نشریه علمی-پژوهشی
شیمی و مهندسی شیمی ایران
https://nsmsi.ir
نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران | دوره ۴۴، شماره ۴، ۱۴۰۴ | ISSN: 1022-7768

جداسازی درجای سوکسینیک اسید از محیط تخمیر باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم

پریسا چارداولی، سیدعباس شجاع الساداتی*+
گروه مهندسی شیمی_بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

در تولید محصولات شیمیایی به روش تخمیر، یکی از چالش‌های رایج، مهار تولید توسط تجمع محصول در محیط کشت است. برای غلبه بر این مشکل، روش‌هایی همچون تغییر شرایط محیطی، افزودن مواد کمکی، اصلاح فرمولاسیون محیط و بهبود سویه‌های میکروبی پیشنهاد شده است. در فرایند بی‌هوازی تولید سوکسینیک اسید با استفاده از کورینه باکتریوم گلوتامیکوم، تجمع این متابولیت موجب کاهش راندمان می‌شود. در این پژوهش، با به‌کارگیری روش جداسازی درجا، امکان بهبود راندمان تولید بررسی شد. گروه‌های مختلفی از حلال‌ها شامل حلال‌های گیاهی، الکل‌ها و آلکان‌ها از نظر زیست‌سازگاری و جنبه‌های اقتصادی ارزیابی شدند. برای انتخاب حلال مناسب، از نرم‌افزار اسپن پلاس استفاده گردید. بر اساس نتایج نمودار مصرف گلوکز، رشد باکتری در ساعت ۲۴ مهار شد؛ بنابراین، حلال در همین زمان به محیط کشت اضافه شد. در میان گزینه‌ها، اولئیل الکل به دلیل زیست‌سازگاری بالا، توانایی جذب مطلوب سوکسینیک اسید و قابلیت بازیابی از طریق تقطیر، به‌عنوان مناسب‌ترین حلال انتخاب گردید. بیشترین جداسازی در غلظت ۱۰٪ (v/v) حاصل شد که منجر به افزایش حدود ۱۵ درصدی راندمان تخمیر گردید.

اطلاعات مقاله

واژه‌های کلیدی:
جداسازی درجا، تخمیر،
سوکسینیک اسید،
کورینه باکتریوم گلوتامیکوم.

Keywords:
In-situ separation, fermentation, succinic acid, Corynebacterium glutamicum.

دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۰۵
پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۱۴

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

مقدمه

سوکسینیک اسید[1] به عنوان یک ماده شیمیایی واسطه و به عنوان پیش‌ماده برای تولید محصولات تجاری مانند آدیپیک اسید، دی متیل سوکسینات، رنگدانه‌ها، رزین‌ها و ۱و۴ بوتان دیول استفاده می‌شود. سازمان انرژی آمریکا، سوکسینیک اسید را جزء ۱۲ ماده واسطه شیمیایی ارزشمند زیستی با ارزش افزوده بالا معرفی کرده است. تولید زیستی سوکسینیک اسید در بازار جهانی در سال ۲۰۲۱ به ارزش ۱۱۰/۴ میلیون دلار و رشد تولید آن از سال ۲۰۲۲ تا سال ۲۰۳۰ با نرخ رشد مرکب سالانه ۱۰/۶ درصد پیش‌بینی شده است. با افزایش تقاضای محصولات زیستی، تقاضا برای تولید زیستی سوکسینیک اسید افزایش یافته است، زیرا محصولات برپایه‌ی زیستی برای انسان و محیط زیست کم خطر هستند [۱]. در صنایع پتروشیمی در حضور کاتالیست های فلزی و حلال‌های آلی و دما و فشار بالا،

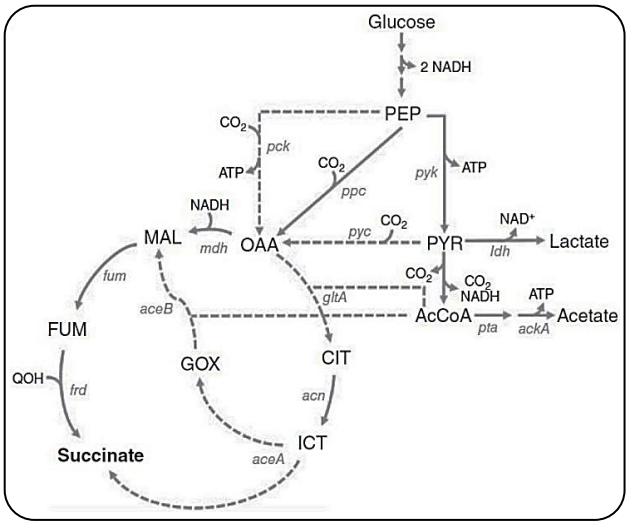
* عهده‌دار مکاتبات
+E- mail: shoja_sa@modares.ac.ir

رجاع: پریسا چارداولی، سیدعباس شجاع الساداتی، جداسازی درجای سوکسینیک اسید از محیط تخمیر باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۴)۴۴: ۱۶۷ تا ۱۷۴ (۱۴۰۴).

