**Semiannual Organic Chemistry Journal**

Vol. 1, No. 2, Autumn-Winter 2022 (1 – 9)

**دوفصلنامه شیمی آلی**

سال اول، شماره دوم، پائیز ـ زمستان ۱۴۰۱ ، (۱ ـ ۹)

# تولید اسید استیک توسط سویهٔ بومی *Acetobacter sp. M*

**فوزیه مقدمی[۱]، محمدرضا پورهروی[۲*]**

۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور تهران، ص.پ. ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

۲ گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، ص.پ. ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

**(تاریخ وصول: ۹۵/۰۷/۰۴ ـ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۱/۲۰)**

# Acetic Acid Production by Native Strain *Acetobacter sp. M*

**Fouzieh Moghadam[*1],Mohammad Reza Poor Heravi[2]**

1 Department of Biology, Payame Noor University (PNU), P.O.Box 19395-4697, Tehran, Iran

2 Department of Chemistry, Payame Noor University (PNU), P.O.Box 19395-4697, Tehran. Iran

**(Received: Sep. 25, 2016 - Accepted: April. 09, 2017)**

**چکیده**

اسید استیک یکی از اسیدهای آلی است که در صنایع غذایی و آرایشی و شیمیایی موارد استفادهٔ فراوانی دارد. تولید این اسید ضعیف عمدتاً به روش‌های شیمیایی است ولی اسید استیک مورداستفاده در صنایع غذایی از طریق فرمنتاسیون میکروبی تولید می‌شود. بررسی سویه‌های بومی تولیدکنندهٔ اسید استیک می‌تواند در استفادهٔ بهینه از آن‌ها، جهت تولید اسید استیک، مؤثر باشد؛ ازاین‌رو، تعدادی از این باکتری‌ها را که از سرکه‌های خانگی جداشده بودند، بررسی کردیم. در بین سویه‌های موردبررسی یک‌سویه بیشترین مقدار اسید استیک را تولید می‌کرد. این سویه *Acetobacter sp. M* نام گرفت. بهینه‌سازی شرایط تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* انجام گرفت. این سویه در شرایط بهینهٔ دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد، دور هوادهی 200 rpm و غلظت اولیهٔ ۶٪ اتانول قادر به تولید 45 g/L اسید استیک در فلاسک شیاردار، در مدت ۱۸ ساعت بود. تولید اسید استیک در بیوراکتور ۲ لیتری نیز با رعایت شرایط بهینه انجام گرفت و با افزایش میزان هوادهی تا 500 rpm میزان تولید اسید استیک به 55 g/L در مدت ۲۴ ساعت رسید.

**واژگان کلیدی**

اسید استیک، استوباکتر، فرمنتاسیون، صنایع غذایی، شرایط هوازی.

**Abstract**

Acetic acid is one of the organic acids which are 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 ºC 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**

Acetic acid, *Acetobacter sp. M*, fermentation, food industries, aerobic conditions.

