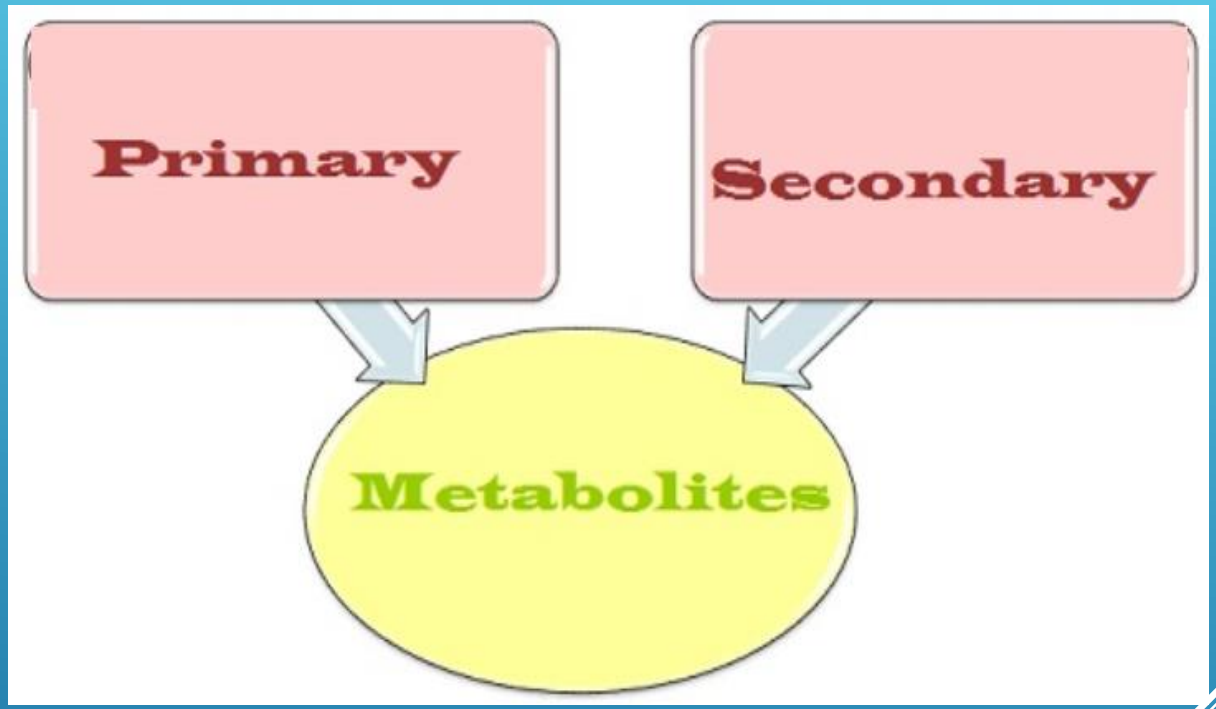
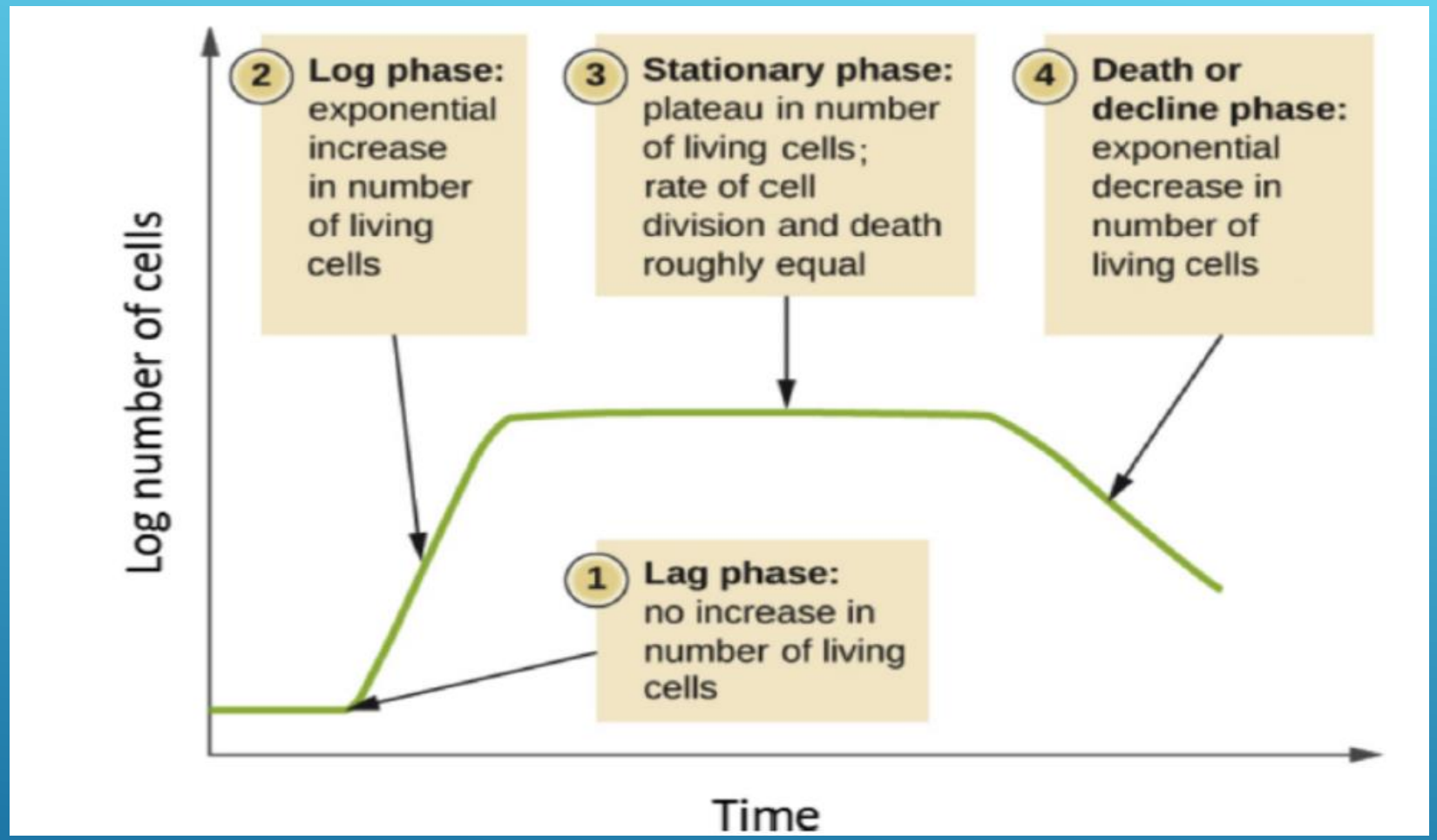
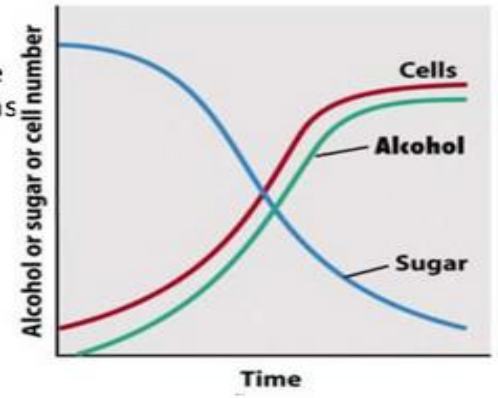

Primary
Secondary
Metabolites


2 Log phase: exponential increase in number of living cells
3 Stationary phase: plateau in number of living cells; rate of cell division and death roughly equal
4 Death or decline phase: exponential decrease in number of living cells
1 Lag phase: no increase in number of living cells
Log number of cells
Time

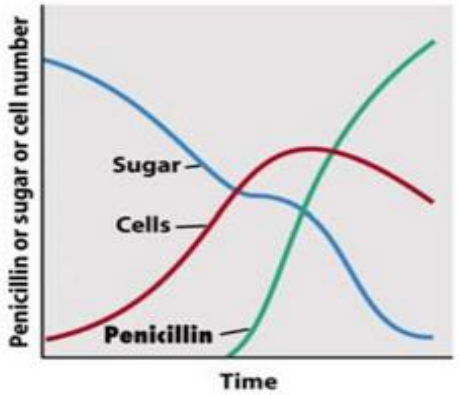
Primary Metabolites

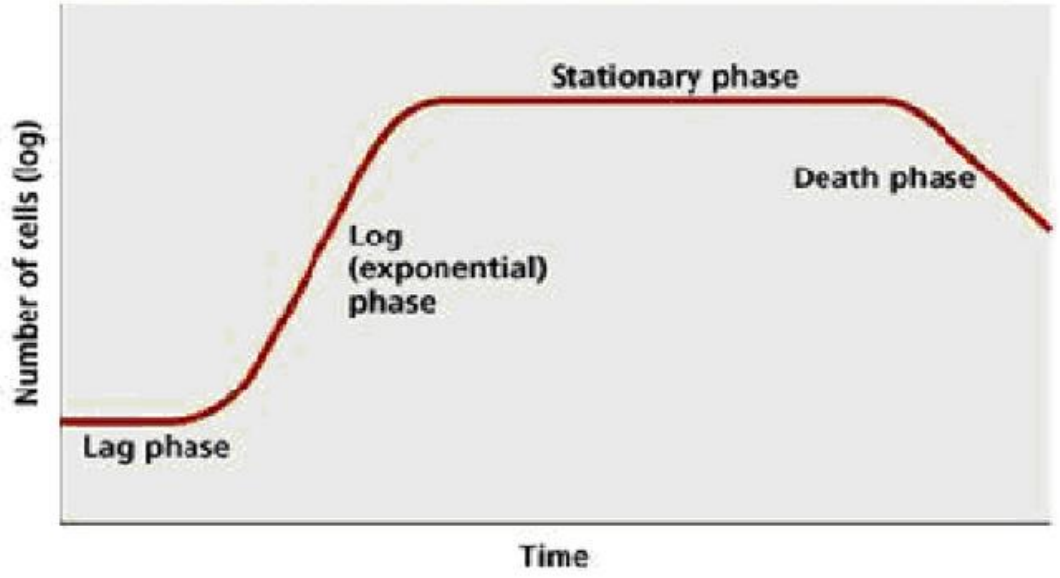
- **Primary metabolites** are produced during active cell growth [*lag, exponential, stationary*], matches the growth in population of the organisms
- Produced by all microorganisms



