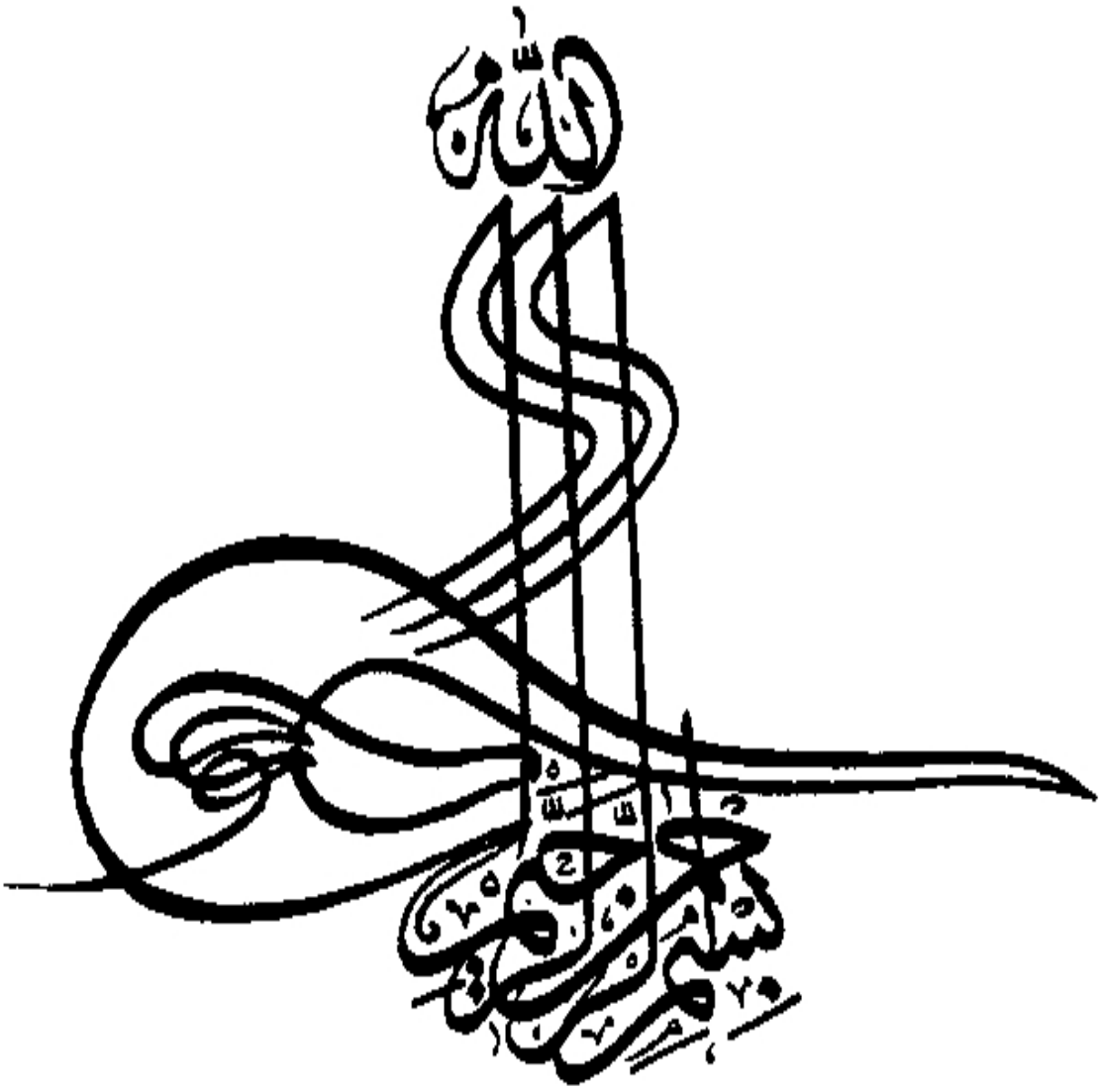


دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد

در رشته میکروبیولوژی

عنوان

جداسازی، شناسلیی و بهینه سازی گونه های بومی مولد اسید اسیک و بررسی نحوه نگهداری آنها

استاد راهنما

آقای دکتر ایرج رسولی

استاد مشاور

اقای کیوان بهشتی مآل

دانشجو

سیده مریم شرفی

اسفند ۱۳۸۸

جداسازي، شناسا يي و بهينه سازي گو نه ها ي بومي مولد اسيد استيك و بررسي نحوه نگهداري آنها

چكيده:

باکتریهای اسید استیک (AAB) جزء باکتریهای گرم منفی و شدیدا هوازی هستند که به طور طبیعی ، روی میوه ها، حبوبات وگیاهان یافت میشود و توانایی اکسید کردن انواع مختلف الکل ها و قندها را به محصولاتی مثل سرکه، سلولز، سوربوز و گلوکونیک اسید دارند .باکتریهای اسید استیک در تولید صنعتی سرکه مفید هستند .در صنعت غذا مقبولیت طعم و رایحه از اهمیت فوق العادهایی برخوردار است .طعم و رایحه پارامترهای قراردادی نیستند و از فرهنگی به فرهنگ دیگر و یا به صورت بومی متغیر می باشند.

