



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη διπλής - αλκοολικής και οξικής - ζύμωσης με βάση το χαρουπόμελο και το πετιμέζι

Study of double - alcoholic and acetic acid – fermentation based on carob syrup and grape syrup



Εισηγητές: Γκρόσιου Χριστίνα (19684154)

Καραντζίκου Σταματίνα (19684034)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μπατρίνου Ανθιμιά

Αθήνα, Φεβρουάριος 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα, Φεβρουάριος 2024

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Μπατρίνου Αθυσία

Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

2. Μέλος Επιτροπής

Στρατή Ειρήνη

Χημικός MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

3. Μέλος Επιτροπής

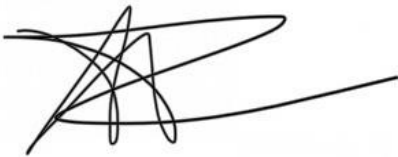
Κοντελής Σπυρίδων

Γεωπόνος, PhD, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Γκρόσιου Χριστίνα και Καραντζίκου Σταματίνα, με αριθμό μητρώου 19684154 και 19684034 αντίστοιχα, φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαστε οι αποκλειστικοί συγγραφείς της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται όλες οι πηγές από τις οποίες έγινε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε αυτούσιες είτε παραφρασμένες, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό. Δηλώνουμε, επίσης, ότι αναλαμβάνουμε τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Η ΔΗΛΟΥΣΑ
ΓΚΡΟΣΙΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ



Η ΔΗΛΟΥΣΑ
ΚΑΡΑΝΤΖΙΚΟΥ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις θερμές μας ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτρια Μπατρίνου Ανθιμιά, για την καθοδήγηση και την συμβολή της κατά την εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

*Επίσης, ευχαριστούμε ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Πυροβόλου Αικατερίνη για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη της καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων. Η έρευνα αυτή διεξήχθη ως μέρος της διδακτορικής της διατριβής με τίτλο: «Αξιοποίηση συστατικών χαρουπιού (*Ceratonia siliqua*) μέσω μικροβιακών ζυμώσεων».*

Τέλος, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μας στις οικογένειες μας και τους φίλους μας, για την αγάπη και στήριξη τους, σε όλη την διάρκεια των σπουδών μας.

*Γκρόσιου Χριστίνα & Καραντζίκου Σταματίνα,
Φεβρουάριος 2024*

Περίληψη

Από τα αρχαία χρόνια, χρησιμοποιείται η διαδικασία της ζύμωσης για παραγωγή ποικίλων τροφίμων και ποτών, τα οποία βρίσκουν εφαρμογή έως και σήμερα. Ο επιστημονικός κλάδος επικεντρώθηκε στην μελέτη και κατανόηση της χημείας των ζυμώσεων, καθώς συνέχιζαν να αναπτύσσονται προϊόντα με το πέρασμα των ετών, όχι μόνο σε οικιακό αλλά και σε βιομηχανικό επίπεδο. Τον σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η παραγωγή αλκοολούχου ροφήματος και ξυδιού, χρησιμοποιώντας εναλλακτική πηγή σακχάρων το χαρουπόμελο και το πετιμέζι, μέσω δύο διαδοχικών ζυμώσεων. Η ανάλυση της βιοχημείας των ζυμώσεων και η κατανόηση της δράσης των κυρίαρχων μικροοργανισμών, όπου αναλύονται στη συνέχεια, συνέβαλε στην πραγματοποίηση του πειράματος και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Το πειραματικό μέρος απαρτίστηκε από τις μικροβιολογικές αναλύσεις, τις μετρήσεις οξύτητας, pH, αλκοόλης, βάρους, χρώματος και ολικού φαινολικού περιεχομένου, ώστε να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα των ζυμώσεων και τα χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων. Βάσει αποτελεσμάτων, οι δύο πηγές φυσικών σακχάρων, δηλαδή το χαρουπόμελο και το πετιμέζι, κρίθηκαν κατάλληλες και αποτελεσματικές, καθιστώντας τις δύο ζυμώσεις πραγματοποιήσιμες και επιτυχείς. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις είναι αισθητά πιο υψηλή στα προϊόντα του χαρουπόμελου σε σχέση με αυτά που περιέχουν πετιμέζι. Συγκεκριμένα, η προσθήκη χαρουπόμελου προκαλεί δεκαπλασιασμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου, συγκριτικά με το πετιμέζι σε όλα τα δείγματα. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, αποδεικνύεται η παρουσία των οξικών βακτηρίων και η συμβολή τους στην ζύμωση, παρά την αδυναμία καταμέτρησης του πληθυσμού τους. Εν κατακλείδι, η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε λίγο πριν το πέρας των 30 ημερών, ενώ η οξική ζύμωση σταμάτησε περίπου την 45^η ημέρα. Συνεπώς, τα τελικά προϊόντα που λήφθηκαν την 60^η ημέρα έχουν υποστεί ενδεχομένως υπεροξειδωση.

Λέξεις-κλειδιά: αλκοολική ζύμωση, οξική ζύμωση, *Saccharomyces cerevisiae*, βακτήρια οξικού οξέος (AAB), βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), χαρουπόμελο, πετιμέζι, υδρόμελο, ξύδι

Abstract

Since ancient times, the fermentation process has been used to produce a variety of foods and beverages, which are still consumed today. The scientific sector has focused on studying and understanding the chemistry of fermentation, as products have continued to be developed over the years, not only at the household level but also at the industrial level. The purpose of this study was to produce an alcoholic beverage and vinegar, using an alternative sugar source of carob and grape syrup, through two successive fermentations. The analysis of the biochemistry of the fermentations and the understanding of the action of the dominant microorganisms, discussed below, contributed to the experiment and the interpretation of the results. The experimental part consisted of the microbiological analyses, acidity, pH, alcohol, weight, color and total phenolic content measurements to examine the efficiency of the fermentations and the characteristics of the final products. Based on the results, the two sources of natural sugars, i.e. carob honey and grape syrup, were found to be suitable and effective, making the two fermentations feasible and successful. In addition, the phenolic content is significantly higher in the carob products than in those containing grape syrup. Specifically, the addition of carob syrup causes a tenfold increase in total phenolic content, compared to grape syrup in all samples. During fermentation, the presence of acetic acid bacteria and their contribution to fermentation is demonstrated, despite the impossibility of measuring their population. In conclusion, alcoholic fermentation was completed shortly before the end of 30 days, while acetic acid fermentation stopped at about 45 days. Therefore, the final products obtained on day 60 may have undergone over-oxidation.

Key-words: alcoholic fermentation, acetification, *Saccharomyces cerevisiae*, Acetic Acid Bacteria (AAB), Lactic Acid Bacteria (LAB), carob syrup, grape syrup, mead, vinegar

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1. Αλκοολική Ζύμωση.....	8
1.1 Βιοχημεία της αλκοολικής ζύμωσης	8
1.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση	13
1.3. Θρεπτικά υποστρώματα αλκοολικής ζύμωσης	18
1.4 Εφαρμογές και προϊόντα αλκοολικής ζύμωσης	21
2. Οξική Ζύμωση	25
2.1 Βιοχημεία Οξικής Ζύμωσης	29
2.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην οξική ζύμωση και οι ιδιότητές τους	38
2.3 Θρεπτικά υποστρώματα οξικής ζύμωσης	47
2.4 Εφαρμογές και προϊόντα οξικής ζύμωσης.....	56
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	60
3.1 Σκοπός πειραματικού μέρους	60
3.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	60
3.3 Προετοιμασία δειγμάτων και σχεδιασμός πειράματος.....	76
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	81
4.1 Μέτρηση βάρους	81
4.2 Ανάλυση pH	83
4.3 Μετρήσεις οξύτητας	84
4.4 Μικροβιολογικές Αναλύσεις	85
4.5 Μέτρηση αλκοόλης	88
4.6 Μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	90
4.7 Μέτρηση ολικών στερεών / σακχάρων	91
4.8 Μέτρηση πυκνότητας και ειδικού βάρους.....	93
4.9 Μέτρηση Χρώματος.....	94
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	97
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Αλκοολική Ζύμωση

1.1 Βιοχημεία της αλκοολικής ζύμωσης

Η ζύμωση τροφίμων έχει χρησιμοποιηθεί ανά τα χρόνια για την παραγωγή παραδοσιακών προϊόντων, η αρχή της οποίας δεν μπορεί να προσδιοριστεί χρονικά. Το γεγονός αυτό, ώθησε τον επιστημονικό κλάδο να ερευνήσει περαιτέρω την βιοχημεία των ζυμώσεων καθώς και τις επιπτώσεις του τελικού προϊόντος βάσει των διαφοροποιήσεων του κλίματος, των πρώτων υλών και της διαδικασίας εκτέλεσης. Η μέθοδος έγινε τόσο γνωστή και αναγκαία στη ζωή των ανθρώπων που πλέον χρησιμοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή τροφίμων και αλκοολούχων ποτών και ροφημάτων (Voidarou et al., 2020).

Ζυμωμένα τρόφιμα είναι εκείνα που για την παραγωγή τους απαιτείται χρήση μικροοργανισμών, οι οποίοι προκαλούν επιθυμητές βιοχημικές αντιδράσεις και τροποποιούν το αρχικό τρόφιμο. Η διαδικασία αυτή βοηθάει τα τρόφιμα να είναι πιο θρεπτικά, πιο γευστικά, περισσότερο εύπεπτα, πιο ασφαλή ή/και συνδυασμός αυτών (Campbell-Platt, 1994).

Παρόλο που η σύγχρονη επιστήμη αναγνωρίζει πολλά είδη ζύμωσης, ο Louis Pasteur δήλωσε πως ένας γενικός ορισμός καθορίζει τη ζύμωση ως μια βιοχημική διαδικασία, κατά την οποία οι μικροοργανισμοί αποσυνθέτουν υδατάνθρακες για να παράγουν ενέργεια υπό αναερόβιες συνθήκες (Voidarou et al., 2020).

Πιο συγκεκριμένα, αλκοολική ζύμωση είναι η μετατροπή σακχάρων, κυρίως της γλυκόζης και της φρουκτόζης, σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Η διεργασία αυτή υλοποιείται με την βοήθεια ζυμών αλλά και κάποιων βακτηρίων όπως για παράδειγμα τον *Zymomonas mobilis*.

Η γενική χημική αντίδραση που τη περιγράφει είναι η εξής:

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2 \text{CO}_2$$

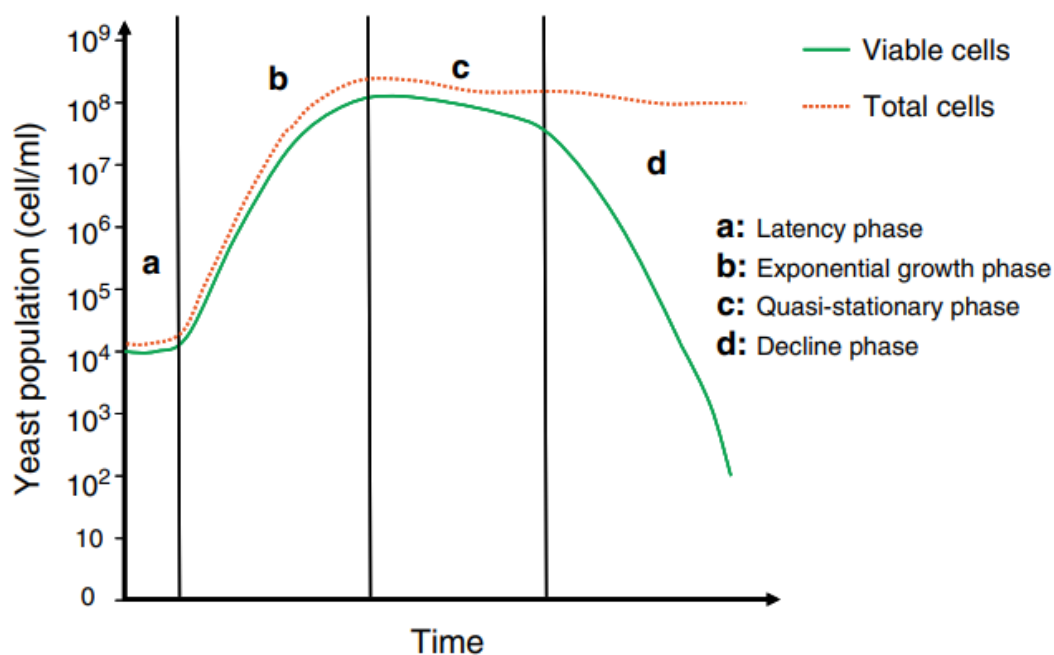
εξόξες αιθανόλη διοξείδιο του άνθρακα

Βέβαια, η διαδικασία είναι αρκετά πιο πολύπλοκη. Ταυτόχρονα με την παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα λαμβάνουν χώρα και πολλές άλλες βιοχημικές, χημικές και φυσικοχημικές αντιδράσεις. Άλλα προϊόντα της ζύμωσης όπως οι εστέρες

και η γλυκερόλη, ενισχύουν την ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

Επίσης, γίνεται και προσθήκη ουσιών, διαλυμάτων και προσθέτων στο προϊόν προς ζύμωση, δηλαδή στο χυμό των σταφυλιών (παραγωγή κρασιού) ή στο υδρόμελο, με σκοπό την διατήρηση, προστασία και ομαλή εξέλιξη της διαδικασίας. Ένα συχνό πρόσθετο είναι το διοξείδιο του θείου, το οποίο εμποδίζει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Παράλληλα, αυτό μπορεί να δράσει ως αναστολέας της καλλιέργειας εκκίνησης της αλκοολικής ζύμωσης. Για αυτό το λόγο έχει αποδειχτεί πως ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο καταλληλότερος, διότι είναι ο πιο ανθεκτικός στο διοξείδιο του θείου και η χρήση του προσθέτου αυτού ευνοεί την ανάπτυξη του.

Οι προστιθέμενοι ζυμομύκητες, λοιπόν, καταναλώνοντας τα σάκχαρα του προϊόντος και άλλα συστατικά που περιέχονται σε αυτό, λαμβάνουν την ενέργεια που χρειάζονται προκειμένου να αναπτυχθούν. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (υγρασία, θερμοκρασία κτλ.), οι ζύμες, ακολουθούν έναν κύκλο ανάπτυξης όπως φαίνεται



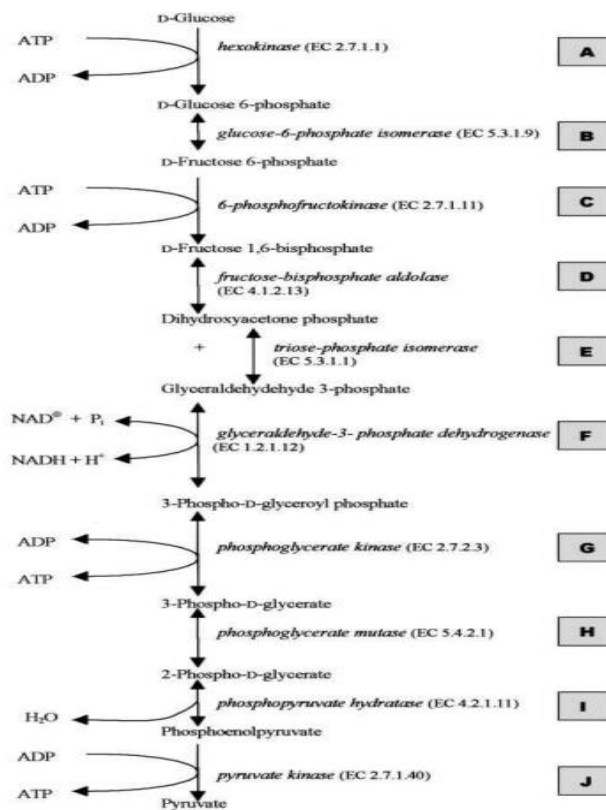
Εικόνα 1.1 Κύκλος Ανάπτυξης Ζυμομυκήτων (Zatsova, 2009)

Κατά την πρώτη φάση, γνωστή ως λανθάνουσα φάση, οι μικροοργανισμοί δεν αναπτύσσονται. Είναι η περίοδος προσαρμογής τους στο περιβάλλον και στο υπόστρωμα. Ακολουθεί η εκθετική φάση, κατά την οποία οι μικροοργανισμοί, έχοντας άφθονες πηγές τροφής και κατάλληλες συνθήκες αυξάνονται δραματικά, της τάξεως

του 10^7 - 10^8 cfu/ml. Η φάση αυτή επηρεάζεται από την θερμοκρασία, την περιεκτικότητα σε αμμωνία και την παρουσία του οξυγόνου. Στη συνέχεια, καθώς τα θρεπτικά συστατικά του προϊόντος ελαχιστοποιούνται, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών φαίνεται να παραμένει σταθερός. Για αυτό τον λόγο η φάση αυτή ονομάζεται στατική. Τέλος, υπάρχει η φάση θανάτου κατά τη διάρκεια της οποίας ο αριθμός των ζυμών μειώνεται. Αυτό συμβαίνει λόγω της παντελούς έλλειψης θρεπτικών συστατικών και επίσης τα προϊόντα που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση, όπως η αιθανόλη, είναι τοξικά για αυτές. Η επιτυχημένη ζύμωση βασίζεται στη διατήρηση ικανοποιητικού αριθμού ζωντανών ζυμών μέχρις ότου να καταναλωθούν όλα τα περιεχόμενα σάκχαρα (Zamora, 2009).

Η αλκοολική ζύμωση επιτυγχάνεται μέσω της γλυκόλυσης, διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και περιγράφει τον μετασχηματισμό της γλυκόζης και της φρουκτόζης σε πυροσταφυλικό, παράγοντας παράλληλα ATP και NADH. Η συνοπτική αντίδραση που περιγράφει τη γλυκόλυση είναι η εξής: $\text{Γλυκόζη} + 2\text{ATP} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2 \text{Πυροσταφυλικό οξύ} + 2\text{NADH} + 2\text{ATP}$ (Biotechnological Production of Ethanol, n.d.)

Η γλυκόλυση περιλαμβάνει έντεκα (11) χημικές αντιδράσεις για την διάσπαση



Εικόνα 1.2: Η πορεία της γλυκόλυσης. (Barnett, 2003)

των εξοζών και την απελευθέρωση ενέργειας στη χημική μορφή ATP, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.2 (Barnett, 2003).

Το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης (A-E) είναι η μετατροπή της γλυκόζης σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη και απαιτεί 2 μόρια ATP. Το πρώτο στάδιο χωρίζεται σε 3 υποστάδια. Στο πρώτο από αυτά, γίνεται μια αρχική φωσφορυλίωση της γλυκόζης προς τον σχηματισμό 6-φωσφορικής γλυκόζης, που καταλύεται από μια οικογένεια ενζύμων, τις εξοικινάσες. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα ο ισομερισμός της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική φρουκτόζη, με τη βοήθεια του ενζύμου ισομεράση της φωσφογλυκόζης.

Στο επόμενο στάδιο, η 6-φωσφορική φρουκτόζη φωσφορυλιώνεται και πάλι από τη δράση της φωσφοφρουκτοκινάσης προς σχηματισμό 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη (Zamora, 2009).

Στο δεύτερο στάδιο της γλυκόλυσης, δύο ισομερή φωσφορικής τριόζης, συγκεκριμένα η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και η φωσφορική διυδροξυακετόνη, σχηματίζονται μετά τη διάσπαση της 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη από το ένζυμο αλδολάση. Στη συνέχεια, η 3-φωσφορική αφυδρογονάση γλυκεραλδεΐδης βοηθάει στη μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3-διφωσφογλυκερικό. Η αντίδραση αυτή παράγει ένα mole NADH. Ύστερα, το τελευταίο μετατρέπεται σε 3-φωσφογλυκερικό, αντίδραση που καταλύεται από φωσφογλυκερική κινάση, με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός mole ATP. Κατά το τελευταίο στάδιο της γλυκόλυσης, το 3-φωσφογλυκερικό μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό, το οποίο είναι και το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης. Τα ένζυμα που καταλύουν τις τελικές αντιδράσεις είναι: η φωσφογλυκερο-μουτάση για την μετατροπή του 3-φωσφογλυκερικού σε 2-φωσφογλυκερικό, το οποίο στη συνέχεια αφυδατώνεται από το ένζυμο ενολάση, σχηματίζοντας πυροσταφυλική φωσφοενόλη. Η τελευταία, μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ, αντίδραση που καταλύεται από πυροσταφυλική κινάση, με ταυτόχρονο σχηματισμό ακόμα ενός mole ATP. Έτσι, από ένα mole γλυκόζης, παράγονται δύο mole πυροσταφυλικού, τέσσερα mole ATP και δύο mole NADH (Biotechnological Production of Ethanol, n.d.).

Η αναγωγική ισχύς του NADH που παράγεται μέσω της γλυκόλυσης πρέπει να μεταφερθεί σε έναν δέκτη ηλεκτρονίων για την αναγέννηση του NAD⁺ που καταναλώνεται από τη γλυκόλυση. Στη περίπτωση του *S. cerevisiae* και άλλων ζυμομυκήτων, αυτή η διαδικασία ονομάζεται αλκοολική ζύμωση και λαμβάνει χώρα

στο κυτταρόπλασμα, όπου η ακεταλδεΐδη (αιθανόλη, το προϊόν αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος) χρησιμεύει ως τελικός δέκτης ηλεκτρονίων. Όσον αφορά τη γλυκόλυση, η αλκοολική ζύμωση περιέχει δύο επιπλέον ενζυματικές αντιδράσεις. Αρχικά, το πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται σε ακεταλδεΐδη από τη πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση. Οι συμπαράγοντες είναι η πυροσταφυλική θειαμίνη και μαγνήσιο. Έπειτα, η ακεταλδεΐδη ανάγεται σε αιθανόλη, ανακυκλώνοντας το NADH σε NAD⁺. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογονάση χρησιμοποιώντας ψευδάργυρο ως συμπαράγοντα. Τέλος, και τα δύο τελικά προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης, η αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα, μεταφέρονται έξω από το κύτταρο με απλή διάχυση. Η μετατροπή της γλυκόζης προς αιθανόλη (αλκοολική ζύμωση) περιγράφεται από την παρακάτω αντίδραση.

$$\text{Γλυκόζη} + 2\text{P}_i + 2\text{ADP} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ μόρια αιθανόλης} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

(*Biotechnological Production of Ethanol*, n.d.)

1.1.1 Μέσα σακχάρων που χρησιμοποιούνται για την αλκοολική ζύμωση

Μέλι

Το μέλι είναι το φυσικό βιολογικό προϊόν που προέρχεται από το νέκταρ και χρησιμοποιείται ως φάρμακο αλλά και ως τροφή για τον άνθρωπο. Το μέλι είναι, ουσιαστικά, ένα αρκετά συμπυκνωμένο διάλυμα σακχάρων, της γλυκόζης και της φρουκτόζης, καθώς και νερού (Subramanian et al., 2007). Πέρα από αυτά τα δύο κύρια σάκχαρα, περιέχονται και ποσότητες τουλάχιστον 22 άλλων πιο πολύπλοκων σακχάρων. Τα σάκχαρα, ως τα κύρια συστατικά του μελιού (95-99.9% των ολικών στερεών του μελιού), καθορίζουν την συμπεριφορά και τα χαρακτηριστικά αυτού. Ωστόσο, τα υπόλοιπα συστατικά του μελιού, δηλαδή αρωματικές ύλες, χρωστικές, οξέα και μέταλλα, ευθύνονται για τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα ποικίλα είδη μελιού (Administration, 1980).

Χαρουπόμελο

Το χαρουπόμελο έχει αρκετά υψηλό ποσοστό σακχάρων (45-52%), καθορίζοντας τα ως το κυριότερο συστατικό του. Τα τρία κυρίαρχα σάκχαρα είναι η σουκρόζη (34-42% των ολικών στερεών), η γλυκόζη (7-10% των ολικών στερεών) και η φρουκτόζη (10-12% των ολικών στερεών). Περιέχει, επίσης, μικρές ποσότητες μετάλλων, αμινοξέων και φαινολικών ενώσεων. Λόγω της σύστασης του, το χαρούπι, αποτελεί

ενναλακτική και αποτελεσματική πηγή σακχάρων για την αλκοολική ζύμωση (Yatmaz & Turhan, 2018).

Πετιμέζι

Το πετιμέζι, ή αλλιώς σιρόπι σταφυλιού, είναι προϊόν το οποίο προκύπτει μετά από ειδική επεξεργασία σταφυλιών. Περιέχει μεγάλες ποσότητες φυσικών σακχάρων, όπως γλυκόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη, καθώς και μέταλλα (ασβέστιο και σίδηρος), βιταμίνες (A, C, B2 και B1), οργανικά οξέα και μερικές αντιοξειδωτικές ουσίες. Λόγω του μεγάλου ποσοστού μονοσακχαριτών που περιέχει, το πετιμέζι μπορεί να προσροφηθεί γρήγορα. Συνεπώς, θεωρείται κατάλληλο για καταστάσεις που απαιτούν επείγουσα πρόσληψη ενέργειας (Rezaei et al., 2020).

1.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση

Η τεχνολογία της ζύμωσης τροφίμων χρησιμοποιεί την ικανότητα των μικροοργανισμών να αναπτύσσονται σε διάφορα υποστρώματα για την παραγωγή διάφορων ζυμώμενων τροφίμων και ποτών, όπως για παράδειγμα μπύρα, κρασί, ψωμί, τυριά, ζυμώμενα λουκάνικα κτλ. Για το σκοπό της ζύμωσης προϊόντων χρησιμοποιούνται βακτήρια και ζυμομύκητες, τα οποία μπορούν να δρουν συνδυαστικά ή με διαδοχικό τρόπο με ένα μεταβαλλόμενο κυρίαρχο μικροβίωμα καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Βέβαια, μεταξύ των πολλών μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, οι ζύμες έχουν μεγάλο αντίκτυπο στην παραγωγή τροφίμων και ποτών, καθώς και στη ζύμωση αυτών. Μεγαλύτερη επιτυχία σημειώνεται στα τρόφιμα και ποτά που περιέχουν μεγάλο ποσοστό υδατανθράκων μιας και οι ζύμες έχουν την ικανότητα επιβίωσης και ανάπτυξης σε συνθήκες στρες (Montet & Ray, 2016).

Αν και, τόσο οι ζύμες όσο και τα βακτήρια, παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά σε μικροσκόπιο το 1680 από τον Antonie van Leeuwenhoek, μόλις το 1837 ο Cagniard-latour πρότεινε ότι η ζύμωση συνδέεται στενά με τα κύτταρα ζυμών. Η συσχέτιση της ζύμης με τη ζύμωση συνδέεται χρονικά με την εξέλιξη του ψωμιού, της μπύρας και του κρασιού (Montet & Ray, 2016).

1.2.1. Κατηγοριοποίηση Μικροοργανισμών

Μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε τους μικροοργανισμούς, χωρίς όμως να υπάρχει καθολική συμφωνία για την ταξινόμηση αυτή. Υπάρχουν δύο βασικοί/ πρωτογενείς τύποι κυττάρων: τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά. Η βασική τους

διαφορά είναι η παρουσία ή απουσία μεμβράνης γύρω από το γενετικό υλικό του κυττάρου, δηλαδή πυρήνα. Οι προκαρυώτες είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί και χαρακτηρίζονται από απλή δομή και μόνο ένα χρωμόσωμα. Επίσης, τα κύτταρα τους στερούνται μιτοχονδρίου, ενδοπλασματικού δικτύου και πυρηνικής μεμβράνης. Από την άλλη πλευρά, οι ευκαρυώτες έχουν περιπλοκότερη εσωτερική δομή, με παραπάνω από ένα χρωμόσωμα (μόριο DNA) στον πυρήνα. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν πυρηνική μεμβράνη και με την βοήθεια αυτής συγκρατούν όλα τα οργανίδια που έχουν και οι προκαρυώτες, αλλά και αυτά που δεν έχουν (Behera et al., 2019).

1.2.2. Βακτήρια

Τα βακτήρια υπάρχουν στα τρόφιμα, η πλειοψηφία των οποίων ευθύνεται για την αλλοίωση των τροφίμων. Κάποια από αυτά, όπως το *Clostridium*, παράγουν τοξίνες που προκαλούν σοβαρές ασθένειες στους ανθρώπους. Για τον λόγο αυτό, τα βακτήρια ως μικροοργανισμοί ζύμωσης, συχνά παραβλέπονται. Τα πιο σημαντικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις τροφίμων είναι βακτήρια του γαλακτικού οξέος, όπως, ο *Lactobacillus*, ο *Pedicoccus*, ο *Streptococcus*, ο *Oenococcus* κτλ, ακολουθούμενα από τα είδη *Acetobacter*, τα οποία οξειδώνουν την αλκοόλη σε οξικό οξύ. Μια ακόμα ομάδα βακτηρίων που βρίσκουν θέση στην ζύμωση (αλκαλική ζύμωση) είναι τα είδη *Bacillus* (*B. Subtilis*, *B. licheniformis* και *B. Pumilius*) (Ray & Didier, 2014).

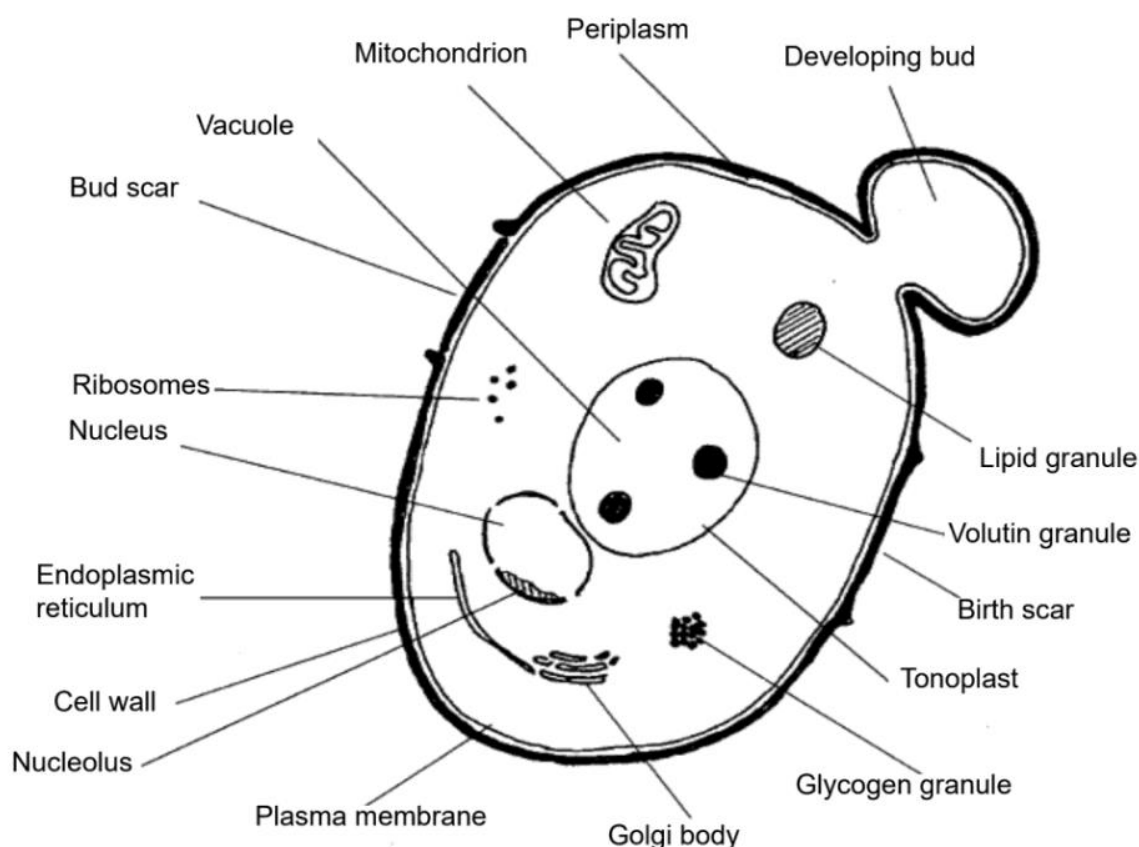
1.2.3 Ζύμες

Οι ζύμες μπορούν να βρεθούν παντού στη φύση, όπως στο έδαφος, στον αέρα και στον εντερικό σωλήνα των ζώων. Όπως όλοι οι μικροοργανισμοί, έτσι και οι ζύμες μπορούν να έχουν ευεργετικές και μη ευεργετικές επιδράσεις στη ζύμωση των τροφίμων. Για παράδειγμα, η *Pichia* προκαλεί αλλοιώσεις στα τρόφιμα, ενώ η *Candida* χρησιμοποιείται για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης. Η πιο ωφέλιμη μαγιά για τις ζυμώσεις είναι η οικογένεια *Saccharomyces* και ειδικότερα ο *S. cerevisiae*, ο οποίος βρίσκει εφαρμογή στη παρασκευή ψωμιού και αλκοολούχων ποτών (Ray & Didier, 2014).

Οι ζυμομύκητες είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των μυκήτων, με 500 είδη που έχουν καταγραφεί έως σήμερα και εκτιμάται ότι αποτελούν το 1% όλων των μυκητιακών ειδών. Ο όρος «ζύμη» συχνά

συγγέεται με τον *S. cerevisiae*, λόγω της συχνότητας χρησιμοποίησής του για παραγωγή ζυμώμενων προϊόντων (Montet & Ray, 2016).

Οι ζυμομύκητες αποτελούνται από μεμονωμένα κύτταρα, τα οποία είναι μικρότερα από τα ζωικά και φυτικά κύτταρα, αλλά μεγαλύτερα από τα βακτήρια. Η δομή τους σχηματίζεται από ένα εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα και στο εσωτερικό του κυττάρου περιέχεται το κυτταρόπλασμα με τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια και τα ριβοσώματα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3.



Εικόνα 1.3: Διαγραμματική αναπαράσταση της διατομής κυτταρικού ζυμομύκητα (Montet & Ray, 2016)

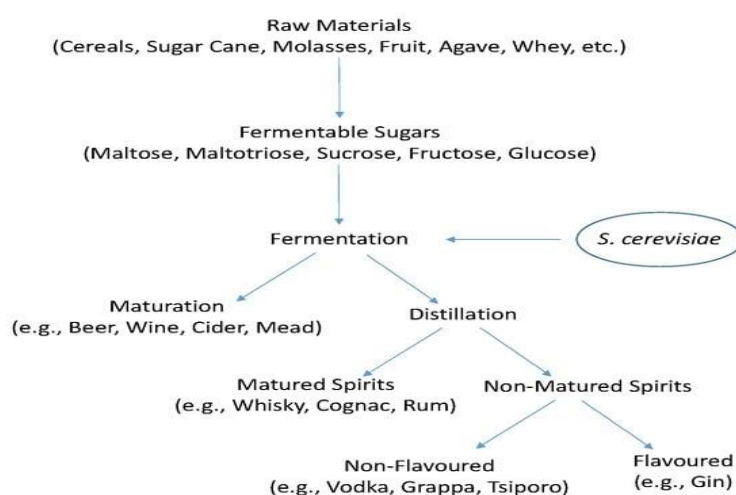
Το κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης αποτελείται από δύο στρώματα. Η εσωτερική στιβάδα αποτελείται από β-1-3-γλυκάνιο συνδεδεμένο ομοιοπολικά με τη χιτίνη και είναι υπεύθυνο για τη σταθερότητα των κυττάρων της ζύμης. Ενώ, το εξωτερικό τοίχωμα, αποτελείται από στενά συνδεδεμένες γλυκοζυλιωμένες μαννοπρωτεΐνες που μειώνουν τη διαπερατότητα. Επίσης, με την φωσφορυλίωση των μαννοπρωτεϊνών επιτυγχάνονται βελτιωμένες υδρόφιλες ιδιότητες του κυττάρου. Παρόλο που η κυτταρική μεμβράνη παρέχει, κυρίως, σταθερότητα στο κύτταρο, είναι και κύριο

εμπόδιο μεταφοράς υποστρωμάτων και ουσιών μέσα και έξω από το κύτταρο, λόγω της ύπαρξης πρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων και στερολών (Montet & Ray, 2016).

1.2.4. *Saccharomyces cerevisiae*

Όπως προαναφέρθηκε, ο *S. cerevisiae* είναι ο πιο διαδεδομένος ζυμομύκητας για την παραγωγή ζυμώμενων προϊόντων. Επίσης, είναι ο πιο εκτενώς μελετημένος ευκαρυωτικός μικροοργανισμός. Ακαδημαϊκά, θεωρείται το παγκόσμιο πρότυπο ευκαρυωτικού μικροοργανισμού. Ο *S. cerevisiae*, τυπικά, περιγράφεται ως προαιρετικά αναερόβιος, που σημαίνει ότι μπορεί να πολλαπλασιαστεί είτε σε αερόβιες, είτε σε αναερόβιες συνθήκες (Dickinson, 2014). Για μεγάλης κλίμακας παραγωγές ποτών, όπως η ζυθοποιία, οινοποίηση και παραγωγή αποσταγμένου οινοπνεύματος, χρησιμοποιούνται καθαρές καλλιέργειες από επιλεγμένα στελέχη *S. cerevisiae*, οι οποίες παρέχονται από εταιρίες παραγωγής μαγιάς. Αντίθετα, σε μικρότερης κλίμακας παραγωγές (χειρωνακτικές), χρησιμοποιείται μικροβιακή χλωρίδα (άγριες ζύμες και βακτήρια) που βρίσκεται στη πρώτη ύλη ή στις εγκαταστάσεις παραγωγής, κάνοντας τη ζύμωση αυθόρμητη. Σε κάποιους τύπους αλκοολικής ζύμωσης, ζύμες διαφορετικές του *Saccharomyces*, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης, είτε να εμφανιστούν φυσικά (Walker & Stewart, 2016).

