الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

التقانات الحيوية الميكروبية

Microbial Biotechnology

(الجزء النظري)

المحاضرة الثامنة

إعداد

الدكتور عبد الواحد الطحلي

جامعة حماة 2019 - 2020

تـقـانـات الـتـخـمـيـر الحيـويـة
Fermenting Biotechnology

يُعد التخمير من أقدم التقانات الحيوية في صناعة الأغذية التي دام استخدامها آلاف السنين.

المفهـوم القـديم للتخميـر والمتعارف عليه أن التخمير هو تفاعل لاهوائي يتحول فيه المركب الهيدروكربوني مثل السكر إلى كحول وثنائي أوكسيد الكربون وماء مع تحرير طاقة.

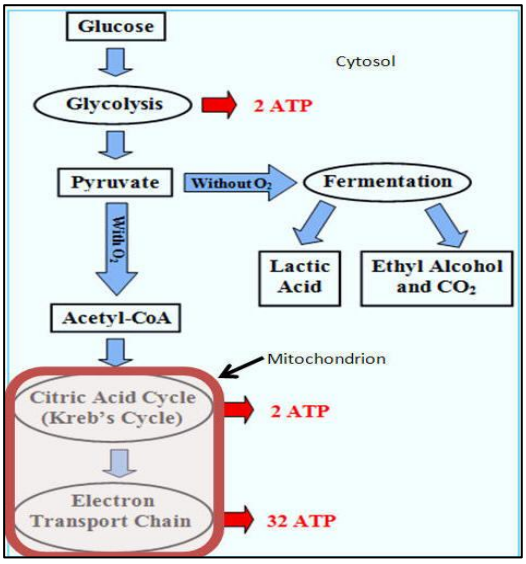
أما المفهوم الحديث للتخمير كتقانة حيوية فيشير إلى نمو الكائنات الحية الدقيقة على مواد غذائية تحت ظروف قد تكون هوائية أو لاهوائية. وبشكل عام التخمُّر عبارة عن عمليات أكسدة وإرجاع تقود إلى تكوين الطاقة ATP، ويقوم بدور معطي ومستقبل لذرات الهيدروجين (الإلكترونات) مواد عضوية تتكون أثناء عملية التخمُّر.

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:

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow[\text{إنزيمات}]{O_2} H_2O + 6CO_2 \quad \text{674 كالوري}$$

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.

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 والتخمر هو أنّ الأكسدة غير التامة تجري بوجود الأوكسجين أما التخمر فيجري بغياب الأوكسجين وتكون الأكسدة غير التامة لصالح الأحياء الدقيقة (الشكل 5).



الشكل (5): الاستقلاب الهوائي واللاهوائي لسكر الغلوكوز

وضع لويس باستور Louis Pasteur أسس الاستثمار التقاني للمنتجات المتخمرة عند اكتشافه جراثيم حمض اللبن عام 1856 فقد وجد أن تخمُّر حمض اللبن يخفض الرقم الهيروجيني 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 وغالاكتوز وتستقلب هذه السكريات إلى حمض اللبن.

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. تتألف جراثيم التخمر المتجانس من الجراثيم التالية:

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

وتتألف جراثيم التخمر المتغاير من الجراثيم التالية:

Leuconostoc mesenteroides، و*Lactobacillus brevis*

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.

تطورت المهارات التقليدية للتخمير 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.

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 تُنتِج 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 متخمر لا هوائي يتألف عادة من الشوندر السكري ويستخدم في الشتاء.

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.

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

أولاً- السلالة الميكروبية:

ينبغي أن تتميز السلالة الميكروبية المستخدمة في الصناعات التخميرية 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 بالمواصفات المطلوبة من عدد كبير من العزلات الميكروبية.
- استحداث طفرة ميكروبية تتمتع بالمواصفات المطلوبة.
- استخدام تقنية الهندسة الوراثية للحصول على سلالة ميكروبية مزودة بالصفات المرغوبة.

ثانياً- المادة الخام:

يجب أن يتوفر في المادة الخام المستخدمة في الصناعات التخميرية عدة خصائص أهما ما يلي:

1- أن تكون متوفرة محلياً على مدار العام ورخيصة الثمن.

