فصلنامه یافته‌های زیست شناسی
جلد 8، **شماره** 1

بهینه‌سازی تولید پیوسته بلیلیپروتئین تک یاخته در مقیاس نیمه صنعتی در فرمانتور *Deep Jet* با حجم *L* 1000

پروانه جعفری*[1]، قدرت اله محمدزمانی[2]، فرزانه الماسیان[2]، مریم تاج‌آبادی ابراهیمی[3]

تاریخ دریافت: 90/6/16 **تاریخ پذیرش:** 90/12/24

پروتئین تک یاخته به سلول‌های خشک میکروبی یا پروتئین تام استخراج شده از کشت خالص سلول میکروبی اطلاق می‌شود که می‌توان به عنوان مکمل غذایی انسان یا دام مورداستفاده قرار گیرد. انتخاب سوبسترای فراوان و مجاور با کارخانه تولیدی، تعیین کننده روند تولید پروتئین تک یاخته می‌باشد. هدف این تحقیق بهینه‌سازی تولید پروتئین تک یاخته در مقیاس پایلوت بود. بنابراین کشت متیلوباکتریوم (سویه 69) در محیط حداقل نمکی (MSB) با متانول هل عنوان تنها منبع کربن و انرژی صورت گرفت.
در کشت پیوسته در فرمانتور Deep Jet با ضرفیت 1000 و حجم کاری L 700، تولید بیومس خشک به میزان 25 g/L مشاهد شد و میزان بازدهی سلولی بر پایه سوبسترا برابر 0/4 g/g بود. ضرایب فرمول استوکیومتری محصول حاصله از تبدیل متانول به بیومس سلولی $CH_{1.84}O_{0.596}N_{0.23}$ بود. پروتئین تام محصول برابر 74٪ و محصول به واسطه بالا بودن اسیدهای آمینه ضروری می‌تواند جایگزین مناسبی برای تغذیه حیوانات باشد.
کلمات کلیدی: تولید نیمه صنعتی، فرمانتور Deep Jet، پروتئین تک یاخته، متیلوتروف

Email: p.jafari@iau-arak.ac.ir

1. عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک
2. عضو هیات علمی پژوهشکده مهندسی جهاد.
3. عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی.

Archive of SID
www.SID.ir

اصطلاح پروتئین تک یاخته[1] به سلول‌های خشک شدهٔ میکروارگانیسم‌هایی چون باکتری‌ها، مخمر، کپک‌ها، جلبک‌ها یا قارچ‌هایی اطلاق می‌شود که در مقیاس بالا با سوبسترای ارزان قیمت کشت شده و به عنوان منبع پروتئین مورد مصرف دام و یا انسان قرار می‌گیرند (2و1). وجود محدودیت در منابع پروتئین دامی و گیاهی در جهان و مسئله بحران جمعیت باعث گردیده که اکثر کشورهای جهان شانس خود را برای تبدیل مواد اولیه ارزان قیمت و قابل دسترس به منابع پروتئینی مورد بررسی قرار دهند (3). در میان این کشورها برخی توانستند با توجه به شرایط خاص خود به تولید صنعتی دست یابند. در سایر کشورها نیز با توجه به سوبستراهای مختلف، تلاش گسترده‌ایی در مقیاس آزمایشگاه و پایلوت برای استفاده از ضایعات سلولزی، آب پنیر، فاضلاب شهری، ملاس، باگاس، متانول، گاز طبیعی، اتانول و... صورت گرفته است. از عوامل دیگری که در میزان علاقه‌مندی به گسترش واحدهای تولید پروتئین تک یاخته نقش آفرینی می‌کند، وضعیت کشاورزی کشورها و میزان دسترسی به منابع پروتئین گیاهی و جانوری ارزان قیمت می‌باشد. این مساله زمانی اهمیت خود را نشان می‌دهد که هزینه‌های حمل ونقل وکاهش کیفت منابع پروتئین گیاهی و جانوری وارداتی درحجم و مسافت زیاد، از هزینه‌های تولید پروتئین تک یاخته تجاوز کند (5و4).

بررسی‌ها نشان داده است که در حال حاضر در ایران امکان استفاده از گاز طبیعی به عنوان سوبسترای تولید پروتئین تک یاخته به واسطه تکنولوژی بالای تولید وجود ندارد. تولید بر پایه n- پارافین‌ها نیز به علت قیمت بالاتر و همچنین هزینه بالای خالص‌سازی محصول از سوبسترا، غیر اقتصادی می‌باشد. بنابراین گزینه باقی مانده به عنوان خوراک، متانول می‌باشد (8و7و6). میکروارگانیسم‌های متیلوتروف می‌توانند این سوبسترا را به صورت بیومس غنی از پزوتئین اسمیله نمایند (11و10و9).

