



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Παραγωγή οξικού οξέος (ξυδιού) από
λευκό κρασί και συμπυκνωμένο
εκχύλισμα ξηρής σταφίδας με τη χρήση
των βακτηρίων *Acetobacter*
pasteurianus & *Gluconobacter oxydans*

Διπλωματική Εργασία
Παπαδέα Κωνσταντίνα

Επιβλέπων Καθηγητής: *Κέκος Δημήτριος*
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ε.Μ.Π. Κέκου Δημήτριου, τον οποίο ευχαριστώ για την επιλογή του θέματος.

Ευχαριστώ την υπεύθυνη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, Δρ. Μαμμά Διομή για την επιστημονική της υποστήριξη για την πραγματοποίηση της διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, που προθυμοποιήθηκαν να με βοηθήσουν για την υλοποίηση αρκετών πειραμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ την εταιρεία ΠΑΠΑΔΕΑΣ Π. ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ & ΣΙΑ Ε.Ε. για την προμήθεια πρώτων υλών και την μετάδοση γνώσεων και εμπειριών.

*Παπαδέα Κωνσταντίνα,
Αθήνα, Φεβρουάριος 2016*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκαν δύο είδη βακτηρίων οξικού οξέος (AAB), προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητά καταβολισμού πηγών άνθρακα με σκοπό την παραγωγή οξικού οξέος, κύριο συστατικό του ξυδιού. Σημαντικά γένη των AAB για το σκοπό αυτό, αποτελούν τα γένη *Acetobacter* και *Gluconobacter*, τα οποία παρουσιάζουν αρκετές διαφορές με σημαντικότερη το είδος της προτιμώμενης πηγής άνθρακα. Το είδος *Acetobacter pasteurianus* προτιμά την αιθανόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, την οποία οξειδώνει με δύο διαδοχικές καταλυτικές αντιδράσεις της PQQ-ADH και της ALDH, ενώ το *Gluconobacter oxydans* προτιμά σακχαρούχες πηγές, τις οποίες μεταβολίζει μέσω των μονοπατιών EDP και PPP.

Ταυτόχρονα, η σύγκυση που επικρατεί περί της αυθεντικότητας του ξυδιού από κρασί, λόγω της νοθείας του με φθηνότερες πρώτες ύλες αποτέλεσε κίνητρο για την μελέτη της οξοποίησης κρασιού και συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας, προκειμένου να κατανοηθεί η δράση των AAB σε δύο διαφορετικά υποστρώματα.

Στην περίπτωση αλκοολούχας πρώτης ύλης, το ξύδι αποτελεί το προϊόν της οξειδωτικής ζύμωσης της, η οποία πραγματώνεται αερόβια από την δράση βακτηρίων οξικού οξέος (AAB). Επιλέχθηκε λευκό κρασί ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια του *A. pasteurianus* και μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης και η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών στην απόδοση της διεργασίας διαλείποντος έργου οξοποίησης. Κρίθηκε ως αποδοτικότερη η χρήση μέσου αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 2.1 % w/v και περιεκτικότητας σε YPM 86 % v/v (απόδοση διεργασίας 88.3 %). Ταυτόχρονα αποδείχθηκε ότι η προσαρμογή του *A. pasteurianus* στο μέσο καλλιέργειας αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 2.1 % w/v είναι ευκολότερη, όταν η προκαλλιέργεια του γίνεται σε ίδιο μέσο, ενώ το φιλτράρισμα του κρασιού, πριν την οξοποίηση του, φάνηκε ότι δεν ενισχύει την παραγωγή οξικού οξέος. Αναγνωρίστηκε, επιπλέον, το φαινόμενο της υπεροξείδωσης του οξικού οξέος σε CO₂ και H₂O μετά την πλήρη κατανάλωση της αιθανόλης. Τελικά, επιτεύχθηκε παραγωγή ξυδιού οξύτητας 7.2 % (g/100 mL οξικού οξέος) με αποδεκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Στην περίπτωση, όμως, σακχαρούχας πρώτης ύλης προηγείται της οξειδωτικής ζύμωσης η αλκοολική ζύμωση. Στη παρούσα διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια ταυτόχρονης αλκοολικής και οξειδωτικής ζύμωσης, προκειμένου η παραγωγική διαδικασία του ξυδιού να πραγματοποιηθεί σε ένα στάδιο μέσα από την συμβιωτική καλλιέργεια των ζυμών του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας και του *G. oxydans*. Στις συνθήκες, όπου πραγματοποιήθηκε η ταυτόχρονη καλλιέργεια των μικροοργανισμών, φάνηκε αδύνατη η συμβίωση τους, καθώς η παραγωγή οξέος ήταν μικρή, ενώ πιθανός αποδείχθηκε και ο καταβολισμός της υπάρχουσας μαννιτόλης και γλυκόζης από το βακτήριο *G. oxydans* ή η υδρόλυση της περιεχόμενης γλυκόζης από ιμπερτάσες, καθώς η συμπεριφορά των συγκεντρώσεων γλυκόζης, αναγωγικών σακχάρων και αιθανόλης κρίθηκε μη ομαλή.

Για την καλύτερη κατανόηση της συμβιωτικής καλλιέργειας μίας ζύμης και ενός οξικού βακτηρίου μελετήθηκε η συμβιωτική καλλιέργεια της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* με τα βακτήρια *A. pasteurianus* και *G. oxydans*, ξεχωριστά, σε υπόστρωμα

οικιακών αποβλήτων τροφίμων. Η συμπεριφορά των συγκεντρώσεων γλυκόζης, αιθανόλης και οξικού οξέος φαίνεται να αποτελεί ένδειξη για την ανταγωνιστική δράση των AAB στη ζύμη, κυρίως λόγω παραγωγής οξέος.

ABSTRACT

Two species of Acetic Acid Bacteria (AAB) were selected in order to investigate the ability of carbon catabolism aiming at the production of acetic acid, which is the main component of vinegar. For this purpose, the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* are important. The bacteria that belong to these genera have several differences from which the most important is the kind of the preferred carbon source. *Acetobacter pasteurianus* prefers ethanol as a carbon and energy source, which oxidizes by two successive catalytic reactions of PQQ-ADH and ALDH, whereas *Gluconobacter oxydans* prefers sugar sources, which metabolizes through the EDP and PPP paths.

Concurrently, the confusion about the authenticity of vinegar from wine, because of adulteration with cheaper raw materials was an additional motivation to study the acidification of wine and concentrated dry raisin extract, in order to understand the effect of AAB on two different substrates.

In the case of alcoholic raw material, vinegar is the product of the oxidative fermentation, which is realized by the aerobic activity of acetic acid bacteria (AAB). For this study a white wine was selected as a substrate for the cultivation of *A. pasteurianus* and the influence of the initial concentration of ethanol and the effect of the initial concentration of nutrients were investigated in the process yield of batch acidification. The use of medium with initial concentration of ethanol 2.1% w/v and content in YPM 86% v/v (process yield 88.3%) proved as the most efficient process. In addition, the phenomenon of peroxidation of the acetic acid to CO₂ and H₂O after the complete consumption of ethanol was recognized. Finally, the production of vinegar 7.2% acidity (g/100 mL acetic acid) with acceptable organoleptic characteristics was reached.

However, in the case of sugar raw material, the alcoholic fermentation precedes the oxidative fermentation. In this thesis it was attempted to make both processes (alcoholic fermentation and oxidation) simultaneously, so that the production process of vinegar to be realized in one stage through the symbiotic culture of yeast of concentrated dry raisin extract and *G. oxydans*. In conditions where the simultaneous cultivation of microorganisms took place, their symbiosis seemed impossible, because the acid production was low and the catabolism of existing mannitol and glucose by the bacterium *G. oxydans* or the hydrolysis of contained sucrose in the concentrated dry raisin extract by invertase proved possible, as the behavior of glucose concentration, reducing sugar concentration and ethanol concentration was abnormal. For a better understanding of the symbiotic culture of yeast and a AAB the symbiotic cultivations of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the bacteria *A. pasteurianus* and *G. oxydans* were studied separately on a substrate household food waste. The behavior of glucose, ethanol and acetic acid might indicate the antagonistic effect of AAB in yeast, particularly due to the acid production.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	7
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
2 ΞΥΔΙ.....	21
2.1 Ιστορική αναδρομή	21
2.2 Είδη Ξυδιού	23
2.2.1 Ξύδι από κρασί.....	23
2.2.2 Ξύδι από συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας	26
2.2.3 Βαλσάμικο ξύδι	26
2.2.4 Ξύδι από ρύζι.....	29
2.2.5 Ξύδι Sherry	29
2.2.6 Ξύδι από βύνη	29
2.2.7 Ξύδι Champagne.....	29
2.2.8 Μηλόξυδο (Ξύδι από μηλίτη).....	29
3 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (ACETIC ACID BACTERIA, AAB).....	30
3.1 Ιστορική αναδρομή	30
3.2 Ταξινόμηση AAB	30
3.3 Χαρακτηριστικά και ιδιότητες AAB	31
3.3.1 Επίδραση συγκέντρωσης Αιθανόλης & Οξικού οξέος	35
3.4 Μεταβολισμός AAB	36
3.4.1 Μεταβολισμός αιθανόλης από τα είδη <i>Acetobacter</i>	39
3.4.2 Μεταβολισμός γλυκόζης από είδη <i>Gluconobacter</i>	44
3.5 Είδη <i>Gluconobacter</i>	47
3.6 Είδη <i>Acetobacter</i>	48
3.7 Διαχωρισμός <i>Acetobacter</i> & <i>Gluconobacter</i>	49
4 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΞΥΔΙΟΥ.....	51
4.1 Μέθοδος Ορλεάνης.....	52
4.2 Γερμανική μέθοδος (Generator Process).....	53
4.3 Βυθισμένη Ζύμωση (Submerged Fermentation)	55
4.3.1 Σημασία συστήματος αερισμού SF	58
4.3.2 Εκκίνηση αντιδραστήρα (Starting-up).....	60
4.3.3 Επίτευξη υψηλής απόδοσης οξοποίησης	60

5	ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ.....	63
B.	ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ	65
1	Όργανα	65
2	Πρώτη ύλη	65
3	Μικροοργανισμοί.....	66
4	Προκαλλιέργεια- διατήρηση μικροοργανισμών.....	66
5	Παραγωγή οξικού οξέος από λευκό κρασί με το βακτήριο <i>Acetobacter pasteurianus</i> DSM 3509	66
5.1	Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε κρασί και ίδιας περιεκτικότητας v/v σε YPM.....	66
5.2	Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε κρασί και διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε YPM.....	67
5.3	Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης ίδιας περιεκτικότητας v/v σε φιλτραρισμένο και αφιλτράριστο κρασί.....	67
5.4	Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 από διαφορετικά εμβόλια με εφαρμογή ασυνεχούς διεργασίας σε μέσο ανάπτυξης 14 % v/v κρασιού	68
6	Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>G. oxydans</i> DSM 3503 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης 10 °Brix και 15 °Brix συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας.....	68
7	Συμβιωτική καλλιέργεια <i>Gluconobacter oxydans</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> & <i>Acetobacter pasteurianus</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε οικιακά διατροφικά απορρίμματα	69
8	Αναλυτικές μέθοδοι	70
8.1	Παρακολούθηση βακτηριακής ανάπτυξης	70
8.2	Παρασκευή καμπύλης αναφοράς βακτηριακής ανάπτυξης <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 και <i>G. oxydans</i> DSM 3503.....	70
9	Μέτρηση χαρακτηριστικών πρώτης ύλης και τελικού προϊόντος	71
9.1	Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων	71
9.2	Μέτρηση γλυκόζης.....	72
9.3	Μέτρηση ολικής ή ογκομετρούμενης οξύτητας	73
9.4	Μέτρηση ενεργής οξύτητας – pH.....	74
9.5	Προσδιορισμός χρωματικών χαρακτηριστικών	74
9.6	Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.....	75

9.7 Μέτρηση αιθανόλης και οξικού οξέος με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	75
C. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	77
1 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε κρασί και ίδιας περιεκτικότητας v/v σε YPM.....	77
2 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε κρασί και διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε YPM.....	88
3 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας ημιδιαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης ίδιας περιεκτικότητας v/v σε φιλτραρισμένο και αφιλτράριστο κρασί.....	97
4 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 από διαφορετικά εμβόλια με εφαρμογή ασυνεχούς διεργασίας σε μέσο ανάπτυξης 14 % v/v κρασιού	99
5 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>G. oxydans</i> DSM 3503 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης 10 °Brix και 15 °Brix συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας.....	104
6 Συμβιωτική καλλιέργεια <i>Gluconobacter oxydans</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε οικιακά απόβλητα τροφίμων & Συμβιωτική καλλιέργεια <i>Acetobacter pasteurianus</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε οικιακά απόβλητα τροφίμων.....	107
D. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	113
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	123

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: Καμπύλη αναφοράς ανάπτυξης <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	70
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2: Καμπύλη αναφοράς ανάπτυξης <i>G. oxydans</i> DSM 3503.	71
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3: Καμπύλη αναφοράς αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης.	72
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4: Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης	73
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5: Καμπύλη αναφοράς οξικού οξέος	76
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1.2% (w/v).	78
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 2.1% (w/v).	78
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 3.8% (w/v).	79
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 5.0% (w/v).	79
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 6.2% (w/v).	80
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης στην παραγωγή κυτταρικής μάζας του βακτηρίου <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509.	83
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης στην παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509.....	84
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης στην μεταβολή του pH του μέσου καλλιέργειας.	85
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14: Επίδραση της συγκέντρωσης αιθανόλης στην παραγωγή οξικού οξέος και στην απόδοση της διεργασίας.	87
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 15: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1.2% (w/v), και αρχική συγκέντρωση μαννιτόλης 2.15% (w/v)	88
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 16: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 2.1% (w/v), και αρχική συγκέντρωση μαννιτόλης 1.80% (w/v)	89
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 17: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 3.6% (w/v), και αρχική συγκέντρωση μαννιτόλης 1.45% (w/v)	89
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 18: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 5.2% (w/v), και αρχική συγκέντρωση μαννιτόλης 1.05% (w/v)	90
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 19: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 8.5% (w/v) και απουσία μαννιτόλης	90

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 20: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης και YPM στην παραγωγή κυτταρικής μάζας του βακτηρίου <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509.	93
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 21: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης και μαννιτόλης στην παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509.	94
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 22: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης και μαννιτόλης στην μεταβολή του pH του μέσου καλλιέργειας.	94
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 23: Επίδραση της συγκέντρωσης αιθανόλης και μαννιτόλης στην παραγωγή οξικού οξέος και στην απόδοση της διεργασίας.	96
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 24: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσο YPM περιεκτικότητας 14 % v/v αφιυτράριστο κρασί.	98
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 25: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσο YPM περιεκτικότητας 14 % v/v φιλτραρισμένο κρασί.	98
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 26: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εμβόλιο από προκαλλιέργεια σε μέσο YPM και εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1.2% (w/v).	101
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 27: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 με εμβόλιο από προκαλλιέργεια σε μέσο 14% v/v κρασί και εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1.2% (w/v).	101
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 28: Παραγωγή οξικού οξέος από συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας 10 °Brix με ταυτόχρονη αλκοολική και οξειδωτική ζύμωση από <i>G. oxydans</i>	105
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 29: Παραγωγή οξικού οξέος από συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας 15 °Brix με ταυτόχρονη αλκοολική και οξειδωτική ζύμωση από <i>G. oxydans</i>	106
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 30: Συμβιωτική καλλιέργεια <i>Acetobacter pasteurianus</i> & <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε οικιακά απόβλητα τροφίμων, Εμβολιασμός <i>A. pasteurianus</i> μετά από 24 h καλλιέργειας <i>S. cerevisiae</i>	108
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 31: Συμβιωτική καλλιέργεια <i>G. oxydans</i> & <i>S. cerevisiae</i> σε οικιακά απόβλητα τροφίμων, Εμβολιασμός <i>G. oxydans</i> μετά από 4 h καλλιέργειας <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	109
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 32: Σύγκριση θεωρητικής απόδοσης και απόδοση διεργασίας με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, σταθερή περιεκτικότητα % v/v YPM.	114
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 33: : Σύγκριση θεωρητικής απόδοσης και απόδοση διεργασίας με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα % v/v YPM.	114
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 34: Ανάπτυξη του <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 απουσία αιθανόλης (100% YPM).	123
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 35: Ανάπτυξη του <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 παρουσία 1.2% (w/v) αιθανόλης.	124
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 36: Ανάπτυξη του <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 παρουσία 2.1% (w/v) αιθανόλης.	124
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 37: Ανάπτυξη του <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 παρουσία 3.8% (w/v) αιθανόλης.	125
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 38: Ανάπτυξη του <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 παρουσία 5.0% (w/v) αιθανόλης.	125

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 39: Ανάπτυξη του *A. pasteurianus* DSM 3509 παρουσία 6.3% (w/v) αιθανόλης
..... 126

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Κατάταξη ανά γένος και είδος οικογένειας <i>Acetobacteraceae</i>	31
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Θρεπτικά μέσα για καταμέτρηση, απομόνωση, ταυτοποίηση και διατήρηση των AAB	32
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Οργανικά οξέα που βρέθηκαν σε διάφορα είδη ξυδιού	34
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Απομονωμένα είδη AAB σε διαφορετικά είδη ξυδιού	35
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Απόδοση ενέργειας των διαφορετικών μεταβολικών λειτουργιών για κατανάλωση γαλακτικού, αιθανόλης, οξικού και ακετοΐνης	39
ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Διάκριση των γενών <i>Acetobacter</i> & <i>Gluconobacter</i>	49
ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Διάκριση των ειδών <i>A. pasteurianus</i> & <i>G. oxydans</i>	49
ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Πειραματικές συνθήκες	66
ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Πειραματικές συνθήκες	67
ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Αποτελέσματα μετρήσεων χαρακτηριστικών λευκού κρασιού.....	77
ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Κινητικά χαρακτηριστικά παραγωγής οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	85
ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Κινητικά χαρακτηριστικά παραγωγής οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	95
ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Κινητικά χαρακτηριστικά παραγωγής οξικού οξέος από το βακτήριο <i>A. pasteurianus</i> DSM 3509 σε μέσο περιεκτικότητας 14 % v/v φιλτραρισμένου και αφιλτράριστου κρασιού	99
ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Χαρακτηριστικά τελικού προϊόντος, πρώτης ύλης (κρασί) και ξύδι εμπορίου	102
ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Χαρακτηριστικά ξυδιών στην ελληνική αγορά	103
ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Αποτελέσματα μετρήσεων χαρακτηριστικών συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας	104
ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Απαιτούμενα χαρακτηριστικά AAB για την παραγωγή ξυδιού	116

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>EIKONA 1: Παραγωγή ξυδιού στην Ε.Ε (ΕΥ-28), 2007-2014, σε εκατομμύρια λίτρα & εκατομμύρια ευρώ</i>	19
<i>EIKONA 2: Διάγραμμα ροής παραγωγής ξυδιού</i>	20
<i>EIKONA 3: Μετατροπή αλκοόλης σε οξικό οξύ</i>	22
<i>EIKONA 4: Πιθανή διαμόρφωση σετ βαρελιών. Συμβατικά το μικρότερο βαρέλι αναφέρεται ως «βαρέλι 1»</i>	28
<i>EIKONA 5: Επίδραση συγκέντρωσης EtOH και οξικού οξέος στην ανάπτυξη βακτηρίων</i>	36
<i>EIKONA 6: Κεντρικός μεταβολισμός <i>A. pasteurianus</i></i>	38
<i>EIKONA 7: Αναπνευστική αλυσίδα AAB</i>	40
<i>EIKONA 8: Επισκόπηση της αναπνευστικής αλυσίδας οξειδωσης της αιθανόλης από AAB. Αιθανόλη οξειδώνεται προς οξικό οξύ μέσω διαδοχικών δράσεων της PQQ-ADH και της αφυδρογονάσης αλδεϋδης, η οποία είναι δεσμευμένη στη μεμβράνη (ALDH), μειώνοντας την Q στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στη συνέχεια, η αναπνευστική αλυσίδα διακλαδίζεται στο κυτόχρωμα οξειδάσης ουβοκινόλης bo_3 και στην οξειδάση CioAB. Το χοντρό διπλό βέλος υποδεικνύει μια πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ PQQ-ADH και CioAB.</i>	41
<i>EIKONA 9: Οξειδωση αιθανόλης προς σχηματισμό οξικού οξέος</i>	42
<i>EIKONA 10: Οξειδωση υποστρώματος στην κυτταρική μεμβράνη και υπεροξειδωση μέσα στο κυττάρο</i>	43
<i>EIKONA 11: Κεντρικός μεταβολισμός γλυκόζης στο βακτήριο <i>G. Oxydans</i></i>	45
<i>EIKONA 12: Κεντρικός μεταβολισμός μαννιτόλης στο βακτήριο <i>G. oxydans</i></i>	46
<i>EIKONA 13: Γενικές αρχές για την παραγωγή ξυδιού</i>	51
<i>EIKONA 14: Βαρέλι μεθόδου Ορλεάνης</i>	52
<i>EIKONA 15: Ροκανίδια οξιάς</i>	53
<i>EIKONA 16: Οξοποιητής Γερμανικής Μεθόδου</i>	54
<i>EIKONA 17: Αναπαράσταση παραγωγής ξυδιού σε σύστημα εμβάπτισης</i>	56
<i>EIKONA 18: SF σε ημι-συνεχή λειτουργία για παραγωγή ξυδιού</i>	58
<i>EIKONA 19: Οξοποιητής στην διαδικασία Βυθισμένης Ζύμωσης</i>	61
<i>EIKONA 20: Παραγωγή ξυδιού από οινόπνευμα και από φρούτα με οξοποίηση βυθισμένης καλλιέργειας</i>	63
<i>EIKONA 21: Εξωκυτταρική υδρόλυση γλυκόζης σε φρουκτόζη και γλυκόζη</i>	107
<i>EIKONA 23: Μηχανισμοί αντίδρασης κύτταρου <i>S. cerevisiae</i> στο στρες οξικού οξέος</i>	112

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AAB: Acetic acid bacteria

EDP: Entner Doudoroff

EMP: Embden-Meyerhof-Parnas

TCA: Tricarboxylic acid

ADH: Alcohol dehydrogenase

ALDH: Aldehyde dehydrogenase

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide

FAD: Flavine adenine dinucleotide

YPM: Mannitol-yeast extract-peptone

PPP: Pentose-phosphate pathway

PQQ: Pyrroloquinoline quinine

Q: Ubiquinone

SNIF-NMR: Site-Specific Natural Isotopic Fractionation – Nuclear Magnetic Resonance

IRMS: Isotope Ratio Mass Spectrometry

TBVM: Traditional Balsamic Vinegar of Modena

TBM: Traditional Balsamic Vinegar

SF: Submerged Fermentation

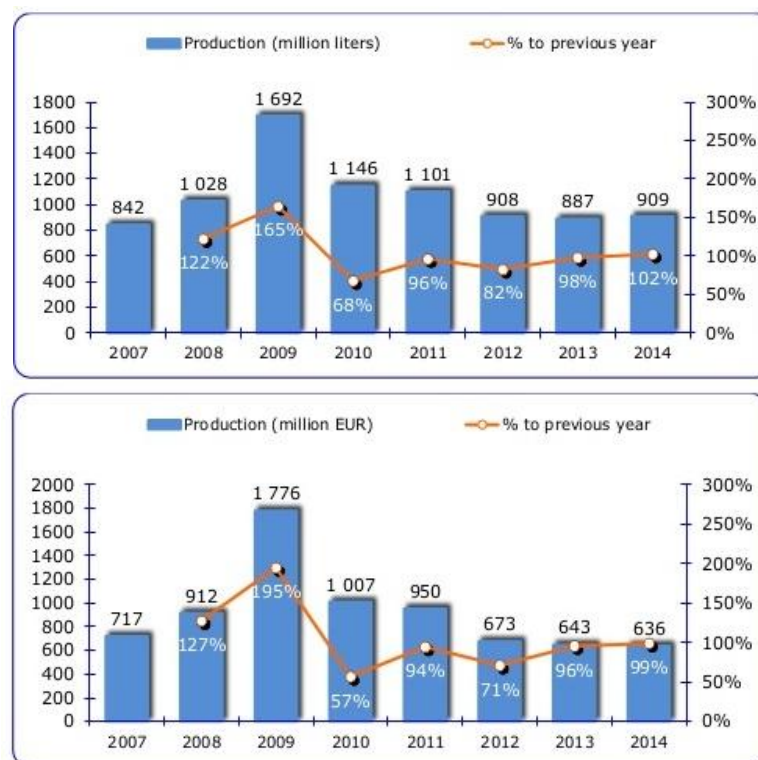
TC: Συνολική συγκέντρωση αιθανόλης και οξικού οξέος

ΔΦΟ: Δείκτης Φαινολικών Ουσιών

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ξύδι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην βιομηχανία τροφίμων ως dressing, αλλά και ως πρόσθετο για την παρασκευή άλλων τροφίμων (π.χ. κέτσαπ, μαγιονέζα, μουστάρδα, λαχανικά τουρσί), ενώ αναγνωρίσιμες είναι και οι θεραπευτικές ιδιότητες του ξυδιού, στις οποίες περιλαμβάνονται η αντιβακτηριδιακή δράση, η μείωση της αρτηριακής πίεσης, η αντιοξειδωτική δράση, η μείωση των επιπτώσεων του διαβήτη, η πρόληψη της καρδιαγγειακής ασθένειας. Επιπλέον, η αξία της αγοράς του ξυδιού έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, λόγω της αύξησης του μεριδίου του βαλσαμικού στην αγορά. Σημαντικό ρόλο στην αγορά του ξυδιού κατέχει η Ιταλία, καθώς αποτελεί τη μεγαλύτερη εξαγωγική χώρα ξυδιού σε όλο τον κόσμο ακολουθούμενη από την Γερμανία. Μάλιστα, στην Ιταλία, το ξύδι αποτελεί το δεύτερο σημαντικότερο dressing μετά το ελαιόλαδο (Galletto & Rossetto, 2015). Αντίστοιχη θέση φαίνεται να κατέχει και στην Ελλάδα.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Παραγωγή ξυδιού στην Ε.Ε (EU-28), 2007-2014, σε εκατομμύρια λίτρα & εκατομμύρια ευρώ
 Πηγή: Eurostat

Λόγω, λοιπόν, της αυξανόμενης ζήτησης ξυδιού απαιτούνται βιομηχανικά συστήματα οξοποίησης ικανά να παράγουν μεγάλες ποσότητες ξυδιού. Στα συστήματα αυτά απαιτείται η διασφάλιση βέλτιστων συνθηκών για την ανάπτυξη των βακτηρίων οξικού οξέος. Για το σκοπό αυτό, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές, οι οποίες αποσκοπούν στην αύξηση του ρυθμού μετασχηματισμού της αιθανόλης σε οξικό οξύ.

Η παραγωγική διαδικασία του ξυδιού ακολουθείται από την περαιτέρω επεξεργασία του, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει την διήθηση και την παστερίωση. Σήμερα, κυρίαρχη βιομηχανική μέθοδος οξοποίησης αποτελεί η βυθισμένη ζύμωση, μία αερόβια διαδικασία, όπου πραγματοποιείται οξείδωση αιθανόλης σε οξικό οξύ από τα βακτήρια οξικού οξέος. Η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο, η παρουσία οξικού οξέος και αιθανόλης και η θερμοκρασία αποτελούν βασικούς παράγοντες για την επιτυχή ζύμωση. Η Frings έχει αναπτύξει τις σημαντικότερες τεχνικές για την παραγωγή ξυδιού τόσο μέσω της βελτιστοποίησης των οξοποιητών βυθισμένης καλλιέργειας όσο και μέσω χρήσης αυτοματοποιημένων διαδικασιών και τεχνικών διήθησης.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Διάγραμμα ροής παραγωγής ξυδιού

Πηγή: <http://www.frings.com/>

Η ποικιλία των ξυδιών είναι μεγάλη και διαφορές εντοπίζονται στην πρώτη ύλη, τη γεωγραφική προέλευση, την παραγωγική μέθοδο, την οξύτητα, ακόμα και τα χαρακτηριστικά της συσκευασίας. Κύριο χαρακτηριστικό του ξυδιού αποτελεί η οξύτητα του εκφραζόμενη σε ισοδύναμα σε g οξικού οξέος/100 mL, η οποία πρέπει να αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος.

Για την παραγωγή ξυδιού χρησιμοποιείται κυρίως κρασί ως πρώτη ύλη. Άλλοι τύποι ξυδιού είναι το μηλόξυδο, το ξύδι από σταφίδα το ξύδι ρυζιού και το ξύδι βύνης. Στην περίπτωση αμυλούχας πρώτης ύλης, το οξικό οξύ σχηματίζεται από αντίδραση τεσσάρων σταδίων που περιλαμβάνει την μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρα από αμυλάσες, αναερόβια μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη μέσω αλκοολικής ζύμωσης παρουσία ζυμών, μετατροπή της αιθανόλης σε ενυδατωμένη ακεταλδεΐδη, και αφυδρογόνωση της τελευταίας σε οξικό οξύ με τη βοήθεια μίας αφυδρογονάσης αλδεΐδης. Τα δύο τελευταία στάδια πραγματοποιούνται αερόβια.

Οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι πραγματοποιούν την οξειδωτική ζύμωση της αιθανόλης είναι τα βακτήρια οξικού οξέος (Acetic Acid Bacteria, AAB). Τα AAB ανήκουν στην οικογένεια *Acetobacteriaceae* και αναπτύσσονται βέλτιστα σε εύρος θερμοκρασίας 25 °C - 30 °C και βέλτιστο εύρος pH μεταξύ 5 και 6.5. Τα κυριότερα γένη AAB είναι τα *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter* και *Gluconobacter*, με τα πρώτα δύο να έχουν την δυνατότητα περαιτέρω οξείδωσης του οξικού οξέος σε CO₂ και

H₂O και το τελευταίο γένος να προτιμά τα σάκχαρα περισσότερο από την αιθανόλη ως πηγή άνθρακα.

Προκειμένου να μειωθεί το κόστος παραγωγής του ξυδιού από κρασί μπορεί να χρησιμοποιηθούν φθηνότερες πρώτες ύλες, όπως είναι το οινόπνευμα και το συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας. Για το σκοπό αυτό απαιτείται ο έλεγχος της γνησιότητας του ξυδιού, καθώς η χρήση φθηνότερων πρώτων υλών μπορεί να στρεβλώσει οικονομικά την αγορά, αλλά και να οδηγήσει σε κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών. Μέχρι στιγμής, ο έλεγχος της προέλευσης του ξυδιού γίνεται βάση των ισοτοπικών παραμέτρων του άνθρακα, του υδρογόνου και του οξυγόνου. Ο προσδιορισμός της αναλογίας ²H/¹H και ο προσδιορισμός της αναλογίας ¹³C/¹²C παρέχουν πληροφορίες για την βοτανική προέλευση του οξικού οξέος, ενώ η αναλογία ισοτόπων ¹⁸O/¹⁶O παρέχει πληροφορίες για την προέλευση του νερού.

Λόγω, λοιπόν, της σύγχυσης των ξυδιών από κρασί με ζύδια φθηνότερων πρώτων υλών, όπως είναι και τα αποξηραμένα σταφύλια, μελετήθηκε η παραγωγή οξικού οξέος από κρασί και από συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας με χρήση δύο διαφορετικών ειδών AAB.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη ενός είδους *Acetobacter* σε κρασί και ενός είδους *Gluconobacter* σε συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας. Στην περίπτωση της χρήσης κρασιού ως πρώτη ύλη, επιλέχθηκε το βακτήριο *Acetobacter pasteurianus* και μελετήθηκε η ανάπτυξη του σε μέσο διαφορετικής περιεκτικότητας % w/v αιθανόλης και διαφορετικές τιμές pH. Στην περίπτωση της χρήσης συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας ως πρώτη ύλη, επιλέχθηκε το βακτήριο *Gluconobacter oxydans* και μελετήθηκαν η αλκοολική και η οξειδωτική ζύμωση σε ένα στάδιο.

Τέλος, μελετήθηκε η δυνατότητα συμβιωτικής καλλιέργειας της ζύμης *Saccharomyce cerevisiae* με τα βακτήρια *A. pasteurianus* και *G. oxydans*, ξεχωριστά.

2 ΕΥΔΙ

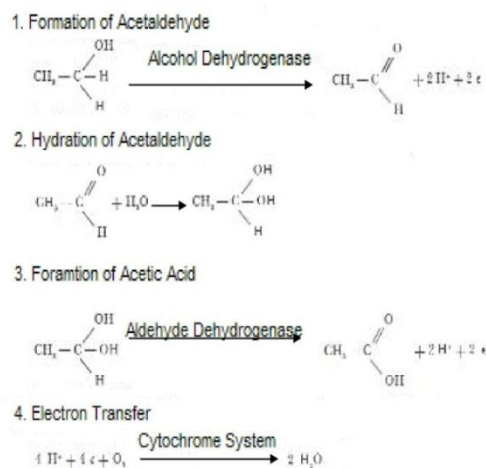
2.1 Ιστορική αναδρομή

Ο όρος “vinegar” προέρχεται από την γαλλική λέξη “vin agrai”, που σημαίνει ξινό κρασί. Η ανακάλυψη του ξυδιού έγινε τυχαία, όταν ένα κρασί σε ένα ξύλινο βαρέλι μετατράπηκε κατά την πάροδο του χρόνου σε ένα υπέροχο νέο προϊόν (Tsfaye W. et al., 2002).

Οι αρχαίοι γρήγορα βρήκαν ότι το ζύδι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποικιλοτρόπως. Γύρω στο 5000 π.Χ., οι Βαβυλώνιοι το χρησιμοποιούσαν ως συντηρητικό και ως καρύκευμα, και ήταν αυτοί που ξεκίνησαν να το αρωματίζουν με βότανα και μπαχαρικά. Οι Ρωμαίοι το χρησιμοποιούσαν ως ένα ποτό. Η Κλεοπάτρα απέδειξε την αξία του ξυδιού με εμβάπτιση πολύτιμων μαργαριταριών σε αυτό για να κερδίσει ένα στοίχημα που θα μπορούσε να καταναλώσει μια περιουσία σε ένα μόνο γεύμα. Ο Ιπποκράτης εξυμνούσε τις φαρμακευτικές του ιδιότητες και, μάλιστα, ήταν πιθανώς ένα από τα πρώτα θεραπευτικά μέσα. Βιβλιογραφικές αναφορές δείχνουν πως το ζύδι

είχε καταπραϋντικές και επουλωτικές ιδιότητες. Οι Έλληνες, επίσης, φέρεται να παρασκεύαζαν λαχανικά τουρσί ή αλλαντικά χρησιμοποιώντας ξύδι. Ο Hannibal, ένας μεγάλος στρατηγός, διέσχισε τις Άλπεις με έναν στρατό πάνω σε ελέφαντες ανοίγοντας το δρόμο χρησιμοποιώντας ξύδι. Συγκεκριμένα, θέρμαιναν τους ογκόλιθους, που έφραζαν τον δρόμο και τους περιέλουζαν με ξύδι, με αποτέλεσμα αυτοί να ραγίζουν και να θρυμματίζονται. Γύρω στο 3000 π.Χ., η παρασκευή του σπιτικού ξυδιού καταργούταν σταδιακά και, το 2000 π.Χ., η παραγωγή ξυδιού ήταν σε μεγάλο βαθμό μια εμπορική βιομηχανία. Κατά τη διάρκεια του αμερικανικού εμφύλιου πολέμου, ξύδι χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία του σκορβούτου, και πιο πρόσφατα, στον Πρώτο Παγκόσμιο Πόλεμο, χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία πληγών (<http://www.versatilevinegar.org/>).

Κατά τον 18^ο αιώνα ο χημικός Georg Ernst Stahl ανακάλυψε ότι η ξινή γεύση του ξυδιού οφείλεται στην παρουσία οξικού οξέος. Η πρώτη ολοκληρωμένη ανάλυση του οξικού οξέος έγινε το 1814 από τον Jöns Jacob Berzelius. Ο Johann Wolfgang Dobereiner απέδειξε ότι η αιθανόλη οξειδώνεται παρουσία οξυγόνου και τελικά παράγεται οξικό οξύ και νερό. Το 1822, ο Dobereiner ανέπτυξε τη θεωρία της παραγωγής οξικού οξέος από αλκοόλη (Kehrer, 1921). Η αλληλουχία των αντιδράσεων παραγωγής οξικού οξέος περιγράφεται στην Εικόνα 3 (Gilbert 1921):



ΕΙΚΟΝΑ 3: Μετατροπή αλκοόλης σε οξικό οξύ

Το 1823, ο John L. Schutzenbach παρουσίασε μία γρήγορη διαδικασία παραγωγής οξικού οξέος από αιθανόλη βασισμένη στην θεωρία του Dobereiner (Kehrer, 1921). Το 1955, ο Maynard Alexander Joslyn ανέφερε ότι ο Otto Hromatka ανέπτυξε μία νέα μέθοδο για την παρασκευή ξυδιού, η οποία ονομάζεται “submerged acetification”, δηλαδή «βυθισμένη οξοποίηση» (Crueess, 1958; Mas et al., 2014).

2.2 Είδη Ξυδιού

Ανάλογα, λοιπόν, με την πρώτη ύλη διακρίνονται διάφορα είδη ξυδιού. Πρώτες ύλες για την παραγωγή ξυδιού μπορεί να είναι το κρασί, η μύρα, ο μηλίτης και άλλα υγρά που απορρέουν από την αλκοολική ζύμωση δημητριακών, φρούτων, πατάτας, σακχαρούχων διαλυμάτων, όπως είναι η μελάσα, το μέλι, ο ορός γάλακτος, ενώ επίσης, και το οινόπνευμα με την προσθήκη των κατάλληλων θρεπτικών συστατικών. Από τις προαναφερόμενες πρώτες ύλες παράγεται το ξύδι από την οξειδωτική δραστηριότητα αερόβιων μικροοργανισμών.

Ξύδια προστατευμένης ονομασίας προέλευσης είναι τα ισπανικά “Vinagredel Condado de Huelva”, “Vinagre de Jerez”, “Vinagre Montilla–Moriles” και τα ιταλικά “Aceto Balsámico Tradizionale di Módena”, “Aceto Balsámico Tradizionale di Reggio Emilia” (Álvarez-Cáliz et al., 2014; Hipólito Rubio-Fernández et al., 2004).

2.2.1 Ξύδι από κρασί

Το ξύδι από κρασί περιέχει τα ίδια συστατικά, που περιέχει το κρασί με τη διαφορά ότι το οξικό οξύ αντικαθιστά το αρχικά περιεχόμενο οινόπνευμα στο κρασί. Έχει ευχάριστη οσμή, όξινη γεύση και το χρώμα του εξαρτάται από το χρώμα του κρασιού, το οποίο μπορεί να είναι λευκό, κόκκινο ή ροζέ.

2.2.1.1 Ορισμός ξυδιού από κρασί βάση νομοθεσίας

Το ξύδι αποτελεί το προϊόν οξικής ζύμωσης ελαφρά αλκοολούχων υγρών (περιεκτικότητα σε αιθυλική αλκοόλη < 10-12 % κ.ο.). Ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) απαιτεί οξύτητα τουλάχιστον 4 % για ένα προϊόν, ώστε να ονομάζεται ξύδι. Η απαίτηση αυτή εξασφαλίζει την ελάχιστη αντοχή του ξυδιού λιανικής πώλησης. Στην Ευρώπη και σε άλλες περιοχές υπάρχουν άλλες απαιτήσεις.

Σύμφωνα με την ισχύουσα ευρωπαϊκή νομοθεσία ξύδι από οίνο είναι το ξύδι που:

- α) παράγεται αποκλειστικά με οξική ζύμωση οίνου
- β) έχει ολική οξύτητα τουλάχιστον 60 γραμμάρια ανά λίτρο, εκφραζόμενη σε οξικό οξύ

Παράλληλα, τονίζεται ότι ο οίνος ορίζεται με την ισχύουσα νομοθεσία ως το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με πλήρη ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών, είτε αυτά έχουν υποστεί έκθλιψη είτε όχι, ή γλεύκους σταφυλιών.

Ο οίνος έχει:

- α) ανεξαρτήτως της εφαρμογής ή μη των επεξεργασιών που προσδιορίζονται στο σημείο Β του παραρτήματος V, αποκτημένο αλκοολικό τίτλο τουλάχιστον 8.5 % vol, υπό τον όρο ότι προέρχεται αποκλειστικά από σταφύλια που έχουν συγκομιστεί στις αμπελουργικές ζώνες Α και Β που αναφέρονται στο παράρτημα ΙΧ, και τουλάχιστον 9 % vol. για τις άλλες αμπελουργικές ζώνες·

- β) κατά παρέκκλιση του ισχύοντος ελάχιστου αποκτημένου αλκοολικού τίτλου, εφόσον φέρει προστατευόμενη ονομασία προέλευσης ή προστατευόμενη γεωγραφική ένδειξη και ανεξαρτήτως της εφαρμογής ή μη των επεξεργασιών που προσδιορίζονται στο σημείο Β του παραρτήματος V, αποκτημένο αλκοολικό τίτλο τουλάχιστον 4.5 % vol·

γ) ολικό αλκοολικό τίτλο το πολύ 15 % vol.

Κατά παρέκκλιση:

— το μέγιστο όριο του ολικού αλκοολικού τίτλου μπορεί να φθάνει το 20 % vol. για τους οίνους που παράγονται χωρίς εμπλουτισμό σε ορισμένες αμπελουργικές περιοχές της Κοινότητας και οι οποίοι θα αποφασιστούν με τη διαδικασία του άρθρου 113 παράγραφος 2,

— το μέγιστο όριο του ολικού αλκοολικού τίτλου μπορεί να υπερβαίνει το 15 % vol. για οίνους με προστατευόμενη ονομασία προέλευσης που παράγονται χωρίς εμπλουτισμό·

δ) με την επιφύλαξη παρεκκλίσεων που είναι δυνατόν να θεσπιστούν με τη διαδικασία του άρθρου 113 παράγραφος 2, ολική οξύτητα, εκφραζόμενη σε τρυγικό οξύ, τουλάχιστον 3.5 γραμμάρια ανά λίτρο, ήτοι 46.6 χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο. Ωστόσο, η μετατροπή της αλκοόλης σε ξύδι στη πραγματικότητα δεν είναι ζύμωση αλλά οξείδωση.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, το ξύδι από κρασί αποτελεί προϊόν, που λαμβάνεται, αποκλειστικά, από την οξική ζύμωση του κρασιού, το οποίο, με τη σειρά του, ορίζεται ως το προϊόν, που λαμβάνεται, αποκλειστικά, από την αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών, συνθλιμμένα ή μη, ή του γλεύκους σταφυλιών (Ε.Κ. 479/2008, Παράρτημα IV, Σημεία 1 και 17). Κατά συμφωνία, ορίζεται από τη Γενική Διεύθυνση Γεωργίας & Αγροτικής Ανάπτυξης της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (Σημείωση Νο. 3284, γραπτές ερωτήσεις E-1690/02 και E-1506/02) ότι το κρασί και το ξύδι από κρασί δεν μπορούν να παραχθούν από σταφίδες και αραίωση με νερό. Για το λόγο αυτό, το ξύδι από σταφίδες, που παράγεται σε χώρες της Μεσογείου με ζύμωση σταφίδων και ενυδάτωση με νερό βρύσης δεν πρέπει να ταυτίζεται με το ξύδι από κρασί (<http://eurlex.europa.eu/>).

2.2.1.2 Έλεγχος αυθεντικότητας ξυδιού από κρασί

Κρίνεται απαραίτητο να αναφερθεί η νομοθεσία περί ορισμού του ξυδιού από κρασί, διότι πρέπει να διευκρινιστεί ότι το ξύδι από κρασί δεν ταυτίζεται με το ξύδι από συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας. Συνθετικό οξικό οξύ μπορεί να ληφθεί ακόμα και από παράγωγα πετρελαίου ή από πυρόλυση του ξύλου. Η χρήση των φθηνότερων πρώτων υλών είναι παράνομη, δημιουργεί οικονομικές στρεβλώσεις στην αγορά και θα μπορούσε δυνητικά να οδηγήσει σε κινδύνους για την υγεία, όταν χρησιμοποιούνται επιβλαβείς προσμίξεις. Συνεπώς, ο έλεγχος της γνησιότητας του ξυδιού είναι ένα πολύ σημαντικό ζήτημα για την προστασία του καταναλωτή και του θεμιτού εμπορίου. Τα φαινόμενα νοθείας του ξυδιού από κρασί με ξύδια χαμηλότερης εμπορικής αξίας και ποιότητας αντιμετωπίζονται με ισοτοπικές μεθόδους.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία η παραγωγή ξυδιού από οίνο με ζύμωση σταφίδων και εκ νέου ενυδάτωση με νερό βρύσης δεν επιτρέπεται. Οι ισοτοπικές μέθοδοι έχουν την ικανότητα να εντοπίζουν την προέλευση των χημικά ταυτώσεων μόριων, όπως το νερό και η αιθανόλη. Για το λόγο αυτό, εφαρμόζονται οι ισοτοπικές μέθοδοι για τον αναλυτικό έλεγχο των κρασιών στην ευρωπαϊκή αγορά. Η ισοτοπική ανάλυση του ξυδιού μέσω των μεθόδων SNIF-NMR (Site-Specific Natural Isotopic Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance) και IRMS (Isotope Ratio Mass

Spectrometry) επιτρέπει τη διάκριση της προέλευσης του προϊόντος, δηλαδή τον προσδιορισμό της πρώτης ύλης, η οποία μπορεί να είναι τα σταφύλια, τα ζαχαρότευτλα, το ζαχαροκάλαμο, η βύνη, το μήλο, ακόμα και σύνθεση πολλών πρώτων υλών.

Ο επίσημος έλεγχος των κρασιών στην Ε.Ε. γίνεται σε εργαστήριά της κατάλληλα εξοπλισμένα με SNIF-NMR και/ή IRMS. Τα εργαστήρια αυτά είναι συμμορφωμένα βάση το πρότυπο ISO 17025.

Το περιεχόμενο ισότοπων υδρογόνου και άνθρακα του οξικού οξέος που προέρχεται τόσο από κρασί όσο και από σταφύλια είναι παρόμοιο, μιας και η βοτανική πηγή είναι ίδια. Επομένως, η διάκριση των δύο πηγών αυτών μπορεί να εξασφαλιστεί με την εύρεση της αναλογίας $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, η οποία φανερώνει την προέλευση του νερού, που περιέχεται στο ξύδι. Από την άλλη η αναλογία $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ είναι παρόμοια σε ξύδι τεύτλων και ξύδι σταφίδων, μιας και στις δύο περιπτώσεις έχει προστεθεί νερό (Camín et al., 2013; Thomas & Jamin, 2009). Η χρήση της ανάλυσης $\delta^{18}\text{O}$ για τον έλεγχο της αυθεντικότητας του ξυδιού από κρασί απαιτεί τον καθορισμό των ορίων κατωφλίου $\delta^{18}\text{O}$. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται η τράπεζα δεδομένων κρασιού. Η γεωγραφική προέλευση, η ποικιλία, το έτος συγκομιδής των σταφυλιών και οι κλιματικές συνθήκες αποτελούν παράγοντες μεταβλητότητας της τιμής του $\delta^{18}\text{O}$. Βάση την ευρωπαϊκή τράπεζα κρασιών, καθορίζονται βάση τον κανονισμό της Ε.Ε. 555/2008 τα όρια -2‰ και -5‰ για ανεπεξέργαστα και αραιωμένα ξύδια, που παράγονται από νωπά σταφύλια. Τιμές χαμηλότερες από τα όρια αυτά φανερώνουν μία σημαντική προσθήκη νερού στην πρώτη ύλη με συγκέντρωση σακχάρων πολύ υψηλότερη από ότι έχουν τα νωπά σταφύλια (π.χ. συμπυκνωμένο γλεύκος σταφυλιών, συμπυκνωμένο εκχύλισμα από τις σταφίδες ή σιρόπι ζάχαρης). Σημειώνεται ότι οι χαμηλότερες τιμές $\delta^{18}\text{O}$ για αυθεντικά ελληνικά κρασιά στην ευρωπαϊκή τράπεζα δεδομένων κρασιού πάνω από περίπου 10 ετών (n 388.) ήταν υψηλότερες από -2‰ . Η τιμή $\delta^{18}\text{O}$ του νερού βρύσης στην Ελλάδα λαμβάνεται από την ιστοσελίδα <http://www.waterisotopes.org> (Bowen, 2011), και εντοπίζεται μεταξύ -9‰ και -4‰ και ως εκ τούτου, επίσης, το όριο $\delta^{18}\text{O}$ για το αραιωμένο ξύδι συμμορφώνεται. Αυτό σημαίνει ότι οι γενικές τιμές κατωφλίου, που αναφέρονται ανώτερα, ισχύουν για τα ελληνικά ξύδια.

Η αναλογία ισωτόπων οξυγόνου ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, εκφραζόμενη ως $\delta^{18}\text{O}$) του φυτικού νερού (vegetal water) εντοπίζεται με την μέθοδο IRMS και διακρίνει το ξύδι από κρασί από το ξύδι από αποξηραμένα σταφύλια. Η παράμετρος αυτή προβλέπεται από τον OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) για την ανάλυση προϊόντων σταφυλιών (μέθοδος OIV-MA-AS2-12, Ψήφισμα OIV, Οίνος 353/2009) και από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης (Comité Européen de Normalisation, CEN) για την ανάλυση των χυμών φρούτων και λαχανικών (Μέθοδος ENV 12141). Έτσι, καθίσταται δυνατή η ανίχνευση της παράνομης προσθήκης νερού σε κρασιά, ο έλεγχος των φρέσκων ή μη χυμών και η ανίχνευση της αραιώσεως των συμπυκνωμάτων. Η ανάλυση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι το φυτικό νερό είναι σημαντικά πλούσιο σε ^{18}O σε σύγκριση με το νερό βρύσης, που χρησιμοποιείται για αραιώση του οίνου και συμπυκνωμάτων φρούτων, λόγω των διαδικασιών εξάτμισης

και διαπνοής, που λαμβάνουν χώρα στα φυτά. Επομένως, γίνεται κατανοητό, γιατί η ανάλυση δ¹⁸O του νερού χρησιμοποιείται για την διάκριση του ξυδιού από κρασί, που παράγεται από νωπά σταφύλια, από το ξύδι, που παράγεται από σταφίδες και προσθήκη νερού, Ωστόσο, επισημαίνεται ότι στα εμπορικά ξύδια από κρασί προστίθεται νερό, προκειμένου να επιτευχθεί ο χαμηλότερος αποδεκτός βαθμός οξύτητας, 6%, (EC 479/2008, Παράρτημα IV) και να είναι οργανοληπτικά αποδεκτά. Καθώς ο βαθμός οξύτητας σε g/mL αντιστοιχεί, χονδρικά, στον αλκοολικό βαθμό σε % vol και τα κρασιά για την παραγωγή ξυδιού έχουν περιεκτικότητα οίνοπνεύματος μεταξύ 9% και 12%, το ξύδι που παράγεται (χωρίς προσθήκη νερού ή περαιτέρω επεξεργασία) θα πρέπει να έχει οξύτητα μεταξύ 9% και 12%. Συνεπώς, η αραίωση καθίσταται αναγκαία, προκειμένου να ληφθεί βαθμός οξύτητας 6% (Camin et al., 2013).

