות למחלות ומזיקים (בעיקר וירוסים, פטריות וחרקים), עמידות לקוטלי עשבים והישרדות טובה יותר בבתי-גידול המאופיינים בתנאים קיצוניים (כגון: חום, קור, יובש, הצפה במים ועקב כך מחסור בחמצן, מליחות גבוהה).

השבחה קונבנציונלית של צמחים מתבססת על הכלאות מיניות וברירת הצאצאים שרכשו את מיטב התכונות מן ההורים. זהו תהליך מורכב וממושך (העשוי להימשך שמונה שנים ויותר), והוא מוגבל

* Reprinted from Moo-Young, Murray, **Comprehensive Biotechnoogy: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry and Medicine**, p.173, with kind permission from Elsevier Science Ltd., The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, England.

מבחינת מספר השילובים הגנטיים החדשים שניתן ליצור, משום שרק מינים קרובים של צמחי יכולים לעבור הכלאה מינית. כתוצאה מכך השבחה קונבנציונלית של צמחים איפשרה עד כה הקנייה של מספר מצומצם יחסית של תכונות רצויות, בעיקר בתחום של הגדלת התפוקה.

היכולת לשחזר צמחים שלמים מתרביות תאי-צמח מספקת שיטה חלופית פשוטה יותר לביצוע השבחת צמחים, זאת על-ידי החדרת שינוי גנטי לתאים וגידולם בתרבית ליצירת מינים חדשים של צמחים בעלי עדיפות חקלאית.

שינוי גנטי של תאי צמח מתבצע בעיקר בשיטות הבאות: וריאציה סומאקלונלית, בידוד מוטנטים, איחוי פרוטופלסטים והחדרה מכוונת של גנים חדשים באמצעות שיטות של הנדסה גנטית.

וריאציה סומאקלונלית

שינויים גנטיים ספונטניים, המתרחשים בתדירות גבוהה במהלך גידול של תאי צמח בתרביות קלוס, עשויים להקנות לתאים תכונות מועילות מבחינה חקלאית. כך התקבלו בשיטה זו סוגים חדשים של תפוחי-אדמה בעלי תפוקה מוגברת, עמידות למחלות, שוני בצבע הקליפה של הפקעת, שוני בתכולת הסוכר ומאפייני אחסון משופרים. גידולים חקלאיים אחרים ששופרו בוריאציה סומאקלונלית הם: עגבניות, דגניים, גזר וסלרי (את שני האחרונים כבר החלו לשווק מסחרית).

החסרון העיקרי של שימוש בוריאציה סומאקלונלית כאמצעי לשינוי גנטי של צמחים נובע מכך שתהליך זה אינו ניתן לשליטה ולהכוונה, והוא מתרחש באופן אקראי. כתוצאה מכך לא כל התכונות ניתנות לשינוי, תכונות רבות עלולות גם להשתנות לרעה, ולא כל השינויים המושגים הם יציבים.

בידוד מוטנטים

שיטה זו מבוססת על השראה של מוטציות בתאי הצמח שבתרבית על-ידי טיפול במוטגנים פיסיקליים או במוטגנים כימיים, ובהמשך ברירה של המוטנטים הרצויים על-ידי הוספה של גורמי ברירה למצע התרבית.

השימוש בתרביות תאים, לבידוד של מוטנטים, מאפשר טיפול וסריקה בכמויות גדולות של תאים בודדים בתנאים מבוקרים ובמרחב קטן יחסית.

הבעיה העיקרית של השיטה היא שכדי לתכנן את מערכת הברירה, דרוש במקרים רבים ידע לגבי הבסיס הביוכימי של המוטציה הרצויה. ידע זה עדיין אינו קיים ברוב התכונות המועילות מבחינה חקלאית. לפיכך שיפור של זנים בשיטה זו הושג בעיקר על-ידי הקניית עמידות לגורמים שונים, כגון: קוטלי עשבים, רעלנים, יונים של מתכות כבדות, ואנאלוגים של חומצות אמיניות (הדבר הושג על-ידי הוספתם למצע הגידול כגורם ברירה).

איחוי פרוטופלסטים

ניתן ליצור פרוטופלסטים (תאים חסרי-דופן) צמחיים מחלקי צמח שונים על-ידי טיפול באנזימים המפרקים תאית - שהיא המרכיב העיקרי של דופן תא צמחי. כך נוצרים תאים עגולים, המוקפים בקרום התא בלבד (ראה איור 4-28 בעמוד הבא).

פרוטופלסטים מצמחים שונים ניתנים לאיחוי בתרבית בהשראת חומרים, כגון פוליאתילן גליקול ויוני קלציום ב-pH גבוה, או בהפעלת שדה חשמלי, הגורם לשבירה של ממברנת התא בכמה אתרים ובהמשך לאיחוי ממברנות של פרוטופלסטים הנמצאים במגע קרוב.

