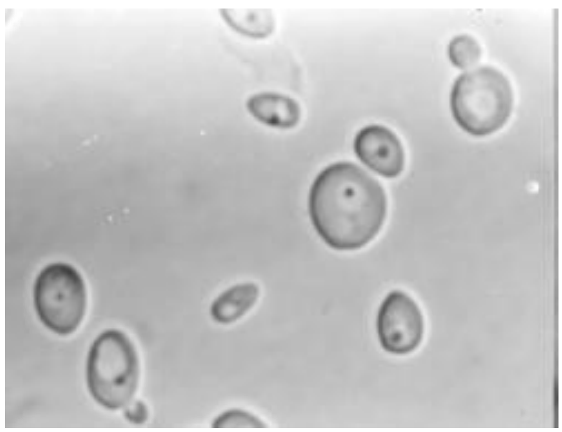
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών :

´´ Οινολογία- Αμπελουργία´´

Αλκοολική Ζύμωση του μικροοργανισμού Candida oleophila



Μεταπτυχιακή Διατριβή της Καλλία Ειρήνης

Επιβλέπων Καθηγητής : Σεραφείμ Παπανικολάου

Αθήνα, Ιούλιος 2015

Στους γονείς μου,

Ευθύμιο και Σοφία.

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστήμιου Αθηνών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το επιβλέπον μέλος και επίκουρο καθηγητή : Σεραφείμ Παπανικολάου για τις πολύτιμες συμβουλές του τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά το στάδιο συγγραφής της παρούσας 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 παρούσας διπλωματικής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Ξενόπουλο Βαγγέλη και Βουκίδη Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την πειραματική διαδικασία καθώς και όλους τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές που απαρτίζουν το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Όλο και περισσότερο στις μέρες μας ερευνώνται νέες αμπελουργικές και οινοποιητικές πρακτικές με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας του οίνου. Μία από αυτές περιλαμβάνει τη σωστή επιλογή κατάλληλων στελεχών ζυμών για την οινοποίηση. Η επιλογή μίας ζύμης έχει στόχο να ενισχύσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός οίνου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στις άγριες ζύμες(Candida, Hanseniaspora, Dekkera) που ανεφέρονται ως σπουδαίες πηγές ενζύμων που σχετίζονται με το άρωμα του οίνου. Στην παρούσα μελέτη λαμβάνει χώρα η έναρξη μίας τέτοιας προσπάθειας. Πραγματοποιείται αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *Candida oleophila* και γίνεται μελέτη λοιπών χαρακτηριστικών που αφορούν την οινοποίηση.

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται προέρχεται από τη συλλογή του εργαστηρίου και πραγματοποιείται αλκοολική ζύμωση αυτού σε θρεπτικά υποστρώματα με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα. Το θρεπτικό μέσο προσομοιάζει στις συγκεντρώσεις των διάφορων ενώσεων που περιέχονται στον οίνο. Το θρεπτικό μέσο παστεριώνεται και έχει σταθερή θερμοκρασία 25 ° C, σταθερό p H 3,5 και ανάδευση τόση ώστε να μην ταράσσεται η επιφάνεια και να μην πραγματοποιείται κανένας αερισμός στο μέσο. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των πηγών άνθρακα είναι 30 g/L γλυκόζη, 30 g/L φρουκτόζη και 200 g/L γλυκόζη και φρουκτόζη εκ των οποίων τα 100 g είναι γλυκόζη και τα υπόλοιπα 100 g φρουκτόζη.

Με τη βοήθεια της HPLC και του αέριου χρωματογράφου γίνεται καταγραφή των συγκεντρώσεων των καταναλωθέντων σακχάρων, της παραγόμενης αιθανόλης, των συγκεντρώσεων των αρωματικών ενώσεων που συμβάλλουν στο άρωμα του οίνου καθώς και του ενδοκυτταρικού λίπους που παράγει ο μικροοργανισμός. Οι παραπάνω μετρήσεις έχουν στόχο τη δημιουργία μίας κινητικής των παραπάνω δεδομένων άρα και την καλύτερη μελέτη του μικροοργανισμού και δίνουν αποτελέσματα που γεννούν νέα ερωτήματα και απαντούν σε παλιά.

Abstract

In order to improve the quality of the wine, the scientists make more and more efforts to find new viticultural and oenological practices. One of these is choosing the suitable strain of yeast, which can enhance the character of the wine. Scientists focus on wild yeasts (*Candida, Hanseniaspora, Dekkera*) which are considered to play a significant role on the aroma of the wine. In this research takes place the alcoholic fermentation of the microorganism Candida oleophila and how this can affect the character of the wine.

The microorganism was chosen from the lab of the Agricultural University of Athens and was used for alcoholic fermentations in different mediums with different initial concentrations of sugar. The temperature of the medium was 25 ° C, the p H was 3,5 and there was no air in it. The initial concentrations of carbon were, 30 g/L Glucose, 30 g/L Fructose and 200 g/L(100g of Fructose and 100 g of Glucose).

The results of the produced ethanol, katanalauenta sugar, the concetrations of the aromatic compounds and incell fat from the fermentations are taken by using the HPLC and the gas chromatography. The aim of this research is to find out if Candida oleophila can be used for winemaking procedures.

1)Εισαγωγή

Ο διεθνής ανταγωνισμός εντός της αμπελοοινικής αγοράς, οι απαιτήσεις των καταναλωτών για τις νεότερες μορφές των κρασιών και οι αυξανόμενες ανησυχίες σχετικά με τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις της παραγωγής κρασιού παρέχουν νέες προκλήσεις για την καινοτομία στην τεχνολογία ζύμωσης κρασιού. Μέχρι περίπου τη δεκαετία του 1980, η συμβολή των ζυμών για την παραγωγή κρασιού θεωρήθηκε ως μια σχετικά απλοϊκή ιδέα. Ουσιαστικά, ο χυμός σταφυλιών υφίστατο φυσική ή αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση που, σχεδόν πάντα, κυριαρχούταν από στελέχη του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Ως συνέπεια, καθαρές καλλιέργειες αυτής της ζύμης απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης για τη διεξαγωγή ζυμώσεων στο κρασί. Ήταν γνωστό ότι πολλά άλλα είδη ζυμών συνυπήρχαν στο χυμό σταφυλιών και να συνέβαλαν στα πρώτα στάδια της ζύμωσης, αλλά, γενικά, θεωρήθηκαν δευτερεύουσας σημασίας ή ανεπιθύμητα στη διαδικασία. Με κατάλληλο εμβολιασμό καλλιεργειών εκκίνησης και προσθήκη διοξειδίου του θείου στο χυμό, οι οινοποιοί είχαν στόχο να εξαλείψουν ή να ελαχιστοποιήσουν την επίδραση των ζυμών, εκτός από το στέλεχος του *S. cerevisiae* με το οποίο εμβολιάζουν. Με αυτή την τεχνολογία, οι οινοποιοί είχε έναν αρκετά καλό έλεγχο της διαδικασίας [1],[2].

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 25 χρόνων, σημαντικές πρόοδοι έχουν συμβεί στην κατανόηση της οικολογίας, βιοχημείας, της φυσιολογίας και της μοριακής βιολογίας των ζυμομυκήτων που εμπλέκονται στην παραγωγή κρασιού, και πώς αυτές επηρεάζουν τις ζύμες στη χημεία οίνου, στις οργανοληπτικές ιδιότητες και στην έκκληση του τελικού προϊόντος Τώρα, η οικολογία της ζύμωσης έχει βρεθεί να είναι πολύ πιο περίπλοκη από ό, τι θεωρείται η κυριαρχία του εμβολιασμού με το στέλεχος *του S. cerevisiae,* και η μεταβολική επίδραση ζυμομυκήτων στο χαρακτήρα του οίνου είναι πολύ περισσότερο ποικιλόμορφη από μία απλή ζύμωση των σακχάρων του σταφυλοχυμού. Με αυτή τη μεγαλύτερη γνώση και κατανόηση, η αλκοολική ζύμωση θεωρείται πλέον ως βασική διαδικασία όπου οι οινοποιοί μπορούν δημιουργικά να διαχειριστούν το χαρακτήρα του οίνου και της αξίας του μέσω της καλύτερης διαχείρισης των ζυμών και μπορεί στρατηγικά να παράγει ειδικά κρασιά σε μια μεταβαλλόμενη αγορά.[3],[4]

1.1) Οι ζυμομύκητες στην Οινολογία

Η μικροβιακή χλωρίδα των σταφυλιών διαμορφώνεται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι το κλίμα οι εφαρμοζόμενες τεχνικές και άλλα. Αν και σε αρκετές περιπτώσεις οι συνθήκες ανάπτυξης των πρεμνών είναι ιδιαίτερα αντίξοες, ωστόσο, ο πληθυσμός των μυκήτων σε αυτές είναι ιδιαίτερα υψηλός.

Τα στελέχη που τον απαρτίζουν ανήκουν κυρίως στα γένη *Rhizopus, Aspergillus , Mucor και Penicillium*.Ωστόσο κάτω από ορισμένες συνθήκες όπως είναι η υγρασία και οι ρωγμές στην επιφάνεια της σταφυλής μπορούν να αναπτυχθούν στελέχη του γένους *Botrytis*. Σε περιπτώσεις σοβαρού τραυματισμού της ράγας έχει παρατηρηθεί η αύξηση ορισμένων μυκήτων που μπορούν να εξαντλήσουν προς όφελός τους βασικές βιταμίνες και μέταλλα του γλεύκους με αποτέλεσμα την εμφάνιση δυσκολιών περάτωσης της αλκοολικής ζύμωσης από τις ζύμες .

Όσον αφορά τις ζύμες που απαντώνται στη σταφυλή αυτές συνήθως ανήκουν στα γένη *Metschnikowia, Hansenula, Hanseniaspora, Candida* και *Kloeckera.*και είναι γνωστές ως άγριες ζύμες. Εν αντιθέσει με τα ανωτέρα είδη το είδος *Saccharomyces* βρίσκεται 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 μία πολύ καλή προσαρμογή 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 για τις άγριες ζύμες οι οποίες είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί και έτσι παρευρίσκονται στην αλκοολική ζύμωση και ανταγωνίζονται στα θρεπτικά συστατικά τον ζυμομύκητα Saccharomyces. Ωστόσο λόγω της μη καλής προσαρμοστικότητας των ειδών αυτών στις εν λόγω συνθήκες στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης ανιχνεύεται ένας πολύ μικρός αριθμός αυτών[5]

1.1.1)Μακρομοριακά συστατικά των κυττάρων των ζυμών (Walker 1998)

Είδος Μακρομορίου	Συστατικά στοιχεία
Πρωτεΐνες	Δομικές πρωτεΐνες : Κυρίας α-ακτίνη και τουμπουλίνη του κυτταροσκελετού, ιστόνες και μεμβρανικές πρωτεΐνες. Ριβοσωμικές πρωτεΐνες : Βρίσκονται στις 60 s και 40s ριβονουκλεοπρωτεινικές υπομονάδες. Ορμονικές Πρωτεΐνες : Φερομόνες σύζευξης Λειτουργικές πρωτεΐνες : Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται αρκετά ένζυμα
Γλυκοπρωτεΐνες	Δομικές μαννοπρωτείνες στα κυτταρικά τοιχώματα (π.χ. ιμβερτάση) στην περιπλασματικά ζώνη.
Πολυσακχαρίτες	Δομικοί Πολυσακχαρίτες : Κυρίως η γλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος, η μαννάνη, η χιτίνη και 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).
Νουκλεικά Οξέα	Δεοξυριβονουκλεικό οξύ :Γενωμικό DNA 80% , Μιτοχρονδρικό γενωμικό DNA 10-20%, και εξωχρωμοσωμικό 1-5 %. Ριβονουκλεικό οξύ : Περίπου 80 % ως ριβονουκλεοπρωτείνη r RNA , 5 % m RNA στο κυτταρόπλαμσα στο αδρό ER και στα μιτοχόνδρια.

[71]

1.1.2)Οι φάσεις αύξησης του *Candida oleophila*.

- 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 τα κύτταρα να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον. Για να επιτευχθεί 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.
- Επιταχυντική φάση αύξησης
- Εκθετική φάση αύξησης : Στη φάση αυτή ο ρυθμός αύξησης είναι ο μέγιστος δυνατός. Τα περισσότερα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση.
- Επιβραδυνόμενη φάση αύξησης : Μετά την εκθετική φάση ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων επιβραδύνεται πριν περάσει στην επόμενη φάση.
- Στατική φάση αύξησης : Στη συγκεκριμένη φάση ο αριθμός των κυττάρων παραμένει σχετικά σταθερός. Αν τα κύτταρα παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο μέσο υπάρχει η περίπτωση να αυτολυθούν και να επηρεάσουν και την ανάπτυξη των άλλων κυττάρων.
- Φάση θανάτου : Στη φάση αυτή τα κύτταρα νεκρώνονται καθώς τα ενεργειακά τους αποθέματα έχουν εξαντληθεί. Η φάση θανάτου είναι εκθετική και αντίθετη από τη λογαριθμική αύξηση.

1.1.3) Προσαρμογή του γένους *Candida* 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 αύξηση τους ενέργεια μέσω δύο μεταβολικών μονοπατιών. Μπορούν να ξεκινήσουν με το μονοπάτι της αναπνοής το οποίο ξεκινά με τη γλυκόλυση και καταλήγει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είτε με το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης που ξεκινά με τη μεταβολική οδό της γλυκόλυσης και καταλήγει στην αλκοολική ζύμωση. Ο παράγοντας που θα κρίνει ποια από τις δύο οδούς θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός είναι η παρουσία ή όχι οξυγόνου στο μέσο.

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

Η διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων στο μέσο αύξησης των ζυμών αποτελεί ίσως τον κυριότερο παράγοντα για την ανάπτυξη τους.

Η σημαντικότερη πηγή άνθρακα για τις ζύμες είναι τα σάκχαρα. Μέσω αυτού ενεργοποιείται ο μεταβολισμός τους και κατ ΄επέκταση το κύτταρο δημιουργεί την απαραίτητη ενέργεια για τη διαβίωση του.

Η μεταφορά των σακχάρων στο εσωτερικό του κυττάρου πραγματοποιείται μέσω της βοήθειας πρωτεϊνικών μεταφορέων και γίνεται υπό τη μορφή της διευκολυνόμενης διάχυσης.

Ένα άλλο πολύ σημαντικό στοιχείο για όλους τους μικροοργανισμός και κατά συνέπεια για τον *Candida oleophila* είναι το άζωτο. Το συγκεκριμένο στοιχείο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση αρκετών μεαλομοριακών ενώσεων. Το άζωτο είναι έν στοιχείο που υπάρχει σε αφθονία στο γλεύκος αν και σε αρκετές περιπτώσεις προστίθενται εξωγενώς κατά την οινοποίηση.

Η άμεσα αφομοιώσιμη μορφή αζώτου είναι τα ιόντα αμμωνίου.

Στις αφομοιώσιμες πηγές φωσφόρου οι ζύμες χρησιμοποιούν ανόργανα φωσφορικά άλατα και φωσφορικούς εστέρες.

1.1.4)Σημαντικές Επιπτώσεις της αιθανόλης στη φυσιολογία των ζυμών (Walker 1998)

Φυσιολογική Λειτουργία	Επίδραση Αιθανόλης
Βιωσιμότητα και Αύξηση των κυττάρων	• Αναστολή αύξησης και βιωσιμότητας των 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 Vmax των κυριότερων γκυκολυτικών ενζύμων. • Ενίσχυση σημειακών μεταλλάξεων. • Επαγωγή της σύνθεσης πρωτεϊνών θερμικού σοκ απόκτηση θερμοανεκτικότητας. • Αύξηση ελεύθερων ριζών οξυγόνου • Επαγωγή σύνθεσης κυτοχρώματος P 450. • Αύξηση της ενεργότητας της μιτοχονδριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου •
Μεμβρανική Δομική 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 διαπερατότητά • Αναστολή της λήψης θρεπτικών ουσιών • Υπερπόλωση της πλασματικής μεμβράνης

1.1.5) Επίδραση της Θερμοκρασίας.

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες όσον αφορά την αύξηση των ζυμών. Όπως όλοι οι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν μέσα σε ένα συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών πέρα από τα όρια του οποίου μπορεί να προκληθεί και κυτταρικός θάνατος.

Όρια θερμοκρασιών αύξησης των ζυμών (Walker 1998)

Θερμοκρασιακές κατηγορίες	Εύρος θερμοκρασιών	Παραδείγματα ζυμών
Ψυχρόφιλες	Ζύμες ικανές να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 5-18 με ανώτατο όριο τους 20.	*Leucosporidium spp.* *Torulopsis spp*
Μεσόφιλες	Ζύμες με όρια αύξησης 0-48	Οι περισσότερες ζύμες
Θερμόφιλες	Ελάχιστη θερμοκρασία αύξησης 20	*Candida sloofii , 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 υψηλό ποσοστό των υπολειμμάτων των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Στην πλασματική μεμβράνη κάτι που εξηγεί το μεγάλο αριθμό ζωντανών κυττάρων που σε ζυμώσεις που πραγματοποιούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Κατά την εκθετική αύξηση των κυττάρων η θερμοκρασία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαίρεση των κυττάρων καθώς σε θερμοκρασία 10 η κυτταρική διαίρεση μπορεί να συμβαίνει κάθε 12 ώρες, στους 20 κάθε 5 ώρες και στους 30 κάθε 3 ώρες. Επίσης άλλοι δύο σημαντικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο στην κυτταρική διαίρεση είναι το p H και η συγκέντρωση του σακχάρου στο μέσο.[6]

1.2) Πηγές των νέων ζυμών κρασιού

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 50-75 ετών, η παραγωγή οίνου έχει μετατραπεί σε μια σύγχρονη, βιομηχανοποιημένη διαδικασία, η οποία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό γύρω από τις δραστηριότητες μόνο των δύο ειδών ζυμών: *S. cerevisiae* και *S bayanus.* Οι μελλοντικές εξελίξεις θα συνεχίσουν να βασίζονται στην καινοτομία με αυτά τα είδη, αλλά και οι ευκαιρίες για καινοτομία, χρησιμοποιώντας άλλα είδη ζυμών δεν μπορούν να αγνοηθούν. Όπως αναφέρθηκε ήδη, διάφορα είδη *Hanseniaspora,* ***Candida****, Kluyveromyces* και *Pichia* παίζουν σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια της ζύμωσης του κρασιού, και υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για στρατηγική εκμετάλλευση των ειδών αυτών ως νέων καλλιεργειών εκκίνησης. [2]

Για τις παραπάνω ζύμες δε μπορεί να αποτελέσει όριο η ανοχή τους στην αιθανόλη. Διάφορα είδη *Zygosaccharomyces, Saccharomycode*s και *Schizosaccharomyces* είναι ισχυρές ζύμες και ανεκτικές στην αιθανόλη. Παρόλο που γενικά θεωρούνται ως ζύμες, δεν υπάρχει κανένας λόγος να αμφιβάλει κανείς ότι με ένα καλό πρόγραμμα επιλογής και αξιολόγησης στο πλαίσιο αυτών των ζυμών δεν θα μπορούσαν να ανακαλυφθούν στελέχη με επιθυμητές ιδιότητες οινοποίησης [7]. Πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι δεν είναι όλα τα στελέχη του S. cerevisiae αποδεκτά για τα κρασιά, και ότι απαιτείται μια συστηματική διαδικασία επιλογής και αξιολόγησης για την απόκτηση επιθυμητών στελεχών [3]

Κατά συνέπεια, στην αναζήτηση και την ανάπτυξη νέων ζύμών, η βιομηχανία οίνου του μέλλοντος πρέπει να κοιτάξει πέρα από τα είδη *Saccharomyces.* Επιπλέον, θα πρέπει να κοιτάξουμε πέρα από τα σταφύλια και να δώσουμε έναν ευρύτερο προβληματισμό και σε άλλα φρούτα, όπως το ακατέργαστο υλικό έναρξης. Με αυτό το όραμα, πολλές νέες ζύμες και αμπελοοινικά προϊόντα περιμένουν να τα ανακαλυφθούν.

1.3) Οι ζύμες και πως επηρεάζουν το χαρακτήρα του κρασιού με διάφορους μηχανισμούς

Η κατανόηση του πώς οι ζύμες επηρεάζουν τις βασικές ιδιότητες του άρωματος του κρασιού, τη γεύση και το χρώμα παρέχει τη βασική πλατφόρμα για την επιλογή των στελεχών ως καλλιέργειες εκκίνησης και διαχείρισης της αλκοολικής ζύμωσης. Τέτοιοι μηχανισμοί τώρα εκτείνονται πέρα από τον γλυκολυτικό μεταβολισμό των σακχάρων του γλέυκους και, σε γενικές γραμμές, μπορεί να θεωρηθούν ως οι εξής:

1) Μεταβολισμός των σακχάρων και αζώτου του σταφυλοχυμού

2) Η ενζυματική υδρόλυση των συστατικών των σταφυλιών και πως μπορούν να επηρεάσουν το άρωμα κρασιού, η γεύση, το χρώμα και τη σαφήνεια.

3) Αυτόλυση.

4) Βιοπροσρόφηση.

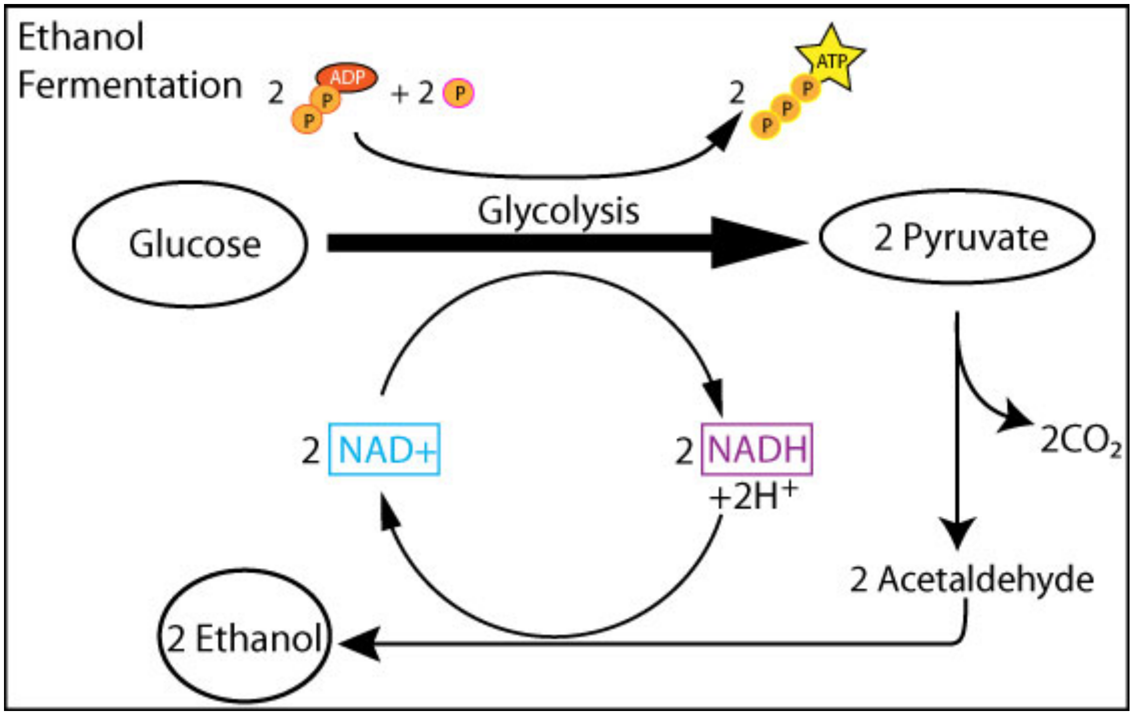
Ο μεταβολισμός των σακχάρων και αμινοξέων του σταφυλοχυμού σε αιθανόλη επηρεάζει ουσίες, όπως οργανικά οξέα, γλυκερόλη, ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, αλδεΰδες, κετόνες, αμίνες και το πτητικό θείο που είναι γνωστή ως η κύρια αντίδραση κατά την οποία οι ζύμες επηρεάζουν το χαρακτήρα του οίνου[8].

Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των μεταβολιτών αυτών για διάφορα στελέχη του *Saccharomyces* και *μη Saccharomyces* [9], [10] [11]. Αυτά τα προφίλ διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ειδών ζύμης και των στελεχών τους, έτσι ώστε να είναι απαραίτητος ο εκτεταμένος ο έλεγχος στα στελέχη για να επιλεχθούν τα άτομα με θετικά χαρακτηριστικά (π.χ. αυξημένη παραγωγή γλυκερόλης, ενίσχυσαν τον σχηματισμό εστέρα) και απορρίπτουν τα άτομα με αρνητικές επιπτώσεις (π.χ. υπερπαραγωγή του οξικού οξέος ή θειούχου υδρογόνο). Σε αυτή τη βάση, είδη όπως *Hanseniaspora, Candida, Pichia, Zygosaccharomyces, Kluyveromyces* και άλλα γένη έχουν τη δυνατότητα να συνεισφέρουν επιπλέον στην ποικιλομορφία της γεύσης και στην πολυπλοκότητα της παραγωγής οίνου [12] , [13]. [14] [15].

Οι ζύμες παράγουν πολλά άλλα ένζυμα, όπως εστεράσες, αποκαρβοξυλάσες, αναγωγάσες , πρωτεάσες και πηκτινάσες , που με διάφορους τρόπους, μπορούν να επηρεάσουν τη γεύση του οίνου και άλλες ιδιότητες του [16],[17], [18], αλλά και πάλι απαιτούνται περεταίρω μελέτες για αυτές τις δυνατότητες.

Η αποκαρβοξυλίωση του υδροξυκινναμωμικών οξέων για παράδειγμα στο χυμό των σταφυλιών μπορεί να σχηματίσει ανεπιθύμητες ποσότητες πτητικών φαινολών όπως 4-αιθυλο φαινόλη που είναι γνωστή για τα είδη *Dekkera* [19], [20].

1.4) Αλκοολική ζύμωση



Το φαινόμενο της αλκοολικής ζύμωσης ήταν το πρώτο που μελετήθηκε θεωρητικά και παρουσίασε μεγάλο ενδιαφέρον από πρακτικής σκοπιάς.

Μέσα στην αλκοολική ζύμωση υπάρχει ένα υπάρχει ένα βιολογικό φαινόμενο(πολ/σμός και ανάπτυξη ζυμών)και ένα φαινόμενο χημικό(μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη), που οφείλονται στα ένζυμα που περιέχουν τα κύτταρα των ζυμών [21].

Η αλκοολική ζύμωση είναι η κύρια δραστηριότητα με την οποία οι ζύμες συμβάλουν θετικά στη γεύση του οίνου [22]. Για αυτό το λόγο οι ζύμες χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς: ((i)χρησιμοποίηση των συστατικών του γλεύκους των σταφυλιών, (ii) παραγωγή αιθανόλης και άλλων διαλυτών που βοηθούν στην εκχύλιση των συστατικών που αφορούν τη γεύση του οίνου, (iii) παράγουν ένζυμα που μετατρέπουν τις ουδέτερες ενώσεις των σταφυλιών σε δραστικές για τη γεύση του οίνου ενώσεις, (iv) παραγωγή πολλών εκατοντάδων δευτερογενών μεταβολιτών(π.χ. οξέα, αλκοόλες, εστέρες, πολυόλες, αλδεΰδες, κετόνες, πτητικές ενώσεις θείου), και (v) αυτολυτική υποβάθμιση των νεκρών κυττάρων της ζύμης, .

1.4.1)Η βιοχημεία της αλκοολικής ζύμωσης.

Το μόριο της εξόζης δεν διασπάται τόσο απλά για να μας δώσει 2 μόρια αιθυλικής αλκοόλης και 2 μόρια CO2, Υφίσταται μία πολύπλοκη μετατροπή έτσι ώστε το σύνολο των αντιδράσεων της αλκοολικής ζύμωσης να περιλαμβάνει περίπου 30 ξεχωριστές αντιδράσεις, που γίνονται με την παρέμβαση ενζύμων κατάλληλων για κάθε μία από αυτές.

Με αυτό τον τρόπο η αλκοολική ζύμωση δεν περιορίζεται μόνο σε μία εξίσωση

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH+2CO_2$$

Τα κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση είναι

1) Η αποκαρβοξυλάση TPP(πυροφωσφορικός εστέρας της θειαμίνης),η οποία καταλύει τις αποκαρβοξυλιώσεις όπως εκείνη του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεϋδη και CO2.

2) Η νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδιο(NAD), που είναι μία αφυδρογονάση και καταλύει τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.

3) Η διφωσφορική αδενοσίνη(ADP)και η τριφωσφορική αδενοσίνη(ATP) που είναι μηχανισμοί μεταφοράς ενέργειας στις βιοχημικές αντιδράσεις.

4) Το συνένζυμο A(CoA—SH), όπου δίνει με τα οξέα τα ακυλο-συνένζυμα A)R-CO-S-CoA) που επιτρέπουν την πρόσφυση της ρίζας R-CO σε ένα άλλο μόριο. Συμμετέχει στη σύνθεση κυρίως των λιπαρών οξέων και των λιπιδίων [21].

1.4.2)Τα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης.

Η πρώτη χημική πράξη της αλκοολικής ζύμωσης είναι η **γλυκόλυση**, γνωστή ως οδός EMBDEM-MEYERHOF. Περιλαμβάνει το σύνολο των αντιδράσεων που επιτρέπουν στα ζώντα κύτταρα να μετατρέψουν τις εξόζες (γλυκόζη, φρουκτόζη) σε πυρουβικό οξύ.

Οι ζύμες ως χημειοαυτότροφοι μικροοργανισμοί προμηθεύονται την ενέργειά τους για την ανάπτυξή τους 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 ελέυθερης ενέργειας στα βιολογικά συστήματα είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη(ATP). Πρόκειται για το λεγόμενο ενεργειακό νόμισμα των κυττάρων, καθώς αποτελεί το σπουδαιότερο μεταφορέα ενέργειας στα κύτταρα. Η υδρόλυση του μορίου σε τριφωσφορική αδενοσίνη (ADP) συνεπάγεται μία σημαντική απελευθέρωση ελεύθερης ενέργειας η οποία ισοδυναμεί με 7.3 Kcal/mole και χρησιμοποιείται στην ενεργό μεταφορά των μεταβολιτών και στις βιοσυνθέσεις.

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

1.4.3)Γλυκόλυση

Η γλυκόλυση είναι η μεταβολική οδός(εικόνα 2), κατά την οποία η γλυκόζη και η φρουκτόζη μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ με ταυτόχρονο σχηματισμό ATP. Όλο το μεταβολικό μονοπάτι λαμβάνει χώρα στο κυτόπλασμα του κυττάρου. Η μεταφορά των εξοζών του γλεύκους στο εσωτερικό του κυττάρου πραγματοποιείται διαμέσου ενός πολύπλοκου συστήματος πρωτεϊνικών μεταφορέων, η φύση του οποίου δεν έχει διαλευκανθεί μέχρι και σήμερα. Πρόκειται για τη διευκολυνόμενη μεταφορά που δεν απαιτεί ενέργεια και πραγματοποιείται από ένα περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα(μέσο) σε ένα άλλο φτωχότερο(κυτόπλασμα)[23].

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 και μείωση της έντασης στη μεταφορά των εξοζών. Τα φαινόμενο αυτό καλείται καταβολική απενεργοποίηση [24].

Κατά την αλκοολική ζύμωση που λαμβάνει χώρα στα οινοποιεία το φαινόμενο αυτό παρατηρείται μετά το τέλος της αύξησης των ζυμών και επιταχύνεται σε περιπτώσεις έλλειψής αφομοιώσιμου αζώτου. Έτσι η προσθήκη των αμμωνιακών στη δεξαμενή κατά τη φάση στασιμότητας των κυττάρων, έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των συστημάτων μεταφοράς εξοζών και αποκαθιστά μερικώς την ένταση της ζύμωσης [21].

Η γλυκόλυση σηματοδοτείται από 3 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 γλυκεραλδεύδης, ενώ το τρίτο από την παραγωγή του πυροσταφυλικού οξέος. Όπως αυτό προκύπτει από μία σειρά αντιδράσεων ξεκινώντας από το 1,3-δι-φωσφορογλυκενικό οξύ.

Όταν ένα μόριο γλυκόζης εισαχθεί στο κυτοσύλιο φωσφορυλιώνεται από την εξωκινάση προς 6-φωσφορική γλυκόζη, με κατανάλωση ενός μορίου ATP.

Στο επόμενο βήμα της γλυκόλυσης η 6-φωσφορική γλυκόζη ισομεριώνεται από την ισομεράση της φωσφογλυκόζης σε 6-φωφορική φρουκτόζη. Στη συνέχεια το υπόστρωμα φωσφορυλιώνεται εκ νέου 1,6-δι-φωσφορική φρουκτόζη με την ταυτόχρονη κατανάλωση ενός μορίου ATP, με τη δράση του ενζύμου φωσφοφρουκτοκινάση. Στο πρώτο στάδιο της γλυκολιτικής οδού χρησιμοποιήθηκαν 2 μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης που εισήχθη.

Το δεύτερο στάδιο της γλυκολιτικής οδού συνεχίζεται με τη διάσπαση της 1,6-δι-φωσφορικής φρουκτόζης σε δύο μόρια ισομερών τριοζών. Τα μόρια αυτά είναι φωσφορική-δι-υδροξυ-ακετόνη κι η 3-φωσφορική-γλυκεραλδευδη. Η συγκεκριμένη διάσπαση καταλύεται από την αλδολάση. Η ισομεράση των φωσφορικών τριοζών καταλύει την ισομερίωση μεταξύ των δύο παραπάνω ενώσεων.

Το τρίτο στάδιο της γλυκολυτικής οδού ξεκινά με τη μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης σε 1,3-δι-φωσφογλυκερινικό οξύ από την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικήε-γλυκεραλδεύδης . Η συγκεκριμένη αντίδραση είναι μία φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Σε αυτή ένα μόριο NAD+ (νικοτιναμινο-αδενίνο-δινουκλεοτίδιο)ανάγεται σε NADH δεχόμενο 2 ηλεκτρόνια από την 3-φωσφορική-γλυκεραλδευδη. Η οξείδωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πλούσιου σε ενέργεια δεσμού 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. Στη συνέχεια η κινάση του φωσφογλυκερινικού οξέος καταλύει την αντίδραση μεταφοράς μίας εκ των δύο φωσφορικών ομάδων του 1,3-δι-φωσφογλυκερινικού οξέος σε ένα μόριο ADP προς παραγωγή ATP. Από αυτή την αντίδραση παράγεται το 3-φωσφογλυκερικό οξύ.

Στη συνέχεια της οδού το 3-φωσφογλυκερινικό οξύ μετατρέπεται σε 2-φωσφογλεκερινικό οξύ που καταλύεται από τη μουτάση του φωσφολυκερινικού. Έπειτα η ενολάση αφαιρεί ένα μόριο νερού από το 2-φωσφογλυκερινικό οξύ προς τη δημιουργία φωσφο-ένολο-πυροσταφυλικού οξέος. Η δράση του ενζύμου αυτού έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μορίου πυροσταφυλικού οξέος με ταυτόχρονη μεταφορά του Pi σε ένα μόριο ADP προς τη δημιουργία ενός μορίου ATP.

Ένα μόριο γλυκόζης έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή 4 μορίων ATP κατά τη διάσπασή της μέσω της γλυκολυτικής οδού. Τα δύο εκ των τεσσάρων μορίων ATP χρησιμοποιούνται 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 αυτού μονοπατιού το πυροστοφυλικό οξύ που σχηματίζεται μπορεί να μεταβολιστεί από 3 μεταβολικά 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[24].

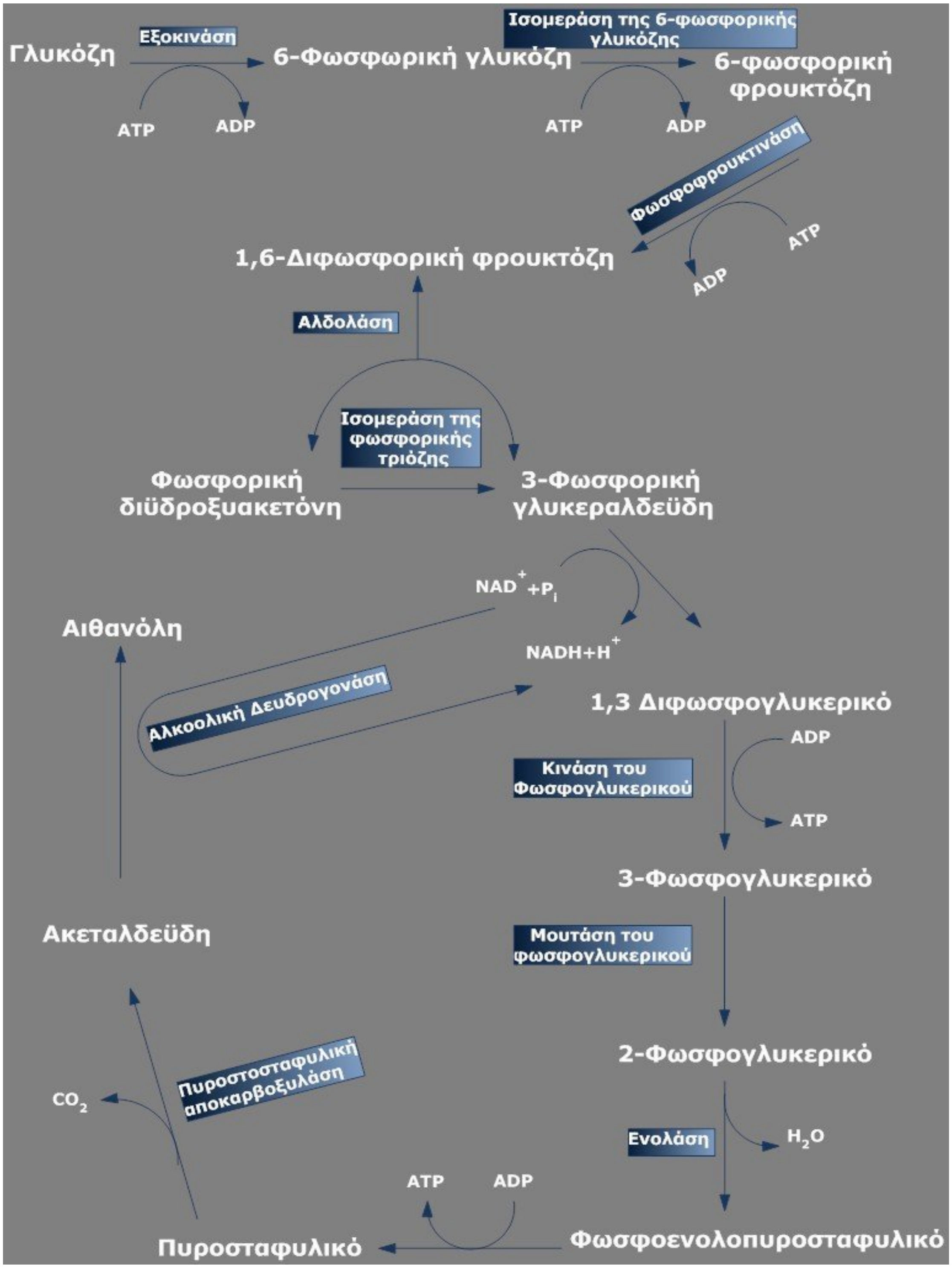
Στο αναερόβιο περιβάλλον που επικρατεί σε μία δεξαμενή οινοποίησης, οι ζυμομύκητες ακολουθούν το μεταβολικό μονοπάτι , προκειμένου να παράγουν την απαιτούμενη ενέργεια για τις βιολογικές διεργασίες του κυττάρου. Κατά τη διεργασία αυτή το πυροσταφυλικό οξύ που παράχθηκε κατά τη γλυκόλυση μετατρέπεται με δύο ενζυμικές αντιδράσεις σε αιθανόλη.

Το πυροσταφυλικό οξύ μη έχοντας τη δυνατότητα να εισέλθει στα μιτοχόνδρια και να εισαχθεί στον κύκλο της αναπνευστικής αλυσίδας ώστε να αναγεννηθεί εκ νέου NADH συνεχίζει στο μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης κατά την οποία λαμβάνουν χώρα δύο ενζυμικές αντιδράσεις. Η πρώτη είναι η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος προς ακεταλδεύδη με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου $CO2$. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος η οποία έχει σαν προσθετική ομάδα την πυροφωσφορική θειαμίνη(TPP).

Στο επόμενο βήμα η ακεταλδεύδη που παράχθηκε ανάγεται σε αιθανόλη. Η συγκεκριμένη αντίδραση καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογονάση η οποία έχει στο ενεργό της κέντρο ένα ιόν ψευδαργύρου $Zn2+$, Στην αντίδραση αυτή το $NADH+$ που παράχθηκε στη γλυκόλυση οξειδώνεται προς παραγωγή $NAD+$. Από ενεργειακής άποψης κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται 2 ακόμη μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης που αποκοδομείται ή 14,6 Kcal/mol που μπορεί να χρησιμοποιήσει το κύτταρο [24].

.

Η αιθανόλη όπως και άλλες αλκοόλες όταν συγκεντρώνονται στο θρεπτικό υλικό δρουν ως χημικοί στρεσογόνοι παράγοντες για τους μικροοργανισμούς. Η αιθανόλη μπορεί να είναι τοξική για τα κύτταρα των ζυμών σε συγκεντρώσεις 8-18 % κ.β. γεγονός που εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και τη μεταβολική κατάσταση της καλλιέργειας Μάλιστα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αιθανόλης, τόσο πιο έντονες γίνονται οι αρνητικές επιδράσεις της. Σε συγκέντρωση αιθανόλης 2% αρχίζει η καταστολή της πρόσληψης γλυκόζης και καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση καταστέλλεται και η μετακίνηση αμμωνιακών ιόντων και μερικών αμινοξέων. Η ζύμωση αναστέλλεται συνήθως πλήρως σε συγκεντρώσεις αιθανόλης περίπου 11% κ.ο. [25].



Γλυκόζη
Εξοκινάση
6-Φωσφωρική γλυκόζη
ATP
ADP
Ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης
6-φωσφορική φρουκτόζη
ATP
ADP
Φωσφοφρουκτινάση
ATP
ADP
1,6-Διφωσφορική φρουκτόζη
Αλδολάση
Ισομεράση της φωσφορικής τριόζης
Φωσφορική διϋδροξυακετόνη
3-Φωσφορική γλυκεραλδεϋδη
NAD$^+$+P$_i$
NADH+H$^+$
Αιθανόλη
Αλκοολική Δευδρογονάση
1,3 Διφωσφογλυκερικό
ADP
Κινάση του Φωσφογλυκερικού
ATP
3-Φωσφογλυκερικό
Ακεταλδεϋδη
Μουτάση του φωσφογλυκερικού
2-Φωσφογλυκερικό
Πυροστοσταφυλική αποκαρβοξυλάση
CO_2
Ενολάση
H_2O
ATP
ADP
Πυροσταφυλικό
Φωσφοενολοπυροσταφυλικό

(Εικόνα 2)

1.4.4)Δευτερογενή προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης.

Κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται και άλλα προϊόντα εκτός της αιθανόλης. Πολλά από αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου, για αυτό το λόγο κάποια είναι επιθυμητά και κάποια άλλα όχι.

Ανώτερες αλκοόλες: Οι κυριότερες ανώτερες αλκοόλες είναι οι προπανόλη-1, βουτανόλη-1, βουτανόλη-2, 2-μέθυλοπροπανόλη-1, 2-μέθυλοβουτανόλη-1, πεντανόλη-1 και εξανόλη-1. Παράγονται κατά την απαμίνωση των ελεύθερων αμινοξέων που προκύπτουν από την πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών της ζύμης και του υποστρώματος [26].

Γλυκερίνη: Είναι ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Ο σχηματισμός της ευνοείται από χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλή περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ και από την προσθήκη SO_2.

Ακεταλδεΰδη: Είναι ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης που προκύπτει, από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Αν προστεθεί $NaHSO_3$ και SO_2 στο σακχαρούχο υπόστρωμα πριν τη ζύμωση ή κατά την διάρκεια της, η παραγόμενη ακεταλδεΰδη σχηματίζει προϊόν προσθήκης και έτσι δεν ανάγεται περαιτέρω προς αιθανόλη. **Εστέρες:** Σπουδαιότερος είναι ο οξικός αιθυλεστέρας $CH_3COOC_2H_5$, ο οποίος σχηματίζεται από την αντίδραση του οξικού οξέος με την αιθανόλη [27].

Οξέα: Κυριότερο είναι το οξικό οξύ, το οποίο παράγεται ως κανονικό προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης σε ποσότητες μικρότερες από 300 mg/l. Υψηλά επίπεδα οξικού οξέος, συνήθως σχετίζονται με παρουσία στο εκχύλισμα βακτηρίων του οξικού και του γαλακτικού οξέος.

Ακετάλες: Σχηματίζονται από την αντίδραση της ακεταλδεΰδης με την αιθανόλη αλλά και των ικού οξέος.

1.5) 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. Μία από αυτές είναι και η λεγόμενη πυροσταφυλική ζύμωση.

Συνήθως μετά την έξοδο της σταφυλομάζας από το σπαστήρα, προσθέτουμε θειώδη ανυδρίτη. Η προσθήκη αυτή αποσκοπεί στην προστασία του γλεύκους από διάφορες οξειδώσεις. Ωστόσο ο θειώδης ανυδρίτης εισέρχεται στο κύτταρο και δεσμεύεται από διάφορε ουσίες. Μία από αυτές τις ενώσεις είναι η ακεταλδεΰδη που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση από με την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Το so2 δεσμεύεται σταθερά με αυτή την ένωση με αποτέλεσμα να μη μπορεί να αναχθεί προς αιθανόλη μέσω της δεύτερης ενζυμικής αντίδρασης. Έτσι χωρίς τη δυνατότητα της παραπάνω μετατροπής ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων του NADH είναι η 1-φωσφορική ακετόνη. Η ένωση αυτή παράγεται από την οξείδωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης και αναγωγή της παραχθείσας ένωσης σε 3-φωσφορική γλυκερόλη. Η τελευταία αποαποφωσφορυλιώνεται με απομάκρυνση της φωσφορικής ρίζας υπό μορφή φωσφορικού οξέος σε γλυκερόλη.

Κατά τη συγκεκριμένη μεταβολική οδό μόνο 2 μόρια ATP παράγονται για κάθε μόριο εξόζης που αποικοδομείται. Το ATP χρειάζεται για την ενεργοποίηση της γλυκόζης (παραγωγή 6-φωσφορικής γλυκόζης) κατά το πρώτο βήμα της γλυκόλυσης. Εν τέλει κατά την γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση το ενεργειακό κέρδος για το κύτταρο είναι μηδέν αφού όπως αναφέρθηκε τα 2 μόρια ATP που παράγονται καταναλώνονται εκ νέου στα πρώτα στάδια της γλυκόλυσης. Ωστόσο οι υψηλές συγκεντρώσεις της γλυκόζης κατάτην έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης επάγουν την παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων γλυκερόλης. Στις συνθήκες αυτές ο μικροοργανισμός παράγει μεγαλύτερες ποσότητες της τελευταίαστις οποίες δεν απελευθερώνει εκτός κυτταροπλάσματος με σκοπό την εξισορόπηση της ωσμοτικής πίεσης.

