كلية الزراعة البيئية والحيوية
والتصنيع الغذائى
قسـم علـوم الأغـذيـة

جامعة بنى سويف

# المحاضرة الخامسة والسادسة

# فى مقرر

# ص ن ع (413)

# تكنولوجيا التخمرات الصناعية

# عملية التخمر

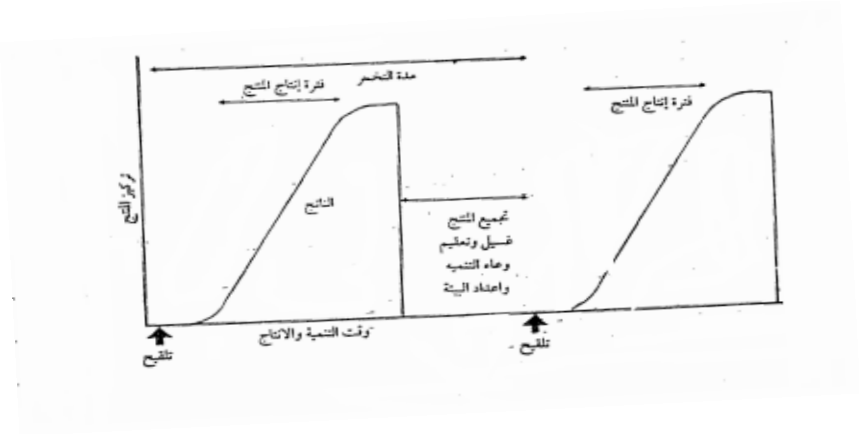
# Fermentation Process

- **طرق التنمية المتبعة في عمليات التخمر:**

يمكن استخدام عديد من التقنيات لتنمية السلالة الميكروبية على محاليل بيئات التخمر مثل التنمية على دفعات Batch culture والتنمية على دفعات متزايدة Fed batch culture والتنمية المستمرة Continuous culture.

## 1- التنمية على دفعات: Batch culture

في هذه الطريقة يتم ملئ حوض الإنتاج بكمية محدده من البيئة ثم تلقح البادئ وتتم تهيئة الظروف المناسبة للإنتاج فتخمر الخلايا وتستهلك المقديات وتحولها إلى منتج وتستمر عملية الإنتاج حتى يصل الناتج النهائي إلى أقصى حد ممكن ثم يتم تفريغ محتويات الحوض وفصل الناتج النهائي ثم يتم غسيل وتعقيم الحوض وتكرر العملية كما سبق. ويكون معدل الإنتاج مرتبط بمعدل نمو الميكروب كما يتضح من الشكل التالي:

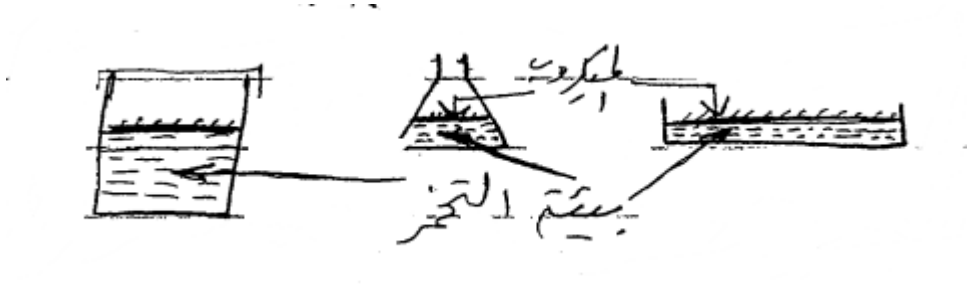



ويمكن أن تتم عملية الإنتاج المتقطع بطريقتين هما:

أ. **طريقة المزرعة السطحية: surface culture method**

وفيها ينمو الميكروب على السطح العلوي للبيئة سواء في دوارق مخروطية أو في صواني سطحية مثل إنتاج حمض الستريك أو في براميل خشبية المستخدمة في إنتاج الخل بالطريقة السطحية أو القديمة.

ويعاب على طريقة المزرعة السطحية احتياجها إلى مسطحات كبيرة وزيادة احتمالات حدوث التلوث.



ب. **طريقة المزرعة المغمورة submerage culture method**

وفيها يتم دفع الهواء إلى داخل البيئة واستخدام المقلبات لتوزيعه بانتظام وينمو الميكروب داخل البيئة موزعاً في كل أجزائها فهذه هي الطريقة المستخدمة حالياً في معظم الصناعات الميكروبية وتمتاز الطريقة بكفاءة إنتاجية عالية مع قلة فرص التلوث إلا أنها تحتاج إلى تجهيزات تكنولوجية أعلى من الطريقة السابقة.

