



الجمهورية العربية السورية

وزارة التعليم العالي

جامعة حماة

كلية الزراعة

# التقنية الحيوية الميكروبية

Microbial Biotechnology

( الجزء النظري )

المحاضرة التاسعة

إعداد

الدكتور عبد الواحد الططي



جامعة حماة 2018 - 2019

## تقانات التخمير الحيوية

### Fermenting Biotechnology

يُعد التخمير من أقدم التقانات الحيوية في صناعة الأغذية التي دام استخدامها آلاف السنين. المفهوم القديم للتخمير والمتعارف عليه أن التخمير هو تفاعل لاهوائي يتحول فيه المركب الهيدروكربوني مثل السكر إلى كحول وثنائي أكسيد الكربون وماء مع تحرير طاقة.

أما المفهوم الحديث للتخمير كتقانة حيوية فيشير إلى نمو الكائنات الحية الدقيقة على مواد غذائية تحت ظروف قد تكون هوائية أو لاهوائية. وبشكل عام التخمير عبارة عن عمليات أكسدة وإرجاع تقود إلى تكوين الطاقة ATP، ويقوم بدور معطي ومستقبل لذرات الهيدروجين (الإلكترونات) مواد عضوية تتكون أثناء التخمير.

يطلق مفهوم الصناعات التخميرية على استخدام الأحياء الدقيقة لإنتاج منتجات ميكروبية مفيدة ذات أهمية اقتصادية كبيرة سواء كانت الخلايا الميكروبية نفسها أو منتجات هذه الميكروبات نتيجة نموها على بيئة غذائية مناسبة، وتعدّ الصناعات الميكروبية إحدى التطبيقات المهمة للتقنية الحيوية حيث يصل استثماراتها عالمياً إلى مئات المليارات من الدولارات.

تطورت المهارات التقليدية بهدف حفظ الغذاء وأصبح بالإمكان إطالة أمد القيمة الغذائية للخضراوات بخفض درجة الرقم الهيدروجيني pH من خلال تشكل الحموض العضوية كالمخللات وتعزيز قابلية هضم الأطعمة من خلال التحلل الإنزيمي كالعجين المتخمر والنقانق أو تحضير المنكهات كصلصة الصويا، وتوجد في البلدان الصناعية حوالي ثلث الأطعمة معدلة بالتخمير.

تتوفر مزارع بادئات التخمير في الصناعات الغذائية لتصنيع مدى واسع من الأطعمة المخمرة وتلعب هذه البادئات دوراً حيوياً في تصنيع منتجات الحليب المتخمرة كالألبان والأجبان وفي إنتاج الخبز، وتصنف إلى مزارع سلالات منفردة، ومزارع فصائل وأنواع منفردة، ومزارع مختلطة.



يعدّ النقانق Sausages أو السجق من الأطعمة المخمرة المنتشرة حيث تنتج أنواعها التي تخزن بدون تبريد بإضافة مزارع بادئة من جراثيم *Staphylococcus carnosus* كما تستخدم سلالات *Lactobacilli* التي تُنتج حمض اللبن من خلال تخمير الغليكوجين المخزن في العضلات مما يؤدي إلى تخفيض الرقم الهيدروجيني pH

إلى أقل من 5 وبذلك يحفظ اللحم من التلوث بالأحياء الدقيقة الحساسة للحموضة كما يصبح بروتين العضلات هلامياً يحمل نكهة السجق.

يعدّ الجبن من الأطعمة المخمرة المنتشرة أيضاً حيث يوجد في أوروبا أكثر من 1000 صنف من الأجبان، ويستعمل في إنتاج الجبن عدد كبير من الكائنات الحية التي غالباً ما تكون من



*Penicillium* لإنتاج أجبان Roqueforti و *Camemberti*، أو استعمال جراثيم *Streptococcus* لإنتاج جبنة *Emmentales*، أو استخدام *Actococcus* لإنتاج جبنة *Gouda*، وتختلف أجبان *Craft* التقليدية

تبعاً لمصدر الحليب (غنم، بقر، ماعز)، وعملية التصنيع (هوائية، لا هوائية)، وإضافة البادئات.

