



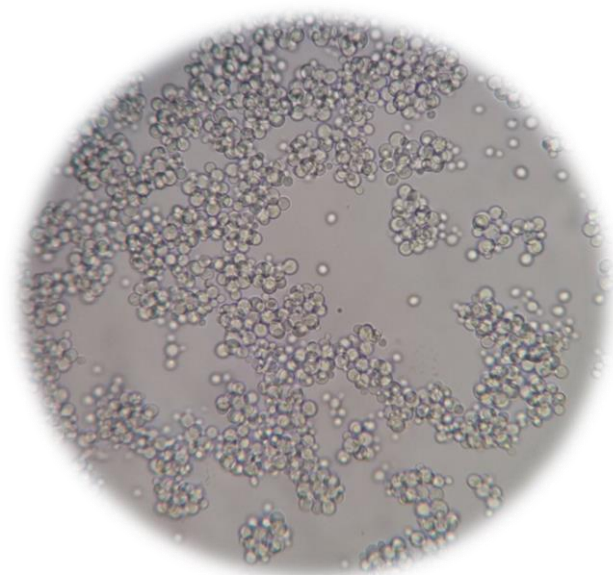
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

&

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

«Δ.Π.Μ.Σ. ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Kazachstania* ΣΕ  
ΣΑΚΧΑΡΟΥΧΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ»**

ΠΛΑΤΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΝΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2017

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Kazachstania* ΣΕ  
ΣΑΚΧΑΡΟΥΧΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

ΠΛΑΤΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΝΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Σεραφείμ Παπανικολάου

## ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναοληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο  
Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μπινιάρη Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια, Εργαστήριο  
Αμπελολογίας, Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κοτσερίδης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οινολογίας, Τμήμα  
Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος «Επιστήμης Τροφίμων και διατροφής του ανθρώπου» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Αμπελουργίας - Οινολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επιβλέπωντα καθηγητή Σεραφείμ Παπανικολάου για την βοήθεια και την εμπιστοσύνη κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης, καθώς και την κυρία Ουρανία Καλλαντζή για όλη την καθοδήγηση και συνεχή επίβλεψη του πειραματικού σταδίου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον Αναπληρωτή καθηγητή και διευθυντή του εργαστηρίου Οινολογίας Γεώργιο Κοτσερίδη καθώς και στην κυρία Νίκη Προξενιά για τη συμβολή τους στο οινολογικό κομμάτι της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στους διδακτορικούς Ξερόπουλο Βαγγέλη και Βουκίδη Γιάννη για την απεριόριστη βοήθεια και συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους, οικογένεια και φίλους, για την υποστήριξή τους σε όλο το διάστημα του μεταπτυχιακού προγράμματος.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	7
ABSTRACT .....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1. ΡΟΛΟΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ .....	9
1.2. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ .....	10
1.3. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ .....	11
1.4. ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ ΣΤΟ ΕΚΑΣΤΟΤΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ .....	12
1.5. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ .....	14
1.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ .....	15
1.7. ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΖΥΜΩΝ .....	16
1.8. ΠΗΓΕΣ ΝΕΩΝ ΖΥΜΩΝ .....	18
1.9. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΖΥΜΩΝ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ .....	20
1.10. ΟΙΝΟΣ ΚΑΙ ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ .....	21
1.11. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΟΔΩΝ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ.....	28
1.12. ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ .....	29
1.12.1 ΕΜΒΔΕΝ-ΜΕΥΕΡΗΟΦ-ΡΑΡΝΑΣ (Γλυκόλυση) .....	29
1.12.2. ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	33
1.12.3. ΓΛΥΚΕΡΟΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ - ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ .....	34
1.12.4. ΑΝΑΠΝΟΗ .....	36
1.13. ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ CRABTREE ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ PASTEUR.....	39
1.14. ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΩΣ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΟ .....	40
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ .....	43
2.2. ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	43
2.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΚΩΝΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ .....	44
2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ .....	45
2.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗΣ .....	45
2.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ .....	45
2.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ .....	46
2.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ .....	46

2.9.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ .....	47
2.10.	ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ...	48
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ		
3.1.	ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ <i>Kazachstania hellenica</i> και <i>Kazachstania zonata</i> ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΟΥ 30 g/L.....	50
3.1.1.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ8 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ.....	50
3.1.2.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ8 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ .....	53
3.1.3.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Υ8 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	55
3.1.4.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ58 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ.....	55
3.1.5.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ58 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ .....	56
3.1.6.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Υ58 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ .....	57
3.1.7.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ59 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ.....	58
3.1.8.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ59 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ .....	59
3.1.9.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Υ59 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ .....	60
3.1.10.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ60 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ.....	61
3.1.11.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ60 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ .....	62
3.1.12.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Υ60 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ .....	63
3.1.13.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ31 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ.....	64
3.1.14.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ31 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ .....	66
3.1.15.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Υ31 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	68
3.1.16.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ32 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ.....	68
3.1.17.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ32 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ .....	69
3.1.18.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Υ32 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ .....	70
3.2.	ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ <i>Kazachstania hellenica</i> και <i>Kazachstania zonata</i> ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΟΥ 100 g/L.....	71
3.2.1.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ8 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ.....	71
3.2.2.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ8 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ .....	72

3.2.3.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Υ8 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	73
3.2.4.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ31 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ.....	73
3.2.5.	ΣΤΕΛΕΧΟΣ Υ31 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ .....	74
3.2.6.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Υ31 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	75
3.3.	ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ (GC-FID SPME).....	76
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	97
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	99

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η αλκοολική ζύμωση έξι στελεχών του γένους *Kazachstania*, σε σακχαρούχα υποστρώματα. Πρόκειται για έναν ζυμομύκητα που δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, ταυτοποιήθηκε το 1971 και προέρχεται από ζυμώμενα σταφύλια στο Καζακστάν.

Στο πρώτο σκέλος του πειράματος πραγματοποιήθηκε ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρου 30g/L και κατόπιν ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρου 100g/L. Με τη χρήση της HPLC έγινε καταγραφή των καταναλωθέντων σακχάρων, της παραγόμενης αιθανόλης και γλυκερόλης, καθώς και του ενδοκυτταρικού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών που παρήγαγαν οι μικροοργανισμοί.