سرکه تولید صنایع داخلی، از سویی به لحاظ طعم متناسب با ذائقه مصرف کننده ایرانی نیست و از سوی دیگر به دلیل عدم تناسب تکنولوژی با شرایط اقلیمی ایران مشکلات متعددی در زمینه تولید وجود دارد.هدف این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری های اسید استیک، بهینه کردن شرایط رشد باکتری و تولید اسید استیک و ارزیابی میزان تولید اسید استیک است .نمونه ها از میوه های مختلف جداسازی شده و برای شناسایی باکتریهای اسید استیک از محیط گلوکز، عصاره مخمر و کربنات کلسیم(GYC)استفاده شده است.برای شناسایی نمونه منتخب از نظر تولید اسید استیک تست های بیوشیمیایی، شناسایی ملکولی بر اساس۱۶ sRNA انجام شد و همچنین درخت فیلوژنیک آن براساس توالی به دست آمده رسم شد .

سرکه و جداسازی ، *Acetobacter pasteurianus*، واژگان کلیدی : باکتری های اسید استیک

فهرست مطالب

فصل اول : کلیات

مقدمه

پیشینه تحقیق

2-1- (AAB) باکتریهای اسید استیک

2-2-طبقه بندی باکتری های اسید استیک

2-3-ویژگیهای خانواده استوباکتریاسه

2-4-تفاوتهای جنسهای خانواده

2-5-تفاوتهای باکتریهای اسید استیک با دیگر جنس ها

2-6-تفاوتهای بین گونههای جنس استوباکتر

2-6-1- *Acetobacter aceti*

2-6-2- *Acetobacter cibinongensis*

2-6-3- *Acetobacter estunensis*

2-6-4- *Acetobacter indonesiensis*

2-6-5- *Acetobacter lovaniensis*

2-6-6- *Acetobacter orientalis*

2-6-7- *Acetobacter orleanensis*

2-6-8- *Acetobacter pasteurianus*

2-6-9- *Acetobacter peroxydans*

2-6-10- *Acetobacter pomorum*

2-6-11- *Acetobacter syzygii*

2-6-12- *Acetobacter tropicalis*

2-7-روش های مختلف شناسایی باکتری های اسید استیک

2-8-محیط های کشت

2-9-روش های جداسازی وغنی سازی

2-10-روشهای نگهداری

2-11-عوامل موثر در تولید اسیداستیک

2-11-1-اکسیژن

2-11-2-دما

2-11-3- pH

2-11-4- Bacteriophage infection

2-11-5- Overoxidationتوانایی باکتری ها برای اکسید کردن اتانل

2-11-6-پلی ساکارید های خارج سلولی

2-12-خصوصیات بیوشیمیایی باکتریهای اسید استیک

2-12-1-متابولیسم قند ها

2-12-2-الکل وآلدهید دهیدروژنازهای باکتری های اسید استیک

2-12-3-زنجیره های تنفسی

2-12-4-آلفا امینو اسید استر هیدرولاز

2-12-5-تولید سلولز واستان

2-12-6- (Insertion sequences) توالی های الحاقی

2-12-7-تثبیت نیتروژن

2-13-خصوصیات ژنتیکی باکتری های اسید استیک

فصل دوم : مواد و روش ها

2-1-مواد

2-2-روش ها
2-2-2-نگهداری سویه ها و تهیه استوک
2-2-3- (Biotyping) شناسایی بیوشیمیایی
2-2-3-1-تست کاتالاز
2-2-3-2- تولید اسید ازD-glucose
2-2-3-3-تولید کتون از گلیسرول
2-2-3-4-تولید 5 -keto-D-gluconate از D-glucose
2-2-3-5-احیای نیترات
2-2-4-شناسایی مولکولی
2-2-4-1-کشت باکتری
2-2-4-2-استخراج ژنوم از استو باکتر
2-2-4-3-آنالیز ژنوم تخلیص شده
2-2-4-4-روش انجام الکتروفورز
2-2-4-5-تهیه بافر الکتروفورز
2-2-4-6-رنگ آمیزی ژل
2-2-4-7-طراحی پرایمر
2-2-4-8-واکنش زنجیرهای پلیمراز
2-2-4-9-نکاتی در مورد واکنش زنجیره ای پلیمراز
2-2-4-10-آنالیز محصولPCR
2-2-4-11-تخلیص محصولPCR
2-2-4-12- (Sequencing) .تعیین ترادف محصول
2-2-4-13- PCRتعیین صحت محصول
2-2-4-14-درخت فیلوژنیک
2-2-5-بهینه سازی شرایط رشد باکتری و تولید اسید استیک
2-2-5-1-بهینه سازی شرایط رشد باکتری
2-2-5-2-بهینه سازی شرایط تولید اسید استیک
فصل سوم : نتایج
3-1-نمونه گیری، شرایط تخمیر و جداسازی
3-2-نگهداری سویه ها و تهیه استوک
3-3-نتایج آزمون های بیوشیمیایی جهت تشخیص گونه های استو باکتر
3-4-نتایج مربوط به شناسایی مولکولی
3-4-1-نتایج استخراج ژنوم استو باکتر و آنالیز آن
3-4-2- (PCR) 16نتایج واکنش زنجیرهای پلیمراز
3-4-3- (Sequencing)تعیین ترادف محصول
3-4-4-آنالیز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز با هضم آنزیمی
3-4-5-نتایج بررسی های فیلونتیک
3-5-نتایج مربوط به بهینه سازی شرایط رشد باکتری و تولید اسید استیک
3-5-1-بهینه سازی شرایط رشد باکتری
3-5-2-بهینه سازی شرایط تولید اسید استیک
فصل چهارم : بحث
فصل پنجم : منابع
فصل ششم : پیوست

