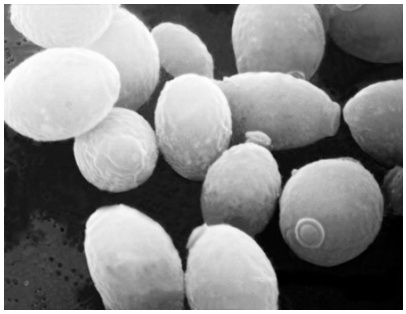
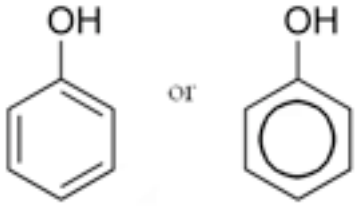
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
“Οινολογία - Αμπελουργία”

Επίδραση των φαινολικών ουσιών στην αύξηση και τη φυσιολογική συμπεριφορά του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5, καλλιεργούμενου σε συνθετικά γλεύκη





Μελέτη του Σωτήριου Δ. Ζερβόπουλου
Επιβλέπων καθηγητής: Σεραφείμ Παπανικολάου

Αθήνα, Ιούνιος 2010

Είμαστε και ό,τι έχουμε χάσει
Γιατί όσα και αν χάσαμε σε αυτό τον κόσμο
Πάντα θα ζουν μέσα μας.
Στην καρδιά και στις πράξεις μας

Στον Πατέρα μου.
"Φτάσε όπου δεν μπορείς"

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά επιβλέπων μέλος ΔΕΠ και Επίκουρο καθηγητή Κ. Σεραφείμ Παπανικολάου για τις πολύτιμες συμβουλές του, τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, όσο και κατά το στάδιο συγγραφής της μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Οινολογίας Κ. Γεώργιο Κοτσερίδη για τη συμβολή του στη διαμόρφωση του θέματος, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την εκπόνηση της παρούσης διπλωματικής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων Κα. Αφροδίτη Χατζηφράγκου, Κα. Κατερίνα Μπέλκα και Κα. Μαρία Μετσοβίτη για τις συμβουλές τους και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (HPLC) και τη χρήση του αέριου χρωματογράφου (GC).

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το συνάδελφο και υποψήφιο διδάκτορα Κ. Δημήτρη Σαρρή για τη βοήθεια κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....8
Summary.....9
1. Εισαγωγή.....10
1. Φαινολικές ενώσεις.....10
1.1 Εισαγωγή.....10
1.2 Χημεία φαινολικών ενώσεων.....10
1.2.1 Φαινόμενο συντονισμού - μεσομέρεια.....11
1.2.2 Όξινος χαρακτήρας.....13
1.2.3 Δεσμός υδρογόνου.....13
1.2.4 Εστέρες και αιθέρες.....13
1.2.5 Οξειδωτικά φαινόμενα.....14
1.2.6 Διμοριακή συμπλοκοποίηση.....14
1.2.7 Αντιοξειδωτική ιδιότητα.....14
1.2.8 Ομαδοποίηση φαινολών.....14
1.2.9 Φλαβανόνες και φλαβανόλες.....17
1.2.10 Κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες.....18
1.2.11 Ταννίνες.....20
1.2.12 Κουμαρίνες.....21
2.1 Βιοσύνθεση φαινολικών παραγώγων στην άμπελο.....22
3.1 Οξειδωτικά φαινόμενα στον οίνο.....24
3.1.1 Φαινολικά παράγωγα στους λευκούς οίνους.....24
3.1.2 Οξείδωση φαινολικών παραγώγων και φαινόμενο Browning.....24
4. Το είδος *Saccharomyces cerevisiae*.....29
4.1 Εισαγωγή.....29
4.2 Το γένος *Saccharomyces* και η επικράτησή του.....31
4.2.1 Μορφολογία και βιολογικός κύκλος του γένους *Saccharomyces*.....32
4.2.2 Οι φάσεις αύξησης του *Saccharomyces cerevisiae*.....34
4.2.3 Προσαρμογή του γένους *Saccharomyces* στο εκάστοτε περιβάλλον.....35
4.2.4 Στρεσογόνες καταστάσεις οφειλόμενες στο περιβάλλον.....37
4.2.4.1 Η επίδραση της αιθανόλης.....38
4.2.4.2 Η επίδραση της θερμοκρασίας.....39
4.2.4.3 Επίδραση της ωσμωτικής πίεσης.....41
5. Η αλκοολική ζύμωση.....42
5.1 Εισαγωγή.....42
5.2 Αποικοδόμηση των σακχάρων κατά την αλκοολική ζύμωση.....43
5.2.1 Γλυκόλυση (οδός Embden-Meyerhoff-Parnas).....43
5.2.2 Η αλκοολική ζύμωση.....45
5.2.3 Η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση.....47
5.2.4 Ο κύκλος του κιτρικού (κύκλος Krebs) και η αναπνευστική αλυσίδα (οξειδωτική φωσφορυλίωση).....48
5.2.5 Δευτερογενή προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης.....50
5.2.6 Παρεμπόδιση υποστρώματος.....51
5.2.7 Φαινόμενο Crabtree και φαινόμενο Pasteur.....52
2. Υλικά και μέθοδοι.....53
1. Βιολογικό υλικό.....53
1.1 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.....53

2. Μέθοδοι ανάλυσης.....55
2.1 Προσδιορισμός του pH.....55
2.2 Προσδιορισμός βιομάζας.....55
2.3 Προσδιορισμός αιθανόλης και γλυκερόλης με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....55
2.4 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών.....55
2.5 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων.....55
2.6 Ποιοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού λίπους.....55
3. Αποτελέσματα.....58
3.1 Αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 0 g/L.....59
3.1.1 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης.....60
3.1.2 Παραγωγή λιπιδίων.....63
3.2 Αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L.....65
3.2.1 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης.....66
3.2.2 Παραγωγή λιπιδίων.....69
3.2.3 Διακύμανση φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.....70
3.3 Αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L.....73
3.3.1 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης.....74
3.3.2 Παραγωγή λιπιδίων.....77
3.3.3 Διακύμανση φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.....79
3.4 Αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L.....81
3.4.1 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης.....82
3.4.2 Παραγωγή λιπιδίων.....85
3.4.3 Διακύμανση φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.....87
3.5 Αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L.....89
3.5.1 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης.....90
3.5.2 Παραγωγή λιπιδίων.....93
3.5.3 Διακύμανση φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.....95
3.5.4 Συγκεντρωτικοί πίνακες αποτελεσμάτων.....96
4. Συμπεράσματα.....100
5. Βιβλιογραφία.....103

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5, ο οποίος είναι ένα εμπορικό στέλεχος. Ο σκοπός της παρούσης ήταν η μελέτη της επίδρασης των φαινολικών ουσιών επί του μεταβολισμού του επιλεγμένου στελέχους, καθώς και η επίδραση του ζυμομύκητα επί των φαινολικών ουσιών, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 2 L, οι οποίες παρέμειναν εν ηρεμία καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Επίσης, η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 18 ^{o}C, καθώς ήταν επιζητούμενη η προσομοίωση των ζυμώσεων σε συνθήκες οινοποιείου. Η αύξηση του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε σε συνθετικό γλεύκος με αρχική συγκέντρωση σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη) περίπου 210 g/L, το οποίο είχε προηγουμένως αποστειρωθεί. Στην αρχή της κάθε ζύμωσης, ανάλογα με τις επιθυμητές συνθήκες, πραγματοποιήθηκε προσθήκη φαινολικών στο μέσο.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι οι φαινολικές ενώσεις που προστέθηκαν εξωγενώς επέδρασαν θετικά στο μεταβολισμό του μικροοργανισμού, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των μεταβολιτών που παρήχθησαν (αιθανόλη, γλυκερόλη). Ωστόσο, η θετική επίδραση αυτή παρατηρήθηκε μέχρι μια συγκεκριμένη τιμή συγκέντρωσης των φαινολικών, η οποία φαίνεται να είναι τα 2 g/L. Έπειτα, παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της αύξησης και της ολοκλήρωσης της ζύμωσης από τον μικροοργανισμό, καθώς παρατάθηκε ο χρόνος αποζύμωσης των σακχάρων του μέσου και μειώθηκε η συγκέντρωση των μεταβολιτών που παρήχθησαν.

Όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις, παρατηρήθηκε μείωση αυτών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από το μικροοργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωσή τους στο μέσο, τόσο μεγαλύτερο ήταν και το ποσοστό απομάκρυνσής τους από αυτό.

Summary

In the current investigation experiments were performed with the strain *Saccharomyces cerevisiae* X5, which is a commercial strain. The object of this study was the effect of phenolic substances on the metabolism of the selected strain, and the effect of the yeast on the phenolic compounds during fermentation as well. The fermentations carried out in Erlenmeyer flask of 2 L, which remained still throughout the duration of fermentation. Also, the temperature was maintained at 18 ^{o}C, as it was desired to simulate the conditions of fermentation in a winery. The microorganism' s growth occurred in synthetic must, with an initial concentration of sugars (glucose and fructose) , about 210 g/L. The medium had previously been sterilized. At the beginning of each fermentation, depending on the desired conditions, phenolics were added to the medium.

The results show that the phenolic compounds added exogenously, influenced positively the metabolism of the microorganism, as the metabolites produced (ethanol, glycerol) increased. However, the positive effect was observed up to a level of the phenolics concentration, which seems to be the 2 g/L. Then there was impeding the development and completion of the fermentation by the microorganism.

The phenolic compounds added exogenously seemed to be decreased during the fermentation. More specifically, the greater was the concentration in the medium, the greater was the rate of their removal from it.

1. Εισαγωγή

1. Φαινολικές ενώσεις

1.1 Εισαγωγή

Οι φαινολικές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο. Είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για τους διάφορους χρωματισμούς που παρουσιάζουν τα άνθη των φυτών. Τα φαινολικά παράγωγα που απαντούν στις σταφυλές και τους οίνους παίζουν σημαντικότατο ρόλο στη διαμόρφωση των ιδιαίτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τελευταίων. Εξάλλου, τα φαινολικά συστατικά, εκτός από τον καθορισμό του χρώματος και των διάφορων αποχρώσεων των έγχρωμων οίνων υπεισέρχονται και στους αρωματικούς χαρακτήρες, οι οποίοι είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της οινικής ποιότητας κατά τη συντήρηση και παλαίωσή των (Κουράκου - Δραγωνά, 2002).

Όσον αφορά την περίπτωση των ερυθρών οίνων, οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικότατο ρόλο, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, στη διαμόρφωση του χρώματος, καθώς και της γευστικής ομαλότητάς των. Αντίθετα, στην περίπτωση των λευκών οίνων, τα φαινολικά παράγωγα συνεισφέρουν τόσο στη δημιουργία του αρωματικού δυναμικού των, χωρίς ωστόσο να είναι οι κύριοι υπεύθυνοι, όσο και στη σταθερότητά τους στις διάφορες ασθένειες, όπως είναι τα διάφορα είδη οξείδωσης.

Οι διάφορες ταννίνες (προκυανιδίνες, συμπυκνωμένες και πολυμερισμένες ταννίνες), καθώς και οι ανθοκυάνες, ελεύθερες ή ενωμένες με ταννίνες, αποτελούν τις δύο μεγάλες τάξεις των φαινολικών παραγώγων που απαντούν στους οίνους. Βρίσκονται συγκεντρωμένες στα στερεά μέρη της σταφυλής και περνούν στον οίνο με εκχύλιση ή διάχυση κατά την παραγωγική διαδικασία. Τα συστατικά αυτά είναι ουσιαστικά οι αποκλειστικοί υπεύθυνοι όλων των διαφορών που υφίστανται μεταξύ των λευκών και των ερυθρών οίνων (Κουράκου - Δραγωνά, 2002).

Τα τελευταία χρόνια, οι γνώσεις που έχουμε αποκτήσει γι' αυτή τη μεγάλη και σημαντική οικογένεια χημικών ενώσεων έχουν πολλαπλασιαστεί. Σε αυτό βοήθησαν οι σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης, οι οποίες μας επιτρέπουν λεπτομερέστερο προσδιορισμό των ιδιοτήτων και των ιδιαιτεροτήτων των εν λόγω ενώσεων. Πολλοί ερευνητές θεωρούν τα φαινολικά παράγωγα ως έναν τρόπο καταπολέμησης των καρδιαγγειακών παθήσεων και της στεφανιαίας νόσου. Αφορμή γι' αυτό στάθηκε το λεγόμενο Γαλλικό παράδοξο (French Paradox), το οποίο θέλει τους Γάλλους, οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν στο καθημερινό τους σιτηρέσιο την κατανάλωση ερυθρού οίνου, να παρουσιάζουν μειωμένες πιθανότητες εμφάνισης τέτοιου είδους παθήσεων. Επίσης, η αντιοξειδωτική ιδιότητα των φαινολικών ενώσεων, καθώς και ορισμένες ιδιότητες βιταμινών που παρουσιάζουν, ενισχύουν την ανωτέρω άποψη (Ribereau - Gayon et. al., 2006).

1.2 Χημεία φαινολικών ενώσεων

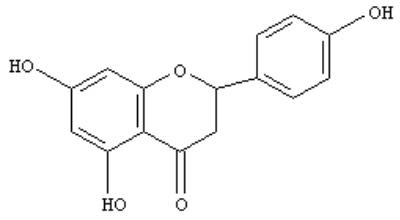
Η επωνυμία φαινολικά παράγωγα υποδηλώνει ότι στο μόριο αυτών των ουσιών απαντώνται μια ή περισσότερες δραστικές φαινολικές ομάδες. Οι ουσίες αυτές μπορούν να καταταχθούν σε δύο κατηγορίες:

I. Τις **πολυμοριακές φαινόλες** έχουν βασικό τύπο C_6-C_3-C_6, ο οποίος αντιστοιχεί στη φλαβανόνη (εικ. 1). Για το λόγο αυτό, το επίσημο όνομα των ενώσεων αυτών είναι φλαβανοειδείς φαινόλες. Οι κύριοι εκπρόσωποι των φλαβανοειδών φαινολών είναι οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες.

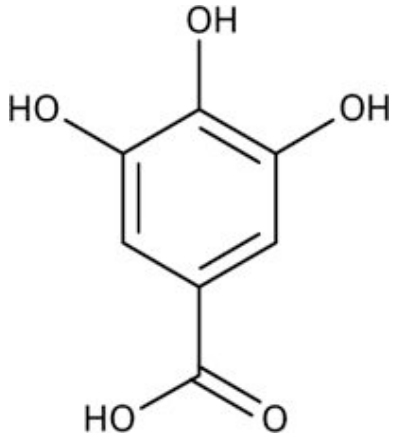
II. Τις **μονομοριακές φαινόλες**, όπως είναι το γαλλικό (εικ. 2) και το καφεϊκό οξύ, που κατ' αντιδιαστολή προς τις ενώσεις της προηγούμενης κατηγορίας, ονομάζονται μη φλαβανοειδείς φαινόλες.

Φαινόλες ονομάζονται τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων, τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια σε αντικατάσταση ισάριθμων υδρογόνων συνδεδεμένων με τα άτομα άνθρακα του βενζοϊκού δακτυλίου. Αντίθετα, τα βενζοϊκά παράγωγα που περιέχουν υδροξύλιο σε αντικατάσταση υδρογόνου πλευρικής αλύσου, όπως π.χ. η βενζυλαλκοόλη, ονομάζονται αρωματικές αλκοόλες και όχι φαινόλες.

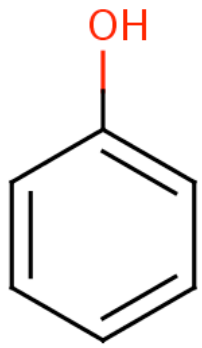
Όπως είναι φανερό, οι φαινόλες παρουσιάζουν αναλογία με τις αλκοόλες της αλειφατικής σειράς. Ωστόσο, παρουσιάζουν διαφορές που οφείλονται στο γεγονός ότι οι ιδιότητες του φαινολικου -OH έχουν ριζικά μεταβληθεί λόγω της ύπαρξης του βενζολικού δακτυλίου (Κουράκου - Δραγωνά, 2002).



Εικ. 1 Φλαβανόνη



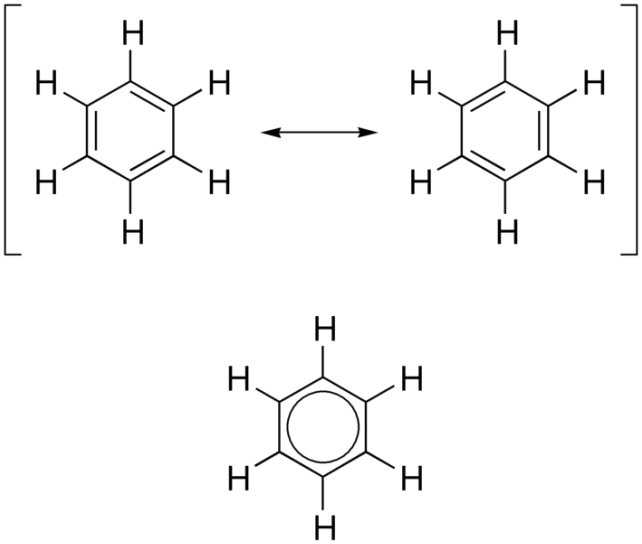
Εικ. 2 Γαλλικό οξύ



Εικ. 3 Φαινόλη

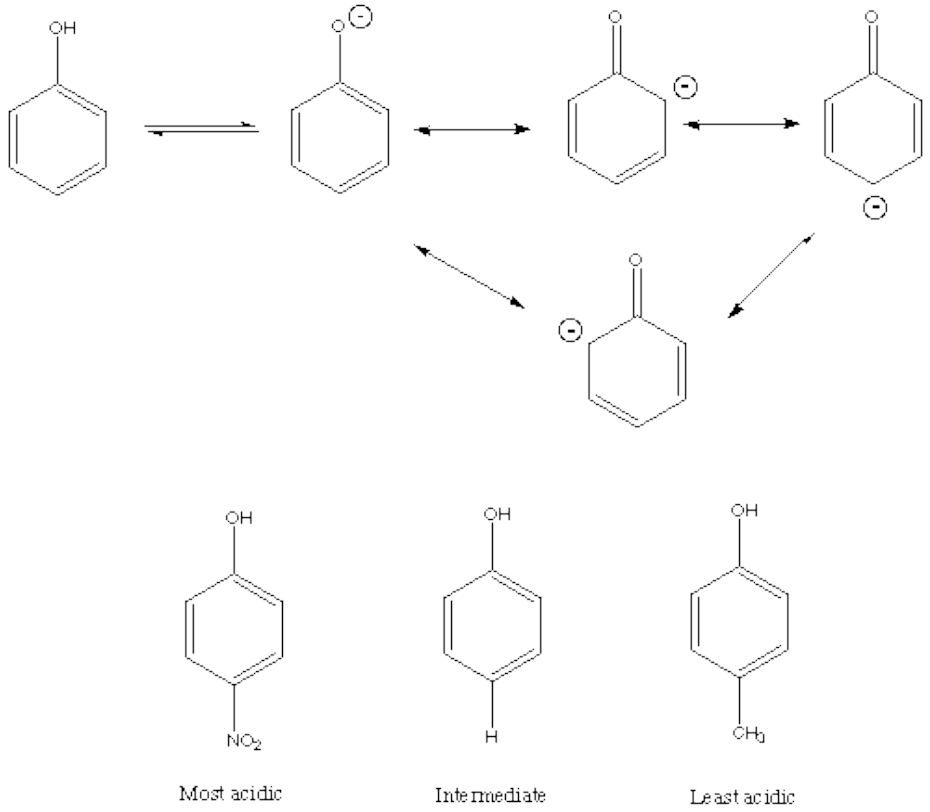
1.2.1 Φαινόμενο συντονισμού - μεσομέρεια

Είναι γνωστό ότι τα έξι υδρογόνα του βενζοϊκού δακτυλίου είναι ισότιμα. Αυτό απορρέει από την ύπαρξη έξι π ηλεκτρονίων, τα οποία δεν είναι τοποθετημένα δύο-δύο έτσι ώστε να εξασφαλίσουν τρεις διπλούς δεσμούς, αλλά μετατοπίζονται στο σύνολο του πυρήνα, δημιουργώντας κατ' αυτό τον τρόπο μια ισότιμη ηλεκτρονική πυκνότητα σε κάθε δεσμό. Όμως, όταν για ένα μόριο μπορούν να γραφούν περισσότεροι του ενός τύποι, οι οποίοι έχουν την ίδια διάταξη των ατομικών πυρήνων, τον ίδιο αριθμό ηλεκτρονικών ζευγών και περίπου την ίδια ενέργεια, τότε η πραγματική δομή του μορίου δεν μπορεί να παρασταθεί με έναν μόνο τύπο, αλλά με μια ενδιάμεση κατάσταση όλων των δυνατών τύπων. Για την ονομασία του εν λόγω φαινομένου είχε προταθεί ο όρος μεσομέρεια. Ωστόσο, επικράτησε εν τέλει ο όρος συντονισμός, ο οποίος συμβολίζεται με στικτό ή όχι κύκλο εντός κανονικού εξάγωνου. Το φαινόμενο του συντονισμού συνεπάγεται μεγάλη σταθερότητα του μορίου. Πράγματι, ο βενζοϊκός δακτύλιος είναι τόσο σταθερός, ώστε η διάσπασή του κατά τη διάρκεια χημικών και βιολογικών αντιδράσεων είναι πολύ σπάνια (John McMurry, 2004).



Εικ. 4 Δομές συντονισμού βενζολίου

Στην περίπτωση του μορίου της φαινόλης, παρουσιάζεται αλληλεπίδραση μεταξύ των κινητών ηλεκτρονίων του δακτυλίου και των ελεύθερων ηλεκτρονικών ζευγών του ατόμου του οξυγόνου, γεγονός που επιτρέπει τη μετατόπιση των ηλεκτρονίων αυτών. Έτσι, παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση το φαινόμενο του συντονισμού, το οποίο επιφέρει μείωση της ηλεκτρονικής πυκνότητας του οξυγόνου και την εμφάνιση θετικού φορτίου στο μόριό του. Η μείωση αυτή συνεπάγεται έλξη ηλεκτρονίων προς το μόριο του οξυγόνου, κάτι το οποίο διασφαλίζει το δεσμό του υδρογόνου στο υδροξύλιο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εύκολη διάσπαση του Η του -ΟΗ, καθώς η παρουσία του δακτυλίου αποσταθεροποιεί τον συγκεκριμένο δεσμό.

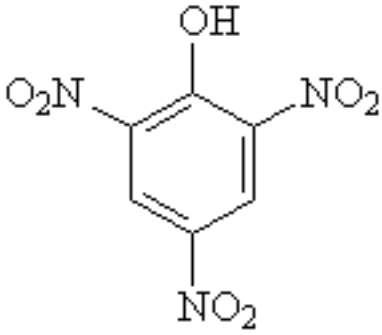


Εικ. 5 Συντονισμός στο μόριο της φαινόλης

1.2.2 Όξινος χαρακτήρας

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η ευκολία διάσπασης του -Η από το φαινολικό -ΟΗ δίνει στο μόριο της φαινόλης χαρακτήρα ασθενούς οξέος. Όπως όλα τα οξέα, έτσι και η φαινόλη, διίσταται στο νερό. Στην περίπτωση της απλής φαινόλης, η σταθερά ιονισμού είναι της τάξης του 10^{-10}, ενώ για τις αλκοόλες φθάνει 10^{-16} - 10^{-19}. Επομένως, η κινητικότητα του -Η της υδροξυλομάδας αποτελεί την ουσιαστική διαφορά μεταξύ αλκοολών και φαινολών.

Ο όξινος χαρακτήρας του -ΟΗ των φαινολών μπορεί να μεταβληθεί σημαντικά από τη γενική δομή του μορίου. Σαν παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί το πικρικό οξύ (τρινιτρο-2,4,6-φαινόλη). Αυτές οι μεταβολές της οξύτητας των φαινολών, σε συνάρτηση με τη δομή του μορίου, χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των φυσικών φαινολικών παραγώγων με τη βοήθεια αλκαλικών διαλυμάτων (Κουράκου - Δραγωνά, 2002).



Εικ. 6 Πικρικό οξύ

1.2.3 Δεσμός υδρογόνου

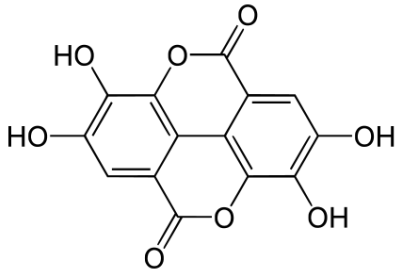
Οι φαινόλες, όπως και οι αλκοόλες, είναι έδρα διαμοριακών συζεύξεων με δεσμό υδρογόνου. Ο συγκεκριμένος δεσμός είναι αποκλειστικά ηλεκτροστατικός και παρουσιάζεται όταν το -Η είναι ενωμένο με ένα ηλεκτροαρνητικό στοιχείο, όπως είναι το οξυγόνο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το -Η που έχει στερηθεί μερικώς το ηλεκτρόνιό του, τείνει να το βρει σε ένα άτομο οξυγόνου του ιδίου ή διαφορετικού μορίου. Ο δεσμός υδρογόνου είναι ευρέως διαδεδομένος εντός της οικογένειας των φαινολικών παραγώγων. Ο σχηματισμός δεσμών τέτοιου ειδους έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της δραστικότητας των φαινολικών ομάδων (Κουράκου - Δραγωνά, 2002).

1.2.4 Εστέρες και αιθέρες

Ως εστέρες μπορούν να θεωρηθούν ενώσεις που προέρχονται από οξέα με αντικατάσταση του υδρογόνου του καρβοξυλίου από αλκύλιο ή αρύλιο. Έχουν τον γενικό τύπο R-COOR' και προέρχονται από την επίδραση αλκοόλης ή φαινόλης επί του οξέος (John McMurry, 2004).

Η εστεροποίηση και η υδρόλυση ενός εστέρα είναι αντιδράσεις αμφίδρομες, η ταχύτητα των οποίων δεν εξαρτάται από τη φύση της αλκοόλης και του οξέος, αλλά από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων σωμάτων και τη σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης.

Οι εστέρες απαντώνται ευρέως στη φύση ως συστατικά των αιθέριων ελαίων. Στην περίπτωση των οίνων, πολλοί εστέρες σχηματίζονται φυσικά, μιας και είναι προϊόντα πλούσια σε αλκοόλες και οξέα. Όμως, εν αντιθέσει με τις αλκοόλες, η εστεροποίηση των φαινολών δεν είναι τόσο συχνό φαινόμενο. Πράγματι, εκτός από μερικά παράγωγα του γαλλικού οξέως, όπως το ελλαγικό οξύ που έχει δύο εστερικούς δεσμούς, δεν έχουν βρεθεί εστέρες φαινολών (Κουράκου - Δραγωνά, 2002).



Εικ. 7 Ελλαγικό οξύ

Εν αντιθέσει με του εστέρες, ο σχηματισμός αιθέρων είναι πολύ πιο συνηθισμένος στη φύση, κυρίως με φαινολική ομάδα και μεθυλική αλκοόλη. Όταν το -Η του φαινολικού -ΟΗ αντικατασταθεί με αλκύλιο ή με αρύλιο, δημιουργούνται αιθέρες, οι οποίοι είναι γνωστοί ως φαινολαιθέρες. Πρόκειται για σώματα ευχάριστης συνήθως οσμής, ορισμένα από τα οποία απαντούν ως αρωματικά συστατικά των οίνων, όπως είναι η γουαϊακόλη, η ευγενόλη κ.α. Στην περίπτωση των φαινολικών παραγώγων, οι αιθέρες με την ομάδα -OCH3 είναι πολύ συνηθισμένοι, ειδικότερα στην περίπτωση των ανθοκυανών και των μη φλαβανοειδών φαινολών, όπως π.χ. η βανιλλίνη, το βανιλλικό οξύ, η κωνιφερυλαλδεΰδη κ.α.

1.2.5 Οξειδωτικά φαινόμενα

Είναι γεγονός ότι στη βιοσύνθεση των φαινολικών παραγώγων υπεισέρχονται οξειδωτικά φαινόμενα. Έχει εξάλλου αποδειχθεί ότι το καφέτιασμα των φυτικών ιστών, που δημιουργεί τεχνολογικά προβλήματα στη βιομηχανία τροφίμων, οφείλεται σε οξειδωτικές μεταβολές χημικής ή ενζυματικής φύσεως, που έχουν ως υπόστρωμα διάφορα φαινολικά παράγωγα. Η οξείδωση όμως των φαινολών είναι ένα θέμα ιδιαίτερα πολύπλοκο (Κουράκου - Δραγωνά, 2002).

1.2.6 Διαμοριακή συμπλοκοποίηση

Εκτός από τις συνήθεις αντιδράσεις, τα φαινολικά παράγωγα έχουν την ικανότητα να κατακρημνίζουν μερικά αλκαλοειδή, τη ζελατίνη και πρωτεΐνες που βρίσκονται σε διαλύματα. Επίσης, μπορούν να κατακρημνιστούν κατά τη συμπλοκοποίηση με άλλα μόρια φαινολών (πολυμερισμός). Η ιδιότητα αυτή, των πολυφαινολών, βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στη ζυθοποιία για την προστασία της μπύρας ενάντια στα διαφόρων τύπων θολώματα (Γκρέκος, Χάδος, 2002).

1.2.7 Αντιοξειδωτική ιδιότητα

Ο ρόλος ενός αντιοξειδωτικού στο σώμα του ανθρώπου είναι να σταματήσει την οξείδωση των μορίων μπλοκάροντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών, κάτι που είναι καταστροφικό για τα κύτταρα. Οι ελεύθερες ρίζες, μπορεί να είναι μια οποιαδήποτε χημική ένωση που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα (μονήρη) ηλεκτρόνια. (Kreuzer H. L., 1998). Όταν π.χ. ένας μικροοργανισμός εισέλθει στον ανθρώπινο οργανισμό, τα λευκά αιμοσφαίρια απελευθερώνουν υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο προσβάλλει τις μεμβράνες των μικροβιακών κυττάρων και προκαλεί την καταστροφή τους. (Schneider J., Raske W., 1997) Οι ελεύθερες ρίζες προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια και έτσι τα μετατρέπουν με τη σειρά τους σε ελεύθερες ρίζες, αρχίζοντας έτσι μια αλυσιδωτή αντίδραση.

1.2.8 Ομαδοποίηση φαινολών

Τα φαινολικά παράγωγα θα μπορούσαν να καταταχθούν σε δύο κύριες κατηγορίες, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές κατά την εφαρμογή της οινολογικής πρακτκής, είτε αναφερόμαστε σε ερυθρούς, είτε σε λευκούς οίνους. Οι κατηγορίες αυτές είναι:

- **<u>Οι πολυμοριακές φαινόλες:</u>** έχουν βασικό τύπο C_6-C_3-C_6, ο οποίος αντιστοιχεί στη φλαβόνη. Για το λόγο αυτό το όνομά τους είναι φλαβανοειδείς φαινόλες. Κύριοι εκπρόσωποι των φλαβανοειδών φαινολών είναι οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες.

- **<u>Οι μονομοριακές φαινόλες:</u>** όπως είναι το γαλλκό οξύ και το καφεϊκό οξύ, που κατ' αντιδιαστολή προς τις πολυφαινόλες της προηγούμενης ομάδας, ονομάζονται μη φλαβανοειδείς φαινόλες (Κουράκου - Δραγωνά, 2002).

Εκτός των δύο ανωτέρω κατηγοριών, τα φαινολικά παράγωγα μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω και σε άλλες κατηγορίες ανάλογα με τη μοριακή τους δομή. Μια εκ' αυτών είναι και οι κουμαρίνες. Αυτές έχουν έναν εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο οξυγόνου, που είναι προσκολλημένος σε ένα βενζολικό δακτύλιο. Είναι ενώσεις που μοιάζουν με τα κινναμωμικά οξέα, τα οποία έχουν και αυτά διάταξη C_6-C_3. Οι κουμαρίνες είναι λακτόνες του ο-υδροξυκινναμωμικού οξέως (Γκρέκος, Χάδος, 2002).

Η οικογένεια των φαινολικών παραγώγων είναι μια από τις σημαντικότερες οικογένειες φυτοχημικών ουσιών και απασχολούν τη βιομηχανία των τροφίμων και όχι μόνο. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι διάφορες κατηγορίες που μπορούν να διαχωριστούν.

Πιν. 1 Ομαδοποίηση φαινολικών παραγώγων (Harbone 1989)

Κλάσεις φαινολικών παραγώγων	**Ανθρακικός σκελετός**
Απλές φαινόλες - βενζοκινόνες	C6
Φαινολικά οξέα	C6-C1
Ακετοφαινόνες - φαινυλακετικά οξέα	C6-C2
Υδροξυκινναμωμικά, φαινυλφαινόλες, κουμαρίνες, ισοκουμαρίνες, χρωμόνες	C6-C3
Ναφθοκινόνες	C6-C4
Ξανθόνες	C6-C1-C6
Ανθρακινόνες	C6-C2-C6
Λιγνάνες, νεολιγνάνες	C6-C3-C6
Φλαβονοειδή, ισοφλαβανοειδή	(C6-C3)2
Βιφλαβονοειδή	(C6-C3-C6)2
Λιγνίνες	(C6-C3)n
Συμπυκνωμένες ταννίνες	(C6-C3-C6)n

- **<u>Μη φλαβανοειδείς φαινόλες (Φαινολικά οξέα)</u>**

Στα φαινολικά οξέα (φαινολοκαρβοξυλικά οξέα) που είναι μονομοριακές φαινόλες, όπως είναι το γαλλικό οξύ και το καφεϊκό οξύ, αποτελούν εκπροσώπους των μη φλαβονοειδών φαινολών. Ο όρος «φαινολικά οξέα» περιλαμβάνει επτά ανθρακικά βενζοϊκά οξέα (C_6-C_1) και εννέα ανθρακικά κινναμωνικά οξέα. (C_6-C_3). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα φαινολικά οξέα δε

βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή στα φυτά. Οι καρβοξυλομάδες τους μετασχηματίζονται σε εστέρες και αμίδες. Οι υδροξυλομάδες τους είναι πολύ δραστικές. Η σπουδαιότητα των φαινολοξέων οφείλεται στο γεγονός ότι παρουσιάζουν αντιβιοτικές και αντισηπτικές ιδιότητες. Τα φαινολοξέα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

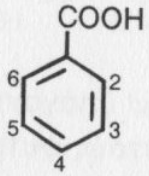
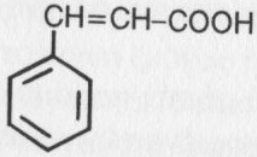
1. **<u>Τα Βενζοϊκά οξέα</u>**

Τα οξέα αυτά δεν βρίσκονται ελεύθερα στα φυτά. Συμμετέχουν στη δομή των ταννινών και αποτελούν ένα από τα κύρια συστατικά τους. Τα κύρια βενζοϊκά οξέα είναι: το βανιλλικό, το γαλλικό, το p-υδροξυβενζοϊκό, το πρωτοκατεχικό και το συριγγικό οξύ. Τα βενζοϊκά οξέα περιέχονται στη σάρκα της σταφυλής σε ελεύθερη μορφή ή βρίσκονται δεσμευμένα στα κυτταρικά τοιχώματα.

2. **<u>Κινναμωμικά οξέα</u>**

Τα κινναμωμικά οξέα σχηματίζονται από τη φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη. Τα πιο γνωστά κινναμωμικά οξέα είναι: το καφεϊκό, το p-κουμαρικό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ. Αρκετά κινναμωμικά οξέα (C6 - C3) έχουν βρεθεί στις σταφυλές και τους οίνους, σε μικρές ωστόσο ποσότητες. Απαντώνται τόσο σε ελεύθερη μορφή, όσο και εστεροποιημένα, κυρίως με τρυγικό οξύ (Ribereau - Gayon, 1965). Επίσης, έχουν βρεθεί γλυκοζίτες κινναμωμικών οξέων, στους οποίου το σάκχαρο είναι η γλυκόζη. Ορισμένοι εστέρες των κινναμωμικών οξέων με τρυγικό οξύ, οι οποίοι απαντούν στο γλεύκος, αποτελούν υποστρώματα οξείδωσης (Cheynier et al., 1989a, 1989b).

Πίν. 2 Τα κυριότερα φαινολικά οξέα (Κουράκου - Δραγωνά, 2002)

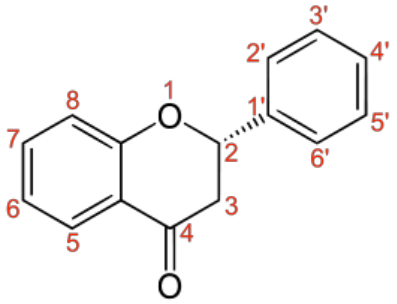
Βασικό όξύ	Βασικός τύπος	Ὀνομασία φαινολοξέων	Θέση πρόσθετων ὁμάδων	
			–OH	–OCH_3
Βενζοϊκό		Σαλυκιλικό ὀξύ	2	
		π-ὑδροξυβενζοϊκό ὀξύ	4	
		Γαλλικό ὀξύ	3,4,5	
		Πρωτοκατεχινικό ὀξύ	3,4	
		Βανιλλικό ὀξύ	4	3
		Συριγγικό ὀξύ	4	3,5
Κινναμωμικό		π-κουμαρικό ὀξύ	4	
		Καφεϊκό ὀξύ	3,4	
		Χλωρογενικό ὀξύ*	3,4	
		Φερουλικό ὀξύ	4	3

* Ἑστέρας τοῦ καφεϊκοῦ ὀξέος μέ τό -OH σέ θέση-3 τοῦ κινινικοῦ ὀξέος.

<u>Φλαβανοειδείς φαινόλες (φλαβονοειδή)</u>

Οι φλαβανοειδείς φαινόλες ή φλαβονοειδή, αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα των φαινολικών ουσιών. Υπάρχουν μόνο στα φυτά και αποτελούν τμήμα των αμυντικών μηχανισμών τους, καθώς προσφέρουν ανοσία απέναντι σε μύκητες, έντομα και άλλους επιβλαβείς οργανισμούς. Χημικά

αποτελούνται από αρωματικούς και μη δακτυλίους όπου συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς οξυγόνου – υδρογόνου. Αυτές είναι οι φαινόλες. Οι φλαβανοειδείς φαινόλες έχουν βασικό τύπο C_6-C_3-C_6. Ο τύπος αυτός αντιστοιχεί στη φλαβανόνη όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.



Εικ. 8 Δομή φλαβανόνης

Οι φλαβανοειδείς φαινόλες, ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου, μπορούν να διακριθούν σε αρκετές ομάδες. (Κουράκου - Δραγωνά, 2002, Παπαδιώτη, Γιαννακοπούλου, 2001) Αυτές είναι:

- **Φλαβόνες**
- **Φλαβανόνες**
- **Φλαβονόλες**
- **Φλαβανόλες (3-φλαβανόλες ή κατεχίνες και 3,4-φλαβανόλες ή προανθοκυανιδίνες)**
- **Ανθοκυανιδίνες**

1.2.9 Φλαβανόνες και φλαβανόλες

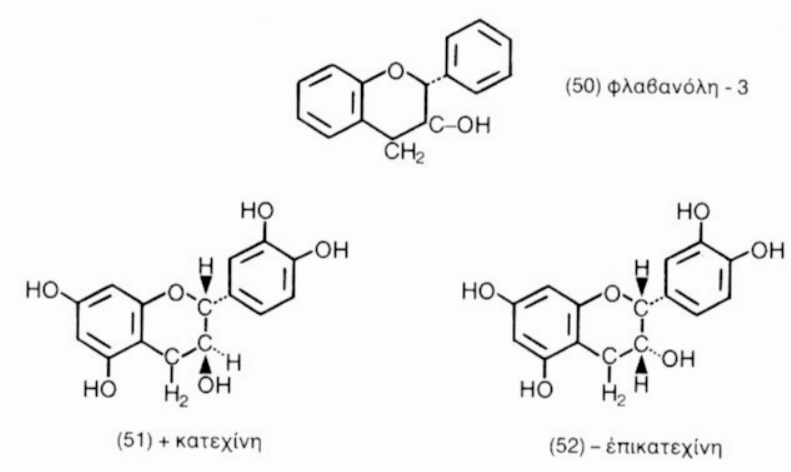
Μέχρι σήμερα, είναι γνωστές τρεις φλαβονοειδείς φαινόλες του τύπου C_6-C_3-C_6 οι οποίες έχουν παρασκευασθεί και *in vitro*. Αυτές είναι η φλαβανόνη, η φλαβόνη και η φλαβανόλη. Υδοξυλιωμένα παράγωγα των τριών αυτών ουσιών, απαντώνται στη φύση σε ελεύθερη μορφή ή σε μορφή ετεροζιτών. Τα παράγωγα αυτά αποτελούν τις δύο ομάδες της κατηγορίας των φλαβανειδών φαινολών, τις φλαβανόλες και τις φλαβανόνες. Οι δύο αυτές ομάδες έχουν μεταξύ τους μόνο μια ουσιαστική διαφορά. Στη θέση 3 του μορίου της φλαβανόλης υπάρχει ένα δραστικό –OH ενώ στη φλαβανόνη όχι.

Οι φλαβανόλες, όπως προαναφέρθηκε, είναι μια κατηγορία φαινολών, οι οποίες παρουσιάζουν ένα –OH στη θέση 3 του ετεροκυκλικού δακτυλίου. Επειδή η φλαβανόλες παρουσιάζουν πολλές διαφορετικές δομές, διαχωρίζονται από τις φλαβόνες. Οι διαφορά των φλαβονών από τις φλαβανόλες είναι ότι στις πρώτες απουσιάζει η –OH από τη θέση 3 του ετεροκυκλικού δακτυλίου (ETS Laboratories, 2005). Οι φλαβανόλες είναι μια πολύ διαδεδομένη κατηγορία φλαβονοειδών φαινολών. Η κερκετίνη αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπό τους, ενώ η μυρικετίνη και η καιμπφερόλη είναι άλλες δύο συνηθισμένες φλαβανόλες. Οι φλαβανόλες είναι οι πιο διαδεδομένες στη φύση φλαβανοειδείς φαινόλες.

Οι φλαβονόνες ανήκουν στα φαινολικά συστατικά του ξύλου της δρυός. Η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί σε οίνους που παλαίωσαν σε βαρέλια (Παπαδιώτη, Γιαννακοπούλου, 2001).

1.2.10 Κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες

Είναι γνωστό ότι το παράγωγο της φλαβονόλης που έχει τον κεντρικό ετεροκυκλικό δακτύλιο υδρογονομένο λέγεται φλαβανόλη-3. Στη φύση απαντούν διάφορα υδροξυλιωμένα παράγωγα της φλαβανίλης-3 γνωστά με το όνομα κατεχίνες. Από αυτά, τη μεγαλύτερη διάδοση έχει η κατεχίνη, το όνομα της οποίας επεκτάθηκε σε όλη την οικογένεια των φλαβανοειδών αυτών φαινολών. Αν δούμε το μόριο της κατεχίνης μπορούμε να παρατηρήσουμε πως έχει τέσσερα ασύμμετρα άτομα άνθρακα. Άρα δίνει και τέσσερα ισομερή. Αυτά είναι η (+) και (-) κατεχίνη, η (+) και (-) επικατεχίνη και δύο ρακεμικά μείγματα. Στη φύση απαντώνται όλες οι μορφές. Όμως στα περισσότερα φυτά απαντούν κυρίως η (+) κατεχίνη και η (-) επικατεχίνη.



Εικ. 9 Διάφορες δομές κατεχινών

Από πλευράς χημικής ονοματολογίας, η κατεχίνη είναι 5,7,3',4'-τετραϋδροξυ-φλαβανόλη-3. Πρόκειται για μια πολύ ευοξείδωτη ουσία κυρίως λόγω των δυο –OH σε ο-θέση στον πλευρικό βενζολικό δακτύλιο. Όταν η κατεχίνη θερμανθεί σε όξινο περιβάλλον πολυμερίζεται προς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες είναι ευρύτατα διαδεδομένες στη φύση και ονομάζονται φλοιοβαφένια. Το χρώμα τους είναι αρχικά κίτρινο και σιγά-σιγά σκουραίνει, ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού, μέχρις ότου να γίνει καστανόμαυρο (Γκρέκος, Χάδος, 2002).

Στη φύση, εκτός από μονομοριακές κατεχίνες, έχουν βρεθεί και συμπυκνωμένα φαινολικά παράγωγα τα οποία όταν απομονώθηκαν και θερμάνθηκαν παρουσία ανόργανων οξέων, έδωσαν κυανιδίνη, κατεχίνη και επικατεχίνη. Ακριβώς επειδή έδωσαν κυανιδίνη, τα παράγωγα αυτά ονομάστηκαν προκυανιδίνες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κυανιδίνη είναι το πιο διαδεδομένο στη φύση ανθοκυανικό άγλυκο. Τελευταία ανευρέθησαν στους οίνους συμπυκνωμένες φλαβανοειδείς φαινόλες όπου κατά τη θέρμανσή τους αντί για κυανιδίνη έδωσαν δελφινιδίνη. Για το λόγο αυτό προτάθηκε ο ευρύτερος όρος προανθοκυανιδίνες ο οποίος δεν έχει ακόμα καθιερωθεί.

Οι φυσικές προκυανιδίνες, δεν είναι τίποτα άλλο από αφυδρογονωμένες κατεχίνες. Ο σχηματισμός τους μπορεί να παρουσιασθεί ως εξής:

$$\underset{\text{κατεχίνη}}{2C_{15}H_{16}O_6} \xrightarrow{-H} C_{30}H_{26}O_{12} \xrightarrow{-H} C_{30}H_{24}O_{12}$$

← διμερείς προκυανιδίνες →

Με συνέχιση των συνενώσεων μπορούν να ενωθούν περισσότερα μόρια προς σχηματισμό προκυανιδινών. Μέχρι σήμερα έχουν ανευρεθεί 26 προανθοκυανιδίνες από 24 διαφορετικά είδη φρούτων και σπόρων. Η εξαιρετική δραστικότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου στο μόριο της κατεχίνης, της επικατεχίνης και των προκυανιδινών, ευνοεί το σχηματισμό ενδοφλαβονικών δεσμών.

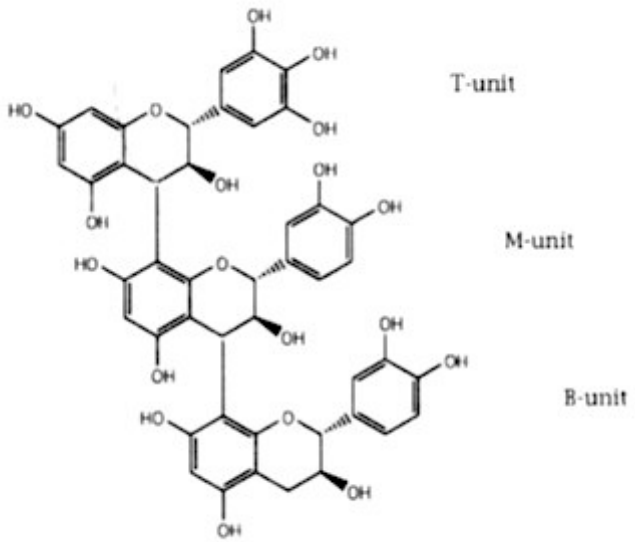
Τα μόρια της κατεχίνης έχουν την τάση να ενώνονται μεταξύ τους ή με μόρια της επικατεχίνης προς διμερείς προκυανιδίνες. Οι τελευταίες με τη σειρά τους ενώνονται προς μεγαλύτερα μόρια. Για να γίνει αντιληπτή η πολυπλοκότητα αυτών των ουσιών, αρκεί να αναφερθεί πως η διμερής προκυανιδίνη έχει πέντε κέντρα ασυμμετρίας. Άρα, μπορεί να δώσει 32 οπτικά ενεργές μορφές.