فرمانتور Deep Jet یکی از انواع فرمانتورها با سیستم اختلاط خارجی است که می‌تواند برای تولید پروتئین تک یاخته با سوبسترای متانول مورد استفاده قرار گیرد. در این فرمانتور گردش مایع توسط پمپ صورت گرفته و با عبور از داخل یک مبدل، انتقال حرارت در خارج از محیط فرمانتور انجام می‌شود. جریان گردشی در قسمت فوقانی در یک نازل[2] با هوا مخلوط می‌شود و سپس مخلوط از طریق یک لوله به عمق محیط کشت فرستاده می‌شود. برای تولید پروتئین تک یاخته به صورت پیوسته ابتدا فرمانتور Deep Jet با حجم 1000 L توسط متخصصین پژوهشکده مهندسی جهاد ساخته و سپس از نصب سیستم‌های کنترل دقیق امکان تولید پروتئین تک یاخته با سوبسترای متانول به صورت کشت پیوسته مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه پیش کشت در فرمانتور 100L همزن‌دار: برای تهیه پیش کشت مورد نیاز برای تلقیح فرمانتور Deep jet، ابتدا کشت تازه و 24 ساعته از سویه متیلوباکتریوم شماره 69 جدا شده توسط جعفری و همکارانش، تهیه شد. برای این منظور باکتری نگهداری شده در گلیسرول در فریزر ^{o}C 80- در محیط حداقل معدنی متانول MSB کشت و پس از رشد در پلیت MSA کشت داده شد. برای تهیه پیش کشت ابتدا 5 L از کشت مایع باکتری (محیط MSB) در فرمانتور آزمایشگاهی تهیه و به فرمانتور همزن‌دار با حجم 100 L منتقل گردید. لازم به ذکر است که محیط کشت MSB موجود در فرمانتور از قبل استریل و پس از خنک شدن، متانول با غلظت 18 g/L به آن افزوده شده بود.

پس از افزودن پیش کشت فرمانتور در شرایط کنترل شده دما (30±2 °C)، pH (8±0/2)، دور همزن (100- 80 rpm) و نرخ هوادهی (6 -9 mg/L) شروه به کار نمود. سیستم کنترل دقیق فرمانتور همزن‌دار به گونه‌ای بود که در تمامی مدت زمان تخمیر شرایط برای رشد باکتری به لحاظ pH، دما و میزان هوادهی بهینه بود. در

1. Single Cell Protein (SCP)

2. Nazel

Archive of SID

www.SID.ir

کل مدت زمان تخمیر در فواصل زمانی معین (هر یک ساعت) نمونه برداری از فرمانتور صورت گرفت و جذب نوری نمونه‌ها تعیین گشت. پس از گذشت مدت زمانی در حدود 24 h و با ورود سلول‌ها به اواسط فاز لگاریتمی، پیش کشت برای تلقیح به فرمانتور Deep Jet و کشت پیوسته آماده شد.

کشت پیوسته در فرمانتور Deep Jet با حجم 1000L: در این پروژه برای تولید نیمه صنعتی پروتئین تک یاخته از فرمانتور Deep Jet طراحی و ساخته شده در پژوهشکده مهندسی جهاد بهره برده شد. لازم به ذکر است که فرمانتورهای همزن‌دار برای تولید پروتئین تک یاخته، مناسب نمی‌باشند زیرا ساخت آن‌ها دشوار و هزینه بردار بوده و الگوی اختلاط آنها نامطمئن است و در عین حال این گونه فرمانتورها انرژی بالایی مصرف می‌کنند.

فرمانتور پیوسته به کار گرفته شده‌دارای حلقه‌های کنترلی pH، اکسیژن محلول، دما، ارتفاع مایع، جریان محصول، فشار و کف[1] بود. در این فرمانتور جریانی از محیط کشت توسط پمپ‌های سیرکولاسیون از داخل مبدل عبور کرده و با آب موجود در مبدل، تبادل حرارتی انجام می‌داد. در هنگام بازگشت به فرمانتور توسط یک نازل ویژه، محیط کشت با هوا مخلوط می‌شد و بدین شکل، اختلاط، هوادهی و انتقال حرارت تمامی همزمان صورت می‌گرفت. با به کار گیری سیستم کنترل بسیار دقیق و انتقال مناسب جرم از هوا به جریان مایع، جداسازی دی‌اکسیدکربن از جریان مایع و اختلاط تقریباً کامل، تخمیر در این فرمانتور به خوبی پیش رفت.