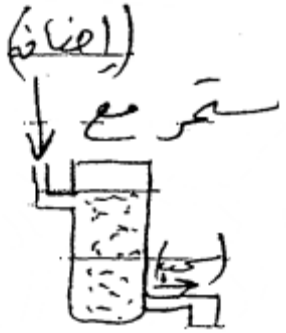
**2- التنمية على دفعات متزايدة: Fed batch culture**

تستخدم هذه الطريقة أساساً في تنمية وإنتاج خميرة الخباز Baker's yeast وتعتمد على إضافة مصدر الكربون المستخدم في البيئة بكميات صغيرة متزايدة كل ساعة بحيث يصبح عاملاً محدداً للنمو. حيث وجد أن استخدام مصدر الكربون بتركيز عالي من بداية عملية التنمية يؤدي إلى تحول خلايا خميرة الـ *saccharomyces cerevisiae* إلى إنتاج كحول الايثانول بدلا من إنتاج كتل حيوية من خلايا الخميرة. وقد أدت هذه الطريقة إلى زيادة الكتلة الخلوية من الخميرة إلى عشرة أضعاف وزنها مقارنة بطريقة التنمية على دفعات batch culture إلا أنه يعاب على هذه الطريقة زيادة تكاليف أجهزة التحكم بالإضافة إلى احتياجها إلى خبرة وكفاءة عالية من العاملين.

**3- التنمية بالطريقة المستمرة continuous culture**

وتسمى كذلك حيث يكون حوض الإنتاج في حالة عمل مستمر مع استمرار عمليات إضافة البيئة وسحب النواتج.

وتتم العملية بوضع البيئة المناسبة في حوض التخمر ويضاف البادئ ويتهيأ الظروف المناسبة وعند الوصول إلى الطور اللوغاريتمي حيث التكاثر أعلى ما يمكن والإنتاج أسرع ما يمكن يتم سحب جزء من المحتويات (البيئة+خلايا+منتج) وإضافة كمية مساوية لها من البيئة وهكذا تستمر عملية السحب والإضافة والإنتاج لفترات طويلة بدون توقف.



مميزات الطريقة المستمرة:

1- زيادة الكفاءة الإنتاجية للأجهزة المستخدمة
2- انتظام عملية السحب والإضافة بنفس الكميات عند طور نمو معين يؤدي إلى حدوث حالة اتزان steady state مما يجعل الناتج النهائي متجانس وهذا لا يتوفر في الطريقة المتقطعة.
3- الطريقة المستمرة تسمح باستخدام البرمجة الآلية في الإنتاج مما يوفر العمالة والتكاليف
4- إمكانية دراسة العوامل المؤثرة على الإنتاج بدقة عالية مع زيادة الكفاءة.

عيوب الطريقة المستمرة:

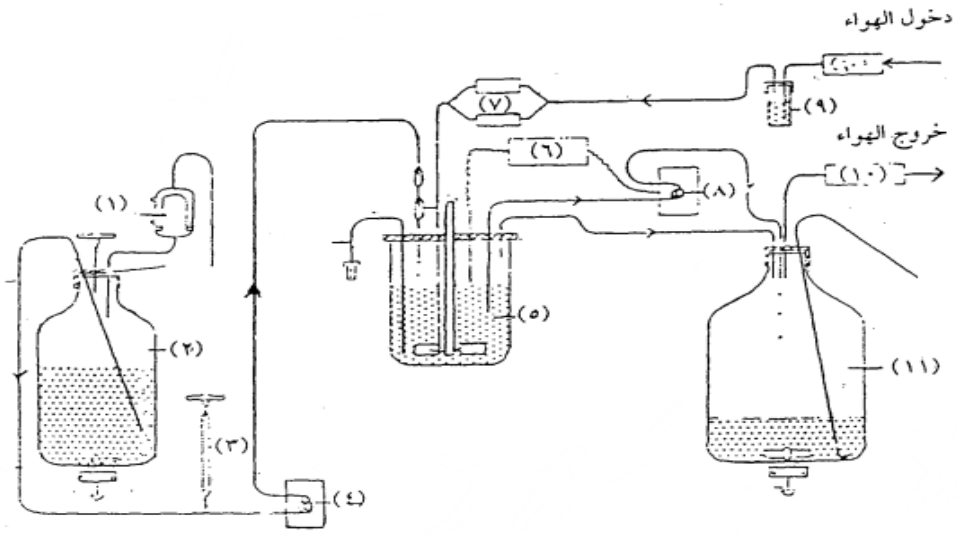
1- توجد خطورة كبيرة على الإنتاج وخسائر عالية في حالة حدوث تلوث لأن العملية تستمر فترة طويلة نسبياً وذلك يتطلب اتخاذ كافة الاحتياطات لمنع حدوث التلوث
2- الإنتاج يكون آلي ومستمر في جميع المراحل وحدوث أي عطل أو خلل في إحدى المراحل التصنيعية يؤدي إلى توقف المصنع بأكمله بينما في الطريقة المتقطعة يكون تأثير الخطأ محدود
3- يمكن أن يحدث فقد محسوس لبعض مكونات البيئة التي تسحب قبل استهلاك كل ما بها من مغذيات ويمكن التغلب على ذلك باستخدام تكنيك إعادة الدوران.
4- للحصول على الناتج المستمر بطريقة ناجحة لابد أن تكون البيئة متجانسة داخل المخمر أثناء الإنتاج وان يكون معدل نمو الميكروب ثابت وهذا ليس بالأمر الهين نظراً لاختلاف درجات الاذابة للخامات واختلاف طبيعة نمو الميكروب (يتكفل، يتغير وراثياً....الخ) وهذا يتطلب المحافظة على حالة الاتزان steady state وهناك عدة تقنيات لتحقيق ذلك منها:

