

Batteri dell'acido acetico

Fermentazione acetica

- È un metabolismo ossidativo
- È un processo aerobico che richiede alcol etilico.

Tale ossidazione avviene ad opera di batteri del genere *Acetobacter*.

La concentrazione in acido acetico si aggira a valori compresi tra il 3% e il 5%.



Batteri dell'acido acetico

Sono microrganismi **aerobici obbligati** Gram negativi.

- **Genere Acetobacter:** ossidano l'etanolo, glicerolo e lattato ad acido acetico.
- **Genere Gluconobacter:** ossida principalmente zuccheri come: mannitolo, sorbitolo, fruttosio e glucosio ma anche glicerolo.



Vie metaboliche principali in *Gluconobacter*

1) Ossidazione di zuccheri

Trasformazione del glucosio ad acido gluconico (gluconato), l'enzima è la glucosio deidrogenasi (membrana, pirrolochinolina chinone PQQ)

Il gluconato può essere ulteriormente ossidato a:

- **Acido 2-cheto-gluconico**
- **Acido 2,5-dicheto-gluconico**

Le ossidazioni sono periplasmatiche, quindi l'ATP prodotto è limitato.

2) Ciclo di Krebs è incompleto

Produce intermedi come l'acido citrico, il succinico, l'acido malico per le biosintesi.

3) Via dei pentosi fosfati (PPP)

È una via limitata, serve soprattutto a produrre NADPH per biosintesi.

Vie metaboliche principali in Acetobacter

1) Ossidazione di alcoli

L'etanolo è trasformato in acetaldeide → acido acetico → $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, gli enzimi sono l'alcol deidrogenasi (ADH, periplasmica), l'aldeide deidrogenasi (ALDH)

- Questa via è perossidativa e legata alla membrana con il trasferimento di elettroni all'ossigeno e produzione di ATP tramite PMF.

Acetobacter può ossidare l'acido acetico ulteriormente a CO_2 e H_2O , diminuendo l'accumulo eccessivo di acido.

2) Ciclo di Krebs è completo

Ossidazione completa di acetato e zuccheri con produzione di ATP, NADH, FADH_2 per la respirazione. Generazione di intermedi biosintetici (aminoacidi, acidi organici)

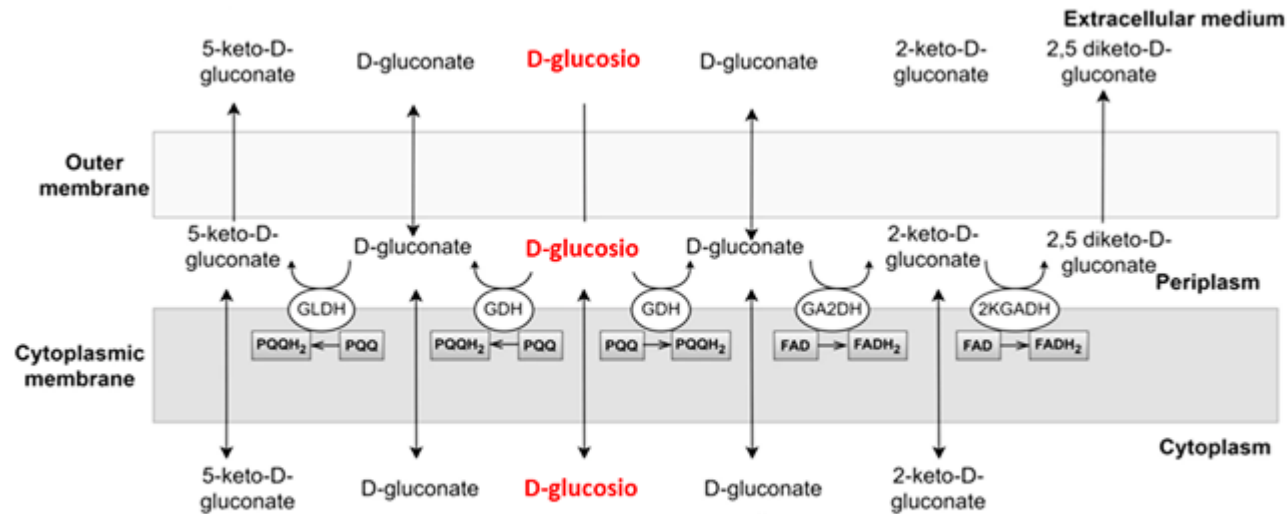
3) Via dei pentosi fosfati

È presente, per la sintesi di NADPH necessario per le biosintesi cellulare.

Gluconobacter ossida il glucosio attraverso due percorsi alternativi.

Il glucosio non entra completamente nel citoplasma per essere metabolizzato tramite glicolisi, ma viene ossidato direttamente nello spazio periplasmatico tramite enzimi legati alla membrana o periplasmatici.

