جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تولید اسید پروپیونیک توسط باکتری *Propionibacterium acidopropionici* به روش تخمیر در کشت ناپیوسته و بررسی اثر نوع سوبسترا در فرآیند

معصومه انوری*[۱]، غلامرضا صفری[۲]، سحر حسن پور گلشنی [۳]

۱*و۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۵۱۶ -۴۱۳۳۵

۳ - دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، باشگاه پژوهشگران جوان، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۵۱۶ -۴۱۳۳۵

anvari@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۲۲

چکیده

با استفاده از تخمیر به روش کشت ناپیوسته، گلوکز و گلیسرول به عنوان سوبسترا در غلظت ۳۰ g/l در pH = ۶/۵ و درجه حرارت ۳۲°C تولید اسید پروپیونیک توسط باکتری *Propionibacterium acidopropionici* در شرایط بی‌هوازی انجام شد. در تمام موارد اسید پروپیونیک محصول نهایی تخمیر و اسید استیک محصول فرعی واکنش بود. شواهد نشان داد که کارآیی تولید محصول با استفاده از گلیسرول به عنوان منبع اصلی کربن و انرژی نسبت به گلوکز بیشتر (۰/۵۵g/lh) بود. بعلاوه با استفاده از گلیسرول به عنوان (مادهٔ اولیه) تولید محصول فرعی اسید استیک ۲۱/۶ درصد کاهش یافت. دلیل بهره وری بالای روش در خصوص باکتری مورد استفاده ممکن است ناشی از تمایل باکتری در تولید هموپروپیونیک اسید و نیز عدم استفاده از محصول نهایی در سایر مسیرهای متابولیسمی باشد.

کلمات کلیدی: اسید پروپیونیک، *Propionibacterium acidopropionici* ، گلیسرول، کشت ناپیوسته.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

پروپیونی‌باکترها و محصولات‌حاصل از فرآیندهای تخمیری آن‌ها در صنایع مختلف کاربردی گسترده دارند. اولین کاربرد مهم صنعتی این باکتری‌ها تهیه استارتر از آن‌ها برای صنایع لبنی خصوصاً تولید پنیر سوئیسی است (۱۲). تولید پروپیوتیک‌ها از کاربردهای دیگر آن‌هاست (۵). اسید پروپیونیک و مشتقات آن در صنایع مختلف کاربردی گسترده دارند، منجمله اینکه به عنوان ضد قارچ در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸). همچنین دارای کاربردهای مختلف در صنایع پلاستیک سازی هستند (۱۳).

تولید صنعتی این ماده مبتنی بر سنتز شیمیایی از مشتقات نفتی است اما امروزه به تولید آن به روش تخمیر با استفاده از منابع کربن تجدید پذیر توجهی ویژه معطوف شده است. به منظور تولید محصول به روش تخمیر منابع کربن متفاوتی چون گلوکز، لاکتوز (آب پنیر) و غیره مورد تحقیق قرار گرفته اند (۴، ۹ و ۱۰).

علیرغم استفاده از منابع مختلف تولید در این میان به گلیسرول توجه کمتری مبذول شده است. با توجه به بررسی منابع مختلف و تاثیر فرآیند این ماده در تولید در این تحقیق تأثیر مقایسه‌ای آن در تولید نسبت به گلوکز مورد مطالعه قرار گرفت.

مـــواد و روش‌ها

سویه میکروارگانیسم مولد (*Propionibacterium acidopropionici* PTCC 1661) به صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