أ. تقنية الثبات الكيميائي chemo stat

وفيها يمكن قياس تركيز مادة معينة تعتبر هي العامل المحدد للنمو مثل عنصر الكربون أو النتروجين أو الأكسجين ويتم تزويدها إذا نقص النمو أو إنقاصها إذا زاد النمو

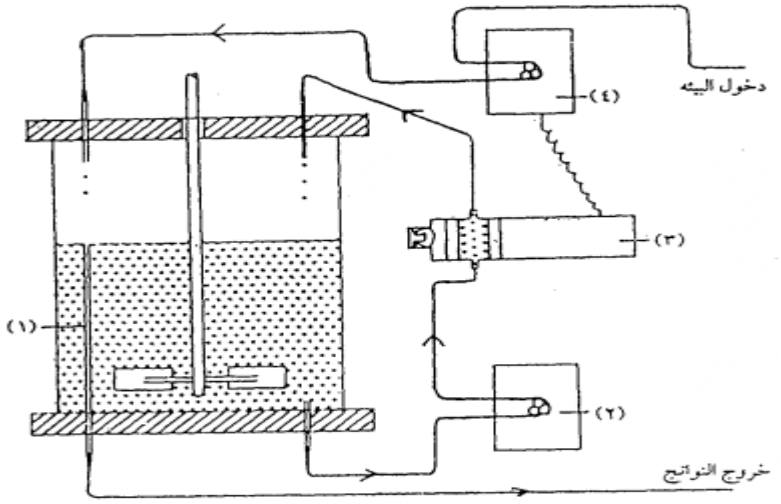
ب. تقنية ثبات درجة العكارة turbid stat :

حيث تستخدم خلية ضوئية لقياس درجة العكارة التي تختلف باختلاف درجة تركيز أو نمو الخلايا فلو زادت درجة التعكير يتم سحب نواتج وإضافة بيئة جديدة حتى يظل تركيز الخلايا ثابتاً داخل المخمر.




**رسم تخطيطي لمزرعة مستمرة بطريقة الثبات الكيميائيchemastat**

| | |
|---|---|
| 1. مرشح البيئة | 7. مرشح هواء مزدوج |
| 2. وعاء البيئة المضافة | 8. مضخة دفع المنتج |
| 3. مقياس معدل التدفق | 9. مرطب الهواء |
| 4. مضخة دفع البيئة | 10.مرشح الهواء |
| 5. وعاء التنمية | 11.وعاء استقبال النواتج |
| 6. وحدة التحكم في مستوى البيئة | |




**رسم تخطيطي لمزرعة مستمرة بطريقة ثبات درجة العكارة Turbidostat**

1- أنبوبة التحكم في مستوى البيئة
2- مضخة دفع دائرية
3- وحدة ضوئية للتحكم (خلية ضوئية)
4- مضخة دفع البيئة

## طرق الحصول على المنتج النهائي

من أهم المشاكل التي تقابل العاملين في مجال التخمرات الصناعية هي كيفية الحصول على الناتج النهائي في صورة نقية. وتتوقف خطوات تنقية هذا الناتج النهائي على عديد من العوامل، منها ظروف الإنتاج، ونوعية وتركيب المنتج وتركيزه في البيئة، ونوعية المواد المصاحبة للمنتج النهائي، ومدى ثبات هذه المواد تحت الظروف المختلفة، ونسبة ودرجة النقاوة المطلوبة في هذا المنتج، وغير ذلك من عوامل.

وعلى أية حال، يجب مراعاة كل من تركيز المنتج ودرجة نقاوته؛ حيث يجب أن تؤدى الطرق المستخدمة في الإنتاج إلى الدرجة المثلى لكل من تركيز الناتج النهائي ونقائه؛ لذا فهناك ارتباط وثيق بين كل من العملية الإنتاجية وعمليات التنقية؛ للحصول على الناتج النهائي المرغوب.

وبناء على ذلك، فإنه يلزم استعمال بيئة غذائية مناسبة للميكروب المستخدم في التخمر كما يجب اختيار سلالة ذات صفات جيدة ، لا ينتج عن إنمائها في البيئة تكوين نواتج ثانوية أخرى تؤثر على عمليات تنقية المنتج النهائي.

ويجب أن يؤخذ في الحسبان أن عمليات تنقية المنتج النهائي من النواتج الأخرى - الثانوية - من العمليات المكلفة، والتي تؤدي - في النهاية - إلى ارتفاع تكاليف إنتاج المنتج النهائي المرغوب بصورة نقية.

- وتضمن طرق الحصول على المنتج النهائي واحدة أو أكثر من الطرق الآتية :

1. الفصل الميكانيكي للخلايا من بيئة النمو.
2. تكسير الخلايا؛ للحصول على المكونات الداخلية (في حالة الاحتياج إلى ذلك)
3. الاستخلاص باستعمال المذيبات، أو البللورة، أو التبخير، أو التجفيف، أو الترشيح، أو غير ذلك من تقنيات.
4. الفصل الكروماتوجرافي - ملى جرام.

