

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

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 گلوکونات سدیم در دمای زیاد با استفاده از باکتری استیک اسید مقاوم به گرما (استوباکتر سنگالنسیس)

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

چکیده

مقدمه: امروزه، گلوکونیک اسید و مشتقات آن کاربرد وسیعی در صنایع غذایی دارند؛ با این حال، هنوز پژوهش‌های وسیعی برای بهینه‌سازی تولید این اسید با استفاده از روش‌های تخمیری در حال 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 گلوکونات سدیم بررسی شدند؛ سپس تأثیر اسیدیته بر ترکیب جمعیت سلول‌های فاز نمایی و سکون و تولید محصولات جانبی به ترتیب 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 زیر جمعیت از نظر فعالیت دهیدروژنازها به وجود می‌آیند. اسیدیته محیط کشت تأثیر بسیار زیادی در درصد زیر جمعیت‌های فعال و غیرفعال سلول‌ها طی فاز تولید گلوکونیک اسید در فاز سکون دارد؛ به طوری که در اسیدیته کمتر، میزان زیر جمعیت دارای دهیدروژنازهای غیرفعال به طور معناداری تا ۶۱ درصد کل جمعیت سلول‌ها افزایش یافت؛ همچنین میزان ناخالصی‌های تولید شده به اسیدیته تخمیر وابسته است؛ به طوری که میزان مشتقات کتون گلوکونیک اسید در اسیدیته ۴/۵ بیش از ۶ برابر افزایش یافت؛ بنابراین، اسیدیته‌های ۵ و ۵/۵ بهترین اسیدیته برای استوباکتر سنگالنسیس به منظور تخمیر ۹۵ گرم گلوکز در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: استوباکتر سنگالنسیس می‌تواند به عنوان باکتری بالقوه برای تولید گلوکونات سدیم در دمای زیاد استفاده شود؛ با وجود این، واگرایی جمعیت سلولی طی تخمیر موجب کاهش تعداد سلول‌های فعال تولیدکننده محصول و در نتیجه، 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: کتو گلوکونیک اسید، تخمیر، دهیدروژناز، فلوسیتومتری

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

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 غیرفعال شدن کاتالیست، تولید گلوکونیک‌اسید از طریق روش‌های شیمیایی را با مشکل روبه‌رو کرده است (۱۰)؛ به‌همین علت، 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 دیواره سلولی خود آنزیم گلوکز اکسیداز دارند و به‌شدت هوازیند (۱۱). ایجاد حالت میسلومی و درنهایت، افزایش ویسکوزیته محیط کشت و جلوگیری از هوادهی و هموژنیزه کردن محیط مشکل عمده قارچ‌های رشته‌ای مانند *آسپرژیلوس نایجر*^۱ است؛ برای حل مشکل یادشده می‌توان از اسپوره‌های این قارچ در شرایط غیرجوانه‌زنی و حتی تثبیت این اسپورها استفاده کرد (۱۲). باکتری‌های استیک‌اسید، گونه‌های *استوباکتر*^۲ و *گلوکونوباکتر*^۳ نیز گلوکونیک‌اسید را به‌عنوان محصولی فرعی در مسیرهای تجزیه‌ای خود تولید می‌کنند. *گلوکونوباکتر اکسیدانس*^۴ 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 خارج شدن اسیدهای قندی از دسترس سایر باکتری‌ها در محیط کشت منجر می‌شود و درنهایت، *گلوکونوباکتر* بدون رقابت به رشد خود در محیط کشت ادامه می‌دهد (۱۳). باوجود مطالب یادشده،