(۱) Succinic acid

با هیدروژن‌دار کردن مالئیک آنیدرید[۱] سوکسینیک اسید تولید می‌شود [۲]. در دهه‌های اخیر تولید این ماده توسط ریزاندامگان[۲]ها در چرخه تری کربوکسیلیک اسید انجام شده است [۱]. برای تولید سوکسینیک اسید باید هزینه‌های تولید این ماده به یک دلار به ازای هر کیلوگرم سوکسینیک اسید برسد [۲]. از مزایای تولید زیستی این محصول می‌توان به مصرف کربن دی اکسید در چرخه‌کربس، کاهش نشر گازهای گلخانه‌ای و بازدهی بالای تبدیل منبع کربنی به سوکسینیک اسید اشاره نمود [۲].

بسیاری از باکتری‌های بی‌هوازی سوکسینیک اسید تولید می‌کنند، از جمله باکتری‌های بی‌هوازی موجود در شکمبه نشخوارکنندگان مانند *مانهمیا سوکسینیسی پرودوسنز*[۳]، *اکتینوباسیلوس سوکسینوژنز*[۴]، *باسفیا سوکسینیسی پرودوسنز*[۵]، *آنائروبیواسپریلوم سوکسینیسی پرودوسنز*[۶]. همچنین می‌توان با دست‌ورزی باکتری‌ها تولید سوکسینیک اسید را فراهم نمود. البته سویه دستکاری نشده باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*[۷] در عدم حضور یون نیترات و کمبود اکسیژن توانایی تولید اسیدهای آلی از جمله استیک اسید، سوکسینیک اسید و لاکتیک اسید را دارد. با توجه به اینکه در فرآیند بی‌هوازی، با تجمع سوکسینیک اسید در محیط کشت راندمان تولید کاهش می‌یابد، جداسازی درجای محصول حاصل از تخمیر روشی است که محصول را همزمان با تخمیر از محیط خارج نموده و مهار تولید را کاهش داده است. علاوه بر این، این روش منجر به کاهش هزینه‌های پایین دستی می‌شود. انواع روش‌های جداسازی درجا شامل جذب سطحی، جداسازی با غشا، جداسازی مایع مایع وجود دارد. جداسازی درجا با روش مایع مایع به علت هزینه عملیاتی پایین و شرایط عملیاتی ساده‌تر به عنوان یک گزینه کارآمد مورد بررسی قرامی‌گیرد. در سال ۲۰۱۱ *لی*[۸] و *همکاران*، توانستند به کمک روش جداسازی درجا و جاذب رزین آنیونی با باکتری *آکتینوباسیلیوس سوکسینوژنز*، ۱۴۵/۲ g/L سوکسینیک اسید تولید کنند [۳]. در سال ۲۰۱۴ *کائور*[۹] و *همکاران* از حلال‌های مختلفی از جمله اکتان و اکتانول برای جداسازی ایتاکونیک اسید استفاده کردند و درنهایت حلال اکتانول به عنوان حلال منتخب استفاده شد [۴]. درسال ۲۰۱۷ *لموس* و *همکاران* برای جداسازی اتانول از محیط تخمیر از روغن کرچک و سایر روغن‌های گیاهی استفاده کردند و میزان جداسازی اتانول با روغن کرچک حدود ۱۸ درصد به دست آمد [۵]. درسال ۲۰۰۹ *انوری* و *همکاران* از حلال‌های مختلفی از جمله اولئیل الکل، اکتان و غیره برای جداسازی بوتان‌دی‌ال استفاده کردند و توانستند غلظت محصول را



شکل ۱ - مسیرهای متابولیکی مؤثر برای تولید سوکسینیک اسید در *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* [۳].

PEP: فسفوانول پیرووات، OAA: اگزالواستات، MAL: مالات، FUM: فومارات، ICT: ایزوسیترات، CIT: سیترات، AcCoA: استیل کوآ، GOX:گلیاکسیلات، aceA: ایزوسیتراتلیاز، aceB: مالات سنتاز، pyc: پیرووات کربوکسیلاز، ppc: فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز، pckA: فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز، pyk: پیرووات کیناز، pta: فسفات استیل ترانسفراز، ackA: استات کیناز، gltA: سیترات سنتاز، QOH: مناکینول، ldh: لاکتات دهیدروژناز، mdh: مالات دهیدروژناز، fum: فوماراز، frd: فومارات ردوکتاز، acn: هیدراتاز آکونیتات.

از ۱۷/۶ به ۲۳/۰۱ گرم بر لیتر برسانند [۶]. در سال ۲۰۱۳ *بیونگ سونگ جئون*[۱۰] و *همکاران* با به کارگیری حلال اولئیل‌الکل توانستند هگزانوئیک اسید را از محیط تخمیر استخراج کنند و تولید محصول را از ۶ گرم به ۳۲ گرم افزایش دادند [۷].