قبل از راه‌اندازی فرمانتور Deep Jet، فرمانتور و تمامی تجهیزات با استفاده از بخار آب استریل شد. پس از خنک شدن فرمانتور 630 lit محیط‌های کشت MSB با 18 g/L متانول استریل شده با فیلتر، موجود در مخازن خوراک روزانه وارد فرمانتور گردید. در مرحله بعد 70 lit پیش کشت (10٪ حجم) موجود در فرمانتور همزن‌دار، وارد فرمانتور پیوسته شد. فرمانتور Deep Jet ابتدا به صورت بسته با نرخ هوادهی 12- 9 mg/L در دمای 30 °C و pH برابر 8 راه‌اندازی شد تا پس از طی شدن یک دوره تخمیری، غلظت باکتری موجود در فرمانتور افزایش یابد. در طی مدت زمان تخمیر شدت گردش محیط کشت در لوپ خارجی متفاوت در نظر گرفته شد. با کاهش اکسیژن محلول، شدت گردش در لوپ خارجی افزایش یافت تا جبران کننده کاهش اکسیژن محلول باشد. طی کشت بسته در فرمانتور Deep Jet، نمونه‌گیری به طور مداوم از فرمانتور صورت گرفت و جذب نوری نمونه‌ها تعیین گردید. با رسیدن غلظت باکتری‌ها به حد بهینه، کشت پیوسته آغاز شد.

برای کشت پیوسته خروجی و ورودی فرمانتور پیوسته به صورت همزمان باز شد. خوراک ورودی با نرخ g/L. h 0/15 وارد فرمانتور گردید و به همان مقدار نیز محصول از فرمانتور خارج شد. ارتفاع مایع درون فرمانتور توسط منوپمپ‌ها ثابت نگاه داشته شد و در نتیجه فرمانتور در یک نقطه کاری به حالت پایا[2] رسید.

بهینه‌سازی تولید در فرمانتور پیوسته: برای دستیابی به حداکثر تولید در فرمانتور پیوسته، باید تمامی شرایط موثر بر رشد و تکثیر باکتری متیلوتروف کاربردی بهینه می‌گردید. آزمون‌های قبل در فرمانتور همزن‌دار 100 L نشان داده بود که درصد اکسیژن، غلظت متانول، دما، سرعت ترقیق[3] و pH از مهمترین عوامل موثر بر رشد می‌باشند که سرعت رشد، ترکیب ماکروملکول‌ها، متابولیت‌ها و ضریب بازدهی بیومس را کنترل می‌کنند. به هنگام کار با فرمانتورهای بزرگ به واسطه دشواری و هزینه زیاد، عملاً امکان انجام آزمایش‌های متعدد میسر نیست. بنابراین برای بهینه‌سازی رشد باکتری در فرمانتور 1000 lit از نوع Deepjet از روش دیگر بهره برده شد. ابتدا در طی یک دوره تخمیری سینتیک رشد در فاز اولیه، یا همان کشت بسته رسم گردید. برای بهینه سازی تولید در این شرایط از نرم افزار Math Cad و حل معالات به

1. Foam

2. Steady State
3. Dilution rate (D)

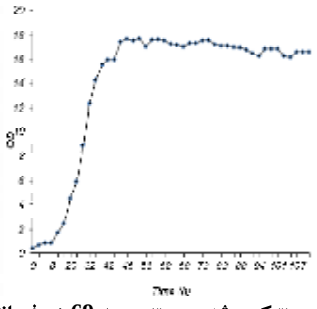
Archive of SID

www.SID.ir

روش رانکوتا[1] بهره گرفته شد (12). برای این منظور ابتدا فاز رشدی لگاریتمی به 3 بخش مرحله تند شونده، مرحله‌ای با سرعت رشدی ثابت و مرحله کند شونده تقسیم گردید (شکل 7). سپس بازه زمانی از نمودارها تعیین شد که در آن سرعت و شتاب رشدی حداکثر باشد.

