

دو سویه جدید استوباکتر پاستوریانوس KBMNS-IAUF-3 و استوباکتر سنگالنسیس KBMNS-IAUF-5 مقاوم به دما و اتانول جداسازی شده از میوه‌های هلو انجیری و انگور مهره و بررسی پتانسیل آن‌ها به منظور تولید سرکه

کیوان بهشتی مآل*، نوشین شفیعی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۸

چکیده

به دلیل مصرف بالای انرژی برای خنک سازی فرماتور، جداسازی سویه های ترموتولرانت استوباکتر به منظور تولید سرکه ضروری است. از طرفی این سویه ها بایستی نسبت به درصد بالای اتانول، که به عنوان منبع کربن استفاده می شود، مقاوم باشند. هدف از این بررسی جداسازی و شناسایی گونه های مقاوم به دمای استوباکتر از میوه های مختلف و مقاومت آن ها نسبت به درصد بالای اتانول بود. به منظور جداسازی گونه های استوباکتر، رقت های مختلف عصاره میوه های هلو انجیری و انگور مره به محیط کشت فراتیور منتقل و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰°C، کلنی های حاوی هاله شفاف خالص سازی شدند. جدایه ها به منظور بررسی خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی، اکسیداسیون مجدد و بیوشیمیایی به محیط کارر منتقل شدند. سپس مقاومت جدایه ها نسبت به مقادیر مختلف اتانول و دما سنجیده شد. در نهایت جدایه ها از نظر مولکولی شناسایی شدند. از هر میوه یک سویه جداسازی شد. بررسی های ماکروسکوپی، میکروسکوپی، بیوشیمیایی، خاصیت اکسیداسیون مجدد و ویژگی های مولکولی نشان داد که این جدایه ها گونه های استوباکتر هستند. با توجه به این که هر دو سویه قادر به رشد در محیط کارر حاوی ۷ درصد اتانول در دمای ۳۸°C پس از ۲۴ ساعت بودند، به عنوان گونه های مقاوم به میزان بالای اتانول و دما محسوب شدند. سویه جداسازی شده از هلو انجیری و انگور مره به ترتیب به نام های استوباکتر پاستوریانوس KBMNS-IAUF-3 تحت شماره دسترسی MG547345.1 و استوباکتر سنگالنسیس KBMNS-IAUF-5 تحت شماره دسترسی MG547383.1 در بانک جهانی ژن در پایگاه NCBI به ثبت رسید.

کلمات کلیدی: استوباکتر پاستوریانوس، استوباکتر سنگالنسیس، انگور مهره، محیط فراتیور، محیط کارر، هلو انجیری

* beheshtimaal@iaufala.ac.ir

مقدمه

و محصول نهایی سریعا از استاتور خارج می شود (۷ و ۸). در سال های اخیر، تکنیک های تثبیت سلول به طور زیادی اهمیت یافته است زیرا در ژنراتورهای قطره ای و روش های غوطه وری تولید سرکه مشکلات مربوط به باکتریوفاژ دیده می شود. بنابراین کارایی تولید استیک اسید را می توان با استفاده از تثبیت سلول هادر درون فیبرهای توخالی، سرامیک یا بستر ژلی افزایش داد. آزادی در حرکت سلولی به وسیله دو روش مهم می تواند محدود شود، یکی از این روش ها، جذب سطحی سلول ها توسط باندهای فیزیکی و شیمیایی و روش دیگر به دام انداختن سلول ها داخل حامل می باشد (۹). به دلیل مصرف بالای انرژی برای خنک سازی فرماتورها، جداسازی سویه های ترموتولرانت / استوباکتر ضروری است. از طرفی این سویه های جداسازی شده بایستی به میزان بالای اتانول مقاوم باشند زیرا هنگامی که میزان اتانول کم باشد سویه های استوباکتر پس از مصرف اتانول، برای بقا و تولید انرژی مجبورند استات را طی چرخه تری کربوکسیلیک، به دی اکسید کربن و آب اکسید کنند ولی در صورت زیاد بودن میزان اتانول، پدیده اکسیداسیون مجدد در این باکتری ها اتفاق نمی افتد. بنابراین جداسازی استوباکتر مقاوم به میزان زیاد اتانول ضرورت دارد (۱۰). هدف از این بررسی جداسازی و شناسایی گونه های ترموتولرانت / استوباکتر از میوه های مختلف و بررسی مقاومت آن ها نسبت به درصد بالای اتانول بود.