Στα διμερή παράγωγα υπάρχουν δύο βαθμοί αφυδρογόνωσης, όπως προαναφέρθηκε, με συνέπεια τη δημιουργία δύο τύπων προκυανιδινών του τύπου Α και Β. Ο τύπος Β είναι ο πιο επικρατέστερος. Στη διμερή προκυανιδίνη τύπου Β, η ένωση γίνεται μεταξύ του άνθρακα της θέσης -8 ενός άλλου μορίου κατεχίνης ή επικατεχίνης. Το μόριο, όπως προαναφέρθηκε, δεν έχει διπλό δεσμό στον ετεροκυκλικό δακτύλιο. Αυτό σημαίνει ότι το μόριο δεν είναι επίπεδο. Έτσι, ένα μέρος του μορίο της προκυανιδίνης βρίσκεται προς τα εμπρός και ένα προς τα πίσω. Εξάλλου, ανάλογα με το συνδυασμό των κατεχινών, προκύπτουν τέσσερις προκυανιδίνες (B_1,B_2,B_3,B_4) (Παπαδιώτη, Γιαννακοπούλου, 2001, Κουράκου - Δραγωνά, 2002).

Η ονομασία των προανθοκυανιδών είναι αρκετά περίπλοκή μιας και υπάρχουν διαφορετικά συστήματα και πολλά ονόματα. Ανάμεσα σε αυτά, τα πιο συνηθισμένα συνώνυμα είναι: προκυανιδίνες, ανθοκυανογενή, κατεχίνες, ταννίνες, ταννινογενή, συμπυκνωμένες ταννίνες. Αυτά τα ονόματα μερικές φορές χρησιμοποιούνται για άλλες ουσίες ή ως ένας συνπροστιθέμενος όρος για να βοηθήσει στην έκφραση ενός συνόλου πολυφαινολών που περιλαμβάνει προανθοκυανιδίνες.

Στη συνέχεια της εργασίας θα αναφέρεται η συντομογραφία των προανθοκυανιδών καθώς και η ονομασία κατά Porter. Εν συντομία αυτή προστάζει:

- Η σύνδεση μεταξύ των μονομερών και η τελική μορφή του μορίου καθώς και το νέο ασύμμετρο άτομο θα ονομαστεί ανάλογα με τη σύνδεση των πολυσακχαριτών στο μόριο π.χ. 4α→8.



Εικ. 10 Μια τριμερής προανθοκυανιδίνη Γαλλοκατεχίνη-(4α→8)-κατεχίνη-(4α→8)-κατεχίνη ή Προδελφινιδίνη C_2 ή GC-C-C (Benno F. Zimmermann, 2004)

- Οι απλά συνδεδεμένες προανθοκυανιδίνες ονομάζονται τύπου Β, ενώ οι διπλά συνδεδεμένες ονομάζονται τύπου Α.

Για την κατάταξη των μονομερών στον τύπο Β, το μονομερές με μόνο ένα ενδοφλαβονικό δεσμό στον C_4 θεωρείται ότι είναι η κορυφή του μορίου και ονομάζεται μονάδα Τ. Ένα μονομερές με δεσμό στον C_4 και με ένα δεύτερο δεσμό με άλλο μονομερές στον C_6 ή C_8 βρίσκεται στο κέντρο του μορίου και καλείται μονάδα Μ. Αν και οι τρεις θέσεις (C_4, C_6 και C_8) του μονομερούς είναι συνδεδεμένες με διαφορετικά μονομερή τότε καλείται μονάδα J (αυτή η ονομασία δεν έχει καθιερωθεί επίσημα). Ένα μονομερές με μόνο ένα δεσμό στον C_6 ή C_8 καλείται βάση (μονάδα Β). (Benno F. Zimmermann, 2004).

Τύπος	Άνω μέρος μορίου	Κάτω μέρος μορίου	Δεσμός** ένδοφλαβονικός
B_1	(–) επικατεχίνη	(+) κατεχίνη	C_4-C_8
B_2	(–) επικατεχίνη	(–) επικατεχίνη	C_4-C_8
B_3	(+) κατεχίνη	(+) κατεχίνη	C_4-C_8
B_4	(+) κατεχίνη	(–) επικατεχίνη	C_4-C_8

Εικ. 11 Οι διμερείς προκυανιδίνες τύπου B_1, B_2, B_3, B_4 (Κουράκου - Δραγωνά, 2002)

1.2.11 Ταννίνες

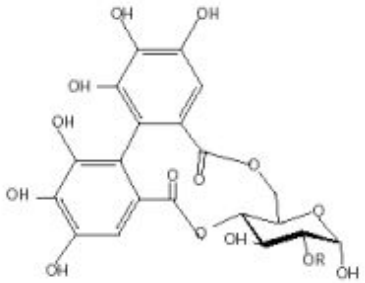
Οι ταννίνες έχουν κοινή ιδιότητα. Ενώνονται με τις πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή, όπως π.χ. με πολυσακχαρίτες. Από αυτή τους την ιδιότητα απορρέει η στυφή τους γεύση. Καθώς οι ταννίνες ενώνονται με τις πρωτεΐνες του εκκρίματος των σιελογόνων αδένων, αυτό χάνει την ικανότητά του να υγραίνει το στόμα. Επίσης, ανστέλλουν τη δράση των ενζύμων αυτού του εκκρίματος λόγω δέσμευσης της πρωτεϊνικής ομάδας τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να φράσσουν οι βλεννογόνοι και να παρεμποδίζεται η εκροή του σάλιου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι ταννίνες προκύπτουν από τον πολυμερισμό των φλαβανοειδών φαινολών (Παπαδιώτη, Γιαννακοπούλου, 2001, Κουράκου - Δραγωνά, 2002).

Στη φύση και γενικά στα ανώτερα φυτά απαντούν τρεις κύρειες ομάδες ταννινών:

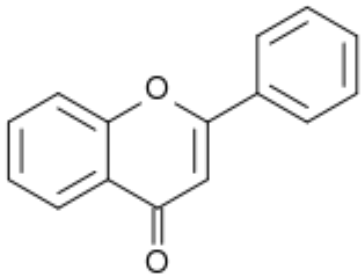
I. Οι υδρολυώμενες ταννινες

II. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες

III. Οι φλωροταννίνες



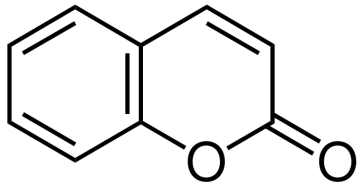
Εικ. 12 Ελλαγιοταννίνη - μια υδρολυόμενη ταννίνη



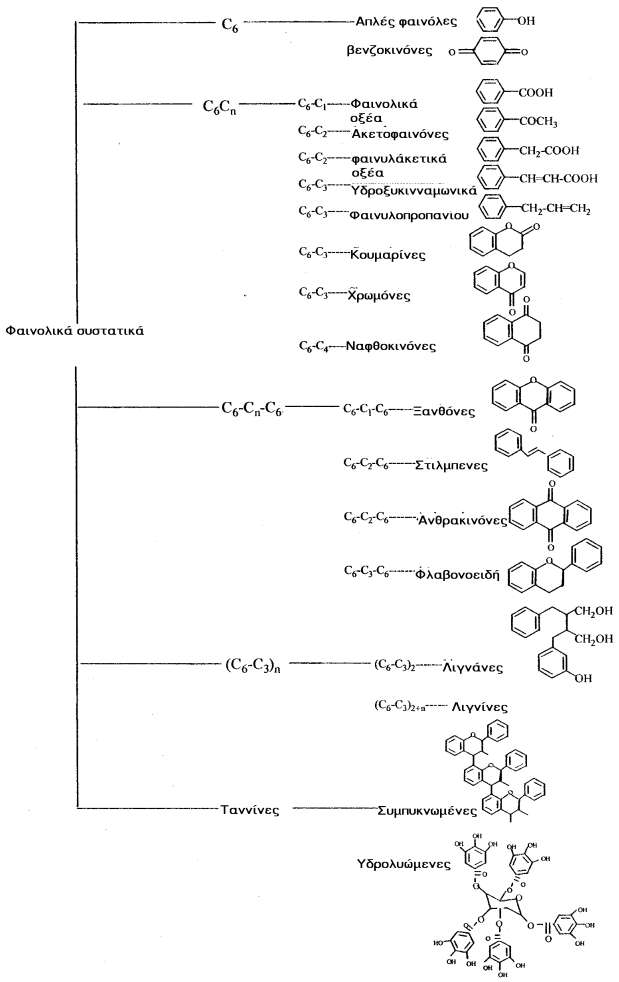
Εικ. 13 Φλαβόνη - μια συμπυκνωμένη ταννίνη

1.2.12 Κουμαρίνες

Τα παράγωγα του φαινυλοπροπανίου φέρουν τον ανθρακικό σκελετό του φαινυλοπροπανίου ο οποίος είναι ένα αρωματικό σύστημα στο οποίο είναι προσκολλημένη μια πλευρική αλυσίδα που αποτελείται από τρία άτομα άνθρακα. Σ' αυτά εκτός από τα κινναμωνικά οξέα, τη λιγνίνη (ένα υψηλού βαθμού πολυμερές), τις κινναμωνικές αλδεΰδες, τις κινναμωνικές αλκοόλες ανήκουν και οι κουμαρίνες, Η κουμαρίνη είναι η μητρική ένωση της οικογένειας των κουμαρινών, όπως είναι το κινναμωνικό οξύ για την οικογένεια των κινναμωνικών οξέων. Εάν το κινναμωνικό οξύ οξειδωθεί σε ο-θέση,ως προς την πλευρική αλυσίδα και στη συνέχεια σχηματισθεί δακτύλιος λακτόνης, με αποβολή ενός μορίου ύδατος, τότε σχηματίζεται η κουμαρίνη. Οι κουμαρίνες είναι λακτόνες του ο-υδροξυκινναμωμικού οξέως.



Εικ. 14 Το μόριο της κουμαρίνης



Εικ. 15 Κατηγορίες φαινολικών παραγώγων (Γκρέκος, Χάδος, 2002)

2.1 Βιοσύνθεση φαινολικών παραγώγων στην άμπελο

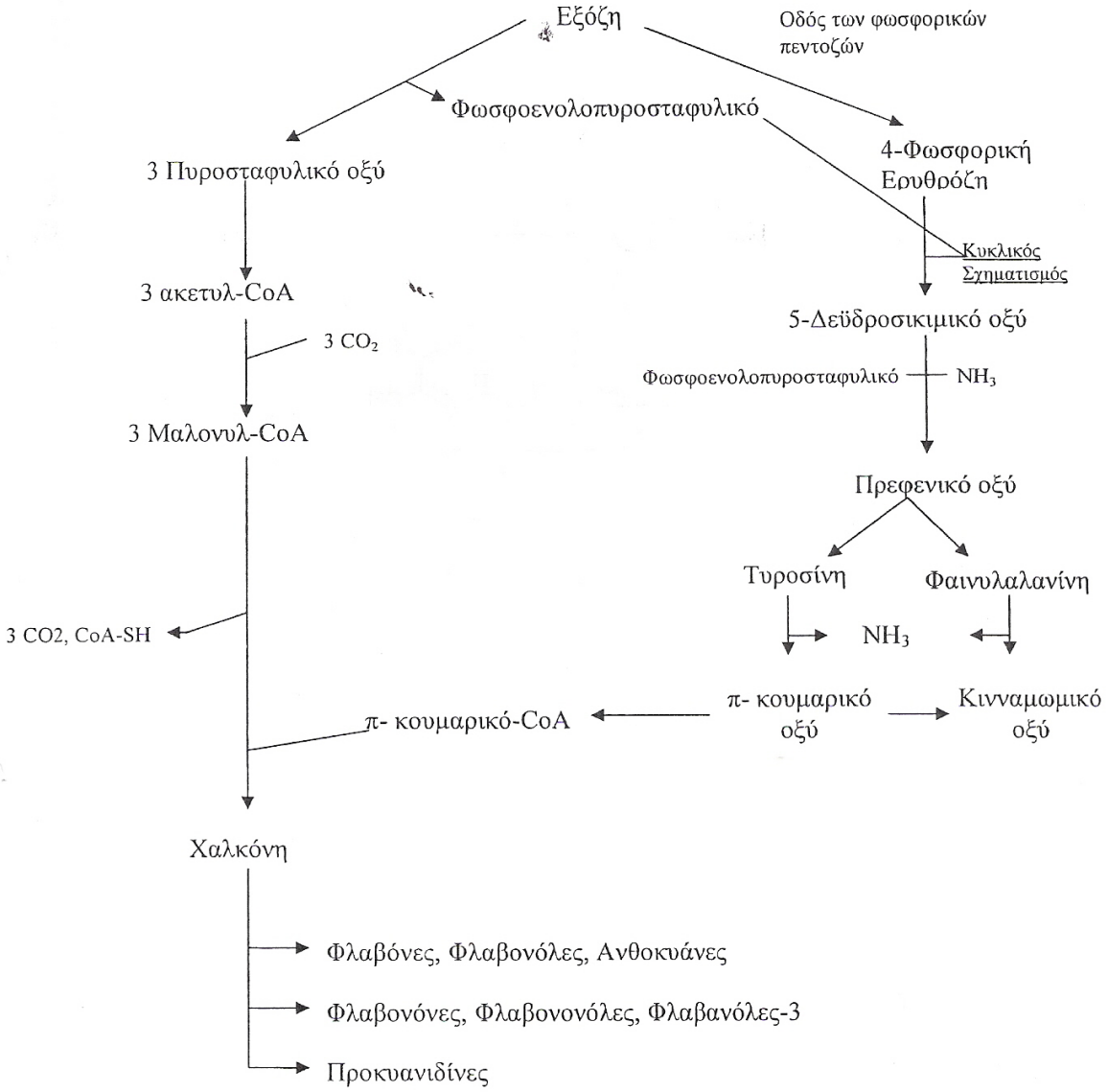
Η βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών, όπως αναφέρθη και ανωτέρω, ξεκινά από την έναρξη της ανάπτυξης των ραγών. Οι ουσίες αυτές αποτελούν δευτερεύοντα συστατικά του καταβολισμού των σακχάρων. Η σύνθεσή τους είναι άμεσα συνδεδεμένη με το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Στην πραγματικότητα, στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών εμπλέκονται δύο μεταβολικά μονοπάτια. Η οδός των φενυλ-προπανοειδών και το μονοπάτι του σικιμικού οξέως, το οποίο αποτελεί μέρος της οδού των φενυλ-προπανοειδών (Ribereau – Gayon, 2006). Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φενυλ-προπανοειδών είναι γενικά αποδεκτό ότι καταλήγει στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Ωστόσο, παρακλάδια της συγκεκριμένης μεταβολικής οδού έχουν σαν αποτέλεσμα τη βιοσύνθεση μιας πληθώρας φαινολικών ενώσεων (Harborne 1967, Gerats and Martin 1992, Haslam 1998).

Η έναρξη της βιοσύνθεσής τους ξεκινά από τη συμπύκνωση της 4-φωσφορικής ερυθρόζης (προϊόν της οδού των φωσφορικών πεντοζών) με το φωσφοενολο-πυροσταφυλικό οξύ (προϊόν της γλυκολυτικής οδού). Το μονοπάτι αυτό είναι γνωστό ως οδός του σικιμικού οξέος και οδηγεί στο σχηματισμό του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέως, καθώς και των αρωματικών αμινοξέων (π.χ. PHE, TYR).

Επίσης, η συμπύκνωση τριών μορίων ακετυλο-συνενζύμου Α (ακέτυλο – CoA), προερχόμενα από τον κύκλο του κιτρικού οξέος, οδηγεί στο σχηματισμό ενός βενζοϊκού δακτυλίου, ο οποίος με τη σειρά του συμπυκνώνεται με ένα μόριο κινναμωμικού οξέος και παράγεται μια ομάδα μορίων, τα οποία είναι γνωστά με το όνομα φλαβονοειδή. Τα μόρια αυτά έχουν δύο βενζοϊκούς δακτυλίους, οι οποίοι ενώνονται με μια C3 ανθρακική αλυσίδα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα μόρια αυτά περιέχουν και έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλική δακτύλιο (Ribereau – Gayon, 2006). Μετά το σχηματισμό της βασικής μορφής του μορίου των φλαβονοειδών (σχηματισμός φλαβυλίου), μπορούν να λάβουν χώρα οι διάφορες βιοχημικές διεργασίες, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή του μορίου. Έτσι, οι διάφορες μεθυλιώσεις, εστεροποιήσεις, γλυκοζιλιώσεις και υδροξυλιώσεις στις οποίες υπόκειται το μόριο εξηγούν την τόσο μεγάλη ποικιλία των φαινολικών μορίων που απαντούν στη σταφυλή.

Ωστόσο, στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί μια βασική διαφορά μεταξύ της βιοσύνθεσης των ανθοκυανών και των υπολοίπων φαινολικών ενώσεων. Στις τελευταίες, τα άγλυκα μόρια είναι τα μόνα υποστρώματα δράσης των ενζύμων που καταλύουν τις υδροξυλιώσεις και τις μεθυλιώσεις. Η εστεροποίηση με τη γλυκόζη και η ακυλίωσή της είναι τα τελευταία στάδια στην αλυσίδα των μετασχηματισμών. Αντίθετα, στις ανθοκυάνες προηγείται η εστεροποίηση με τη γλυκόζη, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του ασταθούς ανθοκυανιδινικού μορίου. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται και οι υπόλοιπες αντιδράσεις. Τα παραπάνω εξηγούν το γεγονός ότι δεν έχουν βρεθεί ελεύθερες ανθοκυανιδίνες στη φύση (Κοτσερίδης, 2002).

Στα δύο αυτά μεταβολικά μονοπάτια, κρίσιμη είναι η δράση του ενζύμου φενυλαλανίνη αμμωνία λυάση (PAL E.C. 4.3.1.5). Η δράση του ενζύμου συνίσταται στην εκτροπή της φενυλαλανίνης από την πρωτεϊνοσύνθεση και στην εξάλειψη της ομάδας NH3. Η δράση του έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή του *trans*-κινναμωμικού οξέως, καθώς και διάφορων άλλων φαινολικών ενώσεων. Η PAL απαντά στα επιδερμικά κύτταρα της ράγας, καθώς και στα γίγαρτα. Στα τελευταία, το ένζυμο έχει τη μέγιστη ενεργότητα κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης της ράγας (στάδιο της πράσινης ράγας) και παραμένει σταθερή όσο πλησιάζουμε προς τον περκασμό. Από αυτή τη χρονική στιγμή και μετά η ενεργότητά της μειώνεται. Αντίθετα, η PAL που απαντά στους φλοιούς παρουσιάζει τη μέγιστη ενεργότητα κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης και μειώνεται σταδιακά όσο πλησιάζουμε στον περκασμό.



Εικ. 15 Το μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των φενυλ-προπανοειδών (Κοτσερίδης, 2002)

3.1 Οξειδωτικά φαινόμενα στον οίνο

3.1.1 Φαινολικά παράγωγα στους λευκούς οίνους

Το γλεύκος είναι ένα ιδιαίτερα ευπαθές, στις πάσης φύσεως οξειδώσεις, υπόστρωμα. Οι λευκοί οίνοι είναι πιο ευπαθείς στις οξειδώσεις εν αντιθέσει με τους ερυθρούς. Η μεγάλη περιεκτικότητα των τελευταίων σε φαινολικά παράγωγα, ιδιαίτερα σε ταννίνες, τους καθιστά πιο ανθεκτικούς έναντι των ενζυμικών και χημικών οξειδώσεων, δύο φαινομένων που είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με την επαφή του γλεύκους ή του οίνου με το οξυγόνο (Ribereau – Gayon, 2006). Η περιεκτικότητα των λευκών οίνων σε φαινολικά παράγωγα είναι πολύ μικρότερη αυτής των ερυθρών, καθώς η επαφή του γλεύκους με τα στερεά μέρη της σταφυλής πραγματοποιείται μόνο κατά τη διάρκεια της παραμονής της σταφυλομάζας στο πιεστήριο με σκοπό την εκχύλιση, κυρίως των αρωματικών ουσιών.

Οι λευκοί οίνοι και τα γλεύκη τους περιέχουν βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα, κατεχίνες, προκυανιδίνες και φλαβονόλες (Ribereau - Gayon, 1964, Weinges and Piretti, 1972). Τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί μια νέα κλάση συμπλόκων ταννινών -πρωτεϊνών, η οποία με τη σειρά της συμβάλει και αυτή στη σύσταση των λευκών οίνων σε φαινολικά παράγωγα (Lea *et al*., 1979, Singleton *et al*., 1979).

Το 1996, ο Biau προσδιόρισε 13 μόρια, τα οποία είναι παρόντα σε λευκούς οίνους, τόσο γλυκούς, όσο και σε ξηρούς. Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (HPLC) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) (Voyatzis, 1984, Kovac *et al*., 1990, Biau *et al*., 1995). Το κύριο φαινολικό παράγωγο διάφορων τύπων λευκών οίνων είναι η τυροσόλη (*p*-υδροξυφενυλαιθυλ-αλκοόλη). Η ένωση αυτή παράγεται από το μεταβολισμό της τυροσίνης από της ζύμες και απαντάται στους οίνους σε συγκεντρώσεις 6-25 mg/L (Sapis, 1967). Εκτός από την τυροσόλη, έχουν βρεθεί κινναμωμικά οξέα, p-κουμαρικό, καφεϊκό οξύ, καθώς και ίχνη φερουλικού οξέος. Τα παραπάνω βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, καθώς και εστεροποιημένα με τρυγικό οξύ (Ribereau - Gayon, 1965). Τα προαναφερθέντα φαινολικά παράγωγα εμπλέκονται στο καφέτιασμα των λευκών οίνων (Cheynier *et al*., 1995).

Σε λευκούς ξηρούς οίνους, η περιεκτικότητα των φαινολικών ουσιών κυμαίνεται μεταξύ 5 και 250 mg/L. Σε γλυκούς οίνους προερχόμενους από ευγενή σήψη, η ανωτέρω περιεκτικότητα είναι κατά πολύ μικρότερη, μιας και η δράση του *Botrytis cinerea* συνοδεύεται από μεγάλης κλίμακας καταστροφή των φαινολικών.

3.1.2 Οξείδωση φαινολικών παραγώγων και φαινόμενο Browning

Όπως αναφέρθη και ανωτέρω, τα γλεύκη και οι οίνοι αποτελούν υποστρώματα οξείδωσης. Η οξείδωση μπορεί να πλήξει τόσο τους ερυθρούς, όσο και τους λευκούς οίνους. Ωστόσο, οι τελευταίοι είναι περισσότερο ευαίσθητοι στο εν λόγω φαινόμενο, μιας και η περιεκτικότητά τους σε φαινολικά παράγωγα και ιδιαίτερα σε ταννίνες, οι οποίες παρέχουν αντιοξειδωτική προστασία στους οίνους, τους καθιστά ιδιαίτερα ευπαθείς.

Οι οξειδώσεις που λαμβάνουν χώρα στους οίνους είναι ενζυμικής φύσεως και επάγονται από την παρουσία του οξυγόνου τη φύση και τη συγκέντρωση των φαινολικών παραγώγων, καθώς και την ενεργότητα των ενζύμων κατά τα αρχικά στάδια της οινοποίησης (Macheix *et al*., 1991). Τα δύο ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτές ανήκουν στην κατηγορία των πολυφαινολοξειδασών.

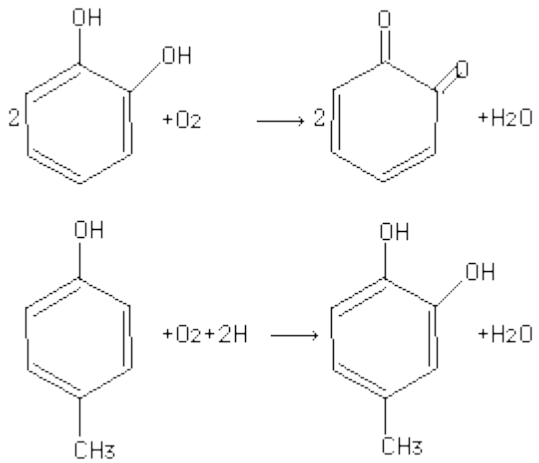
Η οξείδωση των φαινολικών ουσιών έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυμερισμενων ενώσεων με χαρακτηριστικό καφετί χρωματισμό. Η παρουσία των ενώσεων αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την υποβάθμιση του τελικού προϊόντος, καθώς επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των λευκών οίνων.

I. Τυροσινάση

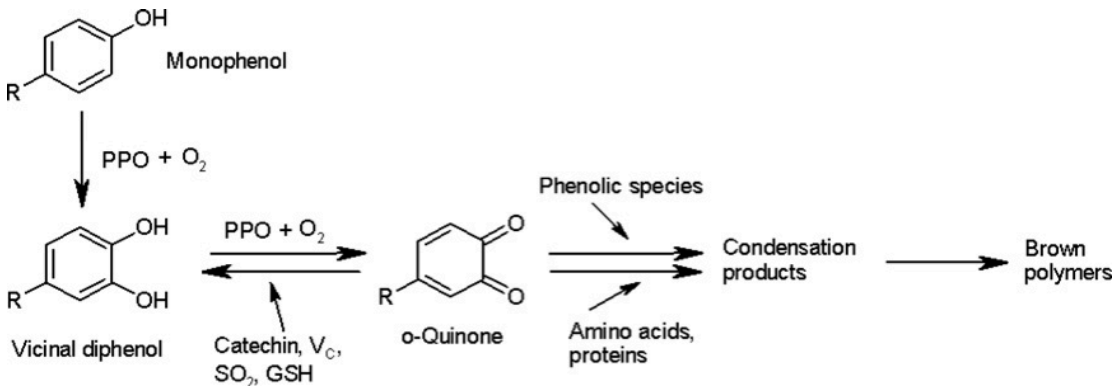
Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, μετά την έκθλιψη των ραγών και την εξαγωγή του γλεύκους, ο χυμός καθίσταται ευάλωτος στις ενζυμικές οξειδώσεις (Sapis *et al*., 1983). Οι ουσίες που συμμετέχουν στις αντιδράσεις αυτές είναι τα φαινολικά παράγωγα. Το παραπάνω φαινόμενο (γνωστό ως φαινόμενο Browning), όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, είναι πιο εμφανές στην περίπτωση λευκών οίνων (οξείδωση κατεχινών και φαινολικών οξέων). Επίσης, η μεταβολή του χρώματος δεν είναι τόσο εμφανής σε γλεύκη από ερυθρά σταφύλια, λόγω του χρώματος.

Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την παραπάνω αντίδραση ήταν γνωστά με το γενικό όνομα *πολυφαινολοξειδάσες*. Ο Dubernet, μετά από έρευνα που πραγματοποίησε το 1974, ανακάλυψε ότι υπάρχουν δύο τύποι οξειδορεδουκτασών στα σταφύλια, οι *τυροσινάσες* που ανευρίσκονται σε υγιείς ράγες και οι *λακκάσες* που απαντώνται στα σταφύλια μετά από προσβολή *Botrytis cinerea*. Οι τυροσινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση οξείδωσης των διφαινολών (*οξειδάση της κατεχόλης ή κατεχολάση* EC 1.10.3.1) και των μονοφαινολών (*μονοξυγενάση της μονοφαινόλης ή κρεσολάση* EC 1.14.18.1) σε *κινόνες* (Harel et al., 1973). Η βέλτιστη τιμή pH δράσης τους είναι 4,75 και αποτελούνται από ισοένζυμα, τα οποία διαφέρουν στις καταλυτικές τους ιδιότητες (P. Riberau-Gayon *et al*., 2006). Η ένταση της οξείδωσης που πραγματοποιείται εξαρτάται από την κατανάλωση O_2 από το γλεύκος. Ο ρυθμός της διάλυσης του οξυγόνου διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία αμπέλου και κυμαίνεται σε τιμές περί 0,5 – 4,6 mg/L/min.

Ο μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης μελετήθηκε το 1987 από τον Singleton. Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, η παρουσία οξυγόνου είναι απαραίτητη για τη δράση του ενζύμου. Τα υποστρώματα πάνω στα οποία δρα η τυροσινάση είναι τρυγικοί εστέρες *υδροξυκιναμμωμικών οξέων* (P. Riberau-Gayon *et al*., 2006). Οι κινόνες που παράγονται υφίστανται περαιτέρω αντιδράσεις μη ενζυμικής φύσης, οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία ενώσεων με χαρακτηριστικό καφέ χρώμα. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν από τους Singleton *et al*., 1985, ως *GRP* (*Grape Reaction Product*). Ένα χρόνο αργότερα, οι Cheynier *et al*., 1986, ταυτοποίησαν το GRP ως S-γλουταθυονυλ-2-*trans* καφεουλτρυγικό οξύ. Η συγκεκριμένη ένωση δεν οξειδώνεται από τη λακκάση και έτσι δεν επηρεάζει το χρώμα του οίνου. Η γλουταθειόνη μπορεί να ενωθεί με κινόνες. Έτσι, αποτρέπεται η συμπύκνωση του δεσμευμένου μορίου με άλλα μόρια κινονών και δεν παρατηρείται αύξηση της έντασης του καφετιάσματος (P. Riberau-Gayon *et al*., 2006).



Εικ. 16 Τρόπος δράσης τυροσινάσης (Μ. Κωμαΐτης, 2004)

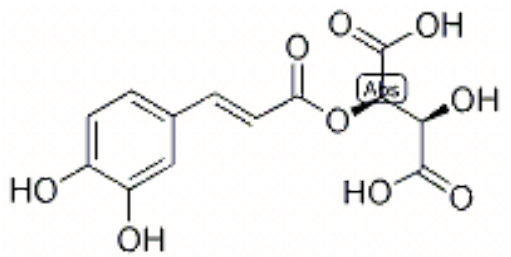


Εικ. 17 Οξείδωση φαινολικών ουσιών στο γλεύκος (P. Ribereau - Gayon, 2006)

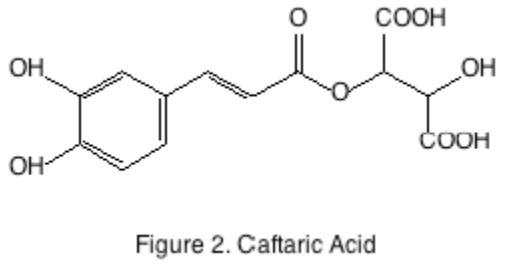
Το φαινόμενο Browning στους λευκούς οίνους εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη συγκέντρωση των *φλαβονοειδών φαινολών* του γλεύκους (Simpson, 1982, Schneider, 1989). Η οξείδωση και η συμπύκνωσή τους είναι πιο γρήγορη και τα προϊόντα που παράγονται έχουν πιο έντονο χρώμα εν συγκρίσει με τα προϊόντα οξείδωσης των μη φλαβονοειδών φαινολικών ουσιών (Cheynier *et al*., 1989). Επίσης, όπως αναφέρθη νωρίτερα, η συγκέντρωση της γλουταθειόνης παίζει σημαντικό ρόλο στην ένταση της οξείδωσης.

Έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές ούτως ώστε να παρεμποδιστεί η δράση της τυροσινάσης στα γλεύκη. Ωστόσο, οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στις μέρες μας είναι η προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (ποσότητα μεγαλύτερη από 50 mg SO_2/L) κατά την έκθλιψη, η κατεργασία με μπετονίτη και η εφαρμογή κολλαρίσματος. Τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται και μια άλλη τεχνική, σύμφωνα με την οποία ανεβάζουμε τη θερμοκρασία του γλεύκους στους 70-80°C. Η τεχνική αυτή καλείται *θερμοοινοποίηση* (Κουράκου - Δραγωνά, 2002). Ο Muller Spath το 1977 πρότεινε μια επαναστατική για την εποχή μέθοδο προστασίας έναντι της οξείδωσης που προκαλεί η τυροσινάση. Η τεχνική αυτή είναι η *υπεροξυγόνωση* και χρησιμοποιείται ακόμα και στις ημέρες μας (Muller Spath, 1990).

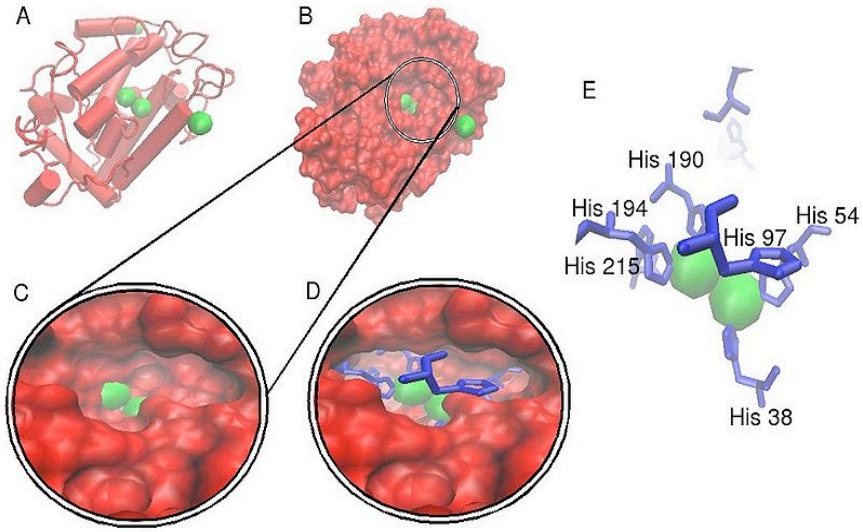
Η υπεροξυγόνωση προκαλεί μια αύξηση της δραστικότητας των πολυφαινολοξειδασών σε χρονικό διάστημα λίγων λεπτών (Guerzoni *et al*., 1981). Σύμφωνα με τους Moutounet *et al*., 1990, η ενζυμική ενεργότητα δεν είναι ο περιοριστικός παράγοντας της οξείδωσης. Σχεδόν πάντα στα γλεύκη υπάρχει αρκετή ποσότητα τυρισονάσης, η οποία είναι ικανή να οξειδώσει τα υδροξυκιναμμωμικά οξέα (πρώτο στάδιο της ενζυμικής αντίδρασης), παρουσία οξυγόνου. Επίσης, το ένζυμο αναγεννάται στο τέλος της ενζυμικής αντίδρασης. Ο παράγοντας μείωσης της ενεργότητας της τυροσινάσης είναι η εξάντληση του υποστρώματος.



Εικ. 18 trans-γλουταθυονυλ-καφεοϋλτρυγικό οξύ



Εικ. 19 Καφταρικό οξύ



Εικ. 20 Η τυροσινάση και το ενεργό της κέντρο (www.absoluteastronomy.com/ topics/Tyrosinase)

ΙΙ. Λακκάση

Η άλλη πολυφαινολοξειδάση που παίζει σημαντικότατο ρόλο στην οξείδωση των φαινολικών παραγώγων των γλευκών με αποτέλεσμα το καφέτιασμά τους είναι η λακκάση. Όπως ανεφέρθει νωριτερα, το ένζυμο αυτό παράγεται από το μύκητα Botrytis cinerea, ο οποίος είναι ένας ιδιαίτερα διαδεδομένος ανά τον κόσμο μικροοργανισμός (Galet, 1977). Η δράση του συνίσταται στην καταστροφή και νέκρωση των ιστών του φυτού που προσβάλει. Η παρουσία νερού επάνω στον φυτικό ιστό και θερμοκρασία 18 ^{o}C είναι αποτελούν ιδανικές συνθήκες ανάπτυξής του.

Όμως, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου η ανάπτυξη και η δράση του *Botrytis cinerea* είναι αποδεκτή και επιθυμητή. Αναφερόμαστε στην ιδιαίτερη περίπτωση ορισμένων περιοχών της γης όπου παράγονται οι εκλεκτοί οίνοι που έχουν υποστεί *ευγενή σήψη*. Οι περιοχές αυτές είναι:

- Sauternes-Barsac
- Coteaux du Layon
- Tokay
- Trockenbeeren auslese

Χάρις τις ιδιαίτερες κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στις παραπάνω περιοχές (υψηλή υγρασία της πρώτες πρωινές ώρες και υψηλή θερμοκρασία κατά της μεσημβρινές), ο μύκητας αναπτύσσεται επάνω στις ράγες των σταφυλιών και προκαλεί τη λεγόμενη ευγενή σήψη. Ο οίνος που παράγεται ύστερα από οινοποίηση των ραγών διακρίνεται για τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.

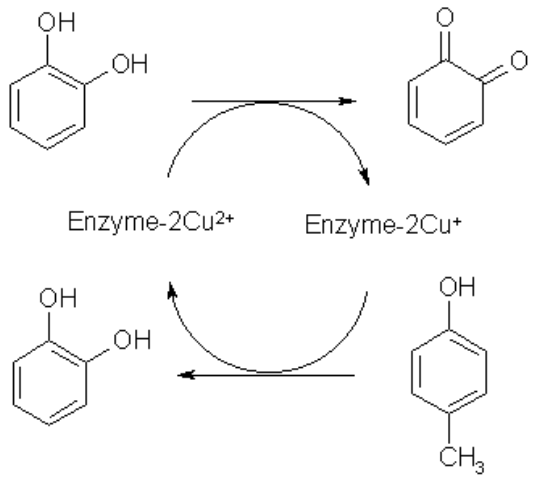
Ο μύκητας διαπερνά το φλοιό και εισέρχεται στη σάρκα χάρις με τη βοήθεια διαφόρων ενζύμων που εκκρίνει. Τα ένζυμα αυτά είναι πηκτινεστεράσες και πολυγαλακτουρονάσες. Ωστόσο, ο Grassin, 1987, απομόνωσε έναν παρεμποδιστή της πολυγαλακτουρονάσης σε ατρύγητα σταφύλια. Ο βαθμός δυσκολίας της εισαγωγής του μύκητα εξαρτάται από την ποικιλία, καθώς και από το στάδιο ωριμότητας των ραγών. Κατά τη διάσπαση του φλοιού, ο μύκητας χρησιμοποιεί

μικρές ποσότητες πηκτινοκυτταρινικών κυτταρικών τοιχωμάτων για την ανάπτυξή του και τις ανάγκες του μεταβολισμού του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτουρονικού οξέος στο γλεύκος λόγω της αποικοδόμισης των πηκτινών (P. Riberau-Gayon *et al*., 2006). Έτσι, παρουσιάζονται προβλήματα κατά την απολάσπωση του γλεύκους. Έκτοτε, ο *B. cinerea* εκκρίνει διάφορα ένζυμα, τα οποία μεταβάλλουν τη σύσταση της ράγας και δημιουργούν δυσκολίες κατά την οινοποίηση. Τα ανωτέρω έχουν σαν αποτέλεσμα την αλλοίωση της ποιότητας του παραγόμενου οίνου.

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που προκαλεί ο *B. cinerea* είναι η οξείδωση των φαινολικών ουσιών. Η παραπάνω αντίδραση συμβαίνει λόγω μιας εξωκυτταρικής οξειδορεδουκτάσης που παράγει ο μύκητας, της *λακκάσης* (EC 1.10.3.2). Η ικανότητα του ενζύμου να οξειδώνει ένα ευρύ φάσμα φαινολικών ενώσεων το καθιστά άκρως επικίνδυνο για τις ουσίες αυτές (Salgues *et al*., 1986). Η λακκάση παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα στο pH του γλεύκους και του οίνου, καθώς και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο θειώδη ανυδρίτη σε σχέση με την τυροσινάση.

Η σύνθεση της λακκάσης από το μύκητα επάγεται από δύο ομάδες υποστρωμάτων. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει ορισμένα φαινολικά συστατικά (γαλλικό και υδροξυκινναμωμικό οξύ), τα οποία πιθανώς να είναι τοξικά για τον μύκητα. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ουσίες που προέρχονται από την αποικοδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων των ιστών (Marbach *et al*., 1985). Η μοριακή δομή του ενζύμου προσαρμόζεται στο pH του ξενιστή ιστού και στη φύση των φαινολικων ενώσεων που απαντούν σε αυτόν.

Η λακκάση μετατρέπει τις κύριες φαινολικές ενώσεις των λευκών σταφυλιών (καφεϊκό και p-κουμαρικό οξύ είτε σε ελεύθερες είτε σε εστεροποιημένες με τρυγικό οξύ μορφές) σε κιννόνες (Salgues *et al*., 1986). Εν συνεχεία, οι ενώσεις αυτές πολυμερίζονται και σχηματίζουν ενώσεις με χαρακτηριστικό καφέ χρώμα, οι οποίες είναι οι κύριες υπεύθυνες για το φαινόμενο Browning. Ο ρυθμός παραγωγής της λακκάσης από το μύκητα μειώνεται στα τελευταία στάδια της ανάπτυξής του.

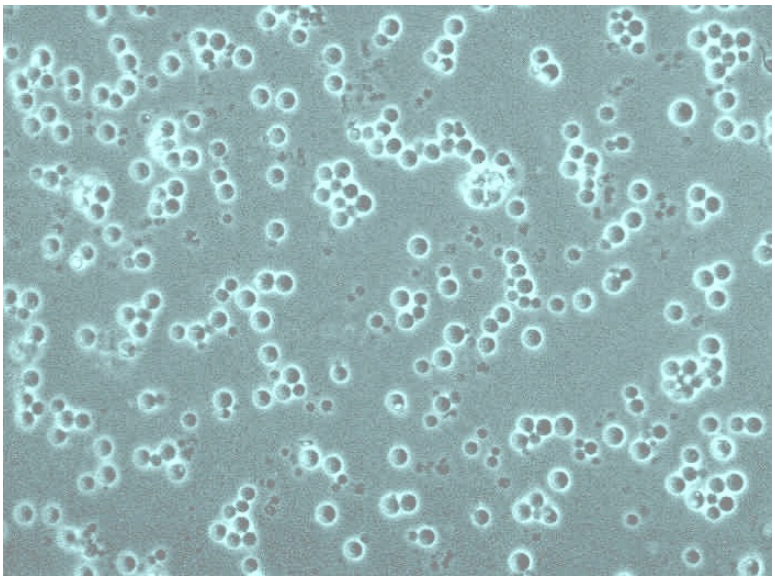


Εικ. 21 Τρόπος δράσης της λακκάσης

Εικ. 22 Προσβολή σταφυλιών της ποικιλίας Riesling από το μύκητα *Botrytis cinerea*

4. Το είδος *Saccharomyces cerevisiae*

4.1 Εισαγωγή



Εικ. 23 Κύτταρα του είδους *Saccharomyces cerevisiae*
(www.bio.miami.edu/.../ 255/255hist/255history.html)

Η μικροβιακή χλωρίδα των σταφυλιών διαμορφώνεται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι το κλίμα, οι εφαρμοζόμενες καλλιεργητικές τεχνικές κ.α. Αν και σε αρκετές περιπτώσεις οι συνθήκες ανάπτυξης των πρέμνων είναι ιδιαίτερα αντίξοες, ωστόσο, ο πληθυσμός των μυκήτων που απαντούν σ' αυτές είναι ιδιαίτερα υψηλός. Τα στελέχη που τον απαρτίζουν ανήκουν κυρίως στα γένη *Rzizopus, Aspergillus, Mucor* και *Penicillium* (Amerine *et al.,* 1980). Ωστόσο, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, όπως είναι η υγρασία και οι ρωγμές στην επιφάνεια της σταφυλής, μπορεί να αναπτυχθούν στελέχη του γένουν *Botrytis*. Σε περιπτώσεις σοβαρού τραυματισμού της ράγας έχει παρατηρηθεί η αύξηση μυκήτων, οι οποίοι μπορούν να εξαντλήσουν προς όφελός τους βασικές βιταμίνες και μέταλλα του γλεύκους, με αποτέλεσμα την εμφάνιση δυσκολιών περάτωσης της αλκοολικής ζύμωσης από τις ζύμες (Boulton *et al*., 1996).

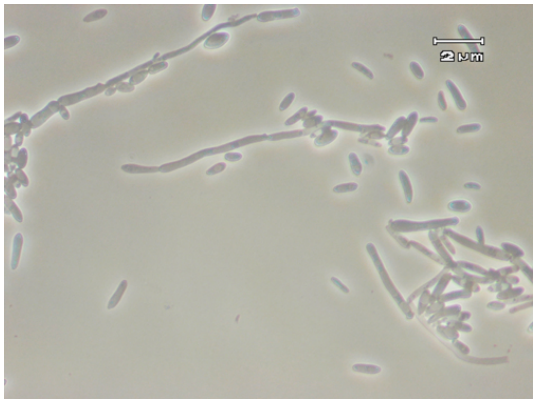
Όσον αφορά τις ζύμες που απαντώνται τη σταφυλή, αυτές ανήκουν συνήθως στα γένη *Metschnikowia, Hansenula, Hanseniaspora, Candida* και *Kloeckera* και είναι γνωστές ως άγριες ζύμες (Castelli, 1957, Adams, 1960). Εν αντιθέσει με τα ανωτέρω είδη, το είδος *Saccharomyces* απαντάται σε πολύ μικρότερο βαθμό στις σταφυλές. Ωστόσο, το συγκεκριμένο είδος ζυμών έχει επικρατήσει ως ο κύριος μικροοργανισμός για την περάτωση της αλκοολικής ζύμωσης, μιας και παρουσιάζει πολύ καλή προσαρμοστικότητα στις αντίξοες συνθήκες που αναπτύσσονται κατά την αλκοολική ζύμωση.

Όπως είναι γνωστό, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, οι συνθήκες που επικρατούν στο μέσο είναι αποκλειστικά αναερόβιες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απουσία μικροβιακής δραστηριότητας αερόβιων μικροοργανισμών, όπως είναι οι μύκητες και τα αερόβια βακτήρια. Όμως, δεν ισχύει το ίδιο και για τις άγριες ζύμες, οι οποίες είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί και έτσι παρευρίσκονται στην αλκοολική ζύμωση και ανταγωνίζονται ως προς τα θρεπτικά συστατικά τον ζυμομύκητα *Saccharomyces*. Ωστόσο, λόγω της μη καλής προσαρμοστικότητας των ειδών αυτών στις εν λόγω συνθήκες, στο τέλος της ζύμωσης ανιχνεύεται ένας πολύ μικρός αριθμός (Boulton *et al*., 1996).

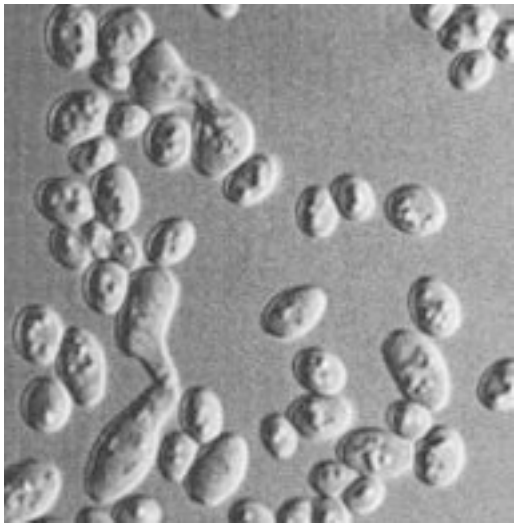
Πιν. 3 Μακρομοριακά συστατικά των κυττάρων των ζυμών (Walker, 1998)	
Είδος μακρομορίου	**Συστατικά στοιχεία**
Πρωτεΐνες	Δομικές πρωτεΐνες: Κυρίως α-ακτίνη και τουμπουλίνη του κυτταροσκελετού, ιστόνες και μεμβρανικές πρωτεΐνες. Ριβοσωμικές πρωτεΐνες: Βρίσκονται στις 60S και 40S ριβονουκλεοπρωτεϊνικές υπομονάδες. Ορμονικές πρωτεΐνες: Φερομόνες σύζευξης. Λειτουργικές πρωτεΐνες: Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται αρκετά ένζυμα.
Γλυκοπρωτεΐνες	Δομικές μαννοπρωτεΐνες στα κυτταρικά τοιχώματα και ένζυμα (π.χ. ιμβερτάση) στην περιπλασματική ζώνη.
Πολυσακχαρίτες	Δομικοί πολυσακχαρίτες: Κυρίως η γλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος, η μαννάνη, η χιτίνη και οι ετεροπολυσακχαρίτες της κάψουλας. Αποθηκευτικοί πολυσακχαρίτες: Γλυκογόνο και τρεχαλόζη.
Πολυφωσφορικά	Κυρίως αποθηκευτικά πολυφωσφορικά στο κενοτόπιο.
Λιπίδια	Δομικά φωσφολιπίδια: Ελεύθερες στερόλες στις μεμβράνες. Αποθηκευτικά λιπίδια: Εστέρες στερόλης και τριγλυκερίδια. Λειτουργικά λιπίδια: Φωσφογλυκερινικά παράγωγα (μεταβίβαση σήματος) και ελεύθερα λιπαρά οξέα (διέγερση αύξησης και μεταβολισμού)
Νουκλεϊκά οξέα	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ: γενωμικό DNA (80%), μιτοχονδρικό γενωμικό DNA (10 - 20%) και εξωχρωμοσωμικό (1-5%). Ριβονουκλεϊκό οξύ: Περίπου 80% ως ριβονουκλεοπρωτεΐνη (rRNA), 5% mRNA στο κυτταρόπλασμα, στο αδρό ER και στα μιτοχόνδρια. Μερικά μικρά πυρηνικά μόρια RNA (snRNA).