ترمولیز محصول خروجی از فرمانتور: در طی تخمیر از دو مخزن مجزا برای ترمولیز محصول خروجی از فرمانتور استفاده شد. مخزن اول نقش نوسان گیر داشت داشت و در شرایط اضطراری می‌شد از آن برای نگهداری موقت محیط کشت استفاده کرد. محصول خروجی از فرمانتور به طور پیوسته وارد مخزن اول می گردید. با رسیدن ارتفاع به حد معین، محصول به صورت منقطع وارد مخزن دوم می‌شد که واحد اصلی ترومولیز بود. در مخزن ترمولیز، باکتری‌ها توسط بخار آب در دمای 95°C به مدت 2 h کشته می‌شدند. برای اطمینان از کارایی فرایند ترمولیز، پس از هر بچ[2] حرارتی، نمونه‌گیری از کشت باکتری‌های درون مخزن در شرایط استریل صورت می گرفت. نمونه‌ها در شرایط استریل بر روی پلیت MSB، کشت داده می‌شدند. پس از 48 h گرماگذاری در دمای 30°C پلیت‌ها به لحاظ رشد باکتری مورد بازبینی قرار می گرفتند.

تولید پیوسته پروتئین تک یاخته در فرمانتور Deep jet: در شکل 1 سینتیک رشد سویه 69 در فرمانتور پیوسته در بازه زمانی 110 ساعته آورده شده است.



شکل 1- سینتیک رشد پیوسته سویه 69 در فرمانتور Deep Jet

در طی رشد باکتری در فرمانتور 1000 L پیوسته، فاز تاخیری در حدود 8 h به طول انجامید. این میزان تاخیر با نتایج حاصله از فرمانتور و ارلن‌های آزمایشگاهی برابر بود. در این شرایط کشت پیوسته، 69 به سرعت با شرایط رشدی فرمانتور پیوسته سازش یافت و رشد خود را آغاز کرد.

پس از گذشت 8 h، باکتری‌ها وارد فاز لگاریتمی شدند که در طی این مدت سرعت رشد حداکثر بود و به همان نسبت میزان مصرف اکسیژن افزایش چشمگیری داشت. در ساعت 42 کاهشی در میزان رشد باکتری‌ها مشاهده شد که با کاهش اکسیژن محلول درون فرمانتور منطبق بود. در این دوره حتی با افزایش حجم اکسیژن رسانی، غلظت اکسیژن محلول افزایش نیافت. دلیل این امر رشد بسیار سریع و مصرف فراوان اکسیژن در این دوره بود. برای جبران افت اکسیژن، جریان محیط کشت در لوپ خارجی یا به عبارت دیگر سیرکولاسیون محیط کشت افزایش یافت. با افزایش سیرکولاسیون، میزان اکسیژن محلول در محیط کشت تا حدودی افزایش پیدا نمود و به همان نسبت رشد سویه تسریع گردید.

پس از گذشت 45 h از دوره تخمیری، بیومس تولیدی توسط باکتری به حدی رسید که برای تولید پیوسته و آغاز خوراک دهی فرمانتور مناسب بود. در این مرحله محیط کشت تازه با نرخ 0/15 L/h وارد فرمانتور شد و پمپ‌های خروجی به همان نسبت محصول را از فرمانتور خارج نمودند. در این حالت پایا از کشت پیوسته، جذب نوری برابر 18 و کمتر از نتیجه حاصله در فرمانتور 1 lit بود. جذب نوری در فرمانتور در حالت بهینه برابر 23 معادل 16 g/l بود. نکته قابل توجه به هنگام کشت در فرمانتور Deep Jet پیوسته کاهش رنگیزه در سویه 69 بود. سویه 69 به هنگام رشد در فرمانتور 1 lit رنگیزه صورتی- قرمز داشت ولی در کشت پیوسته رنگ سویه‌ها به صورتی کم رنگ تغییر یافت. در این شرایط مقایسه بین جذب نوری نمی‌توانست نمایش دهنده بیومس تولیدی در کشت بسته و پیوسته باشد که با خشک کردن محصول این امر تایید شد. با تعیین وزن خشک محصول در کشت پیوسته مشخص شد که در چنین محیطی با جذب نوری

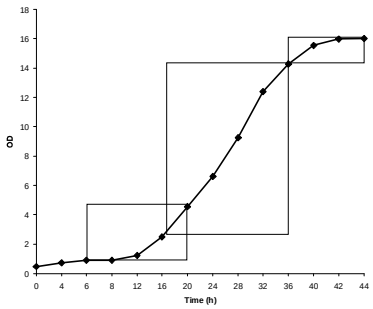
1 Runge Kutta
2 Batch

Archive of SID

www.SID.ir

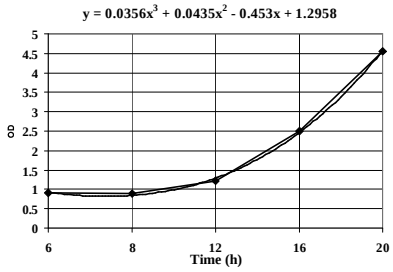
معادل 18، بیومس خشک برابر 25 g/l بود. می‌توان نتیجه گرفت که در کشت پیوسته سویه 69، با فراهم آوردن شرایط بهینه از جمله هوادهی متفاوت و کنترل pH، مقدار تولید به نحوی چشمگیر افزایش یافته بود.