Η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση δεν πραγματοπιείται αποκλειστικά σε περιβάλλοντα με υψηλές συγκεντρώσεις θειώδους. Στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης οι ζύμες χρειάζονται οξυγόνο για την ανάπτυξή τους γιατί η εισαγωγή του πυροσταφυλικού οξέος στην αναπνευστική αλυσίδα αποδίδει μεγαλύτερη παραγωγή ATP. Έτσι υπό αυτές τις συνθήκες η πυροσταφυλική ααποκαρβοξυλάση και η αλκοολική αφυδρογονάση είναι ανενεργές. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μικρή παραγωγή ακεταλδευδης η οποία κατεπέκταση σημαίνει ότι το NADH δε χρησιμοποιεί την τελευτάι για την οξείδωσή του αλλά τη φωσφορική δι-υδροξυ-ακετόνη. Με αυτό τον τρόπο παράγονται ορισμένα από τα δευτερογενή προιόντα όπως είναι η γλυκερόλη, το πυροσταφυλικό οξύ και διάφορα παράγωγα του τελευταίου όπως είναι το διακετύλιο και το ηλεκτρικό οξύ.

1.6)Παρεμπόδιση υποστρώματος

Σε περιπτώσεις που στο μέσο της ζύμωσης απαντώνται αυξημένες συγκεντρώσεις σακχάρων η εισαγωγή τους στο κύτταρο και η αποικοδόμησή τους παρεμποδίζεται. Το εν λόγω φαινόμενο καλείται παρεμπόδιση υποστρώματος. Κατά την οινοποιήση είναι συνηθισμένο να προστίθεται συμπυκνωμένο γλέυκος σταφυλής. Η προσθήκη αυτή εμπεριέχει τον κίνδυνο της πλήρους διακοπής της ζύμωσης μιας και η συγκέντρωση των προστιθέμενων σακχάρων είναι πολύ υψηλή. Αυτό συμβαίνει γιατί τα μόρια του υποστρώματος προσκολλόνται ταυτόχρονα στους πρωτεινικούς μεταφορείς με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η συνολική τους ένωση και κατεπέκταση η μεταφορά τους στο εσωτερικό του κυττάρου. Ωστόσο η παρεμπόδιση υποστρώματος μπορεί και να λάβεις χώρα σε υποστρώματα με μικρότερες συγκεντρώσεις σακχάρων όπως 8g/L γλυκόζης.

1.6.1)Φαινόμενο Crabtree και φαινόμενο Pasteur

Εκτός από την παρουσία ή όχι οξυγόνου στο μέσο το μεταβολικό μονοπάτι που θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός καθορίζεται από 2 φαινόμενα. Αυτά είναι το φαινόμενο Crabtree και το φαινόμενο Pasteur.

Φαινόμενο Crabtree

Η συγκέντρωση σακχάρων στο μέσο επηρεάζει τον τρόπο μεταβολισμού τους. Σε καλλιέργειες ζυμών που η συγκέντρωση σακχάρων ξεπερνάει μία κρίσιμη τιμή (2-5 g/L) ο καταβολισμός των υδατανθράκων ακολουθεί το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης ανεξαρτήτως από το ποσό συγκέντρωσης οξυγόνου που βρίσκεται στο μέσο.

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

Φαινόμενο Pasteur

Το δεύτερο φαινόμενο που καθορίζει το μεταβολισμό των σακχάρων είναι το φαινόμενο Pasteur. Σύμφωνα με αυτό η αλκοολική ζύμωση παρεμποδίζεται από την αναπνοή. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση 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 οξυγόνου ευνοεί την οδό της αναπνευστικής αλυσίδας και το σχηματισμό βιομάζας ενώ μειώνει την παραγωγή΄ αιθανόλης και την κατανάλωση σακχάρων.

Εκτός από το φαινόμενο Pasteur και Crabtree , υπάρχουν δύο άλλα είδη του κανονισμού του ζυμωτικού μεταβολισμού από στελέχη ζυμομύκητα που παράγουν αλκοόλη, και είναι τα Kluyver και Custers**.**

Η επίδραση **Kluyver** υποδηλώνει την απουσία της αλκοολικής ζύμωσης υπό την παρουσία οξυγόνου κατά τη διάρκεια της μειωμένης ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα σακχάρου, συχνά δισακχαρίτη, έστω και αν η γλυκόζη είναι άμεσα ζυμώσιμη[28]

. Είναι γνωστό ότι διάφορα είδη ζύμης μπορούν να αναπτυχθούν σε διάφορα σάκχαρα. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις, η ανάπτυξη σε ορισμένα σάκχαρα (ιδιαίτερα ολιγοσακχαρίτες) συμβαίνει μόνο υπό αερόβιες συνθήκες, και όχι σε αναεροβίωση και εν απουσία της αναπνοής. Η ζύμωση είναι αποκλεισμένη κάτω από αυτές τις συνθήκες. Αυτή η φαινομενική εξάρτηση της χρησιμοποίησης ζάχαρης στην αναπνοή έχει κληθεί Kluyver αποτέλεσμα, [29]. Τέλος, η επίδραση **Custers** αναφέρεται στην αναστολή της ζύμωσης κάτω από αναερόβιες συνθήκες, και έχει θεωρηθεί ως ένα κοινό βιοχημικό χαρακτηριστικό των ζυμών που ανήκουν κυρίως στα γένη *Brettanomyces* και *Dekkera* [30]. Αυτές οι ζύμες ζυμώνουν γλυκόζη σε αιθανόλη και οξικό οξύ κάτω από αερόβιες συνθήκες [31, 32].Ωστόσο, κατά τη μετάβαση σε αναερόβιες συνθήκες, η ζύμωση αναστέλλεται έντονα. Αυτός ο φαινότυπος μπορεί να διασωθεί πλήρως από την επανεισαγωγή του οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας [33].

1.7) Το φαινόμενο της Αναπνοής

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 και ενός μορίου NAD+ . Αυτή η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, NAD και ακετυλοσυνένζυμου Α(ακετυλο coA). Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:

Πυροσταφυλικό οξύ+CoA+NAD+ -----------> ακετυλο- CoA+ CO2+NAD+ H+

Την παραπάνω αντίδραση καταλύει το ένζυμο πυροσταφυλική αφυδρογονάση. Το σύστημα αυτό βρίσκεται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου και αποτελέιται από 3 ένζυμα. Το καθένα καταλύει μία διαφορετική αντίδραση η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ακετυλο-Α.

Σύμπλεγμα της Πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (STRYER 2004)

Ένζυμο	**Συντομογραφία**	**Προσθετική ομάδα**	**Αντίδραση που καταλύεται**
Συνιστώσα της πυροδταφυλικής αφυδρογονάσης	E1	TPP	Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού
Διυδρολιπόυλο-τρανσακετυλάση	E2	Λιποαμίδιο	Μεταφορά της ακετυλικής ομάδας στο CoA
Διυδρολιπόυλο-αφυδρογονάση	E3	FAD	Αναγέννηση της οξειδωμένης μορφής του λιποαμιδίου

Μετά τη δημιουργία του ακετυλο-CoA ξεκινά ο κύκλος του κιτρικού οξέος. Σε αυτή τη μεταβολική οδό το ακετυλο –CoA οξειδώνεται πλήρως σε CO2 σε μία σειρά αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στα μιτόχονδρια. Μετά τον κύκλο του Krebs τα ηλεκτρόνια που έχουν αποθηκευτεί στους μεταφορείς (NADH , FADH2) μεταφέρονται διαμέσου της αναπνευστικής αλυσίδας (οξειδωτική φωσφορυλίωση) στον τελικό αποδέκτη τους ο οποίος είναι το οξυγόνο. Για κάθε ζεύγος ηλεκτρονίων που καταλήγουν στο οξυγόνο από το NADH παράγονται 2,5 μόρια ATP ενώ από το FADH2 παράγονται 1,5 μόρια ATP. Είναι φανερό ότι οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε αερόβιες συνθήκες επιφέρουν πολύ μεγαλύτερα ποσά ενέργειας (30 ATP) σε σχέση με το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμβσης (4 ATP).

1.8)Entner-Dudoroff οδός

Η παραγωγή αιθανόλης από το βακτηριακό στέλεχος *Zymomonas mobilis* εκτός από τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς όπως *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum (carlbergensis), Saccharomyces rouxii, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis, Candida tropicalis, Candida oleophila, Hanseniaspora spp. και Mucor rouxianus* αναφέρονται ως ικανοί μικροοργανισμοί να παράγουν αλκοόλη σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας, η αιθανόλη ωστόσο μπορεί να παράγεται και από διάφορους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς που ανήκουν στο είδος *Zymomonas mobilis, Clostridium acetobutylicum, Clostridium thermosaccharolyticum, Clostridium sporogenes, Thermoanaerobacter ethanolicus και Bacillus stearothermophilus* [34, 35, 36, 37]. Δεδομένου ότι από βιομηχανικής άποψης, η βιοαιθανόλη γενικά παράγεται από στελέχη που ανήκουν στο είδος *Zymomonas mobilis και Saccharomyces spp.* (συνήθως είδη που αναφέρονται στη βιβλιογραφία οτι παράγουν μεγάλες ποσότητες αιθανόλης είναι τα *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces carlsbergensis- uvarum*), στη συνέχεια θα επικεντρωθούμε στη βιοσύνθεση της αιθανόλης από Zymomonas mobilis.

Το βακτήριο Zymomonas mobilis είναι ανίκανο να μεταβολίσει πεντόζες (π.χ. ξυλόζη ή αστικά, βιομηχανικά, αγρο-βιομηχανικά απόβλητα που περιέχουν ξυλόζη), ως εκ τούτου, οι γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί από τα παραπάνω είδη είναι ικανά να διασπούν την ξυλόζη ενέργεια που είναι απαραίτητη για να προχωρήσουμε στη ζύμωση [38, 39, 40, 41].

Ο Zymomonas mobilis παράγει αιθανόλη κάτω από αναερόβιες συνθήκες, ενώ Saccharomyces spp. παράγει αιθανόλη τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες (βλέπε προηγουμένως φαινόμενο Crabtree). Η απόδοση της αντίδρασης και στις δύο περιπτώσεις είναι η ίδια, δίνοντας γενιά των 2 moles αιθανόλης και 2 moles του διοξειδίου του άνθρακα από 1 mole της καταβολισμό της ζάχαρης [42, 37]. Υπάρχουν Θεμελιώδεις βιοχημικές διαφορές μεταξύ της ζύμωση που διεξάγεται από *Zymomonas mobilis* σε σχέση με εκείνη που διεξάγεται από τα στελέχη ζυμομυκήτων. Ο μικροοργανισμός *Zymomonas mobilis* καταβολίζει το υπόστρωμα ζάχαρης μέσω *του Entner- Dudoroff γλυκόλιτικής οδού* [37], ενώ, τα στελέχη ζύμης μέσω της οδού γλυκόλυσης EMP [43, 42]. Από την ανάλυση αυτή μπορεί να συναχθεί ότι στην ζύμωση που διεξάγεται από τα στελέχη του *Zymomonas mobilis*, για 1 mol της καταβολίζόμενης εξόζης παράγεται 1 mole του ATP , ενώ στην μετατροπή που πραγματοποιείται από στελέχη ζύμης, παράγονται 2 moles ATP ανά γραμμομόριο εξόζης που καταβολίζεται. Το παραπάνω γεγονός έχει σαν συνέπεια, η παραγωγή βιομάζας να είναι μικρότερη όταν χρησιμοποιούνται στελέχη *Zymomonas mobilis* σε σχέση με την ζύμωση που διεξάγεται από ζυμομύκητες. Αντιθέτως, όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεν υπάρχουν μεταβολές στο τελικό φάσμα των τελικών προϊόντων ζύμωσης δεδομένου ότι σε αμφότερες τις περιπτώσεις, η στοιχειομετρική αντίδραση είναι η ίδια, δίνοντας 2 moles αιθανόλης και 2 moles του διοξειδίου του άνθρακα από 1 γραμμομόριο καταβολιζόμενης γλυκόζης. Η μέγιστη θεωρητική απόδοση, ως εκ τούτου, σε αμφότερες τις περιπτώσεις (χρησιμοποίηση των δύο *Zymomonas mobilis* ή ζυμομύκητες) είναι ~ 0,51 g αιθανόλης που παράγεται ανά 1 g ζάχαρης που καταναλώνεται [43, 44 , 42, 35,37].

Άλλες βιοχημικές διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ της ζύμωσης που διεξάγεται από Zymomonas mobilis και από ζυμομύκητες, είναι ότι στην πρώτη περίπτωση κατά το μεταβολισμό *του Zymomonas mobilis* μπορούν να παραχθούν παραπροϊόντα ζύμωσης όπως μαννιτόλη, σορβιτόλη, διυδροξυ-ακετόνη, ενώ τα στελέχη *Saccharomyces spp.* παράγουν (εκτός από αιθανόλη), κυρίως γλυκερίνης [35, 37].

Τόσο ο *Zymomonas mobilis* και τα στελέχη *Saccharomyces spp.* μπορούν να ανεχθούν μέχρι 120 - 140 g / L αιθανόλης [16, 25, 54]. Η παραγωγή βιομάζας από στελέχη *Zymomonas mobilis* είναι σχεδόν δύο φορές λιγότερη, σε σύγκριση με την αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται από τον *Saccharomyces cerevisiae*. Η μέγιστη θεωρητική απόδοση αιθανόλης (EtOH) ανά μονάδα ολικών σακχάρων (TS) που καταναλώνεται (YEtOH / TS) είναι 0,51 g / g και για τους δύο μικροοργανισμούς.

1.9)Η αιθανόλη ως βιοκαύσιμο

Η αιθανόλη είναι μία εξαιρετικής σημασίας χημική ένωση η οποία χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που συμπεριλαμβάνει τα αλκοολούχα ποτά, τη βιοαιθανόλη καθώς και τη φαρμακοποιία. Η πλειονότητα του ποσοστού αιθανόλης που παράγεται προέρχεται κυρίως από βιοτεχνολογικές ζυμώσεις ενώ το υπόλοιπο παράγεται με τη χρήση αιθένιου (που προέρχεται από πυρόλυση αργού πετρελαίου ή και φυσικού αερίου) χρησιμοποιώντας τον ατμό και το φωσφορικού οξύ ως καταλύτη (συνθετική αιθανόλη). Η αντίδραση της συνθετικής παραγωγής αιθανόλης παράγει επίσης τοξικά υποπροϊόντα, έτσι δεν είναι χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση. Η βιοαιθανόλη ως προϊόν ζύμωσης υφίσταται επεξεργασία που περιλαμβάνει εμπλουτισμό της με απόσταξη / και αφυδάτωση.

Η αιθανόλη ως καύσιμο, η οποία χαρακτηρίζεται από καθαρή καύση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου δεδομένου ότι μειώνει τα ρυπογόνα αέρια όπως είναι το διοξείδιο του άνθρακα. Επιπλέον η χρήση των γεωργικών-βιομηχανικών υπολλημάτων ως πρώτη ύλη στην αλκοολική ζύμωση δεν αποτελεί μόνο εναλλακτική λύση σε υποστρώματα, αλλά δίνει τη λύση στο πρόβλημα διάθεσής τους. Επιπρόσθετα, η αιθανόλη ως ένα βιοδιασπώμενο και σχετικά υψηλά διαλυτό στο νερό υλικό, έχει χαμηλή τοξικότητα και ως εκ τούτου, οι συνέπειες των μεγάλων διαρροών καυσίμων απειλούν πολύ λιγότερο το περιβάλλον από ό, τι εκείνα που συνδέονται με το αργό πετρέλαιο ή βενζίνη [45]. Τέλος, το δυναμικό της παραγωγής βιοαιθανόλης κάτω από εντελώς μη άσηπτες συνθήκες [46-48, 49-50] καθιστά αυτή τη βιοδιαδικασία ως ένα πολύ σημαντική σε εφαρμογές στο βιομηχανικό τομέα. Η αιθανόλη ως καύσιμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μείγμα με βενζίνη σε ποσοστά από 5% έως 85% [51-52, 53]. Τα πιο δημοφιλή μείγματα είναι γνωστά ως Ε85 (85% βιοαιθανόλη, 15% βενζίνη), Ε20 (20% βιοαιθανόλη, 80% βενζίνη) και Ε10 (10% βιοαιθανόλη, 90% βενζίνη). Ονομάζεται επίσης gasohol στις ΗΠΑ) [51-52,53].

Οι μεγάλες απλές πηγές άνθρακα που μπορούν να μετατραπούν σε αιθανόλη είναι η γλυκόζη (και άλλες εξόζες), δισακχαρίτες (κυρίως σακχαρόζη), ξυλόζη και γλυκερόλη. Η γλυκόζη μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη με τη βοήθεια από ένα από τους σημαντικότερους παραγωγούς αιθανόλης, κυρίως του σακχαρομύκητα *Saccharomyces serevisiae* και το βακτήριο *Zymomonas mobilis* . Ξυλόζη μπορεί να υποστεί ζύμωση με ζύμες, όπως *Pachysolen tannophilus, Candida shehatae και Pichia stipis,* ή με ισομερισμού της ξυλόζης σε ξυλουλόζη με το ένζυμο (ξυλόζη) ισομεράση της γλυκόζης και μετέπειτα ζύμωσης της με ζύμες αρτοποίησης, *Saccharomyces cerevisiae* [54].

1.10) Οίνος και Πτητικές Ενώσεις

Η οσμή και η γεύση του οίνου σχετίζονται άμεσα με όλη τη διαδικασία της οινοποίησης. Το άρωμα προέρχεται από

1) Τα στέμφυλα
2) Το είδος της επεξεργασίας του γλεύκους και τον τρόπο ζύμωσης του
3) Την ωρίμανση του οίνου

Η αισθητηριακή αντίληψη του κρασιού είναι εξαιρετικά περίπλοκη. Κατ' αρχάς, το κρασί περιέχει ένα πολύ μεγάλο αριθμό αρωματικών ενώσεων. Τα τερπένια, οι εστέρες, οι μεθοξυπυραζίνες και οι αλδεΰδες προσδίδουν διακριτά αρώματα και γεύσεις όπως λουλούδια, φρούτα, πιπέρι, και ξύλο στο κρασί Ο γεύση του κρασιού μπορεί να περιγραφεί ως γλυκιά, ξινή, αλμυρή, και πικρή, και γενικά αυτές οι ιδιότητες είναι το αποτέλεσμα της παρουσίας των σακχάρων, των πολυφαινολών, και φλαβονοειδών ενώσεων . Ενώσεις όπως η γλυκερόλη, οι πολυσακχαρίτες, και οι μαννοπρωτεϊνες συνεισφέρουν στο ιξώδες και στην αίσθηση στο στόμα , οι ανθοκυανίνες με το χρώμα , και η αιθανόλη σε ένα αποτέλεσμα στο στόμα με τη θέρμανση .Το Άρωμα που απελευθερώσετε και η αντίληψη είναι, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από φυσικές και περιβαλλοντικές πτυχές, όπως η θερμοκρασία του οίνου ή ακόμη και το σχήμα του γυάλινου ποτηριού που τοποθετείται ο οίνος το οποίο μπορεί να αλλάξει σημαντικά την αντίληψη του αρώματος και τη γεύση [55]

Οι πτητικές οργανικές ουσίες του κρασιού είναι ίσως το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα τόσο για το γευσιγνώστη όσο και για τον οινοποιό. Τρεις είναι οι πηγές που αναγνωρίζονται

1) Το πρωτογενές άρωμα που προέρχεται από τα στέμφυλα
2) Το δευτερογενές που προκύπτει από τον τρόπο οινοποίησης και
3) Το τριτογενές άρωμα που προκύπτει από την αποθήκευση και τις μετέπειτα επεξεργασίες του οίνου, ειδικότερα κατά την παραμονή των οίνων σε δρύινα βαρέλια.

Ως αποτέλεσμα της εξελιγμένης αναλυτικής επεξεργασίας που περιλαμβάνει την αέρια χρωματογραφία η οποία έχει αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 400 πτητικές ουσίες και πολλές από αυτές έχουν ποσοτικοποιηθεί σε διάφορους οίνους.

Σε πρακτικό επίπεδο οι ουσίες αυτές βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό στον οίνο. Για να γίνει αντιληπτή οποιαδήποτε αρωματική ουσία πρέπει να βρίσκεται στην πτητική της κατάσταση.

1.10.1) Αρωματικές ενώσεις και ζύμες

Η ποικιλομορφία και η σύνθεση της ζύμης συμβάλει σημαντικά στην επίτευξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του κρασιού. Η ανάπτυξη της κάθε είδους ζύμης στον οίνο χαρακτηρίζεται από μια συγκεκριμένη μεταβολική δραστηριότητα, η οποία προσδιορίζει τις συγκεντρώσεις των ενώσεων στο τελικό προϊόν .

Ωστόσο, πρέπει να υπογραμμιστεί ότι σε κάθε σημαντικό στέλεχος έχει καταγραφεί μέγάλη μεταβλιτότητα. Η ευρεία χρήση των εναρκτήριων καλλιέργειων, εφαρμόζεται κυρίως για να μειωθεί ο κίνδυνος αλλοίωσης και οι απρόβλεπτες αλλαγές στη γεύση του κρασιού, οπότε μπορεί να εξασφαλίσει μια ισορροπημένη γεύση στο κρασί, αλλά ταυτόχρονα να προκαλέσει και απώλεια από το χαρακτηριστικό άρωμα και τη γεύση.

1.10.2) Οι ομάδες των αρωματικών

1) Αλκοόλες

Οι αλκοόλες διακρίνονται κατά το Σουφλερό (93), στις μονο-αλκοόλες και στις πολυαλκοόλες ή πολυόλες. Οι κυριότερες μονο-αλκοόλες έχουν C3 (προπανόλη-1,ισοπροπανόλη), C4 (βουτανόλη-1, ισοβουτανόλη), C5 (ισοαμυλική, μεθυλο-2-βουτανόλη-1, πεντανόλη-1), C6 (εξανόλη-1) και C8 (φαινυλο-2 αιθανόλη)

Οι κυριότερες πολυαλκοόλες είναι η γλυκερόλη και η 2,3-βουτανοδιόλη.Το τεχνολογικό ενδιαφέρον των μονοαλκοολών είναι η συμμετοχή τους στη σύνθεση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων. Όταν οι ενώσεις αυτές περιέχονται σε μικρές ποσότητες ασκούν ευνοϊκή επίδραση στο άρωμα των οίνων, δε συμβαίνει όμως το ίδιο όταν οι ουσίες αυτές περιέχονται σε ποσότητες μεγαλύτερες από 500-600 mg/L Ποσοτικά, οι πιο σημαντικές μονο-αλκοόλες είναι η προπανόλη, η 2-μεθυλο-προπανόλη (ισοβουτανόλη), οι αμυλικές αλκοόλες (3-μεθυλο- και 2-μεθυλο-βουτανόλη) και η 2-φαινυλοαιθανόλη. Οι περισσότεροι βέβαια ερευνητές θεωρούν ότι συνεισφέρουν περισσότερο στην ένταση του αρώματος του οίνου παρά στην ποιότητά του, η οποία μειώνεται σημαντικά εάν ξεπερνούν τα 400 mg/L .Εξαίρεση αποτελεί η 2-φαινυλοαιθανόλη, της οποίας η συγκέντρωση στους οίνους έχει συσχετισθεί θετικά με την ποιότητά τους αντίθετα με τους εστέρες, σύμφωνα με το Jackson συνεισφέρουν αρνητικά στο άρωμα και στη γεύση των οίνων. Οι ανώτερες αλκοόλες που παράγονται από την οδό Ehrlich με την παρουσία αμινοξέων και από σάκχαρα μέσω βιοσύνθεση από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζυμώση είναι οι 3-μεθυλο βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη), 2-μεθυλο βουτανόλη (ενεργός αμυλικής αλκοόλης), ισο-βουτανόλη (2-μεθυλοπροπανόλη) και η-προπανόλη (1-προπανόλη) είναι τα συστατικά ανώτερες αλκοόλες. (The influence of Kloeckera apiculata and Candida pulcherrima yeasts on wine fermentation D.E. Zohre, H. Erten). Οι ανώτερες αλκοόλες αποτελούνται από την α) αιθανόλη η οποία έχει γλυκερή μεσαίας έντασης οσμή β) τις ανώτερες αλκοόλες που περιλαμβάνουν αλυσίδες από 3-6 άτομα C και έχουν βαριά οσμή διαλυτικού**1-**προπανόλη, 2-μεθυλ-1-προπανόλη (ισοβουτυλική αλκοόλη), 3-μεθυλ-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη)

Μεθυλ-βουτανόλη: βερνίκι νυχιών

- Ποσότητες < 400 mg/L συμμετέχουν θετικά
- Ποσότητες > 400 mg/L δίνουν ανεπιθύμητες βαριές οσμές

γ) και τις αλκοόλες που αποτελούνται από περισσότερα από 6 άτομα C και έχουν χαρακτηριστική χορτώδη οσμή [56].