مشتقات قندها به‌ویژه مشتقات اسیدی یکی از پرمصرف‌ترین ترکیبات در صنایع مختلف محسوب می‌شوند. گلوکونیک‌اسید در بین قندهای یادشده اهمیت ویژه‌ای دارد و در نتیجه 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 از جمله گلوکونو-δ-لاکتون و گلوکونات سدیم را به‌عنوان افزودنی‌های مجاز مواد غذایی تأیید کرد (۱) و از این‌رو، نمک‌های این قند مصارف گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی یافتند (۳). تجزیه ۹۸ درصدی گلوکونیک‌اسید طی دو روز و به‌طور طبیعی مهم‌ترین مزیت این ترکیب از جنبه زیست‌محیطی است. مشتقات گلوکونیک‌اسید از جمله نمک سدیم و کلسیم آن در صنایع غذایی و دارویی، نساجی، تصفیه 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 محصولات محصولاتی مانند لاکتات تولید می‌کنند. محصولات یادشده اسیدیته محیط را کاهش می‌دهند و می‌توانند با اتصال و جذب شدن به موکوس برای سلول‌های اپی تلیال انرژی فراهم کنند (۶ و ۷). یکی از مباحث مهم در غنی‌سازی مواد غذایی، در دسترس قرار گرفتن مواد معدنی آن است؛ از این‌رو، گلوکونات آهن و گلوکونات کلسیم که هر دو تأییدیه FDA و اتحادیه اروپا را دارند، برای غنی‌سازی مواد غذایی استفاده می‌شوند (۸).

استوباکتر برای تولید گلوکونات سدیم کمتر انجام شده است. با توجه به مطالعه‌های پیشین نویسنده (۱۵)، بهینه‌سازی شرایط کشت ناپیوسته باکتری استوباکتر سنگالنسیس به منظور تولید گلوکونات سدیم 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

ریز موجود مورد استفاده و روش کشت: در پژوهش حاضر از استوباکتر سنگالنسیس استفاده شد که نخستین بار از ترکیبات در حال تخمیر در کشور سنگال جداسازی شده است (۱۶). این باکتری در ویال‌های میکروبانک شرکت پرولب^۷ در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و برای کشت آن در محیط جامد و تهیه مایه تلقیح از محیط GYEA^۸ استفاده شد. این محیط حاوی ترکیبات زیر است: ۲۰ گرم درلیتر گلوکز، ۵۰ گرم درلیتر اتانول، ۵ گرم درلیتر استیک اسید، ۵ گرم درلیتر عصاره مخمر، ۵ گرم درلیتر پپتون کازین و ۱۵ گرم درلیتر آگار. در مواردی که به کشت مایع نیاز بود، آگار از ترکیب محیط کشت حذف شد. پس از کشت باکتری روی پلیت حاوی محیط GYEA، پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط هوازی گرماگذاری شدند. از کلنی‌های خالص برای تلقیح به محیط مایع استفاده شد.

تهیه مایه تلقیح: در پژوهش حاضر، مایه تلقیح به منظور تولید سوسپانسون باکتری (زیست‌توده) لازم برای تلقیح به بیوراکتور استفاده شد. محیط کشت مایع

از بین رفتن جمعیت سلولی و تخریب سلول‌ها به ویژه در موارد تنش (دمای زیاد، اسیدیته 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). با وجود این، معمولاً روش‌های ارائه شده به علت 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 درجه سانتی‌گراد رشد و محصول تولید می‌کنند، ضمن کاهش هزینه سرمایه‌های بیوراکتورها سبب کاهش امکان آلودگی با ریزموجودات مزوفیل و در اغلب موارد موجب افزایش سرعت رشد و تولید می‌شود (۱۵). استوباکتر سنگالنسیس^۹ باکتری مقاوم به گرماییست که در سال ۲۰۰۶ از نوشیدنی‌های در حال تخمیر در کشور سنگال جدا شده است. پژوهش‌های نسبتاً بسیاری درباره استفاده از آن در تولید استارتر سرکه، تولید سرکه در مقیاس نیمه‌صنعتی و ... انجام شده است (۱۶-۲۱). این باکتری در بازه دمایی ۳۰ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اتانول به خوبی رشد می‌کند (۲۲). در پژوهشی که شفیع^۶ و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام دادند، تولید گلوکونیک اسید توسط این باکتری مطالعه شد. در این پژوهش مشخص شد باکتری یاد شده توانایی تولید گلوکونات سدیم در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد را دارد (۱۵)؛ با این حال، تولید گلوکونات سدیم و محصولات جانبی آن توسط استوباکتر سنگالنسیس در شرایط مختلف بررسی نشده است.

بر اساس آنچه بیان شد و اطلاعات نویسنده و با وجود مزیت باکتری‌های مقاوم به گرما، پژوهش در زمینه استفاده از گونه‌های مقاوم به گرمای جنس

تخمیر با فسفریک‌اسید و هیدروکسیدپتاسیم ثابت نگه داشته شد. نمونه‌گیری طی ساعت‌های مختلف و در شرایط استریل انجام شد و نمونه‌ها از نظر بررسی مقدار قند، میزان زیست‌توده سلول و گلوکونات سدیم تولیدشده بررسی شدند.