4.2 Το γένος *Saccharomyces* και η επικράτησή του

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, το γένος *Saccharomyces*, είναι ο κύριος μικροοργανισμός της αλκοολικής ζύμωσης. Στην επικράτησή του αυτή συνεισφέρουν πολλοί παράγοντες. Η ταχεία παραγωγή αιθανόλης, η οποία είναι μια ισχυρά τοξική ουσία για αρκετούς μικροοργανισμούς, είναι ίσως το σημαντικότερο πλεονέκτημα του συγκεκριμένου ζυμομύκητα. Όμως, παρότι ο ίδιο ο μικροοργανισμός παρουσιάζει υψηλή ανοχή στην αιθανόλη, το ίδιο παρατηρείται και από ορισμένες ζύμες, οι οποίες είναι γνωστές με το όνομα ζύμες αλλοίωσης, που ανήκουν στα γένη *Zygosaccharomyces* και *Brettanomyces*.



Εικ. 24 Κύτταρα *Brettanomyces*
(quelujo.wordpress.com/.../)



Εικ. 25 Κύτταρα *Zygosaccharomyces*
(www.forumsains.com/ biologi/kombucha/)

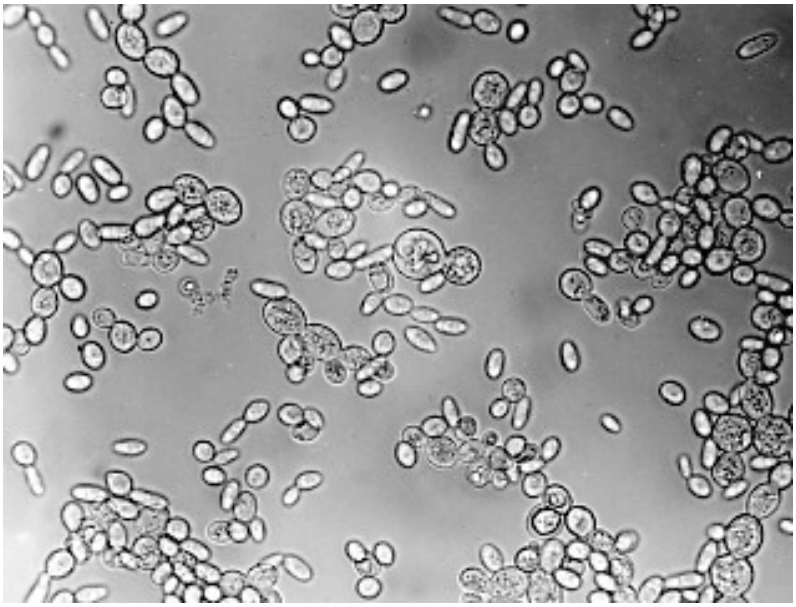
Εκτός από την ικανότητα ταχείας παραγωγής αιθανόλης σε μεγάλες ποσότητες, τα είδη του γένους *Saccharomyces* παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες που είναι δυνατόν να δημιουργηθούν κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η άνοδος της θερμοκρασίας είναι αποτέλεσμα της παραγωγή ενέργειας σε μορφή θερμότητας κατά τη ζύμωση. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι ορισμένα στελέχη του συγκεκριμένου είδους διατηρούν τη ζωτικότητά τους και συνεχίζουν τη ζύμωση ακόμα και όταν η θερμοκρασία πλησιάζει στους 38 ^{o}C, ενώ οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αδυνατούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 25 ^{o}C (Μπέλκα, 2007).

Οι ιδιαιτερότητες που παρουσιάζει το γένος *Saccharomyces* καθιστούν επιτακτική ανάγκη τον εμβολιασμό κάποιου γνωστού στελέχους τους γένους *Saccharomyces*, έτσι ώστε να εξασφαλισθεί η επιτυχημένη πορεία της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς και η ποιότητα του παραγόμενου οίνου (Boulton *et al*., 1996).

Πιν. 4 Η συστηματική κατάταξη της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*	
Βασίλειο	Μύκητες
Φύλο	Μυκόφυτα
Κλάση	Ασκομύκητες
Υποκλάση	Πρωτοασκομύκητες
Τάξη	Ενδομύκητες
Οικογένεια	*Saccharomyceteceae*
Γένος	*Saccharomyces*
Είδος	*Saccharomyces cerevisiae*

4.2.1 Μορφολογία και βιολογικός κύκλος του γένους *Saccharomyces*

Η ζύμη *Saccharomyces* είναι ένας ευκαριωτικός μικροοργανισμός με χαρακτηριστικό λεμονοειδές σχήμα, ο οποίος πολλαπλασιάζεται αγενώς με εκβλαστήσεις. Αναλόγως του στελέχους, το σχήμα του μικροοργανισμού μπορεί να ποικίλει από σφαιρικό, ωοειδές ή κυλινδρικό. Το μήκος του κυττάρου ποικίλει από 5-10 μm, ενώ το πλάτος από 1-3 έως 1-7 μm. Είναι ένας οξεόφιλος μικροοργανισμός που αναπτύσσεται κυρίως σε ελαφρώς ή μετρίως όξινο περιβάλλον (pH 4.5-6.5) με άριστη θερμοκρασία αύξησης τους 20-25 ^{o}C.



Εικ. 26 Το χαρακτηριστικό σχήμα των κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae* (users.rcn.com/.../ BiologyPages/Y/Yeast.html)

Το κύτταρο του ζυμομύκητα περιβάλλεται από ένα άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αποτελείται από γλυκάνες και μαννοπρωτεΐνες. Τα μόρια αυτά καθιστούν ανθεκτικότερο το κύτταρο στις απότομες μεταβολές της οσμωτικής πίεσης. Κάτω από το κυτταρικό τοίχωμα βρίσκεται ο περιπλασματικός χώρος που διαχωρίζει το κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη. Στον περιπλασματικό χώρο εναποτίθενται οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το κύτταρο του ζυμομύκητα, κάτι το οποίο έρχεται σε αντίθεση με άλλα είδη ζυμών, τα οποία εκκρίνουν πρωτεΐνες στον περιβάλλοντα χώρο. Το κυτόπλασμα των κυττάρων περιβάλλεται από την κυτταρική μεμβράνη, η οποία είναι εύθραυστη, αλλά ανθεκτική σε χαμηλές τιμές pH. Η κυτταρική

μεμβράνη αποτελείται από πρωτεΐνες και λιπίδια. Η περιεκτικότητά της σε μονο- και πολυ-ακόρεστα λιπαρά οξέα καθορίζει τη διαπερατότητά της και αποτελεί ίσως το σημαντικότερο τμήμα του κυττάρου, διότι ελέγχει την είσοδο και την έξοδο διάφορων ουσιών από το εσωτερικό του (Boulton *et al*., 1996).

Όπως ισχύει για όλους τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, έτσι και ο ζυμομύκητας *Saccharomyces spp*., διαθέτει πυρήνα και υποκυττάρια οργανίδια. Επίσης, τα στελέχη του είδους διαθέτουν μιτοχόνδριο, το οποίο αποτελείται από τρεις διαδοχικές μεμβράνες, στις οποίες βρίσκονται τα ριβοσώματα του μιτοχονδρίου, πολλά αντίγραφα του γενώματός τους, καθώς και τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη βιοσύνθεση μέρους των πρωτεϊνών του κυττάρου. Στα μιτοχόνδρια του κυττάρου απαντώνται και τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος, καθώς και της διάσπασης των λιπαρών οξέων. Κατά την αλκοολική ζύμωση που πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες, η λειτουργία των μιτοχονδρίων περιορίζεται και τα ένζυμα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων δεν βιοσυντίθενται (Ribereau - Gayon, 2006).

Εκτός των ανωτέρω, έχουν βρεθεί στελέχη του γένους *Saccharomyces* που δεν έχουν μιτοχόνδρια. Τα στελέχη αυτά καλούνται μικρά ή αναπνευστικά ανεπαρκή μεταλλαγμένα στελέχη. Δε μπορούν να αναπτυχθούν σε μη ζυμώσιμα υποστρώματα όπως η αιθανόλη και το πυροσταφυλικό οξύ. Ωστόσο, μπορούν να αναπτυχθούν σε υπόστρωμα σακχάρων (Μπέλκα, 2007).

Ο βιολογικός κύκλος του Saccharomyces cerevisiae αποτελείται από δύο φάσεις:

- Την απλοειδή
- Τη διπλοειδή

Αν υπάρχει αρκετή ποσότητα θρεπτικών στοιχείων, τόσο ο απλοειδής, όσο και ο διπλοειδής τύπος, μπορούν να υφίστανται συνεχείς κύκλους αύξησης και μίτωσης. Ο μικροοργανισμός παρουσιάζει ένα μεγάλο αριθμό εναλλακτικών μορφών αύξησης. Το ερέθισμα για τον καθορισμό της εκάστοτε μορφής (εκτός από τη φάση του ζευγαρώματος) είναι αποκλειστικά θρεπτικό.

Ο απλοειδής τύπος βρίσκεται σε μια από τις δύο συζευκτικές μορφές, οι οποίες ονομάζονται α και a. Τα απλοειδή α εκκρίνουν τη φερομόνη α, ενώ τα απλοειδή a εκκρίνουν τη φερομόνη a αντίστοιχα. Έκαστοι οι τύποι συζευκτικών απλοειδών, διαθέτουν στην επιφάνειά τους ειδικούς υποδοχείς, οι οποίοι αναγνωρίζουν τη φερομόνη του αντίθετου συζευκτικού τύπου. Όταν η εκάστοτε φερομόνη ενωθεί με τον αντίστοιχο υποδοχέα, επάγεται η είσοδος του κυττάρου στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Με αυτό τον τρόπο, η παρουσία του αντίθετου απλοειδούς, προκαλεί την εξάπλωση και το ξεκίνημα του σχηματισμού εξογκωμάτων προς τον αντίθετο συζευκτικό τύπο. Το σχήμα το οποίο προκύπτει από αυτή την εξάπλωση ονομάζεται 'shmoo'. Όταν επιτευχθεί η κυτταρική επαφή, ακολουθεί συγχώνευση των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία της διπλοειδούς μορφής.

Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται με εκβλάστηση. Κατά τη φάση αυτή, το κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλεται από λεπτή μεμβράνη, διαρρηγνύεται σε ένα σημείο, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το θυγατρικό κύτταρο. Το εκβλάστημα συνεχίζει να αναπτύσσεται σε μέγεθος, ώσπου τελικά αποσπάται από το μητρικό κύτταρο με σύσφιξη της βάσης, αφήνοντας στο σημείο της απόσπασης μια ουλή. Το θυγατρικό κύτταρο έχει τη δυνατότητα να εκβλαστάνει όταν βρίσκεται σε επαφή με το μητρικό κύτταρο. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται μια αλυσίδα κυττάρων, το λεγόμενο ψευδομυκήλιο. Κατά τη φάση της εκβλάστησης πραγματοποιείται πυρηνική διαίρεση και

ο ένας θυγατρικός πυρήνας περνάει στο εκβλάστημα, ενώ ο άλλος παραμένει στο μητρικό κύτταρο (Alexopoulos *et al*., 1996).

Όταν καταναλωθεί η περίσσεια των θρεπτικών συστατικών του μέσου, τόσο τα απλοειδή, όσο και τα διπλοειδή κύτταρα εισέρχονται στη στατική φάση της κυτταρικής αύξησης. Τα εν λόγω κύτταρα διαφέρουν σε μορφολογικό, αλλά και βιοχημικό επίπεδο από τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση του πολλαπλασιασμού. Η μη εμφάνιση εκβλαστήματος και το σφαιρικό τους σχήμα είναι μερικές από τις διαφορές αυτές. Επίσης, παρουσιάζουν μεγαλύτερα επίπεδα συγκέντρωσης αποθηκευτικών υδατανθράκων, τρεχαλόζης και γλυκογόνου, καθώς και αυξημένη αντοχή σε ένα πλήθος από στρεσογόνες και δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες εν συγκρίσει με τα εν πολλαπλασιασμό κύτταρα (Warner-Washburne *et al*., 1993).

Τα διπλοειδή κύτταρα που βρίσκονται υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου σε συνδυασμό με την παρουσία φτωχής πηγής σε άνθρακα, όπως είναι η περίπτωση του οξικού οξέος, υφίστανται μείωση και δημιουργούν σπόρια. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται τέσσερα απλοειδή σπόρια, τα οποία περικλείονται μέσα στον ασκό. Η μορφή αυτή είναι πολύ ανθεκτική σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες εν συγκρίσει με τα κύτταρα που βρίσκονται στη στατική φάση. Όταν τα σπόρια βρεθούν σε περίσσεια θρεπτικών στοιχείων βλαστάνουν και αναπτύσσονται ως απλοειδή. Δύο ασκοσπόρια αντίθετου συζευκτικού τύπου ή εκβλαστήματά τους, όταν έρθουν σε φυσική επαφή συγχωνεύονται. Η προηγούμενη ιδιότητα των ασκοσπορίων του ζυμομύκητα είναι γνωστή ως πλασμογαμία. Εν συνεχεία, ακολουθεί καρυογαμία (συγχώνευση πυρήνων) και δημιουργία ζυγωτού κυττάρου (Χριστιάς, 1999).

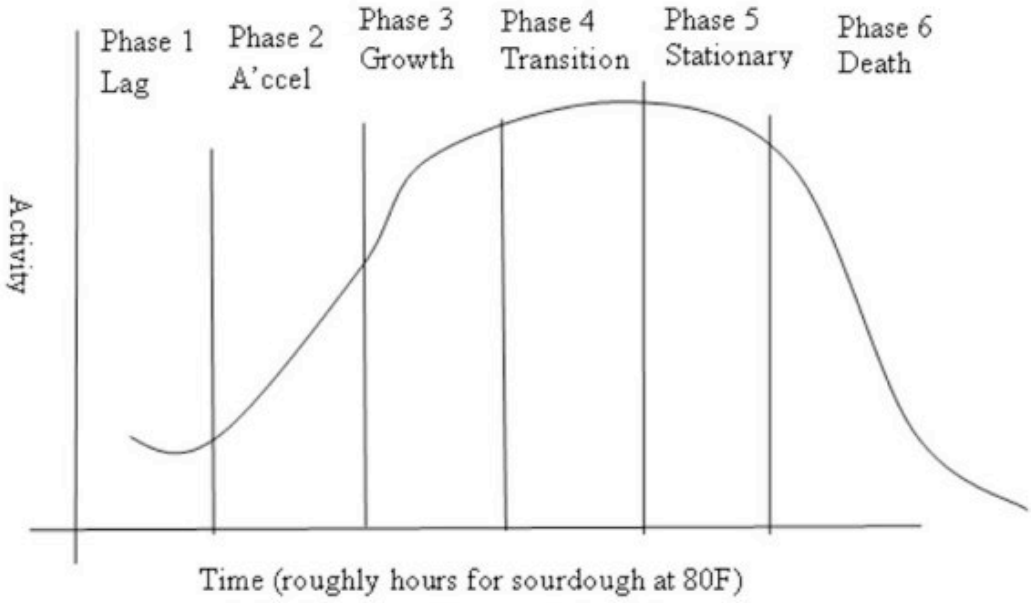
Σε ορισμένες περιπτώσεις, έχει αναφερθεί η παρατήρηση ψευδοϋφών και απλοειδών νημάτων, τα οποία μπορούν εύκολα να αναγνωριστούν, εξαιτίας του μεγάλου τους κυτταρικού μήκους καθώς και της ικανότητάς τους να δημιουργούν αλυσίδες. Και οι δύο μορφές είναι αρκετά ευδιάκριτες, καθώς δεν είναι απλά μια συστάδα από κολλώδη κύτταρα. Γενικά, θεωρείται ότι η νηματώδης μορφή εξυπηρετεί στην πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων, τα οποία βρίσκονται μακρύτερα από το κέντρο αύξησης της αποικίας. Επίσης, έχει παρατηρηθεί η ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ από τον μικροοργανισμό, κάτι το οποίο δεν είναι σύνηθες γι' αυτόν (Reynolds and Fink, 2001).

4.2.2 Οι φάσεις αύξησης του *Saccharomyces cerevisiae*

Όπως και όλες οι ζύμες, έτσι και τα στελέχη του *S. cerevisiae*, παρουσιάζουν έξι φάσεις αύξησης. Αυτές είναι:

1. **Η λανθάνουσα φάση αύξησης:** Στη συγκεκριμένη φάση, η οποία λαμβάνει χώρα αμέσως μετά τον εμβολιασμό, τα κύτταρα δεν αναπτύσσονται καθόλου. Η φάση αυτή αντανακλά το χρόνο που απαιτείται ώστε να προσαρμοστούν τα κύτταρα στο νέο περιβάλλον. Για να επιταχυνθεί η προσαρμογή, τα κύτταρα συνθέτουν ριβοσώματα και ένζυμα που είναι απαραίτητα για την απόκτηση ενός μεγαλύτερου ρυθμού αύξησης. Η χρονική διάρκεια της λανθάνουσας φάσης εξαρτάται από τις συνθήκες και την πυκνότητα του εμβολίου.
2. **Επιταχυντική φάση αύξησης**
3. **Εκθετική φάση αύξησης:** Στη φάση αυτή, ο ρυθμός της αύξησης είναι ο μέγιστος δυνατός. Τα περισσότερα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση.

4. **Επιβραδυνόμενη φάση αύξησης:** Μετά την εκθετική φάση, ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων επιβραδύνεται προτού περάσουν στην επόμενη φάση.
5. **Στατική φάση αύξησης:** Στη συγκεκριμένη φάση, ο αριθμός των κυττάρων παραμένει σχετικά σταθερός. Εάν τα κύτταρα παραμείνουν για μεγάλη χρονική διάρκεια στη στατική φάση, είναι δυνατόν να νεκρωθούν και να αυτολυθούν. Κάτι τέτοιο μπορεί να επηρεάσει την αύξηση και την επιβίωση και των υπολοίπων κυττάρων.
6. **Φάση θανάτου:** Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα νεκρώνονται, καθώς τα ενεργειακά τους αποθέματα έχουν εξαντληθεί. Η φάση θανάτου είναι εκθετική με αντίθετη κλίση προς τη λογαριθμική αύξηση.



Εικ. 29 Οι φάσεις αύξησης των ζυμών

4.2.3 Προσαρμογή του γένους *Saccharomyces* στο εκάστοτε περιβάλλον

Η αύξηση των ζυμών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις συνθήκες που επικρατούν στον περιβάλλοντα χώρο. Έτσι, ανάλογα με τις εξωκυτταρικές συνθήκες, οι ζύμες, σαν προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, μπορούν να αποκτήσουν την απαραίτητη για την αύξησή τους ενέργεια μέσω δύο μεταβολικών μονοπατιών. Μπορούν να ακολουθήσουν το μονοπάτι της αναπνοής, το οποίο ξεκινάει με τη γλυκόλυση και καταλήγει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, είτε το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης, το οποίο ξεκινάει με τη μεταβολική οδό της γλυκόλυσης και καταλήγει στην αλκοολική ζύμωση. Ο παράγων που θα κρίνει το πιο από τα δύο μονοπάτια θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός είναι η παρουσία ή όχι οξυγόνου στο μέσο.

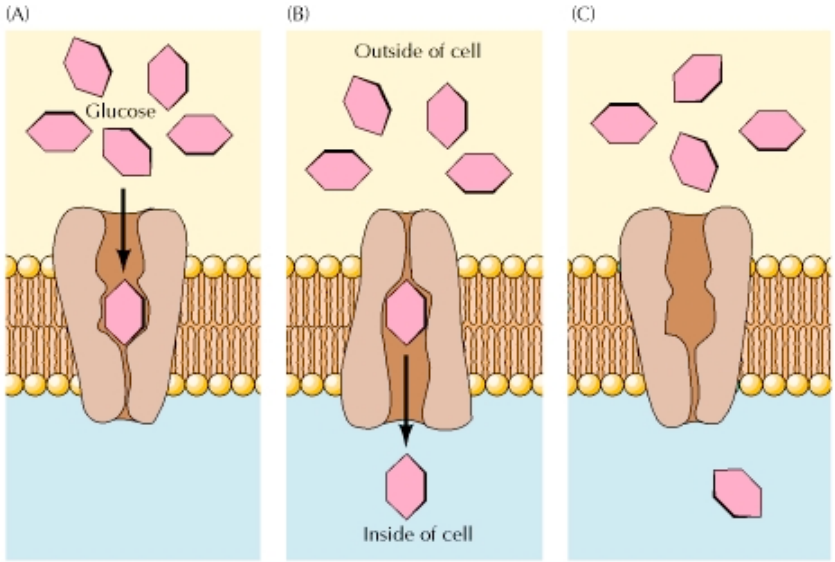
Όπως είναι κατανοητό εκ των ανωτέρω, το οξυγόνο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αύξηση ενός μικροοργανισμού. Ωστόσο, ο ρόλος του οξυγόνου δεν περιορίζεται μόνο στη συμβολή για την παραγωγή της απαιτούμενης ενέργειας, αλλά αποτελεί και ένα απαραίτητο στοιχείο για τη

βιοσύνθεση των βιταμινών, των στερολών και των ακόρεστων λιπαρών οξέων που είναι και αυτά με τη σειρά τους απαραίτητα για την αύξηση των ζυμών (Carlile Michael J. & Watkinson Sarah C., 1994).

Εκτός από το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα αποτελεί και αυτό έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για τον μεταβολισμό των ζυμών. Η ένωση αυτή συμμετέχει σε σημαντικές μεταβολικές δραστηριότητες, όπως σε ορισμένα στάδια της βιοσύνθεσης των πουρινών, πυριμιδινών και λιπαρών οξέων.

Οι διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων στο μέσο αύξησης των ζυμών αποτελεί ίσως τον κυριότερο παράγοντα για την ανάπτυξή τους. Η εκάστοτε πηγές άνθρακα προσφέρουν τις απαραίτητες δομικές μονάδες για τη βιοσύνθεση των συστατικών του κυττάρου, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια κ.α.

Η σημαντικότερη πηγή άνθρακα για τις ζύμες είναι τα σάκχαρα. Μέσω αυτών ενεργοποιείται ο μεταβολισμός τους και κατ' επέκταση το κύτταρο δημιουργεί την απαραίτητη ενέργεια για τη διαβίωσή του. Η μεταφορά των σακάρων στο εσωτερικό του κυττάρου πραγματοποιείται με τη βοήθεια πρωτεϊνικών μεταφορέων και γίνεται υπό τη μορφή της διευκολυνόμενης διάχυσης. Ο Saccharomyces έχει την ικανότητα να μεταβολίζει τους μονοσακχαρίτες γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη και μαννόζη. Επίσης, αρκετά από τα στελέχη που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση μπορούν να διασπάσουν τους δισακχαρίτες μαλτόζη και σακχαρόζη, καθώς και τον τρισακχαρίτη ραφινόζη (Μπέλκα, 2007).

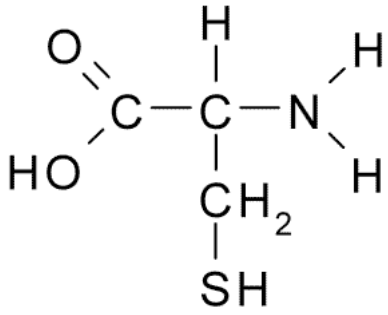


Εικ. 27 Μοντέλο για τη διευκολυνόμενη διάχυση της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου (www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=c...)

Τα στελέχη του σακχαρομύκυτα *Saccharomyces* δεν μπορούν να αποικοδομοίσουν τα οργανικά οξέα. Εξαίρεση αποτελεί το μηλικό οξύ, καθώς και το κιτρικό ή το ηλεκτρικό, τα οποία μπορούν να αποικοδομηθούν από ορισμένα στελέχη. Επίσης, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου ο μικροοργανισμός έχει χρησιμοποιήσει την αιθανόλη σαν πηγή άνθρακα όταν βρίσκεται σε αναερόβιο περιβάλλον (Boulton *et al*., 1996).

Ένα άλλο πολύ σημαντικό και απαραίτητο στοιχείο για το μεταβολισμό όλων των οργανισμών και κατ' επέκταση και των ζυμομυκήτων του γένους *Saccharomyces* είναι το άζωτο. Το συγκεκριμένο στοιχείο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση αρκετών μεγαλομοριακών ενώσεων, όπως είναι η πρωτεΐνες. Το άζωτο είναι ένα στοιχείο που υπάρχει σε αφθονία στο γλεύκος της σταφυλής, αν και σε αρκετές περιπτώσεις βιομηχανικής παραγωγής οίνου προστίθεται και εξωγενώς επιπλέον ποσότητα για υποβοήθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Η άμεσα αφομοιώσιμη μορφή αζώτου για τις ζύμες είναι τα ιόντα αμμωνίου. Επίσης, σαν πηγές αζώτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα περισσότερα αμινοξέα, μιας και ο σακχαρομύκητας παρουσιάζει πρωτεωλυτική ικανότητα. Τα πολυπεπτίδια και οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου, κάτι το οποίο δεν ισχύει και για τα ολιγοπεπτίδια (Carlile Michael J. & Watkinson Sarah C., 1994). Όσον αφορά τις αμίνες, τα πεπτίδια, οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης, η ουρία και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα στελέχη του γένους Saccharomyces σαν πηγή αζώτου (Boulton *et al*., 1996).



Εικ. 28 Το μόριο της L-κυστεΐνης

Σαν αφομοιώσιμες πηγές φωσφόρου, οι ζύμες χρησιμοποιούν ανόργανα φωσφορικά άλατα και φωσφορικούς εστέρες. Οι τελευταίες ενώσεις υδρολύονται από μια φωσφατάση που εκκρίνει ο σακχαρομύκητας. Σαν πηγή θείου χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγω τα αμινοξέα που περιέχουν στο μόριό τους θείο, όπως είναι η κυστεΐνη και η μεθειονίνη και εν συνεχεία τα θειώδη και θειϊκά άλατα (Thomas et al., 1992).

Από τις βιταμίνες, μόνο η βιοτίνη είναι αυτή που διεγείρει την αύξηση των κυττάρων του σακχαρομύκητα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, κάτι τέτοιο μπορεί να επαχθεί και από άλλες βιταμίνες (Castor and Archer, 1956). Όσον αφορά τα απαραίτητα για την αύξηση των κυττάρων μέταλλα, αυτά είναι το μαγνήσιο, το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος, το κάλιο, ο χαλκός και ο σίδηρος (Boulton *et al*., 1996).

4.2.4 Στρεσογόνες καταστάσεις οφειλόμενες στο περιβάλλον

Ένας παράγοντας θεωρείται στρεσογόνος όταν επιδρά αρνητικά στην απόδοση και τη λειτουργικότητα των κυττάρων. Οι παράγοντες αυτοί θα μπορούσαν να διαχωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες.

1. Φυσικοί παράγοντες

Σε αυτού περιλαμβάνονται η υψηλή θερμοκρασία, η οσμωτική πίεση, οι υψηλή υδροστατική και ατμοσφαιρική πίεση, η έλλειψη νερού και οι διάφορες ακτινοβολίες.

2. Χημικοί παράγοντες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφορες χημικές ενώσεις, όπως είναι η αιθανόλη και άλλοι μεταβολίτες, οι οποίοι μπορούν να δράσουν αρνητικά επί των κυττάρων, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, το pH και τα χημικά μεταλλαξιογόνα.

3. Βιολογικοί παράγοντες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφορα φαινόμενα, όπως η γήρανση των κυττάρων, ο ανταγωνισμός από άλλους μικροοργανισμούς, οι γενοτυπικές αλλαγές κ.α.

Από τους παραπάνω παράγοντες, αυτοί που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα και θεωρούνται οι πιο σημαντικοί είναι η παρουσία της αιθανόλης στο μέσο, η οσμωτική πίεση και η θερμοκρασία.

4.2.4.1 Η επίδραση της αιθανόλης

Η αιθανόλη θεωρείται ως άκρως τοξική ουσία για τα κύτταρα. Έτσι, όταν συγκεντρώνεται στο μέσο, δρα ως χημικός στρεσογόνος παράγοντας. Οι συγκεντρώσεις που έχουν αποδειχθεί τοξικές για τα κύτταρα των ζυμών είναι 8-18% αναλόγως το στέλεχος της ζύμης και τη μεταβολική κατάσταση της καλλιέργειας. Σε συγκέντρωση 2% αρχίζει η καταστολή της πρόσληψης γλυκόζης, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μειώνεται και η μετακίνηση αμμωνιακών ιόντων καθώς και μερικών αμινοξέων. Σε συγκεντρώσεις 11% περίπου, η ζύμωση καταστέλλεται πλήρως (Glazer *et al*., 1995).

Η ανασταλτική δράση της αιθανόλης ενισχύεται από την υψηλή θερμοκρασία και από την έλλειψη θρεπτικών ουσιών, κυρίως ιόντων Mg^+, καθώς και άλλων μεταβολικών παραπροϊόντων, όπως είναι οι διάφορες αλκοόλες, οι εστέρες, τα λιπαρά οξέα, οι αλδεΰδες, διάφορα οργανικά οξέα, οι καρβονυλικές και οι φαινολικές ενώσεις (Jackson, 1994, Walker, 1998). Οι ανώτερες αλκοόλες είναι πιο ανασταλτικές από την αιθανόλη, ωστόσο η τοξικότητά τους περιορίζεται από τις χαμηλές συγκεντρώσεις τους στο μέσο.

Η κυριότερη ίσως αρνητική επίδραση της αιθανόλης είναι η κατάρρευση της ημίρρευστης κατάστασης της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς η αιθανόλη εισέρχεται σ' αυτή και διασπά του δεσμούς πρωτεϊνών και λιπιδίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την όλο και μεγαλύτερη διαπερατότητα της μεμβράνης. Η ιοντική διαβάθμιση που αποτελεί την πρωτονιακή κινητήρια δύναμη διαμέσου της μεμβράνης, καταρρέει σιγά σιγά και μικρά μόρια διαρρέουν από το κύτταρο στο περιβάλλον με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου (Jackson, 1994).

Έχει βρεθεί πως η ανθεκτικότητα των διάφορων στελεχών ζυμών στην αιθανόλη σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη (You *et al*., 2003). Η κυτταρική μεμβράνη είναι ίσως ο σημαντικότερος στόχος της αιθανόλης στα διάφορα στελέχη του *S. cerevisiae*, χωρίς ωστόσο να είναι ο μοναδικός.

Πιν. 5 Πιθανοί στόχοι της αιθανόλης στα διάφορα στελέχη του *S. cerevisiae* (Walker, 1998)
Ενδοπλασματικό δίκτυο
Υδρόφιλες πρωτεΐνες
Μεμβράνη κενοτοπίου
Πυρηνική μεμβράνη
Κυτταρική μεμβράνη
Μεμβράνη μιτοχονδρίου

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά οι σημαντικότερες επιπτώσεις στη φυσιολογία του κυττάρου των ζυμών.

Πιν. 6 Σημαντικές επιπτώσεις της αιθανόλης στη φυσιολογία των ζυμών (Walker, 1998)	
Φυσιολογική λειτουργία	**Επίδραση αιθανόλης**
Βιωσιμότητα και αύξηση κυττάρων	•Αναστολή αύξησης, διαίρεσης και βιωσιμότητας κυττάρων •Μείωση κυτταρικού όγκου •Επαγωγή μορφολογικών μεταβολών •Ενίσχυση θερμικού θανάτου
Ενδιάμεσος μεταβολισμός και βιοσύνθεση μακρομορίων	•Μετουσίωση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και γλυκοζιτικών δεσμών •Μείωση ρυθμού συσσώρευσης RNA και πρωτεϊνών •Μείωση της V_{max} των κυριότερων γλυκολυτικών ενζύμων •Ενίσχυση σημειακών μεταλλάξεων •Επαγωγή της σύνθεσης πρωτεϊνών θερμικού σόκ και απόκτηση θερμοανθεκτικότητας •Αύξηση ελεύθερων ριζών οξυγόνου •Επαγωγή σύνθεση κυτοχρώματος P_{450} •Αύξηση της ενεργότητας της μιτοχονδριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου
Μεμβρανική δομή και λειτουργία	•Αλλαγή της σύστασης της μεμβράνης σε λιπαρά οξέα και στερόλες •Ελάττωση του μήκους της αλυσίδας των μεμβρανικών κορεσμένων λιπαρών οξέων •Αύξηση μεμβρανικών ακόρεστων λιπαρών οξέων •Επαγωγή της λιπόλυσης των κυτταρικών φωσφολιπιδίων •Αυξημένη ιοντική διαπερατότητα •Αναστολή της λήψης θρεπτικών ουσιών •Υπερπόλωση της πλασματικής μεμβράνης

4.2.4.2 Η επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερος παράγοντες όσον αφορά την αύξηση των ζυμομυκήτων. Όπως όλοι οι μικροοργανισμοί, έτσι και οι ζυμομύκητες, μπορούν να αναπτυχθούν μέσα σε ένα συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών, πέρα από τα όρια του οποίου μπορεί να προκληθεί μέχρι και κυτταρικός θάνατος. Η T_{opt} (βέλτιστη θερμοκρασία αύξησης) για τα περισσότερα στελέχη είναι οι 20 - 30 ^{o}C, ενώ αξιοσημείωτες αποκλίσεις έχουν αναφερθεί σε στελέχη άγριων ζυμών.

Όσον αφορά τη μέγιστη θερμοκρασία αύξησης (T_{max}), παρουσιάζεται διακύμανση σε εύρος από 35 - 43 ^{o}C. Αν και η T_{max} παραμένει σχετικά σταθερή μέσα στο είδος, η διακύμανση αυτή οφείλεται σε διαφορές στις συνθήκες αύξησης. Παράγοντες όπως η πηγή άνθρακα, η διαθεσιμότητα του οξυγόνο, το δυναμικό του νερού του θρεπτικού μέσου, η παρουσία αιθανόλης και διάφορων αυξητικών παραγόντων, παίζουν σημαντικότατο ρόλο στον καθορισμό της T_{max}.

Ανάλογα με τη θερμοκρασία αύξησης, θα μπορούσε να γίνει μια κατηγοριοποίηση των ζυμών σε ψυχρόφιλες, μεσόφιλες και θερμόφιλες (Walker, 1998).

Πιν. 7 Όρια θερμοκρασιών αύξησης των ζυμών (Walker 1998)

Θερμοκρασιακές κατηγορίες	Εύρος θερμοκρασιών	Παραδείγματα ζυμών
Ψυχρόφιλες	Ζύμες ικανές να αναπτύσσονται μεταξύ 5 - 18 ^{o}C. Τα υποχρεωτικά ψυχρόφιλα στελέχη έχουν ανώτατο όριο αύξησης περί τους 20 ^{o}C ή και χαμηλότερα	*Leucosporidium* spp., *Torulopsis* spp. (π.χ. *T. psychrophilia*)
Μεσόφιλες	Ζύμες με όρια αύξησης 0 - 48 ^{o}C	Οι περισσότερες ζύμες
Θερμόφιλες	Ελάχιστη θερμοκρασία αύξησης 20 ^{o}C	*Candida slooffii, Torulopsis bovina*

Έχει παρατηρηθεί ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης οι ζύμες παρουσιάζουν μικρότερη ευαισθησία στις τοξικές επιδράσεις των υψηλών επιπέδων αιθανόλης. Το συγκεκριμένο φαινόμενο οφείλεται πιθανώς στο μεγαλύτερο ποσοστό των υπολειμμάτων των ακόρεστων λιπαρών οξέων στην πλασματική μεμβράνη, κάτι το οποίο εξηγεί το μεγαλύτερο αριθμό ζωντανών κυττάρων σε ζυμώσεις που πραγματοποιούνται σε μικρές θερμοκρασίες.

Κατά την εκθετική φάση αύξησης των κυττάρων του ζυμομύκητα, η θερμοκρασία παίζει σημαντικότατο ρόλο στον ρυθμό αύξησης. Π.χ. η κυτταρική διαίρεση μπορεί να συμβαίνει κάθε 12 ώρες στους 10 ^{o}C, κάθε 5 ώρες στους 20 ^{o}C και κάθε 3 ώρες στους 30 ^{o}C. Επίσης, άλλοι δύο παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό της κυτταρικής διαίρεσης είναι το pH και η συγκέντρωση του σακχάρου στο θρεπτικό μέσο (Jackson, 1994).

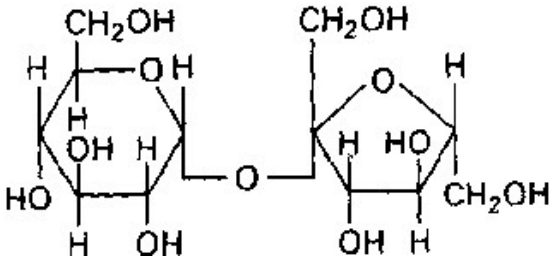
Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 20 ^{o}C οι ζύμες παρουσιάζουν ταχύτατη πτώση της βιωσιμότητάς τους στο τέλος της ζύμωσης, ενώ σε θερμοκρασίες 40 - 50 ^{o}C τα κύτταρα αυτολύονται. Ο μεταβολικός ρυθμός των ζυμών παρουσιάζει αύξηση μέχρι τους 35 ^{o}C, ενώ από 35-43 ^{o}C μειώνεται βαθμιαία. Σύμφωνα με τα ανωτέρω, η θερμοκρασία ζύμωσης ενός βιοαντιδραστήρα θα πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία μικρότερη των 35 ^{o}C (Glazer *et al*., 1995).

Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 20 ^{o}C η κυτταρική αύξηση επιβραδύνεται, ενώ η βιωσιμότητα ενισχύεται. Ωστόσο, οι χαμηλές θερμοκρασίες παρατείνουν τη λανθάνουσα φάση και μπορούν να μειώσουν το ρυθμό της ζύμωσης, προκαλώντας κατ' αυτό τον τρόπο πρόωρο

τερματισμό της. Όπως είναι λογικό, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, να πρέπει να αποφεύγονται οι απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας, αποτρέποντας την εισαγωγή των κυττάρων σε κατάσταση σοκ.

4.2.4.3 Επίδραση της ωσμωτικής πίεσης

Η ωσμωτική πίεση μπορεί να αυξηθεί μετά από απώλεια ενδοκυτταρικού υγρού ή μετά από έκθεση των κυττάρων σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης (Walker, 1998). Έχει παρατηρηθεί ότι η ικανότητα των στελεχών του *S. cerevisiae* να πραγματοποιούν αλκοολική ζύμωση παραμένει υψηλή ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η ικανότητα αυτή είναι αντιστρόφως ανάλογη της ενεργότητας της ιμβερτάσης, ενός ενζύμου που εκκρίνει ο σακχαρομύκητας για να υδρολύσει την σακχαρόζη. Με τη διάσπαση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, η ωσμωτική πίεση αυξάνεται και ως εκ τούτου παρουσιάζονται δυσκολίες στην έκβαση της αλκοολικής ζύμωσης.



Εικ. 30 Το μόριο της σακχαρόζης

Η έκθεση των στελεχών του S. cerevisiae σε υψηλές ωσμωτικές πιέσεις έχει σαν αποτέλεσμα τη γρήγορη ελάττωση του ενδοκυτταρικού όγκου, λόγω εκροής νερού. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί μέρος ενός συνόλου πολύπλοκων αντιδράσεων (Marechal *et al*., 1994, Meikle *et al*., 1988). Ωστόσο, η παρουσία της γλυκερόλης στο μέσο, μιας ουσίας που παράγεται φυσικά ως δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζυμώσεως, εξισορροπεί την ωσμωτική πίεση σε ένα βαθμό. Σε περιπτώσεις αυξημένης ωσμωτικής πίεσης, επάγεται η έκφραση ορισμένων γονιδίων που δίνουν σήμα για τη βιοσύνθεση των ενζύμων που συμμετέχουν στη γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση (Brewster *et al*., 1993, Schuller *et al*., 1994, Hirayama *et al*., 1995).

5. Η αλκοολική ζύμωση

5.1 Εισαγωγή

Οι ζύμες ως χημειοοργανότροφοι μικροοργανισμοί προμηθεύονται την απαραίτητα για την ανάπτυξή τους ενέργεια από την αποικοδόμηση της οργανικής ύλης. Ένα ποσοστό της ενέργειας που παράγεται από τις αντιδράσεις αποικοδόμησης των οργανικών συστατικών (καταβολισμός), διαχέεται υπό μορφή θερμότητας, ενώ το υπόλοιπο (ελεύθερη ενέργεια) διαχέεται στη σύνθεση, τη μεταφορά και την κίνηση.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο μεταφορέας ελεύθερης ενέργειας στα βιολογικά συστήματα είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Πρόκειται για το λεγόμενο "ενεργειακό νόμισμα¨ των κυττάρων, καθώς αποτελεί τον σπουδαιότερο μεταφορέα ενέργειας στα κύτταρα. Η υδρόλυση του μορίου σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) συνεπάγεται μια σημαντική απελευθέρωση ελεύθερης ενέργειας, η οποία ισοδυναμεί με 7.3 Kcal/mol και χρησιμοποιείται στην ενεργό μεταφορά των μεταβολιτών και στις βιοσυνθέσεις. Η αντίδραση της υδρόλυσης του ATP σε ADP είναι η εξής:

$$ATP \Leftrightarrow ADP + H_3PO_4 + \Delta G^o$$

$$\text{όπου } \Delta G^o = 7.3 \text{ Kcal/mol}$$

Η αύξηση ενός μικροοργανισμού είναι λοιπόν άμεσα συνδεδεμένη με την ποσότητα ATP που παράγεται από τα μεταβολικά μονοπάτια που χρησιμοποιούνται για την αποικοδόμηση μιας ένωσης και έμμεσα με την ποσότητα της ένωσης που αποικοδομείται.

Στο ζωντανό κύτταρο δύο μεταβολικά μονοπάτια από τα οποία μπορεί να παραχθεί ATP.

I. <u>Η φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος</u>
II. <u>Η οξειδωτική φωσφορυλίωση</u>

Η φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος πραγματοποιείται κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Ως αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μεταβολικής οδού σχηματίζεται ένας εστερικός δεσμός πλούσιος σε ενέργεια, μεταξύ του οξειδωμένου άνθρακα του υποστρώματος και ενός μορίου ανόργανου φωσφόρου (H_3PO_4). Εν συνεχεία, ο δεσμός αυτός ενσωματώνεται στη διφωσφορική αδενοσίνη με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ATP. Η εν λόγω διαδικασία λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης.

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε αερόβιες συνθήκες. Η παραγωγή ATP πραγματοποιείται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ένα μόριο οξυγόνου, το οποίο είναι και ο τελικός δέκτης των ηλεκτρονίων αυτών, μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας των κυτοχρωμάτων που εδράζουν στα μιτοχόνδρια (Ribereau-Gayon, 2006, Λαναρίδης, 2005).

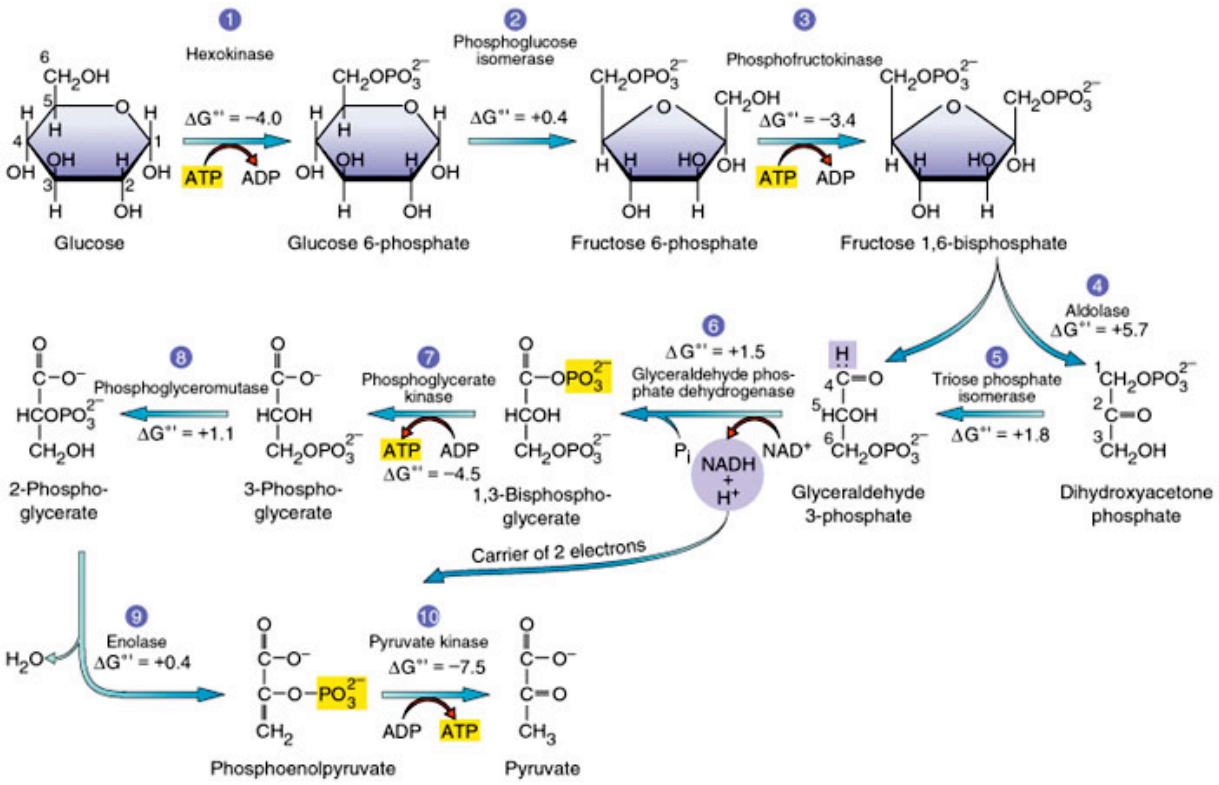
5.2 Αποικοδόμηση των σακχάρων κατά την αλκοολική ζύμωση

5.2.1 Γλυκόλυση (οδός Embden-Meyerhoff-Parnas)

Η γλυκόλυση είναι η μεταβολική οδός εκείνη, κατά την οποία η γλυκόζη ή η φρουκτόζη μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ με ταυτόχρονο σχηματισμό ATP. Όλο το μεταβολικό μονοπάτι λαμβάνει χώρα στο κυτόπλασμα του κυττάρου (Berg *et al*., 2004). Η γλυκόλυση είναι γνωστή και ως μονοπάτι Embden - Meyerhof - Parnas (EMP). Η μεταφορά των εξοζών του γλεύκους στο εσωτερικό του κυττάρου πραγματοποιείται διαμέσου ενός πολύπλοκου συστήματος πρωτεϊνικών μεταφορέων, η φύση του οποίου δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως μέχρι και σήμερα. Πρόκειται για διευκολυνόμενη μεταφορά που δεν απαιτεί ενέργεια και πραγματοποιείται από ένα περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα (το μέσο) σε ένα άλλο φτωχότερο (το κυτόπλασμα) (Λαναρίδης, 2005).