فصل اول

کلیات

۱- مقدمه

باکتری‌های مولد اسید استیک، باکتری‌هایی گرم منفی و شدیدا هوازی هستند که به‌طور طبیعی روی میوه‌ها، حبوبات وگیاهان یافت می‌شود و توانایی اکسید کردن انواع مختلف الکل‌ها و قندها را به محصولاتی مثل سرکه، سلولز، سوربوز و گلوکونیک اسید دارد (Bassirou, 2007). بهترین منبع کربن برای سویه‌های استوباکتر: اتانل، گلیسرول و Na-DL-lactate است و برای گلوکونو باکترها: D- مانیتول، سوربیتول، گلیسرول، D- فروکتوز و D- گلوکز است (Maria et al., 2006). امروزه باکتری های اسید استیک در جنس‌های *Saccharibacter*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacte*, *Swaminathania*, *Kozakia*, *Asaia*, *Acidomonas* طبقه‌بندی می‌شوند. غلظت اسید استیک تولید شده در فرآیند غوطه وری ۱۷٪ گزارش شده است. اخیرا دو گونه از باکتری‌های اسید استیک تحمل کننده دما از انبه به‌دست آمده است (Bassirou, 2007). در فرآیند غوطه‌وری میزان اسید به‌دست آمده۱۲٪ است و بالاترین مقدار اسید تولید شده نزدیک به ۱۶٪ گزارش شده است (San, 2005). اسید استیک باعث طعم سرکه می‌شود و دارای خاصیت ضد میکروبی است. اسید استیک یک افزودنی غذایی است که به‌منظور آلودگی‌زدایی در صنایع غذایی استفاده می‌شود (Marshall et al., 2000).

سرکه نقش مهمی را در چاشنی سالاد، سس کچاپ، سس تند و دیگر سس‌ها دارد. براساس نیاز فراوان به سرکه، سیستم‌های تخمیر صنعتی توانایی تولید مقدار زیادی سرکه را دارند. این سیستم‌ها باید قابل کنترل باشند و شرایط اپتیمم برای باکتری‌های مولد اسید استیک فراهم باشد (De Ory et al., 1999). خیلی از تکنیک‌ها برای بهبود شرایط تولید سرکه شناخته شده‌اند. بیشترین تلاش، برای افزایش سرعت تبدیل اتانل به اسید استیک در حضور باکتری‌های مولد اسید استیک انجام شده است (Tesfaye et al., 2002).

امروزه معمول‌ترین تکنولوژی مورد استفاده برای تولید سرکه صنعتی براساس کشت غوطه‌وری است (Hormatka and Ebner, 1951).

سرکه را می‌توان با استفاده از تکنیک‌های مختلف از مواد متفـاوت تهیـه کـرد. شـراب (سـفید، قرمـز، شراب شیرین یا تلخ اسپانیولی)، آب سیب، جو مالت شده و الکل خالص به‌عنوان سوبسترا بـرای تهیـه سرکه استفاده می‌شود (Morales et al., 2001). سرکه به‌عنوان نگه‌دارنده مواد غذایی نیز کـاربرد دارد (De Ory et al., 2002). از نظر سنتی، از میوه‌های مرغوب و نامرغوب و همچنین باقیمانده‌های حاصل از میوه‌ها تولید سرکه، امکان پذیر است. امروزه بیشتر سرکه‌ها از الکل تقطیر شـده (Distilled grain alcohol) تولید می‌شوند. سرکه ممکن است به‌عنوان یک چاشنی تهیه شده از مواد قندی و نشاسته‌ای تعریف شود. باکتری‌های سرکه که باکتری‌های مولد اسید استیک هم نامیده می‌شوند از اعضای جنس اسـتو بـاکتر هسـتند وتوسـط توانائیشـان در اکسـید کـردن اتانـل (C_2H_5OH) بـه اسـید اسـتیک (CH_3CO_2H) شناخته می‌شوند. سرکه می‌تواند از مواد خام مختلف نظیر: الکل تقطیـر شـده، شـراب، شراب سیب و هر نوع محلول الکلی، توسط چند تکنیک مثل Generator process, Orleans process و Submerged acetification process به‌دست می‌آید.