Όπως φαίνεται και στις Εικόνες 1.4 και 1.5, ο συγκεκριμένος ζυμομύκητας βρίσκει εφαρμογή στη πλειοψηφία παραγωγής αλκοολούχων ποτών και ροφημάτων. Ο συγκεκριμένος ζυμομύκητας χρησιμοποιείται εκτενώς στη βιομηχανία τροφίμων (και



Εικόνα 1.4: Ο ρόλος του *S. cerevisiae* στη παραγωγή διάφορων αλκοολούχων ποτών (Walker and Stewart 2016)

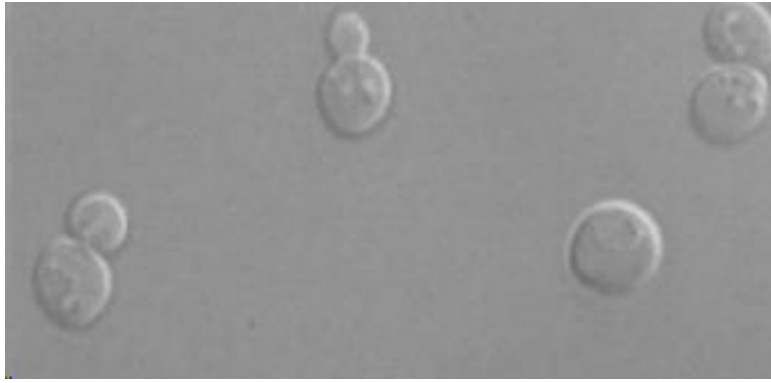
Beverage	Yeast Involved
Beer	Lager beer: <i>Saccharomyces pastorianus</i> Ale: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lambic beer: <i>Brettanomyces bruxellensis</i> and other yeasts
Wine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces bayanus</i> (pure cultures) and naturally-occurring yeasts
Whisky	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Rum	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Schizosaccharomyces pombe</i>

όχι μόνο) λόγω της μικρής περιόδου αναπαραγωγής (στους 30°C χρειάζεται μόλις 1,5-2 ώρες για να διπλασιαστεί), της ευκολίας εξημέρωσης, της ικανότητας σπορίωσης και της χαμηλής παθογένεσης (Onyema et al., 2023). Η υψηλή απόδοση σπορίων είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό των ζυμών, ώστε, να βελτιώνεται η γενετική χειραγώγηση και να ενισχύονται οι αποδόσεις των βιοτεχνολογικών εφαρμογών (Paulissen & Huang, 2016).

Ο *S. cerevisiae* είναι, γενικά, ελλειψοειδούς σχήματος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6, με διάμετρο 5-10μm. Όλες οι μαγιές είναι μονοκύτταροι μύκητες που έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων, όπως αναλύθηκε παραπάνω. Υπάρχουν κάποιες απαιτήσεις για την ανάπτυξη του. Αρχικά, χρειάζονται υψηλή ενεργότητα ύδατος, με την

Εικόνα 1.5: Οι κύριοι τύποι μαγιές που χρησιμοποιούνται στη παραγωγή επιλεγμένων αλκοολούχων ποτών (Walker and Stewart 2016)

ελάχιστη τιμή να βρίσκεται στα 0,65. Οι ζύμες αντιδρούν στην έλλειψη νερού υπερπαράγοντας γλυκερίνη ή άλλους ωσμολύτες, όπως τρεαλόζη, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι να προστατεύουν τις μεμβράνες της ζύμης από την ξήρανση. Τέτοιες ενώσεις μπορούν να αντικαταστήσουν το κυτταρικό νερό, να αποκαταστήσουν τον όγκο των κυττάρων και να επιτρέψουν την ομαλή λειτουργία του μεταβολισμού της ζύμης. Ωστόσο, η μεγάλη παραγωγή της γλυκερίνης μπορεί, τις περισσότερες φορές, να μειώσει την απόδοση της αιθανόλης. Όσον αφορά τις απαιτήσεις στη θερμοκρασία και το pH, η ζύμη λειτουργεί βέλτιστα σε θερμό και όξινο περιβάλλον με τιμές να κυμαίνονται από 20-30°C και pH 4,5-6,5, αντίστοιχα. Τέλος, αν και ο *S. cerevisiae* χαρακτηρίζεται ως προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός, δεν μπορεί να αναπτυχθεί κάτω από πλήρες αναερόβιο περιβάλλον. Αυτό, οφείλεται στο γεγονός πως το οξυγόνο είναι απαραίτητος αυξητικός παράγοντας για τα λιπαρά οξέα της μεμβράνης και τη στερόλη. Συνεπώς, για την διεκπεραίωση μιας αποτελεσματικής ζύμωσης, θα πρέπει να παρέχεται λίγο οξυγόνο κατά την έναρξη της ζύμωσης (Walker & Stewart, 2016).



Εικόνα 1.6: Μεμονωμένα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* (Gancedo, 2001)

1.3. Θρεπτικά υποστρώματα αλκοολικής ζύμωσης

Οι ζύμες χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών συστατικών, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, άζωτο, βιταμίνες, λιπίδια κτλ. Είναι συχνό φαινόμενο οι ζύμες να αντιμετωπίσουν αλλαγές θρεπτικών συστατικών, όπως απώλεια ή περίσσεια. Είναι, όμως, ικανές να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον. Όταν τα κύτταρα *S. cerevisiae* βιώνουν ανεπάρκεια σε κάποιο βασικό θρεπτικό συστατικό, σταματούν την μιτωτική διαίρεση στη φάση G1, η οποία αντιστοιχεί στη στατική φάση ανάπτυξης (Tesnière et al., 2015).

1.3.1. Απαιτήσεις σε Άζωτο

Ένα από τα πιο βασικά συστατικά για την ανάπτυξη των ζυμών είναι το άζωτο, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στο αποτέλεσμα της αλκοολικής ζύμωσης. Οι ζύμες, συνήθως, καταναλώνουν άζωτο στις πρώτες 24-48 ώρες της ζύμωσης (Tesnière et al., 2015). Οι απαιτήσεις αζώτου μπορούν να καλυφθούν, γενικώς, από άλατα αμμωνίου, ουρία ή οργανικές ενώσεις αζώτου. Συγκεκριμένα για τα γένη *Saccharomyces* έχει βρεθεί πως καλή πηγή αζώτου είναι η ασπαραγίνη, το ασπαρτικό οξύ, το γλουταμινικό οξύ, το φωσφορικό αμμώνιο, η λευκίνη και η αργινίνη. Αντιθέτως, μέτριες πηγές θεωρήθηκαν η ορνιθίνη, η σερίνη, η βαλίνη, η προλίνη, η φαινυλανίνη, η τυροσίνη, η αλανίνη και η μεθειονίνη. Κακές πηγές αζώτου για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό είναι η τρυπτοφάνη, η ιστιδίνη, η γλυκίνη και η λυκίνη. Το 1937, οι Nielsen και Hartelius απέδειξαν πως ένας αριθμός αμινοξέων, τα οποία μεμονωμένα βρέθηκαν να είναι τοξικά, αν χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά, έχουν ευεργετικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη της καλλιέργειας μαγιάς έως και 84%. Οι Mitchell και Williams το 1940 επιβεβαίωσαν τα παραπάνω, βρίσκοντας ότι για έξι στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* που καλλιεργούνται σε ένα συνθετικό μέσο συμπληρωμένο με δέκα συστατικά, τα

πέντε πιο σημαντικά αμινοξέα ήταν το γλουταμινικό οξύ, το ασπαρτικό οξύ, η ασπαραγίνη, η αργινίνη και η λευκίνη (Joslyn, 1951).

1.3.2. Απαιτήσεις σε Άνθρακα

Οι ζυμομύκητες είναι χημειοοργανοτροφικοί, οι οποίοι λαμβάνουν άνθρακα και ενέργεια με μεταβολισμό οργανικών υποστρωμάτων. Η γλυκόζη χρησιμοποιείται ως μοναδική πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη μυκήτων στο εργαστήριο. Βέβαια, αυτή η ζάχαρη δεν είναι ελεύθερα διαθέσιμη σε μέσα βιομηχανικής ζύμωσης. Σε τέτοια μέσα, η πηγή άνθρακα είναι η μαλτόζη (όπως στη βύνη για ζυθοποιία), η σακχαρόζη (όπως στη μελάσα για παραγωγή ρουμιού), η λακτόζη και η φρουκτόζη. Μόνο στη περίπτωση χυμών φρούτων και μούστο κρασιού, είναι δυνατόν να ελευθερωθεί η γλυκόζη μαζί με τη φρουκτόζη (Walker & Stewart, 2016). Ο Kluyver το 1931 συμπέρανε πως αν μια ζύμη δεν μπορεί να ζυμώσει τη γλυκόζη τότε δεν μπορεί να ζυμώσει κανένα σάκχαρο, ενώ εάν είναι ικανό να ζυμώσει τη γλυκόζη, τότε θα μπορεί να ζυμώσει και τη φρουκτόζη και τη μαλτόζη. Επίσης, απέδειξε πως μια ζύμη δεν γίνεται να ζυμώνει τόσο τη μαλτόζη όσο και τη λακτόζη (Joslyn, 1951).

1.3.3. Απαιτήσεις σε Βιταμίνες

Κάποια άλλα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη των μυκήτων είναι οι βιταμίνες. Αυτές, εμπλέκονται ως συμπράγοντες σε πολλές μεταβολικές οδούς, όπως, αυτές του άνθρακα, των λιπαρών οξέων, των αμινοξέων, του αζώτου και του θείου. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί η συσχέτιση τους με την παραγωγή πτητικών ενώσεων στη παραγωγή κρασιού. Ύστερα από έρευνα, λοιπόν, αποδείχθηκε πως ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* καταναλώνει ποσότητες βιταμινών B1, B3, B5, B6, B8 και B9. Η B1 βοηθάει στη διαδικασία της ζύμωσης και η B8 στην ανάπτυξη της ζύμης. Η βιταμίνη που φάνηκε να έχει την μεγαλύτερη κατανάλωση είναι η B5, η οποία βρίσκει εφαρμογή και στις δύο διεργασίες, την ζύμωση και την ανάπτυξη (Evers et al., 2023).

1.3.4. Πηγές Απαραίτητων Στοιχείων

Όλα τα προαναφερόμενα συστατικά, οι ζύμες, τα λαμβάνουν από τα λεγόμενα θρεπτικά υποστρώματα. Τα υποστρώματα για την παραγωγή αιθανόλης συστήνεται να είναι μη τροφική πηγή και αρκετά φθηνά. Για παράδειγμα, έχουν γίνει αναφορές σε παραγωγή αιθανόλης από απόβλητα, όπως, μελάσα B, η οποία είναι προϊόν δευτέρου βρασμού και εκχύλισης ζάχαρης με πικρή γεύση, πολτός ζαχαρότευτλων, απόβλητα από την παραγωγή αμύλου κτλ. Τα δύο μεγάλα πλεονεκτήματα της χρήσης αποβλήτων για παραγωγή αιθανόλης είναι πως μειώνει την παραγωγή αποβλήτων και αφού τα εν

λόγω είναι αρκετά οικονομικά, μειώνει το κόστος παραγωγής αιθανόλης (Tesfaw & Assefa, 2014).

1.3.5. Παραδείγματα Θρεπτικών Υποστρώματων

Οι ζύμες είναι ικανές να αναπτυχθούν σε αρκετά θρεπτικά υποστρώματα. Παρακάτω παρατίθενται δύο κύρια υποστρώματα, ευρέως χρησιμοποιούμενα.

1. YPD, ή αλλιώς YPED (yeast extract, peptone, dextrose), περιέχει όλα τα υλικά που απαιτούνται για την ανάπτυξη ζυμών. Είναι γενικώς μη εκλεκτικό μέσο ανάπτυξης. Για την ανάπτυξη *S. cerevisiae*, το πρωτόκολλο για ένα λίτρο άγαρ δίνεται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1: Πρωτόκολλο παρασκευής YPD (Dymond, 2013)

Υλικό	Ποσότητα
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	10,0g
Πεπτόνη (peptone)	20,0g
Τρυπτοφάνη (tryptophan)	0,33g
Δεξτρόζη (dextrose)	20,0g

Σημειώνεται πως για μετατροπή σε στερεό υπόστρωμα γίνεται προσθήκη άγαρ μέχρι τελικής συγκέντρωσης 2%, δηλαδή απαιτούνται 2g άγαρ. Απαραίτητη είναι η αποστείρωση του υλικού (121°C για 15') (Dymond, 2013).

2. DRBC (Dichlorian Rose Bengal Chloramphenicol) agar, είναι το υλικό που χρησιμοποιείται για καταμέτρηση των αποικιών ζυμών. Είναι εκλεκτικό υπόστρωμα και υποστηρίζει την καλή ανάπτυξη των ζυμών και των μυκήτων. Η συνταγή για την παρασκευή του παρατίθεται στον Πίνακα 1.2.

Πίνακας 1.2: Πρωτόκολλο παρασκευής DRBC agar (Zimbro, 2009)

Υλικό	Ποσότητα
Πεπτόνη Πρωτεόζης No 3 (protease peptone No 3)	5,0g
Δεξτρόζη (dextrose)	10,0g
Φωσφορικό Μονοκάλιο (monopotassium phosphate)	1,0g
Θειικό Μαγνήσιο (magnesium sulfate)	0,5g
Διχλωράνη (dichloran)	2,0mg
Rose Bengal	25,0mg

<i>Χλωραμφενικόλη (chloramphenicol)</i>	0,1g
<i>Agar</i>	15,0g

Από το παραπάνω έτοιμο μίγμα σκόνης, χρησιμοποιούνται 31,6g, στα οποία προστίθεται ένα λίτρο απιονισμένου νερού. Απαιτείται αποστείρωση του υλικού (121°C για 15΄) (Zimbro, 2009).

1.4 Εφαρμογές και προϊόντα αλκοολικής ζύμωσης

Η τεχνολογία της ζύμωσης βρίσκει εφαρμογές σε όλων των ειδών τρόφιμα, τα οποία υπάρχουν στη διατροφή των ανθρώπων εδώ και πολλά χρόνια. Τα τρόφιμα και τα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση αντιπροσωπεύουν περίπου το 20-40% των προϊόντων τροφίμων παγκοσμίως. Τυπικά, το ένα τρίτο (1/3) της τροφής των ανθρώπων προέρχεται από ζυμώμενα τρόφιμα. Η μεγαλύτερη παραγωγή ζυμώμενων τροφίμων εμφανίζεται στην Ευρώπη, στην Βόρεια Αμερική και στη Αφρική νότια της Σαχάρα. Οι τρεις κύριες κατηγορίες ζυμώμενων προϊόντων είναι τα γαλακτοκομικά, τα ροφήματα και τα δημητριακά. Ακολουθούν τα κρέατα, τα ψάρια, τα φρούτα και τα λαχανικά (Campbell-Platt, 1994).

1.4.1. Αλκοολούχα Ποτά

Πιο συγκεκριμένα, η αλκοολική ζύμωση είναι η παλαιότερη και πιο σημαντική, από οικονομική άποψη, από όλες τις βιοτεχνολογίες. Τα πρώτα προϊόντα που παράγονται μέσω της αλκοολικής ζύμωσης είναι τα αλκοολούχα ποτά και ροφήματα. Τα τρία πιο διάσημα ποτά παγκοσμίως είναι τα ακόλουθα (Maicas, 2020).

1.4.1.1. Κρασί

Η ζύμωση κρασιού αποτελεί βιοτεχνολογική παράδοση κατά την οποία, ο χυμός του σταφυλιού μετατρέπεται σε κρασί. Κατά την διάρκεια των αιώνων αναπτύχθηκαν πολλές μέθοδοι παραγωγής κρασιού. Αυτό, οδήγησε στην τεράστια ποικιλία κρασιών που υπάρχουν σήμερα, όπως σαμπάνιες, κόκκινα, λευκά ή ροζέ κρασιά, ξερά, γλυκά ή ημίγλυκα κτλ. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ζύμη που συμμετέχει στη διαδικασία είναι *S. cerevisiae* (Mills et al., 2008).

1.4.1.2. Υδρόμελο

Δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τη ποσότητα μελιού που καταναλώνονταν στο παρελθόν, όμως έχει διατυπωθεί η πρόταση πως συμπίπτει με την ποσότητα ραφιναρισμένης ζάχαρης που καταναλώνεται σήμερα (Vidrih & Hribar, 2016). Συνεπώς, το μέλι κατείχε σημαντική θέση στην διατροφή των ανθρώπων. Το υδρόμελο είναι ένα αλκοολούχο ποτό το οποίο παρασκευάζεται με αλκοολική ζύμωση του

μελιού. Ούτε για το υδρόμελο υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την χρονολογία ή την τοποθεσία προέλευσης του. Βέβαια, έχουν βρεθεί στοιχεία ύπαρξης του σε όλους τους αρχαίους πολιτισμούς (Vidrih & Hribar, 2016). Παραδοσιακά διαλύεται το μέλι σε νερό και στη συνέχεια προστίθεται ο κατάλληλος ζυμομύκητας προκειμένου να ξεκινήσει η ζύμωση. Συνήθως ο ζυμομύκητας είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Τα υδρόμελα ποικίλλουν βάση της γεύσης, της γλυκύτητας και της περιεκτικότητας τους σε αλκοόλη (Zamora, 2009). Παρ'όλη την μακρόχρονη ιστορία της παραγωγής του υδρόμελου, δεν έχει γίνει τόσο γνωστό όσο το κρασί από τον χυμό σταφυλιών. Αυτό, οφείλεται στην έλλειψη της ποιότητας που έχει ένα κλασσικό αλκοολούχο ρόφημα. Το μέλι είναι πλούσιο σε σάκχαρα, όμως, έχει μεγάλη έλλειψη σε άλλα συστατικά τα οποία βοηθούν στη ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα του σε οξέα είναι αρκετά χαμηλή σε σχέση με αυτή των χυμών φρούτων. Για τον λόγο αυτό έχουν γίνει προσπάθειες εμπλουτισμού του υδρόμελου με αλάτι ή χυμούς φρούτων για να ενισχύσουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Επίσης, η χαμηλή περιεκτικότητα σε οξέα ενισχύει την γρήγορη προσβολή του υδρόμελου από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς. Σε μικρά ποσοστά, επίσης, περιέχονται και πρωτεΐνες, οι οποίες δυσκολεύουν την διαδικασία. Ο τρόπος επίλυσης αυτού του προβλήματος είναι ο βρασμός του διαλυμένου μελιού στο νερό, για τριάντα με εξήντα (30-60) λεπτά (Kime et al., 1991).

1.4.1.3. Μπύρα

Η μπύρα είναι το ποτό που καταναλώνεται περισσότερο παγκοσμίως. Παραδοσιακά παρασκευάζεται με τέσσερα μόνο υλικά: βυνοποιημένα δημητριακά (κριθάρι ή άλλα), νερό, λυκίσκο και μαγιά. Κάθε ένα από αυτά και συνδυαστικά, προσφέρουν στο τελικό προϊόν της μπύρας το επιθυμητό άρωμα και γεύση. Τα σάκχαρα που πρόκειται να καταναλώσει η μαγιά για την παραγωγή της αιθανόλης και του διοξειδίου του άνθρακα προέρχονται από τα δημητριακά. Δύο είδη μαγιάς χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία, ο *S. cerevisiae* και ο *S. pastorianus* (Maicas, 2020).

1.4.1.4. Μηλίτης

Είναι γνωστό πως τα μήλα περιέχουν υψηλή ποσότητα βιοδραστικών ενώσεων που συμβάλλουν στη υγεία των καταναλωτών. Η διαδικασία ζύμωσης του μηλίτη είναι παρόμοια με αυτή του κρασιού και της μπύρας, αφού χρησιμοποιείται πηγή σακχάρων (μήλα) για την παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Αν και αρκετές φορές, η ζύμωση γίνεται αυθόρμητα από μικροοργανισμούς που βρίσκονται ήδη στη φλούδα και στο εσωτερικό του μήλου, επιλεγμένα στελέχη του *S. cerevisiae* είναι αυτά που

προτείνονται για μία πιο ελεγχόμενη ζύμωση (Guiné et al., 2021).

1.4.2. Μη- Αλκοολούχα Τρόφιμα και Ροφήματα

Βέβαια, εκτός από αλκοολούχα προϊόντα, μέσω της αλκοολικής ζύμωσης παράγονται και προϊόντα όπως το ψωμί, η σοκολάτα και ο καφές.

1.4.2.1 Ψωμί

Το ψωμί, στις αμέτρητες μορφές του, θεωρείται ως μία από τις βασικές τροφές με την μεγαλύτερη κατανάλωση. Τα βασικά συστατικά του είναι αλεύρο σίτου, νερό, αλάτι και κάποιος διογκωτικός παράγοντας, κυρίως μαγιά (*S. cerevisiae*). Ο ρόλος της μαγιάς στο ψωμί είναι να ζυμώσει τα σάκχαρα προς μικρή ποσότητα αιθανόλης και μεγάλη ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα που προκαλεί φούσκωμα στο ζυμάρι κατά το ψήσιμο. Κατά το ψήσιμο, το ψωμί αποκτά χαρακτηριστική ψίχα και κρούστα (Suchintita Das et al., 2023).

1.4.2.2. Καφές

Ο καφές θεωρείται ένα από τα πιο διάσημα μη-αλκοολούχα, ενεργειακά ποτά, με πολλές θετικές ιδιότητες για τον άνθρωπο, με κυριότερη την αντιοξειδωτική του δράση. Μετά τη συγκομιδή, οι σπόροι καφέ, επεξεργάζονται με ξηρή, ημίξηρη ή υγρή διεργασία που προσδίδουν στο τελικό προϊόν τις διαφορετικές γεύσεις και αρώματα. Κατά την διαδικασία αυτή, οι σπόροι υφίστανται μια διαδικασία ζύμωσης, η οποία πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται ήδη στο μίγμα των σπόρων καφέ. Βέβαια, η διαδικασία μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη κατάλληλων ενζύμων (Schwan et al., 2012).

1.4.2.3. Σοκολάτα

Οι ωμοί κόκκοι κακάο έχουν πικρή και στυφή γεύση, λόγω της μεγάλης ποσότητας φαινολικών συστατικών που περιέχονται σε αυτούς. Η ζύμωση προκαλεί την ενζυμική διάσπαση των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων μέσα στους κόκκους, επιτρέποντας την ανάπτυξη της χαρακτηριστικής γεύσης. Οι ζύμες ή τα βακτήρια που συμμετέχουν, ζυμώνουν τους κόκκους κακάο με διαφορετικές μεθόδους, ακολουθώντας μία αναερόβια και μια αερόβια φάση. Στο πρώτο στάδιο, οι ζύμες καταναλώνουν τα σάκχαρα προς σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα και μικρές ποσότητες αιθανόλης και ενέργειας. Στη δεύτερη, αερόβια φάση, κυριαρχούν τα βακτήρια που παράγουν το οξικό οξύ (Maicas, 2020).

1.4.3. Βιοκαύσιμα

Τέλος, εκτός από τα ζυμώμενα τρόφιμα και ποτά, η αλκοολική ζύμωση βρίσκει εφαρμογή και στη παραγωγή βιοκαυσίμων και άλλων χημικών ουσιών. Τα βιοκαύσιμα είναι χημικά εμπλουτισμένα με ενέργεια που παράγονται μέσω βιολογικών διεργασιών ή προέρχονται από βιομάζα ζωντανών μικροοργανισμών (Rodionova et al., 2017). Η μικροβιακή ζύμωση είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την διάσπαση μεγαλύτερων οργανικών μορίων σε απλούστερα. Πριν από την αλκοολική ζύμωση απαιτούνται διεργασίες προεπεξεργασίας της βιομάζας. Μέσω της ενζυματικής υδρόλυσης, απελευθερώνονται σάκχαρα, τα οποία ζυμώνουν οι ζύμες με σκοπό την παραγωγή βιοαιθανόλης (Tse et al., 2021).

2. Οξική Ζύμωση

Το ξύδι αποτελεί παραδοσιακά προϊόν οξικής ζύμωσης φυσικών αλκοολούχων υποστρωμάτων και γίνεται κατάταξη των ειδών ξυδιού ανάλογα με το υπόστρωμα που έχει μεταβολιστεί. Συγκεκριμένα, ταξινομούνται ως ξύδια φρούτων (ξύδι σταφυλιού), αμύλου (ξύδι ρυζιού) ή υποστρώματος αλκοολούχων ποτών (ξύδι από λευκό κρασί). Υπάρχει ποικιλία βακτηρίων που μπορούν να παράγουν οξικό οξύ ως τελικό προϊόν, ωστόσο σε βιομηχανικό επίπεδο χρησιμοποιούνται ευρέως τα γένη των *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, and *Gluconobacter* (Raspor & Goranovič, 2008).

Οι βιομηχανικές διαδικασίες παραγωγής ξυδιού εμπίπτουν σε τρεις κύριες κατηγορίες: αργές διεργασίες, γρήγορες διεργασίες και διεργασίες βυθιζόμενης ζύμωσης.

Η αργή διαδικασία οξικής ζύμωσης με σταθερή-στατική επιφάνεια χρησιμοποιείται περισσότερο για παραδοσιακή παραγωγή ξυδιού, καθώς προσφέρει καλής ποιότητας τελικό προϊόν. Με θετικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης μεθόδου το γεγονός ότι είναι οικονομικά συμφέρουσα και με μειονέκτημα ότι θεωρείται χρονοβόρα, καθώς απαιτείται περίπου ένας μήνας για την ολοκλήρωση της ζύμωσης από την στιγμή που η επιφάνεια του υγρού καλυφθεί από βακτήρια του οξικού οξέος. Στην συγκεκριμένη τεχνική (στατική επιφάνεια) δεν απαιτούνται αυστηρά μέτρα αποστείρωσης. Το αλκοολούχο υγρό ζυμώνεται σε κατάλληλα δοχεία εφοδιασμένα με καλύμματα, των οποίων ο ρόλος είναι η πρόληψη από πιθανές βακτηριακές μολύνσεις. Ακόμη δεν απαιτείται εμβολιασμός καθαρών στελεχών μετά από την έναρξη της ζύμωσης του ξυδιού, καθώς υπάρχουν οξικές ζυμώσεις που συνεχίζουν την ομαλή λειτουργία τους χωρίς εμβολιασμό καθαρών καλλιέργειών για πάνω από εκατό χρόνια (Nanda et al., 2001).

Σε επίπεδο βιομηχανίας η παραγωγή ξυδιού επιτυγχάνεται κυρίως με τη διαδεδομένη μέθοδο της βυθισμένης ζύμωσης, ευέλικτη και γρήγορη. Μέσω της αερόβιας αυτής διαδικασίας η αιθανόλη των αλκοολούχων υγρών (κρασί, μπίρα, μηλίτης) οξειδώνεται σε οξικό οξύ, χάρη στην δράση των οξικών βακτηρίων (AAB). Η βυθισμένη ζύμωση απαιτεί δυνατά στελέχη οξικού οξέος ικανά να προκαλέσουν την παραπάνω μετατροπή υπό εκλεκτικές συνθήκες ώστε να παραχθεί υψηλής συγκέντρωσης οξικό οξύ. Ωστόσο επί του παρόντος και στη συγκεκριμένη μέθοδο ζύμωσης δε χρησιμοποιούνται εκλεκτικές καλλιέργειες οξικών βακτηρίων, αλλά

καλλιέργειες προερχόμενες από αποθέματα προηγούμενης οξοποίησης οι οποίες παραμένουν ενεργές λόγω επαναλαμβανόμενων ανακαλλιιεργειών. Σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν την διαδικασία της ζύμωσης καθώς και την δραστικότητα των οξικών βακτηρίων συνιστούν η διαθεσιμότητα οξυγόνου, η θερμοκρασία και η περιεκτικότητα που υπάρχει σε οξικό οξύ (Gullo et al., 2014).

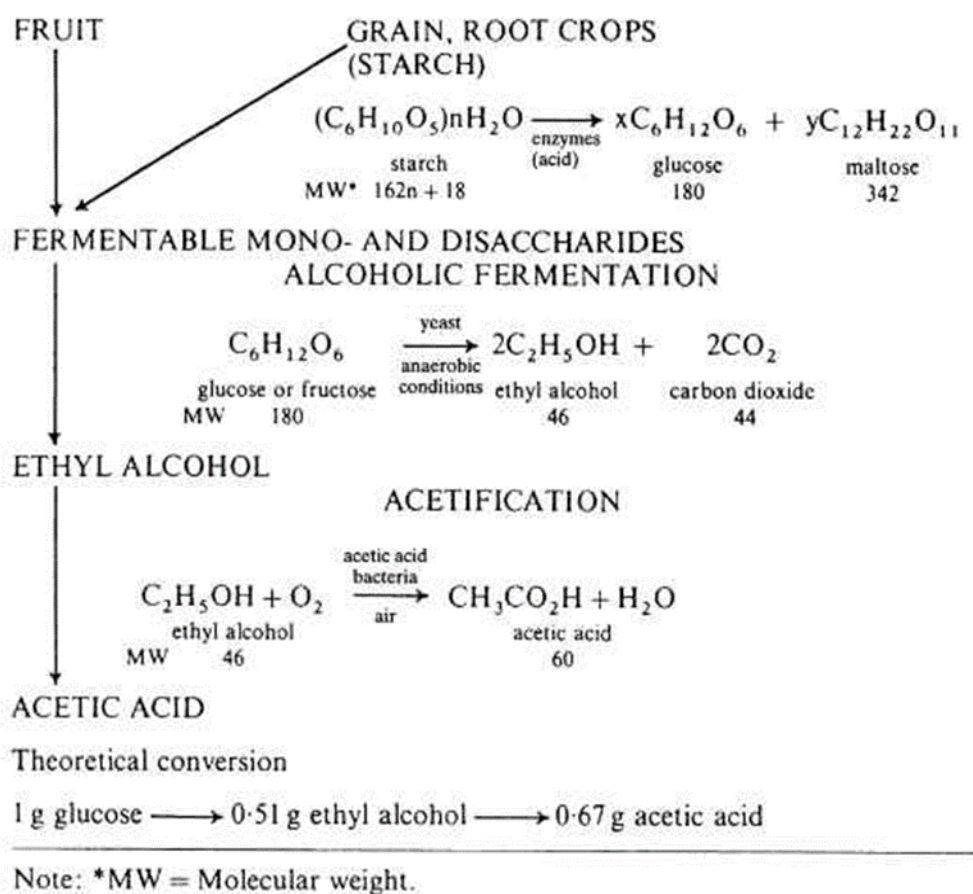
Τα οξικά βακτήρια (Acetic Acid Bacteria-AAB) αποτελούν τους κύριους μικροοργανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή ξυδιού. Ωστόσο, δεν έχουν μόνο θετική δράση ως προς την παραγωγή τροφίμων και ποτών αλλά και αρνητική αφού μπορούν να οδηγήσουν στην αλλοίωση ορισμένων. Τα AAB συναντώνται συνήθως σε υποστρώματα-περιβάλλοντα ποσοτικά πλούσια σε ζάχαρη και αλκοόλ.

Παρελθοντικά, δεν υπήρχε επαρκής ενημέρωση σχετικά με τα είδη των οξικών βακτηρίων που λαμβάνουν χώρα σε βιομηχανικές διεργασίες, λόγω δυσκολίας στην καλλιέργεια αυτών σε ημιστερεά μέσα. Ωστόσο με την πάροδο του χρόνου και την ανάπτυξη της τεχνολογίας η επιστήμη έχει αναγνωρίσει και ταυτοποιήσει συγκεκριμένα είδη βακτηρίων υπεύθυνα για την οξική ζύμωση.

Η παραγωγή του οξικού οξέος περιλαμβάνει δυο στάδια, στο πρώτο τα ζυμώσιμα σάκχαρα μετατρέπονται σε αιθανόλη μέσω της βοήθειας ζυμομύκητα, συνήθως από στελέχη του Σακχαρομύκητα *Cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*). Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η οξειδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ, χάρη στη δράση των οξικών βακτηρίων (AAB) (Raspor & Goranovič, 2008). Συνεπώς, η παραγωγή του ξυδιού πολλές φορές προκύπτει ως μια αυθόρμητη διαδικασία ζύμωσης. Αυτό οφείλεται στις συνθήκες που επικρατούν, οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξη και την δράση των δύο απαιτούμενων για την ζύμωση μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα η υψηλή αρχική συγκέντρωση σακχάρου (περίπου 10% βάρος κατ' όγκο) και το όξινο pH συνιστούν ευνοϊκό περιβάλλον για την παραγωγή αιθανόλης από ζυμομύκητες (κυρίως *Saccharomyces cerevisiae*). Κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης οι συνθήκες που επικρατούν είναι αναερόβιες, με μεγαλύτερη πτώση στην τιμή του pH και με αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης.

Με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, το οποίο συνεπάγεται κατανάλωση των σακχάρων, ακολουθεί η οξική ζύμωση. Αυτή απαιτεί αερόβιες συνθήκες στην επιφάνεια του υγρού ώστε να αρχίσει η ανάπτυξη των βακτηρίων του οξικού οξέος. Τα οξικά βακτήρια (AAB) οξειδώνουν την αιθανόλη παράγοντας οξικό οξύ και μειώνοντας το pH σε τιμές μικρότερες ή ίσες του 3. Το οξικό οξύ που έχει παραχθεί

βρίσκεται συνήθως σε υψηλά επίπεδα μεταξύ 0,7 και 2,0M στα περισσότερα εμπορικά ξύδια. Συνεπώς, ένα παρόμοιας σύστασης υπόστρωμα που αφήνεται εκτεθειμένο στον ατμοσφαιρικό αέρα, που περιέχει O_2 , είναι εύκολο να οδηγήσει μετά από καιρό σε μία φυσική αυθόρμητη ζύμωση δημιουργώντας ως τελικό προϊόν το ξύδι (Wood, 2012). Πιθανόν για τον λόγο αυτό, η παραγωγή ξυδιού, είναι μία από τις παλαιότερες ανθρώπινες ανακαλύψεις μαζί με αυτή των αλκοολούχων ποτών (κρασί, μπύρα). Η άμεση συσχέτιση μεταξύ αλκοόλ και ξυδιού επιβεβαιώνεται, λόγω της επί χιλιάδες έτη δυσκολίας ορισμών ακριβείας και διάκρισης μεταξύ των όρων κρασί, παλιό κρασί, όξινο/ξινό κρασί και ξύδι (Conner & Allgeier, 1976).

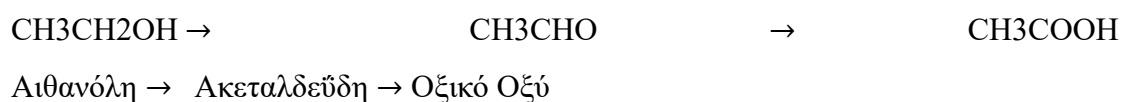


Εικόνα 2.1: Σχεδιάγραμμα παραγωγής ξυδιού (Wood, 2012)

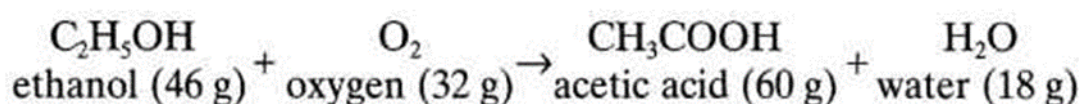
Σύμφωνα με την Εικόνα 2.1, η διαδικασία παραγωγής ξυδιού μπορεί να περιγραφεί συνοπτικά ως εξής. Αρχικά, τα φρούτα, σιτηρά και ριζικές καλλιέργειες, που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο, χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για την έναρξη της διαδικασίας. Το άμυλο, με την βοήθεια ενζύμων, διασπάται σε γλυκόζη και μαλτόζη.

Στη συνέχεια, οι ζυμομύκητες χρησιμοποιούν αυτές τις μορφές σακχάρων (μονο- και δι-σακχαρίτες) ως πηγή ενέργειας και παράγουν αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του θείου, υπό αναερόβιες συνθήκες. Τέλος, κατά την διάρκεια της οξοποίησης, τα οξικά βακτήρια χρησιμοποιούν οξειδωτικές συνθήκες υπό αέρα για να μετατρέψουν την αιθανόλη που προέρχεται από την αλκοολική ζύμωση σε οξικό οξύ, με ταυτόχρονη παραγωγή νερού. Σύμφωνα με θεωρητικές αναλύσεις, 1 γραμμάριο γλυκόζης μετατρέπεται σε 0,51 γραμμάρια αιθανόλης, η οποία παράγει 0,67 γραμμάρια οξικού οξέος (Wood, 2012).