Στο δεύτερο σκέλος του πειράματος προσδιορίστηκε ποιοτικά το αρωματικό προφίλ τριών εκ των έξι στελεχών μέσω GC-FID με SPME.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προέκυψε πως ο μικροοργανισμός *Kazachstania* χαρακτηρίζεται ως Crabtree θετικός, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οινοποιητική ζύμη καθώς παράγει ικανή ποσότητα αιθανόλης καταναλώνοντας γλυκόζη και φρουκτόζη και τέλος παράγει πτητικές ενώσεις ικανές να συμμετέχουν στο αρωματικό προφίλ ενός οίνου.

Λέξεις – κλειδιά: αλκοολική ζύμωση, *Kazachstania*, αιθανόλη, γλυκερόλη, HPLC, πτητικές ενώσεις, GC-FID.

## ABSTRACT

The current thesis is a study of alcoholic fermentation of six strains of the genus *Kazachstania*, on sugary substrates. It's a yeast that has not been studied extensively, it was coined in 1971 and comes from fermented grapes in Kazakhstan.

The first part of the experiment was the alcoholic fermentation with an initial sugar concentration of 30g / L and then with an initial sugar concentration of 100g / L. The use of HPLC revealed the consumed sugars, ethanol and glycerol produced, as well as the intracellular fat and intrapolsaccharides produced by the yeast strains.

In the second part of the experiment, the aromatic profile of three of the six strains was determined by GC-FID with SPME.

The results of the experiments revealed that the yeast *Kazachstania* is classified as Crabtree positive, it can be used as a winemaking yeast as it produces a good amount of ethanol consuming glucose and fructose and finally produces volatile compounds capable of participating in the aromatic profile of a wine.

Key - words: alcoholic fermentation, *Kazachstania*, ethanol, glycerol, HPLC, volatile compounds, GC-FID.



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1. ΡΟΛΟΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

Η μικροβιακή χλωρίδα που υπάρχει στο χυμό των σταφυλιών έχει εντυπωσιακή επίδραση στη σύνθεση του παραγόμενου οίνου. Τα τελικά προϊόντα της μικροβιακής δραστηριότητας μπορεί να επηρεάσουν άμεσα το άρωμα ή τη γεύση του οίνου, αλλά μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με άλλα συστατικά των σταφυλιών, ενισχύοντας τους χαρακτήρες της ποικιλίας ή καλύπτοντάς τους. Ορισμένα πτητικά μικροβιακά συστατικά είναι ανιχνεύσιμα σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά και εντός των ορίων που βρέθηκαν στο κρασί. Όσο μεγαλύτερη ποικιλομορφία έχει η μικροβιακή χλωρίδα, τόσο πιο ποικιλόμορφο θα είναι και το φάσμα των τελικών προϊόντων του οίνου. Αυτό μπορεί να έχει θετικό ή αρνητικό αντίκτυπο, ανάλογα με την επιθυμητή σύνθεση του κρασιού. Πολυάριθμοι μικροοργανισμοί έχουν ταυτοποιηθεί στα σταφύλια, στις επιφάνειες του οινοποιείου, σε ζυμώσεις και κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του κρασιού. Η μελέτη των ζυμομυκήτων στην οινολογία επιβάλλεται, διότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι υπεύθυνοι για την πραγμάτωση της αλκοολικής ζύμωσης, η οποία θα μετατρέψει το γλεύκος σε οίνο [3].

Οι ζυμομύκητες προέρχονται από ώριμα σταφύλια και είναι εντοπισμένοι στην κηρώδη ουσία που περιβάλλει τις ράγες. Η μετακίνηση και η εγκατάσταση των ζυμών στα σταφύλια γίνεται με τη βοήθεια των εντόμων και κυρίως του γένους *Drosophila*. Οι ζυμομύκητες διαχειμάζουν στο έδαφος των αμπελώνων, όπου μεταφέρονται με την πτώση των ραγών. Από εκεί, την περίοδο της άνοιξης, επαναφέρονται στους βότρες με τη βοήθεια των εντόμων.

Υπάρχουν τρία κύρια γένη ζυμομυκήτων που βρέθηκαν στα σταφύλια: το είδος *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), το είδος *Metschnikowia pulcherrima* (*Candida pulcherrima*) και το είδος *Candida stellata*. Ένας βασικός παράγοντας που καθορίζει τα είδη ζυμομυκήτων που υπάρχουν στην επιφάνεια των σταφυλιών φαίνεται να είναι το ύψος της ζημίας στον καρπό. Η διαρροή των σακχαρούχων υποστρωμάτων είτε μέσω της φυσικής βλάβης που προκαλείται από έντομα, πτηνά ή μυκητιάσεις, είτε ως συνέπεια της γήρανσης του καρπού, ο οποίος

ζαρώνει λόγω αφυδάτωσης, είναι ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη Ασκομυκήτων. Η ποσότητα της φυσικής διαρροής ποικίλλει ανάλογα την ποικιλία του σταφυλιού και τις αποστάσεις φύτευσης, έτσι δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι ορισμένες μελέτες έχουν παρατηρήσει μια ισχυρή συσχέτιση της ποικιλίας με την βιοποικιλότητα της επιφάνειας του καρπού. Οι πρώτες από τις ζύμες που θα εμφανιστούν είναι οι προαναφερθείσες ζύμες των γενών *Hanseniaspora*, *Candida* και *Metschnikowia*. Αυτές οι ζύμες κυριαρχούν στην επιφάνεια των σταφυλιών καθώς αυτά ωριμάζουν. Έτσι, μερικές από τις διακυμάνσεις των ειδών που προσδιορίζονται στη βιβλιογραφία, είναι συνάρτηση της φυσιολογικής ωρίμανσης και της ακεραιότητας των σταφυλιών όταν συγκομίζονται. Ο κύριος οινοποιητικός ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* δεν εμφανίζεται σε μεγάλο ποσοστό στην επιφάνεια των σταφυλιών, αλλά είναι αυτός που έχει την καλύτερη προσαρμογή στις αντίξοες συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης. [24]

## 1.2. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Οι ζύμες περιέχουν 75% νερό και 25% ξηρή ουσία, η οποία αποτελείται από:

Υδατάνθρακες 25-50% (κυρίως γλυκογόνο)

Πρωτεΐνες 30-75%

Ανόργανες ουσίες 5-10%

Λιπίδια 2-5%

Ένζυμα

Βιταμίνες

Οι ζύμες είναι ετερότροφοι οργανισμοί και προσλαμβάνουν τον άνθρακα από τα σάκχαρα. Σε αερόβιο περιβάλλον που εκτελούν το φαινόμενο της αναπνοής, η πρόσληψη γίνεται κυρίως από σάκχαρα, γλυκερόλη, αμινοξέα, αλκοόλη, αλδεύδες κλπ, ενώ σε αναερόβιο περιβάλλον κυρίως από εξόζες και κάποιους δισακχαρίτες, παράγοντας ταυτόχρονα αλκοόλη.

