Archive of SID

Improvement of Sodium Gluconate Production using a Thermo-tolerant Acetic Acid bacterium, *Acetobacter Senegalensis*

Rasoul Shafiei *
Assistant professor, Department of Biology, Faculty of sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran, ra.shafiei@gmail.com

Abstract

Introduction: Nowadays, gluconic acid and its derivatives usages have been broadening in food industry. However, there are still many studies to optimize the production of gluconic acid by fermentation methods. The main goal of the present study was to assess the influences of temperature and pH on some fermentation kinetic parameters and activity of total cellular dehydrogenase.

Materials and methods: *Acetobacter senegalensis* was cultured in batch mode fermentation in different conditions (different concentrations of carbohydrates, temperatures and pH_s). In addition, the effect of pH on sub-population formation and by-product production was studied by flow cytometry and different chromatography techniques, respectively.

Results: Flow cytometric assessment showed that bacterial cells segregated during stationary phase, and two sub-populations were appeared based on the activity of total cellular dehydrogenases. Culture medium pH affected the sub-populations formation and the percentage of each sub-population. As culture medium pH decreased, higher percentage (up to 61% of inactive cells) were formed during stationary phase. In addition, it was proved that at low pH (4.5), the percentage of by-products such as keto-gluconic acids increased more than 6 times. Based on the obtained results, the optimum pH for *A. senegalensis* to ferment 95 g/L glucose to sodium gluconat at 38°C was 5-5.5.

Discussion and conclusion: *Acetobacter senegalensis* can be used as a potential microorganism to produce gluconic acid. However, cell segregation during fermentation seems to result in decreased active producing cells and decreased maximum glucose consumption rate. In future studies, it is necessary either to find a method to prevent cell population from segregation or to resuscitate them into functional cells.

Key words: Ketogluconic Acid, Fermentation, Dehydrogenase, Flow Cytometry.

* Corresponding author
Received: August 4, 2018 / **Accepted:** February 3, 2019

www.SID.ir

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۳۰، تابستان ۱۳۹۸، صفحه ۱۲- ۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۴

بهینه‌سازی تولید گلوکونات‌سدیم در دمای زیاد با استفاده از باکتری استیک‌اسید مقاوم به گرما (*استوباکتر سنگالنسیس*)

رسول شفیعی: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، ایران، ra.shafiei@gmail.com

چکیده

مقدمه: امروزه، گلوکونیک‌اسید و مشتقات آن کاربرد وسیعی در صنایع غذایی دارند؛ بااین‌حال، هنوز پژوهش‌های وسیعی برای بهینه‌سازی تولید این اسید با استفاده از روش‌های تخمیری درحال انجام است. هدف اصلی پژوهش حاضر، بررسی تأثیر دماها و اسیدیته‌های مختلف بر برخی پارامترهای سینتیکی تخمیر و عملکرد مجموعه آنزیم‌های دهیدروژناز سلول است.

مواد و روش‌ها: *استوباکتر سنگالنسیس* در کشت ناپیوسته در غلظت‌های مختلف قند، دماها و اسیدیته‌های مختلف کشت شد و ویژگی‌های سینتیکی رشد و تولید گلوکونات‌سدیم بررسی شدند؛ سپس تأثیر اسیدیته بر ترکیب جمعیت سلول‌های فاز نمایی و سکون و تولید محصولات جانبی به‌ترتیب با استفاده از فلوسیتومتری و روش‌های کروماتوگرافی بررسی شد.

نتایج: بررسی‌های فلوسیتومتری نشان دادند با پیشرفت تخمیر و ورود سلول‌ها به فاز سکون، جمعیت سلولی واگرا می‌شود و دو زیرجمعیت ازنظر فعالیت دهیدروژنازها به وجود می‌آیند. اسیدیتهٔ محیط‌کشت تأثیر بسیار زیادی در درصد زیرجمعیت‌های فعال و غیرفعال سلول‌ها طی فاز تولید گلوکونیک‌اسید در فاز سکون دارد؛ به‌طوری‌که در اسیدیتهٔ کمتر، میزان زیرجمعیت دارای دهیدروژنازهای غیرفعال به‌طور معناداری تا ۶۱ درصد کل جمعیت سلول‌ها افزایش یافت؛ همچنین میزان ناخالصی‌های تولیدشده به اسیدیتهٔ تخمیر وابسته است؛ به‌طوری‌که میزان مشتقات کتونی گلوکونیک‌اسید در اسیدیتهٔ ۴/۵ بیش از ۶ برابر افزایش یافت؛ بنابراین، اسیدیته‌های ۵ و ۵/۵ بهترین اسیدیته برای استوباکتر سنگالنسیس به‌منظور تخمیر ۹۵ گرم گلوکز در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: *استوباکتر سنگالنسیس* می‌تواند به‌عنوان باکتری بالقوه برای تولید گلوکونات‌سدیم در دمای زیاد استفاده شود؛ باوجوداین، واگرایی جمعیت سلولی طی تخمیر موجب کاهش تعداد سلول‌های فعال تولیدکنندهٔ محصول و درنتیجه، کاهش حداکثر سرعت مصرف منبع کربنی می‌شود. لازم است در پژوهش‌های بعدی راهکارهای جلوگیری از واگرایی جمعیت سلولی یا برگرداندن آنها به حالت اول بررسی شوند.

واژه‌های کلیدی: کتوگلوگونیک‌اسید، تخمیر، دهیدروژناز، فلوسیتومتری

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

مقدمه

مشتقات قندها به‌ویژه مشتقات اسیدی یکی از پرمصرف‌ترین ترکیبات در صنایع مختلف محسوب می‌شوند. گلوکونیک‌اسید در بین قندهای یادشده اهمیت ویژه‌ای دارد و درنتیجهٔ اکسیداسیون نخستین کربن گلوکز ایجاد می‌شود (۱). این قند غیرسمی به‌طور طبیعی در عسل (تا ۱ درصد)، نوشیدنی‌های الکلی (تا ۰/۲۵ درصد) و سرکه و انواع میوه‌ها یافت می‌شود (۲). سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) در سال ۱۹۸۶، گلوکونیک‌اسید و مشتقات آن ازجمله گلوکونو-δ-لاکتون و گلوکونات‌سدیم را به‌عنوان افزودنی‌های مجاز مواد غذایی تأیید کرد (۱) و ازاین‌رو، نمک‌های این قند مصارف گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی یافتند (۳). تجزیهٔ ۹۸ درصدی گلوکونیک‌اسید طی دو روز و به‌طور طبیعی مهم‌ترین مزیت این ترکیب از جنبهٔ زیست‌محیطی است. مشتقات گلوکونیک‌اسید ازجمله نمک سدیم و کلسیم آن در صنایع غذایی و دارویی، نساجی، تصفیهٔ آب، شوینده‌های صنعتی و خانگی استفاده می‌شوند (۴)؛ افزون‌بر کاربردهای یادشده، این ترکیب تأثیر مثبتی بر جمعیت باکتری‌های روده دارد و سبب افزایش آنها می‌شود (۵)؛ به‌طوری‌که باکتری‌های پروبیوتیک روده گلوکونیک‌اسید را مصرف و محصولاتی مانند لاکتات تولید می‌کنند. محصولات یادشده اسیدیتهٔ محیط را کاهش می‌دهند و می‌توانند با اتصال و جذب‌شدن به موکوس برای سلول‌های اپی تلیال انرژی فراهم کنند (۶ و ۷). یکی از مباحث مهم در غنی‌سازی مواد غذایی، دردسترس قرارگرفتن مواد معدنی آن است؛ ازاین‌رو، گلوکونات‌آهن و گوکونات‌کلسیم که هر دو تأییدیهٔ FDA و اتحادیهٔ اروپا را دارند، برای غنی‌سازی مواد غذایی استفاده می‌شوند (۸).

