مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۹۶

تولید اسید استیک توسط سویه بومی *Acetobacter* sp.M

فوزیه مقدمی

گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
fouziehm@yahoo.com

چکیده

اسید استیک یکی از اسیدهای آلی می باشد که در صنایع غذایی، آرایشی و شیمیایی موارد استفاده فراوانی دارد. تولید این اسید ضعیف عمدتا به روشهای شیمیایی است ولی اسید استیک مورد استفاده در صنایع غذایی، از طریق فرمنتاسیون میکروبی تولید می شود. بررسی سویه های بومی تولید کننده اسید استیک می تواند در استفاده بهینه از آنها جهت تولید اسید استیک موثر باشد از اینرو در این بررسی تعدادی از این باکتریها که از سرکه های خانگی جدا شده بودند مورد مطالعه قرار گرفتند. در بین سویه های مورد بررسی یک سویه بیشترین مقدار اسید استیک را تولید می کرد این سویه *Acetobacter* sp.M نام گرفت. بهینه سازی شرایط تولید اسید استیک توسط سویه *Acetobacter* sp.M انجام گرفت. این سویه در شرایط بهینه دما ۳۰ درجه سانتیگراد، دور هوادهی 200 rpm و غلظت اولیه ٦٪ اتانول قادر به تولید 45 g/l اسید استیک درفلاسک شیاردار درمدت ۱۸ ساعت بود. تولید اسید استیک در بیوراکتور ۲ لیتری نیز با رعایت شرایط بهینه انجام گرفت وبا افزایش میزان هوادهی تا rpm500، میزان تولید اسید استیک به 55 g/l در مدت ٢٤ ساعت رسید.

واژگان کلیدی: اسید استیک، استوباکتر، فرمنتاسیون

مقدمه

اسید استیک یکی از ساده ترین اسیدهای آلی است که دارای بوی تیز و مزه ترش است. این اسید به عنوان یکی از مواد حدواسط مهم در بسیاری از صنایع شناخته می شود مانند صنایع شیمیایی و چوب[۱]. اسید استیک از روشهای شیمیایی و روش فرمنتاسیون میکروبی توسط باکتریهای تولید کننده اسید استیک تولید می شود. در بین روشهای شیمیایی، روش کربوکسیلاسیون متانول روش عمده تولید اسید استیک می باشد و بیش از ٦٥٪ تولید جهانی اسید استیک از این روش انجام می گیرد[۲]. روش فرمنتاسیون میکروبی فقط ۱۰٪ سهم جهانی تولید را در بر می گیرد که توسط باکتریهای تولید کننده اسید استیک انجام می گیرد و این نوع از اسید استیک در صنایع غذایی مورد استفاده قرار

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]

می گیرد. از اینرو بهینه سازی پروسه های بیولوژیک جهت تولید اسید استیک یکی از مهمترین موضوعات برای محققان برای رسیدن به بهترین نتایج می باشد[۳].

باکتریهای تولید کننده اسید استیک تا کنون از نواحی مختلف دنیا جدا شده و مورد مطالعه قرار گرفته اند[٤]، ولی باید توجه داشت که سویه های بومی هر ناحیه ممکن است دارای ویژگیهای خاص خود باشند که گاه به لحاظ صنعتی می تواند قابل توجه باشد[۵و٦]. بنابراین پیشرفت فرایندهای تولید اسید استیک می تواند با مطالعه دقیق تر سویه های بومی هر آب و هوایی تحت تاثیر قرار بگیرد. طبقه بندی باکتریهای اسیداستیک در سال های اخیر توسعه یافته و این میکروارگانیسم ها به ۱۵ جنس تقسیم شده اند [۷] یک گروه از آنها جنس استوباکتر (*Acetobacter*) می باشد که در صنعت برای تولید اسید استیک از آن استفاده می شود و موضوع مورد بحث این مقاله است. سویه های متعلق به جنس Acetobacter دارای چندین انزیم دهیدروژناز وابسته به غشا هستند که سبب می شود آنها بتوانند برخی قندها و قندالکلها را به طور ناقص اکسید کنند و محصولات اکسایش را به بیرون از سلول تراوش کنند. به همین دلیل چنین فرایندهایی را اکسیداسیون ناقص یا فرمنتاسیون اکسیداتیو می نامند. دو انزیم الکل دهیدروژناز (ADH) و الدئید دهیدروژناز (ALDH) در باکتری استوباکتر سبب تولید اسید استیک می شود [۸]. الکل دهیدروژناز قادر است اتانول را به استالدئید اکسید کند و الدئید دهیدروژناز نیز استالدئید حاصل را به اسید استیک اکسید می کند [۹]. فعالیت انزیم الکل دهیدروژناز در اثر افزایش برخی فاکتورهای محیطی مانند دما افزایش می یابد [٤] در مقابل، افزایش برخی فاکتورهای دیگر می تواند اثر عکس بر فعالیت آن داشته باشد مانند افزایش اسیدیته و هوادهی که سبب ایجاد فرم غیر فعال انزیم می شود [۱۰]. از آنجایی که مطالعات زیادی بر روی سویه های بومی Acetobacter انجام نشده است در این مقاله سعی شده است فرمنتاسیون سرکه توسط یک سویه بومی مورد بررسی قرار داده شود و جهت افزایش راندمان تولید اسید استیک، بهینه سازی شرایط تولید انجام گیرد