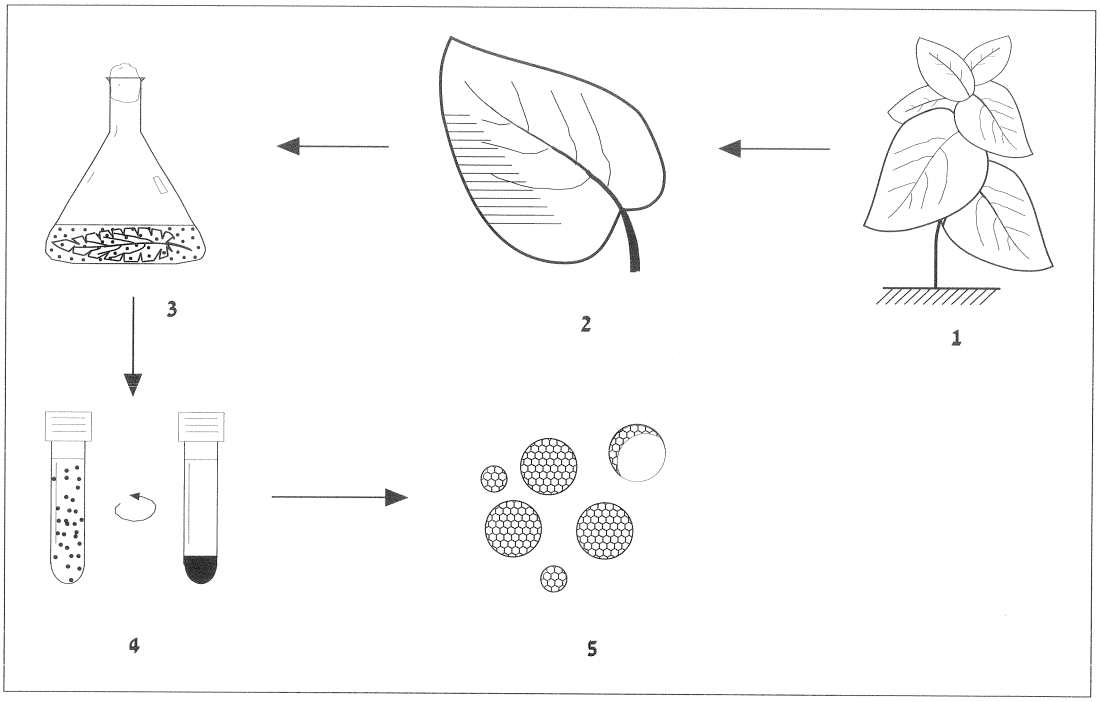
כתוצאה מאיחוי של פרוטופלסטים, תהליך הקרוי גם ***הכלאה סומאטית***, נוצר תא-כלאיים, הנושא מידע גנטי חדש, שמקורו בדנ"א של תאי-האם שהתאחו. ניתן לשחזר תא כזה בתרבית לצמח חדש (בשיטה שתוארה באיור 4-24), הנקרא צמח כלאיים סומאטי, ונושא תכונות משני ההורים.

הכלאה סומאטית משמשת בעיקר לשילוב של תכונות גנטיות רצויות משני מינים רחוקים של צמחים, שאינם יכולים לעבור הכלאה מינית. כך לדוגמה, על-ידי איחוי בין פרוטופלסטים מצמח, שעמיד לוירוס התוקף עלים של תפוחי אדמה (וירוס הנקרא PLRV) ובין פרוטופלסטים של תפוחי אדמה מזן מועדף מבחינה חקלאית, הצליחו ליצור צמח כלאיים פורה, המאופיין בתכונות החקלאיות המועדפות ובעמידות ל-PLRV, זאת למרות שקיימת חוסר התאמה מינית בין שני מיני הצמחים המקוריים.

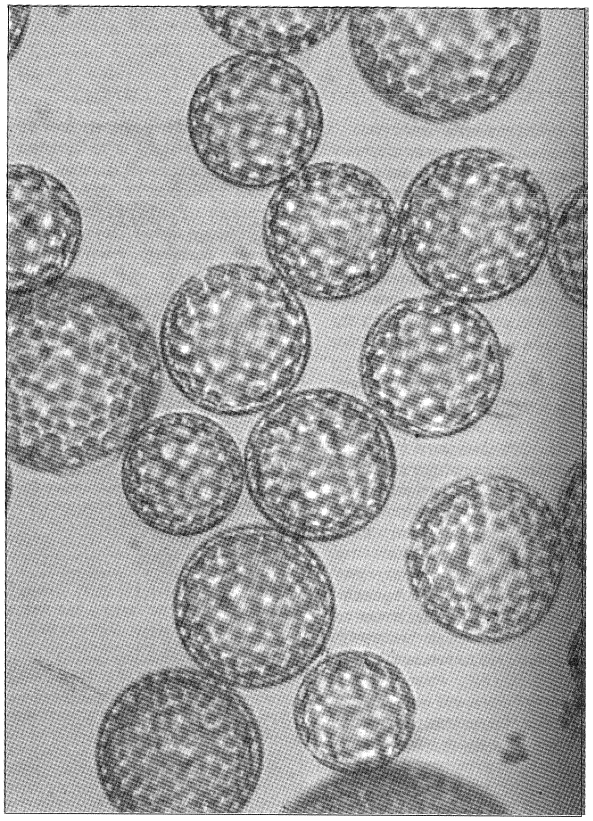
בנוסף לאיחוי של פרוטופלסטים מצמחים שונים, ניתן גם לאחות פרוטופלסטים צמחיים עם ספרופלסטים של חיידקים (חיידקים שהוסרה מהם הדופן על-ידי טיפול אנזימטי), ולהקנות כך לתאי הצמח שינוי גנטי רצוי.

באופן כללי הביצוע של תהליך האיחוי לא תלוי בידיעת הבסיס הגנטי של התכונות שרוצים להקנות, ומכאן היתרון של גישה זו על פני בידוד מוטנטים או החדרה מכוונת של גנים זרים לתוך תא הצמח - גישה המתוארת בפירוט בסעיף הבא.

א.



ב.



איור 4-28

פרוטופלסטים צמחיים: *א. שלבים בתהליך יצירה של פרוטופלסטים צמחיים מעלים*
ב. צילום במיקרוסקופ אור של פרוטופלסטים, שהוכנו מעלה של טבק

4.2.4 החדרת גנים לצמחים

החדרה של גנים לצמחים בשיטות של הנדסה גנטית מאפשרת העברה של תכונות מקבוצות ביולוגיות קרובות כרחוקות, ואין הן מוגבלות לתחום המין והסוג, כמו ההכלאות המיניות. יתר על כן, באופן זה ניתן גם להעביר לצמחים גנים ממקור שאיננו צמחי כלל כגון: וירוסים, חיידקים, שמרים, אצות, פטריות ובעלי חיים.

תא "מהונדס" בודד, שעבר שינוי גנטי כתוצאה מהחדרה של דנ"א זר לתוכו, ניתן לגדלו בתרבית לצמח טרנסגני בוגר ופורה, הנושא את השינוי הגנטי בכל תאיו. באופן זה הושג ייצור של צמחים טרנסגניים ביותר מ-30 מיני צמחים, כולל גידולים חקלאיים חשובים כגון: טבק, עגבניה, תפוחי-אדמה, כותנה, אורז, תירס, קנה-סוכר.