مواد و روش ها

تهیه عصاره میوه

میوه هادر دمای ۲۵ تا ۳۰°C به مدت ۲ هفته در یک ظرف استریل درون یک کابینت با تبادل هوایی مناسب قرار داده شدند. این میوه ها پس از استشمام بوی ترشیدگی و سست شدن ساختارشان فشرده شدند. عصاره به دست آمده به بطری استریل ۲ لیتری به میزان نصف حجم بطری انتقال داده شد. سپس این بطری به مدت یک هفته در دمای ۳۰°C قرار داده شد. همچنین برای جلوگیری از انفجار بطری، چند سوراخ در

استیک اسید به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی و اصلی ترین ماده طعم دهنده در سرکه عمل می کند و توسط باکتری های اسید استیک (AAB) تولید می شود. بر اساس تعریف سازمان غذا و دارو در ایالات متحده، سرکه یک چاشنی و نگه دارنده ترش مزه، دارای حداقل ۴ درصد استیک اسید می باشد. همچنین سرکه دارای خواص دارویی مانند هضم کنندگی، اشتها آور و ضد پیری است (۱ و ۲). انواع مختلف سرکه شامل سرکه شراب، سرکه سفید، سرکه شری (اسپانیایی) و سرکه بالزامیک (ایتالیایی) می باشد (۳). AAB باکتری های گرم منفی، میله ای شکل و هوازی اجباری هستند (۴). در بین AAB، گونه های استوباکتر برای تولید سرکه مناسب هستند زیرا مستقیما اتانول را اکسید کرده و نیازی به سوبستراهای دیگر مانند گلوکز ندارند و همچنین محصول جانبی دیگری تولید نمی کنند. استوباکترها کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و دارای توانایی سوپراکسیداسیون هستند. طی فرایند اکسیداسیون مجدد در سویه های استوباکتر، استات به وسیله چرخه تری کربوکسیلیک به دی اکسید کربن و آب تبدیل می شود. این فرایند زمانی اتفاق می افتد که میزان اکسیژن زیاد باشد ولی اتانول در محیط نباشد. سویه های گلوکونوباکتر قادر به اکسیداسیون مجدد نیستند زیرا آنزیم دهیدروژناز α -کتوگلو تارات و سوکسینات در آن ها غیر فعال است (۱ و ۵). نوع سوبسترا، AAB، روش استفاده شده در تولید سرکه (سنتی، چکه ای و غوطه وری) و فرایند کهنگی تعیین کننده کیفیت تولید سرکه می باشند (۶). تولید سنتی سرکه نیازمند کهنگی در چوب در طی سال ها برای به دست آوردن درجات بالای استیک و در نتیجه تولید محصولی نسبتا گران می باشد. بنابراین هدف تکنولوژی های جدید، تولید سرکه با کیفیت بالا و ارزان قیمت در زمان کوتاه می باشد. این متدهای تولید شامل استفاده از کشت غوطه ور و یک سیستم هوادهی مداوم و نیمه مداوم می باشد. در روش نیمه مداوم برای جلوگیری از ورود باکتری به فاز رکود، الکل به آرامی وارد استاتور شده

¹. Acetic Acid Bacteria

بالای آن ایجاد شد (۱۰).

شناسایی مولکولی سویه‌های استوباکتر

پس از تعیین جنس و گونه استوباکتر جداسازی شده با استفاده از خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی، شناسایی مولکولی جدایه‌ها از طریق آنالیز 16s-rDNA صورت گرفت. پس از استخراج DNA باکتری، میکروتیوب‌های حاوی مواد PCR در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند و برنامه مطابق پروتکل استفاده شده جهت انجام PCR انجام شد. در تحقیق حاضر از پرایمرهای عمومی تعیین توالی 16s-rDNA بنام OF BUI به عنوان پرایمر رفت و OR BUI به عنوان پرایمر برگشت به ترتیب با توالی‌های 5'AACTGGAGGAAGGTGGGGAT3' و 5'AGGAGGTGATCCAACCGCA3' استفاده شد.