2) Αλδεΰδες

Ο Ribereau-Gayon et al(2000) καταγράφει 18 αλδεΰδες (οι περισσότερες από αυτές είναι αλκύλια)στο κρασί αλλά ισχυρίζεται ότι εκτός από την ακεταλδεΰδη (αιθανάλη) οι υπόλοιπες βρίσκονται σε σημαντικά μικρές ποσότητες. Ενώ οι αλδεΰδες βρίσκονται στα στέμφυλα κατά την οινοποίηση το μεγαλύτερο ποσοστό τους θα οξειδωθεί σε αντίστοιχες αλκοόλες. Οι εξανάλη, η 2-εξανάλη και η 3 εξανάλη έχει διαπιστωθεί ότι βρίσκονται στα στέμφυλα και έχουν μελετηθεί ιδιαιτέρως.

Τα αρωματικά χαρακτηριστικά των αλδεϋδών η οσμή καραμέλας προερχόμενη από τη φουρφουράλη κατόπιν θερμικής επεξεργασίας, η οσμή πικραμύγδαλου(βενζαλδευδη) καθώς η κανέλλα και η βανίλια που προκύπτουν από φαινολικές αλδεΰδες.(βλίο με αρωματικα)

3) Κετόνες

Οι κετόνες επηρεάζουν ελάχιστα το άρωμα και βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Τέτοιες είναι το διακετύλιο (2,3- βοτενδιόνη) που σε μικρές συγκεντρώσεις προσδίδει ένα λεπτό άρωμα φουντουκιού βουτύρου ενώ σε μεγάλες (0,2 – 0,4 mg/L) προκαλεί αρνητική βουτυρώδη-γαλακτώδη οσμή.

4) Εστέρες

Οι εστέρες αποτελούν αριθμητικά το μεγαλύτερο μέρος των αρωματικών ενώσεων και παράγονται από τους σακχαρομύκητες. Οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων και οι οξικοί εστέρες των αλκοολών απαντούν με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους οίνους και ακολουθούν, σε μικρότερες ποσότητες, εστέρες των υδροξυοξέων, κετοξέων και αρωματικών οξέων με αλκοόλες ή πολυόλες. Σε σχέση με τη συνεισφορά των εστέρων στην οσφρητική και γευστική αντίληψη των οίνων, οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων και οι οξικοί εστέρες θεωρούνται οι πιο σημαντικοί διότι προσδίδουν οσμές φρούτων και λουλουδιών παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται συχνά για να περιγράψουν τους οίνους.

Οι Εστέρες παίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο στο άρωμα του κρασιού και ανήκουν συνήθως στο δευτερογενές άρωμα του οίνου. Οι εστέρες προκύπτουν από την αντίδραση αιθυλικής αλκοόλης και ενός οξέος, ενεργοποιημένου από το συνένζυμο Α. Σχηματίζονται κυρίως από τους μικρο-οργανισμούς, αλλά μπορεί να υπάρχουν και σε μικρές ποσότητες στο σταφύλι (συμβάλλουν στο άρωμα - υδρόλυση με το χρόνο). Χαρακτηριστικά παραδείγματα εστέρων είναι

- Οι Αιθυλεστέρες πτητικών οξέων (αιθανόλη + πτητικό οξύ)
- Οξικός αιθυλεστέρας : >150 mg/L κόλλα
- Βουτυρικός αιθυλεστέρας: τσιχλόφουσκα, φράουλα
- Εξανοικός αιθυλεστέρας (C8-C12): μήλο, ανανάς
- Οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών (οξικό οξύ + ανώτερη αλκοόλη)
- Ισοαμυλικός αιθυλεστέρας: μπανάνα
- Οξικός φαινεθυλεστέρας: τριαντάφυλλο, ροδόνερο Μικρής αλύσου : φρούτα, λουλούδια

Στατιστικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί για το άρωμα του οίνου συσχετίζουν θετικά την ποιότητά του με τη συγκέντρωση των αιθυλεστέρων των C6, C8 και C10 λιπαρών οξέων, του οξικού αιθυλεστέρα, του οξικού εστέρα της 3-μεθυλο- βουτανόλης, της 2-φαινυλοαιθανόλης (phenethyl alcohol) και της εξανόλης (1- hexanol). Άλλοι εστέρες που θεωρείται ότι συνεισφέρουν σημαντικά στο άρωμα του οίνου είναι ο αιθυλεστέρας του δεκ-9-ενοϊκού οξέος και του 2-υδροξυ-προπανοϊκο οξέος (propanoic acid, 2-hydroxyl ethyl ester)(20).

Ανάμεσα στους παράγοντες που επηρεάζουν το ποσό των εστέρων που βρίσκονται στο κρασί είναι το ίδιο το *σταφύλι* (η *ποικιλία*, η *φυσιολογία του φυτού* καθώς και *το στάδιο ωρίμανσης*). Εφόσον όμως τα σταφύλια δεν είναι η κύρια πηγή προέλευσης εστέρων στο κρασί οι παράγοντες αυτοί δεν έχουν ερευνηθεί ιδιαίτερα. Ουσιαστικά, καθοριστικό ρόλο στη συγκέντρωση των εστέρων στο κρασί παίζουν οι συνθήκες *ζύμωσης* και *παλαίωσης [57]*

Λακτόνες

Είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση και ιδιαίτερα στα φρούτα και φυτά. Οι λακτόνες όμως στον οίνο είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με το βαρέλι.

Οι πιο σημαντικές λακτόνες για το άρωμα των οίνων είναι η σολερόνη (solerone: γ-λακτόνη του 4-ακέτυλο-4-υδροξυ-βουτανοϊκού οξέος), η σοτολόνη (sotolone: 4,5-διμεθυλο-3-υδροξυ-2(5Η)-φουρανόνη) και οι λακτόνες δρυός (oak lactones: ισομερή της γ-λακτόνης του 3-μεθυλο-4-υδροξυ-οκτανοϊκού οξέος [58].

5) Τερπένια

Τα τερπένια αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ενώσεων, διότι καθορίζουν τον αρωματικό χαρακτήρα ορισμένων ποικιλιών. Σε αντίθεση με τις περισσότερες ενώσεις που ανιχνεύονται στους οίνους, τα τερπένια προέρχονται από τα σταφύλια. Συναντώνται υπό τη μορφή των μονοτερπενοειδών αλκοολών ή των οξειδίων τους, ενώσεις οι οποίες είναι πτητικές και συνεισφέρουν στο άρωμα των οίνων. Ένα σημαντικό επίσης ποσοστό τερπενίων, υπάρχει υπό τη μορφή συμπλέγματος με γλυκοσίδες ή ως διόλες ή τριόλες. Οι δομές αυτές όμως δεν είναι πτητικές, οπότε δεν συνεισφέρουν στο άρωμα. Ωστόσο, είναι δυνατόν με ενζυμική υδρόλυση αυτών των συστατικών, να απελευθερωθούν τερπένια και με αυτόν τον τρόπο να ενισχυθεί το άρωμα πολλών οίνων [59,60,58]

Τα τερπένια και τα παράγωγά τους είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και υπάρχουν σε διαφορετικές ποσότητες στα στέμφυλα. Ανήκουν στο πρωτογενές άρωμα.

Τα κυριότερα εξ αυτών είναι

1) LINALLOL 3,7-DIMETHYL-1,6-OCTADIEN-3-OL
2) Geraniol3,7-dimethyl-octo-2-6-dien-1-ol
3) Citronellol
4) Ho-trienol
5) Cyclic terpenols

7) Πυραζίνες

Προέρχονται από το σταφύλι και προσδίδουν τη χαρακτηριστική οσμή της πράσινης πιπεριάς, πατάτας και φιστικιού[56].

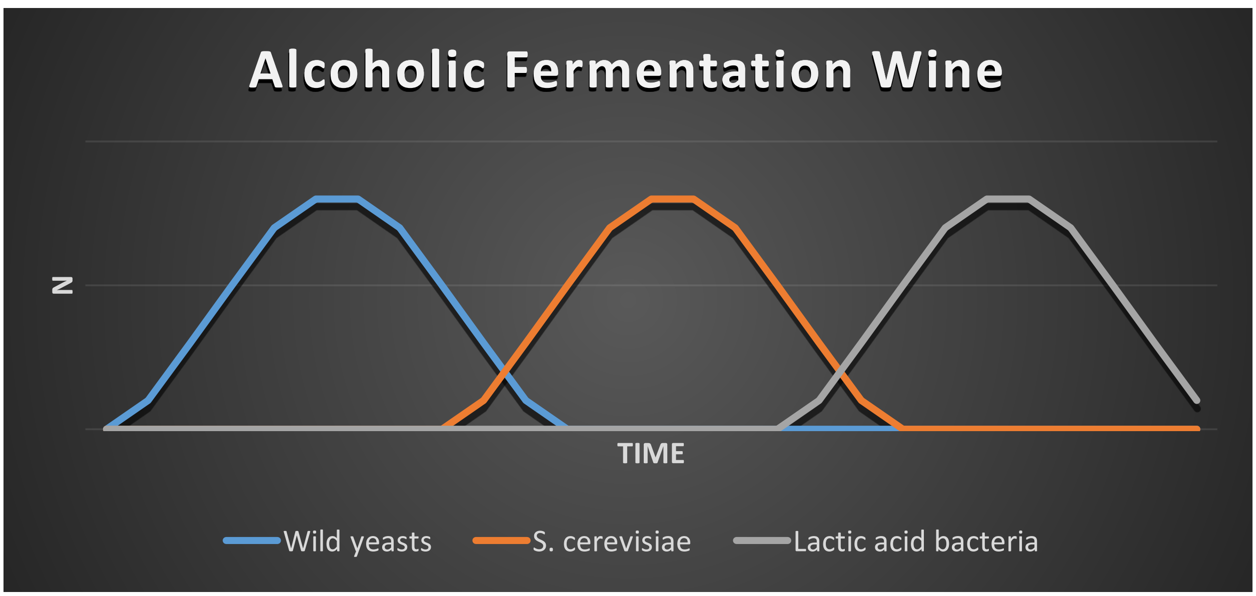
8) Λιπαρά οξέα

Ανάμεσα στα διάφορα οξέα που έχουν βρεθεί στους οίνους, τα λιπαρά οξέα αποτελούν τα μόνα που θεωρούνται πιθανά για τη συνεισφορά τους στο άρωμα. Αυτό οφείλεται στο χαμηλό όριο ανίχνευσης που έχουν, στις σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις τους στους οίνους, σε σχέση με τα υπόλοιπα οξέα, και στην επαρκή πτητικότητά τους σε συνήθεις θερμοκρασίες. Το άρωμα των λιπαρών οξέων έχει περιγραφεί να μοιάζει με αυτό του ξυδιού, βουτύρου, τυριού, λαχανικών, και σάπωνα, καθώς αυξάνει το μοριακό βάρος .

Οι Rapp & Mandery αναφέρουν ότι το οξικό, προπανοϊκό, βουτανοϊκό και2-μεθυλο-προπανοϊκό οξύ είναι αρκετά πτητικά έτσι ώστε να συνεισφέρουν στο άρωμα των οίνων. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις τους στους οίνους που μελέτησαν ήταν μικρότερες από το όριο ανίχνευσής τους. Τα *λιπαρά πτητικά οξέα* ανευρίσκονται μόνο σε ίχνη στο γλεύκος. Η παρουσία τους στους οίνους οφείλεται στο σχηματισμό τους από τους *ζυμομύκητες* και τα βακτήρια [58].

1.11) Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αλκοολικής ζύμωσης, η φυσιολογική συμπεριφορά καθώς και η βιοτεχνολογική συμπεριφορά του μικροοργανισμού *Candida oleophila*. Στα φυσικά μικροοικοσυστήματα βρίσκονται άγριες ζύμες. Αυτές οι ζύμες έχουν τη δυνατότητα παραμονής στο γλεύκος, που προορίζεται για οινοποίηση, μία με δύο ημέρες. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα παρατηρείται αυτόλυση αυτών και τη θέση τους παίρνει ο σακχαρομύκητας *S. Cerevisiae* ο οποίος και καταναλώνει όλα τα σάκχαρα του γλεύκους με ταυτόχρονη παραγωγή αλκοόλης.



Η διεργασίας κατά την οποία καλλιεργήθηκε ο μικροοργανισμός *Candida Oleophila* αναπτύχθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες χωρίς αερισμό σε θρεπτικό μέσο που είχε ως πηγή άνθρακα είτε γλυκόζη, είτε φρουκτόζη είτε γλυκόζη και φρουκτόζη μαζί ενώ ταυτόχρονα προστίθεντο σε κάθε ζύμωση άζωτο, εκχύλισμα ζύμης και τρυγικό οξύ με σκοπό το τελικό υπόστρωμα να προσομοιάζει στη σύσταση του οίνου.

Εφόσον έλαβε χώρα η αλκοολική ζύμωση μελετήθηκαν οι αρωματικές ουσίες του μικροοργανισμού καθώς και το είδος των λιπαρών οξέων που παρήχθησαν.

Ο οίνος είναι ένα παγκόσμιο ανταγωνιστικό προϊόν και η οποιαδήποτε μελέτη μικροοργανισμού που θα μπορούσε να βελτιστοποιήσει την οινοποίηση χρήζει μεγάλης αξίας. Είναι απαραίτητο να γίνουν εκτεταμένες αναλύσεις σχετικά με νέους μικροοργανισμούς καθώς τις τελευταίες μόνο δεκαετίες έχει αναπτυχθεί μεγάλο ενδιαφέρον προς τη μικροβιολογία οίνου.

2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1) Μικροοργανισμοί

Ο μικροοργανισμός που καλλιεργήθηκε είναι ο *Candida Oleophila* και προήλθε από τη συλλογή του εργαστηρίου της μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 βαθμών κελσίου και ανανεώνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα.Ο μικροοργανισμός *Candida oleophila* (*Anamorphic ascomycetous General Deuteromycotina*) έχει βρεθεί από διάφορες μελέτες ότι μπορεί να απομονωθεί από τη φυλλική επιφάνεια διαφόρων φυτών που εκφύονται στην ευρύτερη περιοχή της Μόσχας [61] είτε να βρίσκεται πάνω σε επιφάνειες τροπικών φρούτων[62].

Candida oleophila	
Scientific classification	
Kingdom:	*Fungi*
Phylum:	*Ascomycota*
Subphylum:	*Saccharomycotina*
Class:	*Saccharomycetes*
Order:	*Saccharomycetales*
Family:	*Saccharomycetaceae*
Genus:	*Candida*
Species:	***C. oleophila***

2.2) Συνθήκες Προκαλλιέργειας

Για την έναρξη της κάθε ζύμωσης απαιτούνταν εμβόλιο 10% του συνολικού όγκου του θρεπτικού μέσου στο οποίο θα πραματοποιούταν η αλκοολική ζύμωση. Ο συνολικός όγκος του θρεπτικού μέσου (ενεργός όγκος) όπου θα λάμβανε χώρα η αλκοολική ζύμωση ήταν 3 L. Η ποσότητα του αρχικού εμβολίου ήταν 300 ml.

2.2.1 Προκαλλιέργεια

Σε κωνικές φιάλες των 500 ml προστίθεντο 3 γ/λ yeast extract , 3 g/l και 3 γ/λ peptone καθώς και προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι ο όγκος να γίνει 150 ml (για την κάθε κωνική). Στη συνέχεια οι φιάλες αποστειρώνονταν και όταν είχαν την κατάλληλη θερμοκρασία μετά την αποστείρωση εμβολιάζονταν υπό ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια τοποθετούνταν στον αναδευτήρα για 24 ώρες μέχρι να αναπτυχθεί η προκαλλιέργεια.

2.2.2 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα

Το στέλεχος *C. oleophila* καλλιεργήθηκε σε βιοαντδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας τύπου MCS-2000, MBR Bioriactor AG χωρητικότητας 5 L με δυνατότητα ελέγχου ph , θερμοακρασίας και αριθμό στροφών ανάδευσης. Πριν την προσθήκη του θρεπτικού μέσου έγινε εντατικός καθαρισμός με αιθανόλη 75%.

2.2.3 Θρεπτικό μέσο του βιοαντηδραστήρα

Το θρεπτικό μέσο της κάθε ζύμωσης περιέχει συστατικά σε τέτοιες ποσότητες που να προσομοιάζουν στο κρασί. Το Θρετπικό μέσο περιείχε:

Τρυγικό οξύ= 12g

Yeast extract=15 g

(NH4)2SO4=30g

Όαον αφορά την πηγή άνθρακα σε κάθε ζύμωση ήταν διαφορετική και η ουσία και η ποσότητα της ουσίας. Γενικά χρησιμοιήθηκε γλυκόζη και φρουκτόζη.

Ο όγκος του θρεπτικού μέσου που προστίθεντο στο βιοαντιδραστήρα πριν τον εμβολιασμό ήταν 2,7 L. Ο επιθυμητός τελικός όγκος ήταν 3 L οπότε με την προσθήκη του εμβολίου ο τελικός όγκος που θα περιείχε ο βιοαντηδραστήρας θα ήταν 3 L.

Πριν τον εμβολιασμό πραγματοποιούταν παστερίωση του θρεπτικού μέσου αφού είχε προηγηθεί διόρθωση του ph στο 3,6 με προσθήκη 5 M NaOH. Μετά την παστερίωση η θερμοκρασία ρυθμιζόταν στους 25 βαθμούς κελσίου.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες γινόταν ο εμβολιασμός. Αφού καθαριζόταν πολύ καλά η επιφάνειες(το πάνω μέρος του βιοαντιδραστήρα με αιθανόλη ο εμβολιασμός γινόταν γρήγορα και δίπλα από φλόγα. Αφού αδειάζονταν και οι 2 κωνικές φιάλες στον βιοαντιδραστήρα αναδευόταν όλο το θρεπτικό μέσο σε πολλές στροφές έτσι ώστε να κατανεμηθεί το εμβόλιο ομοιόμορφα σε όλο το θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια ρυθμίζονταν η ανάδευση τόσο όσο να μην ταράζεται η επιφάνεια του μέσου: 120 rpm. Παρατηρήθηκε ότι το p H καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης δεν άλλαξε οπότε και δε χρειάστηκε περεταίρω διόρθωση.

2.3) Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας

Ο προσδιορισμός της κυτταρικής βιομάζας γινόταν με τη βοήθεια φασματοτοφωτόμετρου στα 640 nm . Ως πρότυπο λαμβανόταν φυγοκνετρημένο δείγμα ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υπερκείμενο υγρό.

2.4) Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας

Λαμβάνονταν δείγμα 40 ml και κατόπιν τοποθέτησης του σε φυγόκεντρο Universal 329 R της εταιρίας HETTICH. Λαμβάνονταν το διήθημα με απιονισμένο νερό και τοποθετούταν σε φιάλη τύπου Mc Cartney. Στη συνέχεια μεταφερόταν το δοχείο σε φούρνο Heraus τύπου A1 στους 80 βαθμούς κελσίου για 24 ώρες. Ζυγίζονταν οι φιάλες Mc Cartney πριν και μετά την ξήρανση σε ζυγό ακριβείας Ker new 420-3NM (3 δεκαδικών ψηφίων) και εκφραζόταν σε g/L.

2.5) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης γλυκόζης και φρουκτόζης.

Ο προσδιορισμός τη; Συγκέντρωσης της γλυκόζης και της φρουκτόζης 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 Ml. Η συσκευή της HPLC ήταν Waters 600E και διέθετε ανιχνευτή R1 410(WATERS) για τον προσδιορισμό της γλυκόζης και της φρουκτόζης ενώ διέθετε ανιχνευτή UV(486 Waters) για τον προσδιορισμό των οργανικών οξέων.

Η στατική φάση αποτελούταν από τη στήλη Aminex HPX-87H(Bio-rad RICMOND USA)(30 cm x 7,8 Ml.) ενώ η κινητή φάση ήταν 5 Mm H2SO4 σε δισ-απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό. Η ροή της κινητής φάσης καθορίστηκε στα 0,6 Ml/min και η θερμοκρασία της στήλης ήταν στους 40 βαθμούς κελσίου.

Στα γραφήματα που προέκυπταν πραγματοποιούταν ολοκλήρωση των κορυφών της γλυκόζης και της φρουκτόζης με τη χρήση του λογισμικού Empower. Τέλος με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς τακτοποιούταν η συγκέντρωση της κάθε ουσίας τυ δείγματος από τα εμβαδά που προέκυπταν στο χρωματογράφημα.

2.6) Προσδιορισμός αιθανόλης

Ο προσδιορισμός της παραγώμενης ποσότητας αλκοόλης στη διάρκεια της ζύμωσης γινόταν με τη βοήθεια HPLC ακριβώς με την ίδια διαδικασία που ακολουθούταν για τον προσδιορισμό τη; Συγκέντρωσης της γλυκόζης και της φρουκτόζης.

2.7) Προσδιορισμός αρωματικών ουσιών του μικροοργανισμού.

Αέρια Χρωματογραφία GC

Η ταυτοποίηση των πτητικών αρωματικών ουσιών του μικροοργανισμού Candida oleophila έγινε με τη χρήση αέριας χρωματογραφία. Το GC-FID είναι το HP series II 5890.Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο. Η στήλη είναι DB-WAX length 30m. I.D 0,320mm film 0,25μm. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ήταν 40^{O} για 5 λεπτά Και στη συνέχεια είχε αύξηση 3^o/min μέχρι τους 220 όπου παρέμεινε για 5 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου με εσωτερικό πρότυπο την 3-octanol (της sigma-Aldrich). Η ίνα ήταν SPME fiber 50/30μm DVB-CAR-PDMS. Το αλάτι ήταν επίσης της Sigma Aldrich.

Η προετοιμασία του δείγματος περιλάμβανε υδατόλουτρο του δείγματος στους 35 βαθμούς κελσίου, τοποθέτηση της ίνας μετά το πέρας των 10 λεπτών στο δείγμα για 30 λεπτά ενώ το δείγμα συνεχίζει να βρίσκεται στο υδατόλουτρο και τέλος τοποθέτηση της ίνας στο, αέριο χρωματογράφο με τελικό σκοπό τον καθορισμό των αρωματικών ενώσεων του δείγματος.