א. שיטות החדרה

כיום קיימות מספר מערכות, המאפשרות להחדיר גנים זרים לצמחים, ולקבעם שם, ליצירת צמחים טרנסגניים, שבהם הגן הזר משולב באופן יציב בגנום של הצמח, מתבטא בו ועובר בתורשה לצאצאיו. שיטת ההחדרה הנפוצה ביותר מבוססת על מערכת ביולוגית, הגורמת בטבע למחלת צמחים הנקראת ***עפצי צוואר השורש***. מחלה זו נגרמת על-ידי חיידק קרקע, אגרובקטריום טומפצינס, התוקף צמחים דו-פסיגיים (כגון עגבניה, גזר, תפוחי-אדמה, טבק) וגורם להיווצרות גידול סרטני לא-מאורגן של תאים ***(עפץ)***, הפוגע בצמח ואף עלול לגרום למותו.

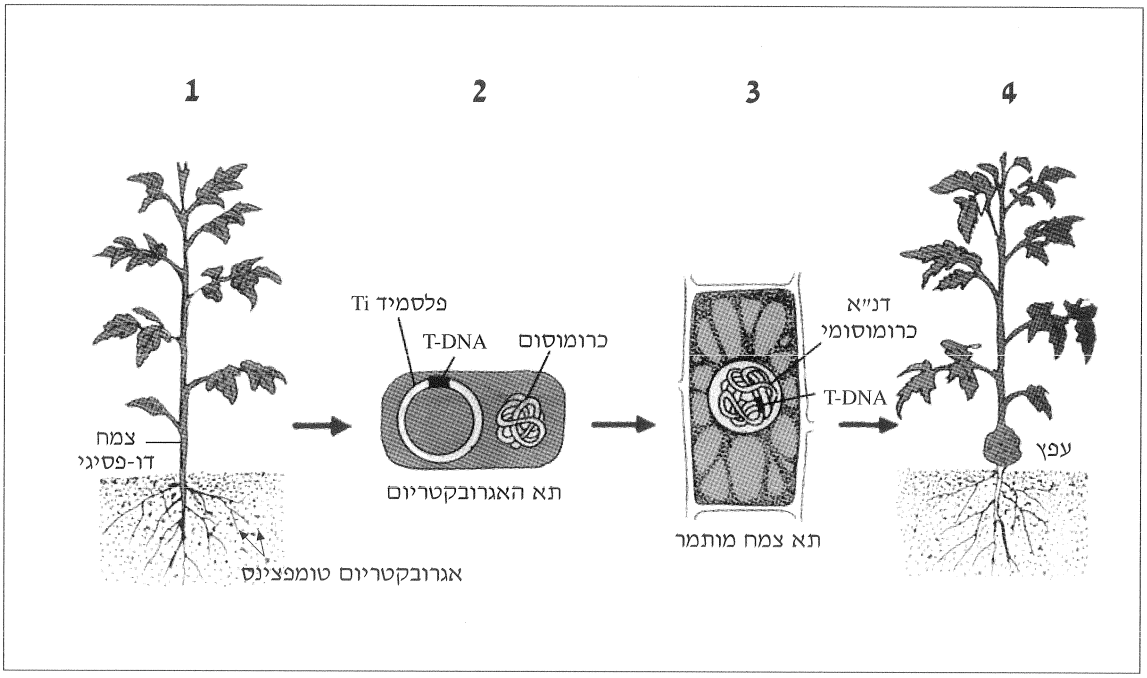
יצירת העפץ בצמחים מתרחשת באותם מקומות, שבהם הצמח פצוע, ואליהם יכולים החיידקים להגיע. בטבע נוצרים עפצים כאלה בעיקר בצוואר השורש, ואילו במעבדה ניתן להדביק אזורי צמח פצועים אחרים, כמו גבעול או עלה, ולקבל עפץ.

התברר, שחיידקי אגרובקטריום נושאים בציטופלסמה שלהם פלסמיד גדול, האחראי לתופעת העפץ. פלסמיד זה משרה יצירת גידול סרטני ולכן הוא כונה ***Ti*** (Tumour inducing). במהלך ההדבקה נצמדים חיידקי אגרובקטריה לתאי הצמח שבאזור צוואר השורש וחלק מפלסמיד ה-Ti עובר מן החיידק אל תוך התא הצמחי ומתאחה עם הדנ"א של גרעין תא הצמח (ראה איור 4-29 בעמוד הבא).

מקטע הפלסמיד, העובר לצמח כונה בשם ***דנ"א מועבר***, ובלועזית T-DNA (Transferred DNA). מקטע זה (T-DNA) נושא גנים, המקודדים סינתזה של אנזימים, המייצרים הורמונים צמחיים: אוכסינים וציטוקינינים. כתוצאה מכך התאים המותמרים (המכילים את ה-T-DNA בתוך הדנ"א הכרומוסומלי שלהם) מייצרים כמויות גדולות של הורמונים אלה, הגורמים להתחלקותם המהירה ולגידולם. תהליך זה מביא לבסוף ליצירת העפץ (שלב 4 באיור 4-29).

בנוסף מכיל ה-T-DNA גנים, המקודדים לאנזימים, שאחראים ליצירה של חומרים חדשים, הקרויים ***אופינים***, שתאי צמח רגילים אינם יודעים לייצרם.

הצמח אינו מסוגל לנצל את האופינים שמיוצרים על-ידי תאי העפץ, ולכן מפריש אותם לסביבה. חיידקי האגרובקטריום הנמצאים בסמוך, קולטים את האופינים לתוכם ומסוגלים לפרק אותם ולהשתמש בתוצרי הפירוק שלהם כמקור פחמן וחנקן.

