



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی
سلولی و مولکولی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

آزمایشگاه میکروب شناسی صنعتی (بیوتکنولوژی میکروبی)

روش جداسازی باکتری های مولد اسید استیک
و تولید سرکه با استفاده از ملاس الکلی

دکتر سهیلا عباسی

دکتر سهیلا عباسی

مقدمه



قدمت تولید **سرکه** به ۴۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح می‌رسد. رومی‌ها و یونانیان، از سرکه رقیق شده به عنوان یک نوشیدنی نشاط آور استفاده می‌کردند و با قرار دادن شراب در معرض هوا، سرکه می‌ساختند. تا قرون وسطی، سرکه فقط برای مصارف محلی و منطقه‌ای تولید می‌شد.



این ماده محصول تبدیل **اتانول به اسید استیک** توسط باکتری‌های خانواده **استوباکتریاسه** می‌باشد. نام سرکه از کلمه‌ی **vinaigre** به معنی شراب ترش گرفته شده است. و امروزه انواع مختلفی از آن در سراسر دنیا تولید می‌شود، مثلاً سرکه‌ی مالت در بریتانیا، سرکه‌ی انگور در فرانسه و سرکه‌ی برنج در ژاپن.



سرکه به عنوان یک ماده‌ی غذایی بسیار مفید دارای خواص متعددی است که به عنوان **طعم دهنده** در سالادها و دیگر غذاها به کار می‌رود. همچنین در صنایع و محصولات غذایی، **مانع رشد میکروفلورها** نظیر مخمرها، قارچ‌ها و لاکتوباسیل‌ها و غیره می‌شود و برای **نگهداری** طولانی مدت بعضی مواد غذایی نیز مورد استفاده است.

مقدمه

اسید استیک ترکیب مهمی در سنتز بسیاری از مواد شیمیایی نظیر سلولز استات و است. بدین ترتیب تولید جهانی آن در سال بسیار بالا بوده و از اهمیت بسزایی برخوردار است. کشور برزیل بزرگترین تولید کننده اسید استیک از راه تخمیر است. در این کشور به علت منابع سرشار نیشکر، سالانه میلیون‌ها لیتر اتانول تولید می‌شود که بخشی از آن برای تولید اسید استیک به هدف می‌رسد.

سرکه تقریباً در هر ماده‌ی قابل **تخمیر الکلی** یا از هر ماده‌ی اولیه که حاوی **اتانول** باشد تهیه می‌شود ولی مواد اولیه‌ی معمول مورد نظر شیرهای بعضی **میوه‌جات** از قبیل سیب، انگور و همچنین عصاره مالت به عنوان ماده اولیه و یا آبجو، شراب، آب سیب الکلی، آب پنیر تخمیر شده و غیره می‌باشند. تولید سرکه در هر مرحله و هر کدام به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌های خاصی صورت می‌گیرد. در مرحله‌ی اول قند قابل تخمیر، محتوی ماده‌ی اولیه، به وسیله‌ی مخمر تحت شرایط **بی هوازی** به الکل تبدیل می‌شود. در مرحله‌ی دوم الکل تولید شده در ضمن فعل و انفعالات قبلی، تحت تأثیر باکتری‌هایی از **جنس استوباکتر** در شرایط **هوازی** به وسیله‌ی عمل اکسیداسیون تبدیل به اسید استیک و آب می‌شود.

میکروارگانیزم های تولید کننده

تولید اسید استیک توسط تعداد زیادی از باکتری های **تخمیر کننده** تولید می شود، اما فقط اعضای گروه خاصی از باکتری ها یعنی **باکتری های مولد اسید استیک** در تولید تجاری مورد استفاده قرار می گیرند. باکتری های مولد اسید استیک را می توان به دو جنس **گلوکونوباکتر** و **استوباکتر** تقسیم کرد. هر دوی این جنس ها، باکتری های گرم منفی، بدون اسپور و هوازی اجباری هستند.

