مجله علوم دانشگاه تهران
جلد سی‌ام (۱۳۸۳) شماره ۳ (۵۴۹-۵۴۱)

جداسازی باکتریهای مولد اسیداستیک از سرکه‌های خانگی وارزیابی پایداری گرمایی آنها

فوزیه مقدمی۱ ،محمدرضا صعودی* [۱]، محمدرضا رضوانیان‌زاده [۲]، شایسته سپهر [۱]
۱ دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم‌پایه، گروه زیست‌شناسی
۲ سازمان انرژی اتمی، آزمایشگاههای جابربن‌حیان
(دریافت: ۸۳/۸/۱۹ ؛ پذیرش:۸۳/۱۰/۲۶)

چکیده

دسترسی به سویه‌های خانواده استوباکتراسه با تحمل حرارتی بالا اهمیت فراوانی در افزایش کارایی تبدیل زیستی الکل‌ها به مشتقات آلدییدی و اسیدی آنها دارد. در جستجوی باکتری‌های اسیداستیک ۷۰ نمونه سرکه خانگی از ٤ شهر تاکستان، تهران، قزوین و ابهر جمع‌آوری شد. باکتریهای مولد اسید استیک از این سرکه‌ها جداسازی و سویه‌های جدا شده براساس سن سرکه و اقلیم آن طبقه بندی شدند. در بررسی برهم‌کنش سن و اقلیم بیشترین تعداد جدایه‌ها از سرکه‌های تاکستان ۱۲-۸ ماهه به دست آمد. در شناسایی جنس جدایه‌ها از میان ۳۹ سویه جدا شده،۲۳ جدایه از جنس استوباکتر (بدون تمایز از گلوکونواستوباکترها) و ۱۶ جدایه گلوکونوباکتر بودند. از آنجا که نیمی از سویه‌های *Glaucanobacter* قادر به اکسیداسیون استات در محیط کشت EOM بودند (ویژگی گلوکونوباکترهای ترموتالرنت) جهت شناسایی این دو جنس تنها به پاسخ جدایه‌ها در محیط کشت LOM (اکسیداسیون لاکتات) استناد شد. در حالی که دمای بهینه رشد سویه‌های استوباکتراسه به طور معمول بین $^{\circ}$C ۳۳-۳۰ و بیشینه آن کمتر از $^{\circ}$C ۳۷ است، یک سوم از جدایه‌ها قادر به رشد در دمای $^{\circ}$C ۱±٤۰ بودند. جدایه‌های اخیر ترموتالرنت محسوب می‌شوند. بنابراین بنظر می‌رسد که ویژگی مقاومت به دما کم و بیش در میان فلور میکروبی ایران صفتی شایع است. این داده‌ها نسبت به نتایج به دست آمده درسایر کشورهای آسیایی نظیر ژاپن و تایلند متفاوت است و اثرات آب و هوایی ممکن است علت اصلی آن باشد. این صفت به لحاظ صنعتی اهمیت دارد زیرا سویه‌های مولد می‌توانند به راحتی تغییرات فصلی دما را تحمل نمایند.

واژه‌های کلیدی: *Acetobacter، Glauconobacter، باکتریهای مولد اسید استیک، مقاوم گرما.*

مقدمه

قدمت تولید سرکه حداقل به ۴۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح می‌رسد (Deppenmeier, 2002)، و فرآیند تولید آن به لحاظ فیزیولوژیک نوعی واکنش اکسیداسیون ناقص می‌باشد. اولین توصیف درباره تولید سرکه توسط پاستور در۱۸۶۲ انجام گرفت. او دریافت که مادر سرکه توده‌ایی از ارگانیزمهای زنده است که عامل اکسیداسیون اتانول به اسید استیک می‌باشد. باکتری‌های *G.suboxy* و *A. aceti* به ترتیب توسط Beijerinck در۱۸۹۸ وde Leeuw و Kluyver در۱۹۲۴ توصیف شدند (Moonmangmee, 2000). Asai در۱۹۳۴ و بار دیگر در ۱۹۶۸، این باکتریها را به دو جنس اصلی استوباکتر(*Acetobacter*) وگلوکونوباکتر (*Gluconobacter*) رده‌بندی کرد (Higgins, 1990). این دو جنس با تغییراتی همچنان بخشی از خانواده Acetobacteraceae را با ۱۲ جنس به خود اختصاص داده‌اند.

