



پژوهشکده علوم پایه کاربردی

عنوان طرح:

تولید محصول میکروبی ازدیاد برداشت مخازن نفت خام با قابلیت حذف باکتری‌های SRB و کاهش H_2S مخزن

گزارش پیشرفت ۲

- ۱- بهینه سازی فرایند تولید نیمه صنعتی محصول
- ۲- تولید و فرمولاسیون نمونه نیمه صنعتی محصول

کارفرما:	جهاد دانشگاهی – معاونت پژوهشی
واحد مجری:	پژوهشکده علوم پایه کاربردی – گروه پژوهشی میکروبیولوژی نفت
مجری طرح:	علی ابوالحسنی سورکی

تاریخ تنظیم: ۱۳۹۹/۱۲/۰۹

بنام خداوند جان و خرد

فهرست مطالب

۱- مقدمه.....	۱
۱-۱- فرایندهای تخمیری برای تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی.....	۲
۱-۱-۱- استراتژی‌های تخمیری.....	۲
۱-۱-۱-۱- فرایندهای تخمیری batch.....	۲
۱-۱-۱-۲- فرایندهای تخمیری fed-batch.....	۳
۱-۱-۱-۳- کشت پیوسته.....	۳
۱-۱-۲- موانع و مشکلات تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی در یک بیوراکتور.....	۴
۱-۲-۱-۱- معضل پراکنده‌سازی.....	۴
۱-۲-۱-۲- مشکلات ناشی از کف.....	۵
۱-۲-۱-۳- آنالیز هزینه تولید محصول بیوسورفکتانت از منظر علمی.....	۱۰
۱-۲-۱-۴- محصولات با بیوسورفکتانت میکروبی و پارامترهای هزینه.....	۱۱
۱-۲-۲-۱- روشها و پارامترهای تعیین هزینه.....	۱۳
۱-۲-۲-۱-۱- هزینه‌های سرمایه‌ای.....	۱۴
۱-۲-۲-۲-۱- هزینه‌های تولید.....	۱۴
۱-۲-۲-۳- هزینه‌ی تولید بیوسورفکتانت.....	۱۶
۱-۳- استراتژی‌هایی برای تولید تجاری بیوسورفکتانت.....	۱۹
۲- بهینه‌سازی تولید نیمه‌صنعتی محصول.....	۲۰
۲-۱- مقدمه.....	۲۱
۲-۲- فرمانتور صنعتی مورد استفاده.....	۲۲
۲-۳- استراتژی فرمانتاسیون.....	۲۲
۲-۴- انتخاب محیط کشت بهینه تولید بیوسورفکتانت.....	۲۳
۲-۴-۱- محیط کشت صنعتی جهت مرحله تولید بیوماس سلولی.....	۲۳
۲-۴-۲- انتخاب منبع کربنی محیط کشت صنعتی جهت تولید محصول.....	۲۷
۲-۵- بهینه‌سازی میزان هوادهی جهت تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی در فرمانتور صنعتی.....	۲۹
۳- ارزیابی و انتخاب فرایندهای پایین‌دستی.....	۳۱
۳-۱- مقدمه.....	۳۲

- ۳-۲- انتخاب روش بهینه استخراج و فرمولاسیون محصول ۳۵
- ۳-۲-۱- روش آزمایش ۳۵
- ۳-۲-۱-۱- استخراج با حلال دی کلو متان ۳۶
- ۳-۲-۱-۲- رسوب دهی با اسید سولفوریک ۳۶
- ۳-۲-۱-۳- تغلیظ به روش اسپری درای ۳۷
- 4- تولید نیمه صنعتی محصول ۳۸
- ۴-۱- فرایند فرمانتاسیون ۳۹
- ۴-۲- فرایندهای پایین دستی ۴۰
- ۴-۳- فرمولاسیون محصول نهایی، بلندینگ و بسته بندی ۴۰
- منابع ۴۲

فهرست شکل‌ها و جدول‌ها

- شکل ۱-۱- طرح شماتیک یک بیوراكتور دیسک چرخان ۸
- شکل ۱-۲- طرح شماتیک بیوراكتور غشایی عاری از حباب ۹
- جدول ۱-۱- بازده و میزان بهره‌وری تولید انواع مختلف بیوسورفکتانت‌ها ۱۲
- جدول ۱-۲- هزینه‌ی تولید و قیمت بازاری بیوسورفکتانت‌های مختلف ۱۷
- شکل ۲-۱- فرمانتور صنعتی مورد استفاده در تولید محصول ۲۲
- جدول ۲-۱- ترکیب ملاس چغندر قند مورد استفاده ۲۴
- شکل ۲-۲- منحنی تولید بیوماس توسط سویه KE1 در فرمانتور با محیط ملاس چغندر قند (۲٪) و آب استیپ (۱٪) ۲۶
- شکل ۲-۳- تولید بیوسورفکتانت (امولسیفیکاسیون هگزادکان) با استفاده از منابع کربنی هیدرو فوب توسط سویه KE1 در فرمانتور نیمه صنعتی ۲۸
- شکل ۲-۴- بهینه‌سازی میزان هوادهی در فرمانتور نیمه صنعتی جهت تولید بیوسورفکتانت توسط سویه KE1 ۳۰
- جدول ۳-۱- فرایندهای پایین دستی مختلف در تولید بیوسورفکتانت‌ها و مزایا و اساس روشهای اجرایی آنها ۳۳
- جدول ۴-۱- شرایط فرمانتاسیون در فرمانتور نیمه صنعتی ۳۹
- جدول ۴-۲- فرمولاسیون نهایی محصول ازدیاد برداشت با پایه بیوسورفکتانت میکروبی ۴۱

١ - مقدمه

۱-۱- فرایندهای تخمیری برای تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی

در گزارش قبلی توضیح داده شد که پایه ساختار محصول میکروبی ازدیاد برداشت مخلوطی از بیوسورفکتانت‌های میکروبی بوده و از این جهت خواص فیزیکی بسیار متنوعی را از خود نشان می‌دهند. به دلیل خواص کف کنندگی، کاهش کشش سطحی و ویژگی‌های امولشن‌سازی این ترکیبات، فرایندهای تخمیری آن‌ها در بیوراکتورها مشکلات مخصوص به خود دارد. به عنوان مثال بیوسورفکتانت‌هایی نظیر رامنولپید و مانوزیل‌اریتریتول را می‌توان در گروه بیوسورفکتانت‌های با کف کنندگی بالا جای داد، درحالی‌که سوفورولپیدها از نوع بیوسورفکتانت‌های با کف کنندگی کم می‌باشند [۱].

بر اساس این تنوع ویژگی، چندین نوع سیستم بیوراکتوری از انواع استاندارد مانند بیوراکتورهای مخزنی همزن‌دار تا انواع اختصاصی مانند بیوراکتورهای دیسک چرخان برای تولید بیوسورفکتانت‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۲].

۱-۱-۱- استراتژی‌های تخمیری

از دیدگاه استراتژی‌های تخمیری، دستورالعمل مشخص و ثابتی را نمی‌توان برای تولید بیوسورفکتانت‌ها تجویز نمود. در این رابطه انواع فرایندهای تخمیری شامل batch، fed-batch و continuous مورد استفاده قرار گرفته است.

۱-۱-۱-۱- فرایندهای تخمیری batch

کشت میکروارگانیسم‌ها با فرآیند تخمیری batch در تولید بسیاری از انواع بیوسورفکتانت‌ها با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است. به عنوان مثال تولید رامنولپید توسط *Pseudomonas aeruginosa* را می‌توان به عنوان مدلی از فرآیند تخمیری batch نام برد [۱]. در این استراتژی تخمیری، فرآیند تنظیم غلظت سوبسترا در بیوراکتور و یا کنترل نرخ رشد در طول دوره تخمیر امکان‌پذیر نیست. حالت پیشرفته

فراینده تخمیری شامل چندین بیوراکتور batch که به صورت سری به دنبال هم عمل می‌نمایند، نیز در تولید بیوسورفکتانت‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۳].

۱-۱-۱-۲- فرآیندهای تخمیری fed-batch

زمانی که استراتژی تخمیری fed-batch مورد استفاده قرار گیرد، غلظت سوبسترا و در نتیجه نرخ رشد میکروارگانیسم را می‌توان با افزودن خوراک بیوراکتور (سوبسترا) در طول دوره تخمیر کنترل نمود. این مکانیسم تنظیمی می‌تواند باعث تولید مقادیر بسیار بالای بیوسورفکتانت در فرآیند تخمیر شود. یک مثال در این زمینه تولید سوفورولپید می‌باشد [۴].

با استفاده از سیستم fed-batch، فرآیند تولید می‌تواند به فاز تقسیم شود: در فاز نخست بیوماس سلولی به میزان زیادی تولید می‌شود در حالی که تولید بیوسورفکتانت ممکن است پایین باشد. بعد از رسیدن به فقر نیترات تولید بیوماس متوقف شده و با خوراک‌دهی بیوراکتور با سوبستراهای گلوکز و استرهای روغن هسته انگور، سوفورولپید با نرخ بسیار بالا شروع به تولید می‌نماید. فرایندهای مهار تولید بیوسورفکتانت نیز با ایجاد شرایطی در محیط کشت که منجر به حل شوندگی کمتر محصول در فاز آبی محیط کشت می‌شود، ممانعت می‌گردد. این پروسه فرمانتاسیون می‌تواند به تولید بیش از ۳۲۰ گرم در لیتر معادل ۶۵ درصد مقدار منبع کربن منجر شود. بالاترین میزان تولید سوفورولپید با بهره‌گیری از سیستم تخمیری دو مرحله‌ای به میزان ۴۲۲ گرم در لیتر گزارش شده است.

۱-۱-۱-۳- کشت پیوسته

سومین استراتژی تولید بیوسورفکتانت‌ها، فرمانتاسیون پیوسته می‌باشد. دو مثال در این زمینه عبارت‌اند از: تولید سورفاکتین به وسیله باکتری باسیلوس سابتیلیس و تولید رامنولپید توسط باکتری سودوموناس آئروجینوزا. نرخ افزودن محیط کشت برای تولید بهینه سورفاکتین بسیار کم بوده و معادل ۰.۰۶۵ در ساعت می‌باشد و برای رامنولپید، این مقدار معادل ۰.۱ تا ۰.۲ در ساعت گزارش شده است.

۱-۱-۲- موانع و مشکلات تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی در یک بیوراکتور

تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی شامل چندین جنبه مشکل‌دار می‌باشد. اغلب در تولید بیوسورفکتانت‌ها استفاده از یک منبع کربن هیدروفوب به دلیل تحریک میکروارگانیسم جهت تولید بیوسورفکتانت دارای مزیت می‌باشد [۵]. علاوه بر این، سوبستراهای دیگر مانند یک فاز غیر محلول در آب مانند یک پلیمر در محیط کشت با پایه آبی نیز محیط‌های مناسبی جهت تولید بیوسورفکتانت‌ها گزارش شده‌اند. در این محیط‌ها که به‌عنوان مثال برای تولید سورفاکتین مورد استفاده قرار می‌گیرند، سلول‌های باکتری و محصول در دو فاز مجزا تجمع می‌یابند، که این امر باعث ممانعت از اثر مهار غلظت بالای محصول بر تولید آن توسط باکتری می‌گردد. با این وجود، در این سیستم جهت دستیابی به راندمان مطلوب تولید محصول، سیستم محیط کشت دوفازی باید به شیوه مناسبی به هم زده شود که این می‌تواند یک چالش مهم در فرآیند تخمیری ایجاد نماید.

مشکل دیگر در تولید بیوسورفکتانت‌هایی است که خود به‌عنوان یک عامل کف‌کننده باعث ایجاد کف به میزان زیاد در فرماتور می‌شوند. در این خصوص اگر از یک منبع کربن هیدروفوب استفاده شود، این سوبسترا خود می‌تواند در اوایل فرایند رشد باکتری به‌عنوان یک ضدکف عمل نماید. با این وجود منبع کربن هیدروفوب در طول دوره رشد و تولید محصول مصرف می‌شود. علاوه بر این متابولیت‌های حد واسطی نظیر اسیدهای چرب به دلیل خواص دوگانه دوستی که دارند نیز می‌توانند تولید کف را تشدید نمایند. بنابراین در تولید بیوسورفکتانت‌ها استفاده از عوامل ضدکف به‌شدت مورد نیاز می‌باشد.