2.8) Προσδιορισμός μικροβιακών ενδοπολυσακχαριτών

Ο προσδιορισμός των ενδοπολυσακαχαριτών πραγματοποιήθηκε με την παρακάτω διαδικασία. Λαμβανόταν 0,05 g ξηρής βιομάζας από το κάθε δείγμα και τοποθετούταν σε μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα σε αυτό 10 ml υδροχλωρικού οξέος και πραγματοποιούταν βρασμός του δείγματος για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεντο στο δοκιμαστικό σωλήνα 10 ml καυστικού νατρίου με σκοπό την εξουδετέρωση του μείγματος. Αφού ανακινούταν το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα με σκοπό την καλύτερη ομογενοποίηση του περιεχόμενου μείγματος διηθούταν το μείγμα και τοποθετούταν σε διαφορετικό δοκιμαστικό σωλήνα πλέον το υπερκείμενο υγρό. Από αυτό λαμβάνονταν 5 ml και προστίθεντο σε αυτό 5 ml DNS. Στη συνέχεια πραγματοποιούταν βρασμός του διαλύματος αυστηρά για 5 λεπτά. Το δείγμα που χρησιμοποιούταν ως μάρτυρας αποτελούταν από 5 ml απιονισμένου νερού και 5 ml DNS. Στο τελικό στάδιο της διαδικασίας λαμβανόταν το τελικό διάλυμα και σε σύγκριση με το μάρτυρα καταγραφόταν η απορρόφηση του δείγματος σε φασματοφωτόμετρο στα 540 nm και τοποθετούταν το αποτέλεσμα σε εξίσωση που μας δίνει το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών.

2.9) Ποσοτική εκχύλιση μικροβιακών λιπιδίων

Η ξηρή βιομάζα αφού ομογενοποιήθηκε εκχυλίστηκε σε εκχυλιστικό μέσο CHCl3/CH3OH 2:1 (v/v) [63]. Παρέμεινε στο εκχυλιστικό μέσο για τουλάχιστον 3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν έγινε διήθησε της βιομάζας σε διηθητικό μέσο Το εκχύλισμα συλλέχθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη και οι διαλύτες απομακρυνθήκαν μέσω περιστροφικού εξατμιστήρα Buchi(Rotavapor R-114). υπό κενό και σε θερμοκρασία 50 βαθμών κελσίου και μετά την απομάκρυνση των διαλυτων τα ολικά ενδοκυτταρικά λιπίδια ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας.

2.10) Μεθυλεστεροποίηση

Για να προσδιοριστεί η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων σε λιπαρά οξέα, απαιτείται η μετατροπή τους στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Η αντίδραση της μεθυλεστεροποίησης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο AFNOR (1954). Αναλυτικά, σε 50 mg ολικών λιπιδίων προστέθηκαν 10 ml μεθοξείδιο του νατρίου που περιείχε φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτη pH και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι ήπιου βρασμού. Μετά το πέρας 20 min, προστέθηκε διάλυμα υδροχλωρικής μεθανόλης μέχρι το pH του μίγματος να γίνει όξινο (αλλαγή χρώματος του μίγματος από ερυθρό σε λευκό) και ο βρασμός συνεχίστηκε για άλλα 20 min. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη νερού και οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων παρελήφθησαν με την προσθήκη 6 ml εξανίου.

2.11) Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Για τις αναλύσεις στον αέριο χρωματογράφο (8000 Series FISSON) πραγματοποιούταν έκχυση 1 Ml 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:

1) Θερμοκρασία εισαγωγέα 250 βαθμών κελσίου.

2) Θερμοκρασία ανιχνευτή

3) Φέρον αέριο He (ροή 1,38 mL / min), H2(60kPa)02(110kPa)

4) Τύπος στήλης Fused Silica WCOT.

- CP-Sill 88(0,2 Ml)
- Μήκος 50 m.
- Διάμετρος 0,2 mm
- Πάχος επικάλυψής που έρχεται σε επαφή εσωτερικά με το δείγμα DF=0,2Ml

Η θερμοκρασία της στήλης παρέμενε σταθερή στους 200 βαθμούς κελσίου για 20 λεπτά. Από το εμβαδόν της κάθε κορυφή προέκυπτε η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος.

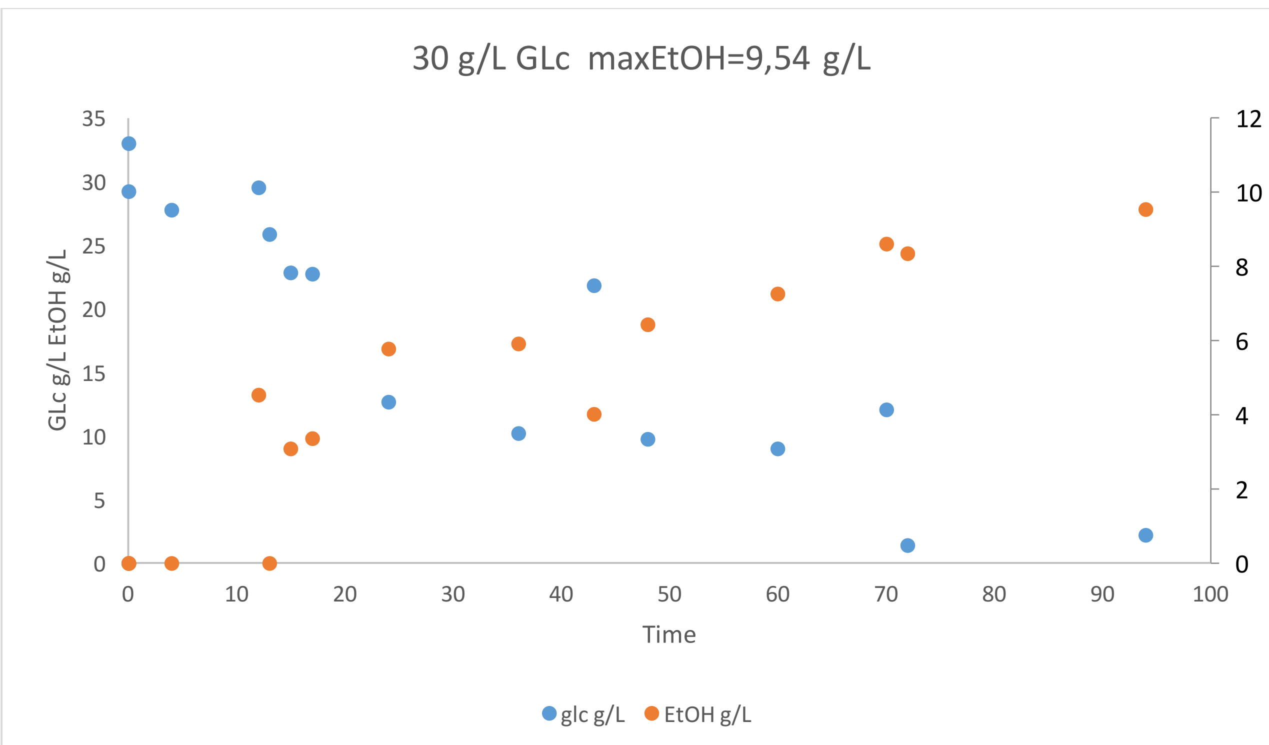
3) ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΑ

3.1) Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *Candida oleophila* σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 30 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες.

Η ικανότητα των non-Saccharomyces να αρχίζουν μία αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση τις πρώτες μέρες της οινοποίησης δίνει το έναυσμα για περεταίρω μελέτη των αλκοολικών ζυμώσεων των μικροοραγανισμών αυτών. Ο *Candida oleophila* αποδείχθηκε ότι πραγματοποιεί αλκοολική ζύμωση τόσο με αρχική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη όσο και με τη φρουκτόζη.

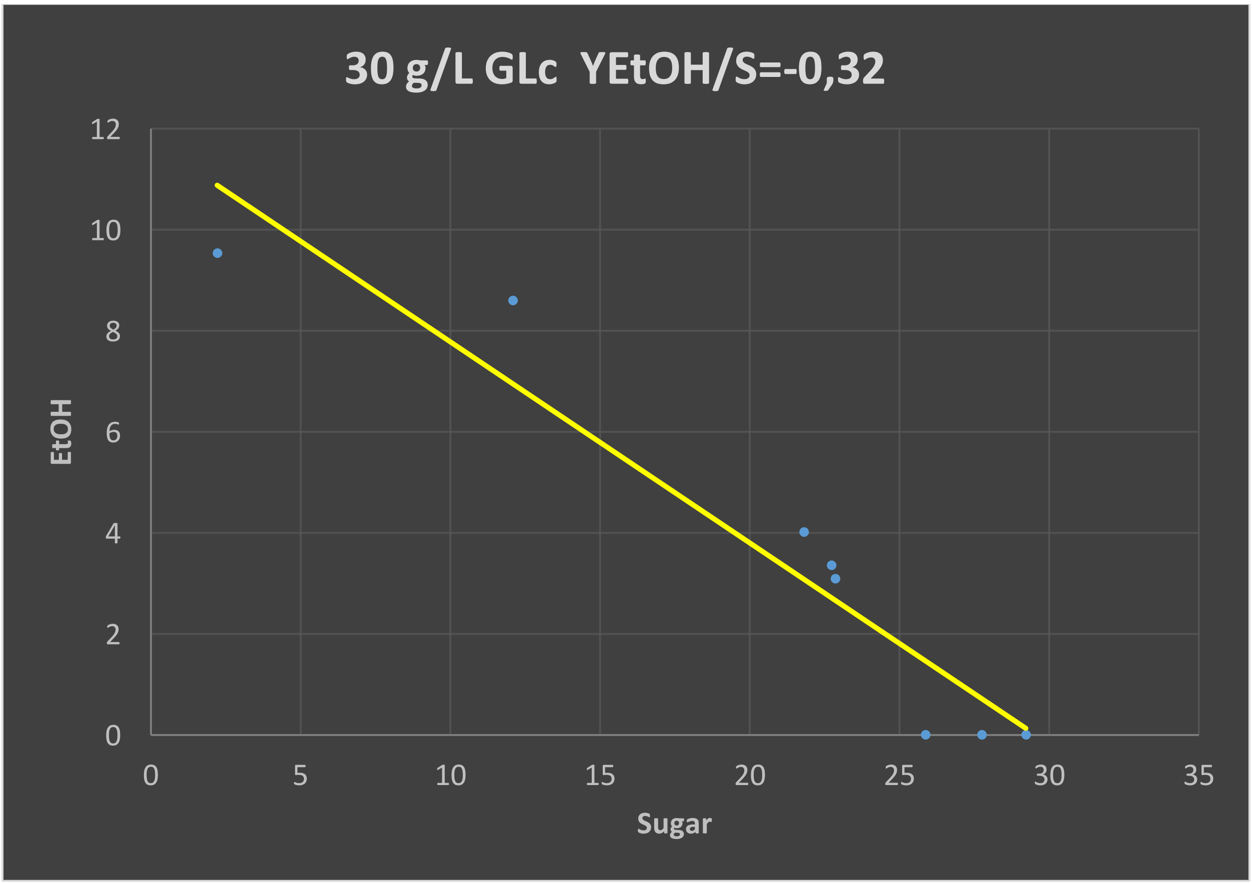
Η πρώτη αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού περιέχει ως αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/L..

Τα δεδομένα προήλθαν από ζύμωση που πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες. Παρατηρήθηκε ότι ο μικροοργανισμός κατανάλωσε όλα τα σάκχαρα και παρήγαγε σημαντική ποσότητα αλκοόλης.(Σχήμα 1)



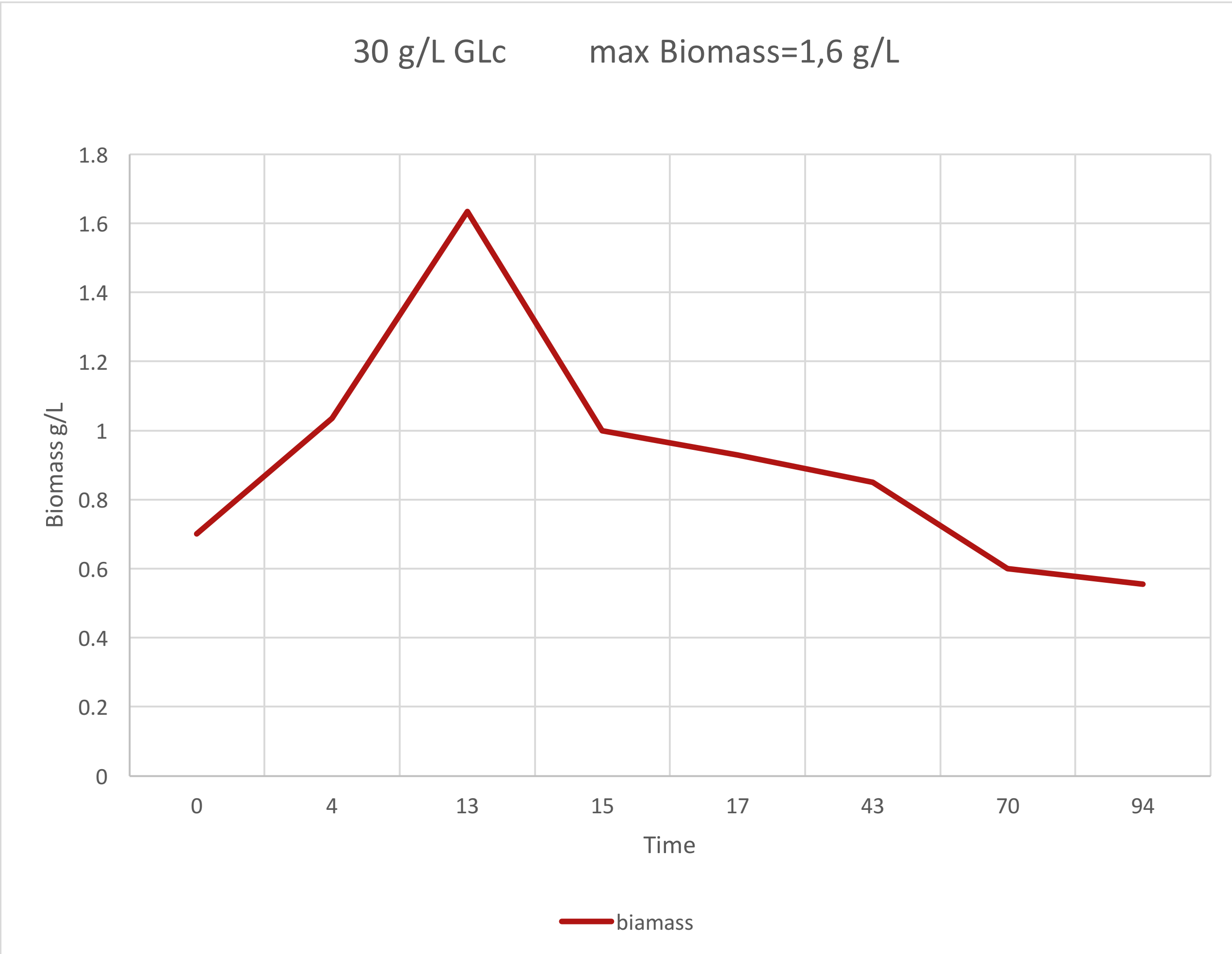
Σχήμα 1 : Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού Candida oleophila σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 30 g/L GLc.

Στο παρακάτω σχήμα (2) αναγράφονται οι τιμές του συντελεστή απόδοσης προιόντος-υποστρώματος του μικροοργανισμού *Candida oleophila* κατά την αλκοολική του ζύμωση σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγή άνθρακα 30 g/L GLc(Γράφημα 2).

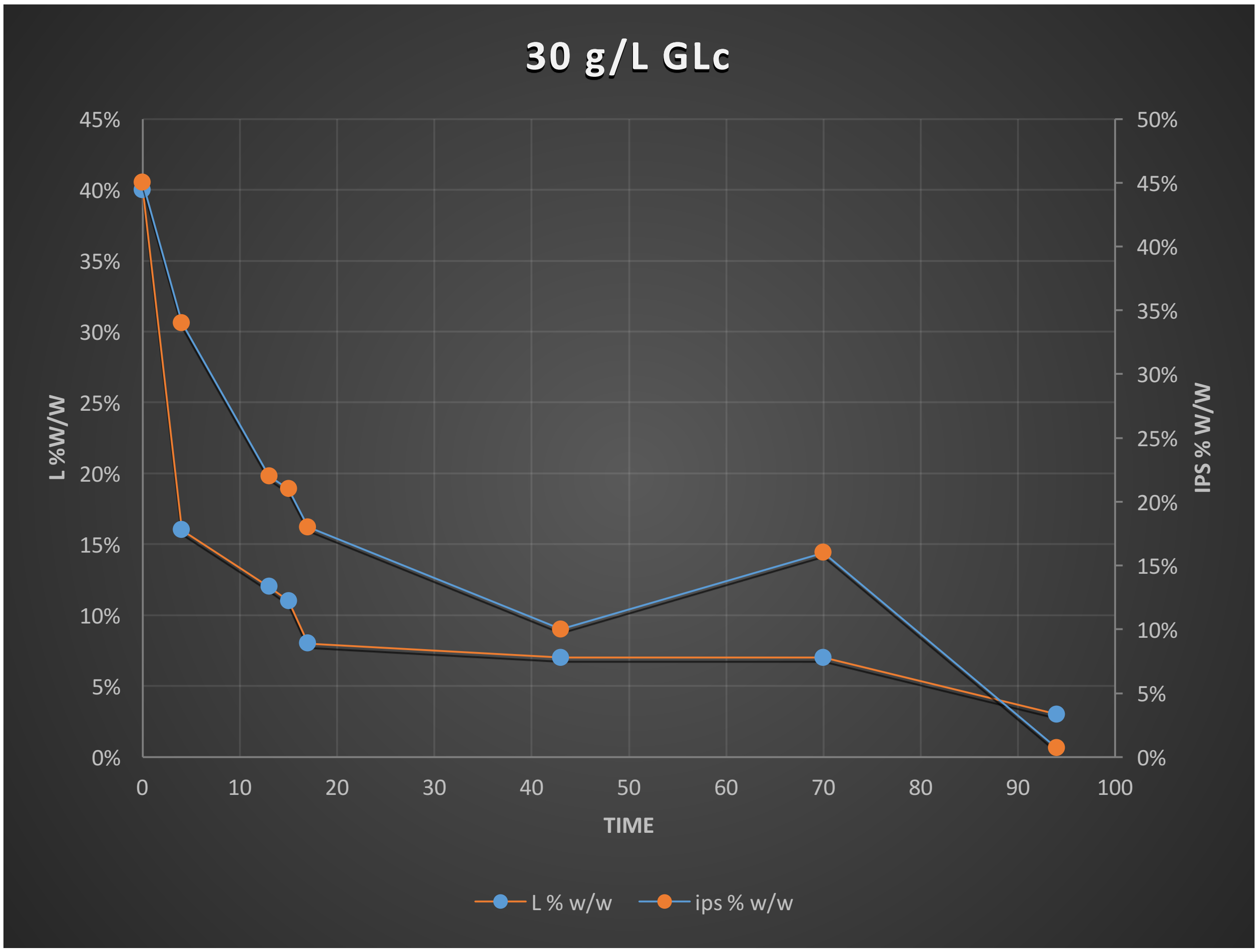


Σχήμα 2 : Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού Candida oleophila σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 30 g/L GLc.

Στον παρακάτω σχήμα αναγράφονται οι συγκεντρώσεις της βιομάζας του μικροοργανισμού *C.oleophila* κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L GLc.



Σχήμα 3: Συγκεντρώσεις της βιομάζας του μικροοργανισμού Candida oleophila κατά την αλκοολική του ζύμωση σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση άνθρακα 30 g/L Glucose.



Σχήμα 4: Συγκεντρώσεις του ποσοστού των ενδοπολυσακχαριτών και του ποσοστού λίπους που παράγει ο μικροοργανισμός Candia oleophila κατά την αλκοολική του ζύμωση με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L Glucose.

Πίνακας 1 : συγκεντρώσεις των αρωματικών ουσιών του μικροοργανισμού C.oleophila κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L GLc.

Time (h)	ethyl butyrate (mg/L)	isoamyl alcohol (mg/L)	Phenethyl alcohol (mg/L)	ethyl caprylate (mg/L)	isoamyl acetate (mg/L)	hexyl acetate (mg/L)
15	0,17	9,87	4,43	0	0	0
17	0,18	19,72	4,21	0,13	0	0
34	0,16	25,73	4,93	0	0	0
47	0,40	37,96	5,23	0	0	0
57	0,23	86,96	5,15	0	0,12	0
71	0,73	21,02	5,28	0	0,12	0,10
95	0,14	34,59	4,81	0	0	0

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων που παράγει ο μικροοργανισμός κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης με αρχική συγκέντρωσης πηγής άνθρακα στο υπόστρωμα 30 g/L Glucose.

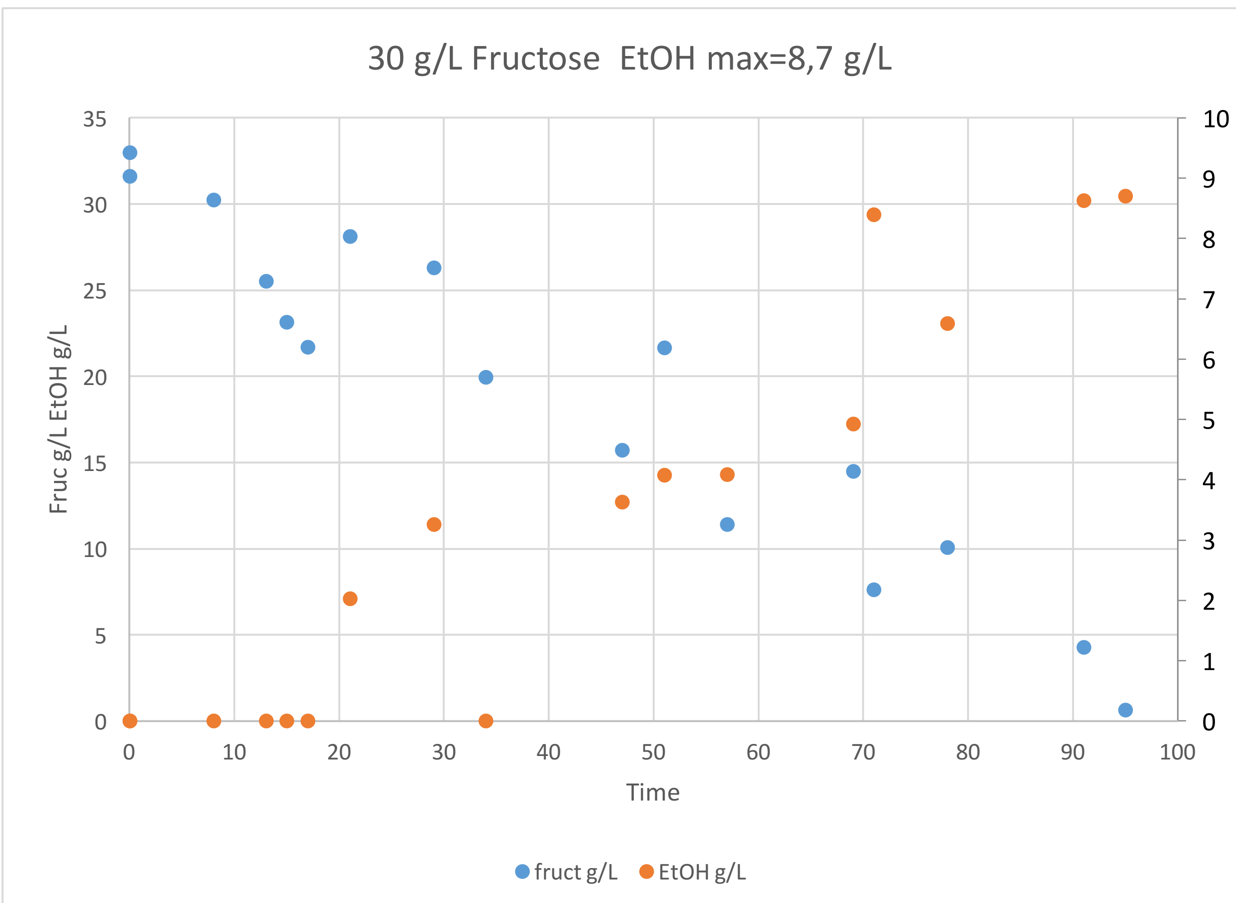
Πίνακας 2 : Ποσοστά των λιπαρών οξέων που παράγει ο μικροοργανισμός κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης με αρχική συγκέντρωσης πηγής άνθρακα στο υπόστρωμα 30 g/L Glucose.