Πολύ σημαντική είναι και η πρόσληψη αμμωνιακού αζώτου. Όταν τελειώσει στο γλεύκος, τότε το προμηθεύονται από τα αμινοξέα, τα πολυπεπτίδια και ορισμένες πρωτεΐνες. Όσο περισσότερο άζωτο έχουν στη διάθεσή τους, τόσο πιο έντονη είναι η ζυμωτική τους ικανότητα [24].

### 1.3. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

1. Λανθάνουσα φάση: Το στάδιο αυτό συμπίπτει με την προσαρμογή των κυττάρων στις καινούργιες συνθήκες που βρέθηκαν και δε συμβαίνει καμία κυτταροδιαίρεση με σκοπό τον εμβολιασμό τους.
2. Φάση επιτάχυνσης: Στη φάση αυτή αρχίζει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.
3. Εκθετική φάση: Αντιπροσωπεύει τον κατεξοχήν πολλαπλασιασμό των κυττάρων και η θνησιμότητά τους σε αυτή τη φάση είναι σχεδόν μηδενική.
4. Φάση επιβράδυνσης: Η ταχύτητα του πολλαπλασιασμού των ζυμών μικραίνει και η καμπύλη ανάπτυξης αρχίζει να οριζοντιώνεται.
5. Φάση στασιμότητας: Καμία αύξηση του πληθυσμού δεν παρατηρείται στο στάδιο αυτό, όμως ο πληθυσμός είναι μεταβολικά ενεργός. Η καμπύλη γίνεται ολότελα οριζόντια και ο πληθυσμός παραμένει σταθερός για αρκετό χρονικό διάστημα.
6. Φάση θανάτου: Ο πληθυσμός των ζυμών μικραίνει και τα κύτταρα αυτολύονται, ελευθερώνοντας τα συστατικά τους. Η καμπύλη παίρνει καθοδική πορεία και ο χρόνος διάρκειας του σταδίου αυτού εξαρτάται από το μέγιστο του αριθμού των κυττάρων – που υπήρχε στη φάση της στασιμότητας – και από τη διάρκεια της φάσης αυτής [24].

#### 1.4. ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ ΣΤΟ ΕΚΑΣΤΟΤΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η αύξηση των ζυμών είναι συνδεδεμένη με τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον όπου βρίσκονται. Ανάλογα με τις εξωκυτταρικές συνθήκες, οι ζύμες όντας προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, μπορούν να αποκτήσουν την απαραίτητη ενέργεια για την αύξησή τους μέσω δύο μεταβολικών μονοπατιών, της αναπνοής ή της αλκοολικής ζύμωσης. Το μεταβολικό μονοπάτι της αναπνοής ξεκινάει με την γλυκόλυση και καταλήγει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και το μεταβολικό μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης ξεκινάει με τη μεταβολική οδό της γλυκόλυσης και καταλήγει στην αλκοολική ζύμωση. Ο καθοριστικός παράγοντας για το ποιά από τις δύο οδούς θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός είναι η παρουσία ή μη του οξυγόνου στο μέσο.

Ο μεταβολισμός των ζυμών εξαρτάται από την παρουσία διοξειδίου του άνθρακα. Όμως επειδή είναι ετερότροφοι οργανισμοί και δεν μπορούν να το αφομοιώσουν, οι ενώσεις του άνθρακα θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες στο θρεπτικό υπόστρωμα των ζυμών. Οι απαιτήσεις τους εξαρτώνται από την παρουσία ή την απουσία οξυγόνου. Έτσι, σε αερόβιο περιβάλλον όπου οι ζύμες τελούν υπό το φαινόμενο της αναπνοής, χρησιμοποιούν την ύλη και την ενέργεια από μεγάλο αριθμό μορίων όπως είναι τα σάκχαρα, η γλυκερόλη, τα αμινοξέα, η αλκοόλη κλπ. Σε αναερόβιο περιβάλλον οι ζύμες μπορεί να χρησιμοποιήσουν μόνο μερικά σάκχαρα και κυρίως τις εξόζες D-γλυκόζη, D-μαννόζη, D-φρουκτόζη και κάποιες τη D-γαλακτόζη. Μπορούν ακόμη να χρησιμοποιήσουν και μερικούς δισακχαρίτες μετατρέποντάς τους σε μονοσακχαρίτες.

Ακόμη ένα σημαντικό στοιχείο για την διαβίωση των ζυμών είναι το άζωτο, το οποίο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση αμινοξέων και υπάρχει σε αφθονία στο γλεύκος. Η άμεσα αφομοιώσιμη μορφή του είναι τα ιόντα αμμωνίου. Όταν τελειώσει το αμμωνιακό άζωτο του γλεύκους, οι ζύμες προμηθεύονται το άζωτο από τα αμινοξέα, τα πολυπεπίδια και ορισμένες πρωτεΐνες. Όσο περισσότερο άζωτο έχουν οι ζύμες στη διάθεσή τους, τόσο πιο έντονη είναι η ζυμωτική τους ικανότητα.

Τέλος, οι αφομοιώσιμες πηγές φωσφόρου των ζυμών είναι τα ανόργανα φωσφορικά άλατα και οι φωσφορικοί εστέρες.

Πίνακας 1: Στοιχεία που χρειάζονται τα μυκητιακά κύτταρα

Element	Common sources	Cellular functions
Carbon	Sugars	Structural element of fungal cells in combination with hydrogen, oxygen and nitrogen. Energy source
Hydrogen	Protons from acidic environments	Transmembrane proton motive force vital for fungal nutrition. Intracellular acidic pH (around 5–6) necessary for fungal metabolism
Oxygen	Air, O <sub>2</sub>	Substrate for respiratory and other mixed-function oxidative enzymes. Essential for ergosterol and unsaturated fatty acid synthesis
Nitrogen	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> salts, urea, amino acids	Structurally and functionally as organic amino nitrogen in proteins and enzymes
Phosphorus	Phosphates	Energy transduction, nucleic acid and membrane structure
Potassium	K <sup>+</sup> salts	Ionic balance, enzyme activity
Magnesium	Mg <sup>2+</sup> salts	Enzyme activity, cell and organelle structure
Sulfur	Sulfates, methionine	Sulfhydryl amino acids and vitamins
Calcium	Ca <sup>2+</sup> salts	Possible second messenger in signal transduction
Copper	Cupric salts	Redox pigments
Iron	Ferric salts. Fe <sup>3+</sup> is chelated by siderophores and released as Fe <sup>2+</sup> within the cell	Haem-proteins, cytochromes
Manganese	Mn <sup>2+</sup> salts	Enzyme activity
Zinc	Zn <sup>2+</sup> salts	Enzyme activity
Nickel	Ni <sup>2+</sup> salts	Urease activity
Molybdenum	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Nitrate metabolism, vitamin B <sub>12</sub>

