

Batteri dell'acido acetico

linear
america





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

Le caratteristiche distintive:

Sono microrganismi aerobici obbligatori Gram negativi.

La temperatura ottimale è tra 25-30°C , mentre il pH ottimale per la crescita va da 5 a 6, ma la maggior parte può moltiplicarsi in ambienti acidi a partire da pH 3,5.

- **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 ed etanolo

I batteri acetici sono sensibili all'azione dell'anidride solforosa nelle normali dosi di impiego.

Si localizzano sulla superficie di fiori e frutti.



Vie metaboliche presenti nei batteri dell'acido acetico

Gli enzimi del *Gluconobacter* sono stati divisi in due gruppi in base alla posizione e alla funzione:

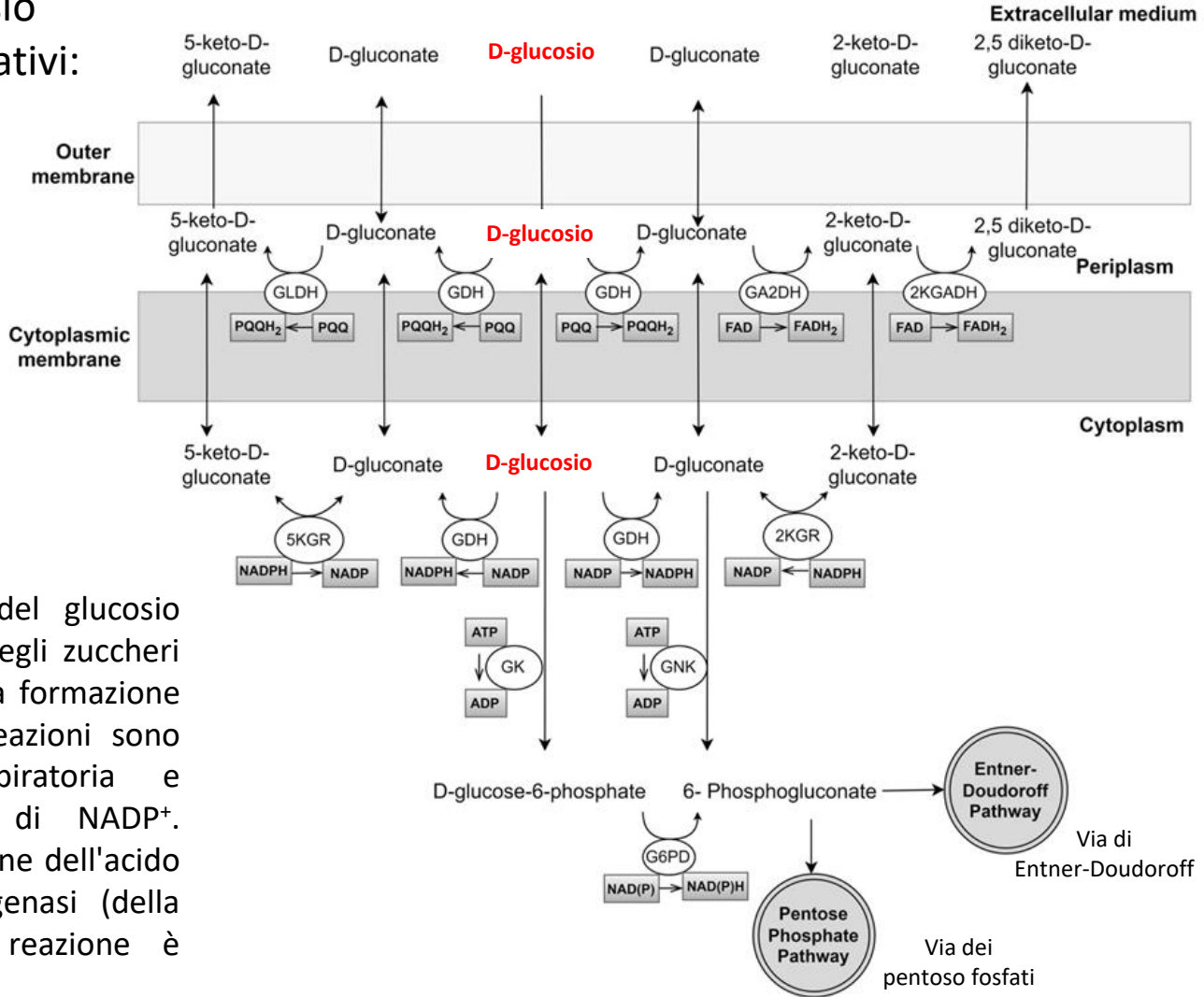
- Uno gruppo è costituito dagli enzimi strettamente legati membrana batterica e al sistema di trasporto elettronico. Catalizzano l'ossidazione diretta dei substrati e funzionano principalmente nella formazione ossidativa di acido acetico, D-gluconato, 2- o 5-cheto-D-gluconato.
- Il secondo gruppo è costituito da enzimi situati nel citoplasma e catalizzano il metabolismo intracellulare dei carboidrati. Solo la via del pentosio fosfato è presente per la rigenerazione ciclica di NADPH, la via glicolitica e il ciclo di Krebs non è funzionale in *Gluconobacter* perché sono incompleti per l'assenza della fosfofruttochinasi 1, della succinil-CoA sintetasi e della succinato deidrogenasi.

La specie *Acetobacter* può utilizzare gli zuccheri attraverso:

- La via del pentosio fosfato e la glicolisi.
- Gli zuccheri vengono ulteriormente metabolizzati in CO_2 e H_2O tramite il ciclo dell'acido citrico.

Gluconobacter ossida il glucosio attraverso due percorsi alternativi:

Gabrielle Alves Ribeiro da Silva et al. The industrial versatility of *Gluconobacter oxydans*: current applications and future perspectives World Journal of Microbiology and Biotechnology (2022) 38:134