استوباکترها، بیضی و میله ای، راست یا کمی خمیده دارای $0.8 - 0.6$ میکرون ضخامت و $2 - 1$ میکرون طول و دارای آرایش تک یا جفت و یا زنجیره ای هستند. در انواع **متحرک**، تاژک های پیرامونی دارند. کلنی های رنگ روشن ایجاد می کنند.

اتانول را ابتدا به اسید استیک و سپس در مراحل بعدی به H_2O و CO_2 می نمایند و **تحمل کننده اسید** هستند.

میکروارگانیزم های تولید کننده

بهترین منبع کربن برای رشد آن‌ها، اتانول، گلیسرول و لاکتات است. دمای بهینه رشد آن‌ها ۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد و $pH = ۴/۵ - ۳/۶$ می‌باشد. در سطح گل‌ها، شهد گل‌ها، میوه‌ها، در عسل و سطح پیکره زنبورهای عسل، انواعی از شراب‌ها و آبجو، شیر، نیشکر، خاک باغچه و آب جوی با تراکم‌های متفاوت یافت می‌شوند.

گونه‌هایی که کاربرد تجارتي دارند. بیشتر از همه گونه *A. aceti* بوده و در عین حال از *A. pasteurianus* و *A. peroxidans* نیز استفاده می‌شود.

اعضای جنس **گلوکونوباکتر**، از نظر اندازه با استوباکترها تقریباً یکسان هستند. آرایش تک یا زوج دارند ولی به ندرت به شکل زنجیره‌ای دیده می‌شوند. سویه‌های متحرک ۳ تا ۸ تاژک قطبی دارند. دمای رشد ۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد و در ۳۷ درجه سانتیگراد رشد نمی‌کنند و $pH = ۶/۵ - ۶$ می‌باشد. اتانول را به اسید استیک اکسید می‌کنند اما قادر به اکسایش استات و لاکتات به دی‌اکسید کربن و آب نیستند. این باکتری‌ها نیز در میوه، عسل، گل‌ها، برخی از انواع آبجو، شراب و نوشیدنیهای غیرالکلی یافت می‌شوند.

روش‌های تولید سرکه

روش صنعتی ✓

روش غیر صنعتی ✓

در مدل **غیر صنعتی** که تقریباً در هر کشوری به نحو خاصی انجام می‌گیرد، راندمان از اهمیت بالایی برخوردار نیست و از این رو این روش‌ها کم‌کم به دست فراموشی سپرده می‌شوند.

اما در روش‌های **صنعتی** تلاش بر این است که روز به روز راندمان تولید سرکه بیشتر شود تا با حداقل زمان و انرژی مصرفی بیشترین محصول به دست آید.

روش‌های صنعتی شامل چندین تکنیک است از جمله:

روش فرانسوی یا فرایند کند یا فرایند Orlean ✓

روش آلمانی یا روش فرایند تند و فرایند Fring یا کشت غوطه‌ور. ✓

مواد و وسایل لازم جهت انجام آزمایش



- سرکه خانگی
- لوله‌ی آزمایش
- لام
- سانتزیفیوژ
- محلول‌های رنگ آمیزی گرم
- محیط وورت آگار
- میله‌ی شیشه‌ای سرکج
- ارلن‌های حاوی ملاس با بریکس ۱۸
- مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر روی PDA
- لوله‌ی درپیچ دار استریل
- فویل آلومینیوم
- لوپ
- ارلن حاوی ملاس با بریکس ۱۵
- ارلن خالی ۲۵۰ میلی لیتری استریل
- کاغذ pH
- پی‌پت استریل
- اسید سولفوریک