***نویسنده مسئول:** محمد رضا پورهروی

***Corresponding Author: Mohammad Reza Poor Heravi**

**Email:** mrheravi@pnu.ac.ir, mrheravi@yahoo.com

**مقدمه**

اسید استیک یکی از ساده‌ترین اسیدهای آلی است که بوی تیز و مزهٔ ترش دارد. این اسید به‌عنوان یکی از مواد حدّ واسط مهم در بسیاری از صنایع، مانند صنایع شیمیایی و چوب، شناخته می‌شود[۱]. اسید استیک با روش‌های شیمیایی و روش تخمیر میکروبی، توسط باکتری‌های تولیدکنندهٔ اسید استیک، تولید می‌شود. در بین روش‌های شیمیایی، روش کربوکسیل‌دار شدن متانول عمده‌ترین روش تولید اسید استیک است. بیش از ٪۶۵ تولید جهانی اسید استیک از این روش انجام می‌پذیرد[۲]. روش تخمیر میکروبی ـ که توسط باکتری‌های تولیدکنندهٔ اسید استیک انجام می‌گیرد ـ فقط ٪۱۰ سهم جهانی تولید را دارا است. از این نوع اسید استیک در صنایع غذایی استفاده می‌شود؛ ازاین‌رو، بهینه‌سازی پروسه‌های بیولوژیک برای تولید اسید استیک یکی از مهم‌ترین موضوعات برای محققان به‌منظور رسیدن به بهترین نتیجه است[۳]. پژوهشگران تاکنون باکتری‌های تولیدکنندهٔ اسید استیک را از نواحی مختلف دنیا جمع‌آوری و مطالعه کرده‌اند[۴]، ولی بایستی به این نکته توجه کرد که سویه‌های بومی هر ناحیه ممکن است ویژگی‌های خاص خود را داشته‌باشند که این موضوع گاه ازلحاظ صنعتی می‌تواند قابل‌توجه باشد [۵, ۶]؛ بنابراین پیشرفت فرایندهای تولید اسید استیک می‌تواند با مطالعهٔ دقیق‌تر سویه‌های بومی هر آب‌وهوایی تحت تأثیر قرار بگیرد. طبقه‌بندی باکتری‌های اسید استیک در سال‌های اخیر توسعه یافته است و این میکروارگانیسم‌ها به ۱۵ جنس تقسیم شده‌اند [۷] یک گروه از آن‌ها جنس استوباکتر (Acetobacter) است که در صنعت برای تولید اسید استیک از آن بهره می‌برند و موضوع این مقاله است. سویه‌های متعلق به جنس Acetobacter دارای چندین آنزیم دهیدروژناز وابسته به غشا هستند که سبب می‌شود بتوانند برخی از قندها و قندالکل‌ها را به‌طور ناقص اکسید و محصولات اکسایش را به بیرون از سلول تراوش کنند. به همین دلیل، چنین فرایندهایی را اکسیداسیون ناقص یا فرمنتاسیون اکسیداتیو می‌نامند. دو آنزیم الکل دهیدروژناز (ADH) و آلدئید دهیدروژناز (ALDH) در باکتری استوباکتر سبب تولید اسید استیک می‌شود [۸]. الکل دهیدروژناز قادر است اتانول را به استالدئید اکسید کند و آلدئید دهیدروژناز نیز استالدئید حاصل را به اسید استیک اکسید می‌کند [۹]. فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز براثر افزایش برخی فاکتورهای محیطی‌ای مانند دما افزایش می‌یابد [۴]. در مقابل، افزایش برخی فاکتورهای دیگر می‌تواند اثر عکس بر فعالیت آن داشته‌باشد، مانند افزایش اسیدیته و هوادهی که سبب ایجاد فرم غیرفعال آنزیم می‌شود [۱۰]. ازآنجایی‌که مطالعات زیادی بر روی سویه‌های بومی Acetobacter انجام نیافته است در این مقاله کوشیده‌ایم که تخمیر سرکه را توسط یک سویهٔ بومی بررسی کنیم و به‌منظور افزایش راندمان تولید اسید استیک، بهینه‌سازی شرایط تولید را انجام دهیم.

**مواد و روش‌ها**

**سویهٔ باکتریایی و محیط‌های کشت**

سویهٔ استفاده‌شده در این بررسی، در پژوهش‌های قبلی از سرکه‌های خانگی جداسازی و شناسایی شده‌بود [۱۱]. برای تهیهٔ کشت تازه و نگهداری سویهٔ *Acetobacter sp. M* از محیط کشت Glucose Yeast Extract Calcium carbonate) GYC) استفاده کردیم (در هر لیتر: D-گلوکز ۵۰ گرم، عصارهٔ مخمر ۱۰ گرم، کربنات کلسیم ۳۰ گرم و آگار ۲۵ گرم). تولید اسید استیک و تحمل سویه در برابر غلظت‌های اولیهٔ اتانول و اسید استیک، اثرات هوادهی، دما و *p*H و همچنین اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در محیط کشت Ethanol- Yeast extract Broth (EYB) بررسی شد (در هر لیتر: عصارهٔ مخمر ۳۰ گرم و اتانول ۲۰ میلی‌لیتر).

**تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M***

به‌منظور ایجاد محیطی مناسب برای تولید اسید استیک توسط سویهٔ Acetobacter sp. M از محیط کشت GYC ۲۴ ساعته جهت تلقیح لوله‌های کشت EYB استفاده کردیم. از محیط کشت ۲۴ ساعته در این لوله‌ها همچنین برای تلقیح فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت EYBبهره بردیم. بعد از ۲۴ ساعت محتوای فلاسک‌ها را در شرایط rpm۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفوژ و از محلول رویی آن برای بررسی میزان تولید اسید

استیک استفاده کردیم. کلیهٔ مراحل آزمایش با ۳ تکرار انجام پذیرفت و میانگین نتایج گزارش شد.

**اثر فاکتورهای مختلف بر تولید اسید استیک**

اثر غلظت‌های اولیهٔ اتانول و اسید استیک را بر تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* با کمک محیط‌های کشت حاوی ۲–۹٪ اتانول و ۲–۵٪ اسید استیک بررسی کردیم. برای بررسی اثر دماهای مختلف نیز ارلن‌های کشت را در دماهای ۱۵–۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری کردیم. برای مطالعهٔ اثر *p*H بر واکنش، محیط‌های کشت در *p*H های ۲–۹ به کمک محلول‌های یک نرمال HCl و NaOH تنظیم شدند. بررسی اثر هوادهی با کمک ارلن ساده و شیاردار در دور rpm ۱۵۰ انجام پذیرفت. سپس ارلن‌های شیاردار در دورهای مختلف rpm ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ قرار داده شدند. کلیهٔ مراحل آزمایش با ۳ تکرار انجام یافت و میانگین نتایج گزارش شد.