Fatty acids	GLc 30 g/L %
Capric acid methy ester	1,83
Lauric Acid Methyl Ester	1,80
Myristic Acid Methyl Ester	4,29
Myristoleic Acid Methyl Ester	0,00
Palmitic Acid Methyl Ester	28,08
Stearic Acid Methyl Ester	2,65
Eladic Acid Methyl Ester/ Oleic Acid Methy Ester(cis-trans)	39,83
Linolelaidic Acid Methyl Ester/ Linoleic Acid Methyl Ester(CIS-TRANS)	16,49
γ-Linoleic AcidMethyl Ester/ α- Linoleic Acid Methyl Ester(cis-trans)	1,32
Arachidic Acid Methyl Ester	3,70

3.2) Αλκοολική ζύμωση του Candida oleophila σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική ποσότητα πηγής άνθρακα 30 g/L Fructose.(Γράφημα 3)

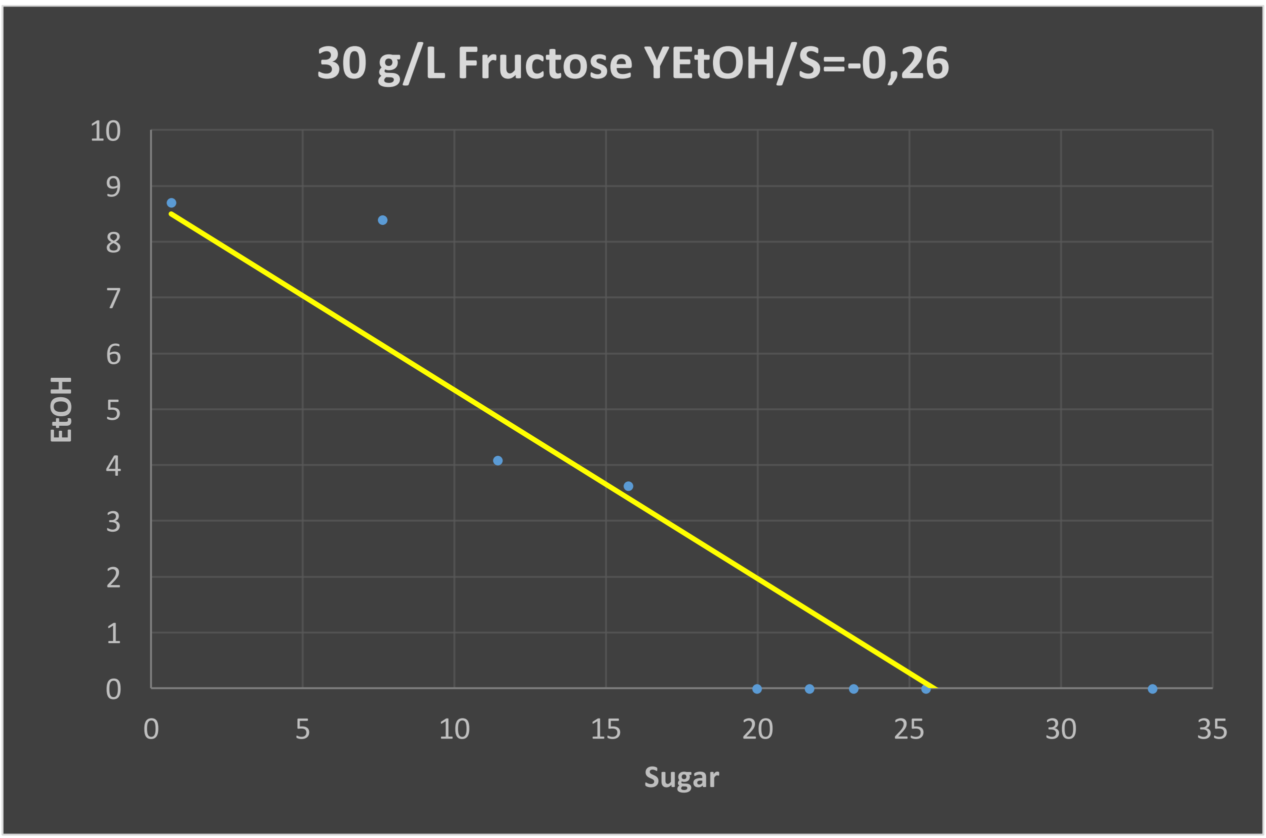
Ο οίνος περιέχει ως σάκχαρα φρουκτόζη και γλυκόζη, οπότε είναι απαραίτητο να μελετηθεί αν ο μικροοργανισμός πραγματοποιεί αλκοολική ζύμωση σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει ως πηγή άνθρακα φρουκτόζη.

Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά της γλυκόζης. Ο μικροοργανισμός μπορεί να παράγει εξίσου σημαντικές ποσότητες αλκοόλης καταναλώνοντας σχεδόν όλη την ποσότητα φρουκτόζης που υπήρχε στο υπόστρωμα.(Σχήμα 3)



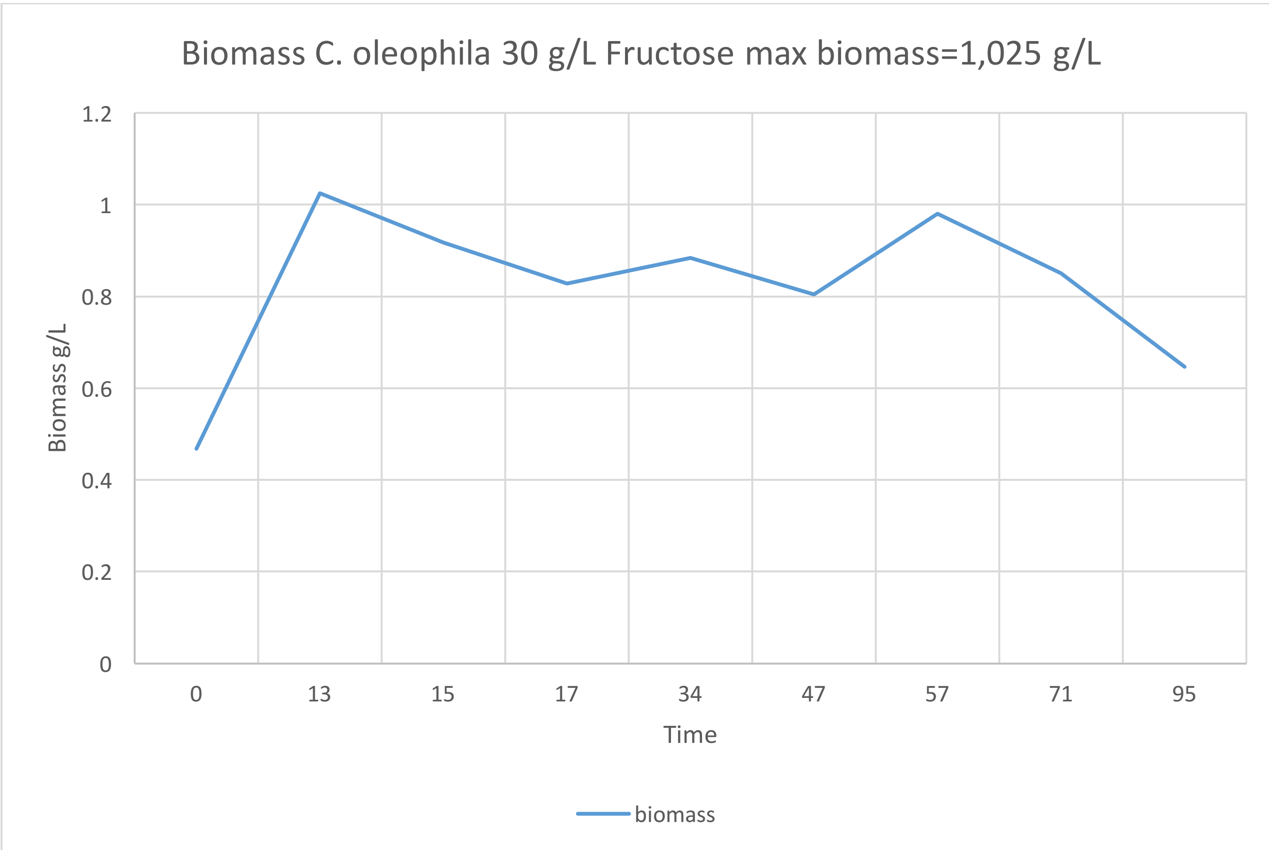
Σχήμα 5 : Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *C. Oleophila* σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L Fructose.

Στο παρακάτω γράφημα απεικονίζονται οι τιμές του συντελεστή απόδοσης του μικροοργανισμού *Candida oleophila* κατά την αλκοολική ζύμωση σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L φρουκτόζη.(Σχήμα 4)



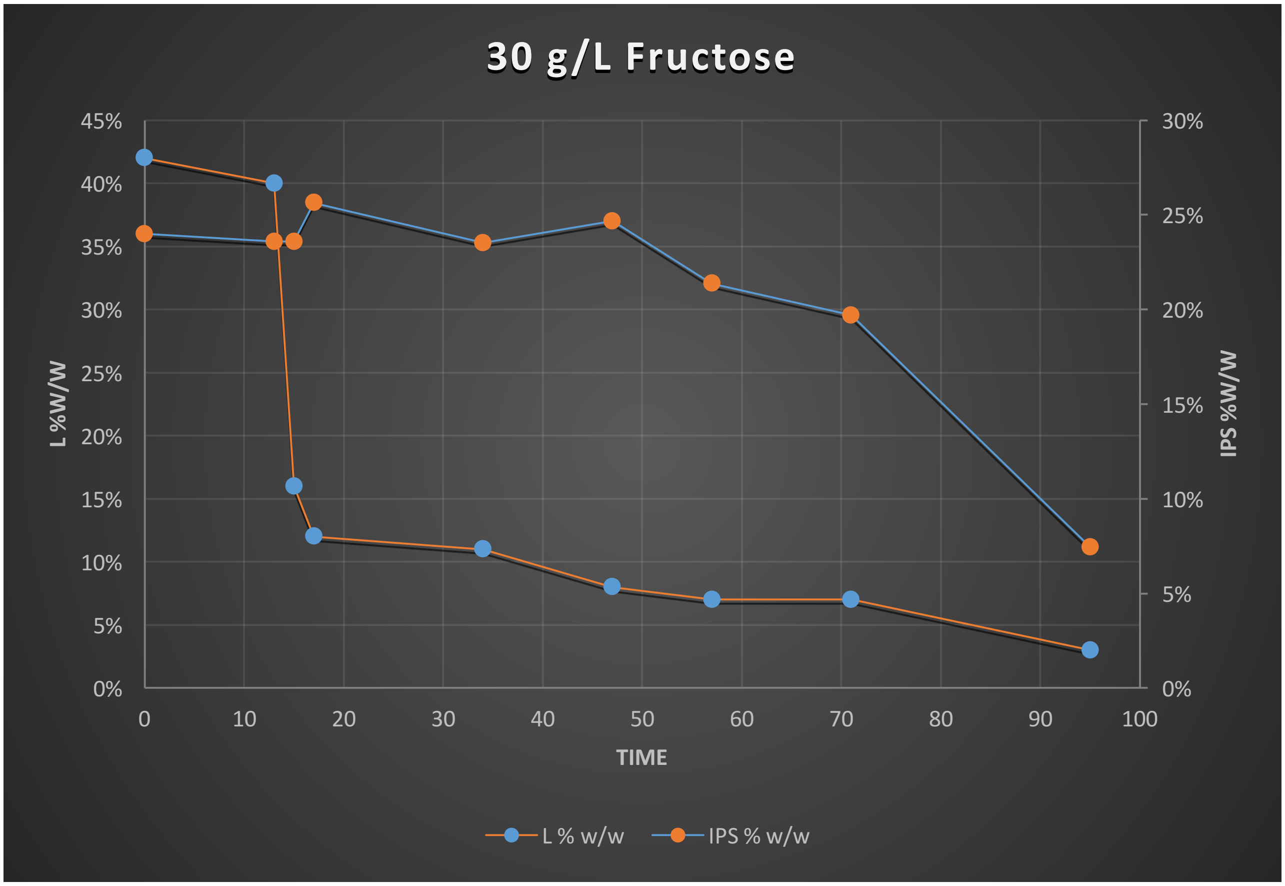
Σχήμα 6 : Τιμές του συντελεστή απόδοσης του μικροοργανισμού C.oleophila κατά την αλκοολική του ζύμωση σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L Fructose.

Στο παρακάτω σχήμα αναφέρονται οι τιμές της βιομάζας του μικροοργανισμού στα διάφορα στάδια της αλκοολικής του ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/l Fructose.



Σχήμα 7 : Τιμές βιομάζας του μικροοργανισμού Candida oleophila κατά την αλκοολική του ζύμωση σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L Fructose.

Στο επόμενο σχήμα απεικονίζονται τα ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών και του ποσοστού λίπους που παράγει ο μικροοργανισμός κατά την αλκοολική του ζύμωση σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L Fructose.



Σχήμα 8 : Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών και του λίπους που παράγει ο μικροοργανισμός κατά την αλκοολική του ζύμωση σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L Fructose.

Στον πίνακα 3 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των αρωματικών ουσιών του μικροοργανισμού *C.oleophila* κατά τη διάρκεια της αλκοολικής του ζύμωσης σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L Fructose.

Πίνακας 3: συγκεντρώσεις των αρωματικών ουσιών του μικροοργανισμού C.oleophila κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L Fructose σε δεδομένους χρόνους.

Time (h)	ethyl butyrate (mg/L)	isoamyl alcohol (mg/L)	phenethyl alcohol (mg/L)	ethyl caprylate (mg/L)	isoamyl acetate (mg/L)	hexyl acet (mg/L)	ethyl caproate (mg/L)
4	0,13	6,86	4,62	0	0,11	0,01	0,13
13	0,14	35,06	6,45	0	0,14	0,02	0,14
43	0,13	26,04	0	0	0	0	0
70	0,13	26,9	6,35	0	0,11	0,01	0,13
94	0,13	59,16	5,21	0,13	0	0	0,12

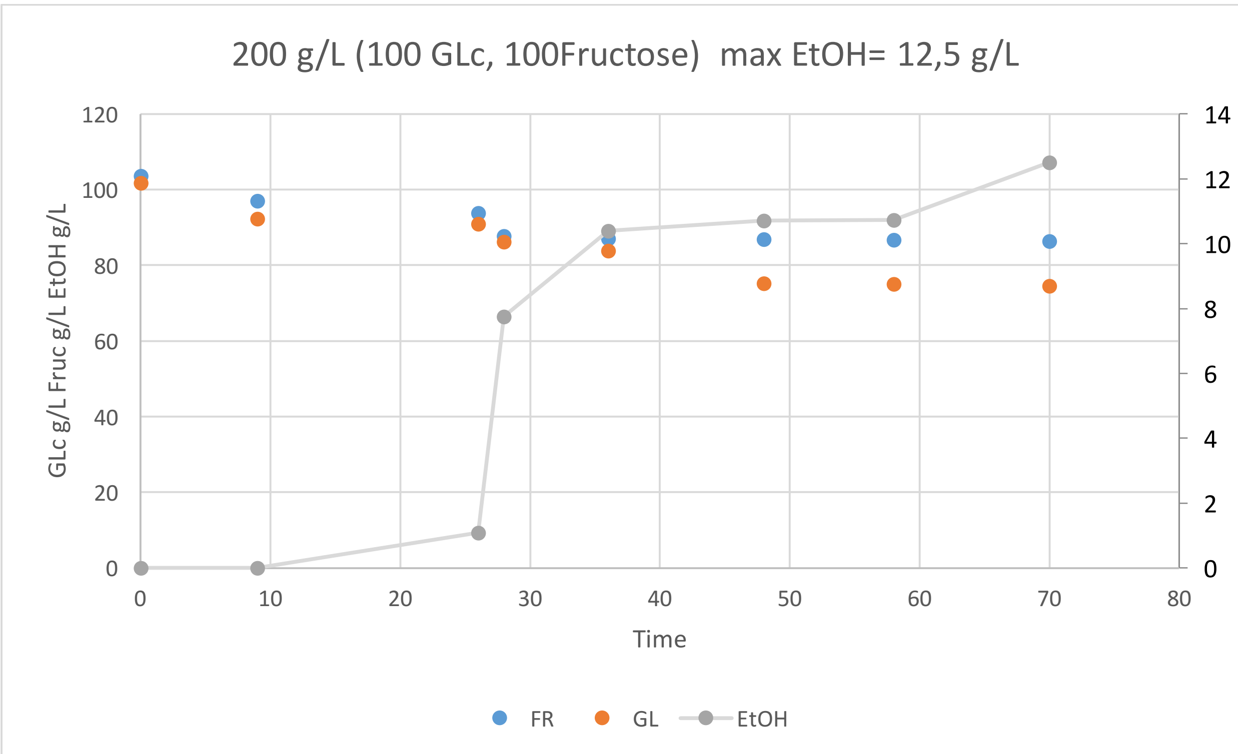
Στον παρακάτω πίνακα ανγράφονται οι τιμές των λιπαρών οξέων που παράγει ο μικροοργανισμός Candida oleophila κατά την αλκοολική του ζύμωση.

Πίνακας 4 : Ποσοστά των λιπαρών οξέων που παράγει ο μικροοργανισμός Candida oleophila κατά την αλκοολική του ζύμωση σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L Fructose.

Fatty acids	Fructose 30 g/L %
Capric acid methy ester	0,17
Lauric Acid Methyl Ester	0,11
Myristic Acid Methyl Ester	0,88
Myristoleic Acid Methyl Ester	0,15
Palmitic Acid Methyl Ester	37,00
Stearic Acid Methyl Ester	5,59
Eladic Acid Methyl Ester/ Oleic Acid Methy Ester(cis-trans)	49,35
Linolelaidic Acid Methyl Ester/ Linoleic Acid Methyl Ester(CIS-TRANS)	6,39
γ-Linoleic AcidMethyl Ester/ α- Linoleic Acid Methyl Ester(cis-trans)	0,13
Arachidic Acid Methyl Ester	0,23

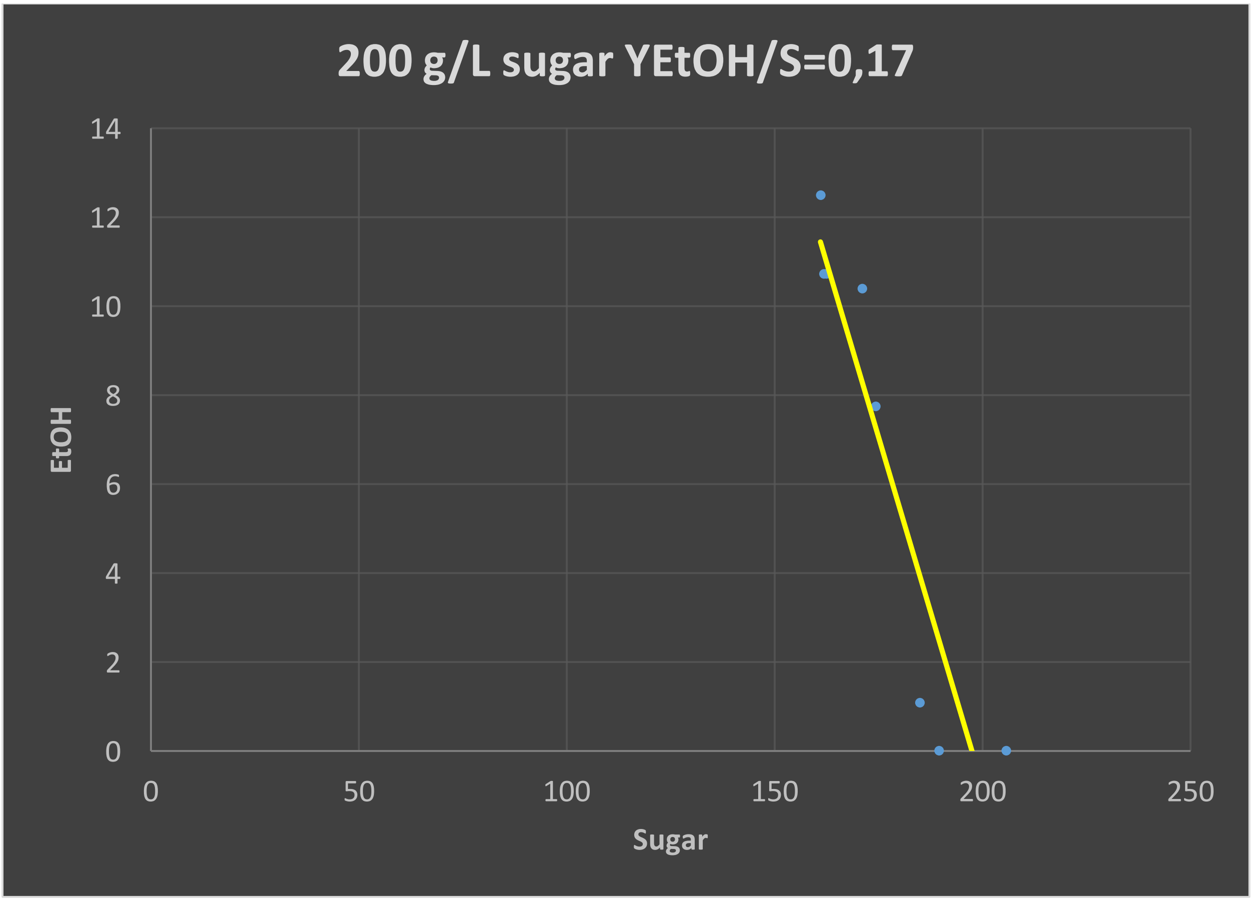
3.3 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *Candida oleophila* σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 100 gr φρουκτόζη+ 100 gr γλυκόζης.

.