مواد و روشها

سویه باکتریایی و محیط های کشت: سویه استفاده شده در این بررسی، در پژوهشهای قبلی از سرکه های خانگی جداسازی و شناسایی شده بود [۱۱]. برای تهیه کشت تازه و نگهداری سویه Acetobacter sp.M از محیط کشت GYC (Glucose Yeast extract Calcium carbonate)استفاده شد (در هر لیتر-D :(گلوکز۵۰ گرم،عصاره مخمر ۱۰ گرم، کربنات کلسیم ۳۰ گرم و آگار ۲۵ گرم. تولید اسیداستیک و تحمل سویه در برابر غلظتهای اولیه اتانول و اسید استیک، اثرات هوادهی،دما و pHو همچنین اندازه گیری فعالیت آنزیم در محیط کشت (Ethanol Yeast extract Broth) EYBمورد بررسی قرار گرفت (در هر لیتر): عصاره مخمر ۳۰ گرم و اتانول ۲۰ میلی لیتر .

تولید اسیداستیک توسط سویه Acetobacter sp.M : به منظور ایجاد محیط مناسب جهت تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M ، از محیط کشت GYC 24 ساعته جهت تلقیح لوله های کشت EYB استفاده شد. از محیط کشت ۲٤ ساعته در این لوله ها نیز جهت تلقیح فلاسک های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت EYB استفاده شد. بعد از ۲٤ ساعت محتوای فلاسک ها در شرایطrpm1000 ، min10و ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]

و محلول رویی آن جهت بررسی میزان تولید اسیداستیک استفاده شد. کلیه مراحل آزمایش با ۳ تکرار انجام شد و میانگین نتایج گزارش شد.

اثر فاکتورهای مختلف بر تولید اسید استیک: اثر غلظت های اولیه اتانول و اسیداستیک بر تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M با کمک محیط های کشت حاوی ۹٪-۲٪ اتانول و ۵٪-۲٪ اسیداستیک مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی اثر دماهای مختلف هم ، ارلن های کشت در دماهای ۴۰-۱۵ درجه سانتیگراد گرما گذاری شدند. برای مطالعه اثر pH بر واکنش ، محیط های کشت در pH های ۹-۲ با کمک محلول های یک نرمال HCl و NaOHتنظیم شدند. بررسی اثر هوادهی با کمک ارلن ساده و شیار دار در دور rpm150 انجام گرفت. سپس ارلن های شیاردار در دورهای مختلف100 rpm ،150،200،250، 300قرار داده شدند. کلیه مراحل آزمایش با ۳ تکرار انجام شد و میانگین نتایج گزارش شد.

تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M در بیوراکتور: تولید اسید استیک توسط سویه مورد نظر درفرمانتور (Biostat B B.Braun) STR با گنجایش ۲ لیتر نیز مورد بررسی قرار گرفت که حاوی 500 ml محیط کشت EYB با غلظت اولیه ٦٪ اتانول ، ٤ pHو دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بود. سرعت همزن rpm200،300،400،500، 600و تراکم اکسیژن 2 vvm در نظر گرفته شد .

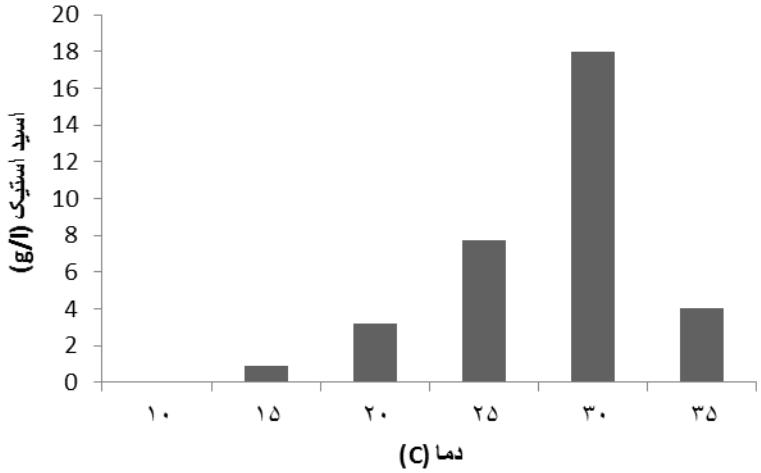
آنالیز محصول: مقدار اسید و اتانول با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی گازی Buck scientist با ستون شیشه ای کاپیلاریAltech سنجش شد. اندازه ستون (m30 × 25/0 µm) و از نوع AT Wax با آشکارساز FID بود. دمای تزریق : ۲۰۰ درجه سانتیگراد و دمای آشکارساز : ۲۵۰ درجه سانتیگراد و برنامه دمایی : دمای شروع۷۰ درجه سانتیگراد که در مدت ۵ دقیقه به ۲۰۰ درجه سانتیگراد می رسید. گاز حامل هلیوم و فشار سر ستون13 psi بود. مقدار تزریق شده از هر نمونه هم3 μl بود.