Η οξική ζύμωση πραγματοποιείται από τα οξικά βακτήρια (AAB, Acetic Acid Bacteria), τα οποία είναι μεσόφιλοι υποχρεωτικοί αερόβιοι μικροοργανισμοί. Τα βακτήρια αυτά οξειδώνουν σάκχαρα, αλδιτόλες (αλκοόλες που προέρχονται από την αναγωγή σακχάρων) και αιθανόλη, με κύριο τελικό προϊόν το οξικό οξύ. Κατά την παραγωγή οξικού οξέος, η αιθανόλη οξειδώνεται σχεδόν ποσοτικά προς οξικό οξύ. Η οξείδωση της αιθανόλης πραγματοποιείται μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων. Η πρώτη αντίδραση καταλύεται από την αφυδρογονάση της αλκοόλης (ADH) και η δεύτερη από την αφυδρογονάση της αλδεΐδης (ALDH) (Raspor & Goranovič, 2008).



Συνεπώς η οξοποίηση συνιστά μια διαδικασία ζύμωσης κατά την οποία βακτήρια του οξικού οξέος οξειδώνουν της αιθανόλη και παράγουν οξικό οξύ και νερό. Αυτή η διαδικασία περιγράφεται χημικά με την ακόλουθη εξίσωση:



Εικόνα 2.2: Αντίδραση οξείδωσης αιθανόλης (Wood, 2012)

Βάσει στοιχειομετρίας της παραπάνω εξίσωσης προκύπτει ότι 1 λίτρο (L) αιθανόλης παράγει 1,036 κιλά (kg) οξικού οξέος και 0,313 κιλά (kg) νερού. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης παρατηρείται μια μικρή αύξηση όγκου της τάξεως 1-3% για την συγκέντρωση της αιθανόλης, υποδηλώνοντας ότι προσεγγιστικά 1% όγκο κατ' όγκο (v/v) αιθανόλη παράγει 1% βάρος κατ' όγκο (w/v) οξικό οξύ. Αυτή η σχέση χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις αιθανόλης της τάξεως 9,2% όγκο κατ'

όγκο, δημιουργώντας μια βάση ώστε να προβλεφθούν τόσο η ενδεχόμενη τιμή οξύτητας του ξυδιού που θα προκύψει όσο και η απόδοση που θα έχει η ζύμωση.

Το άθροισμα των συγκεντρώσεων αιθανόλης (% v/v) και οξικού οξέος (%w/v), γνωστά και ως ολική συγκέντρωση ή GK (Gesammte Konzentration), θα πρέπει να παραμένει σταθερό κατά την διάρκεια της οξοποίησης εφόσον υπάρχει απουσία απωλειών λόγω εξάτμισης και υπεροξείδωσης. Η απόδοση GK είναι η ολική συγκέντρωση, αιθανόλης και οξικού οξέος, του τελικού ξυδιού εκφρασμένη ως ποσοστό του αρχικού αποθέματος ξυδιού (Wood, 2012). Εκτός από τον παραπάνω τρόπο, μια εναλλακτική διαδικασία συνιστά ο υπολογισμός της απόδοσης τους οξέος.

Η μεταβολή της συγκέντρωσης του οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης, εκφρασμένη ως ποσοστό της αρχικής περιεκτικότητας σε αλκοόλη του αποθέματος ξυδιού. Ωστόσο η απόδοση οξέος είναι χαμηλότερη από την απόδοση GK, αφού δεν λαμβάνει υπόψη την περιεχόμενη αλκοόλη που έχει παραμείνει στο ξύδι (Hromatka & Ebner, 2002).

Γενικά, η αντίδραση της αιθανόλης σε οξικό οξύ είναι μια εξώθερμη αντίδραση που παράγει περίπου 8,4 MJ ανά λίτρο αιθανόλης που οξειδώνεται. Ωστόσο, η πραγματική παραγωγή θερμότητας είναι ελαφρώς χαμηλότερη από τη θεωρητική, καθώς πρέπει να ληφθούν υπόψη η παραγόμενη βιομάζα αλλά και η θερμότητα καύσης. Ο συντελεστής απόδοσης εξαρτάται από την τεχνική ζύμωσης και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται. Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι η αντίδραση απαιτεί αερόβιες συνθήκες, πρέπει δηλαδή να υπάρχει οξυγόνο. Η αιθανόλη έχει μικρή διαλυτότητα σε υδάτινα μέσα, διαλύεται δηλαδή 8,1mg/L σε νερό στους 25°C.

Η ικανότητα διάλυσης μειώνεται συνεχώς με την αύξηση της θερμοκρασίας και της περιεκτικότητας της διαλυμένης ουσίας, με αποτέλεσμα η παροχή οξυγόνου να είναι ιδιαίτερα σημαντική και περιοριστική για τον ρυθμό της οξοποίησης. Έτσι, η μεταφορά μάζας οξυγόνου είναι ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά των διαφόρων τεχνικών οξοποίησης (Wood, 2012).

2.1 Βιοχημεία Οξικής Ζύμωσης

Όσον αφορά την βιοχημεία της οξικής ζύμωσης απαιτείται η κατανόηση συγκεκριμένων σχετικών εννοιών για την πλήρη κατανόηση της διεργασίας.

Αρχικά με τον όρο ένζυμα, ή αλλιώς με την ονομασία βιοκαταλύτες, ορίζονται ειδικές πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικής βάσης οργανικές ενώσεις, οι οποίες δρουν ως καταλύτες στις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον μεταβολισμό των

οργανισμών (Dixon & Webb, 1960). Παρά την πληθώρα ενζύμων έγινε κατάταξη αυτών βάσει του τύπου αντιδράσεων που καταλύουν. Οι ομάδες στις οποίες ταξινομήθηκαν είναι οι εξής: ένζυμα υδρόλυσης, μεταφοράς και τα υπόλοιπα ένζυμα. Στην τελευταία κατηγορία περιλαμβάνονται οι συνθετάσες - δηλαδή ένζυμα που καταλύουν συνθετικές αντιδράσεις που συνδέονται με την διάσπαση του ATP- , στεροϊσομεράσες αλλά και ένζυμα που προσθέτουν ομάδες σε διπλούς δεσμούς. Τα οξειδωτικά ένζυμα συγκαταλέγονται μαζί με τα υπόλοιπα ένζυμα μεταφοράς, καθώς μεταφέρουν υδρογόνο (Tipton & Boyce, 2000).

Στην βιοχημεία, η οξειδοοδουκτάση είναι μία ομάδα ενζύμων που καταλύει τις αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής μεταφέροντας ηλεκτρόνια από έναν δότη (αναγωγικό μόριο) σε έναν δέκτη (οξειδωτικό μόριο). Αυτό επιτυγχάνεται με την βοήθεια των συμπαραγόντων, συνήθως NAD^+ ή NADP^+ (Toone, 2011). Οι οξειδοοδουκτάσες μπορούν να δημιουργήσουν αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων(e^-) σε βακτήρια, χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια, συμπεριλαμβανομένων και των αναπνευστικών συμπλεγμάτων (I, II, III).

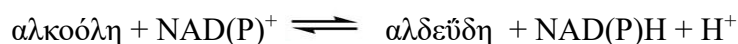
Ως συμπαράγοντες αναφέρονται τα βοηθητικά μόρια, τα οποία διευκολύνουν βιοχημικούς μετασχηματισμούς. Συγκεκριμένα είναι χαμηλού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνική χημική ένωση ή μεταλλικό ιόν, το οποίο κρίνεται απαραίτητο καθώς βοηθάει το ένζυμο να επιτελέσει τον σκοπό του, δηλαδή να αυξήσει τον ρυθμό της χημικής αντίδρασης.

Ορισμένοι συμπαράγοντες αναγεννούνται μόνοι τους, όπως η φωσφορική πυριδοξάλη (φωσφορυλιωμένη μορφή της βιταμίνης B6) και η πυροφωσφορική θειαμίνη (βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης B1). Άλλοι δρουν ως παράγοντες για την μεταφορά λειτουργικών ομάδων, αποτελώντας συνυποστρώματα, δηλαδή προσφέρουν ή δέχονται μια λειτουργική ομάδα προς ή από το άλλο υπόστρωμα της ενζυμικής αντίδρασης.

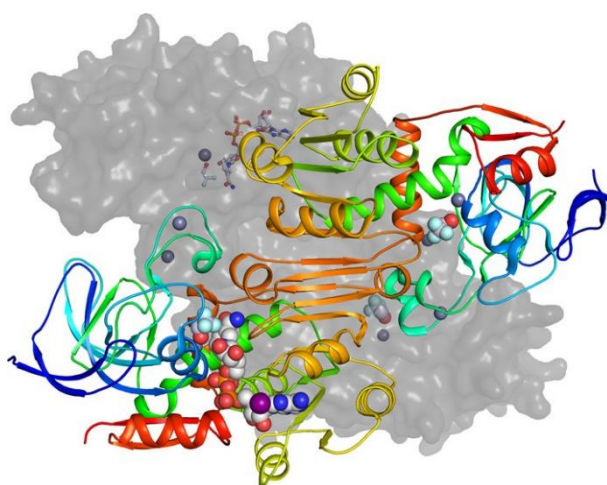
Οποιοσδήποτε από τους ανωτέρω και αν είναι ο σκοπός τους απαιτείται φειδωλή χρήση τους, ιδίως όταν γίνεται αναφορά σε χρήση τους σε μεγάλη κλίμακα, καθώς έχουν υψηλό κόστος. Το υψηλό τους κόστος οδηγεί στην επιτακτική ανάγκη για αναγέννηση τους *in situ* καθώς και την ανακύκλωση τους (Chenault et al., 1988).

Η αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) αποτελεί ένα από τα ένζυμα που συναντώνται στην διαδικασία οξικής ζύμωσης. Αυτή αντιδρά με μεθανόλη, αιθανόλη ή οκτανόλη,

σε διαφορετικές εντάσεις ανάλογα την αλκοόλη που συναντάται στο υπόστρωμα. Η ADH καταλύει την ακόλουθη αντίδραση:

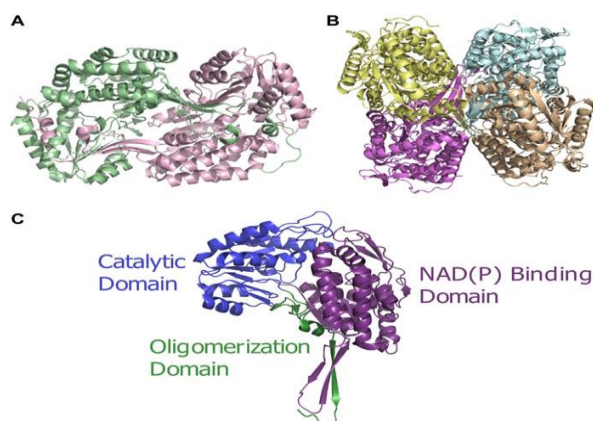


Συνεπώς τα αντιδρώντα αυτής της αντίδρασης είναι η εκάστοτε αλκοόλη, το NAD^+ και το NADP^+ , ενώ στα προϊόντα συγκαταλέγονται η αλδεΰδη, το NADH , το NADPH και το H^+ (Wong & Whitesides, 2002). Το NADPH μεταφέρει ηλεκτρόνια όπως το NADH , ωστόσο χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά στην αναγωγική βιοσύνθεση ενώ το NADH πρωτίστως για την παραγωγή ATP (Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto Jr., Lubert Stryer Biochemistry, n.d.).



Εικόνα 2.3: Τρισδιάστατη δομή του ενζύμου ADH (Raj et al., 2014)

Η αλδεΰδο-αφυδρογονάσες ή αλλιώς αφυδρογονάση της αλδεΰδης (ALDH) είναι μία ομάδα ενζύμων υπεύθυνη για την οξείδωση των αλδεϋδών σε καρβοξυλικά οξέα. Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις κατηγορίες, τα ένζυμα που προέρχονται από το κυτταρόπλασμα είναι η άμεσα ενδιαφερόμενη κατηγορία που χρησιμοποιείται στην



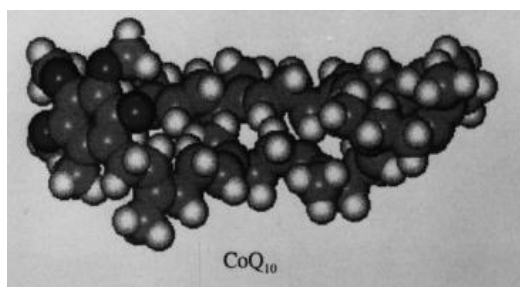
Εικόνα 2.4: Τρισδιάστατη δομή του ενζύμου ALDH (Shortall et al., 2021)

διαδικασία της οξικής ζύμωσης. Η περιοχή δέσμευσης του συμπαραγόνα, η ενεργή θέση και ο μηχανισμός ολιγομερισμού αποτελούν κύρια δομικά χαρακτηριστικά και αποδείχθηκαν κρίσιμοι για τη διατήρηση της φυσιολογικής δραστηριότητας της ALDH (Shortall et al., 2021).

Η κινόπρωτεϊνική αφυδρογονάση αλκοόλης εμπλέκεται σε αντιδράσεις καταβολισμού, στην παραγωγή οξικού οξέος (Chinnawirotpisan et al., 2003). Συγκεκριμένα η αφυδρογονάση της κινόπρωτεΐνης της γλυκόζης είναι ένα ένζυμο, το οποίο καταλύει την ακόλουθη αντίδραση:

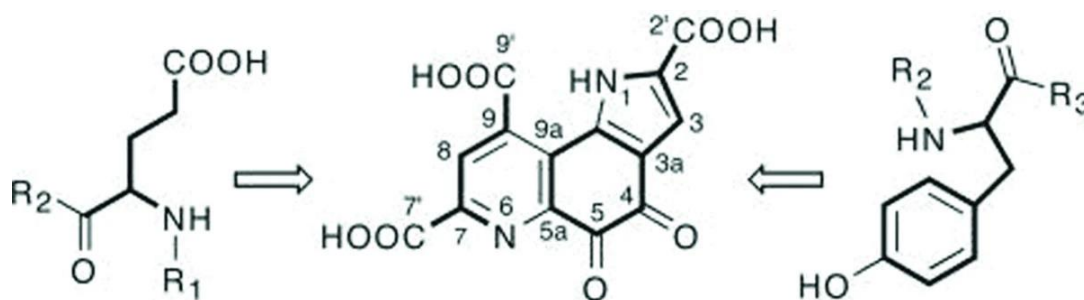
$$D\text{-γλυκόζη} + \text{ουμπικινόνη} \rightleftharpoons D\text{-γλυκονο-1,5-λακτόνη} + \text{ουμπικινόλη}$$
 Στα αντιδρώντα αυτής της αντίδρασης συγκαταλέγονται η D-γλυκόζη και η ουμπικινόνη, ενώ στα προϊόντα η D-γλυκονο-1,5-λακτόνη και η ουμπικινόλη (Duine et al., 1979).

Η ουμπικινόνη (CoQ10) και η ουμπικινόλη (CoQ10-H2) αποτελούν διαφορετικές μορφές του συνενζύμου Q καθώς, η ουμπικινόλη είναι πρακτικά μια περισσότερο ενεργή αντιοξειδωτική και υψηλά βιοδιαθέσιμη μορφή του συνενζύμου Q, συγκριτικά με την μορφή της ουμπικινόνης (Yamashita & Yamamoto, 1997).



Εικόνα 2.5: Δομή ουμπικινόνης (CoQ10) με Προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής (Di Bernardo et al., 1998)

Η κινόπρωτεϊνική αφυδρογονάση ουσιαστικά λειτουργεί ως αισθητήρας γλυκόζης στα βακτήρια και χρησιμοποιεί ως συμπαραγόνα την κινόνη πυρρολοκινολίνης (PQQ:



Εικόνα 2.6: Χημική δομή της PQQ (Πυρρολοκινολίνη κινόνη) (Puehringer et al., 2008)

Pyrrroloquinoline quinone) ή αλλιώς μεθοξατίνη, η οποία διεγείρει την ανάπτυξη των βακτηρίων (Wen et al., 2020). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το PQQ να έχει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της κυτταρικής αναπαραγωγής (Ameyama et al., 1988).

Τα κυτοχρώματα είναι ένζυμα, συγκεκριμένα οξειδοαναγωγικές πρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν μία αίμη με κεντρικό άτομο σιδήρου (Fe) στον πυρήνα τους, ως συμπράγοντα. Ο ρόλος τους είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων και η κατάλυση οξειδοαναγωγής. Ακόμη διαχωρίζονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες λαμβάνοντας υπόψιν τον τύπο της αίμης και τον τρόπο δέσμευσής της: κυτοχρώματα a,b,c και d (“Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature of Electron-Transfer Proteins. Recommendations 1989,,” 1992).



Εικόνα 2.7: Τρισδιάστατη (3D) δομή της PQQ (Puehringer et al., 2008)

Η οξείδωση του αιθανόλης σε οξικό οξύ είναι ένα από τα πιο γνωστά χαρακτηριστικά των βακτηρίων του οξικού οξέος. Η διαδικασία αυτή έχει μεγάλη σημασία από οικονομικής άποψης, καθώς χρησιμοποιείται για την παραγωγή ξυδιού, με αποτέλεσμα την εμβάθυνση στις γνώσεις και στην μελέτη των συσχετιζόμενων βιοχημικών διεργασιών. (G. S. Drysdale & Fleet, 1988) Τα AAB αποτελούνται από πολλά γένη και είδη, συγκεκριμένα για την παραγωγή ξυδιού χαρακτηρίζονται ως αντιπροσωπευτικά είδη τα *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus* καθώς και το *Gluconobacter oxydans*. Το κάθε είδος διαφέρει ως προς τον τρόπο που μεταβολίζει, τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του αλλά και ως προς τις ανθεκτικότητας του σε διάφορες συνθήκες.

Τα δύο ένζυμα που παίζουν σημαντικότερο ρόλο σε αυτή την διαδικασία οξείδωσης είναι και τα δύο συνδεδεμένα με την μεμβράνη και ονομάζονται αφυδρογονάση της αλκοόλης (ADH) και αλδεΰδο-αφυδρογονάση (ALDH). Τα ενεργά

τους κέντρα εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι δύο αναφερόμενες αφυδρογονάσες αποτελούνται από κινόπρωτεΐνες και φλαβοπρωτεΐνες, οι οποίες έχουν πρόσθετες ομάδες την κινόνη πυρρολοκινολίνης (PQQ) και το ομοιοπολικά συνδεδεμένο δινουκλεοτίδιο φλαβίνης αδενίνης (FAD) αντίστοιχα, που δρουν ως συμπράγοντες. Η ADH προκαλεί την αντίδραση οξειδωσης της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη, η οποία παρακάμπτεται στη συνέχεια και οξειδώνεται περαιτέρω σε οξικό οξύ, από ALDH (Adachi et al., 2003).

Η αφυδρογονάση της αλκοόλης αποτελείται από δύο ή τρεις υπομονάδες, απαραίτητες κρίνονται οι υπομονάδες της αφυδρογονάσης και του κυτοχρώματος c για την λειτουργία του ενζύμου. Η ADH των τριών υπομονάδων, που αποτελείται από 72-78 kDa αφυδρογονάση, κυτόχρωμα c 48 kDa και ακόμη μία υπομονάδα 20 kDa, εντοπίζεται στο *Acetobacter aceti*. Ενώ η ADH των δύο υπομονάδων βρίσκεται στο *A. pasteurianus*. Κατά την διάρκεια της οξειδωσης της αιθανόλης, οι δύο μεγαλύτερες υπομονάδες λειτουργούν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων από την ADH στην ουμπικινόνη και, κατόπιν, προς την τελική οξειδάση. Η μικρότερη υπομονάδα βοηθάει τις δύο λειτουργικές υπομονάδες να συνδεθούν με τη μεμβράνη (Gullo & Giudici, 2008).

Οι αλκοολο-αφυδρογονάσες διαχωρίζονται σε αυτήν που είναι συνδεδεμένη στην μεμβράνη και ανεξάρτητη του NAD(P)⁺, η οποία χρησιμοποιεί την πυρρολοκινολίνη κινόνη (PQQ) ως συμπράγοντα και στην εξαρτώμενη από το NAD(P)⁺, που απομονώνεται από το κυτταρόπλασμα. Η κυτταροπλασματική θεωρείται αρκετά περιοριστικής ως προς την οξειδωση της αιθανόλης, καθώς το βέλτιστο pH δράσης της κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 6-8, με χαμηλότερη τιμή δραστηριότητας το pH 3. Ακόμη παρουσιάζει χαμηλότερη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με την ανεξάρτητη του NAD(P)⁺ αφυδρογονάση. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα της τελευταίας να έχει βέλτιστη τιμή pH ίση με 4 καθώς και να παραμένει ενεργή σε τιμή ίση με 2 (Takemura et al., 1993).

Η παραγωγή οξικού οξέος από τα βακτήρια του γένους *Acetobacter* είναι υψηλότερη συγκριτικά με του γένους *Gluconobacter*, γιατί η δραστηριότητα της αλκοολικής αφυδρογονάσης του *Acetobacter* σταθεροποιείται καλύτερα σε οξυάντοχες συνθήκες. Είναι γεγονός ότι τα παραπάνω ένζυμα είναι ενεργά σε περιβάλλοντα όπως αυτό του κρασιού (Matsushita et al., 1994). Αδιαμφισβήτητη είναι η σημαντικότητα της αλδεΐδο-αφυδρογονάσης (ALDH), απομονωμένη από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και ανεξάρτητη από το NAD(P)⁺, με βέλτιστη τιμή pH μεταξύ 4 και 5. Το

ένζυμο αυτό έχει ως στόχο την κατάλυση της αντίδρασης οξείδωσης της ακεταλδεϋδης σε οξικό οξύ (Adachi et al., 1980).

Συγκρίνοντας τα δυο αναφερόμενα ένζυμα, η αλδεϋδο-αφυδρογονάση παρουσιάζει μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα από ότι η αφυδρογονάση της αλκοόλης (Du Toit & Pretorius, 2002). Ακόμη εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην περιεκτικότητα αλκοόλης σε περιβάλλοντα, όπως το κρασί, οδηγώντας πιθανώς σε συσσώρευση ακεταλδεϋδης στον οίνο, μειώνοντας τη δυνατότητα σχηματισμού οξικού οξέος (Kittelmann et al., 1989). Η υψηλή συγκέντρωση ακεταλδεϋδης οφείλεται στην έλλειψη διαθεσιμότητας οξυγόνου, έχοντας ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μη επιθυμητού τελικού προϊόντος, συγκεκριμένα οξειδωμένο κρασί (G. s. Drysdale & Fleet, 1989).

Τα βακτήρια του οξικού οξέος έχουν την ικανότητα να παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις οξικού οξέος- ορισμένα στελέχη παράγουν περισσότερο από 50g/L και έως 150g/L οξικού οξέος σε μία οξική ζύμωση- καθιστώντας τα απαραίτητα στην βιομηχανία ξυδιού (Du Toit & Pretorius, 2002). Αυτές οι υψηλές συγκεντρώσεις δεν είναι εφικτές σε επίπεδο οινοποίησης λόγω αναερόβιων συνθηκών, ωστόσο η ύπαρξη τους στο κρασί οδηγεί σε αύξηση συγκέντρωσης οξικού οξέος, προκαλώντας αλλοίωση. Επιβλαβείς για την ποιότητα του οίνου κρίνονται συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,7-1,2 g/L ή και χαμηλότερες (G. S. Drysdale & Fleet, 1988). Σε συνθήκες οινοποίησης, διαπιστώθηκε μια μικρή αύξηση στην συγκέντρωση του οξικού οξέος (της τάξεως 10-15 mg/L) από τα βακτήρια *A. aceti* και *A. pasteurianus*, ενώ το *G. oxydans* προκαλεί αύξηση 1,64 g/L. Αυτές οι τιμές συγκέντρωσης δύναται να τροποποιηθούν πλήρως σε αερόβιες συνθήκες, όπου οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 1,28 και 3,75 g/L μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων *A. aceti* και *A. pasteurianus*, με ισχυρότερη την δράση του τελευταίου. Ως συμπέρασμα οι διαφοροποιήσεις των συγκεντρώσεων οφείλονται κατά μεγάλο ποσοστό στην διαθεσιμότητα οξυγόνου (G. S. Drysdale & Fleet, 1989).

Θέμα μελέτης, μέσω έρευνας, αποτέλεσε το πότε τα AAB παράγουν την μεγαλύτερη ποσότητα οξικού οξέος. Συγκεκριμένα στελέχη του γένους *Acetobacter* παρήγαγαν το μεγαλύτερο ποσοστό κατά την διάρκεια τόσο της στατικής όσο και της φάσης θανάτου και όχι κατά την φάση ανάπτυξης. Λόγω αυτής της διαπίστωσης ένα κρασί μπορεί να βελτιωθεί ως προς την αλλοίωση του από τα οξικά βακτήρια, αν αυτά απομακρυνθούν πριν την αυτόλυσή τους που συμβαίνει μετά το θάνατο των κυττάρων

(Kösebalaban & Özilgen, 1992). Συμπερασματικά ένα θερμοανθεκτικό στέλεχος του γένους *Acetobacter* οξειδώνει σταθερά την αιθανόλη σε οξικό οξύ κατά την εκθετική φάση, ενώ η παραγωγή του οξικού οξέος φθάνει στο μέγιστο κατά την διάρκεια της στατικής φάσης. Ακόμη για τη δημιουργία οξικού οξέος μπορεί συμμετέχουν και άλλοι μικροοργανισμοί όπως κάποιες ζύμες ή βακτήρια του γαλακτικού οξέος ενισχύοντας την δράση των AAB (Nanba, 1984).

Μία αντίδραση μη επιθυμητή στην βιομηχανία παραγωγής ξυδιού είναι η οξείδωση του οξικού οξέος σε CO₂ και H₂O, μέσω του κύκλου το Krebs. Αυτή η οξείδωση είναι εφικτή από στελέχη του *Acetobacter*, ενώ στελέχη του γένους *Glucanobacter* δεν διαθέτουν τα απαραίτητα λειτουργικά ένζυμα. Τα βασικά ένζυμα που καταλύουν αυτή την διεργασία ονομάζονται α-κετογλουταρική αφυδρογονάση και το ηλεκτρυλο-CoA. Η ικανότητα του ενός γένους να οξειδώσει το οξικό οξύ ενώ του άλλου όχι, αποτελεί βασική διαφοροποίηση μεταξύ τους.

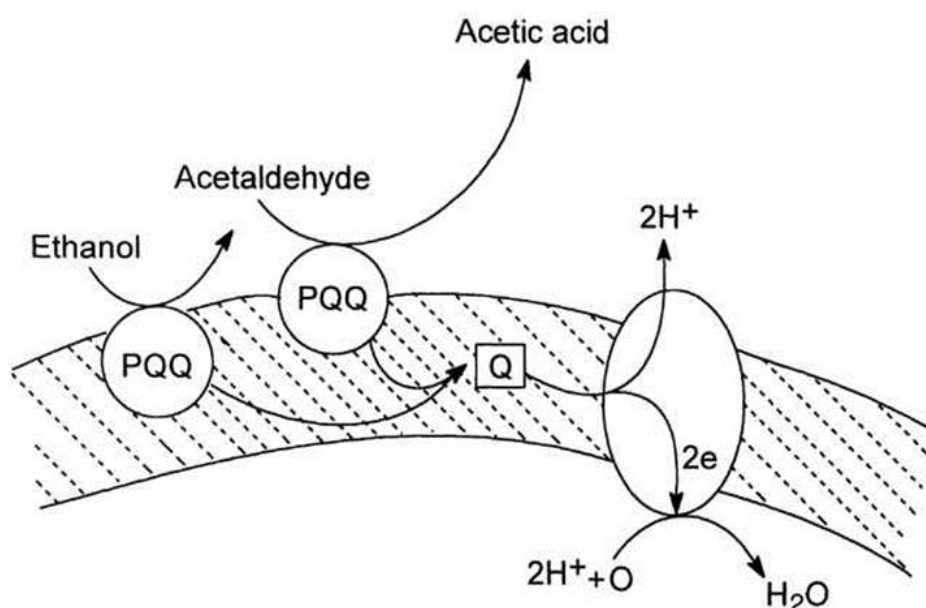
Γενικά η οξείδωση του οξικού οξέος κρίνεται ανεπιθύμητη τόσο σε επίπεδο οινοποίησης όσο και οξοποίησης, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται. Συνεπώς είναι σπάνιο φαινόμενο καθώς τα AAB μεταβολίζουν το οξικό οξύ ως τελευταία επιλογή και μόνο αν δεν υπάρχει διαθεσιμότητα σε αιθανόλη ή γλυκόζη, ως πηγές άνθρακα (Du Toit & Pretorius, 2002).

Μία συνοπτική περιγραφή της βιοχημείας της οξικής ζύμωσης είναι η ακόλουθη, το οξικό οξύ αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη των βακτηρίων του οξικού οξέος (AAB). Παράγεται από τη βιομετατροπή της αιθανόλης μέσω δύο αντιδράσεων, οι οποίες καταλύονται από τα ακόλουθα ένζυμα: αλκοολική αφυδρογονάση (ADH), αλδεϋδο-αφυδρογονάσες (ALDH) και την δεσμευμένη στην μεμβράνη κινωπρωτεϊνική αφυδρογονάση μαζί με τον συμπάράγοντά της, την κινόνη πυρρολοκινολίνης (PQQ). Η ADH οξειδώνει την αιθανόλη σε ακεταλδεϋδη, η οποία στην συνέχεια μετατρέπεται σε οξικό οξύ με την βοήθεια του ενζύμου ALDH, έχοντας ως αποτέλεσμα το οξικό οξύ να απελευθερώνεται στο περιβάλλον (Gullo et al., 2014). Το παραγόμενο οξικό οξύ απελευθερώνεται στο μέσο ανάπτυξης, όπου συσσωρεύεται εκεί με μέγιστο 5-10% στα είδη *Acetobacter* και 10-20% στα είδη *Komagataeibacter* (Andrés-Barrao et al., 2016).

Οι αφυδρογονάσες (ADH και ALDH) είναι αυστηρά συνδεδεμένες με την αναπνευστική αλυσίδα. Εκεί γίνεται η μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω της συμπικινόνης- που είναι συνδεδεμένη στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης- στο οξυγόνο, καθώς αυτό λειτουργεί ως ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων (Gullo et al., 2014). Το κυτοχρώματα και

η τερματική οξειδάση εμπλέκονται επίσης στην οξείδωση της αιθανόλης. Η ουμπικινόλη, η οποία προκύπτει από την ουμπικινόνη, οξειδώνεται από μία τερματική οξειδάση και αυτή η διεργασία συσχετίζεται με το κυτόχρωμα a,b,c ή d ανάλογα με τα είδη του *Acetobacter* (Tamaki et al., 1991).

Το προκύπτον οξικό οξύ, που έχει παραχθεί από μερική οξείδωση της αιθανόλης, μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω στο κυτταρόπλασμα με την βοήθεια ενός συνόλου διαλυτών ενζύμων (ADH και ALDH), τόσο για παραγωγή ενέργειας όσο και για αφομοίωση άνθρακα. Αυτή η διαδικασία γίνεται μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος ή κύκλου του Krebs και ονομάζεται οξείδωση του οξικού οξέος ή γνωστή ως υπεροξείδωση. Συνεπώς κατά τη φάση υπεροξείδωσης (εξαντλημένη αιθανόλη στο περιβάλλον) γίνεται οξείδωση του οξικού οξέος σε CO₂ και H₂O (Matsushita et al., 1994). Ωστόσο αυτή η διαδικασία οδηγεί στην διάκριση μεταξύ των γενών *Acetobacter* και *Gluconobacter*, καθώς το τελευταίο δεν έχει αυτή την ικανότητα (Gullo et al., 2014).



Εικόνα 2.8: Η οξείδωση της αιθανόλης από τα βακτήρια του γένους *Acetobacter* (Wood, 2012)

Το οξικό οξύ αποτελεί το κύριο συστατικό του ξυδιού καθώς επιπλέον αναγνωρίζεται ως αντιμικροβιακή ένωση, η οποία εμποδίζει την ανάπτυξη τόσο παθογόνων όσο και αλλοιογόνων μικροοργανισμών στα ζυμωμένα τρόφιμα. Ωστόσο η ύπαρξη του ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1,2-1,4 g/L) μπορεί να οδηγήσει σε

αλλοιώσεις αλκοολούχων ποτών, όπως το κρασί, έχοντας επιζήμιο δράση (Gullo et al., 2014).

2.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην οξική ζύμωση και οι ιδιότητές τους

Η ταξινόμηση των βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την οξοποίηση είναι πολύπλοκη και παρουσιάζει ακαδημαϊκό ενδιαφέρον. Η διαδικασία της ζύμωσης μπορεί να λειτουργήσει αποτελεσματικά χωρίς αυστηρούς και δαπανηρούς ελέγχους στειρότητας. Αυτό επιβεβαιώνεται καθώς η χρήση καθαρών καλλιεργειών δεν είναι ευρεία, σε βιομηχανικό επίπεδο. Αντιθέτως γίνεται αρκετές φορές χρήση μικτών ή γενικά μη αμιγών καλλιεργειών. Ωστόσο με την πάροδο των χρόνων απομονώθηκε στέλεχος του γένους *Acetobacter* (*Acetobacter mesoxydans*), το οποίο πληροί τις αξιώσεις του Koch, δηλαδή μπορεί να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί στο εργαστήριο σε αμιγή καλλιέργεια. Μέσω της απομόνωσης του συγκεκριμένου στελέχους διαπιστώθηκε ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την διαδικασία ζύμωσης είναι καλύτερα, συγκριτικά με αυτά που προκύπτανε με την χρήση τυχαίας μικροβιακής χλωρίδας, η οποία υπήρχε στο περιβάλλον.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ταχύτερο ρυθμό παραγωγής, ομοιομορφία τελικού προϊόντος και την εξάλειψη ανεπιθύμητων μολύνσεων, γεγονός το οποίο καθίσταται έτσι και αλλιώς δύσκολο λόγω της μεγάλης οξύτητας που επικρατεί στο περιβάλλον της συγκεκριμένης ζύμωσης. Χωρίς να αποκλείεται ωστόσο η πιθανότητα μολύνσεων, προκαλώντας θολερότητα, αλλοιώσεις στα επίπεδα οξύτητας αλλά και γεύσης του τελικού ξυδιού. Συνεπώς το *Acetobacter mesoxydans* έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε πειράματα οξοποίησης για την παραγωγή βύνης, αλκοόλης και ξυδιού.

Για τον χαρακτηρισμό του μικροβιώματος που υπάρχει στους βιομηχανικούς οξοποιητές έγινε ανάλυση μέσω ποικίλου συνόλου πλασμιδίων σε διάφορα στελέχη βακτηρίων του οξικού οξέος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε ένα γρήγορο σύστημα γεννήτριας ξυδιού, το μικροβίωμα είναι αρκετά ετερογενές και δεν λαμβάνονται καθαρά αποτελέσματα, λαμβάνοντας υπόψιν τα προφίλ των πλασμιδίων που συλλέγονται από τη βιομάζα.

Αντίθετα, το μικροβίωμα στους βυθισμένους οξοποιητές παρουσιάζει πανομοιότυπου προφίλ πλασμίδια. Συγκρίνοντας τα προφίλ που ελήφθησαν από απομονωμένες αποικίες και από την ακατέργαστη βιομάζα είναι ταυτόσημα, υποδηλώνοντας ότι το μικροβίωμα σε βυθισμένους οξοποιητές αποτελείται από ένα ή μερικά μόνο στελέχη (Wood, 2012).

Οι μικροοργανισμοί που θεωρούνται κύρια υπεύθυνοι για την διαδικασία παραγωγής ξυδιού ονομάζονται βακτήρια του οξικού οξέος ή οξικά βακτήρια (Acetic Acid Bacteria, AAB). Τα οξικά βακτήρια διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο τόσο στην παραγωγή τροφίμων και ποτών όσο στην βιομηχανική παραγωγή χημικών ενώσεων, χάρη στην δράση τους ως βιοκαταλύτες. Τα τελευταία χρόνια, έχουν σημειωθεί σημαντικές πρόοδοι στην κατανόηση της ταξινόμησης, της μοριακής βιολογίας και της φυσιολογίας τους, καθώς και στις μεθόδους απομόνωσης και ταυτοποίησής τους (Raspor & Goranovič, 2008).