همان طور که ذکر شد برای بهینه‌سازی تولید پروتئین تک یاخته در فرمانتور پیوسته از نرم افزار Math Cad و حل معالات به روش رانکوتا[1] بهره گرفته شد. در نمودار زیر مراحل مختلف سینتیک رشد باکتری در فاز اولیه (کشت بسته) در فرمانتور نمایش داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود فاز لگاریتمی را می‌توان به 3 مرحله تند شونده، ثابت و کنده شونده تقسیم نمود.

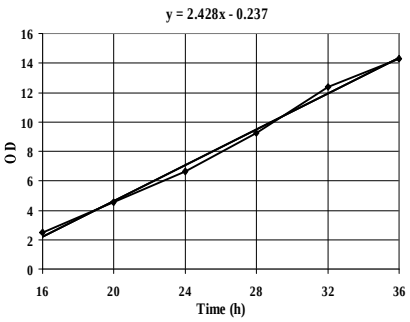


شکل 2- مراحل مختلف رشد در فاز لگاریتمی

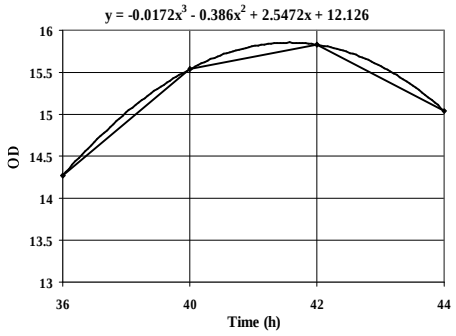
در مرحله بعدی معادله خط مربوط به هر 3 مرحله موجود در فاز لگاریتمی رسم شد که در شکل‌های زیر آورده شده است.



شکل 3- مرحله تند شونده از فاز لگاریتمی

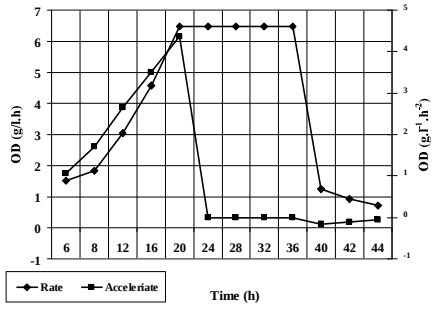


شکل 4- مرحله رشد با سرعت ثابت از فاز لگاریتمی



شکل 5- مرحله کند شونده از فاز لگاریتمی

با مشتق‌گیری از معادلات بالا، سرعت رشد در 3 مرحله یاد شده بدست آمد و با مشتق گیری ثانویه، معادله شتاب رشدی در 3 مرحله فاز لگاریتمی حاصل شد. در شکل 6 نمودارهای مربوط به سرعت و شتاب رشدی نمایش داده شده است.



شکل 6- نمودار سرعت و شتاب رشد در فاز لگاریتمی

با دقت در نمودار فوق می‌توان نتیجه گرفت در زمان‌هایی از رشد که سرعت و شتاب رشدی حداکثر است، شرایط محیطی برای رشد سویه 69 در فرمانتور Deep Jet

1. Runge Kutta

www.SID.ir

مناسب‌تر می‌باشد. بنابراین در بازه زمانی ساعت 16 تا 20، شرایط رشدی برای کسب حداکثر سرعت و شتاب رشد مناسب می‌باشد. فرمانتور پیوسته مجهز به سیستم کنترلی بسیار دقیقی است که تمامی اطلاعات در طی تخمیر در حافظه آن ذخیره می‌گردد. بنابراین با مراجعه به اطلاعات موجود، شرایط بهینه هر عامل موثر بر رشد در بازه زمانی ساعت 16 تا 20 تعیین گردید.