**أولاً : الفصل الميكانيكى للخلايا من بيئة النمو :**

عادة ما يتم فصل الخلايا الفطرية من البيئة الغذائية عن طريق **الترسيب settling** ؛ حيث يترك النمو الفطري - كما في حالة فطريات الخميرة- حتى يترسب في قاع وعاء التخمر بفعل الجاذبية الأرضية، دون استخدام أية مواد كيميائية مضافة إلى البيئة.

وقد تستخدم طريقة **التجميع flocculation** في فصل خلايا الفطر؛ وذلك عن طريق إضافة إحدى المواد التي تعمل على تجميع الخلايا، فيزداد معدل ترسبه ا؛ مثال ذلك إضافة الجيلاتين ، أو حمض التانيك ، أو أحد مركبات الأمونيوم الرباعية، أو أحد الأملاح الثنائية التكافؤ، أو بعض المواد المصنعة

ويعيب الطريقة السابقة أنها تحتاج إلى وقت طويل لإتمام ترسيب خلايا الفطر في قاع وعاء التخمر، كما أن المواد المضافة بغرض تجميع خلايا الفطر قد تؤثر على المنتج النهائي. وبالإضافة إلى ما سبق، فإن هذه الطريقة مكلفة.

ولتجنب العيوب السابقة، يفضل استخدام طريقة **الطرد المركزي centrifugation** لفصل الخلايا الفطرية -سواء جراثيم، أم نموات هيفية - عن بيئة النمو، وعادة ما يستخدم جهاز الطرد المركزي الحلزوني screw - decenter centrifuge فى فصل خلايا الخميرة أو ميسليوم الفطريات الهيفية عن البيئة الغذائية ؛ سواء السائلة ، أم نصف السائلة.

وفي بعض الأحيان، يلجأ القائمون على العمل إلى استخدام أجهزة **الترشيح الغشائي** ، سواء أكانت على دفعات، أم بطريقة مستمرة، وتعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق المستخدمة في فصل ميسليوم الفطريات، كما هي الحال في إنتاج المضاد - الحيوى pencillin G من الفطر Penicillium chrysogenium

**ثانياً : تكسير الخلايا للحصول على المكونات الداخلية**

هناك حالات خاصة يكون فيها المنتج النهائي المرغوب عبارة عن أحد مكونات خلايا هيفات الفطر، لذا يجب تكسير هذه الهيفات للحصول على ذلك المنتج . وتختلف الطرق المتبعة لتكسير خلايا هيفات الفطر؛ حيث يمكن إتباع **وسائل ميكانيكية** ، أو **إستعمال مواد كيميائية** ، أو قد يلجأ القائمون على العمل إلى **إستخدام طرق حيوية**.

ويلخص الشكل التالي بعض الطرق المستخدمة لتكسير خلايا هيفات الفطر :

**1- <u>الطرق الطبيعية لتكسير الخلايا :</u>**

وعادة ما يستخدم في الإنتاج الصناعي عديد من الطرق الطبيعية لتكسير خلايا الفطر، بغرض الحصول على مكونات خلاياه ؛ مثال ذلك :

- **<u>التجنيس – homogenization</u>**. ويتم ذلك عادة - بإمرار المعلق المحتوى على خلايا الفطر، أو البيئة الغذائية النامي فيها الفطر - من خلال فتحة ضيقة تحت ضغط مرتفع؛ مما يؤدى إلى تكسير الخلايا. ومن الأجهزة المستخدمة في عمليات التكسير السابقة، جهاز الطحن الفرنسي French press أو مطحنة هيوز Hughes press.
- وفي بعض الأحيان يلزم **<u>طحن خلايا الفطر</u>** في مطاحن زجاجية، وهي في صورة مبردة أو مجمدة، مع إضافة كرات من الزجاج أو حبيبات الرمل أو جزيئات من البلاستيك الصلد؛ بغرض زيادة كفاءة عملية طحن الخلايا وتكسيرها.
- كما يمكن **<u>تجفيد خلايا الفطر، ثم طحنها</u>** لتكسير خلايا الميسليوم الفطرى.
- كما يمكن استخدام **<u>الموجات فوق الصوتية ultrasonic waves</u>** في تكسير خلايا الفطر، إلا أن ذلك قد يؤثر على المنتج النهائي، الذي يكون أكثر حساسية للحرارة المتولدة من مثل هذه المعاملة - وأيضا من عمليات الطحن السابقة ؛ مما يؤثر على جودة هذا المنتج.

