۱– اهداف و وظایف بیوتکنولوژی صنتی

۲– سوش های صنعتی و منشاء آنها

۳– متابولیسم سوش های صنعتی

۴– سوبستراهای استفاده شده در پروسه های تخمیری

۵– دستگاهها و تجهیزات استفاده شده در بیوتکنولوژی صنعتی

۶– فرآیندهای تخمیری

گردآوری و تنظیم: دکتر آشنگرف

اهداف و وظایف کلی میکروب شناسی صنعتی/بیوتکنولوژی صنعتی

اولین و مهمترین هدف بیوتکنولوژی صنعتی تولید متابولیت ها و محصولات میکروبی مفید و سودمند در مقیاس صنعتی و یا حداقل نیمه صنعتی است. دومین هدف شناسایی سوش های جدید میکروبی که توانایی تولید متابولیت ها و فرآورده های مفید و سودمند را در شرایط صنعتی داشته باشند.

وظایف بیوتکنولوژی صنعتی

۱– بکار گیری M.O های مولد در مقیاس صنعتی که در این درس به آنها سوش صنعتی گفته می شود.
۲– ایجاد اصلاح و تغییرات ژنتیکی مفید در سوش های صنعتی با استفاده از موتاسیون و مهندسی ژنتیک.
۳– بکارگیری تکنیک های جدید میکروب شناسی برای افزایش رشد و تکثیر سوش های صنعتی.
۴– تهیه محیط های کشت مغذی و کم هزینه به منظور تقویت رشد و تکثیر سوش ها و کاهش هزینه تولید.
۵– بکارگیری دستگاههای مجهز و مدرن برای افزایش راندمان تولید محصولات میکروبی.
۶– اصلاح و تغییر شیمیایی برخی از متابولیت ها به منظور تهیه فرآورده های جدید و مفید.
۷– حفظ و نگهداری سوش های صنعتی و جلوگیری از تغییرات منفی در آنها.

M.O های صنعتی، منشاء و خصوصیات آنها

به آن دسته از M.O هایی که توانایی تولید متابولیت های مفید و ارزشمند را داشته باشند و براحتی در پروژه های صنعتی قابل استفاده باشند، سوش صنعتی می گویند. البته اکثر M.O، حتی میکروب های بیماری زا در آینده نه چندان دور بعنوان سوش صنعتی بکار گرفته می شوند، ولی در حال حاضر فقط تعداد معدودی از میکروبها بعنوان سوش صنعتی انتخاب شده اند. علت انتخاب آنها بعنوان سوش صنعتی، توانایی منحصر بفردشان در تولید یک یا چند متابولیت مفید است و گرنه هیچ تفاوتی با سایر اعضای گونه و جنس میکروبی مربوطه ندارند. معمولا از آنجایی که سوش های صنعتی از نظر متابولیکی با سایر اعضای گونه مربوطه تفاوت دارند، به آنها متابولیک حرفه ای (Metabolic specialists) نیز گفته می شود. معمولا پس از شناسایی سوش های جدید، آنها را در معرض تغییرات ژنتیکی قرار می دهند (Modified organisms) و سپس با استفاده از تکنیک های میکروب شناسی، تغییرات ایجاد شده را آزمایش می کنند و در صورت موفقیت سوش مذکور را در پروژه های صنعتی بکار می گیرند.

منشاء سوش های صنعتی

منشاء تمام سوش های صنعتی محیط زیست است. در حقیقت این دسته از M.O ها نیز مثل سایر میکروبها از محیط طبیعی جداسازی می شوند اما بعد از آنکه آزمایشات مختلف را با موفقیت پشت سر گذاشتند، آنها را بعنوان سوش های صنعتی نگهداری

می کنند و بطور انحصاری در کلکسیون های میکروبی به ثبت می رسانند. البته اکثر کمپانی های صنعتی از تحویل دادن سوش های صنعتی خود به مراکز کلکسیون های میکروبی امتناع می ورزند و آنها را به درخواست کنندگان می فروشند. بنابراین بعد از محیط طبیعی، منشاء دوم سوش های صنعتی، کلکسیون های میکروبی است. مراکز کلکسیون های میکروبی علاوه بر انواع کشت های میکروبی، دارای کلکسیونی از انواع پلاسمیدها، ژنهای کلون شده، انواع وکتورهای مهندسی ژنتیک می باشد.