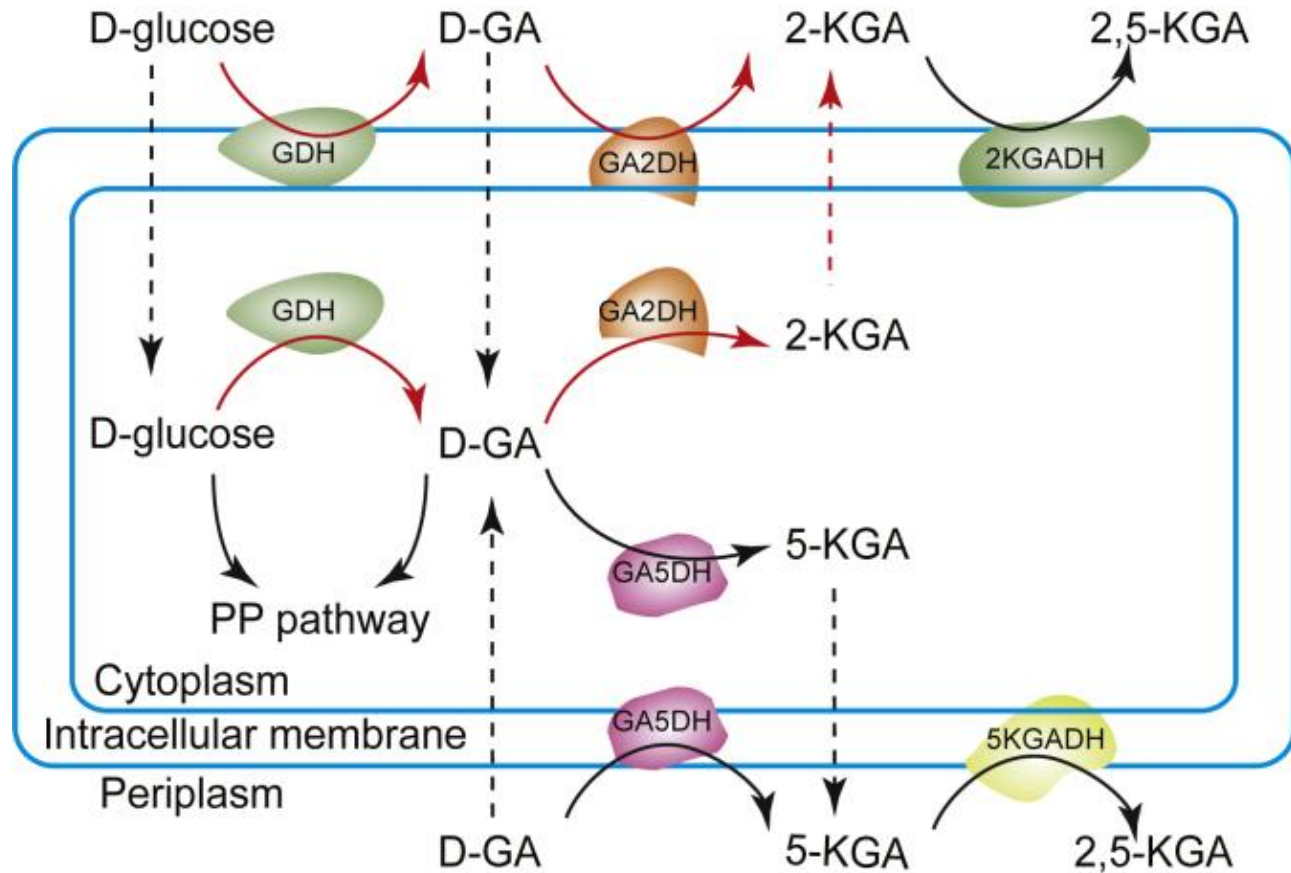


- La via dell'ossidazione diretta del glucosio oppure ossidazione incompleta degli zuccheri (senza la fosforilazione) porta alla formazione dei chetoni corrispondenti, le reazioni sono accoppiate alla catena respiratoria e dipendenti dalla disponibilità di NADP⁺. L'enzima che catalizza la formazione dell'acido gluconico è la glucosio deidrogenasi (della membrana citoplasmatica), la reazione è accoppiata alla riduzione del FAD⁺.

Un'ulteriore ossidazione dell'acido gluconico, porta alla formazione degli acidi cheto-5 gluconico, cheto-2 gluconico e di-cheto-2,5 gluconico. Un secondo sistema enzimatico si trova nel citoplasma, dove la glucosio deidrogenasi citoplasmatica NADP⁺ dipendente catalizza la formazione dell'acido gluconico. L'enzima gluconato NADP⁺-ossidoreduttasi converte l'acido gluconico in acido cheto-5 gluconico e in cheto-2 gluconico.

- La via del pentosio fosfato.

Percorsi per la sintesi dell'acido cheto-2-gluconico (2-KGA) dal glucosio in *Gluconobacter*.



Weizhu Zeng Efficient biosynthesis of 2-keto-D-gluconic acid by fed-batch culture of metabolically engineered *Gluconobacter japonicas*. *Synthetic and Systems Biotechnology* 4 (2019) 134–141

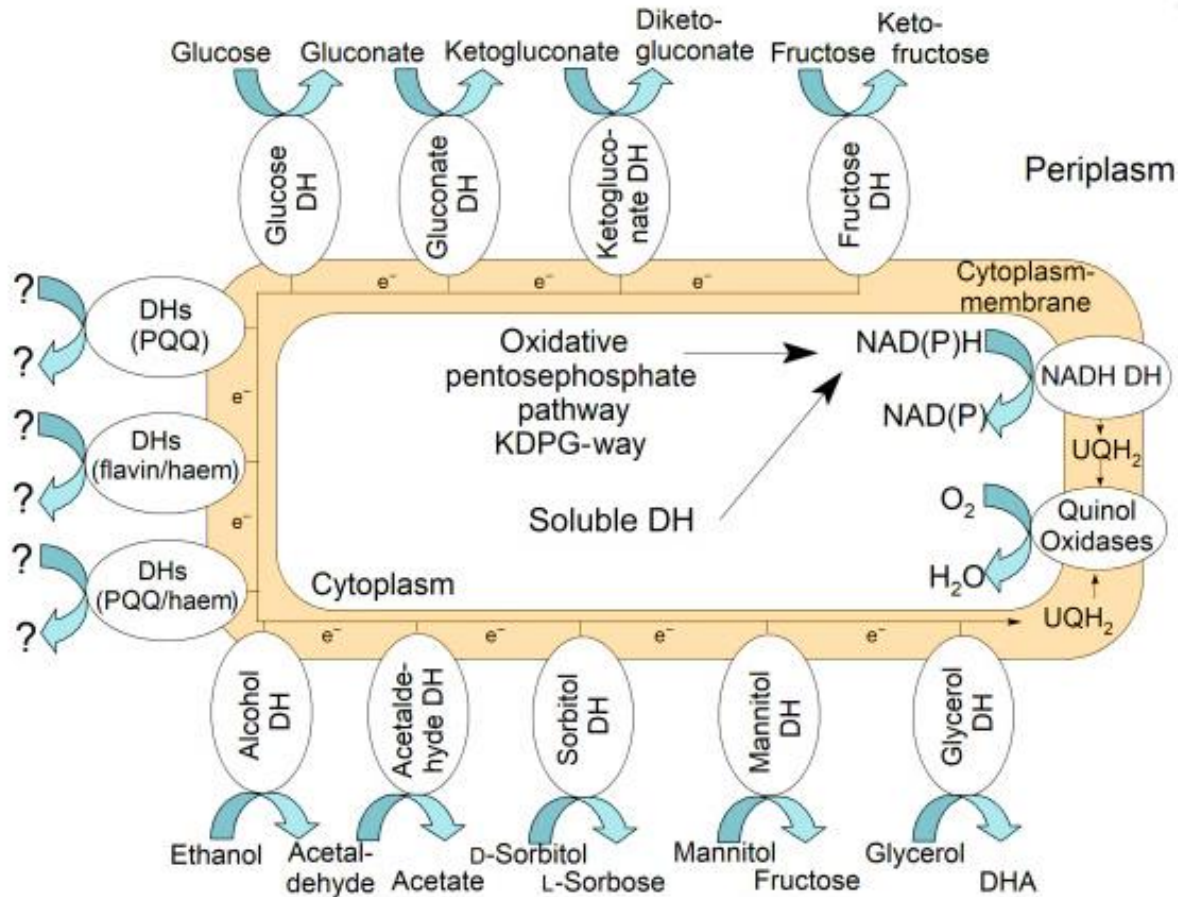
Esistono due percorsi alternativi per la sintesi del 2-KGA:

- Uno è catalizzato dalla glucosio deidrogenasi (GDH) legata alla membrana citoplasmatica dove il glucosio è direttamente ossidato a D-gluconato (D-GA), questo viene ulteriormente ossidato all'acido 2-KGA e all'acido cheto-2,5 gluconico (2,5-KGA).