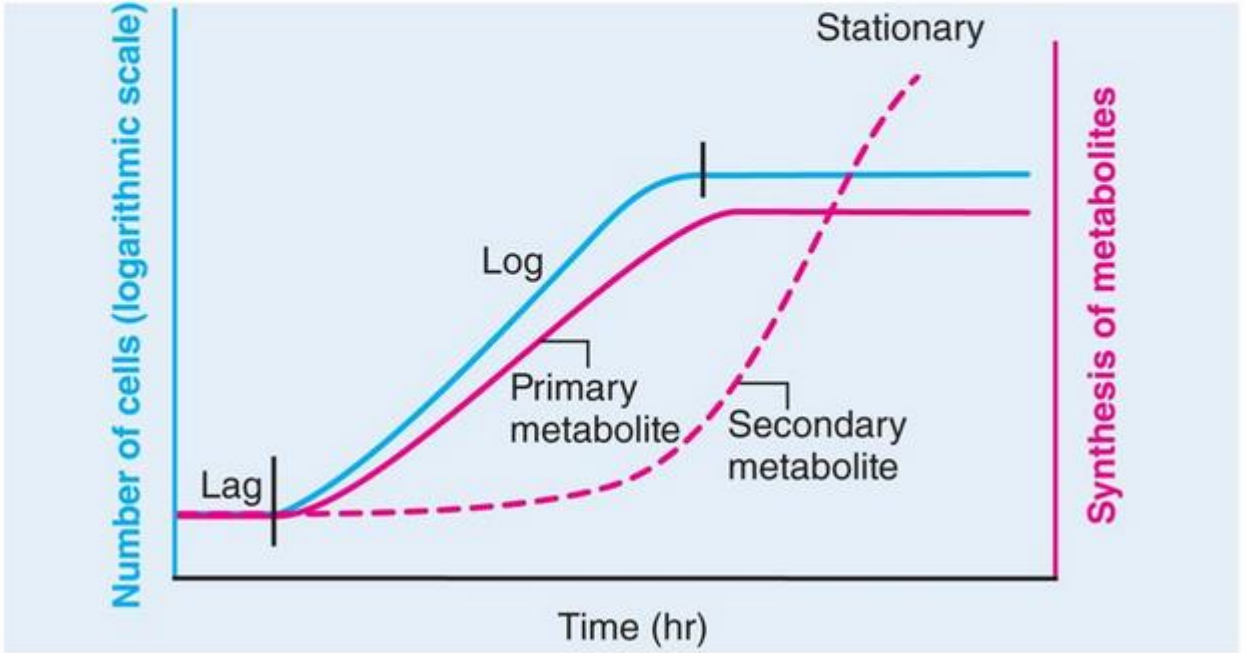
Secondary Metabolites

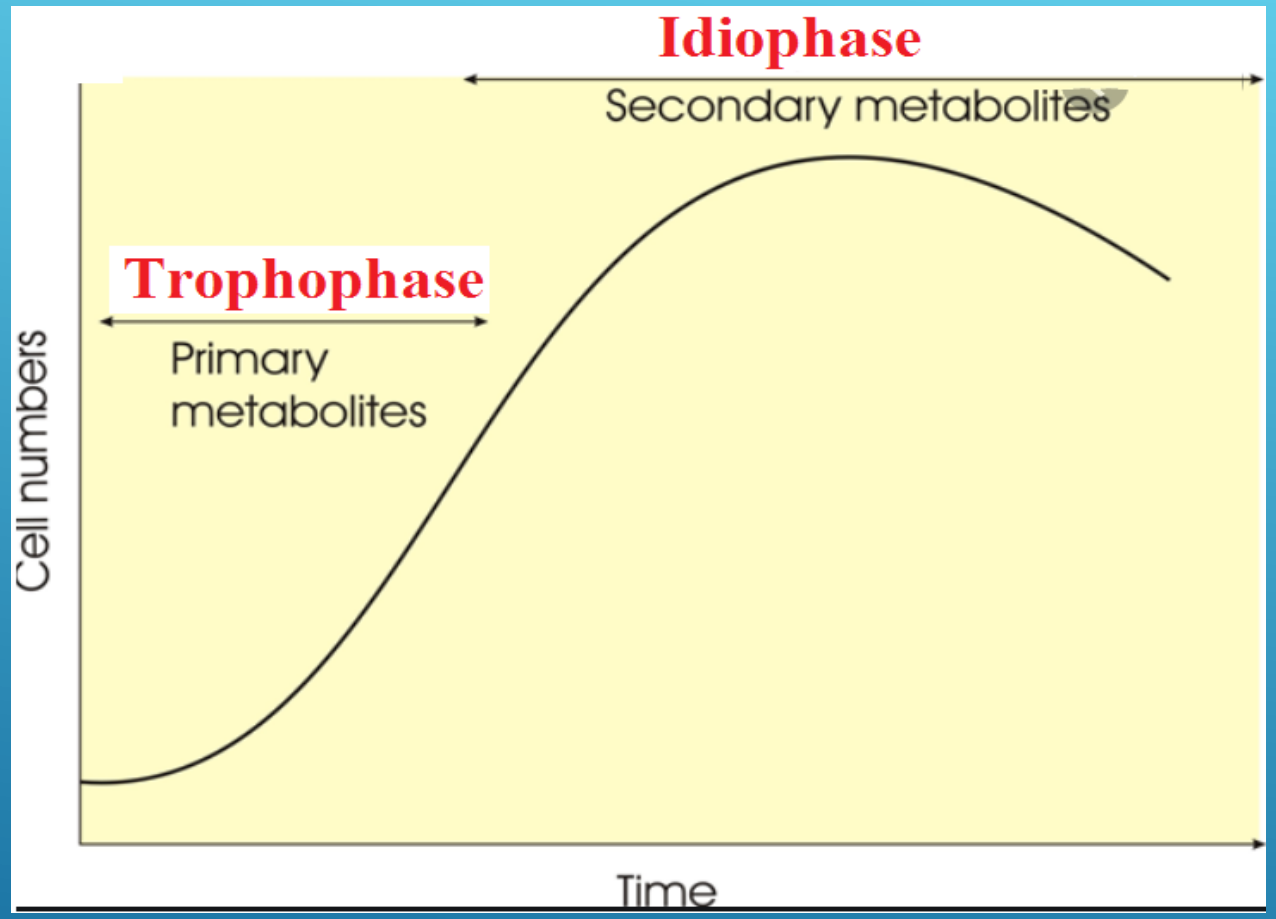
- **Secondary metabolites** are produced near the onset of stationary phase e.g antibiotic chemicals
- Not produced by all microorganisms





Primary and Secondary metabolites




Idiophase
Secondary metabolites
Trophophase
Primary
metabolites
Cell numbers
Time

Some Primary Products of Microbial Metabolism and Their Commercial Significance

Primary Metabolite	Commercial Significance
Ethanol	"Active ingredient" in alcoholic beverages
	Used as a motor-car fuel when blended with petroleum
Organic acids	Various uses in the food industry
Glutamic acid	Flavor enhancer
Lysine	Feed supplement
Nucleotides	Flavor enhancers
Phenylalanine	Precursor of aspartame, sweetener
Polysaccharides	Applications in the food industry
	Enhanced oil recovery
Vitamins	Feed supplements

World Production of Organic Acids

Organic Acid	Annual Production (tonnes)	Annual Production by Microbial Processes (tonnes)
Acetic acid	7,000,000	190,000
Citric acid	1,600,000	1,600,000
Lactic acid	150,000	150,000
Gluconic acid	100,000	100,000
Itaconic	15,000	15,000

Some Secondary Products of Microbial Metabolism and Their Commercial Significance

Secondary Metabolite	Commercial Significance
Penicillin, cephalosporin, streptomycin	Antibiotics
Bleomycin, mitomycin	Anticancer agents
Lovastatin	Cholesterol-lowering agent
Cyclosporine A	Immunosuppressant
Avermectins	Antiparasitic agents

- **تروفوفاز** (Trophophase) : یعنی مرحله رشد و در بر گیرنده تمام واکنش ها و تغییراتی است که در فاز لگاریتمی از ابتدا تا انتهای آن رخ می دهد.
- **ایدیوفاز** (Idiophase) : یعنی مرحله تولید و در بر گیرنده تمام واکنش ها و تغییراتی است که از ابتدای فاز سکون منحنی رشد تا انتهای این فاز رخ می دهد و حتی ممکن است تا مرحله مرگ میکروب ها نیز ادامه داشته باشد.

