



Technologia i mikrobiologia fermentacji octowej

Jerzy Czuba

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa

Technology and microbiology of acetic acid fermentation

Summary

Vinegar producing is one of the oldest processes of biotechnology. It consists of double fermentation, alcoholic and acetous. There are three groups of methods of acetous fermentation: surface, trickling and submerge. They are well elaborated from technological and technical points of view, but the taxonomy and methods for identification of the bacteria active in technical processes are still open. According to the results of molecular researches, the new genus *Gluconacetobacter* (characterised by requirement of the acetic acid for growing and lack of ability to oxidise acetic acid to CO_2 and H_2O – the main features of genus *Acetobacter*) was separated from acetic acid bacteria group. However, the results of few experiments showed that these phenotypic features (characteristic for the genus *Gluconacetobacter*) could be changed in to the features characteristic for genus *Acetobacter* by special procedure of growing. It is a question of how the differences between the same bacteria with different phenotypes would be identified by molecular methods.

Key words:

vinegar, technology, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*.

Adres do korespondencji

Jerzy Czuba,
Instytut Biotechnologii
Przemysłu
Rolno-Spożywczego,
ul. Rakowiecka 36,
02-532 Warszawa.

1. Wstęp

Obok fermentacji alkoholowej i mlekowej jednym z najstarszych procesów biotechnologicznych wykorzystywanych przez człowieka jest fermentacja octowa. Pierwszy ocet był prawdopodobnie niezamierzonym produktem powstałym w wyniku niewłaściwego przebiegu procesu wytwarzania napoju alkoholowego. Potwierdzeniem takiej tezy może być wytwarzanie octu,

w różnych regionach świata, z tych samych surowców co tradycyjnych napojów alkoholowych, np. octu winnego w krajach śródziemnomorskich, octu słodowego w Wielkiej Brytanii, octu ryżowego w krajach Dalekiego Wschodu.

Ocet jest produktem otrzymanym wyłącznie w procesie biologicznym poprzez następujące po sobie fermentacje alkoholową i octową z surowców pochodzenia rolniczego. Nazwą ocet nie może być znakowany roztwór syntetycznego kwasu octowego lub mieszanina octu i syntetycznego kwasu octowego (1).

Istnieje wiele udokumentowanych informacji (2), że już w starożytności ocet, zdefiniowany w ten sposób, był wykorzystywany jako popularna przyprawa, środek konserwujący, napój orzeźwiający czy rozpuszczalnik. Był także szeroko stosowany w medycynie, kosmetyce i chemii. W związku z rozwojem różnych dziedzin wiedzy (nauki o żywności, medycyny, farmacji, chemii) niektóre funkcje octu przejęły inne produkty, ale nadal pełni on rolę samodzielnej przyprawy, ważnego składnika określonych produktów spożywczych (musztard, różnych sosów, dresingów, marynat itp.) oraz konserwanta, jest nadal składnikiem niektórych wyrobów farmaceutycznych i kosmetycznych, a także ważnym elementem medycyny ludowej.

Roczne zapotrzebowanie mieszkańca krajów uprzemysłowionych ocenia się w przybliżeniu na około 1 litr w przeliczeniu na ocet o kwasowości 10 g/100 ml (3). Kwasowość octu może być różna, przy czym minimalna, dopuszczona europejską normą, kwasowość wynosi 5 g/100 ml, a dla octu winnego 6 g/100 ml (1). Ocet spirytusowy w porównaniu z innymi jego rodzajami charakteryzuje się na ogół wyższą kwasowością (od 10 do 18 g/100 ml). Między innymi z uwagi na wygodę stosowania wynikającą z wysokiej kwasowości, jest on najchętniej wykorzystywany w przetwórstwie żywności. To z kolei jest przyczyną największej jego produkcji, np. w Unii Europejskiej ponad 60% produkcji octu stanowi właśnie ten jego rodzaj (4).