پس از الکتروفورز، ۳۰ μl از محصول PCR که دارای باند شارپ و بدون اسمیر بود به همراه ۱۰ μl از هر پرایمر رفت و برگشت در ویال‌های جداگانه ریخته شد و برای تعیین توالی به شرکت تالی ژن پارس واقع در شهرک علمی و تحقیقاتی اصفهان ارسال گردید. توالی‌های به دست آمده در باکتری مورد ارزیابی قرار گرفتند و به منظور تعیین جنس، گونه و سویه بلاست شدند. در نهایت نام باکتری در بانک جهانی NCBI ثبت گردید.

بهینه سازی رشد جدایه‌ها در غلظت بالای اتانول و دما

این آزمایش به منظور انتخاب سویه‌های استوباکتر قادر به رشد در غلظت بالای اتانول و دما صورت گرفت. به این منظور دو متغیر غلظت اتانول و دما به صورت تک فاکتوره در رشد جدایه‌های استوباکتر بررسی شدند. در این آزمایش میزان رشد جدایه‌ها در غلظت‌های مختلف اتانول درصد ۱۰-۲ درصد در دماهای ۳۴، ۳۶، ۳۸ و ۴۰°C در زمان انکوباسیون ثابت ۲۴h در محیط کشت کارر مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد رشد جدایه‌ها در غلظت‌های اتانول ۵، ۷ و ۹ درصد در دماهای ۳۴، ۳۶، ۳۸ و ۴۰°C در زمان انکوباسیون ثابت ۴۸h در محیط کشت کارر مورد بررسی قرار گرفت (۱۲).

جداسازی اولیه سویه‌های مختلف AAB به وسیله محیط فراتیور

ابتدا از عصاره میوه‌های هلوانجیری و انگور مهره رقیق شده به میزان ۵۰ μl در پلیت‌های حاوی محیط کشت فراتیور (عصاره مخمر ۲ درصد، کربنات کلسیم ۲ درصد، آگار ۲ درصد، آب مقطر استریل ۱۰۰ ml و اتانول ۲ درصد) به روش کشت سطحی کشت داده شد و در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸h گرمخانه گذاری شد. سپس کلنی‌های حاوی هاله شفاف، در همان محیط خالص سازی شدند. این جدایه‌ها به دلیل تولید اسید قادر به حل کردن کربنات کلسیم و ایجاد هاله شفاف بودند (۱۱).

غربال‌گری استوباکتر از سایر AAB به وسیله محیط کارر

در این مرحله کلنی‌های حاوی هاله شفاف در محیط فراتیور در محیط کارر (عصاره مخمر، ۳ درصد؛ آگار، ۲ درصد؛ بروموکرزول گرین، ۰/۰۰۲ درصد؛ آب مقطر استریل، ۱۰۰ ml و اتانول، ۲ درصد) به روش کشت خطی کشت داده شدند. از بین جنس‌های مختلف AAB، تنها جنس استوباکتر قادر به انجام سوپر اکسیداسیون در محیط کشت کارر می‌باشد. استوباکترها در ۴۸h اول به علت اکسیداسیون اتانول و تولید اسید استیک در این محیط رنگ آبی آن را به زرد تبدیل می‌کنند.

ویژگی سوپراکسیداسیون استوباکتر باعث تبدیل اسید استیک به آب و دی اکسید کربن شده و پس از ۷۲h رنگ زرد محیط کارر مجدداً به آبی تغییر می‌کند. بنابراین جدایه‌هایی که تا ۴۸h پس از رشدشان رنگ محیط کارر را زرد و پس از ۷۲h مجدداً آبی کردند، غربال‌گری شدند (۱۱).

خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها شامل تست‌های کاتالاز، اکسیداز و مصرف کربنات کلسیم بررسی شدند. برای نگهداری طولانی مدت سویه‌ها از محیط کارر حاوی ۳ درصد اتانول و به شکل اسلنت استفاده شد (۱۱ و ۱۰).

rDNA با تمام توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی GenBank، توسط نرم افزار BLAST مشخص گردید که جدایه MG با توالی استوباکتر سنگالنسیس 108B، ۹۴ درصد پوشش و ۹۹ درصد مشابهت، جدایه FP با توالی استوباکتر پاستوریانوس زیر گونه پاستوریانوس سویه SRCM101342 ۹۷ درصد پوشش و ۹۹ درصد مشابهت داشت. درخت فیلوژنی قطعه ترادف یابی شده جدایه‌های MG و FP نشان می‌دهد که این جدایه‌ها از نظر ژنتیکی، بیشترین نزدیکی را به ترتیب به استوباکتر سنگالنسیس 108B و استوباکتر پاستوریانوس زیر گونه پاستوریانوس سویه SRCM101342 دارد. پس از شناسایی جدایه‌های FP و MG سویه‌های باکتری به دست آمده به وسیله نرم افزار Sequin در بانک جهانی NCBI به ترتیب به نام‌های استوباکتر پاستوریانوس سویه KBMNS-IAUF-3 تحت شماره دسترسی MG547345.1 و استوباکتر سنگالنسیس سویه KBMNS-IAUF-5 تحت شماره دسترسی MG547383.1 به ثبت رسید.