روش‌های گوناگونی برای تولید گلوکونیک‌اسید استفاده می‌شوند؛ در بین این روش‌ها، دو روش شیمیایی و زیستی بیشترین کاربرد را دارند. واکنش‌های ناخواسته و پایداری کم از مهم‌ترین کاستی‌های روش شیمیایی به شمار می‌آیند (۹) و هزینه‌های زیاد و غیرفعال‌شدن کاتالیست، تولید گلوکونیک‌اسید از طریق روش‌های شیمیایی را با مشکل روبه‌رو کرده است (۱۰)؛ به‌همین‌علت، تولید سبز گلوکونیک‌اسید مدنظر قرار گرفته است. در این روش که از ریزموجودات مختلف استفاده می‌شود، قابلیت انتخابی پیش‌ماده و به‌صرفه‌بودن اقتصادی مدنظر قرار دارد. گونه‌های *آسپرژیلوس* و *پنی‌سیلیوم* از مهم‌ترین ریزموجودات مولد گلوکونیک‌اسید هستند که در دیوارهٔ سلولی خود آنزیم گلوکزاکسیداز دارند و به‌شدت هوازیند (۱۱). ایجاد حالت میسلیومی و درنهایت، افزایش ویسکوزیتهٔ محیط‌کشت و جلوگیری از هوادهی و هموژنیزه‌کردن محیط مشکل عمدهٔ قارچ‌های رشته‌ای مانند *آسپرژیلوس نایجر*[1] است؛ برای حل مشکل یادشده می‌توان از اسپورهای این قارچ در شرایط غیرجوانه‌زنی و حتی تثبیت این اسپورها استفاده کرد (۱۲). باکتری‌های استیک‌اسید، گونه‌های *استوباکتر*[2] و *گلوکونوباکتر*[3] نیز گلوکونیک‌اسید را به‌عنوان محصولی فرعی در مسیرهای تجزیه‌ای خود تولید می‌کنند. *گلوکونوباکتر اکسیدانس*[4] گلوکز را توسط آنزیم موجود در فضای پری‌پلاسمی خود به گلوکونیک‌اسید تبدیل و آن را به خارج از سلول ترشح می‌کند و مقداری از آن را برای تأمین انرژی خود وارد سلول می‌کند؛ این امر به خارج‌شدن اسیدهای قندی از دسترس سایر باکتری‌ها در محیط‌کشت منجر می‌شود و درنهایت، *گلوکونوباکتر* بدون رقابت به رشد خود در محیط‌کشت ادامه می‌دهد (۱۳). باوجود مطالب یادشده،

www.SID.ir

ازبین‌رفتن جمعیت سلولی و تخریب سلول‌ها به‌ویژه در موارد تنش (دمای زیاد، اسیدیتهٔ نامطلوب و ...) طی تخمیر اسیدهای آلی مشکل عمده در صنعت است. پیشنهادهای مختلفی برای رفع این مشکل ارائه شده‌اند؛ برای نمونه، روش‌های تثبیت سلولی برای تبدیل سریع کربوهیدرات‌ها به اسیدهای آلی استفاده می‌شوند (۱۴). باوجوداین، معمولاً روش‌های ارائه‌شده به‌علت پیچیدگی‌های فنی، قابلیت انجام در مقیاس صنعتی را ندارند. استفاده از ریزموجودات گرمادوست و یا ریزموجودات مقاوم به گرما که در دمای بیش از ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد رشد و محصول تولید می‌کنند، ضمن کاهش هزینهٔ سرمایش بیوراکتورها سبب کاهش امکان آلودگی با ریزموجودات مزوفیل و در اغلب موارد موجب افزایش سرعت رشد و تولید می‌شود (۱۵). *استوباکتر سنگالنسیس*[۵] باکتری مقاوم به گرماییست که در سال ۲۰۰۶ از نوشیدنی‌های درحال تخمیر در کشور سنگال جدا شده است. پژوهش‌های نسبتاً بسیاری دربارهٔ استفاده از آن در تولید استارتر سرکه، تولید سرکه در مقیاس نیمه‌صنعتی و ... انجام شده است (۱۶-۲۱). این باکتری در بازهٔ دمایی ۳۰ تا ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد با استفاده از اتانول به‌خوبی رشد می‌کند (۲۲). در پژوهشی که شفیعی[۶] و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام دادند، تولید گلوکونیک‌اسید توسط این باکتری مطالعه شد. در این پژوهش مشخص شد باکتری یادشده توانایی تولید گلوکونات‌سدیم در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد را دارد (۱۵)؛ بااین‌حال، تولیدگلوکونات‌سدیم و محصولات جانبی آن توسط *استوباکتر سنگالنسیس* در شرایط مختلف بررسی نشده است.

بر اساس آنچه بیان شد و اطلاعات نویسنده و باوجود مزیت باکتری‌های مقاوم به گرما، پژوهش در زمینهٔ استفاده از گونه‌های مقاوم به گرمای جنس استوباکتر برای تولید گلوکونات‌سدیم کمتر انجام شده است. باتوجه‌به مطالعه‌های پیشین نویسنده (۱۵)، بهینه‌سازی شرایط کشت ناپیوستهٔ باکتری *استوباکتر سنگالنسیس* به‌منظور تولید گلوکونات‌سدیم در دمای زیاد و بررسی اثر اسیدیته بر جمعیت سلولی طی فازهای رشد و تولید و تأثیر آن بر تولید محصولات جانبی هدف اصلی پژوهش حاضر است؛ همچنین علل کاهش سرعت مصرف قند در اسیدیته‌های مختلف با بررسی جمعیت سلولی در فازهای مختلف بررسی خواهند شد.