باکتری‌های مؤثر در سرکه‌سازی در دمای حدود ۳۰ºC بالاترین فعالیت را دارند. تابستانهای گرم باعث افزایش دما بیش از ۳۰ ºC حتی در شب می‌شود که این امر بر تولید سرکه اثر کاهنده دارد و بنابراین این صنایع نیاز به آب فراوانی جهت خنک کردن فرمانتورها برای ثابت نگه داشتن دمای بهینه خواهند داشت که متعاقبا هزینه بالایی را متحمل خواهند شد (Saeki, 1997). تغییردما حتی در حدود ۳-۲ ºC، باعث تغییرات شدیدی در سرعت و کارایی اکسیداسیون خواهد شد. یافتن سویه‌های مناسب تولید کننده اسید استیک که بتوانند در دمای بهینه ۴۰-۳۷ ºC فعالیت کنند، برای کاهش دادن هزینه‌های خنک کردن بسیار مفید است. در صنعت سرکه سازی چنین سویه‌هایی را مقاوم گرما یا ترموتالرنت محسوب می‌شوند. تا قبل از سال ۱۹۹۷ به تولید سرکه با سویه‌های مقاوم گرما توجهی نشده بود. ولی در این سال گروهی از دانشگاه یاماگوشی موفق به یافتن سویه‌هایی از این باکتری‌ها شدند که قادر به رشد در دمای ۴۰-۳۷ ºC بودند (Adachi, 2003; Moonmangmee, 2000 ;Saeki, 1997).

بعد از یافتن این سویه‌ها کار بررسی آنها از لحاظ قدرت اکسیداسیون انواع سوبسترا آغاز شد و مشاهده شد که سویه‌های مقاوم گرما علاوه بر تحمل حرارتی دارای تحمل غلظت اسیداستیک تا ۴٪ واتانول تا ۹٪ هستند (Moonmangmee, 2000).

تاکنون سویه‌های Acetobacteraceae بومی ایران بدین لحاظ مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند و اطلاعاتی در مورد فراوانی سویه‌های مقاوم دما در میان باکتریهای مولد اسید استیک بومی ایران وجود ندارد. اگرچه پژوهشهای محدود انجام شده در زمینه باکتری‌های مولد اسید استیک ارزشمند می‌باشد (اله وردی ۱۳۸۰، ثقفی نیا ۱۳۷۷، جعفری ۱۳۸۱).

در بررسی حاضر نسبت به جداسازی باکتری‌های خانواده Acetobacteraceae از سرکه‌های بومی خانگی متعلق به مناطق خاصی از کشور اقدام شد. پس از جداسازی به بررسی ویژگیهای جدایه‌ها از لحاظ تحمل گرمایی و پایداری سویه‌های بومی درمحیط اسیدی و بستگی این ویژگی‌ها به اقلیم پرداخته شد.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه‌های سرکه

حدود۷۰ نمونه سرکه خانگی از شهرهای تاکستان (۳۰ نمونه)، تهران(۱۵ نمونه)، قزوین (۱۵ نمونه) و ابهر (۱۰نمونه) جمع‌آوری شد. نمونه‌های سرکه با سنین مختلف (۳ ماه تا ۶ سال) در شیشه‌های دردار ml ۵۰ جمع آوری شد وبلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید همه نمونه‌ها در دمای اتاق (۲۵ ºC) نگهداری شد.

محیط‌های کشت جداسازی

برای جداسازی Acetobacteraceae از سرکه از محیط کشت EM واجد تراکم gl^{-1} ترکیبات (عصاره مخمر۱۰،کربنات کلسیم۲۰، آگار۲۰ درpH=۶) استفاده شد. محیط کشت درحجم ml ۵۰ در فلاسک‌های ml ۲۵۰ شیاردار تهیه گردید. بعداز اتوکلاو در دمای ºC ۵۰-۴۵ ،۲۰ml اتانول مطلق به آن افزوده و در پلیت‌ها توزیع شد. ml ۰/۲ از سرکه‌ها درمحیط کشت EM به صورت خطی کشت و در دمای ۳۰ºC به مدت h ۴۸ نگهداری شد. جهت خالص‌سازی جدایه‌ها از محیطGYC واجد تراکم ($g\ l^{-1}$) از ترکیبات D-گلوکوز ۵۰ ، عصاره مخمر۱۰، کربنات کلسیم۳۰، وآگار ۲۵ در pH=۶) استفاده شد (صعودی ۱۳۷۷).