**تولید اسید استیک توسط سویهٔ Acetobacter sp. M در بیوراکتور**

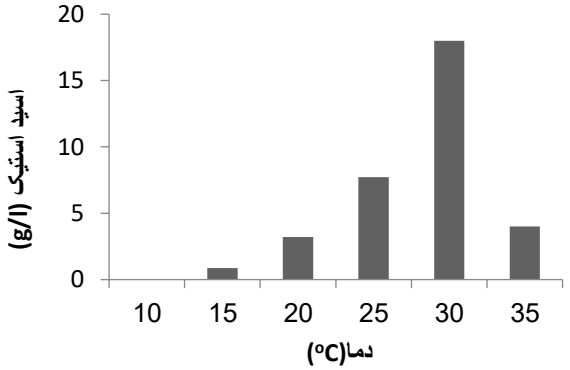
تولید اسید استیک توسط سویهٔ موردنظر در فرمانتور STR (Biostat B B.Braun) با گنجایش ۲ لیتر نیز بررسی شد که حاوی mL ۵۰۰ محیط کشت EYB با غلظت اولیهٔ ٪۶ اتانول، *p*H=۴ و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد بود. سرعت همزن rpm ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و تراکم اکسیژن ۲vvm در نظر گرفته شد.

**آنالیز محصول:** مقدار اسید و اتانول با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی گازی Buck scientist با ستون شیشه‌ای کاپیلاری Altech سنجش شد. اندازهٔ ستون (۳۰×m۰/۲۵μm) و از نوع AT Wax با آشکارساز FID بود. دمای تزریق: ۲۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد، دمای آشکارساز: ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، برنامهٔ دمایی: دمای شروع ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد که در مدت ۵ دقیقه به ۲۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد می‌رسید. گاز حامل هلیوم و فشار سر ستون psi=۱۳ بود. مقدار تزریق‌شده از هر نمونه هم ۱۳ μ بود.

**بحث و نتیجه‌گیری**

**اثر دما بر تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M***

به‌منظور پی‌بردن به اثر دما بر تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* این سویه در محدودهٔ دمایی ۴۰–۱۵ درجهٔ سانتی‌گراد در محیط EYB کشت شد. نتایج نشان داد که با افزایش دما از ۱۵ تا ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد تولید اسید استیک افزایش می‌یابد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین بازده در تولید اسید استیک مشاهده می‌شود؛ یعنی ۱۸ گرم بر لیتر. بعدازاین دما تولید اسید با شیب کم‌وبیش تا دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد کاهش یافت و بعد از دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد اسید تولید نشد؛ زیرا باکتری قادر به رشد نبود. شکل (۱) میزان اسید استیک تولیدشده توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* را در دماهای مختلف نشان می‌دهد.

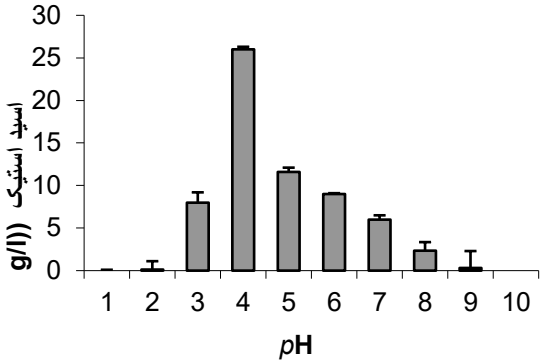



**شکل ۱. اثر دما بر میزان تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری با ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت EYB ۲۴ ساعته**

**اثر *p*H بر تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M***

باکتری‌های خانوادهٔ استوباکتراسه در محیط‌های اسیدی فعال‌لند، ولی فعالیت آن‌ها در محیط‌های قلیایی نیز بایستی موردتوجه قرار گیرد؛ ازاین‌رو، تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* در دامنهٔ *p*H =۲–۹ موردبررسی قرار گرفت. در *p*H کمتر از ۳ تولید چندانی مشاهده نشد، ولی در *p*H =۴ تولید به حداکثر خود، یعنی ۲۶ گرم بر لیتر رسید. بعد از *p*H =۶ تولید اسید ناگهان افت کرد و بعد از *p*H =۹ اسید

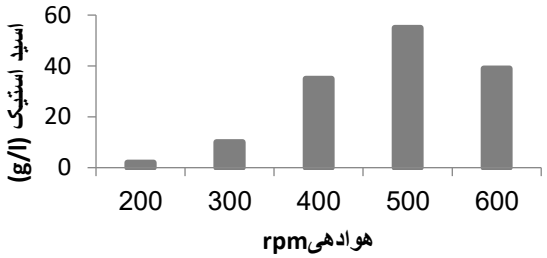
استیک در محیط یافت نشد که دلیل آن عدم رشد باکتری بود.