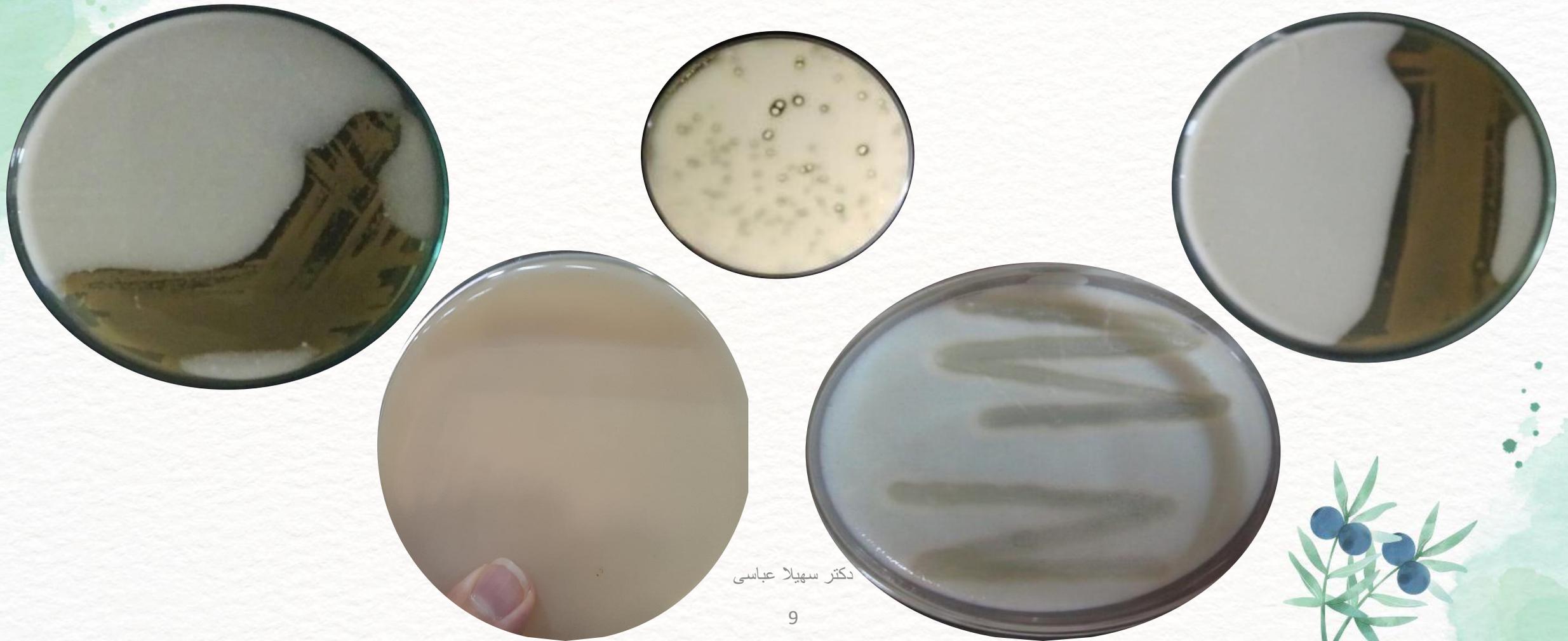
روش کار آزمایش

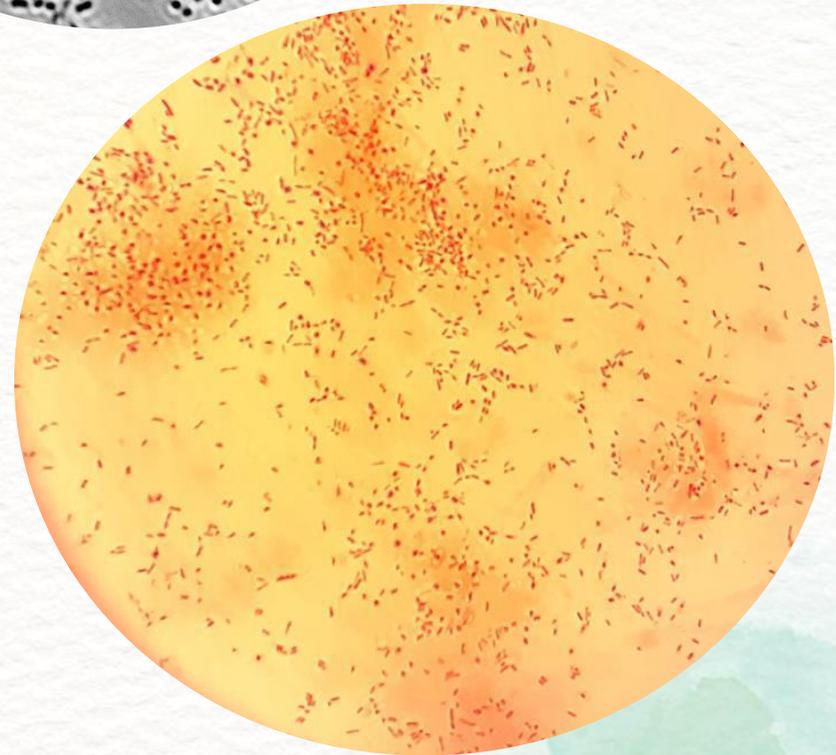