Βάση των ισοτοπικών παραμέτρων του άνθρακα και του οξυγόνου εντοπίζονται τα συνθετικά ξύδια και διακρίνονται τα παράγωγα προϊόντα C3 και C4, επιτρέποντας, έτσι, την ανίχνευση της νοθείας των ξυδιών με φθηνότερες πρώτες ύλες από εκείνες που δηλώνονται στην ετικέτα του τελικού προϊόντος.

Ο προσδιορισμός της αναλογίας ²H/¹H της μεθυλικής πλευράς του οξικού οξέος μέσω της μεθόδου SNIF-NMR και ο προσδιορισμός της αναλογίας ¹³C/¹²C μέσω της μεθόδου IRMS παρέχουν πληροφορίες για την βοτανική προέλευση του οξικού οξέος και την πιθανότητα νοθείας ξυδιού με συνθετικό οξικό οξύ (Thomas & Jamin, 2009).

2.2.2 Ξύδι από συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας

Η σταφίδα αποτελεί μία πολύ καλή πρώτη ύλη για την παραγωγή ζυμώσιμων τροφίμων-ποτών, καθώς περιέχει υψηλό ποσοστό σακχάρων, ποικιλία οργανικών οξέων και θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, βιταμίνες και πολυφαινόλες.

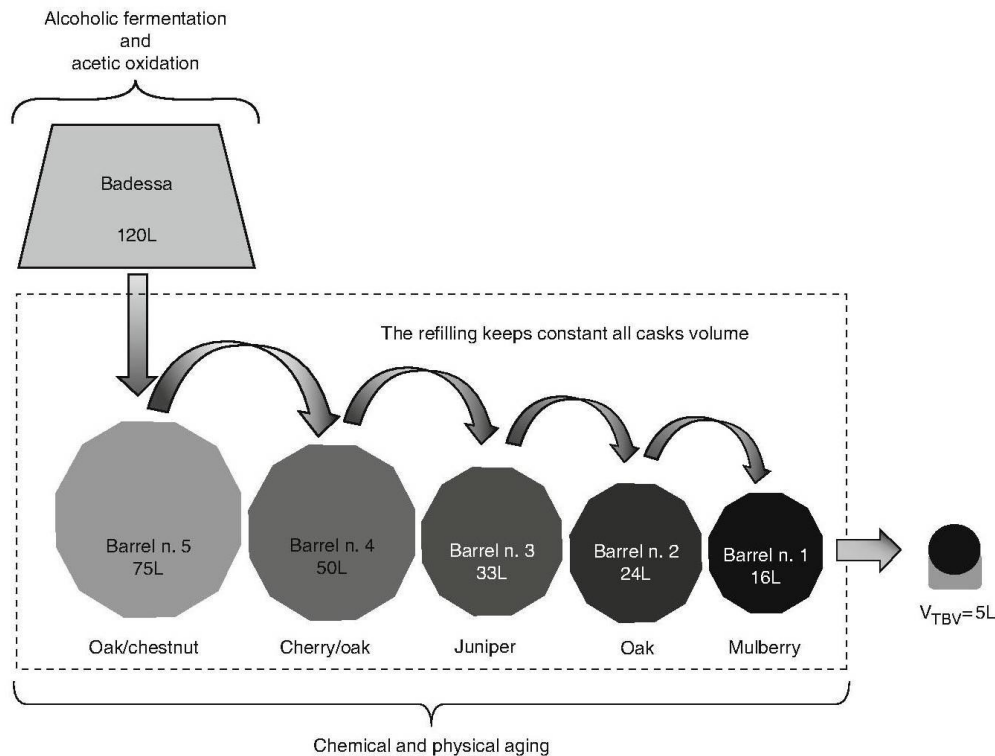
Αρχικά, απαιτείται η εκχύλιση του χυμού από τις ξηρές σταφίδες με την βοήθεια υδραυλικής πρέσας. Ο χυμός ελέγχεται όσον αφορά την πυκνότητα, την οξύτητα, την θερμοκρασία και την σύσταση με σκοπό την καταλληλότητα του υγρού προς ζύμωση και την κατάρτιση απόδοσης σακχάρων προς ζύμωση. Το ξύδι παράγεται μέσω ζύμωσης δύο σταδίων. Πρώτα, τα ζυμώσιμα σάκχαρα μετατρέπονται σε αιθανόλη με τη βοήθεια ζυμομυκήτων, συνήθως είδη *Saccharomyces*. Έπειτα, ακολουθεί η οξειδωση της αιθανόλης από AAB.

2.2.3 Βαλσάμικο ξύδι

Το παραδοσιακό βαλσάμικο ξύδι της Μόντενα (Traditional Balsamic Vinegar of Modena, TBVM) αποτελεί ένα ευρέως γνωστό προϊόν της περιοχής Emilia Romagna, Μόντενα, Ιταλία. Το TBVM αποτελεί μοναδικό προϊόν υψηλής ποιότητας, ενώ το 2000 η Ε.Ε. το αναγνώρισε ως προϊόν προστατευόμενης γεωγραφικής προέλευσης (PGI) (Reg. CE n. 813/2000 Απρίλιος 17, 2000). Τα μοναδικά χαρακτηριστικά του TBVM εξαρτώνται από φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες-μεταβλητές. Κατά την διάρκεια της παλαίωσης του TBVM, η συγκέντρωση των συστατικών του αυξάνεται και επακόλουθα και η πυκνότητα, κυρίως, λόγω της εξάτμισης του περιεχόμενου νερού. Ταυτοχρόνως, επέρχεται ισορροπία μεταξύ των γλυκών και οξικών γεύσεων, καθώς και ένα σκούρο καφέ χρώμα.

Κύρια διαφορά μεταξύ του σπιτικού TBVM και των βαλσάμικων προϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων αποτελεί η χρήση χρωμάτων τροφίμων (π.χ. καραμελόχρωμα) στις βιομηχανίες, με σκοπό την αύξηση της περιεκτικότητας σακχάρων και του σκούρου καφέ χρώματος, και η χρήση ξυδιού από κρασί, με σκοπό της βελτίωσης της οξύτητας. Επιπλέον, το TBVM παράγεται με την παραδοσιακή μέθοδο που ρυθμίζεται από τις Ιταλικές αρχές.

Η διαδικασία, αυτή, ξεκινά με την συλλογή χυμού τοπικών σταφυλιών (Trebiano, Lambrusco, Sauvignon, Berzemino και Ancellotta). Ο χυμός αυτός ονομάζεται μούστος και μαγειρεύεται αργά σε ένα ανοιχτό δοχείο, το οποίο θερμαίνεται με φλόγα και βρίσκεται σε ατμοσφαιρική πίεση και σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 80 °C, μέχρι η συγκέντρωση των σακχάρων σε υδατικό διάλυμα να φθάσει τα 30 – 35 ° Brix. Κατά την διάρκεια του μαγειρέματος του μούστου η σύνθεση και οι φυσικές ιδιότητες του μούστου αλλάζουν σε μεγάλο βαθμό, λόγω της εξάτμισης του νερού (μείωση 30-60 %), η οποία οφείλεται στη μετατροπή των σακχάρων, στην υποβάθμιση των πολυφαινόλων και στο σχηματισμό νέων ενώσεων. Μετά το μαγείρεμα, ακολουθεί η ζύμωση από ζύμες (πρωτίστως στελέχη *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces*). Στο στάδιο αυτό ελέγχεται η μείωση των σακχάρων μέσω της παραγωγής αιθανόλης. Ύστερα, η αιθανόλη οξειδώνεται σε οξικό οξύ από AAB. Οι πιο κοινά απομονωμένες ζύμες είναι τα στελέχη *Zygosaccharomyces bailii* και *Zygosaccharomyces rouxii*, που περιέχονται συχνά και στους αλλοιωμένους χυμούς φρούτων. Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώνεται σε 2 εβδομάδες και στην περίοδο αυτή οι ζύμες αναπτύσσονται ραγδαία σε εύρος 10² με 10³ cfu (colony-forming units)/g. Η ανάπτυξη των ζυμών επηρεάζεται από την περιεκτικότητα σακχάρων, το pH, τη θερμοκρασία (θάνατος σε θερμοκρασίες > 55 °C, pH 2.6 και περιεκτικότητα σακχάρων > 60 %). Ο ζυμωμένος και οξειδωμένος μούστος εισάγεται σε ξύλινα βαρέλια, τουλάχιστον 5 ειδών (π.χ. κερασιάς, καστανιάς, μουριάς, βελανιδιάς) και διαφορετικού όγκου (από 75 μέχρι 10 L), ώστε να επιτρέπονται-διευκολύνονται επιπλέον χημικές και φυσικές αλλαγές για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η περίοδος παλαίωσης του TBVM διαρκεί, τουλάχιστον, 12 χρόνια, σύμφωνα με τις Ιταλικές Αρχές. Αντίθετα, τα βαλσαμικά προϊόντα των βιομηχανικών παλαιώνονται για τουλάχιστον 60 ημέρες.



ΕΙΚΟΝΑ 4: Πιθανή διαμόρφωση σετ βαρελιών. Συμβατικά το μικρότερο βαρέλι αναφέρεται ως «βαρέλι 1»
 Πηγή: (Giudici, 2009)

Η γεύση και το άρωμα των σπιτικών TBVM διαφέρει από παραγωγό σε παραγωγό και εξαρτάται από τον συνδυασμό των ειδών ξύλινων βαρελιών, την ηλικία των βαρελιών και τον χρόνο παραμονής και παλαίωσης των TBVM εντός των βαρελιών. Κατά την παραμονή του TBVM στα βαρέλια και στα γυάλινα μπουκάλια παρατηρούνται ανεπιθύμητες επιδράσεις της αποκρυστάλλωσης του προϊόντος. Η αποκρυστάλλωση του βαλσαμικού αποτελεί ένα ανεπιθύμητο φαινόμενο, που συμβαίνει κατά την παλαίωση και μπορεί να σχετίζεται με την θερμοκρασία κατά τον χειμώνα και το καλοκαίρι (το καλοκαίρι αυξανόμενης της θερμοκρασίας επιταχύνεται η εξάτμιση του νερού). Η αλλοίωση του TBVM εντός των μπουκαλιών είναι σπάνια, αλλά μερικές φορές παρατηρείται η αποκρυστάλλωση, η οποία οφείλεται σε αλλαγές, που συνέβηκαν στα βαρέλια, πρωτίτερα, με αποτέλεσμα την υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και την χαμηλή ολική οξύτητα του προϊόντος. Η σύντηξη των κρυστάλλων μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Η μέγιστη αρχική περιεκτικότητα του «μαγειρεμένου» μούστου (cooked must) σε σάκχαρα και η ολική οξύτητα πρέπει να είναι $> 72^{\circ}$ Brix και ≤ 6 g/L, αντίστοιχα.

Το βαλσαμικό ξύδι της Μόντενα (BVM) αναγνωρίστηκε ως προϊόν προστατευόμενης γεωγραφικής προέλευσης από την Ε.Ε. το 2009 (Reg. CE n. 583/2009 Ιούλιος, 2009).

Η διαφορά των βαλσαμικών ξυδιών από τα άλλα ξύδια έγκειται στον τρόπο παραγωγής, ο οποίος περιλαμβάνει την αλκοολική και την οξική ζύμωση μαγειρεμένου και συμπυκνωμένου γλεύκους σταφυλιών. Αντίθετα, τα κοινά ξύδια προέρχονται, γενικά, από αλκοολικά διαλύματα.

Κατά τη διάρκεια της παραγωγής, επιτρέπεται ο εμβολιασμός με βακτήρια οξικού οξέος (AAB), ενώ απαγορεύεται η χρήση οποιουδήποτε επιπλέον προσθέτου. Το

BVM είναι ένα φθηνότερο προϊόν συγκριτικά με το TBVM, παλαιώνεται σε ξύλινα βαρέλια από δύο μήνες έως 3 χρόνια και έχει τη δυνατότητα προσθήκης ξυδιού που αποκτιέται από οξοποίηση οίνου (10 % v/v κατώτατο όριο) και καραμελοχρώματος (2 % v/v ανώτατο όριο) (Decreto Ministeriale, 3 Δεκεμβρίου 1965).

Ο έλεγχος της ποιότητας και η διασφάλιση της ταυτότητας των BVM και TBVM πραγματοποιούνται με οργανοληπτικές και φυσικοχημικές αναλύσεις, όπως είναι η ολική οξύτητα, η πυκνότητα και η ξηρή βιομάζα. Τυποποιημένες αναλυτικές μέθοδοι δίνουν την δυνατότητα για περαιτέρω ανάλυση της ποιότητας και της ταυτότητας των βαλσάμικων. Με τον τρόπο αυτό, ενισχύεται η εμπορική αξία των προϊόντων αυτών και ελέγχεται η πιθανή νοθεία τους (Elmi, 2015; Giudici et al., 2009; M. Gullo & Giudici, 2008).

2.2.4 Ξύδι από ρύζι

Το ξύδι αυτό παράγεται στην Κίνα για πάνω από 5000 χρόνια. Υπάρχουν τρία είδη ξυδιού από ρύζι:

- Κόκκινο ξύδι από ρύζι, που χρησιμοποιείται ως συνοδευτικό σε διάφορα πιάτα και σούπες.
- Λευκό ξύδι από ρύζι, που χρησιμοποιείται σε γλυκόξινα πιάτα.
- Μαύρο ξύδι από κρασί, που χρησιμοποιείται σε τηγανιτά και σάλτσες.

2.2.5 Ξύδι Sherry

Το ξύδι αυτό παλαιώνεται σε ξύλινα βαρέλια κάτω από τον ήλιο, αποκτώντας, τελικά, μία γλυκιά γεύση καρυδιού.

2.2.6 Ξύδι από βύνη

Το ξύδι αυτό είναι δημοφιλές στην Αγγλία. Παρασκευάζεται με ζύμωση κριθαριού και πολτού άλλων σιτηρών, ενώ αρωματίζεται από το είδος του ξύλου του βαρελιού, έχοντας τελικά μία πλούσια γεύση.

2.2.7 Ξύδι Champagne

Το ξύδι αυτό προέρχεται από λευκό, ξηρό κρασί από ποικιλία σταφυλιών Chardonnay ή Pinot Noir, που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή σαμπάνιας. Το ξύδι αυτό σε αντίθεση με την σαμπάνια δεν περιέχει φυσαλίδες αέρα.

2.2.8 Μηλόξυδο (Ξύδι από μηλίτη)

Το ξύδι αυτό παρασκευάζεται με οξοποίηση του μηλίτη και περιέχει οξικό οξύ τουλάχιστον 4.5 %. Έχει κιτρινωπό χρώμα και χαρακτηριστική οσμή μήλου, ενώ δεν περιέχει τρυγικά οξέα, όπως το ξύδι από κρασί, αλλά όξινο μηλικό κάλι και ελεύθερο μηλικό οξύ (Berry, 2011; Tan, 2005).

3 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (ACETIC ACID BACTERIA, AAB)

3.1 Ιστορική αναδρομή

Τα AAB χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ξυδιού, η οποία αποτελεί την πιο γνωστή εφαρμογή τους, από τα χρόνια της Βαβυλωνίας. Για πολλά χρόνια, το ξύδι προερχόταν από τη ζύμωση αλκοολικών διαλυμάτων, χωρίς, ωστόσο, να είναι κατανοητή η φυσική διαδικασία, που λάμβανε χώρα. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, ερευνητές, όπως οι F. T. Kützing, Lafare και Hermann Boerhaave, μελέτησαν την μικροβιακή βάση της διαδικασίας αυτής. Το 1822, ο Christian Persoon μελέτησε για πρώτη φορά το επιφανειακό φιλμ κρασιού και μύρας και πρότεινε το όνομα «Μυκόδερμα» (“Mycoderma”). Αργότερα, το 1837, ο F. T. Kützing απομόνωσε βακτήρια από φυσικά ζυμωμένο ξύδι για πρώτη φορά. Θεωρώντας ότι αυτά είναι ένα είδος άλγης, τα ονόμασε *Ulvina aceti*. Ο Louis Pasteur, το 1864, απέδειξε την αιτιώδη συνάφεια μεταξύ της παρουσίας *Mycoderma aceti* και του σχηματισμού ξυδιού στην πρώτη συστηματική μελέτη της οξικής ζύμωσης με την ονομασία “Etudes sur le vinaigre”. Αυτές οι ανακαλύψεις ακολουθούνται από μελέτες, που σκοπεύουν στην καλύτερη κατανόηση και σε νέες μεθόδους (μέθοδος Pasteur) για τον σχηματισμό ξυδιού. Ο Emil Christian Hansen απέδειξε αργότερα ότι το *Mycoderma aceti* ήταν μίγμα τουλάχιστον δύο βακτηρίων, *Bacterium aceti* ή *Acetobacter* και *Bacterium pasteurianum*. Μεταγενέστερες έρευνες απεκάλυψαν και άλλα μικρόβια, που προκαλούν την οξική ζύμωση λόγω της ύπαρξης οξειδωτικών ενζύμων, τα οποία μεταφέρουν το οξυγόνο στην αιθυλική αλκοόλη. Το απαραίτητο οξυγόνο για την πραγματοποίηση της βιο-οξείδωσης προέρχεται από τον ατμοσφαιρικό αέρα (Mas et al., 2014).

3.2 Ταξινόμηση AAB

Η ένατη έκδοση του εγχειριδίου “Bergey’s Manual” της Συστηματικής Βακτηριολογίας κατατάσσει τα βακτήρια οξικού οξέος στην οικογένεια *Acetobacteraceae*, η οποία είναι ευρέως διαδεδομένη σε ζαχαρούχα, όξινα και αλκοολούχα υποστρώματα, όπως φρούτα και ζυμώσιμα ποτά (Buchanan & Gibbons, 1974). Τα AAB κατατάσσονται στην οικογένεια *Acetobacteraceae* ως υποκατάστατο οξεόφιλων βακτηρίων στην α-υποδιαίρεση της ομάδας βακτηρίων *Proteobacteria*, η οποία έχει τρία μεγάλα γένη *Gluconobacter*, *Acetobacter* και *Gluconoacetobacter*. Η οικογένεια *Acetobacteraceae* αποτελείται από αυστηρά αερόβια χημειοοργανοτροφικά βακτήρια, ικανά να εκτελούν ποικίλες ατελείς οξειδώσεις και να ζουν σε φυτικά υλικά, όπως φρούτα και άνθη (Holt, 2001).

Η ταξινόμηση των AAB γίνεται αρχικά βάση τη μορφολογία και την φυσιολογία των βακτηρίων. Οι πρώτες ταξινομήσεις πραγματοποιήθηκαν το 1894 από τον E. C. Hansen και βασίζονταν στην ύπαρξη μίας μεμβράνης-φιλμ σε υγρό μέσο και στην αντίδρασή του με ιώδιο. Ο Toshinobu Asai (1934-1935) διατύπωσε την κατάταξη των AAB σε δύο γένη: *Acetobacter* και *Gluconobacter*. Σημαντική αλλαγή στην ταξινόμηση πραγματοποιήθηκε από τους K. Yamada, I. Hoshino και T. Ishikawa (1997, 1998) μεταφέροντας είδη *Acetobacter* Q-10 (τύπος ουβικινόνης) στο γένος *Gluconacetobacter* (*Acetobacter xylinus*, *Acetobacter liquefaciens*, *Acetobacter hansenii*, *Acetobacter diazotrophicus* και *Acetobacter europaeus*). Σήμερα, η

οικογένεια *Acetobacteraceae* αποτελείται από 12 γένη AAB, όπου περιλαμβάνονται 59 είδη: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconoacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia* και *Ameyamaea* (Yamada & Yukphan, 2008). Η τρέχουσα κατάταξη παρουσιάζεται παρακάτω:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Κατάταξη ανά γένος και είδος οικογένειας *Acetobacteraceae*

Γένος	Είδος	Γένος	Είδος	
<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>	<i>Gluconoacetobacter</i>	<i>Ga. azotocaptans</i>	
	<i>A. cerevisiae</i>		<i>Ga. diazotrophicus</i>	
	<i>A. cibirongensis</i>		<i>Ga. entanii</i>	
	<i>A. estunensis</i>		<i>Ga. europaeus</i>	
	<i>A. indonesiensis</i>		<i>Ga. hanseni</i>	
	<i>A. lovansiensis</i>		<i>Ga. intermedius</i>	
	<i>A. molarum</i>		<i>Ga. johanna</i>	
	<i>A. nitrogenifigens</i>		<i>Ga. liquefaciens</i>	
	<i>A. oeni</i>		<i>Ga. nataicola</i>	
	<i>A. orientalis</i>		<i>Ga. oboediens</i>	
	<i>A. orleanensis</i>		<i>Ga. rhaeticus</i>	
	<i>A. pasteurianus</i>		<i>Ga. sacchari</i>	
	<i>A. peroxydans</i>		<i>Ga. saccharivorans</i>	
	<i>A. pomorum</i>		<i>Ga. swingsii</i>	
<i>A. syzygii</i>	<i>Ga. xylinus</i>			
<i>Acidomonas</i>	<i>Ac. methanolica</i>	<i>Granulibacter</i>	<i>Gr. bethesdensis</i>	
	<i>As. bogorensis</i>		<i>G. albidus</i>	
	<i>As. krungthrpensis</i>		<i>G. serinus</i>	
<i>Asaia</i>	<i>As. lannensis</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>G. frateurii</i>	
	<i>As. siamensis</i>		<i>G. japonicus</i>	
	<i>As. spathodeae</i>		<i>G. kondonii</i>	
			<i>G. oxydans</i>	
			<i>G. roseus</i>	
			<i>G. sphaericus</i>	
			<i>G. thailandicus</i>	
			<i>G. wancherniae</i>	
<i>Ameyamaea</i>	<i>Am. chiangmainensis</i>		<i>Saccharibacter</i>	<i>S. floricola</i>
<i>Neoasaia</i>	<i>N. chiangmainensis</i>		<i>Swaminathania</i>	<i>Sw. salitolerans</i>
<i>Kozakia</i>	<i>K. baliensis</i>		<i>Tanticharoenia</i>	<i>T. sakaeratensis</i>

Πηγή: (Kommanee et al., 2010): *As. Spathodeae*, (Malimas et al., 2008): *As. Lannensis*, (Malimas et al., 2008a): *G. Roseus*, (Malimas et al., 2009): *G. Japonicas*, (Malimas et al., 2008b): *G. Sphaericus*, (Yamada and Yukphan, 2008; Malimas et al., 2007): *G. Kondonii*, (Yukphan et al., 2008): *Tanticharoenia*, (Yukphan et al., 2009): *Ameyamaea*, (Yukphan et al., 2010): *G. wancherniae*)

3.3 Χαρακτηριστικά και ιδιότητες AAB

Τα βακτήρια οξικού οξέος είναι υποχρεωτικά αερόβιοι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί με την χαρακτηριστική ικανότητα να οξειδώνουν μερικώς μία ποικιλία υδατανθράκων και να απελευθερώνουν τους αντίστοιχους μεταβολίτες (αλδεύδες, κετόνες, οργανικά οξέα). Είναι αρνητικά κατά Gram και έχουν μεταβλητό σχήμα ελλειμοειδές ή κυλινδρικό και μπορούν να παρατηρηθούν κάτω από το μικροσκόπιο

και μόνο, σε ζεύγη ή σε συσσωματώματα και αλυσίδες, ενώ δεν δημιουργούν σπόρια. Το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας ανάπτυξής τους κυμαίνεται μεταξύ 25 °C και 30 °C (18 - 34 °C ανάλογα με το είδος) και το βέλτιστο εύρος pH μεταξύ 5 και 6.5. Ωστόσο, σε τιμές pH μικρότερες του 5 θεωρούνται ανθεκτικά (Holt et al., 1994; L.E. Romero, 1994; Trcek et al., 2000; M. Gullo & Giudici, 2008).

Τα AAB αναπτύσσονται τυπικά σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση πηγών άνθρακα. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη τους μπορεί να περιορίζεται από άλλες θρεπτικές ουσίες ή παράγοντες, ενώ παράλληλα οι αποδόσεις ανάπτυξης, που σημειώνονται είναι μικρές. Σημειώνεται ότι διάφοροι υδατάνθρακες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα από τα AAB. Ανάλογα με την πηγή άνθρακα, που χρησιμοποιείται, μερικά στελέχη απαιτούν για την ανάπτυξη τους αυξητικούς παράγοντες, όπως είναι η βιοτίνη, η θειαμίνη και το παντοθενικό οξύ. Ενδεικτικά, αναφέρονται μέσα καλλιέργειας, στα οποία μπορούν να απομονωθούν και να αναπτυχθούν τα AAB:

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Θρεπτικά μέσα για καταμέτρηση, απομόνωση, ταυτοποίηση και διατήρηση των AAB

Μέσο	Αναλογία	Μέσο	Αναλογία
YPM^a Μέσο (Gullo & Giudici, 2008)		AE- Μέσο (Yamada et al., 1999)	
Εκχύλισμα ζύμης	0.5%	Γλυκόζη	0.5%
Πεπτόνη	0.3%	Εκχύλισμα ζύμης	0.3%
Μανιτόλλη	2.5%	Πεπτόνη	0.4%
Άγαρ	1.2%	Άγαρ	0.9%
GYC^b Μέσο (Gullo & Giudici, 2008)		Αιθανόλη	3 ml
Γλυκόζη	10.0%	Οξικό οξύ	3 ml
Εκχύλισμα ζύμης	1.0%	Ενισχυμένο AE-Μέσο (Zahoor et al., 2006)	
CaCO ₃	2.0%	Γλυκόζη	4%
Άγαρ	1.5%	Εκχύλισμα ζύμης	1%
GY^c Μέσο (Yamada & Yukphan, 2008)		Πεπτόνη	1%
Γλυκόζη	2 g	Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	0.338%
Εκχύλισμα ζύμης	1 g	Κιτρικό οξύ	0.15%
Άγαρ	2 g	Αιθανόλη	2%(v/v)
Απιονισμένο νερό	100 ml	Οξικό οξύ	1%(v/v)

a υγρή καλλιέργεια: εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, μανιτόλη, b υγρή καλλιέργεια: γλυκόζη, εκχύλισμα ζύμης, CaCO₃, c υγρή καλλιέργεια: γλυκόζη, εκχύλισμα ζύμης.

Πηγή: (Sengun Ilkin Yucel & Seniz, 2011)

Τα βακτήρια οξικού οξέος συναντώνται σε φρούτα, όπως τα σταφύλια, και έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται. Αποτελούν τους κύριους μικροοργανισμούς αλλοίωσης ποτών, που έχουν προέλθει από ζύμωση, όπως είναι η μύρα και το κρασί. Ταυτόχρονα, είναι οι κύριοι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί για την παραγωγή του ξυδιού (Barbe et al., 2001; Drysdale & Fleet, 1989; Fleet, 1999; Joyeux et al., 1984). Σε γλεύκος σταφυλιών έχει ανιχνευθεί το είδος *G. oxydans*, ενώ τα είδη *A. aceti* και *A. pasteurianus* έχουν ανιχνευθεί σε κρασί, στο οποίο, μάλιστα, ευθύνονται για την αλλοίωσή του. Η παρουσία και η ποικιλία των ειδών AAB σε σταφύλια εξαρτάται από τη γεωγραφική θέση του αμπελώνα, την ποικιλία των σταφυλιών, τις

αντιμυκητιακές θεραπείες, την κατάσταση των σταφυλιών (υγιή ή αλλοιωμένα) και τις εκάστοτε καιρικές συνθήκες κατά την συγκομιδή τους (Gonzalez et al., 2005).

Τα AAB μπορούν να επιβιώσουν, ακόμα και να αυξηθούν, σε γλεύκος σταφυλιών κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Παράγοντες όπως, το pH, η συγκέντρωση του SO₂ στο μούστο και το κρασί, αλλά και οι τεχνικές οινοποίησης (π.χ. cold soaking), επηρεάζουν την ικανότητα επιβίωσης και ανάπτυξης των βακτηρίων αυτών. Σε χαμηλό pH και επαρκή συγκέντρωση SO₂ προλαμβάνεται η ανάπτυξη του *G. oxydans* σε φρέσκο μούστο, ενώ αργότερα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης εμφανίζονται τα είδη *A. pasteurianus* και *A. liquefaciens* (Du Toit W.J. & M.G., 2002).

Επιπλέον, τα AAB μεταβάλλονται και προσαρμόζονται λειτουργικά και δομικά σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτό το καταφέρνουν είτε μέσω ενεργοποίησης κρυφών και σιωπηλών γονιδίων είτε μέσω της επιλογή μεταλλάξεων σε ρυθμιστικά και δομικά γονίδια. Αυτό επιπλέον, είναι σημαντικό για τον έλεγχο εμπορικών διαδικασιών.

Στα προϊόντα των AAB συγκαταλέγονται διάφορα οργανικά οξέα περιλαμβανομένων οξικό, τρυγικό, γαλακτικό, μηλικό και κιτρικό οξύ ως αποτέλεσμα της οξειδωσης σακχάρων και αλκοολών. Ωστόσο, το οξικό οξύ είναι κυρίαρχο μεταξύ αυτών (Sengun Ilkin Yucel & Seniz, 2011). Η πλειονότητα του οξικού οξέος, που παράγεται από τα AAB, απελευθερώνεται εντός του μέσου ανάπτυξης, όπου συσσωρεύεται σε ένα μέγιστο επίπεδο 5-10 % v/v στην περίπτωση των στελεχών *Acetobacter* και 10-20 % v/v στη περίπτωση των στελεχών *Gluconacetobacter* (Budak et al., 2014; Mamlouk & Gullo, 2013; Mas et al., 2014). Οργανικά οξέα που βρέθηκαν σε διαφορετικούς τύπους ξυδιού παρουσιάζονται στον Πίνακα 3:

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Οργανικά οξέα που βρέθηκαν σε διάφορα είδη ξυδιού

Τύπος ξυδιού	Οργανικό οξύ	Αναφορά
Ξύδι οίνοπνεύματος	οξικό οξύ οξικό οξύ κιτρικό οξύ	Sáiz-Abajo et al., 2005
Μηλόξυδο	μυρμηκικό οξύ γαλακτικό οξύ μηλικό οξύ ηλεκτρικό οξύ οξικό οξύ	Caligiani et al., 2007 Budak, 2010
Ξύδι βύνης	γαλακτικό οξύ ηλεκτρικό οξύ οξικό οξύ	Sáiz-Abajo et al., 2005
Ξύδι δαμάσκηνου	γαλακτικό οξύ τρυγικό οξύ οξικό οξύ	Liu & He, 2009
Ξύδι sherry	γαλακτικό οξύ τρυγικό οξύ μηλικό οξύ κιτρικό οξύ οξικό οξύ κιτρικό οξύ	Morales et al., 1998
Ξύδι από ντομάτα	μυρμηκικό οξύ γαλακτικό οξύ μηλικό οξύ ηλεκτρικό οξύ	Caligiani et al., 2007
Παραδοσιακό βαλσάμικο ξύδι	τρυγικό οξύ μηλικό οξύ κιτρικό οξύ ηλεκτρικό οξύ	Cocchi et al., 2006
Ξύδι από κρασί	οξικό οξύ κιτρικό οξύ μυρμηκικό οξύ γαλακτικό οξύ μηλικό οξύ ηλεκτρικό οξύ τρυγικό οξύ	Caligiani et al., 2007 Budak, 2010

Εστιάζοντας στην παραγωγή ξυδιού από οίνο, σημειώνεται ότι το ξύδι παράγεται από μία σειρά στελεχών και ειδών AAB ανάλογα τη συγκέντρωση του οξικού οξέος. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξικού οξέος κυριαρχούν τα είδη του γένους *Acetobacter* με πιο κοινό το *A. pasteurianus*. Σε συγκεντρώσεις οξικού οξέος μεγαλύτερες του 5 % αναλαμβάνουν τη διαδικασία τα είδη του γένους *Gluconoacetobacter* (*Ga. xylinus*, *Ga. europaeus*, *Ga. oboediens* και *Ga. intermedius*). Στο παραδοσιακό βαλσάμικο, το οποίο θεωρείται μέτριας οξύτητας ξύδι, εμφανίζονται τα βακτήρια *A. pasteurianus*, και *Ga. europaeus* (Vegas et al., 2010).

Για τον καλύτερο έλεγχο της παραγωγικής διαδικασίας ξυδιού συνιστάται η χρήση μικτής καλλιέργειας, όπου αρχικά η οξείδωση θα γίνεται ταχεία από το *A. pasteurianus*, ενώ τελικά δρουν AAB, που εμφανίζει υψηλή ανοχή στο οξικό οξύ (Mas et al., 2014).

Τρία κύρια γένη των AAB, που επιλέγονται για την παραγωγή ξυδιού, είναι τα *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter* και *Gluconobacter*. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται είδη AAB που έχουν απομονωθεί από διαφορετικά είδη ξυδιού:

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Απομονωμένα είδη AAB σε διαφορετικά είδη ξυδιού

Είδος	Τύπος ξυδιού	Αναφορά
<i>A. aceti</i>	Μηλίτη	Trcek 2005
<i>A. intermedius</i>	Μηλίτη	Trcek and others 2000
<i>A. pasteurianus</i>	Μηλίτη, Κόκκινου κρασιού, παραδοσιακό βαλσάμικο και ρυζιού	Haruta and others 2006, Bartowsky and Henschke 2008, Gullo and others 2009
<i>A. pomorum</i>	Βιομηχανικό	Sokollek and others 1998
<i>A. obediens</i>	Βιομηχανικό	Sokollek and others 1998
<i>Ga. entanii</i>	Βιομηχανικό	Schüller and others 2000
<i>Ga. europaeus</i>	Λευκού κρασιού, κόκκινου κρασιού, οινοπνεύματος, μηλίτη	Sievers and Swings 2005, Callejon and others 2008, Vegas and others 2010
<i>Ga. hansenii</i>	Μηλίτη, παραδοσιακό βαλσάμικο	Gullo and Giudici 2008, Fernández-Pérez and others 2010
<i>G. oxydans</i>	Κρασιού	González and others 2005, Vegas and others 2010
<i>G. xylinus</i>	Λευκού κρασιού, παραδοσιακό βαλσάμικο, μηλίτη	Gullo and others 2006, Vegas and others 2010, Fernández-Pérez and others 2010

Μερικά μέλη της οικογένειας προκαλούν παθογένειες σε φυτά, ενώ δεν υπάρχει ένδειξη για παθογένεια θηλαστικών, περιλαμβάνοντας και τον άνθρωπο. Για παράδειγμα, μπορούν να προκαλέσουν βακτηριακή σήψη σε μήλα και αχλάδια. Επιπλέον, ορισμένα στελέχη προκαλούν λοιμώξεις σε φρούτα, όπως είναι η επονομαζόμενη ροζ νόσος σε ανανά, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ροζ αποχρωματισμών σε κονσέρβες ανανά. Μπορούν, επίσης, να χαλάσουν οινοπνευματώδη ποτά, όπως είναι η μύρα και το κρασί (Drysedale, 1989).

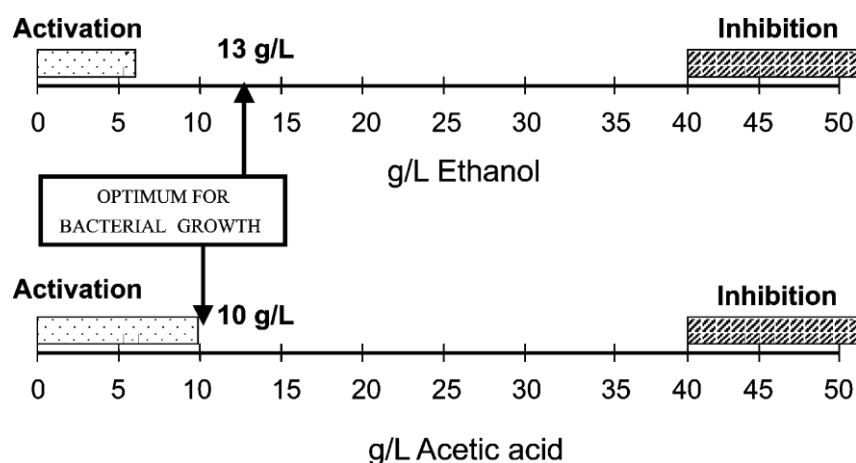
3.3.1 Επίδραση συγκέντρωσης Αιθανόλης & Οξικού οξέος

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού αυξάνεται από 0.13 έως 0.21 h⁻¹ σε συγκέντρωση αρχικής αιθανόλης μεταξύ 0.5 και 6 g/L. Μέχρι συγκέντρωση αιθανόλης 30 g/L ο ρυθμός ανάπτυξης βακτηρίων παραμένει σχεδόν σταθερός, ενώ σε συγκέντρωση αιθανόλης πάνω από 40 g/L η ανάπτυξη παρεμποδίζεται και ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί, ότι σε συγκέντρωση αιθανόλης 120 g/L η βακτηριακή ανάπτυξη είναι απίθανη, ενώ η φάση υστέρησης αυξάνεται ανάλογα με την συγκέντρωση αιθανόλης. Τα παραπάνω έχουν αποδειχθεί από τους (Yong Soo Park et al., 1989) και έχουν καθορίσει την τιμή C_{EtOH} = 40 g/L ως σημείο έναρξης της γραμμικής μείωσης της ικανότητας οξειδωσης των μικροοργανισμών. Λαμβάνοντας υπόψη τις εξισώσεις κινητικής για την βακτηριακή ανάπτυξη του *A. aceti* (Gomez, Romero, Caro, & Cantero, 1994) καθορίζεται μία βέλτιστη τιμή συγκέντρωσης αιθανόλης για τον βακτηριακό μεταβολισμό ίση με 13

g/L, ακόμη και αν η τιμή αυτή επηρεάζεται έντονα από την συγκέντρωση άλλων τοξικών ενώσεων, όπως είναι το οξικό οξύ.

Η παρουσία οξικού οξέος δρα είτε ανασταλτικά είτε θετικά στην δραστηριότητα του μικροοργανισμού *Acetobacter*. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 10 g/L το οξικό οξύ βοηθά την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και την μετέπειτα κατανάλωση αιθανόλης. Σε ασυνεχή ζύμωση η θετική επίδραση του οξικού οξέος μειώνεται κατά την φάση υστέρησης. Ταυτόχρονα, σε συγκεντρώσεις οξικού οξέος μεγαλύτερες από 40 g/L παρεμποδίζεται η ανάπτυξη των βακτηρίων. Λαμβάνοντας υπόψη τις εξισώσεις κινητικής για την βακτηριακή ανάπτυξη καθορίζεται μία βέλτιστη τιμή συγκέντρωσης οξικού οξέος για τον βακτηριακό μεταβολισμό ίση με 10 g/L. Επιπλέον, η παρουσία οξικού οξέος σε συγκέντρωση μικρότερη από 40 g/L ενισχύει την διεργασία της οξοποίησης (Z. Qi et al., 2013).

Το οξικό οξύ σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.5 % v/v) δεν είναι τοξικό. Η τοξική επίδραση του οξικού οξέος οφείλεται στο λιπόφιλο χαρακτήρα του αδιάστατου μορίου, το οποίο δρα ως φορέας πρωτονίων, και μπορεί να διαχυθεί εύκολα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα. Η διάσταση του μορίου στο εσωτερικό του κυττάρου οδηγεί σε συσσώρευση οξικών ανιόντων και μείωση του ενδοπλασματικού pH, οπότε διαταράσσεται η διαμεμβρανική βαθμίδωση πρωτονίων οδηγώντας σε μεταβολική αποσύζευξη. Η τοξικότητα των οξέων ζύμωσης, όπως είναι το οξικό οξύ, μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση ή την ανάπτυξη των βακτηρίων, εξηγώντας έτσι το χαμηλό επίπεδο της βιομάζας των AAB, η οποία εμφανίζεται συνήθως κατά την παραγωγή ξυδιού (Bartowsky, 2008; Andres-Barrao, 2012).



ΕΙΚΟΝΑ 5: Επίδραση συγκέντρωσης EtOH και οξικού οξέος στην ανάπτυξη βακτηρίων

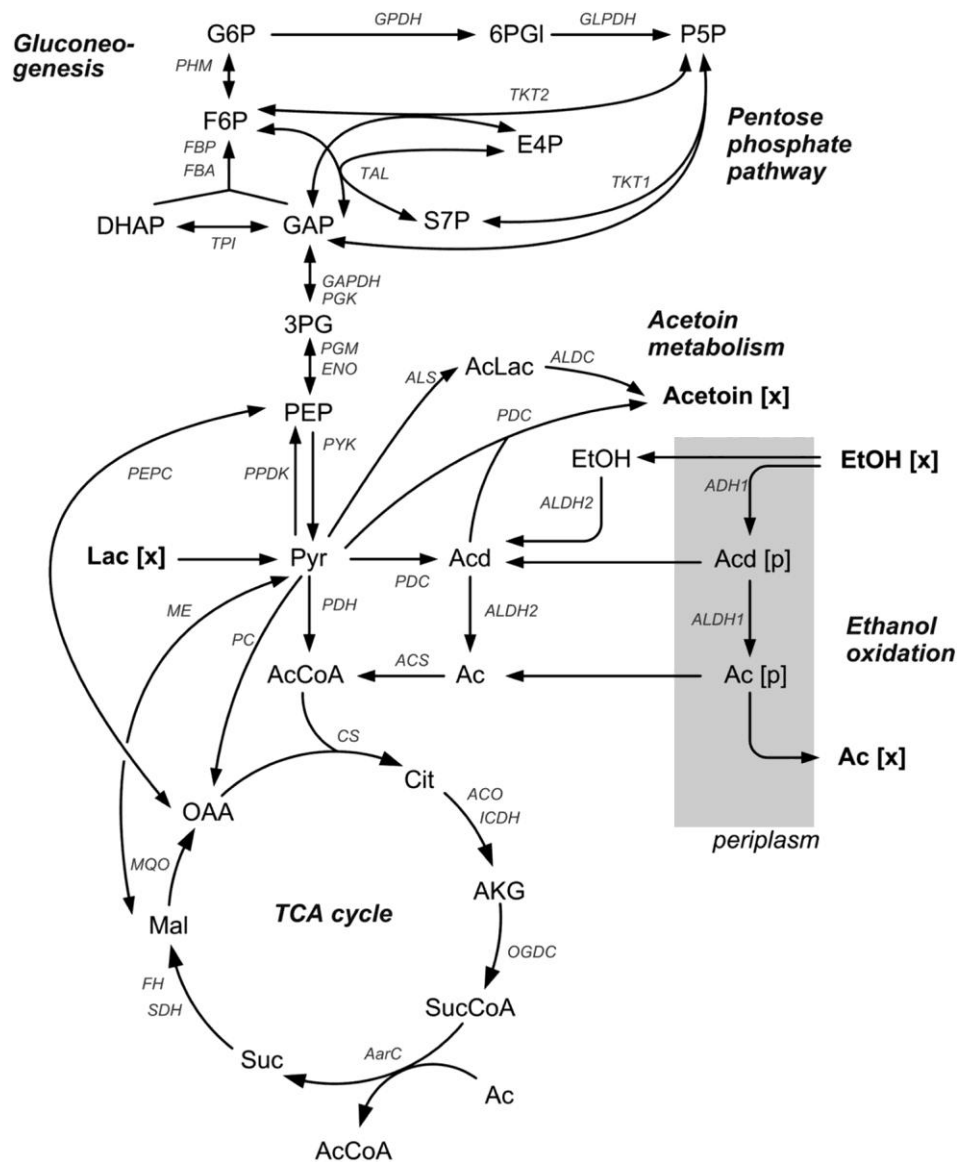
Πηγή: (Ignacio de Ory et al., 2002)

3.4 Μεταβολισμός AAB

Τα AAB διαθέτουν μία χαρακτηριστική αναπνευστική αλυσίδα, μέσω της οποίας οξειδώνονται αρκετές αλκοόλες, σάκχαρα ή αλκοολούχα σάκχαρα και τελικά συσσωρεύονται τα αντίστοιχα προϊόντα στο μέσο καλλιέργειας. Σε αυτά τα μικρόβια, τα βακτηριακά συστήματα αναπνοής εργάζονται άμεσα για την οξειδωτική ζύμωση.

Τα βακτηριακά συστήματα αναπνοής ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το είδος της τερματικής οξειδάσης: κυτοχρώματος c οξειδάσης της αναπνοής, και ουβικινόλη οξειδάσης του συστήματος αναπνοής. Οι οξειδώσεις λειτουργούν βοηθητικά για την παραγωγή ενέργειας, όταν οι απαιτήσεις ενέργειας του κυττάρου είναι υψηλές και πραγματοποιούνται από δεσμευμένες στη μεμβράνη αφυδρογονάσες, οι οποίες συνδέονται με οξειδάσες ουβικινόλης. Με αυτή την έννοια, η αναπνευστική αλυσίδα των AAB είναι ταξινομημένη στο αναπνευστικό σύστημα της τερματικής οξειδάσης της ουβικινόλης. Επιπλέον, τα AAB έχουν 4 διαφορετικές τερματικές οξειδάσες της ουβικινόλης τις οξειδάσεις του κυτοχρώματος o, κυτοχρώματος α₁, κυτοχρώματος d και την CN-ανθεκτική παρακαμπτήρια οξειδάση (CN-resistant bypass oxidase), οι οποίες δεν είναι μοναδικές και μπορούν επίσης να βρεθούν σε άλλα βακτηριακά είδη (Z. Qi, Yang, H., Xia, X., Wang, W., Yu, X., 2014).

Ο μεταβολισμός των AAB είναι λειτουργικά χωρισμένος στην κατανάλωση υποστρωμάτων άνθρακα C2 (αιθανόλη, ακεταλδεΐδη, οξικό) και C3 (γαλακτικό, πυροσταφυλικό, φωσφοενολοπυροσταφυλικό). Το οξικό προέρχεται σχεδόν αποκλειστικά από την αιθανόλη, ενώ το γαλακτικό οξύ χρησιμεύει για τον σχηματισμό ακετοΐνης και την δημιουργία δομικών μονάδων βιομάζας. Αν και αυτός ο διαχωρισμός δεν είναι βέλτιστος για την ενέργεια του κυττάρου, επιτρέπει την μεγιστοποίηση του ρυθμού ανάπτυξης και των ρυθμών μετατροπής. Ο διαχωρισμός αυτός είναι αποτέλεσμα της έλλειψης φωσφοενολοπυροσταφυλικής καρβοξυκινάσης και μηλικών ενζύμων, τα οποία τυπικά υπάρχουν στα βακτήρια για τη διασύνδεση του μεταβολισμού. Η γλυκογονογένεση οδηγείται από πυροσταφυλική φωσφορική δικινάση και κατά συνέπεια μια ισορροπημένη αναλογία γαλακτικού και αιθανόλης είναι σημαντική για την βέλτιστη απόδοση ενός AAB. Για παράδειγμα, το γαλακτικό οξύ και η αιθανόλη παρέχονται από βακτήρια γαλακτικού οξέος και ζύμες κατά την αρχική φάση της ζύμωσης του κακάο, αντίστοιχα, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία μιας ισορροπημένης μικροβιακής κοινοπραξίας για μια επιτυχή διαδικασία ζύμωσης. Τα AAB σημειώνουν μεγάλη απόδοση και παράγουν μεγάλες ποσότητες οξικού οξέος σε μικτές καλλιέργειες βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και ζυμών.



EIKONA 6: Κεντρικός μεταβολισμός *A. pasteurianus*

Πηγή: (Philipp Adler, 2014)

Ορισμοί συντομογραφιών:

G6P: glucose-6-phosphate
 6PGI: 6-phosphogluconate
 P5P: pentose-5-phosphate
 F6P: fructose-6-phosphate
 E4P: erythrose-4-phosphate
 DHAP: dihydroxyacetone phosphate
 GAP: glyceraldehyde 3-phosphate
 S7P: sucrose-7-phosphate
 3PG: 3-phosphoglycerate
 AcLac: acetolactate
 EtOH: ethanol

Ac: acetoin dehydrogenase
 AcCoA: acetyl coenzyme A
 OGD: alpha-ketoglutarate dehydrogenase
 AarC: succinyl-CoA:acetate CoA transferase
 Ac: acetate
 Cit: citrate
 AKG: a-ketoglutarate
 SucCoa: succinyl-CoA
 Su: succinyl
 Mal: malate
 OAA: oxaloacetate.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Απόδοση ενέργειας των διαφορετικών μεταβολικών λειτουργιών για κατανάλωση γαλακτικού, αιθανόλης, οξικού και ακετοΐνης

Λειτουργία μεταβολισμού	Σχηματιζόμενα moles			Βασικό ένζυμο, μονοπάτι
	NADH + H ⁺	ATP (GTP)	ATP ισοδύναμο ^a	
Αιθανόλη-οξικό	2	0	1	Αφυδρογονάση συνδεδεμένη στην μεμβράνη
Αιθανόλη-CO ₂	6	-1 ^c	2	Ακετυλο-CoA συνθετάση, TCA
οξικό-CO ₂	4	-1 ^c	1	Ακετυλο-CoA συνθετάση, TCA
Γαλακτικό-οξικό	2	0	1	Πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση
Γαλακτικό- CO ₂	6	1	4	Πυροσταφυλική αφυδρογονάση, TCA
Γαλακτικό-ακετοΐνη	1	0	0.5	Ακετογαλακτική συνθάση
Ακετοΐνη ^b - CO ₂	10	0	5	αφυδρογονάση ακετοΐνης και ακετυλο-CoA συνθετάση, TCA

a: O/P (ATP που σχηματίζεται ανά ζεύγος e μεταφερόμενο στην αναπνευστική αλυσίδα) = 0.5

b: Ισοδύναμο με 2 μόρια γαλακτικού οξέος.

c: Κατανάλωση ATP

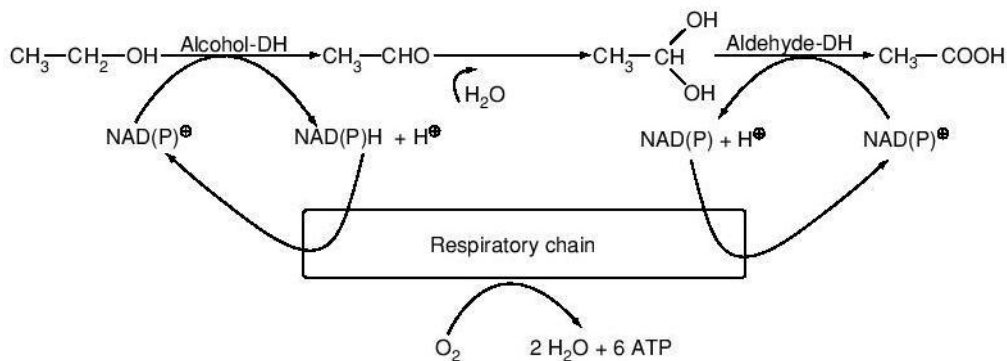
Πηγή: (Philipp Adler, 2014)

Τα AAB είναι εξειδικευμένα στη χρήση συστημάτων οξειδωσης δεσμευμένων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη για την παραγωγή οξικού. Τα συστήματα αυτά είναι άμεσα συνδεδεμένα με την αναπνευστική αλυσίδα, που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και επιτρέπει την οξείδωση εξωτερικών υποστρωμάτων με έναν απλό τρόπο. Δεδομένου ότι η αντίδραση πραγματοποιείται στον περιπλασματικό χώρο, δεν είναι απαραίτητη κάποια μεταφορά κατά μήκος της μεμβράνης και εντός του κυτοπλάσματος. Έτσι, παρόλο που αυτή η ατελής οξείδωση φαίνεται αναποτελεσματική, επιτρέπει στο βακτήριο να παράγει ενέργεια με μία μικρή σειρά ενζύμων. Αντίθετα, η διοχέτευση της αιθανόλης ή του οξικού οξέος εντός του κεντρικού μεταβολισμού μέσω της ακετυλο-CoA συνθετάσης κοστίζει 2, επιπλέον, moles ATP (Philipp Adler, 2014).