**شکل ۲. اثر pH بر میزان تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* محیط کشت‌های ۵۰ میلی‌لیتری EYB (در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری) از طریق افزودن HCl و NaOH تنظیم شد. دما ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت**

### اثر هوادهی بر تولید اسید استیک توسط سویهٔ *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 بر روی محلول حاوی سه مادهٔ آلی (اتانول، استالدئید و اسید استیک) در شرایطی که از ارلن ساده استفاده شد، حاکی از آن است که تنها ۹ گرم بر لیتر از اتانول موجود در محیط کشت مصرف شده است و این در حالی است که زمانی که از ارلن شیاردار استفاده شد ۲۷ گرم بر لیتر از اتانول موجود در محیط مصرف و به اسید استیک تبدیل شد. سپس ارلن‌های شیاردار در دورهای مختلف ۱۰۰rpm، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۲۵۰، ۳۰۰ قرار داده شدند. نتایج نشان داد که در دور ۲۰۰rpm میزان تولید اسید استیک به حداکثر رسید و از g/L ۶۰ اتانول موجود در محیط کشت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و ۴= *p*H در حدود g/L ۴۵ اسید استیک تولید شد که این بیشترین مقدار اسید استیکی بود که در ارلن، با حفظ شرایط بهینه، تولید شد.

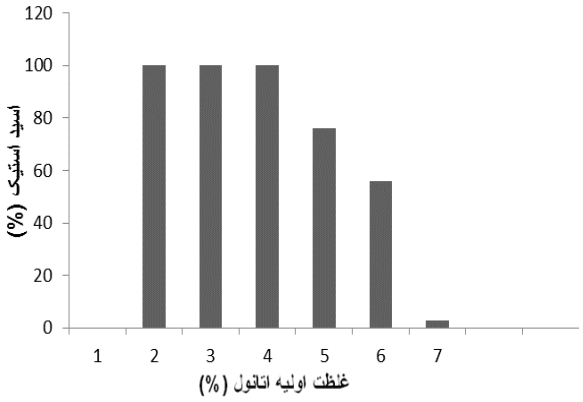



**شکل ۳. اثر میزان هوادهی بر تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری با ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت EYB در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و *p*H=4 در دورهای مختلف شیکرانکوباتور در ۲۴ ساعت**

### اثر غلظت‌های اولیهٔ اسید و اتانول بر تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M*

تحمل سویهٔ *Acetobacter* sp. M در برابر غلظت‌های بالای سوبسترا (اتانول) و محصول (اسید استیک) در شرایط بهینهٔ دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و *p*H=4 و دور هوادهی ۲۰۰rpm موردبررسی قرار گرفت. در غلظت ۷٪ و بالاتر، به دلیل ایجاد یک فاز لگ طولانی ۲۰-۲۴ ساعته در رشد سویهٔ *Acetobacter sp. M*، به‌جای ۲۴ ساعت، مدت‌زمان ۴۸ ساعت جهت انکوباسیون در نظر گرفته شد. سویهٔ *Acetobacter sp. M* قادر است تا غلظت ۷٪ از لتانول را تحمل کند. درواقع، در این غلظت سویهٔ *Acetobacter sp.* M قادر به زنده‌مانی است، ولی نمی‌تواند هیچ‌گونه فعالیتی را از خود نشان دهد. کدورت ناشی از رشد باکتری در محیط EYB نشانگر رشد باکتری در غلظت ۷٪ اتانول است، اما از غلظت ۷٪ اتانول به پایین قادر به فعالیت و بیواکسیداسیون است. نتایج حاصل از فعالیت سویهٔ *Acetobacter sp. M* در برابر غلظت‌های ۲-۹٪ لتانول به‌صورت درصدی و بدون درنظرگرفتن غلظت اولیهٔ اتانول در شکل (۴) نشان داده شده است. فاز تأخیر ۲۰-۲۴ ساعته در حضور غلظت‌های اولیهٔ ۳٪، ۴٪ و ۵٪ اسید نیز ایجاد و به همین جهت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. شکل (۵) نتایج حاصل از فعالیت سویهٔ *Acetobacter sp. M* را در برابر غلظت‌های مختلف ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد اسید استیک، به‌صورت گرم در لیتر، بدون درنظرگرفتن غلظت اولیهٔ آن در دمای ۳۰ درجهٔ