$$2C_2H_5OH \rightarrow 2CH_3CHO \rightarrow 2CH_3CO_2H + 2H_2O$$

بیشتر سویه‌های به‌دست آمده از کارخانه‌های تولید سرکه می‌توانند اسید اسـتیک را بـه CO_2 و H_2O اکسید کنند (Over-oxidation). بنا براین در جنس *Acetobacter* قرار می گیرند (De Ley *et al.*,1984). بـاکتری‌هـای مولـد اسـید اسـتیک توانـایی اکسـید کـردن سـریع و نـاقص سوبستراهای کربنی، خصوصا قند ها و الکل‌ها را دارند. انواع مختلف سرکه‌های تولید شده از نظر مـواد خام، تکنولوژی و موارد استفاده با هم متفاوت هسـتند (Giudici et al., 2006). انـواع معمـول سـرکه شامل سرکه سفید تقطیر شـده، سـرکه سـیب، سـرکه شـراب، سـرکه بـرنج و سـرکه مالـت هسـتند. فرآیندهای بعدی تولید سرکه به‌دنبال تبدیل سوبسترا بـه اسـید اسـتیک شـامل فیلتراسـیون، شـفاف کردن و پاستوریزه کردن در (۷۴°C) °F ۱۶۵/۲ است (Nickol, 1979).

از نظر تکنولوژیکی، ۲ روش مناسب برای تولید سرکه وجود دارد:

- روش سنتی (آهسته)
- روش غوطه ور (سریع) (Tesfaye *et al.*, 2002).

روش‌های سنتی به‌طور معمول بـه "Surface culture fermentations" کـه رشـد بسـیار زیـاد باکتری‌های مولد اسید استیک روی سطح محیط کشت، جایی که غلظـت زیـاد اکسـیژن اسـت گفتـه می‌شود. روش‌های غوطه‌وری (Submerge) معمولا به‌صورت فرآیندهای نیمه‌پیوسته و سریع بـرای تولید صنعتی سرکه استفاده می‌شود (Adams, 1998). از بین روش‌های گفته شده، برای تولید سرکه صنعتی در ایران از فرآیند غوطه‌وری استفاده می‌شود. این فرآیند پیشرفته بنا به آمـار وزارت صـنایع و معادن کشورمان در ۵۴ کارخانه داخلی مورد استفاده قرار می‌گیرد که تولیـد سـالانه آن هـا مجموعـا ۱۳۵۰۰۰ تن می باشد. مشکلات موجود این صنعت در ایران شامل موارد زیر می باشد:

- سرکه ای که تولید می شود از لحاظ طعم متناسب با مصرف کننده ایرانی نیست.
- به دلیل عدم تناسب تکنولوژی با شرایط اقلیمـی ایـران مشـکلات متعـددی در زمینـه تولیـد وجود دارد.

به‌منظور یاری رساندن به حل مشکلات فوق، این تحقیق با اهداف زیر انجام می‌گیرد:

۱- جداسازی گونه‌های بومی مناسب از نظر تولید اسید استیک

۲- شناسایی باکتری‌های مولـد اسـید اسـتیک در حـد جـنس وگونـه بـا اسـتفاده از تسـت‌هـای بیوشیمیایی (بیوتایپینگ)

۳- شناسایی مولکولی بر اساس روش‌های متداول میکروبیولوژیکی

۴- به‌کار گیری روش‌های کاربردی در نگه‌داری گونه‌های انتخاب شده برای مدت طولانی

۲- پیشینه تحقیق

۲-۱- باکتری‌های مولد اسید استیک (AAB)

باکتری‌های مولد اسید استیک، باکتری‌هایی گرم منفی، بیضوی تا میله‌ای هستند، که متابولیسم هوازی اجباری دارند و اکسیژن به‌عنوان گیرنده نهایی الکترون است. این باکتری‌ها می‌توانند سوبستراهایی مثل گلوکز، اتانل، لاکتات یا گلیسرول را به‌عنوان منبع انرژی مصرف کنند. بنابر این بیشتر این ترکیبات به‌طور کامل به Co_2 اکسید نمی‌شوند و آب و چندین متابولیت، خصوصا" اسید استیک درمحیط تولید، جمع می شود. باکتری های مولد اسید استیک معمولا در طبیعت یافت می-شوند. زیرا این باکتری‌ها مقاومت بالایی به اسیدیته دارند و سوبستراهای متنوعی را می‌توانند استفاده کنند

(De Ley *et al.*, 1984). تعدادی از گونه‌ها مثل گونه‌های *G. diazotrophicus* می‌توانند در غلظت ۳۰٪ دی-گلوکز رشد کنند (Swings,1992). بهترین منبع کربن برای سویه‌های استو باکتر، اتانل، گلیسرول و برای گلوکونو باکتر، دی- مانیتول، سوربیتول، گلیسرول، دی- فروکتوز و دی- گلوکز است. باکتری های مولد اسید استیک از نوشیدنی‌های الکلی، سرکه، میوه ها، گل ها، چغندر قند، نیشکر، عسل، خاک و آب جدا می‌شوند (Saeki et al., 1997; Swings, 1992; Yamada et al., 1999).

باکتری های مولد اسید استیک توسط توانائیشان در اکسید کردن ناقص الکل‌ها وقندها شناسایی می-شوند. بیشتر آن‌ها توانایی اکسید کردن اتانل به اسید استیک را دارند به‌جز گونه *Asaia* که نمی‌تواند از اتانل، تولید اسید استیک کند. بعد از اکسیداسیون کامل، سویه‌های *Acetobacter* اسید استیک را بیشتر اکسید می‌کنند و Co_2 و H_2o تولید می‌کنند (overoxidation of ethanol). درحالیکه اکسیداسیون اسید استیک در Gluconobacter, Asaia, Neoasaia, Saccharibacter, Granulibacter, Swaminathania, Kozakia وجود ندارد.