Η αναγνώριση του είδους και ο χαρακτηρισμός των κυρίαρχων στελεχών στη ζύμωση οξικού οξέος είναι επιθυμητά προκειμένου να σταθεροποιηθεί η διαδικασία της ζύμωσης και να βελτιωθεί η δράση των στελεχών. Τα τελευταία χρόνια δύο μέθοδοι που βοηθούν στην ταυτοποίηση, ταξινόμηση και ομαδοποίηση βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των Εντεροβακτηριδίων (*Enterobacteria*), των Οξυγαλακτικών (*LAB*) και των Ακετοβακτηριδίων (*Acetobacter*), είναι η ERIC-PCR μέθοδος (enterobacterial repetitive intergenic consensus) και η μέθοδος RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Nanda et al., 2001).

Με την πάροδο του χρόνου και χάρη στην εξέλιξη της επιστήμης και της προόδου της βιοτεχνολογίας, η ταξινόμηση των AAB έχει αναδιαταχθεί και νέες τεχνικές προσδιορισμού αλληλουχίας του βακτηριακού 16S ριβοσωμικού RNA (r RNA) γονιδίου έχουν έρθει στο προσκήνιο. Η μεταγονιδιωματική αυτή ανάλυση αποτελεί νέο και αποτελεσματικό εργαλείο για την ανάλυση των μικροβιακών πληθυσμών και επιτρέπει τη μελέτη των μικροβιακών πληθυσμών κατευθείαν από το περιβάλλον τους, χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας και απομόνωσης. Συνεπώς προτιμάται η γενετική τεχνική ανάλυσης αλληλουχίας γονιδίου 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA) από ότι οι παραδοσιακές ταυτοποιήσεις βακτηρίων με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, γιατί διαθέτει μεγαλύτερη ακρίβεια αποτελεσμάτων. Ωστόσο η γονοτυπική αυτή μέθοδος διαθέτει υψηλές τεχνικές και οικονομικές απαιτήσεις, περιορίζοντας την ευρεία χρήση της ιδίως σε μικρά κλασσικά μικροβιολογικά εργαστήρια (Clarridge, 2004).

Πρόσφατα, αναγνωρίστηκε ένα παθογόνο βακτήριο οξικού οξέος, που αντιπροσωπεύει το νεότερο και δέκατο γένος του AAB (Raspor & Goranovič, 2008). Κάποια από τα χαρακτηριστικά που ξεχώρισαν το παθογόνο βακτήριο (*Granulibacter bethesdensis*) το οποίο είναι υπεύθυνο για την χρόνια κοκκιωματώδη νόσο είναι τα

ακόλουθα: πολύ αδύναμη παραγωγή οξικού οξέος από αιθανόλη, η ικανότητα χρήσης μεθανόλης ως μοναδική πηγή άνθρακα, η παραγωγή μιας κίτρινης χρωστικής καθώς και η υψηλή βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Τα μοναδικά αυτά φυλογενετικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά οδήγησαν στην ταξινόμηση του βακτηρίου σε ένα ξεχωριστό γένος, με το όνομα *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov. (Greenberg et al., 2006).

2.2.1 Βακτήρια του οξικού οξέος (Acetic Acid Bacteria. AAB)

Τα βακτήρια οξικού οξέος (AAB) είναι μια ομάδα υποχρεωτικά αερόβιων μικροοργανισμών που ανήκουν στην οικογένεια *Acetobacteraceae*. Αυτά διαθέτουν ένα χαρακτηριστικό μεταβολισμό που τα διαφοροποιεί από τα υπόλοιπα βακτήρια, οξειδώνουν την αλκοόλη σε οξικό οξύ. Λόγω της συγκεκριμένης τους ιδιότητας έχει προέλθει και το όνομά τους (Raspor & Goranovič, 2008).

Η ικανότητα τους να οξειδώνουν σάκχαρα, πολυόλες (σακχαρο-αλκοόλες, δηλαδή υδρογονωμένοι υδατάνθρακες) και αλκοόλες στα αντίστοιχα οργανικά οξέα, καθιστά τα AAB μια ειδική ομάδα που χρησιμοποιείται σε εφαρμογές βιοτεχνολογικές και βιοϊατρικής, όπως η παραγωγή οξικού οξέος (ξυδιού), ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C), γλυκονικού οξέος ή βακτηριακής κυτταρίνης (Deppenmeier et al., 2002; Gomes et al., 2018). Στη βιομηχανία τροφίμων τα AAB χρησιμοποιούνται ως κύριοι συμμετέχοντες στην παραγωγή πολλών τροφίμων και ποτών, όπως ξύδι, κακάο, κομπούτσα και άλλα παρόμοια ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση. Ωστόσο, η παρουσία και η δραστηριότητά τους μπορεί εύκολα να οδηγήσει σε αλλοίωση άλλων τροφίμων ή ποτών όπως το κρασί, η μύρα, τα γλυκά ποτά και τα φρούτα (Guillamón & Mas, 2009).

Τα AAB συναντώνται επίσης στο περιβάλλον, συγκεκριμένα φρούτα, καρποί και άνθη αποτελούν μέσα ικανά για την εύρεση οξικών βακτηρίων. Κυρίως αλλοιωμένα φρούτα, τα οποία μπορεί να υποστούν μερική ζύμωση σε αλκοόλες, είναι ένα εξαιρετικό μέσο για τον πολλαπλασιασμό ορισμένων AAB. Αυτό προκύπτει λόγω της ανοχής που έχουν στην αιθανόλη καθώς και στο παραγόμενο οξικό οξύ. Οι δύο παραπάνω ενώσεις είναι εξαιρετικά περιοριστικές για τον πολλαπλασιασμό άλλων μικροοργανισμών.

Σημαντική παράμετρος που βοηθάει στην μεταβολική διαδικασία- δηλαδή στην οξείδωση της αλκοόλης- είναι η διαθεσιμότητα οξυγόνου, καθώς μέσω αερόβιων συνθηκών υπάρχει ανάπτυξη των μικροοργανισμών και αύξηση της δραστηριότητάς

τους. Για τον λόγο αυτό μπορεί να χρειαστεί ειδική προσθήκη οξυγόνου, εάν αυτή η παράμετρος δεν καλύπτεται ήδη στο περιβάλλον της ζύμωσης.

Βέλτιστο pH ανάπτυξης των AAB είναι 5,5-6,3, ωστόσο παρατηρείται ανάπτυξη και σε χαμηλότερες τιμές 3,0-4,0, όπως αυτές του κρασιού (Du Toit & Pretorius, 2002). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για τα AAB είναι μεταξύ των τιμών 25–30°C, ωστόσο ορισμένα στελέχη μπορούν να μεγαλώσουν με αργό ρυθμό μέχρι και τους 10 °C (Guillamon et al., 2003).

Οπότε, τα βακτήρια οξικού οξέος (AAB) ανήκουν στην οικογένεια *Acetobacteraceae*, η οποία περιλαμβάνει πολλά γένη και είδη. Επί του παρόντος, ταξινομούνται στα ακόλουθα δεκαεννέα γένη, που αναγράφονται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Γένη της οικογένειας *Acetobacteraceae*

<i>Acetobacter</i>	<i>Endobacter</i>	<i>Neoasaia</i>
<i>Acidomonas</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Neokomagataea</i>
<i>Ameyamaea</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Nguyenibacter</i>
<i>Asaia</i>	<i>Granulibacter</i>	<i>Saccharibacter</i>
<i>Bombella</i>	<i>Komagataeibacter</i>	<i>Swaminathania</i>
<i>Commensalibacter</i>	<i>Kozakia</i>	<i>Swingsia</i>
<i>Tanticharoenia</i>		

(Trček & Barja, 2015).

Η παραγωγή ξυδιού γίνεται κυρίως από τα γένη *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* και *Komagataeibacter* λόγω της υψηλής ικανότητάς τους να οξειδώνουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ αλλά και της αντοχής τους στο παραγόμενο οξικό οξύ κατά την διαδικασία της ζύμωσης (Andrés-Barrao et al., 2013; Nakano & Fukaya, 2008).

Συγκεκριμένα τα είδη που συναντώνται επί το πλείστον στο ξύδι φαίνονται στο πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Βασικά είδη μικροοργανισμών του ξυδιού

<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Acetobacter pomorum</i>	<i>Komagataeibacter hansenii</i>
<i>Acetobacter cerevisiae</i>	<i>Gluconacetobacter entanii</i>	<i>Komagataeibacter intermedius</i>

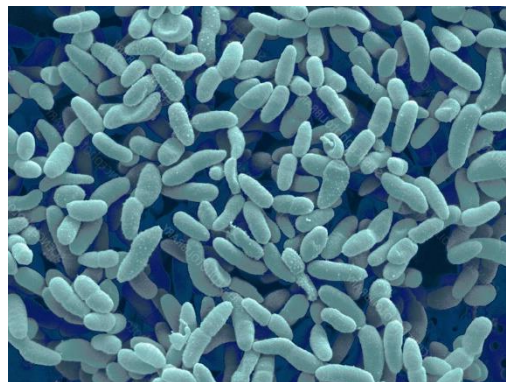
<i>Acetobacter malorum</i>	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	<i>Komagataeibacter medellinensis</i>
<i>Acetobacter oeni</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Komagataeibacter oboediens</i>
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Komagataeibacter europaeus</i>	<i>Komagataeibacter xylinus</i>

(Fernández-Pérez et al., 2010; Yetiman & Kesmen, 2015).

2.2.3 Ταξινόμηση βακτηρίων οξικού οξέος (AAB)

Ιστορικά η αρχική προσπάθεια ταξινόμησης των AAB έγινε από τον Hansen το 1894, με τον Beijerinck, το 1898, να θεωρείται ο πρώτος που καθιέρωσε το όνομα του γένους *Acetobacter* (Gomes et al., 2018). Το 1900 απομονώθηκαν από το ξύδι τρία βακτηριακά είδη, τα *Bacterium aceti*, *B. pasteurianum* και *B. kutzningianum*. Το 1925, ο Visser't Hooft ήταν ο πρώτος επιστήμονας που εξέτασε τα βιοχημικά χαρακτηριστικά στην ταξινόμηση του AAB (De Ley, 1958). Το 1935 το γένος *Acetobacter* χωρίστηκε σε δύο νέα γένη, το πρώτο διατήρησε το όνομα *Acetobacter* και στο άλλο δόθηκε το όνομα *Gluconobacter*. Ο Frateur, το 1950, πρότεινε ένα σχέδιο για την ταξινόμηση του *Acetobacter* το οποίο βασιζόταν σε πέντε βιοχημικά κριτήρια: (i) την παρουσία καταλάσης, (ii) την οξείδωση και υπεροξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ και σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό, αντίστοιχα, (iii) οξείδωση γαλακτικού οξέος σε ανθρακικό, (iv) οξείδωση γλυκερόλης σε διυδροξυακετόνη και (v) παραγωγή οξέος από d-γλυκόζη (Gomes et al., 2018).

Το γένος *Acetobacter* διαθέτει περίτριχα μαστίγια και την ικανότητα οξείδωσης οξικών και γαλακτικών σε CO₂ και H₂O. Αυτό το γένος περιείχε τρία είδη (*A. aceti*, *A. pasteurianus* και *A. peroxydans*) και εννέα υποείδη (Cleenwerck & De Vos, 2008).

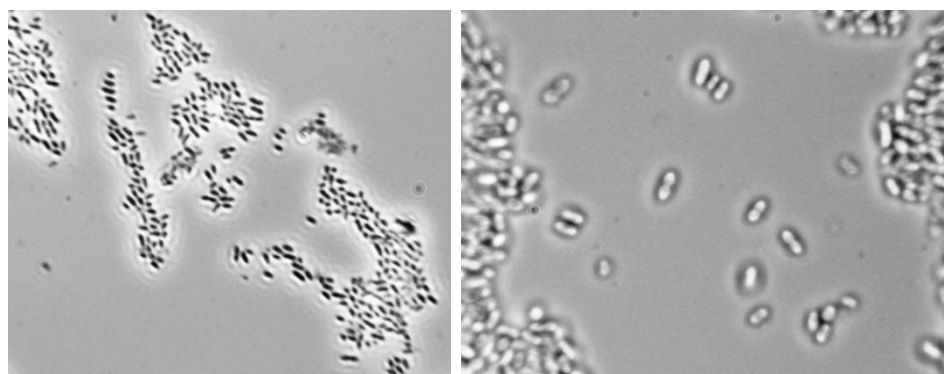


Εικόνα 2.9: *Acetobacter aceti* (LIBRARY, n.d.)

Ουσιαστικά τα βακτήρια του γένους *Acetobacter* αναπτύσσονται καλά σε υποστρώματα με γαλακτικό οξύ, τα οποία πολλές φορές διαθέτουν ως μοναδική πηγή αζώτου άλατα αμμωνίου και είναι σχετικά φτωχά σε γλυκόζη. Εξαιρεση συνιστά ένα είδος του γένους *Acetobacter*, το οποίο απαιτεί για την ανάπτυξη του επιπρόσθετους εξωγενείς παράγοντες (Wood, 2012).

Το γένος *Gluconobacter* ταξινομήθηκε με βάση την παρουσία/απουσία πολικών μαστιγίων, την αδυναμία οξείδωσης οξικού και γαλακτικού και την ικανότητα οξείδωσης της d-γλυκόζης σε γλυκονικό και στη συνέχεια περαιτέρω οξείδωσης του γλυκονικού σε 2-κετογλουκονικό και 5-κετογλουκονικό. Θεωρούνται διατροφικά εκλεκτικά καθώς αναπτύσσονται καλά σε υποστρώματα με γλυκόζη και ορισμένες πολυόλες, αλλά εμφανίζουν αδυναμία ανάπτυξης σε υποστρώματα που περιέχουν αιθανόλη, όπως η μύρα και το σάκε. Η εκλεκτικότητά τους βασίζεται ακόμη στην ανάγκη τους για προσχηματισμένα αμινοξέα καθώς και συγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες όπως νιασίνη (νικοτινικό οξύ), βιταμίνη B5 (πανθοθενικό οξύ) και μερικές φορές 4-Αμινοβενζοϊκό οξύ (Wood, 2012). Αυτό το γένος περιέχει ένα μόνο είδος (*G. oxydans*) με τέσσερα υποείδη (Cleenwerck & De Vos, 2008).

Επιπλέον, όλα τα είδη *Gluconobacter* που εξετάστηκαν από τους Yamada et al. (*Distribution of Ubiquinone 10 and 9 in Acetic Acid Bacteria and Its Relation to the Classification of Genera*, n.d.; Yamada et al., 1969) διαθέτουν το σύστημα συνενζύμου Q10 (ουμπικινόνη). Ωστόσο, αυτά των ειδών *Acetobacter* είχαν το σύστημα Q9 (παρατηρήθηκε συγκεκριμένα στα στελέχη *A. xylinus*) (Yamada & Kondo, 1984).



Εικόνα 2.10: *Gluconobacter oxydans* (Hakim, 2018)

Πίνακας 2.3: Διαφορές στα γένη *Acetobacter* και *Gluconobacter*

	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
Τύπος μαστιγίων	Περίτριχα	Πολικά
Οξείδωση οξικού οξέος σε CO ₂ και H ₂ O	+	-
Οξείδωση γαλακτικού οξέος σε CO ₂ και H ₂ O	+	-

Με το πέρασμα των χρόνων και την προσθήκη νέων ειδών στα ανωτέρω γένη συνέβησαν ορισμένες τροποποιήσεις και στην ταξινόμησή τους. Οι προσαρμογές αυτές βασίστηκαν σε χαρακτηριστικά φυσιολογίας και χωρίστηκαν φυλογενετικά σε δύο κατηγορίες. Για το γένος *Acetobacter* οι δύο ομάδες ήταν η *A. aceti* και η *A. pasteurianus*, ενώ για το γένος *Gluconobacter* έγινε η κατάταξη στις ομάδες *G. oxydans* και *G. cerinus* (Gomes et al., 2018).

Πίνακας 2.4: Τα κύρια είδη των γενών *Acetobacter* και *Gluconobacter*

<i>A. aceti</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. cerinus</i>
<i>A. aceti</i>	<i>A. lovaniensis</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. cerinus</i>
<i>A. cerevisiae</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>G. albidus</i>	<i>G. frateurii</i>
<i>A. cebinongensis</i>	<i>A. peroxydans</i>		<i>G. thailandicus</i>
<i>A. estunensis</i>	<i>A. pomorum</i>		
<i>A. indonesiensis</i>	<i>A. syzygii</i>		
<i>A. malorum</i>			
<i>A. nitrogenifigens</i>			
<i>A. oeni</i>			
<i>A. orientalis</i>			
<i>A. orleanensis</i>			
<i>A. tropicalis</i>			

Η ομάδα *A. aceti* φαινοτυπικά διακρίθηκε από την ομάδα *A. pasteurianus* λόγω της παραγωγής 2-κετογλουκονικού (εκτός από το *A. oeni*) και 5-κετογλουκονικού καθώς και της παραγωγής διυδροξυακετόνης από γλυκερίνη, η οποία ανιχνεύθηκε σε

τρία είδη (*A. aceti*, *A. pomorum* και *A. nitrogenifigens*). Ο φαινοτυπικός διαχωρισμός στο γένος *Gluconobacter* βασίστηκε κυρίως στα χαρακτηριστικά που διαθέτουν τα μέσα ανάπτυξης, που περιέχουν d-αραβιτόλη χωρίς προσθήκη νικοτινικού οξέος (νιασίνης), καθώς και από τη σύνθεση βάσης DNA, δηλαδή την περιεκτικότητα σε G+C (Yamada & Yukphan, 2008).

Την τελευταία δεκαετία, το γένος *Gluconacetobacter* υποδιαιρέθηκε σε δύο ομάδες με διαφορετικά μορφολογικά, φυσιολογικά και οικολογικά χαρακτηριστικά. Αυτές οι ομάδες ήταν η ομάδα *G. liquefaciens* (συμπεριλαμβανομένων των *G. azotocaptans*, *G. diazotrophicus*, *G. liquefaciens* και *G. sacchari*) και η ομάδα *G. xylinus* (συμπεριλαμβανομένων των *G. entanii*, *G. europaeus*, *G. hansenii*, *G. intermedius*, *G. nataicola*, *G. oboediens*, *G. rhaeticus*, *G. saccharivorans*, *G. swingisii* και *G. xylinus*).

Στην συνέχεια, λήφθηκαν υπόψιν γενετικές αναλύσεις και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, βάσει των οποίων προέκυψε ένα νέο γένος με την ονομασία *Komagataeibacter*.

Τα δύο γένη, *Gluconacetobacter* και *Komagataeibacter*, διαφοροποιήθηκαν μεταξύ τους εξαιτίας της παραγωγής μιας υδατοδιαλυτής καφέ χρωστικής και της κινητικότητας των κυττάρων. Τα είδη *Gluconacetobacter* γενικά παράγουν την υδατοδιαλυτή καφέ χρωστική ουσία και έχουν κινητικότητα, ενώ τα είδη *Komagataeibacter* δεν παράγουν τη χρωστική ουσία και είναι μη κινητικά. Επιπλέον, τα είδη του πρώτου γένους συνδέονται με φυτά και απομονώθηκαν κυρίως από φρούτα, άνθη, καφέ και ζαχαροκάλαμο. Αντίθετα, τα είδη του τελευταίου γένους απομονώθηκαν κυρίως από τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως ξύδι, κομπούτσα και χυμό φρούτων (Yamada et al., 2012).

2.2.4 Χαρακτηριστικά βακτηρίων οξικού οξέος

Βασικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων οξικού οξέος είναι τα ακόλουθα:

- υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί
- Gram- αρνητικοί (ωστόσο σε μερικά είδη είναι μεταβλητό)
- θετικοί στην δοκιμή καταλάσης
- αρνητικοί στην δοκιμή οξειδάσης
- κύτταρα ελλειψοειδούς ή ραβδοειδούς σχήματος
- μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μορφή αλυσίδας κύτταρα
- μεσόφιλοι μικροοργανισμοί, με ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης 25-30 °C

- άριστο pH ανάπτυξης 5,0 – 6,5 , ωστόσο έχουν την δυνατότητα ανάπτυξης και σε χαμηλότερες τιμές pH (Sengun & Karabiyikli, 2011; Wang et al., 2015).

Σημαντικοί παράμετροι που επηρεάζουν σε ποια γένη και είδη AAB οφείλεται η οξοποίηση συνιστούν οι πρώτες ύλες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ξυδιού, αλλά και η συγκέντρωση σε οξικό οξύ κατά την διάρκεια της οξοποίησης (Song et al., 2016). Τα είδη του γένους *Acetobacter* είναι κυρίως υπεύθυνα για την παραδοσιακή επιφανειακή διαδικασία παραγωγής ξυδιού και συναντώνται συνήθως στα πρώτα της στάδια, όπου η συγκέντρωση του οξικού οξέος βρίσκεται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα και σίγουρα δεν υπερβαίνει το 8% (Andrés-Barrao et al., 2016). Ωστόσο στην βυθιζόμενη διαδικασία οξικής ζύμωσης και κατά την πορεία της οξοποίησης όπου η αναλογία μάζας προς όγκο οξικούς οξέος υπερβαίνει το 5%, κυριαρχούν τα είδη του γένους *Komagataeibacter* (Mas et al., 2014). Κατά την αυθόρμητη παραγωγή ξυδιού με οξύτητα άνω του 6%, τα *K. europaeus*, *K. intermedius* και *K. oboediens* είναι τα κυρίως αναφερόμενα, καθώς θεωρούνται ιδιαίτερα οξυάντοχα (Andrés-Barrao et al., 2011).

Τα κύρια χαρακτηριστικά για τα γένη των AAB, όσον αφορά την διαδικασία παραγωγής ξυδιού παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.11. Τα βασικά συμπεράσματα που λαμβάνονται είναι η μεγαλύτερη αντοχή υπό όξινες συνθήκες για το γένος *Acetobacter* από ότι το γένος *Gluconobacter*, του οποίου η ADH είναι λιγότερη σταθερή σε αυτές τις συνθήκες. Γι' αυτό κιόλας το πρώτο έχει μεγαλύτερη εφαρμογή στην οξοποίηση. Ακόμη παρουσιάζονται διαφοροποιήσεις στην ικανότητα οξειδωσης αιθανόλης, σακχάρων και αλκοολών, με ισχυρή την οξειδωτική δράση του γένους *Gluconobacter* στα σάκχαρα, ιδίως του γλουκονικού οξέος (Adachi, Tayama, et al., 1978). Σε αντίθεση με τα είδη των γενών *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* και *Komagataeibacter*, που διαθέτουν ένα ισχυρό σύστημα για την οξείδωση της αιθανόλης, αλλά μόνο μια ελαφρά οξειδωτική δράση στα σάκχαρα (Adachi, Miyagawa, et al., 1978).

Table 1. Differential characteristics of the genera *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Komagataeibacter*

Characteristic	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Komagataeibacter</i>
Motility and flagellation	peritrichous or non-motile	polar or non-motile	peritrichous or non-motile	no
Oxidation of ethanol to acetic acid	+	+	+	+
Oxidation of acetic acid to CO ₂ and H ₂ O	+	-	+	+
Oxidation of lactate to CO ₂ and H ₂ O	+	-	+	+
Growth on 0.35 % acetic-acid-containing medium	+	+	+	+
Growth in the presence of 30 % D-glucose	-	+ or -	+ or -	n.d.
Production of cellulose	-	-	+ or -	+ or -
Ketogenesis (dihydroxyacetone) from glycerol	+ or -	+	+ or -	+ or -
Acid production from:				
Glycerol	+ or -	+	+	n.d.
D-Mannitol	+ or -	+	+ or -	-
Raffinose	-	-	-	n.d.
Production of water-soluble brown pigment	-	variable	variable	-
Production from D-glucose of:				
2-keto-D-gluconic acid	+ or -	+	+ or -	+ or -
5-keto-D-gluconic acid	+ or -	+ or -	+ or -	+ or -
2,5-keto-D-gluconic acid	+ or -	+ or -	+ or -	-
Ubiquinone type	Q9	Q10	Q10	Q10

Data shown are combined from various sources (28,31,47,48). +=90 % or more of the strains positive, -=90 % or more of the strains negative; n.d.=not determined

Εικόνα 2.11: Βασικά χαρακτηριστικά και διαφοροποιήσεις (Gomes et al., 2018)

2.3 Θρεπτικά υποστρώματα οξικής ζύμωσης

Γενικά τα βακτήρια του οξικού οξέος μπορούν να χαρακτηριστούν ως «βιώσιμα αλλά όχι καλλιεργήσιμα» (viable but nonculturable, VBNC). Έχουν υψηλές απαιτήσεις, με αναγκαία την χρήση συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών, γεγονός που τα καθιστά δύσκολα στην απομόνωση, απαρίθμηση και ανάπτυξη τους σε τεχνικά μέσα, με την διαδικασία καλλιέργειας, ειδικά όταν η προέλευση τους είναι από προϊόντα-ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση (Sengun & Karabiyikli, 2011; Vegas et al., 2010).

Με βάση την Εικόνα 2.12 φαίνεται πληθώρα μέσων ανάπτυξης για την απομόνωση και καλλιέργεια στελεχών των AAB, ωστόσο το καθένα από τα παρακάτω είναι εκλεκτικό σε συγκεκριμένα στελέχη και δεν υποστηρίζεται οικουμενική ανάπτυξη των βακτηρίων με ένα μόνο μέσο (Bartowsky & Henschke, 2008; Sengun & Karabiyikli, 2011).

Table 2. Main media for culture, recovery, growth and genus differentiation of acetic acid bacteria

Medium	γ/(g/L) or *φ/(mL/L)
AE (acetic acid-ethanol)	Glucose 5, yeast extract 3, peptone 4, acetic acid 30*, ethanol 30*, agar 9
BME (basal medium plus ethanol)	Yeast extract 0.5, vitamin-free casamino acids 3, ethanol 3*, agar 15
Carr	Yeast extract 30, ethanol 20*, bromocresol green 0.022, agar 20
Medium for chalk-ethanol test	Glucose 0.5, yeast extract 5, peptone 3, calcium carbonate 15, ethanol 15*, agar 12
DSM (dextrose-sorbitol-mannitol)	Glucose 1, sorbitol 1, mannitol 2, yeast extract 3.3, proteose-peptone 10, calcium lactate 15, KH_2PO_4 1, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02, cycloheximide 0.004, bromocresol purple 0.03, brilliant green 0.0295, agar 15
GY (glucose-yeast extract)	Glucose 50, yeast extract 10, agar 15
GYAE (glucose-yeast extract-acetic acid-ethanol)	Glucose 50, yeast extract 10, acetic acid 10*, ethanol 20*, agar 15
GYC (glucose-yeast extract- CaCO_3)	Glucose 100, yeast extract 10, calcium carbonate 20, agar 15
GYEC (glucose-yeast extract-ethanol- CaCO_3)	Glucose 10, yeast extract 10, calcium carbonate 20, ethanol 30*, agar 10
GYP (glucose-yeast extract-peptone)	Glucose 30, yeast extract 5, peptone 2, agar 15
HS (Hestrin-Schramm)	Glucose 20, yeast extract 5, peptone 5, Na_2HPO_4 2.7, citric acid 1.15
MYA (malt extract-yeast extract-agar)	Malt extract 15, yeast extract 5, ethanol 60*, agar 15
MYP (mannitol-yeast extract-peptone)	Mannitol 25, yeast extract 5, peptone 3, agar 12
RAE (reinforced AE)	Glucose 40, yeast extract 10, peptone 10, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.38, citric acid 1.5, acetic acid 10*, ethanol 20*, agar 10
SYP (sorbitol-yeast extract-peptone)	Sorbitol 50, yeast extract 5, peptone 3, agar 12
YG (yeast extract-glucose)	Glucose 20, yeast extract 5, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.26, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05
YGM (yeast extract-glucose-mannitol)	Glucose 20, mannitol 20, yeast extract 10, acetic acid 5*, ethanol 20*
YPE (yeast extract-peptone-ethanol)	Yeast extract 10, peptone 5, ethanol 20*, agar 15

Εικόνα 2.12: Κύρια μέσα ανάπτυξης βακτηρίων οξικού οξέος (Gomes et al., 2018)

Τα θρεπτικά μέσα, εξαιτίας των οποίων γίνεται η απομόνωση και ο καθαρισμός των στελεχών AAB από βιομηχανικού επιπέδου ξύδια, οφείλουν να καλύπτουν τις διατροφικές ανάγκες των μικροοργανισμών αυτών. Αυτά τα μέσα χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα κυρίως d-γλυκόζη και d-μαννιτόλη, και σε ορισμένες περιπτώσεις κρίνεται αναγκαία η προσθήκη, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλόγως την συνθήκη, της αιθανόλης και του οξικού οξέος. Για την ανάκτηση των μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται ακόμη ως πηγές αζώτου το εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη καθώς και μέταλλα, όπως KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 και MgSO_4 (Gomes et al., 2018). Όσον αφορά την καλλιέργεια των AAB χρησιμοποιείται διπλής στιβάδας άγαρ, με αρχική προσθήκη 0,5% άγαρ και επακόλουθη επίστρωση στρώματος με 1% άγαρ, υπό συνθήκες υψηλής υγρασίας, καθιστώντας ικανό τον σχηματισμό βακτηριακών αποικιών για τα AAB, λόγω των ανωτέρω ευνοϊκών συνθηκών που επικρατούν (Entani et al., 1985).

Στα μέσα αυτά μερικές φορές γίνεται προσθήκη ορισμένων αναστολέων, εκλεκτικών ως προς την Gram-θετική μικροχλωρίδα. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι το λαμπερό πράσινο (χρωστική τριαρυλομεθανίου- brilliant green) έχει την χαμηλότερη ανασταλτική δράση για το AAB, το δεοξυχολικό νάτριο μείωσε την ανάπτυξη όλων των ειδών *Acetobacter* που δοκιμάστηκαν, ενώ ο ιώδης κρύσταλλος

(violet crystal) ανέστειλε εντελώς την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *A. aceti* που βρίσκεται υπό μελέτη (Cirigliano, 1982).

Για την ορθή παραγωγή ξυδιού είναι επιθυμητές καλλιέργειες οι οποίες με την πάροδο του χρόνου συντηρούνται και παραμένουν καθαρές. Γι' αυτό για την απομόνωση και την καλλιέργεια του *Acetobacter*, επιλέγεται ως μέσο ένα ημιστερεό, διπλής στιβάδας άγαρ οξυάντοχο και κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη του οξικού οξέος. Στην συνέχεια το μέσο αυτό μεταβάλλεται σε μονής στιβάδας, που περιέχει 0,9% (w/v) άγαρ, 0,75% (w/v) γλυκόζη, 0,3% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 0,3% (w/v) πεπτόνη, 3% (v/v) αιθανόλη και 3% (w/v) οξικό οξύ (Sievers et al., 1995).

2.3.1 DMS agar

Το DSM agar (dextrose sorbitol mannitol) βασίζει την λειτουργία του στην ικανότητα οξειδωσης του γαλακτικού οξέος σε CO₂ και H₂O, από τα γένη *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* και *Komagataeibacter*, σε αντίθεση με το γένος *Gluconobacter* που δεν διαθέτει αυτή την ικανότητα. Αυτό το εκλεκτικό μέσο περιέχει ως κύρια πηγή άνθρακα το γαλακτικό ασβέστιο και σε μικρότερα ποσοστά ποσότητες άλλων πηγών, στηριζόμενη στην προνομιακή θέση της πηγής άνθρακα συγκριτικά με τις υπόλοιπες.

Συνεπώς, όταν το *Acetobacter* αναπτύσσεται σε άγαρ DSM, το μέσο μεταβάλλεται από κίτρινο σε μωβ, εξαιτίας της χρήσης γαλακτικού, προκαλώντας άνοδο του pH, η οποία ανιχνεύεται από τον μωβ δείκτη βρωμοκρεσόλης. Ωστόσο, το *Gluconobacter*, επειδή δεν μπορεί να οξειδώσει το γαλακτικό, προτιμά να οξειδώνει τα δευτερεύοντα συστατικά υδατανθράκων, παράγοντας οξύ και διατηρώντας την κίτρινη εμφάνιση του μέσου (Cirigliano, 1982; Gomes et al., 2018).

2.3.2 Carr agar

Το Carr agar περιέχει ως πηγή άνθρακα αιθανόλη και ως δείκτη pH το πράσινο της βρωμοκρεσόλης. Αυτό το θρεπτικό μέσο στηρίζει την λειτουργία του στην διάκριση ανάμεσα στην οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ και στην υπεροξείδωση σε CO₂ και H₂O. Με την οξείδωση της αιθανόλης υπάρχει μεταβολή στο χρώμα του μέσου από πράσινο σε κίτρινο, λόγω της παραγωγής του οξικού οξέος (Gomes et al., 2018). Η ύπαρξη στελεχών που μπορούν να οδηγήσουν σε υπεροξείδωση προκαλεί αρχικά την ίδια αλλαγή χρώματος σε διάστημα 24 ωρών, ωστόσο επανέρχεται το πράσινο χρώμα του μέσου ύστερα από μία εκτεταμένη περίοδο επώασης, περίπου 72 ωρών (Sahoo et al., n.d.).

Σε άλλα στερεά θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία περιέχουν ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3), γίνεται η διάκριση στελεχών που προκαλούν οξείδωση και αυτών που προκαλούν υπεροξείδωση. Η παρουσία οξέων, εξαιτίας της οξείδωσης, οδηγεί στη δημιουργία μιας διαυγούς ζώνης, λόγω της διάλυσης του CaCO_3 που υπάρχει στο μέσο. Ενώ περαιτέρω οξείδωση του οξικού οξέος - υπεροξείδωση - οδηγεί σταδιακά σε καθίζηση CaCO_3 και στην αρχική λευκή γαλακτώδη εμφάνιση του μέσου (Gomes et al., 2018).

2.3.3 ABS agar

Το ABS συνιστά ένα νέο εκλεκτικό για τα βακτήρια του οξικού οξέος μέσο (AAB-selective agar). Αυτό το μέσο αποδείχτηκε ικανό όχι μόνο στην ανάπτυξη τουλάχιστον 16 ειδών AAB αλλά και στην αναστολή ανάπτυξης 21 στελεχών που δεν ανήκουν στα AAB, τονίζοντας την ακρίβεια τους συγκριτικά με άλλα μέσα, όπως το GYC άγαρ (glucose-yeast extract-calcium carbonate). Ακόμη προσφέρει καλύτερη οπτική διαφοροποίηση και οδηγεί σε επιλεκτική απομόνωση. Στα περισσότερα δείγματα τροφίμων, το AAB συνήθως συνυπάρχει με άλλους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια γαλακτικού οξέος, *Bacillus spp.*, ζυμομύκητες και άλλα (Soni & Dey, 2014). Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ανεπιθύμητων ή ανταγωνιστικών μικροοργανισμών είναι αναγκαία και αυτό επιτυγχάνεται μέσω του εκλεκτικού υποστρώματος. Το συγκεκριμένο μέσο, ABS agar, μπορεί να απομονώσει και να απαριθμήσει τα AAB επιλεκτικά.

Η σύσταση του υποστρώματος είναι η εξής: 50g d-(+) γλυκόζη, 10g εκχύλισμα ζύμης, 20mg δείκτη μπλε της βρωμοφαινόλης και 20g βακτηριολογικού άγαρ. Όλα τα προαναφερόμενα διαλύονται σε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό και αποστειρώνονται στον αυτόκλειστο στους 121°C για 15 λεπτά. Ύστερα από ψύξη του μέσου σε υδατόλουτρο στους 50°C , γίνεται προσθήκη 1ml άνυδρου οξικού οξέος, 50ml καθαρής αιθανόλης και 5.000 U πενικιλίνης, τα οποία έχουν πρώτα διαλυθεί σε απεσταγμένο νερό. Μετά από σχολαστική ανάμειξη των ανωτέρω γίνεται διάχυση 20ml του ABS σε τρυβλία Petri. Το pH του ABS σε θερμοκρασία 25°C έχει τιμή $4,8 \pm 0,1$. Δείγματα θετικά στην ύπαρξη AAB εμφανίζουν πράσινες αποικίες με κίτρινο φωτοστέφανο, για το ABS άγαρ (Kim et al., 2019).