Η μεταφορά των σακχάρων ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα του γλεύκους σε αφομοιώσιμο άζωτο και από την ένταση της πρωτεϊνικής σύνθεσης των κυττάρων. Όταν η ένταση της πρωτεϊνικής σύνθεσης μειωθεί ή σταματήσει, παρατηρείται μείωση της έντασης μεταφορά των εξοζών. Το φαινόμενο αυτό καλείται καταβολική ανενεργοποίηση (Ribereau-Gayon, 2006).

Κατά την αλκοολική ζύμωση που λαμβάνει χώρα στα οινοποιεία, το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα μετά το τέλος αύξησης των ζυμών και επιταχύνεται σε περιπτώσεις έλλειψης αφομιώσιμου αζώτου. Έτσι, η προσθήκη αμμωνιακών στη δεξαμενή κατά τη φάση στασιμότητας των κυττάρων, έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των συστημάτων μεταφοράς των εξοζών και αποκαθιστά μερικώς την ένταση της ζύμωσης (Λαναρίδης, 2005).



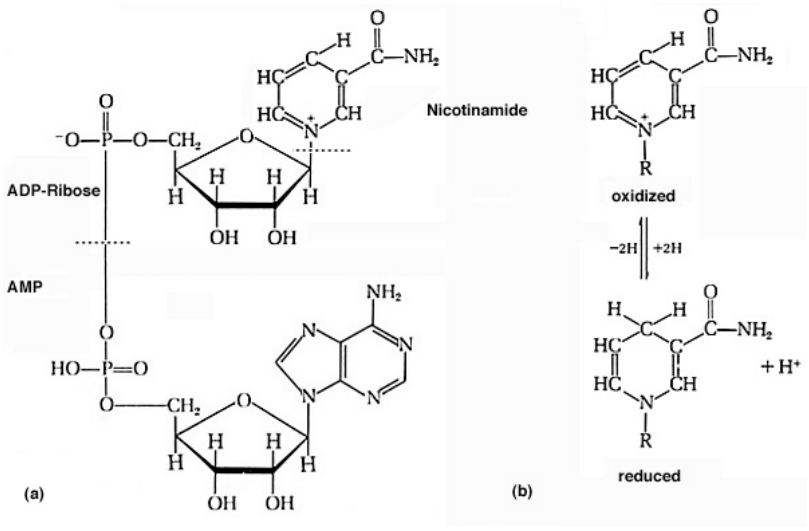
Εικ. 31 Το γλυκολυτικό μονοπάτι (www.biochem.arizona.edu/.../ new_background.html)

Η γλυκόλυση σηματοδοτείται από τρία στάδια. Το πρώτο ξεκινάει με τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης και την εν τέλει παραγωγή της 1,6-δι-φωσφορικής φρουκτόζης. Το δεύτερο στάδιο σηματοδοτείται από τη δημιουργία της φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης, ενώ το τρίτο από την παραγωγή του πυροσταφυλικού οξέος, όπως αυτό προκύπτει ύστερα από μια σειρά αντιδράσεων ξεκινώντας από το 1,3-δι-φωσφογλυκερινικό οξύ.

Όπως φαίνεται και στο ανωτέρω σχήμα, όταν ένα μόριο γλυκόζης εισαχθεί στο κυτοσόλιο, φωσφορυλιώνεται από την *εξωκινάση* (EC 2.7.1.1) προς *6-φωσφορική γλυκόζη*, με κατανάλωση ενός μορίου ATP. Ο σακχαρομύκητας έχει δύο εξωκινάσες, την εξωκινάση I (PI) και την εξωκινάση II (PII). Τα δύο αυτά ένζυμα μπορούν να φωσφορυλιώσουν τη γλυκόζη προς 6-φωσφορική γλυκόζη. Ωστόσο, η PII είναι ενεργή κατά την εκθετική φάση αύξησης των ζυμών σε μέσο με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Αντίθετα, η PI καταστέλλεται από τη γλυκόζη και είναι ενεργή κατά τη στατική φάση αύξησης του μικροοργανισμού (Bisson, 1991).

Στο επόμενο βήμα της γλυκόλυσης, η 6-φωσφορική γλυκόζη ισομεριώνεται από την *ισομεράση της φωσφογλυκόζης* (EC 5.3.1.9) σε *6-φωσφορική φρουκτόζη*. Εν συνεχεία, το υπόστρωμα φωσφορυλιώνεται εκ νέου προς *1,6-διφωσφορική φρουκτόζη* με την ταυτόχρονη κατανάλωση ενός μορίου ATP, με τη δράση του ενζύμου *φωσφοφρουκτοκινάση* (EC 2.7.1.11). Στο πρώτο αυτό στάδιο της γλυκολυτικής οδού χρησιμοποιήθηκαν 2 μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης που εισήχθη.

Το δεύτερο στάδιο της μεταβολικής οδού συνεχίζεται με τη διάσπαση της 1,6-δι-φωσφορικής φρουκτόζης σε δύο μόρια ισομερών τριοζών. Τα μόρια αυτά είναι η *φωσφορική-δι-ϋδροξυ-ακετόνη* και η *3-φωσφορική-γλυκεραλδεΰδη*. Η συγκεκριμένη διάσπαση καταλύεται από την *αλδολάση* (EC 4.1.2.23). Η *ισομεράση των φωσφορικών τριοζών* (EC 5.3.1.1) καταλύει την ισομερίωση μεταξύ των δύο παραπάνω ενώσεων. Αν και το ισοζύγιο μεταξύ της φωσφορικής-δι-ϋδροξυ-ακετόνης και της 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεΰδης είναι υπέρ της πρώτης, ωστόσο η ισομερίωση είναι συνεχής, μιας και η τελευταία συνεχώς καταναλώνεται για τη συνέχιση των αντιδράσεων της οδού. Με άλλα λόγια, ένα μόριο γλυκόζης οδηγεί στην παραγωγή δύο μορίων 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεΰδης (P. Riberau-Gayon *et al*., 2006). Το τρίτο στάδιο της γλυκολυτικής οδού Embden – Meyerhoff ξεκινά με τη μετατροπή της 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεΰδης σε *1,3-δι-φωσφογλυκερινικό οξύ* από την *αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεΰδης* (EC 1.2.1.13). Η συγκεκριμένη αντίδραση είναι μια φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Σε αυτή, ένα μόριο NAD^+ (*Νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο*) ανάγεται σε *NADH*, δεχόμενο δύο ηλεκτρόνια από την 3-φωσφορική-γλυκεραλδεΰδη. Η οξείδωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πλούσιου σε ενέργεια δεσμού



Εικ. 32 Νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο. Δομή και μορφές που απαντάται

μεταξύ του οξειδωμένου υποστρώματος και του ανόργανου φωσφόρου (Pi). Το NADH που παρήχθη μεταφέρεται είτε στην αναπνευστική αλυσίδα προς παραγωγή μορίων ATP, είτε αναγεννάται μέσω οξείδωσης κατά τις αντιδράσεις της αλκοολικής ζύμωσης. Εν συνεχεία, η *κινάση του φωσφογλυκερινικού οξέος* (EC 2.7.2.3) καταλύει την αντίδραση μεταφοράς μιας εκ των δύο φωσφορικών ομάδων του 1,3-δι-φωσφογλυκερινικού οξέος σε ένα μόριο ADP, προς παραγωγή ATP. Από την αντίδραση αυτή παράγεται το *3-φωσφογλυκρικό οξύ*.

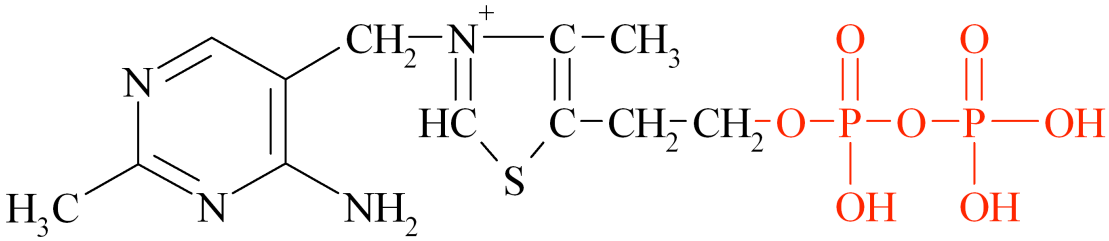
Στη συνέχεια της μεταβολικής οδού, το 3-φωσφογλυκερινικό οξύ μετατρέπεται σε *2-φωσφογλυκερινικό οξύ*, μια αντίδραση που καταλύεται από τη *μουτάση του φωσφογλυκερινικού* (EC 5.4.2.1). Έπειτα, η *ενολάση* (EC 4.2.1.11) αφαιρεί ένα μόριο νερού από το 2-φωσφογλυκερινικό οξύ προς δημιουργία του *φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέος*. Το δέκατο και τελευταίο βήμα σηματοδοτείται από τη δράση της *κινάσης του πυροσταφυλικού οξέος* (EC 2.7.1.40). Η δράση του ενζύμου αυτού έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μορίου πυροσταφυλικού οξέος με ταυτόχρονη μεταφορά του Pi (πυροφωσφορικό) σε ένα μόριο ADP προς δημιουργία ATP.

Όπως φαίνεται και εκ των ανωτέρω, ένα μόριο γλυκόζης έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή τεσσάρων μορίων ATP κατά τη διάσπασή της μέσω της γλυκολυτικής οδού. Τα δύο εκ των τεσσάρων μορίων ATP χρησιμοποιούνται αμέσως για τη διάσπαση ενός άλλου μορίου γλυκόζης. Έτσι, το καθαρό ενεργειακό κέρδος είναι δύο μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης. Μετά το τέλος του μεταβολικού μονοπατιού αυτού, το σχηματισθέν πυροσταφυλικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί από τρία διαφορετικά μονοπάτια, ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες. Έτσι, είτε θα προχωρήσει στις αντιδράσεις της αλκοολικής ζύμωσης, είτε θα πραγματοποιηθεί η λεγόμενη γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση, είτε θα συνεχίσει στην αναπνευστική αλυσίδα (P. Riberau-Gayon *et al*., 2006).

5.2.2 Η αλκοολική ζύμωση

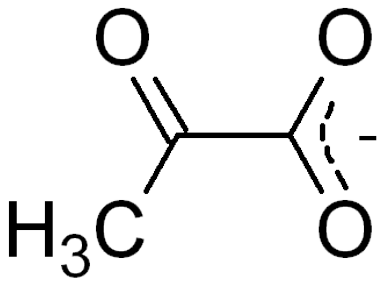
Στη συνέχεια θα περιγράψουμε τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την αλκοολική ζύμωση. Στο αναερόβιο περιβάλλον που επικρατεί μέσα σε μια δεξαμενή οινοποίησης, οι ζυμομύκητες ακολουθούν το μεταβολικό μονοπάτι της ζύμωσης, προκειμένου να παράγουν την απαραίτητη ενέργεια για τις βιολογικές διεργασίες του κυττάρου. Κατά τη διεργασία αυτή το πυροσταφυλικό οξύ που παρήχθη κατά τη γλυκόλυση μετατρέπεται με δύο ενζυμικές αντιδράσεις σε αιθανόλη.

Μη έχοντας τη δυνατότητα να εισέλθει το πυροσταφυλικό οξύ στα μιτοχόνδρια των κυττάρων για να συνεχιστεί η αναπνευστική αλυσίδα και να αναγεννηθεί εκ νέου το NADH που προέκυψε στο 6^{ο} βήμα της γλυκόζυσης, το κύτταρο θα πρέπει να βρει άλλο τρόπο. Η λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα δίνεται από το μεταβολικό μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης. Στο μονοπάτι αυτό, όπως αναφέρθη ανωτέρω, λαμβάνουν χώρα δύο ενζυμικές αντιδράσεις. Η πρώτη είναι η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος προς *ακεταλδεΰδη* με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου CO_2. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την *αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος* (PDC, EC 4.1.1.1), η οποία έχει σαν προσθετική ομάδα την *πυροφωσφορική θειαμίνη* (TPP).

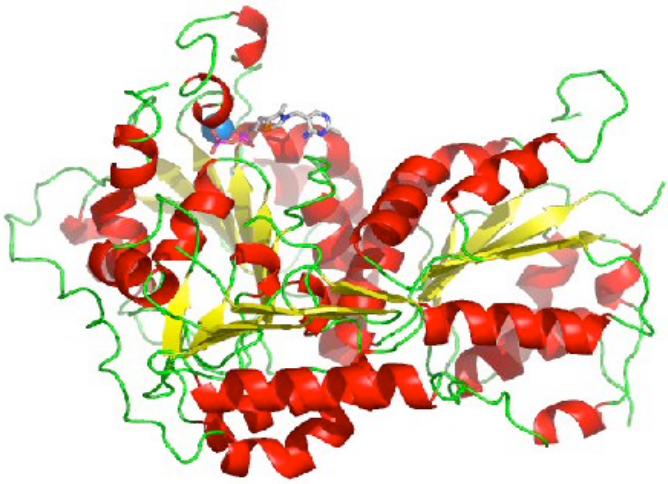


Εικ. 33 Η πυροφωσφορική θειαμίνη

Ο *S. cerevisiae* περιέχει δύο ισοένζυμα της αποκαρβοξυλάσης του πυροσταφυλικού οξέος. Η κύρια μορφή είναι η PDC1, η οποία αποτελεί το 80% της αποκαρβοξυλικής ικανότητας του κυττάρου στο βήμα αυτό. Η δεύτερη μορφή, η PDC5, αποτελεί το υπόλοιπο 20%, ενώ ακόμα και σήμερα η λειτουργία τους παραμένει αβέβαιη (Riberau-Gayon *et al*., 2006).

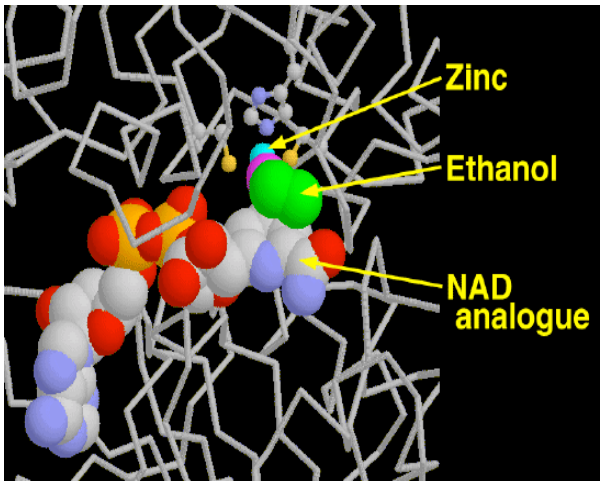


Εικ. 33 Πυροσταφυλικό οξύ



Εικ. 34 Η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση ενωμένη με την προσθετική της ομάδα TPP (chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Oroti2.html)

Στο επόμενο βήμα η ακεταλδεΰδη που παρήχθη, ανάγεται σε *αιθανόλη*. Η συγκεκριμένη α-ντίδραση καταλύεται από την *αλκοολική αφυδρογονάση* (EC 1.1.1.1), η οποία στο ενεργό της κέντρο περιέχει ένα ιόν ψευδαργύρου (Zn^{2+}). Στην αντίδραση αυτή, το NADH που παρήχθη στη γλυκόλυση, οξειδώνεται προς παραγωγή NAD^+. Από ενεργειακής άποψης, κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται δύο επιπλέον μόρια ATP, για κάθε μόριο γλυκόζης που αποικοδομείται, ή 14,6 kcal/mol ενέργειας που μπορεί να χρησιμοποιήσει το κύτταρο (Riberau-Gayon *et al*., 2006).



Εικ. 35 Το ενεργό κέντρο της αλκοολικής αφυδρογονάσης (www.chem.uwec.edu/.../Pages/I/examp1.html)

5.2.3 Η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση

Όταν το κύτταρο ακολουθεί το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης προς παραγωγή ενέργειας, πραγματοποιούνται ταυτόχρονα και διάφορες άλλες αντιδράσεις, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό των λεγόμενων δευτερευόντων προϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης. Μια από αυτές είναι και η λεγόμενη γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση.

Συνήθως, μετά την έξοδο της σταφυλόμαζας από τον σπαστήρα, προσθέτουμε θειώδη ανυδρίτη. Η προσθήκη αυτή αποσκοπεί στην προστασία του γλεύκους από διάφορες οξειδώσεις (χημικές και ενζυμικές). Ωστόσο, ο θειώδης ανυδρίτης εισέρχεται στο κύτταρο και δεσμεύεται με διάφορες ουσίες. Μια από αυτές τις ενώσεις είναι και η ακεταλδεΰδη, η οποία σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση με αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Το SO_2 δεσμεύεται σταθερά με την ένωση αυτή, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αναχθεί προς αιθανόλη μέσω της δεύτερης ενζυμικής αντίδρασης (Neuber, 1946). Έτσι, χωρίς τη δυνατότητα της παραπάνω μετατροπής, ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων του NADH είναι η *1-φωσφορικη-ακετόνη*. Η ένωση αυτή παράγεται από την οξείδωση της 3-φωσφορικης-γλυκεραλδεΰδης και αναγωγή της παραχθείσας ένωσης σε *3-φωσφορικη-γλυκερόλη*. Η τελευταία αυτοαποφωσφορυλιώνεται με απομάκρυνση της φωσφορικής ρίζας υπό μορφή φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) σε γλυκερόλη.

Κατά τη συγκεκριμένη μεταβολική οδό μόνο δύο μόρια ATP παράγονται για κάθε μόριο εξόζης που αποικοδομείται. Το ATP χρειάζεται για την ενεργοποίηση της γλυκόζης (παραγωγή 6-φωσφορικης-γλυκόζης) κατά το πρώτο βήμα της γλυκόλυσης. Εν τέλει, κατά τη γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση το ενεργειακό κέρδος για το κύτταρο είναι μηδέν, μιας και όπως αναφέρθη παραπάνω, τα δύο μόρια ATP που παράγονται καταναλώνονται εκ νέου στα πρώτα στάδια της γλυκόλυσης. Ωστόσο, η υψηλές συγκεντρώσεις της γλυκόζης κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης επάγουν την παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων γλυκερόλης. Στις συνθήκες αυτές, ο μικροοργανισμός παράγει μεγαλύτερες ποσότητες της τελευταίας, τις οποίες δεν απελευθερώνει εκτός κυτταροπλάσματος, με σκοπό την εξισορρόπηση της ωσμωτικής πίεσης (Blomberg and Alder, 1992).

Η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση δεν πραγματοποιείται αποκλειστικά σε περιβάλλοντα με υψηλές συγκεντρώσεις θειώδους. Στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, οι ζύμες χρειάζονται οξυγόνο για την ανάπτυξή τους, μιας και όπως θα δούμε παρακάτω, η εισαγωγή του πυροσταφυλικού οξέος στην αναπνευστική αλυσίδα αποδίδει μεγαλύτερη παραγωγή ATP. Έτσι, στις ανωτέρω συνθήκες, η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση και η αλκοολική αφυδρογονάση είναι ανενεργές. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μικρή παραγωγή ακεταλδεΰδης, η οποία κατ' επέκταση σημαίνει ότι το NADH δεν χρησιμοποιεί την τελευταία για την οξείδωσή του, αλλά τη φωσφορική-δι-υδροξυ-ακετόνη. Με τον τρόπο αυτό παράγονται ορισμένα από τα δευτερογενή προϊόντα, όπως είναι η γλυκερόλη, το πυροσταφυλικό οξύ και διάφορα παράγωγα του τελευταίου όπως το διακετύλιο και το ηλεκτρικό οξύ (Riberau-Gayon *et al*., 2006).

5.2.4 Ο κύκλος του κιτρικού οξέος (κύκλος Krebs) και η αναπνευστική αλυσίδα (οξειδωτική φωσφορυλιωση)

Το μεταβολικό μονοπάτι της αναπνευστικής αλυσίδας ακολουθεί αυτό της γλυκόλυσης, όταν το κύτταρο βρίσκεται σε αερόβιες συνθήκες. Το πυροσταφυλικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται οξειδωτικά παρουσία του *συνενζύμου Α* (CoA) και ενός μορίου NAD^+. Αυτή η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, NADH και *ακέτυλο-συνενζύμου Α* (ακετυλο-CoA). Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:

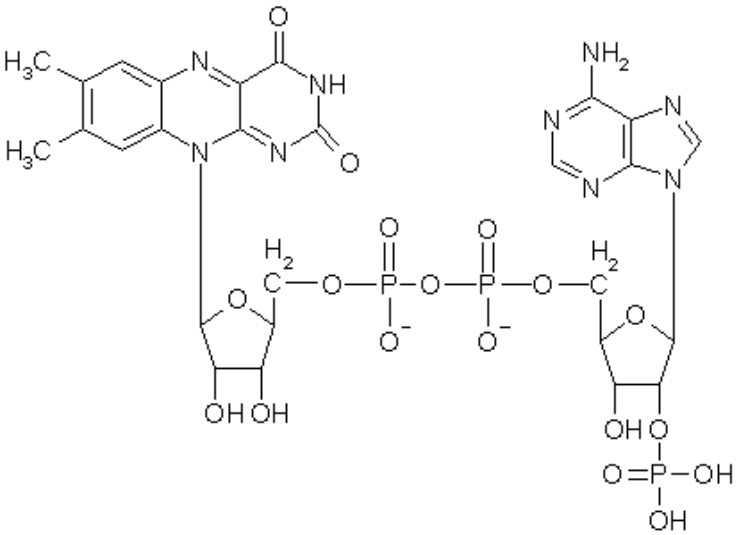
πυροσταφυλικό οξύ + CoA + NAD^+ ----------> ακέτυλο-CoA + CO_2 + NADH + H^+

Την παραπάνω αντίδραση καταλύει το ενζυμικό σύστημα της *πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης* (πυροσταφυλική οξειδάση, EC 1.2.2.2). Το σύστημα αυτό βρίσκεται στον εσωτερικό χώρο του μιτοχονδρίου και αποτελείται από τρία ένζυμα. Το καθένα καταλύει μια διαφορετική αντίδραση, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία του ακετυλο-CoA (Stryer, 2004).

Πιν. 8 Σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (Stryer, 2004)

Ένζυμο	Συντομογραφία	Προσθετική ομάδα	Αντίδραση που καταλύεται
Συνιστώσα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης	E_1	TPP	Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού
Διυδρολιποϋλο-τρανσακετυλάση	E_2	Λιποαμίδιο	Μεταφορά της ακετυλικής ομάδας στο CoA
Διυδρολιποϋλο-αφυδρογονάση	E_3	FAD	Αναγέννηση της οξειδωμένης μορφής του λιποαμιδίου

Μετά τη δημιουργία του ακετυλο-CoA, ξεκινάει ο κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων ή κύκλος του Krebs. Σε αυτή τη μεταβολική οδό, το ακετυλο-CoA οξειδώνεται πλήρως σε CO_2, σε μια σειρά αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια. Μετά το τέλος του κύκλου του Krebs, τα ηλεκτρόνια που έχουν αποθηκευτεί στους μεταφορείς τους (NADH και $FADH_2$) μεταφέρονται διαμέσου της αναπνευστικής αλυσίδας (οξειδωτική φωσφορυλίωση) στον τελικό αποδέκτη τους, ο οποίος είναι το οξυγόνο.



Εικ. 36 Φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD^{2+})

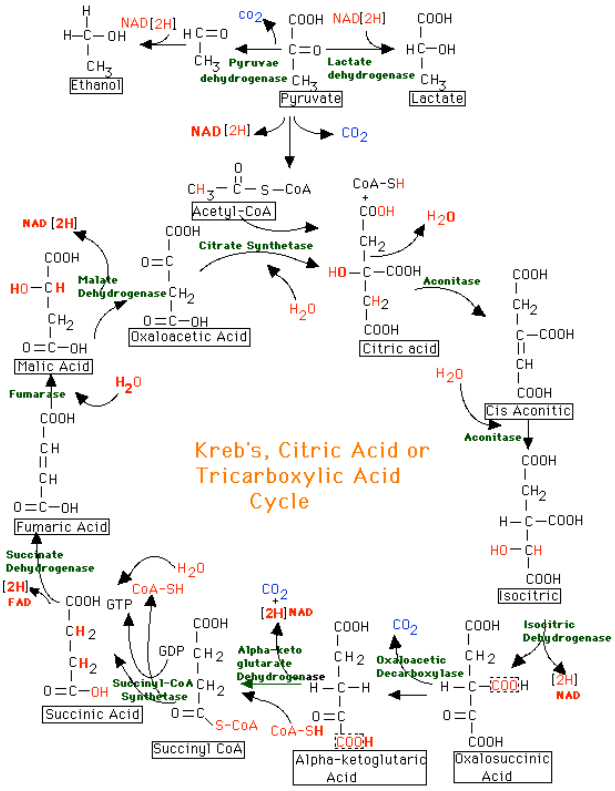
Για κάθε ζεύγος ηλεκτρονίων που καταλήγουν στο οξυγόνο από το NADH, παράγονται 2,5 μόρια ATP. Επίσης, για κάθε μόριο $FADH_2$ παράγονται 1,5 μόρια ATP. Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σε αερόβιες συνθήκες έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσών ενέργειας για το κύτταρο, όπως φαίνονται και στον παρακάτω πίνακα.

Πιν. 9 Απόδοση σε ATP από την πλήρη αποικοδόμηση της γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες (Stryer, 2004)

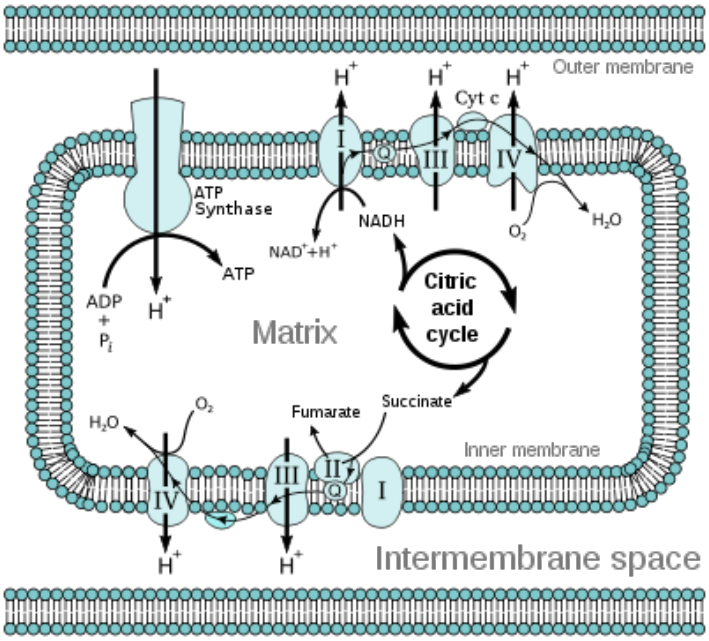
Αλληλουχία αντιδράσεων	Παραγωγή ATP ανά μόριο γλυκόζης
Γλυκόλυση: Γλυκόζη προς πυροσταφυλικό (στο κυτοσόλιο)	
Φωσφορυλίωση της γλυκόζης	-1
Φωσφορυλίωση της 6-φωσφορικης-γλυκόζης	-1
Αποφοσφωρυλίωση δύο μορίων 1,3-δι-φωσφο-γλυκερικού οξέος	+2
Αποφωσφορυλίωση δύο μορίων φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέος	+2
Σχηματισμός δύο μορίων NADH κατά την οξείδωση δύο μορίων 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεΰδης	
Μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA (εντός των μιτοχονδρίων)	
Σχηματισμός δύο μορίων NADH	
Κύκλος του κιτρικού οξέος (εντός των μιτοχονδρίων)	
Σχηματισμός δύο μορίων τριφωσφορικής γουανοσίνης από δύο μόρια ηλεκτρυλο-CoA	+2
Σχηματισμός έξι μορίων NADH από την οξείδωση δύο μορίων από τα: ισοκιτρικό, α-κετογλουταρικο και μηλικό	
Σχηματισμός δύο μορίων $FADH_2$ από την οξείδωση δύο μορίων ηλεκτρικού	
Οξειδωτική φοσφορυλίωση (εντός των μιτοχονδρίων)	
Σχηματισμός δύο μορίων NADH από τη γλυκόλυση. Τα καθένα αποδίδει 1,5 μόρια ATP (υποτίθεται ότι η μεταφορά NADH γίνεται μέσω του συστήματος μεταφοράς της φωσφορικής γλυκερόλης)	+3
Σχηματισμός δύο μορίων NADH από την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικου. Το καθένα αποδίδει 2,5 μόρια ATP	+5
Σχηματισμός δύο μορίων $FADH_2$ από τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Το καθένα αποδίδει 1,5 μόρια ATP	+3
Σχηματισμός έξι μορίων NADH από τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Το καθένα αποδίδει 2,5 μόρια ATP	+15
Καθαρή απόδοση ανά μόριο γλυκόζης	30

Όπως είναι φανερό από τον παραπάνω πίνακα, οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε αερόβιες συνθήκες, επιφέρουν πολύ μεγαλύτερα ποσά ενέργειας (30 μόρια ATP) σε σχέση με το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης (4 μόρια ATP).

Δε θα αναφερθούμε αναλυτικότερα στις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας, μιας και όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, τα δύο αυτά μονοπάτια λαμβάνουν χώρα μόνο σε αερόβιες συνθήκες (κατά τα πρώτα στάδια του εμβολιασμού) και δεν παράγουν προϊόντα, τα οποία απαντούν στο τελικό προϊόν ή παίζουν κάποιο ρόλο στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Οι αερισμοί που εφαρμόζονται κατά την οινοποίηση έχουν ως μοναδικό στόχο τη διευκόλυνση της αύξησης των ζυμομυκήτων σε ένα αρκετά επιβαρυμένο γι αυτούς περιβάλλον (υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων κατά τα πρώτα στάδια και υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης κατά τις τελευταίες ημέρες της ζύμωσης).



Εικ. 37 Ο κύκλος του κιτρικού οξέος (www.sciforums.com/showthread.php?t=97761&page=5)



Εικ. 38 Οξειδωτική φωσφορυλίωση (www.health-spy.com/mitochondrial.html)

5.2.5 Δευτερογενή προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται και άλλα προϊόντα, πλην της αιθανόλης. Πολλά από αυτά παίζουν σημαντικότατο ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Για το λόγο αυτό μερικά είναι επιθυμητά, ενώ κάποια άλλα όχι.

Ένα από τα προϊόντα αυτά είναι το ηλεκτρικό οξύ, το οποίο απαντά σε συγκεντρώσεις 0,5-1,5 g/L οίνου. Όταν παραχθεί ένα μόριο γλυκερόλης, τότε το πυροσταφυλικό οξύ δεν μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη. Έτσι, σε αναερόβιες συνθήκες, παρόλο που τα μιτοχόνδρια δεν μπορούν να διεξάγουν των κύκλο του κίτρικού οξέος, ωστόσο, τα ένζυμα του κύκλου βρίσκονται στο

κυτταρόπλασμα. Σε αυτή την περίπτωση, η *πυροσταφυλική καρβοξυλάση* (EC 6.4.1.1) καταλύει την καρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε *οξαλοξικό οξύ*. Η προσθετική ομάδα αυτού του ενζύμου είναι η *βιοτίνη*. Ο κύκλος του Krebs, υπό αναερόβιες συνθήκες, σταματά στο στάδιο σχηματισμού του ηλεκτρικού οξέος (Riberau-Gayon *et al*., 2006).

Ανάμεσα στα δευτερογενή προϊόντα είναι και διάφορες κετο-ενώσεις, όπως το πυροσταφυλικό και το α-κετογλουταρικό οξύ, καθώς και η ακεταλδεΰδη (αλδεΰδη). Επίσης, ο *S. cerevisiae* παράγει και μικρές ποσότητες οξικού οξέος (100 – 300 mg/L). Η διακύμανση αυτή εξαρτάται από το στέλεχος του σακχαρομύκητα που θα πραγματοποιήσει τη ζύμωση, καθώς επίσης και από την αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης. Το μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής του συγκεκριμένου οξέος δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Ωστόσο, η επικρατέστερη άποψη αναφέρει ότι το οξικό παράγεται από την υδρόλυση του ακετυλο-CoA, το οποίο παράγεται από την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικου οξέος, η οποία λαμβάνει χώρα στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Όμως, υπό αναερόβιες συνθήκες η υδρόλυση του ακετυλο-CoA είναι περιορισμένη.

Η *αλδεϋδική αφυδρογονάση* (EC 1.2.1.3) μπορεί επίσης να παράγει οξικό οξύ με την οξείδωση της ακεταλδεΰδης. Η αλδεϋδική αφυδρογονάση έχει σαν συμπαράγοντα το $NADP^+$. Το ένζυμο αυτό έχει πέντε ισομορφές. Οι τρεις απαντώνται στο κυτοσόλιο (Ald6p, Ald2p και Ald3p), ενώ οι υπόλοιπες δύο απαντώνται στο μιτοχόνδριο (P. Riberau-Gayon *et al*., 2006).

Ένα ακόμα δευτερογενές προϊόν της ζύμωσης είναι το γαλακτικό οξύ. Προέρχεται και αυτό από το πυροσταφυλικό οξύ. Το τελευταίο ανάγεται απευθείας από την L(+) και D(-) *γαλακτική αφυδρογονάση* (EC 1.1.1.28) των ζυμών. Σε συνθήκες αναεροβίωσης οι ζύμες συνθέτουν αποκλειστικά D(-) γαλακτική αφυδρογονάση. Η ποσότητα του D(-) γαλακτικού οξέος που εν τέλει περιέχεται στους οίνους κυμαίνεται από 200 – 300 mg/L. Όσον αφορά το L(+) γαλακτικό οξύ, η ποσότητα του φτάνει μόνο τις μερικές δεκάδες mg/L (P. Riberau-Gayon *et al*., 2006).

Μια ακόμα σημαντική ιδιότητα των στελεχών του είδους *S. cerevisiae* είναι και η αποικοδόμηση του μηλικού οξέος. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης αποκοδομείται περίπου το 10-25% της συνολικής ποσότητας του οξέος αυτού. Ωστόσο, ο βαθμός αποικοδόμησης εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης. Το μηλικό οξύ διαπερνά τη κυτταρική μεμβράνη του ζυμομύκητα με απλή διάχυση. Τότε, μέσα στο κυτταρόπλασμα, το *μηλικό ένζυμο* (EC 1.1.1.40), με την οξείδωση ενός μορίου NAD^+ αποκαρβοξυλιώνει οξειδωτικά το μηλικό οξύ προς πυροσταφυλικό. Από την αντίδραση αυτή απελευθερώνεται και ένα μόριο CO_2 (Fuck and Radler, 1972). Εν συνεχεία, το πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται προς ακεταλδεΰδη και ανάγεται προς αιθανόλη μέσω της οδού της αλκοολικής ζύμωσης.

5.2.6 Παρεμπόδιση υποστρώματος

Σε περιπτώσεις που στο μέσο ζύμωσης απαντώνται αυξημένες συγκεντρώσεις σακχάρων η εισαγωγή τους στο κύτταρο και η αποικοδόμηση τους παρεμποδίζεται. Το εν λόγω φαινόμενο καλείται παρεμπόδιση υποστρώματος. Στην εφαρμογή της οινολογικής πρακτικής είναι συνηθισμένη η προσθήκη συμπυκνωμένου γλεύκους σταφυλής. Η προσθήκη αυτή εμπεριέχει τον κίνδυνο της πλήρους διακοπής της ζύμωσης, μιας και η συγκέντρωση των προστιθέμενων σακχάρων είναι αρκετά υψηλή. Αυτό συμβαίνει γιατί τα μόρια του υποστρώματος προσκολλώνται ταυτόχρονα στους πρωτεϊνικούς μεταφορείς, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η συνολική τους

ένωση και κατ' επέκταση η μεταφορά τους στο εσωτερικό του κυττάρου. Ωστόσο, παρεμπόδιση υποστρώματος μπορεί να παρουσιαστεί και σε μικρότερες συγκεντρώσεις σακχάρων, όπως >8g/L γλυκόζης (Λαναρίδης, 2005).

5.2.7 Φαινόμενο Crabtree και φαινόμενο Pasteur

Όπως ανεφέρθει και νωρίτερα, ο σακχαρομύκητας μπορεί να παράγει την απαραίτητη ενέργεια που απαιτείται για την επιβίωσή του μέσω της αλκοολικής ζύμωσης ή μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, αναλόγως με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ωστόσο, εκτός από την παρουσία ή όχι οξυγόνου στο μέσο, το μεταβολικό μονοπάτι που θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός καθορίζεται από δύο φαινόμενα.

1. **Φαινόμενο Crabtree**

Η συγκέντρωση των σακχάρων στο μέσο επηρεάζει τον τρόπο μεταβολισμού τους. Σε καλλιέργειες ζυμών που η συγκέντρωση των σακχάρων ξεπερνάει μια κρίσιμη τιμή (2 - 5g/L), ο καταβολισμός των υδατανθράκων πραγματοποιείται μέσω της οδού της αλκοολικής ζύμωσης, ανεξαρτήτως από το ποσό συγκέντρωσης του οξυγόνου στο μέσο. Το εν λόγω φαινόμενο, το οποίο ρυθμίζει τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών καλείται "επίδραση Crabtree" ή "καταβολική καταστολή της γλυκόζης" (Λαναρίδης, 2005).

Η υψηλή συγκέντρωση των σακχάρων καταστέλλει το σχηματισμό γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα να εκδηλώνονται φαινόμενα εκφυλισμού των μιτοχονδρίων, μείωσης των στερολών και των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς επίσης και καταστολής της σύνθεσης των μιτοχονδριακών ενζύμων που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Ribereau - Gayon, 2006).

2. **Φαινόμενο Pasteur**

Το δεύτερο φαινόμενο που καθορίζει τον τρόπο καταβολισμού των σακχάρων από τους σακχαρομύκητες είναι το λεγόμενο "φαινόμενο Pasteur". Σύμφωνα με αυτό, η αλκοολική ζύμωση παρεμποδίζεται από την αναπνοή. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση των σακχάρων στο μέσο είναι μικρή και δεν παρεμποδίζει την πραγματοποίηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ο μικροοργανισμός μπορεί να αποικοδομήσει τα σάκχαρα και με τους δύο τρόπους. Όμως η παρουσία του οξυγόνου ευνοεί την οδό της αναπνευστικής αλυσίδας και το σχηματισμό βιομάζας, ενώ μειώνει την παραγωγή αιθανόλης και την κατανάλωση των σακχάρων (Boulton *et al*., 1996).

2. Υλικά και μέθοδοι

1. Βιολογικό υλικό

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην εν λόγω διπλωματική μελέτη ήταν ο *Saccharomyces cerevisiae* X5. Ο μικροοργανισμός προήρθε από τη συλλογή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η διατήρηση του στελέχους γινόταν σε γυάλινους σωλήνες (slands) με YPD - άγαρ (θρεπτικό μέσο για την αύξηση των ζυμομυκήτων) σε θερμοκρασία 4 ^{o}C. Η ανανέωση των σωλήνων γινόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έτσι ώστε να διατηρείται η ζωτικότητά τους. Οι σωλήνες περιείχαν κεκλιμένο θρεπτικό μέσο και επωάζονταν σε θερμοστατούμενο κλίβανο (Memmert) στους 28 ^{o}C.

Πριν από κάθε εμβολιασμό στο θρεπτικό υπόστρωμα, το στέλεχος ανανεωνόταν, έτσι ώστε το εμβόλιο να είναι ηλικίας περίπου τριών ημερών. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου YPD - άγαρ ήταν η ακόλουθη:

20 g/L γλυκόζη (Roquette)
10 g/L πεπτόνη (Fluca)
10 g/L yeast extract (Fluca)
25 g/L άγαρ (Pronadise)

1.1 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας

Μετά το πέρας της διαδικασίας ανανέωσης πραγματοποιείτο η πλήρωση τριών κωνικών φιαλών χωρητικότητας 250 mL με 70 mL υγρού θρεπτικού μέσου που χρησίμευε ως προκαλλιέργεια του σακχαρομύκητα. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν αποστείρωση. Η σύσταση του υγρού θρεπτικού μέσου ήταν 20 g/L γλυκόζης (εμπορικό σκεύασμα), 10 g/L πεπτόνης (Fluca) και 10 g/L yeast extract (Fluca).

Μετά την αποστείρωση ακολουθούσε εμβολιασμός των κωνικών φιαλών με το ανανεωμένο στέλεχος και παρέμεναν για 24 ώρες σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο με ρυθμό 180 rpm στους 24 ^{o}C. Μετά από παραμονή μιας νύχτας επιλέγονταν δύο κωνικές φιάλες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια.

Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες 2 L που περιείχαν 1,5 L συνθετικού γλεύκους. Η κάθε ζύμωση πραγματοποιόταν εις διπλούν (duplicate) με σκοπό την καλύτερη εξαγωγή συμπερασμάτων λόγω επαναληψιμότητας. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σκεύασμα γλυκόζης σε συγκέντρωση 105 g/L και εμπορικό σκεύασμα φρουκτόζης (κρυσταλλική φρουκτόζη) σε συγκέντρωση 105 g/L.

Ως αφομοιώσιμη πηγή αζώτου προστέθηκε $(NH_4)_2SO_4$ σε συγκέντρωση 0,3 g/L. Επίσης, προστέθηκαν τα εξής οργανικά οξέα:

- **Τρυγικό οξύ (3 g/L)**
- **Κιτρικό οξύ (0,3 g/L)**
- **Μηλικό οξύ (0,3 g/L)**

Σαν πηγή φωσφόρου προστέθηκε KH_2PO_4 σε συγκέντρωση 2 g/L. Επίσης, προστέθηκε $MgSO_4$ σε συγκέντρωση 0,2 g/L και yeast extract σε συγκέντρωση 2 g/L. Σε κάθε ζύμωση το pH ρυθμίστηκε στο 3,3 με προσθήκη NaOH 1 N.

Πραγματοποιήθηκαν πέντε σειρές ζυμώσεων με διαφορετική συγκέντρωση φαινολικών παραγώγων η καθεμία. Η πρώτη, η οποία αποτελεί το τυφλό δείγμα, ήταν κενή φαινολικών ουσιών (0 g/L). Στις υπόλοιπες τέσσερις ζυμώσεις προστέθηκαν 1,5 g/L, 2 g/L, 3 g/L και 5 g/L φαινολικών παραγώγων αντίστοιχα. Η ουσίες που προστέθηκαν ήταν:

- **Γαλλικό οξύ**
- **Βανιλλικό οξύ**
- **4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ**
- **(+) - κατεχίνη**

Όλες οι ουσίες προστέθηκαν σε κάθε περίπτωση σε ίση ποσότητα, ανάλογα με την τελική συγκέντρωση του μέσου σε φαινολικά παράγωγα.

Μετά την προετοιμασία του θρεπτικού υποστρώματος, η κάθε κωνική φιάλη τοποθετείτο για αποστείρωση. Έπειτα, εμβολιαζόταν υπό ασηπτικές συνθήκες, με το εμβόλιο που παρασκευάσθηκε νωρίτερα και αφηνόταν εν ηρεμία για να ζυμώσει σε θερμοκρασία 18 ^{o}C.

2. Μέθοδοι ανάλυσης

2.1 Προσδιορισμός του pH

Σε κάθε δειγματοληψία, η οποία λάμβανε χώρα υπό ασηπτικές συνθήκες, μεταφέρονταν περίπου 50 mL από τις εν ζυμώσει κωνικές φιάλες σε δύο ποτήρια ζέσεως. Εν συνεχεία πραγματοποιείτο η μέτρηση του pH σε πεχάμετρο τύπου Jenway 3020.

2.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Η συλλογή της βιομάζας γινόταν κατόπιν διπλής φυγοκέντρησης της ποσότητας του δείγματος σε φυγόκεντρο τύπου Universal 320R-Hettich στις 9000 rpm για 10 min στους 20 ^{o}C. Το υπερκείμενο φυλασσόταν στην κατάψυξη για τις περαιτέρω αναλύσεις.

Ακολουθούσε έκλπυση με απιονισμένο νερό και τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν για δεύτερη φορά. Έπειτα, η βιομάζα μεταφερόταν σε προζυγισμένα φιαλίδια τύπου McCartney και στη συνέχεια σε φούρνο Heraeus προς ξήρανση (85 ^{o}C) μέχρι σταθεροποίησης του βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγιζόταν σε ζυγό ακριβείας τύπου Kern ew 420-3NM (3 δεκαδικών ψηφίων) και εκφραζόταν σε g/L.

2.3 Προσδιορισμός αιθανόλης και γλυκερόλης με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιθανόλης και της γλυκερόλης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της HPLC. Τα δείγματα αρχικά φιλτράρονταν με τη χρήση φίλτρων που διέθεταν πόρους διαμέτρου 0.22 μm. Ο απαιτούμενος όγκος κάθε ένεσης ήταν 20 μL. Η συσκευή της HPLC ήταν Waters 600 E και διέθετε ανιχνευτή R1 (410 Waters) για τον προσδιορισμό της αιθανόλης, της γλυκερόλης και των σακχάρων, καθώς και ανιχνευτή UV (486 Waters) για τον προσδιορισμό των οργανικών οξέων.

Η στατική φάση αποτελείτο από τη στήλη Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA) (30 cm X 7,8 mL), ενώ η κινητή φάση ήταν 5mM H_2SO_4 σε δισ-απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό. Η ροή της κινητής φάσης καθορίστηκε στα 0,6 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης στους 40°C.

Στα γραφήματα που προέκυπταν πραγματοποιείτο ολοκλήρωση των κορυφών της αιθανόλης και της γλυκερόλης με τη χρήση του λογισμικού Empower. Τέλος, με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς, ταυτοποιείτο η συγκέντρωση της κάθε ουσίας του δείγματος από τα εμβαδά που προέκυπταν στο χρωματογράφημα.

Εικ. 39 HPLC Waters 600 E

2.4 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών

Αφού προηγουμένως είχαν πραγματοποιηθεί οι κατάλληλες αραιώσεις, παίρναμε 0,2 mL από το δείγμα και προσθέταμε 10,8 mL απεσταγμένο νερό, 8 mL διαλύματος Na_2CO_3 και 1 mL αντιδραστηρίου Folin - Ciocalteau.. Έπειτα, το δείγμα παρέμενε εν ηρεμία για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πάροδο της συγκεκριμένης χρονικής περιόδου, πραγματοποιείτο μέτρηση της απορρόφησης στα 750 nm. Με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς προσδιοριζόταν η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, τα οποία εκφράζονται ως ανάλογα γαλλικού οξέος.

2.5 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων

Για τον προσδιορισμό της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τη ζύμη, μετά τη ζύγιση της βιομάζας προσθέτονταν ποσότητα λίγων mL μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου ($CHCl_3$) – μεθανόλης (CH_3OH) σε αναλογία 2:1 (Folch *et al.* 1957; Papanikolaou *et al.* 2001). Με το χρησιμοποιούμενο μίγμα διαλυτών είναι κατανοητό ότι εκχυλίζουμε το συνολικό μικροβιακό λίπος (αποθηκευτικά και δομικά λιπίδια). Ακολουθεί διήθηση της βιομάζας και συλλογή της σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης. Έπειτα χρησιμοποιείται περιστροφικός εξατμιστήρας (Büchi rotavapor R-114) για την απομάκρυνση των διαλυτών. Στη φιάλη εξάτμισης παρέμενε το μικροβιακό λίπος το οποίο υπολογίζονταν σε g/L.