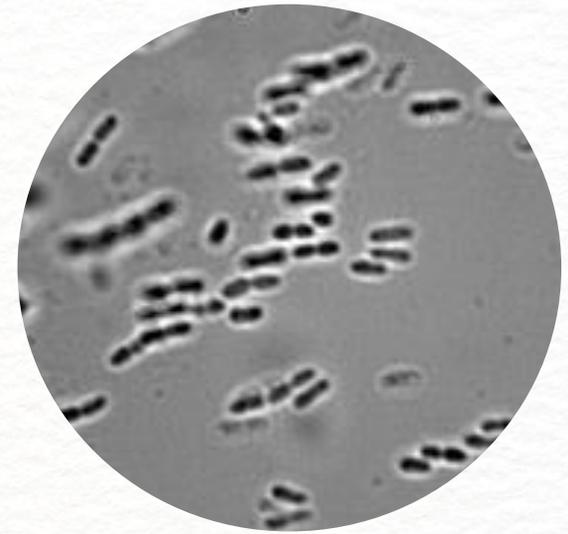
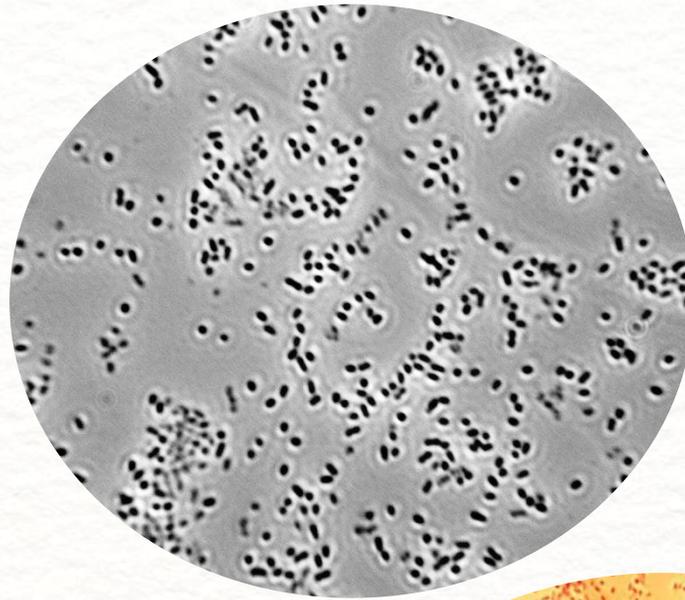
جداسازی و خالص سازی باکتری‌های مولد اسید استیک:



- سرکه خانگی را در لوله آزمایش کوتاه ریخته و ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم.
- مایع رویی را به آرامی دور ریخته و از ته نشین آن لام گرفته و رنگ آمیزی گرم کرده و مرفولوژی و واکنش گرم ارگانسیم های موجود در آن را بررسی کنید.
- در صورت مشاهده باکتری‌های میله‌ای یا کوکوباسیل گرم منفی، ۱- ۵/۰ سی سی از ته نشین فوق را روی محیط وورت آگار (حاوی ۲۰٪ کربنات کلسیم) ریخته و با میله‌ی شیشه‌ای سرکج پخش کنید.
- پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد اتووگذاری شود.
- بعد از این مدت، پلیت‌ها خارج شود و بعد از اطمینان از خلوص اقدام به خالص‌سازی استوباکترها بر روی محیط وورت آگار جدید، به منظور استفاده در مرحله‌ی بعد نمایید.

محیط وورت آگار کربنات کلسیم دارد و سفید رنگ است. اگر استوباکتر داشته باشیم، کربنات کلسیم را تجزیه کرده و رسوب سفید رنگ از بین می‌رود و در اطراف کلنی‌ها شفاف می‌گردد. همچنین گاز تولید می‌شود که روی محیط کشت، شکاف ایجاد می‌گردد.





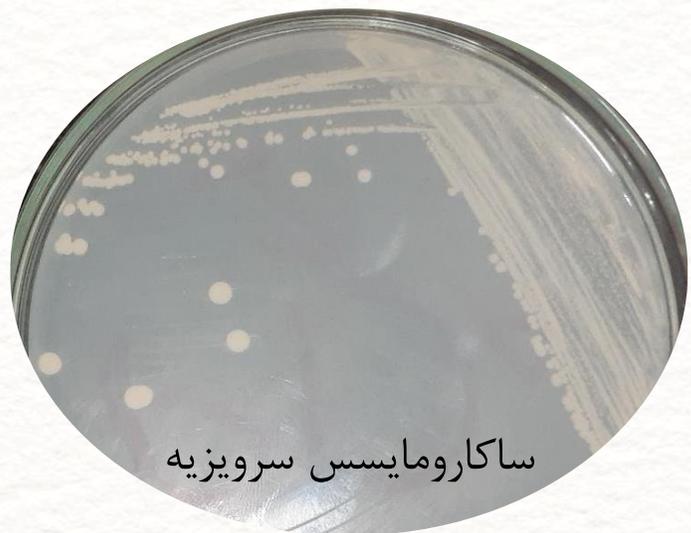
دکتر سهیلا عباسی

تولید میکروبی الکل اتیلیک جهت تولید میکروبی اسید استیک (مرحله‌ی هوازی و بی‌هوازی):