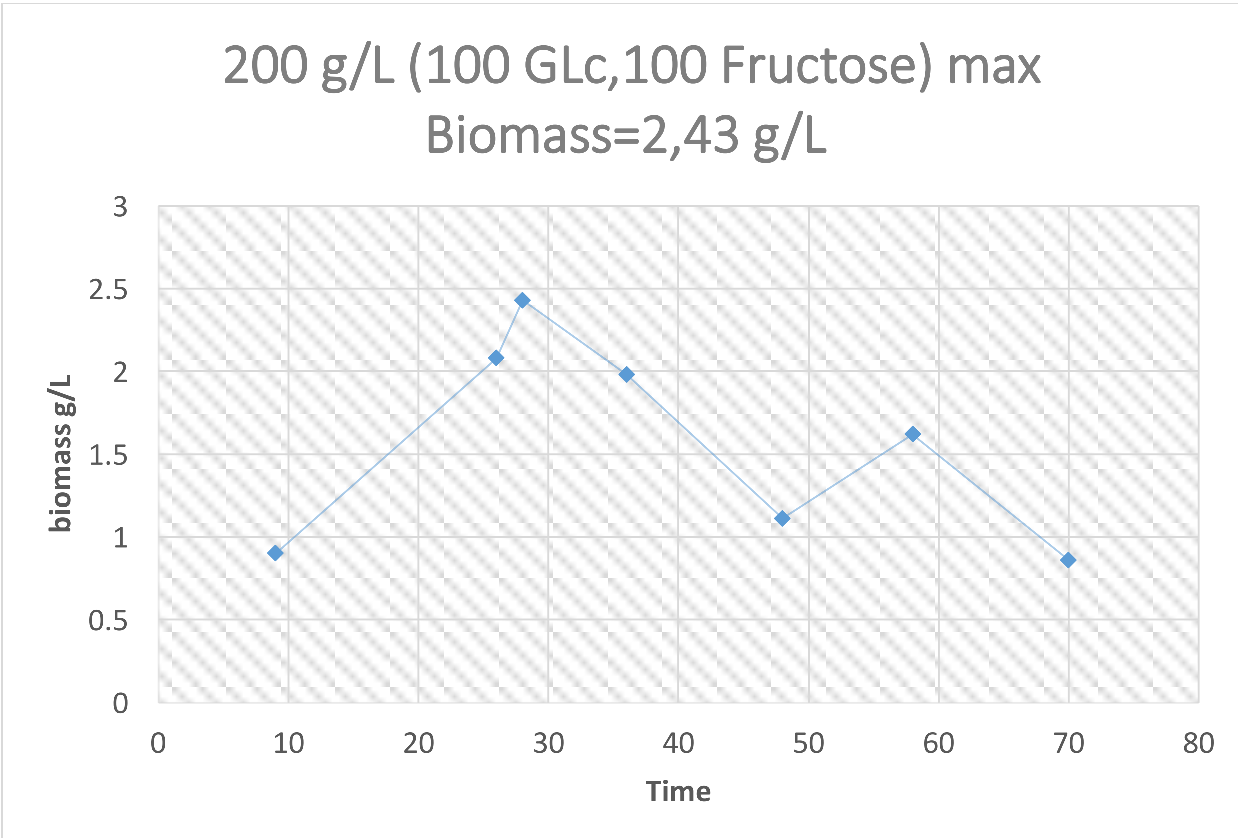
Σχήμα 9 : Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού C.oleophila σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 200 g/L εκ των οποίων τα 100 είναι γλυκόζη και τα άλλα 100 φρουκτόζη.

Στο παρακάτω σχήμα(6) απεικονίζονται οι τιμές του συντελεστή απόδοσης του μικροοργανισμού *Candida oleophila* κατά την αλκοολική ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 200 g/L εκ των οποίων τα 100 είναι γλυκόζη και τα υπόλοιπα 100 φρουκτόζη.



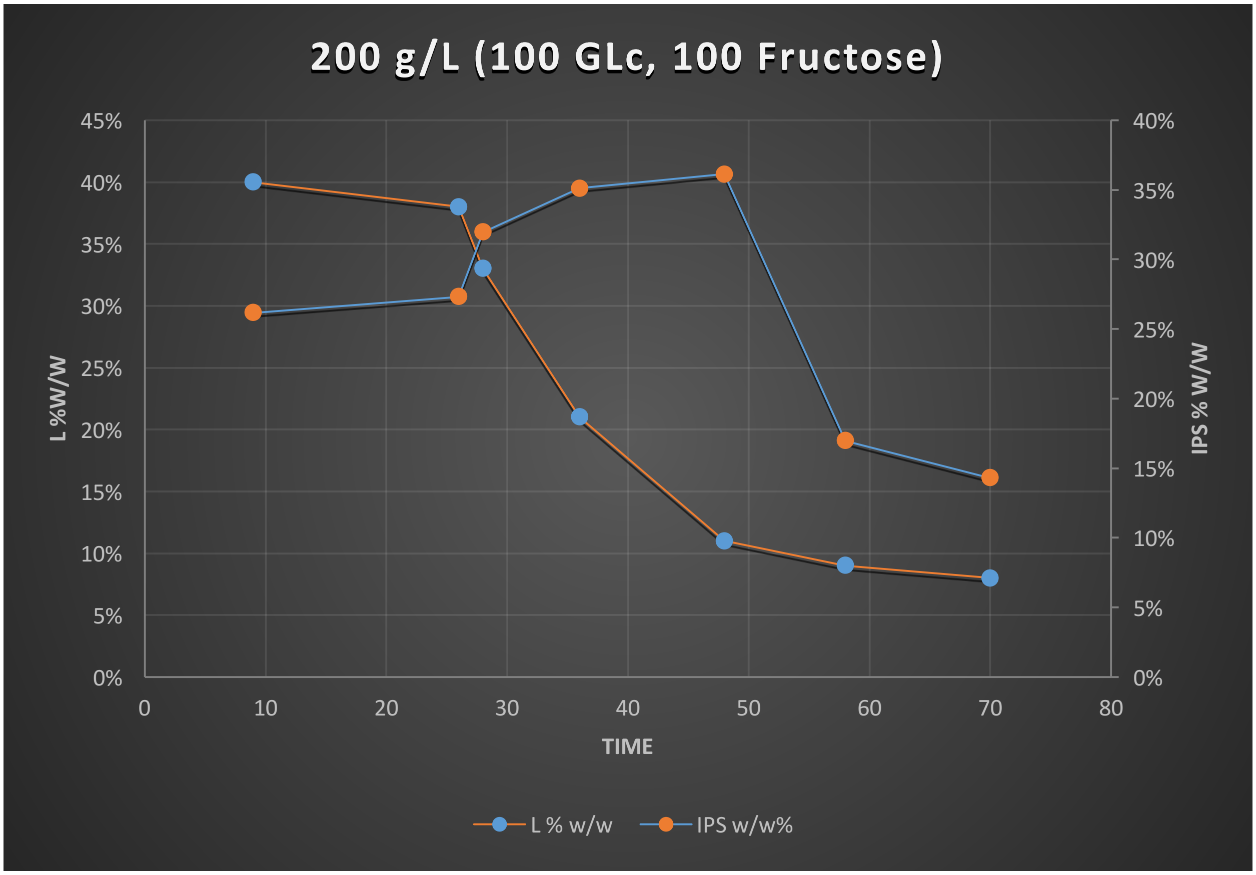
Σχήμα 10 : Τιμές του συντελεστή απόδοσης προϊόντος-υποστρώματος του μικροοργανισμού *C.oleophila* κατά την αλκοολική του ζύμωση σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 200 g/L (100g/L Glucose, 100g/L Fructose)

Οι τιμές που παίρνουν οι συγκεντρώσεις της βιομάζας του μικροοργανισμού *Candida oleophila* κατά την αλκοολική του ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 200 g/L εκ των οποίων τα 100 είναι γλυκόζη και τα υπόλοιπα 100 φρουκτόζη αναγράφονται παρακάτω.



Σχήμα 11 : Συγκεντρώσεις της βιομάζας του μικροοργανισμού C.oleophila κατά την αλκοολική ζύμωση του σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 200 g/L εκ των οποίων τα 100 είναι γλυκόζη και τα άλλα 100 φρουκτόζη.

Παρακάτω απεικονίζονται τα ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών και του λίπους που παράγει ο μικροοργανισμός κατά την αλκοολική ζύμωση σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 200 g/L εκ των οποίων τα 100 είναι γλυκόζη και τα άλλα 100 φρουκτόζη.



Σχήμα 12 : Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών και του λίπους στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού C. Oleophila *κατά την αλκοολική ζύμωση του σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 200 g/L εκ των οποίων τα 100 είναι γλυκόζη και τα άλλα 100 φρουκτόζη.*

Στον πίνακα   απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των αρωματικών ουσιών του μικροοργανισμού C.oleophila κατά τη διάρκεια της αλκοολικής του ζύμωσης σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 200 g/L (100 g/L GLc,100 g/L Fructose)

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις των αρωματικών ουσιών του μικροοργανισμού C.oleophila κατά τη διάρκεια της αλκοολικής του ζύμωσης σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 200 g/L (100 g/L GLc,100 g/L Fructose) σε δεδομένους χρόνους.

Time (h)	ethyl butyrate (mg/L)	isoamyl alcohol (mg/L)	phenethyl alcohol (mg/L)
9	0,13	14,05	0
26	0,14	0,21	0
28	0,14	32,27	5,13
48	0,22	29,66	4,75
70	0,21	16,68	5,65

Στον παρακάτω πίνακα   αναγράφονται τα λιπαρά οξέα καθώς και το ποσοστό τους κατά την αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού C.oleophila σε υποστρώμτα με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα.

Πίνακας 6:Ποσοστό λιπαρών οξέων του μικροοργανισμού C.oleophila κατά την αλκοολική του ζύμωση σε υποστρώματα με αρχικές συγκεντρώσεις,30 g/L GLc, 30 g/L Fructose, 200 g/L (100GLc, 100 Fructose)

Fatty acids	200 g/L (100 g GLc+100 g Fr)%
Capric acid methy ester	1,13
Lauric Acid Methyl Ester	0,11
Myristic Acid Methyl Ester	0,16
Myristoleic Acid Methyl Ester	0,00
Palmitic Acid Methyl Ester	48,81
Stearic Acid Methyl Ester	0,52
Eladic Acid Methyl Ester/ Oleic Acid Methy Ester(cis-trans)	13,12
Linolelaidic Acid Methyl Ester/ Linoleic Acid Methyl Ester(CIS-TRANS)	33,87
γ-Linoleic AcidMethyl Ester/ α- Linoleic Acid Methyl Ester(cis-trans)	0,17
Arachidic Acid Methyl Ester	2,12

4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα κριτήρια για την επιλογή και την ανάπτυξη των ζυμών οινοποίησης έχουν εξελιχθεί κατά τη διάρκεια πολλών ετών και μπορούν να ενταχθούν σε τρεις κατηγορίες με βάση: (1) ιδιότητες που επηρεάζουν την απόδοση της διαδικασίας ζύμωσης, (2) τις ιδιότητες που καθορίζουν την ποιότητα του οίνου και χαρακτήρα και (3) τις ιδιότητες που συνδέονται με την εμπορική παραγωγή των ζυμών κρασιού.

Η γρήγορη και πλήρης ζύμωση των σακχάρων του σταφυλοχυμού σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (> 8% v / v) αποτελούν βασικές απαιτήσεις του ζυμών κρασιού. Η ζύμη πρέπει να είναι ανεκτική στις συγκεντρώσεις του διοξειδίου του θείου που προστίθενται στο χυμό ως αντιοξειδωτικό, να εμφανίζει ομοιόμορφη διασπορά και ανάμιξη σε όλο τον εν ζυμώσει χυμό και να παράγει ελάχιστες ποσότητες αφρού και ιζημάτων στο τέλος της ζύμωσης. Αυτές οι ιδιότητες επεξεργασίας πρέπει να είναι καλά εκφρασμένες σε χαμηλές θερμοκρασίες (π.χ. 15 ° C) για την λευκή οινοποίηση και σε υψηλότερες θερμοκρασίες (π.χ. 25 ° C) για την ερυθρή οινοποίηση.

Όσον αφορά την ποιότητα του οίνου και το χαρακτήρα του , είναι απαραίτητο κάθε ζύμη να παράγει μια ισορροπημένη σειρά μεταβολιτών που επηρεάζουν τη γεύση, χωρίς ανεπιθύμητες υπερβολές των πτητικών όπως το οξικό οξύ, τον οξικό αιθυλεστέρα, το υδρόθειο και το διοξείδιο του θείου. Δεν θα πρέπει να δίνει ανεπιθύμητες γεύσεις που προέρχονται από αυτόλυση μετά τη ζύμωση. Επίσης δεν πρέπει να επηρεάζει αρνητικά το χρώμα του οίνου ή τον ταννικό χαρακτηριστικά του. Στην ουσία, η ζύμη πρέπει να δώσει ένα κρασί με ένα καλό καθαρό άρωμα, χωρίς αισθητηριακές βλάβες, και να επιτρέψει στο χαρακτήρα της ποικιλίας σταφυλιού να γίνει αντιληπτός από τον καταναλωτή .

Οι εταιρείες που παράγουν ζύμες για τη βιομηχανία του οίνου έχουν επίσης βασικές ανάγκες-κριτήρια πάνω στα οποία πρέπει να οικοδομηθεί η επιλογή και η αναπτυξιακή διαδικασία των ζυμών [64]Το κόστος παραγωγής πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε το τελικό προϊόν να είναι προσιτό για τον κλάδο του οίνου. Κατά συνέπεια, η ζύμη πρέπει να είναι επιδεκτική σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια σε σχετικά φθηνά υποστρώματα όπως η μελάσα.

Στη συνέχεια, θα πρέπει να είναι ανεκτική στις τάσεις της ξήρανσης, της συσκευασίας, της αποθήκευσης και, τέλος, της αφυδάτωσης και της επανενεργοποίησης από τον οινοποιό[65]. Οι απαιτήσεις αυτές πρέπει να επιτευχθούν χωρίς απώλεια των ουσιαστικών και επιθυμητών ιδιοτήτων της οινοποίησης.

Η μελέτη της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *Candida oleophila* αποκαλύπτει ότι απαιτούνται περεταίρω μελέτες του μικροοργανισμού γιατί φαίνεται να έχει δυνατότητες να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην οινοποίση. Παρουσιάζει μία σχετική αντοχή στην αιθανόλη γεγονός που μας επιτρέπει να μελετήσουμε το μικροοργανισμό ως οινοποιητική ζύμη.

Η αποδοτικότητα του *Candida oleophila* δεν είναι τόσο μεγάλη που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά αυτός και μόνο ο μικροοργανισμός για την αλκοολική ζύμωση ενός γλεύκους με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 200 g/L.

Όσον αφορά τα λιπαρά οξέα που ανιχνεύτηκαν οι ποσότητες θεωρούνται εξαιρετικά μικρές.

4.1) Αρωματικές ενώσεις και Ζύμες στον οίνο

Η βιοχημική μετατροπή των ανενεργών συστατικών του γλεύκους που σχετίζονται με τη γεύση του οίνου σε ενεργά συστατικά έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια, ως ένας σημαντικός, πρόσθετος μηχανισμός μέσω του οποίου οι ζύμες μπορούν να επηρεάσουν ουσιωδώς το άρωμα και τη γεύση του κρασιού. Οι γνώσεις σχετικά με την ποικιλομορφία και την πολυπλοκότητα αυτών των αντιδράσεων ωστόσο, εξακολουθούν να βρίσκονται σε φάση ανακάλυψης . Από αυτές τις αντιδράσεις, η απελευθέρωση των τερπενίων είναι η πιο μελετημένη . Μονοτερπενιακές αλκοόλες όπως κιτρονελλόλη, γερανιόλη, λιναλοόλη και νερόλη απαντώνται φυσικά στα σταφύλια.

Οι συγκεντρώσεις των αρωματικών ουσιών που εκλύει ο μικροοργανισμός *Candida oleophila* κατά την αλκοολική ζύμωση ποικίλουν. Είναι όμως αξιοσημείωτο όπως προαναφέρθηκε ότι ενώ ανιχνεύονται αρωματικές ενώσεις στις ζυμώσεις με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/L(γλυκόζη ή φρουκτόζη) στη ζύμωση με συγκέντρωση σακχάρων που προσομοιάζει στο κρασί(200 g/L) εκλύονται μόνο 3 από αυτές και σε μικρότερες συγκεντρώσεις από τις προηγούμενες ζυμώσεις. Παρόλα αυτά ο *candida oleophila* παρουσιάζει ικανοποιητικές συγκεντρώσεις των αρωματικών ενώσεων γεγονός που μας δίνει το έναυσμα για περεταίρω μελέτη αυτών των ενώσεων που παράγει ο μικροοργανισμός κατά την αλκοολική του ζύμωση και σε άλλα υποστρώματα.

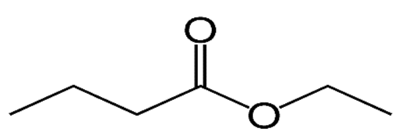
4.2) Σημασία των παραγόμενων αρωματικών ουσιών από την αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *Candia oleophila.*

Ο ρυθμός σχηματισμού εστέρα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης εξαρτάται από δύο κύριους παράγοντες: (1) τη συγκέντρωση συνυποστρώματος του ακυλο-CoA και της αλκοόλης και (2) τη δραστικότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση και υδρόλυση (ακυλοτρανσφεράσες και εστεράσες) τους [66].

Ethyl butyrate

Ο αιθυλικός βουτυλεσταιρας , είναι ένας εστέρας με τον χημικό τύπο C6H12O2. Ο αιθυλικός βουτυλεσταιρας είναι διαλυτός σε προπυλενογλυκόλη, παραφινέλαιο, και κηροζίνη. Ο αιθυλικός βουτυλεσταιρας και η ονομασία του κατά IUPAC είναι Ethyl βουτανοϊκό άλας. Είναι είναι ένα από τα πιο κοινά χημικά που χρησιμοποιούνται σε γεύσεις και αρώματα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δώσει τη γεύση που θυμίζει πορτοκάλι, κεράσι, ανανά, μάνγκο, γκουάβα, τσιχλόφουσκα, ροδάκινο, βερίκοκο, σύκο και δαμάσκηνο. Βιομηχανικά μιλώντας, είναι επίσης μία από τα φθηνότερες χημικές ουσίες που μπορεί να προστεθεί.

Ο αιθυλικός βουτυλεσταιρας μπορεί να συντεθεί με την αντίδραση αιθανόλης και βουτυρικού οξέος. Αυτή είναι μία αντίδραση συμπύκνωσης, που σημαίνει ότι παράγεται νερό σαν ένα παραπροϊόν.



ISOAMYL ACETATE

Το οξικό ισοαμύλιο είναι μία από τις πιο σημαντικές ενώσεις που σχετίζονται με τη γεύση που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες τροφίμων λόγω της χαρακτηριστικής γεύσης μπανάνα. Ο εστέρας χρησιμοποιείται σε πολλές τροφές και ποτά, όπως το μέλι, την καραμέλα, τα υποκατάστατα καφέ, ποτών και αρωμάτων. Επίσης είναι ένα από τα κύρια συστατικά που επικρατούν στην μπύρα και τους οίνους [67].

Penethyl alcohol

Η φαινυλαιθυλική αλκοόλη, έχει την οσμή των τριαντάφυλλων και επίσης πιστεύεται ότι παίζει ένα ρόλο στην αισθητηριακή αντίληψη του σώματος του οίνου [68].

ISOAMYL ALCOHOL

Οι ανώτερες αλκοόλες βρίσκονται στη μεγαλύτερη ποσότητα κρασιού και είναι οι 1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-προπανόλη (ισοβουτυλική αλκοόλη), 2-μεθυλο-1-βουτανόλη, και 3-μεθυλο-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη). Ποσοτικά, η ισοαμυλική αλκοόλη αντιπροσωπεύει γενικά πάνω από το 50% του συνόλου κλάσματα αλκοόλ ζυμέλαια .Ο σχηματισμός των αλκοολών από τις ζύμες, όπως είναι οι εστέρες, βρίσκεται σε παράλληλο σχηματισμό με την αιθανόλη (Rapp και Mandery 1986). Ο Bidan (1975) αναφέρει ότι το ένα τέταρτο του αλκοολών οφείλονται στην καταβολισμό των σακχάρων, και τα τρία τέταρτα οφείλονται στην υποβάθμιση αμινοξέων.. Ο σχηματισμό ανώτερων αλκοολών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης επηρεάζεται από τις πρακτικές οινοποιείο.[69]

Ethyl caprylate

Η αρωματική ένωση ethyl caprylate (καπρυλικό αιθύλιο) προσδίδει στον οίνο το χαρακτηριστικό άρωμα των πράσινων φούτων.

Hexyl acetate

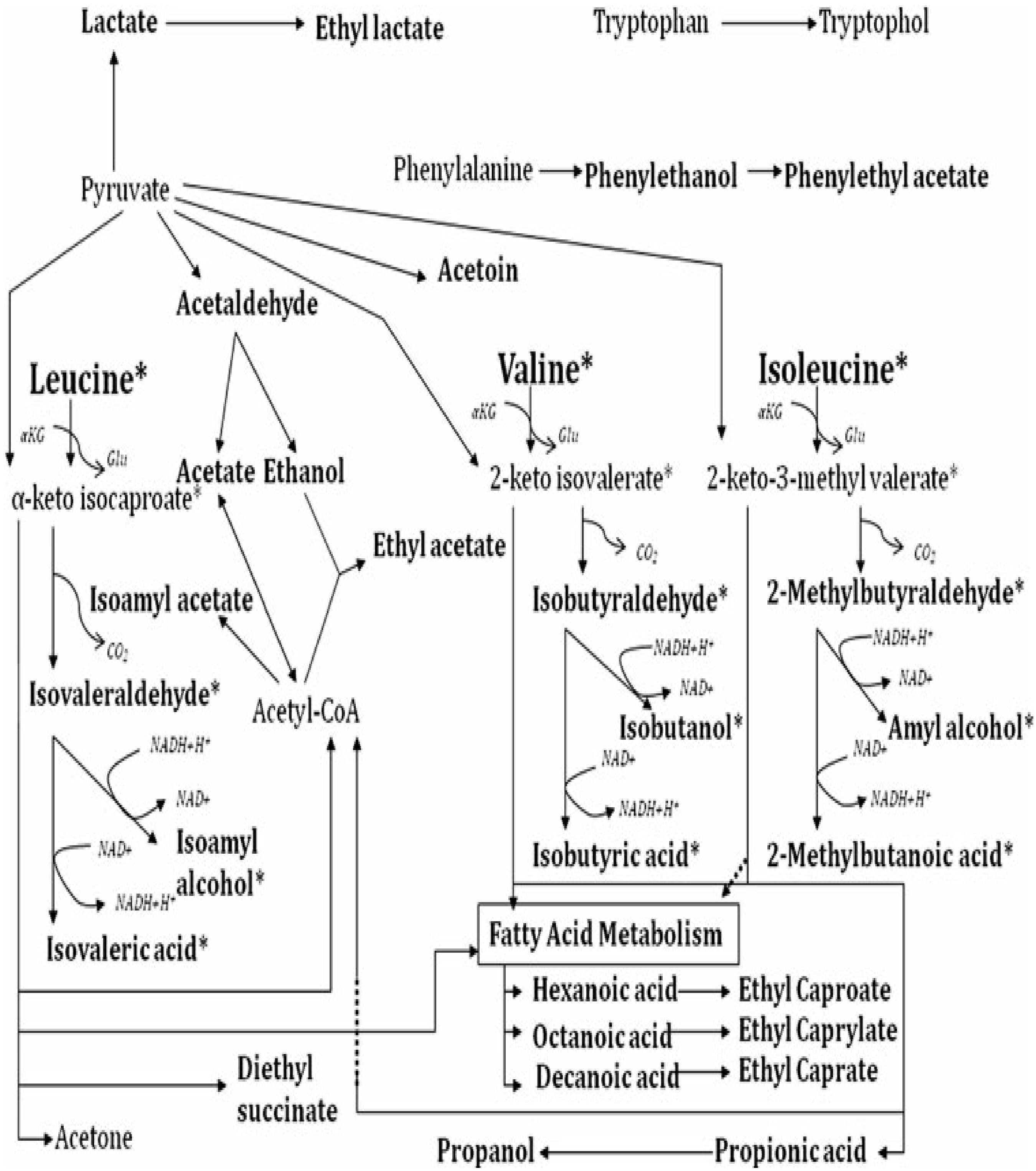
Οξικοί εστέρες, όπως ο οξικός αιθυλεστέρας, το **εξανικό οξύ**,το οξικό ισοαμύλιο και το οξικό 2-φαινυλαιθύλιο αναγνωρίζονται ως σημαντικές ενώσεις οι οποίες επηρεάζουν τη γεύση του κρασιού.