مواد و روش‌ها

ریزموجود مورداستفاده و روش کشت: در پژوهش حاضر از *استوباکتر سنگالنسیس* استفاده شد که نخستین‌بار از ترکیبات درحال تخمیر در کشور سنگال جداسازی شده است (۱۶). این باکتری در ویال‌های میکروبانک شرکت پرولب[۷] در دمای منفی ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری و برای کشت آن در محیط جامد و تهیهٔ مایهٔ تلقیح از محیط GYEA[۸] استفاده شد. این محیط حاوی ترکیبات زیر است: ۲۰ گرم‌درلیتر گلوکز، ۵۰ گرم‌درلیتر اتانول، ۵ گرم‌درلیتر استیک‌اسید، ۵ گرم‌درلیتر عصارهٔ مخمر، ۵ گرم‌درلیتر پپتون کازئین و ۱۵ گرم‌درلیتر آگار. در مواردی که به کشت مایع نیاز بود، آگار از ترکیب محیط‌کشت حذف شد. پس‌از کشت باکتری روی پلیت حاوی محیط GYEA، پلیت‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و شرایط هوازی گرماگذاری شدند. از کلنی‌های خالص برای تلقیح به محیط مایع استفاده شد.

تهیهٔ مایهٔ تلقیح: در پژوهش حاضر، مایهٔ تلقیح به‌منظور تولید سوسپانسون باکتری (زیست‌توده) لازم برای تلقیح به بیوراکتور استفاده شد. محیط‌کشت مایع

www.SID.ir

GYEA برای تهیهٔ مایهٔ تلقیح استفاده شد. این محیط در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری و به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد. پس‌از تلقیح کلنی خالص به این محیط، ارلن‌ها روی شیکر (۱۵۰ دوردردقیقه) و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. هنگامی که جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر (OD_{540nm}) به حدود ۱/۵±۰/۱ رسید، سوسپانسون سلولی برای تلقیح به بیوراکتور استفاده شد. بر اساس آزمایش‌های اولیه، میزان سلول‌ها در این جذب نوری برابر با 5×10^5 در هر میلی‌لیتر بود.

تخمیر گلوکونیک‌اسید: تخمیر گلوکونیک‌اسید در بیوراکتورهای آزمایشگاهی شرکت Infors مدل Labfors با حجم کل ۲/۵ لیتر و حجم مفید ۲ لیتر انجام شد. بیوراکتور مجهز به حسگرهای دما، اسیدیته، اکسیژن محلول و ضد کف بود و هوادهی آن با استفاده از اسپارژر و دو پروانه روشتون انجام شد. برای انجام تخمیر از محیط‌کشت GY استفاده شد که حاوی ترکیبات زیر بود:

۹۵ گرم‌درلیتر گلوکز، ۷ گرم‌درلیتر عصارهٔ مخمر، ۷ گرم‌درلیتر پپتون کازئین، ۱ گرم‌درلیتر آمونیوم‌فسفات، ۰/۲ گرم‌درلیتر سولفات‌منیزیم. اسیدیتهٔ اولیهٔ محیط پس‌از استریل‌کردن محیط‌کشت با فسفریک‌اسید و هیدروکسیدسدیم در چهار سطح ۴، ۴/۵، ۵ و ۵/۵ تنظیم شد.

برای انجام تخمیر، ۲ لیتر محیط‌کشت GY درون بیوراکتور (دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه) استریل شد. گلوکز موجود در این محیط به‌طور جداگانه استریل و پس‌از خنک‌شدن بیوراکتور و در شرایط استریل به آن اضافه شد. پس‌از خنک‌شدن و در شرایط استریل، مایهٔ تلقیح یادشده در بخش پیش به آن اضافه و تخمیر در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد با میزان هوادهی ۱ vvm انجام شد. اسیدیتهٔ محیط‌کشت طی تخمیر با فسفریک‌اسید و هیدروکسیدپتاسیم ثابت نگه داشته شد. نمونه‌گیری طی ساعت‌های مختلف و در شرایط استریل انجام شد و نمونه‌ها ازنظر بررسی مقدار قند، میزان زیست‌تودهٔ سلول و گلوکونات‌سدیم تولیدشده بررسی شدند.

بررسی کیفی میزان گلوکونات‌سدیم، ۲-کتوگلوکونات و ۵-کتوگلوکونات: بررسی کیفی و نیمه‌کمی گلوکونات‌سدیم، ۲-کتوگلوکونات و ۵-کتوگلوکونات توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و استفاده از صفحهٔ نازک سیلیکاژل Silica Gel 60) (plate مطابق با روش سایشینو[9] انجام شد (۲۳). ۵ میکرولیتر از استانداردهای هریک از ترکیبات موردبررسی و نیز مایع رویی محیط‌کشت (فیلترشده) در انتهای صفحهٔ سیلیکاژل قرار داده و در دمای اتاق خشکانده شد. حلال (فاز متحرک) شامل اتیل‌استات، استیک‌اسید، متانول و آب دیونیزه به نسبت ۱: ۱/۵: ۱/۵: ۶ استفاده شد. معرف ایجادکنندهٔ رنگ شامل مخلوط دی‌فنیل‌آمین (۲ گرم)، آنیلین (۲ میلی‌لیتر)، استون (۱۰۰ میلی‌لیتر) و فسفریک‌اسید (۱۵ میلی‌لیتر) به‌شکل تازه تهیه شد. پس‌از قراردادن صفحهٔ سیلیکاژل به‌مدت حدود ۱ ساعت در تانک حاوی حلال و در دمای اتاق (۲۵ تا ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد)، صفحهٔ سیلیکاژل در دمای اتاق خشک و معرف ایجادکنندهٔ رنگ روی آن اسپری شد. سپس صفحهٔ سیلیکاژل به‌مدت ۲۰ دقیقه برای ایجاد رنگ در دمای ۱۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. ۲-کتوگلوکونات و ۵-کتوگلوکونات به‌ترتیب به‌شکل لکه‌های بنفش- قرمز تیره و قرمز تیره ظاهر شدند.

اندازه‌گیری میزان زیست‌تودهٔ سلول، گلوکونات‌سدیم و مشتقات کتونی: اندازه‌گیری زیست‌تودهٔ سلول، گلوکونات‌سدیم، ۲-کتوگلوکونات، ۵-کتوگلوکونات و تعداد سلول‌های قابل‌کشت بر اساس

www.SID.ir

روش شفیعی و همکاران (۲۰۱۷ و ۲۰۱۳) انجام شد (۱۵ و ۱۹). به‌طور خلاصه، کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد (Agilent 1110) مجهز به ستون Supelcogel C610 در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد و جریان ۰/۵ میلی‌متردردقیقه برای سنجش غلظت ترکیبات یادشده استفاده شد. فسفریک‌اسید ۰/۱ درصد به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد و گلوکونات و مشتقات آن در ۲۱۰ نانومتر شناسایی شدند.