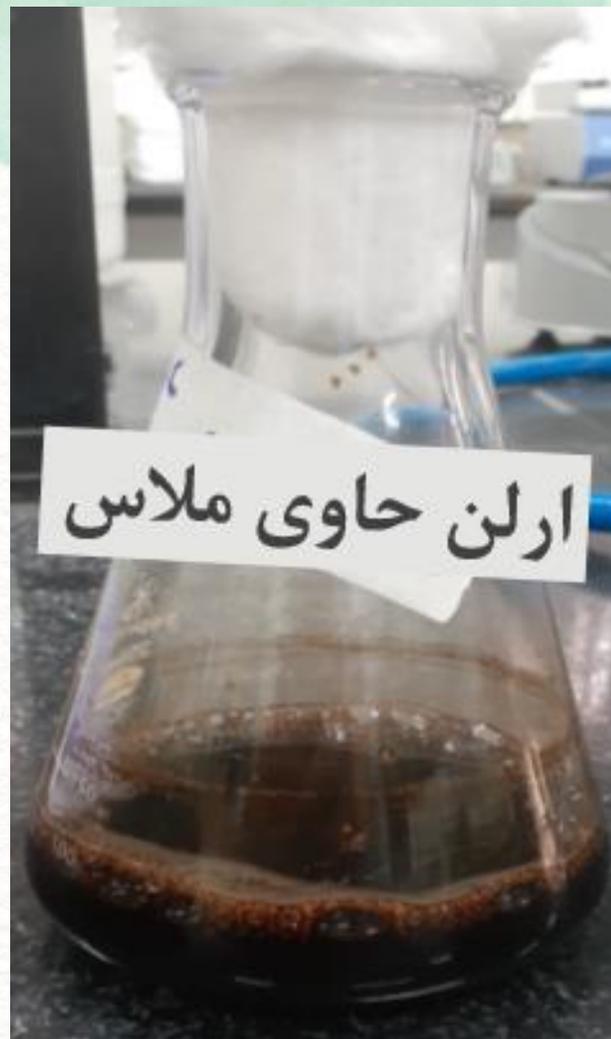


- مخمر ساکارومایسس سرویزیه را به ارلن حاوی ملاس با بریکس ۱۸ تلقیح می‌کنیم.
- پس از سه‌روز هوادهی با شیکر در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد محتویات ارلن را با ارلن ثانویه با بریکس ۱۵ منتقل می‌کنیم.
- مجدداً بر روی شیکر در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ روز قرار می‌دهیم. (مرحله‌ی هوازی).
- سپس محتویات ارلن ثانویه را به لوله‌ی بی‌هوازی منتقل می‌کنیم.
- برای آلوده نشدن محیط روی لوله را با پارافیلیم می‌پوشانیم تا شرایط بی‌هوازی ایجاد گردد.
- روی آن را هم با فویل آلومینیومی می‌پوشانیم و سپس به مدت ۲ روز در انکوباتور می‌گذاریم تا الکل تولید گردد. (مرحله‌ی بی‌هوازی)





ساکارومايسس سرويزيه

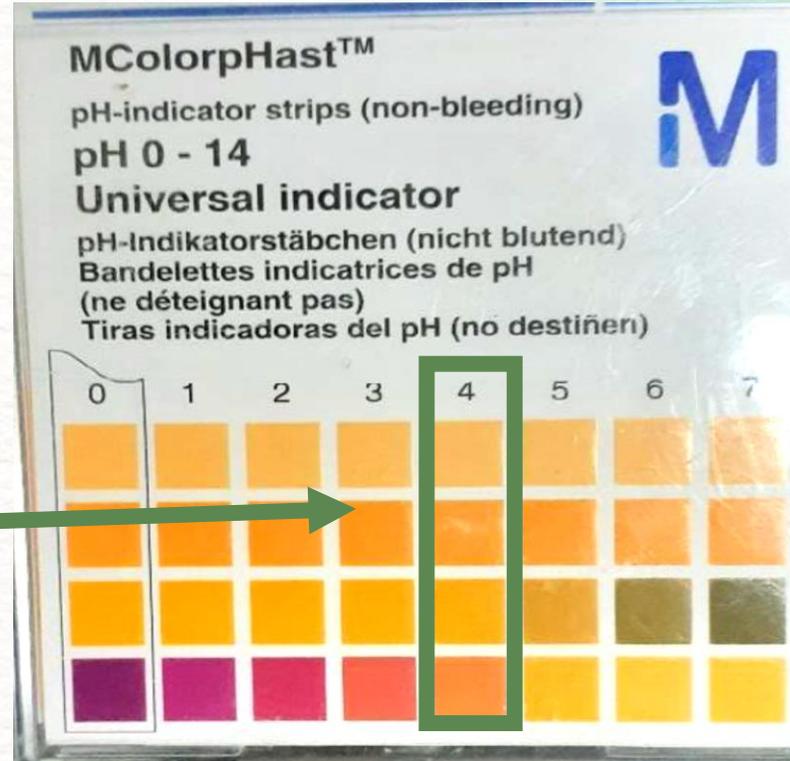


ارلن حاوی ملاس

تولید میکروبی اسید استیک (مرحله‌ی تولید اسید):