۱-۱-۲-۱- معضل پراکنده‌سازی

بیوسورفکتانت‌ها به دلیل خواص دوگانه دوستی خود قادرند مواد هیدروفوب را در محیط کشت آبی پراکنده کنند. بنابراین مشکلات مربوط به پراکنده‌سازی فاز هیدروفوب محدود به مراحل اولیه فرایند فرمانتاسیون می‌شود. برای این منظور در بسیاری از فرآیندهای تولید بیوسورفکتانت‌ها، راکتورهای مخزنی

همزن‌دار به پره‌های شعاعی به نام راشتون مجهز می‌شوند. این پره‌ها می‌توانند به مخلوط و پراکنده کردن منبع کربنی غیر محلول در آب کمک کنند. با این وجود، این پره‌ها قابلیت مخلوط سازی عمودی یا محوری را ندارند و کارایی آن‌ها در مخلوط نمودن فاز هیدروفوب بالایی در فاز هیدروفیل پایینی نسبتاً محدود می‌باشد. علاوه بر این توربین‌های راشتون فاقد ظرفیت همزنی مناسب به‌ویژه برای محیط کشت کف‌کننده در انتهای فرایند فرمانتاسیون هستند. برای حل این مشکل استفاده از پره‌های همزن محوری یا اکسیال به همراه پره‌های همزن شعاعی یا رادیال پیشنهاد می‌شود. علاوه بر این یک همزن فوم نیز می‌تواند جهت مخلوط سازی مؤثر محیط کشت کف‌دار مورد استفاده قرار گیرد. این همزن‌ها دارای تیغه‌های بزرگی بوده که در سطح محیط کشت در فرماتور باعث ایجاد تلاطم و پراکنده شدن کف می‌شوند [۶].

۱-۲-۲- مشکلات ناشی از کف

به‌طور کلی پراکنده شدن گاز در محیط مایع را کف می‌نامند. از لحاظ ساختاری دو گروه متمایز کف قابل تشخیص می‌باشد. کف آبدار (wet foam) یا کوگلشام (Kugelschaum) عمدتاً در زیر سطح مایع شکل گرفته و از حباب‌های کوچک کروی شکل تشکیل شده است که به‌وسیله‌ی دیواره‌های ضخیم از یکدیگر جدا شده است. نوع دیگری از کف که بعد از رسیده شدن شکل می‌گیرد، کف خشک (dry foam) یا پلی‌ادرشام (polyederschaum) نام دارد و دارای جداره‌های نازک به نام لاملا است که این لاملاها در ناحیه اتصال بین حباب‌ها مسطح می‌باشند. فرایند رسیده شدن کف به سبب مکانیسم‌های مختلفی می‌تواند باشد. کاهش میزان آب موجود در کف به دلیل نیروی جاذبه و یا اثر موینگی می‌تواند منجر به نازک شدن لاملاها و ایجاد کف خشک‌تر شود. علاوه بر این، فشار لاپلاس نیز می‌تواند منجر به انتشار گاز از حباب‌های کوچک‌تر به حباب‌های بزرگ و ایجاد کف‌های درشت‌تر شود [۷].

با در نظر گرفتن این سینتیک ناپایدار، کف‌های موقتی با طول عمر در حد چند ثانیه از کف‌های پایدار و یا دائمی با طول عمر چندین ساعت تا چندین روز قابل تفکیک می‌باشند. کف‌های پایدار اغلب در

محیط‌های حاوی مولکول‌های دوگانه دوستی مانند بیوسورفکتانت‌ها ایجاد می‌شوند. در یک محیط آبی به دلیل نیروی دافعه هیدروفیل-هیدروفوب، انتهای آب‌گریز مولکول‌های بیوسورفکتانت‌ها به سمت بیرون از محیط هیدروفیل آبی آرایش می‌گیرند. این باعث تجمع مولکول‌های بیوسورفکتانت در دیواره حباب‌ها و پایدار نمودن کف می‌شود [۸]. چندین نیروی مولکولی متفاوت در پایدارسازی یا ناپایداری کف نقش بازی می‌کنند. تأثیرات پایدارکننده مولکول‌های دوگانه دوست عبارت‌اند از پایدارسازی استری و کشسانی گیبس-مارانگوری (Gibbs-Marangoni elasticity). پایدارسازی استری زمانی اتفاق می‌افتد که به‌عنوان یک سورفکتانت یونی (دارای بار الکتریکی) در محیط وجود داشته باشد. در این مورد سطح حباب‌های مجاور، یکدیگر را دفع نموده و مانع از خارج شدن مایع از حباب‌ها می‌شوند که این منجر به پایداری کف می‌شود. اگر دیواره حباب‌ها به‌صورت ناحیه‌ای و غیریکنواخت نازک شود، غلظت مولکول‌های دوگانه‌دوست در آن ناحیه کم می‌شود. این گرادین غلظتی منجر به مهاجرت مولکول‌های دوگانه‌دوست از درون مایع اصلی به سمت حباب‌های این ناحیه می‌شود تا تعادل نیروی کشش سطحی برقرار شود. این متعادل‌سازی به اصطلاح کشانی گیبس-مارانگوری نامیده می‌شود.

کف شکن‌ها

کف شکن‌ها اصلی‌ترین عوامل از بین برنده کف در طول فرمانتاسیون می‌باشند. استراتژی‌های مختلفی برای این منظور به کار می‌رود:

۱/۱/۲/۲/۱/۱ عوامل ضد کف

یکی از مرسوم‌ترین استراتژی‌های کنترل کف، استفاده از عوامل شیمیایی ضدکف می‌باشد. ترکیب شیمیایی بسیاری از ضدکف‌ها پیچیده و به دلایل تجاری محرمانه و ناشناخته هستند، ولی عمدتاً شامل سورفکتانت‌ها، مواد روغنی و ذرات هیدروفوب با قطر ذرات ۱ تا ۱۰ میکرون می‌باشند [۸]. عوامل ضدکف را می‌توان بر اساس مکانیسم عمل به دو گروه تقسیم‌بندی نمود. عوامل کف‌زدا (defoamer) در طول

فرایند فرمانتاسیون به محیط کشت اضافه می‌شوند تا باعث شکستن کف شوند. درحالی‌که عوامل ضدکف (antifoamer) معمولاً قبل از شروع فرمانتاسیون و جهت ممانعت از ایجاد کف به مخلوط محیط کشت اضافه می‌شوند. علی‌رغم این تقسیم‌بندی‌ها روش عملکرد این ترکیبات پیچیده بوده و تاکنون به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. هرچند استفاده از عوامل ضد کف یکی از روش‌های ساده و مرسوم کنترل کف در فرمانتورها می‌باشد، با این‌وجود استفاده از این عوامل می‌تواند تأثیرات نامطلوبی را نیز در پی داشته باشد. یکی از این تأثیرات، کاهش نرخ انتقال اکسیژن در محیط کشت داخل فرمانتور است. همچنین عوامل ضد کف معمولاً در مقایسه با محصول نهایی (بیوسورفکتانت) نسبتاً گران‌قیمت بوده و می‌توانند هزینه تمام‌شده محصول را افزایش دهند. علاوه بر این به دلیل تشابه خواص شیمیایی ضدکف‌ها با بیوسورفکتانت‌ها، فرآورده‌های پایین‌دستی تخلیص محصول نهایی بسیار مشکل می‌شود.

۱/۱/۲/۲/۱/۲ کف‌شکن‌های مکانیکی

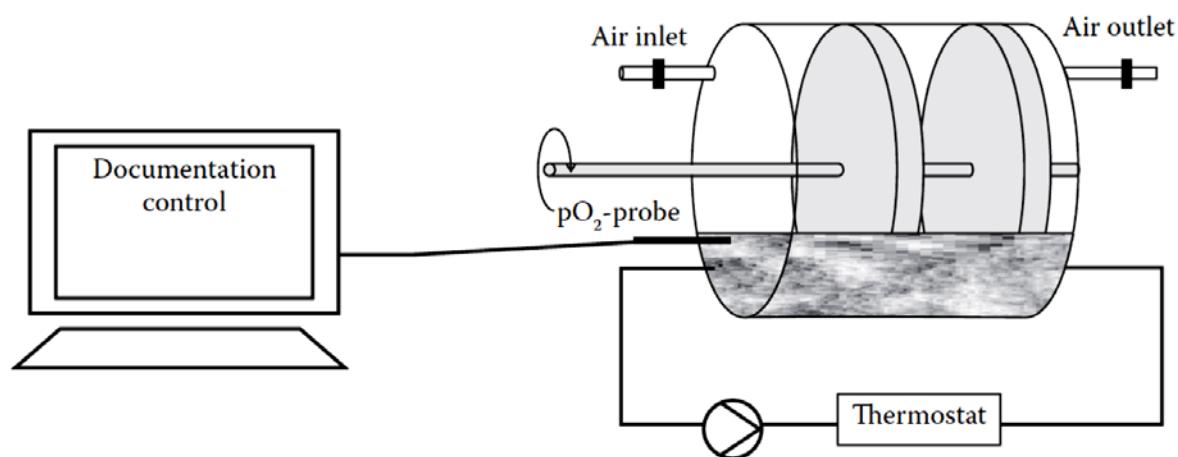
امروزه روش‌های مکانیکی از بین بردن کف در فرمانتورها به‌عنوان جایگزینی برای استفاده از عوامل شیمیایی ضدکف توسعه‌یافته‌اند. مکانیسم‌های اصلی عملکرد کف‌شکن‌های مکانیکی عبارت‌اند از تنش برشی (shear stress) و روش‌های مبتنی بر تغییرات فشار. کف‌شکن‌های مکانیکی می‌توانند بر روی میله همزن نصب شوند و یا به‌صورت مستقل در داخل فرمانتور قرار گیرند.

ممانعت از تشکیل کف

استراتژی دوم جهت رفع مشکلات ناشی از ایجاد کف در پروسه‌های تولید بیوسورفکتانت‌ها در فرمانتور، ممانعت از تشکیل کف از ابتدا می‌باشد. علاوه بر استفاده از عوامل ضدکف جهت ممانعت از تشکیل کف که در بالا توضیح داده شد، استراتژی‌های فرمانتاسیون بهینه‌سازی شده نیز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند:

۱/۱/۲/۲/۱/۳ بیوراکتورهای دیسک چرخان

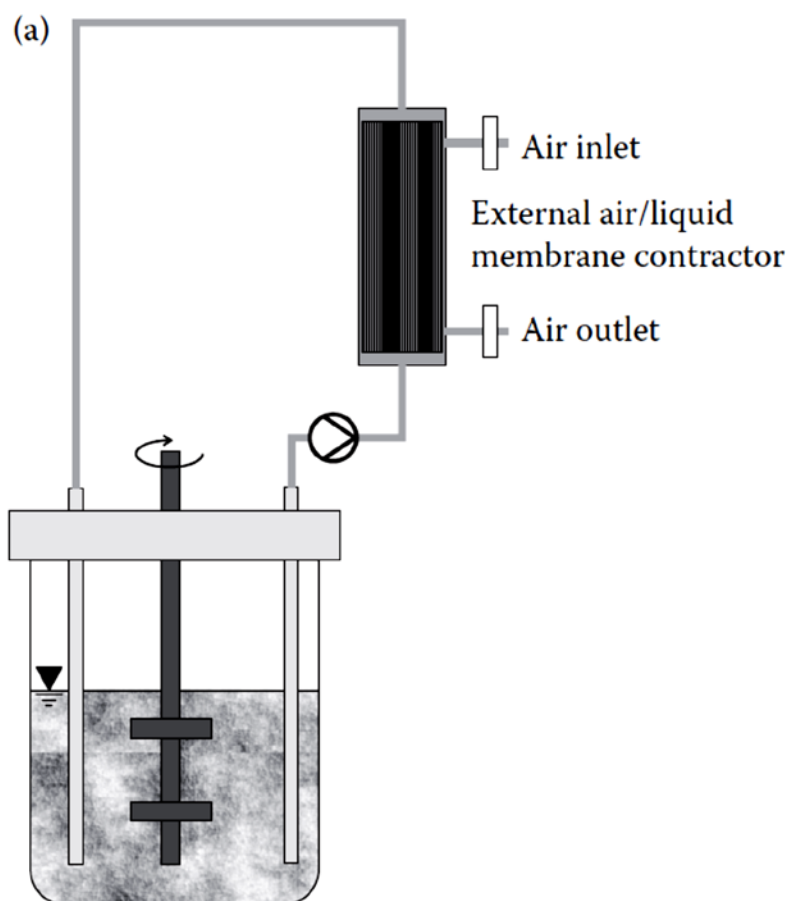
یک روش ابداعی جهت ممانعت از تشکیل کف، استفاده از فرمانتورها یا بیوراکتورهای دیسک چرخان است که در شکل زیر نشان داده شده است. در این فرمانتورها دیسک‌های چرخان که وظیفه هم زدن و همچنین انتقال اکسیژن را دارند، مانع از وارد شدن حباب‌های هوا در محیط مایع فرمانتاسیون و در نتیجه ایجاد کف، می‌شوند.