3.4.1 Μεταβολισμός αιθανόλης από τα είδη *Acetobacter*

Τα στελέχη *Acetobacter* είναι εξοπλισμένα με δύο σειρές ενζύμων, που καταλύουν τις ίδιες αντιδράσεις οξειδωσης. Τα ένζυμα της πρώτης σειράς είναι συνδεδεμένα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, στο ενεργό κέντρο απέναντι από το περίπλασμα και δρουν βέλτιστα σε όξινο pH, ενώ τα ένζυμα της δεύτερης σειράς βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, εξαρτώνται από φωσφορρυλιωμένο δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίνης αδενίνης (phosphorylated nicotinamide adenine dinucleotide, NADP) και δρουν βέλτιστα σε ουδέτερα ή αλκαλικό pH. Η υψηλή οξειδωτική ικανότητα των *Acetobacter* αποδίδεται στις πρωτεΐνες, που είναι συνδεδεμένες στην μεμβράνη, όπως είναι η αφυδρογονάση αλκοόλης, αφυδρογονάση αλδεΐδης, αφυδρογονάση γλυκόζης, αφυδρογονάση σορβιτόλης. Οι ειδικές δραστηριότητες των ενζύμων αυτών είναι έως τρεις τάξεις μεγέθους υψηλότερες από εκείνες των ομολόγων τους κυτταρόπλασμα. Τα περισσότερα ένζυμα, που είναι συνδεδεμένα στην μεμβράνη, χρησιμοποιούνται από κοινού την προσθετική ομάδα πυροκινολίνη κινόλη (pyrroloquinoline quinone,

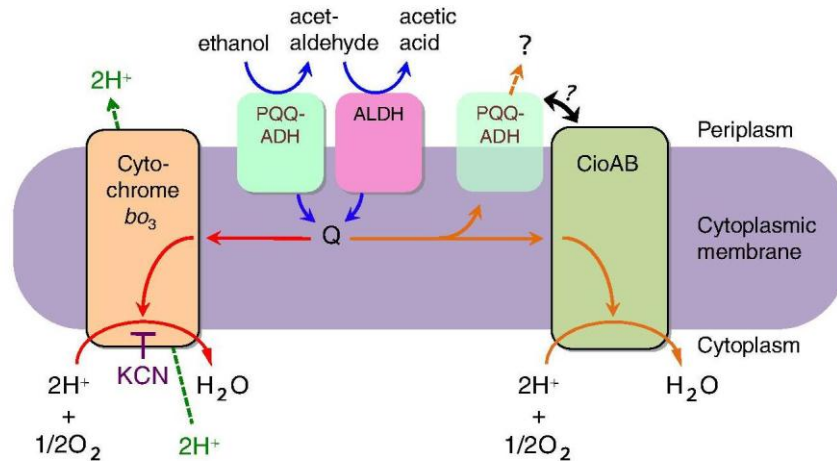
PQQ). Το υπόστρωμα δεν χρειάζεται να μεταφερθεί μέσα στο κύτταρο για οξείδωση. Τα ηλεκτρόνια που παράγονται μεταφέρονται από τη μειωμένη μορφή της PQQ είτε απευθείας σε μία ουβικινόνη (Q-9) της αναπνευστικής αλυσίδας είτε μέσω ενός κυτοχρώματος c (υπομονάδα μερικών αφυδρογονασών αλκοόλης) στη τερματική οξειδάση ουβικινόλης, η οποία είναι είτε ένα κυτόχρωμα a₁ είτε ένα κυτόχρωμα o. Ενέργεια ανακτάται από αυτές τις οξειδώσεις, οι οποίες όμως δεν συμβάλλουν στον μεταβολισμό του άνθρακα. Για παράδειγμα, η οξείδωση 1 mol αιθανόλης προς 1 mol οξικού οξέος αποδίδει 6 moles ATP.



ΕΙΚΟΝΑ 7: Αναπνευστική αλυσίδα AAB

Πηγή: (Plessi, 2003)

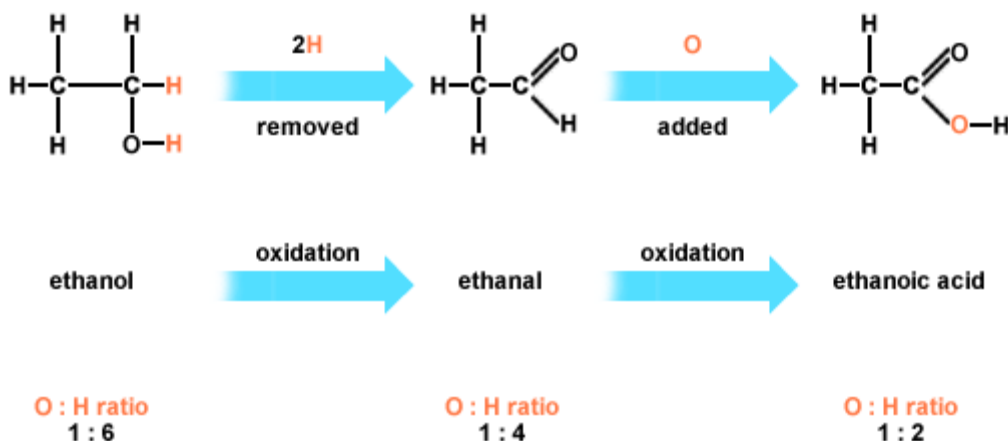
Η ζύμωση της αιθανόλης, γνωστή ως παραγωγή ξυδιού, μέσω AAB επιτυγχάνεται με δύο διαδοχικές καταλυτικές αντιδράσεις, αυτή της συνδεδεμένης στη κυτταροπλασματική μεμβράνη αφυδρογονάσης αλκοόλης, η οποία είναι εξαρτώμενη από μία πυροκινολίνη κινόννη (pyrroquinoline quinonedependent alcohol dehydrogenase (PQQ-ADH)) και αυτή της αφυδρογονάσης αλδεϋδης (ALDH). Οι ADH και ALDH εντοπίζονται στην περιπλασματική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και η λειτουργία τους είναι συνδεδεμένη με την αναπνευστική αλυσίδα. Η PQQ-ADH είναι ένα συγκρότημα μίας κινοπρωτεΐνης και ενός κυτοχρώματος c, που δεσμεύεται στη περιπλασματική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και καταλύει το πρώτο στάδιο της παραγωγής οξικού οξέος, την οξείδωση της αιθανόλης, μεταφέροντας ηλεκτρόνια σε μεμβρανώδη ουβικινόνη (Q). Η PQQ-ADH λειτουργεί ως η πρωτεύουσα αφυδρογονάση στην αναπνευστική αλυσίδα οξείδωσης της αιθανόλης. Οι αντιδράσεις οξείδωσης γίνονται στον περιπλασματικό χώρο. Οι δεσμευμένες στη μεμβράνη αφυδρογονάσες περιέχουν είτε PQQ ή ομοιοπολικά δεσμευμένο δινοκλεοτίδιο φλαβίνης αδενίνης (FAD) ως συνένζυμο και άμεσα ζευγάρι στην αναπνευστική αλυσίδα των οργανισμών, αποδίδοντας βιοενέργεια κατά την οξείδωση του υποστρώματος (Adachi, Moonmangmee, Shinagawa, et al., 2003; M. Gullo & Giudici, 2008).



ΕΙΚΟΝΑ 8: Επισκόπηση της αναπνευστικής αλυσίδας οξειδωσης της αιθανόλης από AAB. Αιθανόλη οξειδώνεται προς οξικό οξύ μέσω διαδοχικών δράσεων της PQQ-ADH και της αφυδρογονάσης αλδεϋδης, η οποία είναι δεσμευμένη στη μεμβράνη (ALDH), μειώνοντας την Q στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στη συνέχεια, η αναπνευστική αλυσίδα διακλαδίζεται στο κυτόχρωμα οξειδάσης ουβοκινόλης bo_3 και στην οξειδάση CyoAB. Το χοντρό διπλό βέλος υποδεικνύει μια πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ PQQ-ADH και CyoAB.

Πηγή: (Yakushi & Matsushita, 2010)

Η PQQ-ADH αποτελείται από τις υπομονάδες I, II και III. Και οι τρεις υπομονάδες συναντώνται στα γένη *Acetobacter*, *Gluconobacter* και *Acidomonas*, ενώ στα είδη του γένους *Gluconacetobacter* αποτελείται μόνο από τις υπομονάδες I και II. Η υπομονάδα I κωδικοποιείται στο γονίδιο *adhA*, είναι περίπου 80 kDa σε μοριακό μέγεθος και περιέχει PQQ και μία αίμη c ως προσθετική ομάδα. Αυτή η υπομονάδα λειτουργεί ως καταλυτική θέση για την οξείδωση της αιθανόλης. Η υπομονάδα II κωδικοποιείται στο γονίδιο *adhB*, είναι περίπου 50 kDa σε μοριακό μέγεθος και περιέχει τρεις ομάδες αίμης c και, πιθανώς, μία Q, η οποία είναι στενά συνδεδεμένη με πρωτεΐνη. Η δεσμευμένη Q λειτουργεί ως ο ενδιάμεσος φορέας της οξειδοαναγωγής, ο φυσιολογικός αποδέκτης ηλεκτρονίων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το συγκρότημα PQQ-ADH μπορεί να διαχωριστεί εν μέρει σε ένα συγκρότημα υπομονάδων I/III και μία υπομονάδα II. Το συγκρότημα υπομονάδων I/III έχει αιθανόλη: δραστηριότητα οξειδοαναγωγής φερρικυανιδίου, αλλά δεν έχει αιθανόλη: Q-1 (τεχνητό ανάλογο της Q). Η υπομονάδα II δεν έχει καμία δραστηριότητα ADH. Το συγκρότημα υπομονάδων I/III όταν ανασυσταθεί με την υπομονάδα II, το ανασυσταθέν σύμπλοκο PQQ-ADH επανακτά την δραστηριότητα της αναγωγής Q-1, καθώς και την δραστηριότητα της αναγωγής του φερρικυανιδίου. Έτσι, συμπεραίνεται ότι πιθανώς η υπομονάδα II είναι υπεύθυνη για την μείωση της Q. Η υπομονάδα III κωδικοποιείται στο γονίδιο *adhS*, είναι περίπου 15 kDa σε μοριακό μέγεθος και έχει προταθεί από βιοχημικά πειράματα ότι δεν έχει καμία προσθετική ομάδα, που σχετίζεται με την αντίδραση της οξειδοαναγωγής (Yakushi & Matsushita, 2010).



EIKONA 9: Οξείδωση αιθανόλης προς σχηματισμό οξικού οξέος

Πηγή: http://www.bbc.co.uk/bitesize/higher/chemistry/carbon/reaction_carbon/revision/2/

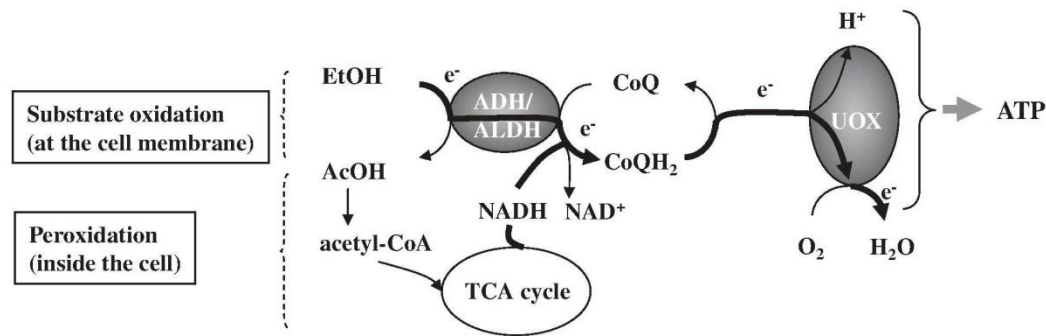
Συνοπτικά, λοιπόν η αλκοόλη αφυδρογονώνεται προς σχηματισμό ακεταλδεΐδης, δύο ιόντων υδρογόνου και απελευθέρωση δύο ηλεκτρονίων. Στη συνέχεια, τα δύο ιόντα υδρογόνου συνδέονται με οξυγόνο προς σχηματισμό νερού, το οποίο ενυδατώνει την ακεταλδεΐδη σχηματίζοντας, τελικά, αλδεΐδη. Η έλλειψη οξυγόνου καθιστά αδύνατη την ενυδάτωση της ακεταλδεΐδης, πράγμα το οποίο γίνεται αντιληπτό με την ανάδειξη της χαρακτηριστικής οσμής της ακεταλδεΐδης. Στο τελικό στάδιο, μία αφυδρογονάση αλδεΐδης μετατρέπει την ακεταλδεΐδη σε οξικό οξύ απελευθερώνοντας δύο ιόντα υδρογόνου και δύο ηλεκτρόνια.

Θεωρητικά, 1 g αλκοόλης αποδίδει 1.3 g οξικού οξέος. Ωστόσο, πρακτικά, η απόδοση είναι 15-20 % μικρότερη, διότι η αλκοόλη, η ακεταλδεΐδη και το οξικό οξύ εξατμίζονται. Το θεωρητικό ποσό του αέρα που απαιτείται για 1 L ζύδι που περιέχει 6 % οξικό οξύ είναι περίπου 120 L. Στην πράξη όμως, απαιτείται μεγαλύτερο ποσό αέρα, καθώς ο ρυθμός ανταλλαγής υγρού-αερίου είναι αργός (Plessi, 2003).

Ταυτόχρονα, η οξική ζύμωση συνοδεύεται από δευτερογενείς ζυμώσεις, οι οποίες συμμετέχουν στην παραγωγή του χαρακτηριστικού αρώματος και της χαρακτηριστικής γεύσης του ζυδιού. Κατά την αντίδραση της οξικής ζύμωσης σχηματίζονται πτητικά συστατικά σε μικρές ποσότητες (αιθάνιο, ακεταλδεΐδη, μυρμιγκικό οξύ, οξικό αιθύλιο, οξικό ισοπεντάνιο, βουτανόλη, μεθυλοβουτανόλη, 3-υδρόξυ-2 βουτάνιο ή ακετυλομεθυλοανθρακας), τα οποία ποικίλουν ανάλογα με το ζύδι και την πρώτη ύλη, η οποία διαθέτει μοναδικά και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, τα οποία οφείλονται για τη χαρακτηριστική οσμή, γεύση, χρώμα και άλλες ιδιότητες του τελικού προϊόντος.

Η ζύμωση σταματά, συνήθως, σε ένα ελάχιστο ποσοστό εναπομένουσας αλκοόλης, προκειμένου να αποφευχθεί η υπεροξείδωση και η οξείδωση του οξικού οξέος σε νερό και CO₂ (Plessi, 2003). Το φαινόμενο αυτό συναντάται στα είδη *Acetobacter* και *Gluconoacetobacter*. Η υπεροξείδωση του οξικού οξέος σε CO₂ και H₂O είναι αδύνατη στα μέλη του γένους *Gluconobacter*, διότι δεν έχουν την διακλάδωση του γλυοξυλικού οξέος και ο κύκλος TCA είναι ατελής (Greenfield & Claus, 1972; Prust

et al., 2005). Ως εκ τούτου, δεν διαθέτουν την ικανότητα να οξειδώσουν πλήρως το οξικό ή το γαλακτικό οξύ σε CO_2 (M. Gullo & Giudici, 2008). Τα είδη *Acetobacter* και *Gluconacetobacter* μπορούν να παράγουν ATP με οξείδωση αιθανόλης σε οξικό οξύ στην κυτταρική μεμβράνη, και επιπλέον μπορεί να μεταβολίσουν το οξικό οξύ με υπεροξείδωση για την παραγωγή ATP μέσω του κύκλου TCA (Hommel, 2014).



ΕΙΚΟΝΑ 10: Οξείδωση υποστρώματος στην κυτταρική μεμβράνη και υπεροξείδωση μέσα στο κυττάρο
 ADH: αλκοολική αφυδρογονάση, ALDH: αφυδρογονάση ακετοαλδεύδης, UOX: ουβικινόλης οξειδάση
 Τα βέλη δείχνουν τη διαδρομή της μεταφοράς ηλεκτρονίων
 Πηγή: (Okamoto-Kainuma et al., 2008)

Τα είδη *Acetobacter* και *Gluconacetobacter* παρουσιάζουν τρεις φάσεις ανάπτυξης σε μέσο αιθανόλης. Από είδος σε είδος παρατηρούνται κάποιες παραλλαγές στη φάση ανάπτυξης, ωστόσο, γενικά ισχύουν τα εξής:

Φάση οξείδωσης αιθανόλης: Εκτελείται από τα AAB μία ταχεία οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ, το οποίο απελευθερώνεται από το περίπλασμα.

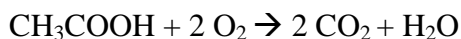
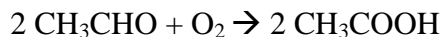
Στατική φάση: Ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων μειώνεται ή παρατηρούνται χαμηλές αποδόσεις της ανάπτυξής τους.

Φάση οξικής οξείδωσης: Αποτελεί μία δεύτερη εκθετική φάση, όπου το οξικό οξύ καταβολίζεται από διαλυτά ADH και ALDH στο κυτταρόπλασμα, τόσο για την παραγωγή ενέργειας όσο και για την αφομοίωση άνθρακα.

Κατά την διάρκεια της οξείδωσης αιθανόλης και της στατικής φάσης συσσωρεύεται οξικό οξύ στο περιβάλλον, ενώ κατά την οξειδωτική φάση τα AAB οξειδώνουν οξικό οξύ προς CO_2 και H_2O (Matsushita K et al., 2004). Η μετάβαση από την συσσώρευση οξικού στην οξική οξείδωση ελέγχεται από τις αλλαγές στη μεταβολική ροή μέσω του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος (Sakurai et al., 2012).

Η πρόληψη της υπεροξείδωσης του οξικού οξέος σε CO_2 και H_2O απαιτεί συνεχή υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης. Η έλλειψη αιθανόλης και οξυγόνου καταστρέφει τον πληθυσμό των AAB. Ακόμα και η χρήση καθαρού οξυγόνου ή αέρα εμπλουτισμένου με αέρα βλάπτει την διαδικασία (Hommel, 2014).

Συνοπτικά, ανάλογα με τις συνθήκες αερισμού και ανάπτυξης των AAB πραγματοποιούνται οι εξής αντιδράσεις:

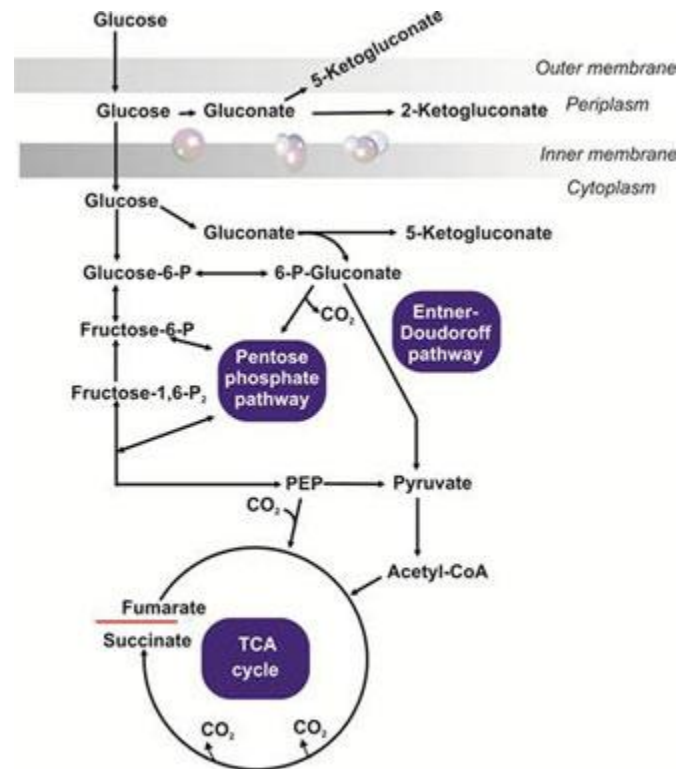


3.4.2 Μεταβολισμός γλυκόζης από είδη *Gluconobacter*

Η γλυκόζη προτιμάται ως πηγή άνθρακα για τα είδη του γένους *Gluconobacter*, λόγω της ικανότητάς τους να αποκτούν ενέργεια πιο αποτελεσματικά από το μεταβολισμό των σακχάρων μέσω του μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης. Η κυτταροπλασματική χρησιμοποίηση των σακχάρων από το υποχρεωτικά αερόβιο βακτήριο *G. oxydans* περιορίζεται σε δύο μεταβολικά μονοπάτια, το μονοπάτι Entner-Doudoroff (EDP) και το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης (PPP). Λόγω έλλειψης ενός γονιδίου για μία φωσφοφρουκτοκινάση απενεργοποιείται το μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas (κύκλος γλυκόλυσης) και απουσία ηλεκτρυλό-CoA συνθετάσης και ηλεκτρικής δεϋδρογονάσης εμποδίζεται η κυκλική λειτουργία του TCA. Το ένα μονοπάτι λειτουργεί μέσα στο κύτταρο (οξειδωση μέσω του μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης) και το άλλο έξω από το κύτταρο και περιλαμβάνει το σχηματισμό γλουκονικού και κετογλουκονικού οξέος (Kulka & Walker, 1954; Olijve & Kok, 1979). Το πρώτο μονοπάτι φέρει εξαρτώμενη αφυδρογονάση γλυκόζης NADP⁺ και το δεύτερο εκτελείται από ανεξάρτητη αφυδρογονάση γλυκόζης NADP⁺ και καλείται «μονοπάτι άμεσης οξειδωσης γλυκόζης» (Kitos et al., 1958). Το μονοπάτι άμεσης οξειδωσης γλυκόζης λειτουργεί μόνο υπό την παρουσία συγκέντρωσης γλυκόζης > 15 mM στο μέσο καλλιέργειας (Weenk, Olijve, & Harder, 1984).

Η οξειδωση των σακχάρων πραγματοποιείται κυρίως στο περίπλασμα από την αναπνευστική αλυσίδα, η οποία συνδέεται με αφυδρογονάσες συνδεδεμένες στην μεμβράνη, προς σχηματισμό των 2-κετογλουκονικού και 2,5-δικετογλουκονικού οξέος με ενδιάμεσο σχηματισμό γλουκονικού οξέος.

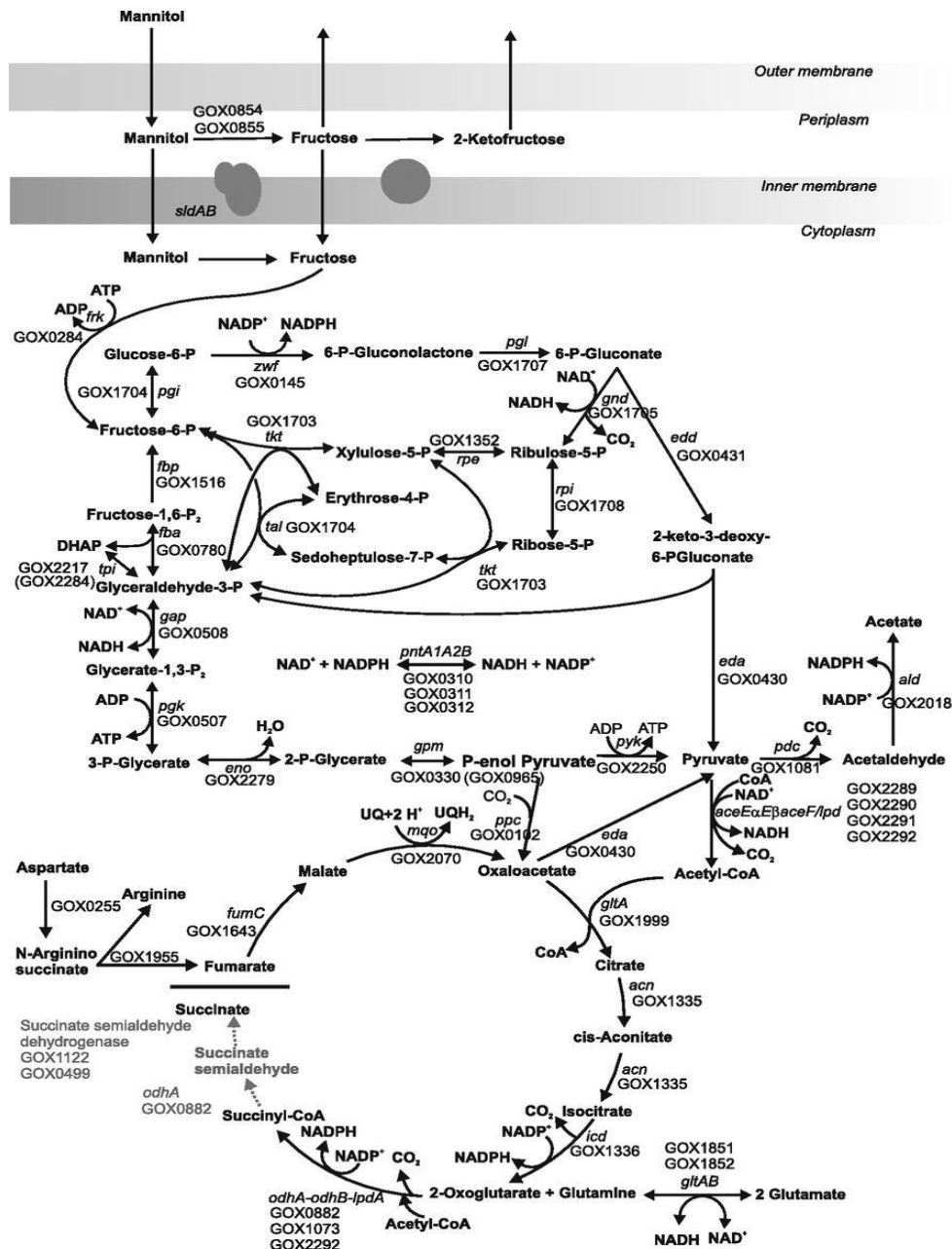
Λίγα είδη έχουν την ικανότητα ανάπτυξης σε αυξημένη συγκέντρωση σακχάρων (π.χ. το βακτήριο *Gluconacetobacter diazotrophicus* μπορεί να αναπτυχθεί σε περιβάλλον με 30% D-γλυκόζη (Sengun Ikin Yucel & Seniz, 2011).



ΕΙΚΟΝΑ 11: Κεντρικός μεταβολισμός γλυκόζης στο βακτήριο *G. oxydans*

Πηγή: http://www.fz-juelich.de/ibg/ibg-1/EN/Research/SystemicMicrobiology/physio/physio_research.html

Η ανάπτυξη σε γλυκόζη και μαννιτόλη είναι διφασική με μία πρώτη φάση γρήγορης ανάπτυξης και μία δεύτερη φάση αργής, γραμμικής ανάπτυξης. Ως συνέπεια των περιορισμών για την κυτταροπλασματική αποικοδόμηση των σακχάρων, το βακτήριο *G. oxydans* εμφανίζει χαμηλή απόδοση ανάπτυξης. Ένας τρόπος βελτίωσης της χαμηλής απόδοσης ανάπτυξης αφορά την κατασκευή μεταλλάξεων, μέσω των οποίων διαγράφονται τα γονίδια, που κωδικοποιούν την αφυδρογονάση της γλυκόζης, που είναι συνδεδεμένη στην μεμβράνη και την κυτταροπλασματική αφυδρογονάση γλυκόζης. Οι (Krajewski V et al., 2010) αναφέρουν ότι με τον τρόπο αυτό η ανάπτυξη βελτιώνεται κατά 271 %, ενώ ο ρυθμός ανάπτυξης κατά 78 % συγκριτικά με το γονικό στέλεχος (Krajewski V et al., 2010).



ΕΙΚΟΝΑ 12: Κεντρικός μεταβολισμός μαννιτόλης στο βακτήριο *G. oxydans*
 Ένζυμα και γονίδια σε γκρι χρώμα θα μπορούσε, ενδεχομένως, εκπληρώσουν τις λειτουργίες που απεικονίζονται.

Η μαννιτόλη αποτελεί μία από τις προτιμώμενες πηγές άνθρακα του *G. oxydans*. Στην πρώτη φάση ανάπτυξης, η ανάπτυξη του βακτηρίου είναι γρήγορη και το μεγαλύτερο μέρος της μαννιτόλης οξειδώνεται γρήγορα στο περιπλασμα σε φρουκτόζη από την πολυολό-αφυδρογονάση SldAB (GOX0854 και GOX0855). Στην δεύτερη φάση ανάπτυξης, η οποία ξεκινά όταν σχεδόν όλη η μαννιτόλη μετασηματιστεί σε φρουκτόζη, η ανάπτυξη του βακτηρίου είναι πιο αργή και μέρος της φρουκτόζης οξειδώνεται περαιτέρω σε 5-κετοφρουκτόζη. Ένα μικρό μέρος μαννιτόλης δεσμεύεται από έναν μεταφορέα ABC μαννιτόλης/σορβιτόλης (GOX2182 σε GOX2185), ο οποίος περιλαμβάνει μία δεσμευτική πρωτεΐνη (GOX 2.185). Στο

κυτταρόπλασμα, η μαννιτόλη οξειδώνεται άμεσα σε φρουκτόζη και εν συνεχεία η τελευταία φωσφορυλιώνεται από μία φρουκτοκινάση (GOX 0284, Frk) σε 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία μετατρέπεται από μία ισομεράση φωσφογλυκόζης (GOX1704, PGI) σε 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία αποτελεί πρόδρομο ένωση και για τα δύο μονοπάτια PPP και EDP. Το οξικό, το οποίο συσσωρεύεται στο μέσο ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του βακτηρίου συντίθεται από πυροσταφυλικό οξύ μέσω ακεταλδεΐδης με μια αλληλουχία αντιδράσεων, που καταλύονται από πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (GOX 1081) και μία NADP-εξαρτώμενη αφυδρογονάση ακεταλδεΐδης (GOX 2018).

Διαφορά των δύο μεταβολικών μονοπατιών PPP και EDP αποτελεί η ενεργειακή απόδοση. Μετατροπή 1 mol σε 6-φωσφορική γλυκόζη μέσω του EDP αποδίδει 2 moles οξικό ή ακετυλό-CoA + 2 moles CO₂ + 4 moles NADPH + 2 moles ATP. Αντίθετα, μετατροπή 1 mol σε 6-φωσφορική γλυκόζη μέσω του PPP αποδίδει 1 mol οξικό ή ακετυλό-CoA + 4 moles CO₂ + 8 moles NADPH + 2 moles ATP. Και τα δύο μεταβολικά μονοπάτια για τον καταβολισμό σακχάρων στο βακτήριο *G. oxydans* είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του σε υπόστρωμα μαννιτόλης και εκχυλίσματος ζύμης. Ωστόσο, οι (Richhardt J., 2012) υποστηρίζουν ότι το μονοπάτι PPP είναι πιο σημαντικό από το EDP (Richhardt J., 2012).

3.5 Είδη *Gluconobacter*

Οι μικροοργανισμοί *Gluconobacter* είναι ευρέως διαδεδομένοι σε φυτά, φρούτα, σε παραγωγικές εγκαταστάσεις και σε διαφορετικά προϊόντα, τα οποία προέρχονται από φυτά ή συγκρίσιμες συνθήκες διαβίωσης. Μήλα, αμύγδαλα, μπανάνες, μάνγκο, πορτοκάλια, δαμάσκηνα, φράουλες και τομάτες μπορούν να αποτελέσουν περιβάλλον για την ανάπτυξη τους. Παράδειγμα τεχνητού περιβάλλοντος για την ανάπτυξη τους είναι η μύρα.

Οι αυστηρά αερόβιοι μικροοργανισμοί προσαρμόζονται μέσα σε φυτικό υλικό και σε σακχαρούχο και αλκοολικό διάλυμα με οξικό pH. Δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια, ενώ μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία 4 - 9 °C, αλλά όχι σε τιμές μεγαλύτερες από 38 - 40 °C. Υπό συνθήκες παραγωγής οξικού οξέος μέχρι 13.5 %, η ανάπτυξη θεωρείται ανεκτική. Τα βακτήρια *Gluconobacter* εμφανίζουν υψηλή οξειδωτική ικανότητα και κετογενικές δράσεις σε σάκχαρα, αλκοόλες, αλδεΐδες και στεροειδή. Αξιοσημείωτες οξειδωτικές ικανότητες είναι γνωστές για αλειφατικές μονοαλκοόλες, οι οποίες μετατρέπονται σε αντίστοιχες αλδεΐδες και οξέα. Υψηλά ποσοστά οξείδωσης συσχετίζονται με χαμηλές αποδόσεις ανάπτυξης, καθιστώντας έτσι τα στελέχη *Gluconobacter* κατάλληλα για βιομηχανικές εφαρμογές (Deprenmeier et al., 2002).

Οι μικροοργανισμοί *Gluconobacter* μετατρέπουν τα υποστρώματα με σειρά προτίμησης τα σάκχαρα, αλκοόλες σακχάρων, αλειφατικές αλκοόλες και αλδεΐδες. Παράδειγμα αποτελεί η οξείδωση της γλυκόζης σε γλουκονικό οξύ, το οποίο μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω σε 2-κετο-γλυκονικό οξύ, 5-κετο-γλυκονικό οξύ και 2,5-δικετο-γλυκονικό οξύ (Hölscher et al., 2006). Προτιμώμενες πηγές άνθρακα για την ανάπτυξη τους είναι η d-μανιτόλη, η σορβιτόλη, η γλυκερόλη, η d-φρουκτόζη και η

d-γλυκόζη. Η αιθανόλη δεν αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα ανάπτυξης, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετη πηγή άνθρακα.

Το είδος *G. oxydans* είναι γνωστό για την ατελή οξειδωση ενός ευρύ φάσματος υδατανθράκων και αλκοολών. Τα αντίστοιχα προϊόντα (αλδεΐδες, κετόνες και οργανικά οξέα) εκκρίνονται σχεδόν πλήρως εντός του μέσου. Ο οργανισμός είναι ικανός να αναπτυχθεί σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων και σε χαμηλές τιμές pH. Βακτήρια οξικού οξέος, όπως το *G. oxydans*, χρησιμοποιούνται σε πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες λόγω της ικανότητάς εκτέλεσης της ταχείας ατελής τοπο- και στερεοεκλεκτικής οξειδωσης μιας μεγάλης ποικιλίας υδατανθράκων, αλκοολών και σχετικών ενώσεων με την μεμβράνη δέσμευσης αφυδρογονασών (Zhu K. et al., 2011).

3.6 Είδη *Acetobacter*

Τα βακτήρια *Acetobacter* χρησιμοποιούνται σε διάφορες διεργασίες για την παραγωγή τροφίμων και πρόσθετα τροφίμων. Το ξύδι είναι το πιο γνωστό προϊόν που παράγεται με τη βοήθεια των *Acetobacter*. Για την οξική ζύμωση χρησιμοποιούνται μείγματα εξαιρετικά προσαρμοσμένων στελεχών *Acetobacter*, τα οποία δεν προέρχονται από καθαρές καλλιέργειες. Τα πιο σημαντικά είδη που έχουν ανιχνευθεί είναι *A. pasteurianus*, *A. lovaniensis*, *A. ascendens*, *A. paradox*, *A. aceti*, *A. xylinum* και *A. orleanensis*.

Το θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξης κυμαίνεται από 5 °C έως 42 °C, με βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας μεταξύ 25 και 30 °C. Τα στελέχη *Acetobacter* παρουσιάζουν μία μέτρια προς υψηλή ανοχή σε οξικό οξύ. Αναπτύσσονται σε pH 4 - 7, ενώ βέλτιστες τιμές pH είναι μεταξύ 5.4 και 6.3. Τα στελέχη, που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ξυδιού, είναι πιο ανθεκτικά σε χαμηλές τιμές pH. Μικρότερη τιμή pH (=2.6) έχει παρατηρηθεί στο στέλεχος *A. acidophilus*. Σε τιμές pH ≤ 5 το δυναμικό της μεμβράνης των κυττάρων αποσυνδέεται, με αποτέλεσμα την ελεύθερη ανταλλαγή πρωτονίων σε όλη την κυτταροπλασματική μεμβράνη, στερώντας, έτσι, την σύνθεση ATP από την κινητήρια δύναμη. Ωστόσο, ο σχηματισμός, οξικού οξέος ή άλλων οξέων προχωρά μέσω των αφυδρογονασών, που είναι συνδεδεμένες στην μεμβράνη. Πολλά προϊόντα μπορούν να αλλοιωθούν όταν παρέχονται οι επαρκείς προϋποθέσεις για την ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αερόβια οξοποίηση του κρασιού, από την οποία ξεκινά η παραγωγή του ξυδιού. Τα είδη *Acetobacter* βρίσκονται στο μούστο του κρασιού και στην επιφάνεια σταφυλιών. Ο σχηματισμός οξικού οξέος μπορεί να επιτευχθεί μόνο όταν είναι διαθέσιμο επαρκές οξυγόνο. Υπό αναερόβιες συνθήκες κατά την παραγωγή του κρασιού, η αλλοίωση του προς σχηματισμό ξυδιού είναι σπάνια. Η εμφάνισή του υποδεικνύεται από την αυξημένη συγκέντρωση οξικού οξέος, οξικού αιθυλεστέρα και d-γαλακτικού. Συνήθως, σε όλα τα αλκοολούχα ποτά, που περιέχουν αιθανόλη σε συγκέντρωση μικρότερη από 15 %, ο σχηματισμός οξικού οξέος είναι πιθανός. Η δράση των *Acetobacter* φανερώνεται από την αύξηση της συγκέντρωσης πτητικών και μη οργανικών οξέων και από την μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και της αιθανόλης (Hommel, 2014).

3.7 Διαχωρισμός *Acetobacter* & *Gluconobacter*

Οι μικροοργανισμοί *Gluconobacter* και *Acetobacter* αποτελούν τα πιο αντιπροσωπευτικά οξειδωτικά βακτήρια, που μπορούν να διενεργήσουν υψηλά αποτελεσματικές οξειδωτικές ζυμώσεις. Οι οξειδωτικές ζυμώσεις είναι ατελείς οξειδώσεις με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεγάλης ποσότητας αντίστοιχου προϊόντος οξείδωσης έξω από το κύτταρο (Gonzales, 2005; Sengun Ilkin Yucel & Seniz, 2011). Τα περισσότερα αερόβια βακτήρια οξειδώνουν πλήρως τις πηγές άνθρακα, που τους παρέχονται, σε νερό και CO₂. Μόνο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης μερικοί μικροοργανισμοί παρουσιάζουν το φαινόμενο της ατελούς οξείδωσης ή ‘overflow metabolism’, ιδιαίτερα σε περιβάλλον πλούσιο με θρεπτικά συστατικά. Σε αντίθεση με άλλα αερόβια βακτήρια, τα AAB οξειδώνουν ατελώς το υπόστρωμα τους, ακόμα και υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης (Deppenmeier, 2002).

Στους ακόλουθους πίνακες επισημαίνονται διαφορές των δύο γενών και των ειδών *A. pasteurianus* και *G. oxydans*:

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Διάκριση των γενών *Acetobacter* & *Gluconobacter*

	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
Κινητικότητα και μαστίγιο	Περίτριχο / μη κινητικό	Πολικό / μη
Οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό	+	+
Οξείδωση του οξικού οξέος σε	+	-
Οξείδωση του γαλακτικού σε CO ₂	+	-
Ανάπτυξη σε μέσο	+	+
Ανάπτυξη παρουσία 30% γλυκόζη	-	- /
Κετογένεση από γλυκερόλη	+ / -	+
Παραγωγή οξέος από		
Γλυκερόλη	+ / -	+
d-μαννιτόλη	+ / -	+
ραφινόζη	-	-
Τύπος ουβικονόνης	Q-9	Q-10

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Διάκριση των ειδών *A. pasteurianus* & *G. oxydans*

	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
Ανάπτυξη σε πηγές άνθρακα		
γλυκερόλη	μεταβλητό	+
αιθανόλη	μεταβλητό	+
δουλισιτόλη	-	μεταβλητό
Οξικό νάτριο	μεταβλητό	-
Σχηματισμός από d-γλυκόζη		
2-κετό-d-γλουκονικό οξύ	μεταβλητό	+
5-κετό-d-γλουκονικό οξύ	-	+
2,5-κετό-d-γλουκονικό οξύ		+
Παραγωγή οξέος από		

d-γλυκόζη	μεταβλητό	+
d-μαννόζη	-	+
d-γαλακτόζη	μεταβλητό	
l-αραβινόζη	μεταβλητό	+
d-ξυλόζη	μεταβλητό	
Κετογένεση από		
γλυκερόλη	-	+
σορβιτόλη	-	+
μαννιτόλη	-	
Αναγωγή νιτρικών	+	
N₂ καθήλωση		
G + C περιεχόμενο (mol %)	51.8-53	56-64

- = αρνητικό, += θετικό, μεταβλητό= 11-89% των στελεχών θετικά

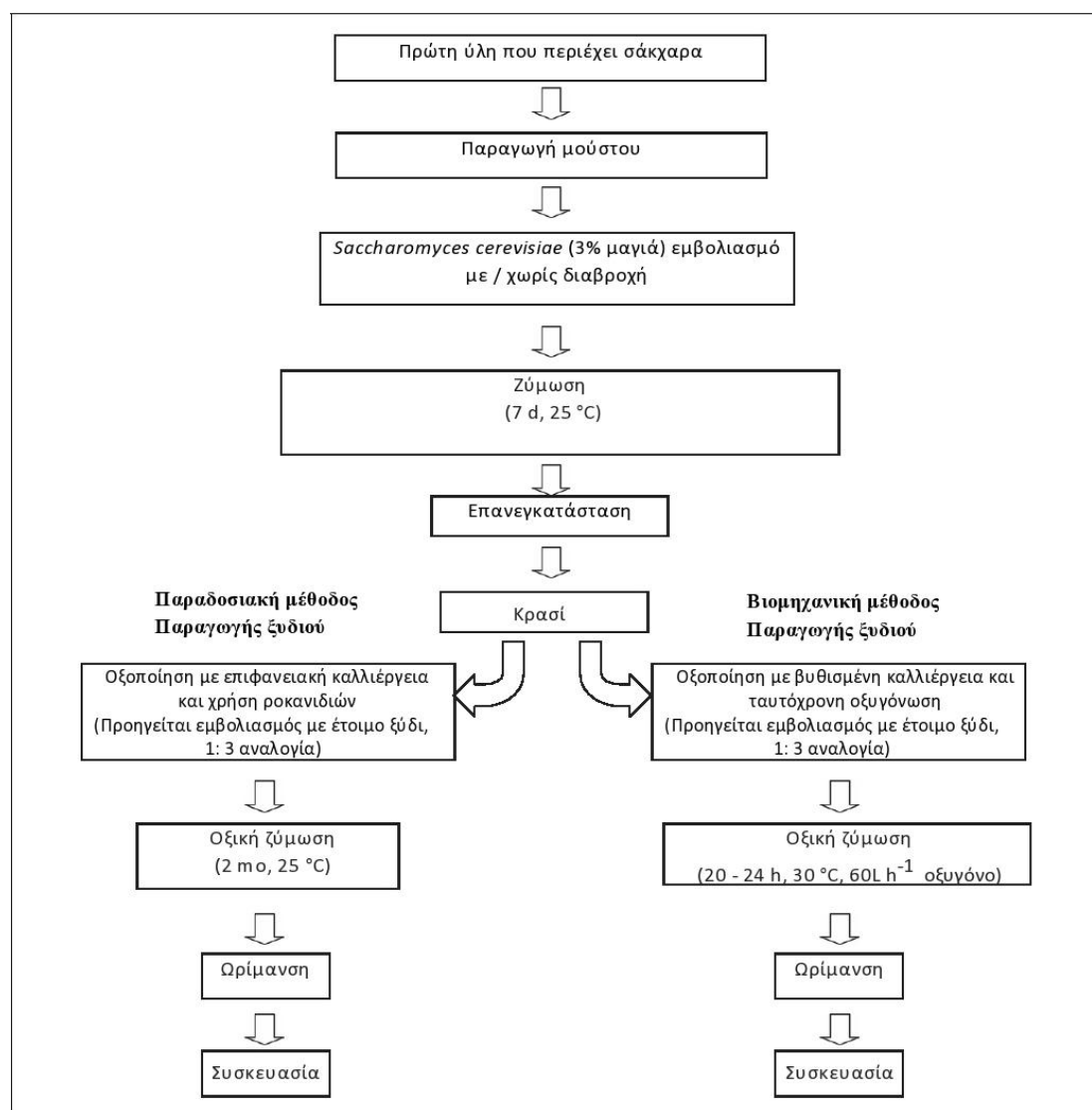
Πηγή: (Drysdale & Fleet 1988; Sokollek et al., 1998; Lisdiyanti et al., 2000; Lisdiyanti et al., 2001; Sievers & Swings 2005; Silhavy & Mandl 2006; Silva et al., 2006)

Χαρακτηριστική διαφορά των ειδών *Acetobacter* συγκριτικά με τα είδη *Gluconobacter* είναι η ικανότητά τους υπεροξείδωσης του οξικού οξέος σε CO₂ και H₂O. Επιπλέον, διαθέτουν περίτριχο μαστίγιο, ενώ δεν σχηματίζουν H₂S και διαθέτουν συγκεκριμένο τύπο ουβοκινόνης (Q-9) (Hommel, 2014). Αντίθετα, οι αυστηρά αερόβιοι χημειο-οργανοτροφικά του γένους *Gluconobacter* είτε κινούνται με πολικά μαστίγια είτε όχι και διαθέτουν Q-10. Τα βακτήρια *Gluconobacter* μπορούν να μεταβολίζουν τόσο πεντόζες, όπως την d-ξυλόζη, όσο και εξόζες, ενώ τα βακτήρια *Acetobacter* μεταβολίζουν μόνο εξόζες. Το γένος *Acetobacter* οξειδώνει την αλκοόλη, κατά προτίμηση, ενώ το γένος *Gluconobacter* οξειδώνει κυρίως γλυκόζη πιο εύκολα παρά την αιθανόλη (Yamada & Yukphan, 2008). Εκτός από αλκοόλες και αλδεΐδες, τα βακτήρια οξικού οξέος είναι σε θέση να οξειδώνουν διάφορα σάκχαρα και αλκοόλες σακχάρων, όπως είναι η d-γλυκόζη, η γλυκερόλη και η d-σορβιτόλη. Είδη *Gluconobacter* καταλύουν εξαιρετικά δραστηρές αντιδράσεις οξείδωσης για την αιθανόλη ή d-γλυκόζης, συμπεριλαμβανομένων επίσης οξειδωτικές αντιδράσεις σε σάκχαρα όπως d-γλυκονικό οξύ, d-σορβιτόλη, και γλυκερόλη. Αντίθετα, τα είδη *Acetobacter* έχουν ένα πολύ δραστικό σύστημα οξείδωσης αιθανόλης, αλλά όχι ένζυμα για την οξείδωση σακχάρων (Adachi, Moonmangmee, Shinagawa, et al., 2003; M. Gullo & Giudici, 2008). Τα είδη *Gluconobacter* είναι λιγότερα ανεκτικά στην παρουσία αιθανόλης και οξικού οξέος από τα στελέχη του γένους *Acetobacter*. Συγκριτικά με στελέχη *Acetobacter*, η οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ είναι χαμηλότερη, ενώ οξειδωτικές και κετογενικές δράσεις παρουσιάζονται στα στελέχη *Gluconobacter* (M. Gullo & Giudici, 2008). Κετογένεση καλείται η οξείδωση δευτερογενών αλκοολών προς κετόνες σε μία διαδικασία.

Για την παραγωγή ξυδιού χρησιμοποιούνται, όπως προαναφέρθηκε, διάφορα είδη AAB. Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα στελέχη *A. pasteurianus* και *G. oxydans*. Η επιλογή των στελεχών αυτών στηρίχθηκε κυρίως στην προτίμηση της αιθανόλης ως πηγή άνθρακα από το πρώτο και των σακχάρων από το δεύτερο.

4 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΞΥΔΙΟΥ

Οι μέθοδοι παραγωγής ξυδιού εκτείνονται από τη παραδοσιακή μέθοδο, που χρησιμοποιεί ξύλινα βαρέλια (Orleans Process), την επιφανειακή καλλιέργεια (Generator Process) έως τη βυθισμένη ζύμωση (Submerged Fermentation) (Morales et al., 2001).