۲-۲- طبقه بندی باکتری های اسید استیک

طبقه‌بندی باکتری های مولد اسید استیک در سال‌های اخیر تغییرات زیادی کرده است. چندین جنس و گونه جدیدا بررسی شده‌اند. باکتری های مولد اسید استیک اخیرا در ۱۰ جنس و ۴۴ گونه طبقه‌بندی می‌شوند:

۱. Acetobacter (16 species)
۲. Gluconobacter (5 species)
۳. Acidomonas (1 species)
۴. Gluconacetobacter (15 species)
۵. Asaia (3 species)
۶. Kozakia (1 species)
۷. Saccharibacter (1 species)
۸. Swaminathania (1 species)
۹. Neosaia (1 species)
۱۰. Granulibacter (1 species)

(Dellaglio et al., 2005; Dutta and Gachhui, 2006; Greenberg et al., 2006; Jojima et al., 2004; Lisdiyanti et al., 2006; Loganathan and Nair, 2004; Sievers and Swings, 2005; Silva et al., 2006; Tanasupawat et al., 2004; Yukphan et al., 2004, 2005).

در حال حاضر شناسایی در حد جنس یا شناسایی باکتری های مولد اسید استیک با استفاده از تست های فنوتیپی آسان‌تر است. شناسایی در سطح گونه کمی سخت‌تر است

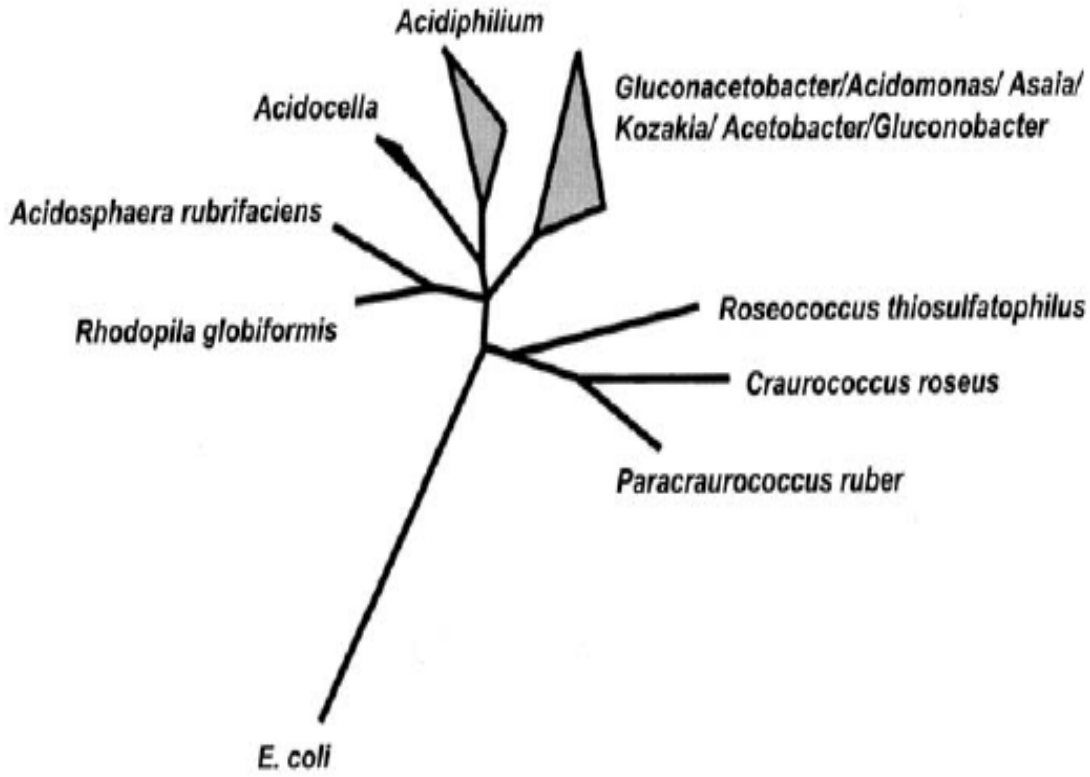
(Gossele et al.,. 1983; Navarro and Komagata, 1999; Lisdiyanti et al., 2000, 2001; Cleenwerck et al., 2002).