Glucosio deidrogenasi legata alla membrana (mGDH, PQQ-dipendente)



Enzimi principali coinvolti sono la glucosio deidrogenasi (GDH, PQQ-dipendente) che ossida il glucosio a glucono- δ -lattone, infine diventa gluconato. La gluconato deidrogenasi può ossidare ulteriormente il gluconato a 2-chetogluconato o 2,5-dichetogluconato.

Durante l'ossidazione del glucosio alcuni atomi di idrogeno vengono rimossi e gli elettroni associati a questi idrogeni, vengono trasferiti a trasportatori elettronici legati alla membrana. Gli elettroni, arrivano all'ossigeno molecolare (O_2), dove viene ridotto in H_2O .

Il trasferimento di elettroni lungo la catena respiratoria è accoppiato al trasporto di protoni (H^+) attraverso la membrana, l'energia del flusso di protoni viene trasformata in ATP.

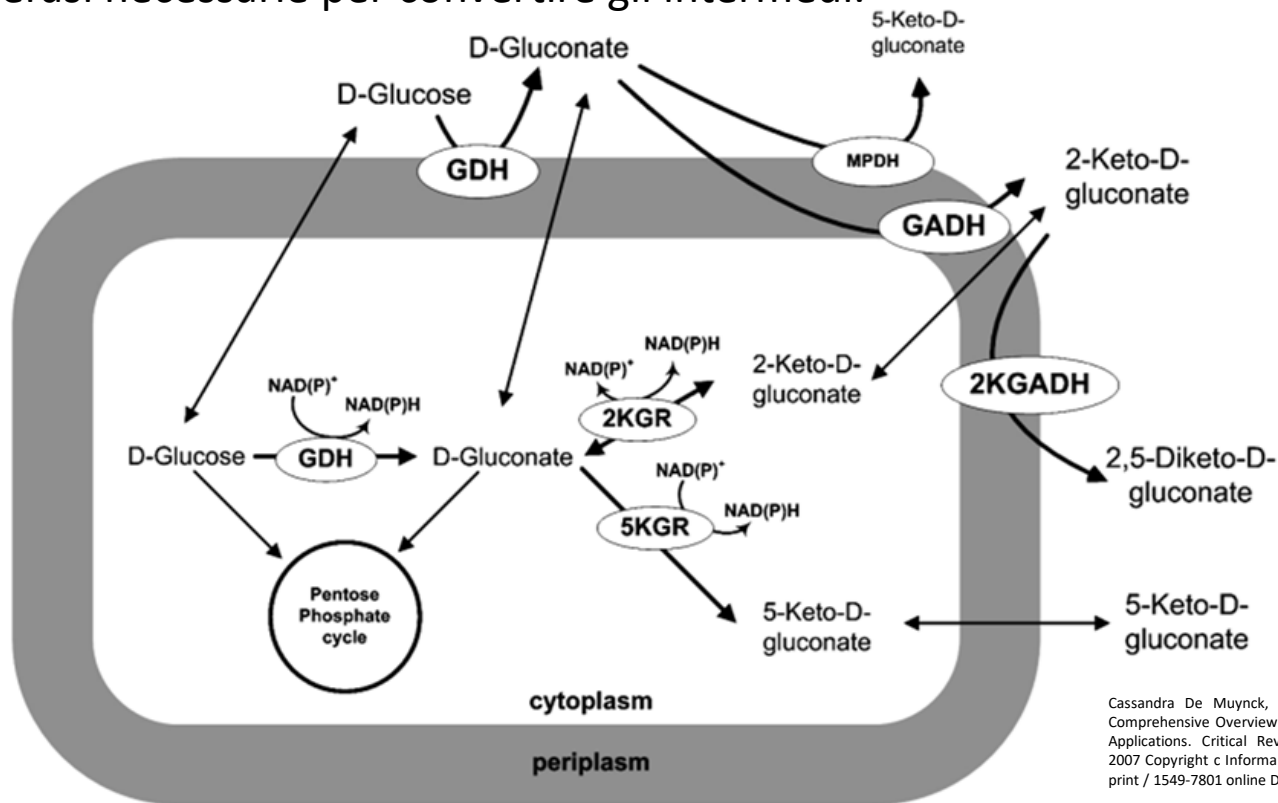
Questo processo è chiamato "ossidazione diretta" perché:

- Non richiede l'ingresso del glucosio nel citoplasma.
- Gli elettroni prodotti vanno direttamente alla catena respiratoria che crea la forza proton-motrice per produrre ATP.

Glucosio deidrogenasi citoplasmatica NADP⁺ dipendente (cGDH)

La via citoplasmatica è legata ad alcuni enzimi NAD(P)-dipendenti.

Gli enzimi coinvolti sono la deidrogenasi citoplasmatiche (NAD⁺/NADP⁺ dipendenti) e alcune chinasi e isomerasi necessarie per convertire gli intermedi.