ΕΙΚΟΝΑ 13: Γενικές αρχές για την παραγωγή ξυδιού

Πηγή: (Budak et al., 2014)

Το ξύδι είναι ένα σημαντικό συστατικό σε πολλά τρόφιμα προϊόντα. Η ανάγκη για μεγάλες ποσότητες ξυδιού απαιτεί βιομηχανικά συστήματα ζύμωσης, που είναι ικανά

να παράγουν όγκους, που ελέγχονται αξιόπιστα (De Ory et al., 1999). Πολλές τεχνικές συσκευές έχουν αναπτυχθεί για τη βελτίωση της βιομηχανικής παραγωγή ξυδιού. Γενικά, οι εν λόγω βελτιώσεις αυξάνουν την ταχύτητα του μετασχηματισμού αιθανόλης σε οξικό οξύ με την παρουσία των βακτηρίων οξικού οξέος (Tesfaye et al., 2002). Η παρασκευή ξυδιού συνιστάται στο να επιτευχθούν οι ευνοϊκότερες συνθήκες για την ανάπτυξη των AAB. Σκοπός των συστημάτων παραγωγής ξυδιού είναι:

1. Η παροχή επαρκούς ποσότητας αέρα, προκειμένου η οξείδωση της αλκοόλης να οδηγεί στον σχηματισμό οξικού οξέος και όχι αλδεϋδης ή CO₂.
2. Η επίτευξη κατάλληλης θερμοκρασίας ανάλογα με το είδος των AAB που χρησιμοποιείται.
3. Η αποφυγή μεγάλης απώλειας αλκοόλης ή/και παραγόμενου οξικού οξέος (λόγω πτητικότητάς τους).

Σημειώνεται ότι ανάλογα με την πρώτη ύλη, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή οξικού οξέος, μπορεί να απαιτηθεί η προσθήκη μικρής ποσότητας αζωτούχων ή φωσφορικών αλάτων ως πηγή αζώτου και φωσφόρου, αντίστοιχα, για την ανάπτυξη των AAB.

Η παραγωγή οξικού οξέος από ζυμωμένα σακχαρούχα διαλύματα, παραδείγματος χάριν κρασί, και οινόπνευμα είναι δυνατή με τις εξής μεθόδους:

4.1 Μέθοδος Ορλεάνης

Η μέθοδος αυτή αποτελεί την παραδοσιακή μέθοδο για την παρασκευή ξυδιού, κατά την οποία η οξοποίηση του οίνου γίνεται αργά. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται στην Γαλλία από το 1960 και ονομάζεται «Γαλλική Μέθοδος» ή «Μέθοδος Ορλεάνης». Σε αυτή τη διαδικασία, διαλύματα αλκοόλης λιγότερο από 5 % δεν μπορούν να οξοποιηθούν εύκολα και απαιτείται η προσθήκη φωσφορικών και αζωτούχων ουσιών, ενώ το προϊόν της οξικής ζύμωσης πρέπει να φέρει την ονομασία «ξύδι από οινόπνευμα». Η διαδικασία της Ορλεάνης ήταν η μόνη μέθοδος για την παραγωγή ξυδιού αποκλειστικά από κρασί (Mitchell, 1916), ενώ έχει αναφερθεί ότι είναι η καλύτερη μέθοδος για να παραχθεί υψηλής ποιότητας ξύδι (Hickey & Vaughn, 1954). Σε αυτή τη διαδικασία, ξύλινα βαρέλια πληρώνονται με το αλκοολούχο διάλυμα προς ζύμωση μέχρι τα $\frac{3}{4}$ του όγκου τους.



ΕΙΚΟΝΑ 14: Βαρέλι μεθόδου Ορλεάνης

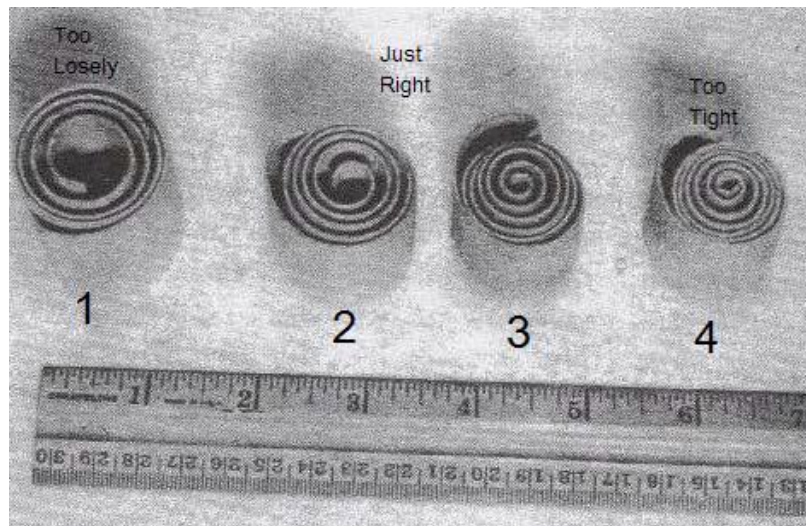
Πηγή: (Cruess, 1958)

Οπές ανοίγονται στο βαρέλι μερικές ίντσες άνωθεν της επιφάνειας του υγρού. Οι οπές, οι οποίες απομένουν ανοιχτές, καλύπτονται με ένα λεπτό φιλμ υφάσματος.

Δεύτερον, περίπου το 20-25% φρέσκου ξυδιού προστίθεται στο βαρέλι. Η προσθήκη του φρέσκου ξυδιού συμβάλει στην οξοποίηση του υγρού, μέχρι την παραγωγή οξικού οξέος βέλτιστης συγκέντρωσης για την ανάπτυξη των AAB (Cruess, 1958). Τα AAB σχηματίζουν ένα ζελατινώδες λεπτό στρώμα στην επιφάνεια του υγρού. Το αλκοολούχο διάλυμα ζυμώνεται για χρονικό διάστημα 1-3 μήνες σε θερμοκρασία 20-30 °C. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, απομακρύνεται το 1/4 ή το 1/3 του παραγόμενου ξυδιού και προστίθεται ισοδύναμη ποσότητα αλκοολικού διαλύματος (Cruess, 1958). Αλκοολούχο διάλυμα πρέπει να προστίθεται συνεχώς, προκειμένου το οξικό οξύ να μην οξειδωθεί σε CO₂ και H₂O (Cruess, 1958). Κάτω από ομαλές συνθήκες η διεργασία αυτή μπορεί να επαναλαμβάνεται για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς διακοπή, η οποία όμως καθίσταται αναγκαία μόνο όταν το δοχείο γεμίσει με υποστάθμη και πρέπει να καθαριστεί (Mas et al., 2014).

4.2 Γερμανική μέθοδος (Generator Process)

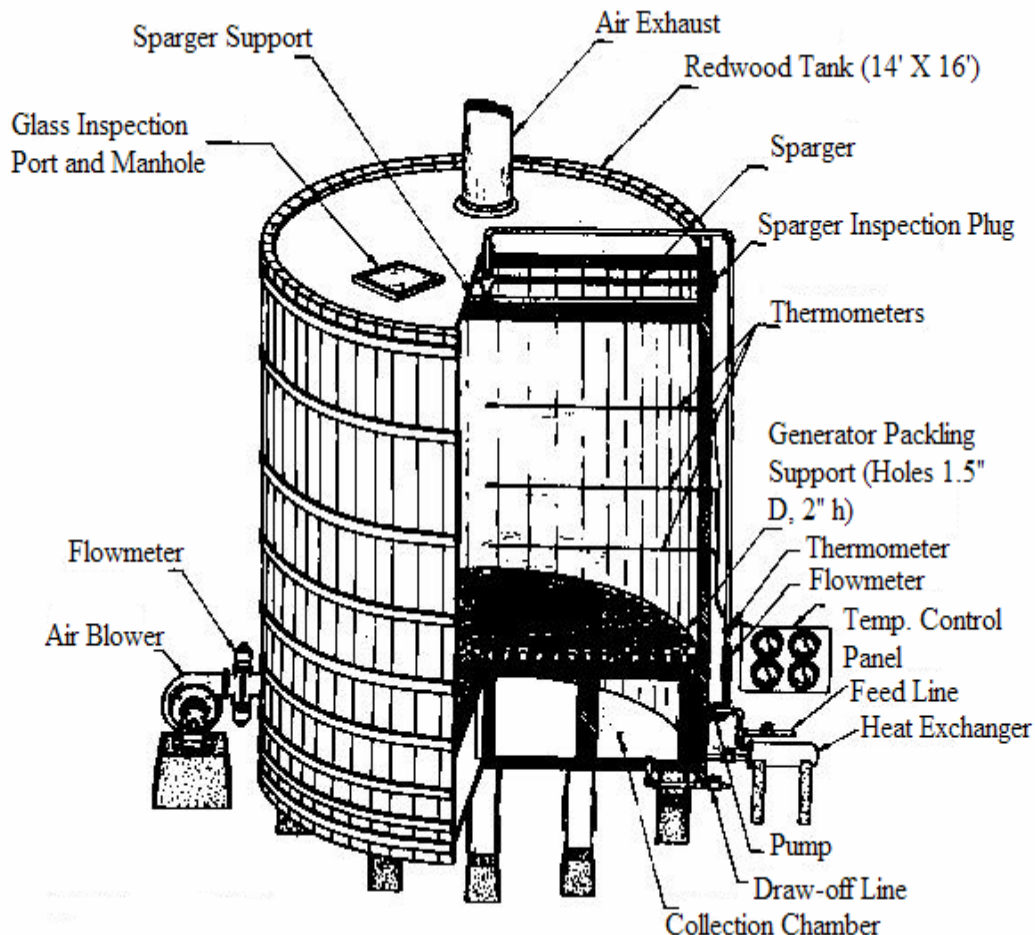
Από το 1832 άρχισε να εφαρμόζεται η ταχεία μέθοδος οξοποίησης, η οποία ανεπτύχθη από τον Γερμανό χημικό Schützenbach και συνίσταται στην αύξηση της επιφάνειας επαφής αλκοόλης – βακτηρίων και αέρος, η οποία επιτυγχάνεται με την χρήση ροκανιδιών οξιάς ή κωκ, τα οποία εισάγονται στο δοχείο, όπου πραγματώνεται η οξοποίηση. Τα ροκανίδια κατασκευάζονται από αποξηραμένο ξύλο οξιάς και έχουν το σχήμα πηνίου μήκους 2 ιντσών και διαμέτρου 1 1/4 ιντσών. Τα βακτήρια αναπτύσσονται και σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα γύρω από τα ροκανίδια ξύλου οξιάς.



ΕΙΚΟΝΑ 15: Ροκανίδια οξιάς

Τα ξύλινα δοχεία, που χρησιμοποιούνται για την μέθοδο αυτή, είναι ύψους 2-5 m και πλάτους 1-2 m, που φέρουν δύο διάτρητους πυθμένες. Από τις οπές του διάτρητου πυθμένα, που βρίσκεται στο πάνω μέρος του δοχείου, γίνεται η τροφοδοσία του θερμοκρασίας 21 - 26 °C συνίσταται από αραιό διάλυμα αλκοόλης (6-10 %), έτοιμο ξύδι, και θρεπτικά συστατικά, εάν είναι απαραίτητα. Η είσοδος του αέρα γίνεται είτε μέσω οπών στα τοιχώματα του δοχείου είτε διαβιβάζεται από κάτω, ενώ σε κάθε περίπτωση εξέρχεται από την κορυφή του δοχείου. Η θερμοκρασία του συστήματος

ρυθμίζεται στους 30-35 °C. Για την ρύθμιση της θερμοκρασίας είναι δυνατή η χρήση εναλλακτών θερμότητας (σερπαντίνες). Χαμηλότερη θερμοκρασία δεν ευνοεί την ανάπτυξη των AAB, ενώ υψηλότερη προκαλεί σημαντική εξάτμιση της αλκοόλης και του οξικού οξέος. Επιπλέον, πρέπει να αποφεύγεται ο υπερβολικός αερισμός του συστήματος, διότι οδηγεί στον σχηματισμό αλδευδών σε ποσοστό μεγαλύτερο του κανονικά σχηματιζόμενου κατά την οξική ζύμωση.



EIKONA 16: Οξοποιητής Γερμανικής Μεθόδου

Το παραγόμενο ξύδι περιέχει 4-6 % οξικό οξύ. Η πλήρης οξειδωση της αλκοόλης πρέπει να αποφεύγεται, διότι τα AAB μπορεί να οξειδώσουν περαιτέρω ο οξικό οξύ σε CO₂ και H₂O. Για τον ίδιο λόγο, πρέπει να απουσιάζουν ζωντανά AAB από το έτοιμο ξύδι. Εάν επιθυμείται παρασκευή ισχυρότερου όξους (7-12 % οξικού οξέος) απαιτείται η προσθήκη ανάλογης προσθήκης αλκοόλης στο έτοιμο ξύδι και η διέλευση του μίγματος εκ νέου στο σύστημα οξοποίησης.

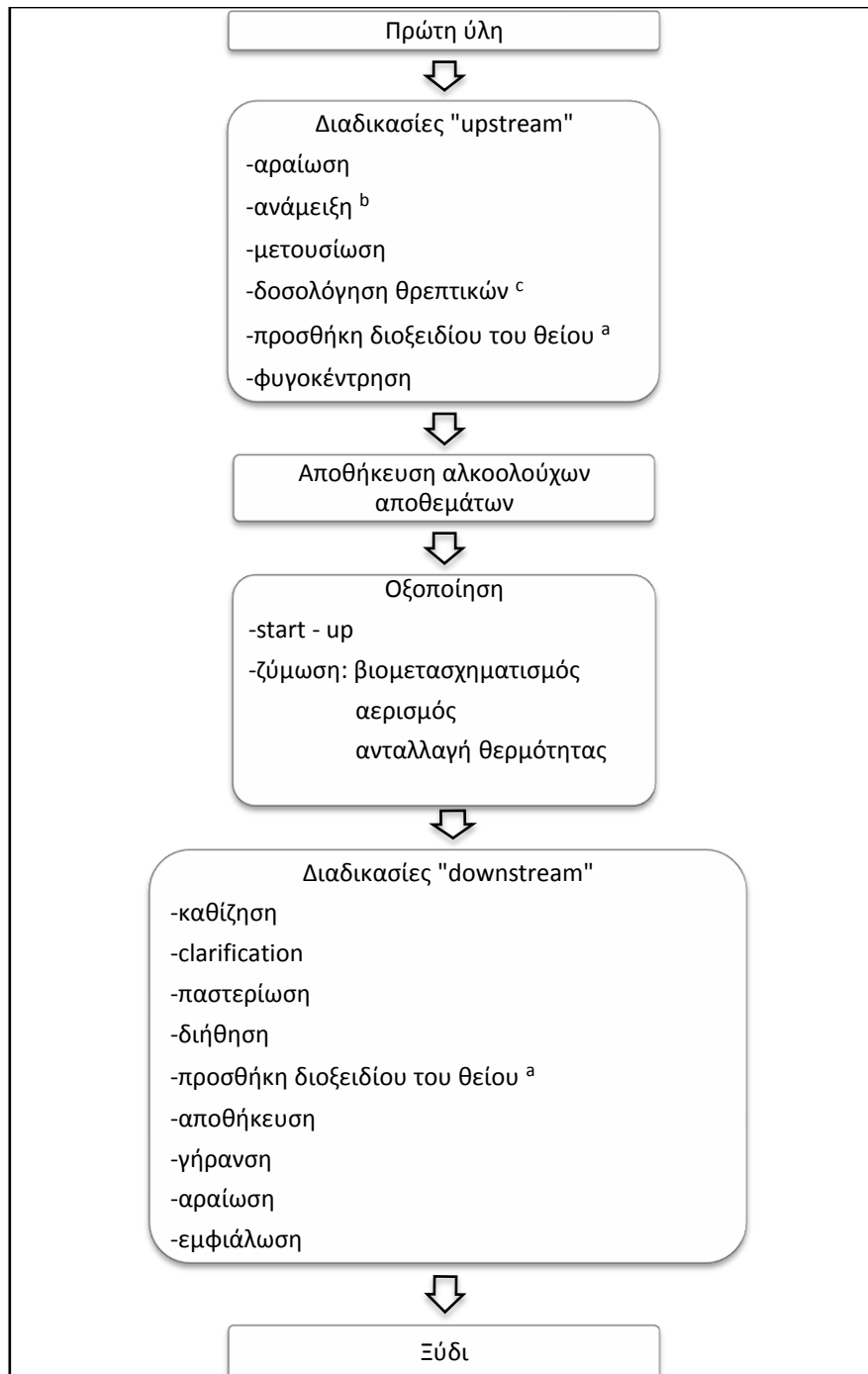
Πρόβλημα της μεθόδου αυτής αποτελεί η διάρκεια ζωής των ροκανιδιών και η αντικατάστασή τους. Κατά την παραγωγή ξυδιού από αλκοολικό διάλυμα, στο οποίο απαιτείται η προσθήκη θρεπτικών υλικών, η διάρκεια ζωής των ροκανιδιών είναι 20 - 30 χρόνια. Όμως, στην περίπτωση παραγωγής όξους από κρασί ή μηλίτη, τα ροκανίδια πρέπει να αντικαθίστανται κάθε 1 - 2 χρόνια, διότι η παρουσία άφθονων θρεπτικών συστατικών ευνοεί την ανάπτυξη μεγάλου πληθυσμού AAB πάνω στα ροκανίδια, με αποτέλεσμα αυτά να γίνονται πιο συνεκτικά και να απαιτείται πιο

ισχυρός αερισμός για να διαπεράσει την μάζα των AAB (Mas et al., 2014; Tan, 2005).

4.3 Βυθισμένη Ζύμωση (Submerged Fermentation)

Σήμερα, η πιο κοινή μέθοδος παραγωγής οξικού οξέος είναι η βυθισμένη καλλιέργεια. Σε βιομηχανική κλίμακα το ξύδι παράγεται κυρίως από ζύμωση με εμβάπτιση «submerged fermentation», μία αερόβια διαδικασία, όπου πραγματοποιείται οξείδωση αιθανόλης σε οξικό οξύ από AAB. Πρώτη ύλη μπορεί να είναι το κρασί, ο μηλίτης και οινοπνευματώδη ποτά. Η ζύμωση αυτή απαιτεί στελέχη AAB ικανά να οξειδώνουν την αιθανόλη υπό επιλεκτικές συνθήκες για την παραγωγή υψηλής οξύτητας ξυδιού.

Σκοπός της μεθόδου αυτής είναι η βελτίωση των συνθηκών ζύμωσης, όπως είναι ο αερισμός, η ανάδευση και η θερμοκρασία. Καθώς η ανάπτυξη της καλλιέργειας είναι αργή και ακριβή, ζυμωτήρες βυθισμένης καλλιέργειας χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία παραγωγής ξυδιού. Κατά την διαδικασία αυτή το μίγμα αιθανόλης, ξυδιού, νερού και θρεπτικών αναδεύεται και αερίζεται (De Ley & Swings, 1984), ενώ ο ζυμωτήρας είναι εφοδιασμένος με ένα σύστημα εναλλαγής θερμότητας για τη διατήρηση της βέλτιστης θερμοκρασίας της ζύμωσης, το οποίο αποτελείται από εσωτερική σερπαντίνα, στην οποία ρέει νερό ως ψυκτικό μέσο (De Ory et al., 1999). Τυπικά, η λειτουργία του συστήματος αυτού είναι ημι-συνεχής (Ignacio de Ory et al., 2002) και αποτελείται από διαδοχικούς ασυνεχείς κύκλους οξοποίησης. Στο τέλος κάθε κύκλου, την στιγμή, δηλαδή, όπου η αιθανόλη βρίσκεται σε έλλειψη, - σημείο που εξαρτάται από τον τύπο του ξυδιού - ένας δεδομένος όγκος οξικού οξέος αποβάλλεται και ο ζυμωτήρας πληρώνεται με νέο κρασί (De Ory et al., 2004). Η καλύτερη θερμοκρασία για βιομηχανική παραγωγή ξυδιού 11-12 % οξικού οξέος είναι 86 °F (30 °C) (Allgeier et al., 1960; Adams, 1985). Τα βακτήρια υφίστανται ζημιές σε θερμοκρασίες ανώτερες των 30 °C, ενώ η κατάστασή τους επηρεάζει την συγκέντρωση του οξικού οξέος, που παράγεται (Fregapane et al., 2001). Η χρονική διάρκεια της ζύμωσης κυμαίνεται μεταξύ 24 - 48 ώρες (Maria Gullo et al., 2014; Mas et al., 2014; Tan, 2005).



ΕΙΚΟΝΑ 17: Αναπαράσταση παραγωγής ξυδιού σε σύστημα εμβάπτισης

a: Σε συγκεντρώσεις που καθορίζονται από τη νομοθεσία, b: Ανάμειξη με ξύδι υψηλής οξύτητας, προκειμένου να εμποδιστεί η αλκοολική ζύμωση, c: Προσθήκη θρεπτικών ουσιών που περιέχουν πηγές άνθρακα, πηγές αζώτου, βιταμίνες και ανόργανα συστατικά για την παραγωγή υψηλής οξύτητας ξύδι (>12 % οξικού οξέος) από αλκοολούχα πρώτη ύλη που δεν περιέχει πηγή άνθρακα εκτός από αιθανόλη

Πηγή: (Solieri & Giudici, 2009)

Η στοιχειομετρική εξίσωση που αντιστοιχεί στην ζύμωση του οξικού οξέος είναι:



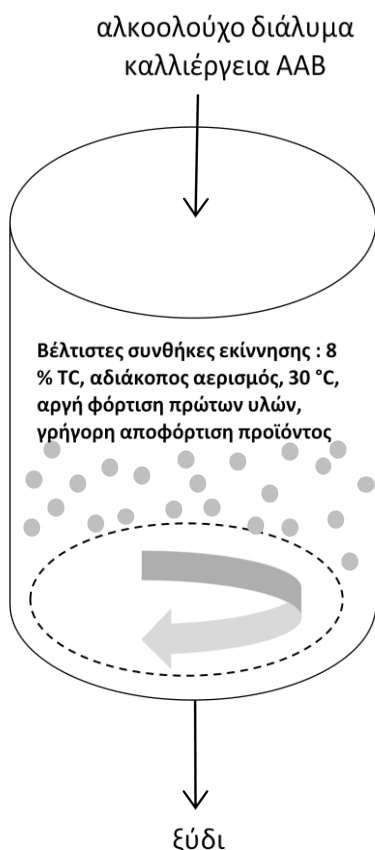
Το άθροισμα της αιθανόλης (mL/100 mL) και του οξικού οξέος (g/100 mL) καλείται ολική συγκέντρωση και εκφράζει τη μέγιστη συγκέντρωση του οξικού οξέος, που μπορεί να παραχθεί από μία πλήρη ζύμωση (Maria Gullo et al., 2014).

Οι βασικές απαιτήσεις για τα συστήματα εμβάπτισης είναι η διαθεσιμότητα κατάλληλων αλκοολούχων αποθεμάτων, ο αδιάκοπος αερισμός και στελέχη AAB με υψηλή ανοχή σε οξικό οξύ και αιθανόλη, μικρή ευαισθησία σε μολύνσεις και μικρές απαιτήσεις σε θρεπτικές ουσίες, ώστε να παράγουν υψηλές ποσότητες οξικού οξέος (Reed, 2008).

Η ζύμωση του οξικού οξέος αποτελεί μία εξώθερμη αντίδραση ($\Delta\text{H} = - 493 \text{ kJ}$), οπότε παράγεται θερμότητα κατά τη διάρκεια της SF. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια φόρτισης του βιοαντιδραστήρα με υπόστρωμα και απομάκρυνσης του προϊόντος η θερμοκρασία μπορεί να ποικίλει σε μεγάλο βαθμό. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται συστήματα ψύξης και θέρμανσης, οπότε και κατανέμεται η διακύμανση της θερμοκρασίας (Schlepütz T. et al., 2013; Solieri & Giudici, 2009).

Η διαδικασία SF, σε βιομηχανική κλίμακα, εκτελείται κυρίως ημι-συνεχώς (μία επαναλαμβανόμενη διαδικασία fed-batch). Το αλκοολούχο υπόστρωμα προστίθεται κατά διαστήματα μετά την έναρξη της οξοποίησης, ανάλογα με την κατανάλωση. Η ημι-συνεχής λειτουργία είναι η πλέον συμφέρουσα για την παραγωγή ξυδιού, διότι μειώνει τον κίνδυνο αναστολής του υποστρώματος και της καταβολικής καταστολής, επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση του υποστρώματος σε επόμενο κύκλο οξοποίησης και παράγει προϊόν ποικίλλουσας συγκέντρωσης αιθανόλης και οξικού οξέος. Ο απλούστερος τρόπος εκτέλεσης ημι-συνεχής λειτουργίας αποτελείται από δύο βιοαντιδραστήρες σε σειρά. Στην περίπτωση αυτή, ο πρώτος βιοαντιδραστήρας πληρώνεται με μαγιά, η οποία προέρχεται από προηγούμενο κύκλο οξοποίησης, και στη συνέχεια προστίθεται το αλκοολούχο υγρό (12-15 % v/v EtOH, 1-2 % w/v CH₃COOH). Όταν η περιεκτικότητα της αιθανόλης φτάνει το 2-3 % v/v, αντλείται υγρό από τον δεύτερο αντιδραστήρα, όπου και παραμένει μέχρι η αιθανόλη να εξαντληθεί (0.2-0.3 % v/v) και να επιτευχθεί η ζητούμενη περιεκτικότητα σε οξικό οξύ (Reed, 2008).

Η διάρκεια ενός κύκλου οξοποίησης κυμαίνεται μεταξύ 18 και 30 ωρών. Ο ακριβής χρόνος διάρκειας εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση αιθανόλης, την αποτελεσματικότητα του συστήματος αερισμού και τη διάρκεια της βακτηριακής φάσης υστέρησης. Για παράδειγμα, για το κρασί, η βέλτιστη επίτευξη ενός κύκλου οξοποίησης πραγματοποιείται εντός 24ώρου, με αποτέλεσμα την απόκτηση ξυδιού υψηλής συγκέντρωσης οξικού οξέος. Η οξοποίηση εντός μικρότερου χρονικού διαστήματος είναι αποδοτικότερη, αλλά η παραγόμενη περιεκτικότητα οξικού οξέος είναι μικρότερη. Από την άλλη, οξοποίηση εντός χρονικού διαστήματος μεγαλύτερο των 30 ωρών φανερώνει αστάθεια των κύκλων οξοποίησης (M. Macias, 1996).



Κύριες απαιτήσεις στελεχών AAB
 Υψηλή ανοχή σε οξικό οξύ και αιθανόλη
 Υψηλή απόδοση οξικού οξέος
 Μικρή ανάγκη σε θρεπτικά συστατικά

Επιπλέον απαιτήσεις στελεχών AAB
 Θερμοανθεκτικότητα
 Ενίσχυση γέυσης και σύστασης
 Λειτουργικές καλλιέργειες εκκίνησης
 nutraceutical ιδιότητες

ΕΙΚΟΝΑ 18: SF σε ημι-συνεχή λειτουργία για παραγωγή ξυδιού

TC: ολική συγκέντρωση (άθροισμα των συγκεντρώσεων αιθανόλης και οξικού οξέος)

4.3.1 Σημασία συστήματος αερισμού SF

Τα βακτήρια οξικού οξέος είναι υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί, οπότε στέρηση οξυγόνου κατά τη διάρκεια της SF προκαλεί ταχεία μείωση της παραγωγικότητας. Κατά τη διάρκεια της SF, το επίπεδο κατανάλωσης του οξυγόνου συνδέεται άμεσα με τη μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν και την φάση ανάπτυξης των AAB. Κατά τη φάση υστέρησης η κατανάλωση του οξυγόνου και η παραγόμενη ποσότητα οξικού οξέος είναι μικρές. Κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης η κατανάλωση του οξυγόνου είναι υψηλή και ανάλογα υψηλός είναι και ο ρυθμός παραγωγής οξικού οξέος. Σε συστήματα βυθισμένης καλλιέργειας χρησιμοποιείται περίσσεια οξυγόνου, προκειμένου να εξασφαλιστεί και να επιταχυνθεί η διαδικασία, ενώ έλλειψη οξυγόνου παρατηρείται σε επιφανειακές καλλιέργειες, διότι συνεχώς καταναλώνεται από AAB. Στέρηση οξυγόνου μπορεί να είναι επιβλαβής τόσο κατά τη διάρκεια της διεργασίας SF όσο και κατά την μεταφορά της μάζας αρχικά στον πρώτο βιοαντιδραστήρα και έπειτα από τον πρώτο σε σειρά βιοαντιδραστήρα στον δεύτερο. Στόχος, λοιπόν, αποτελεί η μείωση της φάσης θανάτου των οξικών βακτηρίων και η διατήρηση υψηλής δραστηριότητας αναπνοής κατά τα διάρκεια της ζύμωσης. Για το λόγο αυτό, προτείνεται η χρήση ενός συστήματος παρακολούθησης

της αναπνοής «RAMOS», το οποίο εξασφαλίζει σταθερή παροχή οξυγόνου (Schlepütz T, 2013).

Κατά τη διάρκεια της διεργασίας SF, το οξυγόνο παρέχεται ως ένα μίγμα αέρα με υψηλό ρυθμό ροής. Ως εναλλακτική λύση προτείνεται η διαλείπουσα χρήση πλούσιου σε οξυγόνο αέρα σε ένα χαμηλότερο ρυθμό ροής. Ωστόσο, ένα τέτοιο μίγμα αέρα δεν χρησιμοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα, λόγω του υψηλού κόστους, των θεμάτων ασφάλειας και εξοπλισμού για τη διαχείριση του οξυγόνου υψηλής πίεσης. Παρόλα αυτά, η χρήση αυτού θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξήσεις στην απόδοση της διαδικασίας, να βελτιώσει τα αισθητικά χαρακτηριστικά του ξυδιού και να μειώσει την απώλεια των πτητικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένης της αιθανόλης.

Ωστόσο, σημειώνεται ότι καθώς το οξυγόνο αποτελεί υπόστρωμα για την αντίδραση οξοποίησης, αύξηση της μερικής πίεσής του, μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της ζύμωσης του οξικού οξέος από το υπόστρωμα. Παράλληλα, υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη των AAB συμβάλλοντας σε οξειδωτικές στρες και πρωτεϊνική βλάβη των κυττάρων. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι σε περιεκτικότητα οξυγόνου μεγαλύτερη από 40 % η εκθετική αύξηση της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης συσχετίζεται με την αναστολή της ALDH (Maria Gullo et al., 2014).

Υψηλή ροή αερισμού κρίνεται ανεπιθύμητη για την βελτίωση της παραγωγής οξικού οξέος, ενώ μειώνει την απόδοση της διαδικασίας και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ξυδιού από κρασί, διότι τείνει να αφαιρεί τα πτητικά συστατικά του κρασιού, συμπεριλαμβανομένων η αιθανόλη, η οποία αποτελεί το υπόστρωμα για την αντίδραση της οξοποίησης.

Η επίδραση της μερικής πίεσής του οξυγόνου στην διαδικασία της οξοποίησης έχει μελετηθεί πραγματοποιώντας ζυμώσεις οξικού οξέος με αερισμό διαφορετικών περιεκτικότητας σε οξυγόνο. Έχει, λοιπόν, παρατηρηθεί ότι η ημι-συνεχής ζύμωση οξικού οξέος δεν είναι εφικτή παρουσία οξυγόνου περιεκτικότητας μεγαλύτερης του 40 %, ενώ όταν η περιεκτικότητά του φθάσει το 63 %, η διαδικασία διακόπτεται με πολύ μικρή παραγωγή οξικού οξέος. Επιπλέον, κατά την αύξηση της περιεκτικότητας του οξυγόνου, έχει παρατηρηθεί μία αντίστροφη σχέση μεταξύ του προφίλ ρυθμού σχηματισμού του οξικού οξέος και της ποσότητας της διαλυμένης ακεταλδεΐδης, που σχηματίζεται από τα οξικά βακτήρια (Hípolito Rubio-Fernández et al., 2004).

Βακτηριοφάγοι μπορούν να σταματήσουν πλήρως την διαδικασία της βυθισμένης ζύμωσης. Η χρήση παστεριωμένου υποστρώματος, στείρου φιλτραρισμένου αέρα και ο αυστηρός διαχωρισμός των βυθισμένων ζυμωτήρων από την μαγιά του ξυδιού χρησιμοποιούνται ως προληπτικά μέτρα για την αποφυγή των βακτηριοφάγων στον βιομηχανικό τομέα (M. Gullo & Giudici, 2008).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των βιοαντιδραστήρων, που χρησιμοποιούνται σε αυτά τα συστήματα, είναι το σύστημα αερισμού. Το σύστημα αερισμού αποτελείται από ένα κοίλο σώμα στροβίλου που υποστηρίζεται από έναν μη περιστρεφόμενο στάτορα. Η τουρμπίνα αναρροφά αέρα από τον εξωτερικό χώρο και τον απελευθερώνει σε ακτινική διεύθυνση από οπές. Δημιουργούνται έτσι φυσαλίδες αέρα, οι οποίες διασπείρονται ομοιογενώς μέσα στο υγρό. Οι φυσαλίδες αέρα ανέρχονται προς την κορυφή του βιοαντιδραστήρα με τη

βοήθεια εκτροπών. Το σύνολο της μάζας διατηρείται σταθερό, ενώ αναδύεται συνεχώς, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός περιοχών χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο, στις οποίες η μεταβολική ικανότητα των οξικών βακτηρίων μειώνεται.

Παράγοντες που επηρεάζουν την μεταφορά οξυγόνου είναι οι φυσικές ιδιότητες του προσφερόμενου αέρα και του υγρού, οι συνθήκες λειτουργίας και οι γεωμετρικές διαστάσεις του βιοαντιδραστήρα. Ταυτόχρονα, η μεταφορά του οξυγόνου εξαρτάται από την ανάδευση, η οποία διευκολύνει την διάσπαση των φυσαλίδων αέρα σε μικρότερες φυσαλίδες, την επιφανειακή τάση του διαλύματος, το ιξώδες του και το κλάσμα αέρα που διατηρείται στο εσωτερικό του αντιδραστήρα.

Λόγω της έντονης ανάδευσης δημιουργείται αφρός στο υγρό διάλυμα, γεγονός που αποτελεί πρόβλημα για την διαδικασία της οξοποίησης, καθώς μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό αναγωγικού περιβάλλοντος. Για την αποφυγή του σχηματισμού αφρού, ο βιοαντιδραστήρας εξοπλίζεται με αφροσπάστη. Η μηχανική διάταξη του αφροσπάστη περιλαμβάνει ένα περιστρεφόμενο τμήμα με φτερά που εκτείνονται ακτινικά. Όταν ο αφρός προσκρούει στην διάταξη αυτή υποβάλλεται σε φυγοκέντρωση και τα παραγόμενα αέρια απομακρύνονται από το εσωτερικό του αντιδραστήρα από άνω άνοιγμα.

4.3.2 Εκκίνηση αντιδραστήρα (Starting-up)

Η εκκίνηση της ημισυνεχούς λειτουργίας ενός οξοποιητή είναι αρκετά σημαντική για το σύνολο της παραγωγικής διεργασίας. Η εκκίνηση του αντιδραστήρα αποτελεί την διαδικασία, κατά την οποία ο αντιδραστήρας πληρώνεται σταδιακά-προοδευτικά με ένα μικρό ποσό αρχικής καλλιέργειας (μέσο με υψηλό αριθμό ζωντανών κυττάρων στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους) έως έναν τελικό όγκο. Τότε ξεκινά ο πρώτος κύκλος παραγωγής. Η επίδραση του χρόνου της εκκίνησης είναι σημαντική για το κόστος της συνολικής διεργασίας, οπότε απαιτείται έλεγχος του βήματος αυτού, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή παραγωγή. Χαρακτηριστικά, που επηρεάζουν την εκκίνηση του αντιδραστήρα και σαφέστερα την βιωσιμότητα των βακτηρίων, είναι η συγκέντρωση αιθανόλης και οξικού οξέος στο μέσο ζύμωσης. Οι διαδοχικές πληρώσεις του αντιδραστήρα επηρεάζουν την μεταβολική κατάσταση των βακτηρίων, λόγω μεταβολής συγκεντρώσεων αιθανόλης και οξικού οξέος. Σημειώνεται ότι τόσο η αιθανόλη όσο το οξικό οξύ μπορούν να δράσουν ενεργητικά ή ανασταλτικά στην βακτηριακή ανάπτυξη, γεγονός που εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις στο μέσο (Ignacio de Ory et al., 2002).

4.3.3 Επίτευξη υψηλής απόδοσης οξοποίησης

Κοινός στόχος των παραγωγών ξυδιού αποτελεί η επίτευξη υψηλής απόδοσης της διαδικασίας οξοποίησης. Αυτό σημαίνει ότι επιθυμείται υψηλή απόδοση της στοιχειομετρικής αντίδρασης, που πραγματοποιείται. Η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο, η παρουσία οξικού οξέος και αιθανόλης και η θερμοκρασία αποτελούν βασικούς παράγοντες για την επιτυχή ζύμωση. Μελέτες αναφέρουν την γενετική βελτίωση στελεχών AAB για την επίτευξη μεγαλύτερης αντίστασης σε θερμοκρασία και οξικό οξύ. Επιπλέον, έχουν υλοποιηθεί αρκετές τροποποιήσεις και βελτιστοποιήσεις των

συνθηκών της ζυμωτικής διεργασίας. Μεταξύ αυτών, αναφέρεται η τεχνολογία οξοποίησης “Frings”, η οποία αποτελεί την πιο κοινή εφαρμοζόμενη μέθοδο παραγωγής διάφορων τύπων ξυδιών, ενώ η ενεργειακή κατανάλωση ανέρχεται σε 400 W/L_{EtOH}, αρκετά μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή σε αεριζόμενο-αναδεδυμένο ζυμωτήρα, και μέγιστη στοιχειομετρική απόδοση 95 %. Βιομηχανικοί ζυμωτήρες χωρητικότητας 3600 L καθαρής αιθανόλης παράγουν οξικό οξύ μέσα σε ένα 24ωρό. Μία, επιπλέον, βελτιστοποίηση αποτελεί η τοποθέτηση ενός αλκοολογραφήματος Frings στον οξοποιητή για την αυτόματη μέτρηση της διαθέσιμης ποσότητας αιθανόλης στο υγρό μέσο.



ΕΙΚΟΝΑ 19: Οξοποιητής στην διαδικασία Βυθισμένης Ζύμωσης

Πηγή: <http://www.frings.com/>

Ταυτοχρόνως, η οξοποίηση είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ικανότητα των βακτηρίων για αλκοολική οξείδωση, η οποία καθορίζεται, κυρίως, από το καθεστώς της κυτταρικής ανάπτυξης των AAB. Σε ημι-συνεχής λειτουργία του ζυμωτήρα, η κυτταρική ανάπτυξη ρυθμίζεται με την αποφόρτιση και την φόρτιση μέσου. Για παράδειγμα, αφαιρώντας το 40-50 % του όγκου παράγεται υψηλής οξύτητας ξύδι από λίγα είδη *Gluconoacetobacter*, ενώ για είδη του γένους *Acetobacter* η μέθοδος αυτή ίσως να μην είναι κατάλληλη για το σκοπό αυτό. Επομένως, για κάθε είδος AAB χρειάζεται ο βέλτιστος όγκος για την παραγωγή της επιθυμητής ποσότητας οξικού οξέος.

Επιπλέον, η παροχή οξυγόνου, η οποία μετράται με την ταχύτητα μεταφοράς οξυγόνου (oxygen transferrate, OTR) επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη. Για την διασφάλιση ομαλής λειτουργίας της ζύμωσης, θα πρέπει η παροχή οξυγόνου να καλύπτει, τουλάχιστον, τις ανάγκες των βακτηρίων. Αύξηση του ρυθμού αερισμού επιφέρει αύξηση της μεταφοράς οξυγόνου. Ωστόσο, παράλληλα, επιταχύνεται και η εξάτμιση της αλκοόλης και του οξικού οξέος, πράγμα που μειώνει την απόδοση της ζύμωσης. Γενικά, η απώλεια αιθανόλης λόγω εξάτμισης, σε βιομηχανικές ζυμώσεις έχει ως αποτέλεσμα τη συνολική μείωση της στοιχειομετρικής απόδοσης κατά 10-30 %. Απαραίτητο είναι, λοιπόν, η εύρεση μίας ισορροπίας μεταξύ του ρυθμού αερισμού και της στοιχειομετρικής απόδοσης.

Ο μεταβολισμός των AAB ανιχνεύεται με την μέτρηση της αλλαγής της συγκέντρωσης αλκοόλης, της οξύτητας και της βιομάζας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Η στοιχειομετρική απόδοση της αντίδρασης παραγωγής οξικού οξέος από αλκοόλη δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

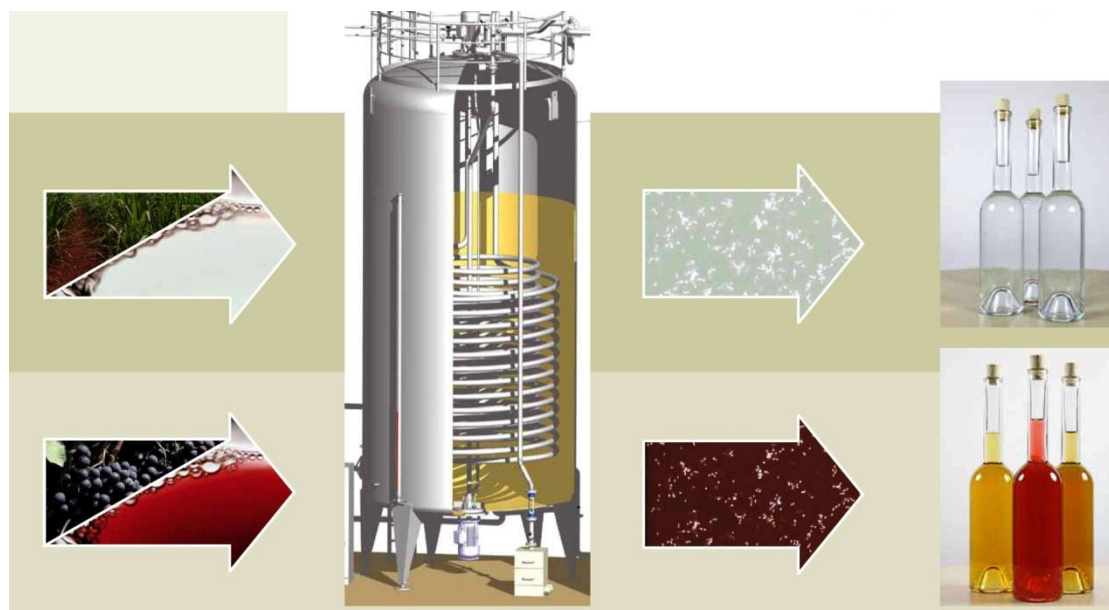
$$\text{Στοιχειομετρική απόδοση \%} = \frac{Y_{acid}}{C_{alco hol} * 1.304} * 100\%$$

όπου Y_{acid} η συγκέντρωση του οξικού οξέος στο μέσο (g/L)

$C_{alcohol}$ η συγκέντρωση της αλκοόλης, που καταναλώθηκε προς παραγωγή οξικού οξέος στο ίδιο μέσο (g/L) (Zhengliang Qi et al., 2014)

Επιπλέον, κρίσιμοι παράγοντες είναι η συγκέντρωση αιθανόλης στο τέλος κάθε κύκλου, ο όγκος που απορρίπτεται από τον ζυμωτήρα και ο ρυθμός φόρτισής του (Baena-Ruano et al., 2010; García-García et al., 2007).

Στο τέλος κάθε κύκλου οξοποίησης αποβάλλεται το 40-50 % του συνολικού όγκου, ενώ ο εναπομένον δρα ως εκκινητής για τον επόμενο κύκλο. Το νέο κρασί γνωστής συγκέντρωσης αιθανόλης και οξικού οξέος, αναφερόμενη ως συνολική συγκέντρωση (TC) συμπληρώνεται με νερό και θρεπτικά συστατικά στην έναρξη κάθε κύκλου. Απαιτείται υψηλή TC για την παραγωγή ξυδιού υψηλής περιεκτικότητας οξικού οξέος. Ωστόσο, τα AAB εμφανίζουν όριο ανοχής σε TC, οπότε η TC πρέπει να ελέγχεται στο μέσο φόρτισης (Krusong et al., 2014).



ΕΙΚΟΝΑ 20: Παραγωγή ξυδιού από οινόπνευμα και από φρούτα με οξοποίηση βυθισμένης καλλιέργειας
 Πηγή: <http://www.frings.com/>

5 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Η τελική ποιότητα του παραγόμενου ξυδιού εξαρτάται από την επιλογή της κατάλληλης μαγιάς (γενικά μικτές καλλιέργειες), την πρώτη ύλη, τη μέθοδο παραγωγής και κατά περίπτωση τη γήρανση (παλαίωση). Ο ενδεδειγμένος χαρακτηρισμός και η αξιολόγηση της ποιότητας του τελικού προϊόντος απαιτεί τον προσδιορισμό του περιεχομένου ενός αριθμού ενώσεων και την οργανοληπτική ανάλυση.

Οι αρωματικές ενώσεις έχουν καθοριστική επίδραση στην ποιότητα του ξυδιού. Το άρωμα είναι ένα σύνθετο κλάσμα, που περιέχει πολλές ενώσεις με ένα ευρύ φάσμα διακυμάνσεων, πολικότητα και συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από mg / L μέχρι ng / L. Περισσότερες από 100 διαφορετικές χημικές ενώσεις επηρεάζουν το άρωμα του ξυδιού από κρασί, συμπεριλαμβανομένων ενώσεων καρβονυλίου, αιθέρες, ακετάλες, λακτόνες, οξέα, αλκοόλες, φαινόλες, εστέρες και πτητικές, με όλες να εμπλέκονται σε διαφορετική έκταση στην τελική γεύση. Σε αναλύσεις αέριας και υγρής χρωματογραφίας ξυδιού από κρασί, εκτός από το οξικό οξύ, έχουν ταυτοποιηθεί και οι εξής ενώσεις: μεθανόλη, 1-προπανόλη, 3-μεθυλο-1-βουτανόλη, 2-μεθυλο-1-βουτανόλη, ακετοΐνη, κιτρικό οξύ, τρυγικό οξύ, μηλικό οξύ, γαλακτικό οξύ κ.α.. Κύριες, ωστόσο ενώσεις σε ξύδι από κρασί αποτελούν το οξικό οξύ και ο οξικός αιθυλεστέρας.

Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, η επαφή με το ξύλο δημιουργεί μια ουσιαστική αύξηση του αρώματος. Ωστόσο, δεν ευθύνονται όλες οι πτητικές ενώσεις για το άρωμα του προϊόντος, καθώς αυτές πρέπει να φθάσουν στους οσφρητικούς υποδοχείς και ταυτόχρονα να αλληλεπιδράσουν στο οσφρητικό επιθήλιο.

Οι πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι παρούσες σε φυτικά προϊόντα, παρουσιάζουν υψηλό ενδιαφέρον για την ποιότητα του ξυδιού, διότι έχουν αντιοξειδωτική δράση, ενώ ταυτόχρονα ευθύνονται για το χρώμα και τη στυφή γεύση του ξυδιού. Ως γνωστό, η οξοποίηση είναι μία αερόβια διαδικασία και το οξυγόνο επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των βακτηρίων. Η δραστηριότητα των πολυφαινολικών ενώσεων και του οξυγόνου σχετίζεται με την αμαύρωση των λευκών κρασιών και τις αντιδράσεις ανθοκυανών στα κόκκινα κρασιά. Επιπλέον, το ποσοστό οξοποίησης σχετίζεται με την διαλυτότητα του οξυγόνου στο μέσο, πράγμα που σχετίζεται με την σύνθεση των φαινολών.

Η διαδικασία της γήρανσης εμπλέκει τον πολυμερισμό των ενώσεων, την απελευθέρωση των ενώσεων από το ξύλο και τις απώλειες λόγω εξάτμισης κατά την πάροδο του χρόνου. Οι ουσίες που απελευθερώνονται από το ξύλο εξαρτώνται από το είδος του ξύλου, το ψήσιμο, τον λόγο της επιφάνειας επαφής προς τον όγκο υγρού και τον χρόνο γήρανσης.

Για τον οργανοληπτικό έλεγχο ξυδιού μπορούν να μελετηθούν τα εξής χαρακτηριστικά:

- ✓ Χρώμα
- ✓ Αρωματική ένταση
- ✓ Ξυλώδες άρωμα
- ✓ Ποώδης οσμή
- ✓ Φρουτώδης οσμή οξικού αιθυλεστέρα
- ✓ Άρωμα κρασιού
- ✓ Πικάντικη αίσθηση

(Mas et al., 2014; Tesfaye W. et al., 2002)

B. ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ

1 Όργανα

Στη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω εργαστηριακός εξοπλισμός:

- Φωτόμετρο (Hitachi UV 2000)
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- Φούρνος μικροκυμάτων (Microwave digestion equipment, speed wave™ MWS-2, Berghof Instruments GmbH, Γερμανία)
- σύστημα HPLC (Shimadzu LC-20AD), με στήλη Aminex Aminex HPX-87H (BioRad, 300 x 7.8 mm, particle size 9 μm) και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A)
- φούρνος ξήρανσης
- αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0.1 mg
- ξηραντήρας (με silica gel)
- κλίβανος τέφρας
- θερμοστατούμενος περιστροφικός αναδευτήρας (Zhicheng 211C, Κίνα, LABLINE Incubator-Shaker, Η.Π.Α.)
- διάταξη διήθησης υπό κενό
- διάταξη τιτλοδότησης
- διατάξεις φυγοκέντρησης

2 Πρώτη ύλη

Η πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας συμπεριλάμβανε ζυμώσεις λευκού οίνου και συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας παρουσία οξικών βακτηρίων. Η διάθεση των πρώτων υλών για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας έγινε από την οξοποιία ΠΑΠΑΔΕΑΣ Π. ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ & ΣΙΑ Ε.Ε. Το λευκό κρασί παραλήφθηκε αφιltrάριστο, ενώ για την παραλαβή του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος από ξηρή σταφίδα προηγήθηκε η εκχύλισή του με υδραυλική πρέσα, στις εγκαταστάσεις της οξοποιίας. Τόσο για το λευκό κρασί όσο και για το συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας προηγήθηκαν, πριν τις ζυμώσεις, χημικές αναλύσεις, ενώ αρχικά προηγήθηκε η φυγοκέντρησή τους, με σκοπό την απομάκρυνση του στερεού υπολείμματος, το οποίο περιείχε μικροοργανισμούς, που θα δρούσαν είτε ανασταλτικά είτε ενισχυτικά στην ζύμωση.