بررسی کیفی میزان گلوکونات سدیم، ۲-کتوگلوکونات و ۵-کتوگلوکونات: بررسی کیفی و نیمه کمی گلوکونات سدیم، ۲-کتوگلوکونات و ۵-کتوگلوکونات توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و استفاده از صفحه نازک سیلیکاژل (Silica Gel 60) (plate مطابق با روش سایشینو^۹ انجام شد (۲۳). ۵ میکرولیتر از استانداردهای هریک از ترکیبات موردبررسی و نیز مایع رویی محیط کشت (فیلترشده) در انتهای صفحه 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 ایجادکننده رنگ شامل مخلوط دی‌فیل‌آمین (۲ گرم)، آنیلین (۲ میلی‌لیتر)، استون (۱۰۰ میلی‌لیتر) و فسفریک‌اسید (۱۵ میلی‌لیتر) به شکل تازه تهیه شد. پس از قراردادن صفحه سیلیکاژل به مدت حدود ۱ ساعت در تانک حاوی حلال و در دمای اتاق (۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد)، صفحه سیلیکاژل در دمای اتاق خشک و معرف ایجادکننده رنگ روی آن اسپری شد. سپس صفحه سیلیکاژل به مدت ۲۰ دقیقه برای ایجاد رنگ در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۲-کتوگلوکونات و ۵-کتوگلوکونات به ترتیب به شکل لکه‌های بنفش - قرمز تیره و قرمز تیره ظاهر شدند.

اندازه‌گیری میزان زیست‌توده سلول، گلوکونات سدیم و مشتقات کتون: اندازه‌گیری زیست‌توده سلول، گلوکونات سدیم، ۲-کتوگلوکونات، ۵-کتوگلوکونات و تعداد سلول‌های قابل کشت بر اساس

GYEA برای تهیه مایه تلقیح استفاده شد. این محیط در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری و به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد. پس از تلقیح کلنی خالص به این محیط، ارلن‌ها روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. هنگامی که جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر (OD_{540nm}) به حدود $1/5 \pm 0/1$ 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 محیط کشت GY استفاده شد که حاوی ترکیبات زیر بود:

۹۵ گرم درلیتر گلوکز، ۷ گرم درلیتر عصاره مخمر، ۷ گرم درلیتر پیتون کازئین، ۱ گرم درلیتر آمونیوم فسفات، ۰/۲ گرم درلیتر سولفات منیزیم. اسیدیته اولیه محیط پس از استریل کردن محیط کشت با فسفریک‌اسید و هیدروکسیدسدیم در چهار سطح ۴، ۴/۵، ۵ و ۵/۵ تنظیم شد.

برای انجام تخمیر، ۲ لیتر محیط کشت GY درون بیوراکتور (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) استریل شد. گلوکز موجود در این محیط به طور جداگانه استریل و پس از خنک شدن بیوراکتور و در شرایط استریل به آن اضافه شد. پس از خنک شدن و در شرایط استریل، مایه تلقیح یادشده در بخش پیش به آن اضافه و تخمیر در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد با میزان هوادهی ۱ vvm انجام شد. اسیدیته محیط کشت طی

بررسی تأثیر دما، غلظت قند و اسیدیته بر برخی پارامترهای سینتیکی تخمیر: در اسیدیته ثابت و کنترل‌شده (۵/۵) و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، استویاکتر سنگالنسیس می‌تواند قند گلوکز را تا ۱۲۰ گرم در لیتر طی مدت ۶۹ ساعت مصرف کند. افزایش غلظت قند موجب کاهش بسیار شدید سرعت مصرف قند می‌شود؛ به طوری که زمان تخمیر بسیار طولانی می‌شود و تخمیر ناتمام به پایان می‌رسد؛ بر این اساس در پژوهش حاضر، تخمیر بیش از ۱۲۰ گرم در لیتر قند گلوکز استفاده نشد. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بین حداکثر سرعت مصرف قند و دمای تخمیر و غلظت اولیه قند رابطه وجود دارد. اگرچه حداکثر سرعت تولید زیست‌توده سلول به دما وابسته است، در غلظت‌های مختلف قند در دمای ثابت مشابه است. با افزایش دما به ۳۸ درجه سانتی‌گراد در غلظت اولیه ۱۲۰ گرم در لیتر قند گلوکز، تولید زیست‌توده سلول با μ_{max} بیشتر از دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد پیش می‌رود؛ با این حال، حداکثر سرعت مصرف قند گلوکز با افت شدید نسبت به دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روبه‌رو می‌شود. با کاهش غلظت اولیه قند در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد، حداکثر سرعت مصرف قند دوباره افزایش می‌یابد؛ اما تاحدی نسبت به دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کمتر است و بنابراین در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۹۵ گرم در لیتر گلوکز و یا کمتر از آن برای تولید گلوکونیک اسید مناسب است.