خصوصیات سوش های صنعتی

۱– سوش صنعتی باید ترجیحا قابلیت تولید سلول های رویشی و یا قابلیت تولید اسپور بعنوان واحد تولید مثل کننده را بطور فراوان داشته باشد (رشد فراوان داشته باشد).

۲– ثبات ژنتیکی داشته باشد. سوش هایی که دائما در معرض تغییرات ژنتیکی قرار گیرند، نامناسب هستند.

۳– سریع الرشد باشد، یعنی خیلی راحت در محیط کشت رشد داشته باشد.

۴– کشت آن خالص و عاری از آلودگی (فاقد مواد سمی) باشد.

۵– کشت آن قابل نگهداری و قابل استفاده های متعدد باشد.

۶– خاصیت خود محافظتی داشته باشد، یعنی در شرایط نامناسب محیطی مقاومت داشته باشد.

۷– در فرآیند صنعتی قابلیت رشد فراوان داشته باشد.

۸– تهیه کشت خالص آن آسان باشد.

۹– در اسرع وقت محصول مورد نظر را تولید نماید (Productivity بالا داشته باشد).

متابولیسم و رشد سوش های صنعتی

بکارگیری راههای مختلف متابولیکی (تنفس/انواع تخمیر) جهت کسب انرژی. در میکروب شناسی صنعتی متابولیسم سوش های صنعتی به دو بخش تقسیم می شود که عبارتند از متابولیسم اولیه و ثانویه.
متابولیسم اولیه: به کلیه واکنش های متابولیکی گفته می شود که در مرحله اول رشد و در فاز لگاریتمی منحنی رشد انجام گیرد.
متابولیسم ثانویه: به کلیه واکنش های متابولیکی گفته می شود که در مرحله دوم رشد و در فاز سکون منحنی رشد انجام می شود.
لازم به ذکر است که این تقسیم بندی به معنی بی ارتباط بودن این دو متابولیسم با یکدیگر نمی باشد، بلکه با توجه به منحنی رشد میکروبها (کشت بسته) متابولیسم اولیه و ثانویه کاملا در ارتباط با یکدیگرند و به عبارت دیگر متابولیسم ثانویه ادامه اولیه است. هر گونه نقص در متابولیسم اولیه منجر به توقف دوم رشد و متابولیسم ثانویه می شود. با این حال هر کدام ویژگی منحصربفرد دارند.

از نقطه نظر میکروب شناسی صنعتی، متابولیت ها و فرآورده هایی که در این دو نوع متابولیسم تولید می شوند به دو دسته اولیه و ثانویه تقسیم بندی می شوند.

متابولیت های اولیه

به کلیه متابولیت هایی گفته می شود که در مرحله اول رشد (فاز لگاریتمی) و طی واکنش های متابولیسم اولیه تولید می شوند و سلول باکتری برای رشد شدیدا به آنها نیاز دارند.

متابولیت های ثانویه

به کلیه متابولیت هایی گفته می شود که در مرحله دوم رشد (فاز سکون) و طی واکنش های متابولیسم ثانویه تولید می شود و معمولا سلول باکتری نیاز چندانی به آنها ندارد (بعنوان یک مزیت رقابتی در یک نیچ اکولوژیکی مشترک).

رشد

از نظر میکروب شناسی صنعتی منحنی رشد میکروب های صنعتی به دو بخش تقسیم می شود که عبارتند از: تروفوفاز و ایدیوفاز.

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 .اکنش ها و تغییراتی است که از ابتدای فاز سکون منحنی رشد تا انتهای فاز رخ می دهد.

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 متفاوت نسبت به متابولیت های اولیه می باشند که در زیر به آنها اشاره می شود.