شکل ۱-۱- طرح شماتیک یک بیوراکتور دیسک چرخان

۱/۱/۲/۲/۱/۴ بیوراکتورهای غشایی عاری از حباب

یک روش دیگر هوادهی بدون ایجاد حباب در محیط کشت، استفاده از بیوراکتورهای غشایی است. این بیوراکتورها در ابتدا به منظور کشت سلول‌های حیوانی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. مکانیسم عمل این بیوراکتورها بر پایه انتشار اکسیژن از طریق رشته‌های فیبری توخالی به درون مایع اطراف و بدون ایجاد حباب می‌باشد [۹]. ساختار غشاء از مواد هیدروفوبی مانند تفلون، پلی‌پروپیلن، پلی‌اتر سولفون یا پلی‌اتیلن تشکیل شده که به دلیل منافذ مولکولی خود اجازه انتقال اکسیژن را می‌دهند در حالی که مایع محیط کشت قادر به عبور از آن نیست.



شکل ۲-۱- طرح شماتیک بیوراکتور غشایی عاری از حباب

۱-۲- آنالیز هزینه تولید محصول بیوسورفکتانت از منظر علمی

استفاده از سورفکتانت‌های شیمیایی در طول دهه‌ی گذشته بسیار افزایش یافته است، که این موضوع اساساً نتیجه‌ی کاربرد این محصولات در پروسه‌های مختلف صنعتی شامل غذا، پاک‌کننده‌ها، بازیافت نفت و زیست‌پالایی محیط‌زیست می‌باشد. تولید جهانی سورفکتانت‌های سنتزی ۱۳ میلیون تن در سال ۲۰۰۸ بود و انتظار می‌رود کل بازار سورفکتانت تا سال ۲۰۱۸ به درآمدی بالغ بر ۴۱ میلیارد دلار برسد [۱۰].

افزایش آگاهی درباره‌ی اثر منفی سورفکتانت‌های شیمیایی بر محیط‌زیست باعث جلب توجه عمومی جهت استفاده از سورفکتانت‌های بی‌خطر برای محیط‌زیست شده است. در مقابل سورفکتانت‌های سنتزی شیمیایی، بیوسورفکتانت‌ها سمیت کمتری داشته و قابلیت تجزیه‌ی زیستی نیز دارند و همچنین در محدوده‌ی PH وسیعی پایدارند. به‌علاوه سورفکتانت‌های میکروبی ساختارهای شیمیایی گوناگونی را دارا هستند که این ویژگی استفاده از این مولکول‌ها را در زمینه‌های مختلف مثل انرژی، محیط‌زیست و سلامت مطلوب کرده است. طبق نظرسنجی‌های اخیر توسط محققین، انتظار می‌رود حجم بازار جهانی سورفکتانت تا سال ۲۰۱۸ به بیش از ۴۷۶.۵۰۰ تن در سال برسد. حجم بازار جهانی بیوسورفکتانت در سال ۲۰۱۱ حدود ۱.۷ میلیارد دلار بود و با لحاظ نمودن افزایش رشد ۳/۵ درصدی سالیانه برای آن، انتظار می‌رود که تا سال ۲۰۱۸ به بیش از ۲.۲۱ میلیارد دلار برسد. شرکت‌های بزرگی چون BAST-Cogns و ECOVER موارد جدیدی هستند که به سمت تولید بیوسورفکتانت گام برداشته‌اند اما شرکت Jeneil در این زمینه کاملاً شناخته شده است. شرکت‌های AGAE Technologies LLC و Rhamnopl Inc رامنولپید تولید می‌کنند درحالی‌که Fraunhofer IGB در زمینه‌ی تولید صنعتی mannosylerythritol lipids فعالیت دارد. شرکت‌های دیگری که در تولید بیوسورفکتانت فعالیت می‌کنند شامل Saraya، Ecochem Ltd (Canada)، (Japan)، Sigma Aldrichco.(USA) و Intobio (South Korea) می‌باشند.

با وجود افزایش نیاز به سورفکتانت‌های میکروبی در میان مصرف‌کننده‌ها، فقدان هزینه‌ی رقابتی این مواد هنوز یک محدودیت بزرگ برای تجاری‌سازی موفق این محصولات می‌باشد. هرچند تلاش‌های محققان با بهینه‌سازی محیط و دیگر پروسه‌های فرمانتاسیون در جهت افزایش تولید بیوسورفکتانت‌های میکروبی تا چندین برابر نیز موفقیت‌آمیز بوده است.

۱-۲-۱- محصولات با بیوسورفکتانت میکروبی و پارامترهای هزینه

گروه متنوعی از میکروارگانیسم‌ها، به‌ویژه باکتری‌ها و مخمرها، بیوسورفکتانت‌ها که مواد اولیه محصولات ازدیاد برداشت نفت هستند را به‌صورت خارج سلولی یا به‌صورت بخشی از غشای سلولی (جهت افزایش دسترسی به سوبسترا و انتقال مواد غذایی) سنتز می‌کنند. این مولکول‌ها بر اساس وزن مولکولی، ترکیب ساختاری و منبع میکروبی به گروه‌هایی از جمله گلیکولیپید، لیپوپپتید، پلیمری و ذرات سورفکتانتی تقسیم می‌شوند. هرچند سورفکتانت‌های میکروبی دارای ساختارهای متنوع و ویژگی‌های شیمیایی بهتری نسبت به نمونه‌های سنتزی می‌باشند، اما در زمینه‌ی قیمت و ظرفیت تولید قادر به غلبه بر سورفکتانت‌های شیمیایی نیستند.

تلاش‌های محققان برای پیشرفت در فناوری‌های تولید بیوسورفکتانت تا حدی به افزایش محصولات تولیدشده کمک کرده است و محققین امیدوارند با توسعه‌ی فناوری این امکان را بیشتر کنند. جدول ۱-۱ بیوسورفکتانت‌های در دسترس را به‌صورت خلاصه آورده است. در میان سورفکتانت‌های مختلف میکروبی، گلیکولیپیدهایی مانند سوفورولیپیدها و رامنولیپیدها، موارد نویدبخش برای تولید در حجم زیاد و تجاری‌سازی موفق هستند که این به علت ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بالا بودن عملکرد محصول آن‌ها می‌باشد.

جدول ۱-۱- بازده و میزان بهره‌وری تولید انواع مختلف بیوسورفکتانت‌ها

Biosurfactant	Microorganism	Substrate	Yield (g/L)	Productivity (mg/L/h)
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	Glucose	6.45	190
Surfactin + Fengycin	<i>B. circulans</i>	Glucose	6.98	320
Lipopeptide biosurfactant	<i>B. subtilis</i> C9	Glucose	7.0	97
Sophorolipid	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Lactose + Rapeseed Oil	422	720
Sophorolipid	<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	Glucose + Fat	120	1765
Rhamnolipid	<i>P. aeruginosa</i> DSM 7107	Soybean oil	112	424
Rhamnolipid	<i>P. aeruginosa</i> UI 29791	Corn oil	46	240
Trehaloselipid	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43215	Mihagol L	32	200
Trehaloselipid	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> BN38	Hexadecane	3.1	82
Mannosylerythritol lipid + cellobiose lipid	<i>Ustilago maydis</i>	Glucose	23	–

سوفورولیپیدها در غلظتی بالای ۴۰۰ گرم در لیتر در مقیاس تجاری تولید می‌شوند و هم‌اکنون در فرمولاسیون مواد ضد عفونی‌کننده و پاک‌کننده به کار می‌روند. بیوسورفکتانت گلیکولیپیدی دیگری به نام رامنولیپید نیز تجاری‌سازی شده و با ماکسیمم غلظت حدود ۱۱۲ گرم بر لیتر توسط *P. aeruginosa* DSM 7107 تولید می‌شود که این باکتری از روغن سویا به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کند. با توجه به اینکه این مولکول‌ها در مقادیر بالاتر تولید می‌شوند، می‌توانند با قیمت کمتری و در زمینه‌های مناسبی بر اساس میزان خلوص استفاده شوند. به‌عنوان مثال گلیکولیپیدهای با خلوص کمتر، در کاربردهای محیط‌زیستی

مثل زیست‌پالایی و مقابله با لکه‌های نفتی در دریا نفت به کار می‌رود. درحالی‌که از مولکول‌هایی با خلوص بالاتر می‌توان در مواد آرایشی به‌عنوان امولسیفایر استفاده کرد.

بیوسورفکتانت‌های لیپوپتیدی در مقادیر کمتری تولید می‌شوند اما ارزش بیشتری دارند که بیشتر به علت ویژگی‌های زیستی خاص آن‌ها می‌باشد. درباره‌ی لیپوپتید سورفاکتین گزارش شده است که دارای فعالیت‌های ضد میکروبی، سیتوتوکسیک و ضد چسبندگی می‌باشد، ازاین‌رو از این مولکول‌ها به‌عنوان محصولاتی با حجم کم اما ارزش زیاد که پتانسیل زیادی برای کاربردهای دارویی و آرایشی در صنعت دارند استفاده می‌شود.

محققان در حال تلاش برای افزایش محصولات لیپوپتیدی جهت مقرون‌به‌صرفه کردن آن‌ها می‌باشند. با بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت و شرایط کشت که با استفاده از ابزارهای محاسباتی پیشرفته انجام شد، ماکسیمم غلظت ۶/۹۴ گرم در لیتر با سرعت ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر در یک ساعت برای لیپوپتید به دست آمد. در مطالعه‌ی دیگری با جهش‌زایی *B. subtilis* SD901 با استفاده از ماده‌ی جهش‌زای *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine محصول سورفاکتین افزایش یافت، به‌طوری‌که به ماکسیمم غلظت ۵۰ گرم بر لیتر رسید.

۱-۲-۲- روش‌ها و پارامترهای تعیین هزینه

یک گام ضروری قبل از اجرای هر پروژه، ارزیابی اقتصادی آن می‌باشد که این پروسه نیازمند علم کافی و همچنین نظم مهندسی می‌باشد. کل هزینه‌ی آنالیز تولید یک محصول بیولوژیکی، شامل تخمین سرمایه‌های موردنیاز و هزینه‌های عملیات می‌باشد که بر اساس سایز و تعداد تجهیزات پروسه، مواد خام موردنیاز و دیگر منابع مصرفی تعیین می‌شود. قیمت‌ها بر اساس خرید تجهیزات موردنیاز، ساخت ساختمان - های موردنیاز و مواد مصرفی در ماه‌های اولیه می‌باشد [۱۱].