فرمول استوکیومتری بیومس تولیدی متیلوتروف‌ها بر پایه متانول عبارت است از:

$$1.66CH_3OH + 0.29NH_3 + 1.52O_2 \rightarrow CH_{1.88}O_{0.57}N_{0.29} + 0.66CO_2 + 2.82H_2O$$

بر اساس فرمول بالا جرم اتمی عناصر موجود در بیومس تولیدی به صورت زیر محاسبه می‌گردد:

g1H= g12C=
g14N= g16O=

وزن ملکولی بیومس=

$$(1\times12)+(0/57\times16)+(0/29\times14)=27/06$$

با توجه به جرم ملکولی عناصر موجود در 27/06 بیومس خشک می‌توان درصد عناصر تشکیل دهنده آن را نیز محاسبه نمود که عبارت است از:

C= ٪44/346H= ٪6/984

O= ٪33/703N= ٪15/004

با استفاده از آنالیز محصول تولیدی درصد عناصر تشکیل دهنده در بیومس حاصله در کشت پیوسته سویه 69 مشخص شد. با برقراری نسبت بین درصد عناصر تشکیل دهنده این محصول با فرمول استوکیومتری آورده شده در بالا می‌توان ضرایب فرمول استوکیومتری برای محصول تولیدی در کشت پیوسته را تعیین نمود که برابر است با:

$$CH_{1.84}O_{0.596}N_{0.23}$$

موازنه جرم و انرژی در فرمانتور: واکنش صورت گرفته در فرمانتور پیوسته به صورت زیر بود:

$$1.66CH_3OH + 0.29NH_3 + 1.52O_2 \rightarrow CH_{1.88}O_{0.57}N_{0.29} + 0.66CO_2 + 2.82H_2O$$

بازدهی این واکنش بر اساس بیومس تولید شده با متانول ($Y_{x/s}$) به صورت زیر برآورد می‌شود:

$$Y_{x/s} = \frac{\text{Biomass , Coefficien t}}{\text{Substrate , Coefficien t}} \times \frac{C_{\text{Substrate}}}{C_{\text{Biomas s}}} = \frac{\frac{12}{32}}{\frac{12}{27.06}} = 0.51 \frac{g_{\text{Biomass}}}{g_{\text{Substrate}}}$$

سوبسترای کاربردی همان منبع کربن یا متانول می‌باشد. معادله فوق در صورتی صادق است که انرژی مصرفی برای بقای سلول در نظر گرفته نشود.

بر اساس داده‌های آزمایشگاهی میزان واقعی بازده برابر $0/4\ gg^{-1}$ بود. غلظت بیومس خروجی از فرمانتور برابر $25\ g/L$ و زمان ماند میکروبی در فرمانتور برابر $8\ h$ بود. با توجه به بازدهی تولید می‌توان متانول مصرفی را محاسبه نمود:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} \Rightarrow \Delta s = \frac{1.8}{0.4} = 4.5\,kg.h^{-1}$$

این مقدار متانول بر اساس میزان واقعی بازدهی تعیین شده در صورتی که بازدهی بر اساس فرمول موازنه جرم و انرژی محاسبه شود در این صورت مقدار آن برابر خواهد بود با:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} \Rightarrow \Delta s = \frac{1.8}{0.51} = 3.529 kg.h^{-1}$$

تفاوت در میزان مصرف متانول با این دو میزان بازدهی نشان دهنده میزان متانولی است که صرف نگهداری و بقای باکتری‌ها می‌شود که برابر است با:

$$4.5 - 3.529 = 0.971 kg.h^{-1}$$

با افزایش میزان ضریب تبدیل، میزان بازدهی سلولی افزایش می‌یابد. واژه بازدهی[1] بیانگر کارایی تبدیل سوبسترا به پروتئین بوده و معمولاً بر اساس گرم وزن خشک سلولی بر اساس میزان سوبسترای مصرف شده بیان می‌شود. بازدهی به لحاظ پروتئین به ضریب بازدهی سلولی بر اساس میزان منبع کربن مورد استفاده و میزان پروتئین

1. Yield

Archive of SID

www.SID.ir

موجود در میکروازگانیسم بستگی‌دارد. از این رو به هنگام انتخاب یک میکروارگانیسم علاوه بر خصوصیات رشدی باید میزان پروتئین آن را نیز مورد توجه قرار داد.