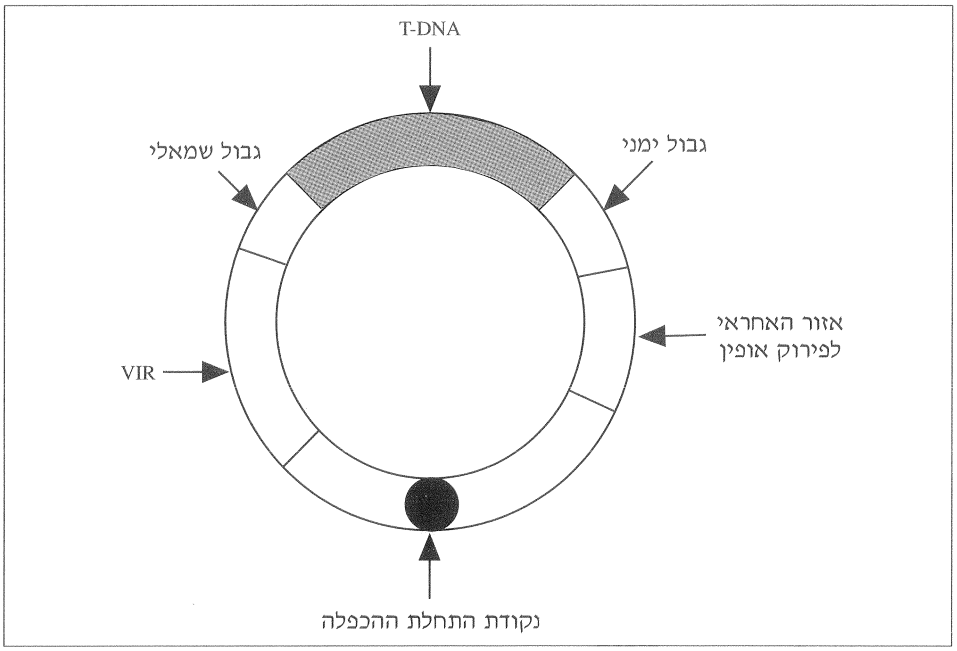


איור 4-29

תהליך ההדבקה של צמחים דו-פסיגיים על-ידי אגרובקטריום טומפצינס

התברר, שגנים המכתיבים את הוצאתו והעברתו של קטע ה-T-DNA לצמח אינם מצויים באזור ה-T-DNA, אלא במקום אחר בפלסמיד Ti, באזור המכונה אזור הווירולנטיות (Vir).

כפי שמתואר באיור 4-30, משני צידי ה-T-DNA מצויים רצפים קצרים זהים כמעט, המשמשים כגבולותיו. הגבול שבין ה-T-DNA לבין אזור ה-Vir נקרא הגבול השמאלי, והגבול האחר שלו נקרא הגבול הימני. גבולות אלה מכתיבים את זהות ה-T-DNA, כלומר, כל מה שנמצא ביניהם ייחשב ל-T-DNA, ויועבר לצמח; כל השאר לא יועבר.



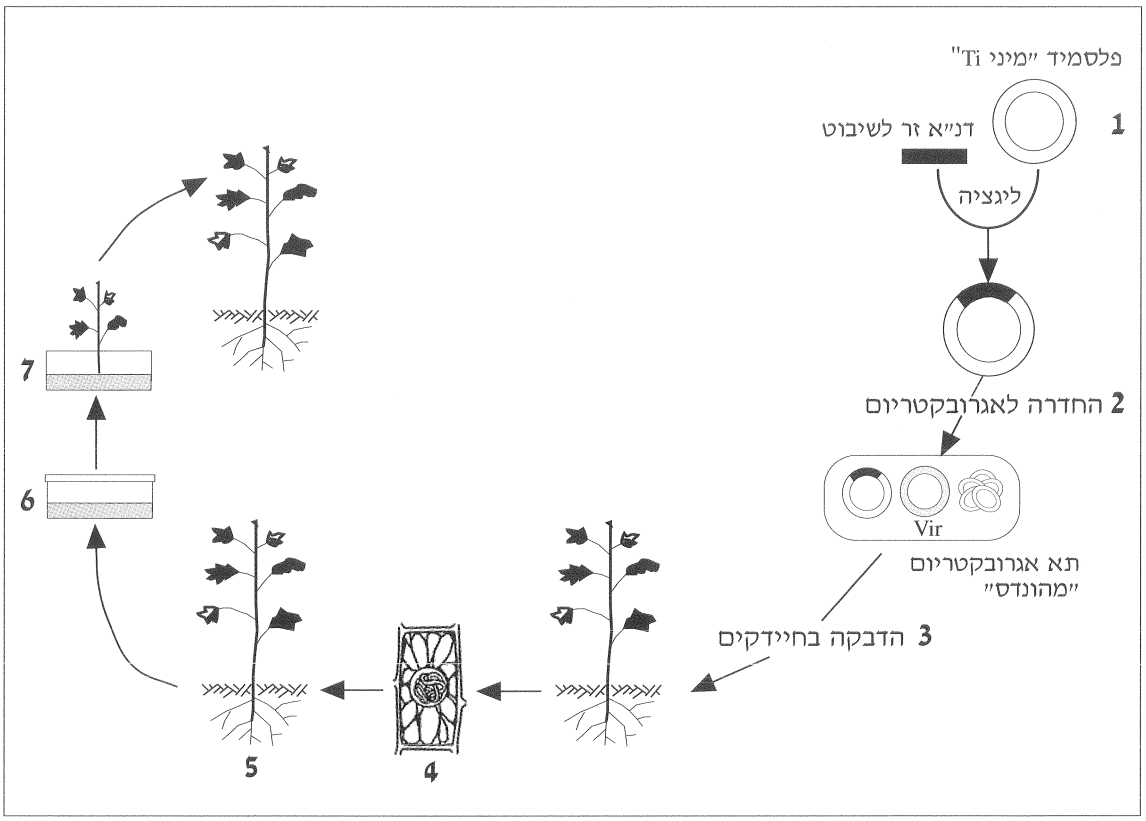
איור 4-30
תיאור סכימתי של הפלסמיד Ti

זוהי אפוא הסיבה לכך שהחדרה של גנים זרים לתוך אזור ה-T-DNA שבין שני הגבולות - גם אם היא גורמת לפגיעה ולשיבוש התבטאותם של הגנים השונים המצויים באופן טבעי באזור זה - אין בה כדי לפגוע בהעברת ה-T-DNA אל תוך הגנום הצמחי. עובדה זו מאפשרת להשתמש באגרובקטריום טומפצינס, כדי להחדיר גנים זרים לצמחים, כך שהם ישתלבו באופן קבוע בחומר הגנטי של הצמח (ראה איור 4-31 בעמוד הבא).

