Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 4 (September-October)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Isolation and identification of a novel strain of *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 from banana fruit, resistant to high temperature and ethanol concentration

Keivan Beheshti-Maal[1]*, Noushin Shafiee[2]

1. Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. M.Sc. of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Article Information

Article Subject:
Microbial Biotechnology

10.30699/ijmm.13.4.251

Corresponding author:

Keivan Beheshti-Maal
Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Email:
beheshtimaal@iaufala.ac.ir

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: The use of ethanol- temperature-resistant *Acetobacter* strains to produce vinegar on an industrial scale is important due to their sensitivity to high ethanol concentration as substrate and high energy consumption for acetator cooling. The aims of this study were to isolate and identify high temperature and ethanol resistant *Acetobacter* strains as starter for production of vinegar.

Materials and Methods: The banana alcoholic extract was transferred to the fermenter medium and after 24 h incubation at 30°C, colonies with transparent zone were purified as acetic acid bacteria and examined macroscopically and microscopically. The resistance to high temperature in constant ethanol and time as well as resistance to high ethanol in constant temperature and time were investigated.

Results: The studies of AAB isolate grown in the Carr medium showed that it was a *Acetobacter* strain. According to the single-factor optimization, this species was able to grow in a Carr medium containing 9% ethanol at 40°C after 72 h.

Conclusion: This is the first report of an AAB isolation from banana in Iran. This bacterium, as a new resistant strain to high levels of ethanol and temperature, was identified as *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 and its 16S-rDNA sequence was deposited in GenBank, NCBI, under the accession number of MK968570. This new strain can be suggested as a high temperature and ethanol resistant strain for producing banana vinegar on a semi-industrial and industrial scale.

Keywords: Acetic acid bacteria, *Acetobacter ghanensis*, Industrial and food biotechnology, Temperature and ethanol resistant strain

Received: 2019/09/01 Accepted: 2020/01/29 Available online: 2020/01/30

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Beheshti-Maal K, Shafiee N. Isolation and Identification of A Novel Strain of Acetobacter ghanensis KBMNS-IAUF-6 from Banana Fruit, Resistant to High Temperature and Ethanol Concentration. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (4) :251-265

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

According to the US Food and Drug Administration, vinegar is a sour-tasting solution containing at least 4% acetic acid. Acetic acid in vinegar is produced by acetic acid bacteria. The quality of vinegar production depends on the type of acetic acid, the substrate and the method used in its production **(1-3)**. Recently vinegar factories are searching for new varieties of vinegar using different types of acetic acid bacteria as starter. Because each microbial starter, in addition to acetic acid, produces 50 other types of aromatic substances. So, the vinegar produced by these strains will have a new flavor. Acetic acid bacteria are isolated from a variety of natural substrates such as fruits, potatoes and rice. Various kinds of vinegar known so far include wine vinegar, white vinegar, sherry vinegar, balsamic vinegar, beer vinegar, malt vinegar, barley vinegar, rice vinegar, onion vinegar and potato vinegar **(4, 5)**. Acetic acid bacteria are obligatory Gram-negative and aerobic rods. There are currently 12 genera in this family, among which three genera are more important industrially including *Acetobacter*, *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* **(6)**. Among the acetic acid bacteria, *Acetobacter* species are more suitable for the production of vinegar on an industrial scale because they directly use ethanol as a cheap substrate and also produce no other product than acetic acid. *Acetobacter* species are chemoli-thotrophic, motile or non-motile, catalase positive, oxidase negative, mesophilic and capable of super-oxidation. In *Acetobacter* species, ethanol is oxidized to acetic acid and then acetic acid to carbon dioxide in the process of oxidation and super-oxidation. The redox process occurs when the oxygen content is high but ethanol is not present in the medium. Therefore, the concentration of ethanol as a substrate is very important in the vinegar production process **(7)**. The traditional method, as the first industrial process of vinegar production, was carried out in open barrels. Despite the high quality of the product, this method was slow. In the nineteenth century, surface fermentations emerged as faster methods. One of these methods was the drop generator, which is still used today. At the beginning of 1949, submerged fermentation methods were developed. Therefore, the goal of new technologies is to produce high quality, inexpensive vinegar in a short period of time. Thus, recent methods of vinegar production include the use of acetator submerged methods **(4, 8, 9)**. Because of the high energy consumption for cooling the acetator, isolation of thermo-tolerant *Acetobacter* strains is necessary. These isolated strains must be highly resistant to ethanol because when the ethanol concentration is low the Acetobacter strains have to oxidize the acetate for survival, but super-oxidation does not occur in the presence of high ethanol levels. Due to the mesophilic nature and susceptibility of the bacteria to high ethanol concentrations, it is needed to optimize different varieties of *Acetobacter* spp. in vinegar production in order to increase their resistance to high temperature and ethanol **(10)**. The purposes of this study were to isolate and identify new strains of high ethanol and temperature resistant *Acetobacter* strains from banana fruit to produce a new flavored vinegar.

Materials and Methods

The **Chemicals and culture media**

The materials used in this study included Gram staining kit (Taligene Pars Co., ISTT, Iran), hydrogen peroxide and oxidase disk (Merck, Germany). Also the culture media used in this study included Carr culture medium [yeast extract, 3%; agar, 2%; bromocresol green, 0.002% (Merck, Germany); sterile distilled water, 100 ml; ethanol, 2% (Merck, Germany)] and Frateur medium [yeast extract, 2%; calcium carbonate, 2%; agar, 2%; sterile distilled water, 100 ml; ethanol, 2% (v/v)].

Initial isolation of different strains of acetic acid bacteria

The ripe and sweet bananas were kept in a clean cabinet at room temperature until the fruit flies were seen and the smell of the scent arose. After peeling and squeezing the banana structure by sterile mortar, the extract obtained from the banana was transferred to a 2-liter sterile bottle. Also, a few holes were created to prevent the bottle from exploding due to the yeast' production of carbon dioxide. The bottle was kept in a clean cabinet at room temperature for 7 to 10 days **(7)**. Then 50 µl of 10^{-1} to 10^{-5} dilutions of this extract were cultured in Frateur culture medium. After incubation at 30°C for 48 to 72 hours, the colonies that were surrounded by clear halo zone were purified in the same medium. Then, the macroscopic and microscopic characteristics of the isolates were studied after 24-hour culture in Frateurr and Carr medium **(11)**.

Screening of different *Acetobacter* spp.

For the screening of *Acetobacter* species from other acetic acid bacteria, in Carr and Frateur media, the yellowish colonies with oxidase-negative and catalase positive reactions were selected **(11)**.

Molecular identification of *Acetobacter* isolated strains

Pure colonies were transferred to 50 ml sterile distilled water from the culture medium for 24 h. 10 ml of this suspension was transferred to a sterile 15 ml Falcon and centrifuged at 5000 g for 15 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was transferred to a sterile tube. DNA extraction kit (Bioneer, South Korea) was used for DNA extraction from 1 mg of bacterial mass. In this study, general primers designed and constructed by Taligene Pars Company, Isfahan, Iran. The OF BUI and OR BUI, were as forward and reverse primers respectively. Their sequences were 5´-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3´ as forward primer and 5'- AGGAGGTGATCCAACCGCA -3´ as reverse primer.

The PCR program consisted of initial temperature of 96°C for 4 minutes followed by 30 cycles with temperatures of 94°C for 2 minutes, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute, respectively. The final stages consisted of 72°C for 4 minutes and 4°C for 10 minutes, respectively. The expected molecular weight of the PCR product was 370 bp **(12)**. The PCR product and primers were sent to Taligene Pars for sequencing. These sequences were analyzed using Finch TV V.1.4.0 and Mega 6 software and compared with the genomic sequences available in GenBank, NCBI using blast software (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Finally, 16S-rDNA sequence of the isolate was deposited in the GenBank, NCBI.

Single-factor optimization of high ethanol resistance and temperature *Acetobacter* isolate

The experiment was performed to select high-alcohol and temperature-resistant *Acetobacter* strains. In this study, acid production and growth rate of the isolate in terms of colony forming unit (CFU) in Carr medium with different amounts of ethanol (2 to 10%) at constant temperatures of 34, 36, 38 and 40°C after 24, 48, 72 and 96 hours were performed. Also, the growth and acid production of this isolate at different temperatures of 34, 36, 38 and 40°C in the culture medium with constant ethanol content (5, 7 and 9%) after 24, 48, 72 and 96 hours were compared **(6)**.