## 1.5. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Οι ζύμες έχουν αξιοποιηθεί εδώ και χιλιάδες χρόνια στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών. Η παραγωγή αιθανόλης εξακολουθεί να είναι και σήμερα το κύριο βιοτεχνολογικό προϊόν. Έχει όμως επιπτώσεις στη φυσιολογία των ζυμών.

Λειτουργεί ως αναστολέας στην ανάπτυξη της ζύμης, ακόμα και σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις, αναστέλλοντας την κυτταρική διαίρεση, μειώνοντας τον όγκο των κυττάρων και τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης μειώνεται η ζωτικότητα των κυττάρων και αυξάνεται ο κυτταρικός θάνατος.

Η αιθανόλη επηρεάζει επίσης τον μεταβολισμό των κυττάρων και τη μακρομοριακή βιοσύνθεση, επάγοντας την παραγωγή πρωτεϊνών θερμικού σοκ, μειώνοντας το ποσοστό του RNA και της συσσώρευσης πρωτεϊνών, ενισχύοντας τη συχνότητα μικρο-μεταλλάξεων, μεταβάλλοντας τον μεταβολισμό και μετουσιώνοντας τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και τα γλυκολυτικά ένζυμα και μειώνοντας τη δραστηριότητά τους.

Οι κύριες θέσεις που επιδρά η αιθανόλη στους ζυμομύκητες είναι οι κυτταρικές μεμβράνες, υδρόφοβες και υδρόφιλες πρωτεΐνες και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η έκθεση των ζυμών στην αιθανόλη έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ρευστότητα της μεμβράνης και τη μείωση της ακεραιότητάς της. Μια μείωση στη διαθεσιμότητα του νερού λόγω της παρουσίας της αιθανόλης προκαλεί την αναστολή των βασικών γλυκολυτικών ενζύμων και αυτές οι πρωτεΐνες μπορεί να μετουσιωθούν.

Οι ζύμες ωστόσο έχουν εξελιχθεί και είναι πιο ανθεκτικές στους στρεσογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η επιβίωση και η ανάπτυξή τους επιτυγχάνεται μέσω μιας σειράς ανταποκρίσεων που εξαρτώνται από ένα πολύπλοκο δίκτυο αντίχενωσης και μεταγωγής σήματος, που οδηγεί σε προσαρμογή στον κυτταρικό κύκλο και προσαρμογές στα προφίλ γονιδιακής έκφρασης και στις δραστηριότητες του μεταβολισμού των κυττάρων.

Η απόκριση των ζυμών στο στρες της αιθανόλης, είναι ένας παροδικός επαναπρογραμματισμός των κυτταρικών δραστηριοτήτων, για να εξασφαλιστεί η επιβίωση σε δύσκολες συνθήκες, να προστατευθούν τα βασικά συστατικά του κυττάρου και να επιτραπεί η επανέναρξη των «φυσιολογικών» κυτταρικών δραστηριοτήτων κατά τη διάρκεια της «ανάρρωσης». Η ανταπόκριση των ζυμών στο περιβαλλοντικό στρες είναι πολύπλοκη, εμπλέκονται διάφορες πτυχές της ανίχνευσης των κυττάρων, της μεταγωγής σήματος, του μεταγραφικού και μετα-μεταγραφικού ελέγχου, της στόχευσης πρωτεϊνών, της συσσώρευσης προστατευτικών και της αυξημένης δραστηριότητας των λειτουργικών επιδιόρθωσης (Mager and Ferreira 1993). Η αποτελεσματικότητα αυτών των διεργασιών σε ένα δεδομένο στέλεχος ζύμης καθορίζει την ευρωστία του και, σε μεγάλο βαθμό, την ικανότητα ενός δεδομένου στελέχους να αποδίδει καλά στις βιομηχανικές διεργασίες. Η καλύτερη κατανόηση των κυτταρικών συνεπειών του μικροβιακού στρες αιθανόλης και των υποκείμενων μηχανισμών αμυντικής πίεσης της αιθανόλης είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτίωση της απόδοσης των στελεχών ζύμης κατά τη διάρκεια του στρες [24].

## 1.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Οι ζυμομύκητες είναι οργανισμοί ψυχρόφιλοι και μεσόφιλοι. Μπορούν να αναπτυχθούν και να δραστηριοποιηθούν είτε σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 20°C, είτε σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 20-45°C. Για κάθε δραστηριότητα των ζυμών, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον τους, υπάρχει ένα άριστο θερμοκρασίας [24].

Πίνακας 2: Κατάταξη ζυμών ανάλογα με το άριστο θερμοκρασίας

Group	Temperature range	Sub-division
1. Psychrophiles	Grow Well at 0°C. (a) cannot grow at temp. above 19° to 22°C (b) may grow at 30° to 35°C	Obligate psychrophiles Facultative psychrophiles
2. Mesophiles	Do not grow at 0°C. Optimum growth temperature is less than 45°C. (a) optimum growth temp. 20°C to 35°C. (b) optimum growth temp. 35°C to 45°C	Saprophytes. Animal parasites.
3. Thermophiles	Optimum growth temperature is greater than 45°C (a) grow above 50°C (b) grow both at 37°C and above 50°C.	Obligate thermophiles Facultative thermophiles

Κατά την εκθετική αύξηση των ζυμών, η θερμοκρασία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαίρεση των κυττάρων. Σε θερμοκρασία 10°C, η κυτταρική διαίρεση μπορεί να πραγματοποιείται κάθε 12 ώρες, στους 20°C κάθε 5 ώρες και στους 30°C κάθε 3 ώρες. Επιπλέον, δύο ακόμα σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη κυτταρική διαίρεση είναι το pH και η συγκέντρωση του σακχάρου στο μέσο [7].