با بررسی مسیر بیوشیمیایی تولید سوکسینیک اسید در شکل ۱ مشاهده می‌شود که NADH به عنوان کوفاکتور احیا کننده مصرف می‌شود و تجمع سوکسینات می‌تواند تعادل ردوکس (NAD^+/NADH) را برهم‌زند زیرا با تجمع سوکسینیک اسید، باکتری NADH تولید نمی‌کند در نتیجه NAD^+ تمام می‌شود و بدون NAD^+ باکتری قادر به متابولیزه کردن گلوکز نیست و مصرف گلوکز متوقف می‌شود. همچنین سوکسینیک اسید ممکن است آنزیم‌های کلیدی مانند فسفوفروکتوکیناز[۱۱] و پیرووات کیناز[۱۲] در مسیر گلیکولیز را مهار کند و باعث کاهش جریان گلیکولیز شود لذا لازم است از تجمع سوکسینیک اسید از محیط تخمیر جلوگیری شود تا بدین‌وسیله راندمان افزایش یابد [۸].

(۱) Maleic Anhydride
(۲) Microorganism
(۳) *Mannheimia succiniproducens*
(۴) *Actinobacillus succinogenes*
(۵) *Basfia succiniproducens*
(۶) *Anaerobiospirillum succiniproducens*
(۷) *Corynebacterium glutamicum*
(۸) Li
(۹) Kaur
(۱۰) Byoung eung Jeon
(۱۱) Phosphofructokinase
(۱۲) Pyruvate kinase

با توجه به اهمیت تولید سوکسینیک اسید به عنوان یک ماده اولیه مهم برای تولید محصولات متنوع شیمیایی، تولید اقتصادی و دوست‌دار محیط زیست آن حائز اهمیت است. از جمله مشکلات تولید سوکسینیک اسید مهار تولید و کاهش راندمان با تجمع سوکسینیک اسید در محیط تخمیر بی‌هوازی است. از جمله روش‌هایی که می‌تواند این مشکل را برطرف کند خارج ساختن سوکسینیک اسید از محیط تخمیر و جلوگیری از مهار تولید آن است، بنابراین در این پژوهش استخراج و جداسازی سوکسینیک اسید از محیط تخمیر بی‌هوازی در خلال فرآیند با استفاده از حلال‌های آلی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

سویه مورد استفاده

در این پژوهش، مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد استفاده از منابع معتبر تهیه شدند. باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ATCC 13032 از مرکز کلکسیون ریزاندامگان سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (PTCC) خریداری و به صورت خشک شده به روش انجمادی دریافت شد. برای سنجش قند، از کیت تشخیص گلوکز ساخت شرکت پارس آزمون استفاده گردید. جهت واکاوی سوکسینیک اسید، مواد زیر به‌کار گرفته شد: سدیم سولفات (دکتر مجللی)، سولفوریک اسید (دکتر مجللی)، سوکسینیک اسید (Merck)، استونیتریل با خلوص کروماتوگرافی، آب با خلوص کروماتوگرافی، و متانول با خلوص کروماتوگرافی (همگی از Merck).

برای تهیه محیط کشت MCGC از ترکیبات متعددی شامل بیوتین، سدیم سیترات بدون آب، گلوکز تک‌آبه، اوره، سدیم بیکربنات، بتائین، تیامین هیدروکلرید، کلسیم کلرید دو آبه، سدیم تترا بورات ده‌آبه، آمونیوم مولیبدات چهار آبه، منیزیم سولفات یک‌آبه، مس (II) کلرید دو آبه، روی سولفات هفت‌آبه، فریک (III) کلرید شش‌آبه، فرو (II) سولفات هفت‌آبه، منیزیم سولفات هفت‌آبه، آمونیوم سولفات، و سدیم کلرید استفاده شد که همگی از شرکت Merck تهیه گردیدند، مگر آنکه خلاف آن ذکر شده باشد. همچنین، دی‌سدیم هیدروژن فسفات از شرکت ایبرسکو و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات از Merck تهیه شد.

برای تهیه بانک ریزاندامگان‌ها، از گلیسرول (دکتر مجللی) و محیط کشت BHI[1] (Merck) استفاده شد. همچنین، در فرایند جداسازی، از حلال‌هایی مانند اولئیل الکل (Merck)، روغن کرچک (هنا)، اکتان (دکتر مجللی)، و اکتانول (Merck) بهره گرفته شد.

تجهیزات مورد استفاده شامل مجموعه فیلتراسیون، نمونه بردار ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر، دستگاه سانتریفیوژ و میکروسانتریفیوژ، انکوباتور و شیکر انکوباتور، هود زیستی، اسپکتروفوتومتر، دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا[2]، حمام اولتراسونیک، دستگاه اتوکلاو، pH متر، پمپ خلا، دستگاه تنظیم pH، فریزر ۷۰- درجه سلسیوس است.

منحنی رشد باکتری

برای بررسی و مقایسه شرایط و زیست سازگاری حلال‌ها منحنی رشد ۲۴ ساعته باکتری در ارلن بافل‌دار با دوبار تکرار رسم شد. برای رسم منحنی رشد، ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت هوازی در ارلن بافل‌دار با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر اضافه شد. سپس در شرایط سترون به مقدار دو درصد مایه تلقیح ($۴*۱۰^{۹}$، تعداد سلول به میلی‌لیتر)، به محیط کشت اضافه شد. برای کشت از دستگاه شیکر انکوباتور با ۲۲۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۳ درجه سلسیوس استفاده شد. منحنی رشد باکتری در فاصله زمانی‌های مشخص با نمونه‌برداری و اندازه‌گیری چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر با دوبار تکرار رسم شد [۹].