כדי שפלסמיד Ti יאפשר החדרה של גנים לצמחים, על תאי הצמח המותמרים לעבור רגנרציה וליצור צמח שלם בריא ופורה. תאי העפץ שבטבע אינם ניתנים לשחזור בתרבית לצמח שלם. הסיבה לכך היא יצירת כמות גדולה של הורמונים צמחיים, המשבשים את המאזן ההורמונלי הקיים בתאי צמח נורמליים וגורמים ליצירת הגידולים הסרטניים - העפצים.

כדי להתגבר על מגבלה זו הורחקו מאזור ה-T-DNA הגנים, המקודדים ליצירת ההורמונים, והוכנסו לתוכו גנים, המקודדים עמידות של התאים הצמחיים בפני אנטיביוטיקות שונות. גנים אלה נועדו לאפשר ברירה של התאים הצמחיים, שהותמרו על-ידי חיידקי האגרובקטריה, מתוך תאי הצמח, שלא עברו התמרה.

מגבלה אחרת, שהקשתה על השימוש בפלסמיד Ti כנשא של גנים זרים, נבעה מכך שהוא פלסמיד גדול במיוחד, ולפיכך אי אפשר לבודדו מהחיידק כמולקולה שלמה שמשבטים לתוכה גנים. כדי להתגבר על מגבלה זו, יצרו במעבדה פלסמיד "מיני Ti", המכיל T-DNA מקוצר (שהורחקו ממנו מרבית הגנים וביניהם גם אלה המקודדים את יצירת ההורמונים); הוא תחום על-ידי שני הגבולות וכולל גן לסלקציה ואתר שיבוט.



איור 4-31

החדרה של דנ"א זר לתוך גנום של צמח באמצעות אגרובקטריום טומפצינס

הגן המיועד להחדרה משובט יחד עם פרומוטור מתאים באיזור ה-T-DNA של פלסמיד "מיני Ti" כזה באמצעות שיטות של הנדסה גנטית (שלב 1 באיור 4-31). בהמשך, מוחדר הפלסמיד לחיידקי אגרובקטריה, המכילים בתוכם פלסמיד Ti שהוא חסר T-DNA אך בעל האזור הדרוש לווירולנטיות, אזור ה-Vir, (שלב 2 באיור 4-31).

לאחר מכן מדביקים את הצמח בחיידקי אגרובקטריה "מהונדסים" אלה על-ידי פציעתו באזור מיוחד לצורך ההדבקה (שלב 3 באיור 4-31). במהלך ההדבקה מוצא ה-T-DNA (המכיל את הגן המשובט) מתוך פלסמיד ה"מיני Ti" ומועבר מהחיידק אל תאי הצמח, שם הוא מתקשר לדנ"א הכרומוסומלי של התא (שלב 4 באיור 4-31). תהליך זה מתרחש בהשראת תוצרי הגנים של אזור ה-Vir, הנמצאים כאמור בחיידק על פלסמיד נפרד.

במקום ההדבקה נוצרת רקמת פצע, שחלק מתאיה הם תאים מותמרים (שלב 5 באיור 4-31). תאים מרקמת הפצע מועברים לגידול על מצע מזון מוצק (שלב 6 באיור 4-31), המכיל בדרך-כלל אנטיביוטיקה, המאפשרת ברירה של התאים המותמרים.

על-ידי שילוב מתאים של הורמונים צמחיים במצע הגידול, ניתן לשחזר מהתאים המותמרים בתרבית צמח שלם בריא ופורה (שלב 7 באיור 31-4), המכיל בכל תאיו את הגן הזר ומבטא אותו באופן יציב.

שיטת החדרה זו מאפשרת להעביר גן זר לצמחים כך שישאר בהם במשך כל חיי הצמח, ואף יעבור בתורשה לצאצאיהם. אולם השיטה שימושית רק במקרה של צמחים דו-פסיגיים, היות שחיידקי אגרובקטריום אינם תוקפים, כאמור, צמחים חד-פסיגיים, שרבים מהם משמשים להכנת מוצרי מזון בסיסיים חשובים ביותר (כגון שעורה, חיטה, תירס ואורז).

דרך חילופית המתבססת על וקטור טבעי לנשיאת דנ"א זר לתוך הצמח היא השימוש בנגיפים צמחיים. הרעיון שביסוד השיטה הוא לשתול דנ"א זר בתוך הדנ"א של הנגיף ולהדביק צמחים בנגיף "המהונדס". עם שילוב הדנ"א הנגיפי בתוך הדנ"א הצמחי, ניתן לצפות להתבטאותו של הדנ"א המושתל.

יתרונה של גישה זו הוא בכך, שקל מאוד להדביק צמחים בנגיפים, אם כי קיימות מגבלות בפיתוח מערכות כאלה, ואלה העיקריות שבהן:

1) מספר הצמחים היכולים לשמש כפונדקאים לנגיף מסוים מוגבל.
2) האפשרות להחדיר דנ"א לתוך הגנום של הנגיף מוגבלת למקטעי דנ"א קצרים בלבד.
3) התכונות הזרות, שהוחדרו לצמחים המודבקים, אינן עוברות לצאצאים, המתקבלים מהכלאה מינית בין צמחים אלה לבין עצמם.

לאור המגבלות האלה נוטים כיום לנטוש את השימוש בנגיפים צמחיים כווקטורים להעברת גנים זרים לצמח.

גישה נוספת להחדרה של גנים לצמחים מבוססת על העברה ישירה של הדנ"א לתאי הצמח. כידוע, תאי הצמח עטופים בדופן, שאינו מאפשר לדנ"א ולמולקולות גדולות אחרות לעבור דרכו. לכן כדי להחדיר ישירות את הדנ"א לתוך תאי הצמח, יש להסיר קודם את דופן התא, דבר המתבצע באמצעות אנזימים המפרקים תאית.

החדרה של דנ"א לתאי צמח שהדופן שלהם הוסרה - (פרוטופלסטים) אפשרית בכמה שיטות. השיטה הפשוטה ביותר היא הרחפת הפרוטופלסטים בתמיסה המכילה פוליאתילן גליקול - חומר המאפשר למולקולות דנ"א לחדור דרך קרום הפרוטופלסט. מוסיפים לתמיסה את הדנ"א שרוצים להחדיר, ומדגירים את התאים בנוכחות הדנ"א והפוליאתילן גליקול בטמפרטורה של 30°C.