Έχει παρατηρηθεί ότι η ζύμωση εξελίσσεται γρηγορότερα όσο η θερμοκρασία είναι υψηλότερη, παρουσιάζοντας άριστο στους 30-39°C, ανάλογα βέβαια και με το είδος της ζύμης. Πέρα όμως από ορισμένα όρια, όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία, τόσο πιο περιορισμένη είναι η ζύμωση, δηλαδή τόσο λιγότερα σάκχαρα ζυμώνονται και κατά συνέπεια παράγεται μικρότερο ποσοστό αιθανόλης.

Με την επιλογή των κατάλληλων θερμοκρασιών ζύμωσης, αποφεύγεται η διακοπή της ζύμωσης καθώς και οι επακόλουθες συνέπειες που έχει η παραμονή αζύμων σακχάρων, που στην περίπτωση του οίνου είναι η βιολογική του αστάθεια, οι βακτηριακές προσβολές με αύξηση της πτητικής οξύτητας κλπ. Πέρα όμως από την πρόληψη διακοπής της ζύμωσης, η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας ασκεί σημαντική επίδραση στο σχηματισμό διαφόρων αρωματικών στοιχείων που συμμετέχουν σημαντικά στη διαμόρφωση της ποιότητας του οίνου.

## **1.7. ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΖΥΜΩΝ**

Η παραγωγή κρασιού είναι και τέχνη και επιστήμη, ένα μείγμα ατομικής δημιουργικότητας και καινοτόμων τεχνολογιών. Αλλά η παραγωγή κρασιού είναι επίσης επιχείρηση, με οικονομικούς παράγοντες που οδηγούν τις πρακτικές παρασκευής. Για να είναι επιτυχής στη σύγχρονη αγορά, ο οινοποιός πρέπει να ενσωματώσει τις καλλιτεχνικές και οικονομικές πτυχές της παραγωγής και να έχει μια σταθερή κατανόηση των εγγενών και εξωγενών παραγόντων που αποτελούν το κίνητρο για την αγορά. [1]

Ο ρόλος του γένους ή του είδους των ζυμών, αλλά και του στελέχους στη παραγωγή του κρασιού είναι γνωστός και πολύ σημαντικός, καθώς πλέον προβάλλεται επιτακτικά η τυποποίηση του, και το παραγόμενο προϊόν πρέπει να έχει μια σταθερότητα. Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στη ποιότητα ενός οίνου από τη μια χρονιά στην άλλη, οφείλονται κατά ένα ποσοστό στη διαφορετική σύνθεση της



φυσικής ζυμογλωρίδας. Κατά την αλκοολική ζύμωση, πέραν της αλκοόλης και του  $CO_2$ , παράγονται και δευτερογενή πτητικά προϊόντα όπως ανώτερες αλκοόλες, ανώτεροι εστέρες, αλδεΐδες κλπ, που είναι υπεύθυνες για το δευτερογενές άρωμα του οίνου. Οι ποσότητες αυτών των στοιχείων εξαρτώνται από την πρώτη ύλη, το στέλεχος ή τα στελέχη ζυμών που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση, τις συνθήκες διεξαγωγής της (pH, θερμοκρασία), τις τεχνικές οινοποίησης κλπ.

Τα στελέχη ζυμών που επιλέγονται για την οινοποίηση πρέπει να διαθέτουν τα εξής:

1. Βασικά χαρακτηριστικά:

- Δυνατότητα ζύμωσης 170-240 g/L σακχάρου
- Ταχύτητα ζύμωσης και αποζύμωσης
- Δυνατότητα συνέχισης της αλκοολικής ζύμωσης σε περιβάλλον 10-14% vol αλκοόλης
- Ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

2. Εξειδικευμένα χαρακτηριστικά:

- Τις συνθήκες οινοποίησης
- Τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κλπ.

3. Χαρακτήρα killer:

Το επονομαζόμενο φαινόμενο killer σχετίζεται με το ότι ορισμένες ζύμες εκκρίνουν πρωτεϊνούχες τοξίνες, οι οποίες μπορούν να θανατώσουν άλλες ζύμες. Γενικά διακρίνονται τέσσερις φαινότυποι ή ομάδες killer:

- **Killer (K)**: Παράγουν θανατηφόρες για άλλες ζύμες τοξίνες.
- **Sensitive (S)**: Δεν παράγουν τοξίνες και είναι ευαίσθητες σε αυτές.

- **Neutral (N):** Δεν παράγουν τοξίνες και δεν είναι ευαίσθητες σε αυτές.
- **Killer (K)-Sensitive (S):** Παράγουν τοξίνες και μπορεί ωστόσο να είναι ευαίσθητες στις τοξίνες άλλων killer ζυμών.

Ο τύπος killer βρέθηκε σε διάφορα γένη και κυρίως στον *Saccharomyces*.

Για την επιλογή ζυμών προτιμάται ο χαρακτήρας killer (K), γιατί κατά τον εμβολιασμό οι ζύμες αυτές μπορούν να υπερισχύσουν των άλλων και να φτάσουν μέχρι το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Οι ζύμες Neutral (N) μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν για επιλεγμένες καλλιέργειες, ως ανθεκτικές στον παράγοντα killer [24].

## 1.8. ΠΗΓΕΣ ΝΕΩΝ ΖΥΜΩΝ

Οι οινοπαραγωγοί αντιμετωπίζουν έναν εντεινόμενο ανταγωνισμό που προκαλείται από τη διεύρυνση του χάσματος ανάμεσα στην παραγωγή και την κατανάλωση κρασιού, την αλλαγή των προτιμήσεων των καταναλωτών από τον οίνο βασικής ποιότητας σε οίνο υψηλής ποιότητας και φυσικά την οικονομική παγκοσμιοποίηση. Η διαδικασία μετασχηματισμού της αμπελοοινικής βιομηχανίας από μια βιομηχανία παραγωγής σε μια βιομηχανία με προσανατολισμό στην αγορά, έχει ως αποτέλεσμα την αυξανόμενη εξάρτηση, μεταξύ άλλων, από τη βιοτεχνολογική καινοτομία [13]. Με τη σωστή προσέγγιση, τα αποτελέσματα των βιοτεχνολογικών καινοτομιών μπορούν να εναρμονιστούν ουσιαστικά με ένα σύνολο εμπορικών, πολιτιστικών, κοινωνικών, περιβαλλοντικών και τεχνικών παραγόντων, χωρίς να καταργηθεί η αρχαία τέχνη της οινοποίησης, του γοητευτικού μυστικισμού και του ρομαντισμού.