از آنجا که گلوکونیک اسید یک اسید آلی و تأثیر آن بر سلول به اسیدیته وابسته است، تأثیر اسیدیته محیط کشت بر برخی پارامترهای سینتیکی تخمیر بررسی شد. بر اساس نتایج، حداکثر سرعت مصرف قند با کاهش اسیدیته به طور معناداری در هر دو دمای ۳۰ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد (جدول ۲)؛ به طوری که در اسیدیته ۴، سرعت مصرف قند در دمای

روش شفیی و همکاران (۲۰۱۷ و ۲۰۱۳) انجام شد (۱۵ و ۱۹). به طور خلاصه، کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد (Agilent 1110) مجهز به ستون Supelcogel C610 در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و جریان ۰/۵ میلی‌متر در دقیقه برای سنجش غلظت ترکیبات یادشده استفاده شد. فسفریک اسید ۰/۱ درصد به عنوان 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. پس از نمونه‌گیری از بیوراکتور در فاز رشد، تعداد سلول‌ها با استفاده از محیط کشت جدید GY (به بخش تخمیر مراجعه کنید) در حد 10^7 سلول در هر میلی‌لیتر تنظیم شد. از فلوروکروم^{۱۱} CTC برای بررسی عملکرد مجموعه آنزیم‌های دهیدروژناز در سلول‌های زنده و از رنگ تیازولین نارنجی^{۱۱} (TO) برای رنگ‌آمیزی سلول‌های مرده و زنده استفاده شد. میزان غلظت و زمان رنگ‌آمیزی طبق روش شفیی و همکاران (۲۰۱۳) تنظیم شد (۲۰).

نتایج

بر اساس مطالعه پیشین شفیی و همکاران (۲۰۱۷)، استویاکتر سنگالنسیس در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد می‌تواند ۹۵ گرم در لیتر گلوکز را در اسیدیته ۵/۵ تحمل و با بازده بیش از ۸۰ درصد گلوکز را به گلوکونیک اسید تبدیل کند (۱۵). در مطالعه حاضر، میزان تولید گلوکونات سدیم و مشتقات آن در کشت ناپیوسته در دو دمای ۳۰ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته‌های مختلف بررسی شد.

اسیدیته ۴/۵ تا ۵ بیش از ۸۰ درصد گلوکز اولیه را در هر دو دمای یادشده به گلوکونات سدیم تبدیل می‌کند. با توجه به نتایج این بخش و به منظور دستیابی به حداقل زمان تولید، در ادامه کار برای تولید گلوکونات سدیم در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد از ۹۵ گرم در لیتر قند گلوکز در اسیدیته ۵/۵ استفاده شد.

۳۸ درجه سانتی‌گراد ناچیز است و تخمیر به طور کامل انجام نمی‌شود و بیش از ۵۰ درصد قند در محیط باقی می‌ماند. با افزایش اسیدیته، زمان مصرف گلوکز به طور معناداری کاهش می‌یابد؛ به طوری که این زمان در اسیدیته ۴/۵ حدود ۸۸ ساعت است و در اسیدیته ۵/۵ به ۴۸ ساعت کاهش می‌یابد. استویاکتر سنگالنسیس در

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

۳۸ درجه سانتی‌گراد			۳۰ درجه سانتی‌گراد			غلظت قند (گرم در لیتر)
۷۵	۹۵	۱۲۰	۷۵	۹۵	۱۲۰	
۰/۶۶	۰/۶۸	۰/۶۳	۰/۵۳	۰/۵۱	۰/۵۷	μ_{max} (بر ساعت)
۳/۷	۳/۲	۱/۲	۴/۳	۳/۸	۳/۱	$q_s \max$ (بر ساعت)