منحنی مصرف گلوکز

با توجه به اینکه واکاوی سوکسینیک اسید با دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا به دلیل تولید اسیدهای آلی متنوع با زمان بازداری نزدیک به هم با دشواری و خطا روبه‌رو است، لذا با توجه به تجربه به دست آمده از صدها واکاوی و تناسب مصرف گلوکز با تولید سوکسینیک اسید، روند مصرف گلوکز در حین تخمیر مدنظر قرار گرفت [۱۰، ۱۱]. لذا برای به دست آوردن زمان مناسب افزودن حلال به محیط کشت، منحنی مصرف گلوکز توسط باکتری به دست آمد. با توجه به اینکه باکتری در شرایط بی‌هوازی محصول را تولید می‌کند، منحنی مصرف گلوکز در شرایط بی‌هوازی نیز رسم شد. محیط کشت برای حالت بی هوازی، تهیه شد و به میزان ۱۵ درصد از مایه تلقیح ($۴*۱۰^{۹}$ سلول به میلی‌لیتر محیط کشت) به دست آمده از مرحله رشد، به آن اضافه شد. سپس در شرایط سترون به شیشه پنی‌سیلین با حجم ۲۰ میلی‌لیتر منتقل شد، به طوری که فضای خالی بالای ظرف وجود نداشته باشد و با فواصل زمانی مناسب نمونه برداری شده و میزان مصرف گلوکز نمونه‌ها در فواصل زمانی مناسب با استفاده از کیت مخصوص سنجش گلوکز تهیه شده از شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شد. به این صورت که محلول ذخیره ۸ گرم بر لیتر گلوکز تهیه و سپس با روش رقیق سازی غلظت‌های ۰ و ۰/۵ و ۱و۲و۴ گرم برلیتر گلوکز تهیه شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول سنجش گلوکز به ریزلوله‌های خالی اضافه شد. سپس به مقدار یک میکرولیتر از نمونه‌های گلوکز با غلظت مشخص و مجهول، به محلول‌های سنجش گلوکز اضافه شد. ریزلوله‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه قرارداده شدند و سپس با دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج ۵۴۶ نانومتر جذب نمونه‌ها خوانده شد. برای صفر کردن دستگاه از آب مقطر استفاده شد، سپس منحنی استاندارد رسم شد و از معادله به دست آمده برای سنجش میزان گلوکز موجود در نمونه‌های مجهول استفاده شد.

(۱) Brain Heart Infusion

(۲) HPLC

انتخاب حلال و شرایط شبیه‌سازی در نرم‌افزار Aspen Plus

در این پژوهش، به‌منظور انتخاب حلال مناسب جهت استخراج اسید سوکسینیک از فاز آبی، شبیه‌سازی فرآیند با استفاده از نرم‌افزار Aspen Plus و بر پایه‌ی واحد برج استخراج مایع–مایع[۱] انجام شد تا امکان بررسی رفتار جداسازی فازها و راندمان استخراج در شرایط مختلف فراهم گردد. شرایط ورودی فرآیند شامل دمای ۲۵ درجه سلسیوس، فشار عملیاتی یک بار، غلظت اولیه اسید سوکسینیک در فاز آبی برابر با ۲۰ گرم بر لیتر، نسبت حجمی فاز آبی به فاز آلی ۱:۱ و زمان تماس فازها (بر اساس آزمون تجربی تطبیقی) معادل ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. برای انتخاب حلال مناسب، دو گروه از حلال‌ها مورد بررسی قرار گرفتند؛ گروه نخست شامل حلال‌های صنعتی مانند اکتان، دکان، دودکان، هگزادکان، نونان، هپتان، ایزوپروپیل میریستات، اولئیل الکل و اکتانول و گروه دوم شامل حلال‌های گیاهی از قبیل روغن کرچک، روغن آووکادو، روغن کانولا و روغن جوجوبا بودند. از آنجا که برخی حلال‌های گیاهی به‌صورت ترکیب خالص در پایگاه داده نرم‌افزار موجود نبودند، اجزای اصلی سازنده آن‌ها همراه با درصد ترکیبی متناظر به‌طور جداگانه وارد سیستم شدند تا امکان پیش‌بینی دقیق رفتار ترمودینامیکی فراهم شود.

برای شبیه‌سازی رفتار فازی و پیش‌بینی انحلال‌پذیری اسید سوکسینیک در فاز آلی، سه مدل ترمودینامیکی NRTL[۲] برای پیش‌بینی دقیق رفتار مایع–مایع در مخلوط‌های غیرایده‌آل، UNIQUAC-RK[۳] جهت مدل‌سازی سیستم‌های قطبی و چندجزئی، و Peng-Robinson (PR) برای ترکیبات دارای فشار بخار بالا و سیستم‌های هیدروکربنی مورد استفاده قرار گرفتند. پارامترهای برهم‌کنش ویژه هر مدل از پایگاه داده نرم‌افزار استخراج شد و در موارد عدم دسترسی، مقادیر مورد نیاز بر اساس منابع معتبر محاسبه و به سیستم وارد گردید [۲].