Results

Macroscopic, microscopic and biochemical properties of *Acetobacter* isolates

In this experiment, an acetic acid bacterium was isolated by creating a transparent area around colonies in the Frateur medium after 72 h (Fig. A1). Investigation of macroscopic characteristics of 24-hour culture of this bacterium in Carr and Frateur media showed that the colonies grown were round, fine, colorless, translucent, soft and had an odor of vinegar. Also microscopic characteristics of the isolates in these two media showed that these bacteria were rod-shaped and Gram-negative. According to the results of the screening, this catalase-positive and oxidase-negative isolate had oxidation (Figure B1) and super-oxidation (Figure C1) properties. Therefore, this isolate was identified as an *Acetobacter* species.

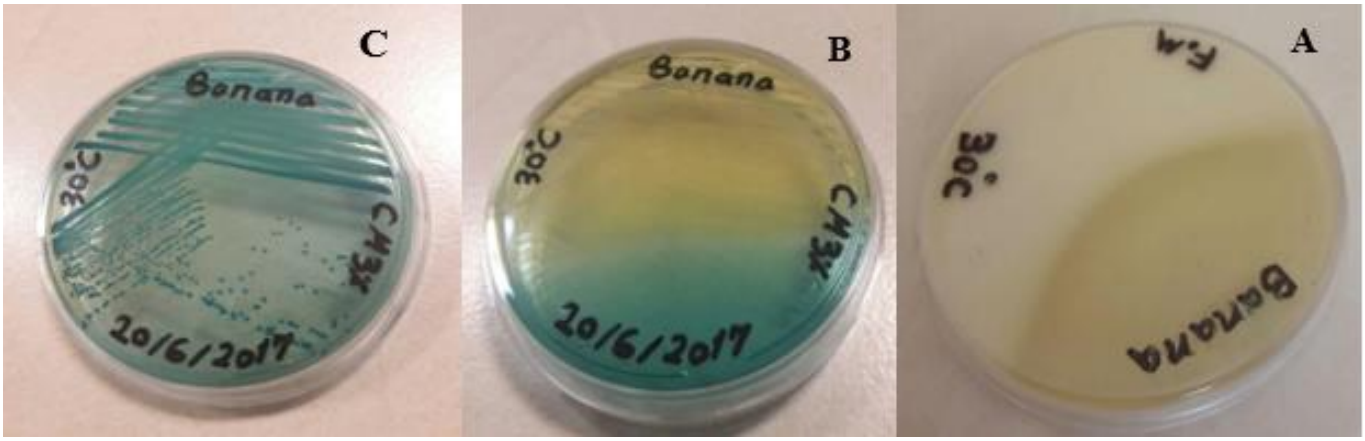


Figure 1. Calcium carbonate consumption in Frateur medium by strain isolated from bananas after 72 h (A), oxidation process by isolate after 24 h in Carr medium (B) and super-oxidation process by isolate after 72 h in Carr medium (C).

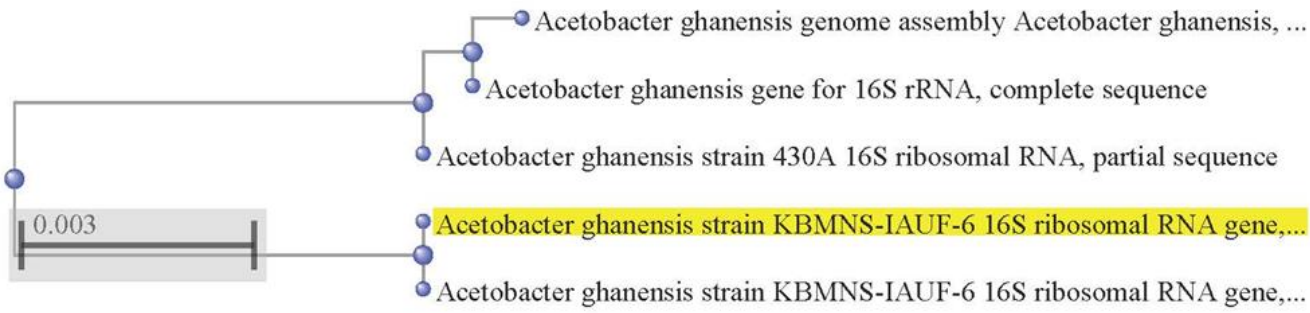


Figure 2. The phylogenetic tree of *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 16S-rDNA sequence deposited in GenBank, NCBI under the accession number of MK968570.

Table 1. Growth rate of Acetobacter ghanensis KBMNS-IAUF-6 in different ethanol concentration after 24 h incubation at constant temperatures of 34, 36, 38 and 40°C.

No	Ethanol (%)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	34°C	4+	4+	3+	2+	2+	2+	1+	-	-*
2	36°C	4+	4+	3+	2+	2+	1+	1+	-	-
3	38°C	4+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	-	-
4	40°C	3+	3+	3+	2+	1+	1+	1+	-	-

*: -: non-growth, 1+: 103>CFU/ml>101, 2+: 105>CFU/ml>103, 3+: 107>CFU/ml>105, 4+: 109>CFU/ml>107

Table 2. Growth rate of Acetobacter ghanensis KBMNS-IAUF-6 in different ethanol concentration after 48 h incubation at constant temperatures of 34, 36, 38 and 40°C.

No	Ethanol (%)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	34°C	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	-	-*
2	36°C	4+	4+	4+	3+	2+	2+	2+	-	-
3	38°C	4+	4+	4+	3+	2+	2+	2+	-	-
4	40°C	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	-	-

*: -: non-growth, 1+: 10^3>CFU/ml>10^1, 2+: 10^5>CFU/ml>10^3, 3+: 10^7>CFU/ml>10^5, 4+: 10^9>CFU/ml>10^7

Table 3. Growth rate of Acetobacter ghanensis KBMNS-IAUF-6 in different ethanol concentration after 72 h incubation at constant temperatures of 34, 36, 38 and 40°C.

No	Ethanol (%)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	34°C	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	-*
2	36°C	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	-
3	38°C	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	-
4	40°C	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	-

*: -: non-growth, 1+: 10^3>CFU/ml>10^1, 2+: 10^5>CFU/ml>10^3, 3+: 10^7>CFU/ml>10^5, 4+: 10^9>CFU/ml>10^7

Table 4. Growth rate of Acetobacter ghanensis KBMNS-IAUF-6 in different ethanol concentration after 96 h incubation at constant temperatures of 34, 36, 38 and 40°C.

No	Ethanol (%)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	34°C	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-*
2	36°C	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	1+	-
3	38°C	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	1+	-
4	40°C	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	1+	-

*: -: non-growth, 1+: 10^3>CFU/ml>10^1, 2+: 10^5>CFU/ml>10^3, 3+: 10^7>CFU/ml>10^5, 4+: 10^9>CFU/ml>10^7

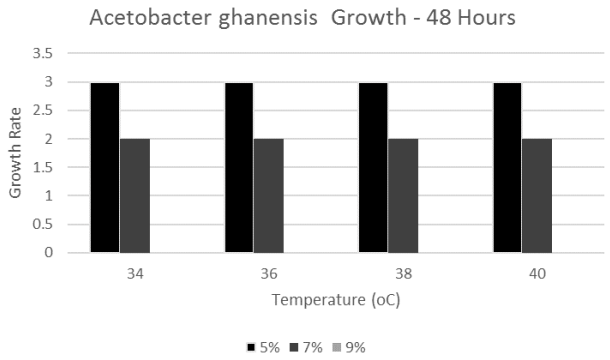


Figure. 4. *A. ghanensis* KBMNS-IAUF-6 growth rate in different ethanol concentrations and temperatures after 48 hours

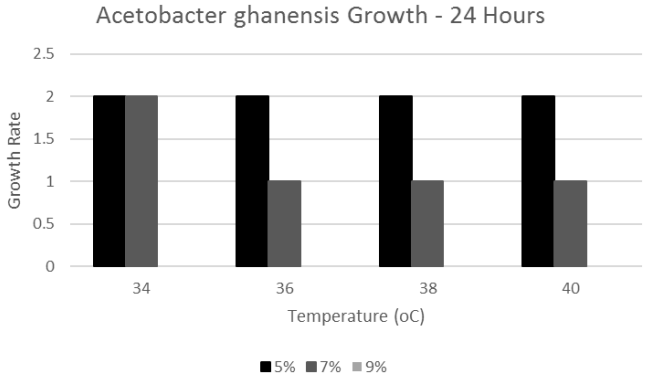


Figure. 3. *A. ghanensis* KBMNS-IAUF-6 growth rate in different ethanol concentrations and temperatures after 24 hours