2.6 Ποιοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού λίπους

Το εξωκυτταρικό και το ενδοκυτταρικό λίπος ενδιαφέρουν ως προς τη σύστασή τους. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η αέριος χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων. Επειδή όμως τα λιπαρά οξέα είναι ελάχιστα πτητικά για να μπορέσουν να ανιχνευθούν από τον αέριο χρωματογράφο (GC), πρέπει να μετατραπούν σε αιθυλικούς εστέρες των λιπαρών οξέων που είναι πτητικοί. Η διαδικασία μετατροπής των ελέυθερων λιπαρών οξέων στους μεθυλικούς τους εστέρες ονομάζεται μεθυλεστεροποίηση και στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με βάση το προτώκολλο της AFNOR (1959), όπως περιγράφεται από τους Papanikolaou *et al.* (2001). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται σε αλκαλικό και το δεύτερο σε όξινο περιβάλλον. Κατά το πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των αντιστοίχων μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, ενώ τα ήδη υπάρχοντα λιπαρά οξέα μετατρέπονται στους αντίστοιχους σάπωνές τους αντιδρώντας με διάλυμα μεθανολικού νατρίου. Στο δεύτερο στάδιο οι σάπωνες μετατρέπονται στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής: διάλυμα μεθανολικού νατρίου ($CH_3O^-Na^+$) που περιέχει 1% μεταλλικό νάτριο σε μίγμα μεθανόλης και βενζολίου σε αναλογία 70:30 και μια μικρή ποσότητα φαινολοφθαλεΐνης, υδροχλωρική μεθανόλη (20 mL ακετυλοχλωρίδιο σε 250 mL μεθανόλης), κανονικό (η-) εξάνιο και άνυδρο θειϊκό νάτριο (Na_2SO_4).

Πιο αναλυτικά η διαδικασία της μεθυλεστεροποίησης έχει ως εξής: αρχικά μικρή ποσότητα συνολικού λίπους (όχι μεγαλύτερη από 0.1 g) προστίθεται σε σφαιρική φιάλη μαζί με πέτρες βρασμού και 10 mL μεθανολικό νάτριο. Η φιάλη τοποθετείται σε θερμαινόμενο μανδύα και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα. Ο θερμαινόμενος μανδύας ανοίγεται και το περιεχόμενο της φιάλης βράζει για 20 min. Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο κατά το οποίο προστίθεται ποσότητα υδροχλωρικής μεθανόλης (CH_3OH - HCl) έως ότου το χρώμα μεταβληθεί του περιεχομένου της

φιάλης από ροζ σε άσπρο και συνεχίζει ο βρασμός για άλλα 20 min. Μετά την ολοκλήρωση και του δεύτερου σταδίου προστίθεται μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού, με την οποία τερματίζεται η αντίδραση και ακολουθεί η προσθήκη 6 mL εξανίου. Το εξάνιο λόγω της υψηλής του συγγένειας παρασύρει στη μάζα του στους μεθυλεστέρες (εκχυλίζονται στο εξάνιο). Για τον για χωρισμό των δύο φάσεων χρησιμοποιείται εκχυλιστική χοάνη με την οποία απομακρύνεται το νερό και συλλέγεται μόνο η φάση του εξανίου. Η τυχόν εναπομείνουσα ποσότητα νερού απομακρύνεται με προσθήκη άνυδρου θειίκού νατρίου.

Για τις αναλύσεις στον αέριο χρωματογράφο (8000 series FISONS) πραγματοποιούνταν έκχυση 1 μL από το διάλυμα των μεθυλεστέρων, οι οποίοι είναι πιο πτητικοί από τα αντίστοιχα λιπαρά οξέα και μπορούν να προσδιοριστούν στον αέριο χρωματογράφο, με τη βοήθεια ειδικής σύριγγας. Οι συνθήκες του αέριου χρωματογράφου ήταν οι εξής:

• Θερμοκρασία εισαγωγέα 250 ^{0}C

• Θερμοκρασία ανιχνευτή

• Φέρον αέριο He (ροή 1.38 mL/min) , H_2 (60 kPa) O_2 (110 kPa)

• Τύπος στήλης Fused silica WCOT :

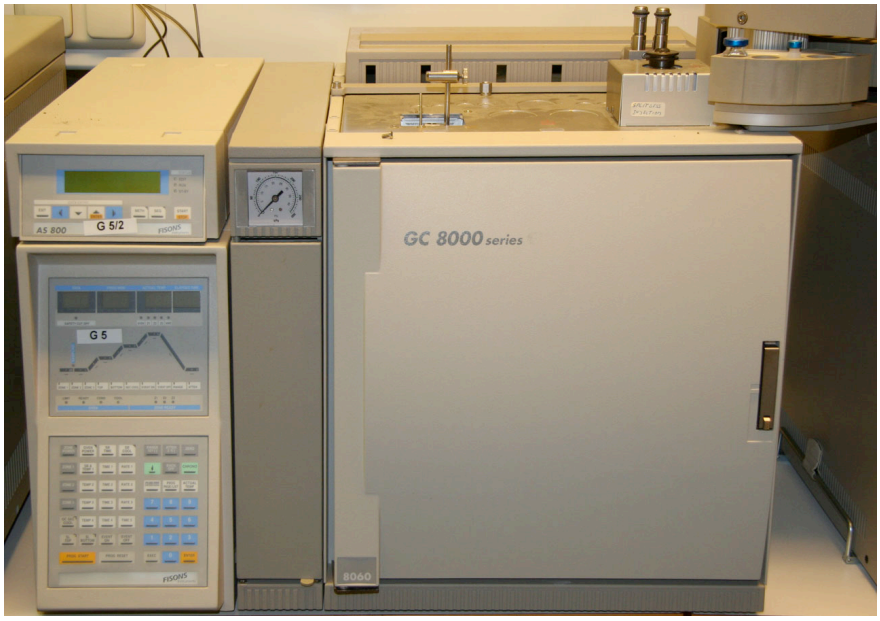
1. CP-Sill 88 (0.2 μl)

2. Μήκος 50 m

3. Διάμετρος 0.32 mm

4. Πάχος επικάλυψης εσωτερικά που έρχεται σε επαφή με το δείγμα DF = 0.2 μm

Η θερμοκρασία της στήλης παρέμενε σταθερή στους 200 ^{0}C για 20 min. Από το εμβαδόν της κάθε κορυφής προέκυπτε η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος.



Εικ. 40 Fisons - GC 8000 series

3. Αποτελέσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* X5 και μελετήθηκε η επίδραση των φαινολικών ουσιών στην αύξηση και τη φυσιολογική συμπεριφορά του μικροοργανισμού καλλιεργούμενου σε συνθετικά γλεύκη. Το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στην ικανότητα αύξησης του μικροοργανισμού στα ανωτέρω υποστρώματα, καθώς επίσης και στην παραγωγή αιθανόλης. Κατά τη διάρκεια της κινητικής μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι μικροβιακής αύξησης:

- Το pH της καλλιέργειας
- Η παραγωγή βιομάζας (ξηράς ουσίας X, g/L)
- Η κατανάλωση υποστρώματος (S, g/L)
- Η παραγωγής αιθανόλης (EtOH, g/L)
- Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών (Phe, g/L)

Επίσης, κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων, υπολογίστηκαν οι εξής συντελεστές:

- Συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα $Y_{EtOH/S}$ (g αιθανόλης / g καταναλωθέντος υποστρώματος).
- Συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα $Y_{X/S}$ (g παραχθείσης ξηράς κυτταρικής μάζας / g καταναλωθέντος υποστρώματος).
- Συντελεστής απόδοσης παραγωγής λιπιδίων προς παραχθείσα βιομάζα (g λιπιδίων / g παραχθείσης ξηράς κυτταρικής μάζας).

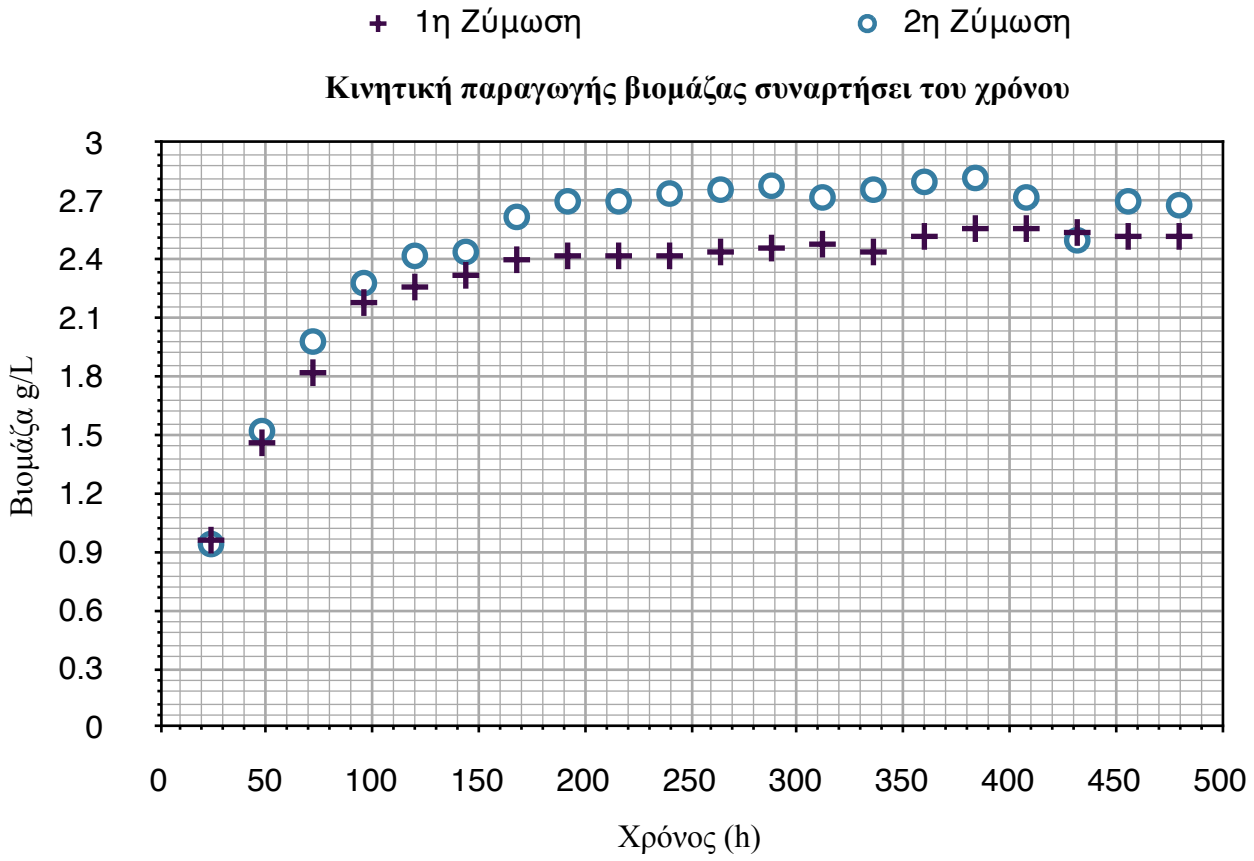
Η μελέτη χωρίστηκε σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος της πραγματοποιήθηκε σειρά ζυμώσεων με αυξανόμενη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών, της τάξης των 0 g/L, 1,5 g/L, 2 g/L, 3 g/L και 5 g/L. Κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων πραγματοποιούνταν καθημερινές δειγματοληψίες και παρατηρήσεις του μέσου, ακολουθούμενες από συγκεκριμένες αναλύσεις.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκε σειρά αναλύσεων, ούτως ώστε να διαπιστωθεί η ικανότητα αύξησης του μικροοργανισμού στο εκάστοτε περιβάλλον αύξησης, καθώς επίσης και για να καταγραφή η κινητική της εκάστοτε ζύμωσης. Όλες οι ζυμώσεις, όπως ειπώθηκε ανωτέρω, πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες 2 L, η οποίες ήταν τοποθετημένες εν ηρεμία σε χώρο με ελεγχόμενη θερμοκρασία 18 ^{o}C.

3.1 Αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 0 g/L

Το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* X5 καλλιεργήθηκε σε συνθετικό γλεύκος με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 210 g/L και 0 g/L φαινολικών ουσιών. Το pH ρυθμίστηκε στο 3.3 με NaOH 1N και αφέθηκε να ζυμώσει σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 2 L.

Η σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν είχε σαν σκοπό τη μελέτη της βιοκινητικής συμπεριφοράς (παραγωγή βιομάζας, κατανάλωση υποστρώματος, παραγωγή μεταβολιτών) του μικροοργανισμού στις ανωτέρω συνθήκες. Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε με επιτυχία και διήρκεσε 480 h. Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται η παραγωγή βιομάζας από τον μικροοργανισμό.

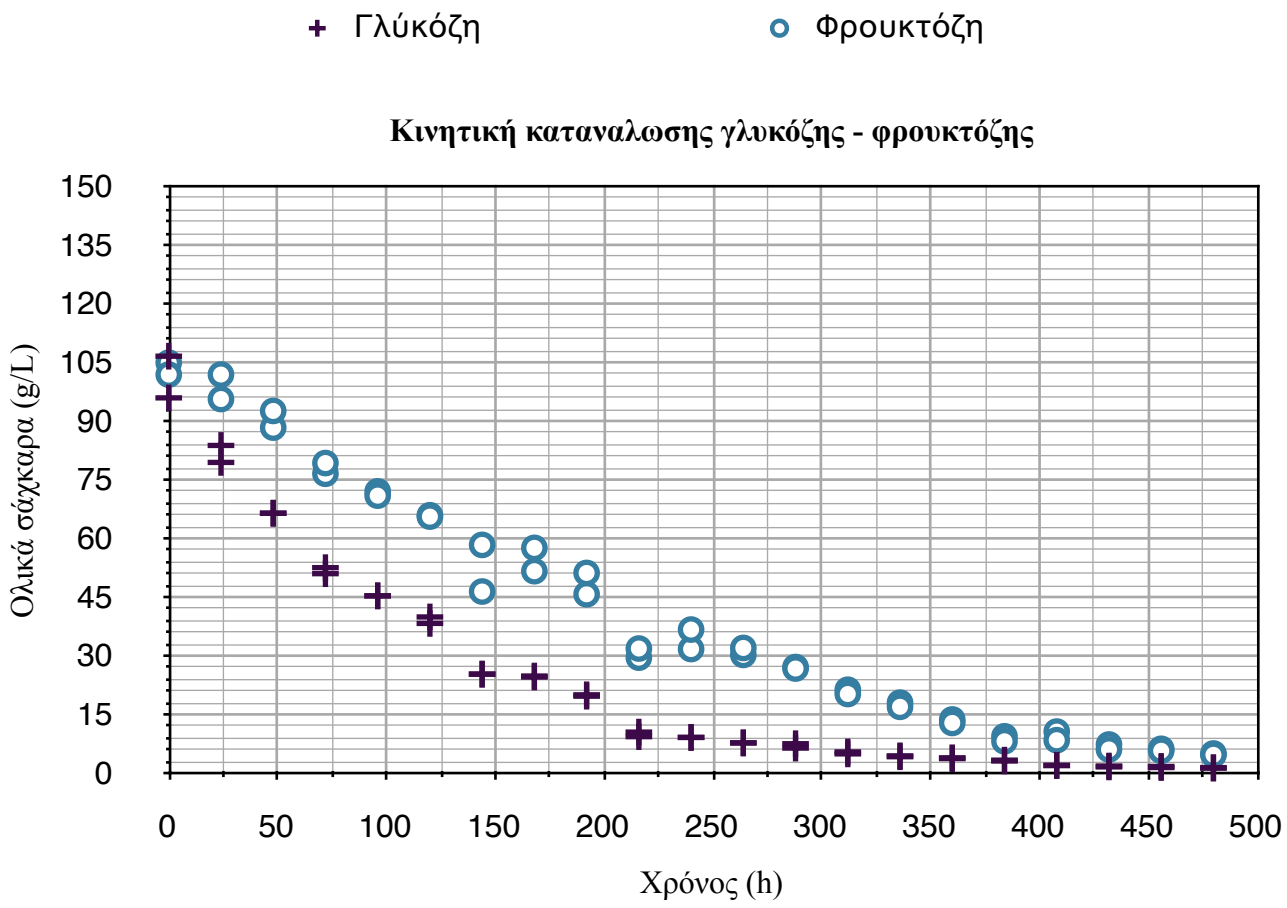


Διάγραμμα 1: Κινητική παραγωγής βιομάζας του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 0 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 200.7 g/L για την πρώτη ζύμωση και 208.4 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Η στατική φάση αύξησης του μικροοργανισμού στο μέσο παρουσίασε μεγαλύτερη διάρκεια εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες ζυμώσεις, μιας και ο συνολικός όγκος του μέσου παρουσίασε εμφανή σημάδια ζύμωσης κατά την τρίτη ημέρα.

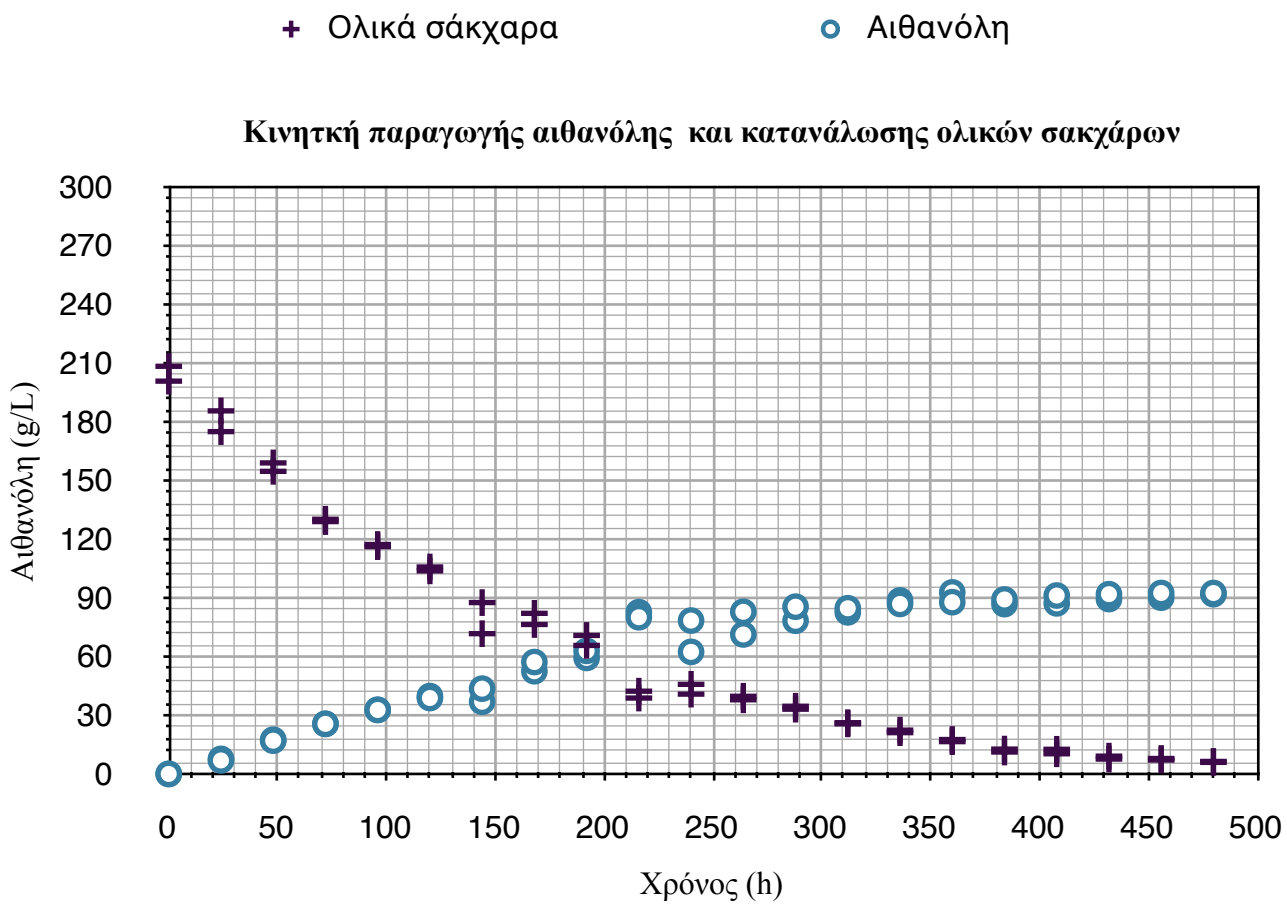
3.1.1 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης

Στο κάτωθι γράφημα, παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων του μέσου (γλυκόζης και φρουκτόζης) από το μικροοργανισμό ήταν ομαλή καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και για τις δύο ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με τις συγκεκριμένες συνθήκες. Ο μικροοργανισμός κατάφερε να αποζυμώσει με επιτυχία τα σάκχαρα του μέσου.



Διάγραμμα 2: Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 0 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 200.7 g/L για την πρώτη ζύμωση και 208.4 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης παρατηρήθηκε στις 360 ώρες για την πρώτη ζύμωση, με τιμή 91.9 g/L. Για τη δεύτερη ζύμωση, η μεγίστη παραγωγή αιθανόλης επετεύχθει στο τέλος της ζύμωσης (480 ώρες), με τιμή 92.5 g/L για τη δεύτερη. Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής αιθανόλης, καθώς και η κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων και για τις δύο ζυμώσεις. Η παραγωγή της αιθανόλης και στις δύο περιπτώσεις ακολουθεί την ίδια πορεία, γεγονός το οποίο αποδεικνύει την επαναληψιμότητα της ζύμωσης στις συγκεκριμένες συνθήκες. Οι συντελεστές απόδοσης σε αιθανόλη της πρώτης και της δεύτερης ζύμωσης ήταν 0.49 και 0.45 g/g αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3: Κινητική παραγωγής αιθανόλης και κατανάλωσης ολικών σακχάρων από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 0 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 200.7 g/L για την πρώτη ζύμωση και 208.4 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές της μέγιστης παραγόμενης αιθανόλης και βιομάζας για το χρονικό σημείο στο οποίο σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης. Επίσης, αναφέρεται η αρχική και η τελική συγκέντρωση των σακχάρων, καθώς και οι συντελεστές απόδοσης της αιθανόλης και της βιομάζας της συγκεκριμένης ζύμωσης.

Πιν. 10 Τιμές δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους, χωρίς την προσθήκη φαινολικών ουσιών

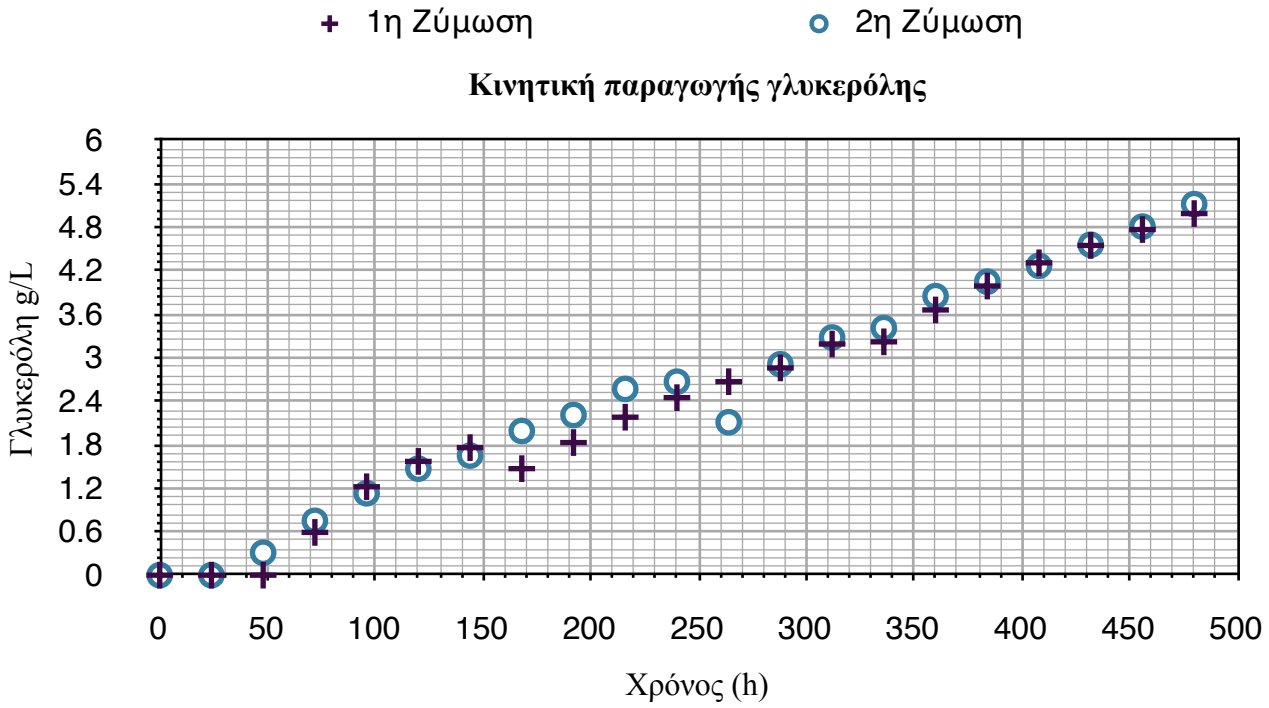
Ζύμωση	S_0	Χρόνος (h)	X (g/L)	EtOH (g/L)	S_f	$Y_{X/S}$	$Y_{EtOH/S}$
A΄a	200.8	360	2.52	92.8	6.4	0.013	0.50
A΄b	200.8	384	2.56	86.8	6.4	0.013	0.46

Πιν. 10 Τιμές δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους, χωρίς την προσθήκη φαινολικών ουσιών							
Ζύμωση	**S_0**	**Χρόνος (h)**	**X (g/L)**	**EtOH (g/L)**	**S_f**	**$Y_{X/S}$**	**$Y_{EtOH/S}$**
B΄a	208.4	480	2.68	92.5	5.9	0.013	0.45
B΄b	208.4	384	2.82	89.2	5.9	0.014	0.45

Όπου S_0: η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (g/L), S_f: η τελική συγκέντρωση των σακχάρων (g/L), X: η συγκέντρωση της βιομάζας (g/L), EtOH: η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), $Y_{EtOH/S}$: συντελεστής απόδοσης αιθανόλης (g/g), $Y_{X/S}$: συντελεστής απόδοσης βιομάζας (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε εν ηρεμία κωνικές φιάλες των 2 L, T=18 ^{o}C, pH = 3.3. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά εμβόλια.
a: Σημείο μέγιστης παραγωγής αιθανόλης
b: Σημείο μέγιστης παραγωγής βιομάζας

Ωστόσο, εκτός από την αιθανόλη και τη βιομάζα, μελετήθηκε και η ικανότητα του ζυμομύκητα όσον αφορά την παραγωγή γλυκερόλης στο μέσο, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή γλυκερόλης παρατηρήθηκε στο τέλος της ζύμωσης και στις δύο περιπτώσεις. Όσον αφορά την πρώτη περίπτωση, η μέγιστη τιμή της ήταν 4.99 g/L, ενώ για τη δεύτερη 5.12 g/L αντίστοιχα. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η κινητική αυτή.



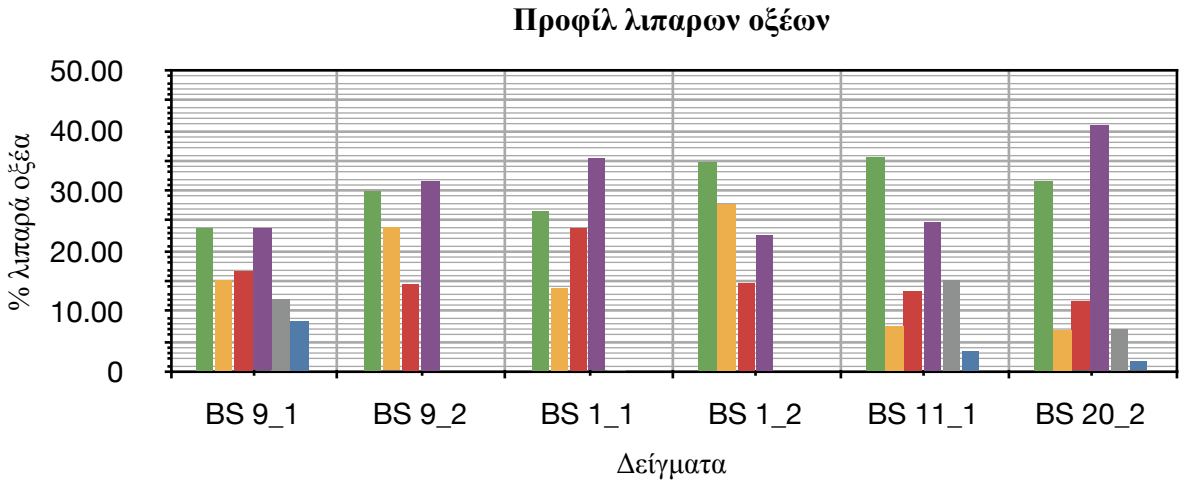
Διάγραμμα 4: Κινητική παραγωγής γλυκερόλης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 0 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 200.7 g/L για την πρώτη ζύμωση και 208.4 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

3.1.2 Παραγωγή λιπιδίων

Ο *Saccharomyces cerevisiae* X5 δεν αποτελεί έναν ελαιογόνο μικροοργανισμό συγκρινόμενος με άλλους σακχαρομύκητες. Τα λιπαρά οξέα που παρήχθησαν ήταν τα κάτωθι:

- **C:16 (palmitic acid)**
- **C:16:1 (palmitoleic acid)**
- **C:18:0 (stearic acid)**
- **C:18:1 (Oleic acid)**
- **C:18:2 (Linoleic acid)**
- **C:18:3 (α-Linoleic acid)**

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η % συμμετοχή του εκάστοτε λιπαρού οξέος στο συνολικό κλάσμα. Τα δείγματα που αναλύθηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας, αφού προηγουμένως είχε λάβει χώρα η μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών οξέων, λήφθηκαν από την αρχή, τη μέση και το τέλος της ζύμωσης, με σκοπό να παρουσιαστεί μια πλήρης εικόνα του προφίλ και της διακύμανσης των λιπαρών οξέων.



Διάγραμμα 5: Προφίλ λιπαρών οξέων του μικροοργανισμού Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 0 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 200.7 g/L για την πρώτη ζύμωση και 208.4 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.
Όπου:
BS 9_1 - 1η ζύμωση 216 ώρες
BS 9_2 - 2η ζύμωση 216 ώρες
BS 1_1 - 1η ζύμωση 24 ώρες
BS 1_2 - 2η ζύμωση 24 ώρες
BS 11_1 - 1 ζύμωση 264 ώρες
BS 20_2 - 2η ζύμωση 480 ώρες

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές των λιπιδίων που παρήχθησαν (g/L), καθώς και οι αποδόσεις λιπιδίων επί ξηρού βάρους (g/g) του μικροοργανισμού.

Πιν. 11 Τιμές λιπιδίων που παρήχθησαν από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξηση του σε μέσο με 0 g/L φαινολικών ουσιών και αποδόσεις τους επί ξηρού βάρους						
Ζύμωση	**24 h**	**168 h**	**216 h**	**312 h**	**432 h**	**480 h**
1η Ζύμωση (g/L)	0	0.2	0	0	0.4	0
$Y_{L/X}$ (g/g)	0	0.08	0	0	0.15	0
2η Ζύμωση (g/L)	0	1	0	0	1.4	0
$Y_{L/X}$ (g/g)	0	0.38	0	0	0.56	0

Όπου $Y_{L/X}$: η απόδοση λιπιδίων επί ξηρού βάρους (g/g).

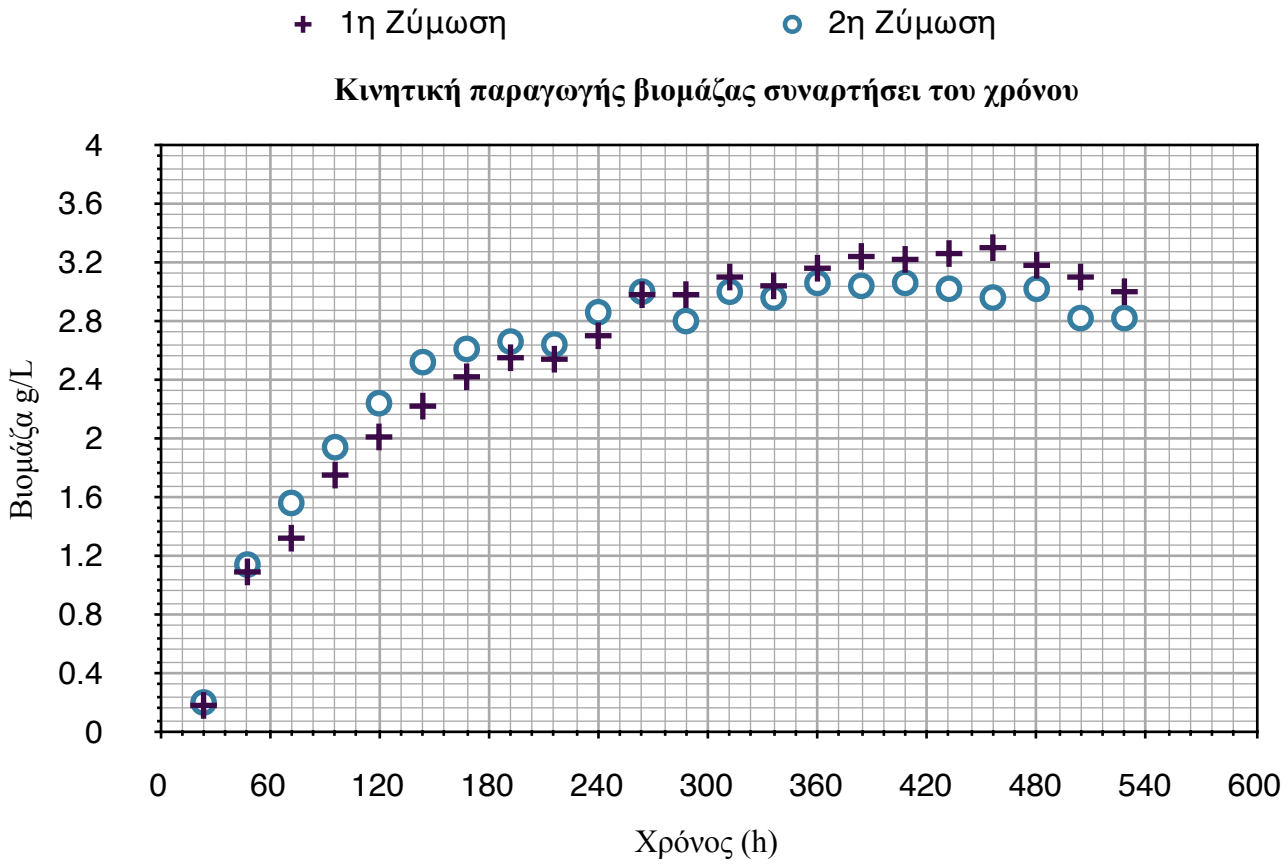
Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε εν ηρεμία κωνικές φιάλες των 2 L, T=18 ^{o}C, pH = 3.3. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά εμβόλια.

3.2 Αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L

Η επόμενη σειρά ζυμώσεων περιελάμβανε καλλιέργεια του σακχαρομύκητα σε μέσο αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 208.6 g/L όσον αφορά την πρώτη κωνική και 204.3 g/L για τη δεύτερη. Το pH της κάθε ζύμωσης ρυθμίστικε στο 3.3 μετά από προσθήκη κατάλληλης ποσότητας NaOH 1 N.

Τα φαινολικά παράγωγα, προτού προστεθούν στο μέσο καλλιέργειας διαλύθηκαν σε 1 ml αιθανόλη 70%. Έπειτα, προστέθηκαν στο μέσο και προτού πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός με το επιλεγμένο στέλεχος, αφέθηκαν υπό ανάδευση για μια νύχτα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ευκολότερη διάλυση των ουσιών, μιας και είναι σχεδόν αδιάλυτες στο νερό. Την επόμενη ημέρα, και ενώ οι ουσίες είχαν διαλυθεί πλήρως, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού υπό ασηπτικές συνθήκες.

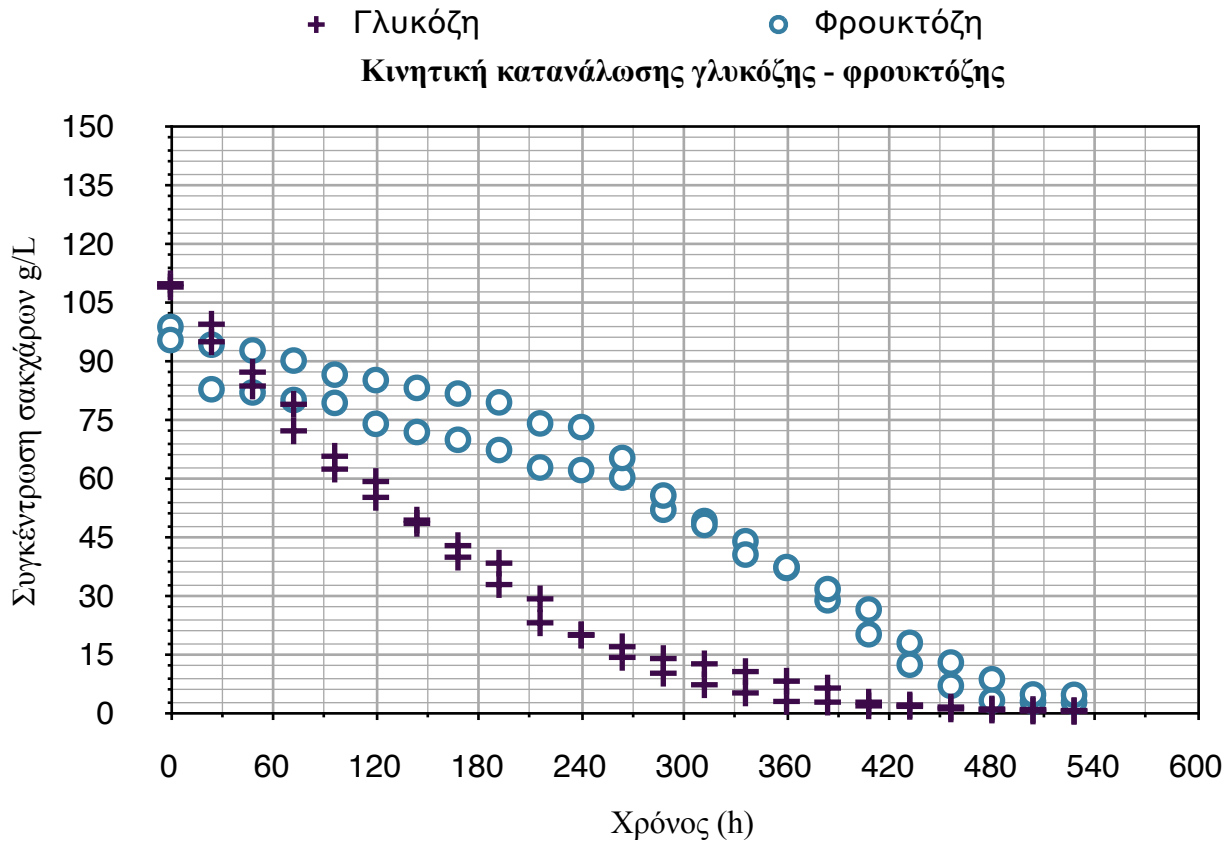
Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε με επιτυχία στις 528 ώρες από την έναρξή της. Για την ταυτοποίηση της ολοκλήρωσής της πραγματοποιήθηκε ανάλυση ολικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS στα δείγματα που λήφθηκαν τις 4 τελευταίες ημέρες. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η διακύμανση της βιομάζας που παρήχθη από τον σακχαρομύκητα.



Διάγραμμα 6: Κινητική παραγωγής βιομάζας του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 208.6 g/L για την πρώτη ζύμωση και 204.3 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

3.2.1 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης

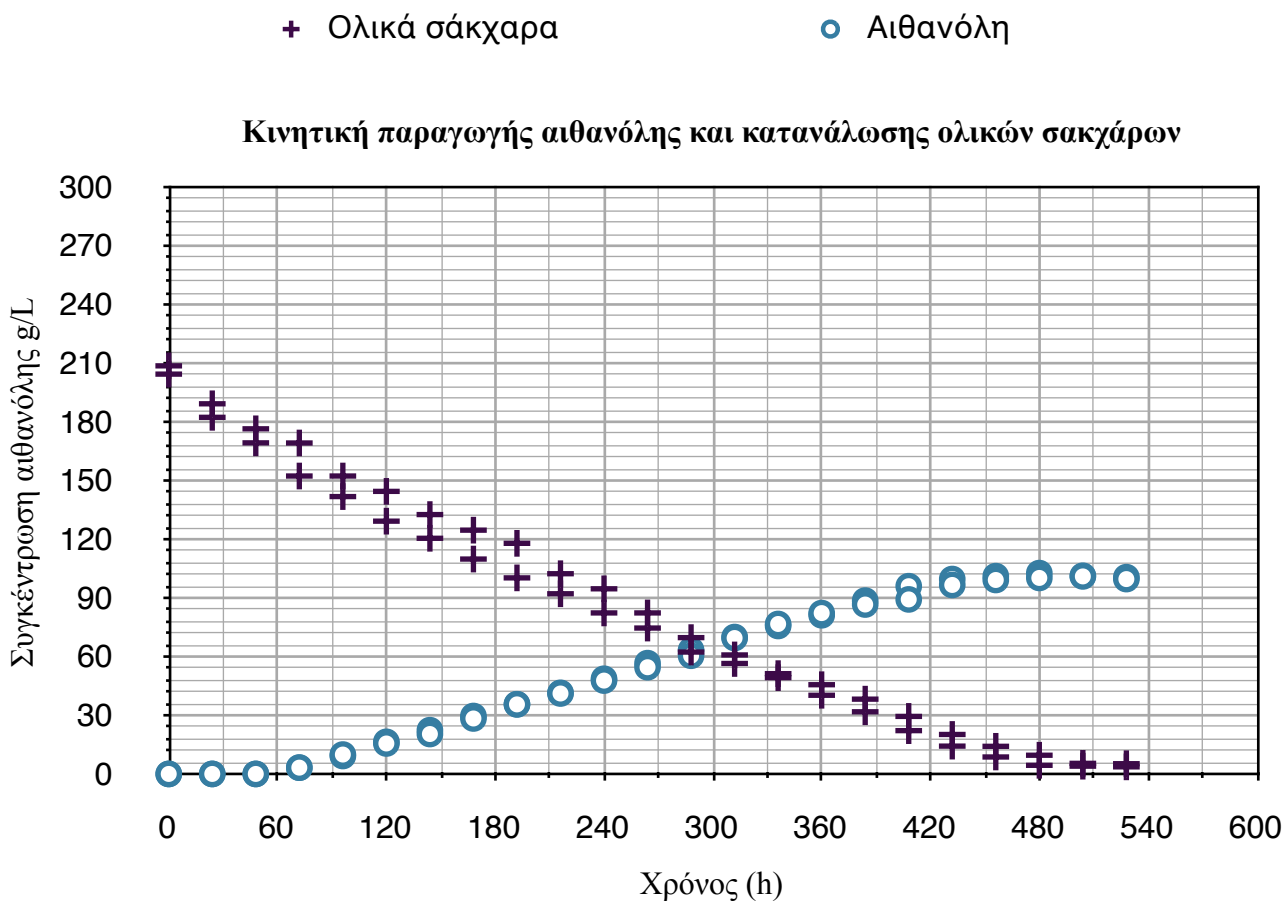
Ο μικροοργανισμός κατάφερε να αποζυμωσει με επιτυχία τα σάκχαρα και στις δύο ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν υπό αυτές τις συνθήκες. Η τελική τους συγκέντρωση ήταν 3.97 g/L για την πρώτη ζύμωση και 5.42 g/L για τη δεύτερη. Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται η κινητική κατανάλωσης του υποστρώματος από τον μικροοργανισμό.



Διάγραμμα 7: Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 208.6 g/L για την πρώτη ζύμωση και 204.3 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Όπως είναι εμφανές από το ανωτέρω γράφημα, ο μικροοργανισμός κατάφερε να αποζυμώσει πλήρως τα σάκχαρα. Ωστόσο, η χρονική διάρκεια της ζύμωσης ήταν μεγαλύτερη απ' ότι στην πρώτη περίπτωση όπου δεν είχαν προστεθεί καθόλου φαινολικά παράγωγα στο μέσο.

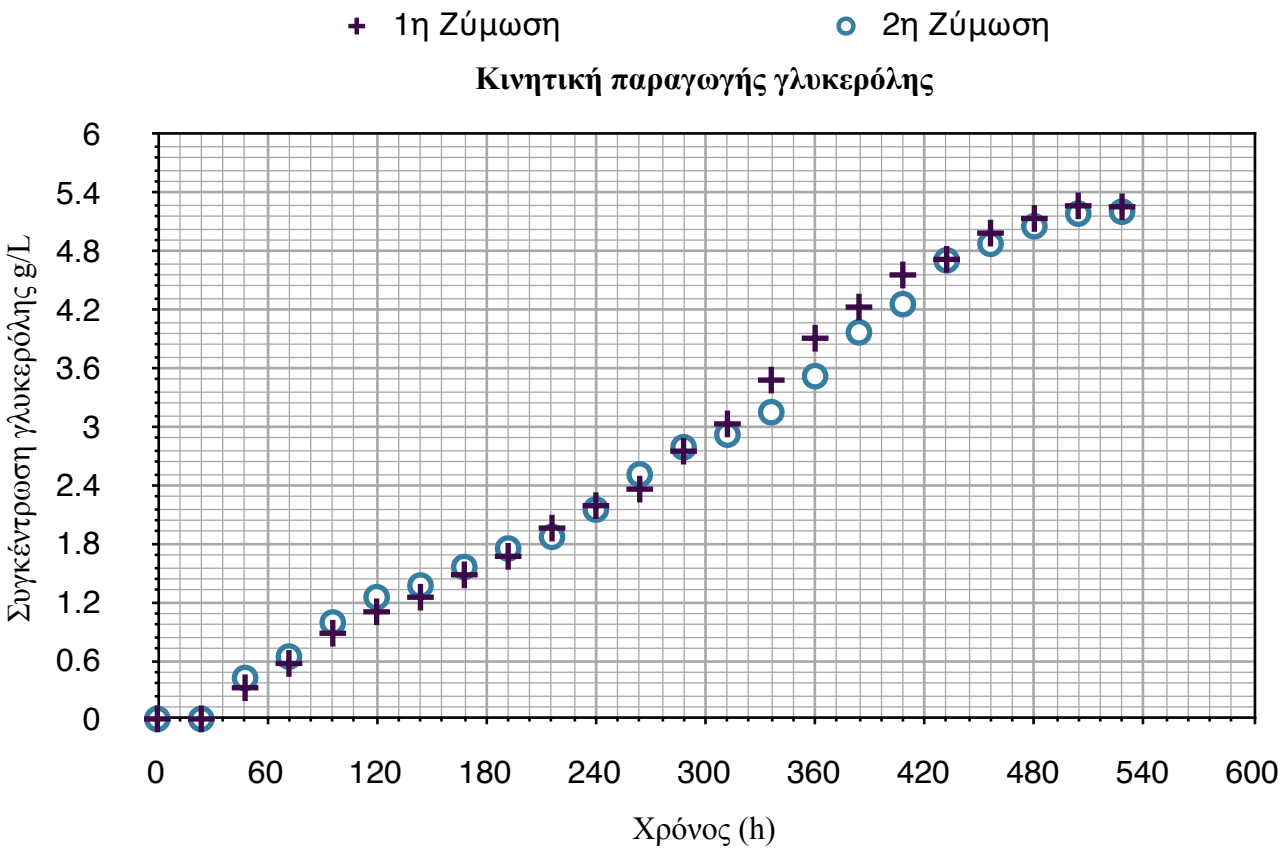
Όσον αφορά την αιθανόλη, η μέγιστη παραγωγή της παρατηρήθηκε στις 504 ώρες με τιμή 169.16 g/L για την πρώτη ζύμωση και στις 528 ώρες με τιμή 178.21 g/L για τη δεύτερη. Οι συντελεστές απόδοσης ήταν 0.82 g/g για την πρώτη περίπτωση και 0.89 g/g όσον αφορά τη δεύτερη. Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής αιθανόλης και κατανάλωσης ολικών σακχάρων από το μικροοργανισμό.