اعتبارسنجی نتایج شبیه‌سازی

به منظور بررسی اعتبار مدل‌های شبیه‌سازی شده و صحت داده‌های خروجی نرم‌افزار، آزمایش تجربی جداسازی در شرایط هم‌سان با شبیه‌سازی اجرا گردید. بدین منظور، محلولی از اسید سوکسینیک با غلظت g/L ۲۰ تهیه شده و به‌صورت جداگانه با حلال‌های منتخب از جمله اکتانول، اکتان و روغن کرچک در نسبت حجمی ۱:۱ درون لوله آزمایش در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مخلوط شد. پس از ۱۰ دقیقه اختلاط، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و فاز آبی جهت اندازه‌گیری غلظت باقیمانده اسید سوکسینیک به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق شد [۹]. مقایسه نتایج تجربی با داده‌های شبیه‌سازی، هم‌پوشانی مناسبی نشان داد که اعتبار نتایج نرم‌افزار را تأیید می‌کند.

آزمون سمیت

برای بررسی سمیت حلال‌های منتخب حاصل از شبیه‌سازی بر روی ریزاندامگان‌ها، کشت در حضور و عدم حضور حلال انجام و میزان کدورت محیط کشت اندازه‌گیری شد [۹]. بدین منظور ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت سترون تهیه و مایه تلقیح به میزان دو درصد ($۴*۱۰^{۹}$ ، سلول/میلی‌لیتر محیط کشت) اضافه شد، سپس به ۱۲ ارلن هرکدام ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت سترون حاوی مایه تلقیح اضافه و به هر کدام از ۶ ارلن ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۲۰ درصد از حلال منتخب اضافه شد. آزمایش با دوبار تکرار انجام و میزان کدورت نمونه‌ها بررسی و مقایسه شدند.

بررسی تخمیر و تولید محصول

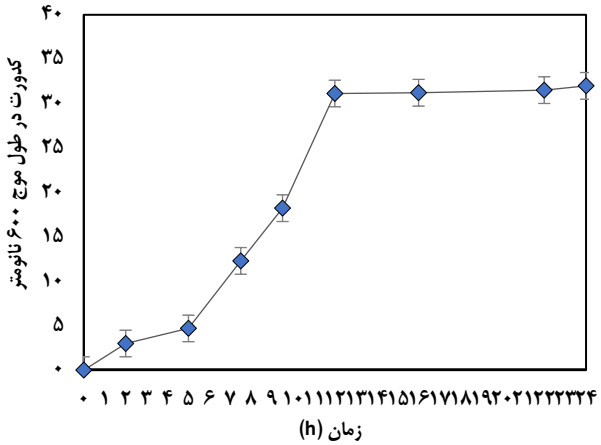
با توجه به مقدار نمونه‌ها، برای بررسی و مقایسه میزان تولید سوکسینیک اسید، میزان مصرف گلوکز محیط تخمیر در حضور و عدم حضور حلال سنجیده شد [۹، ۱۲]. بدین منظور ابتدا روند مصرف گلوکز در شرایط عدم حضور حلال بررسی و زمان توقف تخمیر و مهار مصرف گلوکز به دست آمد. از این طریق زمان مناسب افزودن حلال به دست آمد. سپس حلال در زمان به دست آمده، به محیط تخمیر اضافه شد و بررسی میزان مصرف گلوکز برای نمونه‌ها سنجیده شد. بدین منظور ابتدا به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت سترون حاوی ده درصد مایه تلقیح به ۴ شیشه پنی سیلین منتقل شد. کشت بی‌هوازی به مدت ۴۰ ساعت در انکوباتور با سرعت همزدن ۲۲۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۳ درجه سلسیوس انجام شد و سپس حلال منتخب به میزان ده درصد، به محیط کشت تخمیر اضافه شد. باید توجه داشت شیشه پنی سیلین باید پر باشد تا شرایط بی‌هوازی به درستی رعایت شود، در انتها نیز مصرف گلوکز محیط کشت تخمیر در حضور و عدم حضور حلال بررسی شد. برای سنجش میزان مصرف گلوکز از کیت سنجش گلوکز تهیه شده از شرکت پارس آزمون استفاده شد.

نتایج و بحث

منحنی رشد باکتری

نتیجه‌ی منحنی رشد با کشت باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* در ارلن بافل‌دار با هوادهی و اختلاط مناسب در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطورکه ملاحظه می‌شود باکتری پس از یک فاز تاخیر کوتاه وارد فاز لگاریتمی رشد شده و به فاز سکون با OD حدود 30 رسیده است.

(۱) Liquid-Liquid Extractor
(۲) Non-Random Two Liquid
(۳) *Universal Quasi-Chemical–Redlich-Kwong*



شکل ۲ – نمودار رشد باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*.