تمایز متابولیسمی سویه‌ها

جهت تمایز متابولیسمی سویه‌ها از دو محیط کشتEOM (واجد تراکم $g\ l^{-1}$ عصاره مخمر۳۰، برموکرزول‌گرین۰/۰۲۲، آگار۲۰ و اتانول۲۰) وLOM (واجد تراکم $g\ l^{-1}$ عصاره مخمر۲۰، لاکتات کلسیم ۲۰، آگار ۱۵) استفاده شد و کشتها در دمای ۳۰ºC به مدت h ۴۸ نگهداری شدند.

آنالیز فراورده‌ها

سوسپانسیون سلول‌های شسته شده باکتری با تراکم معین به مدت ۲۴ ساعت با محلول الکل اتیلیک ۴٪ مجاور شد و پس از سانتریفیوژ درrpm ۱۲۰۰۰ مایع رویی با استفاده از دستگاه گاز

۵۴۴ ـــــــ

براساس آنالیز فراورده‌ها، رخداد فرایند اکسیداسیون اتانول و تشکیل اسید استیک و استالدیید به عنوان تنها ترکیب‌های حاصل از واکنش در مورد همهٔ جدایه‌ها به تأیید رسید. لذا همهٔ سویه‌های بدست آمده به عنوان باکتری‌های مولد اسید استیک شناخته شدند. با توجه به خاستگاه سویه‌ها، و بر اساس ویژگی‌های متابولیسمی این سویه‌ها بطور موقت درجنس‌های استوباکتر و گلوکونوباکتر قرار داده شدند. این تقسیم‌بندی تنها به لحاظ کاربردی اهمیت دارد و ارزش تاگزونومیک ندارد، زیرا گلوکونواستوباکترها را (که به لحاظ متابولیسمی تفاوتی با استوباکترها ندارند، ولی) به واسطهٔ دارا بودن یوبیکینون-۱۰ از استوباکترها متمایز می‌شوند (Yamada, *et al.,* 1997) ، جدا نمی‌کند. در ویرایش نهم کتاب سیستماتیک باکتریها, باکتریهای مولد اسید استیک متعلق به خانواده استوباکتراسه به ۴ جنس استوباکتر، گلوکونوباکتر، فراچوریا *(Fraturia)* و اسیدوموناس*(Acidomonas)*، تقسیم‌بندی شدند (Holt, 1994). در ویرایش دهم بر اساس قرابت فیلوژنتیک ۱۲ جنس در این خانواده جای داده شد (Boone and Castenholz, 2001). مهمترین جنس‌هایی که در سرکه سازی دخالت دارند عبارتند از: *Acetobacter, Gluconobacter, Gluconoacetobacter*. فعالیت کتوژنیک و تشکیل کتوگلوکونات در*Glauconobacter* قوی و در *Acetobacter* ضعیف است. بر خلاف، تولید اسید استیک از اتانول در *Acetobacter* قوی‌تر است (Adachi, 1978a, 1978b). گلوکونوباکترها قدرت اکسیداسیون فراتر استات و لاکتات را ندارند.در مقابل استو باکترها استات و لاکتات را اکسید می‌کنند و آنزیمهای چرخه تری کربوکسیلیک را دارا هستند (Higgins 1990).