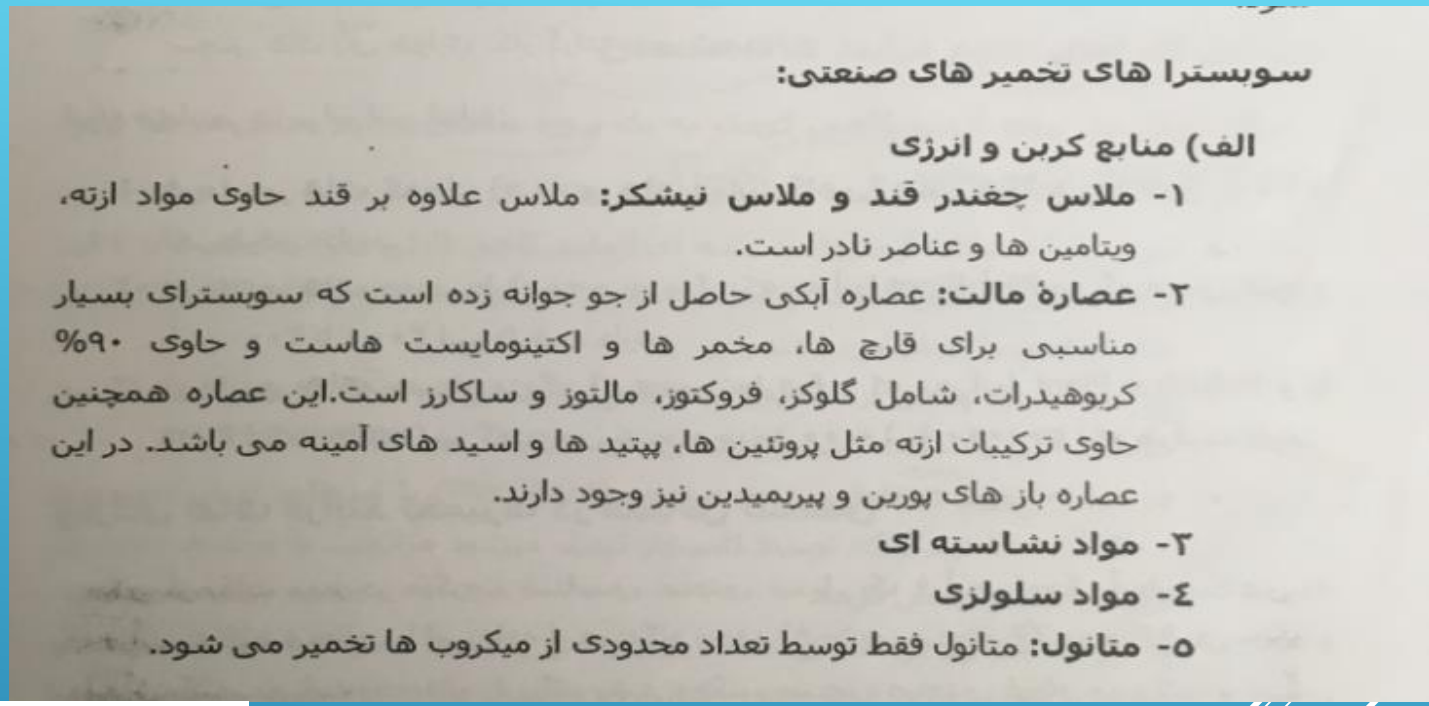
بنابراین متابولیت های اولیه همراه با رشد لگاریتمی و در مرحله اول رشد (تروفوفاز) تولید می شوند در حالی که متابولیت های ثانویه در فاز سکون و در مرحله دوم رشد (ایدیوفاز) تولید می شوند.

متابولیت های اولیه و ثانویه هر دو از نظر میکروب شناسی صنعتی حائز اهمیت هستند اما متابولیت های ثانویه از تنوع بیشتری برخوردارند و دارای ویژگی های متفاوتی نسبت به متابولیت های اولیه می باشند که در زیر به آنها اشاره می شود.

ویژگی های متابولیت های ثانویه:

- متابولیت های ثانویه محصول متابولیسم ثانویه می باشند.
- در فاز لگاریتمی (تروفوفاز) تولید نمی شوند.
- در فاز سکون رشد تولید می شوند.
- توسط تعداد محدودی از میکروب ها تولید می شوند.
- دارای ارزش اقتصادی می باشند.
- بر رشد و تکثیر میکروب ها اثر چندانی ندارند.
- تولید آنها شدیداً به شرایط محیط کشت بستگی دارد.
- از نظر ساختمان شیمیایی شباهت زیادی به یکدیگر دارند.
- تولید آنها حتی پس از توقف رشد نیز می تواند ادامه داشته باشد.
- اکثر متابولیت های ثانویه ملکول های آلی پیچیده ای هستند که برای بیوسنتز آنها توسط سلول واکنش های آنزیمی بسیار زیادی انجام می گیرد.برای مثال برای بیوسنتز تتراسایکلین، ۷۲ واکنش آنزیمی و برای اریترومایسین، ۲۵ واکنش انجام می گیرد.
- متابولیت هایی مثل اتانول، اسید لاکتیک، اسید پیرویک و ... متابولیت های اولیه می باشند چون که در مرحله اول رشد (تروفوفاز) تولید می شوند، در حالی که آنتی بیوتیک ها متابولیت ثانویه می باشند و در مرحله دوم رشد (ایدیوفاز) تولید می شوند.

Economical fermentation media



سوبسترا های تخمیر های صنعتی:

الف) منابع کربن و انرژی

۱- **ملاس چغندر قند و ملاس نیشکر:** ملاس علاوه بر قند حاوی مواد ازته، ویتامین ها و عناصر نادر است.

۲- **عصارهٔ مالت:** عصاره آبکی حاصل از جو جوانه زده است که سوبسترای بسیار مناسبی برای قارچ ها، مخمر ها و اکتینومایست هاست و حاوی ۹۰% کربوهیدرات، شامل گلوکز، فروکتوز، مالتوز و ساکارز است.این عصاره همچنین حاوی ترکیبات ازته مثل پروتئین ها، پپتید ها و اسید های آمینه می باشد. در این عصاره باز های پورین و پیریمیدین نیز وجود دارند.

۳- **مواد نشاسته ای**

٤- **مواد سلولزی**

٥- **متانول:** متانول فقط توسط تعداد محدودی از میکروب ها تخمیر می شود.

sugarcane molasses

sugarbeet molasses

Sorghum

Cheese whey

Agro-industrial wastes (sugarcane bagasse, wheat bran, rice bran, corn cob and wheat straw are cheapest and abundantly available natural carbon sources)

lignocellulose biomass

corn steep liquor

Yeast extract

Peptone

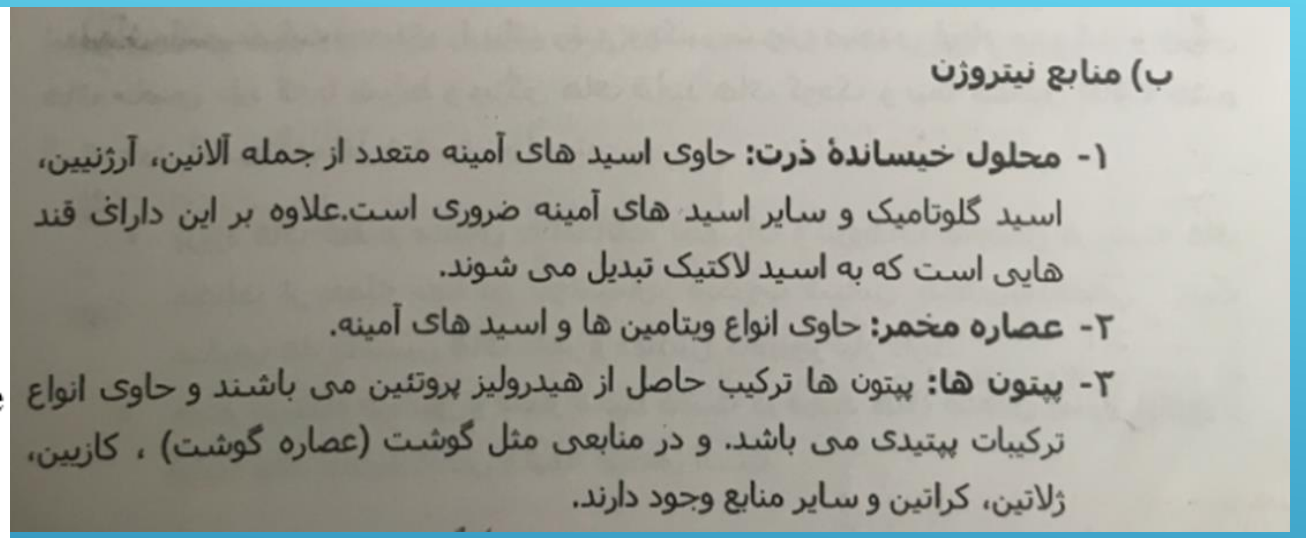
Tryptone

Casein Hydrolysate

urea

NH3

nitrate (NO_3)



ب) منابع نیتروژن

۱- **محلول خیساندهٔ ذرت:** حاوی اسید های آمینه متعدد از جمله آلانین، آرژنیین، اسید گلوتامیک و سایر اسید های آمینه ضروری است.علاوه بر این دارای قند هایی است که به اسید لاکتیک تبدیل می شوند.

۲- **عصاره مخمر:** حاوی انواع ویتامین ها و اسید های آمینه.

۳- **پپتون ها:** پپتون ها ترکیب حاصل از هیدرولیز پروتئین می باشند و حاوی انواع ترکیبات پپتیدی می باشد. و در منابعی مثل گوشت (عصاره گوشت) ، کازیین، ژلاتین، کراتین و سایر منابع وجود دارند.

