جداسازی و شناسائی سویه جدید *استوباکتر اوکینانونسیس* از شلیل ایرانی مقاوم به دما و غلظت بالای اتانول مناسب برای تولید سرکه شلیل

کیوان بهشتی مآل*[1]، نوشین شفیعی[1]

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۷

چکیده

اخیراً تولید انواع سرکه با استفاده از سویه های جدید باکتری های مولد استیک اسید در صنعت چالش برانگیز است. هدف از این تحقیق جداسازی و خالص سازی سویه های جدید باکتری های مولد اسید استیک با ویژگی های تحمل به دمای بالا و غلظت های بالای اتانل بود. نمونه گیری از میوه شلیل انجام شد. برای جداسازی باکتری های مولد اسید استیک (AAB)† از محیط های کشت کارر و فراتیور استفاده شد. تشخیص مولکولی با استفاده از پرایمرهای یونیورسال 16s-rDNA انجام شد. تحمل این باکتری در برابر غلظت های مختلف اتانول ۱۰٪-۲ و دمای ۳۴-۳۸°C مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق سویه جدیدی از *استوباکتر اوکینانونسیس* از شلیل ایرانی، جداسازی شد. طبق آنالیز مولکولی 16s-rDNA این باکتری بنام *استوباکتر اوکینانونسیس* KBMNS-IAUF-1و توالی 16s-rDNA آن را در بانک ژنی، NCBI با شماره دسترسی MG544095.1 ثبت شد. این سویه در دمای ۳۸°C رشد و تولید اسید خوبی در اتانول ۵٪-۲ درصد داشت و به عنوان یک باکتری های مولد اسید استیک مقاوم به دمای بالا در اتانول ۵٪ و دمای ۳۸°C رشد خوبی داشت. همچنین در محیط کشت صنعتی اقتصادی در دمای ۳۸°C با استفاده از فرمانتور مینیاتوری که برای تولید سرکه طراحی شده بود به میزان ۶٪ اسید استیک تولید کرد. این مقاله اولین گزارش از جداسازی و شناسایی *استوباکتر اوکینانونسیس* KBMNS-IAUF-1 از شلیل ایرانی به عنوان یک AAB مقاوم به دما و اتانل بالا می باشد که قادر به تولید میزان بالای اسید استیک در مدت زمان کوتاهی است. همچنین این سویه کاندیدای بسیار خوبی برای تولید نوع جدیدی از سرکه، سرکه شلیل، در دما و غلظت اتانول بالا محسوب می شود. AAB مقاوم به دما–اتانول به عنوان یک پتانسیل برای تولید انواع جدید سرکه با طعم مناسب می تواند یک سرمایه در میکروبیولوژی مواد غذایی و همچنین بیوتکنولوژی صنعتی باشد.

واژه‌های کلیدی : اسید استیک، *استوباکتر اوکینانونسیس*، تخمیر، بیوتکنولوژی مواد غذایی، شلیل ایرانی، سرکه

* beheshtimaal@iaufala.ac.ir

† Acetic Acid Bacteria

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

مقدمه

سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) شراب ترش یا سرکه را به عنوان یک مایع حاوی ۴٪ اسید استیک (۴ گرم اسید استیک در هر سانتی متر مکعب) تعریف کرده است که از طریق تخمیر الکلی مواد قندی و شیرین تولید می شود (۱). سرکه طبیعی به عنوان یک طعم دهنده و مکمل غذایی محبوب دارای چندین اسید آمینه ضروری، ویتامین ها، اسیدهای آلی، فنولیک ها و مواد معدنی با توجه به منبع میوه اش است و می تواند برای تسکین دردها به ویژه دردهای ایجاد شده در دستگاه گوارش انسان استفاده شود (۴-۲). باکتری های مولد اسید استیک (AAB) باکتری های میله ای هوازی گرم منفی هستند که مسئول تولید سرکه از طریق اکسیداسیون بیولوژیکی هستند (۶-۵). در حالی که بیش از ۳۰ سال پیش AAB به دو جنس *استوباکتر* و *گلوکونوباکتر* تقسیم می شد، اما اخیراً این طبقه بندی به طور قابل توجهی تغییر کرده است. با توجه به طبقه بندی مولکولی مدرن از آنالیز DNA ریبوزومی 16s، AAB مربوط به خانواده *استوباکتریاسه* هستند و در ۱۹ جنس *استوباکتر*[3]، *اسیدوموناس*[4]، *آمیامیا*[5]، *آسائیا*[6]، *بومبلا*[7]، *کومنسالی باکتر*[8]، *اندوباکتر*[9]، *گلوکن استوباکتر*[10]، *گلوکونوباکتر*[11]، *گرانولی باکتر*[12]، *کوماگاتی باکتر*[13]، *کوزاکیا*[14]، *نئوآسائیا*[15]، *نئوکوماگاتی باکتر*[16]، *نگوئینی باکتر*[17]، *ساکاری باکتر*[18]، *سوامیناتانیا*[19]، *سوینسیا*[20] و *تانتیکارئونیا*[21] طبقه بندی می شوند (۸-۷). جنس‌های مهم AAB در تولید سرکه به دلیل توانایی‌های منحصربفردشان در اکسید کردن اتانول به اسید استیک به *استوباکتر*، *گلوکونواستوباکتر*، *گلوکونوباکتر* و *کوماگاتیباکتر* مربوط می‌شوند (۱۲-۹). استفاده از AAB خالص شناسایی شده می تواند تولید سرکه را افزایش دهد و تولیدکنندگان سرکه صنعتی به دنبال AAB جدیدی هستند که دارای اقبال عمومی باشد (۱۵-۱۳، ۲). سوبستراهای مختلفی برای تولید سرکه استفاده شده است که می توان به عسل، انگور، گلابی خاردار، انجیر، پیاز و گوجه فرنگی (۱۶-۱۷)، سیب (۱۸) برنج (۱۹) ، نیشکر (۴) و بالزام (۲۲-۲۰) اشاره کرد. در بین AAB، گونه های *استوباکتر* به عنوان میکروارگانیسم اصلی مسئول تولید سرکه از چندین منبع طبیعی مانند انگور، خرما و نارگیل (۲۵-۲۳) گیلاس سفید-قرمز ایرانی (۲۷-۲۶)، هلو ایرانی (۲۹-۲۸)، زردآلو ایرانی (۳۰)، گیلاس جامایکایی، آناناس، رامبوتان، انبه و لونگان (۳۱-۳۲)، شراب نخل و درخت خرما (۳۴-۳۳) و خرمای ایرانی، رطب (۱۴) جداسازی شده اند. دمای بهینه برای تولید اسید استیک ۲۵-۳۰ $^{\circ}C$ است که یک نقطه ضعف عمده در تولید صنعتی سرکه محسوب می شود. به همین دلیل، استفاده از سیستم خنک کننده برای حفظ دمای مطلوب رشد AAB و تولید سرکه مورد نیاز است. در صنعت سرکه، کنترل دما منجر به مصرف انرژی بالا و افزایش هزینه ها می شود. همچنین غلظت بالای اتانول باعث کاهش رشد، زنده ماندن سلولی، فعالیت متابولیکی و کاهش ظرفیت تولید اسید استیک می شود. از طرفی تولید بهینه اسید استیک توسط AAB در غلظتی بین ۴ تا ۸٪ اتانول به دست می آید. بنابراین، جداسازی و بهینه سازی AAB مقاوم به دما و غلظت اتانول بالا از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۸، ۱). هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی AAB از میوه شلیل ایرانی و همچنین بررسی میزان تحمل آن ها در برابر دما و غلظت های