ویژگی های متابولیت های ثانویه

۱– متابولیت ثانویه محصول متابولیسم ثانویه هستند.

۲– در فاز لگاریتمی (تروفوفاز) تولید نمی شوند.

۳– در فاز سکون رشد تولید می شوند.

۴– توسط تعداد معدودی از میکروبها تولید می شوند.

۵– دارای ارزش اقتصادی هستند.

۶– بر رشد و تکثیر میکروبها اثر چندانی ندارند.

۷– تولیدشان شدیدا به شرایط کشت و ترکیبات محیط کشت بستگی دارد.

۸– از نظر ساختمان شیمیایی شباهت زیادی به یکدیگر دارند.

۹– 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 آنزیمی انجام می گیرد.

محیط های کشت مورد استفاده در میکروب شناسی صنعتی

از آنجایی که اکثر سوش های صنعتی از نظر تغذیه شیمیو هتروتروف (شیمیو اورگانو تروف) می باشند و برای رشد به منابع کربن آلی نیاز دارند، لذا محیط های کشت استفاده شده در فرآیندهای صنعتی باید حاوی کربوهیدراتها و مواد آلی دیگر بعنوان منبع کربن و انرژی باشند، و همچنین باید حاوی منبع نیتروژن، فسفر، گوگرد، منیزیم، کلسیم و سایر مواد غذایی لازم باشند. در صورت هوازی بودن سوش مورد نظر باید اکسیژن بمقدار کافی در محیط کشت تامین شود و بالاخره آب نیز به محیط کشت اضافه می گردد (کربن، ازت، نوترینت، یونهای فلزی و آب). بنابراین محیط کشت باید تمام ترکیبات و مواد غذایی مورد نیاز سوش های صنعتی را دارا باشد و در صورت لزوم مواد مکمل و ضروری (Supplement) به آن اضافه شود. علاوه بر این، دما، pH، فشار اسمزی محیط کشت نیز باید کنترل شود.

سوبستراهای تخمیری صنعتی

منابع کربن و انرژی

۱– ملاس چغندرقند و ملاس نیشکر: ملاس علاوه بر قند حاوی مواد ازته، ویتامین ها و عناصر نادر است.

۲– عصاره مالت: عصاره آبکی حاصل از جو جوانه زده است که سوبسترای بسیار مناسبی برای قارچ ها، مخمرها و اکتینومیست ها است و حاوی ۹۰٪ کربوهیدراتها (گلوکز، فروکتوز، مالتوز و ساکارز) است. این عصاره همچنین حاوی ترکیبات ازته مثل پروتئین ها، پپتید ها و اسید های آمینه است. در این عصاره بازهای پورینی و پریمیدینی نیز وجود دارند.

۳– مواد نشاسته ای

۴– مواد لیگنوسلولزی

۵– متانول: متانول فقط توسط تعداد محدودی از میکروبها تخمیر می شود.

منابع نیتروژن

۱– محلول خیسانده ذرت: حاوی اسیدهای آمینه متعددی از جمله آلانین، آرژنین، اسید گلوتامیک و سایر اسید های آمینه ضروری است. علاوه بر این دارای قندهایی است که به لاکتیک اسید تبدیل می شوند.

۲– عصاره مخمر: حاوی انواع ویتامین ها و اسیدهای آمینه است.

۳– پپتون ها: ترکیبات حاصل از هیدرولیز پروتئین ها می باشند و حاوی انواع ترکیبات پپتیدی هستند. در منابعی مثل گوشت، کازئین، ژلاتین، کراتین و سایر منابع وجود دارند.

دستگاهها و تجهیزات میکروب شناسی صنعتی

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 فیزیکوشیمیایی لازم را برای رشد و تکثیر سوش های صنعتی فراهم نماید بطوریکه سوبستراها توسط سوش های صنعتی تخمیر یا تجزیه گردد و متابولیت مورد نظر تولید و استخراج گردد.