دستگاه ها و تجهیزات میکروب شناسی

مهمترین وسیله ای که در میکروب شناسی صنعتی مورد استفاده قرار می گیرد **فرمانتور** است. فرمانتور (تخمیر کننده) به دستگاهی گفته می شود که شرایط فیزیکی لازم را برای رشد و تکثیر سوش صنعتی فراهم نماید به طوری که سوبسترا ها توسط سوش های صنعتی تخمیر و یا تجزیه گردد و منابولیت مورد نظر تولید و استخراج گردد.

انواع فرمانتور بر اساس اهداف پروژه های صنعتی و ویژگی های سوش صنعتی:

۱- **فرمانتور های هوازی:** اکثر فرمانتور ها هوازی می باشند و برای سوش های هوازی بکار گرفته می شوند.

۲- **فرمانتور های بی هوازی:** این فرمانتور ها کمتر مورد استفاده قرار می گیرند و برای سوش های بی هوازی بکار گرفته می شوند.

انواع فرمانتور ها بر اساس اندازه:

۱- **فرمانتور های کوچک** (فرمانتور های آزمایشگاهی) : این فرمانتور ها حدود ۵ تا ۱۰ لیتر ظرفیت دارند.

۲- **فرمانتور های متوسط** (نیمه صنعتی) : که به آنها Pilot Plant نیز گفته می شود و حدود ۳۰۰ تا ۲۰۰۰ لیتر ظرفیت دارند.

۳- **فرمانتور های بسیار بزرگ** (صنعتی_تجاری) : که به آنها Industral Plant و یا Commericial Plant نیز گفته می شود و حدود ۱۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ لیتر ظرفیت دارند.

laboratory-scale (bench scale)



pilot plant

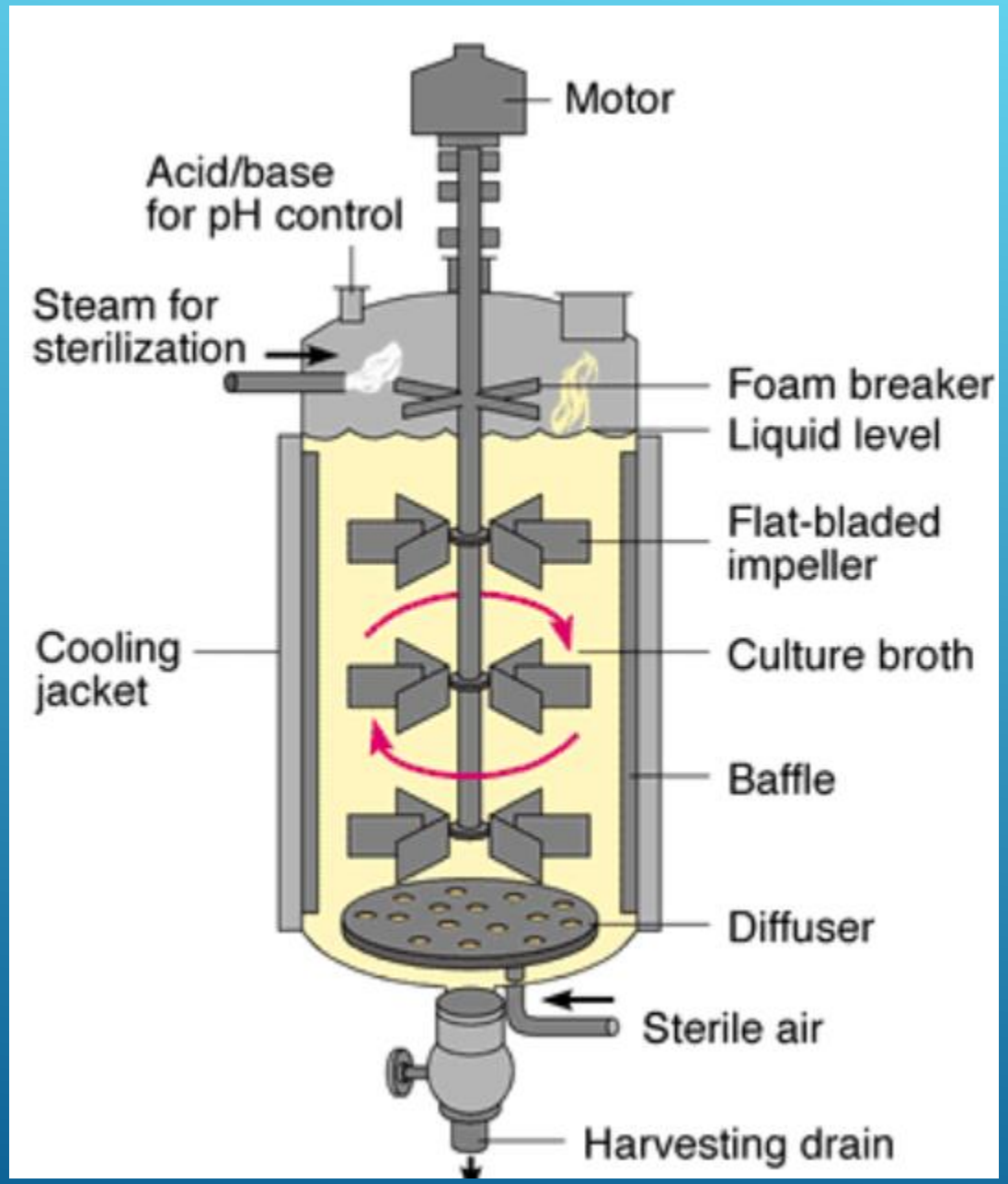


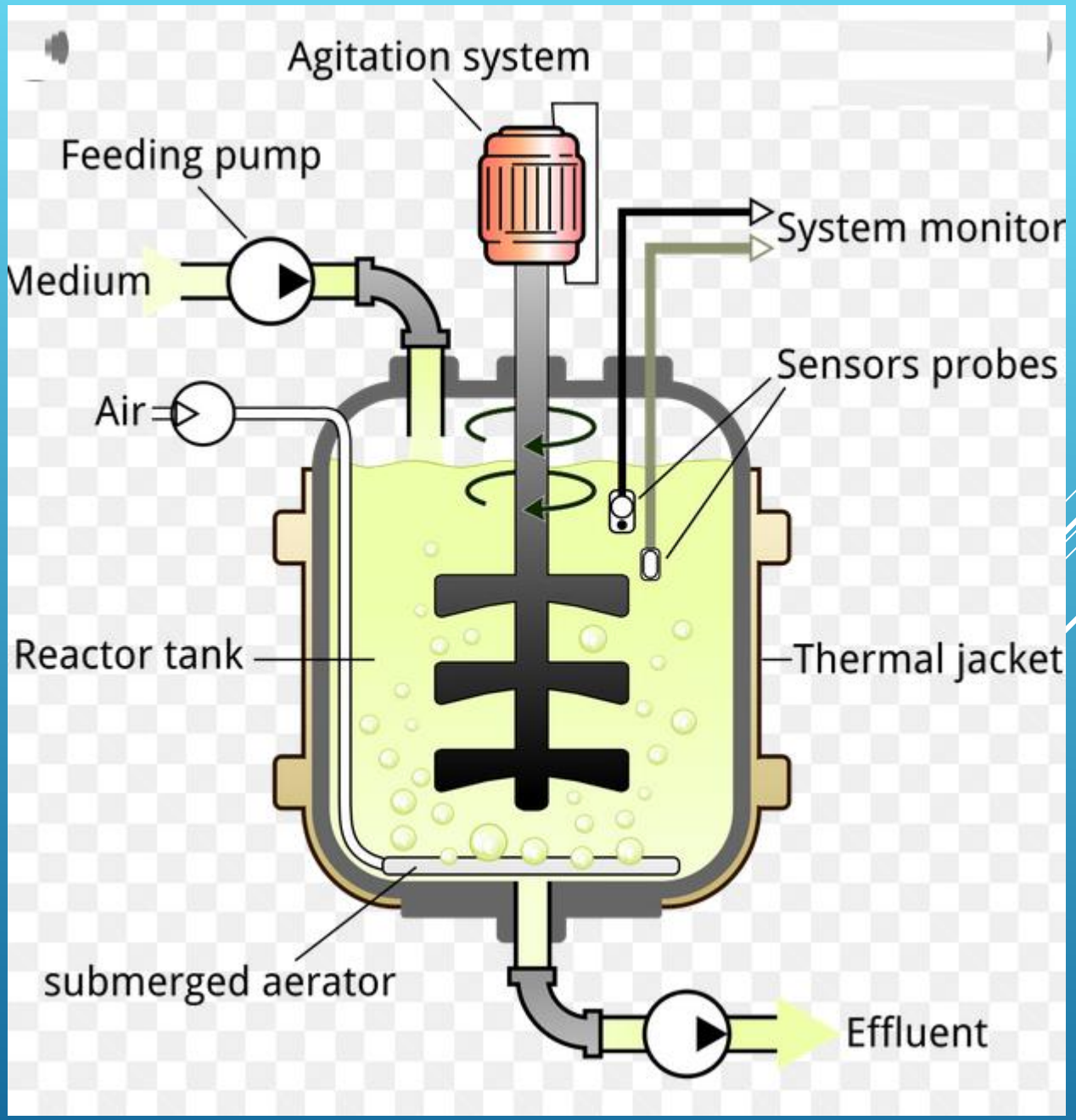
Industrial scale=large pilot plant (large-scale commercial plants)

مراحل افزایش حجم فرآیند های صنعتی

برای تبدیل یک پروژه آزمایشگاهی کوچک به یک پروژه صنعتی عظیم چندین مرحله وجود دارد که به شرح زیر می باشد.