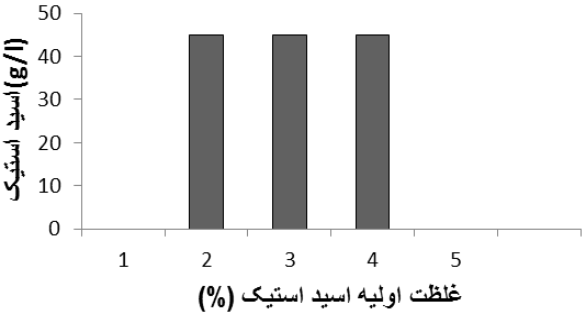
سانتی‌گراد نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل هم دیده می‌شود سویهٔ *Acetobacter sp. M* در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قادر است در غلظت اولیهٔ ۴٪ اسید رشد کند و عمل بیواکسیداسیون اتانول را انجام دهد.




**شکل ۴ . اثر غلظت اولیهٔ اتانول بر تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter* sp. M در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد**

به محیط‌های کشت EYB (۵۰ میلی‌لیتر در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری) غلظت‌های مختلف اتانول ۲–۹٪ افزوده شد. بعد از تلقیح، کشت‌ها در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند.

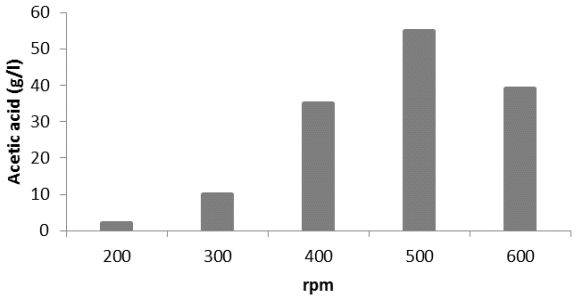
ساعت گرماگذاری شدند.




**شکل ۵. اثر غلظت اولیهٔ اسید استیک بر تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد. به محیط‌های کشت EYB (۵۰ میلی‌لیتر در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری) غلظت‌های مختلف اسید استیک ۲–۵٪ افزوده شد. بعد از تلقیح، کشت‌ها در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸**

## تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* در بیوراکتور

در این پژوهش فعالیت سویهٔ *Acetobacter* sp. M در حجم‌های بالای محیط کشت در راکتور موردبررسی قرار گرفت. بدین منظور از یک فرمانتور ۲ لیتری از نوع تانک واکنشگاه به‌هم‌زن استفاده شد. نتایج حاصل از فعالیت سویهٔ *Acetobacter sp. M* در شرایط بهینهٔ دما در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و *p*H برابر ۴ در بیوراکتور ۲ لیتری با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت EYB و حجم هوادهی ۲ vvm در حضور ۶٪ اتانول با سرعت‌های مختلف همزن در مدت ۲۴ ساعت در شکل (۶) قابل‌مشاهده است. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است بیشترین میزان تولید اسید استیک در دور هوادهی ۵۰۰rpm به‌دست آمد که در حدود ۵۵ g/L بود. در دورهای بالاتر، افزایش هوادهی سبب کاهش تولید اسید استیک شد.

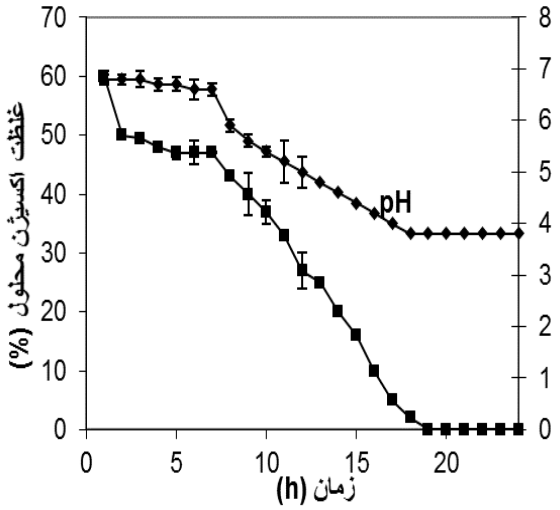



**شکل ۶. تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و *p*H برابر ۴ در بیوراکتور ۲ لیتری با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت EYB و حجم هوادهی vvm ۲ در حضور ۶٪ اتانول با سرعت‌های مختلف همزن در مدت ۲۴ ساعت**