محیط کشت و شرایـط رشد: پیش کشت در فلاسک‌های ۱۰۰ ml حاوی ۳۰ ml محیط کشت شامل عصارهٔ مخمر ۱۰ g/l، محیط TSB ۵ g/l، K_2HPO_4 ۲/۵ g/l، KH_2PO_4 ۱/۵ g/l انجام و فلاسک‌های حاوی محیط پس از درپوش گذاری در شرایط بی‌هوازی به مدت ۳۰ ساعت در ۳۰°C گرمخانه گذاری شدند. محیط تولید محصول در فلاسک‌های ۲۵۰ ml حاوی محیط فوق به اضافه گلوکز و گلیسرول با غلظت ۳۰ g/l بود که در مورد گلوکز محلول قندی جداگانه به مدت ۵ دقیقه اتوکلاو و سپس به محیط کشت اضافه شد. به محیط کشت تخمیر ۱۰ درصد حجمی به حجمی از محیط پیش کشت تلقیح شد. درجه حرارت و pH گرمخانه گذاری بترتیب ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۶/۵ بود (۱۲).

محاسبه بازده رشد: بازده رشد با تعیین OD آبگوشت کشت بعد از کالیبراسیون توده خشک سلولی با این پارامتر (OD) محاسبه شد. بدین منظور محیط کشت مایع طی ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس رسوب در آون خشک و وزن گردید. جذب در ۶۱۰ nm اندازه‌گیری گردید. به این ترتیب پس از کالیبراسیون هر گرم توده خشک سلولی از فرمول زیر محاسبه شد (۷):

هر گرم توده ی خشک سلولی = ۰/۲۱ ×A

A (شدت جذب در ۶۱۰ nm)

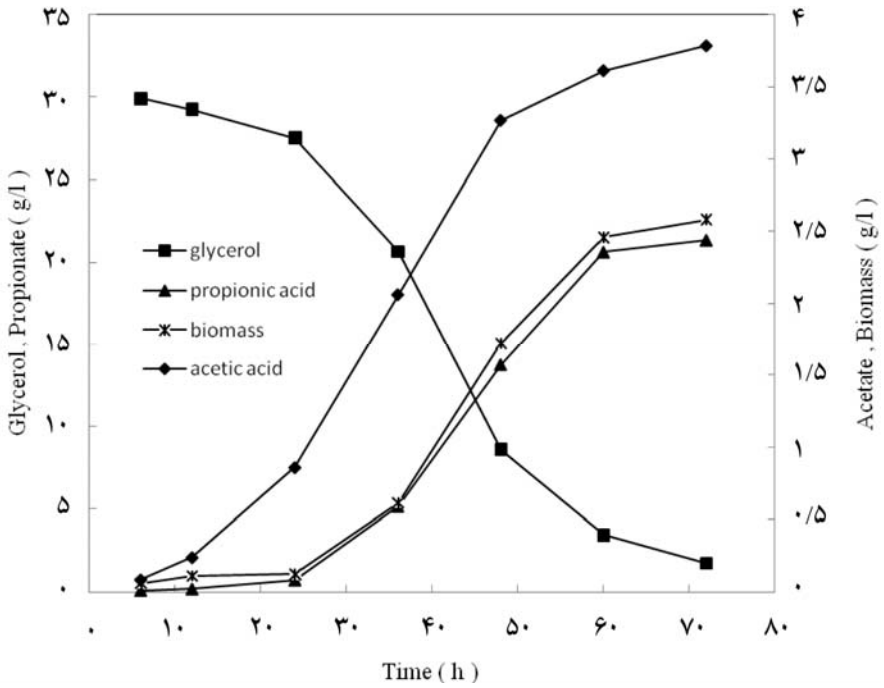
روش سنجش اسید پروپیونیک: پس از سانتریفوژ کشت‌ها، غلظت محصول نهایی و سوبسترای باقیمانده توسط روش HPLC (حامل اسید سولفوریک ۰/۰۱ مولار با سرعت جریان ۰/۴ میلی‌لیتر بر دقیقه، درجه حرارت ستون ۳۵ درجه سانتی‌گراد و درجه رفراکتومتر ۴۵ درجه سانتی‌گراد) ارزیابی گردید. بازده محصول بر

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اساس مقدار اسیدپروپیونیک و اسید استیک تشکیل شده از سوبسترا محاسبه گردید (۷).