بررسی عملکرد آنزیم‌های دهیدروژناز طی مراحل مختلف تخمیر: تأثیر شرایط تخمیر روی عملکرد آنزیم‌های دهیدروژناز سلول در دو فاز نمایی و سکون در هر اسیدیته بررسی شد. پس‌از نمونه‌گیری از بیوراکتور در فاز رشد، تعداد سلول‌ها با استفاده از محیط‌کشت جدید GY (به بخش تخمیر مراجعه کنید) در حد 10^7 سلول در هر میلی‌لیتر تنظیم شد. از فلوروکروم[10] CTC برای بررسی عملکرد مجموعه آنزیم‌های دهیدروژناز در سلول‌های زنده و از رنگ تیازولین نارنجی[11] (TO) برای رنگ‌آمیزی سلول‌های مرده و زنده استفاده شد. میزان غلظت و زمان رنگ‌آمیزی طبق روش شفیعی و همکاران (۲۰۱۳) تنظیم شد (۲۰).

نتایج

بر اساس مطالعهٔ پیشین شفیعی و همکاران (۲۰۱۷)، *استوباکتر سنگالنسیس* در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد می‌تواند ۹۵ گرم‌درلیتر گلوکز را در اسیدیتهٔ ۵/۵ تحمل و با بازدهٔ بیش از ۸۰ درصد گلوکز را به گلوکونیک‌اسید تبدیل کند (۱۵). در مطالعهٔ حاضر، میزان تولید گلوکونات‌سدیم و مشتقات آن در کشت ناپیوسته در دو دمای ۳۰ و ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد و اسیدیته‌های مختلف بررسی شد.

بررسی تأثیر دما، غلظت قند و اسیدیته بر برخی پارامترهای سینتیکی تخمیر: در اسیدیتهٔ ثابت و کنترل‌شده (۵/۵) و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد، *استوباکتر سنگالنسیس* می‌تواند قند گلوکز را تا ۱۲۰ گرم‌درلیتر طی مدت ۶۹ ساعت مصرف کند. افزایش غلظت قند موجب کاهش بسیار شدید سرعت مصرف قند می‌شود؛ به‌طوری‌که زمان تخمیر بسیار طولانی می‌شود و تخمیر ناتمام به پایان می‌رسد؛ بر این اساس در پژوهش حاضر، تخمیر بیش از ۱۲۰ گرم‌درلیتر قند گلوکز استفاده نشد. همان‌طورکه در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بین حداکثر سرعت مصرف قند و دمای تخمیر و غلظت اولیهٔ قند رابطه وجود دارد. اگرچه حداکثر سرعت تولید زیست‌تودهٔ سلول به دما وابسته است، در غلظت‌های مختلف قند در دمای ثابت مشابه است. با افزایش دما به ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد در غلظت اولیهٔ ۱۲۰ گرم‌درلیتر قند گلوکز، تولید زیست‌تودهٔ سلول با $\mu_{max.}$ بیشتر از دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد پیش می‌رود؛ بااین‌حال، حداکثر سرعت مصرف قند گلوکز با افت شدید نسبت به دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد روبه‌رو می‌شود. با کاهش غلظت اولیهٔ قند در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد، حداکثر سرعت مصرف قند دوباره افزایش می‌یابد؛ اما تاحدی نسبت به دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد کمتر است و بنابراین در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد، غلظت ۹۵ گرم‌درلیتر گلوکز و یا کمتر از آن برای تولید گلوکونیک‌اسید مناسب است.

ازآنجاکه گلوکونیک‌اسید یک اسید آلی و تأثیر آن بر سلول به اسیدیته وابسته است، تأثیر اسیدیتهٔ محیط‌کشت بر برخی پارامترهای سینتیکی تخمیر بررسی شد. بر اساس نتایج، حداکثر سرعت مصرف قند با کاهش اسیدیته به‌طور معناداری در هر دو دمای ۳۰ و ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد کاهش می‌یابد (جدول ۲)؛ به‌طوری‌که در اسیدیتهٔ ۴، سرعت مصرف قند در دمای

www.SID.ir

۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد ناچیز است و تخمیر به‌طور کامل انجام نمی‌شود و بیش از ۵۰ درصد قند در محیط باقی می‌ماند. با افزایش اسیدیته، زمان مصرف گلوکز به‌طور معناداری کاهش می‌یابد؛ به‌طوری‌که این زمان در اسیدیتهٔ ۴/۵ حدود ۸۸ ساعت است و در اسیدیتهٔ ۵/۵ به ۴۸ ساعت کاهش می‌یابد. *استوباکتر سنگالنسیس* در اسیدیتهٔ ۴/۵ تا ۵ بیش از ۸۰ درصد گلوکز اولیه را در هر دو دمای یادشده به گلوکونات‌سدیم تبدیل می‌کند. باتوجه‌به نتایج این بخش و به‌منظور دستیابی به حداقل زمان تولید، در ادامهٔ کار برای تولید گلوکونات‌سدیم در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد از ۹۵ گرم‌درلیتر قند گلوکز در اسیدیتهٔ ۵/۵ استفاده شد.

جدول ۱- پارامترهای سینتیکی تخمیر مقادیر مختلف قند گلوکز به گلوکونیک‌اسید در دماهای مختلف و اسیدیتهٔ ۵/۵ *

	۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد			۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد		
غلظت قند (گرم‌درلیتر)	۱۲۰	۹۵	۷۵	۱۲۰	۹۵	۷۵
μ_{max} (بر ساعت)	۰/۵۷	۰/۵۱	۰/۵۳	۰/۶۳	۰/۶۸	۰/۶۶
$q_{s\ max}$ (بر ساعت)	۳/۱	۳/۸	۴/۳	۱/۲	۳/۲	۳/۷

*اسیدیته در تمام طول تخمیر ثابت نگه داشته شد (±۰/۲)

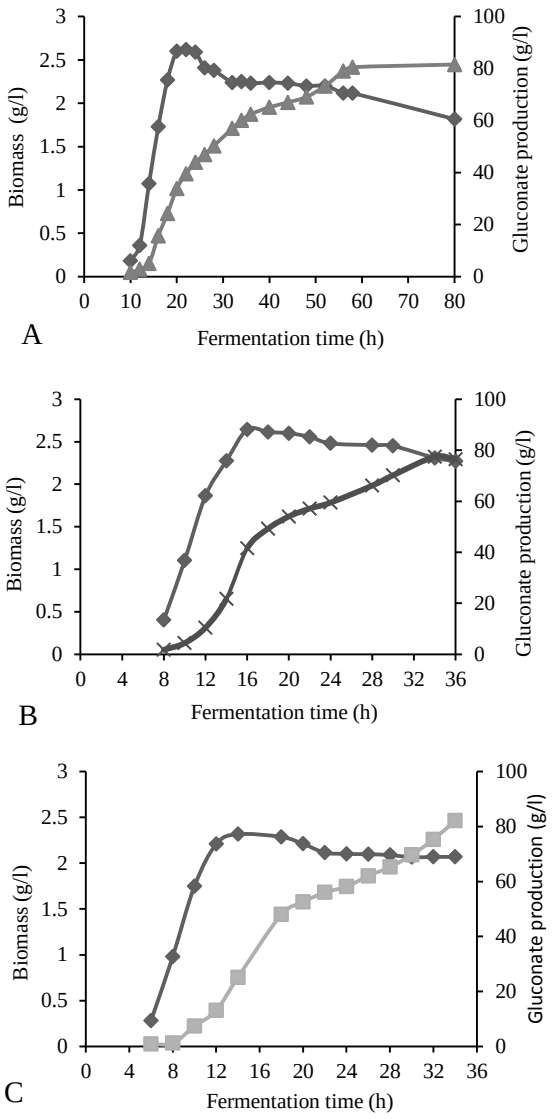
جدول ۲- پارامترهای سینتیکی تخمیر ۹۵ گرم‌درلیتر قند گلوکز به گلوکونات‌سدیم در دما و اسیدیته‌های مختلف و کنترل‌شده

	۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد				۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد			
	اسیدیتهٔ ۵/۵	اسیدیتهٔ ۵/۰	اسیدیتهٔ ۴/۵	اسیدیتهٔ ۴/۰	اسیدیتهٔ ۵/۵	اسیدیتهٔ ۵/۰	اسیدیتهٔ ۴/۵	اسیدیتهٔ ۴/۰
$\mu_{max.x}$ (بر ساعت)	۰/۵۱	۰/۴۳	۰/۴۷	۰/۲۸	۰/۵۰	۰/۵۱	۰/۴۸	۰/۱۹
$q_{s\ max}$ (بر ساعت)	۳/۸	۳/۹	۲/۷	۱/۳	۴/۲	۳/۵	۱/۳	۰/۴

* اسیدیته در تمام طول تخمیر ثابت نگه داشته شد (±۰/۲)

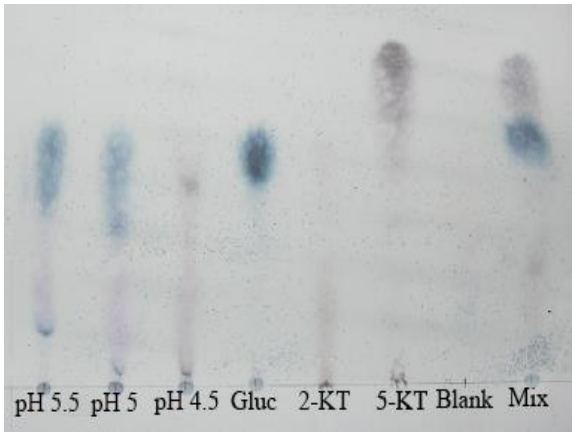
همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد اگرچه گلوکونات‌سدیم در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد در هر دو مرحلهٔ رشد (فاز نمایی و سکون) تولید می‌شود، عمده تولید آن در فاز سکون است. باتوجه‌به میزان قند اولیه (۹۵ گرم‌درلیتر)، در تمام حالات حدود ۸۰ گرم‌درلیتر گلوکونات‌سدیم تشکیل می‌شود. به‌طورکلی، در تمام اسیدیته‌ها درصد کمی از قند گلوکز به‌عنوان پیش‌ماده برای رشد سلول‌ها استفاده می‌شود و بخش عمدهٔ گلوکز موجود در محیط صرف تولید گلوکونات‌سدیم می‌شود. با کاهش اسیدیته، زمان تخمیر طولانی‌تر می‌شود (شکل ۱، A)؛ به‌طوری که تولید گلوکونیک‌اسید در اسیدیتهٔ ۴/۵ به زمان طولانی (حدود ۸۰ ساعت) نیاز دارد، اما در اسیدیته‌های بیشتر (۵ تا ۵/۵) مدت تخمیر نهایتاً ۳۶ ساعت است؛ باوجوداین، اسیدیته تأثیری بر فاز نمایی ندارد و رشد سریع سلول‌ها در همهٔ موارد انجام می‌شود (شکل ۱، A-C).

www.SID.ir



شکل ۱- منحنی رشد (◊) و تولید گلوکونات‌سدیم (Δ) طی تخمیر ناپیوسته در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد و اسیدیته‌های ثابت و کنترل‌شده (میزان قند اولیه ۹۵ گرم‌درلیتر بوده است)؛ A. تخمیر در اسیدیتهٔ ۰/۲±۴/۵، B. تخمیر در اسیدیتهٔ ۰/۲±۵/۰، C. تخمیر در اسیدیتهٔ ۰/۲±۵/۵

بررسی میزان تولید محصولات جانبی طی تخمیر گلوکونیک‌اسید: در پژوهش حاضر، میزان تولید محصولات جانبی تخمیر بررسی شد. به این منظور، نمونه‌های گرفته‌شده در ساعت‌های پایانی تخمیر با دو روش کیفی و کمی یعنی کروماتوگرافی لایه نازک و HPLC تجزیه‌وتحلیل شدند. بررسی با کروماتوگرافی لایهٔ نازک نشان داد گلوکونات‌سدیم ترکیب عمدهٔ تولیدشده در هر سه اسیدیتهٔ ۴/۵، ۵ و ۵/۵ است. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود در اسیدیته‌های ۵ و ۵/۵، گلوکونات‌سدیم محصول غالب تولیدشده است. در هر سه اسیدیته، نوار باریک قرمزرنگی دیده می‌شود که وجود مشتقات کتونی گلوکونیک‌اسید را نشان می‌دهد؛ بااین‌حال، نتایج کروماتوگرافی لایه نازک قطعیت لازم را ندارند و ازاین‌رو، تجزیه‌وتحلیل با استفاده از کروماتوگرافی مایع تحت فشار زیاد انجام شد.