Cassandra De Muynck, The Genus *Gluconobacter* Oxydans: Comprehensive Overview of Biochemistry and Biotechnological Applications. Critical Reviews in Biotechnology, 27:147–171, 2007 Copyright c Informa Healthcare USA, Inc. ISSN: 0738-8551 print / 1549-7801 online DOI: 10.1080/07388550701503584

FIGURE 2 Pathways of glucose oxidation in *G. oxydans*; GDH; glucose dehydrogenase; GADH; gluconate dehydrogenase; 2KGADH; 2-keto-D-gluconate dehydrogenase; 2KGR; 2-keto-D-gluconate reductase; 5KGR; 5-keto-D-gluconate reductase; MPDH; major polyol

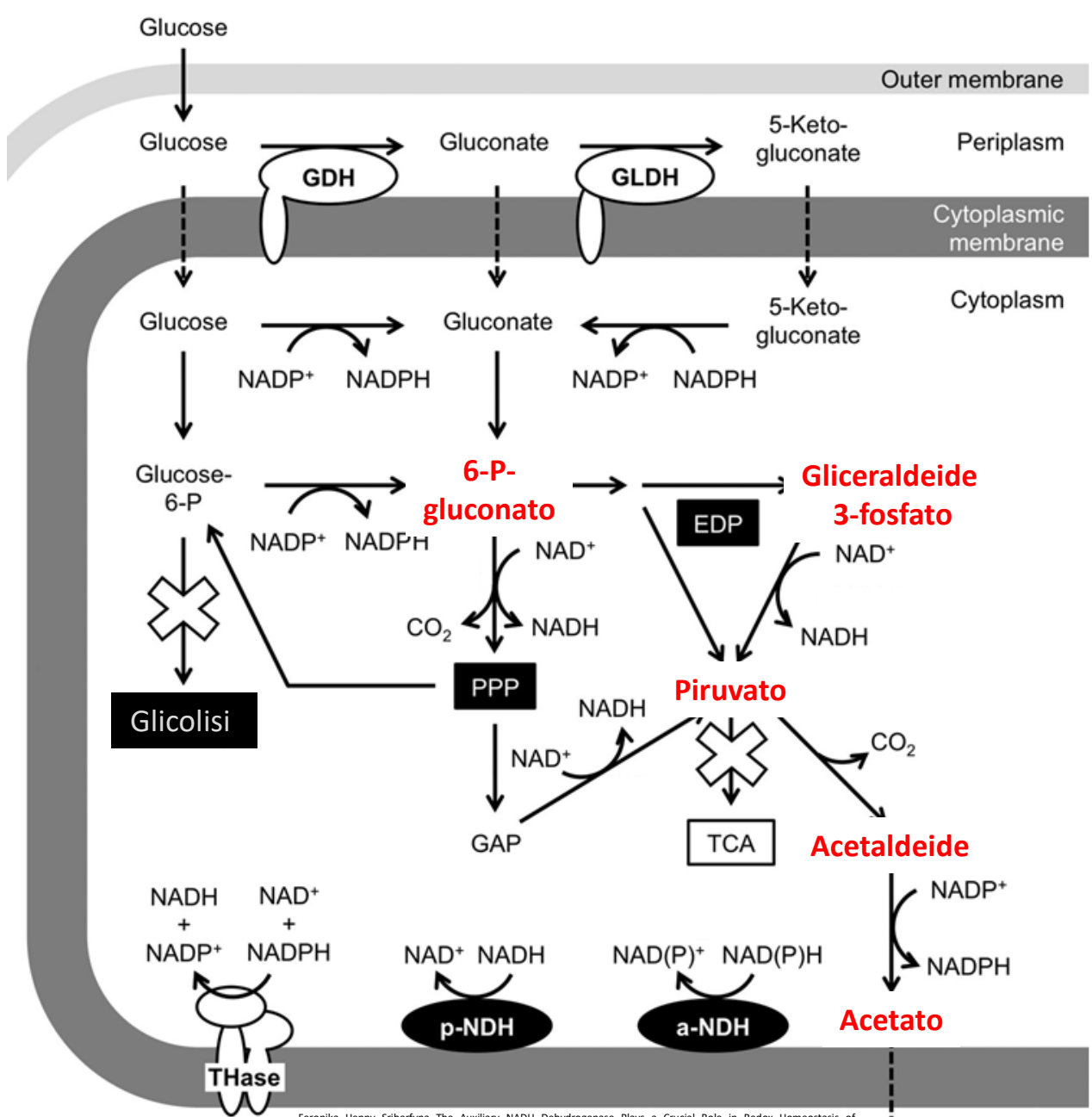
- La funzione è la rigenerazione di cofattori redox: NAD⁺/NADP⁺ che servono per le biosintesi.
- La via citoplasmatica rigenera glucosio/fruttosio-6-P dai triosi (glicerolo, gliceraldeide-3-P). Questi intermedi servono per la sintesi di nucleotidi, aminoacidi e polisaccaridi.