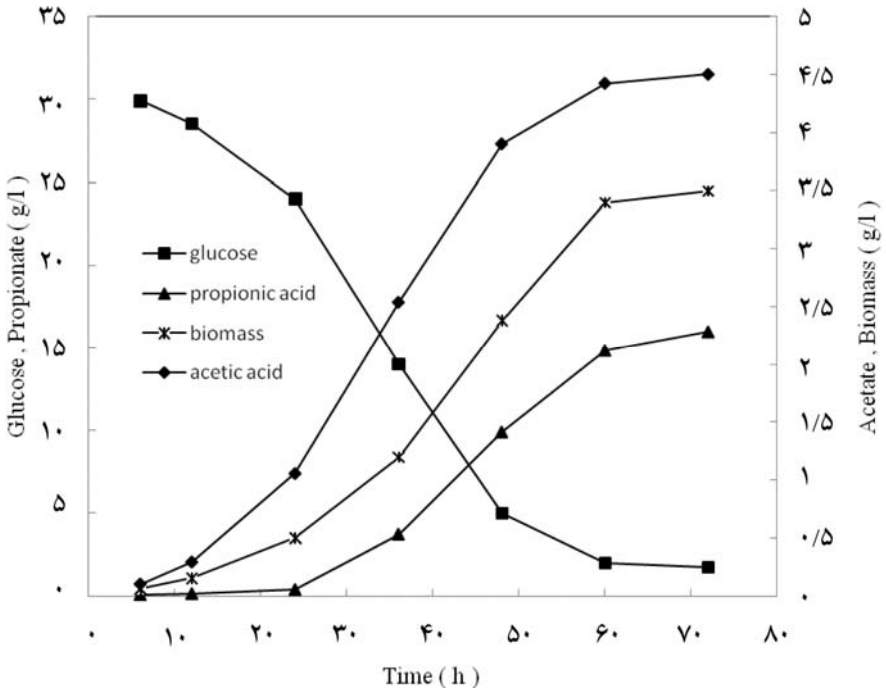
نتایج

نمودار ۱ نشان دهنده نتایج حاصل از مصرف گلیسرول به عنوان تنها منبع کربن در تولید اسید پروپیونیک است. پارامترهای اندازه‌گیری شده نیز در جدول ۱ ارائه شده‌اند. زمان تاخیر (تولید) در باکتری حدوداً ۶ ساعت، سرعت رشد باکتری g/lh ۰/۰۶۸ و تولید توده زیستی g/l ۲/۵۸ و اسید استیک محصول فرعی تخمیر بود. اسید پروپیونیک تولیدی g/l ۲۱/۶۳ و سرعت تولید g/lh ۰/۵۵، بازدهی تولید اسید پروپیونیک g/g ۰/۷۶ و میزان تولید اسید استیک g/l ۳/۷ بود.



نمودار ۱: میزان رشد ، مصرف سوبسترا (گلیسرول) و محصولات ناشی از تخمیر توسط باکتری *P.acidopropionici*

نمودار ۲ نتایج حاصل از تخمیر گلوکز درکشت ناپیوسته در غلظت g/l ۳۰ و پارامترهای اندازه‌گیری شده در رابطه با مصرف گلوکز نیز در جدول ۱ ارائه شده است. سوبسترا پس از ۶۰ ساعت بطور کامل توسط باکتری به مصرف رسید.



نمودار ۲: میزان رشد ، مصرف سوبسترا (گلوکز) و محصولات ناشی از تخمیر توسط باکتری *P.acidopropionici*

جدول ۱: بازده محصولات نهائی و پارامترهای سینتیکی تخمیر با دوسوبسترای گلوکز و گلیسرول برای باکتری *P.acidopropionici*