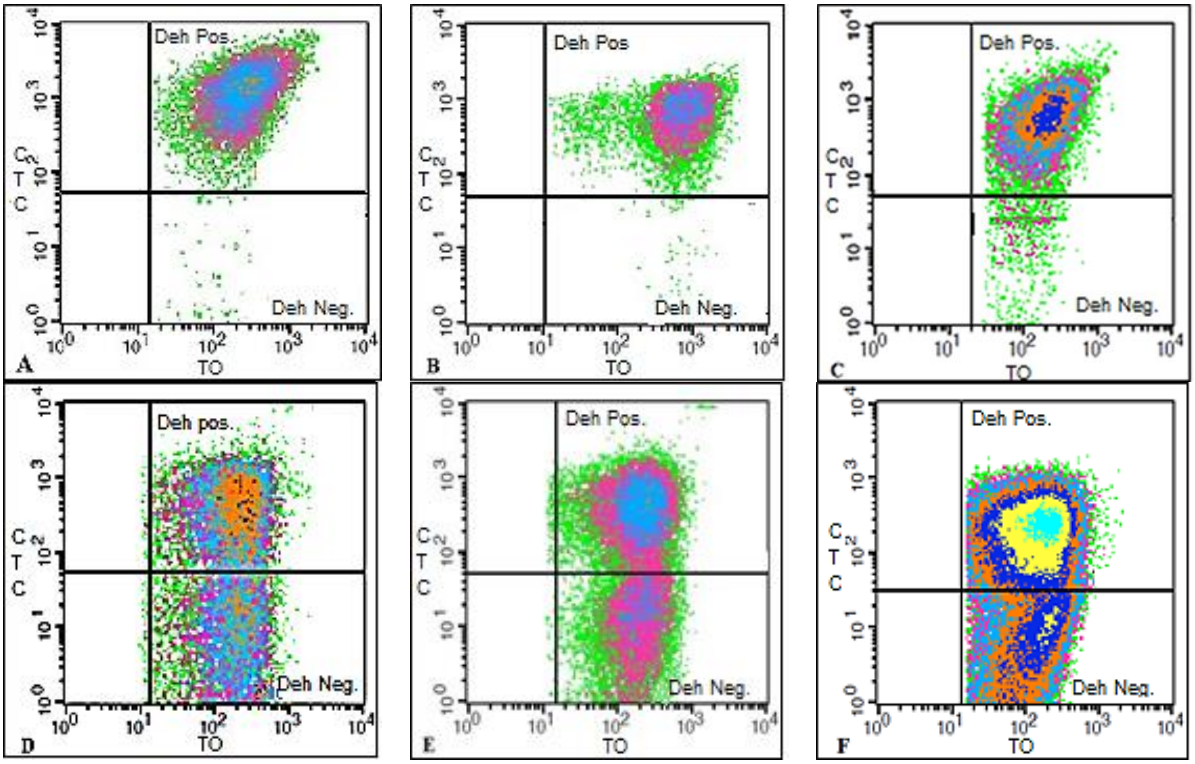
شکل ۲- کروماتوگرافی لایه نازک برای تشخیص محصولات تخمیر گلوکز توسط *استوباکتر سنگالنسیس* در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد و اسیدیته‌های مختلف. نمونه مخلوط (Mix) شامل گلوکونات‌سدیم (Gluc)، ۲-کتوگلوکونات (2-KT)، گلوکز و ۵-کتوگلوکونات (5-KT) است. اسیدیته‌ها اسیدیته‌ای را نشان می‌دهند که تخمیر گلوکونیک‌اسید در آن انجام شده است. نمونهٔ شاهد شامل محیط‌کشت اولیه بدون تلقیح باکتری است.

تجزیه‌وتحلیل کمی نمونه‌های تخمیر با HPLC تا حد زیادی داده‌های کروماتوگرافی لایه نازک را تأیید کرد؛ به‌طوری‌که گلوکونات‌سدیم (۷۹ گرم‌درلیتر) و ۲-کتوگلوکونیک‌اسید (۱/۲ گرم‌درلیتر) مهم‌ترین ترکیبات تولیدشده در انتهای تخمیر و در اسیدیته‌های

www.SID.ir

۵ و ۵/۵ بودند و در هر دو اسیدیته، میزان ۵-کتوگلوکونیک‌اسید بسیار ناچیز (۰/۰۵ گرم‌درلیتر) بود. افزایش میزان ۲-کتوگلوکونیک‌اسید در اسیدیتهٔ ۴/۵ جالب بود؛ به‌طوری که میزان این ترکیب حدود ۶ برابر تخمیر در اسیدیتهٔ ۵/۵-۵ بود. اگرچه کروماتوگرافی لایه نازک میزان گلوکونات‌سدیم را در اسیدیتهٔ ۴/۵ ناچیز نشان داد (شکل ۲)، تجزیه‌وتحلیل HPLC میزان گلوکونات‌سدیم را ۷۹/۳ گرم‌درلیتر نشان داد.

در پژوهش حاضر، به‌منظور پی‌بردن به ترکیب جمعیت سلول‌ها طی تخمیر و یافتن علت کاهش حداکثر سرعت تولید در اسیدیته‌های کمتر از دو فاز نمایی و سکون هر تخمیر نمونه‌گیری و فعالیت مجموعه آنزیم‌های دهیدروژناز سلولی با فلوسیتومتر تجزیه‌وتحلیل شد.



شکل ۳- بررسی فلوسیتومتری فعالیت مجموعه دهیدروژنازهای سلول‌های *استوباکتر سنگالنسیس* طی تخمیر گلوکونیک‌اسید. سلول‌ها از دو فاز نمایی و سکون در اسیدیته‌های مختلف به دست آمدند و فعالیت مجموعه دهیدروژنازهای آنها بررسی شدند. سلول‌ها در محیط کشت حاوی گلوکز در معرض CTC (معرف دهیدروژنازهای فعال) و در دمای ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و سپس با رنگ TO رنگ‌آمیزی شدند. A-C به‌ترتیب عملکرد دهیدروژنازها را در جمعیت سلول‌های فاز نمایی در اسیدیته‌های ۴/۵، ۵ و ۵/۵ و D-F به‌ترتیب عملکرد دهیدروژنازها را در جمعیت سلول‌های فاز سکون در اسیدیته‌های ۴/۵، ۵ و ۵/۵ نشان می‌دهند. مناطقی که جمعیت سلول‌ها دهیدروژناز فعال دارند با .Deh pos و مناطقی که جمعیت سلول‌ها ازنظر فعالیت دهیدروژنازی منفی است با علامت .Deh Neg مشخص شده است. به‌طور خلاصه، با کاهش اسیدیته به ۴/۵ (قسمت D)، میزان جمعیت سلول‌های غیرفعال (Deh. Neg) در فاز سکون افزایش می‌یابد.

www.SID.ir

بر اساس نتایج (شکل ۳)، جمعیت باکتری‌ها (بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها) در فاز نمایی در هر سه اسیدیتهٔ ۴/۵، ۵ و ۵/۵ با داشتن مجموعه آنزیم‌های دهیدروژناز فعال قادر به انجام تنفس و احیای رنگ CTC هستند و بنابراین، همگی به‌طور زنده ظاهر می‌شوند. این نتایج با نتایج جدول ۲ همخوانی دارد؛ زیرا در فاز نمایی که حداکثر سرعت رشد در آن دیده می‌شود، μ_{max} در همهٔ حالات بسیار به هم نزدیک است. ترکیب جمعیت سلولی در فاز سکون نسبت به فاز نمایی تغییر می‌کند و به دو بخش سلول‌های دارای دهیدروژناز فعال و سلول‌های دارای دهیدروژناز غیرفعال تبدیل می‌شود. تشکیل این ترکیب جمعیتی هرچند به اسیدیته وابسته نیست و در تمام اسیدیته‌ها اتفاق می‌افتد، درصد سلول‌های فعال و غیرفعال به اسیدیتهٔ محیط کشت وابسته است. باتوجه‌به اینکه نمونه‌گیری برای همهٔ تخمیرها در شرایط یکسان (باتوجه‌به شکل ۱، زمانی که میزان غلظت گلوکونات‌سدیم ۶۰ گرم‌درلیتر بود) انجام شد، میزان سلول‌های غیرفعال ازنظر دهیدروژنازها با کاهش اسیدیته افزایش می‌یابد؛ جالب اینکه در اسیدیتهٔ ۴/۵، بیش از ۶۱ درصد سلول‌های فاز سکون به‌شکل دهیدروژناز منفی ظاهر می‌شوند (شکل ۳، D) و این در حالیست که زیرجمعیت غیرفعال در اسیدیته‌های ۵ و ۵/۵ به‌ترتیب ۵۲ و ۴۵ درصد است.