Gluconobacter e la via di Entner-Doudoroff (EDP): produzione di acido acetico

Il 6-fosfogluconato prodotto nel citoplasma dalla via dei pentosio fosfato entra nella via, viene scisso da una aldolasi in piruvato e gliceraldeide 3-fosfato.

Quest'ultima viene ossidata a piruvato in presenza di NAD⁺ con produzione di ATP.

Il piruvato viene decarbossilato ad acetaldeide dalla piruvato decarbossilasi, quest'ultima viene trasformata in acetato (acido acetico) dall'acetaldeide deidrogenasi. entra nella via ED



Feronika Heppy Sriherfyna The Auxiliary NADH Dehydrogenase Plays a Crucial Role in Redox Homeostasis of Nicotinamide Cofactors in the Absence of the Periplasmic Oxidation System in *Gluconobacter oxydans* NBRC3293. PHYSIOLOGY. January 2021 Volume 87 Issue 2 e02155-20

Acetobacter

In *Acetobacter* sono espressi la maggior parte dei geni coinvolti sia nella glicolisi sia nella gluconeogenesi. Il glucosio, una volta convertito in glucosio-6-fosfato oppure in gluconato, viene indirizzato principalmente verso la via del pentosio fosfato.

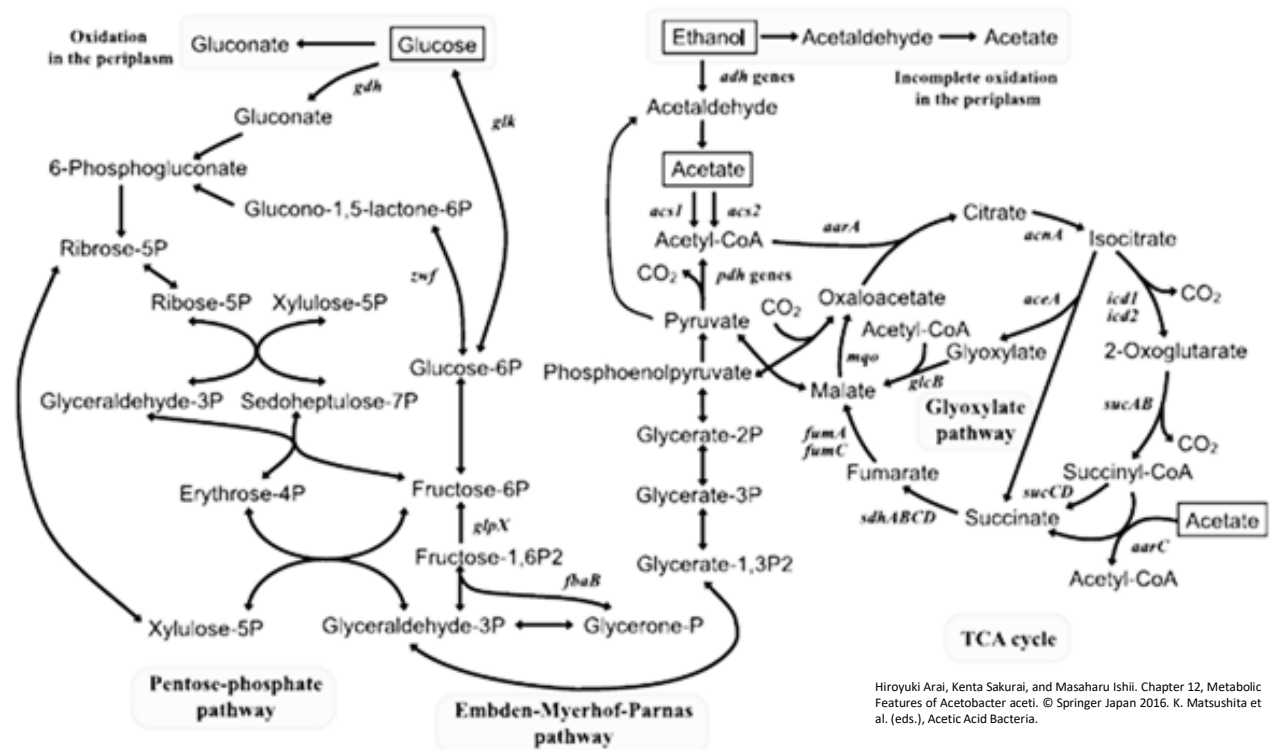


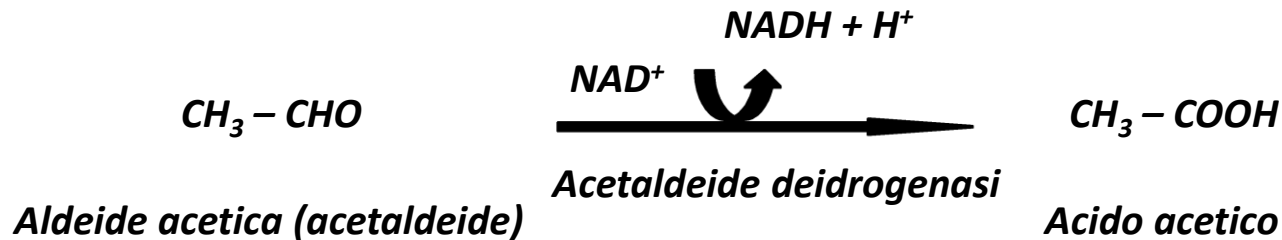
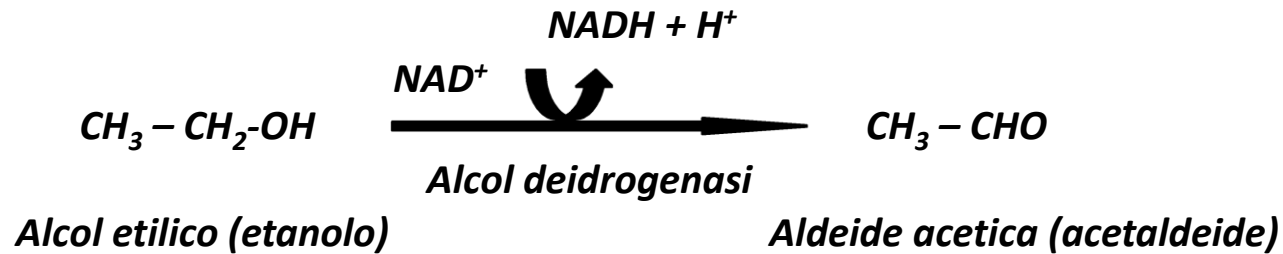
Fig. 12.1 Predicted central carbon metabolic pathway of *Acetobacter acetii* NBRC 14818. (Reproduced from Sakurai et al. 2011)

Hiroaki Arai, Kenta Sakurai, and Masaharu Ishii. Chapter 12, Metabolic Features of *Acetobacter acetii*. © Springer Japan 2016. K. Matsushita et al. (eds.), Acetic Acid Bacteria.