- محتویات درون لوله بی‌هوازی حاوی ملاس، مخمر و الکل تولیدی را در کنار شعله به درون یک ارلن ۲۵۰ سی سی خالی استریل منتقل می‌کنیم. چون هدف تولید اسید استیک است.
- بعد از تولید الکل به وجود مخمر فوق نیاز نیست و چون قسمت اعظم مخمر به واسطه وجود شرایط بی‌هوازی در ته لوله است، هنگام انتقال باید دقت کنیم ته نشین لوله وارد ارلن نشود.
- بعد از انتقال pH اولیه محیط کشت فوق را اندازه‌گیری می‌کنیم. بدین منظور با پیپت استریل ۱ قطره از محتویات ارلن را برداشته و بر روی کاغذ pH می‌گذاریم و با رنگ‌های استاندارد pH را تعیین می‌کنیم.
- سپس اقدام به تلقیح باکتری استوباکتر خالص سازی شده به درون ارلن می‌نماییم.
- ارلن‌های تلقیح شده را به مدت یک هفته بر روی شیکر در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم. (۱۲۰ - ۱۱۰ دور در دقیقه)
- بعد از یک هفته با اندازه‌گیری pH و طی آزمایش ویژه تولید اسید بررسی می‌کنیم.

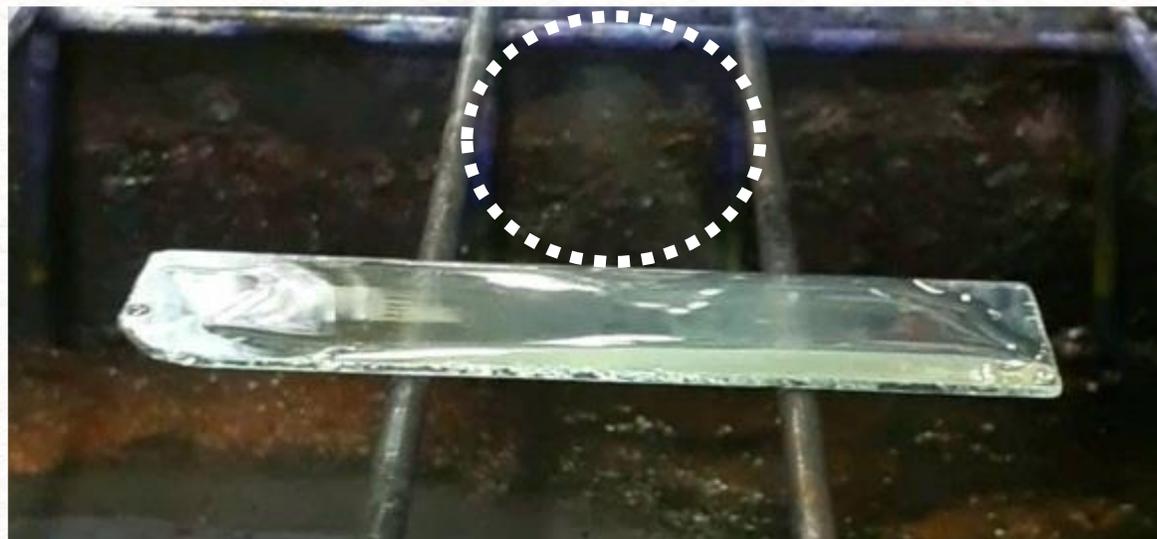


دکتر سهیلا عباسی

روش شناسایی اسید استیک:



- برای شناسایی اسید استیک ابتدا **pH** محتویات ارلن را اندازه می‌کنیم.
- سپس یک قطره از محتویات این ارلن را بر روی **لام** قرار می‌دهیم.
- یک قطره **اسید سولفوریک** روی آن می‌ریزیم، اگر در نمونه اسید استیک داشته باشیم با اسید سولفوریک واکنش داده و تولید **دود** می‌کند.





با تشکر از توجه شما
با آرزوی سلامتی و موفقیت

دکتر سهیلا عباسی