۱-۲-۲-۱- هزینه های سرمایه ای

هزینه های سرمایه ای مجموع همه ی هزینه های غیرمصرفی شامل خرید تجهیزات، نصب، ساختمان سازی و امکانات کمکی می باشد. قیمت خرید تجهیزات می تواند بر اساس اطلاعاتی از کارپردازان و همچنین داده های منتشر شده تخمین زده شود. تجهیزات مورد نیاز عمدتاً شامل تانک های مخزن، فرمانتور، سانتریفیوژ دکانتر، اسپری درایر، وکیوم درایر و واحدهای دهیدراتاسیون غربالگری مولکولی است. مقدار و نوع تجهیزات و در نتیجه هزینه های مورد نیاز بر اساس نوع بیوسورفکتانت تولیدی متفاوت است. به عنوان مثال تولید سورفاکتین علاوه بر استخراج با حلال به تخلیص با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا نیز نیاز دارد، در صورتی که تنها مرحله ی تخلیص در تولید سوفورولپید استفاده از استخراج با حلال می باشد. فاکتور دیگری که بر قیمت تجهیزات اثر می گذارد مواد مورد استفاده در ساخت و ساز می باشد. برای مثال قیمت یک لوله ی (vessel) استیل ضد زنگ در حدود ۳-۲/۵ برابر بیشتر از یک لوله ی استیل کربنی است و به همین ترتیب قیمت یک لوله ی ساخته شده از تیتانیوم ۱۵ برابر بیشتر از یک تانک استیل کربنی می باشد.

۱-۲-۲-۲- هزینه های تولید

هزینه های تولید بیوسورفکتانت شامل مواردی چون مواد خام، مواد مصرفی، کارگر، تعمیرات و استهلاک تجهیزات، دفع ضایعات و آیتم های وابسته به امکانات می باشد. قیمت تمام شده تولید بیوسورفکتانت را می توان بر اساس نسبت هزینه ی عملیاتی سالیانه بر نرخ تولید سالیانه ی بیوسورفکتانت تخمین زد. قیمت واحد تولید متناسب با معکوس حجم بازار بیوسورفکتانت می باشد. قیمت بیوسورفکتانت های گلیکولپیدی همچون سوفورولپیدها که در مقادیر زیادی تولید می شوند ۲-۵ دلار برای هر کیلوگرم می باشد. در حالی که قیمت تولید یک گرم بیوسورفکتانت لیپوپتیدی مثل

سورفاکتین و ایتورین در محدوده‌ی ۱۵۰۰۰-۱۰۰۰۰ دلار می‌باشد که این به علت امکان تولید کم آن‌ها می‌باشد.

هزینه مواد خام

به‌طور کلی هزینه‌ی مواد خام بخش اصلی هزینه‌های مربوط به محصولات تخمیری را تشکیل می‌دهد و حدود ۸۰-۱۰٪ از کل قیمت عملیات را شامل می‌شود. برای محصولات حجم بالا ولی ارزش کم مثل سوفورولیپیدها و رامنولیپیدها بیشترین هزینه مربوط به مواد خام می‌باشد، اما در مورد محصولات با حجم کم اما ارزش زیاد مثل سورفاکتین، بخش اصلی هزینه مربوط به مواد استفاده‌شده برای بازیافت محصول و همچنین حفظ حالت استریل آن تا بسته‌بندی نهایی می‌باشد.

در مدل تولید سوفورولیپید، قیمت گلوکز و اولئیک اسید استفاده شده برای تولید ۹۰/۷ میلیون کیلوگرم محصول ۱۵۰ میلیون دلار تخمین زده شد که تقریباً ۷۵٪ از کل هزینه‌های را در بر می‌گرفت. البته با جایگزین کردن محصولات فرعی صنعتی و همچنین مواد خامی که قیمت پایین‌تری داشتند با سوبستراهای گران‌قیمت هزینه‌ها کاهش می‌یافت. به‌گونه‌ای که در یکی از مطالعاتی که از سوبستراهای ارزان برای تولید بیوسورفکتانت استفاده شد، قیمت محیط مصرفی ۸۰-۶۰ درصد کاهش یافت و مقدار محصول نیز تا ۱/۵ برابر افزایش یافت. قیمت هر لیتر محیط تخمیری آب‌پنیر و ملاس حدود ۳/۸-۲/۶ دلار ارزیابی می‌شود. در طول تولید بیوسورفکتانت استفاده از سوبستراهای پیچیده و افزودن عوامل ضد کف باعث نیاز به مراحل تخلیص اضافی می‌گردد که در نتیجه، انجام پروسه‌های پایین‌دستی کمی گران‌تر تمام می‌شود، بنابراین استفاده از استراتژی‌های کشت متفاوت منظور کاهش میزان تشکیل کف، می‌تواند قیمت تمام‌شده محصول را کاهش دهد.

هزینه‌ی نیروی کار

هزینه‌ی نیروی کار بر اساس تعداد اپراتور و نوبت‌های کاری در هر سال تخمین زده می‌شود. شرکت‌هایی با تجهیزات فوق خودکار نیروی کار کمتری نیاز خواهند داشت. به‌طور طبیعی هر شرکت تولیدکننده‌ی محصولات تخمیری برای هر یک از دستگاه‌ها حداقل نیاز به یک اپراتور دارد. هزینه‌ی نیروها نیز بر طبق کشور موردنظر متفاوت است؛ مثلاً قیمت سالیانه کارگر در کشورهای در حال توسعه ۱۰۰۰۰-۴۰۰۰ دلار است اما در کشورهای توسعه‌یافته می‌تواند تا ۵۰۰۰۰ دلار نیز افزایش یابد.

هزینه‌ی آب و برق و مواد مصرفی

مواد مصرفی شامل موادی است که باید به‌طور مداوم جایگزین شوند، مانند غشاها، پوشش فیلترها، رزین‌های جذب و ستون‌های کروماتوگرافی. البته این موضوع، به مراحل پردازش و سطح خلوص موردنیاز، که برای هر نوع بیوسورفکتانت متفاوت است، بستگی دارد. هزینه‌ی آب و برق در طول عملیات مربوط به استفاده از نیرو، فشار بخار، آب سرد، هوای فشرده و دیگر لوازم جانبی مثل خط لوله می‌باشد. با توجه به اینکه فرمانتاسیون جهت استریل کردن رآکتور و محیط به بخار استریل نیاز دارد و همچنین به مقدار زیادی از عوامل سردکننده و خنک‌کننده جهت حفظ دما در طول پروسه استفاده می‌کند، بیشترین هزینه‌ی آب و برق را به خود اختصاص می‌دهد.

۱-۲-۳- هزینه‌ی تولید بیوسورفکتانت

قیمت بازاری بیوسورفکتانت برای رقابت و پذیرفته شدن از لحاظ اقتصادی باید بتواند با سورفکتانت شیمیایی برابری کرده و یا حتی کمتر از آن باشد. هزینه‌ی تولیدی و قیمت بازاری بیوسورفکتانت‌های مختلف در جدول ۱-۲ آورده شده است. قیمت بیوسورفکتانتی با حجم بالا اما ارزش پایین حدود ۲-۳ دلار برای هر کیلوگرم می‌باشد که ۲۰-۳۰ درصد بیشتر از قیمت بیوسورفکتانت شیمیایی می‌باشد. قیمت کیلوگرم از سوفورولپید که برای تولید آن‌ها از ملاس و روغن سویا استفاده شده بود ۳ دلار بود. قیمت

تولید هر کیلوگرم سوفورولیپید در مقیاس ۲۰۰ مترمکعب و با استفاده از شربت ذرت و کربن زرد ۲/۶ دلار برای هر کیلوگرم تخمین زده شد که این بر اساس غلظت ۱۰۰ گرم بر لیتر از محصول بود.

جدول ۱-۲- هزینه تولید و قیمت بازاری بیوسورفکتانت‌های مختلف

Biosurfactant	Substrate	Production Scale (m ³)	Production Cost/Market Price (USD)	Reference/Supplier
Sophorolipid	Glucose + high oleic sunflower oil	19,832	2.95/kg 2.54/kg	Ashby et al. (2013)
Sophorolipid	Glucose + oleic acid	—	3.00/kg	Kosaric (1992)
Sophorolipid	Molasses + soybean oil	—	3.00/kg	Deshpande and Daniels (1995)
Sophorolipid	Corn syrup + yellow grease	15 × 10 ⁻³	2.69/kg	Lang and Wullbrandt (1999)
Rhamnolipid	Soybean oil	100 20	5/kg 20/kg	Rosenberg and Ron (1997)
RAG-1 Emulsan	Ethanol and phosphate	5 × 10 ⁻³	50/kg	Youssef et al. (2007)
Lipopeptide biosurfactant	Glucose + oil	—	23.43/mol	AGAE Technologies, LLC, USA
Rhamnolipid			150/g (90% pure) 1500/g (95% pure)	Sigma-Aldrich Co. LLC, USA
Surfactin			697/50 mg	Sigma-Aldrich Co. LLC, USA
Iturin			460/5 mg	

محاسبات هزینه‌های بالا بر اساس داده‌های R & D بود. قیمت هر کیلوگرم سوفورولیپید با استفاده از گلوکز و روغن اولئیک آفتابگردان در مقیاس بزرگ (۱۹۸۳۲ مترمکعب) ۲/۹۵ دلار بود و هزینه نمونه‌ای که از گلوکز و روغن اولئیک استفاده شد ۲/۵۴ بود.

بر طبق داده‌های بالا واضح است که نوع مواد خام و مقیاس تولید، بر هزینه تولید سورفکتانت‌های میکروبی تأثیر می‌گذارد. از این رو تولید بیوسورفکتانت‌ها در یک مقیاس اقتصادی با استفاده از سوبستراهای ارزان و تجدید پذیر می‌تواند زمینه را برای رقابت آن‌ها با سورفکتانت‌های شیمیایی فراهم کند. هزینه تولید بیوسورفکتانت گلیکولیپیدی دیگری به نام رامنولیپید توسط *Pseudomonas aeruginosa* که از روغن سویا به عنوان سوبسترا استفاده می‌کرد در مقیاس‌های مختلف فرمانتاسیون ارزیابی شد. قیمت‌ها به طور

معکوسی متناسب با مقیاس تولید بود به طوری که مثلاً هزینه‌ی یک کیلوگرم از محصول در ۲۰ مترمکعب ۲۰ دلار و در ۱۰۰ مترمکعب ۵ دلار بود.

قیمت بازار رایج برای هر کیلوگرم رامنولیپید بسته به سطح خلوص و میزان تولید از ۱/۵ تا ۱۵۰۰ دلار متغیر می‌باشد. شرکتی در چین رامنولیپیدی با درجه‌ی خلوص پایین می‌فروشد که می‌تواند در فرمولاسیون پاک‌کننده‌ها و دیگر کاربردهای محیط‌زیستی استفاده شود که قیمت هر گرم آن ۱/۶۲ دلار می‌باشد. درحالی‌که شرکتی در آمریکا هر گرم رامنولیپید با خلوص ۹۵٪ را ۱۵۰۰ دلار به فروش می‌رساند. رامنولیپید با خلوص بالا به علت دارا بودن ویژگی‌های ضد میکروبی می‌تواند در صنایع غذایی و آرایشی و دارویی استفاده شود. بیوسورفکتانت لیپوپپتید در مقادیر کمی تولید می‌شود اما پتانسیل کاربرد در صنایع غذایی را دارد و قیمت هر میلی‌گرم از آن ۱۳۰-۲۰ دلار می‌باشد. قیمت هر ۱۰ میلی‌گرم سورفاکتین تولید شده توسط شرکت سیگما ۱۸۴/۵ دلار و قیمت هر ۵ میلی‌گرم ایتورین ۴۶۰/۵ دلار می‌باشد. قیمت بالای لیپوپپتید در مقایسه با گلیکولیپید اساساً به علت میزان کم محصول آن و استفاده از محیط دارای سوبستراهای گران می‌باشد. هرچند تخمیر *in situ* باکتری گونه‌ی باسیلوس در یک مخزن آهکی باعث تولید مقرون به صرفه‌ی آن می‌شود.