[3] *Acetobacter*
[4] *Acidomonas*
[5] *Ameyamaea*
[6] *Asaia*
[7] *Bombella*
[8] *Commensalibacter*
[9] *Endobacter*
[10] *Gluconacetobacter*
[11] *Gluconobacter*
[12] *Granulibacter*
[13] *Komagataeibacter*
[14] *Kozakia*
[15] *Neoasaia*
[16] *Neokomagataea*
[17] *Nguyenibacter*
[18] *Saccharibacter*
[19] *Swaminathania*
[20] *Swingsia*
[21] *Tanticharoenia*

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

بالای اتانول بود. همچنین تولید اسید استیک توسط سویه AAB جداسازی شده در یک فرمانتور مینیاتوری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی و محیط های کشت میکروبیولوژیکی:

مواد شیمیایی اصلی استفاده شده در تحقیق شامل اتانول ۹۶٪ (رازی، ایران)، عصاره مخمر (تالی ژن، ایران)، اسید استیک، آگار آگار، D-گلوکز، کربنات کلسیم، بروموکرزول گرین، NaOH و فنل فتالئین (همه از مرک، آلمان) بودند. محیط کشت میکروبیولوژیکی شامل برین هارت اینفیوژن براث (BHI)از هایمدیا، هند، محیط فراتیور (کربنات کلسیم، ۲۰ g/L؛ عصاره مخمر، ۱۰ g/L؛ اتانل، ۲۰ g/L؛ آگار آگار، ۲۰ g/L؛ آب مقطر استریل، ۱۰۰۰mL)، محیط کارر (عصاره مخمر، ۳٪؛ بروموکرزول گرین، ۰/۰۰۲٪؛ اتانول، ۲٪؛ آگار آگار، ۲٪، آب مقطر استریل، ۱۰۰۰ mL) و محیط های کارر تغییر یافته در غلظت های مختلف اتانول ۳٪، ۴٪، ۵٪، ۶٪، ۷٪، ۸٪، ۹٪ و ۱۰٪ بودند. همچنین از محیط کشت صنعتی (عصاره مخمر، ۱٪، اسید استیک، ۲٪؛ اتانل، ۲٪ و آب مقطر استریل، ۱۰۰۰ mL) استفاده شد.

نمونه برداری و تهیه میوه شلیل ایرانی: هر دو نمونه میوه شلیل ایرانی سالم و معیوب از باغ های شلیل واقع در اصفهان تهیه شدند. میوه ها توسط ظرف استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی مجتمع آزمایشگاه های تحقیق و توسعه واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران منتقل شدند. میوه ها در کیسه پلاستیکی استریل باز در دمای اتاق و شرایط تهویه مناسب به مدت ۱۰-۷ روز قرار داده شدند. پس از پدیدار شدن مگس میوه و بوی سرکه از ظرف، میوه ها فشرده و همگن شدند و سپس به یک بطری پلاستیکی استریل منتقل و درب آن بسته شد. برای جلوگیری از ترکیدن بطری در حین تخمیر الکلی و تجمع دی اکسید کربن، تعدادی سوراخ کوچک با سوزن در بالای بطری ایجاد شد. بطری در دمای ۳۰ °C به مدت ۷ روز انکوبه شد (۱،۳۵).

جداسازی اولیه AAB از عصاره شلیل ایرانی

۱۰mL عصاره شلیل به ۹۰ mL آب مقطر استریل اضافه شد تا رقت 10^{-1} به دست آید. یک لوپ استاندارد از این رقت روی محیط فراتیور به روش خطی کشت داده شد. این محیط در دمای ۳۰ °C به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شد. کلنی های مجزا با هاله شفاف انتخاب و در همان شرایط خالص سازی شدند (۱۴، ۵).

غربالگری گونه های جداسازی شده AAB از عصاره شلیل ایرانی

AAB خالص شده از مرحله قبل بر روی محیط کشت کارر به روش خطی کشت و در دمای ۳۰ °C به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شد. کلنی‌هایی که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون زرد رنگ و پس از ۴۸ ساعت آبی رنگ شدند، با استفاده از شرایط مشابه انتخاب و خالص‌سازی شدند و در نهایت در دمای ۷۰ °C- پس از رشد در محیط کشت مایع صنعتی حاوی ۵۰ درصد گلیسرول برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند (۲۸،۳۵).

شناسایی ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی جدایه AAB

خصوصیات ماکروسکوپیک کلنی AAB جدا شده از شلیل ایرانی با استفاده از استریومیکروسکوپ انجام شد. صفات میکروسکوپی پس از رنگ‌آمیزی گرم کلنی‌های خالص‌شده در محیط‌های کارر و فراتیور بررسی شدند. کلنی‌های خالص‌شده از نظر واکنش کاتالاز، اکسیداز، تولید اسید، ایجاد شفافیت در محیط فراتیور[22] و توانایی اکسیداسیون مجدد در محیط کارر [23]مورد بررسی قرار گرفتند (۱۶،۳۰).

شناسایی مولکولی AAB جدا شده از شلیل ایرانی با استفاده از آنالیز ۱۶ s-rDNA

یک تک کلنی از جدایه AAB در محیط کارر به ۵۰ mL آب مقطر استریل منتقل شد. ۱۰ mL سوسپانسیون به فالکون استریل ۱۵ mL منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ g

[22] Frateur medium

[23] Carr medium

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و ۱ mg از بیوماس باکتریایی برای استخراج DNA توسط کیت استخراج DNA (بیونیر، کره جنوبی) استفاده شد. پرایمرهای یونیورسال مورد استفاده بر اساس مطالعه بهشتی مآل و شفیعی، ۲۰۲۰، (۱) و بهشتی مآل و شفیعی، ۲۰۱۹، (۳۵) شامل OF BUI به عنوان پرایمر رفت با توالی 5′AACTGGAGGAAGGTGGGGGAT3' و OR BUI به عنوان پرایمر برگشت با توالی 5′AGGAGGTGATCCAACCGCA3' توسط شرکت تالی ژن پارس، طراحی و ساخته شدند. برنامه PCR به ترتیب شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۶°C به مدت ۴ دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه، دمای ۵۵°C برای ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه بود. مراحل نهایی شامل دمای ۷۲°C به مدت ۴ دقیقه و انکوباسیون در دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. وزن مولکولی مورد انتظار محصول PCR ۳۷۰ bp بود (۳۶، ۳۵، ۱). محصول PCR و پرایمرها برای تعیین توالی DNA به شرکت تالی ژن پارس، شهرک علمی و تحقیقاتی اصفهان (ISTT)، اصفهان، ایران ارسال شد. توالی DNA با استفاده از نرم افزارهای Finch TV V.1.4.0 و Mega 6 بررسی شد و شباهت آن با توالی ژنومی بانک ژنی با استفاده از نرم افزار BLASTN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) بررسی شد. سویه جدا شده پس از آنالیز بیوانفورماتیک شناسایی و توالی 16s-rDNA آن در بانک ژنی، NCBI ثبت شد (۳۵، ۵، ۱).