شبیه‌سازی نرم افزار اسپن پلاس

نتایج حاصل از انتخاب حلال برای جداسازی سوکسینیک اسید در جدول ۱ آورده شده است، همانطورکه ملاحظه می‌شود روغن‌های گیاهی توانایی جداسازی سوکسینیک اسید را ندارند درصورتی‌که سایر حلال‌ها به خوبی سوکسینیک اسید را از محیط واکنش جدا کردند. نتایج کاوش با نرم‌افزار نشان می‌دهد که اولئیل الکل و اکتانول نسبت به سایر حلال‌های مورد بررسی جداسازی بیشتری دارند.

بررسی صحت نتایج انتخاب حلال‌ها

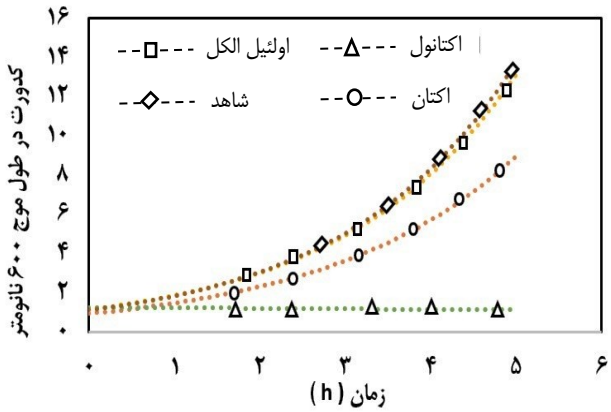
برای بررسی و تایید نتایج شبیه‌سازی، آزمایش‌های مربوطه مطابق آنچه در بخش روش‌ها اشاره شده، انجام گردید. نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان می‌دهد میزان جداسازی سوکسینیک اسید با حلال اکتانول ۸۷ درصد و نزدیک به نتایج حاصل از شبیه‌سازی جدول ۱ به دست آمد بطوری‌که از آن برای جداسازی سوکسینیک اسید می‌توان استفاده نمود. نتایج به دست آمده از به‌کارگیری روغن کرچک برای جداسازی سوکسینیک اسید نتیجه‌ای در برنداشت. در سال ۲۰۱۷ *لموس و همکاران* در پژوهشی برای جداسازی اتانول از محیط کشت تخمیر از روغن کرچک استفاده کردند. میزان جداسازی اتانول با این روغن نسبت به سوکسینیک اسید بیشتر بود. بدیهی است که بالاتر بودن میزان قطبیت سوکسینیک اسید درمقایسه با اتانول باعث عدم حلالیت سوکسینیک اسید در روغن کرچک در مقایسه با اتانول شده است [۵].

آزمون سمیت

میزان رشد باکتری در حضور حلال‌های مختلف در شکل ۳ با اندازه‌گیری چگالی نوری نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، برای حلال اولئیل الکل، باکتری به خوبی در حضور ۱۰ درصد حجمی حلال رشد کرده و چگالی نوری محیط کشت تخمیر شده در حضور حلال به نمونه شاهد نزدیک است.

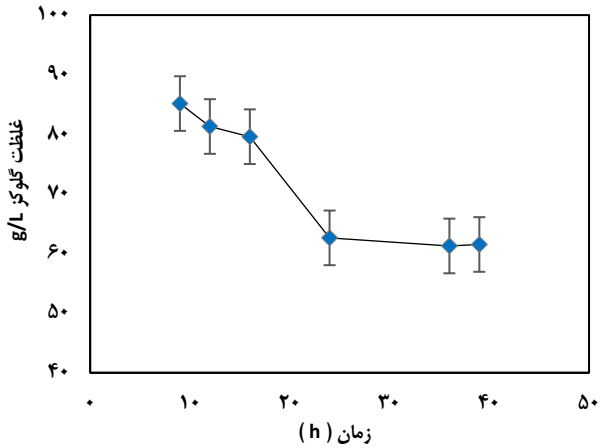
جدول ۱ – انتخاب حلال با استفاده از نرم افزار اسپن پلاس و نتیجه جداسازی در مواد مختلف.

نام حلال	درصد جداسازی
روغن کرچک	۵
روغن جوجوبا	۰
روغن کانولا	۰
روغن آووکادو	۰
ایزوپروپیل میریستات	۰
اولئیل الکل	۹۸
اکتانول	۹۳/۴
دکان	۸۴/۵
دودکان	۸۷/۵
هگزادکان	۸۲/۷
اکتان	۸۸
هپتان	۸۸



شکل ۳ – مقایسه‌ی زیست‌سازگاری باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* در حضور حلال‌های اولئیل الکل، اکتان و اکتانول.

در نتیجه با توجه به سمیت کم حلال برای جداسازی درجای سوکسینیک اسید از محیط تخمیر از این حلال استفاده شد. همان‌طورکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود ترتیب سمیت از زیاد به کم شامل اکتانول، اکتان و اولئیل الکل است. این تفاوت سمیت مربوط به تفاوت ساختار شیمیایی سه حلال است. به دلیل اشباع بودن و طول زنجیره کربنی کمتر و ساختار خطی، منجر به حمله ریزاندامگان‌ها به حلال برای مصرف آنها می‌شود [۳]. همچنین بالاتر بودن وزن مولکولی حلال اولئیل الکل در مقایسه با دو حلال دیگر موثر است. بالا بودن وزن مولکولی بر زیست‌سازگاری آن تاثیرگذار است [۱۳]. علاوه بر این ممکن است مولکول‌های کوچک جذب غشای باکتری شود و در نتیجه منجر به از بین رفتن باکتری گردد [۱۴]. همچنین مناسب‌ترین مقدار حلال اولئیل الکل و اکتان ۱۰ درصد به دست آمد. زیرا هرچه مقدار حلال در محیط بیشتر باشد به معنی تماس بیشتر با باکتری است و غلظت بالای آن سبب آسیب رساندن به غشای سلول و از بین رفتن باکتری شود.