Παρά το σημερινό σκεπτικισμό ορισμένων ομάδων καταναλωτών σχετικά με τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς και προϊόντα (οι αποκαλούμενοι GMO και GM products), δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η εφαρμογή της κορυφαίας τεχνολογίας γονιδίων στη βιομηχανία οίνου κατέχει εκπληκτική δυνατότητα. Προκειμένου να υπάρξει τεχνολογική ισορροπία με την τεράστια πρόκληση που αντιμετωπίζουν οι καταναλωτές, οι παγκόσμιες βιομηχανίες οίνου στον κόσμο, όλο και περισσότερο, επικεντρώνονται στον γενετικό προγραμματισμό και τη βελτίωση των δύο κύριων

οργανισμών που συμμετέχουν στην παραγωγή οίνου, δηλαδή της αμπέλου και των ζυμομυκήτων.

Οι ζύμες κυριαρχούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κρασιού. Σε αυθόρμητες ζυμώσεις, υπάρχει ένα προοδευτικό μοντέλο ανάπτυξης των ιθαγενών ζυμών που προέρχονται από τις επιφάνειες των σταφυλιών και του εξοπλισμού του οινοποιείου.

Ζυμομύκητες των γενών *Kloeckera*, *Hanseniaspora* και *Candida* κυριαρχούν στα πρώτα στάδια, ακολουθούμενα από διάφορα είδη *Metschnikowia* και *Pichia* στα μεσαία στάδια, όταν η αιθανόλη ανέρχεται στο 3-4%. Στα τελευταία στάδια των αυθόρμητων ζυμώσεων του κρασιού, κυριαρχούν πάντοτε τα ανεκτικά σε αλκοόλη στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*, τα οποία επομένως, είναι παγκοσμίως γνωστά ως «οινολογικές ζύμες». Οι αυτόχθονες ζύμες που υπάρχουν σε αυθόρμητες ζυμώσεις κρασιού πιστεύεται ότι παράγουν κρασιά με πληρέστερη δομή και «στρογγυλό ουρανίσκο».

Ωστόσο, οι αυθόρμητες ζυμώσεις συνήθως παρατείνονται και το αποτέλεσμα είναι εξαιρετικά απρόβλεπτο. Ως εκ τούτου, οι αυθόρμητες ζυμώσεις χρησιμοποιούνται μόνο σε μερικά οινοποιεία που εξαρτώνται περισσότερο από τη μεταβλητότητα των καλλιεργειών και που είναι πρόθυμα να δεχτούν αυτούς τους κινδύνους για να επιτύχουν ξεχωριστά στυλ κρασιών που αντικατοπτρίζουν την ποικιλομορφία των ζυμών της συγκεκριμένης περιοχής.

Στα σύγχρονα, μεγάλης κλίμακας οινοποιεία, όπου οι ταχείες και αξιόπιστες ζυμώσεις είναι απαραίτητες για τη συνεπή γεύση και την προβλέψιμη ποιότητα του κρασιού, χρησιμοποιούνται ειδικά επιλεγμένα στελέχη καλλιέργειας *S. cerevisiae*, με γνωστές ιδιότητες. Εκτός από την πρωταρχική λειτουργία αυτών των ενεργών στελεχών που καταλύουν την ταχεία, αποτελεσματική και πλήρη μετατροπή των σακχάρων σταφυλιού (γλυκόζη και φρουκτόζη) σε αλκοόλ χωρίς ανάπτυξη αρωμάτων, οι σημερινοί πρωτοπόροι οινοπαραγωγοί απαιτούν στελέχη αρχικής καλλιέργειας με μια ολόκληρη σειρά εξειδικευμένων ιδιοτήτων που μπορούν να προσθέσουν αξία στο τελικό προϊόν. Αυτή η αναζήτηση για στελέχη ζυμομυκήτων που βελτιστοποιούνται για συγκεκριμένα καθήκοντα που έχουν θέσει οι οινοποιοί, οδήγησαν στην αναπαραγωγή ζύμης και στη γενετική μηχανική [12].

Πέρα όμως από τις γενετικά τροποποιημένες ζύμες, η βιομηχανία του οίνου του μέλλοντος πρέπει να σταφεί και πέρα από τα είδη του *Saccharomyces*, όπως επίσης και πέρα από το σταφύλι σαν φρούτο για την απομόνωση οινοποιητικών ζυμών. Σε άλλα φρούτα ή φυτικά υλικά μπορεί να υπάρχουν νέα είδη ζυμομυκήτων που μπορούν να καλύψουν τις ανάγκες της ζύμωσης κατά τη διαδικασία παραγωγής κρασιού.

### **1.9. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ**

Η γεύση είναι το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό του κρασιού. Η γεύση του κρασιού θα μπορούσε, με την ευρύτερη έννοια του όρου, να θεωρηθεί ως η συνολική αισθητική εντύπωση τόσο του αρώματος όσο και των γευστικών ενώσεων και συνεπώς μπορεί να ενσωματώσει τις πιο μετρήσιμες πλευρές της οξύτητας, της γλυκύτητας, του αλκοολικού τίτλου, του ανθρακικού, της στυπτικότητας και της πικράδας (Robinson, 1994).

Η γεύση του κρασιού ταξινομείται ανάλογα με τις πηγές των διαφόρων ενώσεων που συμβάλλουν σε αυτό. Αυτό περιλαμβάνει γεύση ποικιλίας (ενώσεις γεύσης που προέρχονται από τα σταφύλια), προζυμωτική γεύση (ενώσεις που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης και συσκευασίας γλεύκους), γεύση ζύμωσης (που παράγεται από ζύμη και βακτήρια κατά τη διάρκεια αλκοολικής και μηλολακτικής ζύμωσης) και μεταζυμωτική γεύση. Εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παλαίωσης με ενζυματικές ή φυσικοχημικές δράσεις στο ξύλο ή στη φιάλη (Schreier, 1979, Boulton et al, 1995, Rapp, 1998).

Κατανοώντας το πως οι ζύμες επηρεάζουν τις βασικές ιδιότητες του αρώματος του κρασιού, τη γεύση και το χρώμα, δημιουργείται μια βασική πλατφόρμα για την επιλογή των στελεχών που θα αποτελέσουν τις καλλιέργειες εκκίνησης και διαχείρισης της αλκοολικής ζύμωσης. Τέτοιοι μηχανισμοί τώρα εκτείνονται πέρα από τον γλυκολυτικό μεταβολισμό των σακχάρων του γλεύκους και σε γενικές γραμμές θεωρούνται ως οι εξής:

1. Μεταβολισμός των σακχάρων και του αζώτου του σταφυλοχυμού.