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

جدول ۲- پارامترهای سینتیکی تخمیر ۹۵ گرم در لیتر قند گلوکز به گلوکونات سدیم در دما و اسیدیته‌های مختلف و کنترل‌شده

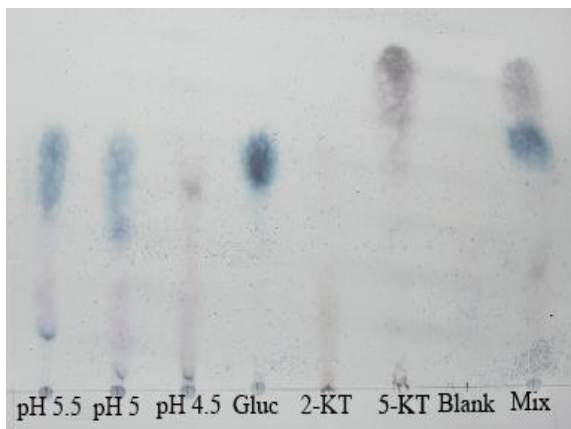
۳۸ درجه سانتی‌گراد				۳۰ درجه سانتی‌گراد				$\mu_{max.x}$ (بر ساعت)
اسیدیته	اسیدیته	اسیدیته	اسیدیته	اسیدیته	اسیدیته	اسیدیته	اسیدیته	
۴/۰	۴/۵	۵/۰	۵/۵	۴/۰	۴/۵	۵/۰	۵/۵	۰/۵۱
۰/۱۹	۰/۴۸	۰/۵۱	۰/۵۰	۰/۲۸	۰/۴۷	۰/۴۳	۰/۴۳	$q_s \max$ (بر ساعت)
۰/۴	۱/۳	۳/۵	۴/۲	۱/۳	۲/۷	۳/۹	۳/۸	

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

تولید گلوکونات سدیم می‌شود. با کاهش اسیدیته، زمان تخمیر طولانی‌تر می‌شود (شکل ۱، A)؛ به طوری که تولید گلوکونیک‌اسید در اسیدیته ۴/۵ به زمان طولانی (حدود ۸۰ ساعت) نیاز دارد، اما در اسیدیته‌های بیشتر (۵ تا ۵/۵) مدت تخمیر نهایتاً ۳۶ ساعت است؛ با وجود این، اسیدیته تأثیری بر فاز نمایی ندارد و رشد سریع سلول‌ها در همه موارد انجام می‌شود (شکل ۱، A-C).

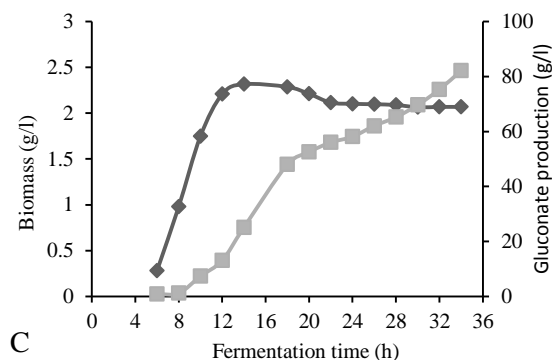
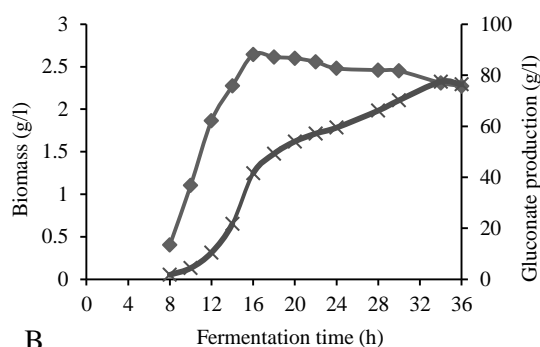
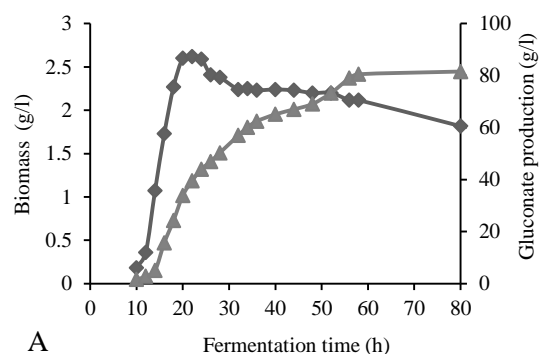
همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد اگرچه گلوکونات سدیم در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد در هر دو مرحله رشد (فاز نمایی و سکون) تولید می‌شود، عمده تولید آن در فاز سکون است. با توجه به میزان قند اولیه (۹۵ گرم در لیتر)، در تمام حالات حدود ۸۰ گرم در لیتر گلوکونات سدیم تشکیل می‌شود. به طور کلی، در تمام اسیدیته‌ها درصد کمی از قند گلوکز به عنوان پیش‌ماده برای رشد سلول‌ها استفاده می‌شود و بخش عمده گلوکز موجود در محیط صرف