- L'altro è catalizzato da una glucosio deidrogenasi intracellulare (GDH), dove il glucosio trasportato nel citoplasma viene ossidato a D-GA e ulteriormente ossidato all'acido 2-KGA o all'acido cheto-5 gluconico (5-KGA)

- oppure il glucosio viene trasformato in glucosio 6 fosfato e metabolizzato nella via dei pentosi.

Ossidazione di diversi substrati da parte delle deidrogenasi situate nel periplasma di *Gluconobacter oxydans*.

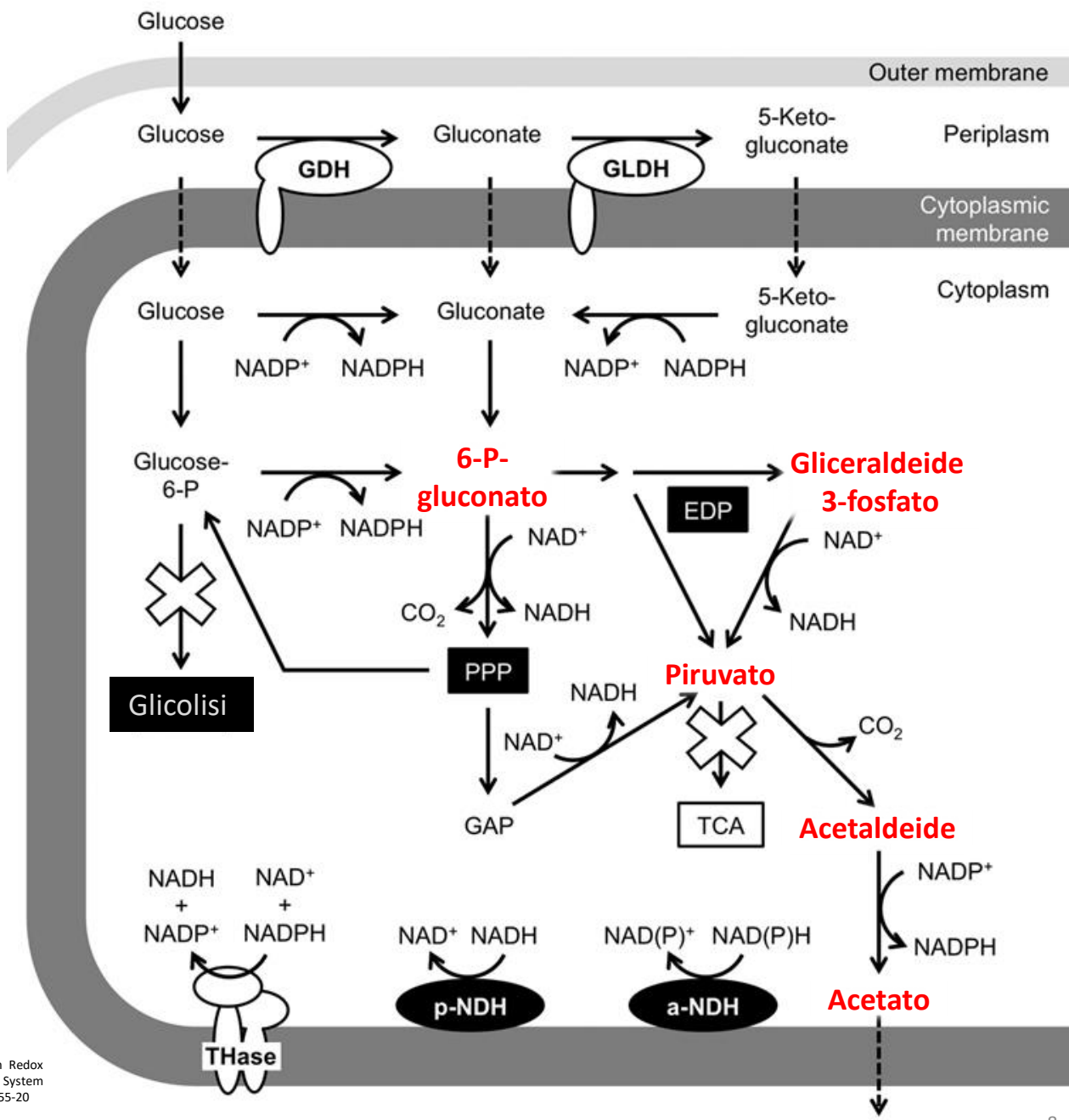


Glucobacter e la via di Entner-Doudoroff (EDP): produzione di acido acetico

il 6 fosfogluconato viene scisso 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.



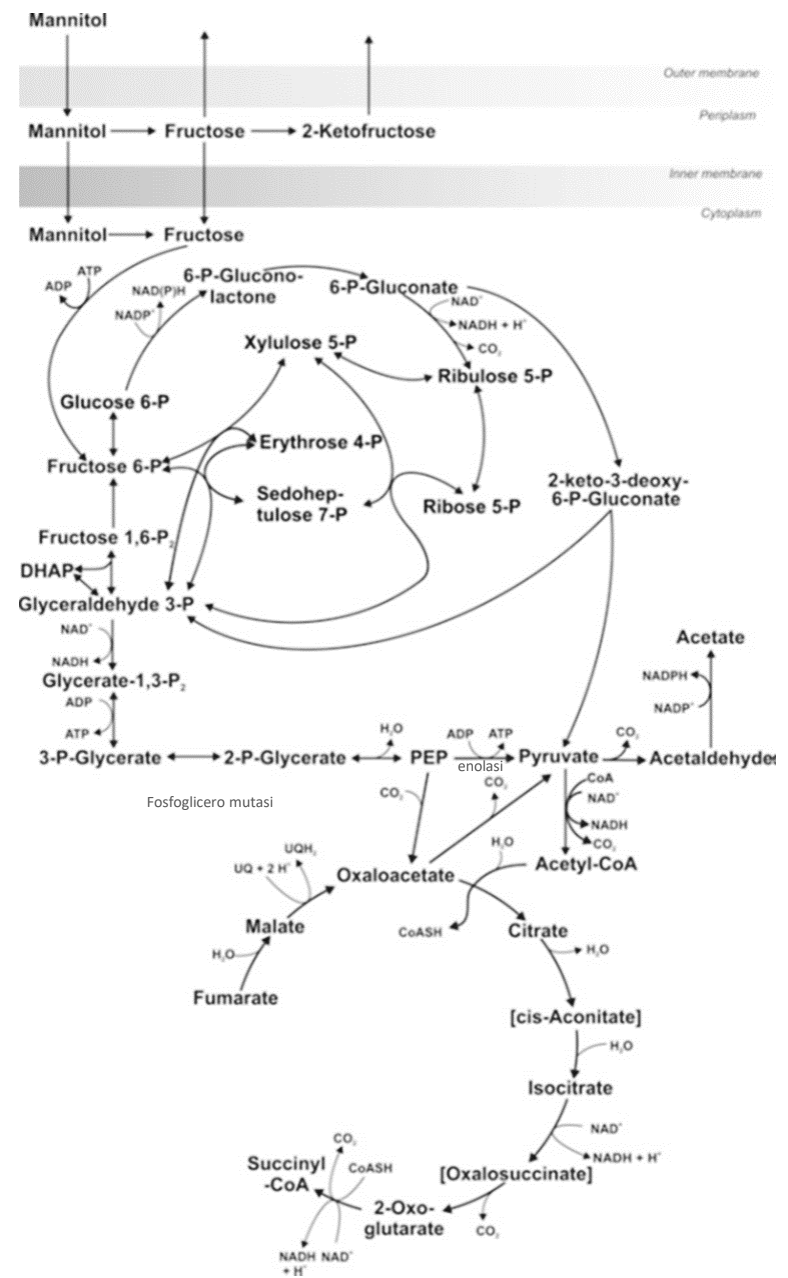
Feronika Heppy Sriherfyna The Auxiliary NADH Dehydrogenase Plays a Crucial Role in Redox Homeostasis of Nicotinamide Cofactors in the Absence of the Periplasmic Oxidation System in *Glucobacter oxydans* NBRC3293. PHYSIOLOGY. January 2021 Volume 87 Issue 2 e02155-20