نتایج

اثر دما بر تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M : به منظور پی بردن به اثر دما بر تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M ، این سویه در محدوده دمایی ۴۰-۱۵ درجه سانتیگراد در محیط EYB کشت شد. نتایج نشان داد که با افزایش دما از ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد تولید اسید استیک افزایش یافته و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بیشترین بازده در تولید اسید استیک مشاهده شد یعنی ۱۸ گرم بر لیتر. بعد از این دما تولید اسید با شیب کم و بیش تا دمای ۳۵ درجه سانتیگراد کاهش یافت و بعد از دمای ۳۵ درجه سانتیگراد اسید تولید نشد زیرا باکتری قادر به رشد نبود. شکل۱ میزان اسید استیک تولید شده توسط سویه Acetobacter sp.M را در دماهای مختلف نشان می دهد.

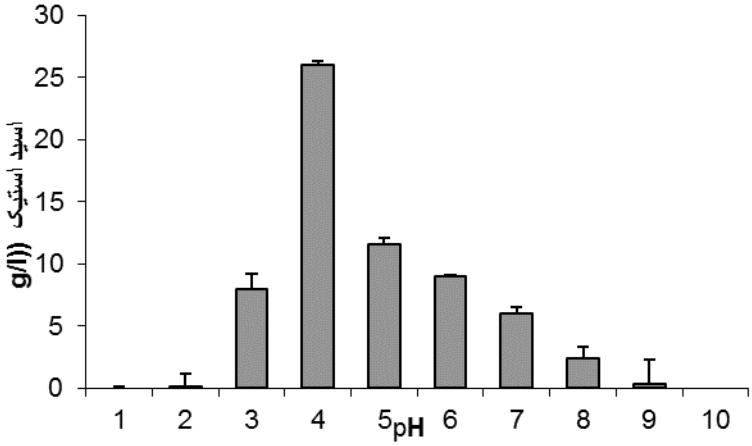
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]



شکل ۱ – اثر دما بر میزان تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M در فلاسکهای ۲۵۰ میلی‌لیتری با ۵۰ میلی لیتر محیط کشت EYB 24 ساعته

اثر pH بر تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M : باکتریهای خانواده استوباکتراسه در محیطهای اسیدی فعال هستند ولی فعالیت آنها در محیطهای قلیایی نیز باید مورد توجه قرار گیرد. از اینرو تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M در دامنه 2-9 pH مورد بررسی قرار گرفت. در pH کمتر از ۳ تولید چندانی مشاهده نشد . ولی در 4 pH تولید به حداکثر خود یعنی ۲۶ گرم بر لیتر رسید. بعد از 6 pH تولید اسید ناگهان افت کرده و بعد از pH =9، اسید استیک در محیط یافت نشد که دلیل آن عدم رشد باکتری بود .

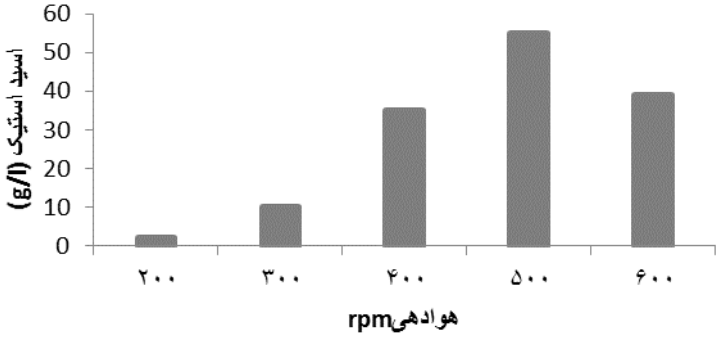


شکل۲– اثر pH بر میزان تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M . pH محیط کشتهای EYB 50 میلی لیتر در فلاسکهای ۲۵۰ میلی لیتری از طریق افزودن HCl و NaOH تنظیم شد. دما ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]