از مشکلات دنیای کنونی فراهم آرودن نیازهای غذایی به خصوص پروتئین است. در کشورهای جهان سوم، کمبود مواد غذایی سبب مرگ و میر افراد به خصوص کودکان شده و مشکلات زیادی را در پی‌دارد. عدم دسترسی به منابع غذایی به خصوص ترکیبات غنی از پروتئین مشکلی است که روز به روز حادتر می‌شود. به نظر می‌رسد استفاده از تکنولوژی‌های جدید تنها راه غلبه بر این مشکل می‌باشد (13,14). در ایران نیز تهیه غذا به خصوص منابع پروتئین برای تغذیه دام و انسان، یک معضل رو به گسترش است. با توجه به کاهش پودر ماهی داخلی و عدم دسترسی به پودر ماهی وارداتی با کیفیت مناسب، صنایع دام‌پروری با مشکلات زیادی روبرو شده‌اند. بررسی‌های اقتصادی صورت گرفته در پژوهشکده مهندسی جهادکشاورزی نشان داد که تولید پروتئین تک یاخته با استفاده از سوبسترای متانول در ایران اقتصادی بوده و می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

در این تحقیق امکان سنجی تولید پیوسته پروتئین تک یاخته با استفاده از سوبسترای متانول با سویه‌های متیلوتروف بومی ایران مورد بررسی قرار گرفت. سویه متیلوتروف مورد استفاده متعلق به جنس متیلوباکتریوم بوده و بالغ بر 74٪ پروتئین تام داشته و از الگوی مناسب اسیدهای آمینه برخوردار بود.

فرمانتور Deep Jet مورد استفاده‌دارای سیستم کنترلی بسیار دقیقی بود ولی در ابتدای تولید عدم کنترل دقیق شیرهای ورودی و خروجی، سبب شسته شدن سلول‌ها و کاهش شدید سلول‌ها در فرمانتور گردید. برای غلبه بر این مشکل، شیر خروجی بسته شد و فرمانتور در شرایط نیمه پیوسته[1] به کار ادامه داد تا با رشد میکروارگانیسم‌ها شرایط ثابت و پایا دوباره بر قرار گردد. در طی با ورود به فاز لگاریتمی و همگام با رشد سریع میکروارگانیسم‌ها، اکسیژن محلول تقریباً به صفر رسید. در این شرایط حتی با به حداکثر رساندن هوای ورودی، امکان فراهم آوردن اکسیژن مورد نیاز وجود نداشت. از این رو تصمیم گرفت شد تا افزایش شدت جریان مایع (سیرکولاسیون) در لوپ خارجی، کاهش اکسیژن جبران گردد. در نهایت با ایجاد شرایط پایا و پس از خشک کردن مشخص شد که محصول تولیدی برابر با 25 g/l بود. در این شرایط میزان متانول مصرفی برابر 4/5 kg/h و میزان بازدهی $0/4\ gg^{-1}$ به ازای هر گرم متانول مصرفی بود.

در حال حاضر در دنیا تنها یک شرکت دانمارکی با نام نورفرم[2] مبادرت به تولید پروتئین تک یاخته به صورت پیوسته می‌نماید. بنابراین با مقایسه روند تولید و محصول تولیدی می‌توان از مناسب بودن محصول اطمینان حاصل نمود. شرکت نورفرم تولید تجاری خود را از سال 1998 آغاز نموده است. محصول تولیدی آن‌ها (پرونین)دارای تاییدیه اتحادیه اروپا و با کشت متیلوکوکوس کپسولاتوس[3] بر روی متان حاصل می‌شود. برای تولید بیوپروتئین از فرمانتور پیوسته و لوپ به ارتفاع 90 m بهره برده می‌شود. راندمان تولید آن‌ها برابر 3- 2٪ بر پایه وزن خشک می‌باشد (15، 16، 17). مقایسه راندمان تولید دو محصول نشان دهنده کارایی مناسب روند تولید پروتئین تک یاخته در فرمانتور Deep Jet می‌باشد. اما باید در نظر داشت که کارایی این گونه محصولات تنها با میزان بیومس تولیدی تعریف نمی گردد بلکه درصد پروتئین و الگوی پروتئینی آن‌ها نیز اهمیت‌دارد (18و17). در آزمون‌های صورت گرفته در قبل بر روی سویه 69 مشخص شده بود که محصول تولیدی با آن بالغ بر 74٪ پروتئین داشته و آنالیز اسیدهای آمینه آن بیانگر تناسب و غنی بودن محصول به لحاظ اسیدهای آمینه ضروری می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد این محصول می‌تواند جایگزین مناسبی برای مکمل‌های غذایی پروتئین دام و جایگزین پودر ماهی باشد. البته ذکر این نکته ضروری