لایه نازک نشان داد گلوکونات سدیم ترکیب عمده تولیدشده در هر سه اسیدیته ۴/۵، ۵ و ۵/۵ است. همان طور که در شکل ۲ دیده می‌شود در اسیدیته‌های ۵ و ۵/۵، گلوکونات سدیم محصول غالب تولیدشده است. در هر سه اسیدیته، نوار باریک قرمز رنگی دیده می‌شود که وجود مشتقات کتونیک گلوکونیک اسید را نشان می‌دهد؛ با این حال، نتایج کروماتوگرافی لایه نازک قطعیت لازم را ندارند و از این رو، تجزیه و تحلیل با استفاده از کروماتوگرافی مایع تحت فشار زیاد انجام شد.



شکل ۲- کروماتوگرافی لایه نازک برای تشخیص محصولات تخمیر گلوکز توسط استویاکتر سنگالنسیس در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته‌های مختلف. نمونه مخلوط (Mix) شامل گلوکونات سدیم (Gluc)، ۲-کتوگلوکونات (2-KT)، گلوکز و ۵-کتوگلوکونات (5-KT) است. اسیدیته‌ها اسیدیته‌ای را نشان می‌دهند که تخمیر گلوکونیک اسید در آن انجام شده است. نمونه شاهد شامل محیط کشت اولیه بدون تلقیح باکتری است.

تجزیه و تحلیل کمی نمونه‌های تخمیر با HPLC تا حد زیادی داده‌های کروماتوگرافی لایه نازک را تأیید کرد؛ به طوری که گلوکونات سدیم (۷۹ گرم در لیتر) و ۲-کتوگلوکونیک اسید (۱/۲ گرم در لیتر) مهم‌ترین ترکیبات تولیدشده در انتهای تخمیر و در اسیدیته‌های