هناك منتجات مخمرة آسيوية مثل الكشك الذي يحضر من تخمير القمح المنبت بإضافة اللبن الحامض، وصلصة الصويا التي تحضر منذ 1000 عام في الصين من فول الصويا والقمح حيث يلقح المزيج بفطر *Aspergillus oryzae* ويخمر لمدة عام بدرجة حرارة الغرفة وبوجود جراثيم حمض اللبن والخميرة.



يُعدّ السيلاج من الأعلاف المخمرة وهو علف متخمّر لا هوائي يتألف عادة من الشوندر السكري ويستخدم في الشتاء.

#### • تخمر الغلوكوز: هناك مساران لتخمير الغلوكوز تؤدي إلى إنتاج الطاقة هما:

1- المسار الأول: هو التخمر المتجانس بحيث يكون الناتج الرئيس هو حمض اللاكتيك



وتنتج مولين من حمض اللبن لكل مول غلوكوز

2- المسار الثاني: هو التخمر المتباين الذي يحصل في العديد من الأحياء الدقيقة بحيث يؤدي

إلى إنتاج الكحول الإيثيلي وثنائي أكسيد الكربون وفق المعادلة:



ويستخدم ثنائي أكسيد الكربون الناتج في صناعة المياه الغازية ومطافئ الحريق، وتحصل هذه

التفاعلات بطرق مختلفة وإن تشابهت في النواتج النهائية.

تتألف جراثيم التخمر المتجانس من الجراثيم التالية:

*Lactococcus lactis* و *Lactobacillus casei*، و *Streptococcus pyogenes*

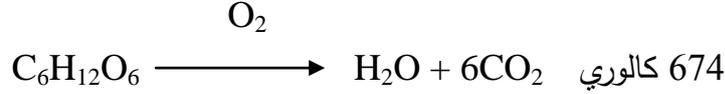
وتتألف جراثيم التخمر المتغاير من الجراثيم التالية:

*Lactobacillus brevis* و *Leuconostoc mesenteroides*

وتنتج مولاً واحداً من حمض اللبن لكل مول غلوكوز، وتحتوي منتجات الحليب المتخمرة على بروتينات متحللة جزئياً من دون وجود اللاكتوز لذلك تعدّ هذه المنتجات ذات قيمة غذائية عالية.

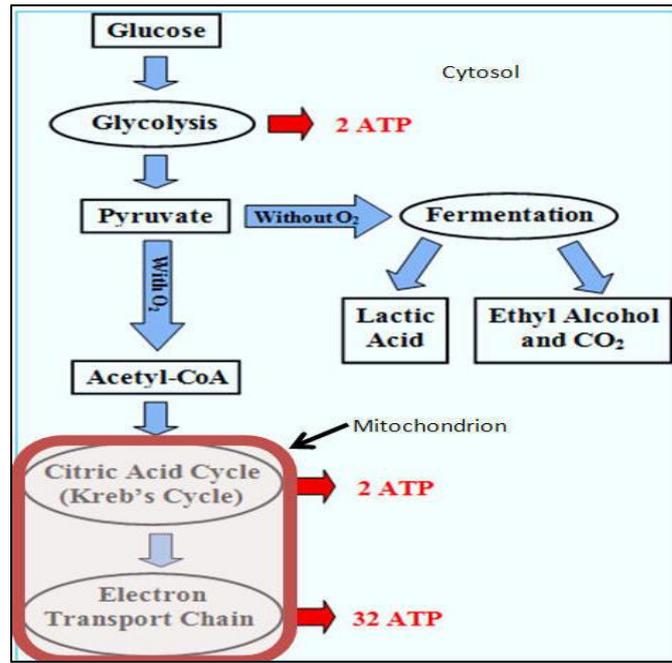
وضع لويس باستور Louis Pasteur أسس الاستثمار النقاني للمنتجات المتخمرة عند اكتشافه جراثيم حمض اللبن عام 1856 فقد وجد أن تخمّر حمض اللبن يخفض الرقم الهيدروجيني pH إلى قيمة 4 الذي يحمي من الإصابة بمعظم الأحياء الدقيقة الأخرى. تختلف جراثيم حمض اللبن في أشكالها فهي موجبة غرام لا هوائية اختيارية تفتقد إنزيم الكاتالاز والسيتوكرومات، وتستطيع تفكيك اللاكتوز إلى غلوكوز وغالكتوز وتستقلب هذه السكريات إلى حمض اللبن.