L'*Acetobacter* utilizza preferenzialmente l'etanolo come fonte di carbonio ed energia, anche in presenza di glucosio. Il batterio ossida l'etanolo tramite le alcool deidrogenasi e aldeide deidrogenasi di membrana, generando direttamente energia attraverso la catena respiratoria. Questo comportamento ricorda l'effetto Crabtree nei lieviti, ma negli *Acetobacter* si tratta principalmente di una regolazione catabolica perché gli enzimi chiave della glicolisi possono essere parzialmente inibiti o meno espressi in presenza di etanolo abbondante. Di conseguenza, il glucosio rimane disponibile ma viene metabolizzato più lentamente. Essendo un batterio strettamente aerobio, *Acetobacter* utilizza l'ossigeno molecolare come accettore finale degli elettroni nella sua catena respiratoria.

Metabolismo dell'etanolo

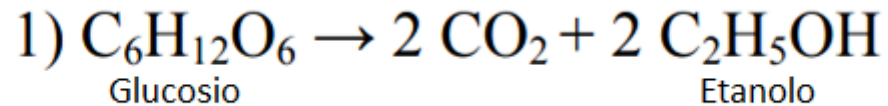
Tra tutte le trasformazioni effettuate dai batteri dell'acido acetico, quella che ha più interesse enologico è la trasformazione dell'etanolo in acido acetico



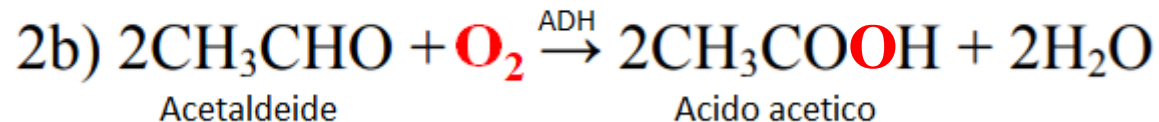
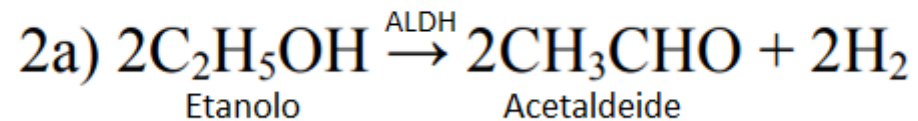
Gli Acetobacter sono anche in grado di ossidare l'acido acetico, ma questa reazione è inibita dall'etanolo. In condizioni di aerobiosi il 75% dell'acetaldeide porta a la formazione di acido acetico e in condizione di molta aereazione tutto l'etanolo si converte in acido acetico. Quando l'ambiente si impoverisce di ossigeno, l'acetaldeide si accumula nel mezzo. È una reazione pH-dipendente, in un ambiente acido sia ha l'ossidazione e l'accumulo di acetaldeide piuttosto che la trasformazione ad acido acetico.