انواع فرمانتورها براساس اهداف پروژه های صنعتی و ویژگی های سوش صنعتی:

۱– هوازی: اکثرا هوازی اند و برای سوش های هوازی بکار گرفته می شوند.

۲– بی هوازی: کمتر استفاده می شود و برای سوش های بی هوازی بکار گرفته می شوند.

انواع فرمانتورها براساس اندازه:

۱– فرمانتورهای کوچک (فرمانتورهای آزمایشگاهی): این فرمانتورها حدود ۵ تا ۱۰ لیتر ظرفیت دارند.

۲– فرمانتورهای متوسط (نیمه صنعتی): به آنها Pilot plant نیز گفته می شود و حدود ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ لیتر ظرفیت دارند.

۳– فرمانتورهای بسیار بزرگ (صنعتی–تجاری): به آنها Industrial/Commercial plant نیز گفته می شود و حدود ۱۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ لیتر ظرفیت دارند.

عوامل موثر در طراحی بیوراکتورها: کنترل اکسیژن، هم زدن، کنترل کف (هم زدن و هوادهی محیط کشت که تراکم سلولی را زیاد می کند و همچنین در صورت ترکیبات پیچیده در محیط از جمله عصاره مخمر ایجاد می شود: کف شکن های مکانیکی/روغنی).

بیوراکتورها: Stirred Tank Bioreactor (همزن دار)، Airlift، Bubble column .

مراحل افزایش حجم فرآیندهای 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 آزمایش را انجام می دهند (پس از جداسازی سویه و انجام آزمایشات در ارلن های کوچک ۲۵ تا ۵۰ میلی لیتری).

◄در مرحله بعد همین آزمایش را با فرمانتور های کوچک ۵ تا ۱۰ لیتری انجام می دهند و نتایج بدست آمده را بررسی می کنند (Semi-pilot scale).

◄در مرحله سوم در مقیاس نیمه صنعتی (Pilot plant scale): با استفاده از فرمانتورهای ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ لیتری که توسط کامپیوتر کنترل می شود، متابولیت یا محصول مورد نظر تولید و استخراج می گردد.

◄در مرحله چهارم در مقیاس صنعتی–تجاری (Industrial scale): با استفاده از فرمانتورهای صنعتی عظیم با حجم ۱۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ لیتری محصول مورد نظر تولید و استخراج می گردد.

انواع فرآیندهای تخمیری صنعتی

از آنجایی که تعداد فرآیندها و محصولات تخمیری که بطور صنعتی تولید می شوند، روز به روز بیشتر می شود و به دلیل اینکه فرآیندهای تولیدی با یکدیگر تفاوت دارند لذا این فرآیندها را براساس نوع محصول به پنج دسته تقسیم بندی می کنند:

۱– فرآیندهای تولید توده زیستی میکروبی: در این فرآیندها محصول نهایی توده عظیم میکروبی می باشد. مثل فرآیندهای تولید مخمر نان و یا فرآیندهای تولید SCP.

۲– فرآیندهای تولید آنزیم های میکروبی: تولید آنزیم از منابع میکروبی مزایای زیادی نسبت به تولید آنزیم از سایر منابع دارد. این مزایا عبارتند از سادگی افزایش بازده تولید در فرآیندهای میکروبی از طریق القاء کردن (Induction)، بوسیله افزودن محرک ها (Inducer) و یا از طریق بازدارندگی (Reprssion). بکارگیری تکنیک های مهندسی ژنتیک و تولید DNA نوترکیب در میکروبها بمراتب آسانتر است.

۳– فرآیندهای تولید متابولیت های اولیه و ثانویه میکروبی.

۴– فرآیندهای تولید محصولات نوترکیب: ورود فناوری DNA نوترکیب، طیف تخمیری را بطور وسیعی گسترش داده است. با استفاده از این فناوری ژن های موجودات عالی را می توان به سلول های میکروبی بالاخص باکتریها انتقال داد، بطوریکه میکروب های دریافت کننده ژن، توانایی تولید پروتئین های بیگانه را خواهند داشت. تاکنون از طیف وسیعی از میکروبها مثل اشریشیاکلی، ساکارومایسس سرویزیه، . قارچ های رشته ای (کپک ها) بعنوان میزبان و دریافت کننده ژن خارجی استفاده شده است و محصولاتی مثل اینترفرون، انسولین، آلبومین سرم انسانی، فاکتورهای ۸ و۹، عامل رشد پوستی، کیموزین گوساله و سوماتوستاتین گاوی تولید شده است.