شکل ۴ - روند مصرف گلوکز توسط باکتری در مرحله کشت بی‌هوازی بدون حضور حلال

تخمیر و تولید محصول

روند مصرف گلوکز توسط باکتری در مرحله‌ی کشت بی‌هوازی بدون حضور حلال در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج آزمایش از حدود ساعت ۲۴ ام مصرف گلوکز مهار شده است. بنابراین زمان مناسب افزودن حلال در ساعت ۲۴ ام پیشنهاد شد.

تولید محصول در حضور حلال‌ها

تخمیر بی‌هوازی باکتری در حضور حلال‌ها انجام و میزان مصرف گلوکز بررسی شد. طبق جدول ۲ ملاحظه می‌شود که مصرف گلوکز در محیط تخمیر با حلال اولئیل الکل بیشتر است. تخمیر در حضور حلال‌های اکتان و اکتانول در مقایسه با اولئیل الکل مصرف کمتر گلوکز را نشان می‌دهد. این کاهش مصرف گلوکز به معنای کاهش فعالیت باکتری برای تولید سوکسینیک اسید است. لذا استفاده از حلال‌های اکتان و اکتانول برای جداسازی درجای سوکسینیک اسید در مقایسه با اولئیل الکل در اولویت نیست. با توجه به زیست‌سازگاری بالای حلال اولئیل الکل و توانایی آن در جداسازی سوکسینیک اسید از محیط کشت تخمیر، این حلال برای استخراج سوکسینیک اسید از محیط کشت تخمیر انتخاب شد. این امر باعث برداشتن مهار مصرف گلوکز توسط باکتری شده و درنتیجه افزایش تولید محصول می‌شود.

با توجه به مسیرمتابولیکی تولید سوکسینیک اسید بازده تئوری تولید سوکسینیک اسید ۱٫۷۱ مول به مول گلوکز یا ۰٫۱۹ گرم به گرم گلوکز است. اما موارد مختلف از جمله تولید محصولات جانبی همچون استیک اسید، فرمیک اسید و لاکتیک اسید باعث کاهش بازده تئوری می‌شود.

$$7C_6H_{12}O_6 + 6CO_2 \rightarrow 12C_4H_6O_4 + 6H_2O \qquad (۱)$$

جدول ۲ - مقدار گلوکز باقی مانده در شرایط تخمیر برای حلال‌ها.

مقدار گلوکز باقی‌مانده در کشت بدون حلال (گرم بر لیتر)	مقدار گلوکز باقی‌مانده در کشت با حضور حلال (گرم بر لیتر)
۶۲/۵۲	۸۵/۶۶ (اوکتانول)
۶۱/۱۳	۸۰/۲۳ (اوکتان)
۶۲/۶۳	۵۴/۲۳ (اولئیل الکل)

سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* قادر به تولید سوکسینیک اسید با بازده ۰٫۲۹ مول بر مول گلوکز گزارش شده است. با توجه به پژوهش‌های قبلی و با علم به اینکه در فرایند تخمیر بی‌هوازی تولید سوکسینیک اسید، سایر اسیدهای آلی نیز تولید می‌شوند امکان اندازه‌گیری دقیق سوکسینیک اسید با روش HPLC وجود ندارد. بنابراین از روش LC-MS[۱] برای نتایج نهایی استفاده شد. نتایج LC-MS به‌طور دقیق میزان سوکسینیک اسید را در حضور سایر اسیدهای آلی نشان می‌دهد [۹، ۱۲].

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد استفاده از روش جداسازی درجا و با به‌کارگیری حلال‌های مناسب، موجب افزایش و بهبود راندمان تولید سوکسینیک اسید می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده از نرم‌افزار اسپن پلاس امکان پیش‌بینی میزان جداسازی سوکسینیک اسید از محیط کشت با حلال‌های مختلف وجود دارد. سمیت حلال‌های مختلف منتخب با نرم‌افزار در حضور *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* مورد آزمایش قرار گرفت و با توجه به زیست سازگاری نتایج جداسازی سوکسینیک اسید، حلال اولئیل الکل به عنوان بهترین حلال انتخاب شد. این حلال علاوه بر سازگاری بالا، دارای حلالیت مناسب برای سوکسینیک اسید است. طبق داده‌ها و نتایج، میزان زیست‌سازگاری حلال‌ها از بیشترین مقدار به ترتیب اولئیل الکل، اکتان و در نهایت اکتانول بود. با توجه به نتایج، مناسب‌ترین حلال اولئیل الکل انتخاب شد و بیشترین میزان جداسازی در ۱۰٪ (حجمی/حجمی) حلال به دست آمد و راندمان تخمیر حدود ۱۵ درصد افزایش یافت. همچنین با توجه به اختلاف نقطه جوش اولئیل الکل و سوکسینیک اسید این حلال قابلیت بازیابی از روش تقطیر را دارد و می‌توان آن را برای استفاده مجدد بازیابی نمود. برای استفاده در مقیاس صنعتی نیاز به بررسی بیشتر دارد. این پژوهش نشان داد با به کارگیری روش استخراج درجای سوکسینیک اسید در محیط تخمیر و با به کارگیری حلال‌های مناسب همانند اولئیل الکل که در این پژوهش معرفی شد، می‌توان راندمان تولید سوکسینیک اسید از محیط تخمیر ارتقا داد. با توجه به ماهیت زیست‌پایدار و دوستدار محیط‌زیستِ فرایند تولید زیستی سوکسینیک اسید، این رویکرد از چشم‌انداز مطلوبی برخوردار است. با این حال، برای توسعه و پیاده‌سازی در مقیاس صنعتی،