بررسی رشد گونه‌های استوباکتر در غلظت‌های مختلف اتانول در دمای ثابت پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته

همان طور که در جدول‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ مشاهده می‌شود، شدت رشد در باکتری استوباکتر سنگالنسیس KBMNS-IAUF-5 و استوباکتر پاستوریانوس KBMNS-IAUF-3 در محیط کشت کارر با افزایش میزان اتانول در

نتایج

بررسی خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی جدایه‌های مختلف AAB

جدایه‌های AAB با ویژگی مصرف کربنات کلسیم در محیط کشت فراتیور، به نام‌های FP و MG به ترتیب از میوه‌های هلوانجیری و انگورمه‌ره جداسازی شدند. جدایه‌های FP و MG، در محیط کشت کارر پس از ۴۸h رنگ محیط را از آبی به زرد تبدیل کردند و توانستند پس از ۷۲h رنگ زرد به وجود آمده در محیط کارر را مجدداً به آبی تبدیل کنند که نشان دهنده ویژگی سوپراکسیداسیون آنها بود. خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی این جدایه‌ها در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج حاصل، هر دو جدایه به عنوان جنس استوباکتر شناسایی شدند.

بررسی خصوصیات مولکولی جدایه‌های مختلف AAB

شناسایی ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی در جدایه‌های FP و MG مشخص کرد که این جدایه‌ها می‌تواند مربوط به جنس‌های استوباکتر باشد. بنابراین برای شناسایی این جدایه‌ها در حد گونه، از روش شناسایی مولکولی استفاده شد. محصولات PCR در دو جدایه MG و FP با پرایمرهای OF BUI و OR BUI الکتروفورز شدند. مارکر مورد استفاده ۱۰۰ جفت باز بوده و محصول بین ۳۸۰-۳۷۰ جفت باز قرار گرفت. پس از تطابق دادن توالی -16S

جدول ۱. بررسی خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی در جدایه‌های مختلف AAB

ردیف	نام جدایه	خصوصیات کلنی در محیط کشت کارر	خصوصیات کلنی در محیط کشت فراتیور	خصوصیات میکروسکوپی در محیط کشت کارر	مصرف کربنات کلسیم	کاتالاز	اکسیداز
۱	FP	زرد-آبی، گرد، برجسته، بوی ترشیدگی، نرم، ۲ میلی متر	بیرنگ، شفاف، گرد، برجسته، بوی ترشیدگی، نرم، ۲ میلی متر	گرم منفی، کوکوباسیل، مونو، دیپلو و استرپتوباسیل	+	+	-
۲	MG	زرد-آبی، گرد، برجسته، بوی ترشیدگی، نرم، ۲ میلی متر	بیرنگ، شفاف، گرد، برجسته، بوی ترشیدگی، نرم، ۲ میلی متر	گرم منفی، کوکوباسیل، مونو، دیپلو و استرپتوباسیل	+	+	-

جدول ۲. میزان رشد جدایه‌های AAB در غلظت‌های مختلف اتانول پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد

ردیف	اتانول (%)	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	استوباکتر سنگالنسیس KBMNS-IAUF-5	+۴	+۴	+۴	+۳	+۲	+۲	+۱	-	-°
۲	استوباکتر پاستوریانوس KBMNS-IAUF-3	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۳	+۲	+۱	-

*: - : عدم رشد، +۱: $10^2 < \text{CFU/ml} < 10^3$ ، +۲: $10^5 < \text{CFU/ml} < 10^6$ ، +۳: $10^7 < \text{CFU/ml} < 10^8$ ، +۴: $10^9 < \text{CFU/ml} < 10^{10}$

جدول ۳. میزان رشد جدایه‌های AAB در غلظت‌های مختلف اتانول پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتیگراد

ردیف	اتانول (%)	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	استوباکتر سنگالنسیس KBMNS-IAUF-5	+۴	+۴	+۴	+۳	+۲	+۲	-	-	-°
۲	استوباکتر پاستوریانوس KBMNS-IAUF-3	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۲	+۲	-	-

*: - : عدم رشد، +۱: $10^2 < \text{CFU/ml} < 10^3$ ، +۲: $10^5 < \text{CFU/ml} < 10^6$ ، +۳: $10^7 < \text{CFU/ml} < 10^8$ ، +۴: $10^9 < \text{CFU/ml} < 10^{10}$

جدول ۴. میزان رشد جدایه‌های AAB در غلظت‌های مختلف اتانول پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۸ درجه سانتیگراد

ردیف	اتانول (%)	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	استوباکتر سنگالنسیس KBMNS-IAUF-5	+۴	+۳	+۲	+۲	+۲	+۱	-	-	-°
۲	استوباکتر پاستوریانوس KBMNS-IAUF-3	+۴	+۴	+۴	+۳	+۲	+۱	-	-	-

*: - : عدم رشد، +۱: $10^2 < \text{CFU/ml} < 10^3$ ، +۲: $10^5 < \text{CFU/ml} < 10^6$ ، +۳: $10^7 < \text{CFU/ml} < 10^8$ ، +۴: $10^9 < \text{CFU/ml} < 10^{10}$

جدول ۵. میزان رشد جدایه‌های AAB در غلظت‌های مختلف اتانول پس از ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد

ردیف	اتانول (%)	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	استوباکتر سنگالنسیس KBMNS-IAUF-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-°
۲	استوباکتر پاستوریانوس KBMNS-IAUF-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: - : عدم رشد، +۱: $10^2 < \text{CFU/ml} < 10^3$ ، +۲: $10^5 < \text{CFU/ml} < 10^6$ ، +۳: $10^7 < \text{CFU/ml} < 10^8$ ، +۴: $10^9 < \text{CFU/ml} < 10^{10}$

۹ درصد پس از ۴۸h، کاهش یافت. در شکل‌های ۱ و ۲، میزان +۴ نشان دهنده رشد بسیار زیاد و معادل با $10^9 < \text{CFU/ml} < 10^{10}$ ، میزان +۳ نشان دهنده رشد زیاد و معادل با $10^7 < \text{CFU/ml} < 10^8$ ، میزان +۲ نشان دهنده رشد متوسط معادل با $10^5 < \text{CFU/ml} < 10^6$ ، میزان +۱ نشان دهنده رشد کم و معادل با $10^3 < \text{CFU/ml} < 10^4$ و میزان - (منفی) نشان دهنده عدم رشد در محیط کشت است.

دماهای ثابت ۳۴، ۳۶، ۳۸ و 40°C کاهش یافت. در جداول ۲ تا ۵، میزان +۴ نشان دهنده رشد بسیار زیاد و معادل با $10^9 < \text{CFU/ml} < 10^{10}$ ، میزان +۳ نشان دهنده رشد زیاد و معادل با $10^7 < \text{CFU/ml} < 10^8$ ، میزان +۲ نشان دهنده رشد متوسط معادل با $10^5 < \text{CFU/ml} < 10^6$ ، میزان +۱ نشان دهنده رشد کم و معادل با $10^3 < \text{CFU/ml} < 10^4$ و میزان - (منفی) نشان دهنده عدم رشد در محیط کشت است.

بحث و نتیجه گیری

شرفی و همکاران در سال ۲۰۱۰، سویه‌های مختلف AAB را پس از تهیه عصاره میوه، به وسیله محیط کشت GYC که حاوی ۱۰ درصد گلوکز، ۱ درصد عصاره مخمر، ۱/۵ درصد آگار و ۲ درصد کربنات کلسیم بود، جداسازی کردند. آن‌ها کلنی‌هایی که حاوی هاله شفاف در اطراف خود بودند، به عنوان باکتری‌های AAB جداسازی و خالص سازی و

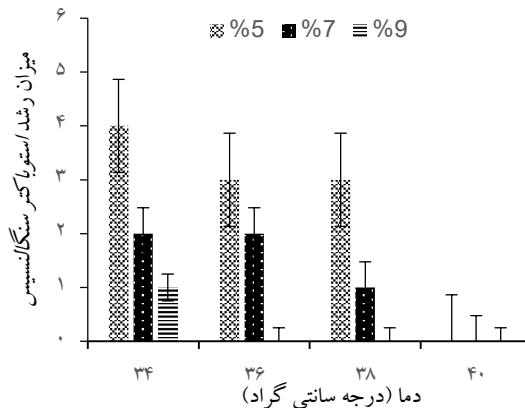
بررسی رشد گونه‌های استوباکتر در غلظت‌های