با توجه به بکارگیری یک روش جداسازی معین برای تمام نمونه‌ها و تعداد متفاوت نمونه‌های واجد باکتری در هر ناحیه، فراوانی نسبی باکتری‌های مقاوم مشخص گردید (جدول ۱). این بررسی نشان می‌دهد که سویه‌های بومی ساکن سرکه‌های تاکستان در دوره زمانی طولانی‌تری فعالیت خود را حفظ می‌کنند. مطابق رابطهٔ زیر "طول عمر نسبی" باکتری‌های مولد سرکه متعلق به هر یک از نواحی تعریف شد. این کمیت تنها برای مجموعه آزمون‌های همسان معنی‌دار است و مطلق نمی‌باشد.

$$\mathbf{A_r = \bar{A}\ (n_a / n_t)}$$

$\mathbf{A_r}$: طول عمر نسبی

$\mathbf{\bar{A}}$: میانگین طول عمر نمونه‌های واجد باکتری فعال

$\mathbf{n_a}$: تعداد نمونه های سرکه واجد باکتری فعال

$\mathbf{n_t}$: تعداد کل نمونه های سرکه

۵۴۶ ـــــــ

از میان ویژگیهای مقاومتی Acetobacteraceae تحمل گرمایی صفت ارزشمندتری است و در صنعت چنین سویه‌هایی به دلیل نیاز کمتر به کنترل دما و تولید اسید استیک بیشتر ترجیح داده می‌شوند (Saeki, 1997). ازمیان ۳۹ جدایه بدست آمده ۳۵ جدایه تا دمای ۳۶±۱ ºC در محیط کشت GYC قادر به رشد و تولید اسید استیک هستند و ۱۳ جدایه توانستند در دمای ۴۰±۱ºC به رشد ادامه دهند. از میان این ۱۳ جدایه، ۵ جدایه از جنس *Acetobacter* و ۸ جدایه از جنس *Glauconobacter* تشخیص داده شد. بنا به تعریف سویه‌هایی از استوباکتر "مقاوم گرما" گفته می‌شوند که قادر به رشد در دمای ۳۷-۴۰ºC باشند (Adachi, 2003). برای سویه‌های مقاوم گرمای *Glauconobacter* دمای بهینه ۳۰-۳۳ ºC و حداکثر دمای ۳۷ ºC گزارش شده است (Moonmangmee, 2000). درحالی که جدایه‌های *Glauconobacter* در این پژوهش قادر به رشد در دمای ۴۰±۱ ºC نیز بوده اند (جدول۳).

جدول۳- دسته بندی سویه‌ها براساس جنس و مقاومت گرمایی

تعداد سویه ها	رشد در دمای ۴۰±۱ ºC	رشد در دمای ۳۶±۱ ºC	اکسیداسیون استات در EOM	دادن هاله در LOM
گروه دارای ویژگی های استوباکتر				
۵	+	+	+	+
۱۴	−	+	+	+
۴	−	−	+	+
گروه دارای ویژگی های گلوکونوباکتر				
۵	+	+	−	−
۱	−	+	−	−
۲	−	−	−	−
گروه دارای ویژگی های گلوکونوباکتر ترموتالرنت				
۳	+	+	+	−
۵	−	+	+	−
۰	−	−	+	−

نسبت جدایه‌های مقاوم گرمای یافت شده با توجه به تعداد جدایه‌های هر شهر برابر است با: تهران ۶۰٪، ابهر ۵۰٪، تاکستان ۳۱/۸۱٪، و قزوین ۱۲/۵٪. این یافته احتمال سازش دمایی باکتریها با اقلیم را تایید می‌کند، زیرا تهران دارای میانگین دمایی بالاتری نسبت به سه شهر دیگر می‌باشد. میانگین دمای سالانه این ۴ شهر در سال ۲۰۰۰ میلادی به ترتیب عبارتند از تهران ۱۶/۵ ºC قزوین ۱۴/۲ ºC تاکستان ۱۳/۶ ºC و ابهر ۱۲/۹ ºC (سازمان هوا شناسی). بنابراین دمای اولیه جهت تولید سرکه در ایجاد سویه‌های ترموتالرنت مؤثر بوده است.