- در ابتدا با استفاده از ظروف شیشه ای آزمایشگاهی (ارلن مایر) با حجم ۱ تا ۲ لیتر و به منظور مطمئن شدن از عملکرد صحیح سوش صنعتی و تولید متابولیت مورد نظر آزمایش را انجام می دهند.
- در مرحله بعد همین آزمایش را با فرمانتور های کوچک ۵ تا ۱۰ لیتری انجام می دهند و نتایج به دست آمده را بررسی می کنند.
- در مرحله سوم در مقیاس نیمه صنعتی (Pilot Plant) با استفاده از فرمانتور های ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ لیتری که توسط کامپیوتر کنترل میشود متابولیت یا محصول مورد نظر تولید و استخراج می گردد.
- در مرحله چهارم در مقیاس صنعتی_تجاری و با استفاده از فرمانتور های صنعتی عظیم با حجم ۱۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ لیتری محصول مورد نظر تولید و استخراج می گردد.


Motor
Acid/base
for pH control
Steam for
sterilization
Foam breaker
Liquid level
Flat-bladed
impeller
Cooling
jacket
Culture broth
Baffle
Diffuser
Sterile air
Harvesting drain


Agitation system
Feeding pump
System monitor
Medium
Sensors probes
Air
Reactor tank
Thermal jacket
submerged aerator
Effluent

انواع فرآیندهای تخمیری صنعتی

۱-فرآیند تولید توده زیستی میکروبی (SCP)

۲-فرآیند تولید آنزیم های میکروبی (Microbial Enzymes)

۳-فرآیند های تولید متابولیت های میکروبی (Microbial metabolites)

۴-فرآیندهای تولید محصولات نوترکیب (Recombinant product)

۵-فرآیند تولید محصولات دگرگون سازی شده (Bioconverted products)

The Stages in the Chronological Development of the Fermentation Industry

Stage	Main Products	Vessels	Process Control	Culture Method	Quality Control	Pilot Plant Facilities	Strain Selection
1 Pre-1900	Alcohol	Wooden, up to 1500 barrels capacity Copper used in later breweries	Use of thermometer, hydrometer and heat exchangers	Batch	Virtually nil	Nil	Pure yeast cultures used at the Carlsberg brewery (1886)
	Vinegar	Barrels, shallow trays, trickle filters		Batch	Virtually nil	Nil	Fermentations inoculated with 'good' vinegar
2 1900–1940	Bakers' yeast glycerol, citric acid, lactic acid and acetone/butanol	Steel vessels of up to 200 m^3 for acetone/butanol Air spargers used for bakers' yeast Mechanical stirring used in small vessels	pH electrodes with off-line control Temperature control	Batch and fed-batch systems	Virtually nil	Virtually nil	Pure cultures used
3 1940–date	Penicillin, streptomycin, other antibiotics, gibberellin, amino acids, nucleotides, transformations, enzymes	Mechanically aerated vessels, operated aseptically—true fermenters	Sterilizable pH and oxygen electrodes. Use of control loops which were later computerized	Batch and fed-batch common Continuous culture introduced for brewing and some primary metabolites	Very important	Becomes common	Mutation and selection programmes essential

4 1964–date	Single-cell protein using hydrocarbon and other feedstocks	Pressure cycle and pressure jet vessels developed to overcome gas and heat exchange problems	Use of computer linked control loops	Continuous culture with medium recycle	Very important	Very important	Genetic engineering of producer strains attempted
5 1982–date	Production of heterologous proteins by microbial and animal cells Monoclonal antibodies produced by animal cells	Fermenters developed in stages 3 and 4. Animal cell reactors developed	Control and sensors developed in stages 3 and 4	Batch, fed-batch or continuous Continuous perfusion developed for animal cell processes	Very important	Very important	Introduction of foreign genes into microbial and animal cell hosts. In vitro recombinant DNA techniques used in the improvement of stage 3 products
6 2000–date	Use of "synthetic biology" to improve established fermentations and develop new bulk chemical processes	Fermenters developed in stages 3 and 4	Control and sensors developed in stages 3 and 4	Batch, fed-batch or continuous	Very important	Very important	Synthetic biology used to develop existing and novel fermentations

مراحل اصلی فرآیند تخمیر صنعتی

فرآیند بالادستی تخمیر (Upstream processing)

۱- انتخاب میکروارگانیسم صنعتی ، به عبارت دیگر جداسازی و خالص سازی وسپس ایجاد تغییرات و اصلاحات ژنتیکی در میکروارگانیسم مربوطه GMO

۲- انتخاب محیط کشت مناسب ، ارزان ، فراوان (تهیه محیط کشت به منظور رشد میکروب و تولید محصول)

۳- تهیه محیط کشت مناسب برای کشت مایه تلقیح ، کشت بذر و کشت تولید محصول

٤- استریل سازی محیط کشت و دستگاه ها و تجهیزات

٥- توسعه مایه تلقیح مناسب(Inoculum Development)

٦- آماده کردن سایر تجهیزات ولوازم مورد نیاز فرایند

۷- افزودن مایه تلقیح به محیط کشت استریل با رعایت تکنیک های آسپتیک

۸- کنترل رشد و تکثیر و کنترل تولید محصول در طول فرایند

۹- اضافه کردن مواد افزودنی درحین تخمیر در فرایند هایFeed-Batch

۱۰- حفظ شرایط استریل و جلوگیری از آلودگی در طول فرایند

۱۱- انتخاب زمان مناسب برای خاتمه تخمیر

فرآیند پایین دستی تخمیر (Downstream processing)

۱- جداسازی توده زیستی (فاز جامد) از فاز مایع توسط صافی ها

۲- تخریب غشا ودیواره سلولی (درصورت لزوم)