اثرهوادهی بر تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M : اثر هوادهی ابتدا در فلاسک در دو حالت بررسی شد: در فلاسکهای ساده (Conical flask) و فلاسکهای شیاردار (Buffled flask)نتایج حاصل از آنالیز GC برروی محلول حاوی سه ماده آلی (اتانول، استالدئید و اسید استیک) در شرایطی که از ارلن ساده استفاده شد حاکی ازآن است که تنها ۹ گرم بر لیتر از اتانول موجود درمحیط کشت مصرف شده واین در حالی است که زمانی که از ارلن شیاردار استفاده شد، ۲۷ گرم بر لیتر از اتانول موجود درمحیط مصرف شده و به اسید استیک تبدیل شد. سپس ارلن های شیاردار در دورهای مختلف100 rpm،150،200،250، 300 قرار داده شدند و نتایج نشان داد که در دور 200 rpm میزان تولید اسید استیک به حداکثر میزان رسید و از 60 g/l اتانول موجود در محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و pH 4 ، در حدود 45 g/l اسید استیک تولید شد که این بیشترین مقدار اسید استیک بود که در ارلن با حفظ شرایط بهینه تولید شد.



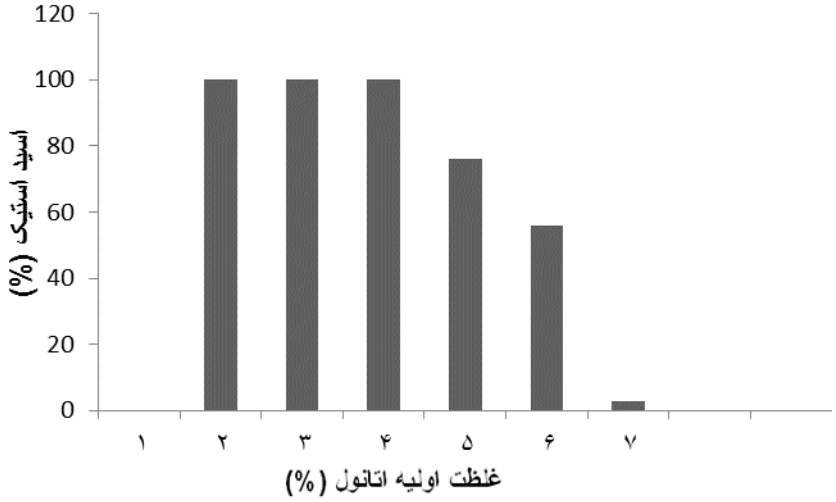
شکل ۳ – اثر میزان هوادهی بر تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M در فلاسکهای ۲۵۰ میلی‌لیتری با ۵۰ میلی لیتر محیط کشت EYB در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، pH 4در دورهای مختلف شیکرانکوباتور در ۲٤ ساعت

اثرغلظتهای اولیه اسید واتانول بر تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M : تحمل سویه Acetobacter sp.M در برابرغلظتهای بالای سوبسترا (اتانول) ومحصول (اسیداستیک) در شرایط بهینه دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و pH 4 و دور هوادهی 200 rpm مورد بررسی قرار گرفت. در غلظت ۷ ٪ و بالاتر به دلیل ایجاد یک فاز لگ طولانی ، ۲٤–۲۰ ساعته در رشد سویه Acetobacter sp.M ، به جای ۲٤ ساعت مدت زمان ٤۸ ساعت جهت انکوباسیون در نظر گرفته شد. سویه Acetobacter sp.M قادراست تا غلظت ٪۷ ازاتانول را تحمل کند درواقع دراین غلظت سویه Acetobacter sp.M قادربه زنده مانی می باشد ولی نمی تواند هیچگونه فعالیتی را ازخود نشان دهد .کدورت ناشی از رشد باکتری درمحیط EYB نشانگر رشد باکتری درغلظت ٪۷ اتانول می باشد . اما ازغلظت ٪۷ اتانول به پایین قادر به فعالیت و بیواکسیداسیون می باشد. نتایج حاصل از فعالیت سویه Acetobacter sp.M در برابرغلظتهای ٪۹–۲ اتانول به صورت درصدی و بدون در نظر گرفتن غلظت اولیه اتانول در شکل ٤ نشان داده شده است. فاز تاخیر ۲٤–۲۰ ساعته در حضور غلظتهای اولیه ۳ ٪ ٤ ٪ و ۵ ٪ اسید نیز ایجاد شد از اینرو زمان انکوباسیون ٤۸ ساعت در نظر گرفته شد. شکل ۵ نتایج حاصل از فعالیت سویه Acetobacter sp.M در برابر غلظتهای مختلف

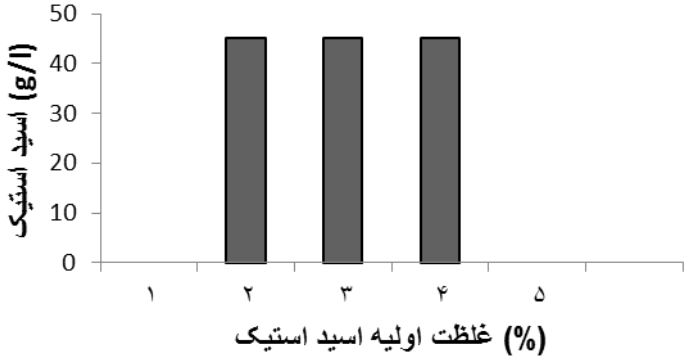
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]