سوبسترا	بازدهی اسید استیک (g/g)	بازدهی اسید پروپیونیک (g/g)	r_X	r_S	r_P	r_A
گلوکز	۰/۱۶	۰/۵۷	۰/۰۶۸	۰/۵۵	۰/۴۰	۰/۰۸۶
گلیسرول	۰/۱۳	۰/۷۶	۰/۰۶۵	۰/۵۴	۰/۵۵	۰/۰۷۰

r_X سرعت تولید بیومس (g/lh) – r_S سرعت مصرف سوبسترا (g/lh) – r_P سرعت تولید اسید پروپیونیک (g/lh) – r_A سرعت تولید اسید استیک (g/lh)

زمان تأخیر برای تولید بیومس در محیط حاوی گلیسرول در مقایســـه با گلوکز ۱۴ ساعت بیشتر اما سرعت رشد باکتری در دو محیط مشابه بود. میزان اسید پروپیونیک تولیدی با استفاده از گلوکز g/l ۱۶/۰۱، کمتر از زمانی بود که از گلیسرول به عنوان سوبسترا استفاده گردید. بازدهی محصول و سرعت تولید نیز بترتیب g/g ۰/۵۷ و g/lh ۰/۴۰ بود.

بحث

مطالعه تخمیر در کشت ناپیوسته توسط باکتری *P.acidopropionici* با استفاده از دو منبع کربن گلیسرول و گلوکز، نشانه تولید اسید پروپیونیک به عنوان محصول اصلی و اسید استیک به عنوان مهمترین محصول فرعی بود. سایر محصولات فرعی تولید شده طی تخمیر بوسیله پروپیونی باکترها که توسط محققان مختلف گزارش شده‌اند n- پروپانل و اسید سوکسینیک هستند. لذا بنظر می‌رسد که تولید اسید

پروپیونیک از این دو سوبسترا مسیر تولید اسیدهای کربوکسیلیک را درگیر می‌نماید (۳ و ۱۱).

نتایج نشان داد اسید استیک تولیدی در صورت استفاده از گلیسرول به عنوان سوبسترا، در مقایسه با گلوکز ۲۱/۶ درصد کمتر بود. توجیه این امر، به بحث موازنه پتانسیل اکسیداسیون احیا بر می‌گردد. گلیسرول نسبت به گلوکز ترکیب احیاتری است (۴/۶۷ در برابر ۴) و این پتانسیل تقریباً با پتانسیل اکسیداسیون احیا اسید پروپیونیک برابر است. لذا برای حفظ موازنه اکسیداسیون احیا نیاز به تولید متابولیت دیگری نیست در حالی‌که در مورد گلوکز برای حفظ موازنه اسید استیک بیشتری بایستی تولید شود (۷).

در این تحقیق مشخص شد بیشترین تولید اسید پروپیونیک درکشت ناپیوسته با گلیسرول به عنوان منبع کربن و انرژی حاصل شد. بازده تبدیل در مقایسه با استفاده از گلیسرول ۳۳/۳ درصد بیشتر بود با توجه به گزارش موارد مشابه در رابطه با کارائی بیشتر گلیسرول پیشنهاد می‌گردد که باکتری تمایل به تخمیر همونرمانتاتیو اسیدپروپیونیک دارد (۱).

در تحقیق مشابه انجام شده بر روی باکتری *P. acidopropionici* بمنظور بهینه سازی تولید محصول اثر مقادیر ۲۰، ۵۰، ۷۰ و ۸۰ گرم بر لیتر گلیسرول بر تولید اسید پروپیونیک نشان داده است که ماکزیمم غلظت محصول در غلظت ۲۰ گرم بر لیتر گلیسرول به میزان ۱۵/۷۲ گرم بر لیتر طی ۱۲۰ ساعت حاصل شده است. با افزایش غلظت گلیسرول از ۲۰ تا ۸۰ گرم بر لیتر، گرچه غلظت محصول افزایش یافته اما تدریجاً سرعت رشد کاهش یافته است. لذا پیشنهاد شده است که بهترین غلظت مورد استفاده گلیسرول برای حفظ بازده و محصول دهی بالا، غلظت ۳۰ – ۲۰ گرم بر لیتر می‌باشد (۲).