בשלב הבא בוררים את התאים המותמרים, מאפשרים להם ליצור מחדש את דופן התא, ובהמשך לגדול ולהתמיין לצמח שלם.

אם הדנ"א הזר מתאחד עם הדנ"א של הפרוטופלסט, ישאו כל תאי הצמח, שיתקבל מפרוטופלסט זה, את הגן הזר שהוחדר, וגן זה יעבור בתורשה לצאצאי הצמח הטרנסגני שנוצר. החסרון הבולט ביותר של שיטה זו הוא התדירות הנמוכה של ההתמרה - רק 1%-0.1% של התאים מותמרים מתוך כלל אוכלוסית הפרוטופלסטים בתמיסה.

תדירות התמרה גבוהה יותר (פי 10 ויותר) מתקבלת בשיטת האלקטרופורציה:
אל תמיסה, המכילה פרוטופלסטים, פוליאתילן גליקול ודנ"א, מחדירים זוג אלקטרודות, ומעבירים ביניהן, דרך התמיסה, זרם חשמלי קצר ביותר. עקב כך נוצרים בקרומי הפרוטופלסטים פתחים, המאפשרים כניסה של מולקולות דנ"א לתוכם. באופן זה מוגדל מספר התאים שהדנ"א הזר נכנס לתוכם, ובהתאם חלה עלייה ביעילות ההתמרה.

קיימת גם שיטה להזרקת דנ"א לתוך פרוטופלסטים באמצעות מערכת מורכבת ביותר של מיקרוסקופ ומיקרו-מזרקים.

באופן כללי המגבלה העיקרית של כל השיטות, המשמשות להעברה ישירה של גנים לפרוטופלסטים, היא שהן טובות רק לאותם צמחים שניתן לשחזר בהם צמח בריא ופורה מפרוטופלסטים. אבל יש כמה וכמה מיני צמחים (במיוחד אלה השיכים למשפחת הדגניים) שבהם הדבר קשה לביצוע.

ב. תחומי יישום עיקריים

שינוי מכוון של הגנום, על-ידי העברה ישירה של מידע תורשתי דרך מחסומי המין המקובלים, יכול לאפשר קיצור של תהליכי ההשבחה ויצירה מהירה של מינים חדשים בעלי תכונות משופרות מבחינה חקלאית. אולם בדומה למערכות של בעלי-חיים, גם בצמחים קיים עדיין קושי לבטא את הגן המוחדר, בשל קיומם של מנגנוני בקרה מורכבים, המווסתים את רמת הביטוי של הגן, ותהליכי עיבוד המתרחשים לאחר הביטוי ודרושים ליצירה של תוצר פעיל.

עובדה נוספת המקשה על תהליך הביטוי היא, שרבות מן התכונות החשובות מבחינה חקלאית הן תכונות כמותיות, הנשלטות על-ידי מספר גנים. הכרת מכלול הגנים הקשורים בתכונה כמותית היא עדיין משימה מורכבת בפני עצמה, ומכאן ועד העברתם של גנים אלה מצמח לצמח הדרך ארוכה עדיין.

מסיבות אלו מספרם של צמחים "מהונדסים" בעלי ערך כלכלי הוא מועט יחסית. צמחים אלה מבטאים תכונות מועילות מבחינה חקלאית, שרובן הן תכונות דומיננטיות, המקודדות על-ידי גן בודד ומקנות לצמחים עמידויות שונות (כגון עמידות לקוטלי עשבים, עמידות לנזקי חרקים וחסינות למחלות ויראליות ופטריתיות) או משפרות את ערכם התזונתי וטעמם (כגון יצירה של חלבונים מתוקים או של חלבונים עשירים בחומצות אמיניות, אשר שכיחותן בצמחים נמוכה בדרך-כלל).

הקניית עמידות לקוטלי עשבים

בחקלאות נעשה כבר זמן רב שימוש בתרכובות כימיות, כדי להשמיד עשבים שוטים ובכך לאפשר עלייה בייצרנות של גידולים חקלאיים (עשבים שוטים מפחיתים את הייצרנות של גידולים חקלאיים לפחות ב-12%).

כיום זמינים בשוק קוטלי עשבים כימיים, המאופיינים בדרגה גבוהה של יעילות, בעלות נמוכה יחסית, בפירוק מהיר על-ידי מיקרואורגניזמים באדמה ובחוסר רעילות לבעלי-חיים. החסרון העיקרי של

תרכובות אלה הוא, שהן בדרך-כלל בעלות בררנות נמוכה, ולכן הן רעילות במידה מסוימת גם ליבולים החקלאיים הרצויים. כתוצאה מכך השימוש בהם מבוסס על תזמון מתאים ועל מיקום מבוקר. פיתוח של צמחים "מהונדסים" בעלי עמידות לקוטלי עשבים יגביר את הבררנות ואת יעילות השימוש בתרכובות אלה.

עשבים שוטים מסוימים פיתחו עם הזמן עמידות ספונטנית לקוטלי עשבים. כן הצליחו לבודד מוטנטים של מיני טבק, תירס וצמחים נוספים, בעלי עמידות לקוטלי עשבים מסוימים.

למרות שהבסיס הביוכימי והגנטי של העמידויות אינו ברור תמיד במלואו, הוכח במספר מקרים שהעמידות נובעת ממוטציה דומיננטית יחידה, ולכן מהווה מועמד מתאים להעברה לצמחים במטרה להקנות להם עמידות לקוטלי עשבים.

יצירת צמחים "מהונדסים", העמידים לקוטלי עשבים, מבוססת על שתי גישות עיקריות:

1. **שינוי הרגישות או הכמות של אנזים המטרה, המושפע מקוטל העשבים**

שינוי הרגישות התאפשר על-ידי בידוד של גנים מוטנטים, מצמחים וממיקרואורגניזמים עמידים, המקודדים לאנזים פעיל, שאינו רגיש עוד לנוכחותו של קוטל העשבים. החדרה של גן כזה לצמחים רגישים מאפשרת קיום תקין של המסלול הביוכימי, שנפגע במקור על-ידי קוטל העשבים.