وفي مثل الحالات السابقة، يلجأ القائمون على العمل إلى تكسير خلايا الفطر بإتباع أساليب أخرى غيرطحن الخلايا، ومن أهم هذه الأساليب استعمال المواد الكيمائية

**2- الطرق الكيميائية لتكسير الخلايا**

فعلى سبيل المثال :

- يمكن استخدام **بعض الأحماض العضوية** لتكسير خلايا الكائنات الحية الدقيقة التي لا تتحمل الأحماض،
- وقد نستخدم **بعض المواد الناشرة** ذات الجذب السطحى detergent ؛ مثل مادة توين Tween، ومركب sodium lauryl sulfate، بالإضافة إلى مركبات الأمونيوم الرباعية وغيرها، والتي تعمل على تغيير طبيعة الليبوبروتين بالغشاء السيتوبلازمي ما يعمل على خروج مكونات الخلية.
- وقد تستخدم **بعض المذيبات العضوية** ؛ مثل الايزوبروبانول والأسيتون وخلات الإيثيل والتي تعمل على إذابة الدهون الموجودة في الغشاء السيتوبلازم للخلية الفطرية.
- وفي حالات أخرى، يوضع المعلق المحتوى على خلايا الفطر في **محلول عالى الأسموزية** ؛ مما يسبب حدوث بلزمة للخلايا وتقطع الأغشية السيتوبلازمية.

**3- الطرق الحيوية لتكسير الخلايا :**

وبالإضافة إلى الطرق السابقة، قد يلجأ العاملون إلى الطرق الحيوية (البيولوجية) وذلك بغرض تكسير خلايا الفطر؛ للحصول على المكونات الداخلية :

- وتعتمد هذه الطرق البيولوجية على **تحلل خلايا الفطر تحللاً ذاتيا بفعل الإنزيمات الداخلية** مثال ذلك إنتاج مستخلص الخميرة ومشتقاتها.
- وفي حالات أخرى يمكن **إضافة انزيمات من مصدر خارجي** تعمل على تحليل جدار الخلية، أو تثبط تكوين الجدار الخلوى ، إلا أن مثل هذه الطرق باهظة التكاليف.

**ثالثاً : إستخلاص نواتج التخمر:**

**أولاً : ترسيب الأحماض النووية**

بعد تكسير الخلايا ، يتم **ترسيب الأحماض النووية** باستخدام مادة كبريتات البروتامين protamine sulphate أو المضاد الحيوي ستربتومايسين . وبعد الانتهاء من هذه المرحلة يتم الحصول على المكونات الذائبة في خلايا الفطر.

**ثانياً : طرق فصل نواتج التخمر :**

وتتشابه طرق الحصول على المكونات الذائبة من الخلايا الفطرية مع تلك الذائبة في البيئة الغذائية التي ينمو فيها الفطر. وتعتمد طرق الفصل على حجم الجزيء المراد فصله أو على ترسيبه أو إدمصاصه ، أو على المبادلات الأيونية ion exchange ، أو على طريقة الاستخلاص.

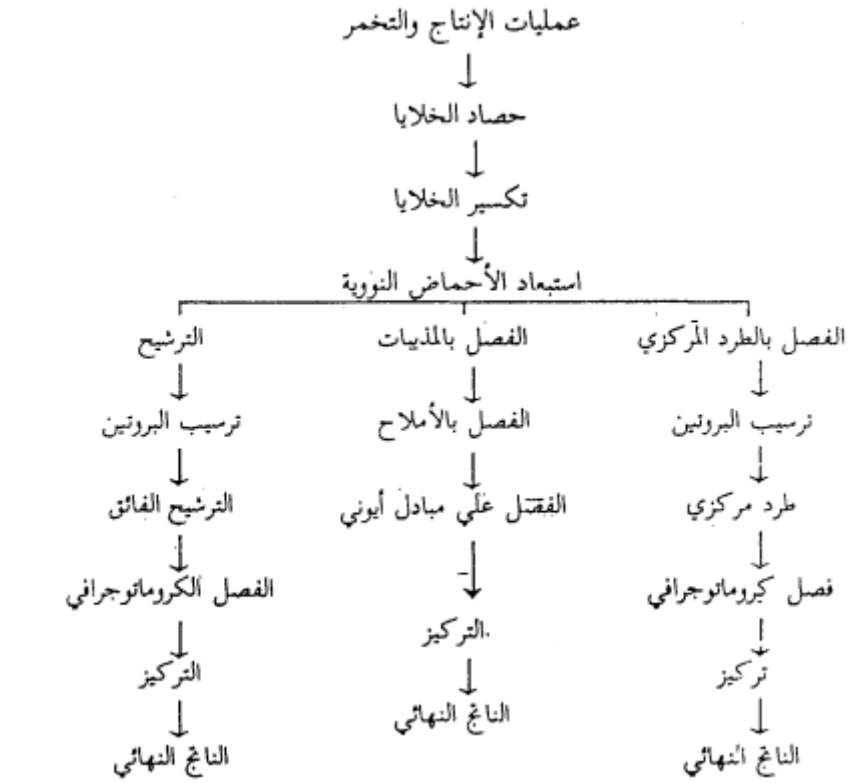
**أ- طرق فصل المواد الذائبة على أساس حجم الجزئيات :**