2- أن تكون غنية بمصدر الكربون والعناصر الغذائية الأخرى 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 التخميرية:**

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 التخميرية 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:

تُستخدم العديد من النواتج الثانوية والمخلفات الناتجة من مصانع الأغذية كمواد خام في الصناعات التخميرية أهمها:

أ- **المولاس Molasses**: وهو أحد المنتجات الثانوية لمصانع السكر يحتوي على حوالي 50% سكر (15% سكروز، و35% غلوكوز وفركتوز).

ب- مصل اللبن والجبن أو الشرش Whey:

هو 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 الغلوكوز والغالاكتوز.
- إنتاج الكتلة الحيوية (البروتين وحيد الخلية) مثل تنمية الخميرة بعد تحويل سكر الحليب إلى حمض اللاكتيك لأن معظم الخمائر لا تستطيع استهلاك سكر الحليب.
- إنتاج أجبان المصل (جبن ريكوتا، قريشة)، وتغذية الحيوانات بالمصل السائل عوضاً عن الماء.
- إنتاج الغاز الحيوي (الميتان)، وتسميد التربة بالمصل بعد فصل البروتينات.

ت- منقوع الذرة Corn Steep Liquor: وهو أحد مخلفات مصانع نشا الذرة وعبارة عن الماء الذي تنقع 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 الميتان 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 التخمرات 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 ليتر تستخدم للإنتاج صغير المقياس، أو تكون ذات سعة كبيرة تصل حتى 10000 ليتر تستخدم للإنتاج كبير المقياس كما في الإنتاج الصناعي (الشكل 6).

الشكل (6): مخمِّر بسيط

يوجد نوعان من مزارع التخمير يعرف الأول بمزارع التخمير 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، واعتماداً على مراحل نمو الخلايا الجرثومية في طرائق الزرع بالمخمرات يوجد ثلاثة أنواع من المزارع هي:

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

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 التخمير في الصناعات الغذائية توفر الماء والأكسجين ومصدر للطاقة ومصدر كربون ونتروجين وعناصر مغذية صغيرة وعوامل نمو وبادئات ومحفزات ضرورية لنمو الكائن الدقيق. 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 التخمر 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 والسكروز.

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 للتخمر 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 وتتحمل تراكيز عالية من السكر ومن الإيتانول الذي تنتجه. ويجري إنتاج البروتين وحيد الخلية أو البروتين الميكروبي من خميرة الخباز باستخدام المخلفات الصناعية والغذائية وتستعمل الخميرة كعلف للحيوانات بعد إضافة بعض البروتينات الحيوانية مثل مسحوق السمك نظراً لنقص البروتين الميكروبي من بعض الحموض الأمينية مثل السيستيئين والميثيونين.

- **مجالات تطبيق تقانة التخمير:**

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.

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 الميتان المستخدم كوقود ومصدر طاقة.

❖ **الإنتاج الحيوي لكحول الإيثانول Production of Ethyl Alcohol:**

الإيثانول وهو مركب كيميائي عضوي ينتمي إلى الكحوليات له الصيغة الكيميائية C_2H_5OH ويسمى الكحول تعميماً، والإيثانول مادة قابلة للاشتعال عديمة اللون يُستخدم كمطهر ومذيب في العديد من الصناعات الكيميائية والطبية والدوائية وفي صناعة العطور، كما يستخدم حديثاً كمصدر للطاقة ووقود للسيارات والمحركات الميكانيكية وهو أهم وقود حيوي Biofuel يطمح لإنتاجه.