Gluconobacter

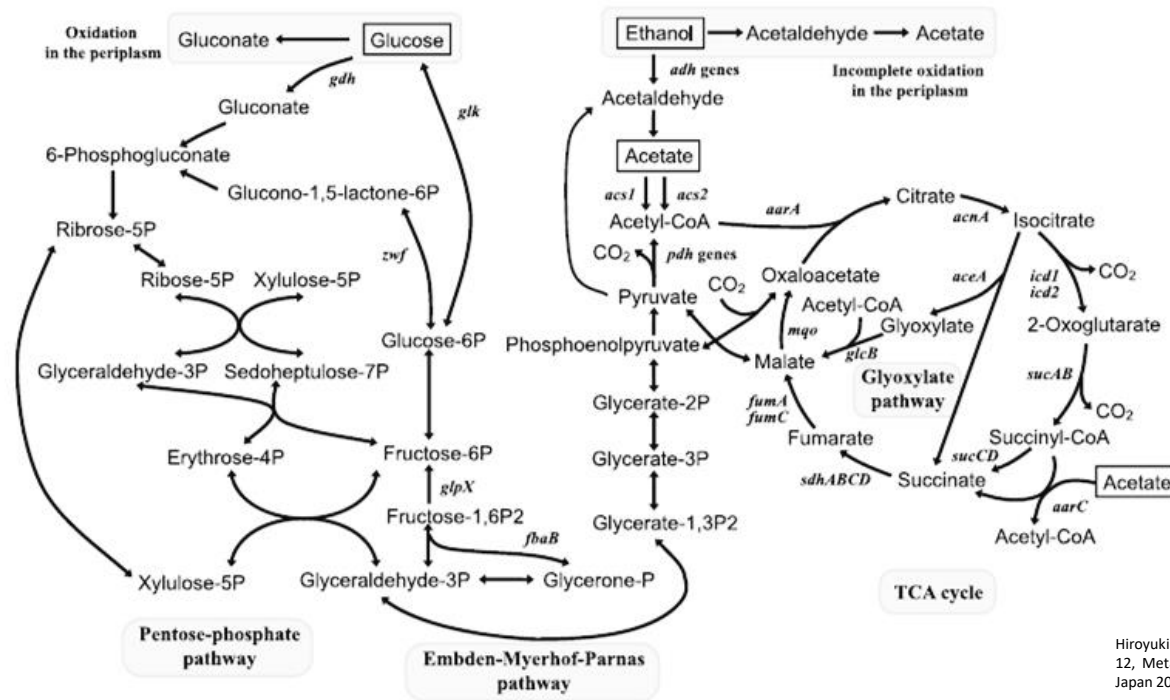
Nel *Gluconobacter* l'assenza della fosfofruttochinasi 1, della succinil-CoA sintetasi e della succinato deidrogenasi interrompe la glicolisi e il ciclo dell'acido citrico, lasciando spazio alla via del pentoso fosfato.

Il piruvato viene convertito in acetil-CoA dalla piruvato deidrogenasi oppure in acetaldeide dalla piruvato decarbossilasi. L'enzima aldeide deidrogenasi trasforma l'acetaldeide in acetato (acido acetico).

La catena respiratoria coinvolge l'ubichinolo e citocromi, ma la glicolisi incompleta limita la quantità di NADH come donatore di elettroni per il trasporto di elettroni e per la fosforilazione, sarà la via dei pentosi a contribuire alla produzione di NADH.



Acetobacter



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

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

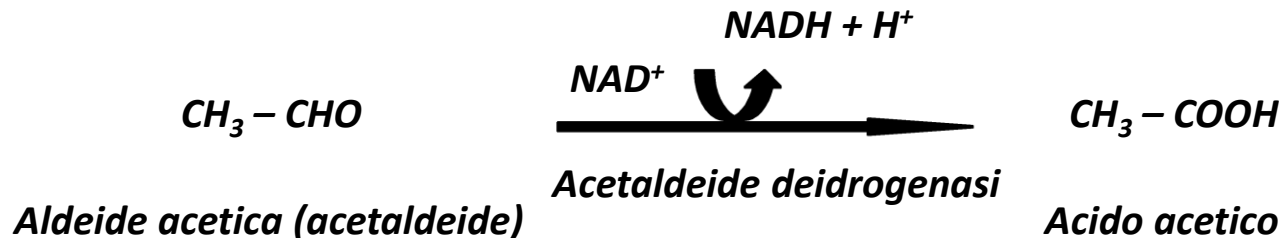
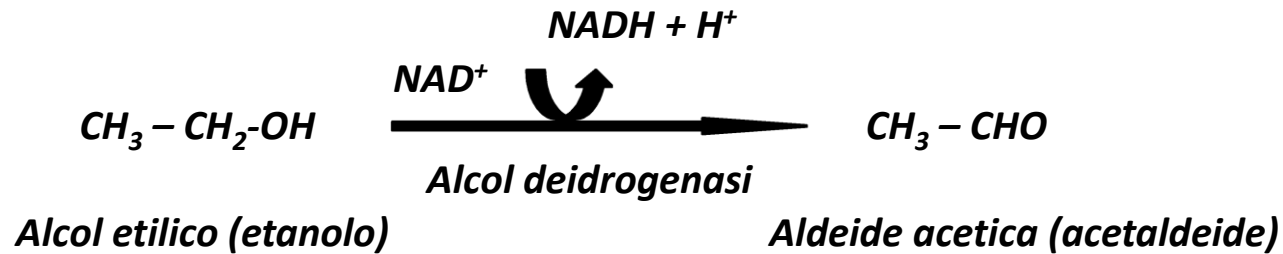
Nell'acetobacter sono espressi la maggior parte dei geni coinvolti nella via della glicolisi e della gluconeogenesi; il glucosio, sotto forma di glucosio 6 fosfato o di gluconato, viene utilizzato nella via del pentosio fosfato.

Quando l'acetobacter cresce in presenza di etanolo e glucosio, la crescita cellulare è più lenta rispetto alla crescita in un mezzo contenente solo glucosio. I geni codificanti per gli enzimi della via dei pentosi, transchetolasi e transaldolasi, sono regolati dall'etanolo indipendentemente dalla presenza di glucosio, così come per i geni codificanti per gli enzimi del ciclo dell'acido citrico. Questi batteri utilizzano come fonte di carbonio l'etanolo anche in presenza di glucosio, spesso inibendo il metabolismo del glucosio.