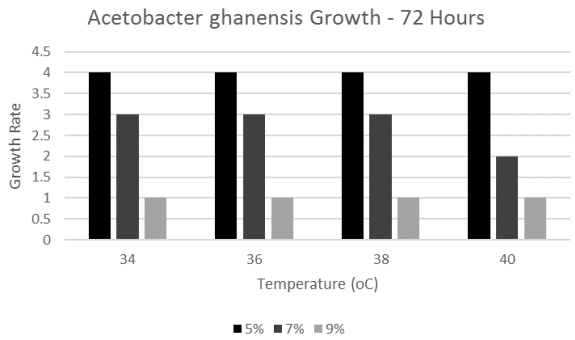


Figure. 5. *A. ghanensis* KBMNS-IAUF-6 growth rate in different ethanol concentrations and temperatures after 72 hours

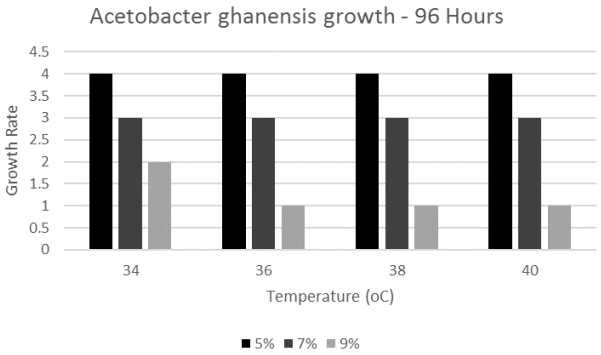


Figure. 6. *A. ghanensis* KBMNS-IAUF-6 growth rate in different ethanol concentrations and temperatures after 96 hours

Molecular characterization of *Acetobacter* isolate. Molecular identification was used to identify this bacterium at species level. The PCR product in this isolate was electrophoresed with the primers of OF BUI and OR BUI. The marker used was 100 bp and the product ranged from 370 to 380 bp. After matching the 16S-rDNA sequence to all sequences in the GenBank genomic database, BLAST software determined that the isolate was identical as *Acetobacter ghanensis* genomic sequence LN309609.1, 98.77% similarity and 94% coverage. The phylogenetic tree of the sequenced fragment showed that this bacterium was genetically most closely related to Acetobacter ghanensis (Fig. 2). Due

to the genomic similarities found, the 16S-rDNA sequence of the isolate obtained at the GenBank, Acetobacter ghanensis KBMNS-IAUF-6, was deposited under the accession number of MK968570.

Evaluation of *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 resistance to different ethanol concentrations at constant temperatures

The growth intensity and acetic acid production of *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 by increasing ethanol content at constant temperatures of 34, 36, 38 and 40°C and constant times of 24, 48, 72 and 96 h decreased in the culture medium (Tables 1 to 4). These results were repeated three times. In Tables 1 to 4, 4+ indicates very high growth rate of AAB equal to 10^9>CFU/ml>10^7, 3+ indicates high growth rate equivalent to 10^7>CFU/ml>10^5, 2+ indicates moderate growth rate equal to 10^5>CFU/ml>10^3, 1+ indicates low growth rate, equivalent to 10^3>CFU/ml>10^1 and - (negative) indicates no growth of AAB in the medium.

Comparison of acetic acid production at different temperatures under constant ethanol content and time

With increasing temperature, growth and acid production in *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 decreased in the culture medium (with constant ethanol levels of 5, 7 and 9%) and at constant times (24, 48, 72 and 96 h) (Figures 3 to 6). These results were repeated three times. In Figures 3 to 6, 4+ indicates very high growth rate of AAB equal to 10^9>CFU/ml>10^7, 3+ indicates high growth rate equal to 10^7>CFU/ml>10^5, 2+ indicates moderate growth rate equivalent to 10^5>CFU/ml>10^3, 1+ indicates low growth and equivalent to 10^3>CFU/ml>10^1 and - (negative) indicates no growth of AAB in the medium.

Discussion and Conclusion

So far, high temperature and ethanol resistant strains of *Acetobacter* have been isolated and identified from fruits such as peaches **(7, 13)**, cherry **(14, 15)**, apricot **(16)** and Rotab-Date palm (10). In the present experiment, banana fruit was used as a source of isolation. In a 2015 study, Klawpiyapamornkun et al., Enriched acetic acid species in medium containing sodium chloride and ethanol and then in medium containing glucose, yeast extract, peptone, glycerol, potato extract, ethanol, agar and bromocruzol. They selected the colonies that turned yellow on their culture medium as acetic acid bacteria. Cyclohexamide was also added to this medium to prevent fungal growth **(6)**. This method was costlier than the method used in this study because of the high diversity of media contents and the potential for acetic acid bacteria to be lost due to the use of ethanol-enriched medium. Sharafi et al. isolated AAB from different fruits after fruit extract by GYC medium (10% glucose, 1% yeast extract, 1.5% agar and 2% calcium carbonate) and also screened by Frateur culture medium. In this way, bacteria were grown that were able to produce acetic acid and dissolve calcium carbonate by oxidizing the glucose in the culture medium **(11)**. This method was suitable for the isolation of different types of AAB, but it is not suitable for isolation of *Acetobacter* species alone because *Acetobacter* spp. are only able to use alcohol and the use of glucose-containing medium makes them difficult to be isolated. In 2008, Moryadee and Pathom-Aree enriched the AAB spp. from various fruits in media containing 4% ethanol for 3 to 5 days at 37°C and then agar medium with purple bromocresol. They selected the colonies with yellow surrounded area as AAB. Due to the mesophilic nature AAB, the use of 37°C in the enrichment medium may kill bacteria that have a high potential for thermo-tolerance **(17)**. In a research, Diba et al. (2015) strains of AAB after enrichment in medium containing 3% acetic acid and 4% ethanol, were cultured in a medium containing yeast extract, polypeptone, glycerol, agar, purple bromocruzol and ethanol. They isolated the colonies containing yellow halo around them as AAB. This method was more expensive than the one used in the present experiment because of the presence of peptone as a nitrogen source **(1)**. The extract obtained in the present experiment was considered a natural enrichment medium for AAB because yeast and acetic acid bacteria in fruit inhibited the growth of other secondary microorganisms, respectively, by producing alcohol and acid. *Acetobacter* species were able to produce acetic acid and dissolve calcium carbonate by oxidizing ethanol in the Frateur medium. These bacteria also changed the color of the bromocresol green medium in the Carr medium, during the oxidation and production of acetic acid, from green to yellow, as well as due to the redox and acetic acid use, from yellow to blue again. In one study, the ability of AAB to grow in yeast extract agar medium containing 4 to 10% ethanol was determined and most of these bacteria were able to grow in medium containing 4 to 6% ethanol but only a few of them were able to grow in medium containing 10% ethanol **(6)**. Beheshti-Maal et al. Reported in 2010 the production of apricot vinegar by an *Acetobacter* strain

isolated from Iranian apricot. The target *Acetobacter* was able to grow in concentrations of 5% -9% ethanol at 30°C **(16)**. In 2009 and 2010, Beheshti-Maal and Shafiei isolated and identified an *Acetobacter* species from Iranian white-red cherry fruit. The species was able to produce acetic acid at concentrations of 5%-9% ethanol at 34-36°C after 72 hours. As the concentration of ethanol increased, the growth rate and consequently the production of acetic acid decreased by the mentioned isolate **(14, 15)**. In 2010, Beheshti-Maal and Shafiei isolated and identified an *Acetobacter* species from Iranian peach fruit. The isolated AAB was able to grow in the presence of 2.5% -5.5% ethanol at 34-40°C after 96 h of incubation. In this study, increasing the percentage of ethanol increased bacterial susceptibility to high temperatures **(7, 13)**. In all of these studies, acetic acid producing isolates were identified at the level of genus and were identified as *Acetobacter.* With the exception of *Acetobacter* isolated from cherry, other isolates were not able to withstand concentrations of more than 5% ethanol at temperatures above 34°C **(7, 13-16)**. In the present experiment, the growth rate of *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 decreased with increasing ethanol at constant temperature due to shock and increased bacterial cell sensitivity. Also, *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 was able to grow in culture medium containing 9% ethanol at 40°C after 72 h. In 2014, it was shown that increasing the amount of ethanol increased the temperature sensitivity in a species of *Acetobacter* isolated from Rotab. Also, with increasing the temperature, the growth of this strain decreased in a constant amount of ethanol **(10)**. In the present experiment, with increasing ethanol content, the susceptibility of *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 to higher temperature and its growth was decreased. For example, the cells' sensitivity to 9% ethanol was greater than that of 7% ethanol at 40°C. Also, with increasing temperature the growth of this strain decreased in constant amounts of ethanol. This is the first report of the isolation of an acetic acid producing bacterium from banana fruit in Iran. According to the results of single-factor optimization, *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6, which was able to grow in a medium containing 9% ethanol at 40°C, was identified as a high temperature and ethanol resistant strain. Therefore, this new strain could be suggested as a viable option for producing banana vinegar on a semi-industrial and industrial scale.