تحمل سویه *استوباکتر* شلیل ایرانی در برابر غلظت اتانول و دماهای بالا

سویه *استوباکتر* جدا شده از شلیل ایرانی روی محیط کشت اصلاح شده کارر در غلظت های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰٪ اتانول به روش کشت خطی کشت داده و در دماهای ۳۴، ۳۶ و ۳۸°C به مدت ۹۶-۲۴ ساعت انکوبه و هر ۲۴ ساعت، سرعت رشد و تولید اسید سویه *استوباکتر* جدا شده در محیط کشت اندازه‌گیری شد. تمام آزمایش ها در سه تکرار انجام شد و میانگین سرعت رشد در هر آزمون به عنوان سرعت رشد در نظر گرفته شد. رشد باکتری در محیط کشت کارر با اتانول ۲٪ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (۲۹، ۱۴، ۵).

سنجش تیتراسیون اسید استیک

سنجش تیتراسیون اسید استیک تولید شده توسط سویه جدا شده از شلیل ایرانی به شرح زیر انجام شد. ۵ ml از محیط مایع به یک ارلن حاوی ۲۰ ml آب مقطر و به دنبال آن چند قطره فنل فتالئین [فنول فتالئین، ۰/۱ g؛ اتانول، ۶۰ g؛ آب مقطر، ۴۰ گرم] به محلول فوق اضافه شد. هیدروکسید سدیم ۰/۵ نرمال [NaOH، ۲۰ g/l؛ آب مقطر استریل، ۱۰۰۰ ml] توسط یک بورت ۵۰ میلی لیتری به محلول اسید استیک اضافه شد تا زمانی که رنگ صورتی کمرنگ در ارلن ظاهر شود. حجم هیدروکسید سدیم مصرف شده اندازه گیری شد و درصد اسید استیک در محیط مایع محاسبه شد (۱۴).

تولید اسید استیک با استفاده از سویه *استوباکتر* جدا شده از شلیل ایرانی در محیط کشت صنعتی

برای ارزیابی AAB جدا شده از شلیل ایرانی به عنوان یک پتانسیل برای تولید سرکه شلیل، سویه در ۵۰ ml محیط کشت صنعتی مایع [اتانول، ۲٪؛ اسید استیک، ۲٪؛ عصاره مخمر، ۱٪؛ آب مقطر استریل، ۱۰۰۰ ml] برای تولید سرکه کشت داده و در دمای ۳۸°C و ۱۲۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از ایجاد بوی سرکه از محیط، کل ۵۰ ml به فرمانتور شیشه ای مینیاتوری ۱۰۰۰ میلی لیتری (شرکت تالی ژن پارس، ISTT، ایران) حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت صنعتی منتقل شد. سرعت پمپ هوای استریل بر روی ۱۶ LPM تنظیم و فرمانتور در دمای ۳۸°C به مدت ۱۶۸ ساعت انکوبه شد. هر ۲۴ ساعت میزان اسید استیک با استفاده از روش تیتراسیون اسید استیک که قبلا توضیح داده شد اندازه گیری شد. پس از اتمام تیتراسیون، ۲٪ اتانول اضافی بطور استریل به فرمانتور اضافه شد و فرمانتور در همان شرایط تنظیم شد، یعنی اجازه داده شد تا تخمیر اتانول به اسید استیک تا رسیدن به حداکثر تیتر استیک اسید ادامه یابد (۲۸، ۱).

نتایج

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

جداسازی اولیه AAB از عصاره شلیل ایرانی

کشت عصاره شلیل ایرانی در محیط کشت فراتیور پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰°C منجر به پیدایش کلنی هایی شد که می توانستند با تولید اسید شفافیت را در اطراف کلنی ها ایجاد کنند. رشد جدایه در این محیط و تولید اسید پس از زمان انکوباسیون، ارتباط باکتری جدا شده با AAB را تایید کرد (شکل ۱ الف و د).

غربالگری گونه های *استوباکتر* از عصاره شلیل ایرانی

انتقال کلنی های منفرد AAB از محیط فراتیور به محیط کارر و انکوباسیون در دمای ۳۰°C به مدت ۲۴ ساعت، کلنی هایی را نشان داد که می توانستند رنگ آبی بروموکرزول گرین محیط کارر را با تخمیر اسید استیک به زرد تبدیل کنند (شکل ۱ ب و ه). ظهور مجدد رنگ آبی در محیط کشت کارر پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون (شکل ۱ ج) توانایی اکسیداسیون مجدد جدایه را تایید کرد و مشخص شد که گونه جدا شده از شلیل ایرانی مربوط به جنس *استوباکتر* و خانواده *استوباکتریاسه* است.

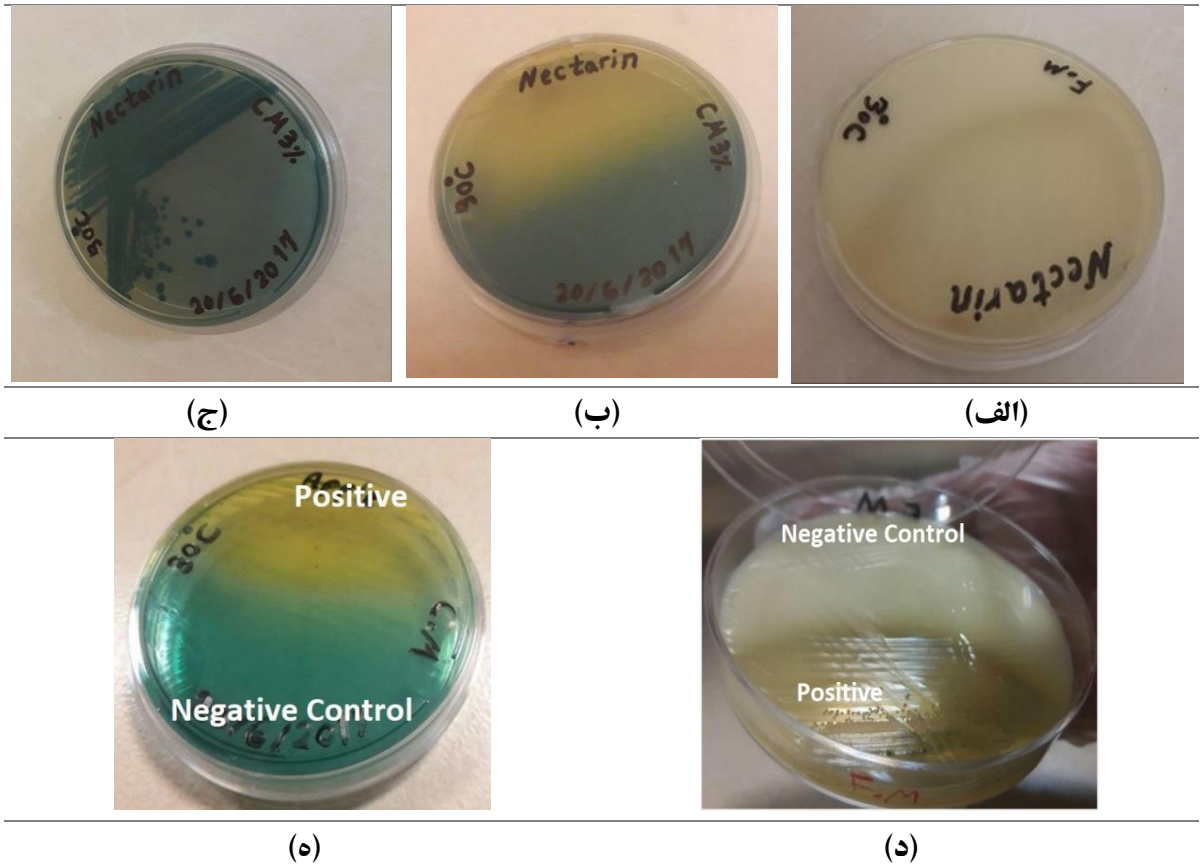
شناسایی ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی جدایه *استوباکتر*