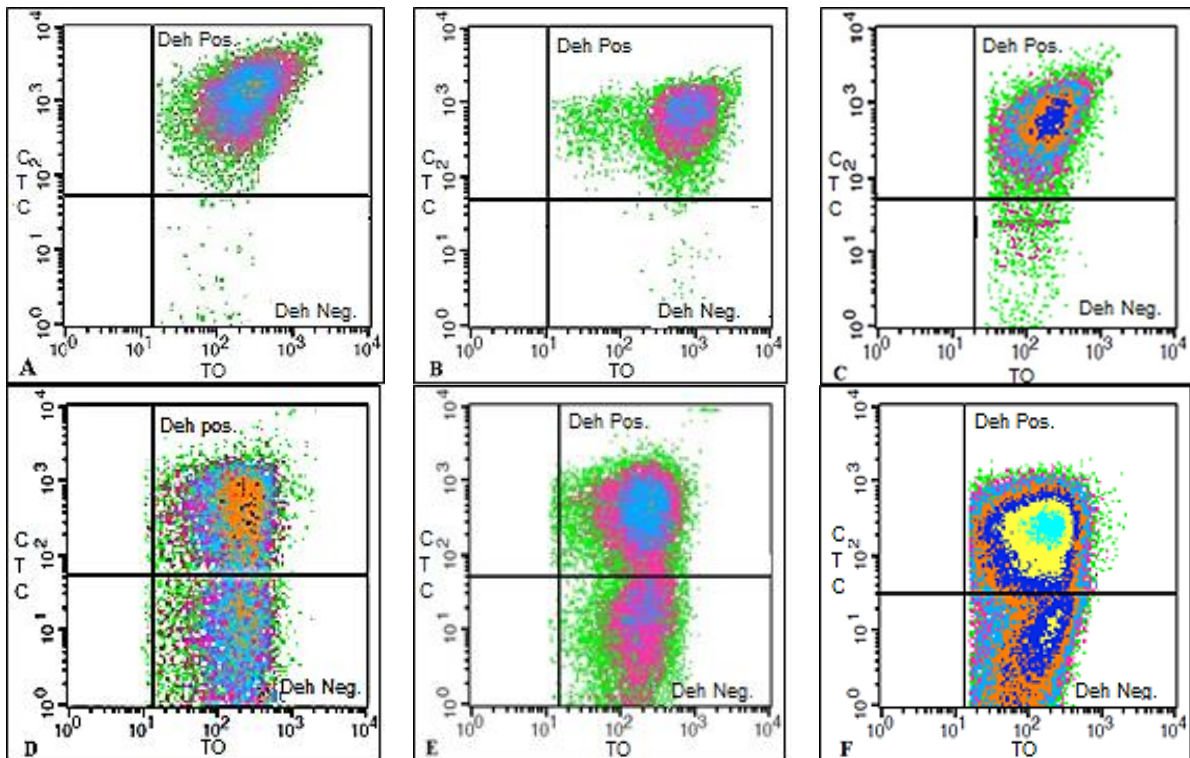


شکل ۱- منحنی رشد (\diamond) و تولید گلوکونات سدیم (Δ) طی تخمیر ناپیوسته در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته‌های ثابت و کنترل شده (میزان قند اولیه ۹۵ گرم در لیتر بوده است)؛ A. تخمیر در اسیدیته ۴/۵±۰/۲، B. تخمیر در اسیدیته ۵/۰±۰/۲، C. تخمیر در اسیدیته ۵/۵±۰/۲

بررسی میزان تولید محصولات جانبی طی تخمیر گلوکونیک اسید: در پژوهش حاضر، میزان تولید محصولات جانبی تخمیر بررسی شد. به این منظور، نمونه‌های گرفته شده در ساعت‌های پایانی تخمیر با دو روش کیفی و کمی یعنی کروماتوگرافی لایه نازک و HPLC تجزیه و تحلیل شدند. بررسی با کروماتوگرافی

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

۵ و ۵/۵ بودند و در هر دو اسیدیت، میزان ۵-کتوگلوکونیک اسید بسیار ناچیز (۰/۰۵ گرم‌درلیتر) بود. افزایش میزان ۲-کتوگلوکونیک اسید در اسیدیت ۴/۵ جالب بود؛ به طوری که میزان این ترکیب حدود ۶ برابر تخمیر در اسیدیت ۵/۵-۵ بود. اگرچه کروماتوگرافی لایه نازک میزان گلوکونات سدیم را در اسیدیت ۴/۵ ناچیز نشان داد (شکل ۲)، تجزیه و تحلیل HPLC میزان گلوکونات سدیم را ۷۹/۳



شکل ۳- بررسی فلوسیتومتری فعالیت مجموعه دهیدروژنازهای سلول‌های استوباکتر سنگالتسیس طی تخمیر گلوکونیک اسید. سلول‌ها از دو فاز نمایی و سکون در اسیدیت‌های 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 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و سپس با رنگ TO آمیزی شدند. A-C به ترتیب عملکرد دهیدروژنازها را در جمعیت سلول‌های فاز نمایی در اسیدیت‌های ۴/۵، ۵ و ۵/۵ و D-F به ترتیب عملکرد دهیدروژنازها را در جمعیت سلول‌های فاز سکون در اسیدیت‌های ۴/۵، ۵ و ۵/۵ نشان می‌دهند. مناطقی که جمعیت سلول‌ها دهیدروژناز فعال دارند با Deh pos. و مناطقی که جمعیت سلول‌ها از نظر فعالیت دهیدروژنازی منفی است با علامت Deh Neg. مشخص شده است. به‌طور خلاصه، با کاهش اسیدیت به ۴/۵ (قسمت D)، میزان جمعیت سلول‌های غیرفعال (Deh. Neg) در فاز سکون افزایش می‌یابد.