2. Technologia octownictwa

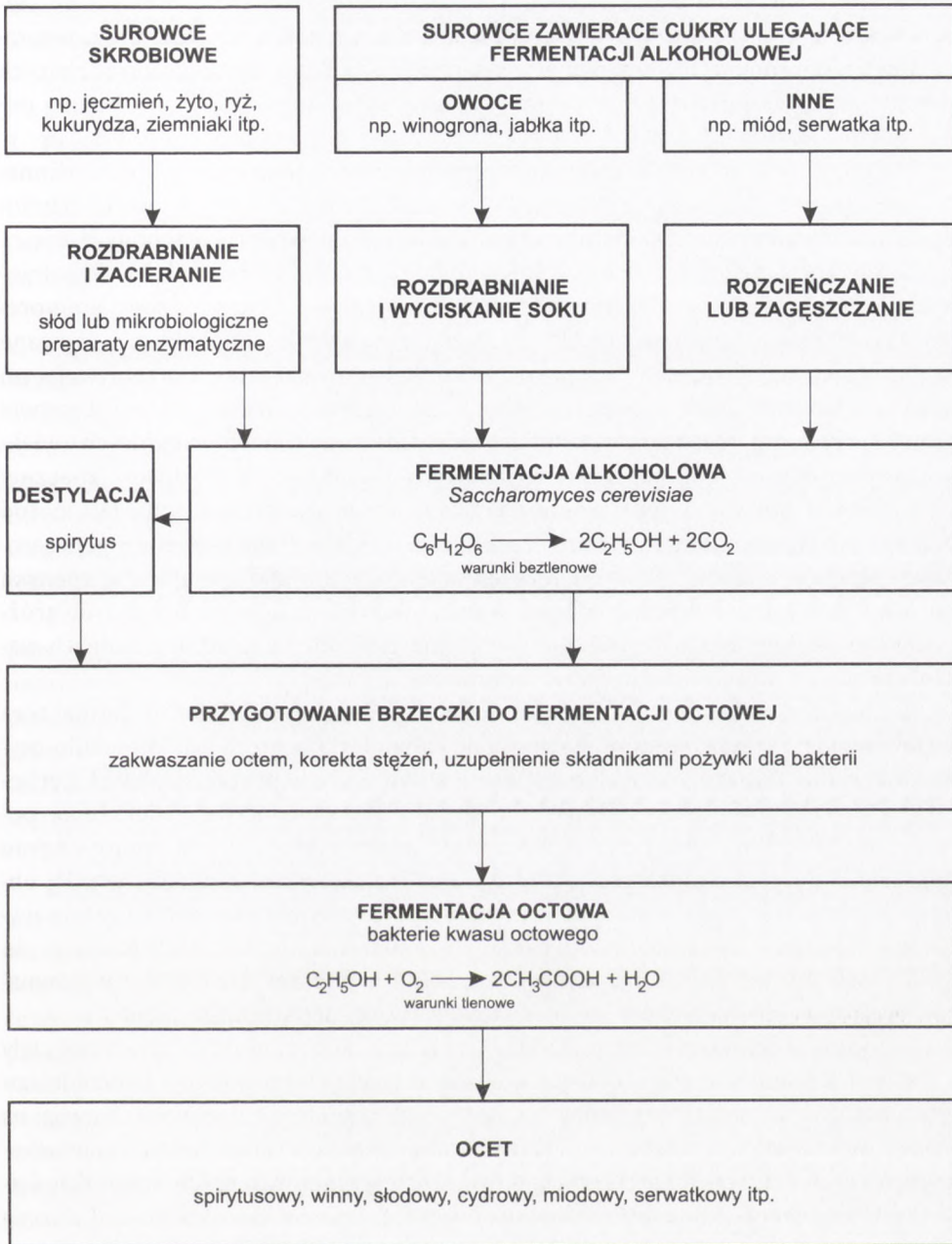
Szacuje się, że ocet jako zamierzony produkt otrzymywany jest od ponad 10 000 lat (2).

Do produkcji octu mogą być stosowane różne surowce pochodzenia rolniczego, zawierające węglowodany lub alkohol. Ogólne zasady otrzymywania octu z różnych surowców przedstawiono na rysunku.

Bakterie kwasu octowego mogą wykorzystywać tlen rozpuszczony w fermentującej cieczy. W miarę przebiegu procesu biosyntezy kwasu octowego tlen rozpuszczony w środowisku jest zużywany, należy zatem stworzyć warunki jego stałego dopływu z fazy gazowej do ciekłej.