ویژگی های ماکروسکوپی AAB جدا شده از شلیل ایرانی در محیط های فراتیور و کارر شامل مورفولوژی کلنی، رنگ و بو مورد ارزیابی قرار گرفت. رنگ آمیزی گرم جدایه AAB باسیل و کوکوباسیل گرم منفی را در دو محیط فراتیور و کارر نشان داد (شکل ۲ الف و ب). تست کاتالاز و اکسیداز جدایه AAB به ترتیب مثبت و منفی بود. این نتایج نشان داد که AAB جدا شده از شلیل ایرانی مربوط به گونه های *استوباکتر* است. بررسی های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی AAB جدا شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی سویه *استوباکتر* جدا شده از شلیل ایرانی

ماکروسکوپی		میکروسکوپی	بیوشیمیایی			
محیط کارر	محیط فراتیور		تجزیه CaCO3	تولید اسید از اتانل	کاتالاز	اکسیداز
کلنی های زرد تا آبی، گرد، محدب، صاف، قطر≤ ۲mm، بوی سرکه	کلنی های شفاف بی رنگ، گرد، محدب، صاف، قطر≤ ۲mm، بوی سرکه	باسیل، کوکوباسیل، مونو، دیپلو و استرپتو باسیل گرم منفی	+	+	+	−

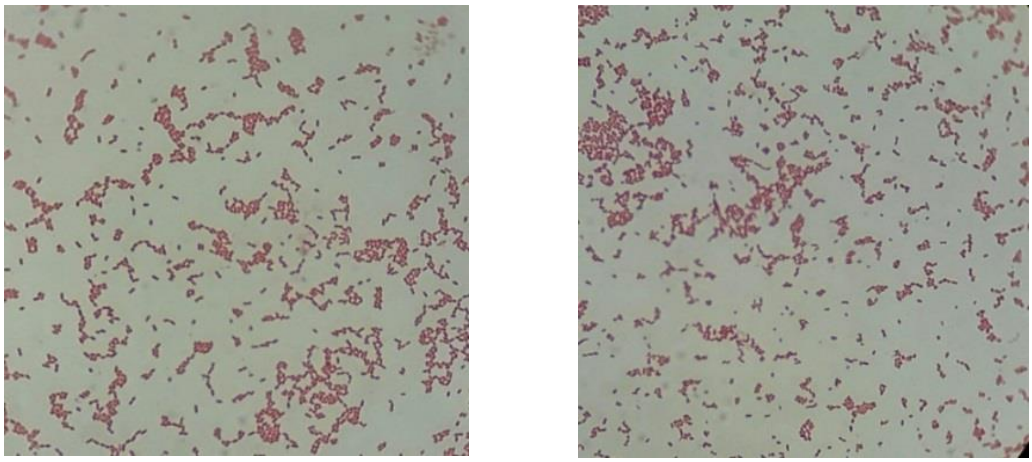
[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]



(الف) (ب) (ج)

(د) (ه)

شکل ۱. جداسازی AAB از عصاره شلیل ایرانی بر روی محیط کشت انتخابی پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰°C بر روی محیط کشت فراتیور(الف) تغییر محیط از کدر به شفاف به دلیل تولید اسید استیک توسط گونه های *استوباکتر* و استفاده از کربنات کلسیم (ب) محیط کارر: تغییر رنگ محیط از سبز به زرد به دلیل واکنش اکسیداسیون اتانول به اسید استیک توسط گونه های *استوباکتر* پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (ج) محیط کارر: تغییر رنگ محیط از زرد به آبی به دلیل واکنش اکسیداسیون مجدد اسید استیک به CO2 توسط گونه های *استوباکتر*، پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون (د) کنترل منفی و مثبت محیط فراتیور (ه) کنترل منفی و مثبت محیط کارر



(الف) (ب)

شکل ۲. رنگ‌آمیزی گرم *استوباکتر* جدا شده از شلیل ایرانی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰°C روی محیط فراتیور (الف) و کارر (ب) نشان‌دهنده کوکوباسیل‌های گرم منفی با آرایش یکسان در هر دو محیط است.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

شناسایی مولکولی سویه *استوباکتر* جدا شده از شلیل ایرانی

تکثیر ژن ۱۶s-rDNA از DNA استخراج شده *استوباکتر* شلیل ایرانی با استفاده از پرایمرهای یونیورسالOF BUI و OR BUI یک محصول ۳۷۰bp را پس از الکتروفورز و ترانس ایلومیناسیون نشان داد. تکثیر ژن های ۱۶s-rDNA از DNAاستخراج شده از دو سویه استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC25922 و *استوباکتر استی* ATCC23746 به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت، همان باند ۳۷۰bp را نشان داد (شکل ۳). آنالیز BLASTN توالی ۱۶s-rDNA از سویه *استوباکتر* ۹۲٪ شباهت و ۹۶٪ پوشش دهی را با *استوباکتر اوکیناونسیس* [۲۴]سویه SZCPY2 (شماره دسترسی بانک ژنی KU555380) را نشان داد. آنالیزهای مولکولی نشان داد که سویه AAB جدا شده از نمونه شلیل ایرانی مربوط به گونه *استوباکتر اوکیناونسیس* است. این جدایه، *استوباکتر اوکیناونسیس* سویه KBMNS-IAUF-1 نام گرفت و توالی ژن ۱۶s-rDNA آن در بانک جهانی ژن، در پایگاه بین المللی NCBI با شماره دسترسی MG544095.1 ثبت شد. شکل ۴ درخت فیلوژنیک گونه های مختلف *استوباکتر* و موقعیت *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 شناسایی شده را نشان می دهد.