۷ مول لیپوپپتید از مایع تولید شده از مخزن بازیافت شد و قیمت هر مول محصول حدود ۲۳/۴۳ دلار تخمین زده شد. علاوه بر تولید *in situ* بیوسورفکتانت در مخزن نفت، تولید هم‌زمان این مولکول‌ها با دیگر متابولیت‌های مفید می‌تواند منجر به تجاری‌سازی موفق آن‌ها شود. در مطالعه‌ی دیگری قیمت تولید هر کیلوگرم بیوسورفکتانت امولسان RAG-1 با وزن مولکولی بالا در یک فرمانتور ۵ لیتری حدود ۵۰ دلار تخمین زده شد که سه برابر قیمت امولسیفایرهای تجاری موجود می‌باشد. به منظور تولید بیوسورفکتانتی که بتواند با سورفکتانت‌ها رقابت کند نیاز به استفاده از سوبستراهایی ارزان‌تر و همچنین میزان تولید بالاتر می‌باشد.

۱-۳- استراتژی های برای تولید تجاری بیوسورفکتانت

چون استفاده از سوبستراهای گران و میزان کم محصولات، دلایل اصلی قیمت بالای تولید بیوسورفکتانت می باشد انجام روش های زیر می تواند تجاری سازی این مولکول ها را تسهیل کند.

- هرچند میکروب های مختلفی قادر به تولید بیوسورفکتانت هستند در حال حاضر اساساً بر روی *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Candida* تمرکز شده است. از این رو دیگر گونه های تولیدکننده نیز باید در مقیاس بزرگ تر جهت تولید بیوسورفکتانت بررسی شوند. میکروارگانیسم ها از خاک های آلوده، پساب ها و منابع فاضلاب می توانند جداسازی شوند و برای تولید سورفکتانت غربالگری شوند، زیرا آن ها قادر به استفاده از پساب های صنعتی هستند.
- جدای از گونه های تولیدکننده بیوسورفکتانت، میکروارگانیسم های تولیدکننده می توانند با نوترکیبی ژنتیکی و جهش زایی دست کاری شوند. با انجام چنین روش هایی نه تنها می توانیم میزان محصول را افزایش دهیم بلکه می توان بیوسورفکتانت هایی با ویژگی های برتر تولید کرد.
- سیستم های زیستی دارای رویکرد جالبی هستند و می توانند در جهت افزایش تولید محصول و کاهش تشکیل متابولیت های ثانویه به کار گرفته شوند.
- نوع و میزان بیوسورفکتانت تولید شده به اجزای تشکیل دهنده محیط و شرایط محیطی بستگی دارد. از این رو ابزارهای ریاضیاتی و آماری می توانند استفاده شوند تا شرایط را برای افزایش محصول بهینه کنند.
- هزینه ی مواد خام ۸۰-۳۰٪ از کل هزینه ی تولید بیوسورفکتانت را تشکیل می دهند. استفاده از پساب های صنعتی و سوبستراهای تجدید پذیر با قیمت پایین می تواند منجر به کاهش معنی داری در هزینه های عملیات شود.
- ارزیابی نوع مواد خام و نوع مراحل تخلیص، فاکتور مهمی در راه اندازی یک پروسه ی اقتصادی می باشد. و بنابراین استفاده از پروسه هایی که مراحل پایین دستی با قیمت پایین تر باشند گامی مثبت به سمت تجاری سازی موفق بیوسورفکتانت ها می باشد.

۲- بهینه‌سازی تولید نیمه‌صنعتی محصول

۱-۲- مقدمه

به منظور افزایش تولید محصول و همچنین حفظ کیفیت محصول، مسائل کلیدی در فرمانتاسیون صنعتی شامل استراتژی فرمانتاسیون، محیط کشت صنعتی، و شرایط فرمانتاسیون می‌بایست برای هر محصول به طور جداگانه مورد بهینه‌سازی قرار گیرد. برای کشت میکروارگانیسم‌ها در شرایط اپتیمم باید از روش‌های تخمیر استفاده نمود. در فرایندهای تخمیری نقش مهندسی فقط کمک به توسعه و تنظیم فرایندهای بیولوژیکی است و درواقع خود میکروارگانیسم است که در کانون همه توجهات قرار دارد. برای اداره کردن صحیح یک فرایند تولید محصول باکتریایی در مقیاس صنعتی، داشتن اطلاعات دقیق و روشن در مورد سینتیک رشد میکروب الزامی است. تخمیر غیرمداوم را می‌توان یک سیستم بسته در نظر گرفت. در زمان صفر، محلول غذایی استریل داخل فرمانتور، با میکروارگانیسم موردنظر تلقیح شده و تحت شرایط فیزیولوژیکی بهینه، انکوباسیون انجام می‌شود. در ضمن عمل تخمیر هیچ چیز به جز اکسیژن (به صورت هوادهی)، عامل ضد کف و اسید یا باز برای کنترل pH، اضافه نمی‌شود. بنابراین در نتیجه رشد سلولی، معمولاً ترکیب محیط کشت و غلظت بیوماس دائماً تغییر می‌کند.

در این مرحله از پروژه، تولید نیمه‌صنعتی محصول بیوسورفکتانت میکروبی در فرمانتور نیمه‌صنعتی مورد بهینه‌سازی قرار می‌گیرد. برای این منظور ابتدا بر اساس نتایج آزمایش‌های قبلی استراتژی فرمانتاسیون انتخاب می‌گردد. در ادامه محیط کشت‌های صنعتی جهت تولید بیوماس و محصول انتخاب می‌گردد. در ادامه شرایط هوادهی جهت تولید محصول در فرمانتور نیمه‌صنعتی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲-۲- فرمانتور صنعتی مورد استفاده

در این پروژه فرایند فرمانتاسیون در فرمانتور ۷۵۰ لیتری با حجم عملیاتی ۵۰۰ لیتر صورت گرفت. شکل تجهیزات فرمانتوری مورد استفاده جهت تکثیر سویه های باکتریایی را نشان می دهد.



شکل ۲-۱- فرمانتور صنعتی مورد استفاده در تولید محصول

۲-۳- استراتژی فرمانتاسیون

در بررسی آزمایشگاهی صورت گرفته (فاز اول پروژه) با مقایسه نمودارهای سینتیک رشد با تولید بیوسورفکتانت توسط سویه KE1، مشخص شد که تولید بیوسورفکتانت در باکتری موردنظر زمانی که وارد

فاز سکون می شود، افزایش می یابد که این ویژگی مشخصه متابولیت های ثانویه بوده و به نظر می رسد بیوسورفکتانت تولیدی توسط این سویه، از نوع متابولیت های ثانویه باشد. ژن های کنترل کننده تولید این ترکیبات تحت کنترل سیستم quorum sensing بوده و رسیدن جمعیت سلولی به یک حد آستانه جهت شروع تولید محصول ضروری می باشد. از این رو استراتژی فرمانتاسیون جهت تولید محصول به صورت fed-batch انتخاب گردید. بنابراین پروسه فرمانتاسیون در دو مرحله مجزا شامل (۱) تولید بیوماس سلولی و (۲) تولید محصول طراحی گردید.

۲-۴- انتخاب محیط کشت بهینه تولید بیوسورفکتانت

۲-۴-۱- محیط کشت صنعتی جهت مرحله تولید بیوماس سلولی

محیط کشت صنعتی جهت تولید بیوماس سلولی در فرمانتور نیمه صنعتی کمابیش می تواند شبیه محیط کشت مورد استفاده در مرحله scale up باشد. همان گونه که در فاز اول پروژه (تولید نمونه آزمایشگاهی) مشاهده شد، باکتری *R. ruber strain KE1* قادر است در محیط حاوی ملاس چغندر قند به عنوان تنها منبع کربن و انرژی رشد نماید. ملاس چغندر قند مورد استفاده از شرکت قند هگمتانه خریداری گردید. ملاس چغندر قند (محصول جانبی تولید قند) علاوه بر مقدار زیاد قند، حاوی مواد از ته، ویتامین ها و عناصر کمیاب می باشد. جدول ۱-۲ ترکیب ملاس چغندر قند مورد استفاده را نشان می دهد.

محیط های کشتی که در فرایندهای تولید استفاده می شوند، نه تنها از نظر اجزای تشکیل دهنده، بلکه به لحاظ چگونگی تهیه نیز باید بهینه سازی شوند. برای به دست آوردن حداکثر تولید، وجود یک محیط کشت کاملاً متوازن الزامی است. بنابراین در صورت لزوم باید از مکمل ها نیز استفاده کرد. با استفاده از روش های آماری و برنامه های کامپیوتری می توان محیط های کشت را بهینه کرد.

جدول ۱-۲- ترکیب ملاس چغندر قند مورد استفاده

Composition	Amount
Dry matter	82.2 g/100 g
Sucrose	48.5 g/100 g
Raffinose	1.1 g/100 g
Invert sugar	1.3 g/100 g
Miscellaneous organic materials	25.7 g/100 g
N	0.5 g/100 g
P ₂ O ₅	0.06 g/100 g
CaO	0.62 g/100 g
MgO	0.09 g/100 g
K ₂ O	2.9 g/100 g
SiO ₂	0.35 g/100 g
Al ₂ O ₃	0.05 g/100 g
Fe ₂ O ₃	0.015 g/100 g
Ash	6.3 g/100 g
Vitamins & Cofactors	
Thiamine	128 µg/100 g
Riboflavine	44 µg/100 g
Pyridoxine	512 µg/100 g
Nicotinamide	5055 µg/100 g
Pantothenic acid	119 µg/100 g
Folic acid	18.3 µg/100 g
Biotin	6.1 µg/100 g

با توجه به اینکه منابع ازت و فسفر موجود در ملاس ممکن بود جهت رشد حداکثری سویه KE1 ناکافی باشد، طی یک سری آزمایش های آماری بهینه سازی، تأثیر افزودن یک منبع نیتروژن و فسفر و همچنین منبع کربنی مکمل به محیط ملاس، بر روی رشد سویه KE1 مورد آزمایش قرار گرفت. برای این منظور، با در نظر گیری فاکتورها و سطوح مورد نظر در نرم افزار Minitab، بهینه سازی این پارامترها طراحی و اجرا گردید.

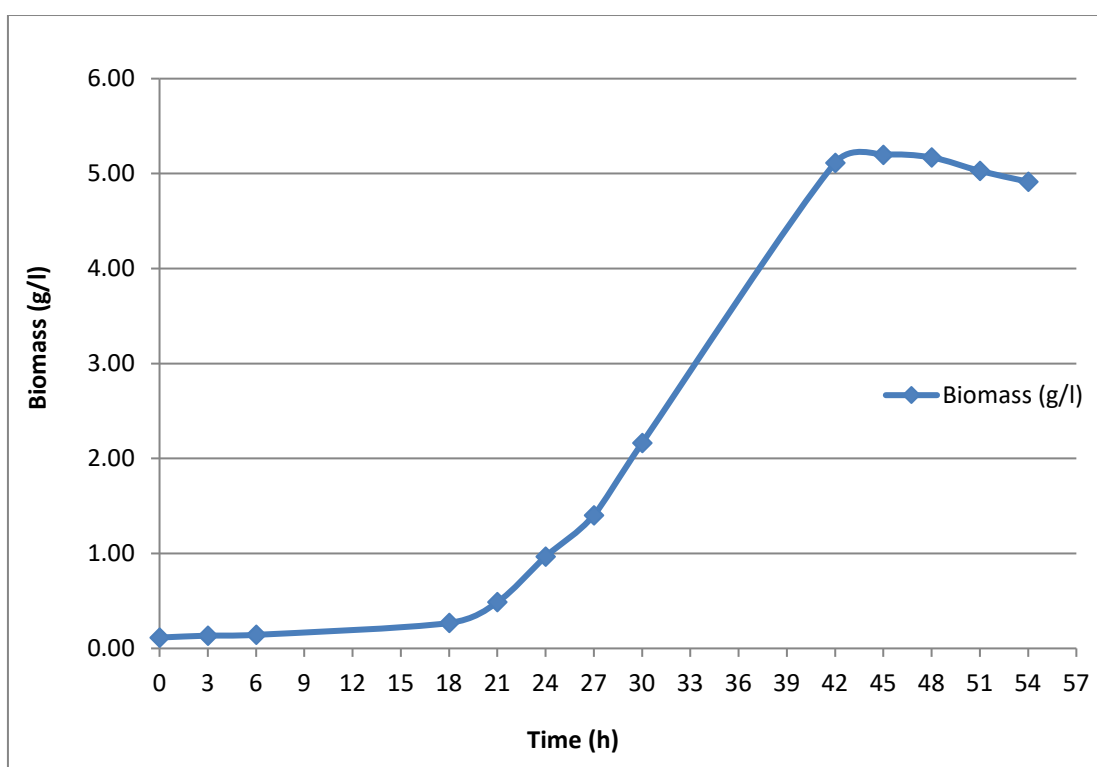
جهت تأمین منبع ازت محیط کشت، از مایع آب استیپ ذرت (corn steep liquor) که به عنوان پساب در کارخانه های تولید محصولات از ذرت (روغن، گلوکز و ...) تولید می گردد با غلظت ۱٪ استفاده شد.