Chimica della fermentazione acetica:

Fermentazione alcolica da parte dei lieviti:



Fermentazione acetica da parte di acetobacter:



L'*Acetobacter*, nel metabolismo dell'etanolo, utilizza una serie di deidrogenasi specializzate, molte delle quali sono legate alla membrana e utilizzano pirrolochinolina chinone (PQQ), citocromi o NAD^+ come cofattori. Questi enzimi possono dare sia l'ossidazione incompleta dell'etanolo fino ad acido acetico sia l'ossidazione completa (fino a CO_2) tramite il ciclo di Krebs.

Nel metabolismo dell'etanolo gli enzimi coinvolti in sono:

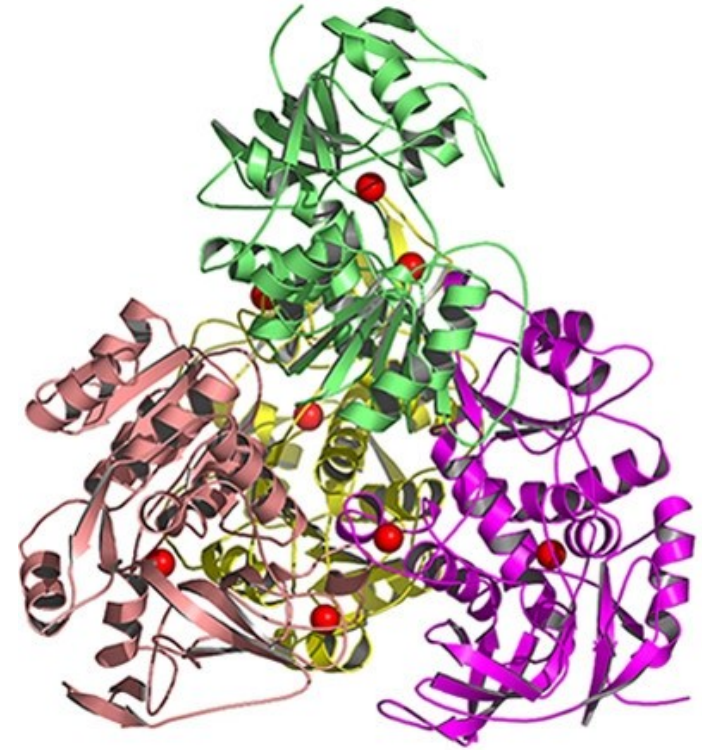
l'alcol deidrogenasi (ADH) e l'acetaldeide deidrogenasi (ALDH).

Se ne distinguono di due tipi:

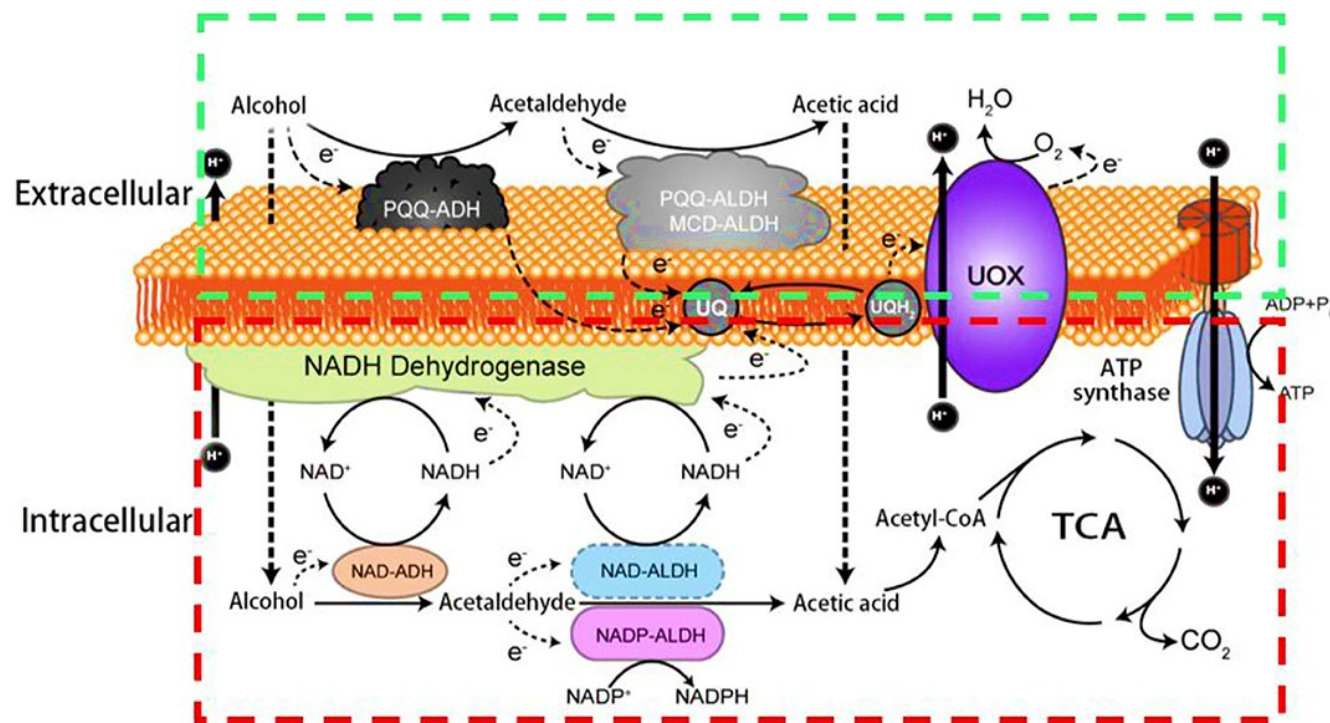
- l'ADH e ALDH dipendenti dal coenzima NADP^+
- l'ADH e ALDH non dipendenti dal coenzima