تحمل *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 در برابر غلظت های اتانول و دماهای بالا

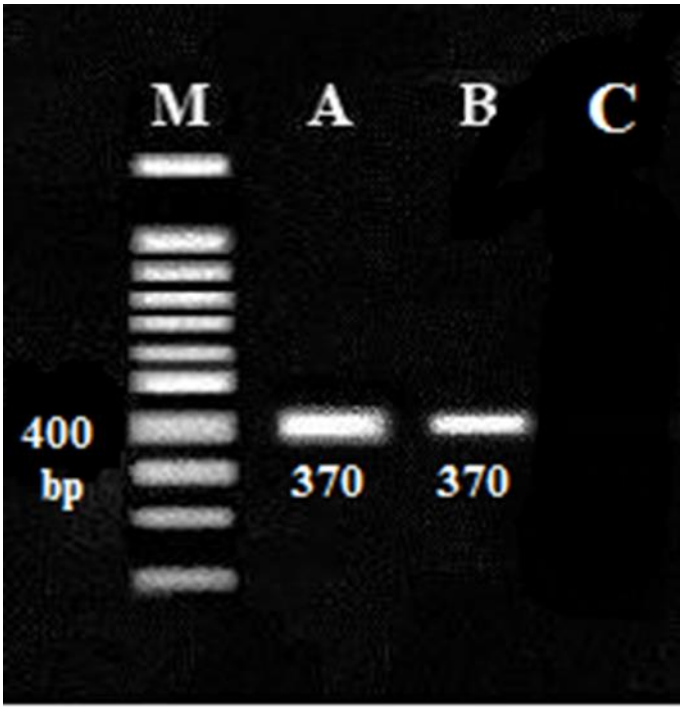
نتایج سرعت رشد و تولید اسید توسط *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 در محیط کشت اصلاح شده کارر با غلظت های مختلف اتانول ۲ تا ۱۰٪ پس از ۲۴ تا ۹۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۴، ۳۶ و ۳۸°C در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. سرعت رشد و تولید اسید در *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 در محیط کارر تغییر یافته با ۵٪-۲٪ اتانول بعد از ۹۶-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۴، ۳۶ و ۳۸°C

سرعت رشد و تولید اسید												
زمان انکوباسیون (ساعت)												
۲٤			٤٨			۷۲			۹٦			
غلظت اتانول (٪)	دمای انکوباسیون (°C)											
	۳۴	۳۶	۳۸	۳۴	۳۶	۳۸	۳۴	۳۶	۳۸	۳۴	۳۶	۳۸
۲	+۴	+۴	+۳	+۴	+۴	+۳	+۴	+۴	+۴	+۴	+۴	+۴
۳	+۴	+۴	+۳	+۴	+۴	+۳	+۴	+۴	+۴	+۴	+۴	+۴
۴	+۴	+۳	+۲	+۴	+۳	+۲	+۴	+۴	+۳	+۴	+۴	+۳
۵	+۳	+۲	+۱	+۴	+۲	+۱	+۴	+۳	+۲	+۴	+۳	+۲
۶	+۳	–	–	+۳	+۱	+۱	+۳	+۱	+۱	+۴	+۲	+۲
۷	+۱	–	–	+۱	–	–	+۲	+۱	–	+۲	+۱	+۱
۸	+۱	–	–	+۱	–	–	+۱	–	–	+۱	–	–
۹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۱۰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

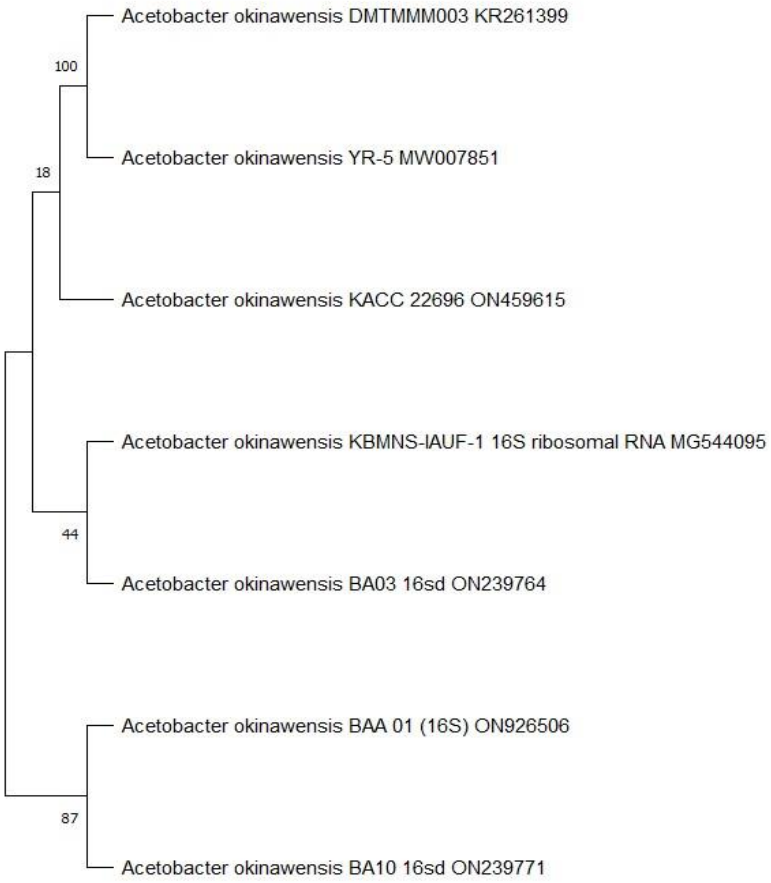
[24] *Acetobacter okinawensis*

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]



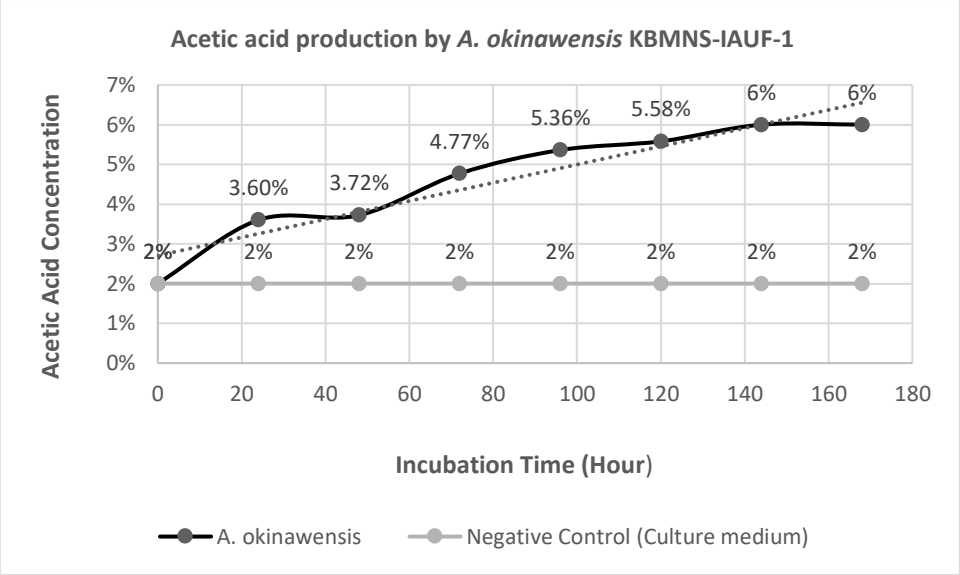
شکل ۳. تکثیر DNA/*استوباکتر* جدا شده از شلیل ایرانی در PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال OF BUI و OR BUI، M: مارکر ۱۵۰۰ جفت باز، (A) *استوباکتر* جدا شده از شلیل ایرانی، (B) کنترل مثبت، *استوباکتر استی* ATCC23746، (C) کنترل منفی.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]



شکل ٤. درخت فیلوژنیک *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 در حال حاضر شناسایی شده است. تجزیه و تحلیل مولکولی نشان داد که سویه AAB جدا شده از شلیل بیش از ۹۹٪ شباهت به *استوباکتر اوکیناونسیس* دارد.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]



شکل ۵. تولید اسید استیک توسط *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 جدا شده از شلیل ایرانی پس از ۱۶۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۸°C و سرعت هوادهی ۱۶ LPM در محیط کشت صنعتی با استفاده از فرمانتور شیشه ای مینیاتوری. نمودار نشان می دهد که بیشترین تولید اسید استیک پس از ۱۴۰–۱۶۸ ساعت رخ داده است.