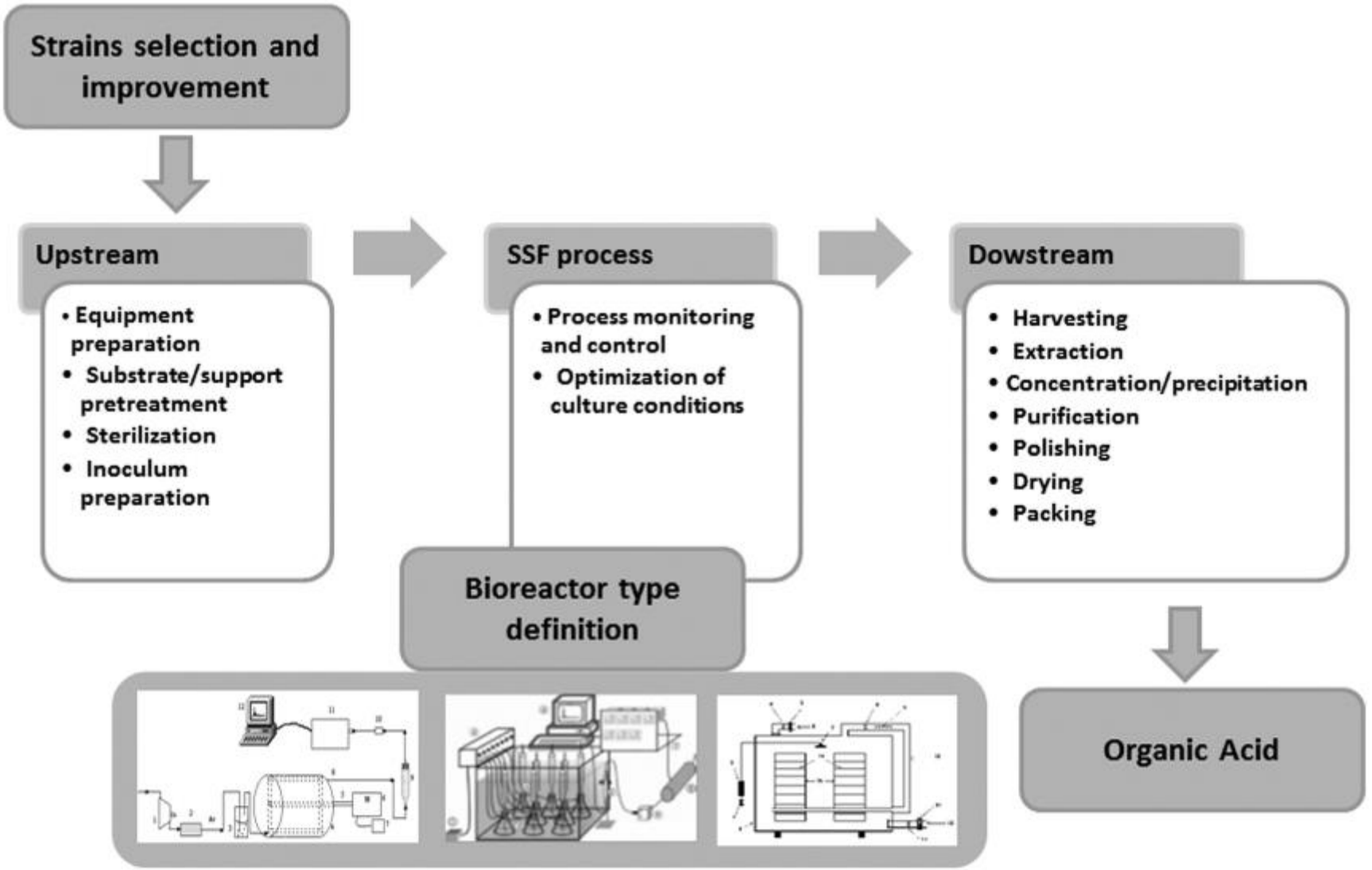
۳- تغلیظ محصول

٤- جداسازی و خالص سازی محصول از سایر ترکیبات محلول

٥- کنترل کمی و کیفی محصول

٦- بسته بندی محصول

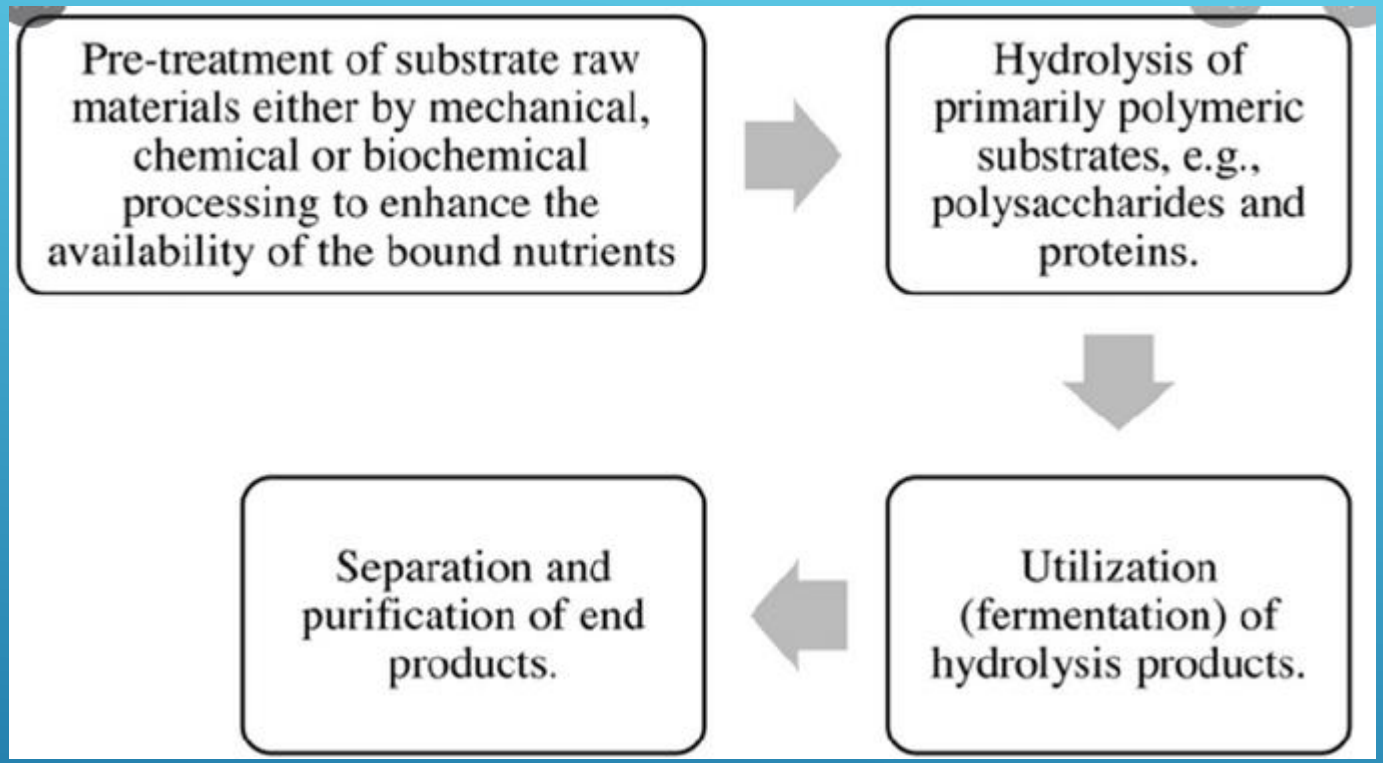
۷- استریلیزاسیون و تصفیه پساب



Flowchart of the main steps of organic acid production by solid-state fermentation.

Submerged fermentation/ Solid-state fermentation

- **Submerged fermentation** involves the production of enzymes by microorganisms (e.g. bacteria, yeast) in a liquid nutrient media (**water content of the media:** > 95%)
- **Solid-state fermentation** is the cultivation of microorganisms on a solid substrate.
- Carbon containing compounds in or on the substrate are broken down by the micro organisms, which produce the enzymes either intra-cellularly or extra-cellularly.


Pre-treatment of substrate raw materials either by mechanical, chemical or biochemical processing to enhance the availability of the bound nutrients
Hydrolysis of primarily polymeric substrates, e.g., polysaccharides and proteins.
Utilization (fermentation) of hydrolysis products.
Separation and purification of end products.

What is Solid State Fermentation??

- Solid-state (substrate) fermentation (SSF) has been defined as the fermentation process occurring in the absence or near-absence of free water.
- SSF employs natural raw materials as carbon source such as cassava, barley, wheat bran, rice bran, sugarcane bagasse, cassava bagasse, various oil cakes (e.g. coconut oil cake, palm kernel cake, soybean cake, ground nut oil cake, etc), fruit pulps (e.g. apple pomace), corn cobs, saw dust, seeds (e.g. tamarind, jack fruit), coffee husk and coffee pulp, tea waste, spent brewing

Advantages of SSF

- Process is simple
- Cost Effective
- Less Effluent release, reduces pollution
- High Titers, (High Product yields)
- Aeration Process is easy
- Resembles the natural habitat of some fungi and bacteria
- Easier downstream processing

Submerged Fermentation Cont…

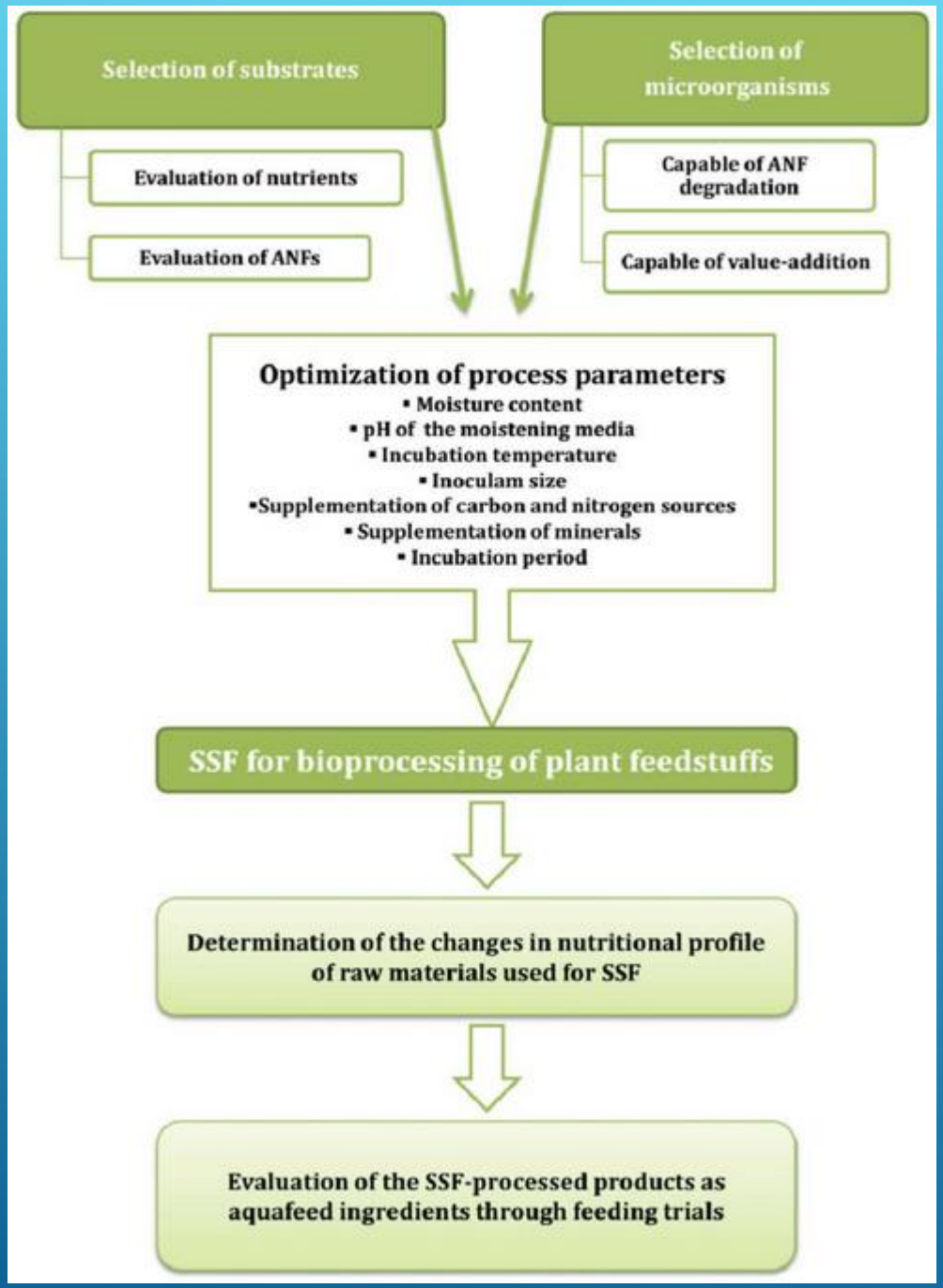
Advantages:

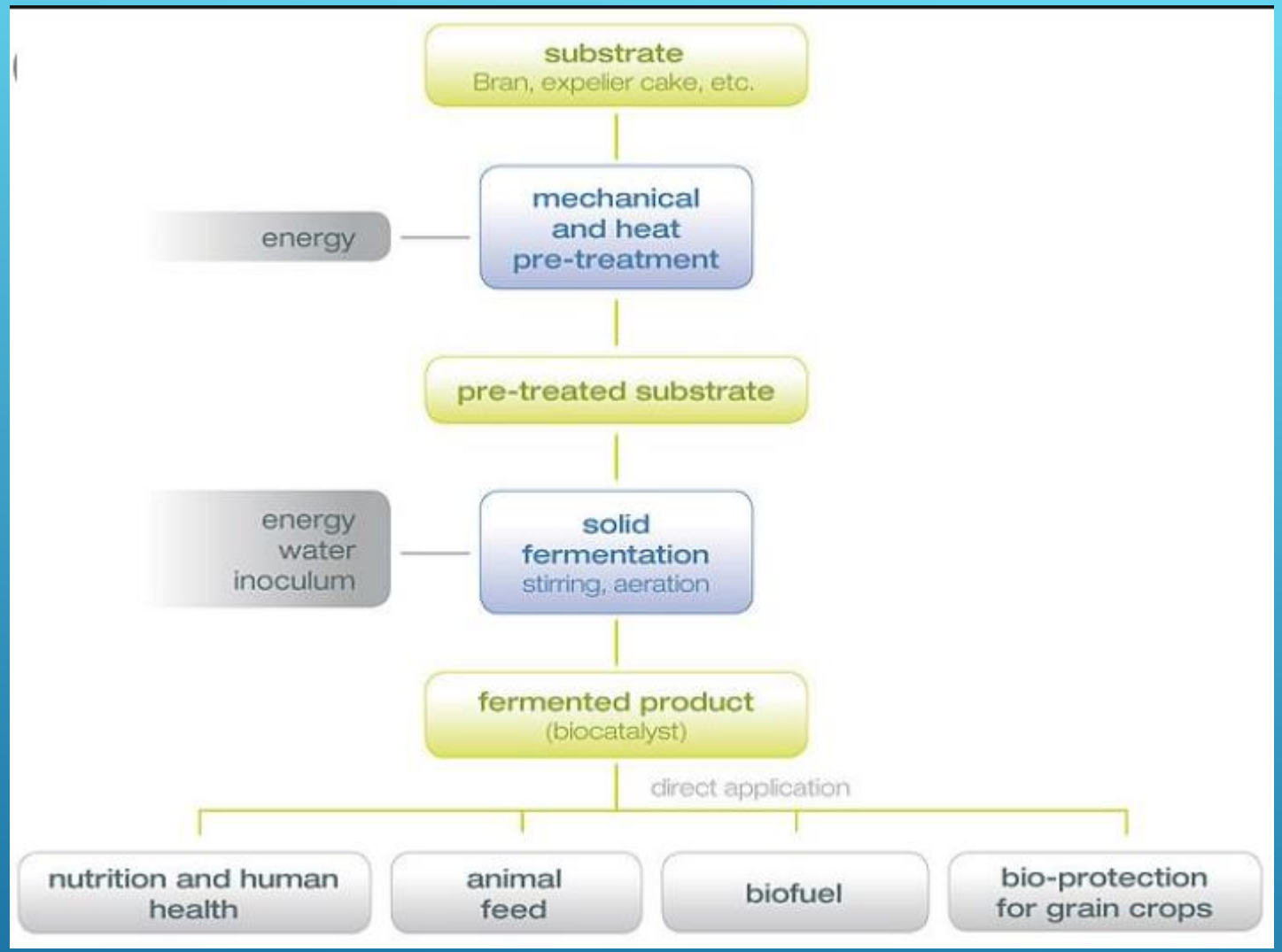
- Measure of process parameters is easier than with solid-state fermentation.
- Bacterial and yeast cells are evenly distributed throughout the medium.
- There is a high water content which is ideal for bacteria.

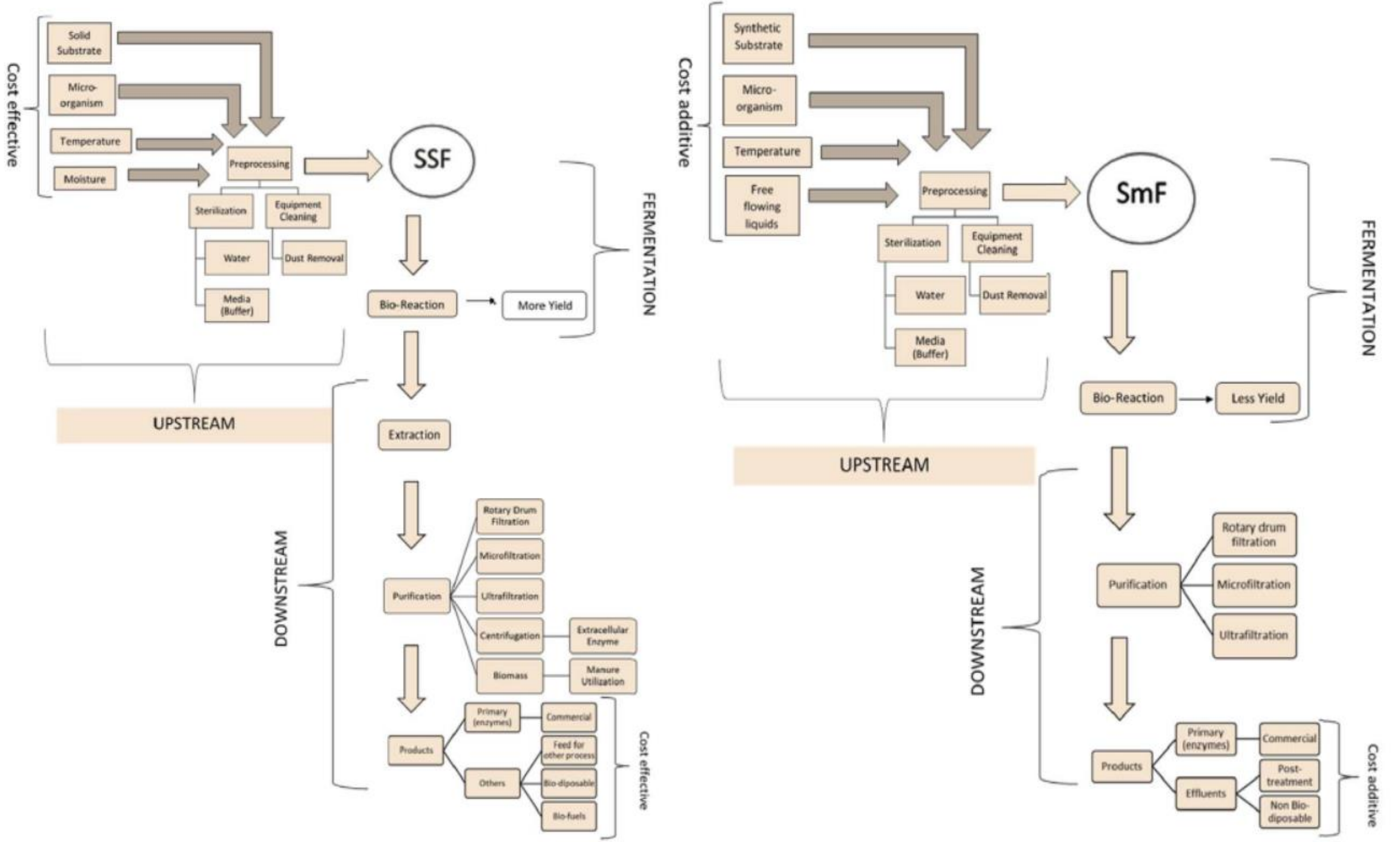
Disadvantages:

- High costs due to the expensive media.

SOLID-STATE FERMENTATION	SUBMERGEDFERMENTATION
Utilizes solid substrates like bran, bagasse and paper pulp.	Utilizes free flowing liquid substrates, such as molasses and broths
Substrates are utilized very slowly, need not to be replaced.	Substrates are utilized quite rapidly, need to be replaced constantly
Best suited for fungi that require less moisture content.	Best suited for bacteria that require high moisture content.
Culture systems involves three phases, solid, liquid and gaseous	Involves two phases ,liquid and gaseous phase.
Inoculum ration is always larger	Inoculum ration is usually small.
System may or may not involve agitation	Agitation is often essential