(۱) Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

انجام بررسی‌های جامع‌تر فنی، اقتصادی و عملیاتی ضرورت دارد. افزون بر این، قابلیت استفاده از روش استخراج درجا از محیط تخمیر، که می‌تواند منجر به افزایش راندمان تولید گردد، افق‌های نویدبخشی را از نظر فنی و اقتصادی برای این فرایند ترسیم می‌کند.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه تربیت مدرس و ستاد توسعه و زیست فناوری معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری به دلیل حمایت مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

مراجع

[1] Escaniano I.A., Ladero M., Santos V.E., On the Succinic Acid Production from Xylose by Growing and Resting Cells of *Actinobacillus succinogenes*., *A Comparison, Biomass Convers Biorefin*, **14(5)**: 6533-6546 (2024).

[2] Law J.Y., Mohammad A.W., Osmotic Concentration of Succinic Acid by Forward Osmosis: Influence of Feed Solution pH and Evaluation of Seawater as Draw Solution, *Chin. J. Chem. Eng.*, **26(5)**: 976-983 (2018).

[3] Li Q., Wang D., Hu G., Xing J., Su Z., Integrated Bioprocess for High-Efficiency Production of Succinic Acid in an Expanded-Bed Adsorption System, *Biochem. Eng. J.*, **56(3)**: 150-157 (2011).

[4] Kaur G., Elst K., Development of Reactive Extraction Systems for Itaconic Acid: A Step Towards In Situ Product Recovery for Itaconic Acid Fermentation, *RSC Adv.*, **4(85)**: 45029-45039 (2014).

[5] Lemos D.A., Sonego J.L.S., Boschiero M.V., Araujo E.C.C., Cruz A.J.G., Badino A.C., Selection and Application of Nontoxic Solvents in Extractive Ethanol Fermentation, *Biochem. Eng. J.*, **127**: 128-135 (2017).

[6] Anvari M., Khayati G., In Situ Recovery of 2,3-Butanediol from Fermentation by Liquid–Liquid Extraction, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*., **36(2)**: 313-317 (2009).

[7] Jeon B.S., Moon C., Kim B.C., Kim H., Um Y., Sang B.I., In Situ Extractive Fermentation for the Production of Hexanoic Acid from Galactitol by *Clostridium sp. BS-1*, *Enzyme Microb. Technol*., **53(3)**: 143-151 (2013).

[8] Inui M., Murakami S., Okino S., Kawaguchi H., Vertès A.A., Yukawa H., Metabolic Analysis of *Corynebacterium Glutamicum* During Lactate and Succinate Productions Under Oxygen Deprivation Conditions, *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, **7(4)**: 182-196 (2004).

[۹] میلاد مهریار، سید عباس شجاع الساداتی.، "شناخت مسیرهای گلوگاهی در باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم به منظور بهبود تولید زیستی سوکسینیک اسید با رویکرد زیست شناسی سامانه‌ها" پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس (۱۴۰۲).

[10] Litsanov B., Brocker M., Bott M., Toward Homosuccinate Fermentation: Metabolic Engineering of *Corynebacterium Glutamicum* for Anaerobic Production of Succinate from Glucose and Formate, *Applied and environmental microbiology.*, **78(9)**: 3325-3337 (2012).

[11] Zhu N., Xia H., Yang J., Zhao X., Chen T., Improved Succinate Production in *Corynebacterium Glutamicum* by Engineering Glyoxylate Pathway and Succinate Export System, *Biotechnology letters*, **36**: 553-560 (2014).

[۱۲] نگین گودرزی، سیدعباس شجاع الساداتی، " افزایش بازدهی تولید سوکسینیک اسید در تخمیر دو مرحله‌ای باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*" پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس (۱۴۰۲).

[13] serrano-Carreón L., Balderas-Ruíz K., Galindo E., Rito-Palomares M., Production and Biotransformation of 6-Pentyl-α-Pyrone by *Trichoderma Harzianum* in Two-Phase Culture Systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**: 170-174 (2002).

[14] Kurzrock T., Weuster-Botz D., Recovery of Succinic Acid from Fermentation Broth, *Biotechnol. Lett.,* **32**: 331-339 (2010).