تولید اسید استیک با استفاده از *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 جدا شده از شلیل ایرانی در محیط کشت صنعتی

کشت *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 در فرمانتور شیشه ای مینیاتوری حاوی ۵۰۰ ml محیط صنعتی منجر به تولید یک نوع سرکه جدید با بو، طعم و ظاهر مطبوع پس از ۲۴ ساعت عملکرد فرمانتور شد. سنجش تیتراسیون استیک اسید در محیط کشت صنعتی تخمیر شده حاوی سویه جدید AAB کشف شده پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۸°C و سرعت هوادهی ۱۶ RPM نشان دهنده افزایش درصد استیک اسید به میزان به ترتیب ۳/۶٪، ۳/۷۲٪، ۴/۷۷٪، ۵/۳۶٪، ۵/۵۸٪، ۶٪ و ۶٪ بود. نتایج نشان داد *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1جدا شده از شلیل ایرانی می تواند در مدت زمان کوتاهی مقدار قابل توجهی استیک اسید تولید کند. شکل ۵ تولید استیک اسید توسط *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1را در محیط کشت صنعتی با استفاده از یک مخزن فرمانتور شیشه ای مینیاتوری نشان می دهد.

بحث

تولید غلظت بالای اسید استیک در استاتورها چالش برانگیز است و یافتن سویه‌های جدید AAB مقاوم به اتانول–دما می‌تواند یک دارایی در صنعت سرکه و همچنین بیوتکنولوژی مواد غذایی باشد (۳، ۳۷). بیشترین گونه های *استوباکتر* که برای تولید سرکه گزارش شده اند شامل *استوباکتر استی*، *استوباکتر سرویزیه*، *استوباکتر مالورون*، *استوباکتر اونی*، *استوباکتر پاستوریانوس* و *استوباکتر پومورون* می باشد (۳۸، ۱۰). برای اولین بار *استوباکتر اوکیناونسیس* از ساقه نیشکر در سال ۲۰۰۴ در اکیناوا، ژاپن جداسازی شد. سپس از انگور، آلو ژاپنی و ملون شرقی در سال ۲۰۰۷ در اوکایاما، ژاپن جدا شد (۳۹). چن و همکاران (۲۰۱۶) جداسازی AAB را به عنوان *استوباکتر اوکیناونسیس* از کفیر تبت گزارش کرده اند (۴۰). در مطالعه دیگری گزارش شد که *استوباکتر اوکیناونسیس* اغلب از نمونه های مرتبط با منابع سیب جدا شده است. همچنین پیشنهاد شد که آنالیز توالی مبنی بر ژن اختصاصی برای تمایز AAB موثر است (۳۸). در این تحقیق سویه جدید *استوباکتر اوکیناونسیس* از شلیل ایرانی که از باغ شلیل در اصفهان به دست آمده بود جداسازی شد. با توجه به آنالیز مولکولی ۱۶s-rDNA این باکتری به عنوان *استوباکتر اوکیناونسیس* سویه KBMNS-

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

IAUF-1 ثبت و توالی 16s-rDNA آن را در بانک جهانی ژن، NCBI با شماره دسترسی MG544095.1 ثبت شد. ال-عسکری و همکاران (۲۰۲۲) از محیط غنی مایع حاوی ۱٪ گلوکز، ۰/۳٪ اسید استیک، ۰/۵٪ اتانول، ۱/۵٪ پپتون و ۰/۸٪ عصاره مخمر برای غنی‌سازی AAB استفاده کردند (۸). کلاپیاپامورکان و همکاران (۲۰۱۵) از یک محیط سنتزی شامل نمک نرمال و اتانول برای غنی سازی و جداسازی AAB از میوه ها و آب میوه های تخمیر شده استفاده کردند (۱۲). در تحقیق حاضر میوه ها در یک کیسه پلاستیکی استریل در دمای اتاق به مدت ۷ تا ۱۰ روز قرار داده شدند و پس از همگن شدن به بطری پلاستیکی انتقال داده شدند تا AAB غنی شوند. این روش بسیار ساده تر و ارزان تر از روش های گزارش شده قبلی می باشد. میزی و همکاران (۲۰۲۲)، واشیشت و همکاران (۲۰۱۹) و شرفی و همکاران (۲۰۱۰) از محیط کشت GYC (گلوکز، عصاره مخمر، کربنات کلسیم) برای جداسازی و غربال گری AAB از چندین نمونه میوه استفاده کردند (۲۸، ۱۸، ۱۶). در تحقیق حاضر از محیط کشت فراتیور برای غربال گری AAB و سپس از محیط کارر برای بررسی فعالیت اکسیداسیون و اکسیداسیون مجدد AAB و جداسازی گونه‌های *استوباکتر*، به عنوان برترین گونه های AAB، استفاده شد. برای تولید صنعتی سرکه هر دو محیط ذکر شده، اقتصادی و از نظر بیوتکنولوژیکی به راحتی قابل استفاده و در دسترس بودند. جداسازی جنس *استوباکتر* در مقایسه با سایر جنس های AAB در محیط فراتیور و کارر بیشتر از GYC امکان پذیر است. زیرا تنها منبع کربن در این محیط ها اتانول است اما در GYC گلوکز است که منبع کربن عمومی تری نسبت به اتانول است. در یک مطالعه تحقیقاتی، رشد AAB در حضور غلظت ۴ تا ۱۰٪ اتانول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمام جدایه‌های AAB قادر به رشد بهینه در غلظت‌های ۴ تا ۶٪ اتانول بودند (۱۲). بهشتی مآل و شفیعی (۲۰۱۱) نشان دادند که یک گونه *استوباکتر* جداسازی شده از هلو ایرانی توانست ۲/۵ تا ۵٪ اتانل را در دماهای ۳۴-۴۰°C پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون تحمل کند (۲۹). در یک مطالعه نشان داده شد که افزایش غلظت اتانول از ۲ تا ۹٪ در محیط کشت صنعتی منجر به حساسیت بیشتر گونه ی *استوباکتر* جدا شده از رطب در دماهای بالای ۳۴-۳۸°C شده است (۱۴). در مطالعه حاضر نیز، افزایش غلظت اتانول با کاهش رشد سویه ها همراه بود. تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر بهینه سازی *استوباکتر اوکینانونسیس* در تولید استیک اسید در شرایط غلظت اتانول و دمای بالا به طور همزمان وجود ندارد. در این مطالعه، تحمل *استوباکتر اوکینانونسیس* KBMNS-IAUF-1 در برابر غلظت ۲ تا ۱۰٪ اتانل در دمای ۳۴-۳۸°C بررسی شد. نتایج نشان داد که در دمای ۳۴°C، اتانول ۲ تا ۵٪ هیچ تأثیر منفی بر رشد باکتری نداشت. اتانول ۶٪ بین ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون کمی سرعت رشد و تولید اسید استیک را کاهش داد اما پس از ۹۶ ساعت بیشترین رشد را داشتیم. غلظت اتانول ۷ تا ۸٪ بطور قابل توجه باعث کاهش رشد و تولید استیک اسید شد. همچنین هیچ رشدی در غلظت اتانول ۹ تا ۱۰٪ در این دما وجود نداشت. در دمای ۳۶°C حساسیت سویه AAB جدا شده نسبت به غلظت اتانول بالاتر آشکارتر بود به طوری که سویه جدا شده رشد و تولید استیک اسید خوبی در اتانول ۵ -٪۲ داشت اما در اتانول ۶٪ سرعت رشد کاهش یافت. هیچ رشدی در اتانول ۷ تا ۱۰٪ در این دما وجود نداشت. در دمای ۳۸°C *استوباکتر اوکینانونسیس* KBMNS-IAUF-1 رشد و تولید اسید خوبی در اتانول ۲ تا ۵٪ داشت اما در ۶٪ اتانول به وضوح رشدش را از دست داد. رشد و تولید استیک اسید در اتانول ≤ ۶٪ وجود نداشت. این نتایج نشان داد که غلظت اتانل و دمای بالا می تواند از سرعت رشد و تولید استیک اسید توسط *استوباکتر اوکینانونسیس* KBMNS-IAUF-1 جدا شده از شلیل ایرانی جلوگیری کند. با این حال، این سویه به عنوان یک AAB مقاوم به حرارت، در دمای ۳۸°C رشد و تولید استیک اسید خوبی در غلظت اتانول ۵٪ داشت. همچنین این باکتری، به عنوان یک سویه مقاوم به غلظت بالای اتانول، در غلظت ۸٪ اتانل رشد و تولید اسید خوبی در دمای ۳۴°C داشت. در یک مطالعه، حداکثر تولید استیک اسید از سویه AAB جدا شده از ضایعات سیب ۴/۸۸٪ بود (۴۱). کلاپیاپامورکان و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