Acetobacter è un batterio obbligatoriamente aerobico che utilizza l'ossigeno molecolare come accettore finale degli elettroni nella catena di trasporto elettronica.

Metabolismo dell'etanolo

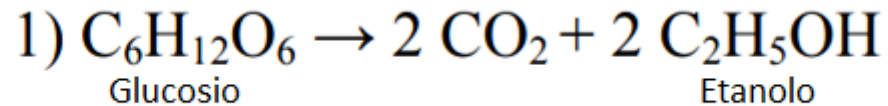
Tra tutte le trasformazioni effettuate dai batteri dell'acido acetico, quella che ha più interesse enologico è la trasformazione dell'etanolo in acido acetico



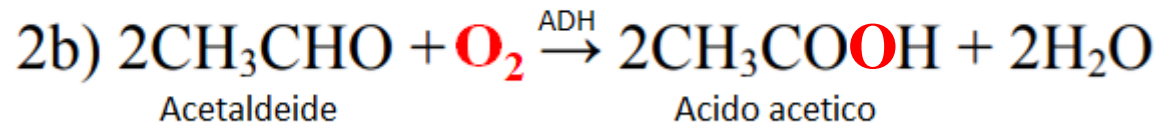
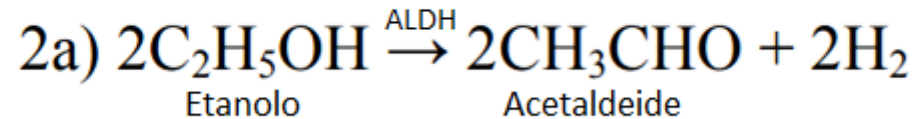
Gli Acetobacter sono anche in grado di ossidare l'acido acetico, ma questa reazione è inibita dall'etanolo. In condizioni di aerobiosi il 75% dell'acetaldeide porta a la formazione di acido acetico e in condizione di molta aereazione tutto l'etanolo si converte in acido acetico. Quando l'ambiente si 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:



alcol deidrogenasi batterica

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

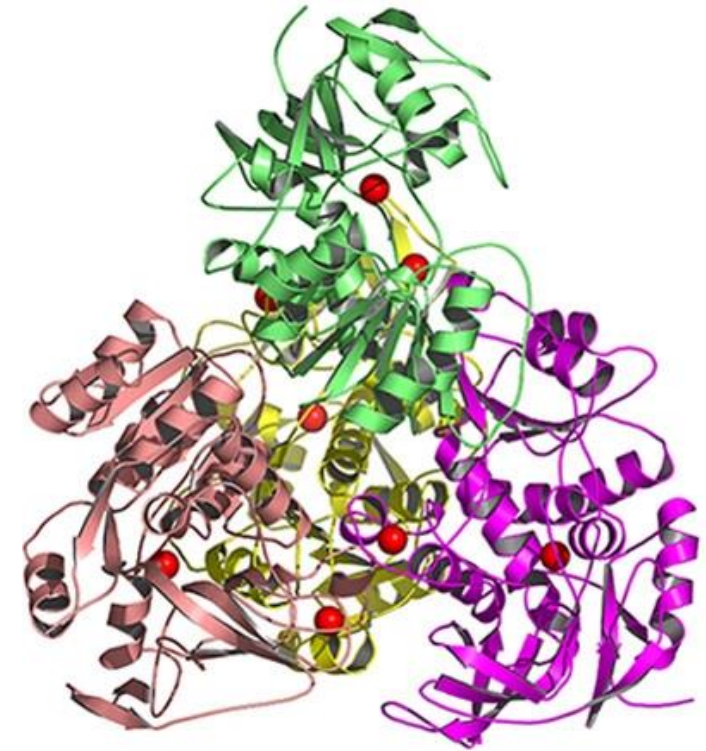
I primi sono solubili e citoplasmatici, mentre i secondi sono legati alla membrana plasmatica. Per questi ultimi gli elettroni generati nella reazione di ossidazione sono avviati fino all'O₂, attraverso il sistema di trasporto di elettroni integrato nella membrana.

L'ADH è costituita da tre subunità:

La subunità I possiede come cofattori un gruppo eme e una pirrolochinolina chinone (PQQ) e richiede Ca²⁺

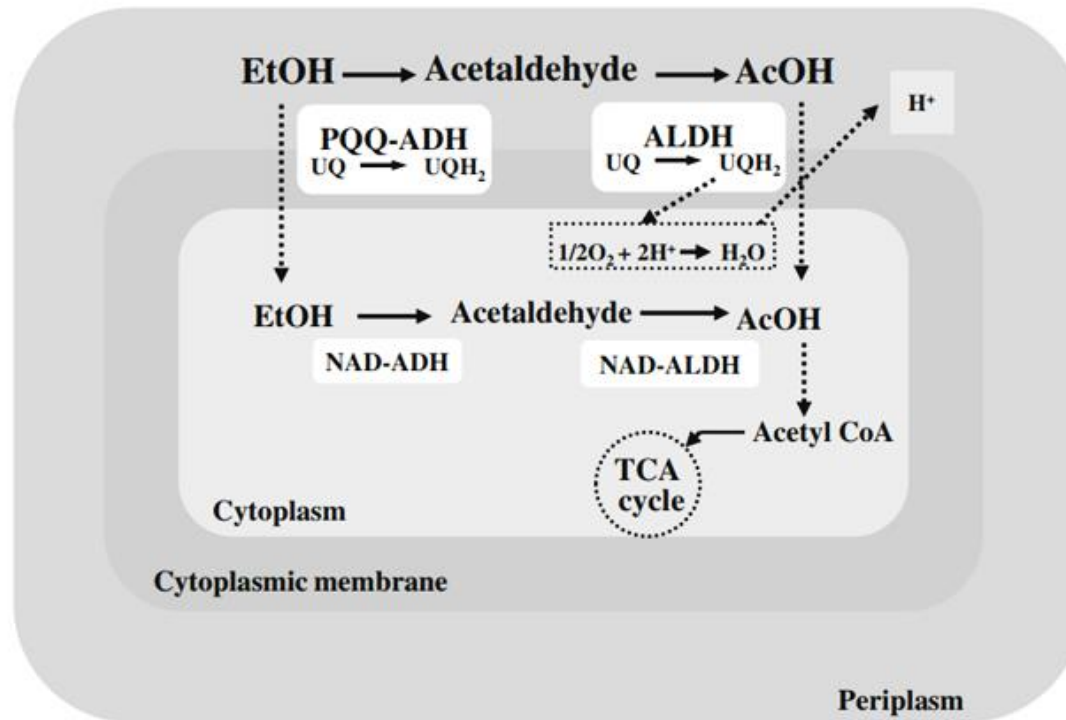
La subunità II contiene tre gruppi eme

La subunità III aiuta alle due subunità funzionali ad associarsi con la membrana e contribuisce alla corretta conformazione del complesso ADH per il trasporto di elettroni.