## فاز تولید اسید استیک در سویهٔ *Acetobacter sp. M*

با استفاده از اعداد ثبت‌شدهٔ حاصل از فعالیت بیوراکتور به‌راحتی می‌توان زمان تولید اسید استیک را در باکتری موردنظر بررسی کرد. برای این کار هم می‌توان از *p*H محیط استفاده کرد و هم از میزان اکسیژن موجود در محیط کشت؛ به این صورت که به‌دلیل استفادهٔ باکتری‌ها از اکسیژن محیط کشت، در ابتدا اکسیژن به‌آهستگی کاهش می‌یابد، ولی زمانی که باکتری به فاز تولید اسید استیک می‌رسد مصرف اکسیژن به بیشترین حالت خود می‌رسد و به‌سرعت در محیط کاهش می‌یابد. بعد از پایان این فاز مجدداً مصرف اکسیژن به‌آهستگی صورت می‌گیرد. در مورد *p*H نیز همراه با فاز تولید اسید استیک، *p*H محیط کشت به دلیل تولید سریع اسید استیک

ناگهان کاهش می‌یابد و بعدازاین فاز کاهش آن به‌آهستگی صورت می‌گیرد. شکل (۷) منحنی تولید اسید استیک را بر اساس کاهش pH و کاهش اکسیژن موجود در محیط کشت توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود کاهش میزان اکسیژن محلول در محیط کشت از ساعت ۸ شروع شده است. در ساعت ۱۸ میزان اکسیژن به حداقل رسیده و ثابت مانده است. هم‌زمان pH محیط که در ۶/۸ تنظیم شده‌بود افت می‌کند. پایین‌ترین مقدار pH که این باکتری در محیط ایجاد می‌کند ۳/۸ است. بر طبق هر دو منحنی، از زمان تلقیح باکتری تا ۷ ساعت بعد، تولید زیادی صورت نمی‌گیرد. از ساعت ۸ اسیدیتهٔ محیط کشت یا pH رو به کاهش گذاشته 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 سویهٔ *Acetobacter sp. M* است. این بدین معناست که تمام اسید استیک تولیدشده توسط سویهٔ *Acetobacter* sp. M در مدت ۱۰ ساعت تولید می‌شود که نشانگر سرعت بالای این سویه در اکسیداسیون و تولید اسید استیک است.




شکل ۷ . فاز تولید اسید استیک بر اساس کاهش pH و کاهش اکسیژن موجود در محیط کشت توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M*

برای بهینه‌سازی تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* از روش بررسی یک فاکتور در هر زمان استفاده شد. به‌کارگیری شرایط بهینه باعث شد میزان تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* تا ۴۵ گرم بر لیتر در ارلن افزایش یابد. اثرات دما، pH، هوادهی و غلظت اولیهٔ اتانول و اسید استیک بر تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* موردمطالعه قرار گرفت.

در این پژوهش دامنهٔ pH هایی که باکتری‌ها در آن قادر به رشد و فعالیت هستند ۳–۸ و pH بهینه برای تولید اسید استیک ۴ بود. در کارهای مشابهی که بر روی سویه‌های مختلفی از این باکتری‌ها انجام یافته، این دامنه بین ۲/۵–۸/۵ گزارش شده است [۱۲]. معلوم شده است که سرعت تخمیر اتانول به اسید استیک در بالای ۴/۵ کاهش می‌یابد. بهترین pH برای فعالیت *A. aceti* نیز ۳/۸ گزارش شده است. غلظت اسید استیک تولیدشده در محیط کشت نیز عامل دیگری است که بر تولید اسید استیک توسط سویه‌های استوباکتر تأثیرگذار است. مشخص شده است که اسید استیک و یون‌های استات وارد سلول‌ها می‌شوند و باعث کاهش pH درونی گشته، با مهار تنفس سلولی، نهایتاً سبب مهار رشد سلول‌های باکتری می‌شوند[۱۳]. برای کاهش این اثر می‌توان اسید تولیدی را از محیط خارج کرد. تحقیقات نشان داده است که با کمک روش الکترودیالیز تخمیری (ED-F) که در آن با خروج اسید استیک تولیدشده از محیط، اثر مهاری اسید از بین می‌رود، تولید اسید را می‌توان به ۹۷/۶ گرم بر لیتر رساند [۱۴]. یافتن سویه‌ای که بتواند pH های پایین‌تر از pH بهینه را تحمل کند نیز روش مناسبی است. گزارش‌های مختلفی دربارهٔ قدرت تحمل و رشد باکتری‌های استوباکتراسه در غلظت‌های متفاوتی از اسید وجود دارد [۴]. از آن جمله سویه‌ای از *A. lovaniensis* است که قادر به تحمل غلظت اولیهٔ اسید استیک تا ۵٪ است [۱۵]، یا سویه‌ای از *A. aceti* که ۶٪ اسید را در محیط کشت تحمل می‌کند، ولی این سویه به‌سرعت مقاومت خود را از دست می‌دهد که احتمالاً به دلیل ناپایداری ژنتیکی است [۱۶]. سویهٔ *Acetobacter sp. M* نیز قادر بود غلظت ۴٪ اسید استیک را در محیط کشت تحمل کند. از عمده‌ترین دلایل مقاومت باکتری در مقابل غلظت بالای اسید وجود سیستمی برای کاهش pH درونی یا وجود سیستمی برای خروج یون‌های استات است؛ زیرا pH درونی در چنین سویه‌هایی، با