انکوباتور شیکردار و محیطی حاوی ۲٪ اتانول و ۲٪ عصاره مخمر، توسط جدایه های AAB شامل P1، P4، P6، P12 و *استوباکتر استی* به ترتیب به میزان ۱/۷۸، ۱/۸۰، ۱/۸۰، ۱/۸۱ و ۱/۸۱٪ استیک اسید تولید کردند (۱۲). دیبا و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که AAB جدا شده از میوه در محیط YGEA حاوی عصاره مخمر، گلوکز، اتانول و اسید استیک در دمای ۳۷°C پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، ۶-۳٪ اسید استیک تولید کرده است (۴۲). در حالی که گلوکز در تحقیقات آن ها به طور قابل توجهی باعث تخمیر استیک شده است، اما استفاده از آن اقتصادی نیست. در تحقیق حاضر برای اولین بار نشان داده شد که *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 جدا شده از شلیل ایرانی مقدار قابل توجهی اسید استیک، به میزان ۶٪، در محیط کشت صنعتی اقتصادی در دمای ۳۸°C تولید می کند.

نتیجه گیری

این تحقیق، اولین گزارش از جداسازی و شناسایی استوباکتر *اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 از شلیل ایرانی برای تولید سرکه است. همچنین بهینه سازی سرعت رشد و تولید اسید استیک در شرایط دماها و غلظت های بالای اتانول برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفته است. *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1در دمای ۳۴، ۳۶ و ۳۸°C دارای حداکثر سرعت رشد و تولید اسید به ترتیب در غلظت اتانول ۶، ۴ و ۳٪ پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون بود. نتایج این تحقیق تایید کرد که *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 جدا شده از شلیل ایرانی نه تنها می تواند غلظت های بالای اتانول و دماهای بالا تحمل کند، بلکه در غلظت های بالای استیک اسید نیز مقاومت می کند و می تواند به عنوان یک سویه بالقوه AAB برای تولید سرکه با اسیدیته ۶٪ در مدت زمان کوتاه، ۵ روزه، به طور صنعتی درنظر گرفته شود. بنابراین *استوباکتر اوکیناونسیس* KBMNS-IAUF-1 به عنوان یک سویه AAB مقاوم به گرما-اتانول، کاندید بسیار خوبی برای تولید نوع جدیدی از سرکه، سرکه شلیل، در دما و غلظت اتانول بالا است. AAB مقاوم به گرما-اتانول را می توان به عنوان یک ابزار بالقوه جهت تولید سرکه در میکروبیولوژی مواد غذایی و همچنین بیوتکنولوژی صنعتی در نظر گرفت.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

منابع

[1] Beheshti-Maal K, Shafiee N. Isolation and identification of thermo-ethanol-tolerant *Acetobacter pasteurianus* KBMNS-IAUF-3 and *Acetobacter senegalensis* KBMNSIAUF-5 strains from fig-peach and nut-grape fruits and investigation of their potential for vinegar production. Applied Microbiology in Food Industry. 2020;39-47

[2] Luzón-Quintana L, Castro R, Duran-Guerrero E. Biotechnological Processes in Fruit Vinegar Production. Foods. 2021;10(5):1-23.

[3] Román-Camacho JJ, García-García I, Santos-Dueñas IM, García-Martínez T, Mauricio JC. Latest Trends in Industrial Vinegar Production and the Role of Acetic Acid Bacteria: Classification, Metabolism, and Applications-A Comprehensive Review. Foods. 2023;12(19):3705.

[4] Kocher GS, Kalra KL, Phutela RP. Comparative production of sugarcane vinegar by different immobilization techniques. Journal of Instant Brewery. 2006;112:264-6.

[5] 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. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2019;12(4): 251-65 (b).

[6] Ndoye B, Cleenwerck I, Engelbeen K, Dubois-Dauphin R, Guiro AT, *et al*. *Acetobacter senegalensis* sp. nov., a thermotolerant acetic acid bacterium isolated in Senegal (sub-Saharan Africa) from mango fruit *(Mangifera indica*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007;57:1576-81.

[7] He Y, Xie Z, Zhang H, Liebl W, Toyama H, Chen F. Oxidative Fermentation of Acetic Acid Bacteria and Its Products. Frontiers in Microbiology. 2022;13:1-16.

[8] El-Askri T, Yatim M, Sehli Y, Rahou A, Belhaj A, Castro R, Durán-Guerrero E, Hafidi M, Zouhair R. Screening and characterization of New *Acetobacter fabarum* and *Acetobacter pasteurianus* strains with high Ethanol–Thermo tolerance and the optimization of acetic acid production. Microorganisms. 2022;10(9):1-14.

[9] La China S, Zanichelli G, De Vero L, Gullo M. Oxidative fermentations and exopolysaccharides production by acetic acid bacteria: a mini review. Biotechnology Letters. 2018;40:1289-302.

[10] Gomes RJ, Borges MF, Rosa MF, Castro-Gómez R, Spinosa WA. Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. Food Technology and Biotechnology. 2018;56:139-51.

[11] Trcek J, Barja F. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. International Journal of Food Microbiology. 2015;196:137-44.

[12] Klawpiyapamornkun T, Bovonsombut S, Bovonsombut S. Isolation and characterization of acetic acid bacteria from fruits and fermented fruit juices for vinegar production. Food Applied and Biosciences Journal. 2015;3:30-8.

[13] Bellankimath A, Katti A, Hemalata VB, Meti BS. Isolation and characterization of the indigenous acetic acid bacteria from western ghats soil samples. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2017;9:1255-65.

[14] Beheshti-Maal K. Identification of a thermo-tolerant *Acetobacter* strain isolated from Iranian date palm (Rotab) suitable for date vinegar production in agricultural biotechnology. Advanced Environmental Biology. 2014;10:1063-71.