- ومن الطرق المتبعة في فصل المواد الذائبة على أساس حجم الجزئيات ، طريقة **التركيز باستخدام الأسموزية العكسية reverse osmosis**. وفي هذه الطريقة يتم تمرير محلول البيئة الغذائية المحتوية على المادة الذائبة المراد فصلها خلال مرشح تحت ضغط يعمل على حجز جميع الجزيئات، ماعدا الماء وبعض الأملاح الذائبة ذات الوزن الجزيئي الصغير.
- وفي حالات أخرى، يمكن استخدام **الترشيح الفائق ultrafiltration** ؛ حيث يمرر محلول البيئة الغذائية من خلال مرشح تحت ضغط ، يحجز الجزئيات ذات الوزن الجزيئي الكبير، بينما تمر الجزئيات ذات الوزن الجزيئي الصغير.
- وقد نستخدم طريقة **الترشيح خلال أعمدة الجيل gel filteration** ؛ حيث تنفصل مكونات المحلول تبعا لوزنها الجزيئي خلال عمود الجيل ؛ ومن ثم تحدث تنقية جزئية لمكونات المحلول الغذائي، بحيث تفصل كل مجموعة ذات وزن جزيئي مشابه عن المجموعات الأخرى.

**ب- فصل المواد الذائبة عن طريق الترسيب**

ويمكن استخدام طريقة الترسيب precipitation لفصل مكونات بيئة نمو الفطر؛ وذلك

- **باستخدام الأملاح** : مثل كبريتات الأمونيوم،
- أو **باستخدام المذيبات العضوية**.
- وفي حالات أخرى يمكن اللجوء إلى **تغيير رقم حموضة البيئة** ؛ للوصول إلى نقطة التعادل الكهربي،
- أو قد تستخدم **مواد مجمعة flocculating agents** نعمل على زيادة معامل الترسيب.




**شكل (31): بعض طرق فصل وتنقية الإنزيمات والمواد البروتينية المتكونة داخل خلايا الفطر**

ت- **فصل المواد الذائبة عن طريق الاستخلاص بالمذيبات**

وقد تستخدم طريقة الاستخلاص بالمذيبات؛ اعتمادا على مدى ذوبان المنتج في مذيب ما دون مذيب آخر.

ث- **طرق أخرى لفصل المواد الذائبة**

قد تستخدم مواد تمتاز بقدرتها على الادمصاص-adsorption أو الامتصاص absorption، أو تستعمل مبادلات أيونية في حالات الفصل الدقيق المكونات البيئة الغذائية، أو طريقة الفصل بالهجرة الكهربية electrophoresis، وغير ذلك من طرق الفصل.

ويوضح شكل (٣١) بعض طرق فصل وتنقية الإنزيمات والمواد البروتينية المتكونة داخل خلايا الفطر، بينما يوضح شكل (٣٢) بعض طرق نقل نواتج التمثيل الغذائي الخارجية، وشكل (٣٣) أمثلة لبعض طرق فصل نواتج التمثيل الغذائي الفطرية غير المتطايرة.

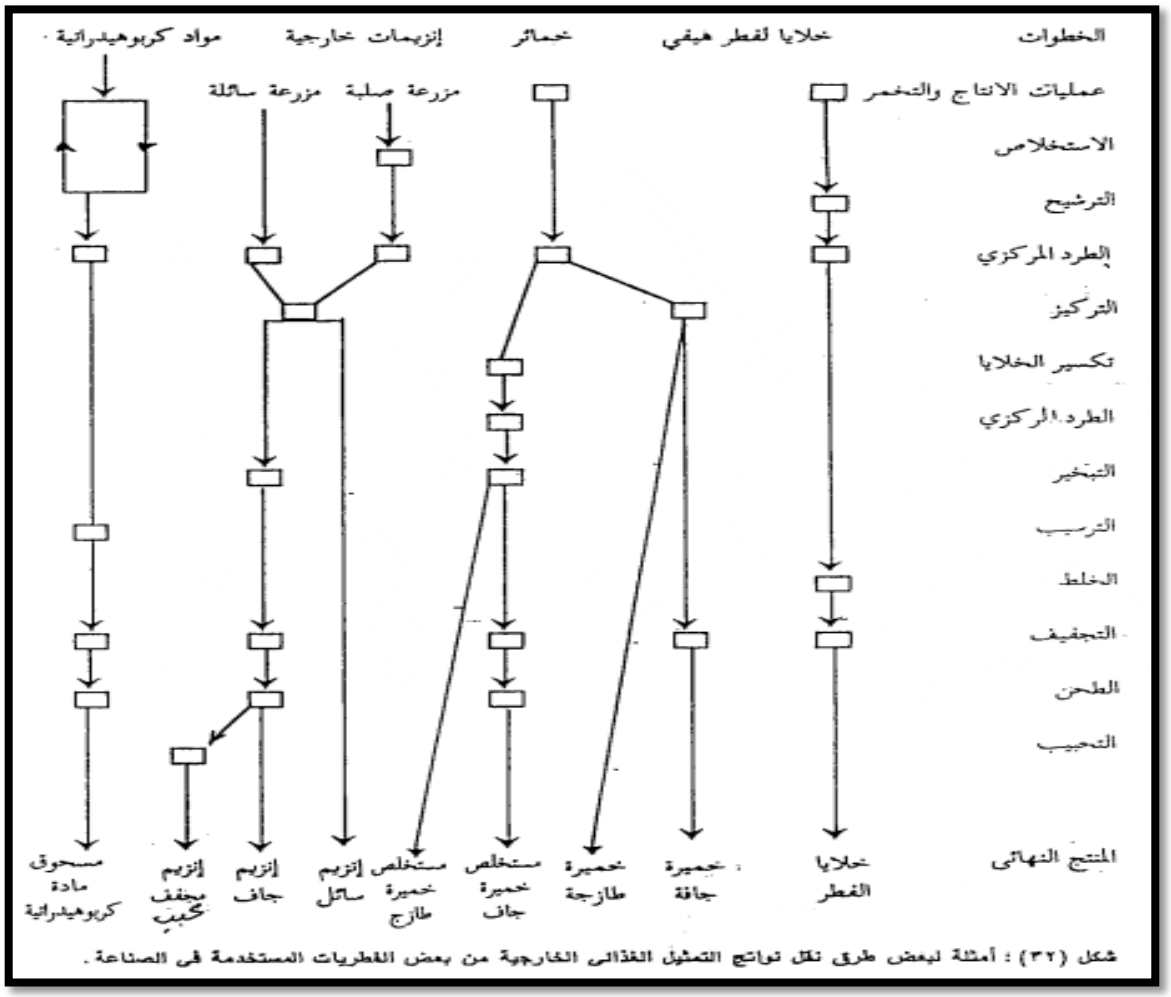
ويلاحظ من الأشكال السابقة اختلاف مراحل استخلاص وتنقية المركبات المختلفة الناتجة عن التمثيل الغذائي للفطر المستخدم في التخمر؛