Διάγραμμα 8: Κινητική παραγωγής αιθανόλης και κατανάλωσης ολικών σακχάρων από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 208.6 g/L για την πρώτη ζύμωση και 204.3 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Από το παραπάνω γράφημα είναι εμφανές ότι ο μικροοργανισμός παρήγαγε περισσότερη ποσότητα αιθανόλης απ΄ ότι στην προηγούμενη σειρά ζυμώσεων. Επίσης, παρατηρούμε ότι στην πρώτη ζύμωση πραγματοποιήθηκε και μια μικρή ανακατανάλωση της αιθανόλης κατά το τέλος της ζύμωσης. Το συγκεκριμένο φαινόμενο οφείλεται στη μικρή συγκέντρωση των σακχάρων που απαντούν στο μέσο κατά τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, όταν βρεθεί σε περιβάλλον με συγκέντρωση σακχάρων μικρότερη από μια κρίσιμη τιμή (5 g/L), ο μεταβολισμός του συνεχίζεται αεροβίως. Έτσι, η παραγωγή αιθανόλης δεν ευνοείται.

Στο κάτωθι γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική της παραγωγής γλυκερόλης, ενώ στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές της μέγιστης παραγόμενης αιθανόλης και βιομάζας για το χρονικό σημείο στο οποίο σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης. Επίσης, αναφέρεται η αρχική και η τελική συγκέντρωση των σακχάρων, καθώς και οι συντελεστές απόδοσης της αιθανόλης και της βιομάζας της συγκεκριμένης ζύμωσης.



Διάγραμμα 9: Κινητική παραγωγής γλυκερόλης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 208.6 g/L για την πρώτη ζύμωση και 204.3 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Όπως είναι εμφανές από το προηγούμενο γράφημα, η παρηχθήσα ποσότητα γλυκερόλης σ' αυτή τη ζύμωση είναι μεγαλύτερη από αυτή της προηγούμενης. Η μεγαλύτερες τιμές και για τις δύο ζυμώσεις παρατηρήθηκαν στο τέλος της ζύμωσης και ήταν 5.26 g/L όσον αφορά την πρώτη περίπτωση και 5.21 g/L όσον αφορά τη δεύτερη.

Πιν. 12 Τιμές δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους, με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L.

Ζύμωση	S_0	Χρόνος (h)	X (g/L)	EtOH (g/L)	S_f	$Y_{X/S}$	$Y_{EtOH/S}$
A΄a	208.6	480	3.18	102.67	3.62	0.015	0.50
A΄b	208.6	456	3.30	102.39	3.62	0.016	0.50
B΄a	204.3	504	2.82	100.98	5.2	0.014	0.50

Πιν. 12 Τιμές δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους, με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L.							
Ζύμωση	**S_0**	**Χρόνος (h)**	**X (g/L)**	**EtOH (g/L)**	**S_f**	**$Y_{X/S}$**	**$Y_{EtOH/S}$**
B΄b	204.3	408	3.06	96.61	5.2	0.018	0.50

Όπου S_0: η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (g/L), S_f: η τελική συγκέντρωση των σακχάρων (g/L), X: η συγκέντρωση της βιομάζας (g/L), EtOH: η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), $Y_{EtOH/S}$: συντελεστής απόδοσης αιθανόλης (g/g), $Y_{X/S}$: συντελεστής απόδοσης βιομάζας (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε εν ηρεμία κωνικές φιάλες των 2 L, T=18 ^{o}C, pH = 3.3, συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά εμβόλια.
a: Σημείο μέγιστης παραγωγής αιθανόλης
b: Σημείο μέγιστης παραγωγής βιομάζας

3.2.2 Παραγωγή λιπιδίων

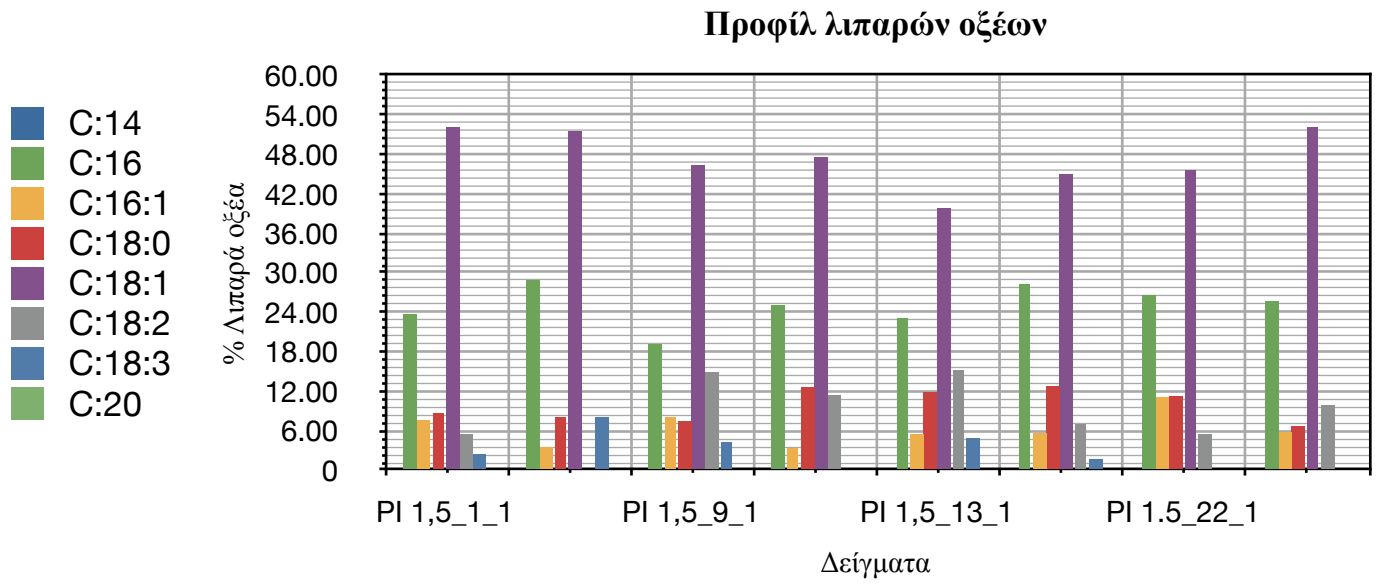
Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι τιμές των λιπιδίων που παρήχθησαν (g/L), καθώς και οι αποδόσεις λιπιδίων επί ξηρού βάρους (g/g) του μικροοργανισμού, όπως λήφθηκαν ύστερα από ανάλυση ορισμένων δειγμάτων από τη συγκεκριμένη σειρά ζύμωσης.

Πιν. 13 Τιμές λιπιδίων που παρήχθησαν από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξησή του σε μέσο με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L και αποδόσεις τους επί ξηρού βάρους						
Ζύμωση	**24 h**	**120 h**	**168 h**	**288 h**	**456 h**	**528 h**
1η Ζύμωση (g/L)	0	0.06	0.02	0.08	0.04	0.06
$Y_{L/X}$ (g/g)	0	0.08	0.01	0.02	0.01	0.02
2η Ζύμωση (g/L)	0	0.06	0.14	0.08	0.06	0.06
$Y_{L/X}$ (g/g)	0	0.02	0.05	0.02	0.02	0.02

Όπου $Y_{L/X}$: η απόδοση λιπιδίων επί ξηρού βάρους (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε εν ηρεμία κωνικές φιάλες των 2 L, T=18 ^{o}C, pH = 3.3. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά εμβόλια.

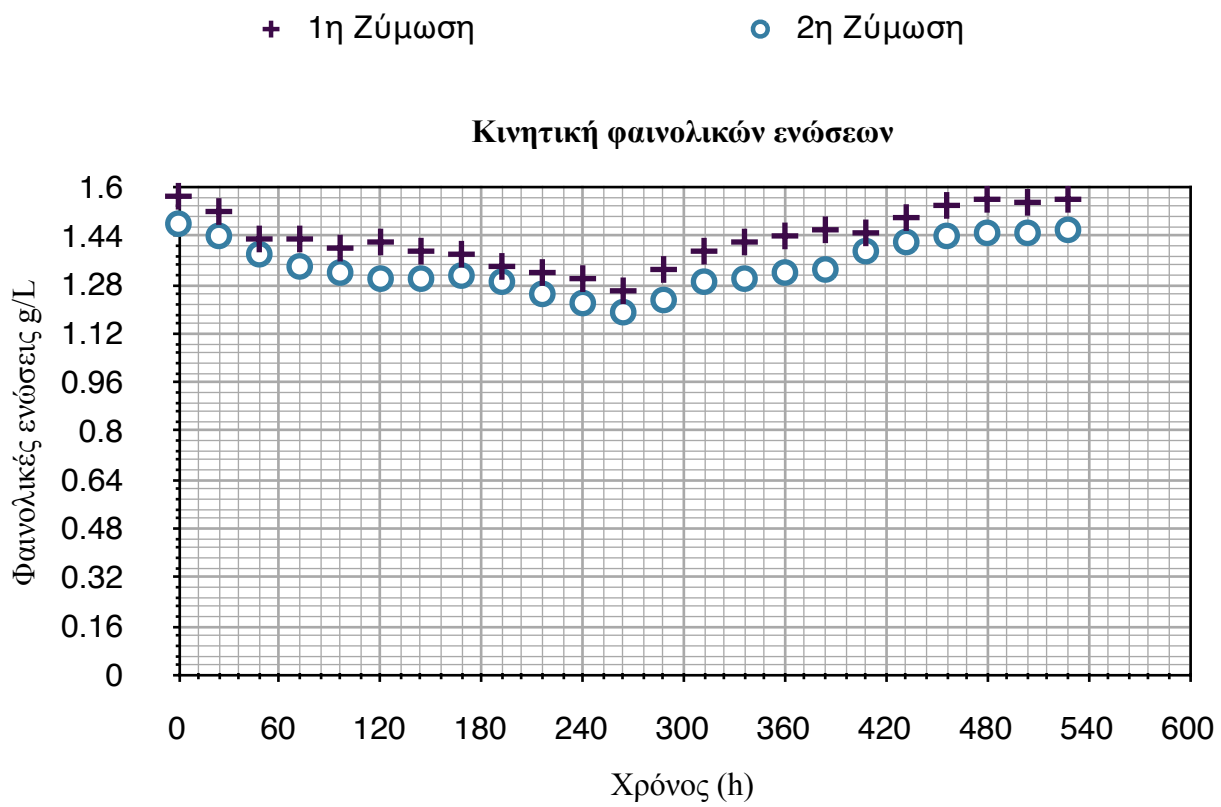
Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται το προφίλ των λιπαρών οξέων, όπως προέκυψε ύστερα από ανάλυση συγκεκριμένων δειγμάτων με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC).



Διάγραμμα 10: Προφίλ λιπαρών οξέων του μικροοργανισμού Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 208.6 g/L για την πρώτη ζύμωση και 204.3 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3. Όπου:
PI 1.5_1_1: 1η ζύμωση 24 ώρες
PI 1.5_1_2: 2η ζύμωση 24 ώρες
PI 1.5_9_1: 1η ζύμωση 216 ώρες
PI 1.5_9_2: 2η ζύμωση 216 ώρες
PI 1.5_13_1: 1η ζύμωση 312 ώρες
PI 1.5_13_2: 2η ζύμωση 312 ώρες
PI 1.5_22_1: 1η ζύμωση 528 ώρες
PI 1.5_22_2: 2η ζύμωση 528 ώρες

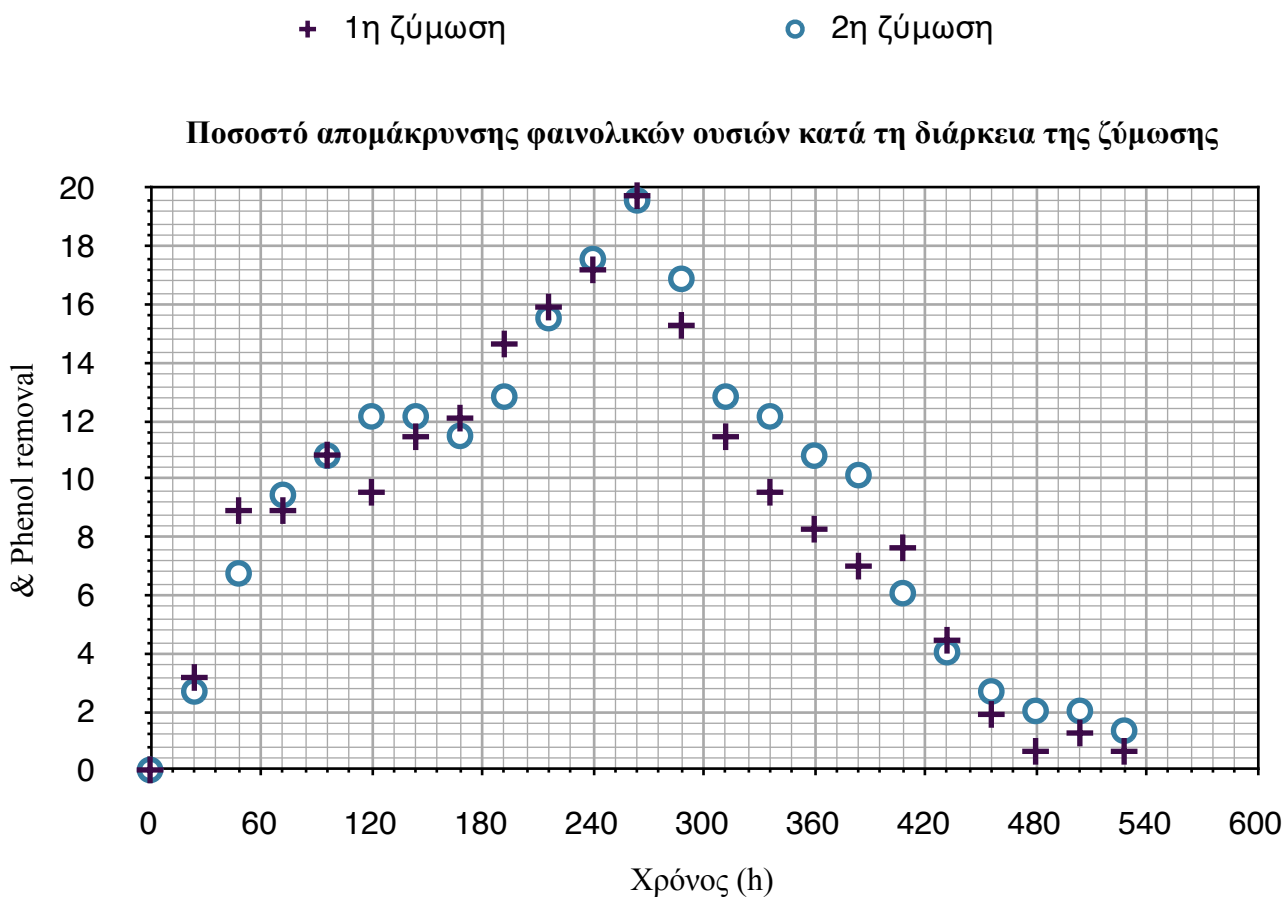
3.2.3 Διακύμανση φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης

Εκτός των ανωτέρω αναλύσεων, στη συγκεκριμένη σειρά ζυμώσεων, πραγματοποιήθηκε και προσδιορισμός της διακύμανσης των φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Folin - Ciocalteau, η οποία βασίζεται στη μέθοδο της φωτομετρίας. Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται η διακύμανση των ουσιών αυτών, όπως προέκυψε μετά από την ανάλυση των δειγμάτων.



Διάγραμμα 11: Κινητική απορρόφησης φαινολικών ουσιών από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 208.6 g/L για την πρώτη ζύμωση και 204.3 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Όπως φαίνεται από το προηγούμενο γράφημα, οι φαινολικές ενώσεις που είχαν προστεθεί από την αρχή στο μέσο, παρουσιάζουν μια πτωτική τάση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Ωστόσο, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η μέγιστη μείωσή τους παρατηρείται στο μέσο της ζύμωσης. Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται το ποσοστό απομάκρυνσης των φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.



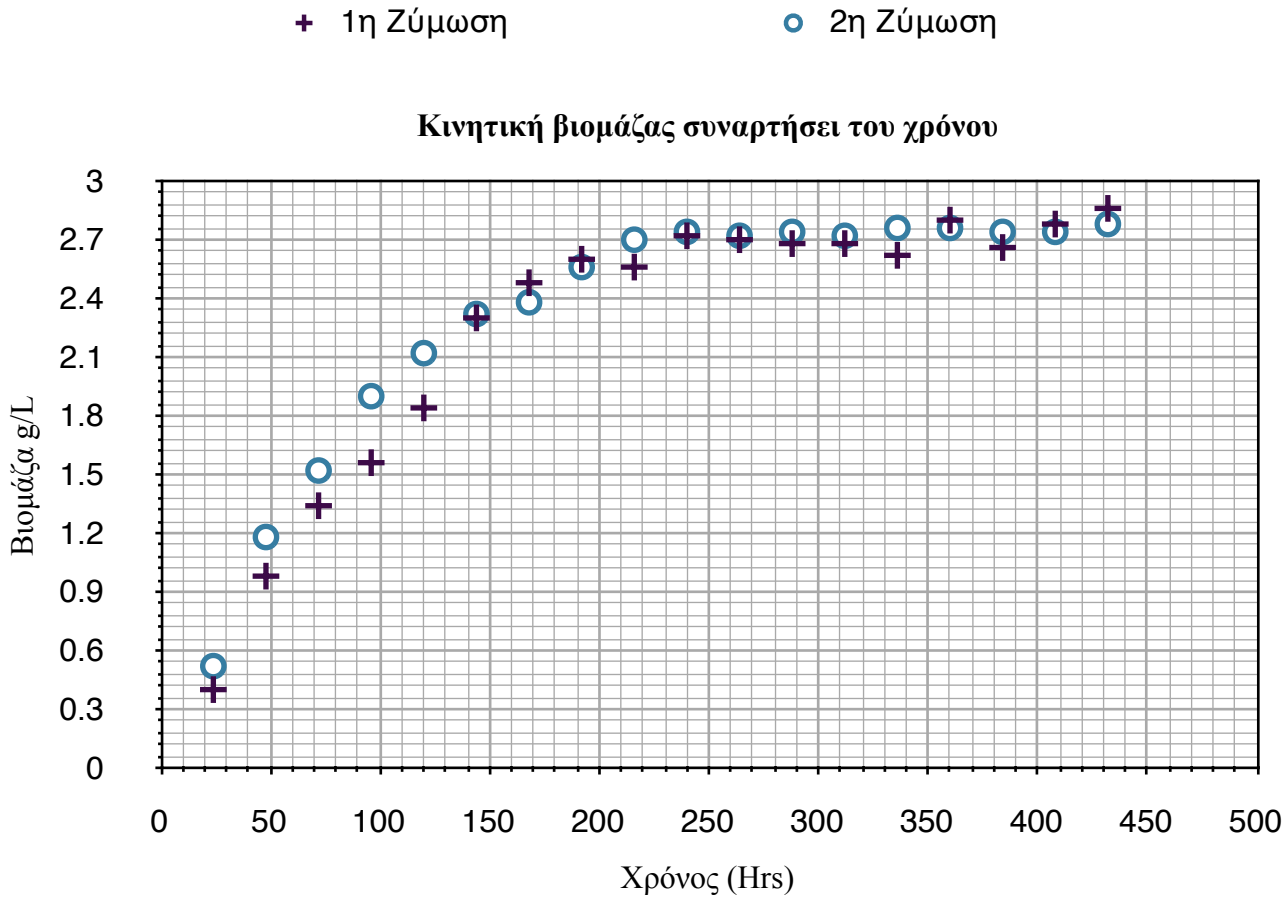
Διάγραμμα 12: Ποσοστό απομάκρυνσης φαινολικών ουσιών από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 208.6 g/L για την πρώτη ζύμωση και 204.3 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

3.3 Αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L

Ο ζυμομύκητας Saccharomyces cerevisiae X5 καλλιεργήθηκε σε συνθετικό γλεύκος με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L. Η συγκέντρωση των σακχάρων ήταν της τάξης των 210 g/L περίπου, ενώ το pH ρυθμίστηκε στο 3.3 μετά από προσθήκη κατάλληλης ποσότητας NaOH 1N.

Τα φαινολικά παράγωγα, προτού προστεθούν στο μέσο καλλιέργειας διαλύθηκαν σε 1 ml αιθανόλη 70%. Έπειτα, προστέθηκαν στο μέσο και προτού πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός με το επιλεγμένο στέλεχος, αφέθηκαν υπό ανάδευση για μια νύχτα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ευκολότερη διάλυση των ουσιών, μιας και είναι σχεδόν αδιάλυτες στο νερό. Την επόμενη ημέρα, και ενώ οι ουσίες είχαν διαλυθεί πλήρως, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού υπό ασηπτικές συνθήκες.

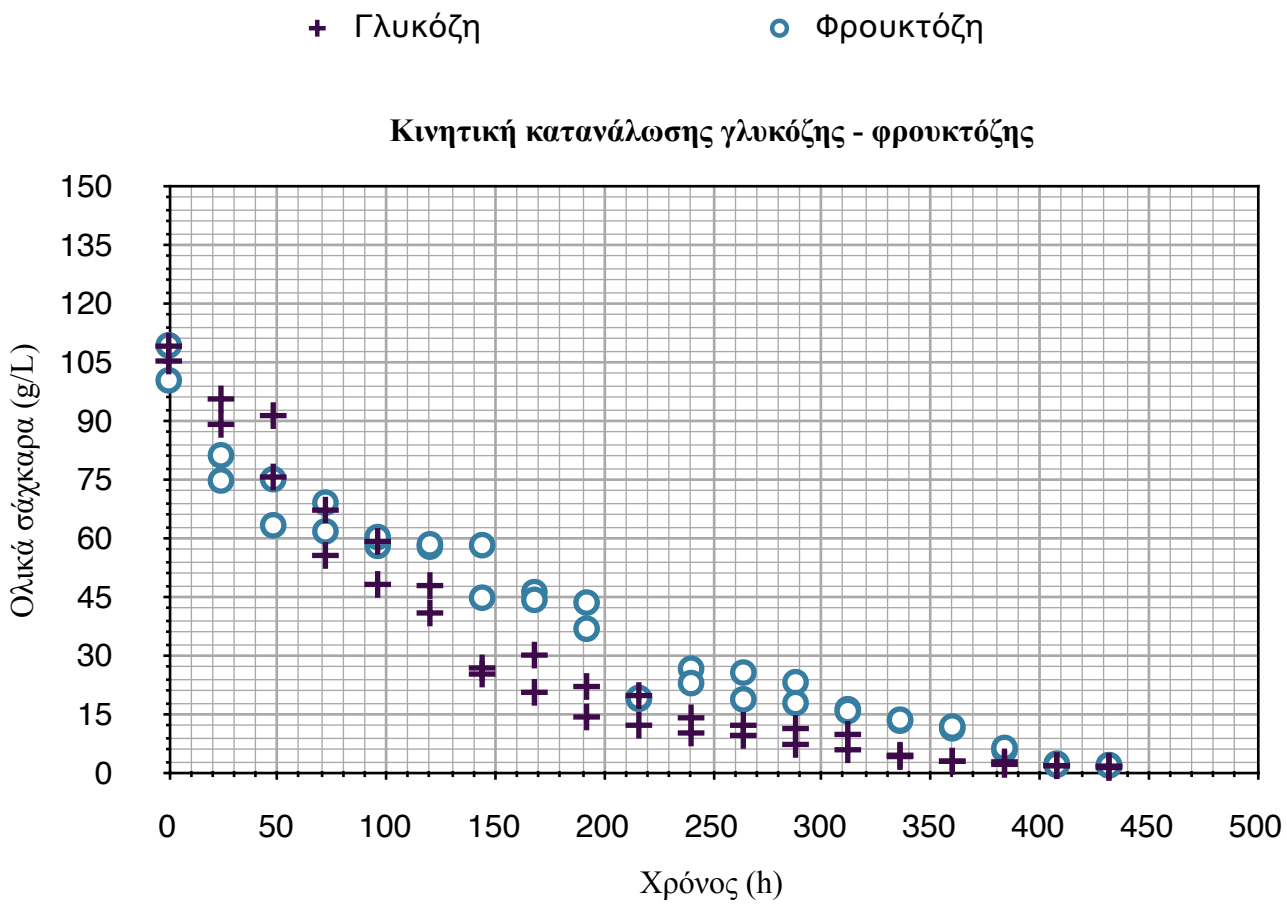
Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε με επιτυχία στις 432 ώρες από την έναρξή της. Για την ταυτοποίηση της ολοκλήρωσής της πραγματοποιήθηκε ανάλυση ολικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS στα δείγματα που λήφθηκαν τις 4 τελευταίες ημέρες. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η διακύμανση της βιομάζας που παρήχθη από τον ζυμομύκητα.



Διάγραμμα 13: Κινητική παραγωγής βιομάζας του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 212.8 g/L για την πρώτη ζύμωση και 214.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

3.3.1 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης

Ο μικροοργανισμός κατάφερε να αποζυμώσει με επιτυχία τα σάκχαρα του μέσου υπό αυτές τις συνθήκες. Η συγκέντρωση των σακχάρων στο τέλος της ζύμωσης ήταν της τάξης των 3.8 g/L για την πρώτη ζύμωση και 3.4 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Στο κάτωθι διάγραμμα παρουσιάζεται η κινητική κατανάλωσης του υποστρώματος από το μικροοργανισμό.

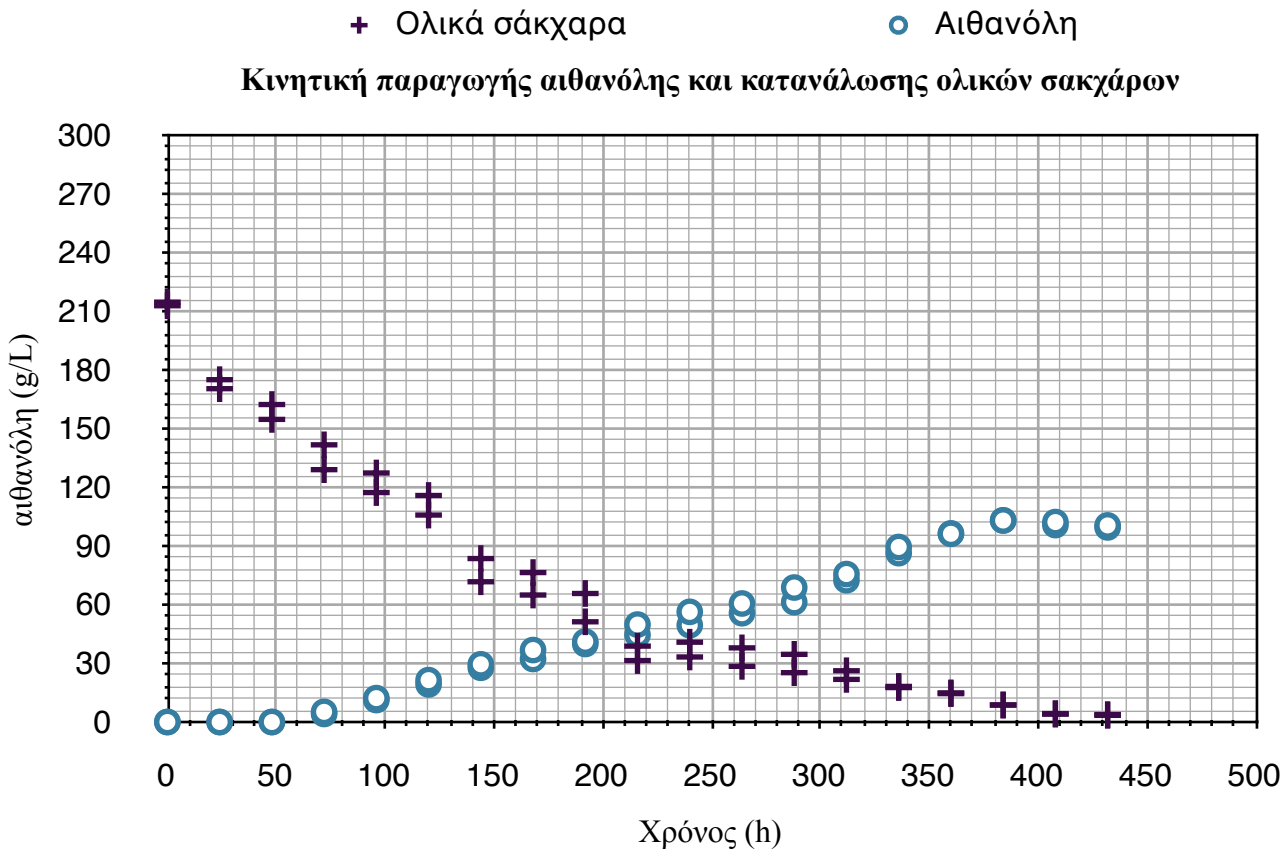


Διάγραμμα 14: Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 212.8 g/L για την πρώτη ζύμωση και 214.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Όπως φαίνεται και από το ανωτέρω γράφημα, ο μικροοργανισμός αποικοδόμησε τα σάκχαρα γρηγορότερα απ' ότι στην περίπτωση της ζύμωσης χωρίς την παρουσία φαινολικών ενώσεων. Η συγκεκριμένη ζύμωση διήρκεσε 432 ώρες, ενώ αυτή με 0 g/L φαινολικά 480 ώρες. Θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι φαινολικές ενώσεις του γλεύκους επάγουν τη γρηγορότερη περάτωση της αλκοολικής ζύμωσης από τον *Saccharomyces cerevisiae*.

Όσον αφορά την αιθανόλη, η μέγιστη παραγωγή και για τις δύο ζυμώσεις πραγματοποιήθηκε στις 384 ώρες. Η τιμή της, για την πρώτη ζύμωση ήταν 233.6 g/L, ενώ για τη δεύτερη ήταν 253.5 g/L. Έπειτα, παρατηρήθηκε μια μικρή ανακατανάλωση της αιθανόλης. Οι συντελεστές απόδοσης της αιθανόλης ήταν 1.14 g/g στην πρώτη περίπτωση και 1.23 g/g για τη δεύτερη.

Στο κάτωθι γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική της παραγωγής αιθανόλης, καθώς και η κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων, ενώ στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές της μέγιστης παραγόμενης αιθανόλης και βιομάζας για το χρονικό σημείο στο οποίο σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης. Επίσης, αναφέρεται η αρχική και η τελική συγκέντρωση των σακχάρων, καθώς και οι συντελεστές απόδοσης της αιθανόλης και της βιομάζας της συγκεκριμένης ζύμωσης.



Διάγραμμα 15: Κινητική παραγωγής αιθανόλης και κατανάλωσης ολικών σακχάρων από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 212.8 g/L για την πρώτη ζύμωση και 214.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Πιν. 14 Τιμές δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους, με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L.

Ζύμωση	S_0	Χρόνος (h)	X (g/L)	EtOH (g/L)	S_f	$Y_{X/S}$	$Y_{EtOH/S}$
A΄a	212.8	384	2.66	103.12	3.8	0.013	0.50
A΄b	212.8	432	2.86	99.48	3.8	0.013	0.47
B΄a	214.6	384	2.74	103.00	3.4	0.013	0.50

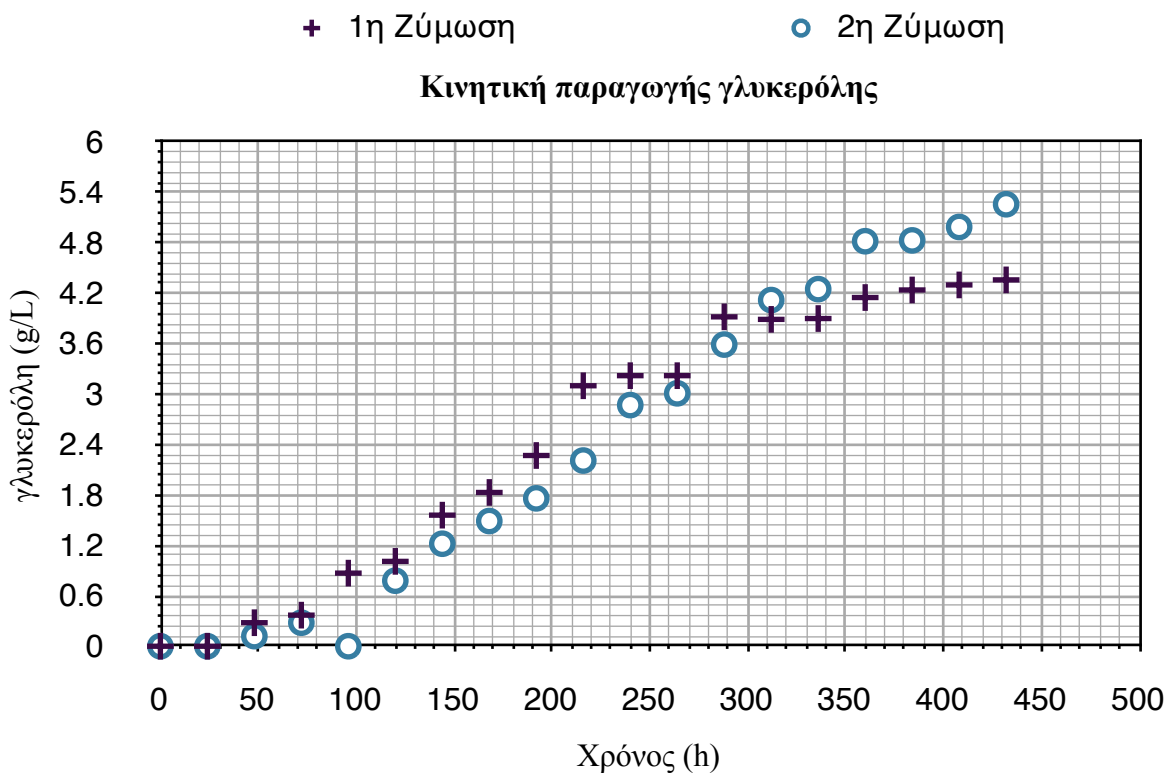
Πιν. 14 Τιμές δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους, με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L.							
Ζύμωση	**S_0**	**Χρόνος (h)**	**X (g/L)**	**EtOH (g/L)**	**S_f**	**$Y_{X/S}$**	**$Y_{EtOH/S}$**
B´b	214.6	432	2.78	100.51	3.4	0.013	0.47

Όπου S_0: η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (g/L), S_f: η τελική συγκέντρωση των σακχάρων (g/L), X: η συγκέντρωση της βιομάζας (g/L), EtOH: η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), $Y_{EtOH/S}$: συντελεστής απόδοσης αιθανόλης (g/g), $Y_{X/S}$: συντελεστής απόδοσης βιομάζας (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε εν ηρεμία κωνικές φιάλες των 2 L, T=18 ^{o}C, pH = 3.3, συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά εμβόλια.
a: Σημείο μέγιστης παραγωγής αιθανόλης
b: Σημείο μέγιστης παραγωγής βιομάζας

Εκτός των ανωτέρω, μελετήθηκε και η ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει γλυκερόλη. Η γλυκερόλη βιοσυντίθεται, όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα, κατά τη διάρκεια της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης και θεωρείται δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης.

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η μέγιστη παραγωγή γλυκερόλης παρατηρήθηκε στις 482 ώρες και στις δύο περιπτώσεις. Για την πρώτη ζύμωση, η μέγιστη τιμή ήταν 4.36 g/L , ενώ για τη δεύτερη ήταν 5.26 g/L αντίστοιχα. Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής γλυκερόλης και για τις δύο ζυμώσεις που έλαβαν χώρα υπό αυτές τις συνθήκες.



Διάγραμμα 16: Κινητική παραγωγής γλυκερόλης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 212.8 g/L για την πρώτη ζύμωση και 214.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

3.3.2 Παραγωγή λιπιδίων

Τα λιπαρά οξέα που παρήχθησαν στη συγκεκριμένη ζύμωση ήταν τα ίδια με αυτά των προηγουμένων. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι τιμές των λιπιδίων που παρήχθησαν (g/L), καθώς και οι αποδόσεις λιπιδίων επί ξηρού βάρους (g/g) του μικροοργανισμού, όπως λήφθηκαν ύστερα από ανάλυση ορισμένων δειγμάτων.

Πιν. 15 Τιμές λιπιδίων που παρήχθησαν από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξηση του σε μέσο με 2 g/L φαινολικών ουσιών και αποδόσεις τους επί ξηρού βάρους

Ζύμωση	24 h	96 h	216 h	312 h	360 h	432 h
1η Ζύμωση (g/L)	0	0.02	0.12	0.16	0.08	0.04
$Y_{L/X}$ (g/g)	0	0.01	0.04	0.05	0.02	0.01

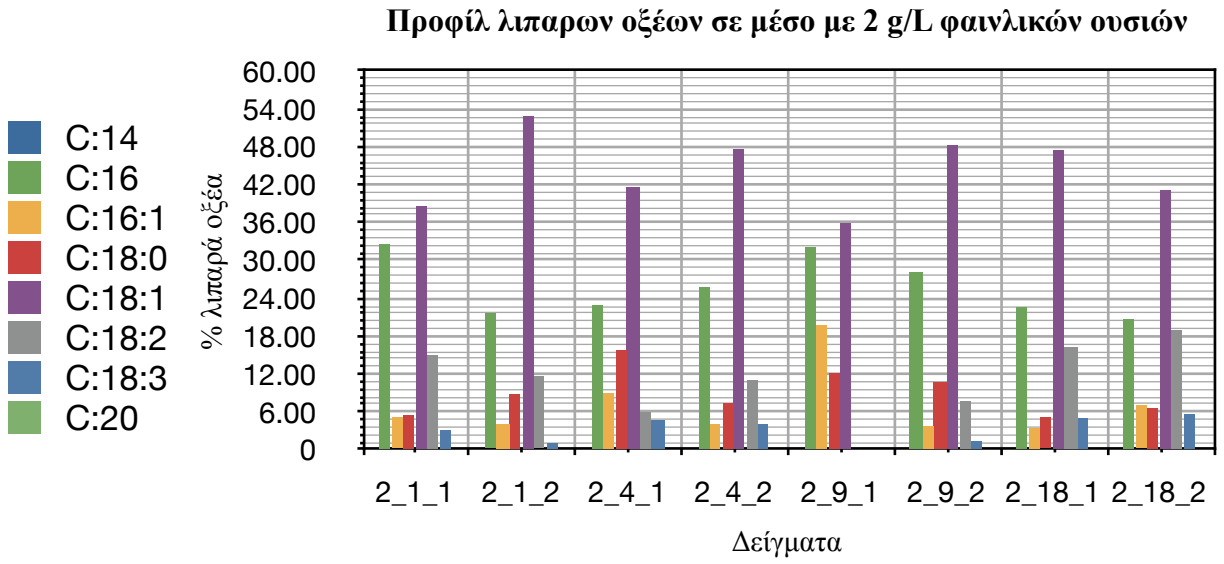
Πιν. 15 Τιμές λιπιδίων που παρήχθησαν από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξηση του σε μέσο με 2 g/L φαινολικών ουσιών και αποδόσεις τους επί ξηρού βάρους						
2η Ζύμωση (g/L)	0	0.04	0.14	0.08	0.06	0.06
$Y_{L/X}$ (g/g)	0	0.02	0.05	0.02	0.02	0.02

Όπου $Y_{L/X}$: η απόδοση λιπιδίων επί ξηρού βάρους (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε εν ηρεμία κωνικές φιάλες των 2 L, T=18 ^{o}C, pH = 3.3. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά εμβόλια.

Από τον προηγούμενο πίνακα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσία ή όχι φαινολικών παραγώγων στο μέσο επηρεάζει σε κάποιο βαθμό την παραγωγή λιπιδίων. Το συμπέρασμα αυτό απορρέει από τη σύγκρισή των αποδόσεων λιπιδίων επί ξηρού βάρους της συγκεκριμένης ζύμωσης και της πρώτης.

Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η % παραγωγή λιπιδίων, όπως αυτή προσδιορίστηκε μετά από την ανάλυση των δειγμάτων με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC).

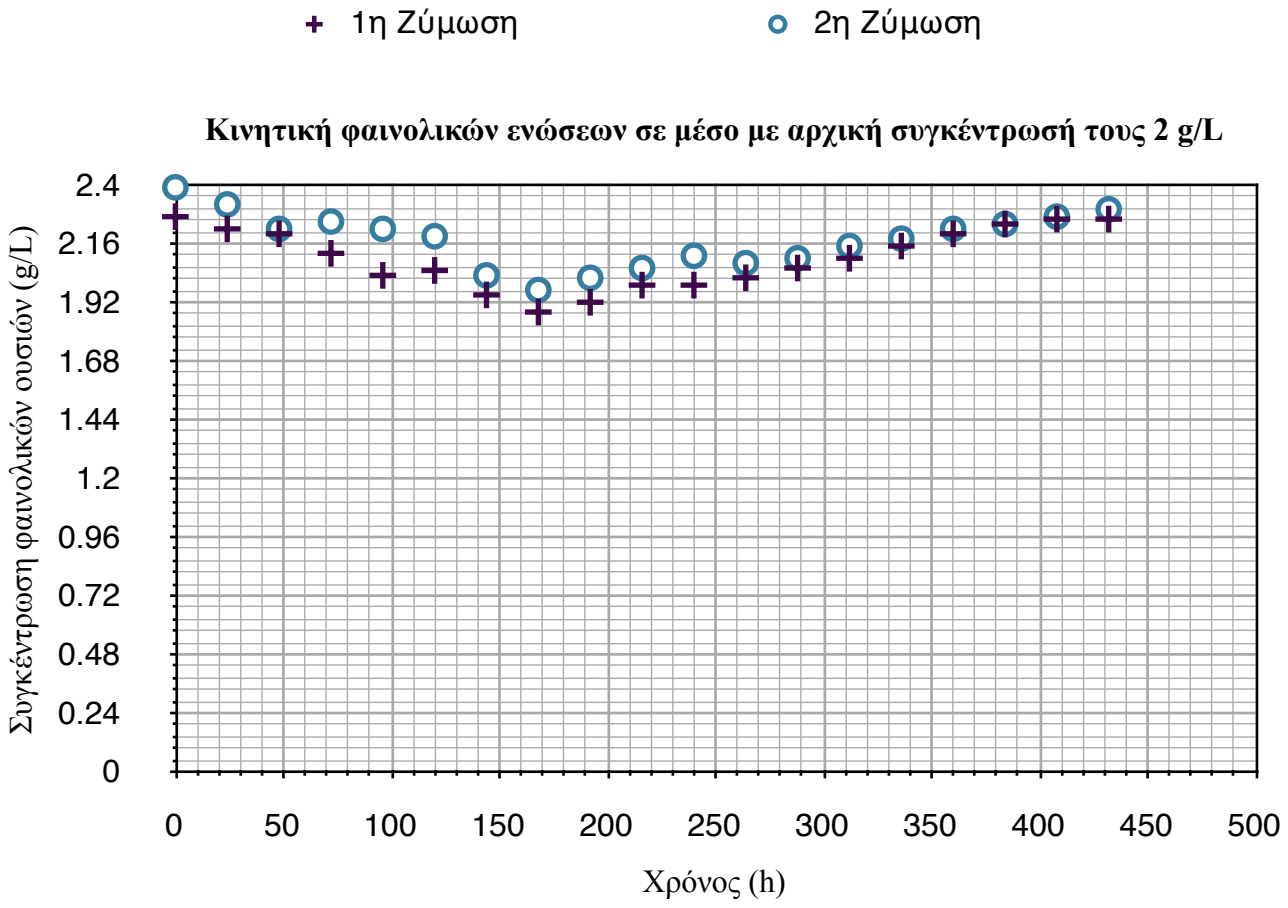


Διάγραμμα 17: Προφίλ λιπαρών οξέων του μικροοργανισμού Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 212.8 g/L για την πρώτη ζύμωση και 214.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3. Όπου:

- **2_1_1: 1η ζύμωση 24 ώρες**
- **2_1_2: 2η ζύμωση 24 ώρες**
- **2_4_1: 1η ζύμωση 96 ώρες**
- **2_4_2: 2η ζύμωση 96 ώρες**
- **2_9_1: 1η ζύμωση 216 ώρες**
- **2_9_2: 2η ζύμωση 216 ώρες**
- **2_18_1: 1η ζύμωση 432 ώρες**
- **2_18_2: 2η ζύμωση 432 ώρες**

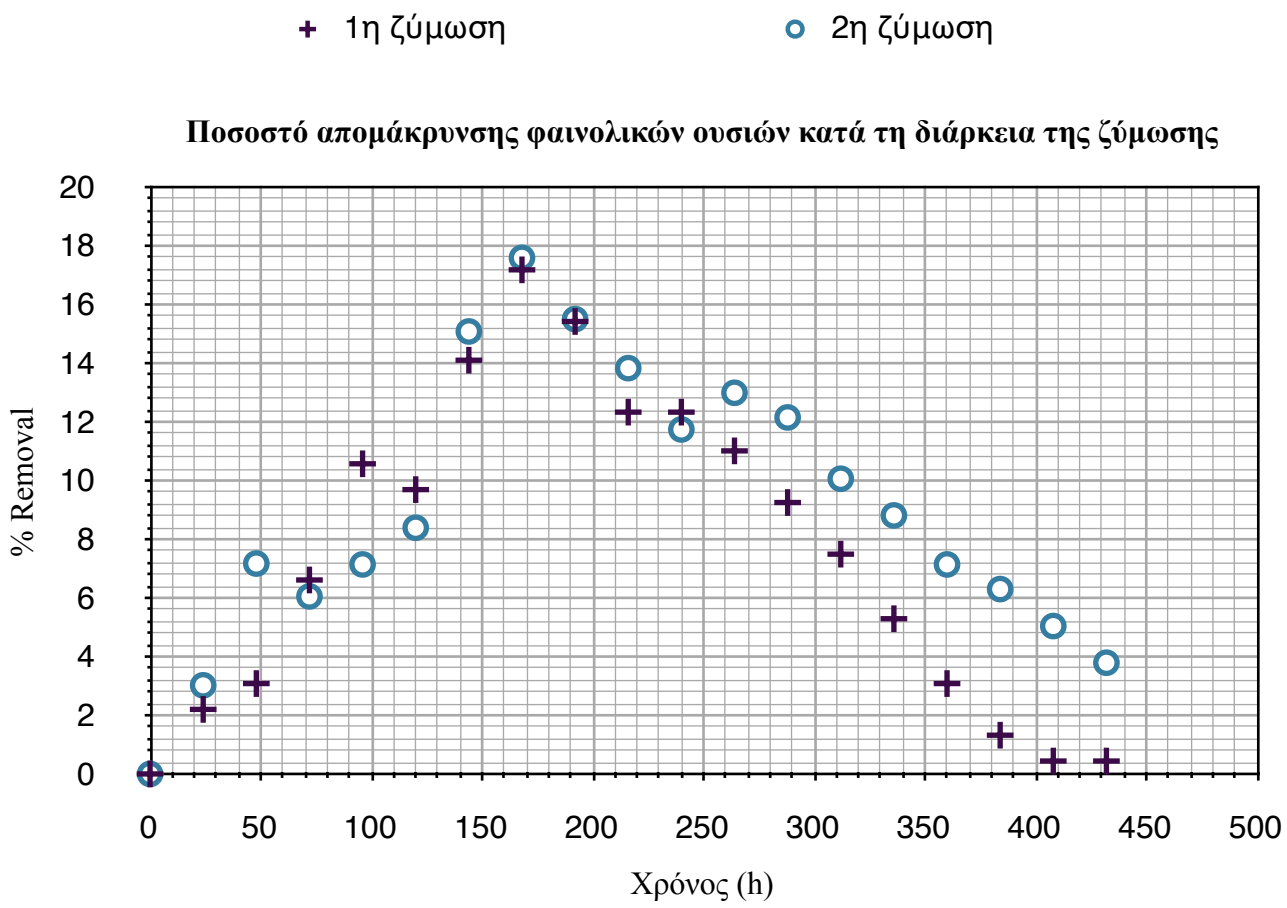
3.3.3 Διακύμανση φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης

Η τελευταία ανάλυση που πραγματοποιήθηκε ήταν ο προσδιορισμός της διακύμανσης των φαινολικών ενώσεων που είχαν προστεθεί από την αρχή της ζύμωσης. Ο εν λόγω προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου Folin - Ciocalteau, όπως αυτή περιγράφει στην ενότητα των αναλυτικών μεθόδων. Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζεται η διακύμανση αυτή.