Acknowledgments

This study was originated from a research project No. 28326/301 approved by the Research Council of Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. The authors express their gratitude to the Vice-Chancellor for Research and Technology of the Falavarjan Branch, Islamic Azad University. Also, we are grateful to the Department of Microbiology and Biotechnology of Taligene Pars Co., Isfahan Science and Technology Town, Isfahan, Iran for their scientific and technical support in the field of molecular identification of bacteria.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest reported between authors.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۴ ـ مهر و آبان ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی و شناسایی یک سویه جدید *استوباکتر گانسیس* KBMNS-IAUF-6 از میوه موز، مقاوم به میزان بالای دما و اتانول

کیوان بهشتی مآل[1*]، نوشین شفیعی[2]

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

۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۰

پذیرش:۱۳۹۸/۱۰/۰۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۱۰/۱۰

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM1398;13(3): 251-265

نویسندهٔ مسئول:

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

ایمیل:

beheshtimaal@iaufala.ac.ir

چکیده

زمینه و اهدف: استفاده از سویه های *استوباکتر* مقاوم به اتانول و دما برای تولید سرکه در مقیاس صنعتی اهمیت دارد. هدف از این بررسی جداسازی و شناسایی سویه های *استوباکتر* مقاوم به میزان بالای دما و اتانول به عنوان استارتر تولید سرکه بود.

مواد و روش کار: عصاره الکلی موز به محیط فراتیور منتقل و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰°C، کلنی های دارای هاله شفاف به عنوان باکتری های استیک اسید، خالص و از نظر میکروسکوپی و ماکروسکوپی بررسی شدند. مقاومت نسبت به دمای بالا در میزان اتانول و زمان ثابت و مقاومت نسبت به میزان بالای اتانول در دما و زمان ثابت بررسی شدند.

یافته‌ها: بررسی های جدایه در محیط کار نشان داد که این باکتری گونه ای *استوباکتر* است. با توجه به نتایج بهینه سازی به روش تک فاکتوره، این گونه قادر به رشد در محیط کار حاوی ۹٪ اتانول در دمای ۴۰°C پس از ۷۲ ساعت بود.

نتیجه‌گیری: این اولین گزارش از جداسازی باکتری اسید استیک از موز در ایران است. ترادف ژنومی 16S-rDNA این باکتری، به عنوان یک سویه جدید مقاوم به میزان بالای اتانول و دما، به نام *استوباکتر گانسیس* KBMNS-IAUF-6 تحت شماره دسترسی MK968570 در بانک جهانی ژن در پایگاه NCBI به ثبت رسید. این سویه جدید می تواند به عنوان یک سویه مقاوم نسبت به میزان بالای دما و اتانول، برای تولید سرکه موز در مقیاس نیمه صنعتی و صنعتی پیشنهاد شود.

کلید واژه‌ها: *استوباکتر گانسیس*، باکتری های مولد اسید استیک، بیوتکنولوژی صنعتی و غذایی، سویه مقاوم به دما و اتانول

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

بر اساس تعریف سازمان غذا و دارو در ایالات متحده، سرکه یک محلول ترش مزه حاوی حداقل ۴ درصد استیک اسید است. استیک اسید در سرکه توسط باکتری های استیک اسید تولید می شود. کیفیت تولید سرکه به نوع باکتری استیک اسید، سوبسترا و روش استفاده شده در تولید آن بستگی دارد (۱-۳). اخیرا کارخانه های تولید کننده سرکه در حال جستجوی انواع جدید سرکه با استفاده از انواع مختلف باکتری های استیک اسید به عنوان استارتر هستند. زیرا هر استارتر میکروبی، علاوه بر استیک اسید ۵۰ نوع ماده معطر دیگر نیز تولید می کند. بنابراین سرکه حاصل شده توسط این سویه ها، دارای طعم جدید خواهد بود. باکتری های استیک اسید از انواع سوبستراهای طبیعی مانند میوه، سیب زمینی و برنج جداسازی می شوند. از انواع مختلف سرکه که تا کنون شناخته شده است می توان سرکه شراب، سرکه سفید، سرکه شری، سرکه بالزامیک، سرکه آبجو، سرکه مالت، سرکه جو، سرکه برنج، سرکه پیاز و سرکه سیب زمینی را نام برد (۴، ۵). باکتری های استیک اسید باسیل های گرم منفی و هوازی اجباری هستند. در حال حاضر ۱۲ جنس در این خانواده وجود دارد که شامل *استوباکتر، گلوکونوباکتر، اسیدوموناس، گلوکوناستوباکتر، آسائیا، کوزاکیا، سوآمیناتانیا، ساکاری باکتر، نئوآسائیا، گرانولی باکتر، تانتی کاروئنیا، آمیامائیا* می باشد (۶). از بین باکتری های استیک اسید، گونه های *استوباکتر* برای تولید سرکه در مقیاس صنعتی مناسب تر هستند زیرا مستقیما از اتانول به عنوان یک سوبسترای ارزان قیمت استفاده کرده و همچنین به غیر از استیک اسید محصول دیگری تولید

نمی کنند. گونه های *استوباکتر* شیمیولیتوتروف، متحرک یا غیر متحرک، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، مزوفیل و دارای توانایی اکسیداسیون مجدد می باشد. در گونه های *استوباکتر* طی فرایند اکسیداسیون و اکسیداسیون مجدد به ترتیب اتانول به استیک اسید و سپس استیک اسید به دی اکسید کربن اکسید می شود. فرایند اکسیداسیون مجدد زمانی اتفاق می افتد که میزان اکسیژن زیاد باشد ولی اتانول در محیط نباشد. بنابراین در فرآیند تولید سرکه میزان غلظت اتانول به عنوان سوبسترا بسیار اهمیت دارد (۷). روش سنتی، به عنوان اولین فرآیند صنعتی تولید سرکه، در بشکه های روباز انجام شد. باوجود کیفیت بالای محصول، این روش کند بود. در قرن نوزدهم، تخمیرهای سطحی، به شکل روش های سریعتری نمود پیدا کرد. یکی از این روش ها، ژنراتور قطره ای بود، که امروزه نیز مورد استفاده قرار می گیرد. در شروع سال ۱۹۴۹، روش های تخمیر غوطه وری توسعه یافتند. بنابراین هدف تکنولوژی های جدید، تولید سرکه با کیفیت بالا و ارزان قیمت در زمان کوتاه می باشد. بنابراین متدهای اخیر تولید سرکه شامل استفاده از روش غوطه وری در استاتور می باشد (۸، ۹، ۴). به دلیل مصرف بالای انرژی برای سرد کردن استاتور، 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* برای بقا مجبورند استات را اکسید کنند ولی در صورت زیاد بودن میزان اتانول، پدیده اکسیداسیون مجدد در این باکتری ها اتفاق نمی افتد. با توجه به مزوفیل بودن و حساسیت باکتری نسبت به غلظت بالای اتانول، بهینه سازی گونه های مختلف *استوباکتر* در تولید سرکه به منظور افزایش مقاومت آن ها نسبت به میزان بالای دما و اتانول ضرورت دارد (۱۰). بنابراین هدف از این بررسی جداسازی و شناسایی گونه های جدید *استوباکتر* مقاوم به میزان بالای اتانول و دما از میوه موز به منظور تولید سرکه با طعم جدید بود.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی و محیط های کشت

مواد شامل کیت رنگ آمیزی گرم (Taligene Pars Co., ISTT, Iran)، آب اکسیژنه و دیسک اکسیداز (Merck, Germany) بود. همچنین محیط کشت های به کار رفته در این تحقیق شامل محیط کشت کارر [عصاره مخمر، ۳٪(شارلو، اسپانیا)؛ آگار، ۲٪ (Merck, Germany)؛ بروموکرزول گرین، ۰/۰۰۲٪ (Merck, Germany)؛ آب مقطر استریل، ۱۰۰ میلی لیتر و اتانول، ۲٪(Merck, Germany)] و محیط کشت فراتیور [عصاره مخمر، ۲٪؛ کربنات کلسیم، ۲٪ (Merck, Germany)؛ آگار، ۲٪؛ آب مقطر استریل، ۱۰۰ میلی لیتر و اتانول، ۲٪] بود.