Szybkość przenoszenia tlenu z powietrza do fermentującego środowiska, limitująca najczęściej szybkość fermentacji, zależy od sposobu kontaktowania tych faz.

W zależności od sposobu kontaktowania fazy ciekłej z fazą gazową metody fermentacji octowej można podzielić na trzy zasadnicze grupy: powierzchniowe, ociekowe i wgłębne.



Rys. Ogólne zasady otrzymywania octu z różnych surowców.

W metodach powierzchniowych, swobodna powierzchnia cieczy stanowi powierzchnię kontaktów międzyfazowych. Przez tę powierzchnię tlen wnika do cieczy. Bakterie kwasu octowego, w formie kożuszka, rozwijają się w strefie powierzchniowej. Wnikający tlen jest natychmiast zużywany i nie dochodzi do głębszych warstw cieczy. Intensywność fermentacji zależy zatem od wielkości swobodnej powierzchni cieczy.

Metody powierzchniowe znajdują zastosowanie przy wytwarzaniu octu winnego, owocowego, słodowego i innych o kwasowości do 8 g/100 ml. Do powierzchniowych metod należy zaliczyć metodę orleańską, metodę Pasteura i ich modyfikacje.

Fermentacja metodami ociekowymi, prowadzona jest w zbiornikach wypełnionych, w całości lub w części, porowatym materiałem – najczęściej specjalnie preparowanymi wiórami bukowymi. Unieruchomione w wypełnieniu bakterie omywane są ociekającą brzeczką, która jest w stałym kontakcie z powietrzem przepływającym w przeciwnym kierunku przez przestrzeń roboczą bioreaktora. Dzięki cienkiej warstwie cieczy spływającej po dużej powierzchni, uzyskano w metodach ociekowych zwiększenie powierzchni kontaktów międzyfazowych, a tym samym możliwość znacznej intensyfikacji procesu w porównaniu z metodami powierzchniowymi. Do metod ociekowych należy zaliczyć stosowaną jeszcze w wielu krajach metodę generatorową. Metody ociekowe mają tę niedogodność, że warunki panujące w różnych punktach przestrzeni wypełnionej porowatym materiałem są w istotny sposób zróżnicowane. W niektórych strefach mogą one znacznie odbiegać od optymalnych warunków dla rozwoju bakterii kwasu octowego.

Niedogodność ta nie występuje w metodach wgłębnych. Zbiornik fermentora napełniony jest cieczą, w której zawieszony jest komórkami bakterii (5). Mieszadło oryginalnie skonstruowane zasysa i rozprowadza powietrze w postaci drobnych pęcherzyków w całej objętości cieczy. W ten sposób uzyskano dalsze zwiększenie powierzchni kontaktu między cieczą a tlenem atmosferycznym. Dzięki intensywnemu mieszaniu stworzono możliwość utrzymywania jednakowych warunków w całej objętości fermentowanej cieczy. Zwiększenie szybkości fermentacji jest tu zatem wynikiem, nie tylko zwiększenia szybkości przenoszenia tlenu z fazy gazowej do cieklej, ale także zwiększenia aktywności bakterii poprzez stworzenie wyrównanych, korzystnych warunków środowiskowych w każdej strefie fermentora.

Fermentacja octowa prowadzona jest w warunkach niesterylnych, w sposób półciągły – bakterie zawarte w części środowiska, pozostawianej w fermentorze z poprzedniego cyklu, stanowią materiał szczepienny dla następnego cyklu fermentacyjnego. Z uwagi na kłopotliwe uruchamianie fermentacji, szczególnie przy zastosowaniu metod z unieruchomionymi drobnoustrojami, fermentacja prowadzona jest miesiącami lub nawet dziesiątkami lat bez przerw. Niskie pH środowiska i wysokie stężenie kwasu octowego chronią proces przed rozwojem innych, niż bakterie kwasu octowego, drobnoustrojów dostających się z otoczenia wraz z wprowadzonym do fermentorów powietrzem.

Metoda wgłębna stwarza warunki naturalnej selekcji bakterii w kierunku eliminacji szczepów gorzej przystosowanych do warunków przebiegu procesu. Z jednej

strony prowadzi to do poprawy wskaźników technologicznych procesu, a z drugiej, stwarza realną groźbę załamania fermentacji w wyniku rozwoju specyficznych bakteriofagów (6).