- ففي المواد التي تتكون داخل خلايا الفطر - مثل الإنزيمات الداخلية والمواد البروتينية الخلوية - يلزم للحصول عليها تكسير الخلايا.

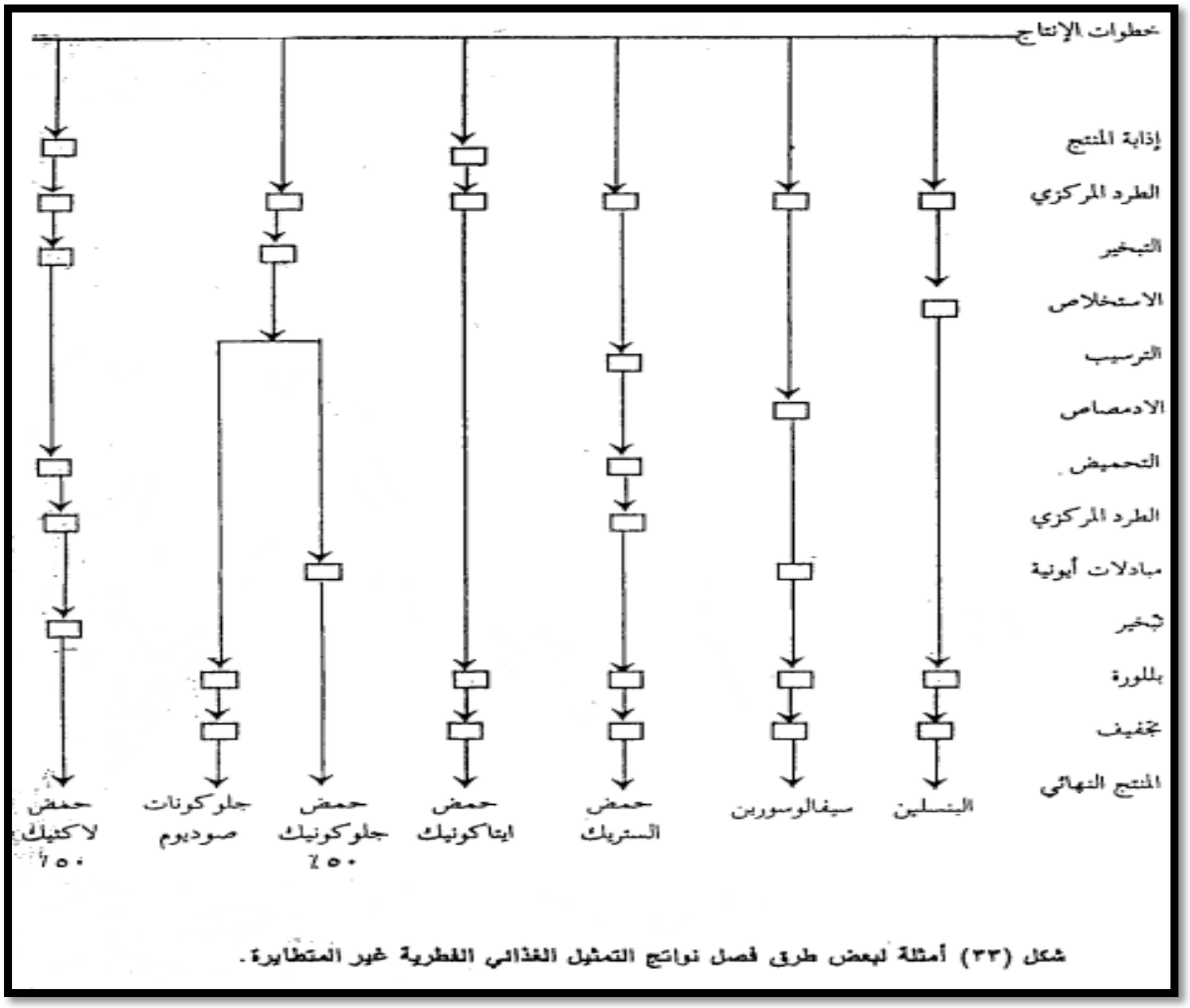
وتحتاج عملية استخلاص الأحماض النووية إلى ترسيب البروتين، أو اللجوء إلى الترشيح بأنواعه المختلفة، ثم الفصل الكروماتوجرافي بعد ذلك. وفي حالات أخرى يمكن استخدام المذيبات، ثم يتبعه الفصل الكروماتوجرافي.