3 Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509 και *Gluconobacter oxydans* DSM 3503 προμηθεύτηκαν από την DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) και χρησιμοποιήθηκαν σε όλη την εργασία.

4 Προκαλλιέργεια- διατήρηση μικροοργανισμών

Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό μέσο YPM (0.5% w/v yeast extract, 0.3% w/v peptone, 2.5% w/v mannitol) σε κωνικές φιάλες 250 mL. Την αποστείρωση του μέσου (121 °C, 20 min) ακολούθησε εμβολιασμός. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε θερμοστατούμενο επωαστήρα υπό αερόβιες συνθήκες με περιστροφική κίνηση 180 rpm και θερμοκρασία 27 °C. Η ανάπτυξη διήρκησε 72 h. Οι μικροοργανισμοί διατηρήθηκαν σε γλυκερόλη στους -80 °C.

5 Παραγωγή οξικού οξέος από λευκό κρασί με το βακτήριο *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509

5.1 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε κρασί και ίδιας περιεκτικότητας v/v σε YPM

Για την υλοποίηση του πειράματος αυτού εφαρμόστηκαν διεργασίες διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες των 250 mL, οι οποίες πληρώθηκαν με ποσότητα φυγοκεντρημένου λευκού κρασιού 9.3 % w/v EtOH, 28 mL YPM και ποσότητα νερού μέχρι τελικό όγκο 100 mL. Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται οι συνθήκες των πειραμάτων, που εκτελέστηκαν:

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Πειραματικές συνθήκες

Περίπτωση	Προστιθέμενος όγκος κρασιού (mL)	Προστιθέμενος όγκος μέσου YPM (mL)	Προστιθέμενος όγκος νερού (mL)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση αιθανόλης (% w/v)	Αρχική τιμή pH
1	14	28	58	100	1.2	4.25
2	28	28	44	100	2.1	3.78
3	42	28	30	100	3.8	3.62
4	58	28	14	100	5.0	3.54
5	72	28	0	100	6.3	3.50

Μετά την πλήρωση των κωνικών φιαλών πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός τους με 10% (v/v) προκαλλιέργειας και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα με περιστροφική κίνηση 180 rpm και θερμοκρασία 27 °C.

Δείγματα λαμβάνονταν καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης, προκειμένου να εξετάζονται η βακτηριακή ανάπτυξη, η κατανάλωση αιθανόλης και η παραγωγή οξικού οξέος. Κάθε ζύμωση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

5.2 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε κρασί και διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε YPM

Για την υλοποίηση του πειράματος αυτού εφαρμόστηκαν διεργασίες διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες των 250 mL, οι οποίες πληρώθηκαν με ποσότητα φυγοκεντρημένου λευκού κρασιού 9.3 % w/v EtOH και mL YPM μέχρι τελικό όγκο 100 mL. Σαφέστερα, στον ακόλουθο πίνακα δίνονται οι συνθήκες των πειραμάτων, που εκτελέστηκαν:

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Πειραματικές συνθήκες

Περίπτωση	Προστιθέμενος όγκος κρασιού (mL)	Προστιθέμενος όγκος μέσου YPM (mL)	Συγκέντρωση αιθανόλης (% w/v)	Συγκέντρωση μαννιτόλης (% w/v)	Συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης (% w/v)	Συγκέντρωση πεπτόνης (% w/v)	Αρχική τιμή pH
1	14	86	1.2	2.15	0.43	0.258	4.47
2	28	72	2.1	1.80	0.36	0.216	4.16
3	42	58	3.6	1.45	0.29	0.174	3.93
4	58	42	5.2	1.05	0.21	0.126	3.77
5	72	28	6.3	0.70	0.14	0.084	3.70
6	100	-	8.5	-	-	-	3.70

Μετά την πλήρωση των κωνικών φιαλών πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός τους με 10% (v/v) προκαλλιέργειας και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα με περιστροφική κίνηση 180 rpm και θερμοκρασία 27 °C.

Δείγματα λαμβάνονταν καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης, προκειμένου να εξετάζονται η βακτηριακή ανάπτυξη, η κατανάλωση αιθανόλης και η παραγωγή οξικού οξέος. Κάθε ζύμωση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

5.3 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης ίδιας περιεκτικότητας v/v σε φιλτραρισμένο και αφιλτράριστο κρασί

Για την υλοποίηση του πειράματος αυτού εφαρμόστηκε διεργασία διαλείποντος έργου σε κωνικές φιάλες των 250 mL, οι οποίες πληρώθηκαν με 14 mL φυγοκεντρημένου και αφιλτράριστου λευκού κρασιού 9.3 % w/v EtOH, στην μία περίπτωση, και ίδια ποσότητα φυγοκεντρημένου και φιλτραρισμένου λευκού κρασιού 9.3 % w/v EtOH, στην δεύτερη περίπτωση, και 86 mL YPM μέχρι τελικό όγκο 100

mL. Παράλληλα, ρυθμίστηκε η τιμή του pH του μέσου καλλιέργειας με την προσθήκη NaOH 2 M ουδέτερο pH. Ύστερα από την συμπλήρωση 48 h ζύμωσης, το μέσο φορτίστηκε με, επιπλέον, 14 % v/v κρασί, χωρίς να γίνει, προηγουμένως, αποφόρτιση ποσότητας ζυμωμένου μέσου.

5.4 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 από διαφορετικά εμβόλια με εφαρμογή ασυνεχούς διεργασίας σε μέσο ανάπτυξης 14 % v/v κρασιού

Για την υλοποίηση του πειράματος αυτού εφαρμόστηκε ασυνεχής έργου ζύμωση σε κωνικές φιάλες των 250 mL, οι οποίες πληρώθηκαν με 14 mL φυγοκεντρημένου και αφιλτράριστου λευκού κρασιού 9.3 % w/v EtOH και 86 mL YPM μέχρι τελικό όγκο 100 mL. Παράλληλα, ρυθμίστηκε η τιμή του pH του μέσου καλλιέργειας με την προσθήκη NaOH 2 M σε ουδέτερο pH. Διακρίθηκαν δύο περιπτώσεις βάσει το εμβόλιο, που χρησιμοποιήθηκε. Στην πρώτη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο, το οποίο είχε παρασκευαστεί από καλλιέργεια του βακτηρίου *Acetobacter pasteurianus* σε μέσο YPM. Στην δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο, το οποίο είχε παρασκευαστεί από καλλιέργεια του βακτηρίου σε μέσο περιεκτικότητας 14 % v/v κρασιού, 86 % v/v YPM ουδέτερου pH. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν αποφόρτιση 14 % v/v ζυμωμένου μέσου καλλιέργειας και φόρτιση με νέα ίση ποσότητα κρασιού. Ο όγκος του μέσου διατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης σταθερός 100 mL. Το τελικό προϊόν εξετάστηκε ως προς την ολική οξύτητα, την απόχρωση, την ένταση χρώματος και τον δείκτη φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ).

6 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *G. oxydans* DSM 3503 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης 10 °Brix και 15 °Brix συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας

Για την υλοποίηση του πειράματος αυτού εφαρμόστηκε ασυνεχής έργου ζύμωση σε κωνικές φιάλες των 250 mL, οι οποίες πληρώθηκαν με φυγοκεντρημένο και αφιλτράριστο συμπυκνωμένο εκχύλισμα σταφίδας 24.38 °Brix (=268.88 g/L TRS) και 4.8 % w/v EtOH και YPM μέχρι τελικό όγκο 100 mL. Η αραίωση του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος σταφίδας κρίθηκε απαραίτητη, προκειμένου η περιεκτικότητα των αζύμων σακχάρων να μειωθεί, καθώς υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του βακτηρίου οξικού οξέος. Η τιμή του pH του μέσου καλλιέργειας δεν ρυθμίστηκε.

Διακρίθηκαν δύο περιπτώσεις βάσει τη περιεκτικότητα του τελικού μέσου καλλιέργειας σε σάκχαρα. Στην πρώτη περίπτωση, εξετάστηκε μέσο 10 °Brix (=110.34 g/L TRS) τελικού όγκου 100 mL, το οποίο παρασκευάστηκε με αραίωση του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας με YPM (41 mL συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας + 59 mL YPM). Στην δεύτερη περίπτωση, . Στην δεύτερη περίπτωση, εξετάστηκε μέσο 15 °Brix (=165.50 g/L TRS) τελικού όγκου

100 mL, το οποίο παρασκευάστηκε με αραίωση του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας με YPM (61 mL συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας + 39 mL YPM).

Μετά την πλήρωση των κωνικών φιαλών πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός τους με 10% (v/v) προκαλλιέργειας και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα με περιστροφική κίνηση 180 rpm και θερμοκρασία 27 °C.

Επιπλέον, στην πρώτη περίπτωση, πραγματοποιήθηκε μία αποφόρτιση 41 mL ζυμωμένου μέσου και μία φόρτιση με ίδια ποσότητα συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας.

Δείγματα λαμβάνονταν καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης, προκειμένου να εξετάζονται η βακτηριακή ανάπτυξη, η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων, της γλυκόζης, της αιθανόλης και του οξικού οξέος. Κάθε ζύμωση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν

7 Συμβιωτική καλλιέργεια *Gluconobacter oxydans* - *Saccharomyces cerevisiae* & *Acetobacter pasteurianus* - *Saccharomyces cerevisiae* σε οικιακά διατροφικά απορρίμματα

Αρχικά, δείγμα οικιακών διατροφικών απορριμμάτων προκατεργάστηκε υδροθερμικά στους 120 °C για 1 h. Ακολούθως, το προκατεργασμένο δείγμα υπέστη ενζυμική υδρόλυση. Το πρώτο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης περιλάμβανε την μείωση της θερμοκρασίας στους 65-70 °C και την προσθήκη αμυλασών, διαδικασία που διήρκησε 1 h, ενώ το δεύτερο στάδιο περιλάμβανε την μείωση της θερμοκρασίας στους 50 °C και την προσθήκη κυτταρινασών, διαδικασία που διήρκησε 6 h.

Ύστερα από το τελευταίο στάδιο επεξεργασίας του δείγματος οικιακών διατροφικών απορριμμάτων, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός του με την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Η καλλιέργεια του ζυμομύκητα πραγματοποιήθηκε υπό αναερόβιες συνθήκες σε θερμοστατούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 30 °C και με περιστροφική κίνηση 80 rpm.

Ο δεύτερος εμβολιασμός του μέσου έγινε μετά το πέρας ορισμένου χρονικού διαστήματος.

Σαφέστερα, στην περίπτωση του βακτηρίου *G. oxydans*, ο εμβολιασμός του έγινε μετά από 4 h καλλιέργειας της ζύμης. Σκοπός ήταν ο εμβολιασμός του μέσου με το βακτήριο αυτό να πραγματοποιηθεί χρονική στιγμή, όπου το μέσο ήταν πλούσιο σε σάκχαρα και παραγόμενη αιθανόλη. Πρακτικά, ύστερα από 4 h καλλιέργειας της ζύμης, η ζύμωση των σακχάρων δεν ήταν πλήρης.

Στην περίπτωση του βακτηρίου *A. pasteurianus*, ο εμβολιασμός του έγινε μετά από 24 h καλλιέργειας της ζύμης. Την χρονική στιγμή αυτή, η ζύμωση των σακχάρων ήταν πλήρης και το μέσο ήταν φτωχό σε γλυκόζη, πλούσιο σε αιθανόλη.

Η συμβιωτική καλλιέργεια των μικροοργανισμών, σε κάθε περίπτωση, πραγματοποιήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 27 °C και με

περιστροφική κίνηση 180 rpm και διήρκησε 7 ημέρες. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν δειγματοληψία των μέσων. Σε κάθε δείγμα, ύστερα από τη φυγοκέντρησή του, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ως προς το περιεχόμενό του σε αναγωγικά σάκχαρα, γλυκόζη, αιθανόλη και οξικό οξύ.

8 Αναλυτικές μέθοδοι

8.1 Παρακολούθηση βακτηριακής ανάπτυξης

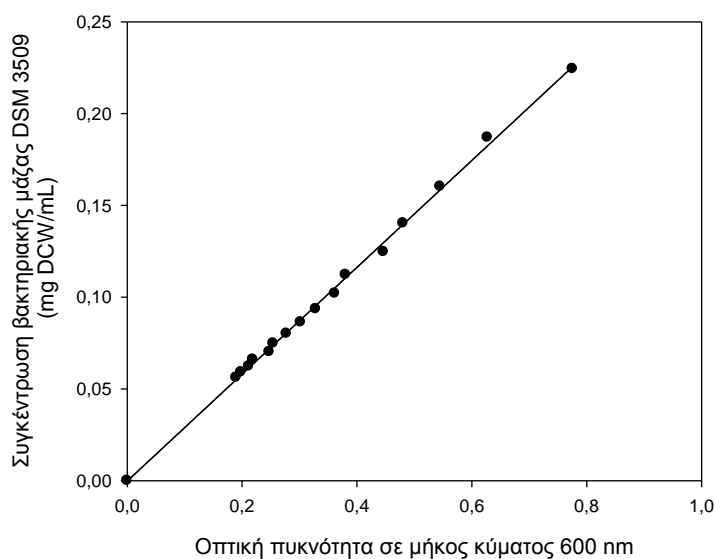
Η συνολική βιομάζα (ανάπτυξη των κυττάρων) παρακολούθηθηκε με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 600 nm χρησιμοποιώντας ένα UV / ορατού φασματοφωτόμετρο. Τα δείγματα αραιώθηκαν με την κατάλληλη συγκέντρωση να κρατήσει την τιμή OD_{600 nm} μεταξύ 0.3 και 0.8 (Hai-Lin Yang et al., 2011).

8.2 Παρασκευή καμπύλης αναφοράς βακτηριακής ανάπτυξης *A. pasteurianus* DSM 3509 και *G. oxydans* DSM 3503

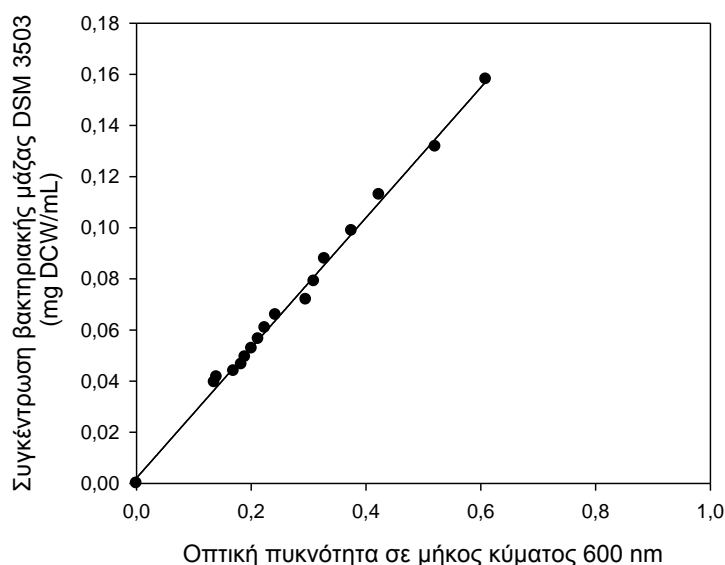
Ύστερα από την ανάπτυξη των κυττάρων, δείγμα συγκεκριμένου όγκου μέσου ανάπτυξης YPM διηθήθηκε υπό κενό. Το υπερκείμενο τμήμα τοποθετήθηκε σε φούρνο 60 °C, προκειμένου στη συνέχεια, να μετρηθεί το μικτό βάρος φίλτρου-ξηρής βιομάζας. Τελικά, αφαιρείται από το μικτό βάρος το βάρος του φίλτρου και υπολογίζεται το βάρος και η συγκέντρωση της ξηρής βιομάζας.

Ταυτόχρονα μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 600 nm αραιωμένων δειγμάτων, ώστε τελικά η τιμή OD_{600 nm} να είναι μεταξύ 0.1 και 0.5.

Στο Διάγραμμα 1 και στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται η καμπύλες αναφοράς της ανάπτυξης του DSM 3509 και του DSM 3503 αντιστοίχως:



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: Καμπύλη αναφοράς ανάπτυξης *A. pasteurianus* DSM 3509. $y = 0.290x$, $R=0.998$



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2: Καμπύλη αναφοράς ανάπτυξης *G. oxydans* DSM 3503. $y = 0.260x$, $R=0.995$

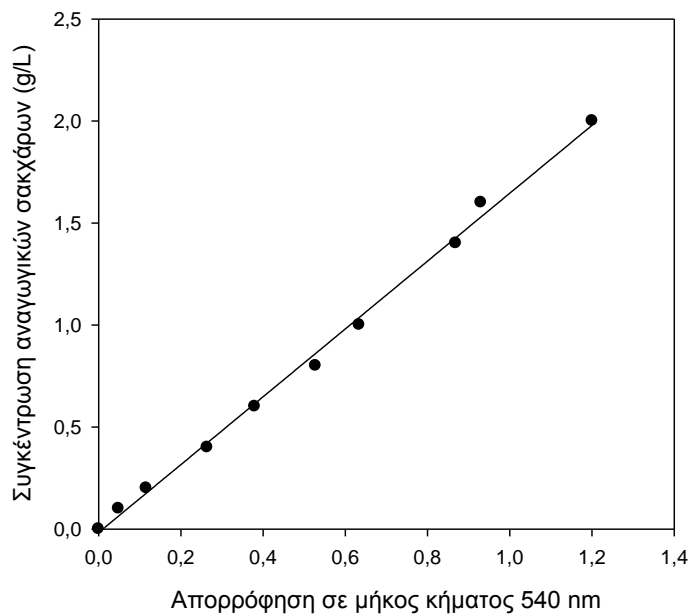
9 Μέτρηση χαρακτηριστικών πρώτης ύλης και τελικού προϊόντος

Σημειώνεται ότι οι αναλυτικές μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν σε φυγοκεντρημένα δείγματα, προκειμένου να είναι διαυγή. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

9.1 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

Η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιήθηκε με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Ως αναγωγικό σάκχαρο ορίζεται το σάκχαρο, το οποίο έχει ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο. Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο προαναφερθέν υδροξύλιο και το δινιτροσαλικυλικό οξύ κατά τη θέρμανση σε θερμοκρασία πάνω από τους 70 °C. Το σύμπλοκο αυτό, εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm. Η γλυκόζη είναι αναγωγικό σάκχαρο και κατά συνέπεια είναι δυνατόν να μετρηθεί με τη μέθοδο αυτή. Αρχικά, παρασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς για τα σάκχαρα, ενώ η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας και του κρασιού πραγματοποιήθηκε σε αραιωμένα δείγματα, ώστε τελικά η τιμή απορρόφησης να είναι μεταξύ 0.1 και 0.5. Ταυτοχρόνως, με χρήση κατάλληλων πινάκων η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας μετατρέπεται σε βαθμούς Brix.

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης:



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3: Καμπύλη αναφοράς αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης.
 $y = 1.642x$, $R^2 = 0.995$

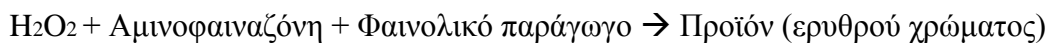
9.2 Μέτρηση γλυκόζης

Η μέτρηση της γλυκόζης πραγματοποιήθηκε ενζυμικά με τη χρησιμοποίηση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος, το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Αρχικά, η γλυκόζη μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με τη δράση της οξειδάσης παράγοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου. Ακολούθως, το υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαιολικού παραγώγου με τη δράση της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε προϊόν ερυθρού χρώματος, το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm.

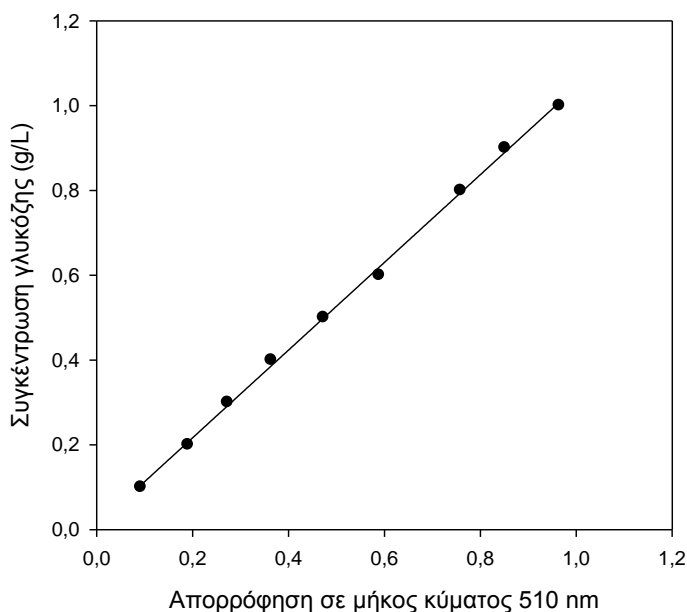
GOD



POD



Στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης:



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4: Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης. $y = 1.048x$, $R^2 = 0.998$

9.3 Μέτρηση ολικής ή ογκομετρούμενης οξύτητας

Το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται στο ξύδι και τον οίνο, είτε σε μοριακή κατάσταση είτε σε μορφή ανιόντων, αποτελεί την ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα. Ο προσδιορισμός της βασίζεται στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων του δείγματος με πρότυπο διάλυμα αλκάλειας παρουσία ενός δείκτη. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα NaOH 0.1 N και 1 N (για το ξύδι) και δείκτης φαινολοφθαλείνη (Z. Qi et al., 2013). Η διαδικασία, που ακολουθήθηκε είναι:

Σε κωνική φιάλη μεταφέρονται 10 mL αντιπροσωπευτικού δείγματος από το ξύδι ή τον οίνο που εξετάζεται. Στην ίδια φιάλη προστίθενται 40 mL αποσταγμένο νερό και 3 - 4 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλείνης (διάλυμα 1 % σε αιθανόλη). Η τιτλοδότηση γίνεται με διάλυμα καυστικού νατρίου 0.1 N για το κρασί και 1 N για το ξύδι αναδεύοντας συνεχώς μέχρι να εμφανιστεί ρόδινο χρώμα το οποίο θα παραμείνει σταθερό για 30 sec. Από την ποσότητα του διαλύματος NaOH που καταναλώθηκε (n) υπολογίζεται η οξύτητα. Η ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο (meq/L) δίνεται από τον τύπο

$$A = 10 * n$$

με ένα δεκαδικό ψηφίο.

Η ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο (g/L) δίνεται από τον τύπο

$$A = 0.75 * n$$

με ένα δεκαδικό ψηφίο.

Η ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε γραμμάρια οξικού οξέος ανά λίτρο (g/L) δίνεται από τον τύπο

$$A = 0.60 * n$$

με ένα δεκαδικό ψηφίο.

9.4 Μέτρηση ενεργής οξύτητας - pH

Η διαδικασία, που ακολουθήθηκε είναι η εξής: Αρχικά, γίνεται η βαθμονόμηση του οργάνου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή με ρυθμιστικά διαλύματα γνωστού pH, 4 και 7. Κατόπιν σε ένα ποτήρι ζέσεως (που περιέχει ένα μικρό μαγνήτη και βρίσκεται πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα) τοποθετείται επαρκής ποσότητα δείγματος έτσι ώστε το ηλεκτρόδιο να είναι εμβαπτισμένο και να μην ακουμπάει στα τοιχώματα του ποτηριού ή στον μαγνήτη. Η θερμοκρασία του δείγματος πρέπει να είναι 20 - 25 °C. Όταν η τιμή σταθεροποιηθεί λαμβάνεται η μέτρηση.

9.5 Προσδιορισμός χρωματικών χαρακτηριστικών

Το χρώμα των οίνων και των ξυδιών είναι αποτέλεσμα εκλεκτικής απορρόφησης ορισμένων ακτινοβολιών του ηλιακού φάσματος και οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις. Το φάσμα απορρόφησης των ερυθρών οίνων παρουσιάζει μέγιστο στα 520 nm (ερυθρό). Στους νεαρούς ερυθρούς οίνους το μέγιστο οφείλεται στο καθαρό ερυθρό χρώμα των ελεύθερων ανθοκυανών με μορφή φλαβυλίου. Με την πάροδο του χρόνου, παλαίωση, η απορρόφηση στα 520 nm μειώνεται και αυξάνεται η απορρόφηση στα 420 nm (κίτρινο). Αιτία είναι οι διάφορες μορφές τανινών που επικρατούν στους παλαιωμένους οίνους και που απορροφούν στην περιοχή του κίτρινου. Για την αξιολόγηση αυτών των χρωμάτων, λαμβάνεται υπόψη η απορρόφηση στην περιοχή του κυανού (620 nm), που αποδίδεται στις μορφές της βάσης της κινόνης των ελευθέρων και των ενωμένων ανθοκυανών. Για την εκτίμηση του χρώματος των λευκών οίνων πιο σημαντική είναι η απορρόφηση στα 420 nm (κίτρινο) και δείχνει το βαθμό οξειδωσης τους. Όσο πιο οξειδωμένος είναι ένας λευκός οίνος τόσο πιο μεγάλη απορρόφηση παρουσιάζει στα 420 nm.

Σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους του OIV, χρωματικά χαρακτηριστικά ενός οίνου ονομάζονται η φωτεινότητα του και η χρωματικότητα του. Η φωτεινότητα αντιστοιχεί στη διαπερατότητα. Είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την ένταση χρώματος του οίνου. Η χρωματικότητα ανταποκρίνεται στο επικρατούν μήκος κύματος (που χαρακτηρίζει την απόχρωση) και την καθαρότητα. Η μέθοδος αναφοράς είναι μια φασματοφωτομετρική μέθοδος που επιτρέπει τον υπολογισμό των τρισερεθιστικών τιμών και των τριχρωματικών συντελεστών που απαιτούνται για τον καθορισμό του χρώματος σύμφωνα με τους κανόνες της διεθνούς επιτροπής φωτισμού (CIE).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα χρωματικά χαρακτηριστικά του κρασιού και των προϊόντων ζύμωσης του προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρικές μετρήσεις σε A_{420} nm, A_{520} nm, και A_{620} nm. Υπολογίστηκαν οι εξής παράμετροι:

- Ένταση χρώματος (E)

Είναι το άθροισμα των απορροφήσεων στα 420 nm, 520 nm και 620 nm.

$$E = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

- Απόχρωση (A)

Είναι ο λόγος της απορρόφησης του γλεύκους ή του οίνου στα 420 nm προς την απορρόφηση στα 520 nm.

$$A = A_{420} / A_{520}$$

- Πυκνότητα χρώματος (Π)

Είναι το άθροισμα των απορροφήσεων στα 420 nm και 520 nm.

$$\Pi = A_{420} + A_{520}$$

(Skenderi, 2013)

Τα συμβατικά αυτά μεγέθη παρέχουν σημαντικές πληροφορίες, γιατί διαφοροποιούνται κατά πολύ ανάλογα με την ποικιλία απ' όπου προήλθε ο οίνος και το ξύδι, τις καλλιεργητικές φροντίδες που δέχτηκε, τη μέθοδο οινοποίησης κá. Ταυτοχρόνως, τα χαρακτηριστικά αυτά εξετάστηκαν και σε δείγμα έτοιμου ξυδιού του εμπορίου και των δειγμάτων, που προέκυψαν ύστερα από την ζύμωση του κρασιού. Η απορρόφηση υπολογίζεται με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου στα τρία μήκη κύματος (A_{420} , A_{520} , A_{620}). Το αποδεκτό εύρος τιμών οπτικής πυκνότητας είναι 0.3 - 0.7. Οι μετρήσεις γίνονται σε κυψελίδες των 10 mm. Σαν υγρό αναφοράς για τον μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. (Achaerandio et al., 2002)

9.6 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών

Οι φαινολικές ουσίες αποτελούν σημαντική παράμετρο των οίνων, γιατί από αυτές εξαρτάται το χρώμα και οι αποχρώσεις, κυρίως, των ερυθρών και ροζέ οίνων αλλά και οι ιδιαίτεροι γευστικοί χαρακτήρες τους. Είναι υπεύθυνες για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της ποιότητας των οίνων κατά τη συντήρηση και παλαιώση (π.χ. εξευγενισμός γευστικών χαρακτήρων των ερυθρών ή, αντίθετα, 'καφέτιασμα' των λευκών. Ως εκ τούτου, σημαντικές είναι και για τα ξύδια. Για τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού φορτίου των δειγμάτων εξετάστηκε ο δείκτης φαινολικών ουσιών, ΔΦΟ. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην ισχυρή απορρόφηση που παρουσιάζουν οι βενζολικοί δακτύλιοι των φαινολικών ενώσεων στο υπεριώδες φως, το μέγιστο της οποίας παρατηρείται γύρω στα 280 nm. Μετρά την περιεκτικότητα των φλαβονοειδών φαινολών (ανθοκυάνες, τανίνες), των μη φλαβονοειδών (φαινολικά οξέα) και κάποιων μη φαινολικών ουσιών που απορροφούν στα 280 nm. Ο ΔΦΟ είναι γρήγορη και εύκολη μέθοδος και δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι ορισμένες ενώσεις όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες, δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm. Το σφάλμα αυτό θεωρείται μικρό, μια και η περιεκτικότητα των παραπάνω ουσιών στα σταφύλια και τους οίνους είναι χαμηλή. Ο ΔΦΟ προκύπτει από την ακόλουθη σχέση:

$$\Delta\Phi\text{O} = \text{OD}_{280} \times \text{Αραίωση δείγματος (εδώ 100)}$$

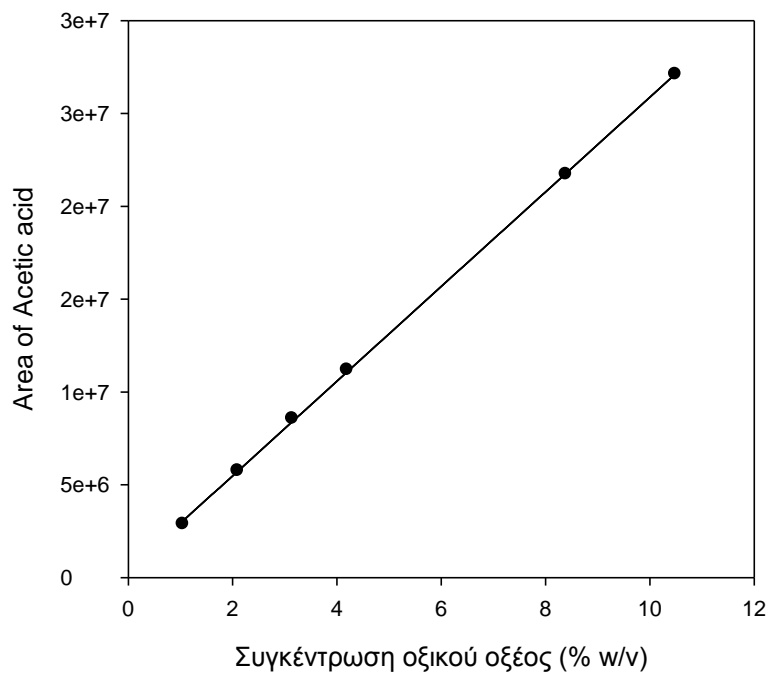
Όπου OD: η ένδειξη του οργάνου

(Achaerandio et al., 2002)

9.7 Μέτρηση αιθανόλης και οξικού οξέος με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Το οξικό οξύ, που παράγεται κατά τη βιομετατροπή του οίνου και του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας, καθώς και η αιθανόλη, που καταναλώνεται προσδιορίστηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

(HPLC). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC (Shimadzu LC-20AD), με στήλη Aminex Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7.8 mm, particle size 9 μm) και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Shimadzu RID 10A). Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 5 mM H_2SO_4 με ροή 0.6 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 50 $^\circ\text{C}$ (Dogaris et al. 2009). Για την ποσοτική ανάλυση παρασκευάστηκαν, αρχικά, καμπύλες αναφοράς οξικού οξέος και αιθανόλης και εν συνεχεία μετρήθηκαν δείγματα από τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν, καθώς και οι πρώτες ύλες (κρασί, συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας) και έτοιμο ξύδι εμπορίου. Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς του οξικού οξέος:



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5: Καμπύλη αναφοράς οξικού οξέος. $y = 3E+06x$, $R^2 = 0.999$

C. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε κρασί και ίδιας περιεκτικότητας v/v σε YPM

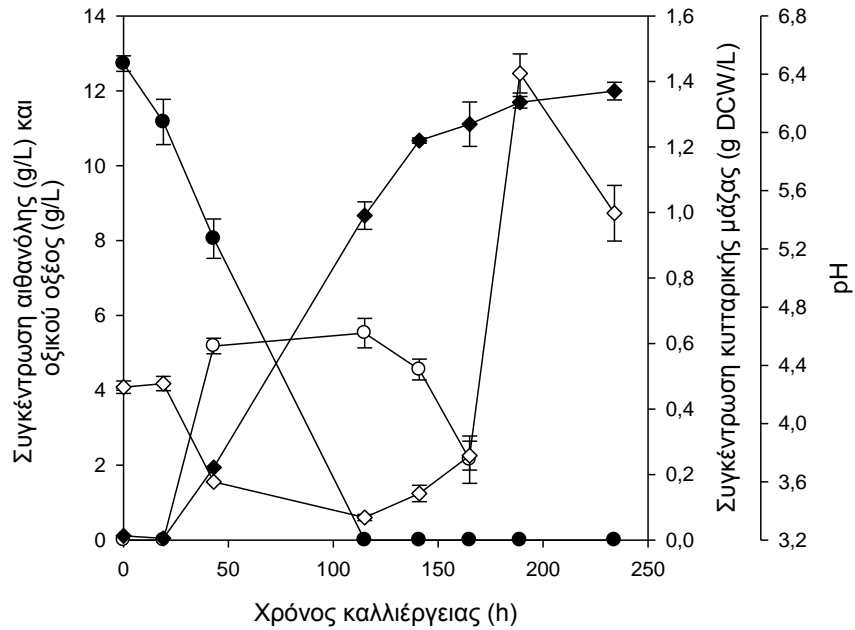
Τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή οξικού οξέος παρουσιάζονται στον Πίνακα 10:

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Αποτελέσματα μετρήσεων χαρακτηριστικών λευκού κρασιού

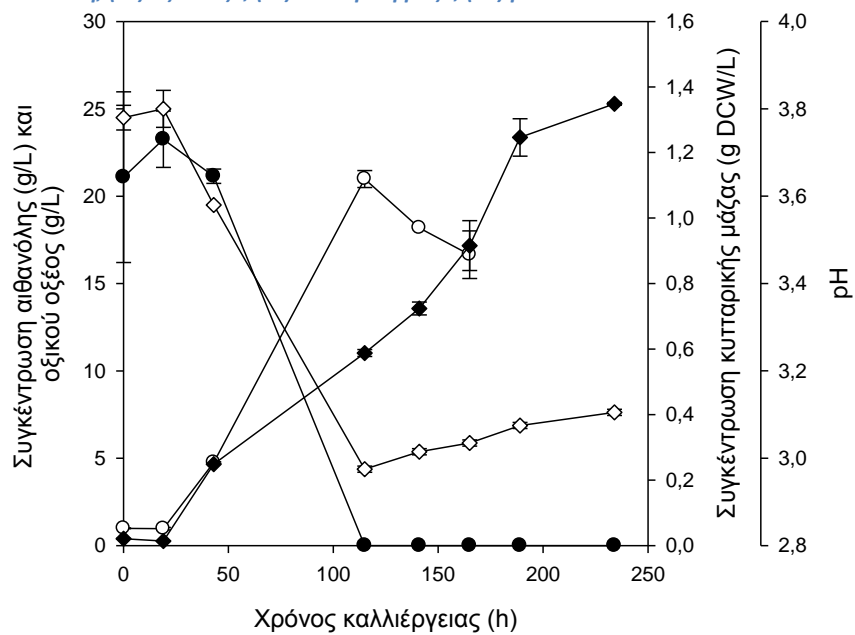
	Λευκό κρασί
pH	3.70
A ₄₂₀	0.280
A ₅₂₀	0.079
A ₆₂₀	0.059
Ένταση χρώματος	0.418
Απόχρωση	3.540
Πυκνότητα χρώματος	0.359
ΔΦΟ	21.75
Οξύτητα (g/L ισοδύναμα τρυγικού οξέος)	7.95
TRS (g/L)	1.48
Βαθμοί Brix (°Bx)	δ.π.
Γλυκόζη (g/L)	0
Αιθανόλη (g/L)	93.39
Οξικό οξύ (g/L)	-

* δεν προσδιορίστηκε

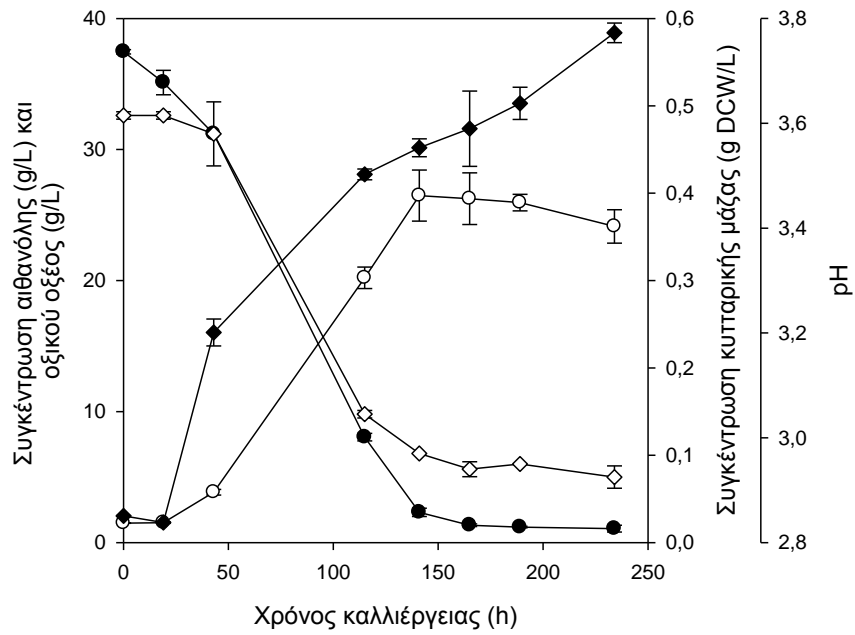
Αρχικά, παρουσιάζεται διαγραμματικά η επίδραση αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης στην παραγωγή οξικού οξέος από κρασί και στην ανάπτυξη της κυτταρικής μάζας σε κάθε περίπτωση ξεχωριστά.



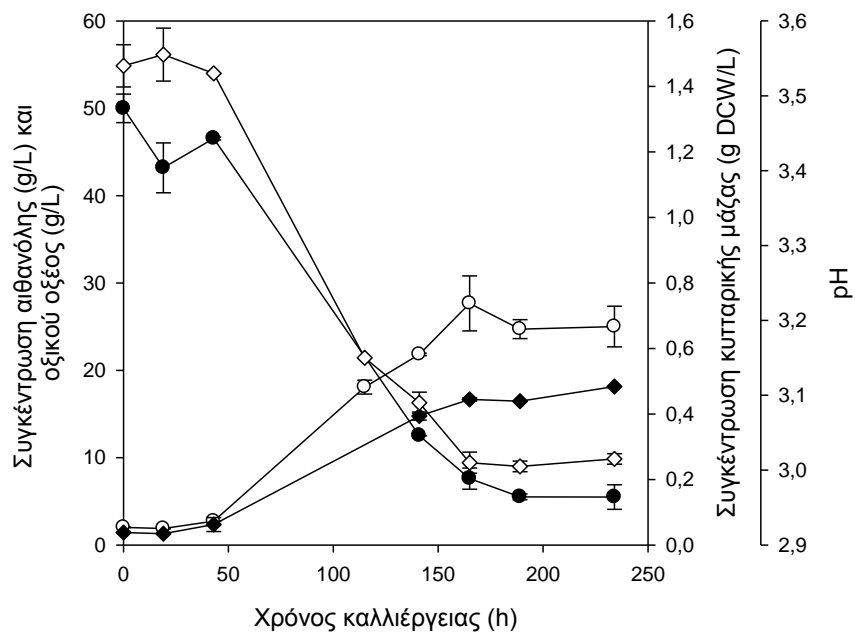
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1.2% (w/v).
 Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα, (◇) pH



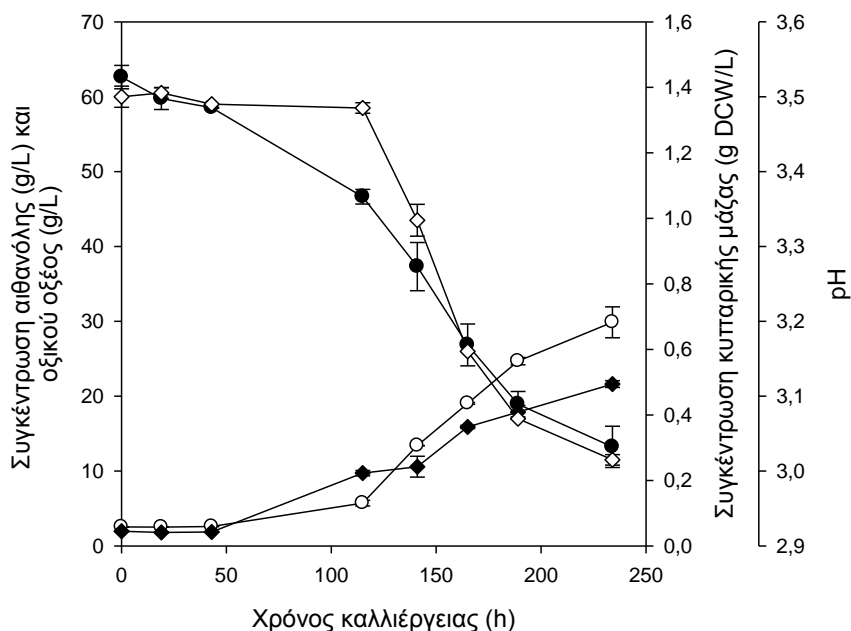
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 2.1% (w/v).
 Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα, (◇) pH



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 3.8% (w/v).
Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα, (◇) pH



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 5.0% (w/v).
Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα, (◇) pH



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 6.2% (w/v).
 Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα, (◇) pH

Κατά την ζύμωση του μέσου καλλιέργειας αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 1.2 % w/v παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης και παραγωγή οξικού οξέος με ταυτόχρονη μείωση της τιμής pH του μέσου μέχρι μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Πιο αναλυτικά, σε χρονικό διάστημα 115 h η αιθανόλη του μέσου καταναλώνεται πλήρως, ενώ ταυτοχρόνως την χρονική στιγμή αυτή η συγκέντρωση οξικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας είναι η μέγιστη δυνατή, ίση με 5.18 g/L και η τιμή pH η ελάχιστη δυνατή, ίση με 3.35. Την χρονική στιγμή, όπου σημειώνεται μηδενική συγκέντρωση αιθανόλης, σημειώνονται η ελάχιστη τιμή pH και μέγιστη συγκέντρωσης οξικού οξέος.

Στο Διάγραμμα 6 φαίνεται ότι η λανθάνουσα φάση ανάπτυξης του βακτηρίου ολοκληρώνεται σε 43 h καλλιέργειας και ακολουθεί η εκθετική φάση. Κατά την διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, λοιπόν, πληθυσμός των μικροοργανισμών που προέρχεται από την αρχική καλλιέργεια παραμένει σχεδόν σταθερός. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το βακτήριο χρειάζεται κάποιο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστεί στις καινούργιες συνθήκες και να αρχίσει να αναπτύσσεται. Καθώς, λοιπόν, η ανάπτυξη του βακτηρίου στη φάση αυτή είναι αρκετά αργή φαίνεται ότι δεν παράγεται οξικό οξύ. Στη συνέχεια, οι μικροοργανισμοί διαιρούνται με ταχύ ρυθμό, η παραγωγή οξικού οξέος είναι μεγάλη και επακόλουθα μειώνεται η τιμή pH. Η παραγωγή οξικού οξέος κρίνεται αδύνατη μετά το πέρας 115 h καλλιέργειας, λόγω της πλήρους κατανάλωσης αιθανόλης και παρ' ότι η ανάπτυξη του *A. pasteurianus* είναι ακόμα εκθετική. Ύστερα από 115 h καλλιέργειας σημειώνεται μείωση συγκέντρωσης οξικού οξέος και επακόλουθα αύξηση της τιμής pH. Η συμπεριφορά αυτή δικαιολογείται με την εμφάνιση ενός ανεπιθύμητου φαινομένου στην παραγωγή ξυδιού. Το φαινόμενο αυτό καλείται υπεροξειδωση οξικού οξέος και αφορά την κατανάλωση οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* για την παραγωγή ATP μέσω του κύκλου TCA. Αυτό συμβαίνει όταν όλες οι πηγές άνθρακα και ενέργειας –

στην περίπτωση αυτή νοείται η αιθανόλη του κρασιού και η μαννιτόλη του YPM – εξαντλούνται και μόνο οξικό οξύ παραμένει στην στατική φάση ανάπτυξης του βακτηρίου *A. pasteurianus*. Η οξειδωση του οξικού οξέος δεν διακρίνεται όταν στο μέσο καλλιέργειας υπάρχει αιθανόλη ή/και άλλες πηγές άνθρακα. Στην περίπτωση, λοιπόν, ύπαρξης μόνο οξικού οξέος, το βακτήριο καταναλώνει το οξικό οξύ, που έχει συσσωρευθεί στο μέσο από την οξειδωση της αιθανόλης και αναπτύσσεται ταχεία εμφανίζοντας μία δεύτερη εκθετική φάση. Για το λόγο αυτό, σημειώνεται και αύξηση της κυτταρικής μάζας κατά την χρονική διάρκεια δράσης του φαινομένου αυτού. Στην φάση αυτή, το οξικό οξύ μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA από την συνθετάση του ακετυλο-CoA, προκειμένου το οξικό οξύ να εισαχθεί στον κύκλο TCA και το βακτήριο να μπορεί να αναπτυχθεί ταχεία στο περιβάλλον του οξικού οξέος μετά την εξάντληση της αιθανόλης. Τα κύτταρα της πρώτης φάσης ανάπτυξης (φάση οξειδωσης αιθανόλης) είναι ανθεκτικά στο οξικό οξύ, ενώ τα κύτταρα της δεύτερης φάσης (φάση οξειδωσης οξικού οξέος) φαίνονται ευαίσθητα στην παρουσία οξικού οξέος και επιπλέον διαθέτουν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά σε κάθε φάση. Προϊόντα της υπεροξειδωσης του οξικού οξέος είναι CO₂ και H₂O. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος της υπεροξειδωσης κατά την παραγωγή ξυδιού προτείνεται η συσσώρευση οξικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας να είναι μεγαλύτερη από 4 %, ενώ ταυτόχρονα, στο τέλος της διεργασίας, να υπολείπεται αιθανόλη σε μικρή συγκέντρωση. Σε ένα έτοιμο ξύδι η συγκέντρωση της αιθανόλης κυμαίνεται μεταξύ 0.5 και 1 % w/v (Mas et al., 2014).

Κατά την ζύμωση του μέσου καλλιέργειας αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 2.1 % w/v προκύπτουν αντίστοιχα συμπεράσματα. Η συγκέντρωση αιθανόλης μειώνεται, παράγεται οξικό οξύ και ταυτόχρονα μειώνεται η τιμή pH του μέσου μέχρι μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Την χρονική στιγμή, όπου σημειώνεται μηδενική συγκέντρωση αιθανόλης, παρατηρείται αύξηση της τιμής pH και μείωση της συγκέντρωσης οξικού οξέος, λόγω υπεροξειδωσης οξικού οξέος σε CO₂ και H₂O. Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης μηδενίζεται και παράλληλα η συγκέντρωση του οξικού οξέος μεγιστοποιείται (20.98 g/L) και επακόλουθα η τιμή pH ελαχιστοποιείται (2.97) την χρονική στιγμή των 115 h, την ίδια χρονική στιγμή που παρατηρούνται τα ίδια συμπεράσματα στην αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 1.2 % w/v. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι δύο περιπτώσεις αφορούν μικρές και κοντινές τιμές αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης, οπότε η αιθανόλη δεν δρα αρκετά παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του βακτηρίου. Ωστόσο, φαίνεται στην περίπτωση αυτή ότι η κατανάλωση της αιθανόλης δεν ξεκινάει από την χρονική στιγμή μηδέν, αλλά μετά από 43 h καλλιέργειας, όπου σημειώνεται και αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού. Προφανώς στην περίπτωση αυτή παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα οξικού οξέος μιας και υπάρχει μεγαλύτερη αρχική ποσότητα αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας, ενώ από την κλίση της καμπύλης της συγκέντρωσης οξικού οξέος στο Διάγραμμα 7 και συγκριτικά με την αντίστοιχη καμπύλη του Διαγράμματος 6 διαπιστώνεται μεγαλύτερος ρυθμός παραγωγής οξικού οξέος, ενώ η συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας κυμαίνεται στις ίδιες σχετικές τιμές και στις δύο περιπτώσεις.

Στην περίπτωση αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 3.8 % w/v, η ανάπτυξη και η δράση του βακτηρίου *A. pasteurianus* σημειώνουν εκτός από ομοιότητες και

χαρακτηριστικές διαφορές. Η ανάπτυξη του βακτηρίου οδηγεί στην οξείδωση της αιθανόλης και στον σχηματισμό οξικού οξέος. Ωστόσο, εντός του χρονικού διαστήματος, που μελετήθηκε (250 h) δεν καταναλώθηκε πλήρως η αιθανόλη του κρασιού, οπότε και το φαινόμενο της υπεροξείδωσης του οξικού οξέος δεν παρατηρήθηκε έντονα. Επιπλέον, στο χρονικό διάστημα των 250 h δεν σημειώνεται στατική φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Το βακτήριο βρίσκεται στην εκθετική φάση μετά τις πρώτες 20.78 h καλλιέργειας και μέχρι το χρονικό διάστημα των 250 h, που μελετήθηκε. Ύστερα, όμως, από 141 h καλλιέργειας παρατηρείται μείωση της παραγόμενης ποσότητας οξικού οξέος, παρότι το βακτήριο βρίσκεται στην εκθετική φάση. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αρκετά μειωμένη υπάρχουσα αιθανόλη στο μέσο καλλιέργειας. Ταυτόχρονα, η παρουσία οξικού οξέος συγκέντρωσης $> 20 \text{ g/L}$ δρα ανασταλτικά (Z. Qi et al., 2013). Επιπρόσθετα, ο χρόνος καθυστέρησης είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση αυτή, καθώς η αιθανόλη δρα παρεμποδιστικά (ενώ ο όγκος του εμβολίου σε κάθε περίπτωση είναι ο ίδιος).