۲٪،۳٪،٤٪،٥٪ اسیداستیک به صورت گرم درلیتر، بدون درنظر گرفتن غلظت اولیه آن در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نشان می دهد .همانطور که در شکل هم دیده می شود سویه Acetobacter sp.M در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قادر است در غلظت اولیه ٤ ٪ اسید رشد کرده عمل بیواکسیداسیون اتانول را انجام دهد.



شکل٤- اثر غلظت اولیه اتانول بر تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به محیطهای کشت EYB (۵۰ میلی لیتر در فلاسکهای ۲۵۰ میلی لیتری) غلظتهای مختلف اتانول٪ ۹-۲ افزوده شد. بعد از تلقیح کشتها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ٤۸ ساعت گرماگذاری شدند.

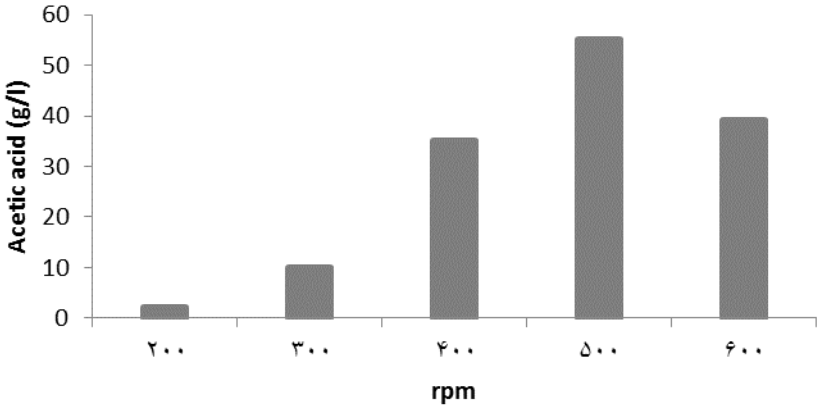


شکل ۵ - اثر غلظت اولیه اسید استیک بر تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد .به محیطهای کشت EYB (۵۰ میلی لیتر در فلاسکهای ۲۵۰ میلی لیتری) غلظتهای مختلف اسید استیک ٪ ۲-۵ افزوده شد. بعد از تلقیح کشتها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ٤۸ ساعت گرماگذاری شدند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]

تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M در بیوراکتور: در این پژوهش فعالیت سویه Acetobacter sp.Mدر حجمهای بالای محیط کشت در راکتور مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از یک فرمانتور ۲ لیتری از نوع stirred tank reactor استفاده شد. نتایج حاصل از فعالیت سویه Acetobacter sp.M در شرایط بهینه دما در ۳۰ درجه سانتیگراد و pH برابر ٤ در بیوراکتور ۲ لیتری با حجم ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت EYB و حجم هوادهی 2 vvm در حضور ٦٪ اتانول با سرعتهای مختلف همزن در مدت ٢٤ ساعت در شکل ٦ قابل مشاهده است. همانطور که در شکل نشان داده شده است بیشترین میزان تولید اسید استیک در دور هوادهی 500 rpm بدست آمد و در حدود 55 g/l می باشد. در دورهای بالاتر، افزایش هوادهی سبب کاهش تولید اسید استیک شد .



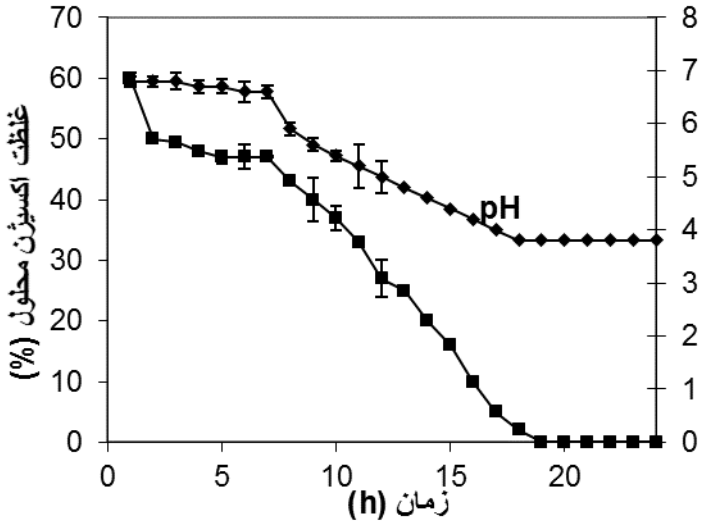
شکل ٦- تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و pH برابر ٤ در بیوراکتور ۲ لیتری با حجم ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت EYB و حجم هوادهی 2 vvm در حضور ٦٪ اتانول با سرعتهای مختلف همزن در مدت ٢٤ ساعت