I primi sono solubili e citoplasmatici, mentre i secondi sono legati alla membrana plasmatica. Per questi ultimi gli elettroni generati nella reazione di ossidazione sono avviati fino all' O_2 , attraverso il sistema di trasporto di elettroni integrato nella membrana.

alcol deidrogenasi
batterica



Kyriacos Petratos et al., Structure and Dynamics of a Thermostable Alcohol Dehydrogenase from the Antarctic Psychrophile *Moraxella* sp. TAE123. ACS Omega 2020, 5, 14523–14534. <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c01210>



L'etanolo è inizialmente ossidato ad acetaldeide, successivamente un'ulteriore ossidazione lo trasformerà in acido acetico.

Le reazioni ossidative sono catalizzate dagli enzimi citoplasmatici e da quelli legati alla membrana plasmatica (l'ADH e ALDH). Questi ultimi trasferiscono gli elettroni al PQQ → PQQH₂ (catena respiratoria). Gli elettroni entrano direttamente nella catena di trasporto degli elettroni, generando un gradiente elettrochimico che può essere utilizzato per la sintesi di ATP. In particolare, il trasferimento di protoni attraverso la proteina ubiquinolo ossidasi (UOX) di membrana crea una forza proton-motrice che alimenta la produzione di ATP.

Nelle reazioni ossidative che avvengono nel citoplasma, l'acetato prodotto viene assimilato nel metabolismo cellulare, dove contribuisce alla formazione di NADH, che a sua volta alimenta la catena respiratoria. I geni per gli enzimi PQQ-ADH e ADH sono assenti nel *Gluconobacter*.

I batteri dell'acido acetico nel mosto d'uva

Nei vini e nei mosti, generalmente si trova nelle prime fasi *Gluconobacter* in quantità maggiore rispetto ad *Acetobacter*, soprattutto perché:

- *Gluconobacter* cresce velocemente sugli zuccheri del mosto e ossida principalmente glucosio e fruttosio ad acidi organici, senza necessità di alcol.
- *Acetobacter* predilige ambienti con etanolo già presente, quindi si sviluppa di più dopo la fermentazione alcolica.

Entrambi sono batteri aerobici, ma *Gluconobacter* tollera meglio condizioni iniziali di bassa ossigenazione e zuccheri elevati.

All'inizio del processo di vinificazione (mosto fresco), *Gluconobacter* è più abbondante, mentre *Acetobacter* cresce più tardi, quando l'etanolo è disponibile.

Sono naturalmente presenti sulla buccia dell'uva, poiché si sviluppano in ambienti ricchi di zuccheri e in presenza di ossigeno.

Nel mosto, se l'esposizione all'aria è eccessiva, questi batteri possono proliferare e iniziare ad ossidare l'etanolo prodotto dalla fermentazione alcolica.

La loro attività può portare a un aumento dell'acidità volatile nel vino, influenzando negativamente la qualità.