يتم إنتاج الإيثانول كمادة كيميائية نفطية من خلال إضافة الماء إلى الإيثيلين، وحيوياً من خلال تخمير السكّر مع الخميرة. هناك مساران لتخمير الغلوكوز تؤدي إلى إنتاج الطاقة هما:

1- المسار الأول: هو التخمر المتجانس بحيث يكون الناتج الرئيس هو حمض اللاكتيك كما في المعادلة: $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_3H_6O_3$

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 الإيتيلي وثنائي أكسيد الكربون وفق المعادلة:

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 + 2ATP$ 27 كالوري

- **السلالة الميكروبية المستخدمة للإنتاج الحيوي لكحول الإيثانول:**

تستخدم سلالة منتخبة من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* ذات كفاءة عالية في تحويل

السكر إلى كحول إيتيلي، ويكون لها القدرة على تحمل تراكيز عالية نسبياً من السكر والكحول. يحضر البادئ بتنمية السلالة النقية من الخميرة المنتخبة وتنشيطها بإعادة تنميتها عدة مرات على الوسط الغذائي المناسب، وتتم التنمية تحت الظروف الهوائية لتشجيع الخميرة على تكوين كميات كبيرة من الخلايا حتى يصل حجم اللقاح إلى 4 ليتر ثم ينقل إلى مصنع الإنتاج لاستخدامه كبادئ لإنتاج الكحول.

- **المادة الخام المستخدمة:**

يجب إجراء معاملة أولية إذا كانت المادة الخام المتوفرة والمستخدمة نشوية مثل القمح والشعير والذرة أو سيليلوزية مثل بقايا صناعة الخشب لتحويلها إلى مواد سكرية تتمكن الخميرة من استخدامها، ويستعمل لذلك الحلمهة Hydrolysis باستخدام الحموض أو إنزيم الأميلاز المستخلص من فطر

Aspergillus niger لحلمهة النشاء، أما إذا كانت المادة الخام سكرية مثل المولاس فيتم استخدامه مباشرة بعد تخفيفه دون الحاجة إلى معاملات أولية لأن تحويل السكريات الثنائية إلى غلوكوز تتم بوساطة إنزيم الإنفرتاز Invertase الموجود في خلايا جدار الخميرة.

- **الظروف المثلى للإنتاج:**

يضبط تركيز السكر في المولاس إلى 12 % لأنّ تركيز السكر في المولاس يبلغ نحو 50 % لذلك يجب تخفيفه لأنّ التركيز الأعلى من ذلك (أكثر من 18 %) يبطئ نمو الخميرة وعملية التخمر كما يبقى جزء من السكر بدون تخمير، والتركيز الأقل (10 %) غير اقتصادي في الإنتاج، ويضاف إلى محلول المولاس المخفف مصدر للنتروجين مثل كبريتات الأمونيوم ومصدر للفوسفور مثل فوسفات الأمونيوم لأنّ عنصري النتروجين والفوسفور أساسيان لتغذية الخميرة ويفتقر المولاس لهما. يضبط درجة pH إلى 4.5 باستخدام حمض الكبريت لأنّ هذه الدرجة تتحملها الخميرة وتمنع نمو العديد من الجراثيم الملوثة، وتضبط درجة الحرارة بين 20–27°م لأنّ درجة الحرارة الأقل من ذلك تؤدي إلى إبطاء عملية التخمر والأعلى من ذلك تؤدي إلى تطاير الكحول ونمو بعض الجراثيم الملوثة.

يجب أن تجري عملية التخمر تحت ظروف لا هوائية حتى يتحول السكر بكفاءة إلى كحول إيتيلي وثنائي أكسيد الكربون، وعادة تبدأ خلايا الخميرة (البادئ) باستهلاك الهواء الذائب في المحلول أولاً ثم تبدأ الظروف اللاهوائية بعد ذلك ويبدأ تحول السكر إلى كحول بدلاً من إنتاج خلايا الخميرة، وتستغرق عملية التخمر كاملة حوالي 48 ساعة في حالة التحكم في توفير الظروف المثلى للإنتاج.

- **استخلاص الكحول:**

يتم استخلاص الكحول من محلول التخمير بالتقطير حيث يصل التركيز في البداية إلى حوالي 60–90 % ثم يجري تركيزه إلى أكثر من 95 %، كما ينتج غاز ثنائي أكسيد الكربون كمنتج ثانوي مع إنتاج الكحول، ويتم جمع الغاز وينقى ويضغط في اسطوانات ليستعمل بعد ذلك في صناعة المياه الغازية ومطافئ الحريق والثلج الجاف.

انتهت المحاضرة