فاز تولید اسید استیک در سویه Acetobacter sp.M : با استفاده از اعداد ثبت شده حاصل از فعالیت بیوراکتور به راحتی می توان زمان تولید اسید استیک را درباکتری مورد نظر بررسی کرد. برای این کارهم می توان از pH محیط استفاده کرد و هم از میزان اکسیژن موجود درمحیط کشت، به این صورت که به دلیل استفاده باکتریها ازاکسیژن محیط کشت، درابتدا به طورآهسته اکسیژن کاهش می یابد ولی زمانی که باکتری به فاز تولید اسید استیک می رسد مصرف اکسیژن به بیشترین حالت خود رسیده و به سرعت اکسیژن درمحیط کاهش می یابد . بعد از پایان این فاز مجددا مصرف اکسیژن به آهستگی صورت می گیرد. در مورد pH هم همرا ه با فاز تولید اسید استیک، pH محیط کشت به دلیل تولید سریع اسید استیک ناگهان کاهش می یابد و بعد ازاین فازکاهش آن به آهستگی صورت می گیرد. شکل۷ منحنی تولید اسید استیک را براساس کاهش pH و کاهش اکسیژن موجود درمحیط کشت توسط سویه Acetobacter sp.M نشان می دهد. همانطور که در شکل مشاهده می شود کاهش میزان اکسیژن محلول در محیط کشت از ساعت ۸ شروع و در ساعت ۱۸ میزان اکسیژن به حداقل رسیده و ثابت مانده است. همزمان، pH محیط که در ٦/۸ تنظیم شده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]

بود افت می کند. پایینترین pH ایی که این باکتری درمحیط ایجاد می کند ۳/۸ می باشد . طبق هر دو منحنی از زمان تلقیح باکتری تا ۷ ساعت بعد ، تولید زیادی صورت نمی گیرد. از ساعت ۸ اسیدیته محیط کشت یا pH رو به کاهش گذاشته است و در ساعت ۱۸ در ۳/۸ ثابت مانده است. همپوشانی این دو منحنی (افت pH و افت اکسیژن محلول) نشانگر زمان آغاز و پایان تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M می‌باشد. این بدین معناست که تمام اسید استیک تولید شده توسط سویه Acetobacter sp.M در مدت ۱۰ ساعت تولید می شود که نشانگر سرعت بالای این سویه در اکسیداسیون و تولید اسیداستیک می باشد.



شکل ۷- فاز تولید اسید استیک براساس کاهش pH و کاهش اکسیژن موجود درمحیط کشت توسط سویه Acetobacter sp.M

بحث و نتیجه گیری

جهت بهینه سازی تولید اسید استیک توسط سویه *Acetobacter* sp.M از روش بررسی یک فاکتور در هر زمان استفاده شد. بکارگیری شرایط بهینه باعث شد میزان تولید اسید استیک توسط سویه *Acetobacter* sp.M تا ٤٥ گرم بر لیتر در ارلن افزایش یابد. اثرات دما، pH، هوادهی و غلظت اولیه اتانول و اسید استیک بر تولید اسید استیک توسط سویه *Acetobacter* sp.M مورد مطالعه قرار گرفت.

دراین پژوهش دامنه pH ایی که باکتریها درآن قادربه رشد و فعالیت هستند ۸-۳ و pH بهینه جهت تولید اسید استیک ٤ بود. درکارهای مشابهی که برروی سویه های مختلفی ازاین باکتریها انجام شده این دامنه بین۸/۵-۲/۵ گزارش شده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]

است [۱۲] و معلوم شده است که سرعت فرمنتاسیون اتانول به اسیداستیک درpH بالای ٤/٥ کاهش می یابد .بهترین PH برای فعالیت A.aceti نیز ۳/۸ گزارش شده است [۱۳].