این مایع غنی از منابع از ته معدنی و آلی می‌باشد. آب استیپ مصرفی از شرکت گلوکوزان در شهرک صنعتی قزوین تهیه گردید.

نتایج نشان داد که افزودن آب استیپ ذرت به عنوان منبع ازت می‌تواند تأثیر بسیار مثبتی در رشد باکتری دارا باشد. افزودن Na₂HPO₄ به عنوان منبع فسفر نیز تأثیر مثبتی در رشد باکتری داشت، با این وجود این تأثیر به شدت افزودن منبع ازت نبود. از طرف دیگر افزودن یک منبع کربن کمکی (گلیسرول) تأثیر چندانی بر رشد این باکتری ایفا نکرد.

همچنین یکی از مهم‌ترین پارامترهای محیط کشت باکتریایی به منظور کشت در مقیاس وسیع تعیین C_{max} به معنی بالاترین میزان غلظت سوبسترا (منبع کربن) است که بیشترین میزان تولید بیوماس را ایجاد کند. با افزایش غلظت سوبسترا میزان رشد نهایی باکتری نیز افزایش می‌یابد ولی این افزایش تا نقطه C_{max} ادامه پیدا می‌کند و بعد از این افزودن غلظت سوبسترا تأثیری مثبتی در میزان رشد نهایی باکتری نداشته و در بسیاری موارد حتی می‌تواند بازدارنده رشد نیز باشد. بنابراین تعیین این پارامتر در اجرای موفقیت‌آمیز کشت باکتری در مقیاس بزرگ با حداقل هزینه مواد اولیه حائز اهمیت بسیار می‌باشد. در بررسی صورت گرفته غلظت C_{max} برای سویه KE1 ۲٪ تعیین شد. در غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر از ۲٪ در تمامی موارد کاهش در میزان رشد ماکسیمم مشاهده شد.

با استفاده از محیط کشت صنعتی حاصل یک ست فرمانتاسیون در فرمانتور نیمه‌صنعتی اجرا شد و منحنی تولید بیوماس توسط سویه KE1 مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۲-۲ نتایج تعیین منحنی تولید بیوماس توسط سویه KE1 را در محیط کشت ملاس چغندر قند و آب استیپ نشان می‌دهد. بررسی منحنی رشد سویه مورد آزمایش نشان می‌دهد که شروع فاز رشد لگاریتمی در سویه KE1 بعد از ۱۸ ساعت می‌باشد. همچنین ماکسیمم تولید بیوماس به میزان 5.20 g/l سه ساعت بعد از انتهای فاز رشد لگاریتمی در این سویه و در ساعت ۴۵ مشاهده شد.



شکل ۲-۲- منحنی تولید بیوماس توسط سویه KE1 در فرمانتور با محیط ملاس چغندر قند (۲٪) و آب استیپ (۱٪)

۲-۴-۱- انتخاب منبع کربنی محیط کشت صنعتی جهت تولید محصول

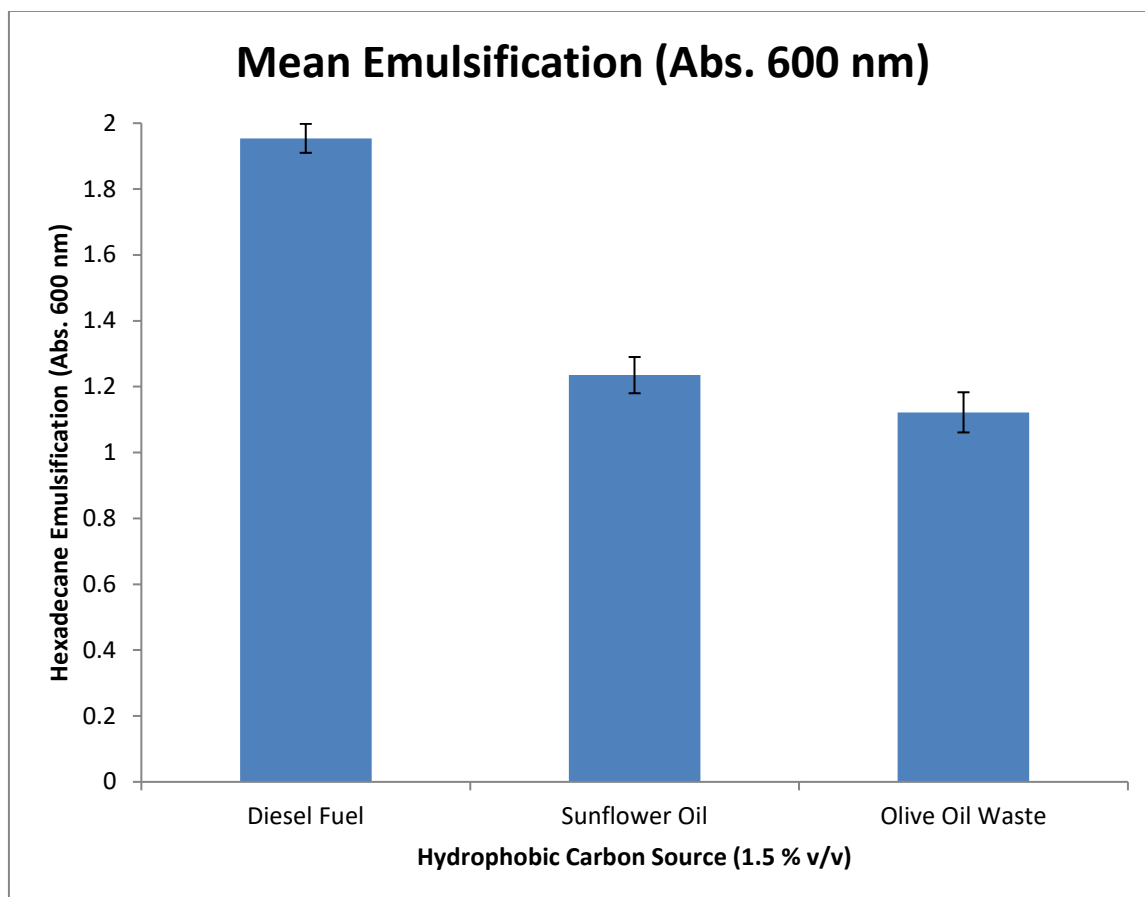
همان‌گونه که توضیح داده شد بالاترین میزان تولید بیوماس سلولی توسط باکتری تولیدکننده بیوسورفکتانت، در ساعت ۴۵ بعد از شروع فرمانتاسیون می‌باشد، بنابراین این زمان برای افزودن منبع کربنی هیدروفوب به محیط کشت جهت تحریک تولید ترکیبات دوگانه‌دوست پراکنده‌کننده نفت توسط سلول‌های باکتری انتخاب گردید.

نتایج مطالعات صورت گرفته نشان داده است که افزودن n-هگزادکان به عنوان منبع کربنی بالاترین میزان تولید بیوسورفکتانت‌ها را توسط باکتری *R. ruber* به همراه دارد [۱۲]. از سوی دیگر به منظور کاهش هزینه‌های تولید و در نتیجه به حداقل رساندن قیمت تمام‌شده محصول، استفاده از منابع کربنی ارزان قیمت اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. بر این اساس سه منبع کربنی هیدروفوب شامل روغن آفتابگردان، گازوئیل و پساب روغن زیتون جهت تحریک تولید ترکیبات پراکنده ساز نفت به وسیله سویه KE1 مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور سه منبع کربنی فوق به وسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل گردید و به میزان 1.5% v/v در زمان ساعت ۴۵ فرمانتاسیون به فرمانتور اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت میزان تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی با انجام آزمون امولسیفیکاسیون بررسی گردید.

برای این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی بیوسورفکتانت به ۴۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر در یک لوله آزمایش، اضافه شد. سپس بعد از اندازه‌گیری کدورت در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۵۰۰ میکرولیتر هگزادکان به مخلوط فوق اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد. سپس لوله به مدت ۳۰ ثانیه در حالت ساکن قرار داده شد و کدورت مجدداً اندازه‌گیری شد. اختلاف میزان جذب به عنوان شاخص فعالیت امولسیفیکاسیون در نظر گرفته شد.

همان‌گونه که انتظار می‌رفت نتایج نشان داد که گازوئیل به طور معناداری بیشتر از دو منبع کربنی دیگر تولید بیوسورفکتانت را افزایش می‌دهد (شکل ۳-۲). گازوئیل مخلوطی از هیدروکربن‌های ۹ تا ۲۳

کربنه بوده که هیدروکربن‌های نرمال از جمله آن-هگزادکان (۱۶ کربنه) بخش عمده هیدروکربن‌های آن را تشکیل می‌دهد.



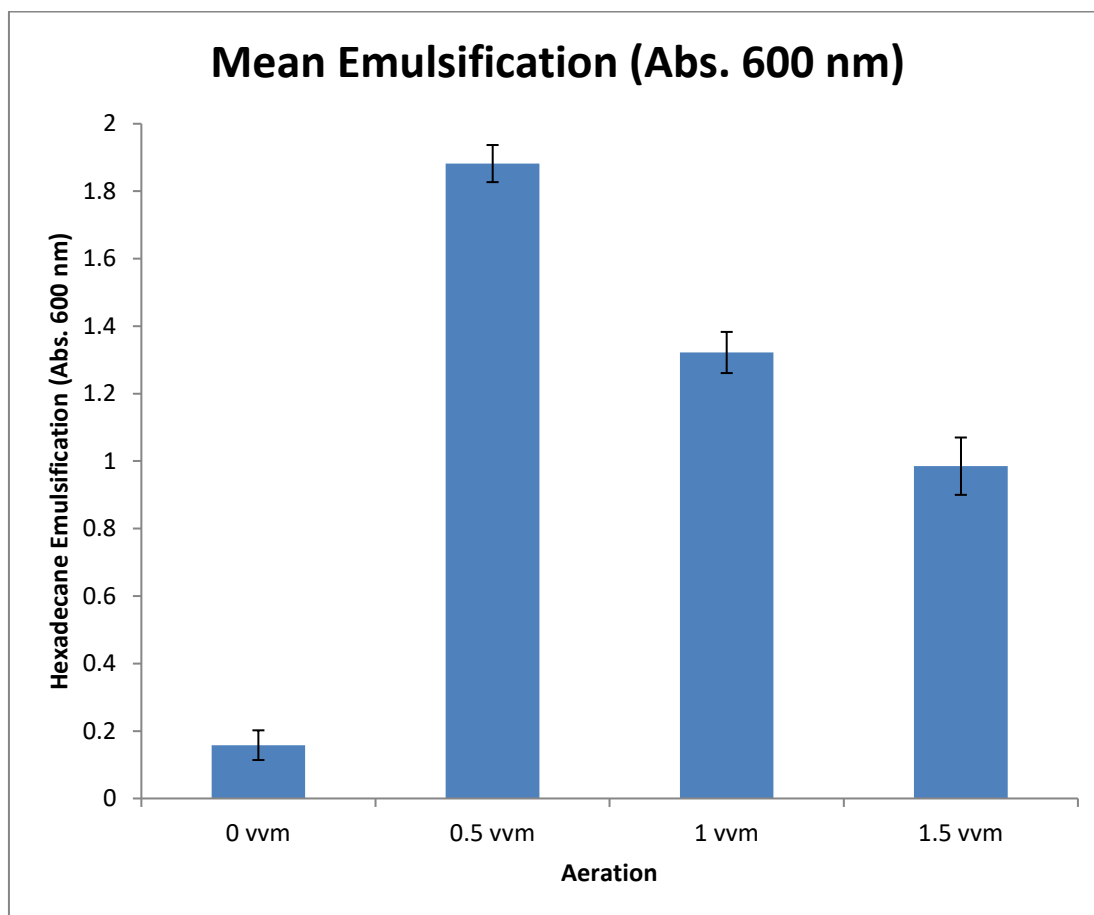
شکل ۳-۲- تولید بیوسورفکتانت (امولسیفیکاسیون هگزادکان) با استفاده از منابع کربنی هیدروفوب توسط سویه KE1 در فرمانتور نیمه صنعتی.