ABS agar

Υλικό	Ποσότητα
D - (+) Γλυκόζη	50 g
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	10 g
Δείκτης μπλε της βρωμοφαινόλης	20 mg
Άγαρ	20 g
Άνυδρο οξικό οξύ	1 ml
Καθαρή αιθανόλη	50 ml
Πενικιλίνη	5.000 U

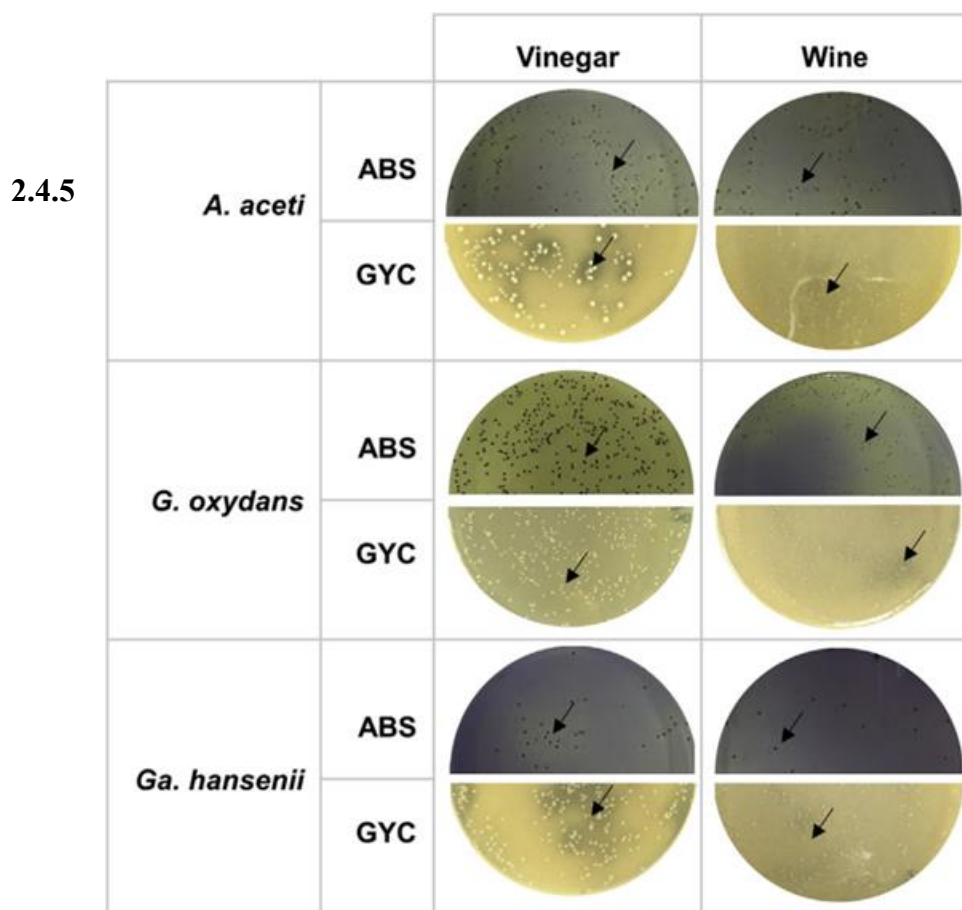
2.3.4 GYC agar

Άλλο ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μέσο ανάπτυξης των AAB είναι το GYC άγαρ (glucose-yeast extract-calcium carbonate). Το συγκεκριμένο αποτελείται από:

GYC agar

Υλικό	Ποσότητα (g/L)
Γλυκόζη	50
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	10
CaCO ₃ (ανθρακικό ασβέστιο)	5
Άγαρ	20

Ομοίως με το ABS άγαρ, γίνεται μετά την αποστείρωση του μέσου διάχυση 20ml σε κάθε τρυβλίο Petri. Πολλές φορές γίνεται προετοιμασία πολλών τρυβλίων, έτοιμα με θρεπτικό υπόστρωμα, τα οποία αντέχουν για 14 ημέρες στους 4°C, δηλαδή σε συνθήκες ψύξης. Δείγματα θετικά στην ύπαρξη AAB, για το GYC άγαρ, εμφανίζονται λευκές αποικίες με διαυγές-καθαρό φωτοστέφανο τριγύρω (Kim et al., 2019).



Εικόνα 2.13: Ανάπτυξη AAB με εκλεκτικά μέσα ABS και GYC άγαρ (Kim et al., 2019)

Παραδείγματα θρεπτικών μέσων

Ορισμένα προτεινόμενα μέσα για τα AAB είναι τα ακόλουθα:

YPM agar

Υλικό	Ποσότητα (%)
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	0,5

Πεπτόνη	0,3
Μαννιτόλη	2,5
Άγαρ	1,5

GYC agar

Υλικό	Ποσότητα (%)
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	1,0
Γλυκόζη	10
CaCO ₃	2,0
Άγαρ	1,5

RAE agar

Υλικό	Ποσότητα (%)
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	1,0
Γλυκόζη	4,0
Πεπτόνη	1,0
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,338
Κιτρικό οξύ × H ₂ O	0,15
Αιθανόλη	1,0
Άγαρ (στην βάση- πάτο του τρυβλίου)	1,0

Άγαρ (στην κορυφή)	2,0
--------------------	-----

ΑΕ μέσο

Υλικό	Ποσότητα (%)
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	0,3
Γλυκόζη	0,5
Πεπτόνη	0,4
Καθαρή αιθανόλη	3,0
Άνυδρο οξικό οξύ	3,0

AG agar

Υλικό	Ποσότητα (%)
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	0,5
Γλυκόζη	0,1
Πεπτόνη	0,5
CaCO ₃	0,7
Γλυκερόλη	0,15
Εκχύλισμα βύνης	0,2
Άγαρ	1,5

Ωστόσο όπως διακρίνεται και από τους παραπάνω πίνακες η σύνθεση είναι παρόμοια, σε διαφορετικές αναλογίες. Τα μέσα αυτά δεν θεωρούνται εκλεκτικά για την

ανάπτυξη βακτηρίων οξικού οξέος, ούτε κατάλληλα για την απομόνωση νέων λειτουργικών στελεχών AAB ή για την ανίχνευση μόλυνσης από τα AAB. Οπότε η χρησιμότητά τους στηρίζεται μόνο στην διατήρηση και αποθήκευση των οξικών βακτηρίων (Kim et al., 2019).

Το DMS agar σύμφωνα με τον Cirigliano (1982), αποτελεί ένα από τα βασικά εκλεκτικά θρεπτικά μέσα για τα AAB, καθώς οδηγεί στην επιλεκτική απομόνωση καθώς και στην διαφοροποίηση μεταξύ των *Gluconobacter spp.* και *Acetobacter spp.* (Cirigliano, 1982)

DSM agar (dextrose sorbitol mannitol)

Υλικό	Ποσότητα (%)
Πεπτόνη πρωτεόζης	1,0
Εκχύλισμα ζύμης	0,3
Γαλακτικό ασβέστιο	1,5
Δεξτρόζη	0,1
d-σορβιτόλη	0,1
d-μαννιτόλη	0,2
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο	0,1
Μονοϋδρικό θεικό μαγγάνιο	0,002
Μωβ της βρωμοκρεσόλης	0.003
Κυκλοεξαμίδιο	0.0004
Δεσοξυχολικό νάτριο	0,01
Λαμπερό πράσινο (brilliant green)	0,00295

Άγαρ

1,5

2.4 Εφαρμογές και προϊόντα οξικής ζύμωσης

Τα AAB βρίσκονται σε ποικίλα τρόφιμα είτε ως εκκινητήριοι μικροοργανισμοί ζύμωσης, παραδείγματος χάρη σε προϊόντα όπως είναι το ξύδι και μερικά ζυμωμένα γαλακτοκομικά, είτε αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε αλκοολούχα ποτά όπως το κρασί και η μπύρα. Ακόμη τα AAB παρουσιάζουν προβιοτικές ιδιότητες, κυρίως αντοχή στην χολή και σε οξέα, δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και αντικαρκινική δράση (Kim et al., 2019).

2.4.1 Ξύδι

Ένα από τα κύρια προϊόντα μεταβολισμού των βακτηρίων του οξικού οξέος είναι το ξύδι, το οποίο αποτελεί το κύριο υπό εξέταση θέμα της συγκεκριμένης πτυχιακής. Το ξύδι συνιστά ένα υδατικό διάλυμα οξικού οξέος και άλλων συστατικών και είναι γνωστό παγκοσμίως για την χρήση του ως σάλτα φαγητού και συντηρητικό τροφίμων (Chen et al., 2013; Wu et al., 2012).

Πριν από περισσότερο από 10 000 χρόνια, αναφέρεται η ανακάλυψη και χρήση του ξιδιού. Οι αρχαίοι πολιτισμοί είχαν γνώση για την ύπαρξη του ξιδιού και το χρησιμοποίησαν στη λαϊκή ιατρική για να θεραπεύσουν τραύματα. Ακόμη χρησιμοποιήθηκε ως μέσο πρόληψης μολύνσεων, καθώς και ως αντισηπτικό για το πλύσιμο των χεριών. Σήμερα, το ξύδι χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή τουρσιών, dressings σαλάτας και άλλων διατροφικών προϊόντων. Επιπλέον, έχει αναγνωριστεί για τις ιδιότητες που αφορούν την λειτουργία του, όπως η αντιβακτηριακή δράση, η μείωση της αρτηριακής πίεσης, η αντιοξειδωτική δράση, η αντιμετώπιση των επιπτώσεων του διαβήτη και η πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (Budak et al., 2014; Marques et al., 2010).

Αυτό το προϊόν είναι αποτέλεσμα ζύμωσης δύο σταδίων. Το πρώτο βήμα είναι μια αναερόβια ζύμωση (αλκοολική ζύμωση σακχάρων σε αιθανόλη από ζυμομύκητες) και το δεύτερο βήμα είναι μια αερόβια ζύμωση (οξειδωση αιθανόλης σε οξικό οξύ από AAB). Οι πρώτες ύλες, που αποτελούνται από άμυλο ή σύνθετους υδατάνθρακες, χρειάζονται επίσης μια διαδικασία για να συμβεί απελευθέρωση απλών και ζυμώσιμων σακχάρων, πριν από την αλκοολική ζύμωση (Andrés-Barrao et al., 2011; Yetiman &

Kesmen, 2015). Η κατανάλωση ξιδιού ολοένα και οξύνθηκε οδηγώντας αναγκαία την εκπόνηση τεχνολογικών διαδικασιών για την απόκτηση του προϊόντος. Επί του παρόντος, υπάρχουν τρεις βασικές μέθοδοι παραγωγής ξυδιού, συγκεκριμένα, αργή ζύμωση επιφανειακής καλλιέργειας (Ορλεάνη ή παραδοσιακή διαδικασία), διαδικασία γεννήτριας (γερμανική διαδικασία) και βυθιζόμενη διαδικασία (Raspor & Goranovič, 2008; Valera et al., 2015).

2.4.2 Κομπούτσα

Η κομπούτσα είναι ένα παραδοσιακό ρόφημα που παρασκευάζεται με ζύμωση ζαχαρούχου τσαγιού. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οξεόφιλοι ζυμομύκητες και οξεοβακτήρια μετατρέπουν την ζάχαρη παράγοντας οργανικά οξέα, CO₂ και αιθανόλη. Η παραγόμενη αιθανόλη αργότερα οξειδώνεται από το AAB σε οξικό οξύ (Diba et al., 2015; Marsh et al., 2014). Στην κομπούτσα, πολλά είδη ζυμών και βακτηρίων αναπτύσσονται, περιλαμβάνοντας για τα AAB τα *A. aceti*, *A. pasteurianus* *G. oxydans* και *K. Xylinus* και πολλά γένη ζυμών όπως *Brettanomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Mycoderma*, *Mycotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Pichia* και *Zygosaccharomyces*. Έχει αναφερθεί ότι η κομπούτσα έχει οφέλη για την υγεία, όπως βελτίωση της γενικής υγείας, αύξηση της μακροζωίας και θεραπεία γαστρεντερικών προβλημάτων, λόγω της όξινης σύνθεσης και της παρουσίας αντιοξειδωτικών φαινολικών ενώσεων (Ayed et al., 2017).

2.4.3 Γλυκονικό οξύ

Το γλυκονικό οξύ συναντάται φυσικά σε φρούτα, φυτά και άλλα τρόφιμα, όπως το κρασί, το ξύδι και το μέλι. Χρησιμοποιείται ως πρόσθετο και συντηρητικό στη βιομηχανία τροφίμων για να βελτιώσει τις γευστικές ιδιότητες και να προσδώσει μια πικρή αλλά αναζωογονητική γεύση. Η παραγωγή γλυκονικού οξέος μπορεί να γίνει με χημικές και βιοτεχνολογικές μεθόδους, με τη βιομηχανική κλίμακα να χρησιμοποιεί κυρίως τη δεύτερη. Η οξείδωση της d-γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ είναι εφικτή από μία μεγάλη ποικιλία βακτηρίων, συνήθως είναι διάφορα γένη AAB αλλά και τα *Pseudomonas* και *Zymomonas* (Cañete-Rodríguez et al., 2016).

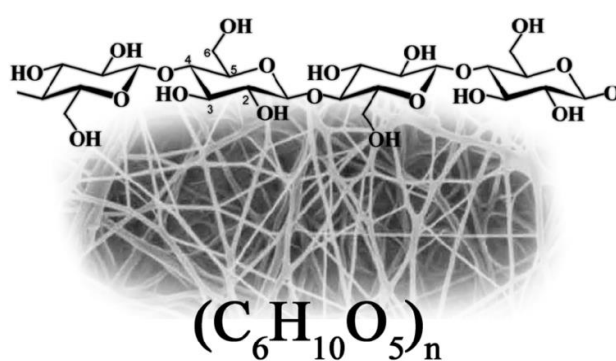
Ένας από τους βασικότερους μικροοργανισμούς είναι το *G. oxydans*, που χρησιμοποιείται για τη βιομηχανική παραγωγή γλυκονικού οξέος, περιέχει δύο αφυδρογονάσες γλυκόζης (GDHs), που καταλύουν την άμεση οξείδωση της d-γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ (Sainz et al., 2016). Το γλυκονικό οξύ έχει προταθεί ως ποιοτική παράμετρος για τα τρόφιμα λόγω του ρόλου του στο αρωματικό προφίλ τους.

Για αυτόν τον λόγο, προτιμάται η χρήση στελεχών AAB που παράγουν ταυτόχρονα γλυκονικό και οξικό οξύ κατά τη ζύμωση (Mounir et al., 2016).

2.4.4 Βακτηριακή κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό ομοπολυμερές μονάδων β-(1→4)-d-γλυκόζης, που περιστρέφεται εναλλάξ κατά 180° (Gibson, 2012). Συντίθεται από πολλούς διαφορετικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, των φυκιών και ορισμένων βακτηρίων, με την βακτηριακή κυτταρίνη να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των μοναδικών της ιδιοτήτων. Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι εξαιρετικά καθαρή, σε αντίθεση με την κυτταρίνη που προέρχεται από φυτά και παρουσιάζει πολλές προσμίξεις. Επιπλέον η βακτηριακή κυτταρίνη εμφανίζει πολλές μοναδικές φυσικοχημικές και μηχανικές ιδιότητες, όπως υψηλή κρυσταλλικότητα, υψηλό βαθμό πολυμερισμού, υψηλή ικανότητα απορρόφησης και συγκράτησης νερού, υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό και υψηλή ελαστικότητα.

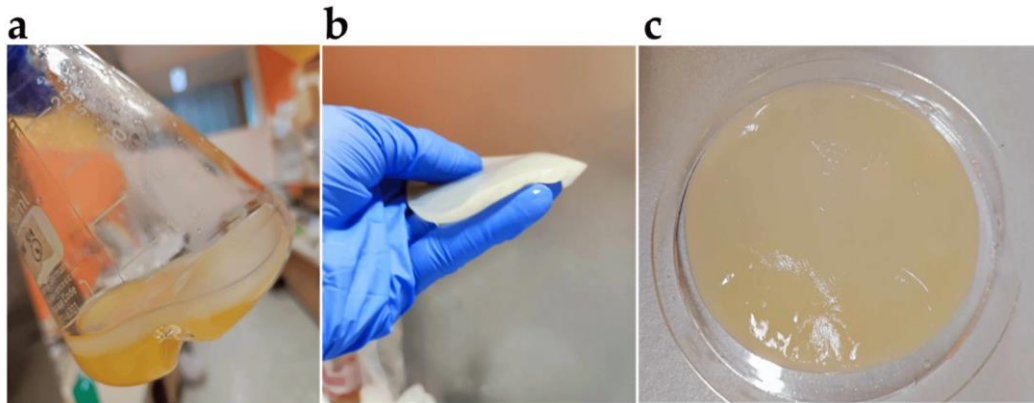
Η βακτηριακή κυτταρίνη χρησιμοποιείται σε πολλούς τομείς, όπως η βιομηχανία τροφίμων (πηκτωματοποιητής, σταθεροποιητικός και πυκνωτικός παράγοντας σε τρόφιμα) και η ιατρική (επούλωση πληγών, προθέσεις καρδιακών βαλβίδων και τεχνητά αιμοφόρα αγγεία) (Mohammadkazemi et al., 2015). Πολλά είδη βακτηρίων παράγουν βακτηριακή κυτταρίνη, αλλά το *K. xylinus* είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο, παράγοντάς την από ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα και αζώτου (Kuo et al., 2016).



Εικόνα 2.14: Χημική δομή βακτηριακής κυτταρίνης (Mensah et al., 2022)

Η βακτηριακή κυτταρίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην παροχή οξυγόνου στα αερόβια βακτήρια και προστατεύει από την υπερϊώδη ακτινοβολία. Επίσης, βοηθά στη διατήρηση της υγρασίας στο περιβάλλον των βακτηρίων (Williams & Cannon, 1989). Η διαδικασία παραγωγής κυτταρίνης από d-γλυκόζη από το *K. xylinus* αποτελείται από

τέσσερα ενζυμικά στάδια, με την δράση συγκεκριμένων ενζύμων (Donini et al., 2010) (Donini et al., 2010; Mamlouk & Gullo, 2013).



Εικόνα 2.14: Βακτηριακή κυτταρίνη (α)λεπτή μεμβράνη σχηματιζόμενη από το *K. xylinus*, μέσω στατικής καλλιέργειας (β) βακτηριακή μεμβράνη ελαστική αλλά πολύ στιβαρή (γ)υψηλή ικανότητα συγκράτησης σε νερό και ιδιότητες που μοιάζουν με υδρογέλη (Potočnik et al., 2023)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Σκοπός πειραματικού μέρους

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η παραγωγή καινοτόμου αλκοολούχου ροφήματος (υδρόμελο) με βάση το χαρουπόμελο, το πετιμέζι ή μίγμα αυτών και η συνέχεια ζύμωσης του με στόχο την παραγωγή ξυδιού. Για να επιτευχθεί αυτό, εφαρμόστηκαν δύο είδη ζυμώσεων, αρχικά η αλκοολική και μετέπειτα η οξική ζύμωση. Δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητα των πηγών σακχάρων ξεχωριστά αλλά και σε συνδυασμό μεταξύ τους σε αναλογία 1:1. Για τον έλεγχο ποιότητας κατά την διάρκεια των δύο ζυμώσεων αλλά και των τελικών προϊόντων που προέκυψαν, πραγματοποιήθηκαν χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

Για την υλοποίηση των αναλύσεων καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων έγινε χρήση μεγάλου αριθμού και ποικίλων υλικών, μηχανημάτων και μεθόδων. Απαραίτητα για την πραγματοποίηση του πειράματος κρίθηκαν τα ακόλουθα:

1. Πετιμέζι, GAEA (100% φυσικό προϊόν)



Εικόνα 3.1: Πετιμέζι, GAEA

Αποτελεί ένα φυσικό, υγιεινό και παραδοσιακό σιρόπι από συμπυκνωμένο χυμό σταφυλιού.

2. Χαρουπόμελο, Γη του Νότου (100% χαρουπόμελο από χαρούπι ολικής άλεσης)



Εικόνα 3.2: Χαρουπόμελο, Γη του Νότου

3. Αφυδατωμένη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, Cross Evolution



Εικόνα 3.3: Αφυδατωμένη ζύμη *S. cerevisiae*, με την μέθοδο YSEO

4. Παλαιωμένα οικιακά κρασιά (τα οποία με το πέρασμα του χρόνου οξειδώθηκαν)



Εικόνα 3.4: Παλαιωμένα οικιακά κρασιά (V1, V2, V3, V4)



Εικόνα 3.5: Ο εμπλουτισμός των V1, V2, V3, V4 στο μη εκλεκτικό θρεπτικό μέσο, BHI

3.2.1 Βάρος

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις βάρους, με την χρήση ζυγού ακριβείας. Αρχικά υπολογίστηκε το απόβαρο των πλαστικών μπουκαλιών 1,5 Lt. Ακολούθησε καταγραφή του βάρους μετά την προσθήκη αεροπαγίδας- που περιέχει αλκοόλη-, η οποία αποτρέπει τις επιμολύνσεις και βοηθάει στην απομάκρυνση του O₂ και τέλος έγιναν μετρήσεις με την προσθήκη του υγρού (Α, Β, Γ) και της ζύμης (*Saccharomyces cerevisiae*). Οι μετρήσεις για το κάθε δείγμα λαμβάνονταν κάθε 15 ημέρες, για τις πρώτο μήνα του πειράματος.

Πίνακας 3.1: Εξοπλισμός για μετρήσεις βάρους

Ζυγός Ακριβείας EW KERN
Πλαστικά μπουκάλια 1,5 λίτρο (lt)
Αεροπαγίδα



Εικόνα 3.6: Μετρήσεις βάρους δειγμάτων Α,Β,Γ (Απρίλιος 2023)

3.2.2 pH

Η μέτρηση του pH κρίθηκε αναγκαία σε πολλά στάδια κατά την πορεία του πειράματος. Λήφθηκαν τιμές pH τόσο για τα δείγματα (Α,Β,Γ), κάθε 15 ημέρες μέχρι την λήξη του πειράματος, όσο και για την εκκινήτρια καλλιέργεια οξικών βακτηρίων («μάννα»).

Πίνακας 3.2: Εξοπλισμός για μετρήσεις pH

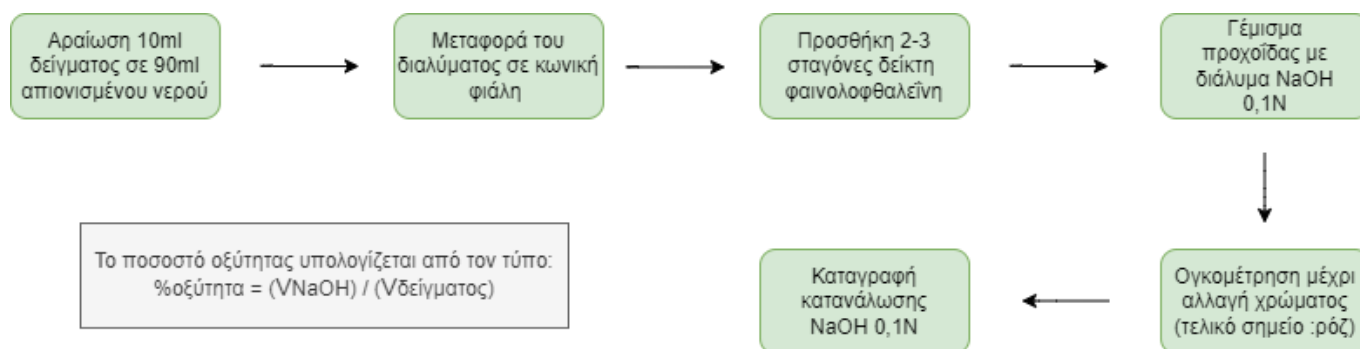
Πεχάμετρο GLP 21, CRISON
Ποτήρι ζέσεως 50ml
Ρυθμιστικά διαλύματα (pH=4 και pH=7)
Απιονισμένο νερό



Εικόνα 3.7: Πεχάμετρο GLP 21, CRISON

Αρχικά γίνεται καλιμπράρισμα του οργάνου (πεχάμετρο GLP 21, Crison) με δύο ρυθμιστικά διαλύματα, αρχικά ένα όξινο με τιμή pH ίση με 4 και μετά με ένα βασικό με τιμή ίση με 7. Όταν το όργανο έχει ρυθμιστεί λαμβάνονται μετρήσεις για το κάθε δείγμα, το οποίο έχει τοποθετηθεί ποσότητά του σε ποτήρι ζέσεως. Ανάμεσα σε κάθε αλλαγή δείγματος απαιτείται έκπλυση του ηλεκτροδίου με απιονισμένο νερό, ώστε να μην επηρεαστούν οι τιμές pH.

3.2.3 Μέτρηση οξύτητας



Σχήμα 3.1: Διάγραμμα ροής μεθόδου μέτρησης οξύτητας

Πίνακας 3.3: Εξοπλισμός για προσδιορισμό οξύτητας

Κωνική φιάλη	Πλαστικά Σιφόνια 5ml
Ογκομετρικός κύλινδρος 100ml	Πρότυπο διάλυμα NaOH 0,1M
Προχοΐδα	Δείκτης φαινολοφθαλεΐνης



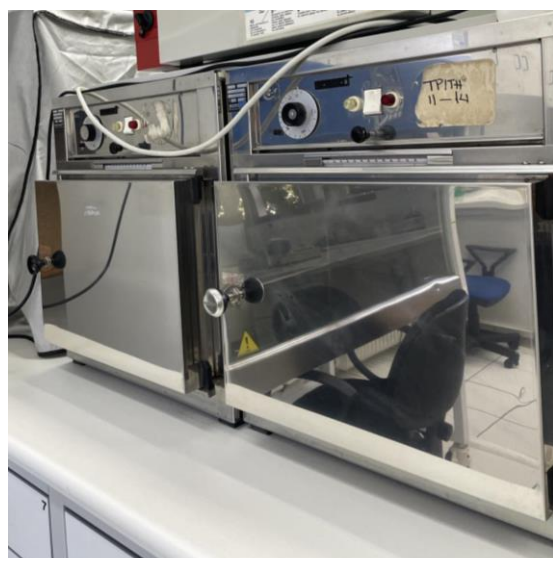
Εικόνα 3.8: Διαδικασία ογκομέτρησης για προσδιορισμό οξύτητας δειγμάτων, έχοντας φτάσει στο τελικό σημείο (ροζ χρώμα)

3.2.4 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Οι μικροοργανισμοί που απασχόλησαν το πείραμα της συγκεκριμένης πτυχιακής είναι κυρίως: *Saccharomyces cerevisiae*, βακτήρια του οξικού οξέος (AAB) και βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB). Ο βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4: Εξοπλισμός μικροβιολογικών αναλύσεων

Θρεπτικά Υποστρώματα	Tips
Τρυβλία Petri	Λύχνος Bunsen
Δοκιμαστικοί Σωλήνες	Vortex
Φούρνος Μικροκυμάτων	Κρίκος ενοφθαλμισμού
Υγρός Αποστειρωτήρας	Σπάτουλα Εξάπλωσης (Spreader)
Υδατόλουτρο (Mettler)	Καθαρή αλκοόλη
Επωαστικός Κλίβανος (Mettler)	Ισοτονικό αποστειρωμένο αραιωτικό διάλυμα
Απαγωγός (Laminar flow cabinet)	Θάλαμος αναεροβίωσης
Πιπέτα	Φάκελοι αναεροβίωσης
Γυάλινες φιάλες-μπουκάλια αποθήκευσης 250ml	Πουαρ
Μετρητής αποικιών (Stuart SC6)	Μεταλλικά και πλαστικά κουτάλια – σπάτουλες

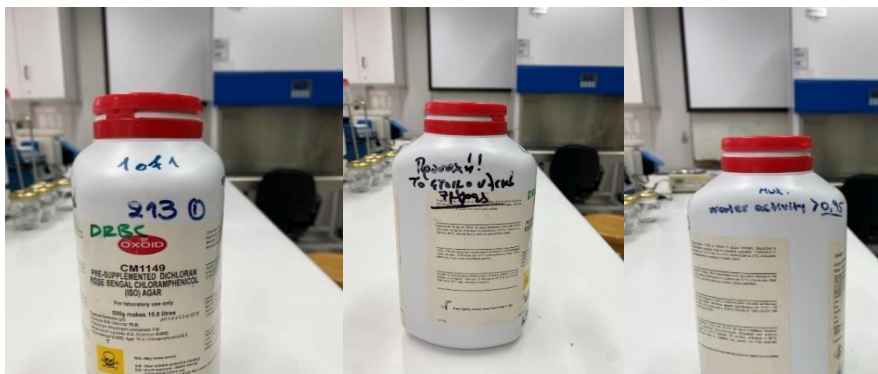


Εικόνα 3.9: Επωαστικοί κλίβανοι (Mettler)

Συγκεκριμένα τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

3.2.4.1 DRBC (Dichloran-rose bengal chloramphenicol) agar

DRBC (Dichloran-rose bengal chloramphenicol) agar, το οποίο συνιστά κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων. Για την παρασκευή του από το έτοιμο μίγμα σκόνης, χρησιμοποιούνται 31,6g, στα οποία προστίθεται ένα λίτρο απιονισμένου νερού. Απαιτείται αποστείρωση του υλικού (121°C για 15').



Εικόνα 3.10: DRBC (Dichloran-rose bengal chloramphenicol) agar

Μικροβιολογικός έλεγχος – καταμέτρηση αποικιών ζυμών και μυκήτων πραγματοποιήθηκε στα δείγματα κάθε 15 ημέρες. Το πείραμα απαιτεί την προετοιμασία του θρεπτικού υποστρώματος. Αφού ζυγιστεί κατάλληλη ποσότητα DRBC Agar σε γυάλινες φιάλες αποθήκευσης και ενυδατωθεί με την ανάλογη ποσότητα απιονισμένου νερού, το μείγμα τοποθετείτε στον φούρνο μικροκυμάτων με σκοπό την ομογενοποίηση του, ή αλλιώς μέχρι να επιτευχθεί ο πρώτος βρασμός. Στη συνέχεια, το μπουκάλι με το υγρό υπόστρωμα μεταφέρεται στον υγρό αποστειρωτήρα όπου και θα υποστεί αποστείρωση σε θερμοκρασία 121°C για 15'. Πριν την ψύξη του υποστρώματος ή πριν το μοίρασμα στα τρυβλία, το διάλυμα θα πρέπει να παραμείνει στο υδατόλουτρο των 45°C έως σταθεροποίησης της θερμοκρασίας, για την αποφυγή δημιουργίας πηγμάτων. Μετά, το υπόστρωμα χωρίζεται στα τρυβλία κάτω από ασυπτικές συνθήκες (στον απαγωγό ή γύρω από λύνχο Bunsen) και αφήνεται σε ηρεμία έως ότου πήξει. Ακολουθούν οι απαιτούμενες αραιώσεις του δείγματος. 1ml από το κάθε δείγμα προστέθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 9ml ισότονικου αποστειρωμένου αραιωτικού διαλύματος, επιτυγχάνοντας έτσι την πρώτη αραιώση (10⁻¹). Έγιναν διαδοχικές, δεκαδικές αραιώσεις με τον ίδιο τρόπο, μέχρι αραιώση -4. Στη συνέχεια έγινε επιφανειακή επίστρωση με το DRBC Agar (0,1ml αραιωμένου

δείγματος μεταφέρεται με πιπέτα σε κάθε τρυβλίο). Χρειάστηκαν δύο τρυβλία για κάθε αραίωση. Κατόπιν, η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 22°C για 5 ημέρες (αερόβιες συνθήκες).

3.2.4.2 GYEC (Glucose-Yeast extract- Ethanol -CaCO₃) agar

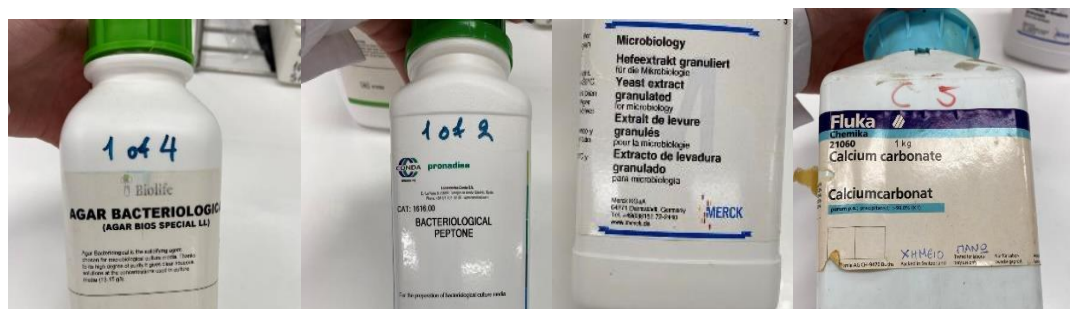
Το Glucose-Yeast extract-Ethanol-CaCO₃ Agar (GYEC), κρίνεται εκλεκτικό για την ανάπτυξη των βακτηρίων του οξικού οξέος. Η ανάπτυξη διακρίνεται καθώς τα AAB καταναλώνουν το ανθρακικό ασβέστιο (CaCO₃) και παράγουν διαυγές ζώνες. Όσον αφορά τον εντοπισμό και την καταμέτρηση των AAB ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία με αυτή των ζυμών – μυκήτων. Διαφορά παρουσιάζεται στο θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, η συνταγή του οποίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.5. Για 500ml θρεπτικού υποστρώματος:

Πίνακας 1.5: Πρωτόκολλο παρασκευής GYEC Agar (Antioxidants | Free Full-Text | Evaluation of Bioactive Compounds and Antioxidative Activity of Fermented Green Tea Produced via One- and Two-Step Fermentation, n.d.)

Γλυκόζη	10g
Εκχύλισμα ζύμης	4g
Ανθρακικό Ασβέστιο	3,5g
*Αιθανόλη	2,5ml
Πεπτόνη	2,5g
Αγάρ	6g

Σημειώνεται, πως η προσθήκη αιθανόλης στο υπόστρωμα γίνεται μετά την αποστείρωση του, έτσι ώστε να αποφευχθεί η εξάτμηση της.

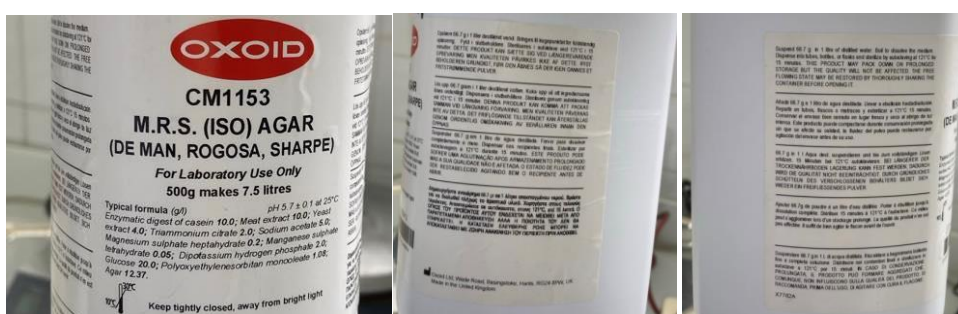
3.2.4.3 MRS (deMan Rogosa Sharpe) agar



Εικόνα 3.11: Συστατικά παρασκευής Calcium Carbonate agar

Για την απομόνωση, απαρίθμηση και καλλιέργεια των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) χρησιμοποιήθηκε το MRS Agar (deMan Rogosa Sharpe). Το συγκεκριμένο

υπόστρωμα παρέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στα LAB. Περιέχει πεπτόνη και δεξτρόζη, οι οποίες παρέχουν άζωτο, άνθρακα και άλλα στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη. Το πολυσορβικό, το οξικό, το μαγνήσιο και το μαγγάνιο αποτελούν αυξητικούς παράγοντες. Επίσης, τα συστατικά αυτά μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών εκτός των γαλακτοβακίλλων (Moraes et al., 2010). Ζυγίζονται 66,7g έτοιμης σκόνης MRS και προστίθενται σε 1lt απιονισμένο νερό, συνεπώς σε 250ml απαιτούνται περίπου 16,68g σκόνης.



Εικόνα 3.12: MRS Agar (deMan Rogosa Sharpe)

Οι αραιώσεις για την ανάλυση γίνονται όπως και για τις παραπάνω αναλύσεις. Η διαφορά, όμως, επάγεται στο ότι τα LAB για την ανάπτυξη τους χρειάζονται αναερόβιες συνθήκες. Συνεπώς, αντί για επιφανειακή επίστρωση, εφαρμόζεται η μέθοδος της ενσωμάτωσης, δηλαδή 1ml του αραιωμένου δείγματος μεταφέρεται με πιπέτα σε άδειο τρυβλίο. Σε αυτό, στη συνέχεια, προστίθενται 15-20ml του υποστρώματος MRS Agar και ανακινείται καλά. Για την κάθε αραιώση (έως -3) αντιστοιχούν δύο τρυβλία. Έπειτα, τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο αναερόβιωσης, μέσα στον οποίο προστέθηκε ένας φάκελος αναερόβιωσης, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών. Όλος ο μηχανισμός μεταφέρθηκε σε επωαστικό κλίβανο των 37°C για 3 ημέρες.

3.2.4.4 BHI (Brain Heart Infusion) broth

Το BHI αποτελεί ένα γενικό- μη εκλεκτικό- υγρό θρεπτικό μέσο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό των παλαιωμένων οικιακών κρασιών (V1, V2, V3, V4). Μία αντλία παροχής οξυγόνου προστέθηκε σε κάθε κωνική φιάλη, που φέρει τα δείγματα και το θρεπτικό μέσο, ευνοώντας τις αερόβιες συνθήκες που απαιτούνται.