جداسازی اولیه سویه های مختلف باکتری های استیک اسید

موز رسیده و شیرین، تا زمان رویت مگس میوه و استشمام بوی ترشیدگی، در دمای اتاق داخل کابینت تمیز قرار داده شد. پس از پوست کندن و فشرده ساختن ساختار موز به وسیله هاون استریل، عصاره به دست آمده از موز به بطری استریل ۲ لیتری، به میزان نصف حجم آن منتقل شد. همچنین برای جلوگیری از انفجار بطری به دلیل تولید دی اکسیدکربن توسط مخمرهای موجود در این میوه، چند سوراخ بالای آن ایجاد شد. این بطری به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای اتاق داخل کابینت تمیز قرار داده شد (۷). سپس میزان ۵۰ میکرولیتر از رقت های 10^{-1} تا 10^{-5} این عصاره، در محیط فراتیور کشت خطی داده شد. پس از قرار گیری این پلیت ها در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت، کلنی هایی که اطرافشان هاله شفاف بودند، در همان محیط خالص سازی شدند. سپس ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه ها پس از کشت ۲۴ ساعته آن در محیط فراتیور و کارر بررسی شد (۱۱).

غربال گری گونه های مختلف *استوباکتر*

برای غربال گری گونه های *استوباکتر* از سایر باکتری های استیک اسید، جدایه ای که کشت ۲۴ ساعته آن در محیط کارر و فراتیور، از نظر بیوشیمیایی کاتالاز مثبت-اکسیداز منفی بود و همچنین تا ۴۸ ساعت پس از رشدش رنگ محیط کارر را زرد و پس از ۷۲ ساعت مجددا آبی کرد، به عنوان گونه ای *استوباکتر* غربال گری شد (۱۱).

شناسایی مولکولی گونه های جداسازی شده *استوباکتر*

چند کلنی خالص از کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر از محیط کشت کارر به ۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل منتقل شد. ۱۰ میلی لیتر از این سوسپانسیون به یک فالکون ۱۵ میلی لیتری استریل منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت دور ریخته شد و به میزان یک میلی گرم از بیوماس باکتری برای استخراج DNA به کیت استخراج DNA (Bioneer, South Korea) منتقل شد. در این تحقیق از پرایمرهای عمومی طراحی و ساخته شده توسط شرکت Taligene Pars واقع در شهرک علمی-تحقیقاتی اصفهان در ایران بنام OF BUI و OR BUI به ترتیب به عنوان پرایمر رفت با توالی

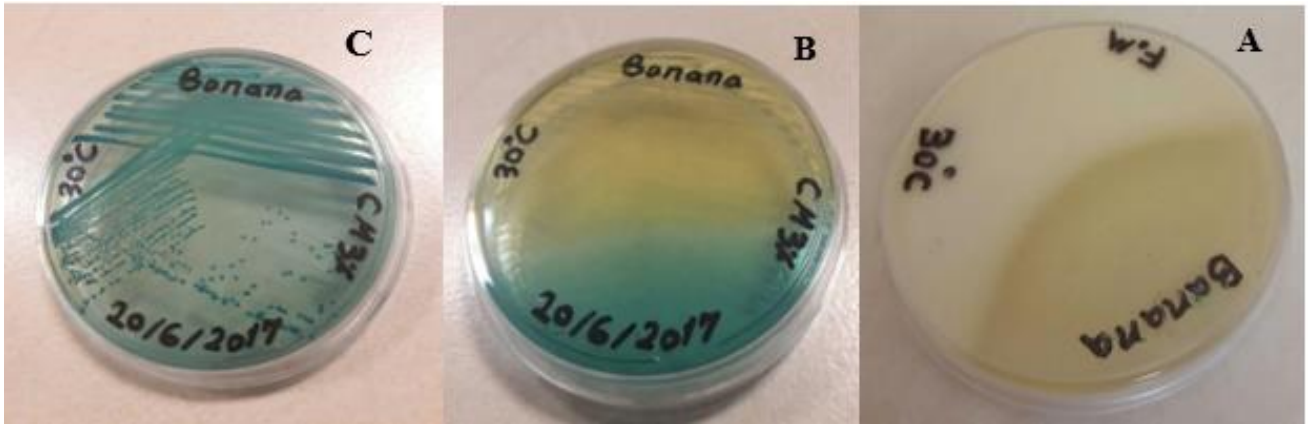
5´-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3´ و همپنین پرایمر برگشت با ترادف 5´-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3´ استفاده شد. برنامه PCR شامل دمای اولیه ۹۶°C به مدت ۴ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل با دماهای به ترتیب ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه، ۵۵°C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه بود. مراحل پایانی به ترتیب شامل دمای ۷۲°C به مدت ۴ دقیقه و ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. وزن مولکولی مورد انتظار محصول PCR ۳۷۰ جفت باز بود (۱۲). محصول PCR و پرایمرها برای تعیین توالی به شرکت تالی ژن پارس ارسال گردید. این توالی ها با استفاده از نرم افزارهای Finch TV V.1.4.0 و Mega 6 بررسی و تشابه آن ها با توالی های ژنومی موجود در GenBank با به کارگیری نرم افزار بلاست (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) بررسی گردید. در نهایت توالی 16srDNA سویه جداسازی شده در بانک ژنومی، NCBI ثبت شد.

بهینه سازی تک فاکتوره مقاومت به میزان بالای اتانول و دما در جدایه *استوباکتر*

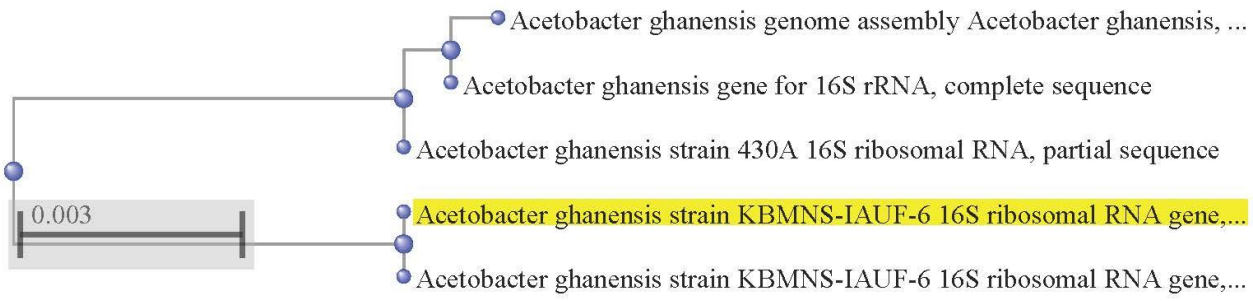
این آزمایش به منظور انتخاب سویه های *استوباکتر* مقاوم به میزان بالای الکل و دما صورت گرفت. در این بررسی میزان تولید اسید و رشد جدایه بر حسب واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU) در محیط کارر با مقادیر مختلف اتانول (۲ تا۱۰٪) در دماهای ثابت ۳۴، ۳۶، ۳۸ و C ۴۰ ° پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی شد. همچنین میزان رشد و تولید اسید در این جدایه در شرایط دمایی متفاوت (۳۴، ۳۶، ۳۸ و ۴۰°C) در محیط کشت کارر با میزان ثابت اتانول (۵، ۷ و ۹٪) پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مقایسه گردید (۶).

نتایج

جداسازی و خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی جدایه *استوباکتر*. در این آزمایش یک سویه باکتری استیک اسید با ایجاد هاله شفاف در محیط فراتیور پس از ۷۲ ساعت جداسازی شد (شکل ۱A). بررسی خصوصیات ماکروسکوپی کشت ۲۴ ساعته این باکتری در محیط کارر و فراتیور نشان داد که کلنی های رشد یافته گرد، ریز، بیرنگ، شفاف، نرم و دارای بوی ترشیدگی بودند. همچنین خصوصیات میکروسکوپی جدایه در این دو محیط نشان داد که این باکتری ها میله ای شکل و گرم منفی بودند. طبق نتایج حاصل از غربال گری، این جدایه کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی، دارای خاصیت اکسیداسیون (شکل ۱B) و اکسیداسیون مجدد (شکل ۱C) بود. بنابراین این جدایه به عنوان یک گونه *استوباکتر* شناسایی شد.