המגבלה העיקרית בשיטה זו היא, שבמקרים רבים המוטציה, שמקנה את העמידות לאנזים, גורמת גם לירידה מסוימת בפעילותו האנזימטית.

הגברת הכמות של אנזים המטרה מושגת על-ידי החדרת הגן המקודד לאנזים יחד עם מבנים גנטיים (כגון פרומוטורים מיוחדים), המאפשרים ייצור יתר קבוע של האנזים, מה שמביא לביטול או להפחתה של העיכוב שלו על-ידי קוטל העשבים.

2. **החדרה של גן המקודד לאנזים, המבטל את הרעילות של קוטל העשבים**

במסגרת גישה זו פותחו שתי שיטות:

א) העברה של גנים מצמחים עמידים, המקודדים לאנזימים (כגון: אוקסידאזות, אמידאזות, דקרבוקסילאזות), הגורמים לניטרול של קוטל העשבים, על-ידי פירוקו או הכנסת שינוי כימי במבנהו.

ב) העברה של גנים מחיידקי קרקע שונים המקודדים לאנזימים (כגון: ניטרילאז, אצילאמידאז, מונואוקסיגנאז), הגורמים לניטרול של קוטל העשבים על-ידי פירוקו.

באמצעות גישות אלה הצליחו ליצור צמחים טרנסגניים (כגון: טבק, עגבניה, תפוחי-אדמה) בעלי סבילות גבוהה או עמידות לקוטלי עשבים, המעכבים את תהליך הפוטוסינתזה (כגון טריאזינים) או את הביוסינתזה של חומצות אמיניות (כגון גליפוסט) בתאי הצמח.

בנוסף לשימוש החקלאי, הקניית העמידות לקוטלי עשבים מנוצלת גם במחקר בסיסי של צמחים. גנים, המקנים עמידות לקוטלי עשבים, יכולים לשמש גם כסמנים דומיננטיים בתהליכי ברירה, באופן אנאלוגי לגנים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה.

הקניית עמידות מפני נזקי חרקים

השמדה של חרקים מזיקים, הפוגעים ביבולים חקלאיים בוצעה בעבר, בעיקר על-ידי ריסוס של הצמחים בחומרי הדברה כימיים. שיטה זו מאופיינת בכמה חסרונות:

א) חומרי ההדברה הכימיים הם רעילים לא רק לחרקים מזיקים אלא גם לחרקים מועילים ולבעלי-חיים אחרים.

ב) ריסוס בחומרי הדברה גורם לזיהום סביבתי של הקרקע ושל מי-התהום.

ג) חומרי הדברה, המסופקים ממקור חיצוני, אינם מגיעים לכל חלקי הצמח (כגון: עלים תחתונים מוסתרים ושורשים), והללו נשארים חשופים להתקפת חרקים.

ד) ריסוס בחומרי הדברה לא מבוצע באופן תמידי והוא מוגבל לתקופות מסוימות. לכן הצמחים שצומחים בין משטרי הריסוס חשופים להתקפת חרקים.

בשנים האחרונות פותחה גישה חלופית יעילה יותר להשמדה של חרקים מזיקים, המבוססת על החדרה לתאי הצמח של גנים, המקודדים לחלבונים טבעיים קוטלי חרקים, ויצירה של צמחים טרנסגניים העמידים לנזקי חרקים. גישה זו מעניקה הגנה קבועה לכל חלקי הצמח למשך כל חייו, בלי לזהם את סביבתו או לפגוע בבעלי-חיים אחרים (כולל חרקים מועילים, שאינם ניזונים מהצמח).

פיתוח של צמחים טרנסגניים, העמידים לחרקים, יאפשר ירידה משמעותית (בשיעור של 40%-80%) בשימוש בחומרי הדברה כימיים בחקלאות.

עד כה בודדו ונוצלו ליצירה של צמחים טרנסגניים בעיקר שני סוגים של גנים, המקנים עמידות לנזקי חרקים:

1. גנים שמקורם בחיידק בצילוס טורינגיאנסיס והם מקודדים לקבוצה של חלבונים גבישיים (דלתא אנדוטוקסינים), הנוצרים במהלך הספורולציה של החיידק. כאשר חלבונים אלה נאכלים על-ידי חרקים רגישים, הם מתפרקים במעי שלהם (על-ידי שילוב של פרוטאזות ו-pH גבוה) והופכים לרעלן חלבוני פעיל, הגורם לאחר דקות אחדות לשיתוק ולהרס של מעי החרק.

   קיימים כמה סוגי חלבונים כאלה, כולם מקודדים בחיידק על-ידי גן יחיד, אינם רעילים לבני-אדם ולבעלי-חיים, ומאופיינים בפעילות קטלנית חזקה כנגד טווח צר יחסית של חרקים אוכלי צמחים. רובם פועלים על זחלים של חרקים מסדרת הפרפריים, אולם יש ביניהם גם כאלה המשמידים זחלים של חרקים מסדרת החיפושיות ומסדרת הזבוביים.

   השימוש בחיידק עצמו כחומר הדברה ביולוגי נתקל בקשיים, משום שאנדוטוקסינים אלה מתפרקים מהר בחשיפה לאור ונשטפים בקלות. יצירתם בצמחים עוקפת בעיות אלה ומאפשרת לפתח צמחים, העמידים לנזקי החרקים.

כיום קיימים כבר צמחים טרנסגניים של טבק, של עגבניה, של תפוחי-אדמה, של כותנה ועוד. צמחים אלה מייצרים דלתא-אנדוטוקסינים, וכתוצאה מכך עמידים להתקפה של זחלים מסדרת הפרפריים. תכונה זו עוברת דרך הזרעים בתורשה לצאצאים. המתת החרקים מתרחשת מיד לאחר שהם אוכלים את הצמח, כך שהחרק מושמד עוד לפני שחל נזק משמעותי ליבול.

2. גנים שמקורם בצמחים שפיתחו מנגנוני הגנה טבעיים נגד חרקים אוכלי צמחים. אחד ממנגנוני ההגנה האלה הוא ייצור של חלבונים, המעכבים פעילות של פרוטאזות ספציפיות.

כאשר חלבונים אלה נאכלים על-ידי חרקים הם גורמים להפרעות בעיכול של חלבונים במעי החרק וכתוצאה מכך למחסור בהספקה של חומצות אמיניות.