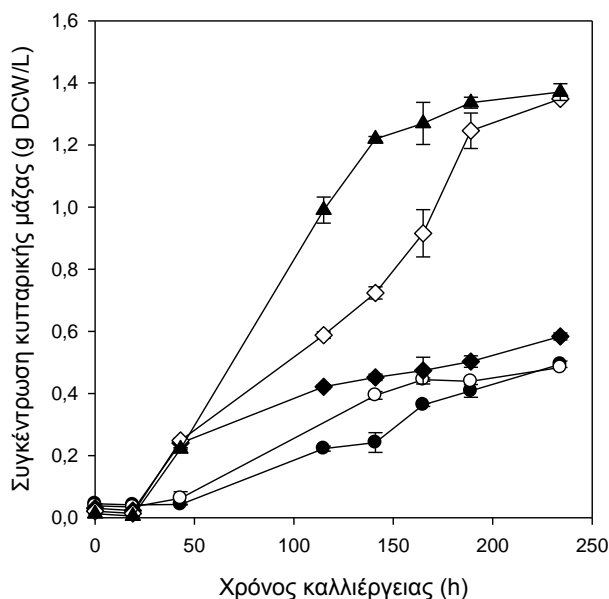
Στην τέταρτη περίπτωση, η παρεμπόδιση, που προκαλεί η μεγάλη αρχική τιμή συγκέντρωσης αιθανόλης ($> 4 \text{ \% w/v}$) στην ανάπτυξη του βακτηρίου είναι αρκετά εντονότερη και αυτό φαίνεται από τις χαμηλές τιμές συγκέντρωσης της κυτταρικής μάζας του (Romero L.E. et al., 1994). Ωστόσο, η παρουσία οξικού οξέος από την χρονική στιγμή t_0 δρα θετικά στην δραστηριότητα του μικροοργανισμού *Acetobacter*. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 10 g/L το οξικό οξύ βοηθά την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και την μετέπειτα κατανάλωση αιθανόλης. Η ανασταλτική δράση του οξέος ξεκινά μετά τις 141 h καλλιέργειας, όπου η συγκέντρωση του στο μέσο αυξάνεται πάνω από 20 g/L (Romero L.E. et al., 1994). Στην περίπτωση αυτή, είναι ευκρινής και η στατική φάση ανάπτυξης, στην οποία βρίσκεται το βακτήριο μετά από 165 h καλλιέργειας. Στην φάση αυτή διακόπτεται η ανάπτυξη του βακτηρίου λόγω συσσώρευσης του οξικού οξέος, το οποίο χαρακτηρίζεται ως τοξικό προϊόν μεταβολισμού σε μεγάλες τιμές συγκεντρώσεων, ενώ πιθανόν να έχει εξαντληθεί και κάποιο θρεπτικό συστατικό. Στην περίπτωση, αυτή, επιπλέον, φαίνεται πιο καθαρά η σχέση του οξικού οξέος με την ανάπτυξη του βακτηρίου *A. pasteurianus*. Πιο αναλυτικά, το μεταβολικό προϊόν φαίνεται ότι συσχετίζεται με την ανάπτυξη του βακτηρίου, δηλαδή ο ρυθμός παραγωγής του είναι ανάλογος με τον ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Μελετώντας μία μεγαλύτερη τιμή αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης αποτυπώνονται διαγραμματικά οι σχέσεις των μεγεθών C_{EtOH} , C_{AcOH} , $C_{\text{κυτταρικής μάζας}}$ και pH ευκρινέστερα, λόγω της αργής δράσης του μικροοργανισμού. Αρχικά, η αργή δράση του δικαιολογείται με την παρεμπόδιση, που προκαλεί η αιθανόλη στην ανάπτυξή του, καθώς η αρχική τιμή συγκέντρωσής της είναι αρκετά μεγάλη ($62.61 \text{ g/L} \gg 40 \text{ g/L}$). Ο χρόνος, που απαιτείται για την προσαρμογή του μικροοργανισμού αυτού στις αντίξοες αυτές συνθήκες είναι μεγάλος, ενώ ο ρυθμός ανάπτυξής του στην εκθετική φάση φαίνεται μικρός συγκριτικά με τις προηγούμενες, κιόλας, περιπτώσεις μελέτης. Η μορφή του διαγράμματος 10 βοηθά στην εξαγωγή των εξής συμπερασμάτων:

- Η σχέση αιθανόλης – οξικού οξέος είναι αντιστρόφως ανάλογη.
- Το προϊόν (οξικό οξύ) είναι σχετιζόμενο με την ανάπτυξη της κυτταρικής μάζας.

Επιπλέον, διαπιστώνεται ότι το χρονικό διάστημα των 250 h δεν ήταν αρκετό, προκειμένου να εντοπιστεί η στατική φάση ανάπτυξης. Μάλιστα, την χρονική στιγμή $t_7 = 234$ h (τελευταία δειγματοληψία) η συγκέντρωση αιθανόλης είναι η βέλτιστη για τον βακτηριακό μεταβολισμό (ίση με 13 g/L), ακόμη και αν η τιμή αυτή επηρεάζεται έντονα από την συγκέντρωση άλλων τοξικών ενώσεων, όπως είναι το οξικό οξύ.

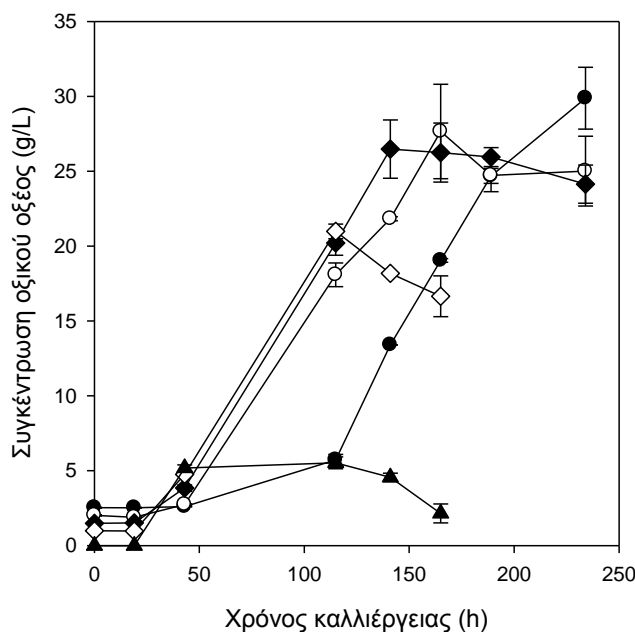
Από τη μορφή του διαγράμματος 11 εξάγεται το συμπέρασμα ότι αυξανόμενης της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας μειώνεται τόσο ο ρυθμός ανάπτυξης της κυτταρικής μάζας όσο και ο πληθυσμός της σε κάθε χρονική στιγμή. Στο διάγραμμα αποτυπώνονται η φάση υστέρησης και η εκθετική φάση σε κάθε περίπτωση, ενώ η ανάπτυξη του βακτηρίου φαίνεται να σταματά σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 250 h στις δύο πρώτες περιπτώσεις, λόγω εξάντλησης της αιθανόλης. Αντιθέτως, στις περιπτώσεις, όπου η αρχική συγκέντρωση αιθανόλης είναι μεγαλύτερη, δεν αποτυπώνεται η στατική φάση ανάπτυξης στο χρονικό διάστημα των 250 h. Τέλος, σε καμία περίπτωση δεν αποτυπώνεται η φάση θανάτου. Ακόμα και μετά την εξάντληση της αιθανόλης, η κυτταρική μάζα συντηρείται και αναπτύσσεται καταβολίζοντας το οξικό οξύ (φαινόμενο υπεροξειδωσης οξικού οξέος). Τέλος σημειώνεται ότι η θερμοκρασία και ο αερισμός σε κάθε περίπτωση είναι ίδια. Ωστόσο, η τιμή pH σε κάθε μέσο ανάπτυξης διαφέρει, λόγω διαφορετικής συγκέντρωσης αιθανόλης και μη ρύθμισης του σε κάποια σταθερή τιμή. Αυξανόμενης της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης μειώνεται η αρχική τιμή pH του μέσου. Είναι γνωστό ότι βέλτιστο εύρος pH για την ανάπτυξη των AAB είναι μεταξύ 5 και 6.5. Ωστόσο, σε τιμές pH μικρότερες του 5 θεωρούνται ανθεκτικά (Holt and others 1994, Trcek and others 2000, Gullo and Giudici 2008), γεγονός που διαπιστώνεται και από τα πειραματικά αποτελέσματα. Η τοξικότητα του οξικού οξέος μεγάλων συγκεντρώσεων επηρεάζει την επιβίωση ή την ανάπτυξη των βακτηρίων, δίνοντας, έτσι, μία ακόμα εξήγηση για το χαμηλό επίπεδο της βιομάζας AAB.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης στην παραγωγή κυτταρικής μάζας του βακτηρίου *A. pasteurianus* DSM 3509.

Σύμβολα: αρχική συγκέντρωση αιθανόλης (% w/v) (▲) 1.2, (◇) 2.1, (◆) 3.8, (○) 5.0 και (●) 6.3.

Η τιμή της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας επιδρά, σαφώς, και στην παραγωγή του οξικού οξέος. Εν γένει, αυξανόμενης της αρχικής τιμής συγκέντρωσης αιθανόλης αυξάνεται η τελική τιμή συγκέντρωσης οξικού οξέος. Το συμπέρασμα αυτό κρίνεται φυσιολογικό, μιας και η αιθανόλη είναι αυτή που οξειδώνεται προς οξικό οξύ. Ταυτόχρονα, όμως, παρότι το παραγόμενο οξικό οξύ είναι περισσότερο, ο ρυθμός παραγωγής του είναι μικρότερος, λόγω παρεμπόδισης της αιθανόλης και χαμηλότερων τιμών pH, καθώς αυξάνεται η τιμή αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης. Συμπερασματικά, η παραγωγή οξικού οξέος επηρεάζεται από την ανάπτυξη της βιομάζας και τον μεταβολισμό (Z. Qi et al., 2013).



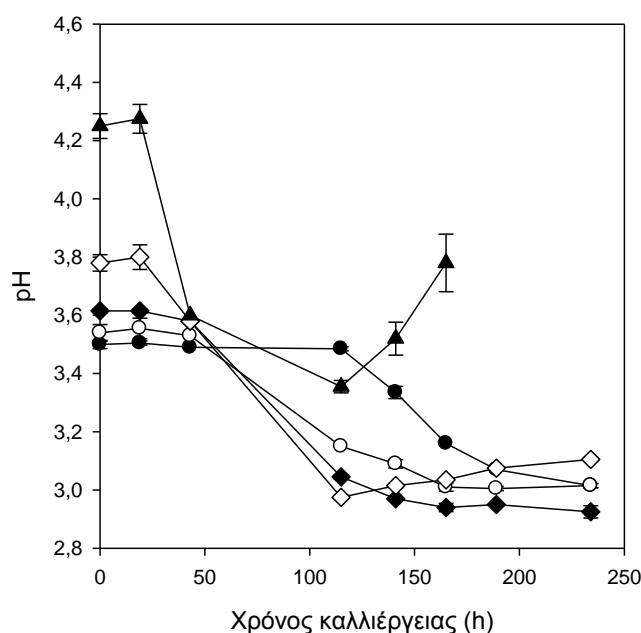
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης στην παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509.

Σύμβολα: αρχική συγκέντρωση αιθανόλης (% w/v) (▲) 1.2, (◇) 2.1, (◆) 3.8, (○) 5.0 και (●) 6.3.

Η τιμή του pH μειώνεται καθώς παράγεται οξικό οξύ, οπότε η σχέση $\text{pH}-C_{\text{AcOH}}$ είναι αντιστρόφως ανάλογη, γεγονός που διαπιστώνεται από την μορφή των διαγραμμάτων 12 και 13. Επομένως, αναμένεται η τελική τιμή pH να είναι μικρότερη στην περίπτωση, όπου παράγεται η μεγαλύτερη ποσότητα οξικού οξέος και η συγκέντρωση αιθανόλης είναι μικρή. Η χαμηλότερη τελική τιμή pH (2.92) σημειώνεται στην τρίτη περίπτωση την χρονική στιγμή όπου η συγκέντρωση οξικού οξέος είναι η μέγιστη και η αιθανόλη έχει καταναλωθεί σχεδόν πλήρως ($C_{\text{EtOH}} = 1.32 \text{ g/L}$, $C_{\text{AcOH}} = 26.25 \text{ g/L}$). Παρότι στην πέμπτη περίπτωση η τελική τιμή οξικού οξέος, που παράγεται είναι μεγαλύτερη, η τιμή pH είναι μεγαλύτερη, λόγω της παρουσίας μεγάλης ποσότητας αιθανόλης ($t = 234 \text{ h}$: $C_{\text{EtOH}} = 13.23 \text{ g/L}$, $C_{\text{AcOH}} = 29.88 \text{ g/L}$, $\text{pH} = 3.01$). Επίσης, στις περιπτώσεις, όπου παρατηρείται το φαινόμενο της υπεροξείδωσης, η τιμή του pH αυξάνεται από την χρονική στιγμή, όπου παρατηρείται και η μείωση της συγκέντρωσης οξικού οξέος, λόγω του φαινομένου αυτού.

Τα AAB εμφανίζουν υψηλή δυνατότητα οξείδωσης της αιθανόλης σε οξικό οξύ, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση οξικού οξέος έξω από τα κύτταρα. Αποτέλεσμα αυτού

είναι η μείωση της τιμής pH του μέσου σε τιμές μικρότερες από 4. Σε περιβάλλον χαμηλού pH, το οξικό πρωτονιώνεται και σχηματίζεται οξικό οξύ, το οποίο μπορεί να διαπεράσει το κυτταρικό τοίχωμα και να εισέλθει στο κύτταρο μέσω παθητικής διάχυσης και να μειώσει την τιμή του ενδοκυτταρικού pH απελευθερώνοντας ένα πρωτόνιο και σκοτώνοντας, τελικά, το κύτταρο. Για το λόγο αυτό, απαιτείται τα AAB να έχουν ένα μηχανισμό αντίστασης στην παρουσία οξικού οξέος και να έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν σε ένα περιβάλλον υψηλή συγκέντρωσης οξικού οξέος. Οι μηχανισμοί που διαθέτουν τα AAB για το σκοπό αυτό περιλαμβάνουν την αφομοίωση του οξικού οξέος (αποτοξίνωση), την εκροή του οξικού οξέος και την προστασία ενάντια της διάχυσης οξικού οξέος με τροποποίηση των συνθέσεων λιπιδίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Kanchanarach et al., 2010).



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης στην μεταβολή του pH του μέσου καλλιέργειας. Σύμβολα: αρχική συγκέντρωση αιθανόλης (% w/v) (▲) 1.2, (◇) 2.1, (◆) 3.8, (○) 5.0 και (●) 6.3.

Ύστερα από την γραφική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων, τα κινητικά χαρακτηριστικά παραγωγής οξικού οξέος από το βακτήριο *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509 συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Κινητικά χαρακτηριστικά παραγωγής οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509

	Συγκέντρωση αιθανόλης (% w/v)					
	0	1.2	2.1	3.8	5.0	6.3
μ_{\max} (h^{-1})	0.1639	0.0361	0.0321	0.0213	0.0181	0.0125
t_d (h)	4.23	19.20	21.59	32.54	38.30	55.45
t_{lag} (h)	-	δ.π.	2.01	20.78	12.61	14.91
X_{\max} (g DCW/L)	0.68	1.37	1.35	0.58	0.48	0.49
$Y_{x/s}$ (g DCW/g αιθανόλης)	-	δ.π.*	δ.π.	0.0075	0.0099	0.0093
$Y_{p/s}$ (g οξικού οξέος/g αιθανόλης)	-	δ.π.	0.8228	0.7447	0.6111	0.5760
r_E (g/L/h)	-	0.1125	0.2541	0.2650	0.2661	0.2574

r_A (g/L/h)	-	0.1906	0.2122	0.2107	0.2014	0.1442
Max παραγόμενη C_{AcOH} (g/L)	-	8.90	16.00	25.00	25.64	27.34
Απόδοση διεργασίας (%)	-	69.93	75.84	66.73	51.28	43.67

* δεν προσδιορίστηκε

Τα συμπεράσματα, που εξάγονται για την δράση του βακτηρίου *A. pasteurianus* κατά την μεταβολή της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης κρατώντας σταθερή την περιεκτικότητα του μέσου καλλιέργειας σε μέσο YPM είναι τα εξής:

- Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, μ_{max} , ελαττώνεται καθώς αυξάνεται η αρχική τιμή συγκέντρωσης αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας. Ταυτόχρονα, η τιμή του μεγέθους αυτή είναι αρκετά μεγαλύτερη στην περίπτωση απουσία αιθανόλης από κάθε άλλη περίπτωση. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η αιθανόλη σε μικρή συγκέντρωση αποτελεί δυσκολότερη πηγή άνθρακα για το βακτήριο *A.pasteurianus* συγκριτικά με την μαννιτόλη. Ωστόσο, σε συγκεντρώσεις αιθανόλης 2.1 % w/v και 3.8 % w/v, η κατανάλωση της γίνεται ταχύτερα. Αυτό ισχύει όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης είναι μικρότερη από 40 g/L. Μετά το όριο αυτό, η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης δρα παρεμποδιστικά, οπότε μειώνεται ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και ο ρυθμός σχηματισμού οξικού οξέος.

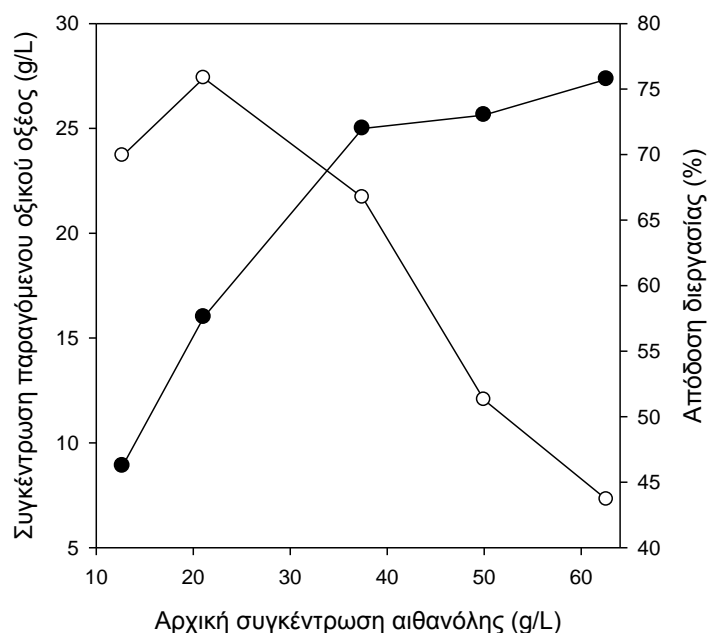
Υπενθυμίζεται ότι η μαννιτόλη αποτελεί την πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη του βακτηρίου στο μέσο YPM και βρίσκεται σε συγκέντρωση 2.5 % w/v σε μέσο καλλιέργειας 100 % YPM, ενώ στο παρόν πείραμα βρίσκεται σε συγκέντρωση 0.7 % w/v.

Ο χρόνος διπλασιασμού αυξάνεται καθώς αυξάνεται η αρχική τιμή συγκέντρωσης αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας, ενώ η τιμή του, στην περίπτωση απουσίας αιθανόλης, είναι σημαντικά μικρότερη από τις υπόλοιπες περιπτώσεις. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού και κατά συνέπεια το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το pH, το O_2 και η θερμοκρασία. Σε κάθε περίπτωση η παροχή οξυγόνου και η θερμοκρασία είναι ίδια. Ωστόσο, παρουσία αιθανόλης, η τιμή του pH του μέσου είναι αρκετά μικρότερη από την τιμή του στο μέσο απουσία αιθανόλης, η οποία κυμαίνεται γύρω στο 7.

- Το χρονικό διάστημα, που απαιτείται για να προσαρμοστεί ο μικροοργανισμός στις συνθήκες του περιβάλλοντος καλλιέργειας, t_{lag} , εμφανίζει μία μέγιστη τιμή στην περίπτωση, όπου η αρχική συγκέντρωσης αιθανόλης ισούται με 3.8 g/L. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο χρόνος t_{lag} είναι μηδενικός απουσία αιθανόλης.
- Η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας είναι αρκετά μεγαλύτερη στις περιπτώσεις αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 1.2 % w/v και 2.1 % w/v, όπου η παρουσία αιθανόλης σε χαμηλές τιμές συγκέντρωσης δρα θετικά στην ανάπτυξή της και όχι παρεμποδιστικά.
- Κύριο ζητούμενο ήταν η παραγωγή οξικού οξέος, πράγμα που σε κάθε περίπτωση επιτεύχθηκε. Για το χρονικό διάστημα, που μελετήθηκε, φαίνεται

ότι η απόδοση της διεργασίας βάση την παραγόμενη συγκέντρωση οξικού οξέος μειώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση αιθανόλης στο μέσο και δρα παρεμποδιστικά. Εξαιρέση αποτελεί η περίπτωση, όπου η αρχική συγκέντρωση αιθανόλης ισούται με 2.1 % w/v. Η απόδοση οξείδωσης αιθανόλης 2.1 % w/v φαίνεται να είναι μεγαλύτερη από την οξείδωση αιθανόλης 1.2 % w/v. Υπενθυμίζεται ότι παρουσία οξικού οξέος δρα είτε ανασταλτικά είτε θετικά στην δραστηριότητα του μικροοργανισμού *Acetobacter*. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 10 g/L το οξικό οξύ βοηθά την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά και την μετέπειτα κατανάλωση αιθανόλης (Z. Qi et al., 2013). Στην περίπτωση αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 2.1% w/v, ανιχνεύθηκε 1 g/L οξικού οξέος την χρονική στιγμή μηδέν, ενώ μηδενική ήταν η αρχική συγκέντρωση οξικού οξέος όταν η αρχική συγκέντρωση αιθανόλης ήταν 1.2 % w/v. Επομένως, θεωρείται ότι η παρουσία οξικού οξέος είχε θετική επίδραση στην κατανάλωση της αιθανόλης και στην παραγωγή επιπλέον ποσότητας οξικού.

Το κύριο συμπέρασμα, που εξήχθη από το πείραμα αυτό, αποτυπώνεται στο διάγραμμα 14. Η παραγωγή οξικού οξέος είναι ανάλογη της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης, όμως η απόδοση της διεργασίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με αυτή. Επομένως, απαιτείται η εύρεση μίας βέλτιστης τιμής αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης, προκειμένου ταυτοχρόνως η οξείδωση της αιθανόλης να οδηγεί σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη παραγωγή οξικού οξέος και η διεργασία να είναι αποδοτική. Σε συνδυασμό με τα δεδομένα του πίνακα 12 οι περιπτώσεις αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 2.1 % w/v και 3.8 % w/v φαίνεται να είναι πιο κοντά στο ζητούμενο αυτό. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η βέλτιστη τιμή αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης βρίσκεται μεταξύ 2.1 g/L και 3.8 g/L.

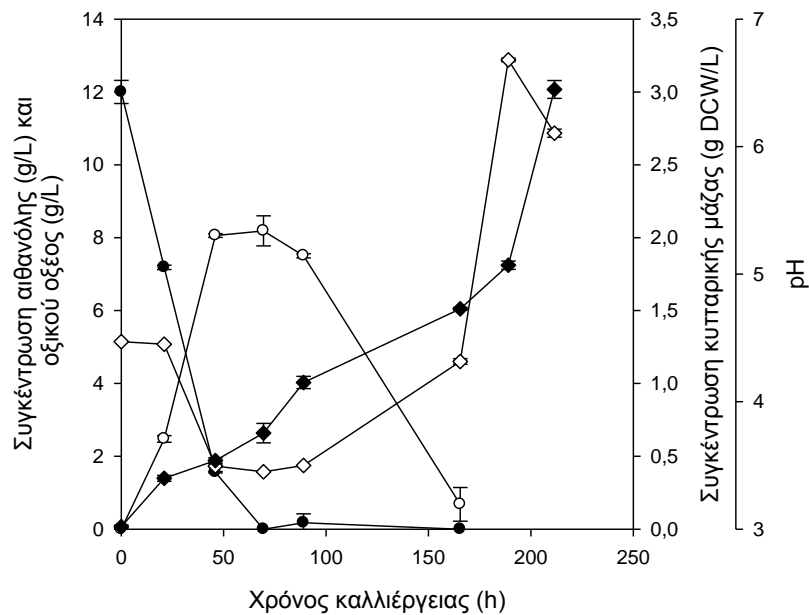


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14: Επίδραση της συγκέντρωσης αιθανόλης στην παραγωγή οξικού οξέος και στην απόδοση της διεργασίας.

Σύμβολα: (●) παραγωγή οξικού οξέος, (○) απόδοση της διεργασίας

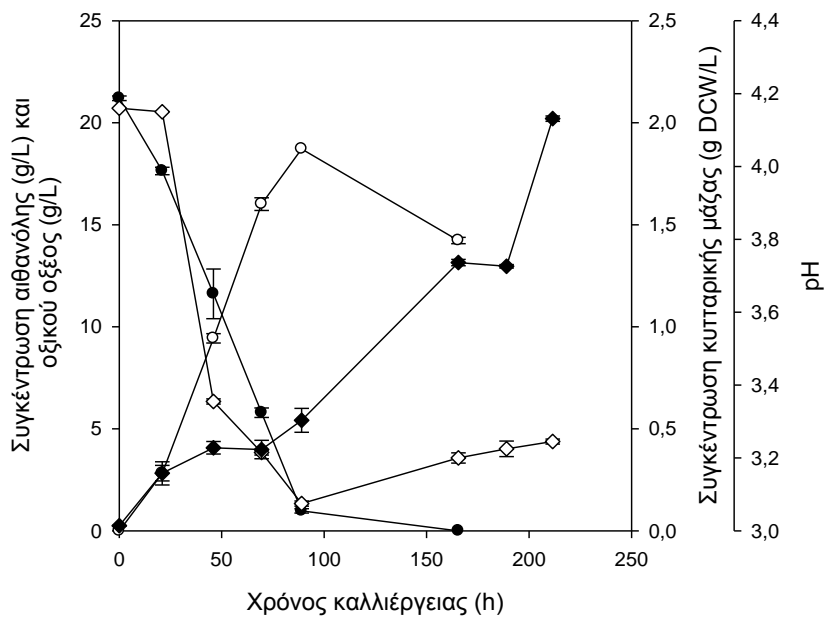
2 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε κρασί και διαφορετικής περιεκτικότητας v/v σε YPM

Αρχικά, παρουσιάζεται διαγραμματικά η επίδραση αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης στην παραγωγή οξικού οξέος από κρασί και στην ανάπτυξη της κυτταρικής μάζας σε κάθε περίπτωση ξεχωριστά.



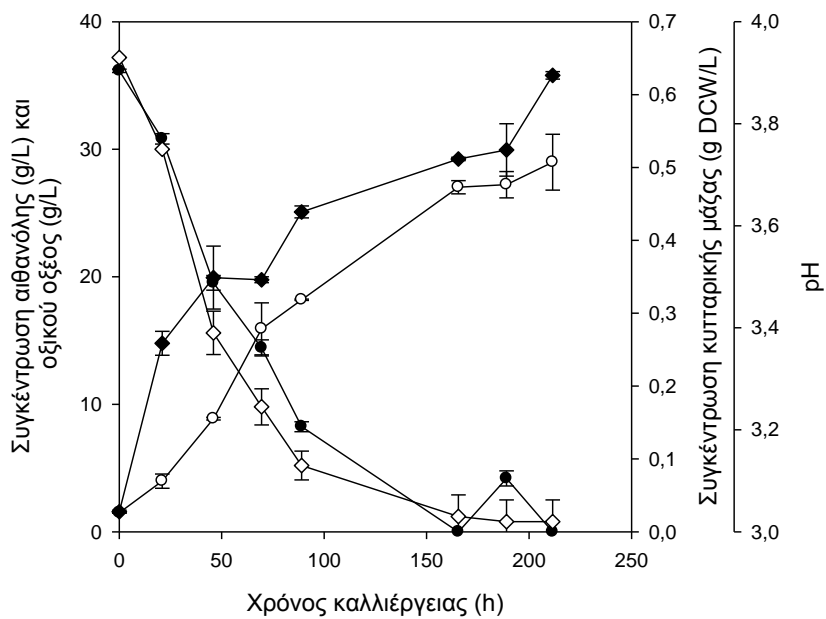
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 15: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1.2% (w/v), και αρχική συγκέντρωση μαννιτόλης 2.15% (w/v).

Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα, (◇) pH



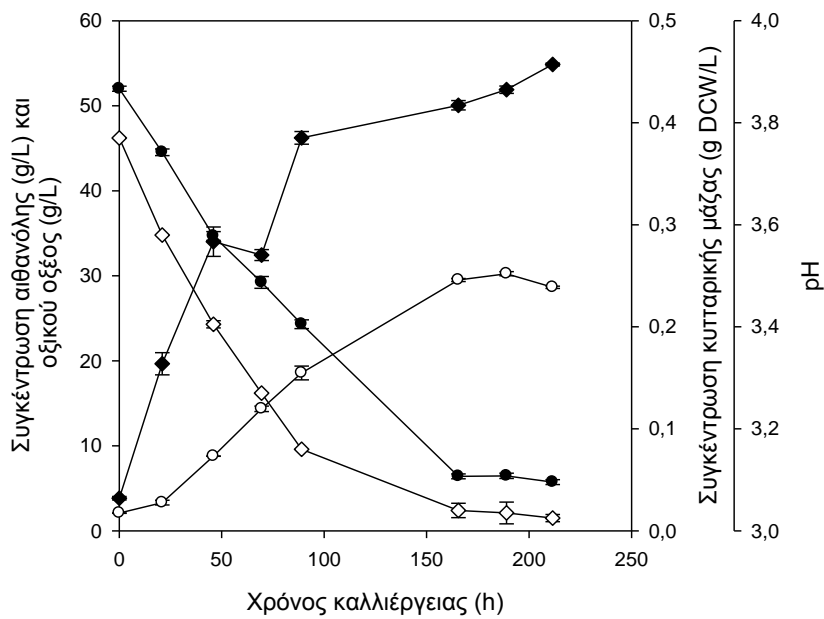
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 16: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 2.1% (w/v), και αρχική συγκέντρωση μαννιτόλης 1.80% (w/v).

Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα, (◇) pH



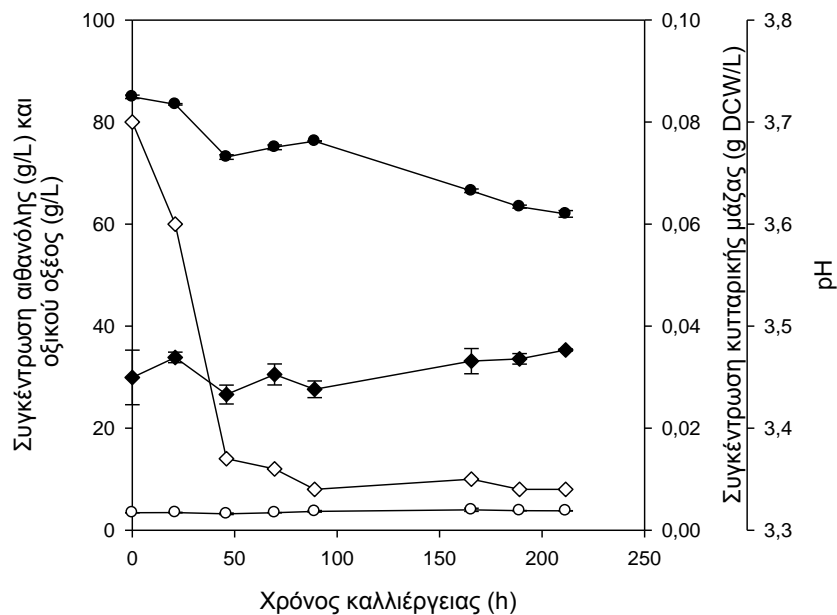
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 17: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 3.6% (w/v), και αρχική συγκέντρωση μαννιτόλης 1.45% (w/v).

Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα, (◇) pH



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 18: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 5.2% (w/v), και αρχική συγκέντρωση μαννιτόλης 1.05% (w/v).

Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα, (◇) pH



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 19: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 8.5% (w/v) και απουσία μαννιτόλης. Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα, (◇) pH

Παρουσία υψηλής αρχικής συγκέντρωσης μαννιτόλης και αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 1.2 % w/v, η ανάπτυξη της κυτταρικής μάζας γίνεται ταχεία επιτυγχάνοντας, μάλιστα, και υψηλή συγκέντρωση κυτταρικής μάζας εντός χρονικού διαστήματος 211 h. Το βακτήριο καταναλώνει γρήγορα την αιθανόλη, η οποία

λειτουργεί ως πηγή άνθρακα και παράγεται οξικό οξύ με αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής pH του μέσου. Η οξείδωση της αιθανόλης διαρκεί περίπου 70 h μέχρι την πλήρη κατανάλωσή της. Στην συνέχεια λαμβάνει χώρα η υπεροξείδωση του οξικού οξέος σε CO₂ και H₂O.

Και στην περίπτωση αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 2.1 % w/v, ο κυτταρικός πληθυσμός αυξάνεται γρήγορα, καθώς το περιβάλλον είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Η οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ πραγματοποιείται εντός χρονικού διαστήματος 90 h και εν συνεχεία παρατηρείται η υπεροξείδωση του οξικού οξέος.

Συγκριτικά με την περίπτωση αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 2.1 % w/v, 28 mL YPM και 44 mL H₂O σημειώνονται ορισμένες διαφορές. Αρχικά, στην περίπτωση μεγαλύτερης περιεκτικότητας του μέσου καλλιέργειας στα θρεπτικά συστατικά του μέσου YPM, η ανάπτυξη της κυτταρικής μάζας γίνεται ταχεία από την χρονική στιγμή t₀ χωρίς να παρατηρείται η λανθάνουσα φάση ανάπτυξης και ο πληθυσμός των κυττάρων είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με την περίπτωση μικρότερης περιεκτικότητας % v/v YPM και ίδιας περιεκτικότητας % v/v κρασιού, όπου το βακτήριο χρειάζεται 2.01 h για να προσαρμοστεί στις συνθήκες του περιβάλλοντος. Όσον αφορά την παραγωγή οξικού οξέος, σημειώνεται ταχύτερος ρυθμός σχηματισμού του και επίτευξη μέγιστης δυνατής συγκέντρωσής του στην περίπτωση μεγαλύτερης περιεκτικότητας % v/v YPM και επακόλουθα η οξείδωση του οξικού οξέος ξεκινά νωρίτερα.

Στην τρίτη περίπτωση, η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών του μέσου YPM είναι μικρότερη. Παρόλα αυτά, τα θρεπτικά συστατικά καταφέρνουν και ενισχύουν την ανάπτυξη του βακτηρίου, η οποία δεν εμφανίζει φάση υστέρησης. Το βακτήριο προσαρμόζεται γρήγορα και σε αυτές τις συνθήκες καλλιέργειας, ενώ ταυτοχρόνως, δεν παρατηρείται σημαντική παρεμπόδιση στην ανάπτυξή του από την αιθανόλη, η οποία αρχικά βρίσκεται σε συγκέντρωση 36 g/L. Ωστόσο, επισημαίνεται ότι στις συνθήκες αυτές ο πληθυσμός των κυττάρων είναι σημαντικά χαμηλότερος, αλλά αυτό δεν εμποδίζει την οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό 29 g/L οξικού οξέος, τιμή συγκέντρωσης οξικού οξέος αρκετά υψηλότερη από την μέγιστη τιμή συγκέντρωσης οξικού οξέος, συγκριτικά με τις προηγούμενες εξεταζόμενες περιπτώσεις

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 17 εξάγεται, επιπλέον, το συμπέρασμα ότι εντός του χρονικού διαστήματος 211.5 h δεν λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της υπεροξείδωσης του οξικού οξέος. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος σημειώνει συνεχώς αύξηση και η τιμή pH του μέσου συνεχώς μειώνεται. Εν αντιθέσει με την περίπτωση αυτή, στην περίπτωση ίδιας αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης, αλλά μικρότερης περιεκτικότητας % v/v YPM, παρατηρείται μείωση του παραγόμενου οξικού οξέος και αύξηση της τιμής pH μόλις μετά από 141 h καλλιέργειας. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται στο Διάγραμμα 17, διότι η συγκέντρωση της εναλλακτικής πηγής άνθρακα – νοώντας την μαννιτόλη του μέσου YPM – είναι υψηλότερη στην περίπτωση αυτή και το βακτήριο, ακόμα και σε περιβάλλον μηδενικής συγκέντρωσης αιθανόλης, προτιμά να καταβολίσει την μαννιτόλη παρά το οξικό οξύ, προκειμένου να παραχθεί η απαιτούμενη ενέργεια για την ανάπτυξή του. Σημαντικό πλεονέκτημα, όμως, της περίπτωσης μικρότερης περιεκτικότητας % v/v YPM είναι η επίτευξη χαμηλότερης

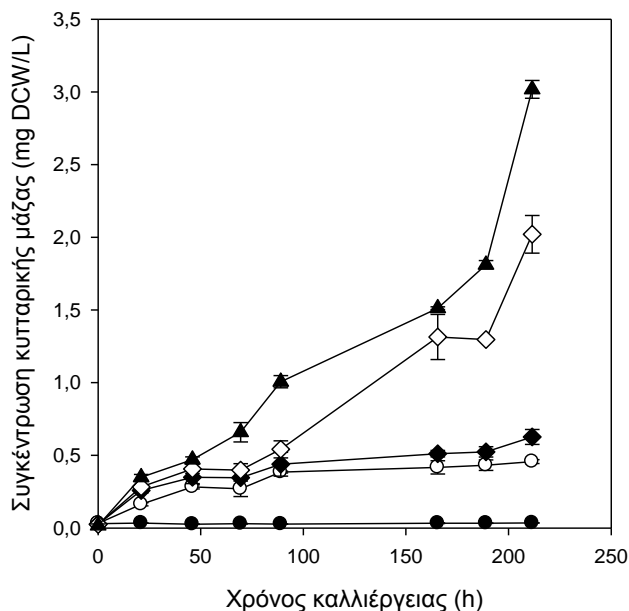
τιμής pH. Η αυξημένη περιεκτικότητα % v/v YPM, το οποίο έχει ουδέτερο pH (pH = 7), του μέσου καλλιέργειας της φαίνεται να εμποδίζει την περαιτέρω μείωση της τιμής pH του.

Στο Διάγραμμα 18 φαίνεται ότι η παραγωγή οξικού οξέος είναι πιο αργή, ιδιαίτερα στις πρώτες 21 h καλλιέργειας, συγκριτικά με τις προηγούμενες περιπτώσεις, όπου η αρχική συγκέντρωση αιθανόλης είναι μικρότερη. Αυτό υποδηλώνει ότι η υψηλή συγκέντρωση αρχικής αιθανόλης (52 g/L) δρα ανασταλτικά στην αντίδραση οξειδωσής της προς οξικό οξύ. Η ανασταλτική αυτή δράση ισχύει όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης είναι μεγαλύτερη από 40 g/L, τιμή η οποία σημειώνεται ακόμα και μετά από 21 h καλλιέργειας. Παρά την αργή, λοιπόν, αντίδραση οξειδωσης αιθανόλης και τον αργό σχηματισμό οξικού οξέος η ανάπτυξη της βιομάζας γίνεται ταχύτατα από την χρονική στιγμή t_0 , κιόλας, χωρίς να παρατηρείται και φάση υστέρησης. Αιτία της γρήγορης ανάπτυξης του κυτταρικού πληθυσμού είναι η παρουσία μέσου YPM σε μεγάλη περιεκτικότητα % v/v. Στην περίπτωση, αυτή, λοιπόν, φαίνεται ότι η οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη του βακτηρίου, διότι η πρώτη παρεμποδίζεται από την υψηλή περιεκτικότητα του μέσου σε αιθανόλη και η δεύτερη ενισχύεται από την υψηλή περιεκτικότητα του μέσου σε μαννιτόλη. Παρόλα αυτά, γίνεται παραγωγή οξικού οξέος μέγιστης συγκέντρωσης 30 g/L ύστερα από 189 h καλλιέργειας. Στην συνέχεια, σημειώνεται μικρή μείωση της συγκέντρωσης οξικού οξέος και αύξηση της τιμής, λόγω πιθανής υπεροξειδωσης του οξικού οξέος. Η υπεροξειδωση θεωρείται πιθανή, διότι δεν γνωρίζεται η συγκέντρωση της μαννιτόλης στο μέσο κάθε χρονική στιγμή, οπότε και πότε καταναλώνεται πλήρως. Ωστόσο, θεωρώντας ότι η μαννιτόλη έχει καταναλωθεί κατά το χρονικό διάστημα, όπου η συγκέντρωση αιθανόλης είναι μεγάλη (> 40 g/L) και δρα ανασταλτικά, προκειμένου η κυτταρική μάζα να αναπτυχθεί γρήγορα, θεωρείται ότι η μείωση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος οφείλεται, όντως, στην υπεροξειδωσή του. Το φαινόμενο αυτό θα ήταν ευκρινέστερο μετά τις 211 h καλλιέργειας.

Από το Διάγραμμα 19 διαπιστώνεται ότι η ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού και η οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ είναι αδύνατες σε περιβάλλον αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 85 g/L σε χρονικό διάστημα μικρότερο από 211 h σε περιβάλλον αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 85 g/L. Η παρεμπόδιση που προκαλεί η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης καθιστά τις συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού αντίξοες.

Από τη μορφή του διαγράμματος 20 εξάγεται το συμπέρασμα ότι αυξανόμενης της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας μειώνεται τόσο ο ρυθμός ανάπτυξης της κυτταρικής μάζας όσο και ο πληθυσμός της σε κάθε χρονική στιγμή. Στο διάγραμμα δεν διακρίνεται φάση υστέρησης σε καμία περίπτωση, όπου η περιεκτικότητα του μέσου σε μαννιτόλη είναι μεγάλη. Τέλος, σε καμία περίπτωση δεν αποτυπώνεται η φάση θανάτου. Ακόμα και μετά την εξάντληση της αιθανόλης, η κυτταρική μάζα συντηρείται και αναπτύσσεται καταβολίζοντας το οξικό οξύ (φαινόμενο υπεροξειδωσης οξικού οξέος).

Συγκριτικά με τα αποτελέσματα του Διαγράμματος 11 σημειώνονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κυτταρικής μάζας, μιας και η περιεκτικότητα του μέσου στα θρεπτικά συστατικά του μέσου YPM είναι μεγαλύτερη, γεγονός που ενισχύει την ανάπτυξη της βιομάζας.



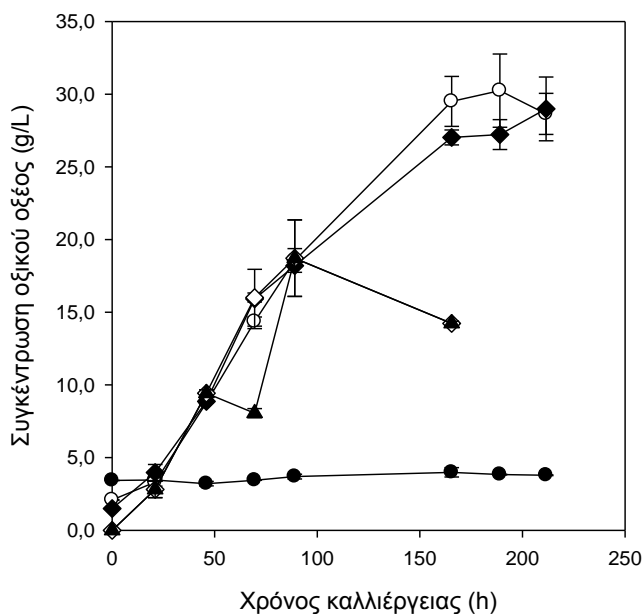
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 20: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης και YPM στην παραγωγή κυτταρικής μάζας του βακτηρίου *A. pasteurianus* DSM 3509.
 Σύμβολα: αρχική συγκέντρωση αιθανόλης (% w/v) (▲) 1.2, (◇) 2.1, (◆) 3.8, (○) 5.0 και (●) 8.5.

Μεταβάλλοντας την αρχική περιεκτικότητα του μέσου YPM στο μέσο καλλιέργειας, μεταβάλλεται και η συγκέντρωση του εκχυλίσματος ζύμης, το οποίο αποτελεί σημαντικό θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη της βιομάζας και την παραγωγή οξικού οξέος. Σαφέστερα το εκχύλισμα ζύμης αποτελεί πηγή οργανικού αζώτου, αμινοξέων, βιταμινών και πολλών άλλων αυξητικών παραγόντων μικρότερου μοριακού βάρους (Hassan M. Awad et al., 2012). Έτσι δικαιολογείται η αυξημένη παραγωγή οξέος και η αυξημένη συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας, όταν στο μέσο καλλιέργειας προστίθεται μεγαλύτερη ποσότητα μέσου YPM. Ωστόσο, σημειώνεται ότι οι μεταβολές της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος ζύμης στην παρούσα πειραματική διαδικασία είναι μικρές. Για το λόγο αυτό οι διαφορές, που σημειώνονται στις τιμές της μέγιστης παραγόμενης συγκέντρωσης οξικού οξέος και στην μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας είναι μικρές. Οι (Hassan M. Awad et al., 2012) αναφέρουν μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας με προσθήκη 15 g/L εκχυλίσματος ζύμης και μέγιστη παραγωγή οξικού οξέος με προσθήκη 12 g/L εκχυλίσματος ζύμης.

Ανάλογη επίδραση έχει και η συγκέντρωση της πεπτόνης στην παραγωγή οξικού οξέος και στην ανάπτυξη του βακτηρίου. Οι (Hassan M. Awad et al., 2012) αναφέρουν μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας με προσθήκη 6 g/L πεπτόνης και μέγιστη παραγωγή οξικού οξέος με προσθήκη 5 g/L πεπτόνης.

Ός προς την παραγωγή οξικού οξέος εξάγονται ανάλογα συμπεράσματα. Αυξανόμενη της αρχικής τιμής συγκέντρωσης αιθανόλης αυξάνεται η τελική τιμή

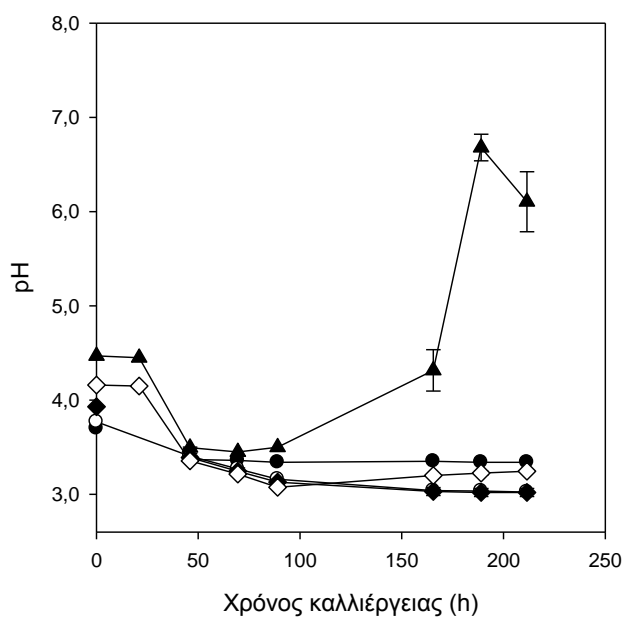
συγκέντρωσης οξικού οξέος. Στις περιπτώσεις πλήρους οξείδωσης αιθανόλης παρατηρείται ύστερα μείωση της παραγόμενης συγκέντρωσης οξικού οξέος, λόγω υπεροξείδωσης του προς σχηματισμό CO_2 και H_2O .



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 21: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης και μαννιτόλης στην παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509.

Σύμβολα: αρχική συγκέντρωση αιθανόλης (% w/v) (▲) 1.2, (◇) 2.1, (◆) 3.6, (○) 5.2 και (●) 8.5.

Παρόμοια και η μεταβολή του pH εμφανίζονται στα Διαγράμματα 13 και 22.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 22: Επίδραση της αρχικής ποσότητας αιθανόλης και μαννιτόλης στην μεταβολή του pH του μέσου καλλιέργειας.

Σύμβολα: αρχική συγκέντρωση αιθανόλης (% w/v) (▲) 1.2, (◇) 2.1, (◆) 3.6, (○) 5.2 και (●) 8.5.

Ύστερα από την γραφική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων, τα κινητικά χαρακτηριστικά παραγωγής οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Κινητικά χαρακτηριστικά παραγωγής οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509

	Συγκέντρωση αιθανόλης (% w/v)						
	0	1.2	2.1	3.6	5.2	6.3	8.5
C_{mannitol} (g/L)	25	21.5	18.0	14.5	10.5	7.0	-
C_{yeast} (g/L)	5	0.43	3.6	2.9	2.1	1.4	-
C_{peptone} (g/L)	3	0.258	2.16	1.74	1.26	0.84	-
μ_{max} (h^{-1})	0.1639	0.0385	0.0235	0.1065	0.012	0.015	0.0014
t_d (h)	4.23	18.00	29.50	6.51	57.76	46.21	495.11
t_{lag} (h)	-	-	-	-	-	11.60	95
X_{max} (g DCW/L)	0.68	3.02	2.02	0.62	0.46	0.67	0.035
$Y_{X/E}$ (g DCW/g αιθανόλης)	-	δ.π.*	δ.π.	0.0074	0.0066	0.0062	-
$Y_{E/A}$ (g οξικού οξέος/g αιθανόλης)	-	0.7783	0.7488	0.6192	0.7031	0.6491	-
r_E (g/L/h)*	-	0.2268	0.2309	0.3195	0.2713	0.2495	-
r_A (g/L/h)	-	0.1767	0.2244	0.2009	0.1750	0.1869	-
Max παραγόμενη C_{AcOH} (g/L)	-	8.19	18.72	27.49	28.16	33.00	0.56
Απόδοση διεργασίας (%)		68.23	88.30	76.05	54.15	52.41	0.66

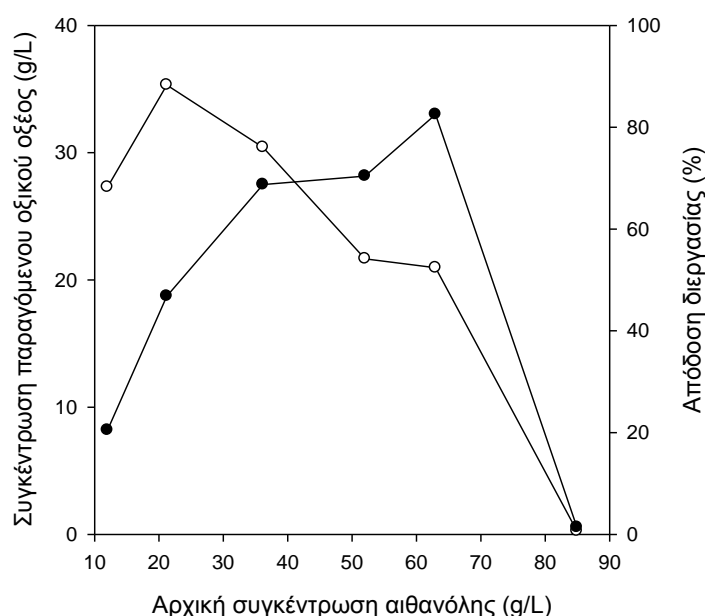
Τα κινητικά χαρακτηριστικά της παραγωγής οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* στην περίπτωση μεταβλητής αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης και μεταβλητής αρχικής συγκέντρωσης μέσου YPM είναι παρόμοια και οι τιμές των μεγεθών, που εξετάζονται, είναι ίδιας τάξης μεγέθους με τις αντίστοιχες τιμές του Πίνακα 6 (αντίστοιχη πειραματική μελέτη του βακτηρίου υπό συνθήκες, όμως, σταθερής συγκέντρωσης μέσου YPM).