تتم الأكسدة الهوائية أو التنفس عبر دورة كريبس أو الفسفرة التأكسدية حيث يتأكسد جزيء السكر الأحادي أكسدة تامة لينتج غاز ثنائي أكسيد الكربون والماء حسب المعادلة التالية:



إنزيمات

والتنفس هو عملية أكسدة وإرجاع تجري مع تكوين ATP وتقوم المواد اللاعضوية والعضوية بدور المعطي للهيدروجين (الإلكترون) أما المستقبل النهائي للهيدروجين فهي مركبات لاعضوية، وعندما يكون المستقبل النهائي للهيدروجين هو عنصر الأوكسجين تسمى العملية بالتنفس الهوائي، وعندما يكون المستقبل النهائي للهيدروجين هو الأوكسجين المرتبط بالمركبات اللاعضوية مثل النترات والسلفات والكربونات تسمى العملية بالتنفس اللاهوائي. وفي عمليات التخمر تحت تأثير الأوكسجين تتغير طريقة الحصول على ATP بحيث يتحول التخمر إلى عملية تنفس وهذا يحدث في الخمائر.



الشكل 5- الاستقلاب الهوائي واللاهوائي لسكر الجلوكوز

يرتبط التنفس عادة بالأكسدة التامة للمركبات العضوية إلا أنّ بعض أنواع الجراثيم من جنس *Pseudomonas* وبعض الفطريات لا تؤكسد ماءات الفحم أكسدة تامة ويتجمع في الوسط حمض الغلوكونيك والفوماريك والليمون واللبن والخل ويدعى ذلك بالأكسدة غير التامة والفرق بين الأكسدة غير التامة والتخمير هو أنّ الأكسدة غير التامة تجري بوجود الأوكسجين أما التخمير فيجري بغياب الأوكسجين وتكون الأكسدة غير التامة لصالح الأحياء الدقيقة.

يعتمد نجاح الصناعات التخمرية بشكل عام على عاملين رئيسيين هما اختيار السلالة الميكروبية النشطة والمادة الخام المناسبة.

#### أولاً- السلالة الميكروبية:

ينبغي أن تتميز السلالة الميكروبية المستخدمة في الصناعات التخمرية بعدة صفات أهمها:

- 1- أن تكون ذات كفاءة عالية في إنتاج المنتج بكميات كبيرة وجودة عالية.
- 2- أن تكون لها القدرة على تحمل ظروف التصنيع مثل تحمل التركيز العالي من المادة الخام المستخدمة في الصناعة والتركيز العالي من المنتج النهائي.
- 3- أن تحافظ على ثبات معدل إنتاجها وجودة المنتج وظروف الإنتاج لفترة زمنية طويلة.
- 4- ألا تكون السلالة المستخدمة ضارة أو سامة أو ممرضة.

ويمكن اختيار السلالة الميكروبية المناسبة بطريقة من الطرائق التالية:

- انتخاب سلالة تتمتع بالموصفات المطلوبة من عدد كبير من العزلات الميكروبية.
- استحداث طفرة ميكروبية تتمتع بالموصفات المطلوبة.
- استخدام تقنية الهندسة الوراثية للحصول على سلالة ميكروبية مزودة بالصفات المرغوبة.

#### ثانياً - المادة الخام:

يجب أن يتوفر في المادة الخام المستخدمة في الصناعات التخمرية عدة خصائص أهمها ما يلي:

- 1- أن تكون متوفرة محلياً على مدار العام ورخيصة الثمن.
- 2- أن تكون غنية بمصدر الكربون والعناصر الغذائية الأخرى بشكل مناسب لتغذية السلالة الميكروبية المستخدمة.
- 3- أن تكون سهلة التخزين ومكان تخزينها قريب من المصنع.
- 4- ألا تحتاج إلى عمليات كثيرة لإعدادها كبيئة غذائية تناسب تنمية السلالة الميكروبية المستخدمة.