2. Η ενζυματική υδρόλυση των συστατικών των σταφυλιών και πως μπορούν να επηρεάσουν το άρωμα, το χρώμα και τη διαύγεια του κρασιού.
3. Αυτόλυση.
4. Βιοπροσρόφηση.

Ο μεταβολισμός των σακχάρων και των αμινοξέων του σταφυλοχυμού σε αιθανόλη επηρεάζει ουσίες, όπως οργανικά οξέα, γλυκερόλη, ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες, αμίνες και το πτητικό θείο. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως η κύρια αντίδραση κατά την οποία οι ζύμες επηρεάζουν το χαρακτήρα του οίνου [19].

Σε πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των μεταβολιτών αυτών για διάφορα στελέχη του *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces*. Αυτά τα προφίλ διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ειδών της ζύμης και των στελεχών τους, έτσι ώστε να είναι απαραίτητος εκτεταμένος έλεγχος στα στελέχη για να επιλεγθούν εκείνα με τα αποδεκτά χαρακτηριστικά (π.χ. αυξημένη παραγωγή γλυκερόλης) και να απορριφθούν εκείνα με τα μη αποδεκτα (π.χ. υπερπαραγωγή του οξικού οξέος ή υδρόθειου). Με αυτή τη λογική, είδη ζυμών όπως *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces* και άλλα γένη έχουν τη δυνατότητα να συνεισφέρουν επιπλέον στην ποικιλομορφία της γεύσης και την πολυπλοκότητα του αρώματος των οίνων.

## 1.10. ΟΙΝΟΣ ΚΑΙ ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Το άρωμα των οίνων μπορεί να διακριθεί σε 3 κατηγορίες:

Το πρωτογενές, το οποίο οφείλεται σε χημικές ενώσει που προέρχονται από το σταφύλι, το δευτερογενές, το οποίο σχηματίζεται κατά την ζύμωση από την δράση των ζυμών και των βακτηριδίων και το τριτογενές, το οποίο οφείλεται στην ωρίμανση και παλαίωση των οίνων σε δρύινα βαρέλια ή στις φιάλες και στις χημικές – ενζυματικές αντιδράσεις που επισυμβαίνουν [22].

Στους οίνους υπάρχουν δύο κατηγορίες αρωματικών ενώσεων. Εκείνες που συνιστούν το άρωμα στους νέους οίνους και εκείνες που συνιστούν το «μπουκέτο» στους παλαιωμένους. Πιο αναλυτικά, το άρωμα του νέου οίνου συντίθεται από το άρωμα του σταφυλιού, που αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό για κάθε ποικιλία, και από το άρωμα της ζύμωσης, που είναι χαρακτηριστικό των ζυμών και των συνθηκών της ζύμωσης. Η ανάπτυξη του «μπουκέτου» ή της «ανθοσμίας» κατά την παλαίωση του οίνου, προκύπτει από το μετασχηματισμό των συστατικών του αρώματος των νέων οίνων. Ο μετασχηματισμός αυτός για ορισμένους τύπους οίνων είναι οξειδωτικός (Madera, Xégès), ενώ για τους περισσότερους τύπους λεπτών οίνων είναι αναγωγικός.

Σήμερα είναι γνωστό ότι το άρωμα και το μπουκέτο των οίνων οφείλονται κυρίως, στις ανώτερες αλκοόλες και στους εστέρες. Σημαντική θεωρείται επίσης, και η συμμετοχή άλλων αρωματικών ενώσεων, όπως οι αλδεΐδες, οι κετόνες, τα τερπένια, και άλλες [24].

Όσον αφορά το πρωτογενές άρωμα ενός οίνου, οι ενώσεις που το καθορίζουν είναι τα τερπένια, οι τερπενόλες, οι πυραζίνες και οι θειόλες. Στο δευτερογενές, συμμετέχουν οι ανώτερες αλκοόλες, οι εστέρες, τα πτητικά λιπαρά οξέα, οι αλδεΐδες και θειούχες ενώσεις. Τέλος, το τριτογενές άρωμα διαμορφώνεται από ενώσεις όπως είναι οι εστέρες, οι λακτόνες, οι φουρανικές ενώσεις και οι αλδεΐδες.

## ΤΕΡΠΕΝΙΑ

Οι περισσότερες αρωματικές ενώσεις που έχουν περιγραφεί σε ποικιλίες *Vitis vinifera*, ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων. Τα συστατικά αυτά είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό άρωμα των Μοσχάτων ποικιλιών, αν και βρίσκονται (σε μικρότερες συγκεντρώσεις) και σε μη-αρωματικές ποικιλίες.

Η μεγάλη οικογένεια των τερπενίων που περιλαμβάνει γύρω στα 4000 συστατικά, είναι από τις πλέον διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο. Οι οσμηρές ενώσεις αυτής της οικογένειας είναι κυρίως τα μονοτερπένια (με 10 άτομα άνθρακα) και τα σεσκιτερπένια (με 15 άτομα άνθρακα), τα οποία αποτελούνται από δυο και τρεις μονάδες ισοπρενίου αντίστοιχα.

Τα μονοτερπένια συναντώνται κυρίως στην μορφή των απλών υδρογονανθράκων (λεμονένιο), των αλδευδών (λιναλάλη, γερανιάλη), των αλκοολών (λιναλοόλη, γερανιόλη), των οξέων (λιναλικό και γερανικό οξύ) ακόμη και των εστέρων αυτών.

Στα σταφύλια έχουν εντοπιστεί πρόδρομες μορφές τερπενίων και σε ελεύθερη και σε γλυκοζυλιωμένη μορφή (πρακτικά άοσμη). Έχει διαπιστωθεί ότι η πλειοψηφία των μονοτερπενίων που ανευρίσκονται στο σταφύλι και τον οίνο δεν είναι στην ελεύθερη μορφή τους αλλά δεσμευμένα με την γλυκόζη ή κάποιο άλλο σάκχαρο. Τα δεσμευμένα μονοτερπένια δεν συνεισφέρουν άμεσα στο άρωμα αλλά αποτελούν μη οσμηρές πρόδρομες ενώσεις του μεταγενέστερου αρώματος (Cámara, 2007; Cámara, 2004).