Ethyl carporate

Η αρωματική αυτή ένωση (καπρονικό αιθύλιο) προσδίδει στον οίνο φρουτώδη χαρακτήρα και οσμές όπως του ανανά και της μπανάνας.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται σχηματικά πως προκύπτουν οι αρωματικές ενώσεις

(εικόνα 3)



Lactate
Ethyl lactate
Tryptophan
Tryptophol
Phenylalanine
Phenylethanol
Phenylethyl acetate
Pyruvate
Acetoin
Acetaldehyde
Leucine*
Valine*
Isoleucine*
αKG
Glu
αKG
Glu
αKG
Glu
Acetate Ethanol
α-keto isocaproate*
2-keto isovalerate*
2-keto-3-methyl valerate*
Ethyl acetate
CO_2
CO_2
Isobutyraldehyde*
2-Methylbutyraldehyde*
Isoamyl acetate
CO_2
NADH+H+
NADH+H+
NAD+
NAD+
Isovaleraldehyde*
Acetyl-CoA
Isobutanol*
Amyl alcohol*
NAD+
NAD+
NADH+H+
NAD+
NADH+H+
NADH+H+
NAD+
Isoamyl alcohol*
NAD+
NADH+H+
Isobutyric acid*
2-Methylbutanoic acid*
Fatty Acid Metabolism
Isovaleric acid*
Hexanoic acid
Ethyl Caproate
Octanoic acid
Ethyl Caprylate
Decanoic acid
Ethyl Caprate
Diethyl succinate
Acetone
Propanol
Propionic acid

(Εικόνα 3)

4.3) Λιπαρά Οξέα και Ζύμες

Για να μελετηθεί εκτενέστερα ο μικροοργανισμός κατά την αλκοολική ζύμωση έγινε ανάλυση του ενδοπολυκκυταρικού του λίπους και στα τρία διαφορετικά υποστρώματα των τριών ζυμώσεων.

Μια από τις κύριες τοξικές επιδράσεις της αιθανόλης είναι η κατάρρευση της ημίρρευστης κατάστασης της κυτταρικής μμεμβράνης, καθώς η αιθανόλη εισχωρεί στην μμεμβράνη και διασπά τους δεσμούς λιπιδίου–πρωτεΐνης και λιπιδίου–λιπιδίου. Το αποτέλεσμα είναι η κυτταρική μμεμβράνη να γίνεται ολοένα και πιο διαπερατή. Η ιοντική διαβάθμιση που αποτελεί την πρωτονιακή κινητήρια δύναμή διαμέσου της μμεμβράνης, καταρρέει σιγά σιγά και μμικρά μόρια διαρρέουν από το κύτταρο στο περιβάλλον με κατάληξη τον θάνατο του κυττάρου . Έχει βρεθεί πως η ανθεκτικότητα των διαφόρων στελεχών στην αιθανόλη σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μμεμβράνη [70].

Σύμφωνα με τα δεδομένα που παρατέθηκαν στο κεφάλαιο 3, κατά την αλκοολική ζύμωση ο μικροοργανισμός *Candida oleophila* σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L γλυκόζης παρατηρείται ότι όσο περισσότερα σάκχαρα καταναλώνει τόσο περισσότερη αιθανόλη παράγει. Οι δύο ζυμώσεις δεν παρατηρείται να έχουν μεγάλη διασπορά . Η ανώτατη τιμή που παίρνει η αιθανόλη είναι 9,54 g/L(σχήμα 1).

Ο συντελεστής απόδοσης του μικροοργανισμού στην παραπάνω ζύμωση έχει τιμή 0, 32 που θεωρείται ικανοποιητικός (σχήμα 2).

Η βιομάζα στην παρούσα ζύμωση παρουσιάζει μία αύξηση με ανώτατη τιμή 1,6 g/L και στη συνέχεια της αλκοολικής ζύμωσης μειώνεται (σχήμα 3).

Το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών καθώς και το ποσοστό λίπους που παράγει ο μικροοργανισμός μειώνονται και φτάνουν σε ελάχιστα επίπεδα κάτω από 5 %(σχήμα 4).

Από τον πίνακα 1 γίνεται αντιληπτό ότι η αρωματική ένωση ethyl butyrate(αιθυλικός βουτυλεστέρας) παρέμεινε σχεδόν σταθερή σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις σε αντίθεση με την isoamyl alcohol(ισομυλική αλκοόλη) η οποία παρουσιάζει μία αύξηση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τις υπόλοιπες αρωματικές ενώσεις. Η phenethyl alcohol παρουσιάζει μικρή αύξηση αλλά προς το τέλος της ζύμωσης αρχίζει να μειώνεται. Η isoamyl acetate και η ethyl caprylate παρουσιάζουν μία μικρή αύξηση κατά την πορεία της ζύμωσης και αρχίζουν να μειώνονται προς το τέλος της . και οι δύο βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

Τέλος παρατηρείται ότι στη ζύμωση σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 30 g/L γλυκόζης τα κύρια λιπαρά οξέα που παράγει ο μικροοργανισμός είναι το παλμιτικό, το ελαϊκό το οποίο βρίσκεται και στο μεγαλύτερο ποσοστό και το λινοελαικό (πίνακας2).

Από το Σχήμα 5 παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός *Candida oleophila* παρουσιάζει μία μικρή διασπορά μεταξύ των δύο ζυμώσεων με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L φρουκτόζη. Ειδικότερα στην πρώτη ζύμωση η παραγωγή αλκοόλης φαίνεται να αρχίζει μετά τις 34 ώρες όταν στη δεύτερη ζύμωση με την ίδια αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα η παραγωγή αλκοόλης ξεκινά στις 22 ώρες. Διαφορά παρουσιάζουν επίσης και τα εναπομείναντα σάκχαρα καθώς στην πρώτη ζύμωση αποζυμώνει ενώ στη δεύτερη υπολείπονται για κατανάλωση 4 g/L σάκχαρα.

Στο σχήμα 6 διακρίνουμε πως ο συντελεστής απόδοσης προϊόντος- υποστρώματος έχει τιμή 0,26 που είναι μικρότερος από το συντελεστή απόδοσης του μικροοργανισμού κατά την αλκοολική ζύμωση με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L γλυκόζης.

Στα αρχικά στάδια της ζύμωσης η βιομάζα του μικροοργανισμού αυξάνεται με ταχύ ρυθμό με ανώτατη τιμή 1,025 g/L ενώ στα επόμενα στάδια παρατηρείται σταθερή μείωση αυτής (σχήμα 7).

Το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών καθώς και το ποσοστό λίπους που παράγει ο μικροοργανισμός παρουσιάζει παρόμοια πορεία με αυτή της προηγούμενης ζύμωσης (30g/L γλυκόζης), μειώνονται σταθερά με τελικά ποσοστά κατώτερα από 10 % για τους ενδοπολυσακχαρίτες και 5 % για το λίπος (σχήμα 8) .

Στον πίνακα 3 παρατηρείται μία μεγαλύτερη συγκέντρωση της αρωματικής ένωσης ethyl butyrate σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε στην αλκοολική ζύμωση με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 30 g/L γλυκόζη. Η ουσία αυτή παρουσιάζει μία μεγαλύτερη αυξομείωση κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης με ανώτατη τιμή 0,40 mg/L. Όσον αφορά την isoamyl alcohol βρίσκεται και αυτή σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με την προηγούμενη αλκοολική ζύμωση και παρουσιάζει και αυτή αυξομείωση με ανώτατη τιμή 86,9 mg/L. Η phenethyl alcohol βρίσκεται στα ίδια επίπεδα τιμών με την προηγούμενη ζύμωση και παρατηρείται και σε αυτή μία μικρή αυξομείωση της συγκέντρωσης της κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης με ανώτατη τιμή 5,23 mg/L.

Και σε αυτή τη ζύμωση τα κυριότερα λιπαρά οξέα που παράγει ο μικροοργανισμός *Candida oleophila* είναι το παλμιτικό, το ελαϊκό και το λινοελαικό με μεγαλύτερο ποσοστό να παρουσιάζει το ελαϊκό σε ποσοστό 49,5 % (πίνακας 4) .

Κατά την αλκοολική ζύμωση με αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα 200 g/L εκ των οποίων τα 100 αποτελούνται από γλυκόζη και τα υπόλοιπα 100 από φρουκτόζη γίνεται αντιληπτό ότι η κατανάλωση της γλυκόζης από το μικροοργανισμό είναι ταχύτερη από αυτή της φρουκτόζης (σχήμα 9). Ο οργανισμός κατάφερε να καταναλώσει συνολικά 44,63 g/L σάκχαρα εκ των οποίων τα 27,38 ήταν γλυκόζη και τα 17,25 φρουκτόζη.

Η παραγωγή αλκοόλης ξεκινά μεταξύ των 9 και 26 ωρών της ζύμωσης με τελική τιμή 10,8 g/L.

Ο συντελεστής απόδοσης του μικροοργανισμού είναι αισθητά μικρός με τιμή 0,17 (σχήμα 10).

Η βιομάζα του μικροοργανισμού σε αυτή τη ζύμωση βρίσκεται σε μεγαλύτερα επίπεδα από ότι στις προηγούμενες ζυμώσεις με ανώτατη τιμή 2,43 g/L (σχήμα 11).

Όσον αφορά τα ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών και λίπους που παράγει ο μικροοργανισμός παρουσιάζουν και εδώ παρόμοια πορεία με τις τα ποσοστά των προηγούμενων ζυμώσεων. Τα τελικά ποσοστά έχουν τιμές 14% για τους ενδοπολυσακχαρίτες και 8% για το λίπος (σχήμα 12).

Στην παραπάνω ζύμωση η οποία και προσομοιάζει στις συγκεντρώσεις του κρασιού παρατηρείται το εξής αξιοσημείωτο: αρωματικές ενώσεις που αναγνωρίζονταν από τον αέριο χρωματογράφο στις προηγούμενες ζυμώσεις σε αυτή δεν διαφαίνονται. Ο αιθυλικός βουτυλεστερας βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζοντας μία αυξομείωση κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης με ανώτατη τιμή 0,22 mg/L. Η ισοαμυλική αλκοόλη βρίσκεται σε σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις δύο προηγούμενες ζυμώσεις αλλά παρουσιάζει και αυτή αυξομείωση συγκέντρωσης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με ανώτατη τιμή 32,27 mg.L. Τέλος η phenethy alcohol παρουσιάζει μία πολύ μικρή αύξηση και παραμένει και αυτή σε χαμηλές συγκεντρώσεις με ανώτατη τιμή 5,65 mg/L.(πίνακας 5).

Παρατηρείται και ε αυτή τη ζύμωση ότι τα κύρια λιπαρά οξέα του ενδοκυτταρικού λίπους του C. Oleophila είναι το παλμιτικό οξύ, το λινολεικού καθώς και το ολεϊκό οξύ με το παλμιτικό οξύ να βρίσκεται στο μεγαλύτερο ποσοστό 48,8 % (πίνακας 6).

Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα βρίσκονται σε εξαιρετικά χαμηλές ποσότητες.

.

5) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *Candida oleophila*. Ταυτόχρονα με τη διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής αιθανόλης μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις των αρωματικών ουσιών που εκλύει ο μικροοργανισμός κατά την αλκοολική ζύμωση καθώς και το ενδοκυτταρικό του λίπος που παράγει. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες με σκοπό την επίτευξη του ακριβέστερου αποτελέσματος.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ο *Candida oleophila* δεν είναι μία αποδοτική ζύμη για την ολοκλήρωση μίας αλκοολικής ζύμωσης από γλεύκος σταφυλιών. Γίνεται αντιληπτό ότι η εφαρμογή του μικροοργανισμού σε συνζύμωση με κάποια πιο αποδοτική όπως είναι το χαρακτηριστικό παράδειγμα του *S. Cerevisiae* είναι απαραίτητη για την περεταίρω διερεύνηση του μικροοργανισμού.

Η ανώτατη τιμή αιθανόλης ήταν 12,5g/L που αντιστοιχεί περίπου στο 1 % v/v αλκοόλης.

Οι αρωματικές ουσίες που παράγει έχουν ικανοποιητικές συγκεντρώσεις σε σχέση με άλλες οινοποιητικές ζύμες γεγονός που τον κάνει ελκυστικό για τη χρησιμοποίησή του με σκοπό τη βελτιστοποίηση των αρωματικών ουσιών μίας ποικιλίας.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι ο μικροοργανισμός δεν παράγει σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους κατά την αλκοολική του ζύμωση. Δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ελαιογόνος μικροοργανισμός γιατί αγγίζει μόλις το 9% w/w λιπιδίων στη μικροβιακή του μάζα.(Για να θεωρηθεί ένας μικροοργανισμός ελαιογόνος απαιτείται να συσσωρεύει > 20 % W/W λιπίδια). Τα κύρια λιπαρά οξέα που παράγει μικροοργανισμός είναι το ελαϊκό, το παλμιτικό και το λινοελαικό.

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι ο μικροοργανισμός *Candida oleophila* δε μπορεί να θεωρηθεί αποδοτικός για την παραγωγή βιοαιθανόλης αφού καθώς παρατηρούμε από τον παρακάτω πίνακα ο συντελεστής απόδοσής του είναι πολύ μικρός συγκριτικά με άλλων μικροοργανισμών που ήδη χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό.

Strain	Ethanol g/L	Yield g/g
S. cerevisiae (CBS8066)	120	0,51
Z.mobilis (ZM4)	120	0,51
C. oleophila	8-12,5	0,17

Η επέκταση της μελέτης του μικροοργανισμού είναι και εδώ απαραίτητη για να διαπιστωθεί αν τελικά είναι η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων αυτή που διακόπτει την αλκοολική του ζύμωση ή η ελάχιστη ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους που από μελέτες έχει βρεθεί ότι προστατεύει τις κυτταρικές μεμβράνες από τα υψηλά ποσοστά αιθανόλης.

Συμπερασματικά ο μικροοργανισμός *Candida oleophila* αποτελεί μία ενδιαφέρουσα ζύμη για την ενδεχόμενη εφαρμογή της στην οινοποίηση.

Βιβλιογραφία

[1] Bisson LF, Waterhouse LA, Ebeler SF, Walker MA & Lapsley JT (2002) The present and future of the international wine industry. 696–699

[2] Pretorius IS & Bauer FF (2002) Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. Trends Biotechnol 426–432

[3] Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast 675-729.

[4] Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. & Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Aust. J. Grape Wine Res. 139-173

[5] Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. & Kunkee, R.E., 1996. Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York.

[6] Jackson R.S. ''Wine Science Principles and Applications'', Academic Press

[7] Romano P. and Suzzi G. 1996, Appl. Envirom. Microbial. 309-315

[8] Lambrechts MG & Pretorius IS (2000) Yeast and its importance in wine aroma – a review. S Afr J Enol Vitic : 97–129.

[9] Fleet GH (1992) Spoilage yeasts. Crit Rev Biotechnol : 1–44

[10] Fleet GH (2003) Yeast interactions and wine flavor. Int J Food Microbiol : 11–22.

[11] Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA & Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. Aust J Grape Wine Res

[12] Ciani M & Maccarelli F (1998) Oenological properties of nonSaccharomyces yeasts associated with wine-making. World J Microbiol Biotechno

[13] Heard GM (1999) Novel yeasts in winemaking-looking to the future. Food Aust : 347–352

[14] Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M & Capece A (2003) Function of yeast species and strains in wine flavor. Int J Food Microbiol : 169–180.

[15] Jolly NP, Augustyn OPH & Pretorius IS (2003a) The occurrence of non-Saccharomyces cerevisiae yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. S Afr J Enol Vitic : 35–42.

[16] Charoenchai C, Fleet GH, Henschke PA & Todd BEN (1997) Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. Aust J Grape Wine Res : 2–8.

[17] Fernandez M, Ubeda JF & Briones AI (2000) Typing of nonSaccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. Int J Food Microbiol : 29–36.

[18] Strauss MLA, Jolly NP, Lambrechts MG & van Rensburg P (2001) Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. J Appl Microbiol : 182–190.

[19] Dias L, Dias S, Sancho T, Stender H, Querol A, Malfeito-Ferreira M & Loureiro V (2003) Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. Food Microbiol : 567–574.

[20] Dias L, Dias S, Sancho T, Stender H, Querol A, Malfeito-Ferreira M & Loureiro V (2003) Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. Food Microbiol : 567–574.

[21] Σουφλερός Ευάγγελος . Οινολογία, Θεσσαλονίκη 2012

[22] Henschke, P., 1997. Wine yeast. In: Zimmerman, F.K., Entian, K.D. (Eds.), Yeast Sugar Metabolism, Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications. Technomic Publishing, Lancaster, UK, pp. 527 – 560.

[23] Παπανικολάου Σ. Μικροβιολογία Οίνου Πανεπιστημιακές σημειώσεις 2014

[24] Rubereau Gayon P. (1964) Les composes phainolueq du raisin et du vin Institute National de la RechercheAgronomique de Paris

[25] Glazer A.N. Nikaido H. ,Microbial Biotechnology, Fundamentals of Applied Microbiology W.H. Freeman and Company New York 1995

[26] Hawtman, A.C., Duplessis, C.S. (1986): The effect of grape cultivar and yeast strain on fermentation rate and concentrations of volatile components in wine. S. Afr. J. Enol. Vitic.

[27] Yoshioka, K., Hashimoto, N. (1984): Ester formation by brewer's yeast during sugar fermentation. Agricultural and Biological Chemistry

[28] Pronk J.T. Steensma , H. Y. and Van Dijken Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae.* Yeast,1996 1607-1633.

[29] Fukuhara, H., The Kluyver effect revisited. FEMS Yeast Res., **2003**. 327-331.

[30] Carrascosa, J., Viguera, M. D., de Castro, I. N. and Scheffers, W., Metabolism of acetaldehyde and custers effect in the yeast. Antonie Van Leeuwenhoek, **1981**. 209-215

[31] Wijsman, M. R., van Dijken, J. P., van Kleeff, B. H. and Scheffers, W. A., Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). Antonie Van Leeuwenhoek, **1984**. 183-192.

[32] van Dijken, J. P. and Scheffers, W. A., Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. FEMS Microbiol. Rev., **1986**. 199-224.

[33] Rodrigues, F., Ludovico, P. and Leão, C., Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism, (Ed.), Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, Springer, **2006**, pp. 101-121

[34] Lin, Y. and Tanaka, S., Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol., **2006**. 627-642

[35] Aggelis, G., Microbiology and Microbial Technology. **2007**, Stamoulis

[36] Jeffries, T. and Jin, Y.-S., Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol., **2004**. 495-509

[37] Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., et al., Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. Chem. Soc. Rev., **2014**. 2587-2627

[38] Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M. and Picataggio, S., Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis.* Science, **1995**. *267* 240-243.

[39] Yang, S., Pappas, K. M., Hauser, L. J., Land, M. L., et al., Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis.* Nat. Biotechnol., **2009**. *2)*, 893-894.

[40] Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H., Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues.Resour. Conserv. Recycl., **2007***,* 1-39.

[41] Sun, Y. and Cheng, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresour. Technol., **2002**. , 1-11.

[42] Rehm, H. J. and Reed, G., Products of primary Metabolism, in N. Kosaric, Editor (Ed.), Biotechnology, VHC, **1996**, pp. 121-205.

[43] Koutinas, A. A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S. and Kookos, I. K., Design and techno994 economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. Fuel, **2014**. *116*, 566-577

[44] Lin, Y. and Tanaka, S., Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl. Microbiol.Biotechnol., **2006**. 627-642.

[45] McMillan, J. D., Bioethanol production: Status and prospects. Renew. Energy, **1997**. 295-302.

[46] Sarris, D., Kotseridis, Y., Linga, M., Galiotou-Panayotou, M. and 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., **2009**. 29-37.

[47] Sarris, D., Giannakis, M., Philippoussis, A., Komaitis, M., et al., Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses. J. Chem. Technol.Biotechnol., **2013**. 958-969.

[48] Sarris, D., Matsakas, L., Aggelis, G., Koutinas, A. A. and Papanikolaou, S., Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. Ind. Crops. Prod., **2014**. 83-93

[49] Roukas, T., Ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells on the mineral kissiris. Food Biotechnol., **1995**. 175-188.

[50] Kopsahelis, N., Bosnea, L., Bekatorou, A., Tzia, C. and Kanellaki, M., Alcohol production from sterilized and non sterilized molasses by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on brewer's spent grains in two types of continuous bioreactor systems. Biomass Bioenerg., **2012**. 87-94.

[51] Balat, M., Balat, H. and Öz, C., Progress in bioethanol processing. Prog. Energy Combust. Sci., **2008**. 551-573.

[52] Kim, S. and Dale, B., Ethanol fuels: E10 or E85–life cycle perspectives (5 pp). Int. J. Life Cycle Assess., **2006**. 117-121

[53] Philbrook, A., Alissandratos, A. and Easton, C. J., Biochemical processes for generating fuels and commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **2013**.

[54] Hahn-Hagerdal, B., Lidén, G., Senac, T. and Skoog, K., Ethanolic Fermentation of Pentoses in Ugnocellulose Hydrolysates Appl. Biochem. Biotechnol., **1991**. 131-144

[55] Wine flavor and aroma Gustav Styger • Bernard Prior • Florian F. Bauer Received: 4 May 2011 / Accepted: 4 July 2011 / Published online: 24 July 2011 Society for Industrial Microbiology 2011.

[56] Καλλίθρακα, Χημεία Οίνου Πανεπιστημιακές σημειώσεις 2014

[57] ETIEVANT, X.P. (1991) Wine. In Volatile compounds in foods and beverages, eds. H. Maarse, New York, Marcel Dekker, pp. 483-546

[58] RAPP, A.; MANDERY, H. (1986) Wine aroma. Experientia 42: 873-884.

[59] BONNLANDER, B.; BADERSCHNEIDER, B.; MESSERER, M.; WINTERHALTER, P. (1998) Isolation of two novel terpenoid glucose esters from Riesling wine. J. Agric. Food Chem. 1474- 1478.

[60] ZOECKLEIN, W.B. MARCY, E.J. WILLIAMS, M.J. JASINSKI Y. (**1997**) Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* on glycosyl glucose, potential volatile terpenes and selected aglycones of white Riesling (Vitis vinifera L.) wines. *J. Food Composition Anal.* 55-65

[61] Massive Isolation of Anamorphous Ascomycete YeastsCandida oleophila from Plant Phyllosphere A. M. Glushakova, A. M. Yurkov, and I. Yu. Chernov1.

[62] Production of flavoured volatile organic compounds (VOCs) by Candida oleophila GK10 Optimisation using factorial design and response surface analysis Pietro Buzzini a,∗, Alessandro Martini a, Ugo Maria Pagnoni b, Paolo Davoli b.

[63] Folch et al 1956, Asimple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues.

[64] Degre, 1993 Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine

[65] Soubeyrand S, Pope L, De Chasseval R, Gosselin D, Dong F, de Villartay JP, Hache RJ (2006) Artemis phosphorylated by DNA-dependent protein kinase associates preferentially with discrete regions of chromatin.

[66] Saerens et al 2006, 2008, Verstrepen et al 2003.

[67] Banana flavor: insights into isoamyl acetate production Sebastian Torres1, Ashok Pandey2 and Guillermo R. Castro3,4.

[68] Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review M.G. Lambrechts and I.S. Pretorius

[69] The aroma of wine is caused of hundrents of volatile compounds, B Zoecklein - 2004.

[70] You, K.M., Rosenfield, C.L., Knipple, D.C. (2003): Ethanol tolerance in the yeast Saccharomyces cereviciae is dependent on cellular oleic acid content. Applied and environmental microbiology.

[71] Walker 1998, Yeast Physiology and Biotechnology.