شکل ۱. امصرف کربنات کلسیم در محیط فراتیور توسط سویه جداسازی شده از موز پس از ۷۲ ساعت (A)، فرآیند اکسیداسیون توسط جدایه پس از ۲۴ ساعت در محیط کارر (B)، فرآیند اکسیداسیون مجدد توسط جدایه پس از ۷۲ ساعت (C).



شکل ۲. درخت فیلوزنیک *استوباکتر گانسیس* KBMNS-IAUF-6 به شماره دسترسی MK968570 در بانک جهانی ژن، NCBI

جدول ۱. میزان رشد استوباکتر گانسیس KBMNS-IAUF-6 در مقادیر مختلف اتانول پس از ۲۴ ساعت در دماهای ثابت ۳۴، ۳۶، ۳۸ و ۴۰°C

ردیف	اتانول(٪)	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	۳۴°C	+۴	+۴	+۳	+۲	+۲	+۲	+۱	–	–*
۲	۳۶°C	+۴	+۴	+۳	+۲	+۲	+۱	+۱	–	–
۳	۳۸°C	+۴	+۳	+۳	+۲	+۲	+۱	+۱	–	–
۴	۴۰°C	+۳	+۳	+۳	+۲	+۱	+۱	+۱	–	–

*: – : عدم رشد، ۱+ : $10^3 > CFU/ml > 10^1$، ۲+ : $10^5 > CFU/ml > 10^3$، ۳+ : $10^7 > CFU/ml > 10^5$، ۴+ : $10^9 > CFU/ml > 10^7$

جدول ۲. میزان رشد استوباکتر گانسیس KBMNS-IAUF-6 در مقادیر مختلف اتانول پس از ۴۸ ساعت در دماهای ثابت ۳۴، ۳۶، ۳۸ و ۴۰°C

ردیف	اتانول(٪)	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	۳۴°C	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۲	+۲	–	–*
۲	۳۶°C	+۴	+۴	+۴	+۳	+۲	+۲	+۲	–	–
۳	۳۸°C	+۴	+۴	+۴	+۳	+۲	+۲	+۲	–	–
۴	۴۰°C	+۴	+۴	+۴	+۳	+۲	+۲	+۱	–	–

*: – : عدم رشد، ۱+ : $10^3 > CFU/ml > 10^1$، ۲+ : $10^5 > CFU/ml > 10^3$، ۳+ : $10^7 > CFU/ml > 10^5$، ۴+ : $10^9 > CFU/ml > 10^7$

جدول ۳. میزان رشد استوباکتر گانسیس KBMNS-IAUF-6 در مقادیر مختلف اتانول پس از ۷۲ ساعت در دماهای ثابت ۳۴، ۳۶، ۳۸ و ۴۰°C

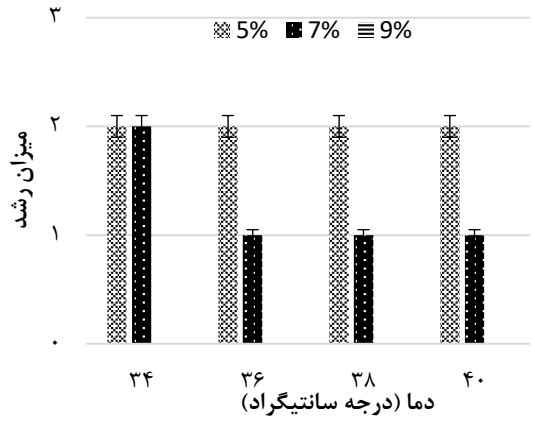
ردیف	اتانول(٪)	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	۳۴°C	+۴	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۲	+۱	–*
۲	۳۶°C	+۴	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۲	+۱	–
۳	۳۸°C	+۴	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۲	+۱	–
۴	۴۰°C	+۴	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۲	+۱	–

*: – : عدم رشد، ۱+ : $10^3 > CFU/ml > 10^1$، ۲+ : $10^5 > CFU/ml > 10^3$، ۳+ : $10^7 > CFU/ml > 10^5$، ۴+ : $10^9 > CFU/ml > 10^7$

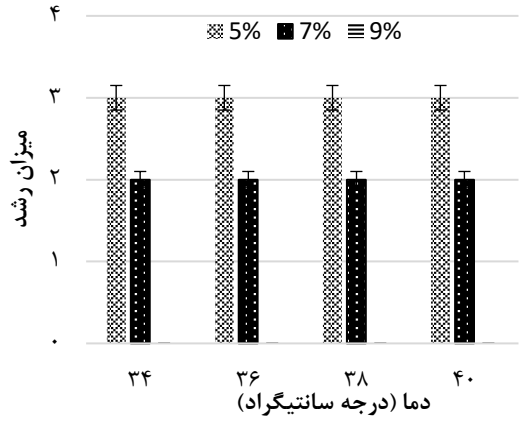
جدول ۴. میزان رشد استوباکتر گانسیس KBMNS-IAUF-6 در مقادیر مختلف اتانول پس از ۹۶ ساعت در دماهای ثابت ۳۴، ۳۶، ۳۸ و ۴۰°C

ردیف	اتانول(٪)	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	۳۴°C	+۴	+۴	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۲	–*
۲	۳۶°C	+۴	+۴	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۱	–
۳	۳۸°C	+۴	+۴	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۱	–
۴	۴۰°C	+۴	+۴	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	+۱	–

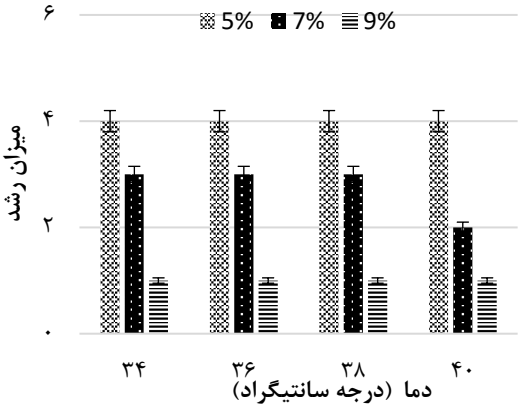
*: - : عدم رشد، ۱+ : $10^3 > CFU/ml > 10^2$، ۲+ : $10^5 > CFU/ml > 10^3$، ۳+ : $10^7 > CFU/ml > 10^5$، ۴+ : $10^9 > CFU/ml > 10^7$



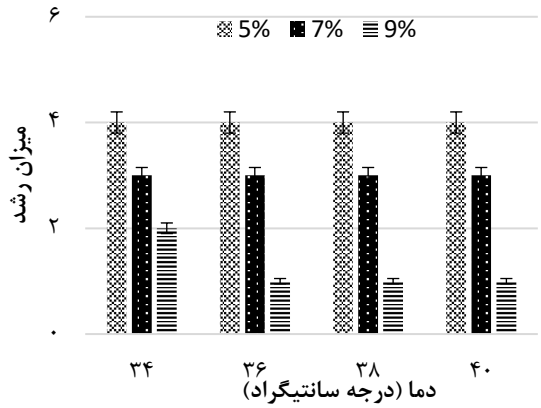
نمودار ۱. میزان رشد در دماهای مختلف و میزان اتانول ثابت (۵، ۷ و ۹٪) در *استوباکتر گاننسیس* KBMNS-IAUF-6 پس از ۲۴ ساعت



نمودار ۲. میزان رشد در دماهای مختلف و میزان اتانول ثابت (۵، ۷ و ۹٪) در *استوباکتر گاننسیس* KBMNS-IAUF-6 پس از ۴۸ ساعت



نمودار ۱. میزان رشد در دماهای مختلف و میزان اتانول ثابت (۵، ۷ و ۹٪) در *استوباکتر گاننسیس*KBMNS-IAUF-6 پس از ۷۲ ساعت



نمودار ۱. میزان رشد در دماهای مختلف و میزان اتانول ثابت (۵، ۷ و ۹٪) در *استوباکتر گاننسیس*KBMNS-IAUF-6 پس از ۹۶ ساعت

خصوصیات مولکولی جدایه *استوباکتر*

برای شناسایی این باکتری در حد گونه، از روش شناسایی مولکولی استفاده شد. محصول PCR در این جدایه با پرایمر های OF BUI و OR BUI الکتروفورز شد. مارکر مورد استفاده ۱۰۰ جفت باز بوده و محصول بین ۳۸۰-۳۷۰ جفت باز قرار گرفت. پس از تطابق دادن توالی 16S-rDNA با تمام توالی های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی GenBank، توسط نرم افزار BLAST مشخص گردید که این جدایه با توالی زنومی *استوباکتر گاننسیس به شماره ثبت* LN309609.1، ۹۸/۷۷٪ مشابهت و ۹۴٪ پوشش داشت. درخت فیلوژنی قطعه ترادف یابی شده نشان داد که این باکتری از نظر ژنتیکی، بیشترین نزدیکی را به *استوباکتر گاننسیس* دارد (شکل ۲). با توجه به مشابهت های یافت شده ژنومی، توالی 16S-rDNA جدایه به دست آمده در بانک جهانی ژن، NCBI، به نام *استوباکتر گاننسیس* KBMNS-IAUF-6 تحت شماره دسترسی MK968570 به ثبت رسید.