#### • المواد الخام المستخدمة في الصناعات التخمرية:

##### 1- المخلفات النباتية:

مثل حطب القطن وقش القمح وقش الذرة وقوالحها وغيرها،

وكل هذه المخلفات غنية بالمواد السيليلوزية، ويمكن استخدامها في صناعات ميكروبية مختلفة مثل إنتاج السماد العضوي (الكومبوست) وإنتاج الغاز الحيوي. عند استخدام هذه المخلفات في الصناعات التخمرية التي تحتاج فيها السلالات الميكروبية للسكريات البسيطة كمادة أولية في غذائها يجب إجراء معاملات أولية لتحويل السيليلوز والسكريات العديدة إلى سكريات بسيطة باستخدام الحموض والحرارة.

##### 2- النواتج الثانوية لمصانع الأغذية:

تستخدم العديد من النواتج الثانوية والمخلفات الناتجة من مصانع الأغذية كمواد خام في



الصناعات التخمرية أهمها:

أ- المولاس **Molasses**: وهو أحد المنتجات الثانوية

لمصانع السكر يحتوي على حوالي 50% سكر (15%)

سكروز، و35% غلوكوز وفركتوز).

ب- **مصل اللبن أو الشرش Whey**: وهو أحد المنتجات الثانوية لصناعة الجبن واللبن الذي ينتج بكميات كبيرة من مصانع الألبان ومنتجاتها، ويحتوي على حوالي 5% سكر اللاكتوز ونسبة قليلة من البروتين والدهون والملح، ونصف الشرش المنتج عالمياً له استخدامات منها:



- إنتاج حمض اللاكتيك والكحول بالتخمير.
- إنتاج اللاكتوز أو مكوناته من الجلوكوز والجالاكتوز.
- إنتاج الكتلة الحيوية مثل تنمية الخميرة بعد تحويل سكر الحليب إلى حمض اللاكتيك لأن معظم الخمائر لا تستطيع استهلاك سكر الحليب.



ت- **منقوع الذرة Corn Steep Liquor**: وهو أحد مخلفات مصانع نشا الذرة وعبارة عن الماء الذي تتقع فيه الذرة قبل تصنيعها، ويحتوي المنقوع على 6-12% مواد صلبة غني بالمواد الغذائية المختلفة.

ث- **الهيدروكربونات Hydrocarbons**:

وهي مخلفات بعض الصناعات البترولية الغازية مثل غاز الميثان والبروبان التي يمكن استخدامها في الصناعات التخميرية كمواد خام تنمو عليها بعض الميكروبات المفيدة.

تجري عمليات التخمير ضمن خزانات التخمير (fermentation tanks) أو المفاعلات الحيوية عندما نرغب بالحصول على كميات كبيرة من المنتج في التخميرات الصناعية وقد تتألف الخزانات من الزجاج أو المعدن أو البلاستيك وتكون مزودة بعدادات (gauges) وإعدادات (settings) للسيطرة على التهوية ومعدل التحريك بالمزج أو ضخ الهواء والحرارة ودرجة الحموضة (pH) ومتغيرات أخرى ذات علاقة بالنمو والإنتاج.

يمكن أن تكون وحدة التخمير صغيرة الحجم بحيث يمكن وضعها على منضدة المختبر سعتها 5 - 10 لتر تستخدم للإنتاج صغير المقياس، أو تكون ذات سعة كبيرة تصل حتى 10000 لتر تستخدم للإنتاج كبير المقياس كما في الإنتاج الصناعي.

هناك نوعان من مزارع التخمر يعرف الأول بمزارع التخمر المغمور submerged حيث يتم فيها زرع الكائنات الدقيقة في أوساط سائلة، أما النوع الآخر فهي مزارع الحالة الصلبة solid state تزرع فيها الكائنات الدقيقة على أسطح المواد الغذائية الصلبة مثل المخلفات النباتية مع ترطيبها بكميات قليلة من السوائل، وهناك ثلاثة أنواع من المزارع اعتماداً على مراحل نمو الخلايا الجرثومية في طرائق الزرع بالمخمرات هي:

1- المزرعة المغلقة batch culture حيث تمر فيها الخلايا بجميع المراحل حتى الموت، ولا يضاف لها الغذاء خلال فترة التخمر.