مختلف اتانول در دمای ثابت پس از انکوباسیون ۴۸

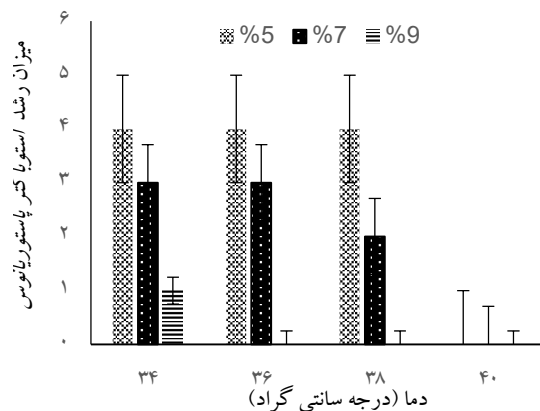
ساعته

همان طور که در شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش دما، رشد سویه‌های جداسازی شده استوباکتر سنگالنسیس KBMNS-IAUF-5 و استوباکتر پاستوریانوس KBMNS-IAUF-3 در محیط کشت کارر در غلظت‌های اتانول ۵، ۷ و

نمک نرمال و اتانول غنی کرده و سپس در محیط کشت حاوی گلوکز، عصاره مخمر، پیتون، گلیسرول، عصاره سیب زمینی، اتانول، آگار و بروموکرزول ارغوانی کشت دادند. ایشان کلنی‌هایی که رنگ محیط کشت اطرافشان را زرد کردند را به عنوان باکتری‌های AAB جداسازی و غربال‌گری کردند. همچنین برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها به این محیط، سیکلوهاگزامید افزودند (۱۲). این روش در مقایسه با روش انجام شده در آزمایش حاضر به دلیل تنوع زیاد محتویات محیط کشت، گران تر است. موریادی و پاتوم آری در سال ۲۰۰۸، گونه‌های مختلف AAB را از میوه‌های مختلف، توسط محیط کشت دارای آب مقطر و ۴ درصد اتانول، به مدت ۳ تا ۵ روز، در دمای 37°C غنی سازی کرده و سپس در محیط سیب زمینی آگار دارای بروموکرزول ارغوانی کشت دادند. ایشان کلنی‌هایی که اطرافشان هاله زرد بود را به عنوان باکتری‌های AAB جداسازی کردند (۱۳). دیا و همکاران در سال ۲۰۱۵، گونه‌های مختلف AAB را از میوه‌های مختلف مناطق بنگلادش، در محیط کشت حاوی ۳ درصد استیک اسید و ۴ درصد اتانول غنی سازی کرده و سپس در محیط کشت حاوی عصاره مخمر، پلی پیتون، گلیسرول، آگار، بروموکرزول ارغوانی، استیک اسید و اتانول کشت دادند. ایشان کلنی‌هایی که اطرافشان هاله زرد داشتند را به عنوان AAB جداسازی کردند (۱). این روش نیز در مقایسه با روش به کار برده شده در آزمایش حاضر به دلیل وجود پیتون به عنوان منبع نیتروژن پرهزینه تر است. روش جداسازی گونه‌های مختلف/استوباکتر در آزمایش حاضر که شامل تهیه عصاره میوه و کشت آن در محیط کشت فراتیور بود، نسبت به سایر روش‌های جداسازی نام برده سریع تر، کم هزینه تر و همچنین احتمال هدر رفتن AAB در آن بسیار کمتر بود. در این تحقیق سوبه‌های مختلف AAB از میوه‌هایی مانند انگور مهر و هلوانجیری جداسازی شدند. ایجاد گاز فراوان در تولید عصاره الکلی میوه به دلیل تولید دی اکسید کربن توسط مخمر و همچنین بوی ترشیدگی به دلیل تولید اسید استیک توسط AAB بود. این عصاره میوه یک نوع محیط غنی سازی برای AAB محسوب شد زیرا مخمر و