از میان ۳۹ سویه، ۲۳ جدایه متعلق به جنس *Acetobacter* و بقیه متعلق به جنس *Glauconobacter* بودند. البته در میان سویه‌های متعلق به *Glauconobacter*، جدایه‌های مقاوم گرما دارای خصوصیات خاصی هستند، بدین صورت که قادر به اکسیداسیون فراتر استات هستند. ولی نمی‌توانند لاکتات را به CO2 وH2O اکسیده کنند(Saeki 1997) . نتایج حاصل از بررسی متابولیسمی سویه‌ها درجدول۳ قابل مشاهده است. در این مطالعه نیز برخی از جدایه-های *Glauconobacter* (۳ جدایه یعنی ۷/۶۹ ٪ کل جدایه ها) استات را فراتر اکسید نمودند ولی اکسیداسیون لاکتات مشاهده نشد. این بدان معنا نیست که همه سویه‌های مقاوم گرمای *Glauconobacter* دارای این ویژگی هستند زیرا ۱۲/۸ ٪ از کل جدایه‌ها (۵ جدایه) گلوکونوباکترهای ترموتالرنتی هستند که قدرت اکسیداسیون استات را ندارند. این یافته که نیازمند بررسی‌های بیشتری است با نتایج کار پژوهشگران دیگر نظیر مونمانگمی (Moonmangmee *et al.,* 2000) سازگاری دارد.

References

Adachi O., Moonmangmee D., Toyama H., Yamada M., Shinagawa E., and Matsushita, K. (2003) *New development in oxidative fermentation*. Applied Microbiology and Biotechnology, **60**, 643-653.

Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, E., Matsushita, K., and Ameyama, M. (1978a) *Purification and characterization of particulate Alcohol dehydrogenase from Geluconobacter suboxydans.* Agricultural and Biological Chemistry, **42**, 2045-2056.

Adachi, O., Miagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K., and Ameyama, M. (1978b) *Purification and characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from Acetobacter aceti*. Agricultural and Biological Chemistry, **42**, 2331-2340.

Best, D.J. (1990) *Chemistry and Biotechnology.* In Biotechnology. Eds. Higgins, I.J, Best, D.J., Jones, J. Pub. Black Well Scientific. pp. 111-162.

Boone, D.R., and Castenholz, W. (2001) *Bergy's Manual of Systematic Bacteriology.* Ed. in chief: Garrity, G. M., Pub. Springer.

Deppenmeier, V., Hoffmeister, M., and Prust, C. (2002) *Biochemistry and Biotechnological Applications of Gluconobacter Strains*. Applied Microbiology and Biotechnology, **60**, 233-242.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneeth, P.H.A., Stanley, J.T., and Williams S.T. (1994) *Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology*, ninth edition. Pub. Williams & Wilkins.

Moonmangmee, D., Adachi, O., Ano, Y., Shinagawa, E., Toyama, H., Theeragol, G., Lotong, N., and Matsushita, K. (2000) *Isolation and characterization of thermotolerant Gluconobacter strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, **64**, 2306-2315.

Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., and Adachi O., (1997) *Development of Thermotolerant Acetic acid baeteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, **64**,138-145.

Yamada, Y. and Kondo, K. (1984) *Gluconoacetobacter, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus Acetobacter*. Journal of General and Applied Microbiology, **30**, 297-303.

Yamada, Y., Hoshini, K. and Ishikawa, T. (1997) *The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus Gluconoacetobacter to generic level.* Bioscience Biotechnology and Biochemistry, **61**, 1244-1251.

الـه وردی.ع، قـائمی.ن، نـوحی.ا ملـک زاده.ف (۱۳۸۰) *سـینتیک تولیـد L - سـوربوز توسط A.suboxydans TU101 & TU201 & TU301 بـه طریـق FED-Batch*. پایـان نامـه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده علوم.

ثقفی‌نیا، ا.، ملک‌زاده، ف.، (۱۳۷۷) *بررسی مشخصـات میکروبیولـوژی و بیوشـیمیایی کامبوچـا*. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده علوم.

جعفری، پ.، قایمی، ن.، نوحی، ا. (۱۳۸۱) *بیواکسیداسـیون - D سـوربیتول بـه L- سـوربوز بـا استفاده از G.oxydans* . پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده علوم پایه.

صـعودی، م.ر. (۱۳۷۷) *مبـانی و آزمونهـای فراینـدهای تخمیـری*. انتشـارات دانشـگاه الزهـرا. ص:۱۶۴-۱۳۴.