3. Fenotypowa charakterystyka bakterii kwasu octowego

W 1864 r. Ludwik Pasteur wykazał, że fermentację octową wywołują bakterie. Do tego momentu, przez wiele tysięcy lat, człowiek wykorzystywał je nieświadomie.

Bakterie kwasu octowego to gramujemne, elipsoidalne lub pałeczkowate komórki o długości od 1 do 4 μm , występujące pojedynczo, parami lub w łańcuskach. W zależności od gatunku mogą być ruchliwe, lub nie, z rzęskami, lub polarnie usytuowaną wicią. Do tej grupy bakterii do niedawna zaliczano tylko dwa rodzaje *Gluconobacter* i *Acetobacter*. Bakterie obu tych rodzajów utleniają etanol do kwasu octowego, jednak tylko bakterie rodzaju *Acetobacter* mogą dalej utleniać kwas octowy do CO_2 i H_2O . Ta cecha oraz równoległa z nią zdolność utleniania także kwasu mlekowego do dwutlenku węgla i wody jest wykorzystywana do różnicowania tych dwóch rodzajów.

Cecha ta w procesie produkcji wysokoprocentowego octu (końcowa kwasowość powyżej 10 g/100 ml) na ogół nie ujawnia się, gdyż utlenianie kwasu octowego, tzw. nadoksydacja, jest hamowana niskim pH oraz obecnością etanolu. Cykl fermentacji przebiega w warunkach silnie kwaśnego środowiska (pH 2-3), i kończy się przed całkowitym odfermentowaniem etanolu. Populacje bakterii występujące w procesach przemysłowych na ogół stanowią nadal nie zidentyfikowane populacje drobnoustrojów pochodzących z poprzednich cykli produkcyjnych i zawierają nie znane gatunki i szczepy bakterii kwasu octowego.

Identyfikacja bakterii *Acetobacter* i *Gluconobacter* występujących w naturze nie nastręcza większych trudności, natomiast identyfikacja bakterii czynnych w procesie otrzymywania wysokoprocentowego octu budziła i nadal budzi wiele kontrowersji. Powodem tego są trudności występujące już na etapie ich izolacji i hodowli w warunkach laboratoryjnych. Bakterie odpowiedzialne za prawidłowy przebieg procesu produkcyjnego nie rosną na powszechnie stosowanych laboratoryjnych podłożach (7-10).

Prawdopodobnie w wyniku doskonalenia technologii, którego efektem było otrzymywanie octu o coraz wyższej zawartości kwasu octowego oraz stosowanej zasady uruchamiania fermentacji przy użyciu tzw. octu zarodowego, pochodzącego z innego fermentora, człowiek nieświadomie stworzył warunki przyspieszające naturalną ewolucję tych mikroorganizmów polegającą na przystosowaniu do wzrostu w środowisku zawierającym coraz wyższe stężenia kwasu octowego.

W Japonii opracowano podłoże dwuwarstwowe (11), przydatne do izolacji i hodowli bakterii kwasu octowego odpowiedzialnych za utlenianie etanolu do kwasu

octowego w procesie produkcji wysokoprocentowego octu. Podłoże to nie w każdym przypadku dawało pozytywny efekt (12), jednak jego zastosowanie pozwoliło na wyizolowanie kilku nowych gatunków bakterii kwasu octowego oraz na ich charakterystykę zarówno przy użyciu testów biochemicznych jak i metodami molekularnymi.

4. Genotypowe metody identyfikacji bakterii kwasu octowego

Zastosowanie metod molekularnych powinno usunąć wątpliwości w zakresie klasyfikacji i identyfikacji bakterii kwasu octowego. Metody takie, od kilku już lat, są przedmiotem zainteresowania badaczy tej grupy bakterii (12-14). W badaniach tych stosowane są metody polegające na analizie genów rybosomalnego RNA, intergenicznych regionów, konstrukcji specyficznych sond DNA, analizie profili plazmidowych oraz analizie specyficznych insercyjnych sekwencji itd. (15,16). W 1992 r. z fermentorów eksploatowanych w Europie wyizolowano nowy gatunek *Acetobacter europaeus* – sugerowano, że jest to dominujący gatunek w przemysłowych bioreaktorach do produkcji octu (13). Niedawno opublikowano opis czterech kolejnych nowych gatunków wyizolowanych także z bioreaktorów produkujących wysokoprocentowy ocet (17-19).