Διάγραμμα 18: Κινητική απορρόφησης φαινολικών ουσιών από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 212.8 g/L για την πρώτη ζύμωση και 214.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Όπως είναι εμφανές από το ανωτέρω γράφημα, οι φαινολικές ουσίες που είχαν προστεθεί στην αρχή της ζύμωσης, παρουσιάζουν μείωση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και επαναφορά στην αρχική τους τιμή κατά το τέλος της. Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό απομάκρυνσης των φαινολικών ουσιών που παρατηρήθηκε κατά την αυτή ζύμωση.

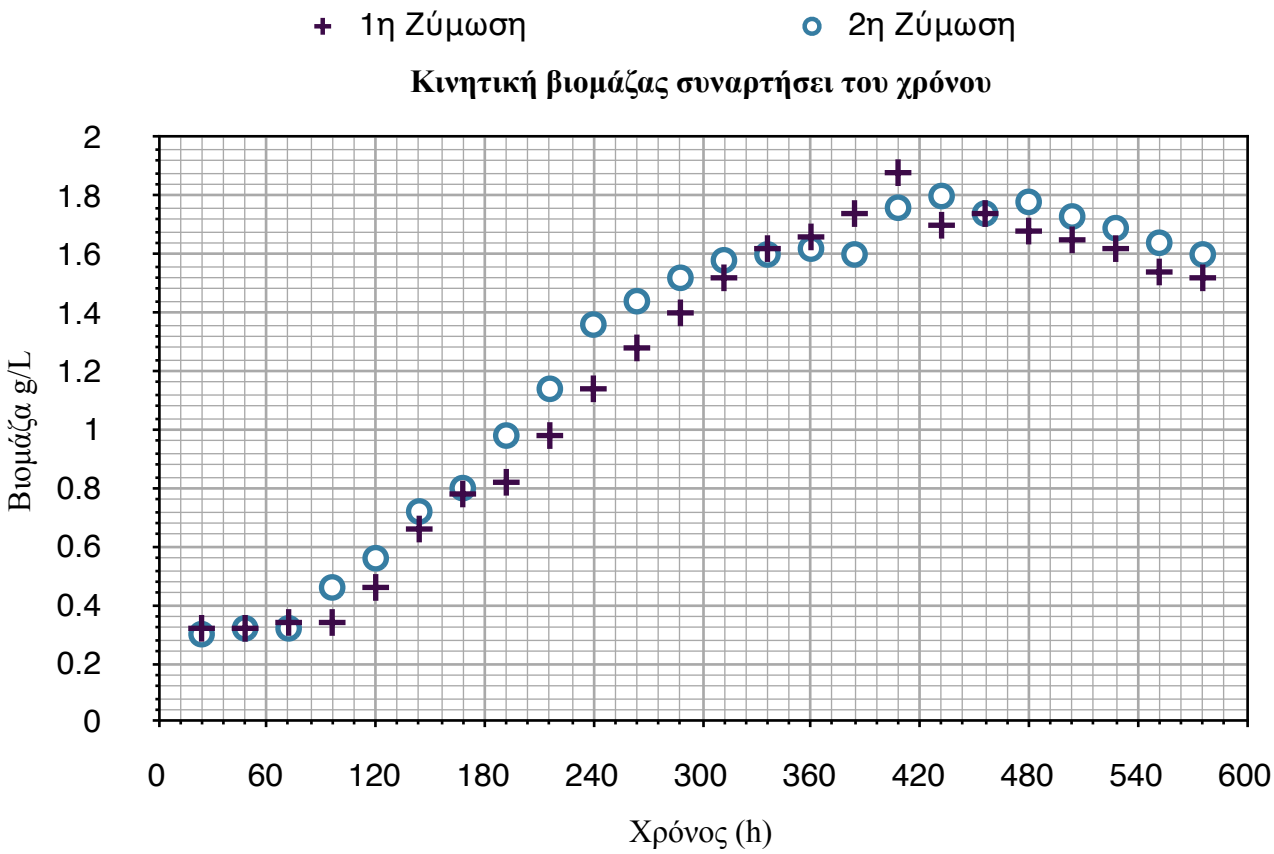


Διάγραμμα 19: Ποσοστό απομάκρυνσης φαινολικών ουσιών από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 212.8 g/L για την πρώτη ζύμωση και 214.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

3.4 Αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L

Η επόμενη σειρά ζυμώσεων περιελάμβανε αύξηση του μικροοργανισμού σε μέσο με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων 3 g/L. Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν της τάξης των 206.48 g/L για την πρώτη ζύμωση και 210.52 g/L για τη δεύτερη. Το pH ρυθμίστηκε στο 3.3 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας NaOH 1N.

Τα φαινολικά παράγωγα, προτού προστεθούν στο μέσο καλλιέργειας διαλύθηκαν σε 1 ml αιθανόλη 70%. Έπειτα, προστέθηκαν στο μέσο και προτού πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός με το επιλεγμένο στέλεχος, αφέθηκαν υπό ανάδευση για μια νύχτα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ευκολότερη διάλυση των ουσιών, μιας και είναι σχεδόν αδιάλυτες στο νερό. Την επόμενη ημέρα, και ενώ οι ουσίες είχαν διαλυθεί πλήρως, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού υπό ασηπτικές συνθήκες. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η κινητική της βιομάζας κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης υπό αυτές τις συνθήκες.

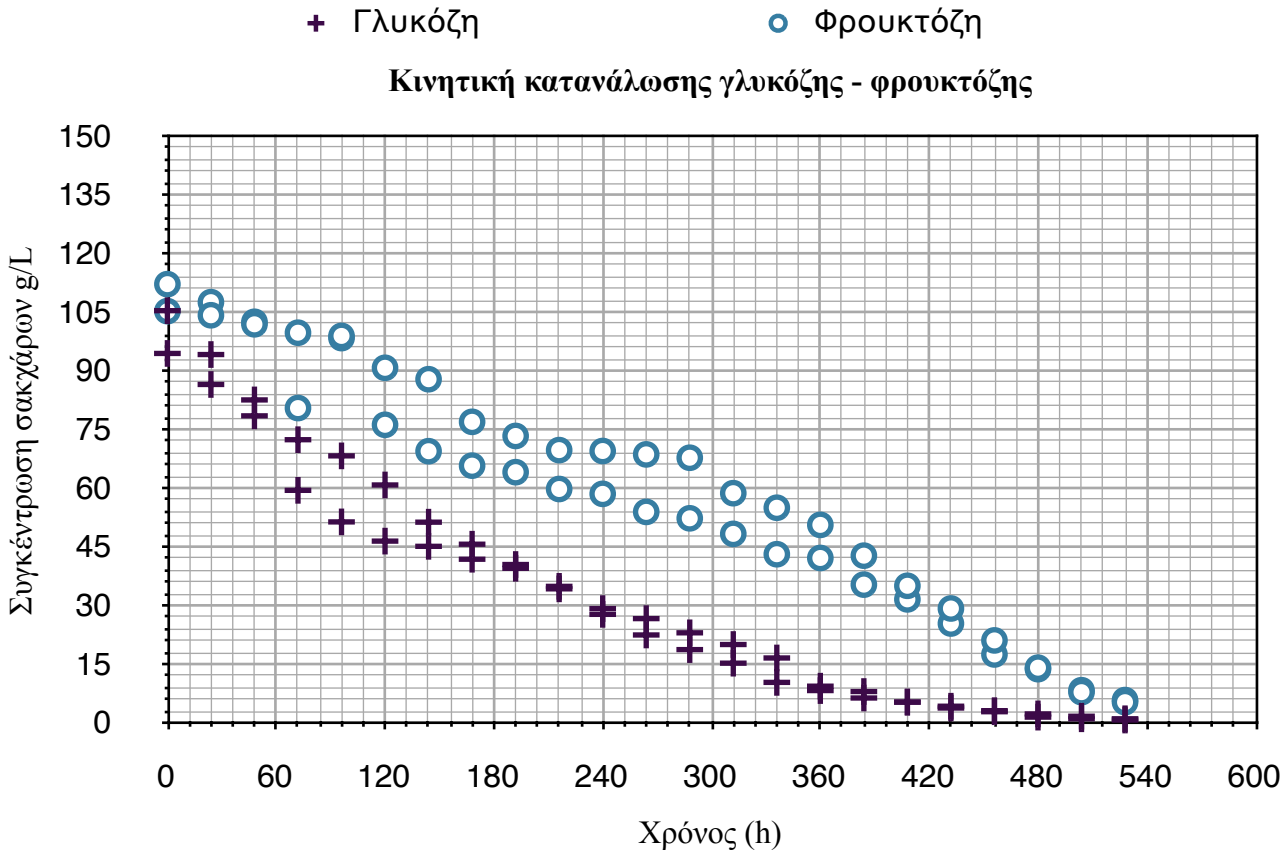


Διάγραμμα 20: Κινητική παραγωγής βιομάζας του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 206.4 g/L για την πρώτη ζύμωση και 210.5 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε στις 528 ώρες από την έναρξή της και για τις δύο περιπτώσεις. Ωστόσο, ο μικροοργανισμός παρουσίασε δυσκολία όσον αφορά τον εγκλιματισμό του στο μέσο, μιας και η διάρκεια της ζύμωσης, συγκρινόμενη με τις προηγούμενες ήταν μεγαλύτερη.

3.4.1 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης

Η τελική συγκέντρωση των σακχάρων για τη συγκεκριμένη ζύμωση ήταν 6.48 g/L για την πρώτη ζύμωση και 6.26 g/L για τη δεύτερη. Οι τιμές αυτές είναι σχεδόν διπλάσιες της προηγούμενης ζύμωσης, κάτι το οποίο καταδεικνύει τη δυσκολία εγκλιματισμού του στελέχους στο συγκεκριμένο μέσο, καθώς και τη δυσκολία ολοκλήρωσης της αλκοολικής ζύμωσης με τιμές σακχάρων μικρότερες των 5 g/L. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η κινητική της κατανάλωσης υποστρώματος από το μικροοργανισμό.

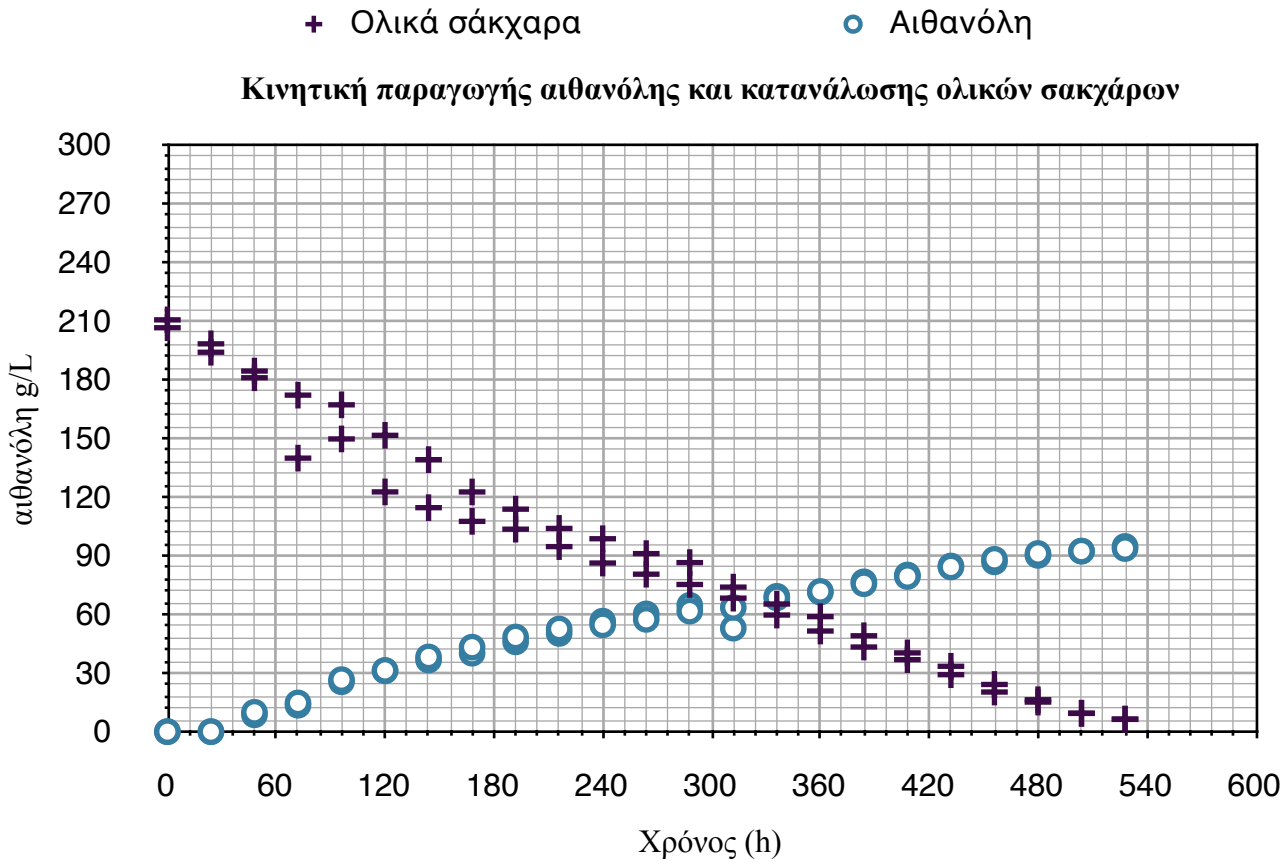


Διάγραμμα 21: Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 206.4 g/L για την πρώτη ζύμωση και 210.5 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αυξανόμενη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών και πιο συγκεκριμένα φαινολικών οξέων επηρεάζει αρνητικά τον χρόνο ολοκλήρωσης της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς και την ικανότητα των ζυμών να αποικοδομούν τα σάκχαρα πλήρως.

Η αιθανόλη που παρήχθη ήταν κατά πολύ μικρότερη αυτής της προηγούμενης ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή της, και για τις δύο ζυμώσεις της σειράς, παρατηρήθηκε στις 528 ώρες και ήταν 94.7 g/L για την πρώτη και 93.6 g/L για τη δεύτερη. Οι συντελεστές απόδοσης της αιθανόλης ήταν 0.47 g/g για την πρώτη ζύμωση και 0.45 g/g για τη δεύτερη. Στη ζύμωση αυτή δεν παρατηρήθηκε ανακατανάλωση αιθανόλης, κάτι το οποίο είχε παρατηρηθεί στις προηγούμενες σειρές. Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής αιθανόλης και κατανάλωσης ολικών σακχάρων,

ενώ στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές της μέγιστης παραγόμενης αιθανόλης και βιομάζας για το χρονικό σημείο στο οποίο σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης. Επίσης, αναφέρεται η αρχική και η τελική συγκέντρωση των σακχάρων, καθώς και οι συντελεστές απόδοσης της αιθανόλης και της βιομάζας της συγκεκριμένης ζύμωσης.



Διάγραμμα 22: Κινητική παραγωγής αιθανόλης και κατανάλωσης ολικών σακχάρων από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 206.4 g/L για την πρώτη ζύμωση και 210.5 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Πιν. 16 Τιμές δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους, με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L.

Ζύμωση	S_0	Χρόνος (h)	X (g/L)	EtOH (g/L)	S_f	$Y_{X/S}$	$Y_{EtOH/S}$
A΄a	206.4	528	1.78	94.7	6.4	0.008	0.47
A΄b	206.4	504	1.82	92.3	6.4	0.009	0.46

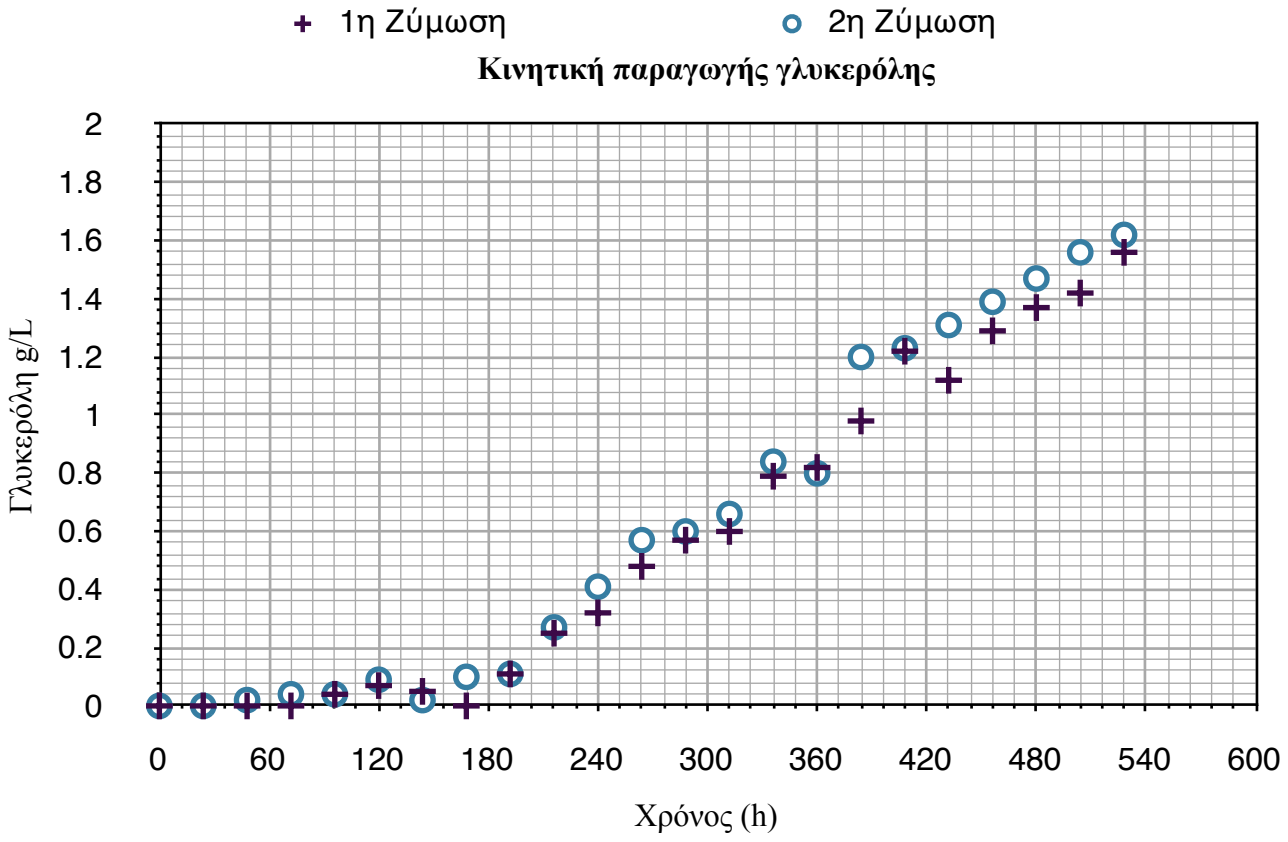
Πιν. 16 Τιμές δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους, με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L.							
Ζύμωση	**S_0**	**Χρόνος (h)**	**X (g/L)**	**EtOH (g/L)**	**S_f**	**$Y_{X/S}$**	**$Y_{EtOH/S}$**
B΄a	210.5	528	1.71	93.6	6.2	0.008	0.45
B΄b	210.5	480	1.82	91.1	6.2	0.009	0.46

Όπου S_0: η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (g/L), S_f: η τελική συγκέντρωση των σακχάρων (g/L), X: η συγκέντρωση της βιομάζας (g/L), EtOH: η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), $Y_{EtOH/S}$: συντελεστής απόδοσης αιθανόλης (g/g), $Y_{X/S}$: συντελεστής απόδοσης βιομάζας (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε εν ηρεμία κωνικές φιάλες των 2 L, T=18 ^{o}C, pH = 3.3, συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά εμβόλια.
a: Σημείο μέγιστης παραγωγής αιθανόλης
b: Σημείο μέγιστης παραγωγής βιομάζας

Όπως είναι εμφανές από τα ανωτέρω στοιχεία, η παρατηρούμενη μείωση της αιθανόλης είναι αρκετά μεγάλη, συγκρινόμενη με τις προηγούμενες ζυμώσεις. Το ίδιο μπορούμε να πούμε και για τη βιομάζα που παρήχθη, καθώς και αυτή είναι κατά πολύ μικρότερη αυτής που παρήχθη σε προηγούμενες ζυμώσεις.

Εκτός από τη βιομάζα και την αιθανόλη, παρατηρήθηκε μείωση και στην παραγωγή γλυκερόλης από το μικροοργανισμό. Η μέγιστη συγκέντρωση της γλυκερόλης στο μέσο ήταν 1.56 g/L για την πρώτη ζύμωση και 1.62 g/L για τη δεύτερη. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά μικρότερες από αυτές που παρατηρήθηκαν στις προηγούμενες ζυμώσεις, γεγονός το οποίο είναι αρκετά πιθανό να οφείλεται στην αυξανόμενη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών στο μέσο. Στο γράφημα που ακολουθεί παρατίθεται η κινητική παραγωγής γλυκερόλης του μικροοργανισμού για την αυτή ζύμωση.



Διάγραμμα 23: Κινητική παραγωγής γλυκερόλης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 206.4 g/L για την πρώτη ζύμωση και 210.5 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

3.4.2 Παραγωγή λιπιδίων

Η αυξανόμενη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών δεν φάνηκε να επηρεάζει την παραγωγή λιπαρών οξέων, εν αντιθέσει με τους υπόλοιπους μεταβολίτες του μικροοργανισμού. Στον κάτωθι πίνακα παρουσιάζεται η ποσότητα των λιπαρών οξέων που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Πιν. 17 Τιμές λιπιδίων που παρήχθησαν από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξηση του σε μέσο με 3 g/L φαινολικών ουσιών και αποδόσεις τους επί ξηρού βάρους

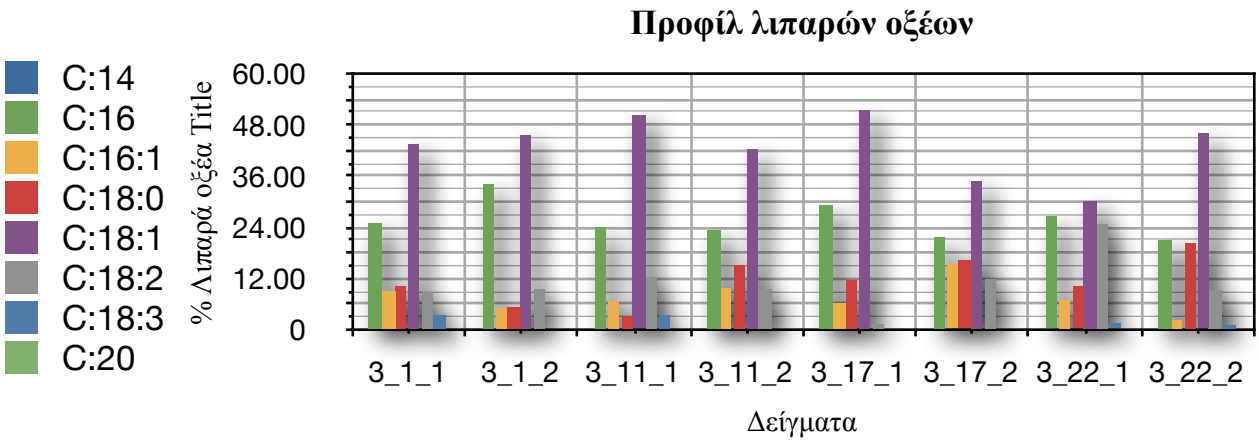
Ζύμωση	24 h	168 h	216 h	264 h	312 h	408 h	456 h	528 h
1η Ζύμωση (g/L)	0	0.10	0.18	0	0.10	0	0.02	0
$Y_{L/X}$ (g/g)	0	0.06	0.10	0	0.05	0	0.01	0

Πιν. 17 Τιμές λιπιδίων που παρήχθησαν από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξηση του σε μέσο με 3 g/L φαινολικών ουσιών και αποδόσεις τους επί ξηρού βάρους								
2η Ζύμωση (g/L)	0	0.12	0.10	0	0.06	0	0.22	0
$Y_{L/X}$ (g/g)	0	0.08	0.06	0	0.03	0	0.13	0

Όπου $Y_{L/X}$: η απόδοση λιπιδίων επί ξηρού βάρους (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε εν ηρεμία κωνικές φιάλες των 2 L, T=18 ^{o}C, pH = 3.3. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά εμβόλια

Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται το προφίλ των λιπαρών οξέων που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, όπως αυτό λήφθηκε μετά από ανάλυση συγκεκριμένων δειγμάτων με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC).



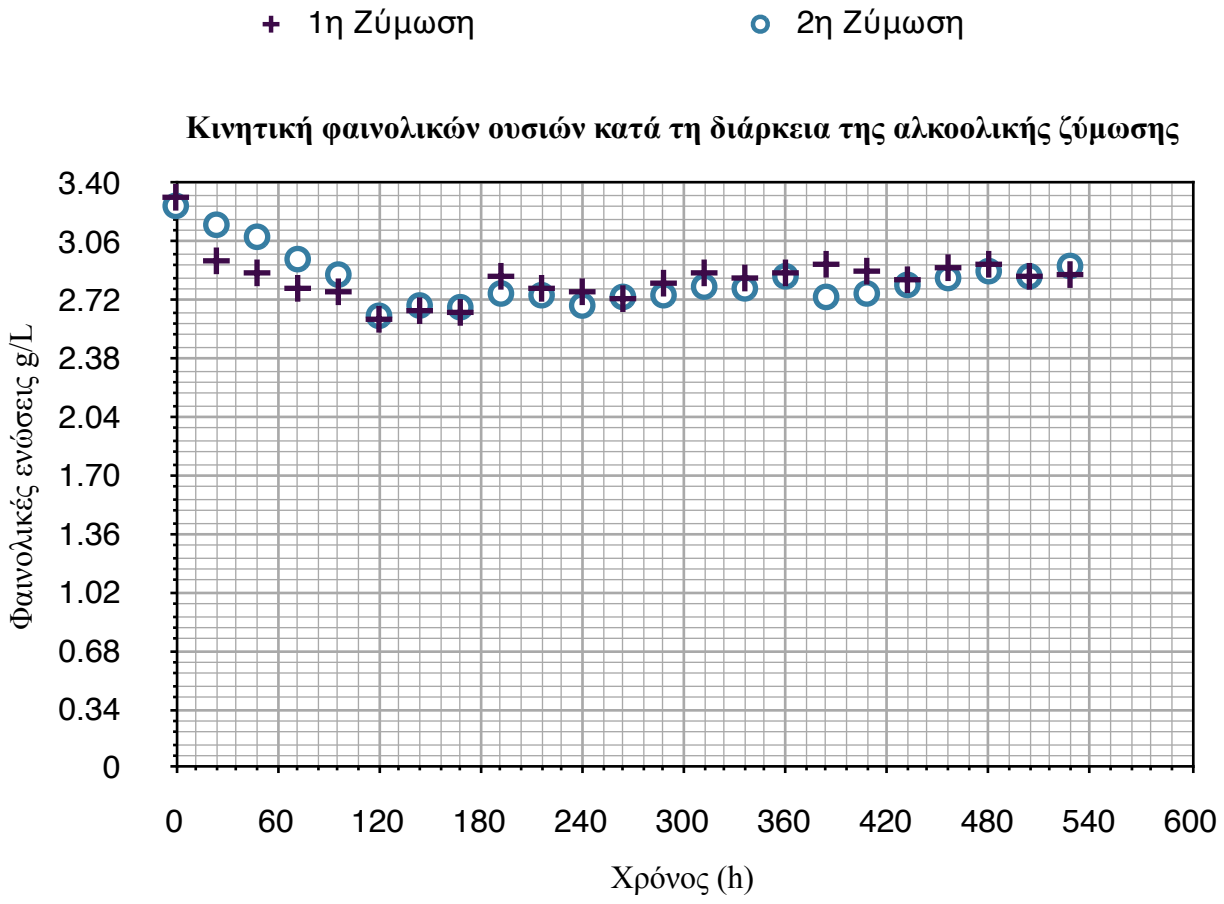
Διάγραμμα 24: Προφίλ λιπαρών οξέων του μικροοργανισμού Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 206.4 g/L για την πρώτη ζύμωση και 210.5 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3. Όπου:

- **3_1_1: 1η ζύμωση 24 ώρες**
- **3_1_2: 2η ζύμωση 24 ώρες**
- **3_11_1: 1η ζύμωση 264 ώρες**
- **3_11_2: 2η ζύμωση 264 ώρες**
- **3_17_1: 1η ζύμωση 408 ώρες**
- **3_17_2: 2η ζύμωση 408 ώρες**
- **3_22_1: 1η ζύμωση 528 ώρες**
- **3_22_2: 2η ζύμωση 528 ώρες**

Όπως φαίνεται από το ανωτέρω γράφημα, η παραγωγή λιπαρών οξέων για την αυτή ζύμωση, δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από τις προηγούμενες. Έτσι, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η παρουσία ή όχι φαινολικών ενώσεων δεν έχει πρακτικά καμία επίπτωση επί του λίπους που παράγεται από το μικροοργανισμό στα πλαίσια της αλκοολικής ζύμωσης.

3.4.3 Κινητική φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης

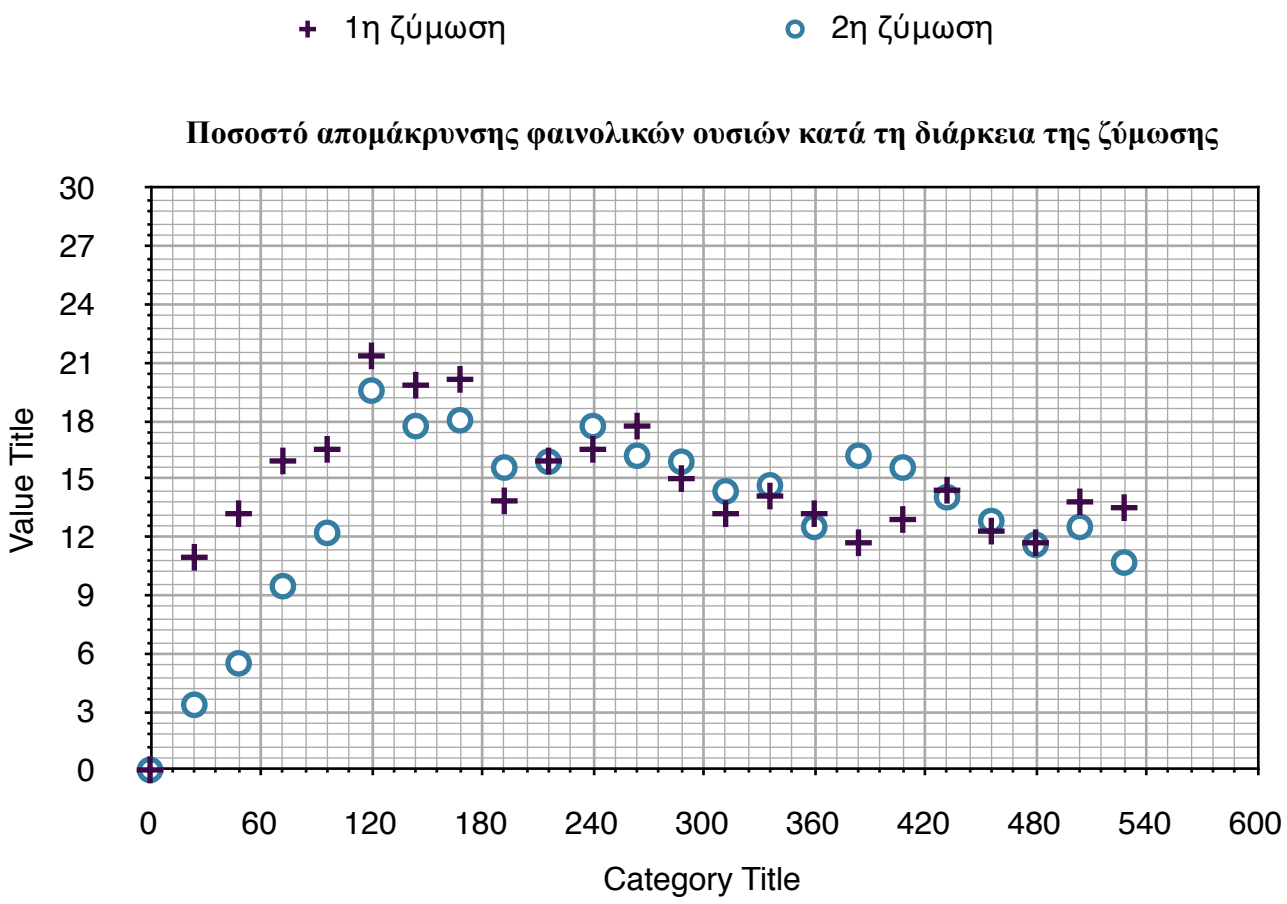
Οι φαινολικές ενώσεις που είχαν προστεθεί στο μέσο, παρουσιάζουν πτωτική πορεία κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, όπως και στις προηγούμενες ζυμώσεις. Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η διακύμανσή τους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.



Διάγραμμα 25: Κινητική απορρόφησης φαινολικών ουσιών από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 206.4 g/L για την πρώτη ζύμωση και 210.5 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Όπως φαίνεται από το ανωτέρω γράφημα, τα φαινολικά παράγωγα που προστέθηκαν στο μέσο στην αρχή της ζύμωσης, παρουσιάζουν μια πτωτική πορεία. Η μείωση αυτή είναι πιθανόν να οφείλεται σε προσρόφηση ή προσκόλληση των φαινολικών παραγώγων στην κυτταρική μεμβράνη του μικροοργανισμού, καθώς εισέρχονται τα σάκχαρα στο κυτοσόλιο για την αποικοδόμησή τους.

Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό απομάκρυνσης των φαινολικών ουσιών από τον ζυμομύκητα, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.



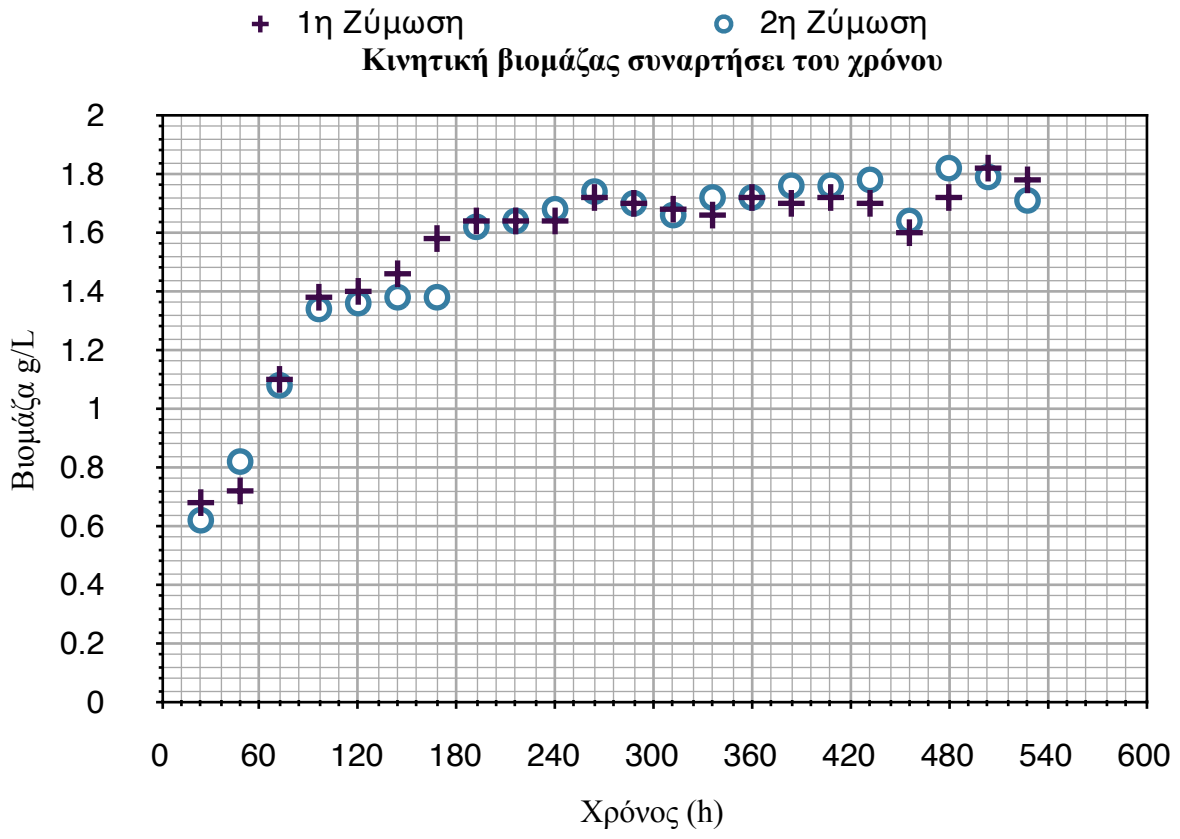
Διάγραμμα 26: Ποσοστό απομάκρυνσης φαινολικών ουσιών από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 206.4 g/L για την πρώτη ζύμωση και 210.5 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

3.5 Αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L

Η επόμενη σειρά ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε μέσο με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 213.38 g/L για την πρώτη ζύμωση και 215.69 g/L για τη δεύτερη. Το pH ρυθμίστηκε και σε αυτή την περίπτωση στο 3.3 με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας NaOH 1 N.

Οι φαινολικές ενώσεις, όπως και στις προηγούμενες ζυμώσεις, προτού προστεθούν στο μέσο καλλιέργειας διαλύθηκαν σε 1 ml αιθανόλη 70%. Έπειτα, προστέθηκαν στο μέσο και προτού πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός με το επιλεγμένο στέλεχος, αφέθηκαν υπό ανάδευση για μια νύχτα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ευκολότερη διάλυση των ουσιών, μιας και είναι σχεδόν αδιάλυτες στο νερό. Την επόμενη ημέρα, και ενώ οι ουσίες είχαν διαλυθεί πλήρως, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού στο μέσο υπό ασηπτικές συνθήκες.

Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε στις 576 ώρες από την έναρξή της. Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται η κινητική της βιομάζας του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

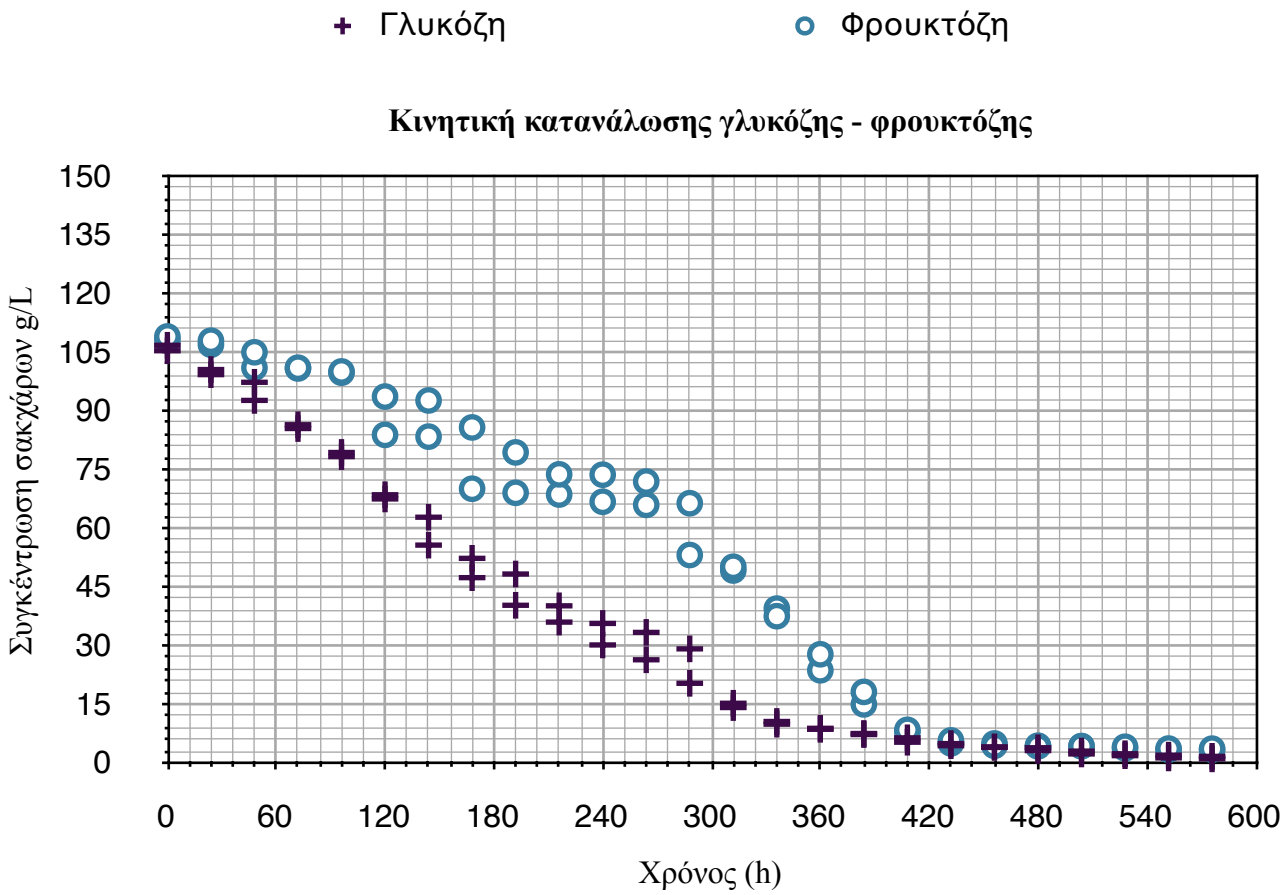


Διάγραμμα 27: Κινητική παραγωγής βιομάζας του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 213.38 g/L για την πρώτη ζύμωση και 215.69 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Όπως φαίνεται και από το ανωτέρω γράφημα, η αυξανόμενη συγκέντρωση φαινολικών παραγώγων στο μέσο, πέρα από μια κρίσιμη τιμή, επηρεάζει αρνητικά το χρόνο ολοκλήρωσης της αλκοολικής ζύμωσης από το ζυμομύκητα.

3.5.1 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης

Η τελική συγκέντρωση σακχάρων για τη συγκεκριμένη σειρά ζυμώσεων ήταν 4.96 g/L για την πρώτη και 4.62 g/L για τη δεύτερη. Αν και η τελική τους συγκέντρωση ήταν μικρότερη από την προηγούμενη ζύμωση, ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ο μικροοργανισμός παρουσίασε δυσκολία στον εγκλιματισμό του στο μέσο και στην ολοκλήρωση της ζύμωσης, κάτι το οποίο μπορεί να εξαχθεί από τη μεγάλη χρονική διάρκεια αποζύμωσης των σακχάρων. Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται η κινητική κατανάλωσης σακχάρων από το μικροοργανισμό.

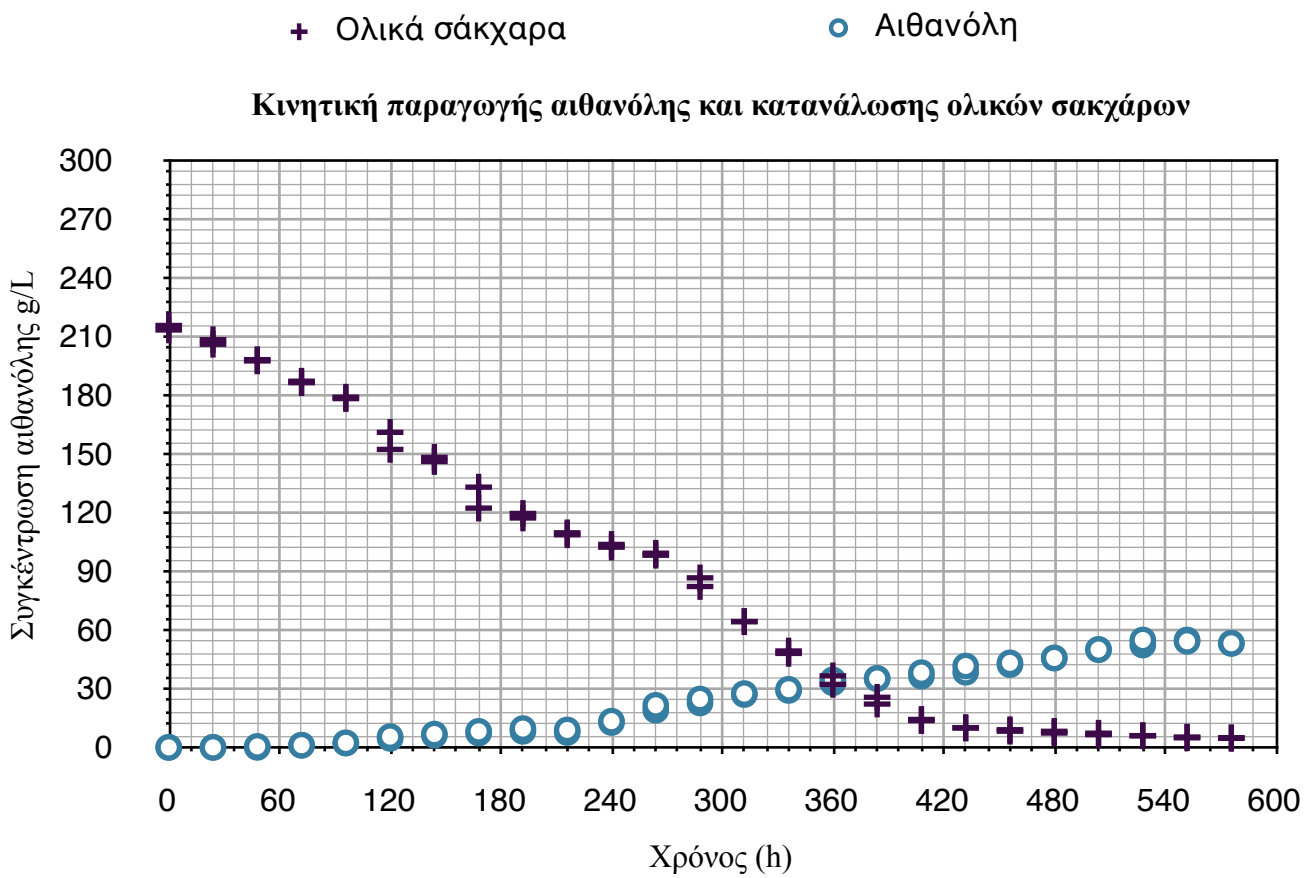


Διάγραμμα 28: Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 213.3 g/L για την πρώτη ζύμωση και 215.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Η παραγωγή της αιθανόλης παρουσιάζει κι αυτή πτώση. Η μέγιστη τιμή της ήταν 54.9 g/L και παρατηρήθηκε στις 522 ώρες ζύμωσης για την πρώτη περίπτωση, ενώ για τη δεύτερη ήταν επίσης 54.9 g/L και παρατηρήθηκε στις 528 ώρες. Οι συντελεστές απόδοσης ήταν 0.26 g/g για την πρώτη ζύμωση και 0.26 g/g για τη δεύτερη. Στη συγκεκριμένη ζύμωση παρατηρήθηκε

ανακατανάλωση αιθανόλης, όταν η συγκέντρωση των σακχάρων στο μέσο ήταν μικρότερη από 5 g/L.

Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής αιθανόλης και κατανάλωσης ολικών σακχάρων, ενώ στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές της μέγιστης παραγόμενης αιθανόλης και βιομάζας για το χρονικό σημείο στο οποίο σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης. Επίσης, αναφέρεται η αρχική και η τελική συγκέντρωση των σακχάρων, καθώς και οι συντελεστές απόδοσης της αιθανόλης και της βιομάζας της συγκεκριμένης ζύμωσης.



Διάγραμμα 29: Κινητική παραγωγής αιθανόλης και κατανάλωσης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 213.3 g/L για την πρώτη ζύμωση και 215.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Πιν. 18 Τιμές δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους, με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L.

Ζύμωση	S_0	Χρόνος (h)	X (g/L)	EtOH (g/L)	S_f	$Y_{X/S}$	$Y_{EtOH/S}$
A΄a	213.3	522	1.54	54.9	4.9	0.007	0.26
A΄b	213.3	408	1.88	36.4	4.9	0.009	0.18

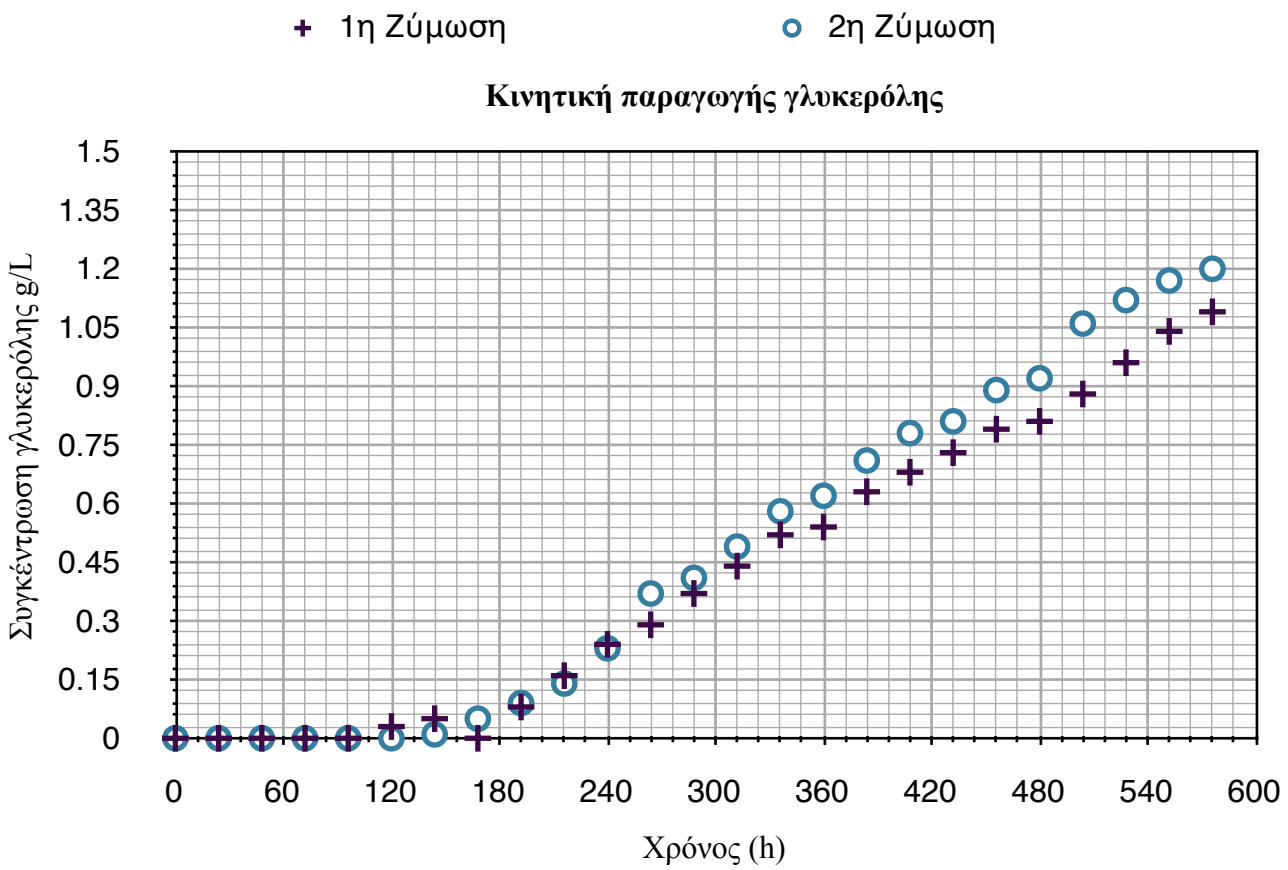
Πιν. 18 Τιμές δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους, με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L.							
Ζύμωση	**S_0**	**Χρόνος (h)**	**X (g/L)**	**EtOH (g/L)**	**S_f**	**$Y_{X/S}$**	**$Y_{EtOH/S}$**
B΄a	215.6	528	1.69	54.9	4.6	0.008	0.26
B΄b	215.6	432	1.80	41.6	4.6	0.008	0.20

Όπου S_0: η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (g/L), S_f: η τελική συγκέντρωση των σακχάρων (g/L), X: η συγκέντρωση της βιομάζας (g/L), EtOH: η συγκέντρωση της αιθανόλης (g/L), $Y_{EtOH/S}$: συντελεστής απόδοσης αιθανόλης (g/g), $Y_{X/S}$: συντελεστής απόδοσης βιομάζας (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε εν ηρεμία κωνικές φιάλες των 2 L, T=18 ^{o}C, pH = 3.3, συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά εμβόλια.
a: Σημείο μέγιστης παραγωγής αιθανόλης
b: Σημείο μέγιστης παραγωγής βιομάζας

Από τα ανωτέρω στοιχεία είναι εμφανής η αρνητική επίδραση της αυξανόμενης συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών, κυρίως των φαινολικών οξέων, στη φυσιολογία του μικροοργανισμού.

Όσον αφορά την παραγωγή γλυκερόλης, παρατηρείται επίσης μια αύξηση εν συγκρίσει με τις προηγούμενες ζυμώσεις. Η μεγαλύτερη τιμή της παρατηρήθηκε για τη μεν πρώτη ζύμωση στις 576 ώρες και ήταν 1.09 g/L, ενώ για τη δεύτερη στις 576 ώρες με τιμή 1.20 g/L. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η κινητική της για την περίπτωση αυτή.



Διάγραμμα 30: Κινητική παραγωγής γλυκερόλης από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 213.3 g/L για την πρώτη ζύμωση και 215.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

3.5.2 Παραγωγή λιπιδίων

Στη συγκεκριμένη ζύμωση, ο μικροοργανισμός δεν παρήγαγε σχεδόν καθόλου λιπαρά οξέα. Οι μετρήσεις που ελήφθησαν ήταν όλες μηδενικές. Στον κάτωθι πίνακα παρουσιάζονται τα σημεία στα οποία πραγματοποιήθηκε μέτρηση, καθώς επίσης και οι συντελεστές απόδοσης λιπιδίων επί ξηρού βάρους.

Πιν. 19 Τιμές λιπιδίων που παρήχθησαν από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξηση του σε μέσο με 5 g/L φαινολικών ουσιών και αποδόσεις τους επί ξηρού βάρους

Ζύμωση	24 h	96 h	168 h	216 h	312 h	360 h	456 h	576 h
1η Ζύμωση (g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0
$Y_{L/X}$ (g/g)	0	0	0	0	0	0	0	0

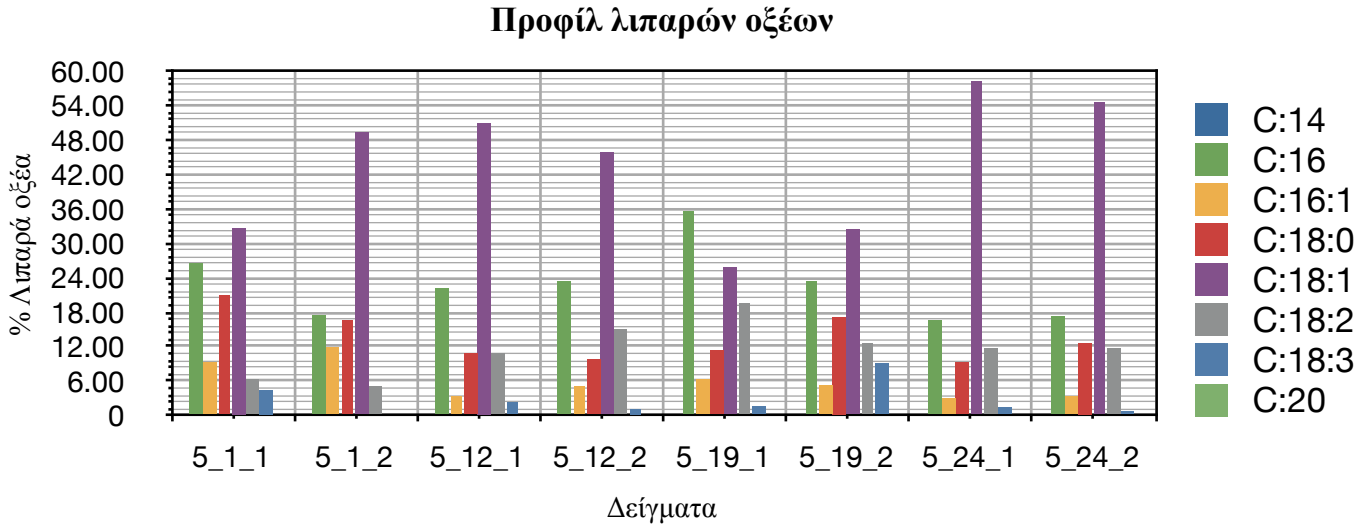
Πιν. 19 Τιμές λιπιδίων που παρήχθησαν από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατά την αύξηση του σε μέσο με 5 g/L φαινολικών ουσιών και αποδόσεις τους επί ξηρού βάρους								
2η Ζύμωση (g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0
$Y_{L/X}$ (g/g)	0	0	0	0	0	0	0	0

Όπου $Y_{L/X}$: η απόδοση λιπιδίων επί ξηρού βάρους (g/g).

Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε εν ηρεμία κωνικές φιάλες των 2 L, T=18 ^{o}C, pH = 3.3. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά εμβόλια

Από τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να ειπωθεί ότι η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, πέρα από μια κρίσιμη τιμή, επιδρά αρνητικά και στην παραγωγή λιπιδίων από το μικροοργανισμό.

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται το προφίλ των λιπαρών οξέων, όπως αυτά προέκυψαν μετά από ανάλυση ορισμένων δειγμάτων με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας.



Διάγραμμα 31: Προφίλ λιπαρών οξέων του μικροοργανισμού Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 213.3 g/L για την πρώτη ζύμωση και 215.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3. Όπου:

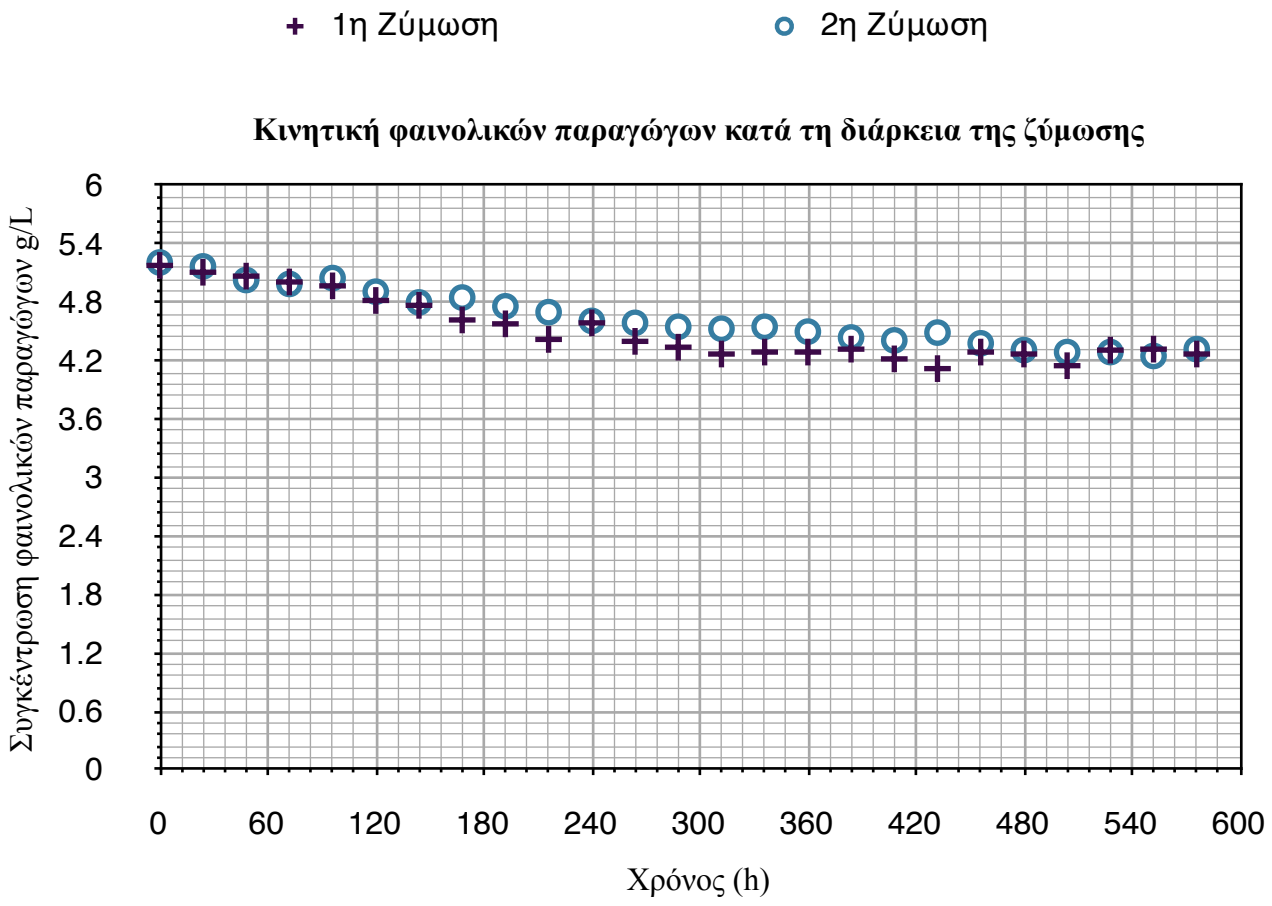
- **5_1_1: 1η ζύμωση 24 ώρες**
- **5_1_2: 2η ζύμωση 24 ώρες**
- **5_12_1: 1η ζύμωση 288 ώρες**
- **5_12_2: 2η ζύμωση 288 ώρες**
- **5_19_1: 1η ζύμωση 456 ώρες**
- **5_19_2: 2η ζύμωση 456 ώρες**
- **5_24_1: 1η ζύμωση 576 ώρες**
- **5_24_2: 2η ζύμωση 576 ώρες**

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω δεδομένα, η παραγωγή των λιπιδίων επηρεάστηκε και αυτή με τη σειρά της αρνητικά από τη συγκέντρωση των φαινολικών παραγώγων που προστέθηκαν στο

μέσο. Ωστόσο, αν και η παραγωγή τους επηρεάστηκε αρνητικά, μπορεί να διαπιστώσει κανείς ότι η σύνθεση του ολεϊκού οξέος από το μικροοργανισμό αυξήθηκε σημαντικά.

3.5.3 Διακύμανση φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης

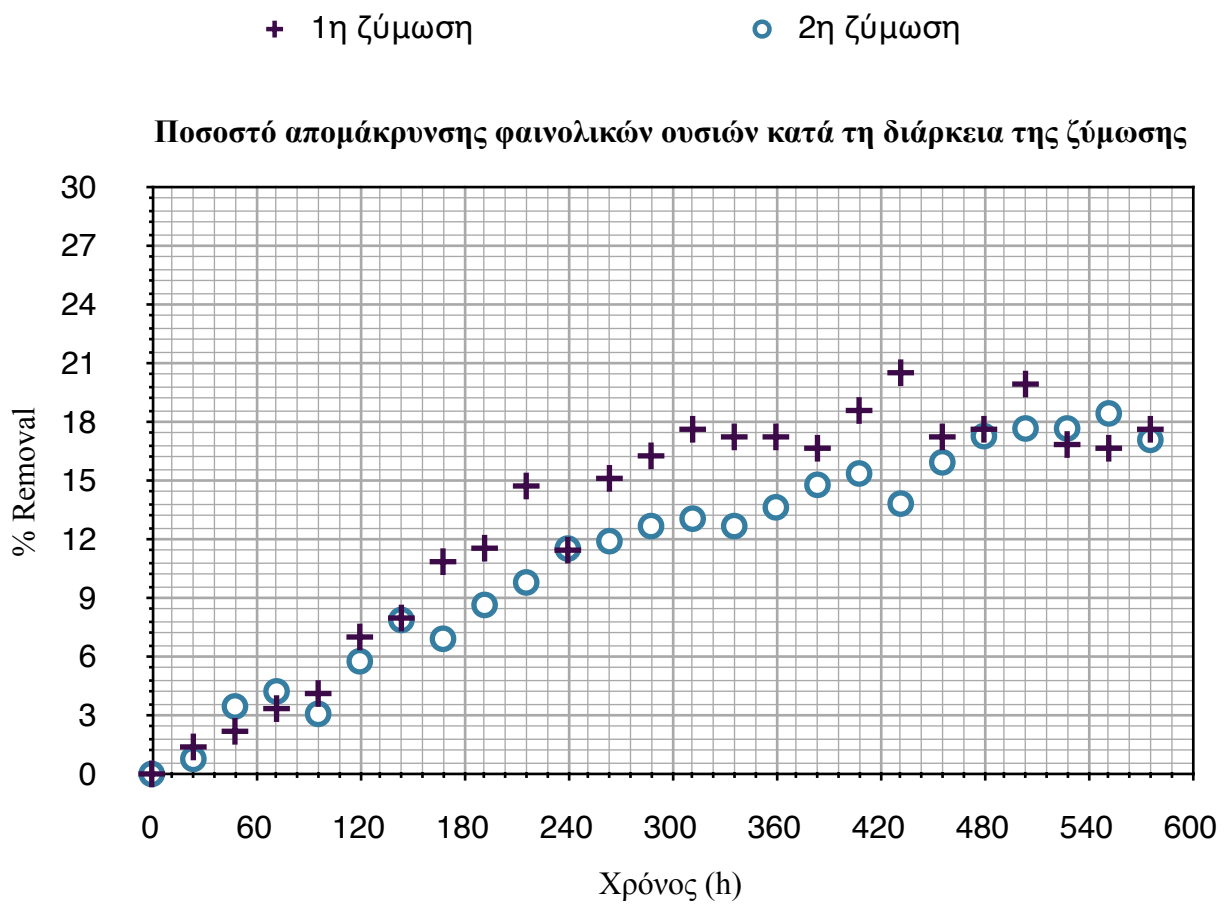
Τα φαινολικά παράγωγα που προστέθηκαν στην αρχή της ζύμωσης παρουσιάζουν πτωτική πορεία και σε αυτή την περίπτωση. Στο κάτωθι γράφημα παρουσιάζεται η διακύμανσή τους κατά την πορεία της ζύμωσης.



Διάγραμμα 32: Διακύμανση φαινολικών ουσιών από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 213.3 g/L για την πρώτη ζύμωση και 215.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

Όπως μπορεί να διαπιστώσει κανείς από το ανωτέρω γράφημα, η πορεία που ακολουθούν τα φαινολικά συστατικά κατά τη ζύμωση είναι πτωτική καθ' όλη τη διάρκειά της. Ωστόσο, μπορούμε να πούμε ότι η συγκέντρωσή τους τείνει να σταθεροποιηθεί γύρω από μια συγκεκριμένη τιμή, η οποία είναι περίπου τα 4.20 g/L.

Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται το ποσοστό απομάκρυνσης των φαινολικών ουσιών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.



Διάγραμμα 32: Ποσοστό απομάκρυνσης φαινολικών ουσιών από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά την αύξησή του σε κωνικές φιάλες των 2 L με συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 213.3 g/L για την πρώτη ζύμωση και 215.6 g/L για τη δεύτερη αντίστοιχα. Η T = 18 ^{o}C και το pH ρυθμίστηκε στο 3.3.

3.5.4 Συγκεντρωτικοί πίνακες αποτελεσμάτων

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται ορισμένα ενδεικτικά στοιχεία που ελήφθησαν απ' όλες τις ζυμώσεις, όσον αφορά τις τιμές της βιομάζας, των σακχάρων και της αιθανόλης στο σημείο μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας αντίστοιχα. Επίσης, στον δεύτερο πίνακα παρουσιάζεται το λίπος επί ξηρού βάρους για όλες τις συνθήκες, καθώς και οι αποδόσεις του.

Πιν. 20 Συγκεντρωτικός πίνακας τιμών δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους.

Ζύμωση	S_0	Χρόνος (h)	X (g/L)	EtOH (g/L)	S_f	$Y_{X/S}$	$Y_{EtOH/S}$
BS(1)a	200.8	360	2.5	92.8	6.4	0.01	0.49
BS(1)b	200.8	384	2.5	86.8	6.4	0.01	0.45
BS(2)a	208.4	480	2.6	92.5	5.9	0.01	0.45

Πιν. 20 Συγκεντρωτικός πίνακας τιμών δεδομένων στο χρονικό σημείο της μέγιστης παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας, κατά την αύξηση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5 σε κωνικές φιάλες των 2 L με θρεπτικό υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους.							
BS(2)b	208.4	384	2.8	83.7	5.9	0.01	0.42
PI1.5(1)a	208.6	480	3.18	102.67	3.62	0.015	0.50
PI1.5(1)b	208.6	456	3.30	102.39	3.62	0.016	0.50
PI1.5(2)a	204.3	504	2.82	100.98	5.2	0.014	0.50
PI1.5(2)b	204.3	408	3.06	96.61	5.2	0.018	0.50
PI2(1)a	212.8	384	2.66	103.12	3.8	0.013	0.50
PI2(1)b	212.8	432	2.86	99.48	3.8	0.013	0.47
PI2(2)a	214.6	384	2.74	103.00	3.4	0.013	0.50
PI2(2)b	214.6	432	2.78	100.51	3.4	0.013	0.47
PI3(1)a	206.4	528	1.78	94.7	6.4	0.008	0.47
PI3(1)b	206.4	504	1.82	92.3	6.4	0.009	0.46
PI3(2)a	210.5	528	1.71	93.6	6.2	0.008	0.45
PI3(2)b	210.5	480	1.82	91.1	6.2	0.009	0.46
PI5(1)a	213.3	522	1.54	54.9	4.9	0.007	0.26
PI5(1)b	213.3	408	1.88	36.4	4.9	0.009	0.18
PI5(2)a	215.6	528	1.69	54.9	4.6	0.008	0.26
PI5(2)b	215.6	432	1.80	41.6	4.6	0.008	0.20

Πιν. 21 Συγκεντρωτικός πίνακας παραγωγής λιπαρών οξέων και αποδόσεων αυτών, από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων									
Αρχική συγκέντρωση φαινολικών (g/L)	**Χρόνος (h)**	**C16:0**	**$^{\Delta 9}$C16:1**	**C18:0**	**$^{\Delta 9}$C18:1**	**$^{\Delta 9,12}$C18:2**	**$^{\Delta 9}$C16:1/ C16:0**	**$^{\Delta 9}$C18:1/ C18:0**	**$^{\Delta 9.12}$C18:2/ $^{\Delta 9}$C18:1**
0.00	24(1)	36.65	23.88	23.89	35.38	12.07	0.65	1.48	0.34
	24(2)	34.73	27.83	21.75	32.68	0.00	0.80	1.50	0.00
	216(1)	25.79	25.18	16.74	33.77	0.19	0.98	2.02	0.01
	216(2)	29.93	23.93	14.54	31.59	0.00	0.80	2.17	0.00
	264(1)	35.56	7.54	13.41	37.85	15.22	0.21	2.82	0.40
	480(1)	31.59	6.99	11.64	40.96	7.12	0.22	3.52	0.17
1.50	24(1)	23.62	7.63	8.70	52.08	5.49	0.32	5.99	0.11
	24(2)	28.91	5.48	8.00	51.53	0.00	0.19	6.44	0.00
	216(1)	22.15	8.05	11.37	46.26	14.87	0.36	4.07	0.32
	216(2)	25.08	6.34	12.66	47.48	11.44	0.25	3.75	0.24
	312(1)	23.04	5.37	11.77	42.84	15.11	0.23	3.64	0.35
	312(2)	28.20	5.53	12.73	44.95	7.01	0.20	3.53	0.16
	528(1)	26.56	8.10	11.25	45.64	5.47	0.31	4.06	0.12
	528(2)	25.61	5.71	10.63	52.14	9.91	0.22	4.90	0.19
2.00	24(1)	32.55	5.12	5.50	48.61	15.06	0.16	8.83	0.31
	24(2)	31.58	4.12	6.79	52.88	11.60	0.13	7.79	0.22
	96(1)	22.91	6.03	9.74	44.58	5.96	0.26	4.58	0.13
	96(2)	25.79	4.13	7.35	47.62	11.00	0.16	6.48	0.23
	216(1)	32.11	6.82	12.19	45.88	0.00	0.21	3.76	0.00
	216(2)	28.22	4.75	10.67	48.27	7.74	0.17	4.52	0.16
	432(1)	22.64	4.42	5.11	47.49	16.32	0.20	9.29	0.34
	432(2)	20.70	7.01	6.58	45.09	18.92	0.34	6.85	0.42
	24(1)	32.92	9.01	7.21	43.49	8.86	0.27	6.03	0.20
	24(2)	34.23	8.18	5.38	45.62	9.59	0.24	8.48	0.21
	264(1)	24.00	6.72	7.29	50.19	12.39	0.28	6.89	0.25

Πιν. 21 Συγκεντρωτικός πίνακας παραγωγής λιπαρών οξέων και αποδόσεων αυτών, από τον μικροοργανισμό Saccharomyces cerevisiae X5 κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων									
3.00	264(2)	23.35	8.74	9.13	48.26	9.51	0.37	5.29	0.20
	408(1)	29.14	6.34	11.69	51.51	1.32	0.22	4.41	0.03
	408(2)	25.72	9.30	11.22	48.84	11.93	0.36	4.35	0.24
	528(1)	26.53	6.93	10.14	44.17	24.76	0.26	4.36	0.56
	528(2)	21.00	4.32	11.41	45.97	9.26	0.21	4.03	0.20
5.00	24(1)	26.49	10.22	16.87	46.68	6.31	0.39	2.77	0.14
	24(2)	24.40	11.81	16.50	49.26	5.03	0.48	2.99	0.10
	288(1)	22.08	3.27	10.74	50.98	10.72	0.15	4.75	0.21
	288(2)	23.38	4.98	9.74	45.81	14.96	0.21	4.70	0.33
	456(1)	25.51	6.30	11.39	45.71	19.52	0.25	4.01	0.43
	456(2)	23.37	5.28	17.15	42.49	12.61	0.23	2.48	0.30
	576(1)	16.58	2.94	9.23	58.22	11.72	0.18	6.31	0.20
	576(2)	17.24	3.25	11.62	56.60	11.60	0.19	4.87	0.20

Όπου:
BS(1) - 1η ζύμωση, αρχική συγκέντρωση φαινολικών 0 g/L
BS(2) - 2η ζύμωση, αρχική συγκέντρωση φαινολικών 0 g/L
PI 1.5(1) - 1η ζύμωση, αρχική συγκέντρωση φαινολικών 1.5 g/L
PI 1.5(2) - 2η ζύμωση, αρχική συγκέντρωση φαινολικών 1.5 g/L
PI 2(1) - 1η ζύμωση, αρχική συγκέντρωση φαινολικών 2 g/L
PI 2(2) - 2η ζύμωση, αρχική συγκέντρωση φαινολικών 2 g/L
PI 3(1) - 1η ζύμωση, αρχική συγκέντρωση φαινολικών 3 g/L
PI 3(2) - 2η ζύμωση, αρχική συγκέντρωση φαινολικών 3 g/L
PI 5(1) - 1η ζύμωση, αρχική συγκέντρωση φαινολικών 5 g/L
PI 5(2) - 2η ζύμωση, αρχική συγκέντρωση φαινολικών 5 g/L
a - Σημείο μέγιστης παραγωγής αιθανόλης
b - Σημείο μέγιστης παραγωγής βιομάζας

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των φαινολικών ουσιών επί του μεταβολισμού του ζυμομύκητα, καθώς επίσης και η επίδραση του ζυμομύκητα επί των φαινολικών ουσιών, κατά την ανάπτυξή του σε συνθετικά γλεύκη, με συγκέντρωση σακχάρων 210 g/L περίπου. Επίσης, διερευνήθηκε η δυνατότητα παραγωγής αιθανόλης από τον μικροοργανισμό στις αυτές συνθήκες. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για την κάθε συνθήκη σε φιάλες εν ηρεμία και σε συνθήκες, οι οποίες να προσομοιάζουν με αυτές που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια μιας λευκής οινοποίησης (χαμηλό pH και θερμοκρασία ζύμωσης).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* X5 κατάφερε να αποζυμώσει το σύνολο των σακχάρων του μέσου σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν παρόλο που η συγκέντρωσή τους ήταν αρκετά υψηλή. Η βιομάζα που παρήχθη παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα, περί των 3.30 έως 3.00 g/L. Κάτι το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα άλλων μελετών, όπως αυτά των Sarris *et al*., 2009 και Μπέλκα, 2006. Στις μελέτες αυτές η βιομάζα που παρήχθη έφτανε σε μεγαλύτερες τιμές, περί των 8 - 10 g/L. Ωστόσο, η προσθήκη φαινολικών ουσιών, μέχρι μια συγκεκριμένη συγκέντρωση, παρόλο που χαρακτηρίζονται για την αντιμικροβιακή τους ικανότητα (π.χ. ευγενόλη), είχε θετική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση και επαγωγή του μεταβολισμού εν συγκρίσει με τους μάρτυρες. Ομοίως, έχουν σημειωθεί στην επίσημη βιβλιογραφία και άλλες περιπτώσεις ζυμώσεων κατά τις οποίες η προσθήκη συστατικών με παρεμποδιστικές, θεωρητικά, ιδιότητες αύξαναν τη συγκέντρωση της βιομάζας, αντί να τη μειώνουν, όπως ήταν το αναμενόμενο. Σε ανάλογο συμπέρασμα έφτασε και η μελέτη του μικροοργανισμού *Y. Lipolytica* από τους Papanikolaou *et al*., 2008, σύμφωνα με την οποία η προσθήκη υγρών αποβλήτων ελαιουργίας σε θρεπτικό υλικό γλυκόζης αύξησε την παραγωγή βιομάζας του μικροοργανισμού.

Η αιθανόλη που παρήχθη κατά τη ζύμωση των μαρτύρων διατηρήθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα (περίπου 92 g/L). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά που παρατίθενται στην επίσημη βιβλιογραφία. Στον κάτωθι πίνακα παρουσιάζονται ορισμένα από τα αποτελέσματα αυτά:

Πίν. 22 Βιβλιογραφικές αναφορές παραγωγής αιθανόλης από διάφορα στελέχη ζυμομυκήτων

Στέλεχος	Υπόστρωμα (g/L)	Χρόνος επώασης (h)	Αιθανόλη (g/L)	Βιβλιογραφικές αναφορές
Ζύμη αρτοποιίας *S. cerevisiae*	Σάκχαρα (150 - 300)	192	53	Roukas 1996
CMI237-*S. cerevisiae*	Σάκχαρα (150 - 300)	30	70	Navarro *et al*., 2000
KR18-*S. cerevisiae*	Σακχαρόζη (30)	72	22.5	Kiran *et al*., 2003
Ζύμη αρτοποιίας *S. cerevisiae*	Σακχαρόζη (220)	96	96.71	Caylak and Vardar, 1996

Πίν. 22 Βιβλιογραφικές αναφορές παραγωγής αιθανόλης από διάφορα στελέχη ζυμομυκήτων				
2.399 *S. cerevisiae*	Γλυκόζη (31.6)	30	13.7	Yu and Zhang, 2004
24860 *S. cerevisiae*	Γλυκόζη (150)	27	48	Ghasem *et al*., 2004
MAK 1	Σάκχαρα (150 - 240)	80	112.8	Sarris *et al*., 2009

Η μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης (103.8 g/L) παρήχθη κατά την αύξηση του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων 2 g/L. Η αυξανόμενη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο μέσο είχε θετική επίδραση στο μεταβολισμό του μικροοργανισμού, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των παραγόμενων μεταβολιτών εν συγκρίσει με τους μάρτυρες. Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την παρούσα έρευνα, όταν η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στο μέσο ξεπέρασε τα 2 g/L ο μεταβολισμός του μικροοργανισμού επηρεάστηκε αρνητικά, καθώς η ικανότητα παραγωγής αιθανόλης μειώθηκε, ενώ η ολοκλήρωση της ζύμωσης έγινε σε μεγαλύτερο χρόνο.

Όσον αφορά την παραγωγή γλυκερόλης, η αυξανόμενη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στο μέσο φάνηκε να την επηρεάζει θετικά. Η μέγιστη παραγωγή της (5.27 g/L) παρατηρήθηκε όταν στο μέσο η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών ανερχόταν στο 1.5 g/L, ποσότητα μεγαλύτερη κατά 0.15 g/L από αυτή που επετεύχθει κατά τη ζύμωση των μαρτύρων. Ωστόσο, στο 2 g/L αρχικής συγκέντρωσης φαινολικών ουσιών, η ποσότητα της γλυκερόλης που παρήχθη παρέμεινε σταθερή. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μείωση της ποσότητας που παρήγαγε ο μικροοργανισμός. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L στο μέσο, η μέγιστη τιμή της γλυκερόλης που παρήχθη ήταν 1.09 g/L.

Οι φαινολικές ενώσεις που είχαν προστεθεί στο μέσο, παρουσίασαν μείωση κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων. Η μεγαλύτερη μείωση σημειώθηκε κατά τη ζύμωση σε μέσο με αρχική συγκέντρωση φαινολικών 3 g/L και ήταν 21.11%. Στη συνέχεια ακολούθησε αυτή με αρχική συγκέντρωση 1.5 g/L και ποσοστό μείωσης 19.61%. Από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν παρατηρείται ότι το ποσοστό απομάκρυνσης των φαινολικών ουσιών από το μέσο, κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων, κυμάνθηκε μεταξύ 15 - 21%. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, ως μέσος όρος των ζυμώσεων.

Πιν. 23 Ποσοστά μείωσης φαινολικών ουσιών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης				
Ζύμωση	**Phe_0 (g/L)**	**Phe_{min} (g/L)**	**Ποσοστό μείωσης (%)**	**Χρόνος (h)**
PI 1.5	1.53	1.23	19.61	264
PI 2	2.33	1.92	17.60	168
PI 3	3.60	2.84	21.11	120
PI 5	5.20	4.19	19.42	432

Όπου:
Phe_0 = Αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών
Phe_{min} = ελάχιστη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης
PI 1.5 (1) = αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L 1η ζύμωση
PI 1.5 (2) = αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 1.5 g/L 2η ζύμωση
PI 2 (1) = αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L 1η ζύμωση
PI 2 (2) = αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 2 g/L 2η ζύμωση
PI 3 (1) = αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L 1η ζύμωση
PI 3 (2) = αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 3 g/L 2η ζύμωση
PI 5 (1) = αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L 1η ζύμωση
PI 5 (2) = αρχική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών 5 g/L 2η ζύμωση

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι η παρουσία φαινολικών ενώσεων, μέχρι μιας κρίσιμης τιμής, στο μέσο ζύμωσης φαίνεται να επηρεάζει θετικά το μεταβολισμό του ζυμομύκητα. Επίσης, ο μικροοργανισμός φαίνεται να απομακρύνει ένα ποσοστό από των φαινολικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Το ποσοστό αυτό φαίνεται να είναι το ίδιο σε όλες τις περιπτώσεις. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κατά τη λευκή οινοποίηση για φυσική σταθεροποίηση των παραγόμενων οίνων έναντι των θολωμάτων και του φαινομένου Browning. Από βιοτεχνολογικής σκοπιάς, η ανωτέρω ικανότητα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για απομάκρυνση των ουσιών αυτών από διάφορα απόβλητα, όπως είναι τα υγρά απόβλητα ελαιουργίας.

Ωστόσο, για την εξαγωγή πληρέστερων αποτελεσμάτων, καθώς και της αποσαφήνισης του ρόλου των φαινολικών ουσιών επί της φυσιολογίας των ζυμομυκήτων, αλλά και του ρόλου των τελευταίων επί των ουσιών αυτών, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες, καθώς φαίνεται να ανοίγει μια νέα δίοδος στον τρόπο με τον οποίο θα μπορούμε να επεξεργαζόμαστε τα διάφορα βιομηχανικά απόβλητα, αλλά και να σταθεροποιούμε τους λευκούς οίνους έναντι των διάφορων, αρνητικών για την ποιότητά τους, ασθενειών και προβλημάτων.

Βιβλιογραφία

Ελληνική

- Αικατερίνη Μπέλκα, "Επίδραση υπολειμάτων φυτοφαρμάκων στη βιοσημική συμπεριφορά στελεχών του είδους Saccharomyces cerevisiae" Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη, 2007.
- Γεώργιος Κοτσερίδης: «Τεχνολογία Οίνου 1», Πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2002
- Γκρέκος, Χάδος, «Πολυφαινόλες στα τρόφιμα» Πτυχιακή εργασία Τ.Ε.Ι. Αθήνας, σχολή τεχνολογίας τροφίμων και διατροφής, τμήμα τεχνολογίας τροφίμων, 2002.
- Λαναρίδης Π.. "Σημειώσεις μικροβιολογίας οίνων", Πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2005.
- Παπαδιώτη, Γιαννακοπούλου, «Σχέση της περιεκτικότητας των πολυφαινολικών ενώσεων στη μπύρα και της αναγωγικής της ικανότητας». Πτυχιακή εργασία Τ.Ε.Ι. Αθήνας, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής, Τμήμα Οινολογίας και Τεχνολογίας Ποτών, 2001.
- Σταυρούλα Κουράκου - Δραγωνά, "Θέματα Οινολογίας", Εκδόσεις Τροχαλία, 2002.
- Χριστιάς Χ., "Μυκητολογία", Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα, 1999.

Ξενόγλωσση

- "The ETS Red Wine Phenolic Report" ETS Laboratories – Technical Bulletin 2005.

·Adams A.M. "Yeasts in horticultural soils". Report if the Horticultural Experiment Station and Products Laboratory, pp. 79-82, 1960.

·Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M., " Introductory Mycology. 4th edition". John

·Amerine M.A., Berg H.W., Kunkee R.E., Ough C.S., Singleton V.L., Webb A.D., " Technology of winemaking, 4th edition", 1980.

and General Genetics, vol. 249, pp. 127-138, 1995.

- Benno F. Zimmermann, "Proanthocyanidins in barley and malt analyzed by pressurized liquid extraction, solid – phase extraction and HPLC", 2004.
- Biau S., Dumon M.C., Glories Y. and Vercauteren J., Actualites (Enologiques 95, 5th International Symposium Enologie, Bordeaux, p. 649, 1995.

·Bisson, L.F.: Yeast – Metabolism of sugars. *Wine microbiology and biotechnology*, pp. 55-75, G.H. Fleet, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 1991.

·Blomberg, A. and Alder, L. *Adv. Microbiol. Physiol.*, vol. 33, pp. 145 – 212, 1992

·Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E.: Principles and practices of winemaking, 1996.

- Brewster J.L., De Valoir T., Dwyer N.D., Winter E., Gustin M.C., "An osmosensing signal transduction pathway in yeast". Science, vol. 259 pp. 1760-1763, 1993.
- Carlile Michael J. & Watkinson Sarah C., "The Fungi", 1994.

·Castelli T., "Climate and agents of wine fermentation". Am. J. Enol. vol. 8, pp. 149 - 156, 1957.

cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of Saccharomyces cerevisiae". Molecular

- Cheynier V., Besire N. and Rigaud J. (1989a) *J. Agric. Food Chem*., 37, 1069
- Cheynier V., Fulcrand H.H., Guyot S., Souquet J.M. and Moutounet M. (1995) 4th International Symposium on *Innovation in Enology*, Messe, Stuttgart, Killesberg, p. 50.
- Cheynier V., Rigaud J. and Moutounet M. (1989b) *J. Chromatography*, 472, 428

·Cheynier, V., Basire, N. and Riguad, J.: Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 37, pp. 1069-1071, 1989

·Cheynier, V., Trousdale, E.K., Singleton, V.L., Salgues M. and Wylde, R.: Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and it's hydrolysis in relation to grape wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 34, pp. 217-221, 1986

·Dubernet, M., Ribereau-Gayon, P., Lerner, H., Harel, E. and Mayer, A.: Purification and properties of laccase from *Botritis cinerea*. *Phytochemistry*, vol. 16, p. 191, 1974

·Fuck, E. and Radler, F. *Archiv. fur Mikrobiologie*, vol. 87, pp. 149 – 164, 1972

·Galet, P.: Les maladies et les parasites de la vigne. Paysan du Midi, Montpellier, France, 1977

- Glazer A.N., Nikaido H., "Microbial Biotechnology. Fundamentals Of Applied Microbiology". W. H. Freeman and Company, New York, 1995.

·Grassin, C., Dubourdieu, D., Koh, K.H. and Ribereau-Gayon: Mise en evidence d'une activite N-acetyl-*β*-glucosaminidase chez *Botritis cinerea*. *Comptes Rendus Academie des Sciences*, III, p. 43, 1987

·Guerzoni, M. E., Zironi, R., Intrieri, C. and Magnanini, E.: Stabilization of white wines by hyper-oxidation of must. *Food Technology in Australia*, vol. 33, pp. 442-446, 1981

Harcourt Brace and Company, New York, 1994.

·Harel, E., Mayer, A.M. and Lehman, E.: Multiple forms of *Vitis vinifera* catechol oxidase. *Phyto-chemistry*, vol. 12, pp. 2648-2654, 1973

- Hirayama T., Maeda T., Saito H., Shinozaki K., "Cloning and characterization of seven
- Jackson R.S., "Wine Science. Principles and applications". Academic Press, a division of
- John McMurry (2004). "Organic Chemistry" vol. 1, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- John McMurry (2004). "Organic Chemistry" vol. 2, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Kovac V., Bourzeix M., Heredia N. and Ramos T. (1990) *Rev. Fr. Enol*., 125, 7.
- Kreuzer H. L., (1998) "The potential of antioxidants".
- Lea A.G.H., Bridle P., Tumberlake C.F. and Singleton V.L. (1979) *Am. J. Enol. Vitic*., 30, 289
- Macheix, J. -J., Sapis, J. -C., and Fleuriet, A. (1991) Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr*., 30:441-486

·Marbach. I., Harel. E. and Mayer. A.M. Phytochem., vol. 24, p. 2559, 1985

- Marechal P.A., Gervais P., "Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase". Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 42 pp. 617-622, 1994.
- Meikle A.J., Reed R.H., Gadd G.M., "Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes whole cells and protoplasts of Saccharomyces cerevisiae". Journal of General Microbiology, vol. 134 pp. 3049-3060, 1988.

·Muller Spath, H.: Historique des experimentations de vinification sans SO_2 et par oxygenation. Revue Francaise d'Oenologie, vol. 124, pp. 5-11, 1990

- P. Ribereau - Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu (2007). "Handbook of Enology vol. 1", Wiley Publications
- P. Ribereau - Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu (2007). "Handbook of Enology vol. 2", Wiley Publications
- Reynolds T.B. and Fink G.R. "Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation". Science 291, 2001.
- Rubereau - Gayon P. (1964) *Les Composes Phenoliques du Raisin et du Vin*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
- Rubereau - Gayon P. (1965) C.R. Acad. Sciences, 260, 341

·S. Papanikolaou, I. Chevalot, M. Komaitis, G. Aggelis and I. Marc. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. Antonie van Leeuwenhoek, vol. 80, pp. 215-224, 2001

·Salgues. M., Cheynier, V., Gunata. Y. and Wylde, R.: Oxidation of grape juice 2-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by *Botritis cinerea* laccase and characterization of a new substance 2,5 di-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid. *Journal of Food Science*, vol. 36, pp. 1191-1194, 1986

• Sapis J.-C. (1967) These de Docteur en Enologie, Universite de Bordeaux II.

·Sapis, J. C., Macheix, J.J. and Cordonnier, R.E.: The browning capacity of grapes1. Changes in polyphenol oxidase activities during development and maturation of the fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 31, pp. 342-345, 1983

·Sarris D., Kotseridis Y., Linga M., Galiotou-Panayotou M., Papanikolaou S., "Enhanced ethanol production, volatile compound biosynthesis and fungicide removal during growth of a newly isolated Saccharomyces cerevisiae strain on enriched pasteurized grape musts". Eng. Life Sci. vol. 1, pp. 29-37, 2009.

• Schneider J., Raske W., (1997) "The protein - polyphenol balance in the brewing process" Brauwelt International.

·Schneider, V.: Stabilisierung von Weisswein durch Mostoxidation. *Weinwirtschaft Tecknik*, vol. 125, pp. 15-20, 1989

• Schuller C., Brewster J.L., Alexander M.R., Gustin M.C., Ruis H., "The HOG pathway controls osmotic regulations of transcription via the stress response element (STRE) of Saccharomyces cerevisiae CTT1 gene". EMBO Journal, vol. 13, pp. 4382-4389, 1994.

·Simpson, R.F.: Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*, vol. 21, pp. 233-239, 1982

• Singleton V.L., Trousdale E. and Zays J. (1979) *Am. J. Enol. Vitic*., 30, 49.

·Singleton, V.L., Salgues, M., Zaya, J. and Trousdale, E.: Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape, must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 36, pp. 50-55, 1985

·Singleton, V.L.: Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 38, pp. 69-77, 1987

·Stryer, L, John L. Tymoczko, Jeremy M. Berg: Biochemistry vol. I, 2004

·Stryer, L, John L. Tymoczko, Jeremy M. Berg: Biochemistry vol. II, 2004

vol. 69 iss. 3, pp. 1499-1503, 2003.

• Voyatzis I. (1984) These de Doctorat (Enologie - Ampelologie, Universite de Bordeaux II.

·Walker, G. M. , "Yeast Physiology and Biotechnology". John Wiley and Sons, New York, 1998.

• Weinges K. and Piretti M.V. (1972) *Annali Chimica*, 62 (29), 45-6

• Werner-Washburn M., Braun E., Johnston G. C. and Singer R. A., "Stationary phase in the

Wiley and Sons INC, 1996.

yeast Saccharomyces cerevisiae". Microbiological Reviews 57, 1993

• You K.M., Rosenfield C.L., Knipple D.C., "Ethanol tolerance in the yeast Saccharomyces cereviciae is dependent on cellular oleic acid content". Applied and environmental microbiology,

Ιστοσελίδες

- www.friedli.com/herbs/ phytochem/flavonoids.html
- **www.wikipedia.com**
- **www.wikimedia.com**
- wiz2.pharm.wayne.edu/ module/acidbase.html
- www.absoluteastronomy.com/ topics/Tyrosinase
- www.biochem.arizona.edu/.../ new_background.html
- www.chem.uwec.edu/.../ Pages/I/examp1.html
- chemistry.umeche.maine.edu/ CHY431/Oroti2.html
- www.sciforums.com/ showthread.php?t=97761&page=5
- www.health-spy.com/ mitochondrial.html
- www.bio.miami.edu/.../ 255/255hist/255history.html
- users.rcn.com/.../ BiologyPages/Y/Yeast.html
- quelujo.wordpress.com/.../
- www.forumsains.com/ biologi/kombucha/
- www.ncbi.nlm.nih.gov/ bookshelf/br.fcgi?book=c...