شکل ۱. میزان رشد در استوباکتر سنگالنسیس KBMNS-IAUF-5 در دماهای مختلف و غلظت‌های اتانول ۵، ۷ و ۹ درصد پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون



شکل ۲. میزان رشد استوباکتر پاستوریانوس KBMNS-IAUF-3 در دماهای مختلف و غلظت‌های اتانول ۵، ۷ و ۹ درصد پس از ۴۸h انکوباسیون

همچنین توسط محیط کشت کارر برای بررسی خاصیت اکسیداسیون و اور اکسیداسیون غربال‌گری کردند. در این روش باکتری‌هایی رشد کردند که با اکسید کردن گلوکز در محیط کشت GYC، قادر به تولید اسید استیک بودند (۱۱). روش مذکور برای جداسازی انواع مختلف AAB مناسب است ولی برای جداسازی گونه‌های مختلف استوباکتر مناسب نیست زیرا استوباکترها تنها قادر به اکسید کردن الکل می‌باشند و استفاده از محیط کشت حاوی گلوکز جداسازی آن‌ها را مشکل می‌کند. کلاپیامورکان و همکاران در سال ۲۰۱۵، گونه‌های مختلف AAB را در محیط کشت حاوی

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق دو باکتری استوباکتر پاستوریانوس-KBMNS-3 و استوباکتر سنگالنسیس 5-KBMNS-IAUF جداسازی شده از میوه های هلو انجیری و انگور مهره قادر به رشد در محیط کشت کارر حاوی ۷ درصد اتانول در دمای ۳۸ درجه سانتیگراد پس از ۲۴ ساعت بودند، بنابراین به عنوان گونه های ترموتولرانت و مقاوم به میزان زیاد اتانول محسوب شدند.

منابع

1. Diba F, Alam F, Talukder A. Screening of acetic acid producing microorganisms from decomposed fruits for vinegar production. *Advances in Microbiology*. 2015; (5): 291-297.
2. Nishidal S, Nakamura Y, Torikal K, Yamamoto M, Kurosu. a traditional vinegar produced from unpolished rice, suppresses lipid peroxidation in vitro and in mouse skin. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 2000; 64 (9): 1909-1914.
3. Mas A, Torija MJ. Acetic Acid Bacteria and the production and quality of wine vinegar. *The Scientific World Journal*. 2014; 5: 1-6.
4. Beheshti Maal K, Shafiee R. A Thermotolerant *Acetobacter* strain isolated from Iranian peach suitable for industrial microbiology. *Asian Journal of Biological Sciences*. 2011; 4(3): 244-251.
5. Greenfield S, Claus GW. Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *Bacteriology*. 1927; 112: 1295-1301.
6. Gullo M, Giudici P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter culture selection. *Food Microbiology*. 2008; 125: 46-53.
7. Tesfaye W, Morales ML, Garcia Parrilla MC, Troncoso AM. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Sciences and Technology*. 2002; 13: 12-21.
8. Ory I, Romero L, Cantero D. Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Food Engineering*. 2004; 63: 39-45.
9. Ory I, Romero L, Cantero D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. strain, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*. *Process Biochemistry*. 2004; 39: 547-555.
10. Beheshti Maal K. Identification of a thermo-tolerant *Acetobacter* strain isolated from Iranian date palm

AAB به ترتیب با تولید الکل و اسید فراوان رشد میکروارگانیزم های دیگر را محدود کردند. جدایه های استوباکتر موجود در عصاره با اکسید کردن اتانول موجود در محیط فراتیور قادر به تولید اسید استیک و مصرف کربنات کلسیم بودند. همچنین این باکتری هارنگ بروموکرزول گرین را در محیط کارر، طی عمل اکسیداسیون و تولید استیک اسید، از سبز به زرد و همچنین به دلیل وجود خاصیت اکسیداسیون مجدد و مصرف استیک اسید، مجدداً از زرد به آبی تغییر دادند. کلایپامورکان و همکاران، در سال ۲۰۱۵ توانایی رشد و تولید اسید را در جدایه های میوه های مختلف در محیط کشت عصاره مخمر آگار (۵/۰ درصد عصاره مخمر و ۲ درصد آگار) حاوی ۴ تا ۱۰ درصد اتانول مورد بررسی قرار دادند. ایشان به این نتیجه رسیدند که تعداد زیادی جدایه ها قادر به رشد در محیط کشت حاوی ۴ تا ۶ درصد اتانول بودند، فقط تعداد معدودی در اتانول ۱۰ درصد رشد کردند (۱۲).