[15] Gullo M, Giudici P. Acetic acid in traditional balsamic vinegar, phenotypic traits relevant for starter cultures selection. International Journal of Food Microbiology. 2008;125:46-53.

[16] Mizzi J, Gaggia F, Bozzi-Cionci N, Di-Gioia D, Attard. Sellection of Acetic acid bacterial strains and vinegar production from local maltese food sources. Frontiers in Microbiology. 2022;13:1-13.

[17] Iiha EC, Anna ES, Torres RC, Porto AC, Meinert EM. Utilization of bee *(Apis mellifera)* honey for vinegar production at laboratory scale. Acta Cie Ven. 2000;51:231-5.

[18] Vashisht A, Thakur K, S. Kauldhar B, Kumar V, Yadav S. Waste valorization: Identification of an ethanol tolerant bacterium Acetobacter pasteurianus SKYAA25 for acetic acid production from apple pomace. Journal of Science and Total Environment. 2019;690:956-64.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

[19] Nanda K, Taniguchi M, Ujike S, Ishihara N, Mori H, Ono H, Muraoka Y. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. Applied and Environmental Microbiology. 2001;67:986-90.

[20] Giudici P, Rinaldi G. A theoretical model to predict the age of traditional balsamic vinegar. Journal of Food Engineering. 2007;82:121-7.

[21] Gullo M, de Vero L, Giudici P. Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. Applied and Environmental Microbiology. 2009;175:2585-9.

[22] Falcone PM, Giudici P. Molecular size and molecular size distribution affecting traditional balsamic vinegar aging. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2008;56:7057-66.

[23] Kadere TT, Miamoto T, Oniang'o RK, Kutima PM, Njoroge SM. Isolation and identification of genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). African Journal of Biotechnology. 2008;7:2963-71.

[24] Drydale GS, Fleet GH. Acetic acid bacteria in some Australian wines. Food Technology Austalia. 1985;37:17-20.

[25] Joyeux A, Lafon-Lafourcade S, Ribereau-Gayon P. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. Applied and Environmental Microbiology. 1984;48:153-6.

[26] 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 Journal Biotechnology. 2010;1:53-9.

[27] 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 Academy of Science, Engineering and Technology. 2009;54:201-4.

[28] Sharafi SM, Rasooli I, Beheshti-Maal K. Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods. Iranian Journal of Microbiology. 2010;1:41-8.

[29] Beheshti-Maal K, Shafiei R. A thermotolerant *Acetobacter* strain isolated from Iranian peach suitable for industrial microbiology. Asian Journal of Biological Sciences. 2011;3:244-51.

[30] Beheshti-Maal K, Shafiei R, Kabiri N. Production of apricot vinegar using an isolated *Acetobacter* strain from Iranian apricot. International Journal of Biological and Life Sciences. 2010;4:230-3.

[31] Sossou SK, Ameyapoh Y, Karau SD, de Souza C. Study of pineapple peelings processing into vinegar by biotechnology. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2009;12:859-65.

[32] Moryadee A, Pathom-Aree W. Isolation of thermotolerant acetic acid bacteria from fruits for vinegar production. Research Journal of Microbiology. 2008;3:209-12.

[33] Ogbona N. Microbiology of Nigerian palm wine with particular reference of bacteria. Journal of Applied Bacteriology. 1993;38:81-8.

[34] Faparusi SI. Origin of initial microflora of palm wine from oil palm trees (*Elaeis guineensis*). Journal of Applied Bacteriology. 1973;36:559-65.

[35] Beheshti-Maal K, Shafiee N. A novel high ethanol-thermo-tolerant *Acetobacter pasteurianus* KBMNS-IAUF-2 Strain and the optimization of acetic acid production using the Taguchi statistical method. Microbiology Metabolites and Biotachnology. 2019:2(2): 77-88 (a).

[36] Amiri-Fahliyani S, Beheshti-Maal K, Ghandehari F. Novel lytic bacteriophages of *Klebsiella oxytoca* ABG-IAUF-1 as the potential agents for mastitis phage therapy. FEMS Microbiology Letters. 2018;20:1-8.

[37] Berraud C. Production of highly concentrated vinegar in fed-batch culture. Biotechnology Letters. 2000;22:451-4.

[38] Yetiman AE, Kesmen Z. Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. International Journal of Food Microbiology. 2015;204:9-16.

[39] Lino T, Suzuki R, Kosako Y, Ohkuma M, Komagata K, Uchimura T. *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. Journal of General and Applied Microbiology. 2012;58:235-43.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

[40] Chen Z, Shi J, Yang X, Liu Y, Nan B, Wang Z. Isolation of exopolysaccharide-producing bacteria and yeasts from Tibetan kefir and characterisation of the exopolysaccharides. International Journal of Dairy Technology. 2016;69:410-7.

[41] Upadhyay A, Kovalev A A, Zhuravleva E A, Pareek N, Vivekanand V. Enhanced production of acetic acid through bioprocess optimization employing response surface methodology and artificial neural network. Bioresource Technology. 2023;376:128930.

[42] Diba F, Alam F, Talukder AA (2015) Screening of acetic acid producing microorganisms from decomposed fruits for vinegar production. Advanced Microbiology. 2015;5:291-7.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]

Isolation and identification of a new strain of *Acetobacter okinawensis* from Iranian nectarine, resistant to high temperature and ethanol concentration, suitable for producing nectarine vinegar

Keivan Beheshti-Maal[*1], Noushin Shafiee[1]
[1] Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran

Abstract

Recently, the production of various types of vinegar using new strains of acetic acid-producing bacteria is challenging in the industry. The aim of this research was to isolate and purify new strains of acetic acid-producing bacteria with the characteristics of tolerance to high temperature and high concentrations of ethanol. Sampling of nectarine fruit was done. To isolate acetic acid-producing bacteria (AAB), Carr and Frateur culture media were used. Molecular detection of isolates was performed using 16s-rDNA ribotyping with universal primers. The tolerance of AAB isolate against different concentrations of 2-10% ethanol and temperature of 34-38°C was investigated. In this research, a new strain of *Acetobacter okinawensis* was isolated from Iranian nectarine. According to the molecular analysis of 16s-rDNA, this strain named *Acetobacter okinawensis* KBMNS-IAUF-1 and its 16s-rDNA sequence was deposited in the GenBank, NCBI with the accession number of MG544095.1. This strain had good growth and acid production in 2-5% ethanol at 38°C, and as an AAB resistant to high temperature, it had good growth in 5% ethanol and 38°C. It also produced 6% acetic acid in an economic industrial cultivation environment at a temperature of 38°C using a laboratory device designed to produce vinegar. This is the first report on the isolation and identification of *Acetobacter okinawensis* KBMNS-IAUF-1 from Iranian nectarine as an AAB resistant to high temperature and ethanol, which is capable of producing high amounts of acetic acid in a short period of time. Also, this strain is considered a very good candidate for producing a new type of vinegar, nectarine vinegar, at high temperature and ethanol concentration. Heat-ethanol-resistant AAB as a potential to produce new types of vinegar with good taste can be an investment in food microbiology as well as industrial biotechnology.

Keywords: Acetic acid, *Acetobacter okinawensis*, Fermentation, Food biotechnology, Iranian nectarine, Vinegar

* beheshtimaal@iaufala.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-07]