بررسی مقاومت *استوباکتر گاننسیس* KBMNS-IAUF-6 نسبت به درصدهای مختلف اتانول در دمای ثابت

شدت رشد و تولید استیک اسید *استوباکتر گاننسیس* KBMNS-IAUF-6 با افزایش میزان اتانول در دماهای ثابت۳۴، ۳۶، ۳۸ و

°۴۰C و زمان های ثابت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در محیط کشت کارر کاهش یافت (جدول های ۱ تا ۴). این نتایج حاصل سه بار تکرار بود. در جداول ۱ تا ۴ میزان ۴+ نشان دهنده رشد بسیار زیاد و معادل با $۱۰^{۹} < CFU/ml < ۱۰^{۷}$، میزان ۳+ نشان دهنده رشد زیاد و معادل با $۱۰^{۷} < CFU/ml < ۱۰^{۵}$ ، میزان ۲+ نشان دهنده رشد متوسط معادل با $۱۰^{۵} < CFU/ml < ۱۰^{۳}$ ، میزان ۱+ نشان دهنده رشد کم و معادل با $۱۰^{۳} < CFU/ml < ۱۰^{۱}$ و میزان – (منفی) نشان دهنده عدم رشد در محیط کشت است.

مقایسه تولید استیک اسید در دماهای متفاوت تحت میزان ثابت اتانول و زمان

با افزایش دما، رشد و تولید اسید در *استوباکتر گاننسیس* KBMNS-IAUF-6 در محیط کشت کارر (با سطوح ثابت اتانول ۵، ۷ و ۹٪) و زمان های ثابت (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) کاهش یافت(نمودارهای ۱ تا ۴). این نتایج حاصل سه بار تکرار بود. در نمودارهای ۱ تا ۴ میزان ۴+ نشان دهنده رشد بسیار زیاد و معادل با $۱۰^{۹} < CFU/ml < ۱۰^{۷}$، میزان ۳+ نشان دهنده رشد زیاد و معادل با $۱۰^{۷} < CFU/ml < ۱۰^{۵}$ ، میزان ۲+ نشان دهنده رشد متوسط معادل با $۱۰^{۵} < CFU/ml < ۱۰^{۳}$ ، میزان ۱+ نشان دهنده رشد کم و معادل با $۱۰^{۳} < CFU/ml < ۱۰^{۱}$ و میزان – (منفی) نشان دهنده عدم رشد در محیط کشت است.

بحث

تاکنون گونه های مختلف *استوباکتر* مقاوم به میزان بالای دما و اتانول از میوه هایی مانند هلو (۷، ۱۳) گیلاس (۱۴، ۱۵) زرد آلو (۱۶) و رطب (۱۰) جداسازی و شناسایی شده اند. در آزمایش حاضر از میوه موز به عنوان منبع جداسازی استفاده گردید. در تحقیقی، Klawpiyapamornkun و همکاران در سال ۲۰۱۵، گونه های باکتری های استیک اسید را در محیط حاوی کلرید سدیم و اتانول غنی کرده و سپس در محیط حاوی گلوکز، عصاره مخمر، پپتون، گلیسرول، عصاره سیب زمینی، اتانول، آگار و بروموکرزول ارغوانی کشت دادند. ایشان کلنی هایی که رنگ محیط کشت اطرافشان را زرد کردند را به عنوان باکتری های استیک اسید انتخاب کردند. همچنین برای جلوگیری از رشد قارچ به این محیط، سیکلوهگزامید افزودند (۶). این روش در مقایسه با روش انجام شده در این بررسی به دلیل تنوع زیاد محتویات محیط کشت، پرهزینه تر و همچنین امکان هدر رفتن باکتری های استیک اسید به دلیل استفاده از محیط غنی سازی حاوی اتانول بیشتر بود. Sharafi و همکاران در سال ۲۰۱۰، سویه های باکتری های استیک اسید را پس از ایجاد عصاره الکلی میوه، توسط محیط GYC (۱۰٪ گلوکز، ۱٪ عصاره مخمر، ۱/۵٪ آگار و ۲٪ کربنات کلسیم) جداسازی و همچنین توسط محیط کشت کارر غربال گری کردند. در این روش باکتری هایی رشد کردند که با اکسید کردن گلوکز موجود در محیط کشت، قادر به تولید اسید استیک و حل کردن کربنات کلسیم بودند (۱۱). این روش برای جداسازی انواع مختلف باکتری های استیک اسید مناسب بود ولی برای جداسازی صرفا گونه های *استوباکتر* مناسب نیست زیرا گونه های *استوباکتر* فقط قادر به استفاده از الکل می باشند و استفاده از محیط حاوی گلوکز جداسازی آن ها را مشکل می کند. Moryadee and Pathom-Aree در سال ۲۰۰۸، گونه های باکتری های استیک اسید را از میوه های مختلف توسط آب مقطر حاوی ۴٪ اتانول، به مدت ۳ تا ۵ روز، در دمای ۳۷°C غنی سازی کرده و سپس در محیط سیب زمینی آگار دارای بروموکرزول ارغوانی کشت دادند. ایشان کلنی هایی که اطرافشان هاله زرد بود را به عنوان باکتری های استیک اسید انتخاب کردند. با توجه به مزوفیل بودن باکتری های استیک اسید استفاده از دمای ۳۷°C در محیط کشت غنی سازی، ممکن است باکتری هایی که توانایی بالایی برای ترموتولرانت شدن دارند، را از بین ببرد (۱۷). درتحقیقی، Diba و همکاران در سال ۲۰۱۵، گونه های باکتری های استیک اسید را پس از غنی سازی در محیط حاوی ۳٪ استیک اسید و ۴٪ اتانول، در محیط کشت حاوی عصاره مخمر، پلی پپتون، گلیسرول، آگار، بروموکرزول ارغوانی، استیک اسید و اتانول کشت دادند. ایشان کلنی هایی که حاوی هاله زرد در اطرافشان بودند را به عنوان باکتری های استیک اسید جداسازی کردند. این روش در مقایسه با روش به کار برده شده در آزمایش حاضر به دلیل وجود پپتون به عنوان منبع نیتروژن گران تر بود (۱). روش جداسازی گونه های مختلف *استوباکتر* در آزمایش حاضر که شامل تهیه عصاره میوه و کشت آن در محیط فراتیور بود، نسبت به سایر روش های جداسازی نام برده سریع تر، کم هزینه تر و همچنین احتمال هدر رفتن باکتری های استیک اسید به دلیل استفاده از دمای ۳۰°C بسیار کمتر بود. عصاره تهیه شده در آزمایش حاضر یک محیط غنی سازی طبیعی برای باکتری های استیک اسید محسوب شد زیرا مخمر و باکتری های استیک اسید موجود در میوه به ترتیب با تولید الکل و اسید، رشد میکروارگانیسم های ثانویه دیگر را محدود کردند. گونه های *استوباکتر* با اکسید کردن اتانول موجود در محیط فراتیور قادر به تولید اسید استیک و حل کردن کربنات کلسیم بودند. همچنین این باکتری ها رنگ محیط کشت حاوی 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، مجددا از زرد به آبی تغییر دادند. در تحقیقی، توانایی رشد باکتری های استیک اسید در محیط عصاره مخمر-آگار حاوی ۴ تا ۱۰٪ اتانول بررسی و مشخص شد که اکثر این باکتری ها قادر به رشد در محیط حاوی ۴ تا ۶٪ اتانول بودند، فقط تعداد معدودی از آن ها در محیط حاوی۱۰٪ اتانول رشد کردند **(۶)**. Beheshti-Maal و همکاران در سال ۲۰۱۰ تولید سرکه زردآلو توسط یک گونه *استوباکتر* جداسازی شده از زردآلوی ایرانی را گزارش نمودند. *استوباکتر* مورد نظر قادر به رشد در غلظت های ٪۹-٪۵ اتانول و در دمای ۳۰°C بود **(۱۶)**. Beheshti-Maal and Shafiei در سال های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ موفق شدند از میوه گیلاس سفید-قرمز ایرانی یک گونه *استوباکتر* را جداسازی و شناسایی نمایند. گونه مذکور در غلظت های ٪۹-٪۵ اتانول و در دمای °C ۳۶-۳۴ بعد از ۷۲ ساعت قادر به تولید اسید استیک بود. با افزایش غلظت اتانول، سرعت رشد و بالطبع تولید اسید استیک توسط جدایه مذکور کاهش یافت **(۱۵، ۱۴)**. Beheshti-Maal and Shafiei در سال ۲۰۱۰ طی تحقیقی یک گونه *استوباکتر* را از میوه هلوی ایرانی جداسازی و شناسایی نمودند. استوباکتری مورد نظر قادر به رشد در حضور ٪۵-٪۲/۵ اتانول و در دمای °C۴۰-۳۴ پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون بود. در تحقیق مذکور افزایش درصد اتانول باعث افزایش حساسیت باکتری در برابر دمای بالا شده بود **(۷، ۱۳)**. در تمامی تحقیقات مذکور جدایه های مولد اسید استیک در حد جنس شناسایی شده بودند و متعلق به جنس *استوباکتر* تشخیص داده شدند. به غیر از *استوباکتر* جداسازی شده از گیلاس بقیه جدایه ها قادر به تحمل همزمان غلظت بالاتر از ٪۵ اتانول در دمای بالاتر از °C ۳۴ نبودند **(۷، ۱۶-۱۳)**. در آزمایش حاضر نیز میزان رشد *استوباکتر گانسیس* KBMNS-IAUF-6 با افزایش میزان اتانول در دمای ثابت به دلیل شوکه شدن و افزایش حساسیت سلول باکتری کاهش یافت. همچنین *استوباکتر گانسیس* KBMNS-IAUF-6 قادر به رشد در محیط کشت حاوی ۹٪ اتانول در دمای °C۴۰ پس از ۷۲ ساعت بود. در سال ۲۰۱۴ نشان داده شد که افزایش میزان اتانول باعث افزایش حساسیت به دما در گونه ای از *استوباکتر* جداسازی شده از رطب می شود. همچنین با افزایش دما رشد این جدایه در میزان ثابت اتانول کاهش یافت **(۱۰)**. در آزمایش حاضر با افزایش درصد اتانول، میزان حساسیت *استوباکتر گانسیس* KBMNS-IAUF-6 به افزایش دما بیشتر و رشد آن کمتر شد. برای مثال حساسیت سلول های این باکتری نسبت به اتانول ۹٪ بیشتر از اتانول ۷٪ در دمای °C۴۰ بود. همچنین با افزایش دما رشد این سویه در مقادیر ثابت اتانول کاهش یافت. این اولین گزارش از جداسازی یک باکتری مولد اسید استیک از میوه موز در ایران محسوب می شود. طبق نتایج حاصل از بهینه سازی به روش تک فاکتوره، *استوباکتر گانسیس* KBMNS-IAUF-6 که قادر به رشد در محیط کشت حاوی ۹٪ اتانول در دمای °C۴۰ بود، به عنوان یک سویه مقاوم نسبت به میزان بالای دما و اتانول شناخته شد. بنابراین این سویه جدید می تواند به عنوان یک گزینه مناسب برای تولید سرکه موز در مقیاس نیمه صنعتی و صنعتی پیشنهاد شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق مربوط به طرح پژوهشی مصوبه شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به شماره ۳۰۱/۲۸۳۲۶ می باشد. نویسندگان مراتب تشکر خود را از معاونت علمی و شورای پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان اعلام می نمایند. همچنین از گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی شرکت دانش بنیان تالی ژن پارس، شهرک علمی و تحقیقاتی اصفهان، به خاطر حمایت های علمی و فنی در زمینه شناسایی مولکولی باکتری ها قدردانی می گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع گزارش نشده است.