Εικόνα 3.13: Κωνικές φιάλες, με V1 και V3 μαζί με BHI broth και διοχέτευση οξυγόνου

3.2.4.5 GYAE (Glucose-Yeast extract-Acetic acid-Ethanol) broth

Ως εκλεκτικό υγρό θρεπτικό μέσο εμπλουτισμού χαρακτηρίζεται το GYAE (Glucose-Yeast extract-Acetic acid-Ethanol) broth, κατάλληλο για την ανάπτυξη βακτηρίων του οξικού οξέος (AAB). Για την παρασκευή 500ml εμπλουτιστικού χρησιμοποιήθηκαν όσα παραθέτονται στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7: Πρωτόκολλο Παρασκευής GYAE (Glucose-Yeast extract-Acetic acid-Ethanol) broth

Υλικό	Ποσότητα
Πεπτόνη (peptone)	7,50g
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	4,00g
Γλυκόζη (glycose)	5,00g
Οξικό οξύ (acetic acid)	1,50g
*Αιθανόλη (ethanol)	2,50g
*Κυκλοεξαμίδιο (cyclohexamide)	0,05g

Αφού ζυγιστούν οι κατάλληλες ποσότητες, προστίθεται το απιονισμένο νερό. Σημειώνεται πως τα δύο τελευταία υλικά, δηλαδή η αιθανόλη και το κυκλοεξαμίδιο, προστίθενται μετά την αποστείρωση του μέσου που απαιτείται (121°C για 15'). Επίσης, όσον αφορά το κυκλοεξαμίδιο, πριν χρησιμοποιηθεί, θα πρέπει να γίνει η ρύθμιση του pH του στο 3. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια HCl, 2M. Ο εμπλουτισμός πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα V1 και V3, στα οποία είχε παρατηρηθεί θολερότητα- ανάπτυξη μικροοργανισμών- στον πρώτο εμπλουτισμό με το BHI broth.



Εικόνα 3.14: Κωνικές φιάλες V1 και V3 με εμπλουτιστικό μέσο, πριν και μετά την επώαση στους 35°C για 3 ημέρες

Παρατηρήθηκε εξάτμιση μεγάλου μέρους της ποσότητας του υγρού που βρισκόταν στην κωνική V1.

Για τις μετρήσεις αλκοόλης, χρώματος, ολικών φαινολών και ολικών στερεών απαιτείται προετοιμασία για την διαύγαση του δείγματος, ώστε να απαλλαχτεί από ίζημα. Η συγκεκριμένη διαδικασία θα αναφερθεί παρακάτω, με κύριο εξοπλισμό όσα αναγράφονται στον Πίνακα 3.8.

Πίνακας 3.8: Εξοπλισμός φυγοκέντρησης και διήθησης

Falcon 50ml	Φυγόκεντρος, mrc Scientific Instruments
Μικροβιοκρατές φίλτρο	Διηθητικό Χαρτί
Αντλία κενού, Chemical Duty Pump, 220 V/50 Hz Millipore	Parafilm (υδατοστεγή μεμβράνη)
Διάλυμα ZnSO ₄ 5%	Διάλυμα Ba(OH) ₂ 0,3N



Εικόνα 3.15: Φυγόκεντρος, mrc Scientific Instruments



Εικόνα 3.16: Αντλία Κενού



Εικόνα 3.17: Διήθηση και καθαρισμός δειγμάτων την 30η ημέρα

3.2.5 Μέτρηση Αλκοόλης

Για τα δείγματα (Α, Α_{ΧΑ}, Β, Γ) λαμβάνονται μετρήσεις για την περιεχόμενη αλκοόλη, ύστερα από την διαύγασή τους, με το όργανο Alcohol and Extract Meter: Alex 500, της Anton Paar. Το συγκεκριμένο όργανο συνδυάζει τη μέτρηση απορρόφησης μέσω φασματοσκοπίας NIR και τη μέτρηση πυκνότητας βασισμένο στην αρχή ταλαντευόμενου σωλήνα U. Το Alex 500 καταγράφει την περιεκτικότητα αλκοόλης (% v/v), την πυκνότητα (g/cm³), το original extract και το real extract (error % w/w). Οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται 3 φορές για κάθε δείγμα, ενώ έχει προηγηθεί καθαρισμός με απιονισμένο νερό και καλιμπράρισμα του οργάνου.



Εικόνα 3.18: Alcohol and Extract Meter, Alex 500 (Anton Paar)

3.2.6 Μέτρηση ολικών στερεών (σακχάρων)

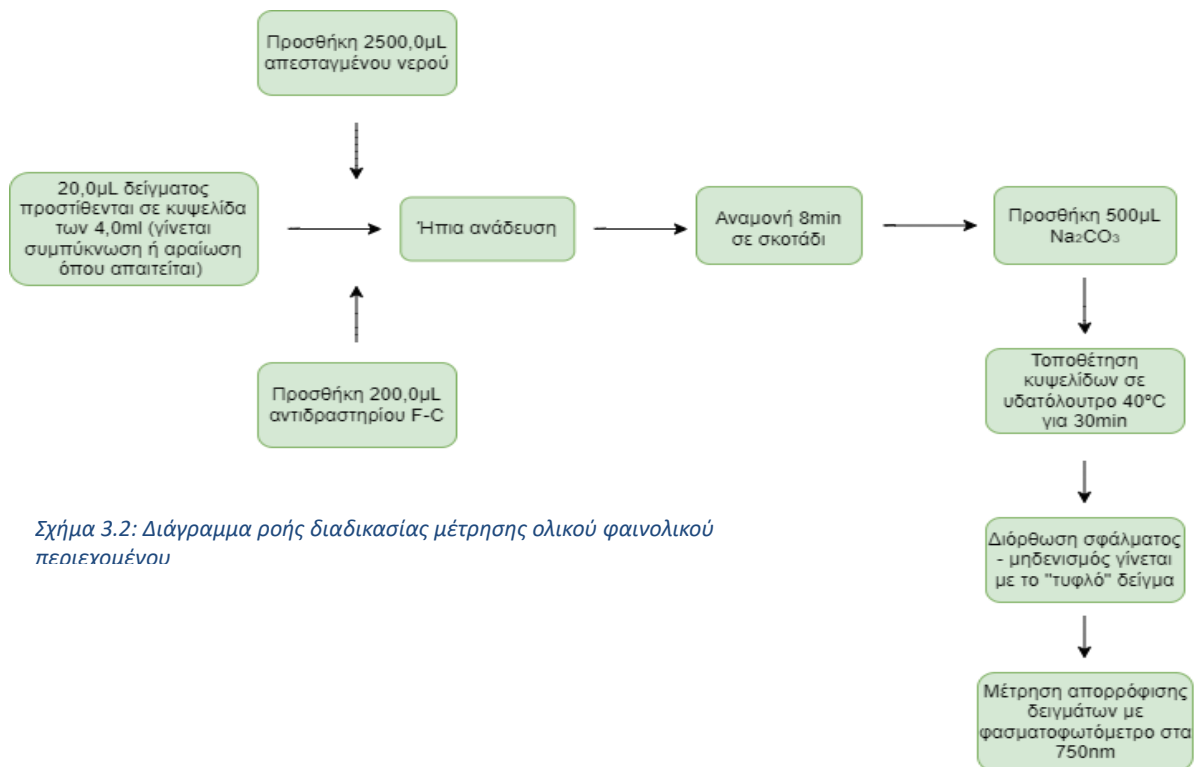


Εικόνα 3.19: Ψηφιακό πυκνόμετρο χειρός Anton paar (Handheld density meter, DMA 35 Basic)

Με το όργανο Handheld density meter, DMA 35, της Anton Paar, λήφθηκαν μετρήσεις για τις παράμετρους: ειδικό βάρος (Specific Gravity, S.G), sugar extract (plato) και Brix (°Brix). Ως ειδική βαρύτητα (S.G) ορίζεται ο λόγος του βάρους ενός διαλύματος προς το βάρος ίσου όγκου νερού. Ακόμη οι τιμές plato εκφράζουν το ποσοστιαίο βάρος των σακχάρων μέσα στο συνολικό βάρος του διαλύματος. Τέλος οι βαθμοί Brix αποτελούν ένα μέτρο των διαλυτών στερεών συστατικών σε ένα υδατικό διάλυμα. Ένας βαθμός Brix αντιστοιχεί σε 1 γραμμάρια σακχαρόζης ανά 100 γραμμάρια διαλύματος. Το ψηφιακό πυκνόμετρο Anton Paar (DMA 35) είναι ένα πυκνόμετρο χειρός που λαμβάνει δείγμα με τη χρήση ενσωματωμένης αντλίας. Αρχικά, έγινε μέτρηση απιονισμένου νερού για την αποφυγή σφάλματος και ύστερα μετρήθηκαν τα δείγματα. Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε 3 φορές.

3.2.7 Μέτρηση ολικών φαινολών

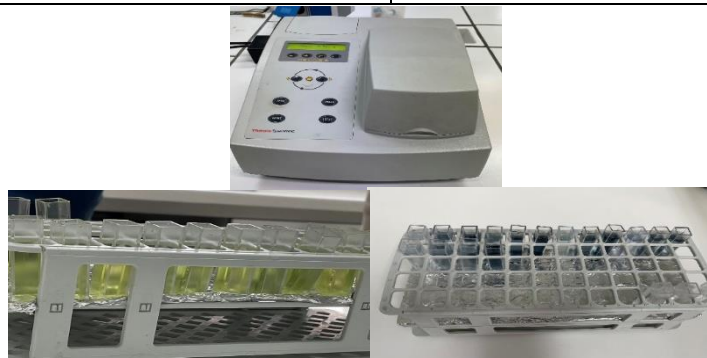
Στα εξεταζόμενα δείγματα γίνονται μετρήσεις ως προς το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο, με την χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Τα βασικά αντιδραστήρια και εξοπλισμός που χρησιμοποιείται παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.9.



Σχήμα 3.2: Διάγραμμα ροής διαδικασίας μέτρησης ολικού φαινολικού περιεχομένου

Πίνακας 3.9: Εξοπλισμός για μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου

Φασματοφωτόμετρο, Thermo Spectronic, Helios epsilon	Μικροσύριγγα 100μl
Πλαστικές κυψελίδες 4ml	Αντιδραστήριο (F-C phenol reagent), Merck KGaA, Germany
Στατό	Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3



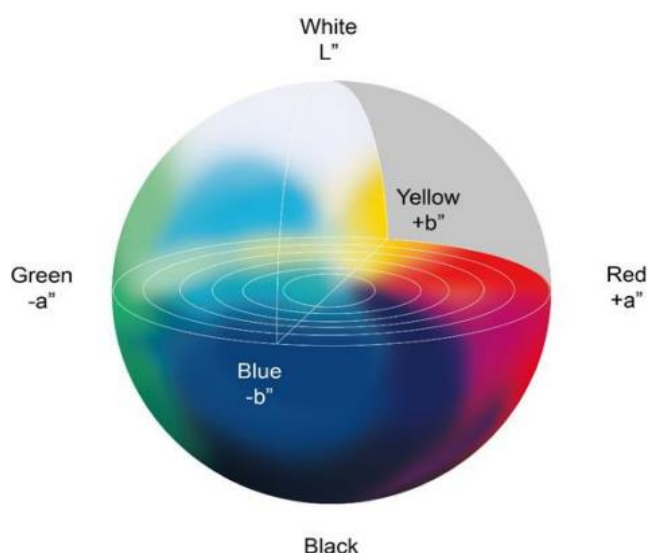
Εικόνα 3.20: (Πάνω) Φασματοφωτόμετρο, Thermo Spectronic, Helios epsilon (Κάτω) Η αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε κυανό, με την μέθοδο

3.2.8 Μέτρηση χρώματος

Η μεταβολή του χρώματος για τα δείγματα (A, A_{χα},B, Γ) κατά την διάρκεια των 60 ημερών είναι ακόμη μία παράμετρος που λήφθηκε υπόψιν και μετρήθηκε. Η μέτρηση χρώματος πραγματοποιήθηκε με το Χρωματόμετρο NR110, της 3nh. Το συγκεκριμένο όργανο φωτίζει το δείγμα από όλες τις γωνίες και μετράει την ένταση του ανακλώμενο φωτός υπό γωνία 8° από την επιφάνεια του δείγματος. Η μέθοδος είναι κατάλληλη για τον ποιοτικό έλεγχο του χρώματος ενός προϊόντος ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του. Παράλληλα, το χρωματόμετρο NR110 έχει ενσωματωμένες τις παραμέτρους του λευκού χρώματος, πράγμα που αποκλείει την ανάγκη για βαθμονόμηση λευκού κάθε φορά που ενεργοποιείται η συσκευή.

Οι μετρήσεις του χρώματος βασίζονται στο σύστημα CIE L*a*b* που εκφράζει το χρώμα με τρεις αριθμητικές τιμές:
-L* (κατακόρυφος άξονας) με τιμές φωτεινότητας 0–100 (μαύρο έως απόλυτο λευκό)
- a* (οριζόντιος άξονας –a*/+a*) αρνητικές τιμές (-a*): πράσινο και θετικές τιμές (+a*): κόκκινο
-b* (οριζόντιος άξονας –b*/+b*) Αρνητικές τιμές (-b*): μπλε και θετικές τιμές (+b*):κίτρινο

Ακόμη το χρωματόμετρο υπολογίζει αυτόματα την παράμετρο c* (χρώμα) και h* (πως και μέσω όλων των ανωτέρω και με την βοήθεια τύπου υπολογίζεται το ΔE*, που αποτελεί την συνολική μεταβολή του χρώματος (Robertson, 1977).



Εικόνα 3.21: Σύστημα CIE (Robertson, 1977)

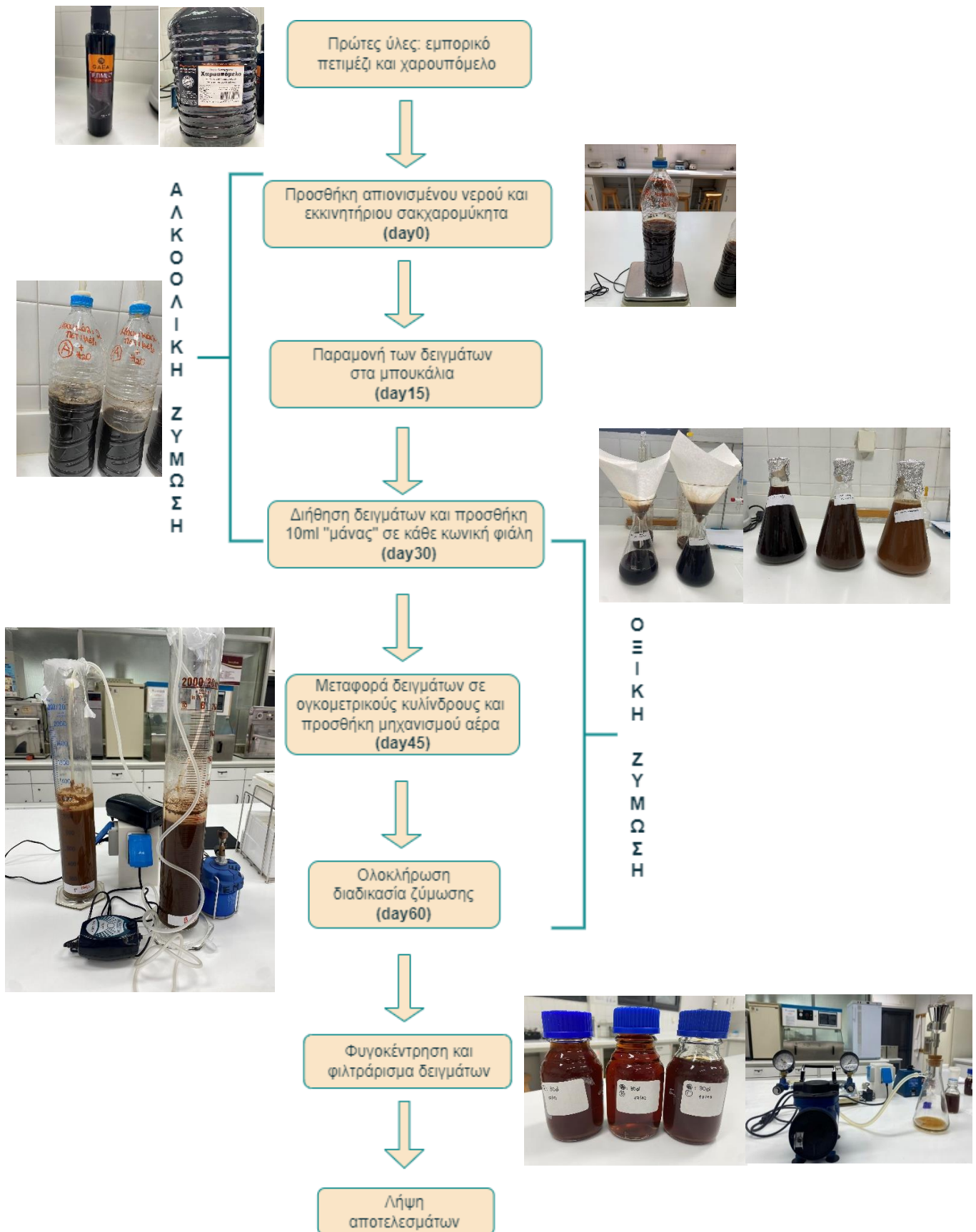
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει την μεταφορά περίπου 20ml από κάθε δείγμα σε ξεχωριστά σε τρυβλία Petri. Κάτω από τα τρυβλία τοποθετήθηκαν

λευκά φύλλα χαρτιών, προκειμένου να διασφαλιστεί η αντικειμενικότητα της μέτρησης. Λήφθηκαν 3 τιμές, από διαφορετικά σημεία η κάθε μία.



Εικόνα 3.22: Χρωματόμετρο NR110, 3nh

3.3 Προετοιμασία δειγμάτων και σχεδιασμός πειράματος



Σχήμα 3.3: Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας, σε χρονικό διάστημα 60 ημερών

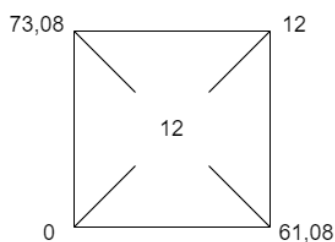
Τα δείγματα που μελετήθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν τρία. Για την δημιουργία αυτών, χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες χαρουπόμελου και πετιμεζιού σε διαφορετικές αναλογίες για το κάθε δείγμα. Το πρώτο (δείγμα Α) περιέχει μόνο πετιμέζι, το δεύτερο (δείγμα Β) περιέχει ίδια ποσότητα χαρουπόμελου όσο και πετιμεζιού, ενώ για το τρίτο (δείγμα Γ) χρησιμοποιήθηκε μόνο χαρουπόμελο. Για κάθε λίτρο αποφασίστηκε να περιέχονται περίπου 200gr σακχάρων, δηλαδή ως πηγές σακχάρων χρησιμοποιήθηκαν για το δείγμα Α (100% πετιμέζι, 179gr), για το δείγμα Β (μείγμα αποτελούμενο από 50% πετιμέζι, και 50% χαρουπόμελο, 180gr) και για το δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο, 180gr). Το δείγμα Β προκύπτει με ανάμιξη 100gr πετιμεζιού και 100gr χαρουπόμελου (σύσταση 1:1). Ακόμη κρίνεται αναγκαίος ο υπολογισμών των °Brix (gr σακχάρων/ 100gr δείγματος) με την βοήθεια επιτραπέζιου διαθλασίμετρου. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές για το καθένα και προέκυψε μέσος όρος αυτών.

Πίνακας 3.10: Αριθμητικές τιμές μετρήσεων °Brix αρχικών δειγμάτων

Δείγμα	°Brix (gr σακχάρων/ 100 gr δείγματος)	Μέσος Όρος (Average)
A (100% πετιμέζι)	73,13 73,06 73,04	73,08
B (μείγμα από 50% πετιμέζι και 50% χαρουπόμελο)	72,92 72,88 72,85	72,88
Γ (100% χαρουπόμελο)	72,67 72,60 72,57	72,61

Για την ακριβή παρασκευή των δειγμάτων οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν μέσω του τετραγώνου του Pearson, όπου πάνω αριστερά τοποθετούνται οι °Brix (πετιμέζι, χαρουπόμελο ή μείγμα αυτών), κάτω αριστερά τοποθετούνται τα plato H₂O και στο κέντρο τα επιθυμητά plato του τελικού προϊόντος (day 0).

Για το δείγμα Α:



Εικόνα 3.20: Τετράγωνο Pearson για το δείγμα Α (100% πετιμέζι)
 Συνολική ποσότητα: 12 + 61,08 = 73,08

Για την εύρεση του ποσοστού που καταλαμβάνει το πετιμέζι και το νερό στην συνολική ποσότητα:

$$12 / 73,08 = 0,164 \text{ ή } 16,4\% \text{ πετιμέζι και } 61,08 / 73,08 = 0,836 \text{ ή } 83,6\% \text{ νερό}$$

Λαμβάνοντας την τιμή πυκνότητας ίση με αυτή του νερού, δηλαδή $d = 1,090 \text{ kg/L}$, και

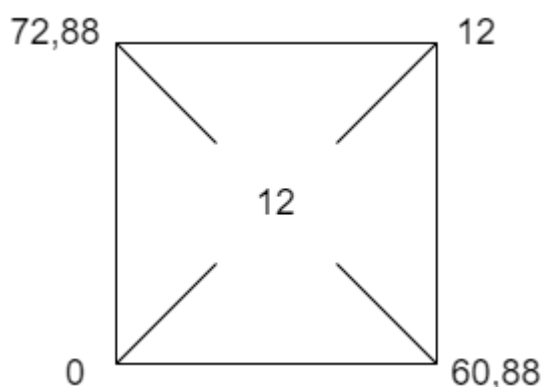
για $V = 1\text{L}$ προκύπτει:

$$m_{\text{μείγματος}} = 1 * 1,090 = 1,090\text{kg} \text{ ή } 1.090\text{gr} \text{ συνολικού μείγματος}$$

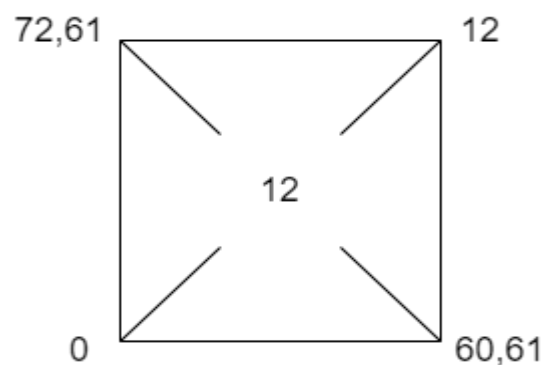
$$m_{\text{πετιμέζι}} = 1,090 * 0,164 = 0,179\text{kg} \text{ ή } 179\text{gr} \text{ πετιμέζι, για κάθε λίτρο}$$

Η ποσότητα προστιθέμενου νερού (gr) υπολογίζεται με την αφαίρεση της ποσότητας πετιμεζιού από την συνολική, δηλαδή: $1.090 - 179 = 911\text{gr H}_2\text{O}$

Ομοίως υπολογίζονται οι ποσότητες (gr) νερού και μείγματος (πετιμέζι, χαρουπόμελο) ή νερού και χαρουπόμελου για τα δείγματα Β και Γ, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.21: Τετράγωνο Pearson για το δείγμα Β (50% πετιμέζι και 50% χαρουπόμελο)



Εικόνα 3.22: Τετράγωνο Pearson για το δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο)

Από τα τετράγωνα του Pearson προκύπτει ότι απαιτούνται για κάθε λίτρο 910 gr νερό και 180gr μείγματος (50% πετιμέζι και 50% χαρουπόμελο), για το δείγμα Β.

Ομοίως 180gr χαρουπόμελο και 910 gr νερό, για το δείγμα Γ (100% πετιμέζι).

Όταν ολοκληρωθεί η παρασκευή των δειγμάτων προστίθεται στο καθένα ξεχωριστά ο μικροοργανισμός εκκίνησης (μαγιά), συγκεκριμένα 0,5gr *Saccharomyces*

cerevisiae. Με αυτόν τον τρόπο, ξεκινάει η αλκοολική ζύμωση του προϊόντος, η οποία πρόκειται να διαρκέσει περίπου 30 ημέρες. Κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών, τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία, ενώ τοποθετείται στο πάνω μέρος των μπουκαλιών αεροπαγίδα, η οποία περιέχει αλκοόλη. Η αλκοόλη έχει ως σκοπό την προστασία των δειγμάτων από τυχόν επιμολύνσεις και την φραγή εισόδου του περιβάλλοντος αέρα στο εσωτερικό του μπουκαλιού, με ταυτόχρονη έξοδο του οξυγόνου που περιέχει το μπουκάλι, δημιουργώντας έτσι αναερόβιες συνθήκες.

Ακολουθεί η απομόνωση οξικών βακτηρίων από πρότυπα δείγματα ζυδιού, με σκοπό την εισαγωγή τους στο πειραματικό δείγμα αφού τελειώσει η αλκοολική ζύμωση, έτσι ώστε, να ξεκινήσει η οξική ζύμωση. Αφού παρασκευαστούν 400ml, ισόποσα χωρισμένο σε 4 κωνικές φιάλες, ενός μη-εκλεκτικού θρεπτικού υγρού υποστρώματος, το BHI broth (Brain Heart Infusion), αποστειρωθεί καταλλήλως (121°C για 15΄) και ύστερα, προστεθεί σε αυτό μικρή ποσότητα αλκοόλης (0,25ml/100ml BHI broth), τότε, ποσότητα από τα 4 πρότυπα ζύδια (10ml από το κάθε ένα) προστίθενται στις 4 κωνικές φιάλες, αντιστοίχως. Σε κάθε μία από αυτές, τοποθετείται αντλία οξυγόνου (Pump Air) και φίλτρο (μικροβιοκράτες). Το σύστημα αυτό διατηρείται σε επωαστικό κλίβανο των 35°C για 3 ημέρες.

Επιτυχημένος εμπλουτισμός παρατηρήθηκε σε δύο από τις κωνικές φιάλες, οι οποίες παρουσίασαν θολερότητα, δηλαδή ανάπτυξη μικροοργανισμών. Για την απομόνωση τους, λοιπόν, έγινε ανακαλλιέργεια σε τρυβλία με υπόστρωμα GYEC (Glucose-Yeast extract-Ethanol- CaCO₃). Η επώαση γίνεται στους 37°C για 5 ημέρες.

Μετά την επώαση, παρατηρήθηκαν διαυγείς ζώνες στα τρυβλία, γεγονός που επιβεβαιώνει την πιθανή ανάπτυξη οξικών βακτηρίων, διότι αυτά, καταναλώνουν το ανθρακικό ασβέστιο (CaCO₃) και σχηματίζουν αυτές τις χαρακτηριστικές ζώνες.

Έπειτα, αφού απομονώθηκαν πιθανές αποικίες οξικών βακτηρίων από τα τρυβλία, με τη βοήθεια κρίκου εμβολιασμού, μεταφέρθηκαν σε εμπλουτιστικό μέσο, το GYAE broth το οποίο επωάζεται με αερισμό στους 35°C για 3 ημέρες.

Οι κωνικές φιάλες που περιέχουν το εμπλουτιστικό μέσο με τα πρότυπα δείγματα των ζυδιών ήταν δύο, αφού μόνο δύο από τα τέσσερα δείγματα έδειξαν επιτυχημένο πρώτο εμπλουτισμό. Μετά το πέρας των ημερών επώασης, έγινε συνένωση των κωνικών φιαλών με τα δύο διαφορετικά δείγματα ζυδιών σε μία. Έτσι, δημιουργήθηκε εκκινητήρια καλλιέργεια («μάννα») για την οξική ζύμωση.

Την 30^η μέρα, έγινε διήθηση στα δείγματα. Χρησιμοποιήθηκε διηθητικό χαρτί, το οποίο συγκρατεί όλα τα στερεά, τα υπολείμματα ζυμών και το ίζημα που έχει δημιουργηθεί κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Τα διηθημένα υγρά δείγματα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες, οι οποίες καλύφθηκαν με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο.

Στη συνέχεια, 10ml από τη «μάνα» προστέθηκαν σε κάθε κωνική φιάλη με τα δείγματα που προέκυψαν από τη διήθηση, έτσι ώστε, να ξεκινήσει η οξική ζύμωση. Τα τελικά δείγματα μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικούς κυλίνδρους των 1000ml, οι οποίοι καλύφθηκαν στο στόμιο τους με parafilm, δηλαδή υδατοστεγή μεμβράνη και τρυπήθηκαν, με σκοπό να ευνοηθούν οι αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε ένα από τα δείγματα τοποθετήθηκαν επίσης μηχανήματα αερισμού (βραχάκια) με πιο ήπια διοχέτευση οξυγόνου από ότι οι αντλίες. Ωστόσο, μία ποσότητα του δείγματος Α (100% πετιμέζι), παρέμεινε στην κωνική φιάλη σε κατάσταση ηρεμίας. Το δείγμα αυτό ονομάστηκε δείγμα Α_{ΧΑ} (Χωρίς Αέρα).

Στο τέλος της οξικής ζύμωσης (60^η ημέρα) και αφού έχει πραγματοποιηθεί δειγματοληψία καθ' όλη τη διάρκεια των δύο ζυμώσεων, στις ημέρες 0, 15, 30, 45 και 60, πραγματοποιείται διαδικασία διαύγασης των δειγμάτων, ή αλλιώς καθίζηση των πρωτεϊνών. Η πρώτη ενέργεια που λαμβάνει χώρα είναι η φυγοκέντρηση των δειγμάτων, με σκοπό την απομάκρυνση του ιζήματος που έχει δημιουργηθεί. Για την εκτέλεση αυτής, απαιτείται ανακίνηση των δειγμάτων, μεταφορά τους σε falcon και προσθήκη οξικό βάριο και θεικό ψευδάργυρο σε αναλογία 8ml δείγματος/1ml Ba(OH)₂/1ml ZnSO₄. Το διάλυμα ανακινείται και αφήνεται σε ηρεμία για 10', με έντονη ανάδευση λίγων δευτερολέπτων στα 5'. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση του στα 3.500rpm για 10'. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και εισάγεται σε νέο falcon. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές για κάθε δείγμα.

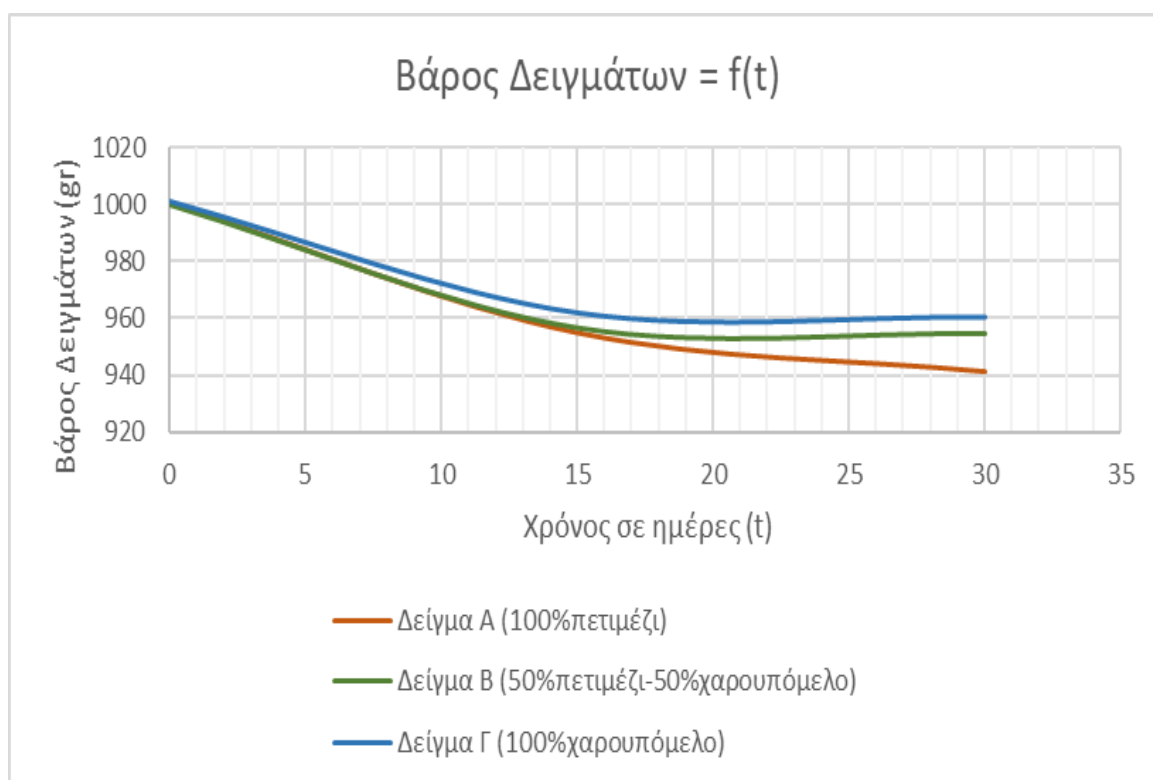
Στη συνέχεια, τα δείγματα φιλτράρονται με τη βοήθεια συσκευής κενού, μέσω διηθητικών φίλτρων. Τα δείγματα είναι πλέον διαυγασμένα και απαλλαγμένα από ιζήματα. Ακολουθούν οι τελευταίες μετρήσεις.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Καθώς τα δείγματα είναι προετοιμασμένα και η αλκοολική και η οξική ζύμωση εξελίσσονται, γίνονται μετρήσεις ανά 15 ημέρες στα προϊόντα, προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα και τα χαρακτηριστικά αυτών. Δηλαδή, γίνεται εξέταση των δειγμάτων στις ημέρες 0, 15, 30, 45 και 60. Οι μετρήσεις που λαμβάνονται είναι μικροβιολογικοί έλεγχοι, περιεκτικότητα αλκοόλης και ολικών στερεών, μετρήσεις οξύτητας, pH και βάρους, περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (Folin - Ciocalteu) και μετρήσεις χρώματος. Ακολουθούν τα δεδομένα και οι μετρήσεις που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σημειώνεται πως για κάποιες από τις αναλύσεις, κρίθηκε αναγκαίο, οι τιμές που λήφθηκαν από τα όργανα να πολλαπλασιαστούν με το αντίστροφο της αραίωσης τους, δηλαδή με το 10/8. Οι αναλύσεις αυτές περιλαμβάνουν τη μέτρηση της αλκοόλης, του ολικού φαινολικού περιεχομένου, των ολικών στερεών/σακχάρων, της πυκνότητας, καθώς και του χρώματος.

4.1 Μέτρηση βάρους

Το βάρος των δειγμάτων μετρήθηκε μόνο κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δηλαδή μέχρι τη 30^η ημέρα. Ο σκοπός των μετρήσεων του βάρους ήταν η επίβλεψη της ορθής εξέλιξης της αλκοολικής ζύμωσης. Η μείωση του βάρους οφείλεται στην μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο όταν απελευθερωθεί προκαλεί την εμφανή πτώση της ποσότητας του υδρόμελου. Στο Διάγραμμα 4.1 φαίνεται η σχηματική πορεία των μετρήσεων και στον Πίνακα 4.1 οι αριθμητικές τιμές για τα 3 δείγματα, Α, Β και Γ. Οι τιμές που λήφθηκαν αφορούν το καθαρό βάρος των δειγμάτων, με άλλα λόγια, μόνο το υδρόμελο. Για να συμβεί αυτό, μετρήθηκαν τα απόβαρα των μπουκαλιών με τις αεροπαγίδες και την περιεχόμενη αλκοόλη, πριν προστεθούν τα δείγματα σε αυτά. Από την τιμή των μπουκαλιών που λήφθηκε μαζί με τα δείγματα, αφαιρέθηκε η τιμή των απόβαραν. Παρατηρείται, λοιπόν, πως και στις τρεις περιπτώσεις το βάρος των δειγμάτων μειώνεται.