Ωστόσο, μπορούν να διακριθούν κάποιες χαρακτηριστικές διαφορές. Η αποδοτικότητα της διεργασίας βάση την παραγόμενη ποσότητα οξικού οξέος είναι μεγαλύτερη, στην περίπτωση μεγαλύτερης συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών στο μέσο καλλιέργειας. Το μέσο YPM, που προστίθεται, προκειμένου το τελικό μέσο καλλιέργειας να έχει συγκεκριμένη περιεκτικότητα % w/v αιθανόλη, είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Ιδιαίτερα, η μαννιτόλη λειτουργεί ως πηγή άνθρακα και βοηθά στην γρήγορη ανάπτυξη του μικροοργανισμού, χωρίς, μάλιστα, να σημειωθεί χρόνος προσαρμογής του βακτηρίου στο περιβάλλον καλλιέργειας. Για τον ίδιο λόγο, ο μέγιστος πληθυσμός της βιομάζας, που επιτυγχάνεται είναι αυξημένος συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές του Πίνακα 6. Από την μορφή του διαγράμματος 20 φαίνεται ότι η προσαρμογή του βακτηρίου στις συνθήκες καλλιέργειας είναι αρκετά επιτυχημένη, οπότε σε μικρό χρονικό διάστημα, το οποίο δεν ανιχνεύθηκε, η ανάπτυξη του είναι εκθετική και η οξείδωση της αιθανόλης προς σχηματισμό οξικού

οξέος γίνεται με υψηλότερους ρυθμούς από αυτούς, που σημειώνονται στον Πίνακα 6. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τιμές των κινητικών χαρακτηριστικών μ_{max} και t_d στην περίπτωση, όπου το μέσο καλλιέργειας περιέχει 36 g/L αιθανόλη και 14.5 g/L μαννιτόλη. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της πηγής άνθρακα, τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του οξικού οξέος μπορεί να παραχθεί (Hassan M. Awad et al., 2012). Ωστόσο, σε μέσο μεγαλύτερης αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης, η αιθανόλη δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη του βακτηρίου, οπότε το βακτήριο χρειάζεται μεγαλύτερο χρόνο για να προσαρμοστεί στις συνθήκες αυτές.

Το κύριο συμπέρασμα, που εξήχθη από το πείραμα αυτό, αποτυπώνεται στο διάγραμμα 23. Η παραγωγή οξικού οξέος είναι ανάλογη της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης μέχρι αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 63 g/L. Η προσπάθεια προσαρμογής του βακτηρίου *A. pasteurianus* και η παραγωγή οξικού οξέος εντός 234 h καλλιέργειας σε κρασί περιεκτικότητας σε αιθανόλη 85 g/L και χωρίς την προσθήκη άλλων θρεπτικών συστατικών δεν επιτεύχθηκε. Η απόδοση της διεργασίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με την παραγωγή οξικού οξέος, εξαιρώντας τις περιπτώσεις χρήσης υποστρώματος 36 g/L αιθανόλης και 58 % v/v YPM, 21 g/L αιθανόλης και 72 % v/v YPM.

Συγκρίνοντας τα δεδομένα του Πίνακα 12 και του Πίνακα 13, θεωρείται ότι η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *A. pasteurianus* σε μέσο περιεκτικότητας 28 % v/v κρασί 21 g/L σε αιθανόλη και 72 % v/v YPM ήταν η αποδοτικότερη.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 23: Επίδραση της συγκέντρωσης αιθανόλης και μαννιτόλης στην παραγωγή οξικού οξέος και στην απόδοση της διεργασίας.

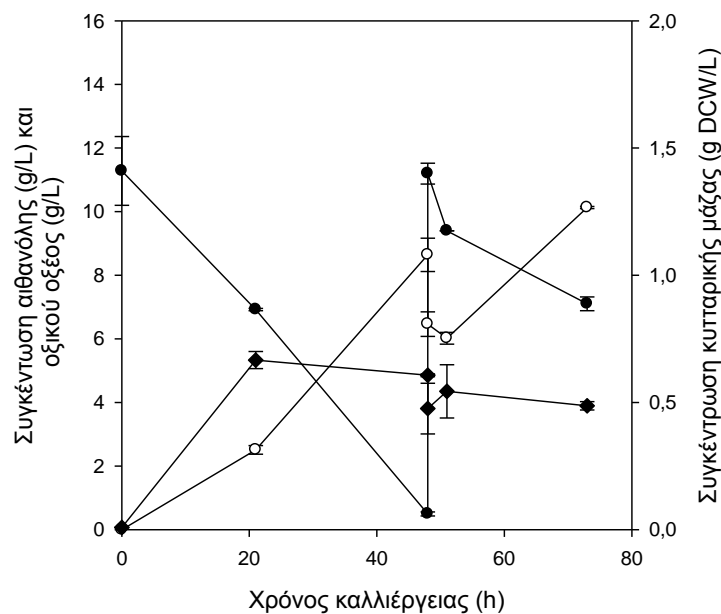
Σύμβολα: (●) παραγωγή οξικού οξέος, (○) απόδοση της διεργασίας.

3 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας ημιδιαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης ίδιας περιεκτικότητας v/v σε φιλτραρισμένο και αφιλτράριστο κρασί

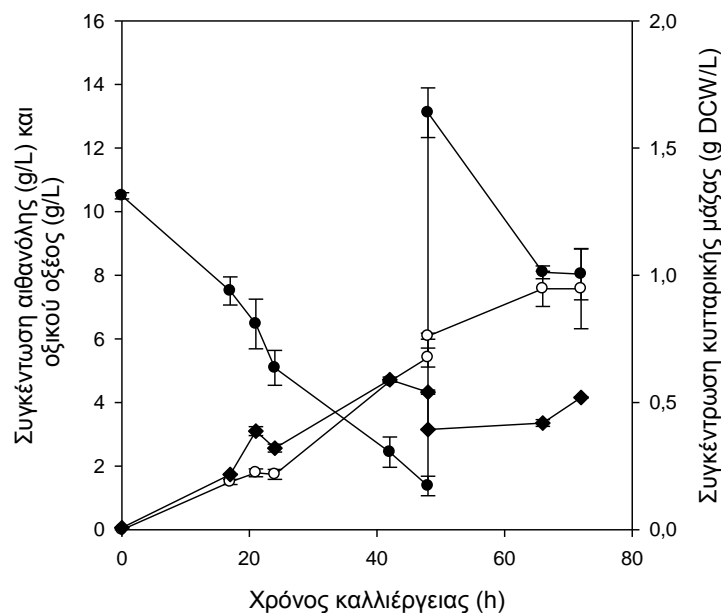
Το φιλτράρισμα του κρασιού δεν αποτελεί απαραίτητη διαδικασία πριν την οξοποίηση του. Σκοπός του φιλτραρίσματος είναι η μείωση του μικροβιακού φορτίου του κρασιού, το οποίο είτε δρα θετικά είτε αρνητικά στην διαδικασία οξείδωσης της περιεχόμενης αιθανόλης. Σημειώνεται, παράλληλα, ότι η αποστείρωση του κρασιού για τον σκοπό αυτό κρίνεται αδύνατη, καθώς αυτό θα οδηγήσει σε απώλεια της περιεχόμενης αιθανόλης, λόγω πτητικότητας, πράγμα το οποίο, προφανώς, δεν επιθυμείται. Επομένως, μοναδικός τρόπος μείωσης του μικροβιακού περιεχομένου του κρασιού αποτελεί το φιλτράρισμά του, διαδικασία, που αποτελεί επιπλέον κόστος για την παραγωγή ξυδιού. Επισημαίνεται, όμως, ότι στην παρούσα διπλωματική εργασία, οι παραλαμβανόμενες πρώτες ύλες έχουν φυγοκεντρηθεί πριν την χρησιμοποίησή τους, οπότε ένα μεγάλο μέρος του μικροβιακού φορτίου έχει παρασυρθεί με το στερεό υπόλειμμα, το οποίο και απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό.

Τα αποτελέσματα της οξοποίησης φιλτραρισμένου κρασιού συνοψίζονται στο Διάγραμμα 25. Διαπιστώνεται ότι η ανάπτυξη της βιομάζας του *A. pasteurianus* και η παραγωγή οξικού οξέος είναι δυνατή. Ταυτόχρονα, όμως, το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται και από την οξοποίηση αφιλτράριστου κρασιού (Διάγραμμα 24). Η διαφορά εντοπίζεται στην τελική παραγόμενη συγκέντρωση οξικού οξέος και στην συγκέντρωση της βιομάζας. Πιο αναλυτικά, κατά την ζύμωση αφιλτράριστου κρασιού παράγονται ύστερα από δύο κύκλους οξοποίησης 10.13 g/L οξικού οξέος, ενώ κατά την ζύμωση φιλτραρισμένου κρασιού παράγονται ύστερα από δύο κύκλους οξοποίησης 7.57 g/L οξικού οξέος. Φαίνεται, λοιπόν, ότι το μικροβιακό φορτίο του κρασιού ενισχύει την παραγωγή οξικού οξέος. Σε κάθε κύκλο, οι ρυθμοί κατανάλωσης αιθανόλης και σχηματισμού οξικού οξέος ήταν μεγαλύτεροι στην περίπτωση αφιλτράριστου κρασιού.

Επομένως, συμπεράθηκε ότι το φιλτράρισμα του οίνου δεν παρουσιάζει σημαντική θετική επίδραση στην διαδικασία της οξοποίησης. Για το λόγο αυτό, θεωρείται ότι μπορεί να παραληφθεί.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 24: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσο YPM περιεκτικότητας 14 % v/v αφιλτράριστο κρασί
 Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 25: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσο YPM περιεκτικότητας 14 % v/v φιλτραρισμένο κρασί
 Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα

Από τον πίνακα 13 παρατηρείται ότι οι μέγιστοι ρυθμοί ανάπτυξης της βιομάζας δεν διαφέρουν σημαντικά, ωστόσο διαφορά επισημαίνεται μεταξύ αυτών και της αντίστοιχης τιμής, η οποία προκύπτει από καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε μέσο 14 % v/v αφιλτράριστο κρασί διαφορετικού pH. Υπενθυμίζεται ότι η μελέτη επίδρασης φιλτραρίσματος του οίνου πραγματοποιήθηκε ύστερα από ρύθμιση της

τιμής pH των μέσων καλλιέργειας. Αντίθετα, κατά την μελέτη επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας η τιμή του pH δεν ρυθμίστηκε. Σαφέστερα, στην περίπτωση, όπου το αρχικό pH του μέσου ισούται με 4.47 (14 ml αφιλτράριστο λευκό κρασί, 86 ml YPM), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ισούται με 0.0385 h^{-1} , τιμή μικρότερη από τις αντίστοιχες τιμές του Πίνακα 6 στον πρώτο κύκλο οξοποίησης. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι το όξινο περιβάλλον δρα αρνητικά στην ανάπτυξη του βακτηρίου, χωρίς, όμως, αυτό να σημαίνει ότι η ανάπτυξή του είναι ανέφικτη (M. Gullo & Giudici, 2008). Για τον ίδιο λόγο, διαφορά σημειώνεται και στον χρόνο διπλασιασμού. Όντας η ανάπτυξη αργότερη σε όξινο περιβάλλον, απαιτείται σχεδόν ο διπλάσιος χρόνος ($t_d = 18 \text{ h}$) για να διπλασιαστεί η βιομάζα. Λόγω της παραγωγής οξικού οξέος στον πρώτο κύκλο οξοποίησης, η τιμή pH των μέσων ελαττώνεται. Αιτία της μείωσης της τιμής μ_{\max} και της αύξησης του χρόνου διπλασιασμού θεωρείται το όξινο περιβάλλον.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Κινητικά χαρακτηριστικά παραγωγής οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 σε μέσο περιεκτικότητας 14 % v/v φιλτραρισμένου και αφιλτράριστου κρασιού

	1 ^{ος} κύκλος οξοποίησης		2 ^{ος} κύκλος οξοποίησης	
	Αφιλτράριστο κρασί	Φιλτραρισμένο κρασί	Αφιλτράριστο κρασί	Φιλτραρισμένο κρασί
$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	0.092	0.096	-	0.008
$t_d (\text{h})$	7.53	7.22	*δ.π.	86.64
$t_{lag} (\text{h})$	-	-	-	52.9
$r_E (\text{g/L/h})$	0.240	0.178	0.141	0.227
$r_A (\text{g/L/h})$	0.193	0.116	0.161	0.066

* Δεν προσδιορίστηκε

4 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 από διαφορετικά εμβόλια με εφαρμογή ασυνεχούς διεργασίας σε μέσο ανάπτυξης 14 % v/v κρασιού

Παρατηρείται ότι σε κάθε κύκλο οξοποίησης η κατανάλωση της αιθανόλης και ο σχηματισμός οξικού οξέος γίνονται γρηγορότερα στην περίπτωση, όπου χρησιμοποιείται εμβόλιο προκαλλιέργειας στο ίδιο μέσο νέας καλλιέργειας.

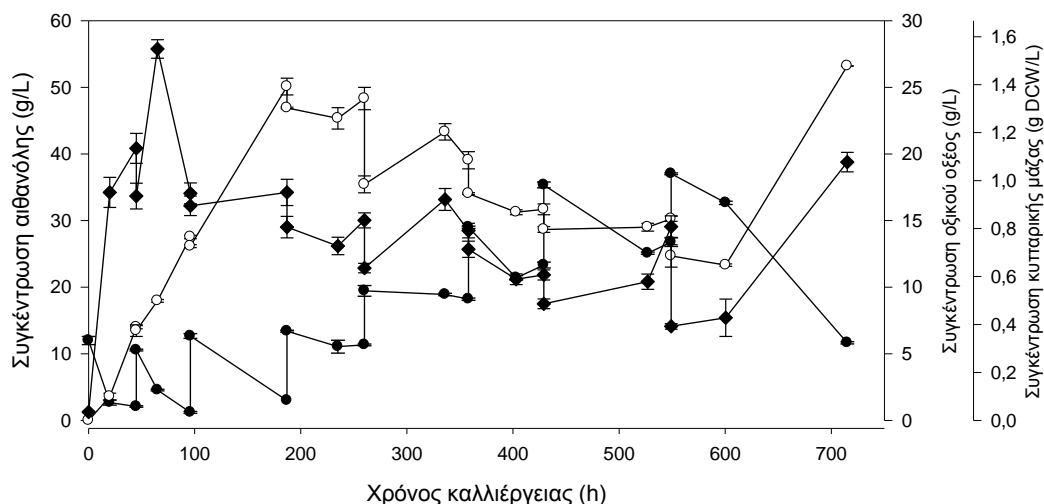
Μετά από 715 h ζύμωσης επιτεύχθηκε η παραγωγή οξικού οξέος και στις δύο περιπτώσεις. Ωστόσο, σημαντικά μειωμένη είναι η τελική συγκέντρωση οξικού οξέος, που επιτυγχάνεται στην περίπτωση, όπου ο εμβολιασμός γίνεται από προκαλλιέργεια σε καθαρό μέσο YPM, συγκριτικά με την δεύτερη περίπτωση, όπου ο εμβολιασμός γίνεται από προκαλλιέργεια σε μέσο YPM περιεκτικότητας 14 % v/v κρασί. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η προσαρμογή του *A. pasteurianus* στο μέσο καλλιέργειας είναι ευκολότερη, όταν η προκαλλιέργεια του γίνεται σε ίδιο μέσο. Οι (Kondo T. & Ikeda, 1999) αναφέρουν ότι το βακτήριο *A. pasteurianus* έχει μεγαλύτερη απόκριση στην αιθανόλη και στην ακεταλδεΐδη όταν καλλιεργείται σε

μέσο, το οποίο περιέχει αιθανόλη, παρά όταν καλλιεργείται σε μέσο, που περιέχει γλυκόζη. Κάτι αντίστοιχο φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση καλλιέργειας του σε μέσο μαννιτόλης.

Κατά τις πρώτες, κίολας, ώρες της ζύμωσης, ο κυτταρικός πληθυσμός αυξάνεται ταχεία επιτυγχάνοντας μεγάλες τιμές συγκεντρώσεων και στις δύο περιπτώσεις. Το πλούσιο περιβάλλον σε θρεπτικά συστατικά και η αρχική τιμή του pH (pH = 6.9), η οποία προσεγγίζει το βέλτιστο εύρος pH για την ανάπτυξη του βακτηρίου ευθύνονται για την συμπεριφορά αυτή. Ωστόσο, σε ημι-συνεχή διεργασία, για την επίτευξη υψηλής οξείδωσης αιθανόλης προς οξικό οξύ δεν είναι απαραίτητη η γρήγορη ανάπτυξη της βιομάζας. (Z. Qi et al., 2013). Μάλιστα, το γεγονός αυτό αποδεικνύεται παρατηρώντας τον ρυθμό ανάπτυξης της βιομάζας σε κάθε κύκλο οξοποίησης. Παραδειγματικά, στον τρίτο κύκλο οξοποίησης (Δt : 96 -187 h) φαίνεται ότι ο ρυθμός σχηματισμού οξικού οξέος είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό ανάπτυξης βιομάζας (παρατηρώντας τις κλίσεις στα διαγράμματα).

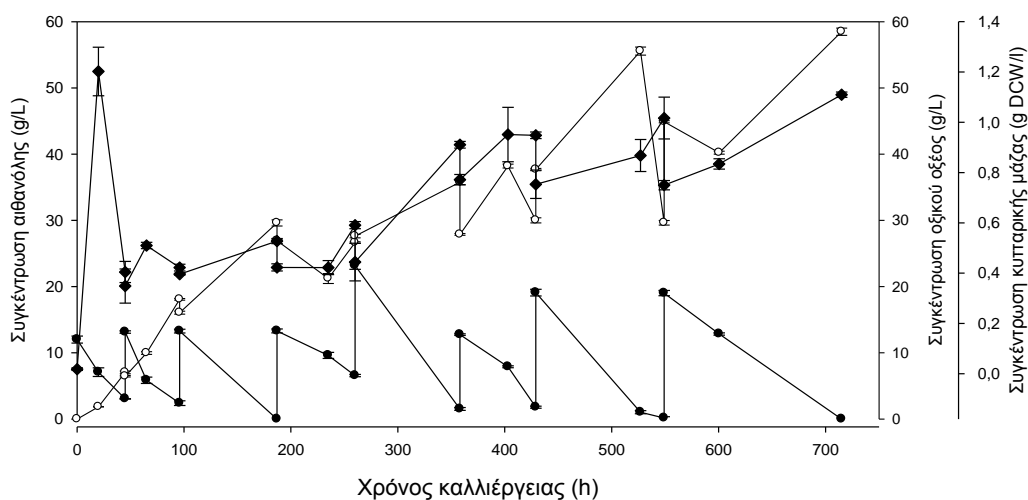
Στην ημι-συνεχή διεργασία, η αρχική αναλογία αιθανόλης / οξικού οξέος ρυθμίζεται από την αφαίρεση ποσότητας ζυμωμένου μέσου και προσθήκης νέας ποσότητας αζύμωτου κρασιού. Η αναλογία αυτή επηρεάζει τον ρυθμό οξοποίησης μέσω της ρύθμισης της ανάπτυξης της βιομάζας. Σαφέστερα, τα κύτταρα μπορεί να χρειαστούν λιγότερο ή περισσότερο χρόνο, ώστε να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες ανάπτυξης, ανάλογα με την αντιξοότητά τους (Z. Qi et al., 2013).

Βέλτιστες τιμές συγκεντρώσεων αιθανόλης και οξικού οξέος για την ανάπτυξη του βακτηρίου *Acetobacter* είναι 13 g/L και 10 g/L, αντίστοιχα Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ξεκινά η παρεμποδιστική δράση του υποστρώματος και του προϊόντος (Ignacio de Ory et al., 2002). Στους χρόνους, λοιπόν, που επιτυγχάνονται οι συγκεντρώσεις αυτές ή μικρότερες τιμές αυτών, παρατηρείται ότι η οξείδωση της αιθανόλης προς οξικό οξύ γίνεται αποδοτικότερα. Επιπλέον, κάθε χρονική στιγμή δεν επιτυγχάνεται πλήρης οξείδωση της αιθανόλης. Η παραμονή ενός μικρού ποσού αιθανόλης στο μέσο ύστερα από κάθε κύκλο οξοποίησης συμβάλλει στην αποφυγή του καταβολισμού του οξικού οξέος, καθώς η μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης σε τιμές μικρότερες από 1% w/v οδηγεί στον καταβολισμό του οξικού οξέος (Mas et al., 2014). Παρουσία αιθανόλης και οξικού οξέος, ταυτόχρονα, φαίνεται ότι το βακτήριο προτιμά την αιθανόλη ως πηγή άνθρακα καταναλώνοντάς τη και παράγοντας, τελικά, επιπλέον ποσότητα οξικού οξέος.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 26: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εμβόλιο από προκαλλιέργεια σε μέσο YPM και εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1.2% (w/v).

Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 27: Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509 με εμβόλιο από προκαλλιέργεια σε μέσο 14% v/v κρασί και εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου και αρχική συγκέντρωση αιθανόλης 1.2% (w/v).

Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) κυτταρική μάζα

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται ορισμένα χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων, σε κάθε περίπτωση και συγκρίνονται με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά ενός έτοιμου ξυδιού και της πρώτης ύλης, που χρησιμοποιήθηκε.

Όσον αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων ξυδιών, που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα, δεν σημειώνονται μεγάλες διαφορές. Επομένως, το εμβόλιο της καλλιέργειας για την οξική ζύμωση φαίνεται να μην επιδρά στην δημιουργία των χαρακτηριστικών αυτών.

Κατά την παραγωγή του ξυδιού είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν οι φαινολικές ενώσεις, καθώς σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενισχύουν το χρώμα του ξυδιού, δίνουν στιφτή και πικρή γεύση, ενώ μπορεί να προκαλέσουν και οξειδωτικές δράσεις, οι οποίες θα είναι επιζήμιες στην ποιότητα του προϊόντος. Επιπλέον, το περιεχόμενο αυτών των φαινολικών ενώσεων του οίνου μπορεί να μειωθεί ή να δημιουργηθούν νέες φαινολικές ενώσεις. Ως εκ τούτου, η περίσσεια των φαινολικών ενώσεων πρέπει να αφαιρεθεί, προκειμένου να αυξηθεί η χημική σταθερότητα και η διάρκεια ζωής του προϊόντος. Για το σκοπό αυτό, συχνά χρησιμοποιείται ενεργός άνθρακας, οποίο προσροφά τις ενώσεις αυτές (Achaerandio et al., 2002; Skenderi, 2013). Παρά ταύτα, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το περιεχόμενο των κρασιών και των ξυδιών σε φαινόλες σχετίζεται με την αντιοξειδωτική τους δράση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Χαρακτηριστικά τελικού προϊόντος, πρώτης ύλης (κρασί) και ξύδι εμπορίου

	Προϊόν από εμβολιασμό από προκαλλιέργεια σε καθαρό YPM	Προϊόν από εμβολιασμό από προκαλλιέργεια σε YPM περιεκτικότητας 14 % v/v κρασί	Κρασί (α' ύλη)	Έτοιμο λευκό ξύδι κρασιού
pH	3.24	2.96	3.70	2.76
Ολική οξύτητα (g οξικού οξέος /100 mL)	2.8	7.2		6
Τελική συγκέντρωση οξικού οξέος (g/L)	26.60	58.49	-	51.53
Τελική συγκέντρωση αιθανόλης (g/L)	11.65	-	9.3	0.20
A ₄₂₀	0.577	0.576		
A ₅₂₀	0.315	0.282		
A ₆₂₀	0.207	0.186		
Ένταση χρώματος (E)	1.09	1.04	0.418	0.067
Απόχρωση (A)	1.85	2.05	3.54	8.43
Πυκνότητα χρώματος	0.888	0.858	0.359	
ΔΦΟ	29.30	29.05	21.75	26.05

Ωστόσο, τα προϊόντα, που παρήχθησαν στην παρούσα διπλωματική εργασία δεν έχουν υποβληθεί σε κάποια διεργασία αποχρωματισμού. Η μέτρηση των χρωματικών χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε ύστερα από φυγοκέντρησή τους. Βάση αυτού εξηγούνται οι μεγάλες τιμές της Έντασης χρώματος. Επιπλέον, σημειώνεται ότι τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 420 nm των παραγόμενων ξυδιών είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή του κρασιού ($A_{420} = 0.280$). Το κίτρινο χρώμα στο κρασί και το ξύδι προέρχεται από την παρουσία τανινών (πολυμερή φλαβονοειδών-προκυανιδινών και μη φλαβονοειδή φαινόλες). Το γεγονός αυτό κρίνεται φυσιολογικό, καθώς όσο πιο οξειδωμένος είναι ένας λευκός οίνος τόσο πιο μεγάλη απορρόφηση παρουσιάζει στα 420 nm. Ταυτοχρόνως, σημειώνονται μεγαλύτερες τιμές A_{420} από A_{520} . Αυτό υποδεικνύει ότι τα ξύδια προέρχονται από λευκό κρασί, καθώς το φάσμα απορρόφησης των ερυθρών οίνων, επακόλουθα και των κόκκινων

ξυδιών, παρουσιάζει μέγιστο στα 520 nm (ερυθρό), ενώ το φάσμα απορρόφησης των λευκών οίνων, επακόλουθα και των λευκών ξυδιών, παρουσιάζει μέγιστο στα 420 nm (κίτρινο). Επακόλουθα, οι τιμές απόχρωσης είναι μεγαλύτερες από τη μονάδα και εντός του εύρους 0.00-9.99. Όσον αφορά την πυκνότητα του χρώματος, η τιμή της εκτείνεται σε εύρος 0.000 – 1.000 για τα λευκά κρασιά και ξύδια (http://www.hannacan.com/fiches_techniques/RHACCP%20&%20Food%20Quality%20Products/HI83742.pdf). Τα παραγόμενα προϊόντα βρίσκονται εντός των ορίων αυτών.

Σημειώνεται ότι δεν υπάρχουν νομοθετικά όρια για τις τιμές των μεγεθών αυτών. Αποτελούν οργανοληπτικά μεγέθη, που αποτυπώνουν το προφίλ των προϊόντων και αφορούν την αποδοχή τους από τους καταναλωτές. Για το λόγο αυτό, οι τιμές των μεγεθών αυτών οριοθετούνται από την εκάστοτε οξοποιία.

Όσον αφορά στην τιμή pH των τελικών προϊόντων, παρατηρείται ότι το pH του τελικού προϊόντος της δεύτερης περίπτωσης προσεγγίζει περισσότερο τις τιμές των pH ξυδιών, που βρίσκονται στην ελληνική αγορά. Επιπλέον, το γεγονός ότι η τιμή αυτή είναι μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή της πρώτης περίπτωσης είναι λογικό, καθώς η παραγωγή οξικού οξέος είναι μεγαλύτερη. Ωστόσο, η μείωση του pH του μέσου καλλιέργειας, το οποίο, αρχικά, είχε ρυθμιστεί ίσο με 6.9 είναι εμφανής σε κάθε περίπτωση. Ανάλογη συμπεριφορά παρουσιάζει και η οξύτητα των τελικών προϊόντων ζύμωσης. Στην δεύτερη περίπτωση, μάλιστα, η τιμή της τελική οξύτητα είναι ανάλογη διαφόρων ξυδιών της ελληνικής αγοράς.

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Χαρακτηριστικά ξυδιών στην ελληνική αγορά

Είδος ξυδιού	Ονομασία	Οξύτητα	pH
Ξύδι κόκκινο κρασιού	Samos	6	2.47
Ξύδι κόκκινο κρασιού	Extra	6	2.49
Ξύδι κόκκινο κρασιού	Fino	6	2.5
Ξύδι κόκκινο κρασιού	Donna	6	2.67
Ξύδι κόκκινο	Samos	6	2.47
Ξύδι κόκκινο	ΜΕΤΕΩΡΑ	6	2.4
Ξύδι κόκκινο κρασιού	Skourti “Orleany”	7	2.26
Ξύδι κόκκινο κρασιού	Πάρος “Δυνατό”	8	2.51
Ξύδι κόκκινο κρασιού	Πάρος	6	2.39
Ξύδι κόκκινο κρασιού	ΤΟΠ	7	2.57
Ξύδι κόκκινο κρασιού	Pan	7	2.28
Ξύδι λευκό κρασιού	Πάρος “Λευκό”	6	2.4
Ξύδι λευκό κρασιού	ΤΟΠ “Λευκό”	7	2.38
Βαλσάμικο	Altis Top Balsamico	6	2.75
Βαλσάμικο	Modena	6	2.49
Βαλσάμικο	Kalamata “3 years aged”	6	2.7
Βαλσάμικο	Modena “L’aretino”	6	2.72
Βαλσάμικο	Kalamata	6	2.65
Βαλσάμικο	Monari Federzoni	8	2.27

Βαλσάμικο	Villa Trebianna	6	2.4
Βαλσάμικο λευκό	Villa Belentani	5.4	2.74
Βαλσάμικο λευκό	De Nigris	5.4	2.48
Σταφυλιού	ΤΟΠ ΡΕΤ	6	2.61
Σταφυλιού	Linea	6	2.74
Σταφυλιού	Πάρος	6	2.39
Σταφυλιού	Πάρος “Νόστιμο”	6	2.5
Μηλόξυδο	ΤΟΠ “Μηλόξυδο”	6	2.49
Μηλόξυδο	Πάρος “Μηλόξυδο”	6	2.62

(Skenderi, 2013)

5 Παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *G. oxydans* DSM 3503 με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου σε μέσα ανάπτυξης 10 °Brix και 15 °Brix συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας

Η σταφίδα αποτελεί μία εκπληκτική πρώτη ύλη για την παραγωγή ζυμώσιμων τροφίμων/ποτών, τα οποία περιέχουν σάκχαρα και ποικιλία οργανικών οξέων. Η σταφίδα περιέχει μία ποικιλία θρεπτικών συστατικών. Ενδεικτικά αναφέρονται πρωτεΐνες, αμινοξέα, βιταμίνες, οργανικά οξέα, πολυφαινόλες και πολυσακχαρίτες. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα μπορεί να φθάσει το 42 %, ποσοστό το οποίο υπερβαίνει το συνολικό περιεχόμενο σε σάκχαρα άλλων φρούτων. Το περιεχόμενο και η σύσταση των οργανικών οξέων μεταβάλλεται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης (Jinle Xiang et al., 2012).

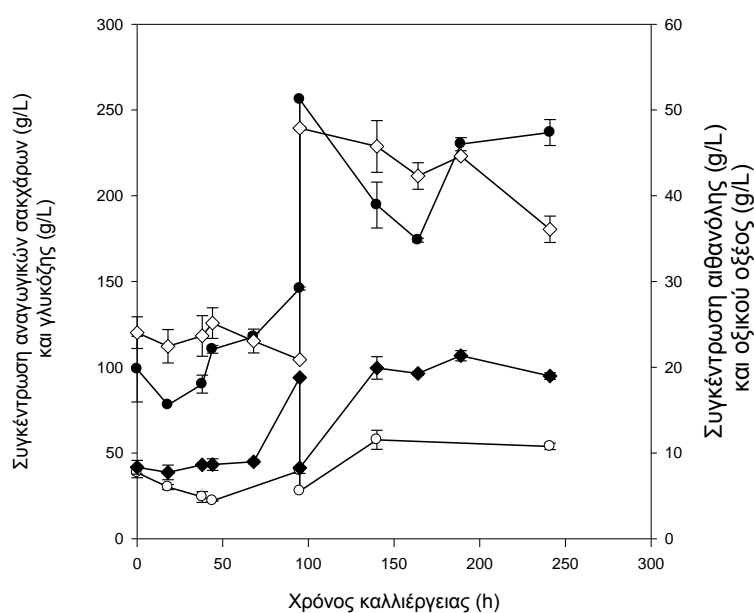
Τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή οξικού οξέος παρουσιάζονται στον Πίνακα 16:

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Αποτελέσματα μετρήσεων χαρακτηριστικών συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας

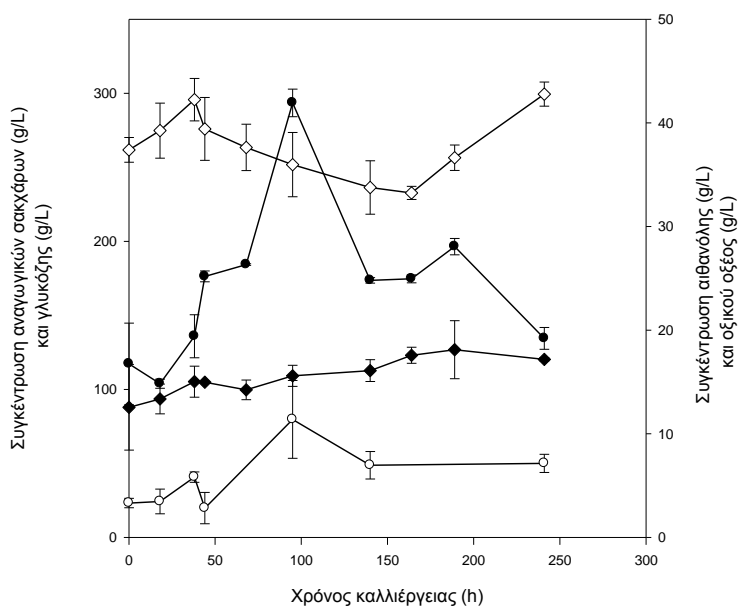
	Συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας
pH	3.75
A ₄₂₀	δ.π.
A ₅₂₀	δ.π.
A ₆₂₀	δ.π.
Ένταση χρώματος	δ.π.
Απόχρωση	δ.π.
Πυκνότητα χρώματος	δ.π.
ΔΦΟ	δ.π.
Οξύτητα (g/L ισοδύναμα τρυγικού οξέος)	-
TRS (g/L)	268.88
Βαθμοί Brix (°Bx)	24.38
Γλυκόζη (g/L)	637.15
Αιθανόλη (g/L)	47.79
Οξικό οξύ (g/L)	-

* δεν προσδιορίστηκε

Η παραγωγή ξυδιού από σακχαρούχα διαλύματα πραγματοποιείται μέσω δύο διαδοχικών ζυμώσεων. Αρχικά, τα σάκχαρα μετατρέπονται σε αιθανόλη μέσω της αλκοολικής ζύμωσης με τη βοήθεια ζυμών. Έπειτα, το παραγόμενο διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης μετατρέπεται σε οξικό οξύ μέσω της οξειδωτικής ζύμωσης. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια συμβιωτικής καλλιέργειας του βακτηρίου *G. oxydans* με τους μικροοργανισμούς, που περιείχε το συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας, προκειμένου οι δύο διαδοχικές ζυμώσεις να πραγματοποιηθούν σε ένα στάδιο. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα παρακάτω διαγράμματα:



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 28: Παραγωγή οξικού οξέος από συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας 10 °Brix με ταυτόχρονη αλκοολική και οξειδωτική ζύμωση από *G. oxydans*
 Σύμβολα: (●) TRS, (○) γλυκόζη, (◆) οξικό οξύ, (◇) αιθανόλη

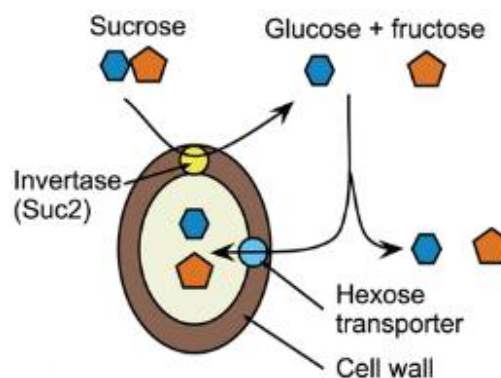


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 29: Παραγωγή οξικού οξέος από συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας 15 °Brix με ταυτόχρονη αλκοολική και οξειδωτική ζύμωση από *G. oxydans*
 Σύμβολα: (●) TRS, (○) γλυκόζη, (◆) οξικό οξύ, (<) αιθανόλη

Τα αποτελέσματα της διεργασίας φαίνονται μη ικανοποιητικά. Αρχικά, η παραγωγή οξικού οξέος είναι μικρή, ενώ η συμπεριφορά της αιθανόλης, της γλυκόζης και των αναγωγικών σακχάρων δεν είναι ξεκάθαρη. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε δύο παράγοντες. Πρώτον, οι μικροοργανισμοί του εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας είναι άγνωστοι, οπότε και η ακριβής δράση τους. Ταυτοχρόνως, το μέσο καλλιέργειας περιέχει ποικίλες πηγές άνθρακα.

Το εκχύλισμα ξηρής σταφίδας περιέχει αναγωγικά και μη σάκχαρα. Σύμφωνα με τους (Bampi M et al., 2010), στη σταφίδα τα αναγωγικά σάκχαρα (φρουκτόζη και γλυκόζη) βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα μη αναγωγικά (σακχαρόζη). Τα προϊόντα, τα οποία προέρχονται από το συμπυκνωμένο εκχύλισμα της σταφίδας εκτιμάται ότι έχουν ανάλογη χημική σύσταση. Ταυτοχρόνως, η αλκοολική ζύμωση, η οποία πραγματοποιείται από την δράση των ζυμών, που περιέχει το εκχύλισμα της ξηρής σταφίδας, οδηγεί στην παραγωγή αιθανόλης, η οποία αποτελεί μία ακόμα πηγή άνθρακα. Τέλος, η προστιθέμενη μαννιτόλη ως συστατικό του μέσου YPM, μπορεί και αυτή να καταβληστεί από το βακτήριο *G. oxydans*. Ο καταβολισμός της μαννιτόλης και της γλυκόζης από το οξικό βακτήριο οδηγεί στο σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων, τα οποία στη συνέχεια μπορεί να μετατραπούν σε οξικό οξύ. Ταυτοχρόνως, και ο καταβολισμός της αιθανόλης οδηγεί σε οξικό οξύ. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι τα στελέχη του γένους *Gluconobacter* προτιμούν τα σάκχαρα ως πηγή ενέργειας και άνθρακα παρά την αιθανόλη. Παρόλα αυτά, συγκέντρωση σακχάρων μεγαλύτερη από 40 % παρεμποδίζει την ανάπτυξη των οξικών βακτηρίων. Ανάμεσα στα διάφορα γένη AAB υπάρχουν οσμοανθεκτικά είδη, ενώ το γένος *Saccharibacter* είναι οσμοφιλικό και εμφανίζει την ικανότητα

ανάπτυξης σε περιβάλλον περιεκτικότητας 40 % w/v γλυκόζη. Τα είδη AAB, που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ξυδιού δεν εμφανίζουν ανοχή σε υψηλά επίπεδα σακχάρων, χαρακτηριστικό το οποίο απαιτείται στην παραγωγή ξυδιού από συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας, όπως και στην παραγωγή βαλσαμικού (M. Gullo & Giudici, 2008). Παράλληλα, οι ζύμες που περιέχονται στο συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας καταβολίζουν τη γλυκόζη, ενώ το οξικό οξύ, που παράγεται, επηρεάζει αρνητικά τις ζύμες. Επιπρόσθετα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας περιέχει σακχαρόζη, η οποία παρουσία ιμπερτάσης, η οποία μπορεί να εκκριθεί από τις περιεχόμενες ζύμες, μπορεί να υδρολυθεί εξωκυτταρικά σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη εισάγονται στο κύτταρο από μεταφορείς εξόζες ή διαφεύγουν στο μέσο με διάχυση (Koschwanez JH, 2011).



ΕΙΚΟΝΑ 21: Εξωκυτταρική υδρόλυση γλυκόζης σε φρουκτόζη και γλυκόζη

Πηγή: (Koschwanez JH, 2011)

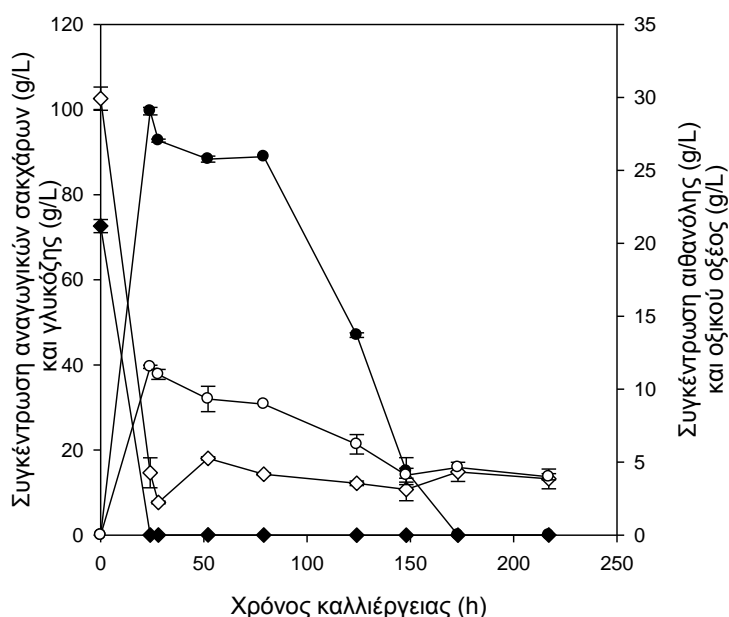
Βάση των παραπάνω μπορεί να δικαιολογηθεί η μη ομαλή συμπεριφορά των συγκεντρώσεων αιθανόλης, γλυκόζης αναγωγικών σακχάρων και οξικού οξέος.

Επιπλέον, σημειώνεται ότι ο καταβολισμός της γλυκόζης από το βακτήριο *G. oxydans* μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό γλουκονικού οξέος, οξύ το οποίο, μάλιστα, διαφοροποιεί ακόμα και το TBV από τα άλλα είδη ξυδιών (M. Gullo & Giudici, 2008). Η ταυτοποίηση γλουκονικού οξέος δεν πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, ωστόσο η μείωση του pH κατά την διάρκεια της διεργασίας μπορεί να αποτελέσει ένδειξη για την παραγωγή οξέων.

6 Συμβιωτική καλλιέργεια *Gluconobacter oxydans* - *Saccharomyces cerevisiae* σε οικιακά απόβλητα τροφίμων & Συμβιωτική καλλιέργεια *Acetobacter pasteurianus* - *Saccharomyces cerevisiae* σε οικιακά απόβλητα τροφίμων

Στο παρόν πείραμα επιλέχθηκε να γίνει ο εμβολιασμός του μέσου με το βακτήριο *A. pasteurianus* μετά την συμπλήρωση 24 h από τον εμβολιασμό του μέσου με την ζύμη *S. cerevisiae*. Την χρονική στιγμή αυτή, σημειώθηκε η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης, η οποία παράχθηκε από την δράση της ζύμης. Έπειτα, η συγκέντρωση της αιθανόλης μειώθηκε μέχρι, μάλιστα, την πλήρη κατανάλωση της, η οποία

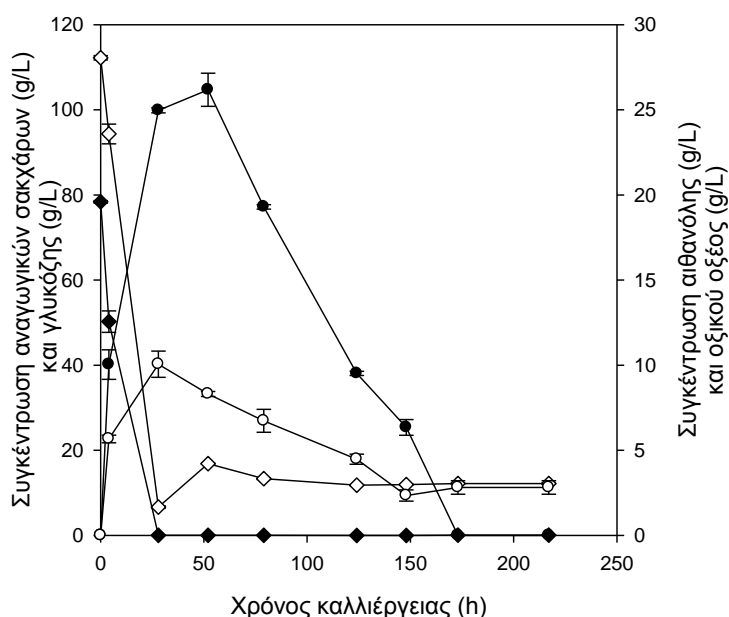
ανιχνεύθηκε ύστερα από 173 h καλλιέργειας (149 h συμβιωτικής καλλιέργειας). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε παραγωγή οξικού οξέος. Παραγωγή οξικού οξέος σημειώνεται μέχρι τις πρώτες 28 h καλλιέργειας. Σαφέστερα, η μεγαλύτερη ποσότητα οξικού οξέος (11.53 g/L) παράχθηκε πριν τον εμβολιασμό του οξικού βακτηρίου ως παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ μετά από 4 h συμβιωτικής καλλιέργειας ανιχνεύθηκε συγκέντρωση οξέος ίση με 11.01 g/L. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι το βακτήριο *A. pasteurianus* δεν οξειδωσε την υπάρχουσα αιθανόλη προς οξικό οξύ. Τελικά, παρατηρείται μείωση του παραγόμενου οξικού οξέος, εκτός από την μείωση των αναγωγικών σακχάρων, της γλυκόζης και της αιθανόλης. Αιτία της μειωμένης, τελικά, παραγωγής οξικού οξέος μπορεί να αποτελεί η μη φόρτιση του μέσου με επιπλέον αιθανόλη ή γλυκόζης, καθώς, τελικά, η γλυκόζη και η αιθανόλη ζυμώνονται πλήρως και καταναλώνονται άμεσα όταν οι δύο μικροοργανισμοί αλληλεπιδράσουν. Σημειώνεται, όμως, ότι η τελική συγκέντρωση του οξικού οξέος δεν είναι μηδενική, αντίθετα με τις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων. Η έλλειψη κάποιας πηγής άνθρακα ωθεί το βακτήριο *A. pasteurianus* στην κατανάλωση του οξικού οξέος, προκειμένου να παράγει την ενέργεια, που χρειάζεται για να συντηρηθεί.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 30: Συμβιωτική καλλιέργεια *Acetobacter pasteurianus* & *Saccharomyces cerevisiae* σε οικιακά απόβλητα τροφίμων, Εμβολιασμός *A. pasteurianus* μετά από 24 h καλλιέργειας *S. cerevisiae*. Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) γλυκόζη, (◇) TRS

Στην περίπτωση, όπου το μέσο καλλιέργειας εμβολιάζεται με το βακτήριο *G. oxydans* ύστερα από μόλις 4 h ζύμωσης των σακχάρων από την ζύμη *S. cerevisiae*, η παραγωγή αιθανόλης δεν παρεμποδίζεται από την παρουσία του βακτηρίου, λόγω της περίσσειας γλυκόζης στο μέσο. Η παραγωγή της αιθανόλης ολοκληρώνεται μόλις καταναλωθεί πλήρως η γλυκόζη. Η παραγωγή οξικού οξέος ξεκινά την χρονική στιγμή, όπου εμβολιάζεται το βακτήριο και συνεχίζεται μέχρι τις 28 h καλλιέργειας (24 h συμβιωτικής καλλιέργειας). Συγκρίνοντας τις δύο συμβιωτικές καλλιέργειες,

στην περίπτωση του βακτηρίου *G. oxydans*, η τελική παραγωγή οξικού οξέος είναι μικρότερη από την περίπτωση του *A. pasteurianus*, καθώς γνωρίζεται ότι συγκριτικά με στελέχη *Acetobacter*, η οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ είναι χαμηλότερη, στα στελέχη *Gluconobacter* (M. Gullo & Giudici, 2008). Επιπλέον, αιτία της μικρής απόδοσης σε οξικό οξύ είναι το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί *Gluconobacter* μετατρέπουν τα υποστρώματα με σειρά προτίμησης τα σάκχαρα, αλκοόλες σακχάρων, αλειφατικές αλκοόλες και αλδεΐδες. Στην περίπτωση παρουσίας γλυκόζης, το είδος *Gluconobacter* μπορεί να οξειδώσει την γλυκόζη σε γλουκονικό οξύ (Adachi, Moonmangmee, Toyama, et al., 2003). Αυτό σημαίνει ότι η μείωση της συγκέντρωσης γλυκόζης κατά την συμβιωτική καλλιέργεια των *G. oxydans* και *S. cerevisiae* μπορεί να οφείλεται τόσο στον καταβολισμό της από την ζύμη όσο και από τον καταβολισμό της από το βακτήριο. Επομένως, πιθανώς ζύμη και οξικό βακτήριο να ανταγωνίζονται για το ίδιο υπόστρωμα μέχρι πλήρης εξάντλησής του. Έπειτα, καθώς μοναδικές πηγές άνθρακα στο μέσο είναι το οξικό οξύ και η αιθανόλη η ζύμη *S. cerevisiae* και το βακτήριο *G. oxydans* φαίνεται να αναγκάζονται να καταβολίσουν αυτά, προκειμένου να μπορέσουν να αναπτυχθούν.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 31: Συμβιωτική καλλιέργεια *G. oxydans* & *S. cerevisiae* σε οικιακά απόβλητα τροφίμων, Εμβολιασμός *G. oxydans* μετά από 4 h καλλιέργειας *Saccharomyces cerevisiae*. Σύμβολα: (●) αιθανόλη, (○) οξικό οξύ, (◆) γλυκόζη, (◇) TRS

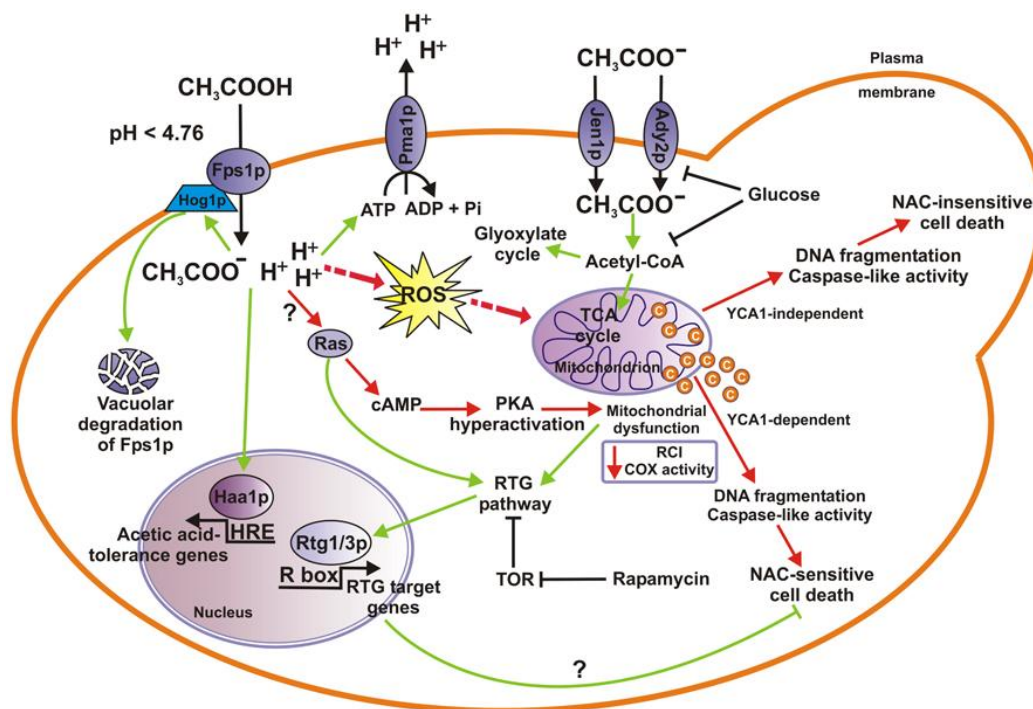
Στην παρούσα περίπτωση, λοιπόν, φαίνεται ότι η ζύμη *S. cerevisiae* δεν μπορούν να συμβιώσει με τους μικροοργανισμούς *A. pasteurianus* και *G. oxydans*, ξεχωριστά και υπό τις δεδομένες συνθήκες. Το οξικό βακτήριο πιθανώς δρα ανταγωνιστικά στη ζύμη, λόγω παραγωγής οξικού οξέος. Ωστόσο, πιθανώς οι μικροοργανισμοί να μπορούν να συμβιώσουν για ένα μικρό χρονικό διάστημα, το οποίο στη συγκεκριμένη

περίπτωση θεωρείται ότι ισούται με 4 h για *S. cerevisiae* και *A. pasteurianus* και 24 h για *S. cerevisiae* και *G. oxydans* (συνολικά 28 h καλλιέργειας ζύμης), καθώς η μείωση του οξικού οξέος είναι μικρή, ενώ στην δεύτερη περίπτωση, καθίσταται δυνατή ακόμα και η συνέχιση της παραγωγής αιθανόλης.