وجود غلظت زیاد اسید، در حدود ۵/۵–۶/۵ است [۱۷]. یکی دیگر از فاکتورهای موردمطالعه در فرایند تولید اسید استیک، اثر غلظت اتانول است. معمولاً استوباکتراسه قادر به تحمل درصد بالایی از اتانول به‌عنوان غلظت اولیه تا ۱۰٪ است [۶]، ولی یک فاز تأخیر طولانی در رشد این باکتری‌ها در حضور غلظت بالای اتانول ایجاد می‌شود [۱۸]. غلظت اولیهٔ اتانول از حدود ۵٪ به بالا در تولید اسید استیک اثر مهاری دارد [۱۹]. این فاز تأخیر در رشد سویهٔ *Acetobacter sp. M* نیز دیده شد. درواقع زمانی که سویهٔ *Acetobacter sp. M* در حضور غلظت ۵٪ اتانول و بالاتر کشت شد، با ۲۰–۲۴ ساعت تأخیر، رشد و فعالیت نشان داد؛ ازاین‌رو، زمان بیواکسیداسیون ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. در گزارشی یک‌سویه از *A. lovaniensis* قادر به تحمل غلظت اولیهٔ اتانول تا ۹٪ بدون فاز تأخیر بود [۱۸]. بایستی توجه کرد که مقاومت در برابر اتانول یا اسید می‌تواند جنبهٔ ژنتیکی باشد [۱۶]. غلظت اکسیژن حل‌شده در محیط نیز پارامتر متابولیکی دیگری است که بر میزان فرمنتاسیون، به‌ویژه در باکتری‌های هوازی، اثر بسیار دارد. اگر مقدار آن در محیط بسیار اندک باشد، پروسه به‌آهستگی انجام می‌پذیرد و بعضی واکنش‌های ثانویه، نظیر تشکیل اتیل‌استات، از طریق استریفیکاسیون اتانول و اسید استیک شکل می‌گیرد [۱۳] و اگر مقدار آن در محیط خیلی زیاد باشد، آنزیم الکل دهیدروژناز ـــ که مسئول اکسیداسیون اتانول است ـ به فرم غیرفعال درمی‌آید و باکتری قدرت تبدیل کردن اتانول به اسید استیک را از دست می‌دهد )). حجم‌های هوادهی متفاوتی در بیواکسیداسیون اتانول استفاده می‌شود، ولی معمولاً از دامنهٔ ۱vvm–۲ خارج نمی‌شود [۱۳]. برای افزایش میزان اکسیژن حل‌شدهٔ محیط، علاوه بر حجم هوادهی، به دور چرخش موتور یا چرخش شیکرانکوباتور هم توجه می‌شود و همین‌طور حجم محیط کشت. در این پژوهش زمانی که از ارلن‌های ساده استفاده شد، حتی در حضور شرایط بهینهٔ ***p*H** دما، غلظت اولیهٔ سوبسترا و محصول، تنها در حدود ۹ گرم بر لیتر اسید تولید شد، اما زمانی که از ارلن شیاردار استفاده شد، به دلیل اینکه هوادهی با این ارلن‌ها بسیار خوب انجام می‌گیرد، میزان تولید اسید به ۲۷ گرم بر لیتر رسید و زمانی که میزان هوادهی از طریق افزایش دور چرخش شیکرانکوباتور بهینه‌سازی شد تولید اسید استیک تا ۴۵ گرم بر لیتر افزایش یافت. در حجم‌های بالاتر در بیوراکتور نیز زمانی که میزان هوادهی از طریق افزایش چرخش پره‌ها افزایش یافت میزان تولید اسید استیک به ۵۵ گرم بر لیتر رسید. هوادهی بالاتر از حد بهینه نیز به دلیل غیرفعال کردن آنزیم الکل دهیدروژناز، سبب کاهش فرایند تولید اسید استیک شد که در تحقیقات دیگر نیز نشان داده شده است [۲۰]؛ ازاین‌رو، پخش اکسیژن به‌طور یکنواخت در محیط کشت از اهمیت بسزایی برخوردار است و این موضوع می‌تواند ازنظر صنعتی موردتوجه واقع شود؛ چراکه در عمل، تولید اسید استیک (سرکه‌سازی) در استاتورهای بزرگ با حجم‌های بسیار بالا یعنی بالاتر از ۱۵۰۰۰ لیتر انجام می‌پذیرد. این نتایج نشان می‌دهد که در بین پارامترهای مطالعه‌شده، هوادهی و میزان اکسیژن محلول در محیط کشت بیشترین اثر را در تولید اسید استیک توسط سویهٔ *Acetobacter sp. M* دارا است.