Διάγραμμα 4.1: Βάρος δειγμάτων (gr) συναρτήσει του χρόνου (σε ημέρες)

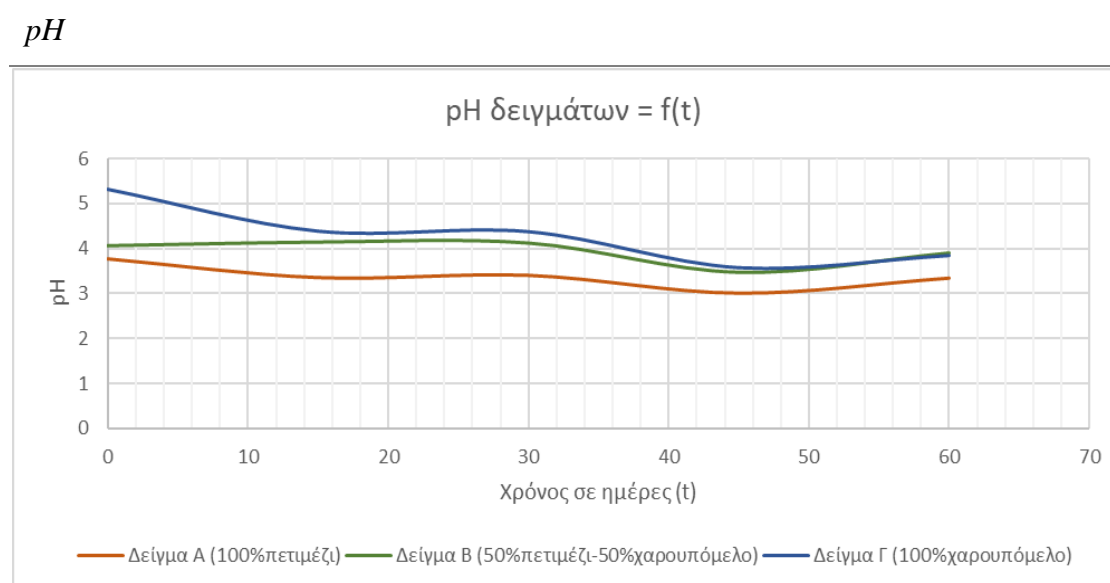
Πίνακας 4.1: Αριθμητικά αποτελέσματα μετρήσεων βάρους δειγμάτων

Ημέρα	Καθαρό Βάρος Δειγμάτων (g)		
	Δείγμα A (100% πετιμέζι)	Δείγμα B (50% πετιμέζι-50% χαρουπόμελο)	Δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο)
0	1000,44	1000,14	1000,95
15	954,68	956,57	962,13
30	940,99	954,50	960,65

4.2 Ανάλυση pH

Το pH του πετιμεζιού κυμαίνεται στο 3,2-4,0 (Alves, Barros, and Rezende 2014). Ενώ, για το χαρουπόμελο το pH έχει εύρος 4,3-5,4 (Toufeili et al. 2022). Οι τιμές αυτές αντιπροσωπεύουν το pH των δειγμάτων στην αρχή του πειράματος. Στο Διάγραμμα 4.2 φαίνονται οι μετρήσεις του pH όλων των δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων. Παρατηρείται πως οι αρχικές τιμές είναι εντός των βιβλιογραφικών ορίων. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, παράγονται μαζί με τους κύριους μεταβολίτες και ορισμένα οργανικά οξέα, στα οποία οφείλεται η μικρή μείωση της τιμής του pH. Στο διάστημα της οξικής ζύμωσης διαπιστώνεται η μεγαλύτερη πτώση του pH, λόγω της συσσώρευσης των οργανικών οξέων, όπως το οξικό και το γαλακτικό οξύ, που δημιουργούν ένα πιο όξινο περιβάλλον (Narendranath and Power 2005). Παρά την αναμενόμενη περεταίρω μείωση του pH από την 45^η έως 60^η ημέρα, διαπιστώνεται μία μικρή άνοδος της τιμής. Αυτό, πιθανόν οφείλεται σε οξειδωση του οξικού οξέος προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό, την αναφερόμενη και ως υπεροξειδωση. Ακόμη, γνωρίζοντας τη βιοχημεία της οξικής ζύμωσης, τα κύρια ένζυμα που συμμετέχουν (ADH και ALDH), έχουν ως βέλτιστη τιμή pH 2,0-5,0 (Du Toit & Pretorius, 2002). Επίσης, τα οξικά βακτήρια (AAB), παρουσιάζουν βέλτιστο pH στο 5,5-6,3, όμως έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και σε χαμηλότερες τιμές, δηλαδή 3,0-4,0 (Gullo et al., 2014). Φαίνεται πως όλες οι τιμές ταυτίζονται με τα παραπάνω.

Πίνακας 4.2: Αριθμητικές τιμές μετρήσεων pH δειγμάτων

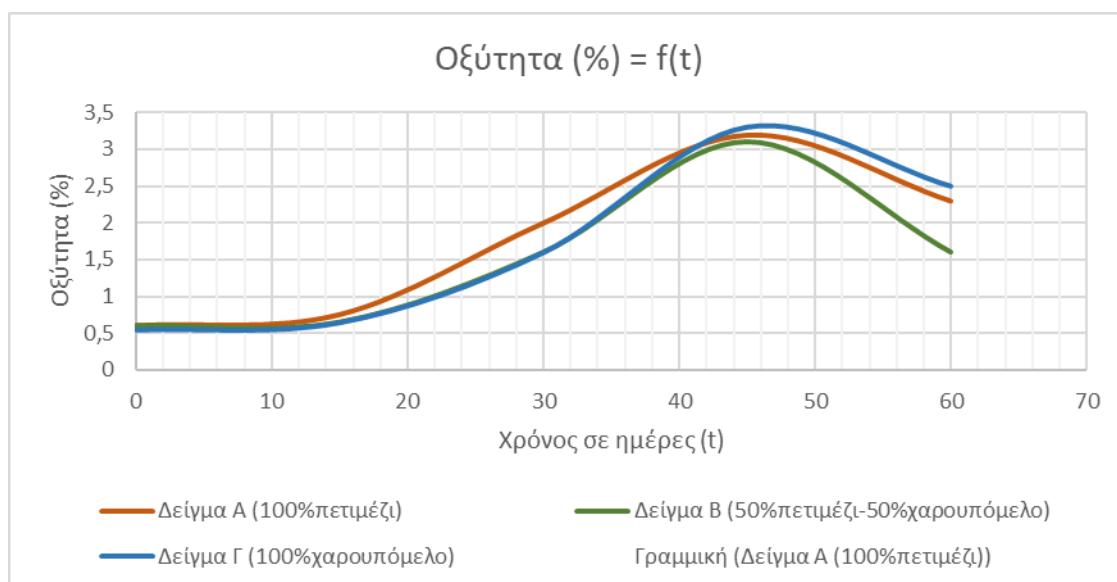


Διάγραμμα 4.2: Τιμές pH δειγμάτων κατά την διάρκεια των δύο ζυμώσεων.

Ημέρες	Δείγμα Α (100% πετιμέζι)	Δείγμα Β (50% πετιμέζι-50% χαρουπόμελο)	Δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο)
0	3,77	4,07	5,31
15	3,36	4,15	4,38
30	3,41	4,13	4,37
45	3,02	3,48	3,57
60	3,35	3,91	3,84

4.3 Μετρήσεις οξύτητας

Η τιμή της οξύτητας για το παραδοσιακό (μη-εμπορικό) ξύδι κυμαίνεται μεταξύ 0,32 – 5,09g οξικού οξέος/ 100ml προϊόντος (ή %w/v) (Cosmulescu et al., 2022). Η οξύτητα του υδρόμελου μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες όπως το pH της πηγής των σακχάρων (μέλι, χαρουπόμελο, πετιμέζι), της διαδικασίας ζύμωσης, κατά την οποία παράγονται φυσικά οξέα, καθώς και της πιθανής προσθήκης συμπληρωμάτων ή οξέων με σκοπό την βελτίωση και διατήρηση του προϊόντος (Pereira et al. 2019). Παρακάτω, φαίνεται το Διάγραμμα 3, το οποίο περιλαμβάνει όλες τις πειραματικές τιμές. Παρατηρείται αύξηση της οξύτητας μέχρι την ημέρα 45. Στο διάστημα μεταξύ των ημερών 45 και 60 φαίνεται μείωση της οξύτητας των δειγμάτων. Οι διακυμάνσεις της οξύτητας στηρίζονται σε όμοιους λόγους με αυτές των τιμών του pH.



Διάγραμμα 4.3: Τιμές οξύτητας δειγμάτων κατά τη διάρκεια των δύο ζυμώσεων.

Πίνακας 4.3: Αριθμητικές μετρήσεις οξύτητας δειγμάτων

Οξύτητα (% v/v)

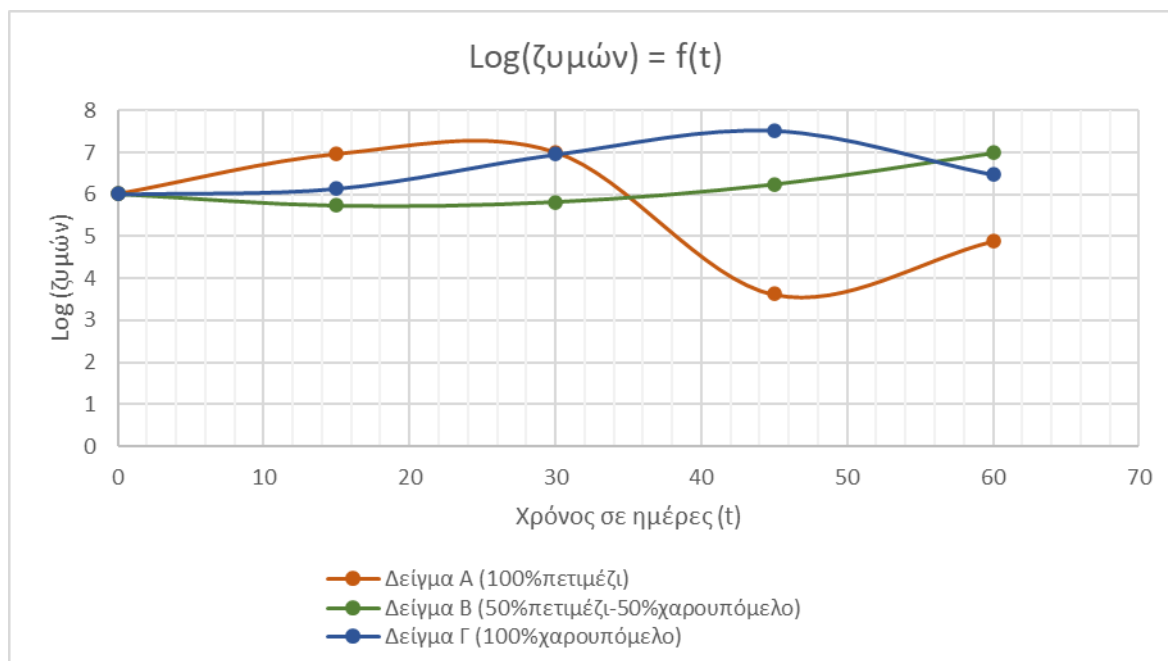
Ημέρες	Δείγμα Α (100% πετιμέζι)	Δείγμα Β (50% πετιμέζι – 50% χαρουπόμελο)	Δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο)
0	0,6	0,6	0,55
15	0,75	0,65	0,65
30	2	1,6	1,6
45	3,2	3,1	3,3
60	2,3	1,6	2,5

4.4 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

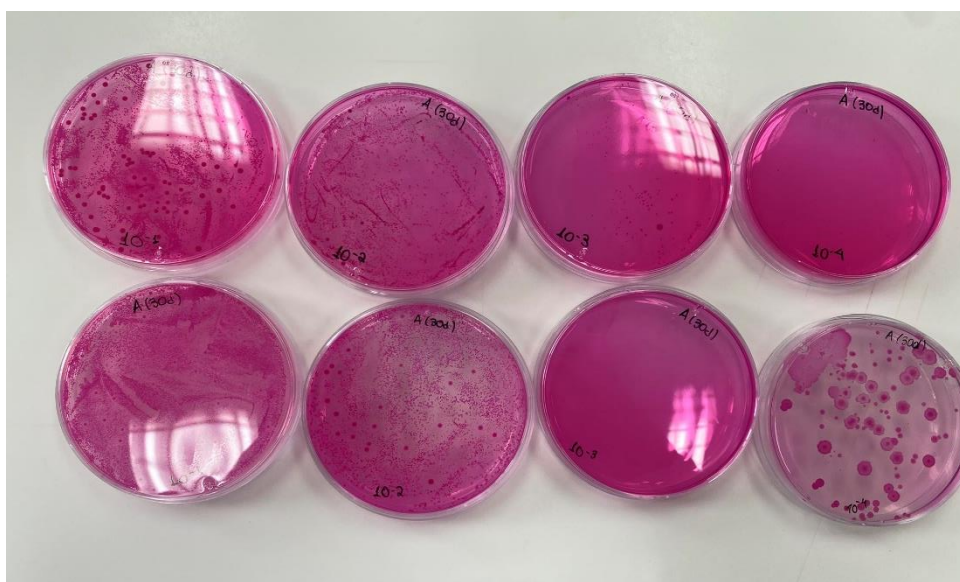
4.4.1 Ζύμες

Στο Διάγραμμα 4.4 φαίνεται η λογαριθμική πορεία που ακολούθησαν οι καταμετρούμενες αποικίες των ζυμών σε όλη τη διάρκεια των δύο ζυμώνσεων. Και για τα τρία δείγματα παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού τους για τις ημέρες που εξελίσσεται η αλκοολική ζύμωση (days 0-30) και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα της τάξεως του 10^6 - 10^7 cfu/ml. Συμπεραίνεται βάσει διαγράμματος, ότι η προσθήκη πετιμεζιού ευνοεί την ανάπτυξη των ζυμών συγκριτικά με το χαρουπόμελο. Αυτό, συμβαίνει λόγω της σύστασης του χαρουπόμελου, το οποίο περιέχει υψηλή συγκέντρωση της κυκλικής αλκοόλης, D-πινιτόλη, καθώς και μεγάλο ποσοστό σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο, εμποδίζοντας την διαδικασία ανάπτυξης των ζυμών (Goulas et al., 2016). Στο χρονικό διάστημα που λαμβάνει χώρα η οξική ζύμωση, διαπιστώνεται πως τα δείγματα Β (50% πετιμέζι - 50% χαρουπόμελο) και Γ (100% χαρουπόμελο) παρουσιάζουν περαιτέρω αύξηση των ζωντανών αποικιών, σε αντίθεση με το δείγμα Α (100%πετιμέζι), ο αριθμός των οποίων μειώνεται δραματικά. Αυτό, προκαλείται εξαιτίας του υψηλού ιξώδους του χαρουπόμελου και της πολύπλοκης δομής του, όπου οι ζύμες εγκλωβίζονται στο μεγάλο ποσοστό ινών-ιστών και σωματιδίων που περιέχονται, καθιστώντας την διήθηση αναποτελεσματική (Goulas et al., 2016). Η συνέχεια ύπαρξης και ανάπτυξης των ζυμών σημαίνει πως εξακολουθεί να λειτουργεί και η μεταβολική τους διαδικασία. Αυτό, συνεπάγεται την παραγωγή επιπλέον μεταβολιτών, οι οποίοι συμβάλλουν στην τελική διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων. Είναι σημαντικό να τονιστεί, πως κατά την διάρκεια

του πειράματος παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκήτων (μούχλας) στην επιφάνεια των μπουκαλιών, των κωνικών φιαλών και των ογκομετρικών κυλίνδρων που περιέχουν τα δείγματα. Το γεγονός αυτό, πιθανόν προκλήθηκε από λανθασμένους χειρισμούς, όπως ανεπιτυχής διατήρηση ασηπτικών συνθηκών.



Διάγραμμα 4.4: Λογαριθμική απεικόνιση ζωντανών καταμετρούμενων αποικιών ζυμών για τα δείγματα καθ' όλη τη διάρκεια των δύο ζυμώσεων.



Εικόνα 4.1: Καταμέτρηση αποικιών ζυμών, με το DRBC agar (30 days)

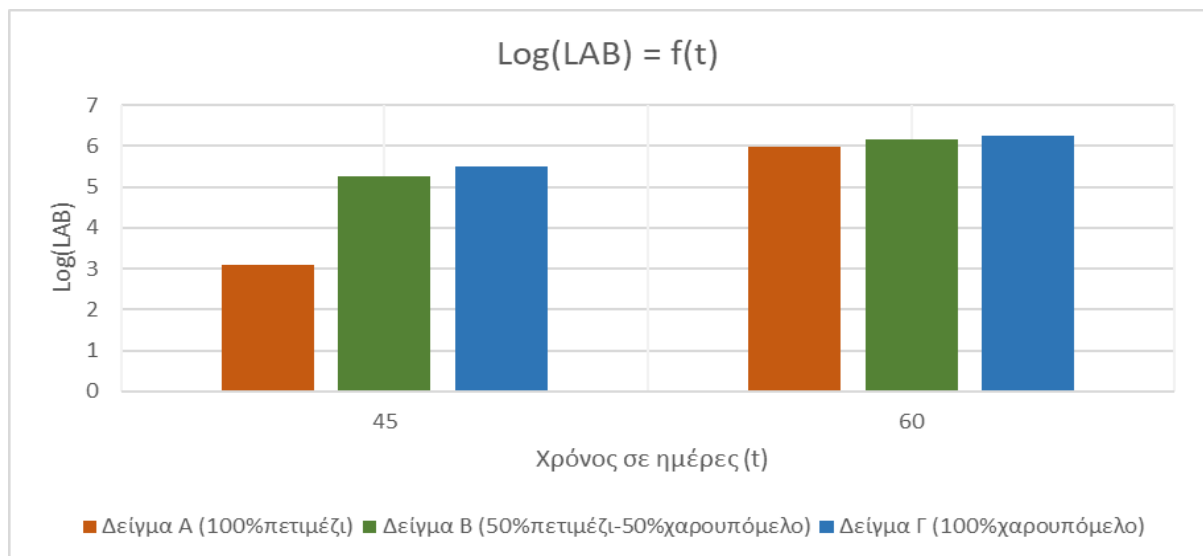
4.4.2 Βακτήρια γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB)



Εικόνα 4.2: Καταμέτρηση αποικιών βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, με θρεπτικό υπόστρωμα το MRS agar

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος βρίσκονται στα νωπά υλικά που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες. Συγκεκριμένα, στα σταφύλια για την παραγωγή πετιμεζιού και στο χαρούπι για την παραγωγή χαρουπόμελου. Τα LAB, αν και χαρακτηρίζονται ως αναερόβια, έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν και σε αερόβιες συνθήκες ή παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο οξυγόνο (Marín et al., 2019). Συνεπώς, καταναλώνουν μέρος των σακχάρων του προϊόντος, μετατρέποντας το σε γαλακτικό οξύ. Το παραγόμενο γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα για την δράση και ανάπτυξη των οξικών βακτηρίων (AAB) (Wood, 2012). Στο Διάγραμμα παρατηρείται η πορεία των καταμετρούμενων αποικιών στις μέρες 45 και 60.

Φαίνεται πως στο δείγμα Α (100% πετιμέζι), τα οξυγαλακτικά βακτήρια διπλασιάστηκαν μέσα σε διάστημα 15 ημερών. Αντίθετα, στα δείγματα Β (50% πετιμέζι – 50% χαρουπόμελο) και Γ (100% χαρουπόμελο) παρέμειναν σχεδόν σταθερά, με μία μικρή άνοδο.



Εικόνα 14 Λογαριθμικές τιμές καταμετρούμενων αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) των δειγμάτων στις ημέρες 45 και 60.

4.4.3 Βακτήρια οξικού οξέος (Acetic Acid Bacteria, AAB)

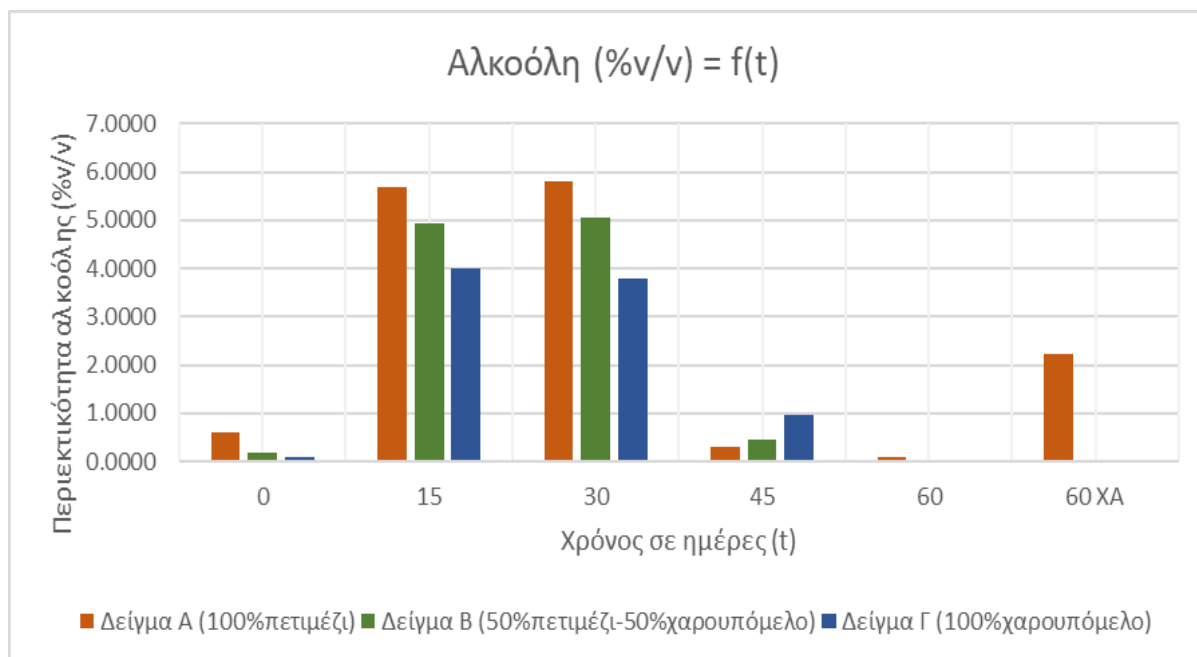
Η καταμέτρηση των βακτηρίων του οξικού οξέος χαρακτηρίστηκε ως μη πραγματοποιησίμη. Έγινε προσπάθεια καλλιέργειας αυτών μέσω του GYEC άγαρ και παρατηρήθηκε θολερότητα στο θρεπτικό υπόστρωμα, χωρίς ωστόσο να είναι εφικτή η λήψη αριθμητικού αποτελέσματος. Γενικά, τα βακτήρια του οξικού οξέος μπορούν να χαρακτηριστούν ως βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα (viable but nonculturable, VBNC). Αυτά τα βακτήρια έχουν υψηλές απαιτήσεις και χρειάζονται συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά για να επιβιώσουν, γεγονός που τα καθιστά δύσκολα να απομονωθούν, μετρηθούν και αναπτυχθούν σε εργαστηριακό περιβάλλον, ειδικά όταν προέρχονται από προϊόντα ή ποτά που έχουν ζυμωθεί (Sengun & Karabiyikli, 2011; Vegas et al., 2010). Παρά την αδυναμία απαρίθμησης του πληθυσμού θεωρείται αδιαμφισβήτητη η παρουσία τους, από την ημέρα 30 και έπειτα, λόγω τόσο της θολερότητας στα θρεπτικά μέσα όσο και στην κατανάλωση αλκοόλης, η οποία μετρήθηκε από το αλκοολόμετρο ALEX 500.

4.5 Μέτρηση αλκοόλης

Μέσω του προσδιορισμού της αλκοόλης διαπιστώνεται η περιεχόμενη ποσότητα αιθανόλης, η οποία περιέχεται σε μία συγκεκριμένη ποσότητα αλκοολούχου ροφήματος. Συνεπώς, ροφήματα-ποτά που δεν έχουν υποστεί αλκοολική ζύμωση θεωρείται ότι έχουν μηδενικό βαθμό αλκοόλης. Το πετιμέζι, το χαρουπόμελο αλλά και το μείγμα αυτών παρουσιάζει βαθμό αλκοόλης πολύ κοντά στην τιμή μηδέν, με το πετιμέζι να διαθέτει την υψηλότερη τιμή συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Άρα την ημέρα 0 τα δείγματα παρουσιάζουν πολύ χαμηλές τιμές αλκοόλης, καθώς δεν έχει αρχίσει η διαδικασία της ζύμωσης. Ως μη αλκοολούχα ονομάζονται τα ροφήματα που διαθέτουν τιμή αλκοόλης χαμηλότερη ή ίση με 0,5% v/v (Catarino & Mendes, 2011).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα διακρίνεται τις ημέρες 15 και 30, με μέγιστη την ημέρα 30, που υποδηλώνει το τέλος αλκοολικής ζύμωσης, για τα δείγματα Α και Β. Το δείγμα Γ παρουσιάζει μέγιστη τιμή στην ημέρα 15, με μικρή απόκλιση συγκριτικά με την 30^η ημέρα. Με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης και την έναρξη της οξικής παρουσιάζεται σημαντική πτώση στην περιεχόμενη αλκοόλη, η οποία οφείλεται στην κατανάλωση της από τα οξικά βακτήρια. Οι μετρήσεις την 60^η ημέρα παρουσιάζουν μηδενικές τιμές υποδηλώνοντας λήξη της οξικής ζύμωσης και πιθανή υπεροξειδωση.

Το δείγμα ΑΧΑ (Χωρίς Αέρα), στο οποίο δεν έγινε προσθήκη συσκευής αερισμού, εμφανίζει πτώση του ποσοστού περιεχόμενης αλκοόλης, όμως με όχι με τόσο ραγδαίο



Διάγραμμα 4.4: Τιμές αλκοόλης δειγμάτων καθ'όλη την διάρκεια των δύο ζυμώσεων

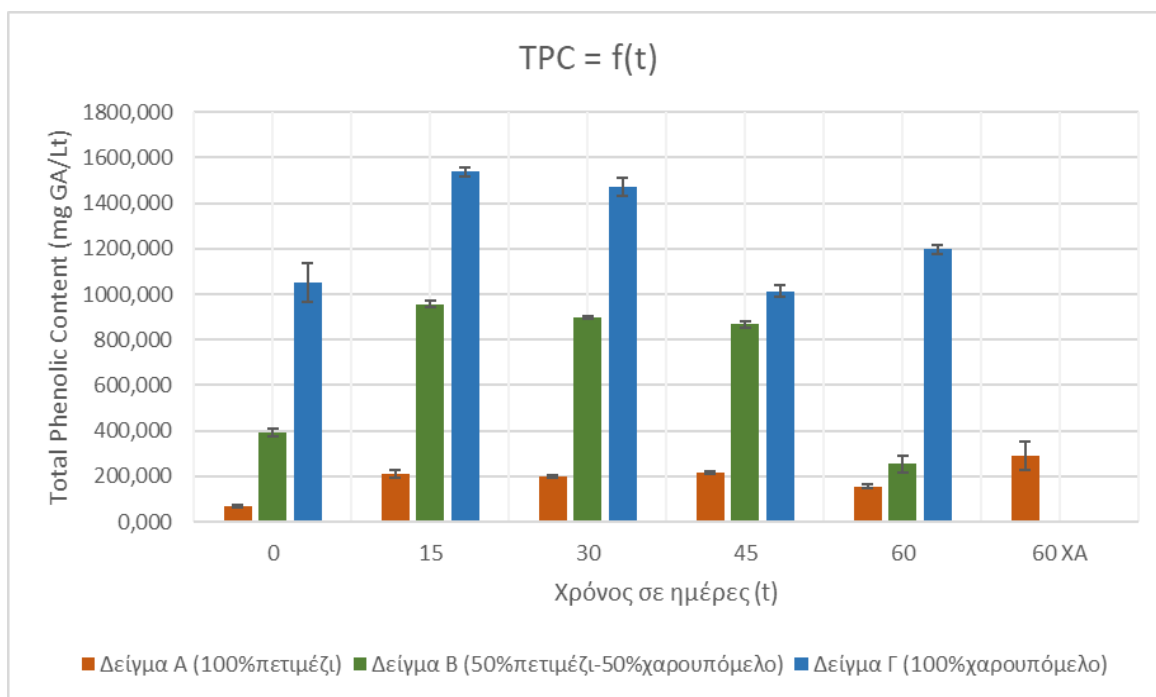
ρυθμό όπως τα υπόλοιπα δείγματα.

Πίνακας 4.4 Αριθμητικές τιμές αλκοόλης

Αλκοόλη (% v/v)						
Ημέρες	Δείγμα Α (100% πετιμέζι)	Δείγμα Β (50% πετιμέζι – 50% χαρουπόμελο)	Δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο)			
0	0,5917	0,1750	0,10			
15	5,6917	4,9250	4,00			
30	5,8000	5,0500	3,79			
45	0,3000	0,4417	0,96			
60	0,1000	0,0000	0,04			
60 ΧΑ	2,2333					

4.6 Μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου

Στο Διάγραμμα 4.5 απεικονίζονται όλες οι τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα δείγματα καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις τους, ενώ στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται οι πειραματικές μετρήσεις. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, φαίνεται πως για όλα τα δείγματα υπάρχει μεγάλη αύξηση των περιεχόμενων φαινολικών από την ημέρα 0 στην 15. Η τιμή που διαμορφώνεται την ημέρα 15 παραμένει σχεδόν σταθερή έως και τη 30^η ημέρα. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα φαινολικών, θεωρητικά, ταυτίζεται με το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Όμως, τα δείγματα εμφανίζουν την πιο υψηλή τιμή φαινολικών ενώσεων την ημέρα 15, λόγω διάσπασης των πολύπλοκων πολυφαινολικών μορίων σε απλούστερα, αυξάνοντας την συγκέντρωσή τους. Αυτό επιτυγχάνεται εξαιτίας της αύξησης της περιεκτικότητας αιθανόλης και την παραγόμενη, από τους ζυμομύκητες, ακεταλδεΐδη (Nogueira et al., 2008; Zou et al., 2017). Το γεγονός αυτό, οδηγεί στο συμπέρασμα πως η αλκοολική ζύμωση πιθανόν ολοκληρώθηκε λίγο πριν το τέλος των 30 ημερών. Επίσης, παρατηρείται τριπλάσια περιεκτικότητα φαινολικών στο δείγμα Β (50% πετιμέζι – 50% χαρουπόμελο) σε σχέση με το δείγμα Α (100% πετιμέζι). Αντίστοιχα, το δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο) παρουσιάζει διπλάσιο ποσοστό σε σχέση με το δείγμα Β καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων. Συνεπώς, η προσθήκη χαρουπόμελου, σχεδόν δεκαπλασιάζει την περιεκτικότητα του δείγματος σε φαινολικό περιεχόμενο. Κατά τις πρώτες 15 ημέρες της οξικής ζύμωσης, οι φαινολικές ενώσεις μειώνονται και για τα τρία δείγματα, με την μεγαλύτερη πτώση να εμφανίζει τον δείγμα Γ. Αυτό συμβαίνει διότι, τα οξικά βακτήρια, μέσω διαφόρων ενζυμικών οδών, μπορούν να αποικοδομήσουν μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις, σε απλά μόρια, είτε σε άλλους μεταβολίτες (Andlauer et al., 2000). Στο χρονικό διάστημα που ακολουθεί, μέχρι την 60^η ημέρα, τα δείγματα Α και Β συνεχίζουν την καθοδική πορεία, με δραματική πτώση να χαρακτηρίζει το δείγμα Β. Αυτό, είναι πιθανό να έχει προκληθεί από υπεροξείδωση του δείγματος. Από την άλλη πλευρά, το δείγμα Γ φαίνεται να παρουσιάζει μια μικρή άνοδο. Παρόμοια μεταβολή διακρίνεται και για το δείγμα ΑΧΛ.



Διάγραμμα 4.5: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο κατά την διάρκεια των δύο ζυμώσεων.

Πίνακας 4.5: Αριθμητικές τιμές ολικού φαινολικού περιεχομένου

TPC (mg GA/Lt) δειγμάτων

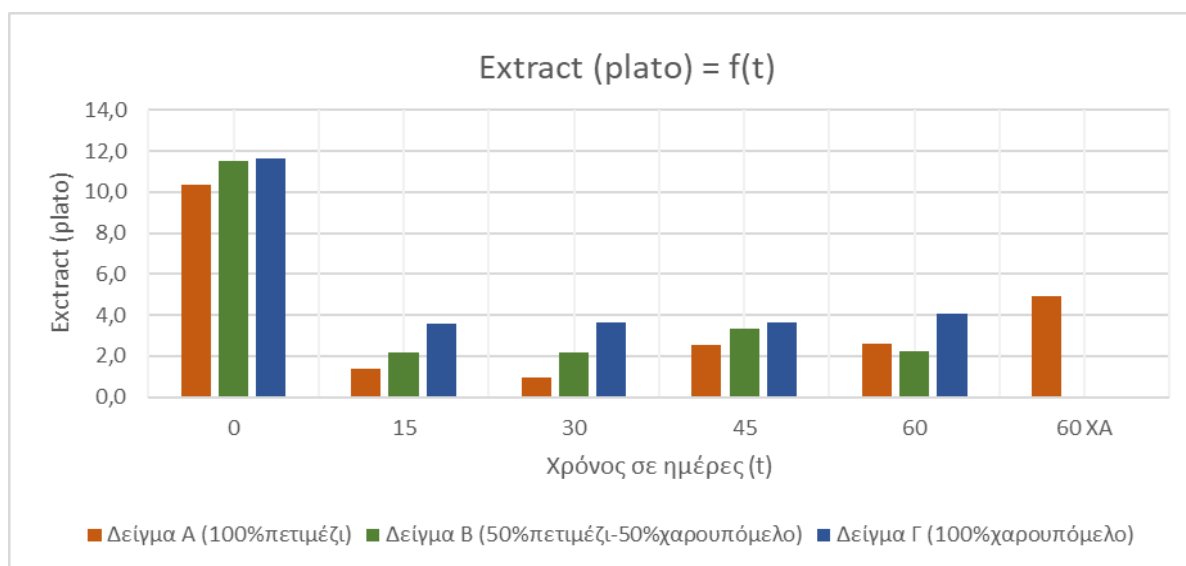
Ημέρα	Δείγμα A (100% πετιμέζι)	Δείγμα B (50%πετιμέζι-50%χαρουπόμελο)	Δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο)
0	67.421	391.292	1051.750
15	210.438	957.583	1538.500
30	199.188	897.583	1473.500
45	216.688	866.708	1013.417
60	156.063	254.188	1196.750
60 XA	292.125		

4.7 Μέτρηση ολικών στερεών / σακχάρων

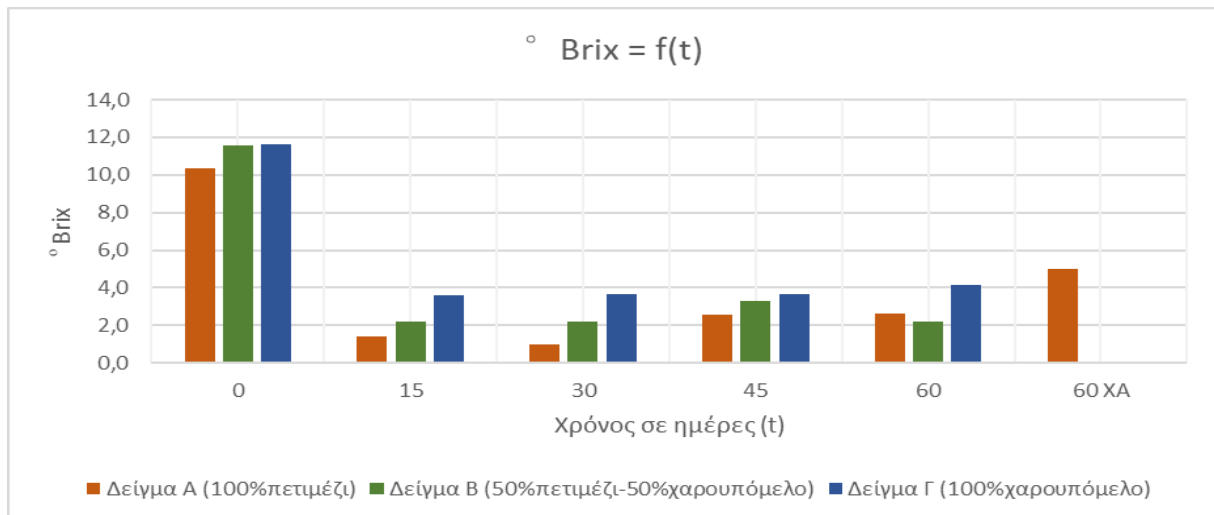
Με τον όρο ολικά διαλυμένα στερεά ορίζεται η ποσότητα οργανικών και ανόργανων συστατικών, που περιέχονται και μπορούν να διαλυθούν σε συγκεκριμένο όγκο νερού. Σε αυτά συγκαταλέγονται σάκχαρα, μέταλλα, ιχνοστοιχεία καθώς άλατα και ιόντα. Το μεγαλύτερο ποσοστό της σύστασης του πετιμεζιού απαρτίζεται από σάκχαρα, καθώς είναι σιρόπι σταφυλιού (Rezaei et al. 2020). Όσον αφορά το χαρουπόμελο η περιεκτικότητα του σε σάκχαρα κυμαίνεται σε ποσοστά 45-52% και

περιέχει σε μικρές ποσότητες μέταλλα, αμινοξέα και φαινολικές ενώσεις (Yatmaz and Turhan 2018). Το μεγαλύτερο μέρος των διαλυτών στερεών αποτελείται από σάκχαρα, συνεπώς οι μετρήσεις για τους °Brix, δηλαδή το μέτρο των διαλυτών στερεών συστατικών σε ένα υδατικό διάλυμα, καθώς και τα plato, το ποσοστιαίο βάρος των σακχάρων στο συνολικό βάρος του διαλύματος, παρουσιάζουν παραπλήσιες τιμές. Οι τιμές λήφθηκαν μέσω του οργάνου Density Meter (DMA 35) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.6.