امروزه، تولید گلوکونیک‌اسید در محصولات تخمیری غذایی از جمله 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 مورد توجه قرار گرفته‌اند و دلیل این امر احتمالاً ماهیت پیش‌ماده مورد استفاده (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 به علت کاهش هزینه‌های خنک‌سازی بیوراکتورها و همچنین کاهش امکان آلودگی اهمیت بسزایی دارد. با توجه به اینکه دمای در نظر گرفته شده در پژوهش حاضر ۳۸ درجه سانتی‌گراد بود، فعالیت متابولسمی 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 از نظر فعالیت دهیدروژنازی در فاز نمایی کاملاً یکدست‌اند، اما طی فاز سکون به دو زیرجمعیت دهیدروژناز مثبت و دهیدروژناز منفی تقسیم می‌شوند. از آنجا که تبدیل گلوکز به گلوکونات سدیم در اثر فعالیت تخمیری اکسیداتیو اتفاق می‌افتد و این کاتابولسم در باکتری‌های استیک‌اسید به دهیدروژنازهای غشایی - پری پلاسمی وابسته است، کاهش فعالیت یا غیرفعال شدن دهیدروژنازها طی فاز سکون احتمالاً موجب

بر اساس نتایج (شکل ۳)، جمعیت باکتری‌ها (بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها) در فاز نمایی در هر سه اسیدیته 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 همه 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 اسیدیته محیط کشت وابسته است. با توجه به اینکه نمونه‌گیری برای همه تخمیرها در شرایط یکسان (با توجه به شکل ۱، زمانی که میزان غلظت گلوکونات سدیم ۶۰ گرم در لیتر بود) انجام شد، میزان سلول‌های غیرفعال از نظر دهیدروژنازها با کاهش اسیدیته افزایش می‌یابد؛ جالب اینکه در اسیدیته ۴/۵، بیش از ۶۱ درصد سلول‌های فاز سکون به شکل دهیدروژناز منفی ظاهر می‌شوند (شکل ۳، D) و این در حالیست که زیرجمعیت غیرفعال در اسیدیته‌های ۵ و ۵/۵ به ترتیب 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 تأثیر غلظت قند در دماها و اسیدیته‌های مختلف بر برخی پارامترهای سینتیکی تخمیر مطالعه شد. همچنین تولید مهم‌ترین محصولات جانبی بررسی شد.

اندک ۲- کتوگلوکونات تولید می‌کند و میزان ۵- کتوگلوکونات بسیار ناچیز است؛ همچنین تولید محصولات کتونی تا حدی به اسیدیته محیط کشت وابسته است. باکتری‌های استیک‌اسید از نظر 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 جدایه گلوکونوباکتر مقاوم به گرما (۳۷ درجه سانتی‌گراد) به دمای محیط کشت وابسته است (۲۳).

بر اساس نتایج، باکتری استوباکتر سنگانسیس قادر است در دمای زیاد (۳۸ درجه سانتی‌گراد) ضمن تولید گلوکونات سدیم، کمترین مقدار محصولات جانبی را تولید کند؛ همچنین باتوجه به تجزیه و تحلیل 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

پروژه 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.

خارج شدن بخشی از جمعیت سلولی از چرخه متابولیسمی تولید گلوکونیک‌اسید می‌شود. این امر با داده‌های جدول ۲ هماهنگی دارد؛ زیرا حداکثر سرعت مصرف گلوکز (که در فاز سکون است) با کاهش 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 از جمله آنها عبارتند از: افزایش تأثیر اسیدهای آلی (مانند استیک‌اسید و یا لاکتیک‌اسید و ...) بر متابولیسم سلول‌ها در اسیدیته کم و کاهش ترکیبات احیاکننده 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 گلوکونات سدیم در اسیدیته‌های مختلف، رشد و تکثیر سلول‌ها بی‌وقفه ادامه می‌یابد؛ از این رو، غیرفعال‌شدن سلول‌ها نمی‌تواند در اثر تأثیر منفی گلوکونات سدیم 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؛ با وجود این، 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

- (2) Mounir M., Shafiei R., Zarmehrshid 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 strawberry purée 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 Reviews* 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 situations. *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., Zarmehrshid 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

- 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 Bioprocess 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 extract- ethanol- acetic acid medium

⁹- Saichana

¹⁰- 5-Cyano-2,3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride

¹¹- Thiazole orange