Condizioni necessarie per la fermentazione acetica

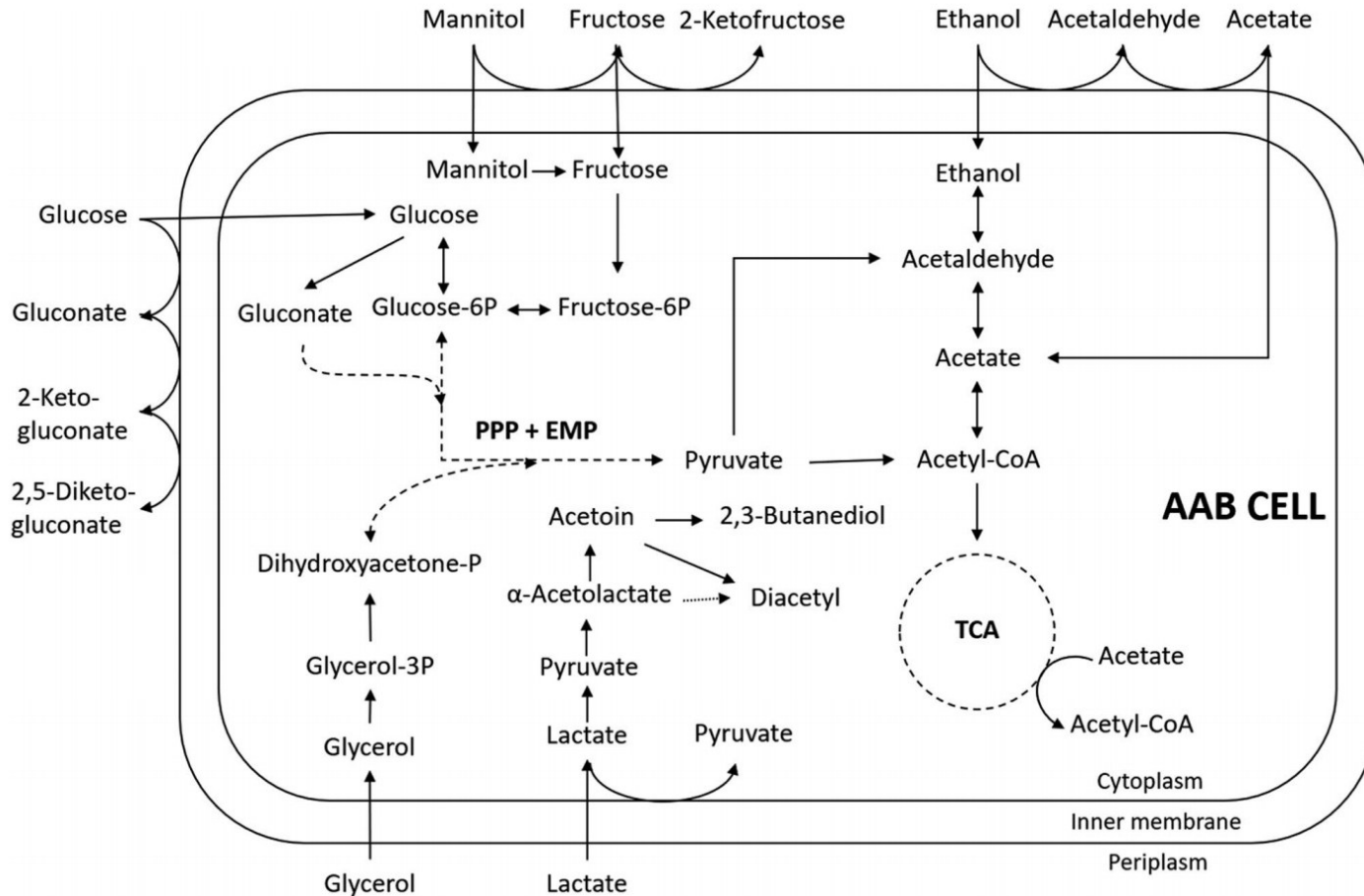
- **Temperatura:** tra 25 e 30 °C
- **pH:** leggermente acido, intorno a 4-5 (ma tollerano anche valori più bassi)
- **Ossigeno:** presenza di ossigeno è essenziale, perché sono aerobici obbligati
- **Concentrazione di etanolo:** moderata, di solito non superiore al 12-13% (l'eccesso può essere tossico)
- **Zuccheri:** disponibili come fonte di carbonio, ma spesso preferiscono etanolo o acido acetico
- **Nutrienti:** presenza di sali minerali (ferro, magnesio, calcio) e vitamine
- **Assenza o bassa concentrazione di SO₂:** perché è tossica per i batteri acetici.



Se è disponibile molto ossigeno, l'acido acetico prodotto da *Acetobacter* può essere ulteriormente ossidato completamente a CO₂ e H₂O tramite il ciclo di Krebs e la catena respiratoria.

Questo processo richiede un metabolismo aerobico efficiente e avviene tipicamente in condizioni con abbondanza di ossigeno e nutrienti, consentendo la completa degradazione del carbonio.

Panoramica del metabolismo dei batteri dell'acido acetico (*Acetobacter sp.* e *Gluconobacter sp.*)



Luc De Vuyst, Andrea Comasio & Simon Van Kerrebroeck (2021): Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, DOI: 10.1080/10408398.2021.1976100