Τα Διαγράμματα 4.6 και 4.7, με παρόμοιες τιμές και διακυμάνσεις, φανερώνουν την ύπαρξη μεγάλης περιεκτικότητας σακχάρων και για τα τρία δείγματα την ημέρα 0, με μεγαλύτερη αυτή του δείγματος Γ (100% χαρουπόμελο). Από την 15^η ημέρα και ύστερα παρατηρείται ουσιαστική πτώση των σακχάρων για τα δείγματα Α, Β και Γ. Αυτή η πτώση οφείλεται στην αλκοολική ζύμωση (15^η έως 30^η ημέρα) και την οξική ζύμωση (30^η έως 60^η ημέρα), διότι αρχικά η ζύμη *S. Cerevisiae* και μετέπειτα τα βακτήρια του οξικού οξέος (AAB) καταναλώνουν τα σάκχαρα που υπάρχουν στο υπόστρωμα για την παραγωγή αιθανόλης και οξικού οξέος, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4.6: Η μεταβολή στην περιεκτικότητα των σακχάρων (plato) κατά την διάρκεια των ζυμώσεων.



Διάγραμμα 4.7: Βαθμοί Brix κατά την διάρκεια των δύο ζυμώσεων

Πίνακας 4.6: Αριθμητικές τιμές plato και °Brix δειγμάτων

Extract (plato) και °Brix δειγμάτων

Ημέρες	Δείγμα Α (100% πετιμέζι)		Δείγμα Β ((50%πετιμέζι-50%χαρουπόμελο)		Δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο)	
	Extract	°Brix	Extract	°Brix	Extract	°Brix
0	10,4	10,4	11,5	11,5	11,6	11,6
15	1,4	1,4	2,2	2,2	3,6	3,6
30	1,0	1,0	2,2	2,2	3,6	3,7
45	2,5	2,5	3,3	3,3	3,7	3,7
60	2,6	2,6	2,3	2,2	4,0	4,1
60 XA	4,9	5,0	11,5	11,5	11,6	11,6

4.8 Μέτρηση πυκνότητας και ειδικού βάρους

Η τιμή Specific Gravity (SG), η οποία υπολογίζεται με την βοήθεια του ενός εκ των δύο μηχανημάτων, ορίζεται ως ο λόγος της πυκνότητας ενός υλικού προς την πυκνότητα του νερού στους 20° C (Rasmussen, 2005). Η τελευταία τιμή υπολογίζεται ως 0,9982g/ml, ή $\approx 1,0\text{g/ml}$. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των δύο μετρήσεων, της πυκνότητας και του SG, είναι αρκετά παρόμοια, κάτι που επιβεβαιώνεται από τον Πίνακα 4.7. Παρατηρείται αρκετά μικρή διακύμανση μεταξύ των τιμών. Συνεπώς, η

πυκνότητα και το ειδικό βάρος των δειγμάτων παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Πίνακας 4.7: Αριθμητικές τιμές πυκνότητας και ειδικού βάρους

Πυκνότητα και SG δειγμάτων						
Ημέρα	Δείγμα A (100% πετιμέζι)		Δείγμα B ((50% πετιμέζι-50% χαρουπόμελο)		Δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο)	
	SG	Density(g/ml)	SG	Density(g/ml)	SG	Density(g/ml)
0	1.2896	1.2898	1.2959	1.2965	1.2965	1.2948
15	1.2725	1.2527	1.2588	1.2568	1.2640	1.2622
30	1.2538	1.2516	1.2582	1.2569	1.2640	1.2625
45	1.2600	1.2581	1.2630	1.2615	1.2644	1.2627
60	1.2601	1.2580	1.2589	1.2569	1.2656	1.2643
60 XA	1.2699	1.2676				

4.9 Μέτρηση Χρώματος

Λαμβάνοντας υπόψιν τα δείγματα την ημέρα 0, τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως δείγματα αναφοράς (control), παρουσιάζεται στο Διάγραμμα η μεταβολή του χρώματος για τα δείγματα A, B και Γ κατά την διάρκεια των δύο ζυμώσεων (αλκοολική και οξική ζύμωση), μετρώντας τα κάθε 15 ημέρες. Η μεταβολή του χρώματος υπολογίζεται από τον τύπο:

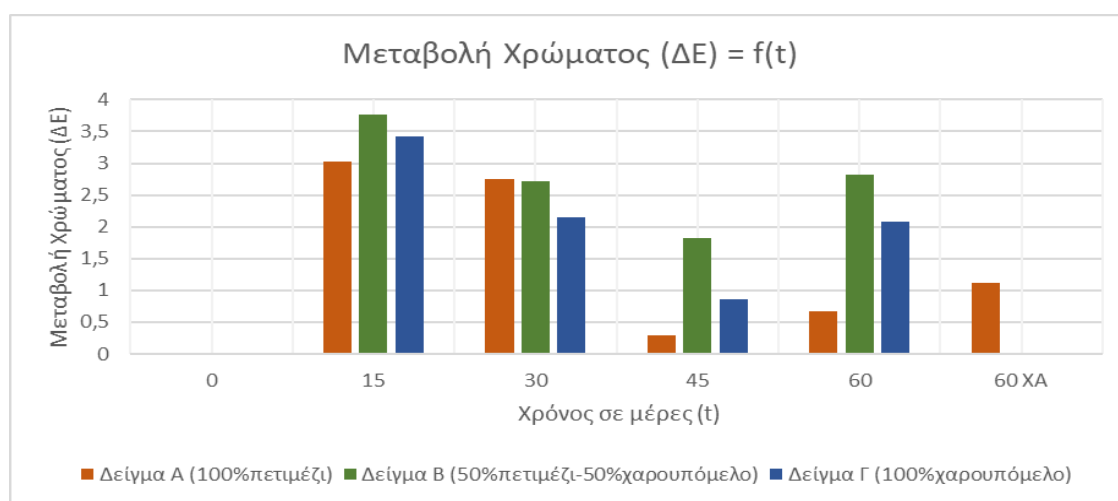
$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}$$

Εικόνα 4.3: Τύπος υπολογισμού συνολικής μεταβολής χρώματος (Yoo et al., 2022)

Για την 15^η και 30^η ημέρα του πειράματος παρουσιάζεται μια σχετικά μικρή μεταβολή στο χρώμα των δειγμάτων, με μικρότερη αυτή του δείγματος A (100% πετιμέζι). Η μέγιστη πτώση διακρίνεται την 45^η ημέρα, όπου διαπιστώνεται σχεδόν υποδιπλασιασμός στις τιμές. Το δείγμα A (100% πετιμέζι) παρουσιάζει ραγδαία μεταβολή και το χρώμα από σχετικά σκουρόχρωμο αλλάζει σε αρκετά ανοιχτό. Ουσιαστικά με την λήξη της αλκοολικής ζύμωσης τροποποιείται και στα τρία δείγματα το χρώμα, το οποίο γίνεται πιο ανοιχτό την 45^η ημέρα, όπου πιθανόν έχει ολοκληρωθεί η οξική ζύμωση. Τέλος τα δείγματα την 60^η ημέρα παρουσιάζουν άλλη μία μεταβολή

στο χρώμα τους, με τη μεγαλύτερη (διπλασιασμός) να εντοπίζεται στο δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο), το οποίο αποκτά ξανά αρκετά πιο σκούρο χρώμα.

Οι αλλαγές του χρώματος πιθανόν οφείλονται στην δράση των μικροοργανισμών που υπάρχουν στα υποστρώματα των δειγμάτων και στην παραγωγή των ποικίλων μεταβολιτών τους. Ακόμη αλλαγές στην συγκέντρωση της αιθανόλης επιδρά στην μεταβολή χρώματος των δειγμάτων (Hanousek Čiča et al., 2020). Στον Πίνακα 4.8 αναφέρονται οι τιμές των παραμέτρων L* (φωτεινότητα), a* (πράσινο-κόκκινο), b* (μπλε-κίτρινο).



Διάγραμμα 4.8: Συνολική μεταβολή χρώματος (ΔΕ) δειγμάτων κατά την διάρκεια της αλκοολικής και οξικής ζύμωσης

Πίνακας 4.8: Αριθμητικές τιμές ολικού φαινολικού περιεχομένου

Ημέρες	Μετρήσεις Χρώματος								
	Δείγμα A (100% πετιμέζι)			Δείγμα B (50% πετιμέζι-50% χαρουπόμελο)			Δείγμα Γ (100% χαρουπόμελο)		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
0	47,277	-0,097	-2,457	45,167	0,1367	-3,207	44,043	0,760	-2,550
15	44,637	1,267	-1,887	42,170	2,2367	-4,127	41,917	2,120	-4,860
30	44,773	1,037	-2,417	43,137	1,8367	-2,623	42,813	2,167	-3,617
45	47,487	-0,177	-2,633	43,643	1,1267	-3,330	44,707	1,273	-2,750
60	46,887	0,070	-1,937	46,340	0,1867	-0,650	43,117	1,653	-4,193
60xA	46,620	0,220	-1,610						



Εικόνα 4.4: Διαφορά χρώματος δειγμάτων, συγκρίνοντας την 30^η με την 45^η ημέρα

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την μελέτη της διπλής (αλκοολικής και οξικής) ζύμωσης προς παραγωγή, αρχικά, αλκοολούχου ροφήματος και μετέπειτα ξυδιού, εξετάστηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των ζυμώσεων και τα χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων, με κύριες πηγές σακχάρων το πετιμέζι, το χαρουπόμελο και μείγμα αυτών. Τόσο τα αλκοολούχα ροφήματα, όσο και τα ξύδια αποτελούν προϊόντα ζύμωσης ύψιστης σημασίας που κατέχουν σημαντική θέση στη διατροφή των ανθρώπων από την αρχαιότητα και απασχολούν τον επιστημονικό κλάδο έως και σήμερα.

Αρχικά, συμπεραίνεται ότι το πετιμέζι και το χαρουπόμελο, που αποτελούν τις πρώτες ύλες, περιέχουν ζυμωμένα σάκχαρα, τα οποία μετατρέπονται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα με την βοήθεια του *S. cerevisiae*, καθιστώντας δυνατή την πραγματοποίηση της αλκοολικής και κατά συνέπεια της οξικής ζύμωσης. Αυτό επιβεβαιώνεται από τις μετρήσεις αλκοόλης, το ποσοστό της οποίας αυξάνεται κατά την αλκοολική ζύμωση (30^η ημέρα) και μειώνεται με στατιστικά σημαντική διαφορά κατά την οξική (45^η ημέρα). Οι δύο πρώτες ύλες παρουσιάζουν παρόμοιο ποσοστό ολικών σακχάρων (περίπου 73°Brix).

Όσον αφορά το μικροβίωμα της αλκοολικής ζύμωσης, διαπιστώνεται πως οι ζύμες αναπτύσσονται καλύτερα παρουσία πετιμεζιού σε σύγκριση με το χαρουπόμελο, διότι, το τελευταίο περιέχει υψηλή συγκέντρωση D-πινιτόλης, καθώς και υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο, τα οποία επηρεάζουν κατασταλτικά την ανάπτυξη των ζυμών. Η παρουσία των οξικών βακτηρίων (AAB) κατά τη διάρκεια της οξικής ζύμωσης, κρίνεται αδιαμφισβήτητη λόγω μείωσης του pH, αύξησης της οξύτητας και κατανάλωσης της αλκοόλης, παρά την δυσκολία απομόνωσης και ταυτοποίησης τους. Εκτός από τους κύριους μικροοργανισμούς των ζυμώσεων (ζύμες, AAB), επιβεβαιώνεται η παρουσία και δράση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (LAB), τα οποία μέχρι και το τέλος των ζυμώσεων μεταβολίζουν μέρος των υπαρχόντων σακχάρων προς οξέα, μειώνοντας το pH.

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικού φαινολικού περιεχομένου εντοπίζεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, με μέγιστη τιμή στην 15^η ημέρα. Αυτό, οφείλεται στην διάσπαση του μεγαλύτερου ποσοστού πολύπλοκων φαινολικών ενώσεων, σε απλούστερα μόρια. Τα υπό εξέταση δείγματα, τα οποία είναι προϊόντα πλούσια σε φαινολικές ενώσεις και διαθέτουν, κυρίως αντιοξειδωτικές ιδιότητες, διατηρούν τα χαρακτηριστικά αυτά, χωρίς να υποβαθμίζονται καθ'όλη τη διάρκεια των

ζυμώσεων. Η προσθήκη χαρουπόμελου δεκαπλασιάζει το ποσοστό των περιεχόμενων πολυφαινολών σε σχέση με το πετιμέζι. Με την έναρξη της οξικής ζύμωσης, το ποσοστό των φαινολικών ενώσεων μειώνεται, εξαιτίας της δράσης των οξικών βακτηρίων, που αποικοδομούν τις μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις σε άλλους μεταβολίτες.

Περιορισμοί της μελέτης

Βάσει των παραπάνω, συμπεραίνεται πως η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε λίγο πριν το τέλος των 30 ημερών. Επιπλέον, η οξική ζύμωση διήρκησε μέχρι την 45^η ημέρα, έπειτα από την οποία, η οξύτητα μειώθηκε ραγδαία. Αυτή η ραγδαία μείωση της οξύτητας συνδυαστικά με την απουσία αλκοόλης (αιθανόλης) στα δείγματα την 60^η ημέρα, υποδηλώνει την πιθανή υπεροξείδωση των προϊόντων. Η επιτάχυνση της οξικής ζύμωσης προκλήθηκε από την προσθήκη μηχανισμού αέρα, ο οποίος είτε θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί για λιγότερο χρονικό διάστημα, είτε να παραληφθεί. Τα δεδομένα αυτά καθιστούν τις ζυμώσεις αυθόρμητες.

Πρόταση για μελλοντική έρευνα

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος χαρακτηρίζονται ως ασφαλή (Generally Regarded as Safe, GRAS) και προάγουν την προβιοτική δράση και τις ευεργετικές επιδράσεις που αυτά προσφέρουν στην υγεία των καταναλωτών. Επομένως, αφού έχει αποδειχθεί η παρουσία τους κατά την οξική ζύμωση, μία πρόταση για μελλοντική μελέτη θα μπορούσε να αποτελέσει η ανάπτυξη προϊόντων ξυδιού με προβιοτικές ιδιότητες. Οι έρευνες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην ενίσχυση της βιωσιμότητας των LAB, τον εντοπισμό στελεχών που διαθέτουν τις μέγιστες προβιοτικές ιδιότητες και την κατάλληλη δοσολογία τους, για να διασφαλιστούν τα λειτουργικά οφέλη.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adachi, O., Miyagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K., & Ameyama, M. (1978). Purification and Properties of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(12), 2331–2340. <https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863357>
- Adachi, O., Moonmangmee, D., Toyama, H., Yamada, M., Shinagawa, E., & Matsushita, K. (2003). New developments in oxidative fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(6), 643–653. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1155-9>
- Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, E., Matsushita, K., & Ameyama, M. (1978). Purification and Characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(11), 2045–2056. <https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863306>
- Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, E., Matsushita, K., & Ameyama, M. (1980). Purification and Characterization of Membrane-bound Aldehyde Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(3), 503–515. <https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10863997>
- Administration, U. S. S. and E. (1980). *Beekeeping in the United States*. U.S. Department of Agriculture.
- Alves, A. A. R., Barros, E. B. P., & Rezende, C. M. (2014). Chapter 78—Method Development and Optimization of Liquid–Liquid Extraction for the Quantitative Analysis of Volatile Compounds from Brazilian Grape Juices. In V. Ferreira & R. Lopez (Eds.), *Flavour Science* (pp. 417–421). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398549-1.00078-7>
- Ameyama, M., Matsushita, K., Shinagawa, E., Hayashi, M., & Adachi, O. (1988). Pyrroloquinoline quinone: Excretion by methylotrophs and growth stimulation for microorganisms. *BioFactors (Oxford, England)*, 1(1), 51–53.
- Andlauer, W., Stumpf, C., & Fürst, P. (2000). Influence of the Acetification Process on Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3533–3536. <https://doi.org/10.1021/jf000010j>
- Andrés-Barrao, C., Benagli, C., Chappuis, M., Ortega Pérez, R., Tonolla, M., & Barja, F. (2013). Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting.

Systematic and Applied Microbiology, 36(2), 75–81.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.09.002>

Andrés-Barrao, C., Falquet, L., Calderon-Copete, S. P., Descombes, P., Ortega Pérez, R., & Barja, F. (2011). Genome Sequences of the High-Acetic Acid-Resistant Bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890T and *G. europaeus* LMG 18494 (Reference Strains), *G. europaeus* 5P3, and *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (Isolated from Vinegar). *Journal of Bacteriology*, 193(10), 2670–2671. <https://doi.org/10.1128/jb.00229-11>

Andrés-Barrao, C., Saad, M. M., Cabello Ferrete, E., Bravo, D., Chappuis, M.-L., Ortega Pérez, R., Junier, P., Perret, X., & Barja, F. (2016). Metaproteomics and ultrastructure characterization of *Komagataeibacter* spp. Involved in high-acid spirit vinegar production. *Food Microbiology*, 55, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.012>

Antioxidants | Free Full-Text | Evaluation of Bioactive Compounds and Antioxidative Activity of Fermented Green Tea Produced via One- and Two-Step Fermentation. (n.d.). Retrieved January 11, 2024, from <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/8/1425>

Ayed, L., Ben Abid, S., & Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology*, 67(1), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>

Barnett, J. A. (2003). A history of research on yeasts 5: The fermentation pathway. *Yeast*, 20(6), 509–543. <https://doi.org/10.1002/yea.986>

Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016>

Behera, S. S., Ray, R. C., Das, U., Panda, S. K., & Saranraj, P. (2019). Microorganisms in Fermentation. In A. Berenjian (Ed.), *Essentials in Fermentation Technology* (pp. 1–39). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_1

Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. (n.d.). <https://doi.org/10.1002/elsc.201400199>

Budak, N. H., Aykin, E., Seydim, A. C., Greene, A. K., & Guzel-Seydim, Z. B. (2014). Functional Properties of Vinegar. *Journal of Food Science*, 79(5), R757–R764. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12434>

Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods—A world perspective. *Food Research International*, 27(3), 253–257. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90093-0](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90093-0)

Cañete-Rodríguez, A. M., Santos-Dueñas, I. M., Jiménez-Hornero, J. E., Ehrenreich, A., Liebl, W., & García-García, I. (2016). Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste biovalorization. *Process Biochemistry*, 51(12), 1891–1903. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.08.028>

Catarino, M., & Mendes, A. (2011). Non-alcoholic beer—A new industrial process. *Separation and Purification Technology*, 79(3), 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.03.020>

Chen, Q., Liu, A., Zhao, J., Ouyang, Q., Sun, Z., & Huang, L. (2013). Monitoring vinegar acetic fermentation using a colorimetric sensor array. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 183, 608–616. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.04.033>

Chenault, H. K., Simon, E. S., & Whitesides, G. M. (1988). Cofactor Regeneration for Enzyme-Catalysed Synthesis. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 6(1), 221–270. <https://doi.org/10.1080/02648725.1988.10647849>

Chinnawirotpisan, P., Theeragool, G., Limtong, S., Toyama, H., Adachi, O. O., & Matsushita, K. (2003). Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(6), 564–571. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70150-4](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70150-4)

Cirigliano, M. C. (1982). A Selective Medium for the Isolation and Differentiation of *Gluconobacter* and *Acetobacter*. *Journal of Food Science*, 47(3), 1038–1039. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb12782.x>

Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.4.840-862.2004>

Cleenwerck, I., & De Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.017>

Conner, H. A., & Allgeier, R. J. (1976). Vinegar: Its History and Development. In D. Perlman (Ed.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 20, pp. 81–133). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70110-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70110-2)

Cosmulescu, S., Stoenescu, A.-M., Trandafir, I., & Tuțulescu, F. (2022). Comparison of Chemical Properties between Traditional and Commercial Vinegar. *Horticulturae*, 8(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030225>

De Ley, J. (1958). Studies on the metabolism of *Acetobacter peroxydans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 24(1), 281–297. <https://doi.org/10.1007/BF02548455>

Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., & Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1114-5>

Diba, F., Alam, F., & Talukder, A. A. (2015). Screening of Acetic Acid Producing Microorganisms from Decomposed Fruits for Vinegar Production. *Advances in Microbiology*, 05(05), Article 05. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.55028>

Dickinson, J. R. (Ed.). (2014). *Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces Cerevisiae*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/9781482295405>

Distribution of Ubiquinone 10 and 9 in Acetic Acid Bacteria and Its Relation to the Classification of Genera. (n.d.). Retrieved January 2, 2024, from https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1961/32/6/32_6_786/_article/-char/ja/

Dixon, M., & Webb, E. C. (1960). *Enzymes*. Academic Press.

Donini, Í. A. N., Salvi, D. T. B. D., Fukumoto, F. K., Lustri, W. R., Barud, H. S., Marchetto, R., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. J. L. (2010). Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose. *Eclética Química*, 35, 165–178. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>

Drysdale, G. S., & Fleet, G. H. (1988). Acetic Acid Bacteria in Winemaking: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(2), 143–154. <https://doi.org/10.5344/ajev.1988.39.2.143>

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. *Journal of Applied Bacteriology*, 67(5), 471–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02518.x>

Drysdale, G. S., & Fleet, G. H. (1989). The Growth and Survival of Acetic Acid Bacteria In Wines at Different Concentrations of Oxygen. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(2), 99–105. <https://doi.org/10.5344/ajev.1989.40.2.99>

Du Toit, W. J., & Pretorius, I. S. (2002). The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, 52(2), 155–179.

Duine, J. a., Jzn., J. F., & Van Zeeland, J. k. (1979). Glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEBS Letters*, 108(2), 443–446. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80584-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80584-0)

Dymond, J. S. (2013). Chapter Twelve—*Saccharomyces Cerevisiae* Growth Media. In J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 533, pp. 191–204). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00012-X>

Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., & Suzuki, K.-I. (1985). *ACETOBACTER POLYOXOGENES* SP. NOV., A NEW SPECIES OF AN ACETIC ACID BACTERIUM USEFUL FOR PRODUCING VINEGAR WITH HIGH ACIDITY. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 31(5), 475–490. <https://doi.org/10.2323/jgam.31.475>

Evers, M. S., Ramousse, L., Morge, C., Sparrow, C., Gobert, A., Roullier-Gall, C., & Alexandre, H. (2023). To be or not to be required: Yeast vitaminic requirements in winemaking. *Food Microbiology*, 115, 104330. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104330>

Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S., & Ruiz-Larrea, F. (2010). Rapid molecular methods for enumeration and taxonomical identification of acetic acid bacteria responsible for submerged vinegar production. *European Food Research and Technology*, 231(5), 813–819. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1331-6>

Gancedo, J. M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00573.x>

Gibson, L. J. (2012). The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(76), 2749–2766. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0341>

- Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, *56*(2), 139–151. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>
- Goulas, V., Stylos, E., Chatziathanasiadou, M. V., Mavromoustakos, T., & Tzakos, A. G. (2016). Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(11), 1875. <https://doi.org/10.3390/ijms17111875>
- Greenberg, D. E., Porcella, S. F., Stock, F., Wong, A., Conville, P. S., Murray, P. R., Holland, S. M., & Zelazny, A. M. (2006). *Granulibacter bethesdensis* gen. Nov., sp. Nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family Acetobacteraceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(11), 2609–2616. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64412-0>
- Guillamon, J., González, A., Poblet, M., & Mas, A. (2003). Development of molecular techniques for the analysis of acetic acid bacteria during winemaking. *Yeast-Bacteria Interactions*, *10*, 45–49.
- Guillamón, J. M., & Mas, A. (2009). Acetic Acid Bacteria. In H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 31–46). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_2
- Guiné, R. P. F., Barroca, M. J., Coldea, T. E., Bartkiene, E., & Anjos, O. (2021). Apple Fermented Products: An Overview of Technology, Properties and Health Effects. *Processes*, *9*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/pr9020223>
- Gullo, M., & Giudici, P. (2008). Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology*, *125*(1), 46–53. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.003>
- Hanousek Čiča, K., Mrvčić, J., Srečec, S., Filipan, K., Blažić, M., & Stanzer, D. (2020). Physicochemical and aromatic characterization of carob macerates produced by different maceration conditions. *Food Science & Nutrition*, *8*(2), 942–954. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1374>

Hromatka, O., & Ebner, H. (2002, May 1). *Vinegar by Submerged Oxidative Fermentation* (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ie50598a033>

Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto Jr., Lubert Stryer *Biochemistry*. (n.d.). Retrieved December 28, 2023, from http://archive.org/details/JeremyM.BergJohnL.TymoczkoGregoryJ.GattoJr.LubertStryerBiochemistry_201802

Joslyn, M. A. (1951). Nutrient requirements of yeast. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 5(2), 260–276. <https://doi.org/10.1007/BF02142298>

Kim, D.-H., Chon, J.-W., Kim, H., & Seo, K.-H. (2019). Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid bacteria from various foods. *Food Control*, 106, 106717. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106717>

Kime, R., Lee, C., & McLellan, M. (1991). An Improved Method of Mead Production. In *NY State Agricultural Experiment Station*.

Kittelman, M., Stamm, W. W., Follmann, H., & Trüper, H. G. (1989). Isolation and classification of acetic acid bacteria from high percentage vinegar fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 47–52. <https://doi.org/10.1007/BF00255995>

Kösebalaban, F., & Özilgen, M. (1992). Kinetics of wine spoilage by acetic acid bacteria. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 55(1), 59–63. <https://doi.org/10.1002/jctb.280550110>

Kuo, C.-H., Chen, J.-H., Liou, B.-K., & Lee, C.-K. (2016). Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Food Hydrocolloids*, 53, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.034>

Maicas, S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

Mamlouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377–384. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0414-z>

- Marín, A., Plotto, A., Atarés, L., & Chiralt, A. (2019). Lactic Acid Bacteria Incorporated into Edible Coatings to Control Fungal Growth and Maintain Postharvest Quality of Grapes. *HortScience*, *54*(2), 337–343. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13661-18>
- Marques, F. P. P., Spinosa, W., Fernandes, K. F., Castro, C. F. de S., & Caliari, M. (2010). Quality pattern and identity of commercial fruit and vegetable vinegar (Acetic acid fermentation). *Food Science and Technology*, *30*, 119–126. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500019>
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, *38*, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
- Mas, A., Torija, M. J., García-Parrilla, M. del C., & Troncoso, A. M. (2014). Acetic Acid Bacteria and the Production and Quality of Wine Vinegar. *The Scientific World Journal*, *2014*, e394671. <https://doi.org/10.1155/2014/394671>
- Matsushita, K., Toyama, H., & Adachi, O. (1994). Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, *36*, 247–301. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60181-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60181-2)
- Mensah, A., Chen, Y., Christopher, N., & Wei, Q. (2022). Membrane Technological Pathways and Inherent Structure of Bacterial Cellulose Composites for Drug Delivery. *Bioengineering*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9010003>
- Mills, D. A., Phister, T., Neeley, E., & Johannsen, E. (2008). Wine Fermentation. In L. Cocolin & D. Ercolini (Eds.), *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods* (pp. 162–192). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74520-6_6
- Mohammadkazemi, F., Azin, M., & Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers*, *117*, 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.008>
- Montet, D., & Ray, R. C. (2016). *Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Tassinari Ortolani, M. B., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(9), 1320–1324. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.005>

- Mounir, M., Shafiei, R., Zarmehrkhoshid, R., Hamouda, A., Ismaili Alaoui, M., & Thonart, P. (2016). Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *121*(2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.06.005>
- Nakano, S., & Fukaya, M. (2008). Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: Molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *125*(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.015>
- Nanba, A. (1984). Synergistic Effects of Acetic Acid and Ethanol on the Growth of *Acetobacter* sp. : *Journal of Fermentation Technology*, *62*(6), 501–505.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., & Murooka, Y. (2001). Characterization of Acetic Acid Bacteria in Traditional Acetic Acid Fermentation of Rice Vinegar (Komesu) and Unpolished Rice Vinegar (Kurosu) Produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(2), 986–990. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.986-990.2001>
- Narendranath, N. V., & Power, R. (2005). Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(5), 2239–2243. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2239-2243.2005>
- Nogueira, A., Guyot, S., Marnet, N., Lequ  r  , J. M., Drilleau, J.-F., & Wosiacki, G. (2008). Effect of alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *51*, 1025–1032. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000500020>
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature of electron-transfer proteins. Recommendations 1989. (1992). *Journal of Biological Chemistry*, *267*(1), 665–677. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48544-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48544-4)
- Onyema, V. O., Amadi, O. C., Moneke, A. N., & Agu, R. C. (2023). A Brief Review: *Saccharomyces cerevisiae* Biodiversity Potential and Promising Cell Factories for Exploitation in Biotechnology and Industry Processes – West African Natural Yeasts Contribution. *Food Chemistry Advances*, *2*, 100162. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100162>

- Paulissen, S. M., & Huang, L. S. (2016). Efficient Sporulation of *Saccharomyces cerevisiae* in a 96 Multiwell Format. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 115, 54584. <https://doi.org/10.3791/54584>
- Potočnik, V., Gorgieva, S., & Trček, J. (2023). From Nature to Lab: Sustainable Bacterial Cellulose Production and Modification with Synthetic Biology. *Polymers*, 15(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/polym15163466>
- Rasmussen, T. (2005). Specific Gravity. In *Water Encyclopedia* (pp. 473–475). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/047147844X.gw1076>
- Raspor, P., & Goranovič, D. (2008). Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101–124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>
- Ray, R. C., & Didier, M. (2014). *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*. CRC Press.
- Rezaei, M., Alizadeh Khaledabad, M., Moghaddas Kia, E., & Ghasempour, Z. (2020). Optimization of grape juice deacidification using mixture of adsorbents: A case study of Pekmez. *Food Science & Nutrition*, 8(6), 2864–2874. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1586>
- Robertson, A. R. (1977). The CIE 1976 Color-Difference Formulae. *Color Research & Application*, 2(1), 7–11. <https://doi.org/10.1002/j.1520-6378.1977.tb00104.x>
- Rodionova, M. V., Poudyal, R. S., Tiwari, I., Voloshin, R. A., Zharmukhamedov, S. K., Nam, H. G., Zayadan, B. K., Bruce, B. D., Hou, H. J. M., & Allakhverdiev, S. I. (2017). Biofuel production: Challenges and opportunities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8450–8461. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.125>
- Sahoo, B. K., Mishra, R. R., & Behera, B. C. (n.d.). *Isolation and Identification of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria from Waste Fruits*. 9(2).
- Sainz, F., Navarro, D., Mateo, E., Torija, M. J., & Mas, A. (2016). Comparison of d-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.015>
- Schwan, R., Silva, C., & Batista, L. (2012). *Coffee Fermentation* (pp. 677–690). <https://doi.org/10.1201/b12055-49>

- Sengun, I. Y., & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.008>
- Shortall, K., Djeghader, A., Magner, E., & Soulimane, T. (2021). Insights into Aldehyde Dehydrogenase Enzymes: A Structural Perspective. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.659550>
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., & Teuber, M. (1995). Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), 590–594. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80420-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80420-0)
- Song, N.-E., Cho, S.-H., & Baik, S.-H. (2016). Microbial community, and biochemical and physiological properties of Korean traditional black raspberry (*Robus coreanus* Miquel) vinegar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(11), 3723–3730. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7560>
- Soni, S., & Dey, G. (2014). Perspectives on global fermented foods. *British Food Journal*, 116(11), 1767–1787. <https://doi.org/10.1108/BFJ-01-2014-0032>
- Subramanian, R., Umesh Hebbar, H., & Rastogi, N. K. (2007). Processing of Honey: A Review. *International Journal of Food Properties*, 10(1), 127–143. <https://doi.org/10.1080/10942910600981708>
- Suchintita Das, R., Tiwari, B. K., & Garcia-Vaquero, M. (2023). The Fundamentals of Bread Making: The Science of Bread. In M. Garcia-Vaquero, K. Pastor, G. E. Orhun, A. McElhatton, & J. M. F. Rocha (Eds.), *Traditional European Breads: An Illustrative Compendium of Ancestral Knowledge and Cultural Heritage* (pp. 1–40). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23352-4_1
- Takemura, H., Kondo, K., Horinouchi, S., & Beppu, T. (1993). Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurianus*. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 6857–6866. <https://doi.org/10.1128/jb.175.21.6857-6866.1993>
- Tamaki, T., Fukaya, M., Takemura, H., Tayama, K., Okumura, H., Kawamura, Y., Nishiyama, M., Horinouchi, S., & Beppu, T. (1991). Cloning and sequencing of the gene cluster encoding two subunits of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*.

Biochimica Et Biophysica Acta, 1088(2), 292–300. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(91\)90066-u](https://doi.org/10.1016/0167-4781(91)90066-u)

Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/532852>

Tesnière, C., Brice, C., & Blondin, B. (2015). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 7025–7034. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6810-z>

Tipton, K., & Boyce, S. (2000). History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics*, 16(1), 34–40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.1.34>

Toone, E. J. (2011). *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Volume 77*. John Wiley & Sons.

Toufeili, I., Itani, M., Zeidan, M., Al Yamani, O., & Kharroubi, S. (2022). Nutritional and Functional Potential of Carob Syrup Versus Date and Maple Syrups. *Food Technology and Biotechnology*, 60(2), 266–278. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.02.22.7419>

Trček, J., & Barja, F. (2015). Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.003>

Trček, J., Mahnič, A., & Rupnik, M. (2016). Diversity of the microbiota involved in wine and organic apple cider submerged vinegar production as revealed by DHPLC analysis and next-generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.007>

Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. T. (2021). Production of Bioethanol—A Review of Factors Affecting Ethanol Yield. *Fermentation*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>

Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., & Mateo, E. (2015). Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiology*, 46, 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.006>

- Vegas, C., Mateo, E., González, Á., Jara, C., Guillamón, J. M., Poblet, M., Torija, M. J., & Mas, A. (2010). Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology*, *138*(1), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.006>
- Vidrih, R., & Hribar, J. (2016). Mead: The Oldest Alcoholic Beverage. In K. Kristbergsson & J. Oliveira (Eds.), *Traditional Foods: General and Consumer Aspects* (pp. 325–338). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7648-2_26
- Voidarou, C., Antoniadou, M., Rozos, G., Tzora, A., Skoufos, I., Varzakas, T., Lagiou, A., & Bezirtzoglou, E. (2020). Fermentative Foods: Microbiology, Biochemistry, Potential Human Health Benefits and Public Health Issues. *Foods*, *10*(1), 69. <https://doi.org/10.3390/foods10010069>
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, *2*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Wang, B., Shao, Y., & Chen, F. (2015). Overview on mechanisms of acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(2), 255–263. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1799-0>
- Wen, H., He, Y., Zhang, K., Yang, X., Hao, D., Jiang, Y., & He, B. (2020). Mini-review: Functions and Action Mechanisms of PQQ in Osteoporosis and Neuro Injury. *Current Stem Cell Research & Therapy*, *15*(1), 32–36. <https://doi.org/10.2174/1574888X14666181210165539>
- Williams, W. S., & Cannon, R. E. (1989). Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(10), 2448–2452. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2448-2452.1989>
- Wong, C. H., & Whitesides, G. M. (2002, May 1). *Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration using ethanol/alcohol dehydrogenase/aldehyde dehydrogenase and methanol/alcohol dehydrogenase/aldehyde dehydrogenase/formate dehydrogenase* (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jo00135a037>
- Wood, B. J. (2012). *Microbiology of Fermented Foods*. Springer Science & Business Media.
- Wu, J. J., Ma, Y. K., Zhang, F. F., & Chen, F. S. (2012). Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of “Shanxi aged vinegar”, a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiology*, *30*(1), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.010>

Yamada, Y., Aida, K., & Uemura, T. (1969). Enzymatic Studies on the Oxidation of Sugar and Sugar Alcohol. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 15(2), 181–196. <https://doi.org/10.2323/jgam.15.181>

Yamada, Y., & Kondo, K. (1984). *GLUCONOACETOBACTER*, A NEW SUBGENUS COMPRISING THE ACETATE-OXIDIZING ACETIC ACID BACTERIA WITH UBIQUINONE-10 IN THE GENUS *ACETOBACTER*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 30(4), 297–303. <https://doi.org/10.2323/jgam.30.297>

Yamada, Y., & Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.077>

Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., & Nakagawa, Y. (2012). Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: The proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria. *Annals of Microbiology*, 62(2), Article 2. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0288-4>

Yamashita, S., & Yamamoto, Y. (1997). Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as a marker of oxidative stress. *Analytical Biochemistry*, 250(1), 66–73. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2187>

Yatmaz, E., & Turhan, I. (2018). Carob as a carbon source for fermentation technology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.006>

Yetiman, A. E., & Kesmen, Z. (2015). Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.013>

Zamora, F. (2009). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 3–26). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_1

Zimbro, M. J. (Ed.). (2009). *Difco & BBL Manual: Manual of microbiological culture media* (2. ed). Becton, Dickinson.

Zou, B., Wu, J., Yu, Y., Xiao, G., & Xu, Y. (2017). Evolution of the antioxidant capacity and phenolic contents of persimmon during fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 26(3), 563–571. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0099-x>