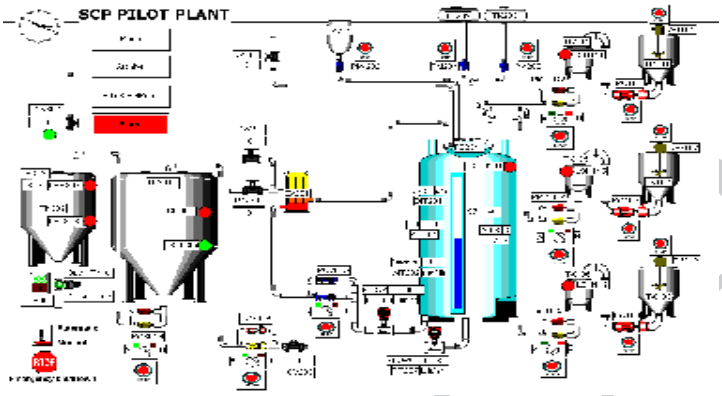
1. Fed Batch

2. Norferm
3. Methylococcus capsulatus

Archive of SID

www.SID.ir

است که با انجام آزمون‌های تکمیلی و بهره گیری از شرایط بهنیه شده در این تحقیق می‌توان بیومس بیشتری را در کشت پیوسته این سویه در فرمانتور Deep Jet انتظار داشت. در ادامه شمایی از فرمانتورها و تجهیزات به کار گرفته شد در این تحقیق آورده شده است (شکل 7).



شکل 7- پایلوت پیوسته تولید نیمه صنعتی پروتئین تک یاخته

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1.Steinkraus K. Indigenous fermented foods in which ethanol is a major product. Handbook of Indigenous fermented foods. 1996;2:363-508.

2.Tannenbaum SR, Wang DIC, Dunlap C, Bellamy W, Rolz C, Anderson C, et al. Single cell protein II1975.

3.Rittmann BE ,McCarty PL. Environmental biotechnology: McGraw Hill New York; 2001.

4.Kharatyan SG. Microbes as food for humans. Annual Reviews in Microbiology. 1978;32(1):301-27.

5.Cooney C, Rha C, Tannenbaum S. Single-Cell Protein: Engineering, Economics, and Utilization in Foods. Advances in food research. 1980;26:1-52.

6.El Nawawy AS, Gnan SO. Isolation and propagation of new methanol - utilizing microorganisms. Biotechnology and Bioengineering. 1983;25(3):863-5.

7.Abu-Ruwaida A, Banat I, Hamdan I. Large-scale production of bacterial biomass from methanol for use as milk-replacer. Biotechnology letters. 1990;12(2):139-44.

8.Putzer K, Buchholz L, Lidstrom M, Remsen C. Separation of methanotrophic bacteria by using percoll and its application to isolation of mixed and pure cultures. Applied and environmental microbiology. 1991;57(12):3656-9.

9.Radajewski S, Webster G, Reay DS, Morris SA, Ineson P, Nedwell DB, et al. Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. Microbiology. 2002;148(8):2331.

10.Lin JL, Radajewski S, Eshinimaev BT, Trotsenko YA, McDonald IR, Murrell JC. Molecular diversity of methanotrophs in Transbaikal soda lake sediments and identification of potentially active populations by stable isotope probing. Environmental microbiology. 2004;6(10):1049-60.

11.Nercessian O, Noyes E, Kalyuzhnaya MG, Lidstrom ME, Chistoserdova L. Bacterial populations active in metabolism of C1 compounds in the sediment of Lake Washington, a freshwater lake. Applied and environmental microbiology. 2005;71(11):6885.

12.Franklin O, Hall EK, Kaiser C, Battin TJ, Richter A. Optimization of biomass composition explains microbial growth-stoichiometry relationships. The American Naturalist. 2011;177(2):E29-E42.

13.Tao L ,Schenzle A, Odom JM, Cheng Q. Novel carotenoid oxidase involved in biosynthesis of 4, 4′-diapolycopene dialdehyde. Applied and environmental microbiology. 2005;71(6):3294-301.

14.Tobias AV, Arnold FH. Biosynthesis of novel carotenoid families based on unnatural carbon backbones: A model for diversification of natural product pathways. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2006;1761(2):235-46.

15.Johannessen A, Kleppe G, Larsen J, Moen E. Method of extracting proteins from a cell. Google Patents; 2006.

16.Bothe H, Møller Jensen K, Mergel A, Larsen J, Jørgensen C, Jørgensen L. Heterotrophic bacteria growing in association with Methylococcus capsulatus (Bath) in a single cell protein production process. Applied microbiology and biotechnology. 2002;59(1):33-9.

17.Marit Berge G, Baeverfjord G, Skrede A, Storebakken T. Bacterial protein grown on natural gas as protein source in diets for Atlantic salmon, Salmo salar, in saltwater. Aquaculture. 2005;244(1-4):233-40.

Archive of SID

www.SID.ir