۵-۲- بهینه‌سازی میزان هوادهی جهت تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی در فرماتور صنعتی

یکی از مهم‌ترین فاکتورها در بهره‌برداری از یک فرماتور صنعتی، تدارک شرایط مناسب جهت تبادل گاز می‌باشد. اکسیژن مهم‌ترین سوبسترای گازی برای متابولیسم میکروبی است و دی‌اکسید کربن مهم‌ترین محصول متابولیک گازی می‌باشد. اگر اکسیژن به‌عنوان یکی از سوبسترهای موردنیاز میکروب باشد، غالباً به‌عنوان یک عامل محدودکننده تخمیر درمی‌آید.

در یک مخلوط هوا-آب در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد فقط ۰/۳ میلی‌مول اکسیژن (معادل 9 ppm) در آب حل می‌شود، زیرا میزان حلالیت آن پایین است. بنابراین ضریب انتقال جرمی اکسیژن (K_{La}) برای فعالیت یک بیوراکتور، پارامتری قطعی و حیاتی محسوب می‌شود. این ضریب به قطر، حجم، توان، سیستم هوادهی، سرعت هوادهی، و همچنین به دانسیته، ویسکوزیته، ترکیب شیمیایی محلول غذایی، ساختار میکروارگانیسم، نوع ضد کف و درجه حرارت بستگی دارد.

شکل ۴-۲ نتایج بهینه‌سازی میزان هوادهی در فرماتور نیمه‌صنعتی جهت تولید بیوسورفکتانت را نشان می‌دهد. میزان تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی با انجام آزمون امولسیفیکاسیون اندازه‌گیری شد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود مقدار بهینه هوادهی برای سویه KE1 معادل ۰/۵ vvm می‌باشد که این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده در فاز آزمایشگاهی سازگار می‌باشد.



شکل ۴-۲- بهینه‌سازی میزان هوادهی در فرمانتور نیمه‌صنعتی جهت تولید بیوسورفکتانت توسط سویه KE1

۳- ارزیابی و انتخاب فرایندهای پایین دستی

۳-۱- مقدمه

در تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی، هرچند شرایط فرمانتاسیون و محیط کشت بهینه‌سازی شده باشد، بدون انتخاب یک روش بهینه جهت بازیافت، فرمولاسیون و تولید محصول نهایی، فرایند تولید ناقص است. بنابراین یک فاکتور مهم و تعیین‌کننده در امکان‌سنجی تولید یک محصول در مقیاس صنعتی، امکان‌پذیر بودن فرایندهای پایین‌دستی مناسب و مقرون‌به‌صرفه است. برای بسیاری از محصولات بیوتکنولوژی، فرایندهای پایین‌دستی بیش از ۶۰٪ هزینه تولید را به خود اختصاص می‌دهند. روش‌های رایج بازیافت محصول از فرمانتور شامل رسوب‌دهی با اسید، استخراج با حلال، کریستالیزه کردن، رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات و سانتریفیوژ کردن در مطالعات قبلی مورد بررسی گسترده قرار گرفته‌اند [۱۳]. روش‌های نوین و جالب‌توجهی نیز در مورد بازیافت بیوسورفکتانت‌ها معرفی شده‌اند. در این روش‌ها جنبه‌های اختصاصی بیوسورفکتانتی مانند خواص کشش سطحی محصول و ایجاد میسل و وزیکول توسط محصول در محیط کشت مایع فرمانتور و امکان بازیافت محصول فرمانتور به شیوه پیوسته، مورد نظر قرار داده است. مثال‌هایی از این روش‌ها را می‌توان جدایش با فوم، اولترافیلتریشن، جذب و بازیافت بر روی سطوح رزین‌های پلی‌استیرن، کروماتوگرافی تبادل یونی، و جذب سطحی روی کربن فعال با پایه چوب ذکر کرد [۱۴-۱۶]. یکی از مزایای عمده این روش‌ها قابلیت استفاده در بازیافت بیوسورفکتانت‌ها با خلوص بالا در فرایندهای فرمانتاسیون پیوسته می‌باشد.

جدول ۳-۱ فرایندهای پایین‌دستی مختلف در تولید بیوسورفکتانت‌ها و مزایا و اساس روش‌های اجرایی آن‌ها را نشان می‌دهد [۱۷].

جدول ۱-۳: فرایندهای پایین‌دستی مختلف در تولید بیوسورفکتانت‌ها و مزایا و اساس روش‌های اجرایی آن‌ها

Downstream recovery procedure	Biosurfactant property responsible for separation	Instrument/apparatus/setup required	Advantages
Acid precipitation	Biosurfactants become insoluble at low pH values	No set-up required	Low cost, efficient in crude biosurfactant recovery
Organic solvent extraction	Biosurfactants are soluble in organic solvents due to the presence of hydrophobic end	No set-up required	Efficient in crude biosurfactant recovery and partial purification, reusable nature
Ammonium sulfate precipitation	Salting-out of the polymeric or protein rich biosurfactant	No set-up required	Effective in isolation of certain type of polymeric biosurfactants
Centrifugation	Insoluble biosurfactants get precipitated because of centrifugal force	Centrifuge required	Reusable, effective in crude biosurfactant recovery
Foam fractionation	Biosurfactants, due to surface activity, form and partition into foam	Specially designed bioreactors that facilitate foam recovery during fermentation	Useful in continuous recovery procedures, high purity of product
Membrane ultrafiltration	Biosurfactants form micelles above their critical micelle concentration (CMC), which are trapped by polymeric membranes	Ultrafiltration units with porous polymer membrane	Fast, one-step recovery, high level of purity
Adsorption on polystyrene resins	Biosurfactants are adsorbed on polymer resins and subsequently desorbed with organic solvents	Polystyrene resin packed in glass columns	Fast, one-step recovery, high level of purity, reusability
Adsorption on wood-activated carbon	Biosurfactants are adsorbed on activated carbon and can be desorbed using organic solvent	No setup required, can be added to culture broth, can also be packed in glass columns	Highly pure biosurfactants, cheaper, reusability, recovery from continuous culture
Ion-exchange chromatography	Charged biosurfactants are attached to ion-exchange resins and can be eluted with proper buffer	Ion-exchange resins packed in columns	High purity, reusability, fast recovery
Solvent extraction (using Methyl tertiary-butyl ether)	Biosurfactants dissolve in organic solvents owing to the hydrophobic ends in the molecule	No set-up required	Less toxic than conventional solvents, reusable, cheap

در برخی صنایع مانند صنایع دارویی و تا حدی صنایع غذایی و بهداشتی - آرایشی، بیوسورفکتانت‌های با خلوص بالا مورد نیاز می‌باشد که با استفاده از این روش‌ها می‌توان به محصول مورد نظر دست یافت. با این وجود حلال‌هایی نظیر استون، متانول و کلروفرم که برای بازیافت این بیوسورفکتانت‌ها مصرف می‌شوند خود برای طبیعت و محیط‌زیست سمی و مضر هستند. در سال‌های اخیر حلال‌های ارزان‌تر و کم‌سمی‌تری مانند دی‌کلرومتان برای بازیافت بیوسورفکتانت‌ها از باکتری *Rhodococcus* مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این حلال‌های ارزان‌قیمت با سمیت پایین‌تر که به راحتی در دسترس نیز هستند، می‌توانند علاوه بر به حداقل رساندن تأثیرات نامطلوب زیست‌محیطی، هزینه‌های تولید بیوسورفکتانت‌ها را نیز کاهش دهند. مطالعات بیشتری در راستای بهبود فرایندهای پایین‌دستی موجود و رقابت‌پذیری بیشتر محصولات بیوسورفکتانتی مورد نیاز است. در بسیاری از فرایندهای تولیدی محصولات بیوسورفکتانتی استفاده از یک تکنیک پایین‌دستی به‌تنهایی جهت بازیافت و تخلیص محصول، کافی نمی‌باشد. در این شرایط استفاده از استراتژی بازیافت و خالص‌سازی چندمرحله‌ای می‌تواند مؤثر واقع شود. در چنین استراتژی فرایند پایین‌دستی امکان دستیابی به محصول با هر درجه از خلوص مورد نظر امکان‌پذیر می‌باشد.

نکته حائز اهمیت در پروژه حاضر این است که محصولات بیوسورفکتانتی به‌صورت خام یا با خالص‌سازی جزئی که در ابتدای فرایندهای پایین‌دستی به دست می‌آیند، می‌توانند برای کاربردهای صنعتی مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین می‌توان با انتخاب فرایندهای پایین‌دستی مناسب هزینه تولید این محصولات را به حداقل رساند به‌طوری‌که با بسیاری از تولیدات شیمیایی با کاربرد مشابه نیز قابل رقابت باشند.

در مرحله قبلی این پروژه، تولید نیمه‌صنعتی محصول بیوسورفکتانت در فرمانتور نیمه‌صنعتی مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. در این مرحله از پروژه فرایندهای پایین‌دستی شامل تغلیظ و خالص‌سازی محصول و فرمولاسیون نهایی محصول با تأکید بر حداکثر کارایی محصول و حداقل قیمت تمام‌شده محصول مورد بهینه‌سازی قرار می‌گیرد.

۳-۲- انتخاب روش بهینه استخراج و فرمولاسیون محصول

همان‌گونه که در بالا اشاره شد، پارامترهای حائز اهمیت در بهینه‌سازی فرایندهای پایین‌دستی ماده پرانده کننده لکه نفتی شامل دو پارامتر میزان (i) کارایی محصول و (ii) قیمت تمام‌شده محصول می‌باشد.

۳-۲-۱- روش آزمایش

در بین فرایندهای پایین‌دستی قابل‌اجرا در مورد محصول بیوسورفکتانت میکروبی، روش رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات برای محصولات پروتئینی بوده که برای محصول بیوسورفکتانت حاصل از سویه باکتری مورد استفاده کاربردی ندارد. روش‌های کروماتوگرافی جذب یونی، اولترافیلتراسیون، و جداسازی با رزین‌های جذب سطحی نیز معمولاً برای تولید محصولات با خلوص بسیار بالا به کار می‌روند که هزینه اجرا و در نتیجه قیمت تمام‌شده محصول برای کاربردهای زیست‌محیطی از لحاظ اقتصادی توجیه‌پذیر نمی‌باشند. روش جدایش فوم نیز با امکانات موجود قابل انجام نبود. بنابراین به‌منظور بهینه‌سازی فرایندهای پایین‌دستی جهت تولید محصول بیوسورفکتانت میکروبی در این پروژه، سه روش استخراج با حلال دی‌کلرومتان، رسوب‌دهی با اسیدسولفوریک، و تغلیظ به روش اسپری‌درای مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آزمایش‌ها و به‌منظور پیشگیری از خطای ناشی از شرایط بالادستی فرمانتاسیون، ابتدا یک batch از فرایند فرمانتاسیون با حجم ۳۰۰ لیتر مطابق روش بهینه‌سازی شده در مرحله قبل صورت گرفت. سپس محصول فرمانتور به سه بخش ۱۰۰ لیتری تقسیم شد و بر روی هر بخش یکی از سه روش پایین‌دستی شامل استخراج با حلال دی‌کلرومتان، رسوب‌دهی با اسیدسولفوریک، و تغلیظ با اسپری‌درای مطابق روش توضیح داده‌شده در زیر در سه تکرار آزمایش شد.