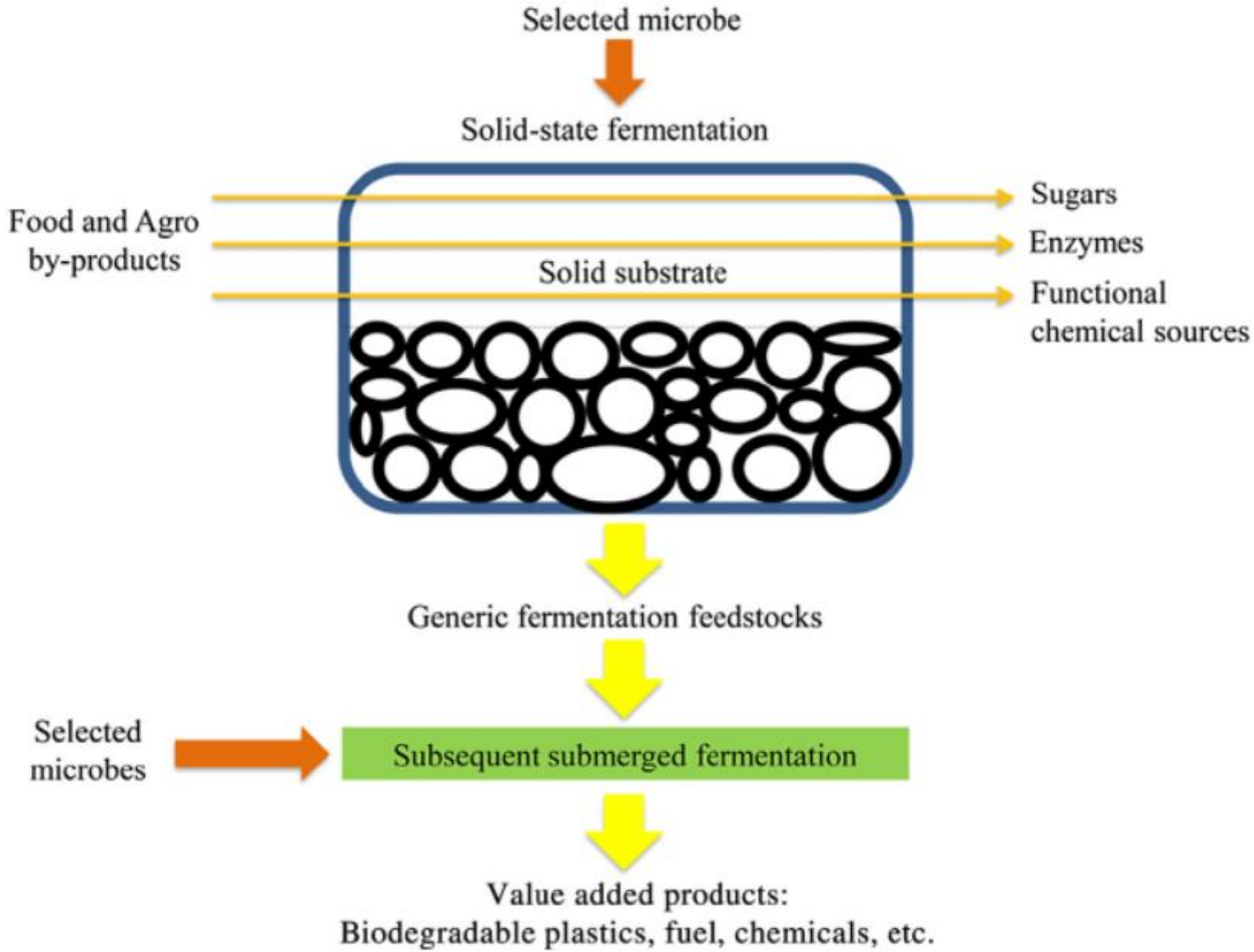

Selection of substrates
Selection of microorganisms
Evaluation of nutrients
Evaluation of ANFs
Capable of ANF degradation
Capable of value-addition
Optimization of process parameters
• Moisture content
• pH of the moistening media
• Incubation temperature
• Inoculam size
•Supplementation of carbon and nitrogen sources
• Supplementation of minerals
• Incubation period
SSF for bioprocessing of plant feedstuffs
Determination of the changes in nutritional profile of raw materials used for SSF
Evaluation of the SSF-processed products as aquafeed ingredients through feeding trials


substrate
Bran, expelier cake, etc.
energy
mechanical and heat pre-treatment
pre-treated substrate
energy
water
inoculum
solid fermentation
stirring, aeration
fermented product
(biocatalyst)
direct application
nutrition and human health
animal feed
biofuel
bio-protection for grain crops


Cost effective
Solid Substrate
Micro-organism
Temperature
Moisture
Preprocessing
Sterilization
Equipment Cleaning
Water
Dust Removal
Media (Buffer)
SSF
Bio-Reaction
More Yield
FERMENTATION
UPSTREAM
DOWNSTREAM
Extraction
Purification
Rotary Drum Filtration
Microfiltration
Ultrafiltration
Centrifugation
Extracellular Enzyme
Biomass
Manure Utilization
Products
Primary (enzymes)
Commercial
Feed for other process
Others
Bio-diposable
Bio-fuels
Cost effective
Cost additive
Synthetic Substrate
Micro-organism
Temperature
Free flowing liquids
Preprocessing
Sterilization
Equipment Cleaning
Water
Dust Removal
Media (Buffer)
SmF
Bio-Reaction
Less Yield
FERMENTATION
UPSTREAM
DOWNSTREAM
Purification
Rotary drum filtration
Microfiltration
Ultrafiltration
Products
Primary (enzymes)
Commercial
Effluents
Post-treatment
Non Bio-diposable
Cost additive

An overview advantage of Solid State Fermentation (SSF) over Submerged Fermentation (SmF).

Factor	SSF	SmF
Substrate	Cheap mostly agro-industrial wastes	Expensive component material
Inoculum	Moderate	Defined
Aseptic condition	Moderate	High
Moisture	Range (30–70% (W/V))	High liquid media
Agitation[a]	Challenging	Easy
Temperature and pH control[a]	Challenging	Easy
Contamination	Less probability	High probability
Enzyme yield	High	Moderate
Downstream processing	Easy, cheap, less time consuming, easier for preliminary enzyme separation (e.g., masculine cloth, rinsing buffers)	Hard, costly, more time consuming, tougher preliminary enzyme separation through centrifugation
Liquid waste	None	Large amount
Scale-up[a]	Challenging	Easy and available
Volume and cost of equipment	Small reactors and low cost	Large reactors and high cost
Biomass	Maximum utilization (e.g., animal feed, biofuels, fertilizers etc.)	Minimal or no utilization
Mass transfer[a]	Difficult to maintain	Easier to handle



Solid-state fermentation process for production of value-added product.

Substrates used for solid-state fermentation.



Rice bran



Wheat bran



Apple pomace



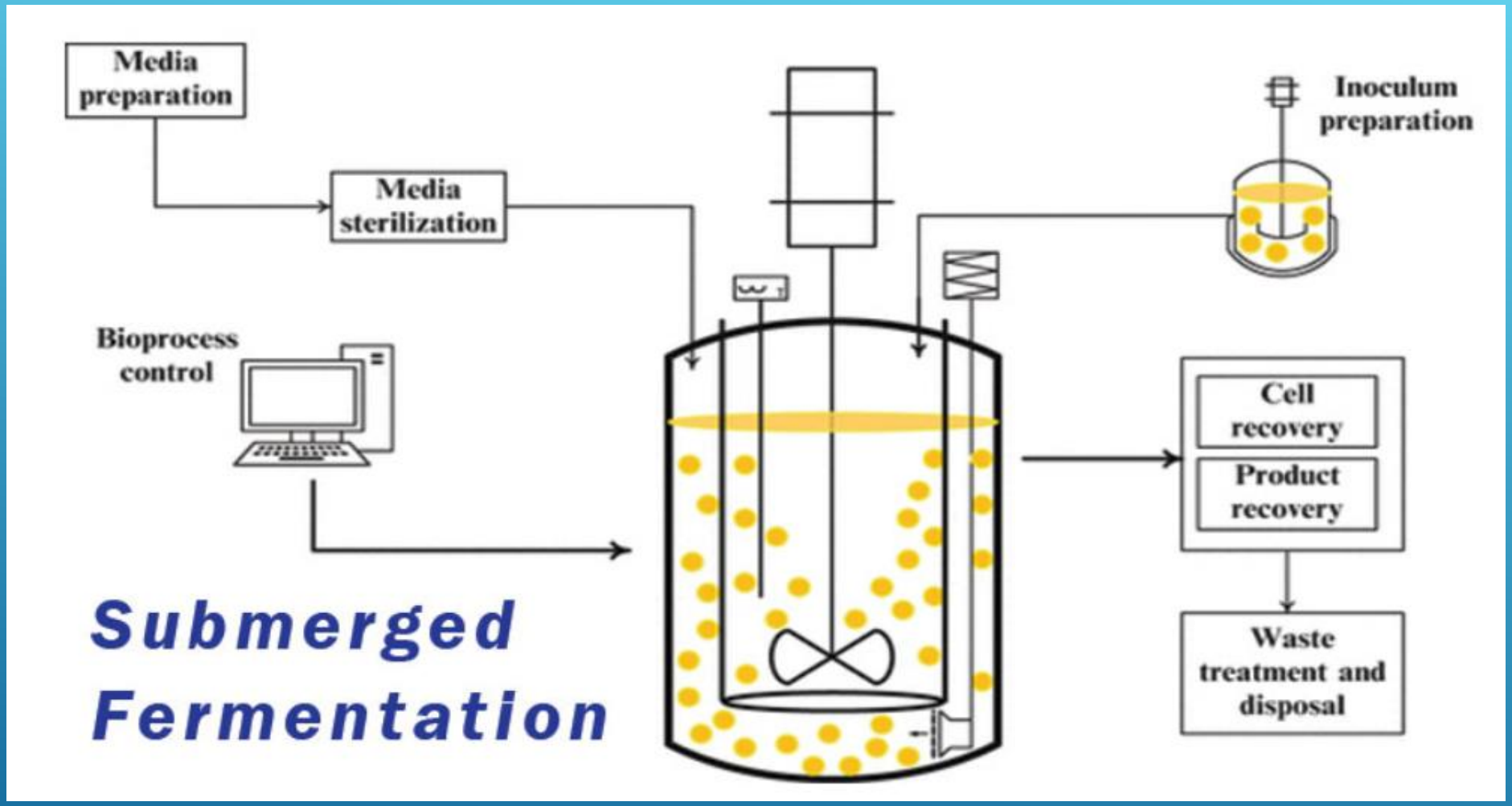
Ground nut oil cake



Coconut oil cake



Soybean oil cake


Media preparation
Media sterilization
Inoculum preparation
Bioprocess control
Cell recovery
Product recovery
Waste treatment and disposal
Submerged Fermentation