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، شرایط رشد و تولید گلوکونیک‌اسید توسط *استوباکتر سنگالنسیس* که باکتری مقاوم به گرماست، بررسی و تأثیرغلظت قند در دماها و اسیدیته‌های مختلف بر برخی پارامترهای سینتیکی تخمیر مطالعه شد. همچنین تولید مهم‌ترین محصولات جانبی بررسی شد.

امروزه، تولید گلوکونیک‌اسید در محصولات تخمیری غذایی ازجمله نوشیدنی‌ها مدنظر قرار گرفته است. اگرچه طی سال‌های اخیر، گونه‌های متعددی از باکتری‌های مولد استیک‌اسید برای تولید گلوکونیک‌اسید یا مشتقات کتونی آن آزمایش شده‌اند (۲۴)، باکتری‌های استیک‌اسید گرمادوست یا مقاوم به گرما کمتر موردتوجه قرار گرفته‌اند و دلیل این امر احتمالاً ماهیت پیش‌مادهٔ مورداستفاده (اغلب ضایعات میوه) است (۲۵)؛ زیرا انجام تخمیر در دمای زیاد تأثیر نامطلوبی بر ویژگی‌های حسی آنها می‌گذارد. در مواردی که ویژگی‌های حسی مطرح نباشند، تولید محصولات تخمیری در دمای زیاد به‌علت کاهش هزینه‌های خنک‌سازی بیوراکتورها و همچنین کاهش امکان آلودگی اهمیت بسزایی دارد. باتوجه‌به اینکه دمای درنظرگرفته‌شده در پژوهش حاضر ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد بود، فعالیت متابولیسمی باکتری می‌تواند این دما را طی مراحل رشد و تولید گلوکونیک‌اسید ایجاد کند و نیازی به تأمین گرما برای رسیدن به این دما نیست.

بر اساس پژوهش‌های جدید، واگرایی جمعیت سلول‌های میکروبی طی تخمیر موجب تغییرات ملایم تا شدید در فرایند تولید می‌شود. در پژوهش حاضر ثابت شد سلول‌ها ازنظر فعالیت دهیدروژنازی در فاز نمایی کاملاً یکدست‌اند، اما طی فاز سکون به دو زیرجمعیت دهیدروژناز مثبت و دهیدروژناز منفی تقسیم می‌شوند. ازآنجاکه تبدیل گلوکز به گلوکونات‌سدیم در اثر فعالیت تخمیری اکسیداتیو اتفاق می‌افتد و این کاتابولیسم در باکتری‌های استیک‌اسید به دهیدروژنازهای غشایی- پری‌پلاسمی وابسته است، کاهش فعالیت یا غیرفعال‌شدن دهیدروژنازها طی فاز سکون احتمالاً موجب

www.SID.ir

خارج‌شدن بخشی از جمعیت سلولی از چرخهٔ متابولیسمی تولید گلوکونیک‌اسید می‌شود. این امر با داده‌های جدول ۲ هماهنگی دارد؛ زیرا حداکثر سرعت مصرف گلوکز (که در فاز سکون است) باکاهش اسیدیته کاهش می‌یابد و به عبارتی، هرچه از جمعیت سلولی فعال (سلول‌های دهیدروژناز مثبت) کاسته شود، میزان سرعت مصرف قند نیز کم می‌شود. دلایل متعددی برای غیرفعال‌شدن مجموعه دهیدروژنازهای سلول وجود دارد که ازجملهٔ آنها عبارتند از: افزایش تأثیر اسیدهای آلی (مانند استیک‌اسید و یا لاکتیک‌اسید و ...) بر متابولیسم سلول‌ها در اسیدیتهٔ کم و کاهش ترکیبات احیاکنندهٔ داخل سلولی. اگرچه گلوکونیک‌اسید نیز جزئی از اسیدهای آلی محسوب می‌شود، در مطالعه‌های اولیه ثابت شد در صورت انتقال سلول‌های فاز نمایی به محیط کشت حاوی غلظت زیاد گلوکونات‌سدیم در اسیدیته‌های مختلف، رشد وتکثیر سلول‌ها بی‌وقفه ادامه می‌یابد؛ ازاین‌رو، غیرفعال‌شدن سلول‌ها نمی‌تواند در اثر تأثیر منفی گلوکونات‌سدیم باشد و دلایل دیگری دارد.

مهم‌ترین محصولات جانبی‌ای که طی تولید گلوکونیک‌اسید تولید می‌شوند، مشتقات کتونی گلوکونیک‌اسید هستند. این محصولات طی یک سری واکنش‌های متوالی تولید می‌شوند که توسط دهیدروژنازهای وابسته به غشای سلول در فضای پری‌پلاسمی انجام می‌شوند (۲۶). ترکیبات یادشده اهمیت دارند و در تولید ترکیبات دارویی نظیر ویتامین ث استفاده می‌شوند؛ باوجوداین، اگر هدف تولید گلوکونیک‌اسید یا نمک‌های آن باشد، تولید محصولات جانبی باید به حداقل برسد. در پژوهش حاضر ثابت شد *استوباکتر سنگانسیس* به مقدار بسیار اندک ۲- کتوگلوکونات تولید می‌کند و میزان ۵- کتوگلوکونات بسیار ناچیز است؛ همچنین تولید محصولات کتونی تا حدی به اسیدیتهٔ محیط‌کشت وابسته است. باکتری‌های استیک‌اسید ازنظر تولید محصولات جانبی بسیار متنوعند و به نظر می‌رسد میزان تولید مشتقات کتونی به عوامل مختلفی وابسته است؛ برای نمونه، نتایج پژوهش Saichana و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند تولید ۵- کتوگلوکونیک‌اسید توسط جدایهٔ *گلوکونوباکتر* مقاوم به گرما (۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد) به دمای محیط‌کشت وابسته است (۲۳).