۵– M.o ها قادرند ماهیت شیمیایی طیف وسیعی از ترکیبات آلی را تغییر دهند. چنین تغییراتی را دگرگون سازی میکروبی (Microbial transformation) یا Bioconversions می نامند. در فرآیندهای دگرگون سازی، میکروبها نقش کاتالیزور شیمیایی را دارند که در بسیاری موارد بهتر از کاتالیزورهای شیمیایی عمل می کنند. واکنش های دگرگون سازی که با استفاده از میکروبها امکان پذیر است عبارتند از:

۱– اکسیداسیون شامل دهیدروژناسیون و دهیدراتاسیون مثل تبدیل تریپتوفان به ۵–هیدروکسی تریپتوفان و یا تبدیل نفتالین به اسید سالیسیلک.

۲– واکنش های هیدرولیتیک.

۳– واکنش های کنداسیون.

۴– واکنش های احیاء.

۵– واکنشهای دکربوکسیلاسیون، آمیناسیون و دآمیناسیون.

تولید سرکه که یک مثال بارز از واکنش های دگرگون سازی است (تبدیل اتانول به اسید استیک)، تولید استروئیدها و بعضی آنتی بیوتیک ها نیز از طریق واکنش های دگرگون سازی انجام می شود.

مراحل اصلی فرآیند تخمیر صنعتی

مراحل یک فرآیند تخمیری در مقیاس صنعتی معمولا به شرح زیر می باشد و شامل دو بخش زیر است:

الف– فرآیند بالا دستی (Upstream-Processing): این بخش از فرآیند شامل مراحل زیر است:

۱– انتخاب میکرواورگانیسم صنعتی: جداسازی، خالص سازی و سپس ایجاد تغییرات و اصلاحات ژنتیکی در میکرواورگانیسم مربوطه.

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

۳– تهیه کشت مناسب برای کشت مایه تلقیح (Primary culture/Pre-culture**: فعال سازی سوش غیر فعال)؛ کشت بذر (** Seed culture**: تکثیر سوش فعال سازی با هدف افزایش توده زیستی)؛ کشت تولید محصول (**Main/production culture**: به کشتی که در فرمانتور اصلی (فرمانتور تولید) تهیه می شود. همراه با رشد سوش مورد نظر، افزایش محصول نیز در حد امکان صورت می گیرد).**

۴– استریل سازی محیط کشت و دستگاهها و تجهیزات.

۵– توسعه مایه تلقیح مناسب (Inoculum development)

۶– آماده کردن سایر تجهیزات و لوازم مورد نیاز فرآیند.

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

۸– کنترل رشد و تکثیر و کنترل تولید محصول در طول فرآیند.

۹– اضافه کردن مواد افزودنی در حین تخمیر در فرآیند Fed-Batch .

۱۰– حفظ شرایط استریل و جلوگیری از آلودگی در طول فرآیند.

۱۱– انتخاب زمان مناسب برای خاتمه تخمیر.

ب– فرآیندهای پایین دستی (Downstream-Processing)

۱– جداسازی فاز جامد (توده زیستی) از فاز مایع توسط فیلتر.

۲– تخریب غشاء و دیواره سلولی (در صورت لزوم).

۳– تغلیظ محصول (Evaporation**).**

۴– جداسازی و خالص سازی محصول (استخراج با حلال، سانتریفیوژ و کریستالیزور).

۵– کنترل کیفی و کمی محصول (بخش Q. C شرکت).

۶– بسته بندی محصول (Bagging).

۷– استریلیزاسیون و تصفیه پساب (بخش تصفیه خانه شرکت)