۳-۲-۱-۱- استخراج با حلال دی‌کلرومتان

روش اجرای استخراج با حلال دی‌کلرومتان به این صورت بود که ۱۰۰ لیتر از مایع فرمانتور در داخل مخزن همزن‌دار فرمانتور ریخته شد. سپس ۲۰ لیتر دی‌کلرومتان صنعتی به آن اضافه شد. درب فرمانتور بسته و مخلوط به مدت ۵ ساعت با دور ۱۵۰ rpm هم زده شد. سپس به مدت ۲ ساعت در حالت ساکن قرار داده شد تا دو فاز کاملاً تفکیک شوند. فاز عصاره دی‌کلرومتانی که حاوی مواد بیوژنیک‌ساز است می‌باشد به دلیل دانسیته بالای دی‌کلرومتان (1.33 g/cm^3) در پایین قرار می‌گیرد. این فاز سپس با احتیاط از طریق خروجی پایینی فرمانتور تخلیه شد.

عصاره حاصل سپس به ظرف تبخیر دستگاه وکیوم‌اوپراتور (دستگاه تبخیر در خلأ) منتقل شد. حلال عصاره در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت تبخیر شد. عصاره تغلیظ شده سپس در ۱۰ لیتر آب دیونیزه حاوی بافر فسفات ۰/۰۱ مولار (pH 7) حل شد. در پایان به محلول حاصل ۱۰ g/l لسیتین سویا (به‌عنوان محرک رشد باکتری‌های طبیعی تجزیه‌کننده نفت) اضافه شد.

۳-۲-۱-۲- رسوب‌دهی با اسیدسولفوریک

روش اجرای رسوب‌دهی با اسیدسولفوریک به این صورت بود که ۱۰۰ لیتر از مایع فرمانتور مجدداً داخل تانک همزن‌دار فرمانتور ریخته شد. سپس ۵ لیتر اسیدسولفوریک ۹۸٪ به آن اضافه شد. درب فرمانتور بسته و به مدت ۵ ساعت با دور ۱۵۰ rpm هم زده شد. سپس به مدت ۲ ساعت در حالت ساکن قرار داده شد تا رسوب‌دهی کامل شود. رسوبات حاصل سپس به وسیله سانتریفیوژ دکانتر صنعتی با قدرت تفکیک $4500 \times g$ جدا شد.

رسوب حاصل سپس در ۱۰ لیتر آب دیونیزه حاوی بافر فسفات ۰/۰۱ مولار (pH 7) حل شد. در پایان به محلول حاصل ۱۰ g/l لسیتین سویا (به‌عنوان محرک رشد باکتری‌های طبیعی تجزیه‌کننده نفت) اضافه شد.

۳-۱-۲-۳- تغلیظ به روش اسپری‌درای

روش اجرایی تغلیظ به روش اسپری‌درای به این صورت بود که ۱۰۰ لیتر از مایع فرمانتور ابتدا به مدت ۵ ساعت توسط دستگاه اسپری‌درایر خشک و تبدیل به پودر شد. پودر حاصل به تانک فرمانتور ۵ لیتری منتقل و جهت شکستن سلول‌های باکتریایی به آن ۱ لیتر محلول KOH ۳ مولار اضافه شد. سپس به مدت ۲ ساعت محلول در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. بعد از خنک شدن جهت خنثی نمودن محلول قلیایی، به مخلوط حاصل ۱ لیتر محلول اسیدکلریدریک ۳ مولار اضافه شد.

در ادامه با افزودن ۳ لیتر آب دیونیزه حاوی بافر فسفات ۰/۰۱ مولار (pH 7) حجم نهایی به ۵ لیتر رسانده شد. در پایان مشابه مراحل قبل به محلول حاصل ۱۰ g/l لسیتین سویا (به‌عنوان محرک رشد باکتری‌های طبیعی تجزیه‌کننده نفت) اضافه شد.

۴- تولید نیمه صنعتی محصول

۴-۱- فرایند فرمانتاسیون

استراتژی فرمانتاسیون همان‌گونه که در گزارش مرحله ۱ پروژه به تفصیل توضیح داده شد، به روش fed-batch و در فرمانتور نیمه صنعتی ۷۵۰ لیتری انجام گردید. در مجموع ۸ مرحله فرمانتاسیون با حجم کشت ۵۰۰ لیتر انجام شد. شرایط فرمانتاسیون جهت تولید محصول نهایی در جدول ۱-۴ ارائه شده است:

جدول ۱-۴- شرایط فرمانتاسیون در فرمانتور نیمه صنعتی

عنوان	شرح
سویه باکتری	<i>Rhodococcus ruber</i> strain KE1 <i>Bacillus Licheniformis</i> strain K-1-5
استراتژی فرمانتاسیون	fed-batch
مرحله تولید بیوماس سلولی	نوع محیط کشت
	ملاس چغندر قند (۲٪) + آب استیپ ذرت (۱٪)
	pH اولیه محیط کشت
	7.5
مرحله تولید محصول	میزان هوادهی
	0.5 vvm
	زمان فرمانتاسیون
	۴۵ ساعت
مرحله تولید محصول	منبع کربنی اضافه شده
	گازوئیل (1.5%)
	میزان هوادهی
	0.5 vvm
	زمان فرمانتاسیون
	۲۴ ساعت

۴-۲- فرایندهای پایین دستی

بر اساس نتایج حاصل از انتخاب روش بهینه استخراج و فرمولاسیون محصول، روش تغلیظ با اسپری‌درایر در مجموع از لحاظ میزان کارایی محصول نهایی، قیمت تمام شده محصول و همچنین ایمنی کار به عنوان روش برگزیده در فرایندهای پایین انتخاب می‌باشد.

بر این اساس فرایند اجرایی در تولید محصول نیمه صنعتی به این صورت بود که محصول فرمانتور ابتدا توسط دستگاه اسپری‌درایر خشک شد. برای این منظور محصول فرمانتور از طریق شیلنگ مخصوص به پمپ دور متغیر اسپری-درایر انتقال داده شد. این پمپ سوسپانسیون باکتریایی را از طریق یک نازل به صورت پاششی به درون محفظه خشک‌کن اسپری می‌کند. قطره‌های میکروسکوپی در این محفظه در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد در کسری از ثانیه خشک می‌شوند. دمای نهفته (latent heat) تبخیر آب باعث جلوگیری از آسیب به ترکیبات مؤثره (بیوسورفکتانت‌های میکروبی) می‌شود. پودر حاصل سپس از طریق یک سیکلون به یک مخزن استیل منتقل شد. دمای پودر حاصل در این مخزن حدود 75-80 °C بود.

پودر حاصل از کلیه مراحل فرمانتاسیون (حدود ۸۵ کیلوگرم) در پایان به تانک فرمانتور ۷۵۰ لیتری منتقل و جهت شکستن سلول‌های باکتریایی به آن ۴۰ لیتر محلول KOH ۳ مولار اضافه شد. سپس به مدت ۲ ساعت محلول در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. بعد از خنک شدن جهت خنثی نمودن محلول قلیایی، به مخلوط حاصل ۴۰ لیتر محلول اسیدکلریدریک ۳ مولار اضافه شد.

۴-۳- فرمولاسیون محصول نهایی، بلندینگ و بسته‌بندی

آخرین مرحله از فرایند تولید محصول ازدیاد برداشت میکروبی، بلندینگ محصول بود. برای این منظور محصول تغلیظ شده جهت حذف باکتری‌های زنده با اتانول مخلوط و در پایان جهت تنظیم pH با

افزودن بافر فسفات ۰/۰۱ مولار (pH 7) محصول نهایی تولید شد. جدول ۴-۲ فرمولاسیون نهایی محصول ازدیاد برداشت با پایه بیوسورفکتانت‌های باکتریایی را نشان می‌دهد.

جدول ۴-۲- فرمولاسیون نهایی محصول ازدیاد برداشت با پایه بیوسورفکتانت میکروبی

مقدار	اجزای تشکیل دهنده
41.25%	عصاره بیوسورفکتانت باکتریایی
18.75%	اتانول
40.00%	بافر فسفات

۴-۴- بازده و میزان بهره‌وری تولید محصول

با توجه میزان تولید محصول از لحاظ ماده مؤثره (بیوسورفکتانت میکروبی) و محصول نهایی (جدول ۴-۲)، حجم فرمانتور تولید (۴۰۰۰ لیتر) و با توجه به زمان تولید (۶۹ ساعت) پارامترهای بازده و میزان بهره‌وری تولید محاسبه شد.

Product	Yield (g/l)	Productivity
Biosurfactant extract	21.25	307.97
Final Product	51.52	746.67

منابع

1. Müller, M.M., et al., *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. Applied microbiology and biotechnology, 2010. **87**(1): p. 167-174.
2. Chtioui, O., et al., *Rotating discs bioreactor, a new tool for lipopeptides production*. Process Biochemistry, 2012. **47**(12): p. 2020-2024.
3. Pornsunthorntawe, O., et al., *Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa SP4 using sequencing batch reactors: Effects of oil loading rate and cycle time*. Bioresource technology, 2009. **100**(2): p. 812-818.
4. Van Bogaert, I.N., et al., *Microbial production and application of sophorolipids*. Applied microbiology and biotechnology, 2007. **76**(1): p. 23-34.
5. Henkel, M., et al., *Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production*. Process Biochemistry, 2012. **47**(8): p. 1207-1219.
6. Abdel-Mawgoud, A.M., et al., *Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production*, in *Biosurfactants*. 2011, Springer. p. 13-55.
7. Colin, A., *Coalescence in foams*. Foam Engineering: Fundamentals and Applications, 2012: p. 75-90.
8. Pelton, R., *A review of antifoam mechanisms in fermentation*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2002. **29**(4): p. 149-154.
9. Coutte, F., et al., *Production of surfactin and fengycin by Bacillus subtilis in a bubbleless membrane bioreactor*. Applied microbiology and biotechnology, 2010. **87**(2): p. 499-507.
10. Ashby, R.D., et al., *A process model for approximating the production costs of the fermentative synthesis of sophorolipids*. Journal of surfactants and detergents, 2013. **16**(5): p. 683-691.
11. Petrides, D., *Bioprocess design and economics*. Bioseparations Science and Engineering, 2015: p. 460-471.
12. Philp, J., et al., *Alkanotrophic Rhodococcus ruber as a biosurfactant producer*. Applied microbiology and biotechnology, 2002. **59**(2-3): p. 318-324.
13. Banat, I.M., et al., *Microbial biosurfactants production, applications and future potential*. Applied microbiology and biotechnology, 2010. **87**(2): p. 427-444.
14. Davis, D., H. Lynch, and J. Varley, *The application of foaming for the recovery of surfactin from B. subtilis ATCC 21332 cultures*. Enzyme and microbial technology, 2001. **28**(4): p. 346-354.

15. Dubey, K.V., A.A. Juwarkar, and S. Singh, *Adsorption—; Desorption Process Using Wood-Based Activated Carbon for Recovery of Biosurfactant from Fermented Distillery Wastewater*. Biotechnology progress, 2005. **21**(3): p. 860-867.
16. Sen, R. and T. Swaminathan, *Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin*. Process Biochemistry, 2005. **40**(9): p. 2953-2958.
17. Mukherjee, S., P. Das, and R. Sen, *Towards commercial production of microbial surfactants*. TRENDS in Biotechnology, 2006. **24**(11): p. 509-515.