Referance

1. Diba F, Alam F, Talukder A. Screening of acetic acid producing microorganisms from decomposed fruits for vinegar production. Adv Microbiol. 2015; 5:291-7. [DOI:10.4236/aim.2015.55028]
2. Gullo M, Giudici P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter culture selection. Food Microbiol. 2008; 125(1):46-53. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.076] [PMID]
3. Nishidal S, Nakamura Y, Torikal K, Yamamoto M. Kurosu M. A traditional vinegar produced from unpolished rice, suppresses lipid peroxidation in vitro and in mouse skin. Biosci Biotechnol Biochem. 2000; 64(9):1909-14. [DOI:10.1271/bbb.64.1909] [PMID]
4. Mas A, Torija MJ. Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. Sci World J. 2014; Article ID: 394671 [DOI:10.1155/2014/394671] [PMID] [PMCID]

5. Juan Ye X, Morimura S, Shu Han L, Shigematsu T, Kida K. In vitro evaluation of physiological activity of vinegar production from barley-, sweet potato-, and rice-shochu post-distillation slurry. Biosci Biotechnol Biochem. 2004; 68(3):551-6. [DOI:10.1271/bbb.68.551] [PMID]
6. Klawpiyapamornkun T, Bovonsombut S, Bovonsombut S. Isolation and characterization of acetic acid bacteria from fruit and fermented fruit juices for vinegar production. Food Appl Biosci J. 2015; 3(1):30-8.
7. Beheshti Maal K, Shafiee R. A Thermotolerant Acetobacter strain isolated from Iranian peach suitable for industrial microbiology. Asian J Biol Sci. 2011; 4(3):244-51. [DOI:10.3923/ajbs.2011.244.251]
8. Ori I, Romero L, Cantero D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. strain, wood chips and polyurethane foam as carriers for Acetobacter aceti. Process Biochem. 2004; 39(5):547-55. [DOI:10.1016/S0032-9592(03)00136-5]
9. Tesfaye W, Morales ML, Garcia Parrilla MC, Troncoso AM. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. Trends Food Sci Technol. 2002; 13(1):12-21. [DOI:10.1016/S0924-2244(02)00023-7]
10. Beheshti Maal K. Identification of a thermo-tolerant Acetobacter strain isolated from Iranian date palm (rotab) suitable for date vinegar production in agricultural biotechnology. Adv Environ Biol. 2014; 8(10):1063-71.
11. Sharafi SM, Rasooli I, Beheshti Maal K. Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation method. Iranian J Microbiol. 2010; 2(1):38-45.
12. Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral Streptococci in saliva samples using GTF genes. Diag Microbiol Infect Dis. 2004; 48(3):195-9. [DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2003.10.002] [PMID]
13. Beheshti-Maal K, Shafiee R. Characterization of an Acetobacter strain isolated from Iranian peach that tolerates high temperatures and ethanol concentrations. Int J Biotechnol Bioeng. 2010; 4(2):146-50.
14. Beheshti-Maal K, Shafiee R. Isolation and identification of an Acetobacter strain from Iranian white-red cherry with high acetic acid productivity as a potential strain for cherry vinegar production in food and agriculture biotechnology. World Acad Sci Eng Technol. 2009; 3(6):201-4.
15. Beheshti-Maal K, Shafiee R. Isolation and characterization of an Acetobacter strain from Iranian white-red cherry as a potential strain for cherry vinegar production in microbial biotechnology. Asian J Biotechnol. 2010; 2(1):53-59. [DOI:10.3923/ajbkr.2010.53.59]
16. Beheshti-Maal K, Shafiei R, Kabiri N. Production of apricot vinegar using an isolated Acetobacter strain from Iranian apricot. Int J Biol Life Sci. 2010; 4(11):230-3.
17. Moryadee A, Pathom-Aree W. Isolation of thermotolerant acetic acid bacteria from fruits for vinegar production. Res J Microbiol. 2008; 3(1):209-12. [DOI:10.3923/jm.2008.209.212]