Θεωρείται, λοιπόν, ότι υπάρχουν δύο βιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ζύμης και των AAB στην ταυτόχρονη ζύμωση. Η πρώτη αλληλεπίδραση αφορά τη συμβίωση, φαινόμενο το οποίο λαμβάνει χώρα κατά το πρώτο στάδιο της ζύμωσης, όπου η ζύμη παρέχει αιθανόλη στο οξικό βακτήριο για την περαιτέρω οξείδωσή της και το σχηματισμό οξικού οξέος. Η συμβίωση αποτελεί ένα είδος σχέσης μεταξύ δύο οργανισμών, όπου κάθε οργανισμός επωφελείται από τον άλλον, χωρίς, όμως, να τον επηρεάζει (Van Beneden & Pierre-Joseph, 1876). Η χρονική περίοδος, που λαμβάνει χώρα το φαινόμενο αυτό, ποικίλλει ανάλογα με τον χρόνο εμβολιασμού του μέσου καλλιέργειας με τα δύο διαφορετικά εμβόλια. Αναλυτικότερα, η χρονική διάρκεια της συμβίωσης είναι μικρότερη όταν και οι δύο εμβολιασμοί γίνονται ταυτόχρονα, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης αιθανόλης, που παρέχεται στο οξικό βακτήριο από τη ζύμη, η οποία δεν έχει προλάβει να αναπτυχθεί, ώστε να παράγει αρκετή αιθανόλη. Στην περίπτωση, όπου ο εμβολιασμός του μέσου με το βακτήριο γίνει μία μέρα μετά τον εμβολιασμό του με τη ζύμη, η συμβίωση διαρκεί περισσότερο (Krusong & Vichitraka, 2010). Παρόλα αυτά, η συμβίωση του *G. oxydans* με την ζύμη θεωρείται ότι διήρκτησε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από την συμβίωση του *A. pasteurianus* με τη ζύμη, λόγω της ικανότητας του πρώτου να μεταβολίζει την γλυκόζη. Στον ίδιο λόγο μπορεί να αποδοθεί και η ελαφρώς μικρότερη παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης από την συμβιωτική καλλιέργεια *G. oxydans* – *S. cerevisiae* συγκριτικά με την συμβιωτική καλλιέργεια *A. pasteurianus* – *S. cerevisiae*. Επιπρόσθετα, σημειώνεται ότι η ανάπτυξη της ζύμης έγινε υπό αναερόβιες συνθήκες τις πρώτες 24 h, ενώ μετά τον εμβολιασμό του βακτηρίου οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν αερόβιες. Οι (Krusong & Vichitraka, 2010) αναφέρουν θετική επίδραση του οξυγόνου στον ζυμομύκητα, όσον αφορά την παραγωγή αιθανόλης, η οποία λειτουργεί ως υπόστρωμα για το AAB για την παραγωγή οξικού οξέος, λόγω της αύξησης των λιπαρών οξέων και της βιοσύνθεσης στερόλης στη ζύμη. Για το λόγο αυτό, η παρουσία οξυγόνου μπορεί να προκαλέσει μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συμβίωσης (Krusong & Vichitraka, 2010).

Η δεύτερη αλληλεπίδραση των δύο μικροοργανισμών αφορά την παρεμπόδιση του παραγόμενου οξικού οξέος στη ζύμη. Το οξικό οξύ αποτελεί στρεσογόνο και θανατηφόρο παράγοντα για τους ζυμομύκητες. Το οξικό οξύ μπορεί να διαχυθεί εντός του κυττάρου μειώνοντας το ενδοκυτταρικό pH και παρεμποδίζοντας, τελικά, την ανάπτυξη της ζύμης. Επιπλέον, το οξικό οξύ επηρεάζει άμεσα τη μεταφορά ενζύμων ή την δραστηριότητα γλυκολυτικών ενζύμων, ενώ ακόμα και η NADH αφυδρογονάση της ζύμης *S. cerevisiae* είναι ευαίσθητη στο οξικό οξύ (Krusong & Vichitraka, 2010). Παραδειγματικά, αρνητικές επιδράσεις μπορεί να έχει το οξικό οξύ στη ζύμη *S. cerevisiae* κατά την αλκοολική ζύμωση για την παραγωγή κρασιού ή την λιγνοκυτταρινούχα ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Σαφέστερα, το οξικό οξύ αναγνωρίζεται ως επαγωγέας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Programmed Cell Death, PCD).

Όταν τα κύτταρα του ζημομύκητα χρησιμοποιούν το οξικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα, το ανιόν του οξικού εισέρχεται στα κύτταρα μέσω των μονοκαρβοξυλικών μεταφορέων Jen1p ή Ady2p, όπου μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA. Το τελευταίο εισέρχεται στον κύκλο TCA ή στον γλυοξυλικό κύκλο. Η μεταφορά του οξικού και ο μεταβολισμός του παρεμποδίζονται από την γλυκόζη, λόγω της ενεργοποίησης των μονοπατιών καταστολής γλυκόζης. Αυτό, λοιπόν, σημαίνει ότι η ζύμη είναι ευαίσθητη στην παρουσία οξικού οξέος όταν υπάρχει στο μέσο ανάπτυξης και γλυκόζη. Αντίθετα με την ζύμη *S. cerevisiae*, η ζύμη *Zygosaccharomyces bailii* μπορεί να μεταβολίσει το οξικό οξύ παρουσία γλυκόζης και παρουσιάζει μεγαλύτερη αντίσταση στο οξικό οξύ. Σε χαμηλές τιμές pH (pKa = 4.76) και παρουσία γλυκόζης, το οξικό οξύ εισέρχεται στα κύτταρα σε αδιάστατη μορφή μέσω διάχυσης διαμέσου του Fps1p, όπου το περισσότερο ουδέτερο κυτταρικό pH προκαλεί διάστασή του σε ανιόντα οξέος και πρωτόνια. Ταυτόχρονα, η κυτταροπλασματική οξοποίηση από τα πρωτόνια επάγει την ενεργοποίηση του Pma1p, μία ATPάση μεμβράνης πλάσματος, η οποία αντλεί πρωτόνια από το κύτταρο. Επιπλέον, το οξικό οξύ μπορεί να ενεργοποιήσει την κινάση, Hog1p (MAP-kinase, microtubule associated proteins) η οποία εμπλέκεται στην φωσφορυλίωση και μετέπειτα στην ουβικιτινίωση, στην ενδοκυττάρωση, και την τελική κενωτοπική αποικοδόμηση του Fps1p και του παράγοντα μεταγραφής Haa1p, που επιτρέπει στα κύτταρα να προσαρμοστούν σε ποικίλα επίπεδα οξικού οξέος. Από την άλλη, θανατηφόρες συγκεντρώσεις οξικού οξέος επάγουν την συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), την απελευθέρωση κυτοχρώματος c και την δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου οδηγώντας, τελικά, στον PCD. Το σηματοδοτικό μονοπάτι RTG προτείνεται να ενεργοποιείται σε ορισμένες συνθήκες ανάπτυξης, προκειμένου το κύτταρο να αντισταθεί στον PCD και να προσαρμοστεί στο στρες του οξικού οξέος (Giannattasio et al., 2013).



ΕΙΚΟΝΑ 22: Μηχανισμοί αντίδρασης κύτταρου *S. cerevisiae* στο στρες οξικού οξέος

Πηγή: (Giannattasio et al., 2013)

Η αιθανόλη και άλλες αλκοόλες είναι λιγότερο τοξικές από το οξικό οξύ. Ο PCD, που προκαλείται από το οξικό οξύ εξαρτάται από την ανάπτυξη της ζύμης, την προκαλλιέργεια της, αλλά και παραμέτρους των πειραματικών συνθηκών, όπως είναι το pH, το οξυγόνο, η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, και ειδικότερα η συγκέντρωση της γλυκόζης, η οποία καθορίζει την αναλογία της ζύμωσης και του αναπνευστικού μεταβολισμού (M. J. Sousa, 2012).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι (Krusong & Vichitraka, 2010) πραγματοποιώντας παρόμοιο πείραμα σε κρασί από ανανά χρησιμοποιώντας τους μικροοργανισμούς *S. cerevisiae* και *A. aceti* αναφέρουν ότι η ανταγωνιστική δράση της ζύμης σε ένα AAB, δεν μπορεί να ανιχνευθεί όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας είναι μικρότερη από 7-8 %, διότι το μικρό αυτό περιεχόμενο αιθανόλης καταναλώνεται γρήγορα στην πρώτη, κιάλας, φάση αλληλεπίδρασης. Ταυτόχρονα, θεωρούν ότι συγκεντρώσεις αιθανόλης της τάξεως 7-8 % μπορεί να λειτουργήσουν παρεμποδιστικά σε χαμηλές τιμές pH.

D. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι Matsushita et al. περιγράφουν ότι η φάση εκθετικής ανάπτυξης AAB είναι παράλληλη προς την παραγωγή οξικού οξέος και η στατική φάση της ζύμωσης (μετά πλήρη κατανάλωση αιθανόλης) συμπίπτει με το στατική φάση της ανάπτυξης (Matsushita K et al., 2005). Το γεγονός αυτό παρατηρήθηκε στις διεργασίες διαλείποντος έργου, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης στην παραγωγή οξικού οξέος από το βακτήριο *A. pasteurianus* DSM 3509.

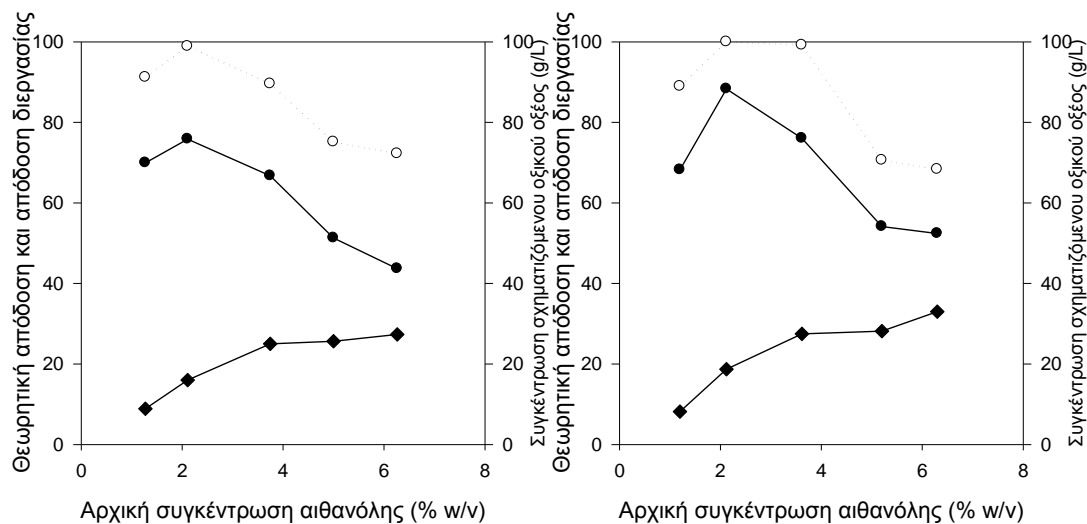
Η ανάλογη αύξηση της συγκέντρωσης κυτταρικής βιομάζας και του οξικού οξέος παύει να ισχύει όταν παρατηρείται το φαινόμενο της υπεροξειδωσης. Οι (Mas et al., 2014) αναφέρουν ότι ένα AAB του γένους *Acetobacter* καταναλώνει το οξικό οξύ, που έχει συσσωρευθεί στο μέσο από την οξείδωση της αιθανόλης και αναπτύσσεται ταχεία εμφανίζοντας μία δεύτερη εκθετική φάση, όταν στο μέσο καλλιέργειας δεν υπάρχει άλλη πηγή άνθρακα.

Οι Macias et al. στην προσπάθεια τους στην ανάπτυξη ενός γενικού κινητικού μοντέλου για την προσομοίωση της διαλείποντος οξοποίησης εκτιμούν τις τιμές των αποδόσεων $Y_{X/E}$ και $Y_{E/A}$ ίσες με $8.55 \cdot 10^{-3}$ g βιομάζας / g καταναλωθείσας αιθανόλης και 0.767 g καταναλωθείσας αιθανόλης / g σχηματιζόμενου οξικού οξέος, αντιστοίχως. Συγκρίνοντας τις τιμές αυτές με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές διαπιστώνεται ότι τα αποτελέσματα είναι αρκετά ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τον συντελεστή απόδοσης $Y_{X/E}$ η μέγιστη ποσοστιαία διαφορά της θεωρητικής τιμής από την μικρότερη πειραματική τιμή $Y_{X/E}$ είναι 38 %, ενώ σημειώνονται ακόμα και μεγαλύτερες τιμές $Y_{X/E}$ από την θεωρητική τιμή. Όσον αφορά τον συντελεστή απόδοσης $Y_{E/A}$ η μέγιστη ποσοστιαία διαφορά της θεωρητικής τιμής από την μικρότερη πειραματική τιμή $Y_{E/A}$ είναι 33 %, ενώ οι υπόλοιπες πειραματικές τιμές δεν διαφέρουν σημαντικά από την θεωρητική τιμή.

Στο σημείο αυτό, σημειώνεται ότι έχουν γίνει οι εξής παραδοχές τόσο κατά την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων όσο και κατά την ανάπτυξη του κινητικού μοντέλου από τους (Mas et al., 2014):

1. Η ποσότητα αιθανόλης, που αφομοιώνει η βιομάζα για να συνθέσει το κυτταρικό υλικό είναι αμελητέα σε σύγκριση με τη συνολική κατανάλωση του υποστρώματος για την παραγωγή οξικού οξέος.
2. Η κατανάλωση υπόστρωμα στην παροχή της απαραίτητης ενέργειας για τη συντήρηση των κυττάρων είναι αμελητέα σε σύγκριση με την κατανάλωση που απαιτούνται για την ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης
3. Η απώλεια της αιθανόλης σε κάθε πειραματική διαδικασία δεν έχει ληφθεί υπόψη, ενώ θεωρείται ίδια για κάθε πειραματική διαδικασία.

Βάση του θεωρητικού συντελεστή $Y_{E/A}$ υπολογίστηκε η θεωρητική απόδοση της διεργασίας για την μελέτη της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης στο μέσο καλλιέργειας και συγκρίθηκε με την πραγματική απόδοση της διεργασίας.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 32: Σύγκριση θεωρητικής απόδοσης και απόδοσης διεργασίας με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, σταθερή περιεκτικότητα % v/v YPM

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 33: Σύγκριση θεωρητικής απόδοσης και απόδοσης διεργασίας με εφαρμογή διεργασίας διαλείποντος έργου, μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα % v/v YPM

Σύμβολα: (●) απόδοση διεργασίας, (○) θεωρητική απόδοση, (◆) οξικό οξύ

* Η θεωρητική απόδοση υπολογίστηκε βάση τον συντελεστή $Y_{E/A} = 0.767$ g καταναλωθείσας αιθανόλης / g σχηματιζόμενου οξικού οξέος (Macias et al)

Στις δεδομένες συνθήκες, που εκτελέστηκαν τα πειράματα (φυσικός αερισμός, 27 °C, 180 rpm) διακρίνονται δύο ξεχωριστές ζώνες λειτουργίας: μία αποδοτική, όπου η αρχική συγκέντρωση αιθανόλης κυμαίνεται μεταξύ 2.1 - 3.8 % w/v και το υπόστρωμα εξαντλείται πλήρως και μία ζώνη χαμηλότερης απόδοσης, όπου η αρχική συγκέντρωση αιθανόλης είναι μεγαλύτερη από 4 % w/v και το υπόστρωμα δεν εξαντλείται πλήρως στον ίδιο χρόνο, καθώς η ανασταλτική δράση της αιθανόλης και του οξικού οξέος προκαλεί μείωση στην βιομάζα. Ως αποδοτικότερη διεργασία διαλείποντος έργου στις δεδομένες συνθήκες προτείνεται η χρήση μέσου αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 2.1 % w/v και περιεκτικότητας σε YPM 86 % v/v (απόδοση διεργασίας 88.3 %). Στην περίπτωση αυτή, η ποσοστιαία διαφορά του θεωρητικού συντελεστή απόδοσης $Y_{E/A}$ από την αντίστοιχη πειραματική τιμή είναι μόλις 2.4 %.

Οι (Qi, 2014) πραγματοποιώντας ημι-συνεχή διεργασία σε οξοποιητή Frings 8 L με το βακτήριο *A. pasteurianus* υπολογίζουν απόδοση διεργασίας 93.97 %. Στα ίδια επίπεδα υπολογίστηκε η απόδοση της διεργασίας (94.3 %) από τους (Z. Qi et al., 2013) όταν πραγματοποίησαν ζύμωση μέσου αρχικής συγκέντρωσης οξικού οξέος 40 g/L με το *A. pasteurianus*. Οι τιμές αυτές προσεγγίζουν τις θεωρητικές τιμές απόδοσης των διεργασιών, που εκτελέστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ωστόσο, η μέγιστη τιμή της πραγματικής απόδοσης, που σημειώθηκε (88.3 %) είναι αρκετά υψηλή και δεν διαφέρει σημαντικά από τις τιμές των βιβλιογραφικών αναφορών.

Οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *A. pasteurianus*, που σημειώνονται στα μέσα ανάπτυξης, που περιέχουν κρασί, μπορούν να χαρακτηριστούν μικρές συγκριτικά με την αντίστοιχη τιμή, που παρατηρείται σε

καθαρό μέσο YPM. Ωστόσο, ακόμα και σε βιβλιογραφικές αναφορές οι τιμές του μεγέθους αυτού ποικίλουν. Οι (Maria Gullo et al., 2014) σε συνεχή ζύμωση μέσου αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 12 % v/v αναφέρουν ότι η τιμή του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ισούται με 0.027 h^{-1} όταν η συγκέντρωση αιθανόλης είναι 4.5 % v/v και 0.006 h^{-1} όταν η συγκέντρωση αιθανόλης είναι 1 % v/v. Από την άλλη, οι (Hai-Lin Yang et al., 2011) υπολόγισαν ύστερα από οξειδωτική ζύμωση μέσου αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης 30 g/L ότι η τιμή του μ_{\max} του *A. pasteurianus* ισούται με 0.32 h^{-1} , ενώ για το βακτήριο *A. aceti*, οι (Romero L.E. et al., 1994) υπολόγισαν τιμή του μ_{\max} 0.22 h^{-1} . Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι η τιμή του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Σημαντική επίδραση εμφανίζει η συγκέντρωση αιθανόλης. Παρατηρείται ότι αυξανόμενης της αρχικής συγκέντρωσης αιθανόλης η τιμή του μειώνεται. Ταυτόχρονα, η αυξανόμενη περιεκτικότητα του μέσου σε θρεπτικά συστατικά επιδρά αυξάνοντας την τιμή του. Επιπλέον, σημειώνεται ότι όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συγκέντρωση αιθανόλης τόσο περισσότερος χρόνος χρειάζεται και τόσο πιο αργός ρυθμός οξοποίησης σημειώνεται (Mas et al., 2014).

Όσον αφορά την συμβιωτική καλλιέργεια του *G. oxydans* με το μικροβιακό φορτίο του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας, η παραγωγή οξικού οξέος κρίνεται μη ικανοποιητική. Η συμπεριφορά των συγκεντρώσεων αναγωγικών σακχάρων, γλυκόζης, αιθανόλης και οξικού οξέος δύσκολα μπορεί να ερμηνευτεί. Η κατανάλωση των αναγωγικών σακχάρων δεν αποσαφηνίστηκε από ποιον μικροοργανισμό πραγματοποιήθηκε. Το βακτήριο *G. oxydans* καταβολίζει τόσο τη φρουκτόζη και την γλυκόζη προς σχηματισμό ενδιάμεσων αναγωγικών σακχάρων και τελικά οξικού οξέος, ενώ καταβολίζει και την αιθανόλη, η οποία σχηματίζεται από τον καταβολισμό της γλυκόζης από τις ζύμες, για τον ίδιο σκοπό. Φαίνεται, λοιπόν, ότι προτιμάται η παραγωγή οξικού από σάκχαρα με δύο διαδοχικές ζυμώσεις. Προτείνεται η αλκοολική ζύμωση από τις ζύμες και η οξειδωτική ζύμωση του αλκοολικού διαλύματος από το *G. oxydans* να γίνεται ξεχωριστά. Συμπερασματικά, για την παραγωγή ξυδιού από κρασί και από συμπυκνωμένο εκχύλισμα σταφίδας απαιτούνται οξικά βακτήρια με τα χαρακτηριστικά, που αναγράφονται ακολούθως:

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Απαιτούμενα χαρακτηριστικά AAB για την παραγωγή ξυδιού

<p>Κύρια Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά AAB για την παραγωγή ξυδιού από κρασί</p>
<p>AAB με βασικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά για τα ξύδια Προτίμηση αιθανόλης και αποτελεσματική οξείδωσης Γρήγορη παραγωγή οξικού οξέος Ανοχή σε οξικό οξύ Απουσία υπεροξείδωσης Αντίσταση σε χαμηλές τιμές pH Αντίσταση σε βακτηριοφάγο Όχι παραγωγή κυτταρίνης Παραγωγή επιθυμητών αρωματικών ενώσεων</p>
<p>Κύρια Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά AAB για την παραγωγή ξυδιού από συμπυκνωμένο εκχύλισμα σταφίδας</p>
<p>Ανθεκτικότητα σε ωσμωτική πίεση Προτίμηση σακχάρων και αποτελεσματική οξείδωση</p>

Πηγή: (M. Gullo & Giudici, 2008)

Ωστόσο, η δυσκολία της καλλιέργειας AAB είναι ένας από τους λόγους, για τους οποίους η διεργασία της οξοποίησης εξακολουθεί να πραγματοποιείται με τη χρήση μη επιλεγμένων καλλιέργειών (Maria Gullo et al., 2014).

Λόγω της μη ταυτοποίησης των ειδών ζυμών του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ξηρής σταφίδας πραγματοποιήθηκε μελέτη της συμβιωτικής καλλιέργειας συγκεκριμένης ζύμης, *S. cerevisiae*, με τα βακτήρια *A. pasteurianus* και *G. oxydans* σε οικιακά απόβλητα τροφίμων. Από την διαδικασία αυτή συμπεραίνεται ότι τα AAB φαίνεται να δρουν ανταγωνιστικά στη ζύμη. Και σε αυτή την περίπτωση προτείνεται η αλκοολική ζύμωση από την ζύμη *S. cerevisiae* και η οξειδωτική ζύμωση του αλκοολικού διαλύματος από το AAB να γίνεται ξεχωριστά. Επιπλέον, προτείνεται η χρήση της ζύμης *Zygosaccharomyces bailii* για την συμβιωτική καλλιέργεια με ένα AAB, καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερη αντίσταση στο οξικό οξύ από τη ζύμη *S. cerevisiae*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Achaerandio, I., Guell, C., Medina, F., Lamuela-Raventos, R., & Lopez, F. (2002). Note. Vinegar Decolourization by Re-Activated Carbon. *Food Science and Technology International*, 8(4), 239-242. doi: 10.1177/1082013202008004932
- Adachi, O., Moonmangmee, D., Shinagawa, E., Toyama, H., Yamada, M., & Matsushita, K. (2003). New quinoproteins in oxidative fermentation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1647(1-2), 10-17. doi: 10.1016/s1570-9639(03)00040-2
- Adachi, O., Moonmangmee, D., Toyama, H., Yamada, M., Shinagawa, E., & Matsushita, K. (2003). New developments in oxidative fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 643-653.
- Álvarez-Cáliz, C., Santos-Dueñas, I. M., García-Martínez, T., Cañete-Rodríguez, A. M., Millán-Pérez, M. C., Mauricio, J. C., & García-García, I. (2014). Effect of biological ageing of wine on its nitrogen composition for producing high quality vinegar. *Food and Bioproducts Processing*, 92(3), 291-297. doi: 10.1016/j.fbp.2013.07.005
- Andres-Barrao, C., Saad, M. M., Chappuis, M. L., Boffa, M., Perret, X., Ortega Perez, R., & Barja, F. (2012). Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation. *J Proteomics*, 75(6), 1701-1717. doi: 10.1016/j.jprot.2011.11.027
- Bampi M, Bicudo MOP, Fontoura PSG, & Ribani, R. (2010). Chemical composition of fruit, concentrated extract and flour from 'Japanese grape'. *Cienc. Rural*, 40(11), 2361-2367.
- Barbe, J. C., De Revel, G., Joyeux, A., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (2001). Role of botrytized grape micro-organisms in SO₂ binding phenomena. *J. Appl. Microbiol.*, 90(1), 34-42.
- Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine. *Int J Food Microbiol*, 125(1), 60-70. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016
- Berry, B. (2011). *The Global Vinegar Market*. Canada: Agriculture & Agri-Food, Government of Canada.
- Budak, N. H., Aykin, E., Seydim, A. C., Greene, A. K., & Guzel-Seydim, Z. B. (2014). Functional properties of vinegar. *J Food Sci*, 79(5), R757-764. doi: 10.1111/1750-3841.12434
- Camin, F., Bontempo, L., Perini, M., Tonon, A., Breas, O., Guillou, C., Gagliano, G. (2013). Control of wine vinegar authenticity through $\delta^{18}O$ analysis. *Food Control*, 29(1), 107-111. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.05.055
- Cruess. (1958). *Commercial fruit and vegetable products: Chapter 21 - Vinegar manufacture* (1 ed.). New York: McGraw-Hill Book Company, Inc.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., & Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 233-242.
- Drysdale, G. S., & Fleet, G. H. (1989). The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Microbiol.*, 67(5), 471-481.

- Du Toit W.J., & M.G., L. (2002). The enumeration & identification of AAB from South African red wine fermentations. *Int J Food Microbiol*, 74.
- Elmi, C. (2015). Relationship between sugar content, total acidity, and crystal by-products in the making of Traditional Balsamic Vinegar of Modena. *European Food Research and Technology*.
- Fleet, G. H. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol*, 50(1-2), 101–117.
- Galletto, L., & Rossetto, L. (2015). A hedonic analysis of retail Italian vinegars. *Wine Economics and Policy*, 4(1), 60-68. doi: 10.1016/j.wep.2015.02.001
- Giannattasio, S., Guaragnella, N., Zdravlevic, M., & Marra, E. (2013). Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Front Microbiol*, 4, 33. doi: 10.3389/fmicb.2013.00033
- Giudici, P., Gullo, M., Solieri, L., & Falcone, P. M. (2009). Technological and Microbiological Aspects of Traditional Balsamic Vinegar and Their Influence on Quality and Sensorial Properties. 58(4), 137-182. doi: 10.1016/s1043-4526(09)58004-7
- Gonzales, A. (2005). *Application of molecular techniques for identification of acetic acid bacteria*. (PhD), Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, Spain.
- Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., & Guillamon, J. M. (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *Int J Food Microbiol*, 102(3), 295-304. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.020
- Greenfield, S., & Claus, G. W. (1972). Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *Journal of Bacteriology*, 112, 1295–1301.
- Gullo, M., & Giudici, P. (2008). Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *Int J Food Microbiol*, 125(1), 46-53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.076
- Gullo, M., Verzelloni, E., & Canonico, M. (2014). Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry*, 49(10), 1571-1579. doi: 10.1016/j.procbio.2014.07.003
- Hai-Lin Yang, Zheng-liang Qi, Xiao-Le Xia, Yu Xin, Ling Zhang, Yun-Wei Leng, . . . Wang, W. (2011). An optimum medium designed and verified for alcohol vinegar fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 10 (42), 8421-8427. doi: 10.5897/AJB10.1552
- Hassan M. Awad, Diazi R., Roslinda A. Malek, Norzalina Othman, Ramlan A. Aziz, & Hesham, A. E. E. (2012). Efficient Production Process for Food Grade Acetic by *Acetobacter aceti* in shake flask & in bioreactor cultures. *E-Journal of Chemistry*, 9(4), 2275-2286.
- Hipólito Rubio-Fernández, María Desamparados Salvador, & Fregapane, G. (2004). Influence of fermentation oxygen partial pressure on semi-continuous acetification for wine vinegar production. *European Food Research and Technology*, 219(4), 393-397.
- Holt, J. G. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (9 ed. Vol. 2): Springer Science & Business Media.
- Hommel, R. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology* (M. L. T. Carl A. Batt Ed. Second ed. Vol. 1). USA.

- Ignacio de Ory, Luis E. Romero, & Cantero, D. (2002). Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 52.
- Jinle Xiang, Wenxue Zhu, Junqi Han, Zhixi Li, Hanjin Ge, & Lin, D. (2012). Analysis of organic acids in Chinese raisin tree (*Hovenia dulcis*) peduncle and their changes in liquid fermentation process. *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1119-1127.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., & Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(1), 153-156.
- Kanchanarach, W., Theeragool, G., Inoue, T., Yakushi, T., Adachi, O., & Matsushita, K. (2010). Acetic acid fermentation of *acetobacter pasteurianus*: relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74(8), 1591-1597. doi: 10.1271/bbb.100183
- Kehrer, E. G. (1921). The chemistry of vinegar. *Journal of Food Product and The American Vinegar Industry*, 1, 5-20.
- Koen Illegheems, Vuyst, L. D., & Weckx, S. (2013). Complete genome sequence and comparative analysis of *Acetobacter pasteurianus* 386B, a strain well adapted to the cocoa bean fermentation ecosystem. *BMC Genomics*.
- Kondo T., & Ikeda, T. (1999). An electrochemical method for the measurements of substrate-oxidizing activity of acetic acid bacteria using a carbon-paste electrode modified with immobilized bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 664-668.
- Koschwanez JH, F. K., Murray AW (2011). Sucrose Utilization in Budding Yeast as a Model for the Origin of Undifferentiated Multicellularity. *PLoS Biology*, 9(8), e1001122. doi: 10.1371/journal.pbio.1001122.g001
- Krajewski V, Simić P, Mouncey N, Bringer S, Sahm H, & Bott, M. (2010). Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation. *Appl Environ Microbiol*, 76, 4369-4376. doi: 10.1128/AEM.03022-09
- Krusong, W., Pornpukdeewatana, S., Kerdpiboon, S., & Tantratian, S. (2014). Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semi-continuous process by artificial neural network. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 383-389. doi: 10.1016/j.lwt.2013.11.026
- Krusong, W., & Vichitraka, A. (2010). An investigation of simultaneous pineapple vinegar fermentation interaction between AAB and yeast. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3(1), 192-203
- M. J. Sousa, P. L., F. Rodrigues, C. Leão and M. Côrte-Real. (2012). *Cell Metabolism - Cell Homeostasis and Stress Response: Stress and Cell Death in Yeast Induced by Acetic Acid* (P. Bubulya Ed. Vol. 4): InTech.
- M. Macias, I. C., D. Cantero. (1996). Optimum operating conditions in closed-system industrial acetifiers (batch operation) a study by computer simulation. *The Chemical Engineering Journal*, 62.
- Mamlouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53.

- Mas, A., Torija, M. J., Garcia-Parrilla Mdel, C., & Troncoso, A. M. (2014). Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. *ScientificWorldJournal*, 2014, 394671. doi: 10.1155/2014/394671
- Matsushita K, Inoue T, Theeragool G, Trček J, Toyama H, & Adachi, O. (2005). *Survival and Death in Bacteria.: Acetic acid production in acetic acid bacteria leading to their 'death' and survival* (Y. M. Kerala Ed.).
- Matsushita K, Toyama H, & Adachi, O. (2004). *Respiration in Archaea and Bacteria, advances in photosynthesis and respiration.:* Springer.
- Okamoto-Kainuma, A. Ehata, Y. Ikeda, M. Osono, T. Ishikawa, M. Kaga, & T. Koizumi, Y. (2008). Hydrogen peroxide resistance of *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 and its relationship to acetic acid fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72(10), 2526-2534. doi: 10.1271/bbb.80136
- Philipp Adler, L. J. F., Antje Berger, Christoph Josef Bolten, Carl Erik Hansen, Christoph Wittmann. (2014). The Key to Acetate: Metabolic Fluxes of Acetic Acid Bacteria under Cocoa Pulp Fermentation-Simulating Conditions. *Appl Environ Microbiol*, 80(15), 4702-4716.
- Plessi, M. (2003). vinegar. *Elsevier Science*.
- Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W. F., Ehrenreich, A., . . . Deppenmeier, U. (2005). Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nat Biotechnol*, 23(2), 195-200. doi: 10.1038/nbt1062
- Qi, Z., Yang, H., Xia, X., Xin, Y., Zhang, L., Wang, W., & Yu, X. (2013). A protocol for optimization vinegar fermentation according to the ratio of oxygen consumption versus acid yield. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 304-309. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.029
- Qi, Z., Yang, H., Xia, X., Wang, W., Yu, X. (2014). High strength vinegar fermentation by *Acetobacter pasteurianus* via enhancing alcohol respiratory chain. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.
- Reed, P. D. H.-J. R. a. D. G. (2008). *Biotechnology: Products of Primary Metabolism* (2 ed. Vol. 6).
- Richhardt J., B. S., Bott M. (2012). Mutational analysis of the pentose phosphate and Entner-Doudoroff pathways in *Gluconobacter oxydans* reveals improved growth of a Deltaedd Deltaeda mutant on mannitol. *Appl Environ Microbiol*, 78(19), 6975-6986. doi: 10.1128/AEM.01166-12
- Romero L.E. , Gomez J.M., Care I. , & Cantero, D. (1994). A kinetic model for growth of *Acetobacter aceti* in submerged culture. *The Chemical Engineering Journal*, 54.
- Sakurai, K., Arai, H., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2012). Changes in the gene expression profile of *Acetobacter aceti* during growth on ethanol. *J Biosci Bioeng*, 113(3), 343-348. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.005
- Schlepütz T, B. J. (2013). Investigation of vinegar production using a novel shakenrepeated batch culture system. *Biotechnol Progr*, 29, 1158-1168.
- Schlepütz T., Gerhards J. P., & Büchs, J. (2013). Ensuring constant oxygen supply during inoculation is essential to obtain reproducible results with obligatory aerobic acetic acid bacteria in vinegar production. *Process Biochemistry*, 48(3), 398-405. doi: 10.1016/j.procbio.2013.01.009
- Sengun Ilkin Yucel, & Seniz, K. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647-656. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.008

- Skenderi, P. K. (2013). Total Antioxidant Capacity and Phenolic Compounds of Selected Vinegars in the Greek Market. *Journal of Food & Nutritional Disorders*, 02(02). doi: 10.4172/2324-9323.1000112
- Solieri, L., & Giudici, P. (2009). *Vinegars of the world*: Springer.
- Tan, S. C. (2005). *Vinegar Fermentation*. University of Louisiana at Lafayette.
- Tesfaye W. , Morales M.L., Garcia-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2002). Wine vinegar Technology, Authenticity and Quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 13.
- Thomas, F., & Jamin, E. (2009). 2H NMR and 13C-IRMS analyses of acetic acid from vinegar, 18O-IRMS analysis of water in vinegar. *Anal Chim Acta*, 649(1), 98-105. doi: 10.1016/j.aca.2009.07.014
- Van Beneden, & Pierre-Joseph. (1876). *Animal parasites and messmates* (H. S. King Ed.). London.
- Vegas, C., Mateo, E., Gonzalez, A., Jara, C., Guillamon, J. M., Poblet, M., . . . Mas, A. (2010). Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *Int J Food Microbiol*, 138(1-2), 130-136. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.006
- Yakushi, T., & Matsushita, K. (2010). Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86(5), 1257-1265. doi: 10.1007/s00253-010-2529-z
- Yamada, Y., & Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 125(1), 15-24. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.077
- Yong Soo Park, Hisao Ohtake, Masahiro Fukaya, Hajime Okumura, Yoshiva Kawamura, & Toda, K. (1989). Effects of Dissolved Oxygen and Acetic Acid Concentrations on Acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 68(2), 96-101.
- Zhengliang Qi, Hailin Yang, Xiaole Xia, Wu Quan, Wu Wang, & Yu, X. (2014). Achieving high strength vinegar fermentation via regulating cell growth status and aeration strategy. *Process Biochemistry*, 49, 1063-1070.
- Zhu K., Lu L., Wei L., Imanaka T., & Q., H. (2011). Modification and evolution of *Gluconobacter oxydans* for enhanced growth and biotransformation capabilities at low glucose concentration. *Molecular Biotechnology*, 49(1), 56-64.

<http://www.frings.com/>

<http://www.fz-juelich.de/ibg/ibg->

1/EN/Research/SystemicMicrobiology/physio/physio_research.html

http://www.hannacan.com/fiches_techniques/RHACCP%20&%20Food%20Quality%20Products/HI83742.pdf

<http://www.waterisotopes.org> <http://eurlex.europa.eu/>

<http://www.versatilevinegar.org/>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ένθεμα: Υπολογισμός μ_{max}

Για την περαιτέρω κινητική μελέτη των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το μη δομημένο-μη κατανεμημένο μοντέλο ανάπτυξης μίας μεταβλητής Monod. Η ανάπτυξη του βακτηρίου *Acetobacter pasteurianus* στην εκθετική φάση περιγράφεται από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = f(x) \text{ (Drysdale \& Fleet, 1989)}$$

$$f(x) = \mu x \text{ (2)}$$

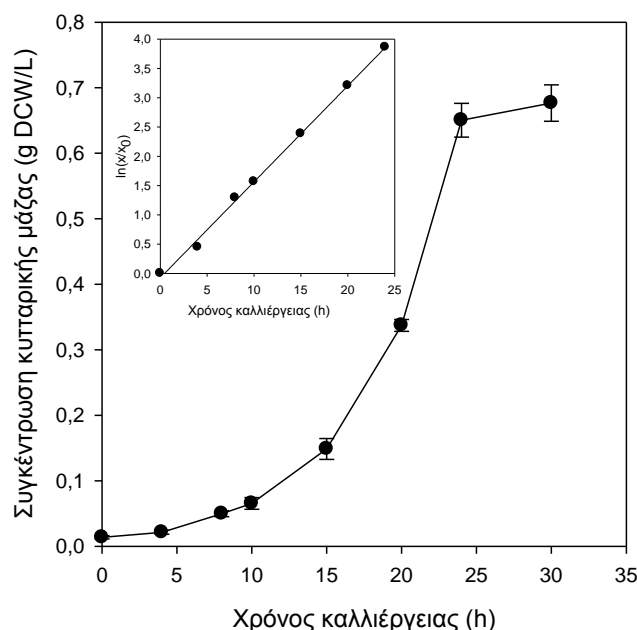
Από τις εξισώσεις (Drysdale & Fleet, 1989), (2) συνεπάγεται ότι:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \rightarrow x(t) = x_0 e^{\mu t}$$

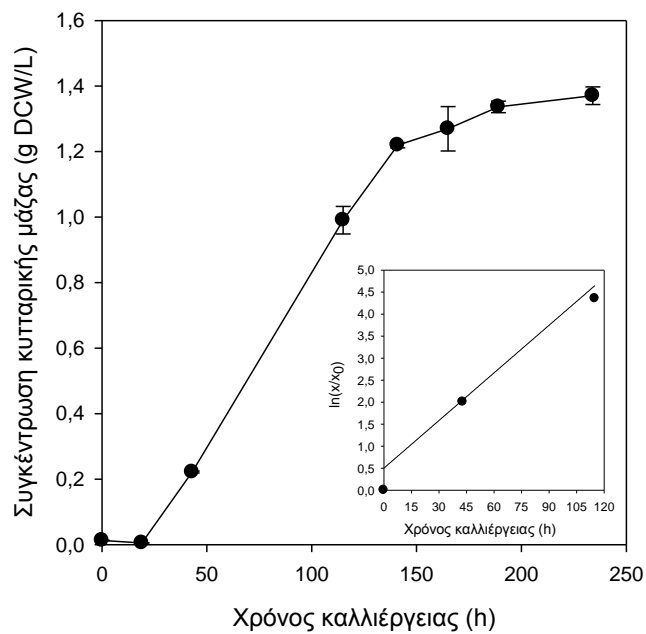
Από την τελευταία υπολογίζεται ο χρόνος διπλασιασμού της βιομάζας ίσος με:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

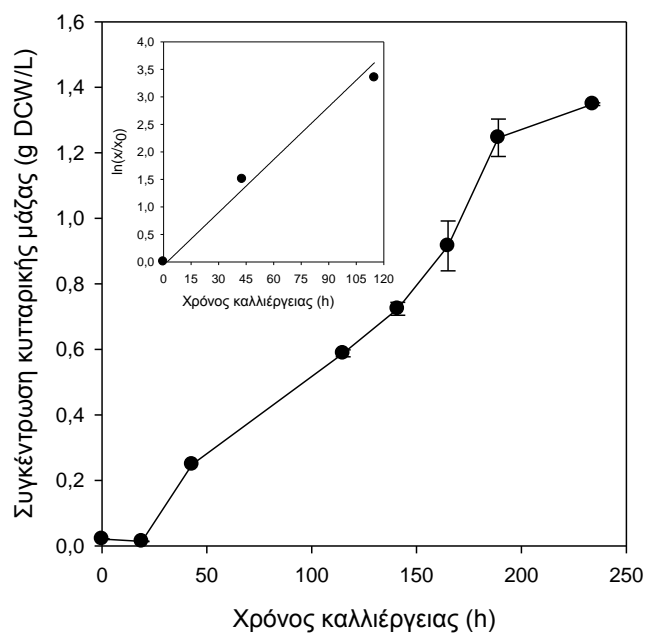
Στην περίπτωση αυτή, θεωρείται ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, μ , είναι σταθερός και ίσος με μ_{max} . Ο υπολογισμός της τιμής του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, μ_{max} , έγινε γραφικά βάση της κλίσης του διαγράμματος $\ln(X/X_0) = f(t)$ στην εκθετική φάση. Επιπλέον, γραφικός υπολογισμός πραγματοποιήθηκε για την εύρεση του ρυθμού κατανάλωσης αιθανόλης, η οποία αποτελεί υπόστρωμα για την αντίδραση οξειδωσης, $r_E = -d[E]/dt$, του ρυθμού σχηματισμού οξικού οξέος, το οποίο αποτελεί προϊόν της αντίδρασης οξειδωσης, $r_A = d[A]/dt$ και των συντελεστών απόδοσης $Y_{P/S}$ $Y_{X/S}$



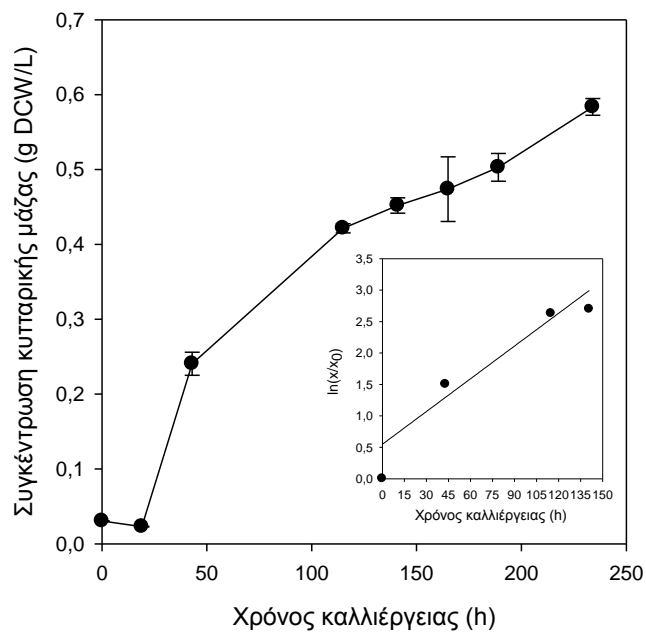
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 34: Ανάπτυξη του *A. pasteurianus* DSM 3509 απουσία αιθανόλης (100% YPM).



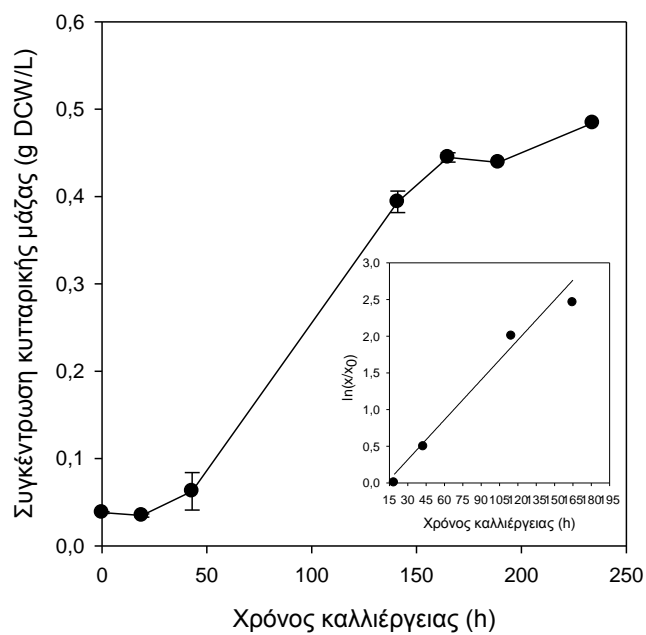
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 35: Ανάπτυξη του *A. pasteurianus* DSM 3509 παρουσία 1.2% (w/v) αιθανόλης



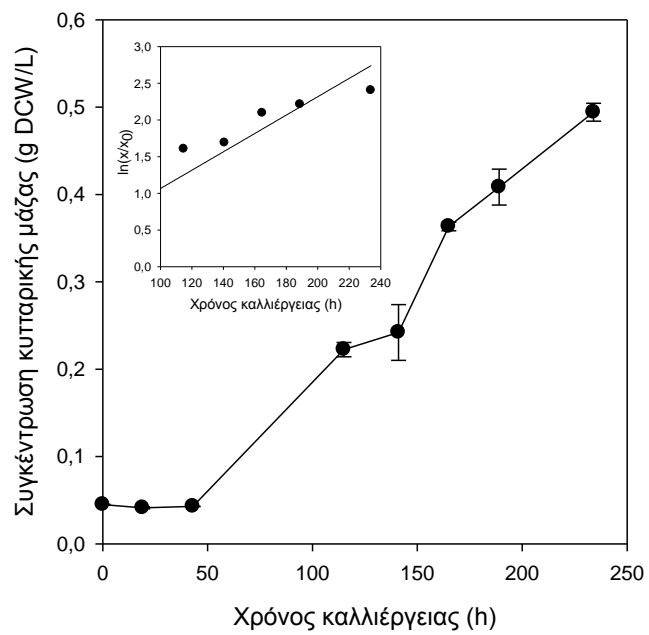
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 36: Ανάπτυξη του *A. pasteurianus* DSM 3509 παρουσία 2.1% (w/v) αιθανόλης



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 37: Ανάπτυξη του *A. pasteurianus* DSM 3509 παρουσία 3.8% (w/v) αιθανόλης



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 38: Ανάπτυξη του *A. pasteurianus* DSM 3509 παρουσία 5.0% (w/v) αιθανόλης



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 39: Ανάπτυξη του *A. pasteurianus* DSM 3509 παρουσία 6.3% (w/v) αιθανόλης