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>

Metabolismo dell'etanolo



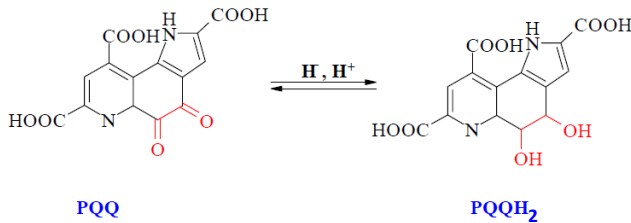
Dhouha Mamlouk & Maria Gullo. Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian J Microbiol* (Oct-Dec 2013) 53(4):377-384

L'etanolo è inizialmente ossidato ad acetaldeide, successivamente un'ulteriore ossidazione lo trasformerà in acido acetico, queste reazioni consentono ai batteri di crescere nel vino dopo la fermentazione alcolica e malolattica.

Le reazioni ossidative sono catalizzate dagli enzimi citoplasmatici e da quelli legati alla membrana plasmatica (l'ADH e ALDH). Questi enzimi non sono in grado di traslocare protoni fuori dalla cellula ma sono in grado di rilasciare gli elettroni ai chinoni associati alla membrana nella catena di trasporto degli elettroni. I geni per gli enzimi PQQ-ADH e ADH sono assenti nel *Gluconobacter*.

In *Acetobacter*, e in condizioni acide, l'attività dell'ADH è stabile ciò significa che sarà questo batterio a produrre una maggiore quantità di acido acetico.

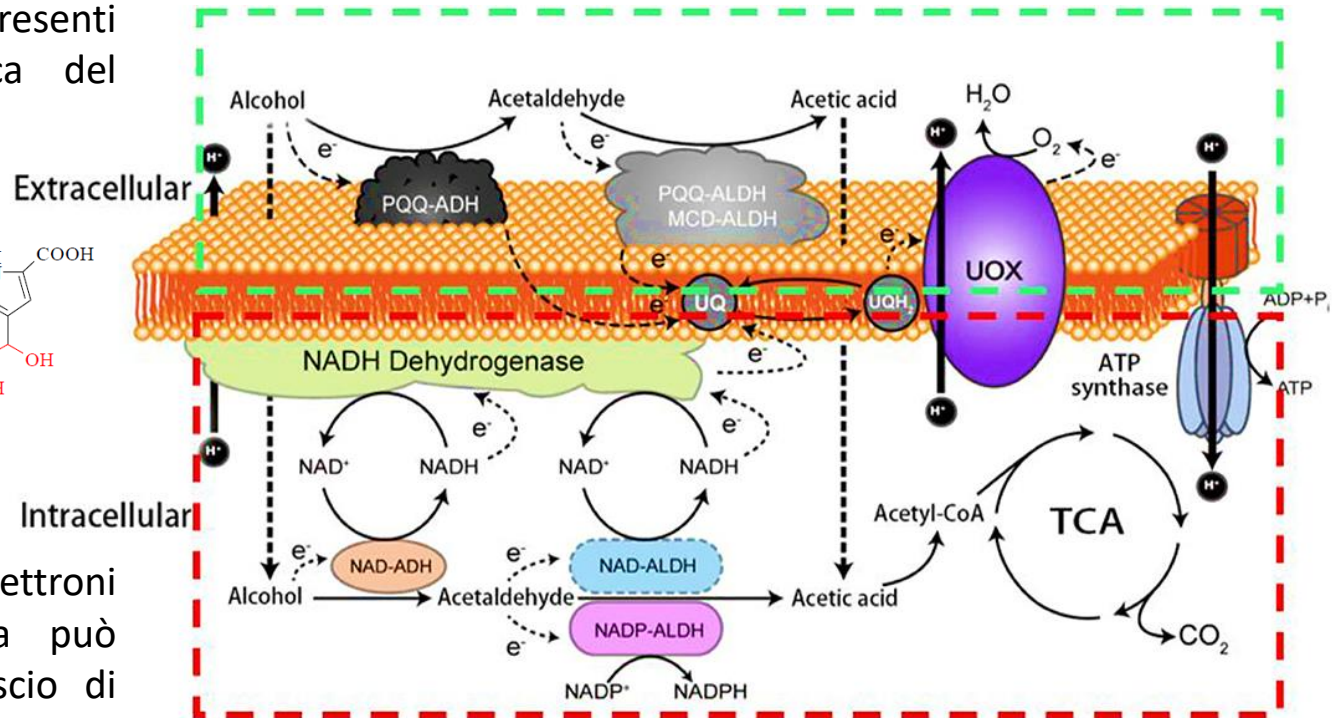
l'ossidazione dell'etanolo porta al rilascio di elettroni, questi verranno catturati dai chinoni (QH_2) presenti nella membrana plasmatica del batterio dell'acido acetico.



Il trasferimento di elettroni all'interno della membrana può essere utilizzato per il rilascio di protoni da parte delle deidrogenasi integrali di membrana o dalle deidrogenasi associate alla membrana.

Questo movimento di elettroni all'interno della membrana e successiva esclusione di protoni, crea un gradiente elettrochimico che può essere utilizzato per generare ATP. Praticamente sarà il trasferimento dei protoni da parte della proteina ubiquinolo ossidasi (UOX) di membrana che creerà una forza protonmotrice che potrà essere utilizzata per la generazione di ATP.

Generazione di energia nei batteri dell'acido acetico



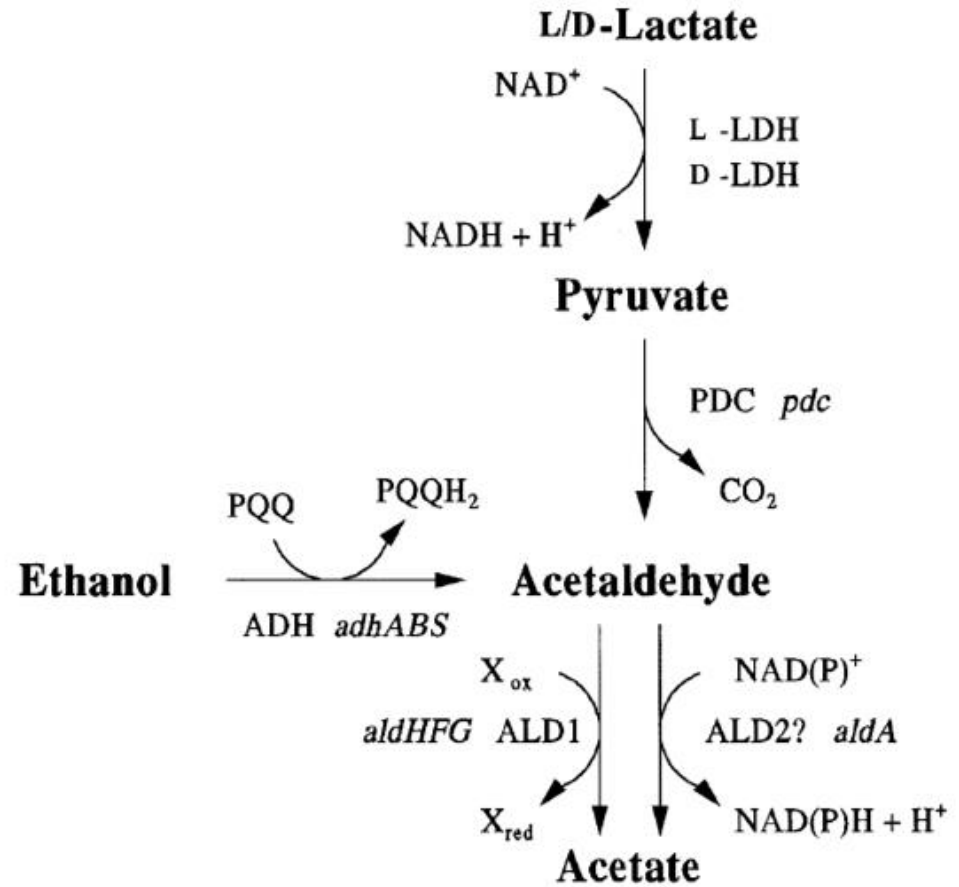
He Y, Xie Z, Zhang H, Liebl W, Toyama H and Chen F. Oxidative Fermentation of Acetic Acid Bacteria and Its Products. (2022) Front. Microbiol. 13:879246. doi: 10.3389/fmicb.2022.879246