2- المزرعة المغلقة المغذاة fed-batch culture حيث يضاف الغذاء عند طور الثبات بدون سحب المنتجات والخلايا المعمرة لتستمر المزرعة فترة أطول من الزمن ثم تنتهي بالموت.

3- المزرعة المستمرة continuous culture يستمر فيها إضافة المواد الغذائية مع سحب المنتجات والخلايا المعمرة لتستمر المزرعة فترة طويلة من الزمن دون الوصول إلى مرحلة الموت.

تتطلب عملية التخمر في الصناعات الغذائية توفر الماء والأكسجين ومصدر للطاقة ومصدر كربون ونيروجين وعناصر مغذية صغيرة وعوامل نمو وبادئات ومحفزات ضرورية لنمو الكائن الدقيق.



مخمر بسيط

يكون تشكل منتجات الأحياء الدقيقة في عمليات التخمير إما مقترناً بالنمو أو غير مقترن به،



ويسمى المنتج المقترن بالنمو بالنوع الأول (Type1) حيث يتضمن تشكل كتلة خلوية (خميرة الخباز، وبروتين الخلية المفردة، والتخمير الكحولي)، ويسمى تشكل المنتج غير المقترن بالنمو بالنوع الثالث (Type3) الذي يحدث

في نهاية الطور اللوغاريتمي للنمو بحيث لا ينشأ المنتج من الاستقلاب الأولي إنما ينتج من الاستقلاب الثانوي مثل إنتاج المضادات الحيوية والإنزيمات خارج خلوية، أما في النوع الثاني (Type2) فيتشكل المنتج بشكل جانبي للاستقلاب الأولي على التوازي مع نمو الكتلة الخلوية مثل إنتاج حمض الليمون والحموض الأمينية، وبسبب تشكل غالبية منتجات هذا النمط بالاقتران بالنمو يجري حالياً تصنيف عمليات التخمير على النمطين الأول والثالث.

لقد توصل العلماء إلى الأسس التالية بالنسبة للقدرة على تخمير السكريات المختلفة:

- 1- أي خميرة لا تخمر الغلوكوز لا تستطيع تخمير أي سكر آخر.
- 2- الخميرة التي تستطيع تخمير الغلوكوز يمكنها تخمير الفركتوز والمالتوز والسكروروز.
- 3- أي خميرة تخمر اللاكتوز لا تستطيع أن تخمر المالتوز والعكس صحيح.

يواجه الباحثون في مجال التخمير مشاكل عديدة منها عدم امتلاك خميرة *Saccharomyces* المورثات التي تنتج الإنزيمات المسؤولة عن تحويل المواد الخام إلى سكريات قابلة للتخمير مثل أنزيمات الأميلاز أو السيلولاز كما أنها لا تستطيع إنتاج الإنزيمات التي تهدم السكريات الخماسية لذلك فإن الاتجاه السائد الآن في أبحاث الخمائر هو تطوير سلالات من الخميرة لها القدرة على الاستفادة من عدد متنوع من المواد الخام عند درجات حرارة مرتفعة وتحمل تراكيز عالية من السكر ومن الإيثانول الذي تنتجه.



تشمل تطبيقات التخمير عدة مجالات منها:

- 1- تخمير الأغذية: من الصناعات القديمة كصناعة الجبن والخبز والخل وغيرها، وقد ارتبط تطور الصناعات الغذائية بتطوير تقانات التخمير وأدى إلى تحسين نوع الغذاء كما ساهم في تحسين وسائل حفظ الأغذية.



2- الصناعات الصيدلانية والتقنية الحيوية: كإنتاج الكتلة الحيوية كما في إنتاج عصيات حمض اللبن وغيرها، وكذلك إنتاج الإنزيمات والحموض العضوية والكحولات والأنسولين واللقاحات وغيرها.

3- تطبيقات بيئية: للتخلص من النفايات والملوثات الصناعية من خلال المعالجة بأنزيمات تنتجها الأحياء الدقيقة بالمخمرات.



4- إنتاج الطاقة: كإنتاج الوقود الحيوي عن طريق استهلاك المخلفات النباتية من قبل الأحياء الدقيقة بالمخمرات وإطلاق غاز الميثان المستخدم كوقود ومصدر طاقة.



**انتهت المحاضرة**