## منابع


[1] Kim JS, Kim H., Oh K.K. , Kim Y.S Efficient production process for food grade acetic acid by Acetobacter aceti in shake flask and bioreactor cultures. Journal of Indian Engineering Chemistry. 2002;8:519-23.

[2] Jiménez-Hornero J.E S-DIM, García-García I. Optimization of biotechnological processes. The acetic acid formation, Partb I: the proposed model. Biochemical Engineering Journal. 2009;45:7-21.

[3] Awad H DR, Malek R, Othman N, Aziz R, Enshasy H. Comparative Proteome of Acetobacter pasteurianus Ab3 During the High Acidity Rice Vinegar Fermentation. E-Journal of Chemistry. 2012;9:2275-86.

[4] Adachi O MD, Toyama H, Yamada M, Shinagawa E, Matsushita K. New developments in oxidative fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 2003;60:610-43.

[5] Moonmangmee D AO, . Ano Y, Shinagawa E,Toyama H, Theeragol G, lotong N, Matsushita K. Isolation and characterization of thermotolerant

Gluconobacter strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 2000;64(11):2306-15.

[6] Saeki A TG, Matsushita K, Toyama H, Lotong N, Adachi O. Microbiological Aspects of Acetate Oxidation by Acetic Acid Bacteria, Unfavourable Phenomena in Vinegar Fermentation. Biosci Biotechnol Biochem. 1997;61(1):138-45.

[7] Berner D, Krieg N, Staley J Bergeys manual of systematic bacteriology , V2, Part C. Pubspringer. 2005:41-95.

[8] Adachi O YT. Acetic Acid Bacteria, chapter 13. 2016:273-97.

[9] Yakushi T MK. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010;86(5):1257-65.

[10] Matsushita K, Yakushi T, Takaki Y, Toyama H ,Adachi O Generation mechanism and purification of an inactive form convertible in vivo to the active form of quinoprotein alcohol dehydrogenase in Gluconobacter suboxydans. Journal of Bacteriology. 1995:6552-9.

[11] Moghadami F SMR, Shayesteh S.H , Rezvanian M. Isolation of acetic acid bacteria from domestic vinegars and evaluation of their thermotolerance. Science journal of Tehran University. 2004;30(3):541-9.

[12] Romano A GR, Nihi P, Rollini M. Acetic acid bacteria as enantioselective biocatalysts. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2002;17:235-40.

[13] De Ory I RLE, Cantero D. Modelling the kinetics of growth of Acetobacter aceti in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. Appl Microbiol Biotechnol. 1998;49:189-93.

[14] Durán E, Palma M, Castro R, García-Barroso C. New FT-IR method to control the evolution of the volatile constituents of vinegar during the acetic fermentation process. Food Chemistry. 2010;121(29):575-9.

[15] González-Sáiz J.M PC, Garrido-Vidal D. Modelling and optimisation of the industrial process of acetic fermentation in Recent Research Developments in Biotechnology & Biotengineering. Research Signpost. 2003:217-42.

[16] Beppu T. Genetic organization of Acetobacter for acetic acid fermentation-NCBI. Antonie van Leeuwenhoek. 1993;64:121-35.

[17] Baena-Ruano S, Santos-Dueñas I.M, Mauricio J.C, García-García I Relationship between changes in the total concentration of acetic acid bacteria and major volatile compounds during the acetic acid fermentation of white wine. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2010;90:2675-81.

[18] Baena-Ruano S, Jiménez-Ot C, Santos-Dueñas I, Jiménez-Hornero J, Bonilla-Venceslada J.L, Álvarez-Cáliz C, García-García I. Influence of the final ethanol concentration on the acetification and production rate in the wine vinegar process. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2010;85:908-12.

[19] González-Sáiz J.M PC, Garrido-Vidal D. Evaluation of Kinetic Models for Industrial Acetic Fermentation: Proposal of a New Model Optimized by Genetic Algorithms. Biotechnology Progress. 2003;19(2):599-611.

[20] Trcek J, Toyama T , Czuba J, Misiewicz A, Matsushita K. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 2006;70:366-73.

COPYRIGHTS
© 2022 by the authors. Lisensee PNU, Tehran, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY4.0) (http:/creativecommons.org/licenses/by/4.0)