Metabolismo dell'acido lattico

Tutte le specie del genere *Acetobacter* possono ossidare l'acido D- e L-lattico. Certi ceppi li ossidano completamente fino a CO₂ e H₂O, ma la maggior parte si ferma allo stadio di acido acetico. Il primo intermedio è il piruvato, decarbossilato ad acetaldeide, che viene ossidato ad acido acetico mediante l'ALDH.

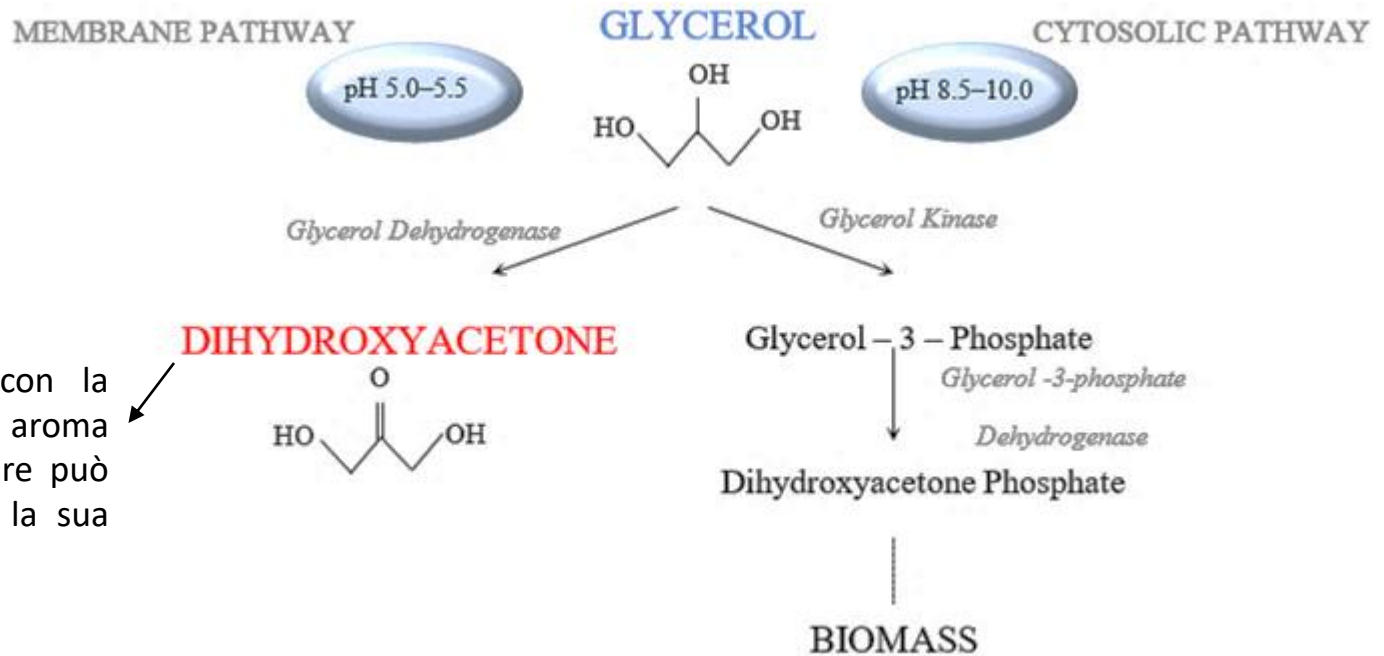
Sono stati identificati due tipi di enzimi, le D- e L-lattato deidrogenasi:

- Gli enzimi di membrana non richiedono un cofattore, ma funzionano con la catena dei citocromi. Le membrane contengono anche la piruvato decarbossilasi, che catalizza il passaggio ad acetaldeide.
- Nel citoplasma la D- e la L-lattato deidrogenasi assicurano l'ossidazione dal lattato al piruvato, mentre la piruvato decarbossilasi assicura la produzione di acetaldeide, infine, l'ALDH-NADP⁺ dipendente porta alla formazione di acido acetico.



Krishnan Chandra Raj · Lonnie O. Ingram · Julie A. Maupin-Furlow. Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*. Arch Microbiol (2001) 176 :443–451

Metabolismo del glicerolo



Nel vino può reagire con la prolina producendo un aroma “simile alla crosta” oppure può legare la SO₂ riducendo la sua attività antimicrobica

L'ossidazione del glicerolo da parte dei batteri dell'acido acetico può seguire due percorsi:

- La prima via (indipendente dall'ATP e dal NAD⁺) procede a pH 5,0–5,5 nello spazio di intermembrana ed è catalizzata dalla glicerolo deidrogenasi legata alla membrana. L'unico prodotto di questo percorso è il DHA, che viene rilasciato nell'ambiente esterno.
- La seconda via di trasformazione del glicerolo procede a pH 8,5–10,0 e richiede la presenza di ioni ATP e Mg²⁺, oltre a un enzima, la glicerolo chinasi. In una serie di trasformazioni biochimiche, il DHA fosfato viene trasformato in altri composti (come fruttosio-1,6-difosfato, glucosio-6-fosfato) e utilizzato per la produzione di biomassa.

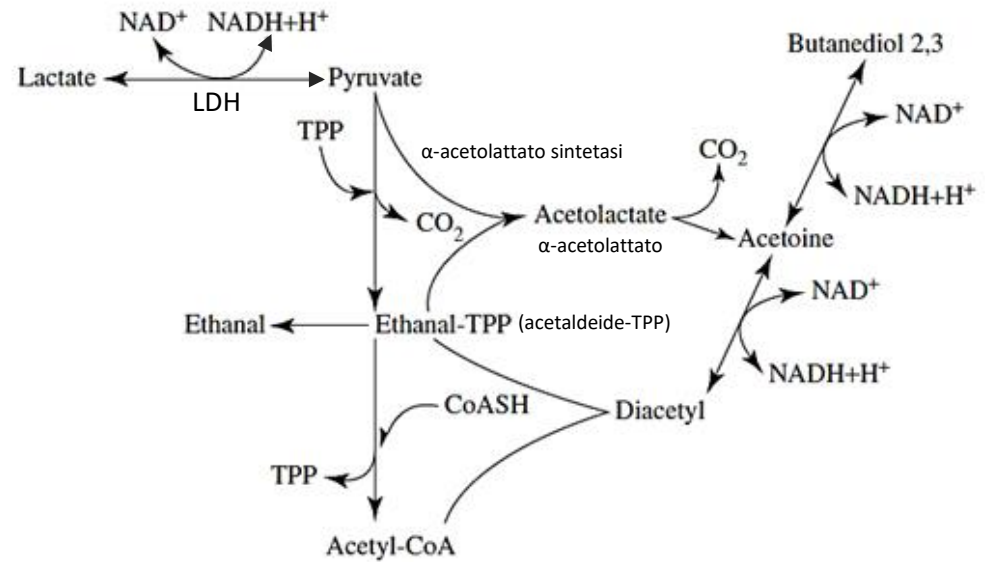
La formazione di Acetoino:

L'acetoino è un composto intermedio di un gruppo di tre molecole acetoiniche presenti nel vino:

il diacetile, l'acetoino e il 2,3-butandiolo.