جهش‌های خود به‌خودی اغلب درباکتری های مولد اسید استیک اتفاق می‌افتد

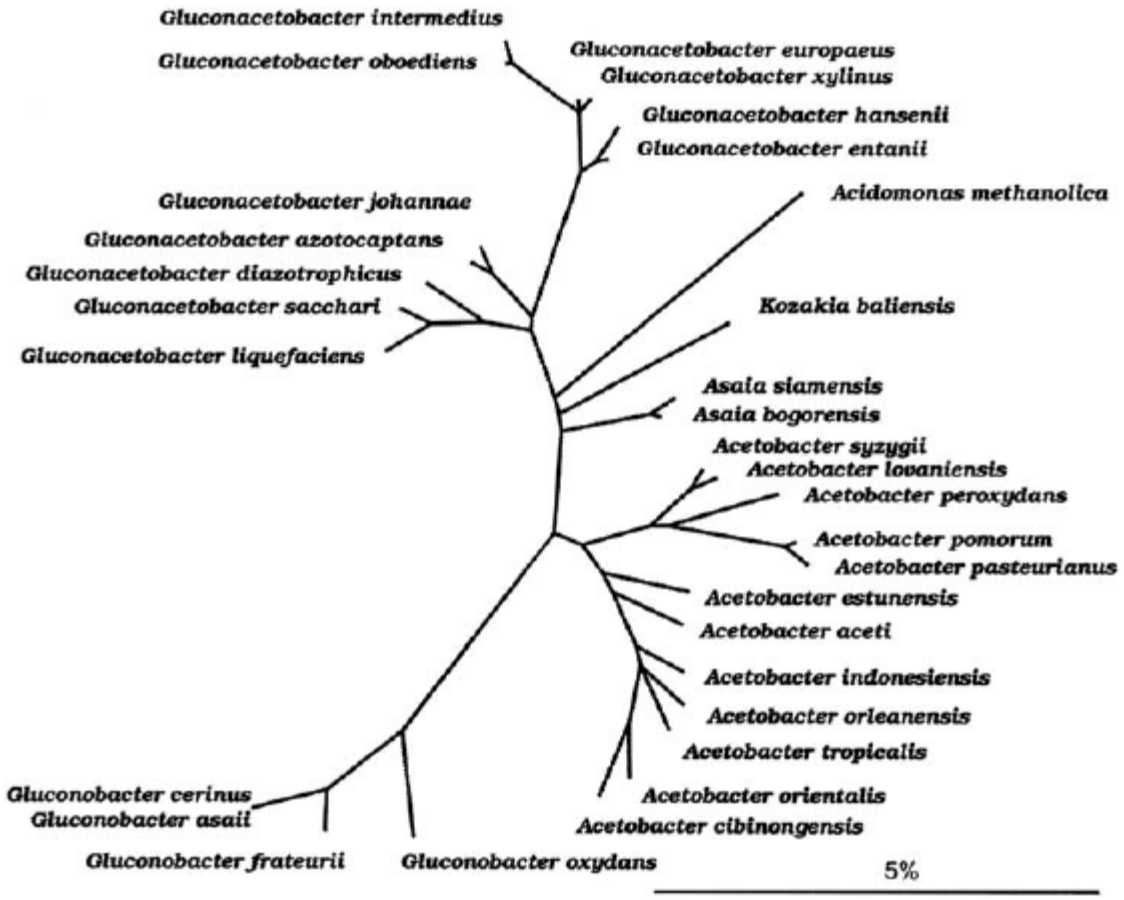
(Ohmori *et al.*, 1982; Yamada, 1983; Iversen *et al.*, 1994; Sokollek *et al.*, 1998a; Navarro and Komagata, 1999; Kersters *et al.*, 2006)·

این تغییرات خود به‌خودی در فنوتیپ ظاهر می‌شوند که در برخی از موارد به‌دلیل IS element ها است. چندین نویسنده گزارش کرده‌اند که انواع فلاژل‌ها برای تمایز باکتری های مولد اسید استیک به‌کار می‌رود (Gossele *et al*., 1983; De Ley *et al*., 1984).

پیوستگی فیلوژنتیکی گونه‌های *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Asaia* و ارتباط باکتری‌های اسیدوفیلیک بر اساس توالی‌های 16S,5 S rRNA مطالعه شده است(شکل ۱-۱ و شکل ۱-۲) (Don *et al*., 2005).



شـــــکل۱-۱ پیوســـــتگی فیلـــــوژنتیکی بـــــین گونـــــه‌هـــــای *paracraurococcus,craurococcus,roseococcus,kozakia, Gluconacetobacter, Acidomonas, Acetobacter, Gluconobacter* را نشان می‌دهد



شکل۱-۲ پیوستگی فیلوژنتیکی بین گونه های مختلف خانواده استو باکتریاسه

از نظر فیلوژنتیکی باکتری های مولد اسید استیک در ۴ دسته اصلی قرار می‌گیرند:

دسته اول:

Gluconacetobacter europaeus

Gluconacetobacter xylinus

Gluconacetobacter intermedius

Gluconacetobacter oboediens

Gluconacetobacter entanii

Gluconacetobacter hansenii

Gluconacetobacter sacchari

Gluconacetobacte liquefaciens

Gluconacetobacter diazotrophicus

Gluconacetobacter azotocaptans

Gluconacetobacter johannae

دسته دوم:

Acetobacter syzygii

Acetobacter lovaniensis

Acetobacter peroxydans

Acetobacter pomorum

Acetobacter pasteurianus

Acetobacter estunensis

Acetobacter aceti

Acetobacter indonesiensis

Acetobacter orleanensis

Acetobacter tropicalis

Acetobacter orientalis

Acetobacter cibinongensis

دسته سوم:

Gluconobacter oxydans

Gluconobacter asaii

Gluconobacter cerinus

Gluconobacter frateurii

دسته چهارم:

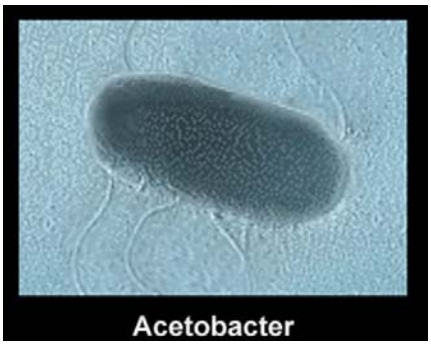
Kozakia baliensis

Asaia bogorensis

Asaia siamensis

۲-۳- ویژگی‌های خانواده استوباکتریاسه

- سلول‌ها بیضی تا کروی شکل، مستقیم و اندکی محدب هستند.
- به‌صورت منفرد یا جفت یا زنجیره‌ای هستند.
- حرکت توسط فلاژل‌های پری تریش یا توسط ۱-۸ فلاژل قطبی انجام می‌شود و یا بدون حرکت هستند(شکل۱-۳).



شکل۱-۳ نمونه ای از *Acetobacter* با فلاژل های پری تریش

- اندوسپور تشکیل نمی‌شود.
- گرم منفی
- هوازی اجباری
- اکسیژن به‌عنوان گیرنده نهایی الکترون است.
- Never fermentative هستند.
- تشکیل کلونی‌های صورتی می‌دهند.
- بیشتر سویه‌ها پیگمان تولید نمی‌کنند.
- تعداد کمی از سویه‌ها پیگمان‌های محلول در آب قهوه‌ای تولید می‌کنند یا کلونی‌های صورتی ایجاد می‌کنندکه به‌دلیل تولید پورفیرین‌ها است.
- معمولا کاتالاز مثبت هستند.
- اکسیداز منفی هستند.

- عدم مایع شدن ژلاتین.
- عدم تولید اندول.
- عدم تولید H_2S.
- اکسید شدن اتانل به اسید استیک.
- اکسید شدن استات به H_2O و CO_2.
- بهترین منبع کربن برای رشدشان اتانل، گلیسرول وگلوکز است.
- برخی از سویه‌ها به‌عنوان فاکتورهای رشد نیاز به:

  Acidniacin، p-aminobenzoic ، Thiamin و Pantothenic acid دارند.
- لاکتوز و نشاسته را هیدرولیز نمی‌کند.
- از D-glucose، 2,5-D keto-D-gluconate تولید نمی‌شود.
- شیمیوارگانوتروف هستند.
- دمای اپتیمم رشد ۳۰ درجه سانتی‌گراد است.
- برخی از سویه‌ها نیترات را به نیتریت اکسید می‌کنند.
- pH مطلوب رشد ۶-۴ است.
- **دارای** یوبی کوئینون Q-9 به عنوان یوبی‌کوئینون اصلی است.
- اثر استوباکتر روی انسان و حیوانات شناخته نشده است.
- اسید چرب غالب در استوباکترها، اسید اشباع نشده زنجیره مستقیم است.
- فرم‌های مارپیچی، دراز، خمیده، چماقی وورم کرده نیز ممکنست وجود داشته باشد.
- میزان G+C mol% ۶۵-۵۱ است.
- کاتالاز مثبت (به جز برای استوباکتر پاستوریانوس و استوباکتر پراکسیدانس).
- گونه‌های استوباکتر در میوه‌ها، گل‌ها، شراب خرما، سرکه، کفیر و غذاهای تخمیر شده وجود دارد (Don et al., 2005).

۲-۴- تفاوت‌های جنس‌های خانواده *Acetobacteracea*

جنس‌های خانواده *Acetobacteracea* شامل:

Gluconacetobacter, *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, and *Gluconobacter*

است که در جنبه‌های زیر با هم تفاوت دارند: (جدول ۱-۱)

۱. ژنتیکی

۲. خصوصیات فیزیولوژیکی مثل:

- 16S rRNA تشابه توالی
- موقعیت‌های فیلوژنیک
- تشابه DNA–DNA
- انواع یوبی کوئینون
- اکسیداسیون اسید استیک به دی اکسید کربن وآب
- تحمل به اسید استیک