- وفي حالة المواد الناتجة عن التمثيل الغذائي للفطر -والتي يفرزها خارج خلاياه في بيئة النمو مثل الإنزيمات الخارجية، والسكريات العديدة- فإن هذه المواد تحتاج - أيضا- إلى إستخلاص مائي، يتبعه الطرد المركزي؛ نظرا لارتفاع لزوجة البيئة الغذائية المحتوية على مثل هذه المواد.

وقد يلجا العاملون في هذا المجال إلى ترشيح البيئة الغذائية تخت تفريغ؛ كما هي الحال في الفطريات الهيفية، أو إلى الترسيب كما في حالة فطريات الخمائر، وبعد ذلك يمكن تجفيف الخلايا الفطرية، كما هي الحال في إنتاج الخميرة الجافة dry yeast، أو يتم تركيز الخلايا ؛ كما هي الحال في إنتاج الخميرة الطازجة (خميرة الخباز).



شكل (٣٢) : أمثلة لبعض طرق نقل نواتج التمثيل الغذائى الخارجية من بعض الفطريات المستخدمة فى الصناعة .




شكل (٣٣) أمثلة لبعض طرق فصل نواتج التمثيل الغذائي الفطرية غير المتطايرة.

1. وفي حالة الإنزيمات الخارجية، فإن المحلول الرائق الناتج بعد إجراء عملية الطرد المركز والذي يخلو من خلايا الفطر- يمكن استخدامه كمصدر رئيسي للإنزيم بطريقة مباشرة. وقد يرسب هذا الإنزيم باستخدام الأملاح، ثم يجفف، ويحبب granulation ، وفي حالات أخرى، يمكن تحميل هذا الإنزيم على مواد حاملة أو يستخدم على صورته السائلة.
2. وبالنسبة إلى نواتج التمثيل الغذائي للفطر ذات الطبيعة غير المتطايرة، فإنه يتم الحصول عليها من نواتج الطرد المركزي للبيئة الغذائية النامي عليها الفطر، بعد تمام نموه والتخلص من خلاياه. ولكن هناك حالات أخرى يكون فيها الناتج المرغوب في صورة مترسبة في قاع وعاء التخمر؛ كما هي الحال في حمض الإيتاكونيك . Itaconic acid ، ومادة لاكتات الكالسيوم calcium lactate ؛ لذا تجب إذابة هذه المواد قبل إجراء عملية الطرد المركزي لبيئة نمو الفطر.

3. وتختلف عمليات التنقية تبعا لنوع المركب المراد فصله والحصول عليه بصورة نقية ، ويوضح شكل (٣٣) بعض الأمثلة لطرق فصل المنتجات الفطرية غير المتطايرة؛ مثل المضادات الحيوية كالبنسلين، والسيفالوسبورين - وبعض الأحماض العضوية مثل حمض الستريك" والإيتاكونيك- وغير ذلك من نواتج التمثيل الغذائي للفطريات. وعلى أية حال، يجب حساب نسبة الفاقد خلال عمليات التنقية، والتي تختلف تبعا لحساسية المركب الناتج. ويوضح جدول (٨) بعض الأمثلة لنسبة الفاقد في بعض عمليات التخمرات الصناعية التي تجرى باستعمال الفطريات.

ويجب أن يؤخذ في الحسبان عند تقييم الإنتاج التجاري لإحدى المواد الهامة اقتصاديا والناتجة من التمثيل الغذائي للفطريات من خلال التخمر الصناعي - تكاليف المواد الكيمائية المستخدمة في مراحل التنقية، والأجهزة المستخدمة لهذا الغرض؛ حيث إن ذلك كله - بجانب نسبة الفاقد من هذه المادة خلال عمليات الاستخلاص والتنقية- سوف يحدد سعر المنتج النهائي.

**جدول (8): النسبة المئوية للفاقد من المنتج النهائي لبعض عمليات التخمرات الفطرية الصناعية خلال عمليات التنقية**

| الناتج النهائي | نسبة الفاقد (%) |
|---|---|
| الكتلة الحيوية | 5 |
| المضادات الحيوية | 50-20 |
| الإنزيمات الداخلية | 90 |
| الإنزيمات الخارجية | 10 |