غلظت اسید استیک تولید شده در محیط کشت نیز عامل دیگری است که بر تولید اسید استیک توسط سویه های استوباکتر تاثیرگذار است. مشخص شده است که اسیداستیک و یونهای استات، وارد سلولها شده و باعث کاهش pH درونی می شود و با مهار تنفس سلولی نهایتا سبب مهار رشد سلولهای باکتری می شود [١٤]. جهت کاهش این اثر، می توان اسید تولیدی را ازمحیط خارج کرد. تحقیقات نشان داده است که با کمک روش ED-F (الکترودیالیز فرمنتاسیون) که در آن با خروج اسیداستیک تولید شده از محیط اثر مهاری اسید از بین می رود، تولید اسید را می توان به ۹۷/٦ گرم بر لیتر رساند [۱٥]. یافتن سویه ای که بتواند PH های پایین تر از PH بهینه را تحمل کند نیز روش مناسبی برای مبارزه با اثر مهاری اسید استیک می باشد. گزارشات مختلفی درباره قدرت تحمل و رشد باکتریهای استوباکتراسه در غلظتهای متفاوتی از اسید وجود دارد[٤]. ازآن جمله سویه ای از A.lovaniensis که قادر به تحمل غلظت اولیه اسیداستیک تا ٥٪ می باشد [١٦] یا سویه ایی از A.aceti که ٦٪ اسید را در محیط کشت تحمل می کند ولی این سویه به سرعت مقاومت خود را از دست می دهد که احتمالا" به دلیل ناپایداری ژنتیکی می باشد [۱۷]. سویه *Acetobacter* sp.M نیز قادر بود غلظت ٤٪ اسید استیک را در محیط کشت تحمل کند. از عمده ترین دلایل مقاومت باکتری در مقابل غلظت بالای اسید، وجود یک سیستم برای کاهش pH درونی یا وجود سیستمی برای خروج یونهای استات می باشد، زیرا pH درونی در چنین سویه هایی با وجود غلظت زیاد اسید در حدود ٦/٥-٥/٥ می باشد[۱۸].

یکی دیگر از فاکتورهای مورد مطالعه در فرایند تولید اسید استیک، اثر غلظت اتانول می باشد. معمولا استوباکتراسه قادر به تحمل در صد بالایی از اتانول به عنوان غلظت اولیه تا ۱۰٪هستند[٥] ولی یک فاز تاخیر طولانی در رشد این باکتریها در حضور غلظت بالای اتانول ایجاد می شود [۱۹]. غلظت اولیه اتانول از حدود ٥٪ به بالا اثر مهاری در تولید اسید استیک دارد [١٤]. این فاز تأخیر در رشد سویه *Acetobacter* sp.M هم دیده شد. در واقع زمانی که سویه *Acetobacter* sp.M در حضور غلظت ٥٪ اتانول و بالاتر کشت شد با ٢٤-٢٠ ساعت تأخیر رشد و فعالیت نشان داد. از اینرو زمان بیواکسیداسیون ٤٨ساعت در نظر گرفته شد. در گزارشی یک سویه از A.lovaniensis قادر به تحمل غلظت اولیه اتانول تا ۹٪ بدون فاز تأخیر بود[۱۹]. باید توجه داشت که مقاومت در برابر اتانول یا اسید می تواند جنبه ژنتیکی باشد[۱۷].

غلظت اکسیژن حل شده در محیط نیز پارامتر متابولیکی دیگری است که بر میزان فرمنتاسیون به ویژه در باکتریهای هوازی اثر بسیاری دارد. اگر مقدار آن در محیط بسیار اندک باشد، پروسه به آهستگی انجام می گیرد و بعضی واکنشهای ثانویه نظیر تشکیل اتیل استات از طریق استریفیکاسیون اتانول و اسید استیک شکل می گیرد[۱۳] و اگر مقدار آن در محیط خیلی زیاد باشد، آنزیم الکل دهیدروژناز که مسئول اکسیداسیون اتانول است، به فرم غیرفعال در آمده و باکتری قدرت تبدیل اتانول به اسید استیک را از دست می دهد[۱۰]. حجمهای هوادهی متفاوتی در

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]

بیواکسیداسیون اتانول استفاده می شود ولی معمولا" از دامنه vvm ۱-۲ خارج نمی شود[۱۳]. برای افزایش میزان اکسیژن حل شده محیط علاوه بر حجم هوادهی، به دور چرخش موتور یا چرخش شیکرانکوباتور هم توجه می شود و همینطور حجم محیط کشت. در این پژوهش زمانی که از ارلن های ساده استفاده شد حتی در حضور شرایط بهینه PH، دما، غلظت اولیه سوبسترا و محصول تنها در حدود ۹ گرم بر لیتر اسید تولید شد اما زمانی که از ارلن شیار دار استفاده شد به دلیل این که هوادهی با این ارلن ها بسیار خوب انجام گیرد میزان تولید اسید به ۲۷ گرم بر لیتر رسید و زمانی که میزان هوادهی از طریق افزایش دور چرخش شیکرانکوباتور بهینه سازی شد تولید اسید استیک تا ٤٥ گرم بر لیتر افزایش یافت. در حجمای بالاتر در بیوراکتور نیز زمانی که میزان هوادهی از طریق افزایش چرخش پره ها افزایش یافت میزان تولید اسید استیک به ۵۵ گرم بر لیتر رسید. هوادهی بالاتر از حد بهینه نیز به دلیل غیرفعال نمودن انزیم الکل دهیدروژناز سبب کاهش فرایند تولید اسید استیک شد که در تحقیقات دیگر نیز نشان داده شده است[۲۰]. از اینرو پخش اکسیژن به طور یکنواخت در محیط کشت از اهمیت بسزایی برخوردار است و این موضوع می‌تواند از نظر صنعتی مورد توجه واقع شود چرا که در عمل، تولید اسید استیک (سرکه‌سازی) در استاتورهای بزرگ با حجمهای بسیار بالا یعنی بالاتر از ۱۵۰۰۰ لیتر انجام می گیرد. این نتایج نشان می دهد که در بین پارامترهای مطالعه شده، هوادهی و میزان اکسیژن محلول در محیط کشت بیشترین اثر را در تولید اسید استیک توسط سویه Acetobacter sp.M دارا می باشد.