קיימים סוגים שונים של חלבונים כאלה, והם מאופיינים כולם בטווח פעולה רחב כנגד כמה סוגי חרקים, אם כי לצורך קטילת החרק נדרשות כמויות גדולות יחסית של החלבון המעכב.

באמצעות בידוד של גנים, המקודדים למעכבי פרוטאזות, מצמחים העמידים להתקפה של חרקים, והעברתם לצמחים רגישים, שאינם מייצרים אותם באופן טבעי, הצליחו ליצור צמחי טבק טרנסגניים, המייצרים רמות גבוהות מאוד של מעכבי פרוטאזות. עקב כך חלה ירידה משמעותית במידת הנזק שנגרם לצמח בעקבות התקפה של חרקים.

הקניית עמידות להתקפה נגיפית

כבר זמן מה ידוע, שהדבקה של צמחים מסוימים בגזע של וירוסים מתונים (כגון נגיף מוזאיקת הטבק - TMV) מקנה לצמחים עמידות בפני התקפה של גזעים אלימים יותר. המנגנון של החסינות המוקנית לצמח עדיין אינו מובן לנו לחלוטין, אולם הוא מנוצל כדי להקנות לצמח הגנה בפני נגיפים שונים.

צמחי טבק טרנסגניים, שהוחדר להם גן המקודד לחלבון המעטפת של TMV, נמצאו חסינים להתקפת הנגיף עליהם בהשוואה לצמחי טבק אחרים.

ביבליוגרפיה

פרק 1

1. Creuger W. & Creuger A., **Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology**, Second Edition, Sinauer Associates: Sunderland, MA, 1989.

2. Demain, Arnold L. and Solomon, Nadine A., **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, American Society for Microbiology: Washington, D.C., 1986.

3. Gaden, Elmer J. Jr., "Production Methods in Industrial Microbiology," **Scientific American**, Vol. 245, September 1981, Scientific American Inc: New York.

4. Smith, John E., **Biotechnology Principles**, Van Nostrand Reinhold Co: UK, 1985.

5. Stanier, R. Y., Adelberg, E.A., Ingraham, J.L., **General Microbiology**, Fourth Edition, Prentice Hall Inc: New York, 1976.

6. Walker, J. M. and Gingold, E.B., **Molecular Biology and Biotechnology**, Second Edition, Royal Society of Chemistry:UK, 1988.

פרק 2

1. Brown, Prof. C.M., **Process Biochemistry**, Vol. 29, No. 6, Elsevier Applied Science: Edinburgh.

2. Creuger W. & Creuger A., **Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology**, Second Edition, Sinauer Associates: Sunderland, MA, 1989.

3. Dziezak, J.D., "Yeast and Yeast Derivatives: Definitions, characteristics and processing," **Food Technology**, Vol. 41 (2), 1987.

4. Godfrey, Tony and Reichelt, Jon, **Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry**, The Nature Press, Macmillan Publishers Ltd.: UK, 1983.

5. Peppler, H. J. and Perlman, D. **Microbial Technology, Volume I: Microbial Processes**, Second Edition, Academic Press: New York, 1979.
6. Peppler, H. J. and Perlman, D. **Microbial Technology, Volume II: Fermentation Technology**, Second Edition, Academic Press: New York, 1979.

7. Stanier, R. Y., Adelberg, E.A., Ingraham, J.L., **General Microbiology**, Fourth Edition, Prentice Hall Inc: New York, 1976.

8. Walker, J. M. and Gingold, E.B., **Molecular Biology and Biotechnology**, Second Edition, Royal Society of Chemistry:UK, 1988.

פרק 3

1. עדנה יפה, תורת החיסון: תאים ואברים במערכת החיסון, האוניברסיטה הפתוחה: תל-אביב, 1992.

2. עדנה יפה, תורת החיסון: מולקולות ההיכרות של מערכת החיסון, האוניברסיטה הפתוחה: תל-אביב, 1992

3. Burdon, R.H. and van Knippenberg, P.H., **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**, Volume 15, Elservier Science Publishers: UK.

4. Roitt, I.M., Brostoff, J., and Male, D.K., **Immunology**, Gower Medical Publishing: London, 1989.

5. "Testing of Autoimmune Therapy Begins," **Science**, Vol. 252, No. 5002, 5 April 1991, American Association for the Advancement of Science: Washington D.C.

6. Tijssen, P. **Practice and Theory of Enzyme Immunoassays**, Elsevier Science Publishers: UK, 1985.

7. Walker, J. M. and Gingold, E.B., **Molecular Biology and Biotechnology**, Second Edition, Royal Society of Chemistry:UK, 1988.

פרק 4

1. Alberts, et. al, **Molecular Biology of the Cell**, Second Edition, Garland Publishing Inc: New York, 1989.

2. Brown, Prof. C.M., **Process Biochemistry**, Elsevier Applied Science: Edinburgh, Vol. 21, No. 6.

3. Freshney, R. Ian, **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, Alan R. Liss Inc: New York, 1983.

4. Green, Howard, "Cultured Cells for the Treatment of Disease," **Scientific American**, Vol. 265, Vol 263, Vol 248, November 1991, Scientific American Inc: New York.

5. Lubiniecki, Anthony S., **Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology**, Marcel Dekker, Inc: New York, 1990.

6. Mizrachi, A. and van Wezel, A.S., **Advances in Biotechnological Processes**, Alan R. Liss: New York, 1983.
7. Moo-Young, Murray, **Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells,** Elsevier Applied Science: Amsterdam, 1988.

8. Moo-Young, Murray, **Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine**, Pergamon Press: Oxford, Vol 4, 1985.

9. Smith, John E., **Biotechnology Principles**, Van Nostrand Reinhold Co: UK, 1985.

10. Verma, Inder M., "Gene Therapy," **Scientific American**, Vol. 263, November 1990, Scientific American Inc: New York.

11. Walker, J. M. and Gingold, E.B., **Molecular Biology and Biotechnology**, Second Edition, Royal Society of Chemistry:UK, 1988.

12. Watson, James, et. al., **Molecular Biology of the Gene**, Vol. II, Fourth Edition, Addison-Wesley Publishing Co: USA, 1987.