Na podstawie analizy podobieństwa sekwencji genów 16S-rRNA Yamada (20,21) zaproponował wydzielenie nowego rodzaju – *Gluconacetobacter* – w ramach grupy bakterii kwasu octowego. Utworzono filogenetyczne drzewo oddające pozycje gatunków w ramach rodzajów *Acetobacter*, *Acetimonas*, *Gluconacetobacter* i *Gluconobacter* (18). Rodzajem *Gluconacetobacter* objęto następujące gatunki bakterii: *Gluconacetobacter oboediens* (19), *Ga. hansenii*, *Ga. entanii* (18), *Ga. europaeus* (13), *Ga. xylinus*, *Ga. diazotrophicus*, *Ga. liquefaciens*, *Ga. sacchari* (22). Większość tych gatunków wyizolowano z głębokich fermentorów octowniczych, produkujących wysokoprocentowy ocet, pierwotnie zaliczano je do rodzaju *Acetobacter*. Bakterie zaliczane do rodzaju *Gluconacetobacter* charakteryzują się fenotypem acetofilnym – do wzrostu wymagają obecności kwasu octowego w podłożu.

5. Stan badań nad acetofilnymi bakteriami kwasu octowego w Polsce

W Polsce do izolacji i przechowywania bakterii czynnych w procesie fermentacji octowej (o acetofilnym fenotypie), z zachowaniem ich cech przydatności technologicznej, opracowano metodę polegającą na:

- zastosowaniu do izolacji i hodowli bakterii podłoża o półciekłej konsystencji,
- nieprzerwanym dostępie tlenu atmosferycznego do kultury bakterii,
- stężeniach kwasu octowego i etanolu zbliżonych do występujących w procesie technologicznym – sumaryczne stężenie (suma stężeń kwasu octowego i etanolu) powyżej 11%,

- zawartości w podłożu półciekłym takich składników pożywki jak w fermentującej brzezce podczas procesu technologicznego,
- niedopuszczeniu do nadmiernego odfermentowania etanolu.

Na takim podłożu bakterie rosną w postaci kożuszka. W celu uzyskania czystej kultury stosowano wielokrotne przeszczepianie redukcyjne. Kultury bakterii izolowane i hodowane na takim podłożu wykazują trwale wysoką aktywność i odporność na wysokie stężenia kwasu octowego, a zatem przydatność technologiczną (9). Kulturę bakterii przechowywanych w ten sposób wykorzystywano z powodzeniem do uruchamiania fermentacji w fermentorach przemysłowych.

Wyizolowane i hodowane w ten sposób szczepy bakterii, podobnie jak szczepy zaliczane do *Gluconacetobacter* nie rosną na podłożach nie zawierających kwasu octowego. W warunkach hodowli na podłożach o wysokiej zawartości kwasu octowego (charakterystycznej dla przemysłowego procesu technologicznego) bakterie te nie ujawniają także podstawowej cechy bakterii rodzaju *Acetobacter* – nie utleniają kwasu octowego do CO_2 i H_2O . Mechanizm ten można jednak uruchomić poprzez ich hodowlę na podłożach o coraz niższym, sumarycznym stężeniu oraz przez kilka pasażów hodowlanych na podłożu o zawartości etanolu 1% i kwasu octowego 3% (9). Taki tryb postępowania umożliwi następnie hodowlę tych bakterii na podłożach nie zawierających kwasu octowego i ich identyfikację jako rodzaj *Acetobacter* przy użyciu powszechnie stosowanych fenotypowych testów fizjologicznych. W ten sposób potraktowane bakterie nie wymagają już kwasu octowego do swego wzrostu – uzyskują fenotyp acetotolerancyjny. W tym momencie tracą również odporność na wysokie stężenia kwasu octowego, a tym samym, przydatność technologiczną. Przywrócenie utraconej przydatności technologicznej, jeśli jest możliwe, jest znacznie trudniejsze niż jej pozabawienie.