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Production of acetic acid	+	+	+	+	−	+	+	v (w/−)	+	v (w/−)
Oxidation of:										
Acetate to CO_2 and H_2O	−	+	+	+	w	w	w	−	−	W
Lactacte to CO_2 and H_2O	−	+	+	v (−/w)	w	w	w	w	−	+
Growth in the presence of 0.35% acetic acid (pH 3.5)	+	+	+	+	−	+	+	−	+	Nd
Growth in the presence of 1% KNO_3 [a]	−	−	−	+	−	−	+	Nd	−	Nd
Production of keto-D-gluconic acid from d-glucose:										
2,5-diketo-D-gluconic acid	v	−	v	−	−	−	nd	nd	nd	Nd
5-keto-D-gluconic acid	+	v	v	−	+	+	nd	+	+	Nd
2-keto-D-gluconic acid	+	v	v[b]	−	+	+	nd	+	+	Nd
Production of hydoxyacetone from glycerol	+	v	v	−	v	+	+	−	w	−
Growth on methanol as carbon source	−	v[c]	−	+	−	−	−	−	−	+
Production of water soluble brown pigment(s)	v	−	v	−[a]	−	−	+	−	−	Nd
Production of γ-pyrones from:										
D-glucose	v	−	v	nd	−	−	nd	nd	nd	Nd
D-fructose	+	−	−	nd	v (+/w)	v	nd	nd	nd	nd
Acid production from:										
L-arabinose	+	v	v	+	+	+	+	+	+	nd
D-arabinose	+	−	−	v	+	v	nd	−	w	nd
D-xylose	+	v	v	+	+	+	v	+	+	−
L-rhamnose	−	−	−	−	v	−	−	−	w	nd
D-glucose	+	v	+	+	+	+	+	+	+	w
D-galactose	+	v	+	+	+	+	+	+	+	nd
D-mannose	+	v	v	+	+	+	+	+	+	nd
D-fructose	+	−	+	−	+	−	v	v	+	nd
L-sorbose	+	−	v	nd	+	−	nd	−	−	nd
Melibiose	+	−	−	v	+	+	nd	+	+	nd
Sucrose	+	−	−	−	+	v	nd	+	+	−
Raffinose	−	−	−	−	−	+	nd	−	+	nd
D-mannitol	+	−	v	−	v	−	−	+	w	−
D-sorbitol	+	−	−	−	v	−	+	−	+	−
Dulcitol	−	−	−	−	v	−	v[g]	−	w	−
Glycerol	+	−	+	+	+	+	+	−	+	v (w/−)
Ethanol	+	+	+	+	−	+	+	−	+	+
Production of cellulose	−	−	v	−	−	−	nd	−	nd	nd
Production of levan-like mucous substance(s) from sucrose	−	v	−	−	−	+	nd	−	−	nd
Growth in the presence of 30% D-glucose	−	v[d]	v	+	+	−	nd	+	+	nd
Motility and flagellation	Non-motile (mostly) or polar[e]	Non-motile or peritrichous	Non-motile or peritrichous	Non-motile or polar	Non-motile or peritrichous	Non-motile	Peritrichous	Non-motile	Non-motile	Non-motile
Major ubiquinone	Q10	Q9	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	nd
G+C content (mol%)[f]	54–64	52–64	56–67	62–63	59–61	56–57	57–60	52–53	63.1	59

Taxa are listed as: 1, *Gluconobacter*; 2, *Acetobacter*; 3, *Gluconacetobacter*; 4, *Acidomonas*; 5, *Asaia*; 6, *Kozakia*; 7, *Swaminathania*; 8, *Saccharibacter*; 9, *Neoasaia*; 10, *Granulibacter*. Data for taxa 1–3 and 5–6 were taken from Lisdiyanti et al. (2002), data for taxon 4 were taken from Yamashita et al. (2004), data for taxon 7 were taken from Loganathan and Nair (2004), data for taxon 8 were taken from Jojima et al. (2004), data for taxon 9 were taken from Yukphan et al. (2005), data for taxon 10 were taken from Greenberg et al. (2006), unless indicated otherwise. Symbols: +: positive, −: negative, w: weak positive, v: variable, nd: not determined.

جدول ۱-۱- خصوصیات متفاوت جنس‌های استوباکتر

۲-۵- تفاوت‌های باکتری های مولد اسید استیک با دیگر جنس‌ها

باکتری های مولد اسید استیک (به جز *Asais*) اتانل را در شرایط هوازی به اسید استیک اکسید می-کنـد و اسـید اسـتیک در محـیط کشـت انباشـته مـی‌شـود. بعـد از کامـل شـدن اکسیداسـیون اتانل ,*Acetobacter*اسید استیک را به CO_2 و H_2O اکسید می‌کند. این پدیده یک تمایز فنـوتیپی سریع overoxidation را نشان می‌دهد. اسید استیکی که در ابتدا ایجاد می‌شود، کربنات کلسیم را حل می‌کند و با اکسیداسیون بیشتر اسید استیک توسط *Acetobacter* تدریجا رنگ سفید محـیط بر می‌گردد. این محیط برای جداسازی باکتری‌های اسید استیک از میوه‌ها و گل‌ها استفاده مـی‌شـود. غلظت نهـایی ۰/۰۱ درصـد سـیکلوهگزامید (stock-solution dissolved in ethanol) بـرای جلوگیری از رشد بیشتر مخمرها اسـتفاده مـی‌شـود. کلـونی‌هـای *Acidiphilium*، قهـوه‌ای روشـن، صورتی کمرنگ، قرمز یا بنفش هستند. *R. thiosulfatophilus* را مـی‌تـوان از بـاکتری‌هـای اسـید استیک توسط خصوصیات زیر تفکیک کرد:

۱- تشکیل کوکسی‌های صورتی

۲- اکسیداسیون تیوسولفات به سولفات

۳- توانـایی در اسـتفاده از اتانـل، دی مـانیتول و دی فروکتـوز بـه‌عنـوان منبـع کـربن(جـدول۱-۲وجدول۱-۳)