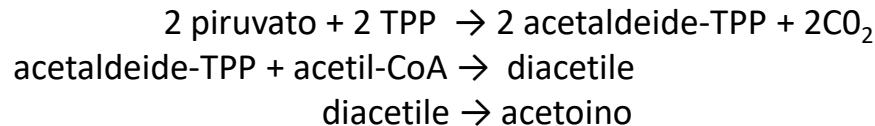
Si forma a partire dal piruvato, metabolita intermedio.

I batteri dell'acido acetico lo possono formare anche a partire dall'acido lattico e sono in grado di ossidarlo prima di ogni altro composto.

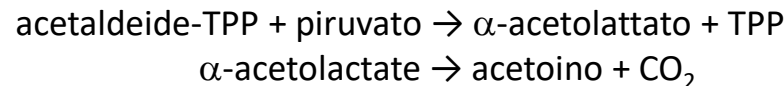


Esistono due vie di sintesi:

- La via di decarbossilazione del piruvato, in presenza di tiamina pirofosfato (TPP), forma l'etanale-TPP. L'etanale-TPP, in presenza di acetil-CoA, forma diacetile che viene ridotto ad acetoino.



- L'altra via di sintesi è la formazione dell'intermedio α -acetolattato (identica alla via dei batteri lattici), per reazione dell'etanale-TPP con il piruvato. L' α -acetolattato viene successivamente decarbossilato ad acetoino.



I batteri dell'acido acetico nel mosto d'uva

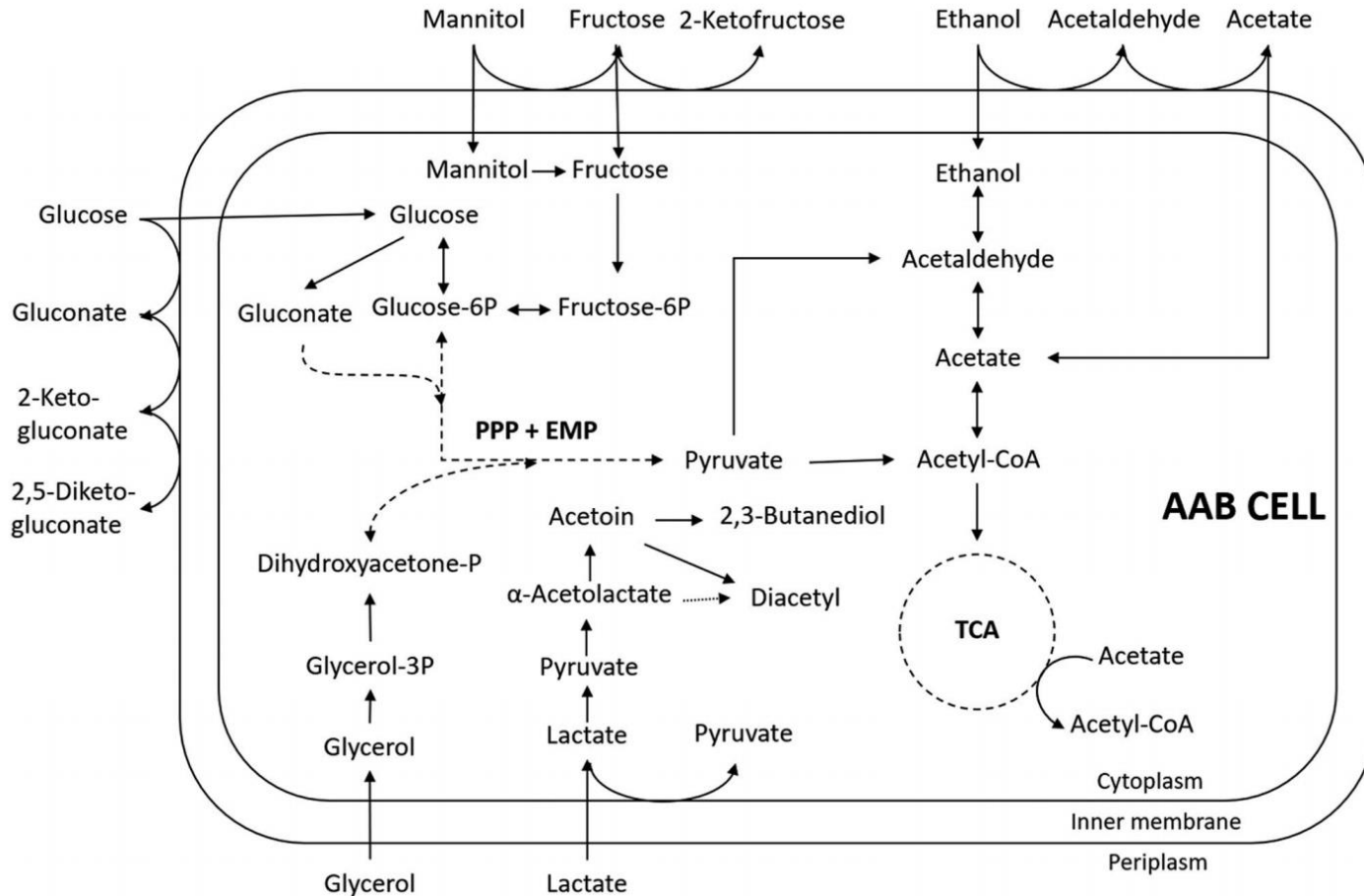
- Le popolazioni variano molto a seconda dello stato sanitario degli acini. Nelle uve sane, il livello della popolazione batterica è basso, dell'ordine di 10^2 UFC/mL. La popolazione è quasi interamente costituita da *Gluconobacter oxydans*.
- Le uve marcie sono, al contrario, largamente contaminate. Le popolazioni raggiungono di solito 10^5 - 10^6 UFC/mL e sono composte da popolazioni variabili da *Gluconobacter* e da *Acetobacter*. La microflora batterica modifica la composizione del mosto metabolizzandone gli zuccheri ed eventualmente gli acidi organici.
- l'attività più significativa di questi batteri è la trasformazione di glucosio in acido gluconico e i δ gluconolattoni che possono combinarsi con SO_2 rimanendo inalterati il vino.
- Riassumendo, il principale inconveniente della contaminazione delle uve da parte dei batteri è la produzione di acidità volatile e di sostanze chetoniche.

Condizioni necessarie per la fermentazione acetica:

- pH: 3-3.5
- Temperatura: 15-38°C
- Presenza di O₂
- Etanolo non superiore al 10% (v/v)



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