Referencces

1- Kim JS, Kim H, Oh K K and Kim YS (2002) *J. Ind. Eng. Chem.*, **8,** 519-523.

2- Jiménez-Hornero, J.E., Santos-Dueñas, I.M., García-García, I. (2009). Biochemical Engineering Journal, 45, 7-21

3- Awad H, Diaz R, Malek R. Othman N, Aziz R, Enshasy H (2012). E-Journal of Chemistry 9(4), 2275-2286

4- Adachi O, Moonmangmee D, Toyama H, Yamada M Shinagawa E, Matsushitak (2003) Appl Microbiol Biotechnol , 60: 643-610.

5- Saeki A, Theeragool G, Matsushita K, Toyama H. Lotong N, Adachi O, (1997) Biosci Biotechnol Biochem. 61(1): 138-145.

6- Moonmangmee D, Adachi O, Ano Y. Shinagawa E, Toyama H, Theeragol G, lotong N, Matsushitak . (2000) Biosci Biotechnol Biochem, 64 (11): 2306-2315.

7- Berner D, Krieg N, Staley J(2005)"Bergys manual of systematic bacteriology", V2, Part C, Pub.springer. pp:41-95.

8- Adachi O, Yakushi T (2016) Acetic Acid Bacteria, chapter 13: pp 273-297.

9- Yakushi T, Matsushita K (2010). Appl Microbiol Biotechnol 86(5):1257–1265.

10- Matsushita.K,Yakushi.T,Takaki.Y,Toyama.H,Adachi.O (1995) J Bacteriol (Nov) 6552-6559.

11- Moghadami F, Soudi MR,Shayesteh SH, Rezvanian M (2004). Science journal of Tehran university, 30(3): 541-549.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]

12- Romano.A,Gandolfi.R,Nihi.P,Rollini.M (2002) J Molecul Catalys B: Enzymatic 17:235-240.

13- De Ory.I, Romero.L.E,Cantero.D (1998) Appl Microbiol Biotechnol 49: 189-193.

14- González-Sáiz, J.M.; Pizarro, C. and Garrido-Vidal, D. (2003).. Biotechnology Progress 19(2), 599-611.

15- Durán, E., Palma, M., Castro, R., García-Barroso, C. (2010).. Food Chemistry, 121(29), 575-579. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.12.050.

16- González-Sáiz, JM., Pizarro, C. and Garrido-Vidal, D. (2003). Research Signpost 217-242.

17- Beppu.T (1993) Antonie van Leeuwenhoek (64): 121-135.

18- Baena-Ruano, S., Santos-Dueñas, I.M., Mauricio, J.C., García-García I (2010). Journal of the Science of Food and Agriculture, 90, 2675-2681.

19- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I., Jiménez-Hornero, J., Bonilla-Venceslada, J.L., Álvarez-Cáliz, C. and García-García, I (2010) Journal of Chemical Technology and Biotechnology 85: 908–912.

20- Trcek J, Toyama T, Czuba J, Misiewicz A, Matsushita K (2006). Appl Microbiol Biotechnol 70:366–373

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.1.1.0]

Acetic acid production by native strain *Acetobacter* sp. M

Fouzieh Moghadami

Department of Biology, Payame Noor University, PO BOX 19395-3697 Tehran, Iran
fouziehm@yahoo.com Tel: 09127821623

Abstract

Acetic acid is one of the organic acids which is used in the cosmetic, chemical and food industries. The production of acetic acid is mainly carried out by chemical methods but acetic acid for food industries is produced by microbial fermentation method. Studying the native strains of acetic acid bacteria can be useful for the best production of acetic acid. Thus, in this study some isolates from domestic vinegars were investigated. Among the isolates, one was able to produce more than the others. This strain was called Acetobacter sp. M. The optimization was done. Acetobacter sp. M was able to produce 45 g/l acetic acid at 30 °C in the presence of 6% ethanol concentration in baffled flasks in 200 rpm in 18 h. Acetic acid production was investigated in 2-lit stirred tank bioreactor. Under fully aerobic conditions, the production of acetic acid reached maximal concentration of about 55 g/l in optimized condition in 500 rpm in 24 h.

Keywords: Acetobacter, Acetic acid, Fermentation