6. *Gluconacetobacter* czy *Acetobacter*

Rodzaj *Gluconacetobacter* został uwzględniony w najnowszym, wydaniu *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2000). Stanowi on jeden z dwunastu rodzajów zaliczonych do rodziny *Acetobacteriaceae*. Do tej rodziny zaliczono także znane dotychczas rodzaje bakterii kwasu octowego: *Acetobacter* i *Gluconobacter*.

Fakt częstych mutacji jest typowy dla bakterii kwasu octowego (23). Za możliwością zmiany fenotypu charakterystycznego dla rodzaju *Gluconacetobacter* na charakterystyczny dla *Acetobacter*, poza wynikami badań prowadzonych w Polsce, przemawiają także wyniki charakterystyki fenotypowej dwóch szczepów izolowanych z bioreaktorów octowniczych w Słowenii. Stwierdzono ich zmienność w zakresie bezwzględnego wymagania kwasu octowego do wzrostu (14).

Celowe byłoby zbadanie różnic na poziomie genotypu między kulturami o zmienionym i niezmienionym fenotypie pochodzących od tych samych acetofilnych szczepów pierwotnych.

Potwierdzenie możliwości zmiany fenotypu bakterii zaliczanych do rodzaju *Gluconacetobacter* na fenotyp bakterii rodzaju *Acetobacter*, w wyniku kilku pasaży hodowlanych na określonym podłożu, jest bardzo prawdopodobne. Jeśli taka możliwość zostanie potwierdzona, powstanie pytanie w jakim stopniu miałyby to wpływ na identyfikację tej grupy bakterii.

Literatura

1. EN 13189:2000 Vinegar – Product made from liquids of agricultural origin – Definitions, requirements, marking, CEN, Brussels.
2. Allgeier R. J., Nicol G. B., Conner H. A., (1974), *Food Prod. Dev.*, 6, 69-71, 7-8, 50-56.
3. Adams M. R., (2000), *Vinegar*, Eds. R. K. Robinson, C. A. Batt, D. P. Patel, *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2258, Academic Press, New York.
4. Czuba J., (1998), *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 9, 61-63.
5. Ebner H., Follmann H., (1983), *Acetic Acid*, Eds. H. J. Rehm, G. Reed, *Biotechnology*, vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim., 387-407.
6. Stamm W. W., Kittelmann M., Follmann H., Trüper H. G., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 41-46.
7. Kittelmann M., Stamm W. W., Follmann H., Trüper H. G., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 47-52.
8. Sievers M., Teuber M., (1995), *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, 79, 84S-95S.
9. Czuba J., Sikorska I., Warowna K., (1991), *Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 45, 178-183.
10. de Ley J., Gillis M., Swings J., (1984), *Family VI. Acetobacteriaceae*, Eds. N. R. Krieg, J. G. Holt, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 267-278.
11. Entani E., Ohmori S., Masai H., Suzuki K. I., (1985), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 31, 475-490.
12. Teuber M., Sievers M., Andresen A., (1987), *Biotechnol. Lett.*, 9, 265-268.
13. Sievers M., Sellmer S., Teuber M., (1992), *System. Appl. Microbiol.*, 15, 386-392.
14. Trček J., Raspor P., Teuber M., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 289-295.
15. Woese C. R., (1987), *Microbiol. Rev.*, 51, 221-271.
16. Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R., Stahl D. A., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1919-1925.
17. Boesch C., Trček J., Sievers M., Teuber M., (1998), *Syst. Appl. Microbiol.*, 21, 220-229.
18. Schüller G., Hertel Ch., Hammes W. P., (2000), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 50, 2013-2020.
19. Sokollek S. J., Hertel Ch., Hammes W. P., (1998), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 935-940.
20. Yamada Y., Hoshino K., Ishikawa T., (1997), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1244-1251.
21. Yamada Y., Hoshino K., Ishikawa T., (1998), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 327-328.
22. Franke I. H., Fegan M., Hayward C., Leonard G., Stackebrandt E., Sly L. I., (1999), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 1681-1693.
23. Swings J., (1992), *The genera Acetobacter and Gluconobacter*, Eds. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harden, K. H. Schleifer, *The Prokaryotes*, New York, Springer Verlag, 2268-2286.