در آزمایش حاضر نیز میزان رشد به همراه تولید اسید در استوباکتر پاستوریانوس 3-KBMNS-IAUF و استوباکتر سنگالنسیس 5-KBMNS-IAUF با افزایش درصد اتانول در دمای ثابت به دلیل شوک شدن، افزایش حساسیت و ورود سلول باکتری به فاز سکون کاهش یافت. همچنین استوباکتر پاستوریانوس 3-KBMNS-IAUF قادر به رشد در محیط کشت حاوی ۹ درصد اتانول در دمای ۳۴°C پس از ۲۴h بود در حالی که استوباکتر سنگالنسیس 5-KBMNS-IAUF در این شرایط رشد نکرد. همچنین هر دو جدایه قادر به رشد در محیط کشت کارر حاوی ۷ درصد اتانول در دمای ۳۸°C پس از ۲۴h بودند. در سال ۲۰۱۴ نشان داده شد که افزایش درصد اتانول باعث افزایش حساسیت به دما در گونه ای از استوباکتر جداسازی شده از رطب می شود. همچنین اثر افزایش دما در کاهش رشد این جدایه در میزان ثابت اتانول بررسی شد (۱۰). در آزمایش حاضر نیز با افزایش درصد اتانول میزان حساسیت سلول به دما بیشتر شد. برای مثال حساسیت سلول های باکتری به اتانول ۹ درصد بیشتر از اتانول ۷ درصد در دمای ۴۰°C بود.

- (rotab) suitable for date vinegar production in agricultural biotechnology. *Advances in Environmental Biology*. 2014; 8(10): 1063-1071.
11. Sharafi SM, Rasooli I, Beheshti Maal K. Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation method. *Iranian Journal of Microbiology*. 2010; 2(1): 38-45.
 12. Klawpiyapamornkun T, Bovonsombut S, Bovonsombut S. Isolation and characterization of acetic acid bacteria from fruit and fermented fruit juices for vinegar production. *Food and Applied Bioscience Journal*. 2015; 3(1): 30-38.
 13. Moryadee A, Pathom-Aree W. Isolation of thermotolerant acetic acid bacteria from fruits for vinegar production. *Research Journal of Microbiology*. 2008; 3(1): 209-212.

Isolation and identification of thermo- ethanol-tolerant *Acetobacter pasteurianus* KBMNS-IAUF-3 and *Acetobacter senegalensis* KBMNS-IAUF-5 strains from fig-peach and nut-grape fruits and investigation of their potential for vinegar production

Keivan Beheshti-Maal*, Noushin Shafiee

Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran

Abstract

Due to the high energy consumption for cooling of fermentors, isolation of thermo-tolerant *Acetobacter* strains to produce vinegar is necessary. On the other hand, these thermo-tolerant strains should tolerate against high percentage of ethanol, which can be used as a source of carbon. The purposes of this study were to isolate and identify thermo-resistant AAB strains from different fruits and investigation of their resistance to the high ethanol concentrations. In order to isolate the AAB strains, the extracts dilutions of fig-peach and nut-grape fruits were prepared, cultivated in Frateur culture media and incubated at 30°C for 24 hours. The individual colonies with round transparent zone were isolated and purified using same condition. The isolates for macroscopic, microscopic and biochemical evaluations were transferred to the Carr culture media. Then the resistance of the isolates against different high temperature and ethanol concentrations were measured. Finally, the molecular identification of isolates was carried out. One strain was isolated from each fruit sample. The overoxidation property in Carr medium as well as macroscopic, microscopic, biochemical and molecular characterizations showed that the isolates were related to *Acetobacter* spp. The isolated *Acetobacter* spp. were able to grow in Carr culture media with 7 percent ethanol and 38°C after 24 hours-incubation so they were considered as thermo- ethanol-resistant AAB spp. The isolated AAB from fig-peach and nut-grape were named *Acetobacter pasteurianus* KBMNS-IAUF-3 and *Acetobacter senegalensis* KBMNS-IAUF-5 and their 16s ribosomal sequences were deposited in GenBank, NCBI under the accession numbers of MG547345.1 and MG547383.1 respectively.

Keywords: *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter senegalensis*, Carr culture medium, Fig-peach, Frateur culture medium, Nut-Grape

* beheshtimaal@iaufala.ac.ir