بر اساس نتایج، باکتری *استوباکتر سنگانسیس* قادر است در دمای زیاد (۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد) ضمن تولید گلوکونات‌سدیم، کمترین مقدار محصولات جانبی را تولید کند؛ همچنین باتوجه‌به تجزیه‌وتحلیل فلوسیتومتری، در صورت تشکیل زیرجمعیت‌ها میکروبی مختلف طی تخمیر، احتمال تغییر روند تولید نظیر کاهش سرعت تولید، اتمام زودرس تخمیر و ... وجود دارد؛ بنابراین، لازم است راهکارهایی برای کاهش تشکیل زیرجمعیت‌ها هنگام تخمیر در پیش گرفته شوند.

سپاسگزاری

پروژهٔ حاضر با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی انجام شده است.

References

(1) Ramachndran S., Fontanille P., Pandey A., Larroche C. Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. *Food Technology and Biotechnology* 2006; 44: 185-95.

www.SID.ir

(2) Mounir M., Shafiei R., Zarmehrkhorshid R., Hamouda A., Alaoui MI., Thonart P. Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2016; 121(2): 166-171.

(3) Ordóñez JL., Cañete-Rodríguez AM., Callejón RM., Santos-Dueñas MI., Troncoso AM., García-García I., et al. Effect of gluconic acid submerged fermentation of strawberrypurée on amino acids and biogenic amines profile. *Journal of Food Processing and Preservation* 2017; 41(2): e12787.

(4) Blom RH., Pfeifer VF., Moyer AJ., TraufRer DH., Conway HF., Crocker CK., et al. Sodium gluconate production: Fermentation with *Aspergillus niger*. *Industrial and Engineering Chemistry* 1952; 44(2): 435-440.

(5) Poeikhampha T., Bunchasak C. Comparative effects of sodium gluconate, mannan oligosaccharide and potassium diformate on growth performances and small intestinal morphology of nursery pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2011; 24(6): 844-850.

(6) Asano T., Kondo R., Mori Y. *Bifidobacterium* growth promotant. U.S. Patent No. 5,800,830. 1 Sep. 1998.

(7) Tsukahara T., Koyama H., Okada M., Ushida K. Stimulation of butyrate production by Gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of Butyrate-producing bacteria. *The Journal of Nutrition* 2002; 132(8): 2229-2234.

(8) Fairweather-Tait SJ., Teucher B. Iron and calcium bioavailability of fortified foods and dietary supplements. *Nutrition Review*s 2002; 60(11): 360-367.

(9) Biella S., Prati L., Rossi M. Selective oxidation of D-Glucose on gold catalyst. *Journal of Catalysis* 2002; 206(2): 242-247.

(10) Pal P., Kumar R., Banerjee S. Manufacture of gluconic acid: A review towards process intensification for green production. Chemical Engineering and Processing 2016; 104: 160-171.

(11) Johnstone-Robertson M., Clarke KG., Harrison STL. Characterization of the distribution of glucose oxidase in *Penicillium* sp. CBS 120262 and *Aspergillus niger* NRRL-3 cultures and its effect on integrated product recovery. *Biotechnology and Bioengineering* 2008; 99(4): 910-918.

(12) Ramachandran S., Fontanille P., Pandey A., Larroche C. Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose. *Bioresource Technology* 2008; 99(11): 4559-4565.

(13) Velizarov S., Beschkov V. Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situtations. *Process Biochemistry* 1998; 33(5): 527-534.

(14) Sankpal N., Kulkarni B. Optimization of fermentation conditions for gluconic acid production using Aspergillus niger immobilized on cellulose microfibrils. *Process Biochemistry* 2002; 37(12): 1343-1350.

(15) Shafiei R., Zarmehrkhorshid R., Mounir M., Thonart P., Delvigne F. Influence of carbon sources on the viability and resuscitation of *Acetobacter senegalensis* during high-temperature gluconic acid fermentation. Bioprocess and Biosystems Engineering 2017; 40(5): 769-780.

(16) Ndoye B., Cleenwerck I., Engelbeen K., Dubois-Dauphin R., Guiro AT., Van Trappen S., et al. *Acetobacter senegalensis* sp. nov., a thermotolerant acetic acid bacterium isolated in Senegal (sub-Saharan Africa) from mango fruit (Mangifera indica L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; 57(7): 1576-1581.

(17) Ndoye B., Lebecque S., Destain J., Guiro AT., Thonart P. A new pilot plant scale acetifier designed for vinegar

www.SID.ir

production in Sub-Saharan Africa. *Process Biochemistry* 2007; 42(11): 1561-1565.

(18) Ndoye B., Weekers F., Diawara B., Guiro AT., Thonart P. Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Subsaharan Africa. *Journal of food engineering* 2007; 79(4): 1374-1382.

(19) Shafiei R., Delvigne F., Babanezhad M., Thonart P. Evaluation of viability and growth of *Acetobacter senegalensis* under different stress conditions. *International Journal of Food Microbiology* 2013; 163(2-3): 204-213.

(20) Shafiei R., Delvigne F., Thonart P. Flow-cytometric assessment of damages to *Acetobacter senegalensis* during freeze-drying process and storage. *Acetic Acid Bacteria* 2013; 2(1s): 10.

(21) Shafiei R., Zarmehrkhorshid R., Bentaib A., Babanezhad M., Leprince P., Delvigne F., et al. The role of protein modifications in senescence of freeze-dried *Acetobacter senegalensis* during storage. *Microbial cell factories* 2014; 13(1): 26.

(22) Ndoye B., Lebecque S., Dubois-Dauphin R., Tounkara L., Guiro A-T., Kere C., et al. Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; 39(4): 916-923.

(23) Saichana I., Moonmangmee D., Adachi O., Matsushita K., Toyama H. Screening of thermotolerant *Gluconobacter* strains for production of 5-keto-D-gluconic acid and disruption of flavin adenine dinucleotide-containing D-gluconate dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 75(13): 4240-4247.

(24) Sainz F., Navarro D., Mateo E., Torija M., Mas A. Comparison of d-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 2016; 222: 40-47.

(25) Cañete-Rodríguez AM., Santos-Dueñas IM., Torija-Martínez MJ., Mas A., Jiménez-Hornero JE., García-García I. Preparation of a pure inoculum of acetic acid bacteria for the selective conversion of glucose in strawberry purée into gluconic acid. *Food and Bioproducts Processing* 2015; 96: 35-42.

(26) Kataoka N., Matsutani M., Yakushi T., Matsushita K. Efficient production of 2, 5-diketo-d-gluconate via heterologous expression of 2-keto-gluconate dehydrogenase in *Gluconobacter japonicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2015; AEM. 04176-14.

[1]- *Aspergillus niger*
[2]- *Acetobacter*
[3]- *Gluconobacter*
[4]- *Gluconobacter oxydans*
[5]- *Acetobacter senegalensis*
[6]- Shafiei
[7]- Prolab®
[8]- Glucose-yeast extarct- ethanol- acetic acid medium
[9]- Saichana
[10]- 5-Cyano-2,3-ditolyl-2*H*-tetrazolium chloride
[11]- Thiazole orange

www.SID.ir