Himmi و همکاران (۶) وی نیز غلظت ۲۰ گرم بر لیتر گلیسرول و گلوکز را در محیط کشت به عنوان منبع کربن و انرژی برای تولید اسید پروپیونیک مقایسه و دریافتند که بیشترین تولید در کشت ناپیوسته با گلیسرول حاصل گردید. بازده تبدیل سوبسترا به محصول گزارش شده توسط باکتری *P. acidopropionici* در مقایسه با گلوکز ۴۹ درصد بیشتر بوده است. چنین بازده تبدیلی با استفاده از منابع کربن رایج مثل گلوکز و لاکتوز تاکنون گزارش نگردیده است. در گزارش همین محققان نسبت‌های جرمی اسید پروپیونیک به استیک تولیدی ۵/۸ در مقایسه با ۳/۵ بترتیب با استفاده از گلیسرول و گلوکز بود. از آنجا که کارآیی استخراج اسید پروپیونیک به روش تقطیر با تولید اسید استیک بیشتر کاهش می‌یابد لذا غلظت کم اسید استیک تولیدی با استفاده از گلیسرول باعث افزایش بازیافت محصول به روش تخمیر می‌شود (۶).

نتایج فوق همگی نشانه برتری استفاده از گلیسرول بر گلوکز است. با توجه به اینکه این ماده محصول اصلی خروجی پساب‌های صنایع روغن سازی و استخراج روغن‌های گیاهی و سوخت‌های بیولوژیک است لذا می‌توان از پساب این خروجی‌ها به عنوان منبع کربن استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری بیدریغ و مساعدت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت آقای دکتر امیر تیموری و مدیریت محترم امور

پژوهشی واحد آقای دکتر ترکاشوند و ریاست محترم باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت آقای دکتر اسلامی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

منابع

1. Barbirato, F.; Himmi, E.H.; Conte, T. and Bories, A., 1998. 1, 3- Propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Industrial Crops Products* 7, 281-289.
2. Bories, A.; Himmi, E.H. and Colin, T., 1998. Microbial production of cosmetic ingredients from glycerol. In: Cosmetic ingredients and biotechnology. *CBB DeÂveloppement, Rennes,* pp 141-152.
3. Delwiche, E.A., 1948. Mechanism of propionic acid formation by *Propionibacterium pentosaceum*. *Journal of Bacteriology* 56, 811-820.
4. Eaton, D.C. and Gabelman, A., 1995. Fed-batch and continuous fermentation of Selenomonas ruminantium for natural propionic, acetic and succinic acids. *Journal of Industrial Microbiology* 15, 32-38.
5. Goswami, V. and Srivastava, A.K., 2000. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici. Biochemical Engineering Journal* 4, 121–128.
6. Himmi, E.H.; Bories, A.; Boussaid, A. and Hassani, L., 2000. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *P. freudenreichii* ssp. *Shermanii*. *Applied Microbiology and Biotechnoloyg* 53, 435-440.
7. Lewis, P.V. and Yang, S.T., 1992. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*: effect of growth substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 437-442.
8. Lind, H.; Jonsson, H. and Schnqrer, J., 2005. Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. *International Journal of Food Microbiology* 98, 157– 165.
9. Quesada-Chanto, A.; Afschar, A.S. and Wagner, F., 1994. Microbial production of propionic acid and vitamin B12 using molasses or sugar. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41, 378-383.
10. Ramsay, J.A. and Aly, H., 1998. Biological conversion of hemicelluloses to propionic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 292-295.
11. Wood, H.G., 1981. Metabolic cycles in the fermentation by propionic acid bacteria. *Curr Top Cell Regul* 18, 255-287.
12. Zhang, A. and Yang, S.T., 2009. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. *Process Biochemistry* 44, 1346–1351.
13. Zhu, Y.; Li, J.; Tan, M.; Du, G. and Chen, J., 2010. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant Propionibacterium acidipropionici with glycerol as the carbon source. *Bioresource Technology* 101, 8902–8906.