## ΝΟΡΙΣΟΠΡΕΝΟΙΔΗ

Άλλες ενώσεις που συνεισφέρουν στο πρωτογενές άρωμα είναι τα νορισοπρενοειδή, τα οποία δεν χαρακτηρίζονται αυστηρά ως τερπένια και προέρχονται από την χημική ή ενζυμική υδρόλυση των καροτενοειδών που υπάρχουν στο σταφύλι. Εντοπίζονται επίσης στην πρόδρομη γλυκοζυλιωμένη μορφή. Η οξειδωτική διάσπαση των καροτενοειδών, τερπενίων με 40 άτομα άνθρακα, δίνει παράγωγα με 9,10,11 ή 13 άτομα άνθρακα. Ανάμεσα σε αυτά τα συστατικά, τα νορισοπρενοειδή παράγωγα με 13 άτομα άνθρακα φαίνεται να έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τις αρωματικές τους ιδιότητες. Τα πιο γνωστά από αυτά είναι η β-δαμασκηνόνη και η β-ιονόνη με χαρακτηριστικά αρώματα λουλουδιών και τροπικών φρούτων [15].

## ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΕΣ

Οι μεθοξυπυραζίνες έχουν περιγραφεί για τον βοτανικό και χορτώδη χαρακτήρα που αποδίδουν σε συγκεκριμένες ποικιλίες, όπως το Cabernet Sauvignon. Τα συστατικά αυτά υπάρχουν στο σταφύλι σε ελεύθερη μορφή και δεν έχουν καταγραφεί πρόδρομες ενώσεις αυτών. Οι μεθοξυπυραζίνες είναι αζωτούχα ετεροκυκλικά παράγωγα που παράγονται κατά τον μεταβολισμό των αμινοξέων. Οι ενώσεις 2-methoxy-3-isopropylpyrazine, 2-methoxy-3-sec-butylpyrazine και 2-methoxy-3-isobutylpyrazine έχουν την χαρακτηριστική οσμή πράσινης πιπεριάς και

σπαραγγιού, ακόμη και γήινα αρώματα. Αρκετά φυτά όπως οι πράσινες πιπεριές, ο αρακάς και οι πατάτες φαίνεται να περιέχουν 2-methoxy-3-isobutylpyrazine. Στους ερυθρούς οίνους του Bordeaux, το κατώφλι αντίληψης της of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine είναι της τάξης των 15 ng/l. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις είναι εντονότερος ο χορτώδης χαρακτήρας, γεγονός που αποδίδει στους οίνους αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά [15].

## ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι θειούχες ενώσεις που ανευρίσκονται στους οίνους ταξινομούνται σε πέντε κατηγορίες, σύμφωνα με τη χημική τους δομή: θειόλες, μερκαπτάνες, θειοεστέρες, σουλφίδια, και ετεροκυκλικές ενώσεις. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις προσδίδουν αρώματα, τα οποία έχουν περιγραφεί παρόμοια με του λάχανου, του σκόρδου και του κρεμμυδιού και σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζονται ως μη επιθυμητά.

Ορισμένες ενώσεις αυτής της κατηγορίας, όπως έχουν ταυτοποιηθεί και στην ποικιλία Sauvignon Blanc, είναι οι 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one, 3-mercaptohexan-1-ol ace-tate, 4-mercapto-4-methylpentan-1-ol, 3-mercaptohexan-1-ol και 3-mercapto-3 methyl-butan-1-ol. Συχνά ταυτίζονται επίσης με αρώματα τροπικών ή εξωτικών φρούτων και μαύρου πιπεριού.

## ΑΛΚΟΟΛΕΣ

Οι σημαντικότερες αλκοόλες που περιέχονται σε όλους ανεξαιρέτως τους οίνους είναι η μεθανόλη, η οποία προέρχεται από την υδρόλυση των πηκτινών του σταφυλιού και η αιθανόλη, η οποία αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος του όγκου του οίνου μετά το νερό και είναι το κύριο προϊόν μεταβολισμού των σακχάρων από τις ζύμες.

Οι ανώτερες αλκοόλες είναι δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης με εξαίρεση την 1-εξανόλη, η οποία δεν προέρχεται από την ζύμωση αλλά από το σταφύλι και δίνει στους οίνους χορτώδη οσμή και γεύση. Οι ανώτερες αλκοόλες προέρχονται από τα κετονοξέα, τα οποία πάλι σχηματίζονται με μηχανισμούς



διαφορετικούς τόσο από τα ζάχαρα όσο και από τα αμινοξέα. Η προπανόλη φαίνεται να μην ασκεί μεγάλη επίδραση στο άρωμα των οίνων, γιατί έχει ουδέτερη οσμή.

Οι αμυλικές αλκοόλες επίσης φαίνεται να μην έχουν ευνοϊκή επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων.

Η φαινυλο-2-αιθανόλη έχει ευχάριστη οσμή τριαντάφυλλου.

Άλλες ανώτερες αλκοόλες: βουτανόλη-1, ισοαμυλική βουτανόλη, πεντανόλη-1 κλπ [24].

Στις πολυόλες ανήκουν η γλυκερόλη, η οποία είναι δευτερογενές προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης, έχει γλυκεία γεύση και η παρουσία της καθιστά τους οίνους πιο «μυελλώδεις», η 2,3-βουτανεδιόλη, η μαννιτόλη, η σορβιτόλη, η ινοσιτόλη και η τυροσόλη.

## **ΕΣΤΕΡΕΣ**

Οι εστέρες σχηματίζονται κατά την αντίδραση των ελεύθερων οργανικών οξέων του οίνου με την αιθανόλη. Οι εστέρες των οίνων σχηματίζονται τόσο διά της χημικής οδού-κατά την παλαίωση αυτών-όσο και διά της ενζυματικής οδού, κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ το τεχνολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οφείλεται στους οργανοληπτικούς χαρακτήρες αυτών. Οι εστέρες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχουν αρώματα λουλουδιών ή φρούτων, ενώ ο προπιονικός αιθυλεστέρας δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ιδιαίτερο ρόλο στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων των οίνων. Αντίθετα οι οξικοί εστέρες του 2-μεθυλοπροπυλίου, του 3-μεθυλοβουτυλίου, του 2-φαινυλοαιθυλίου και οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα αποτελούν σπουδαία συστατικά του αρώματος και του μπουκέτου των οίνων [24].

Σημαντικότερος όλων θεωρείται ο οξικός αιθυλεστέρας ο οποίος αντιπροσωπεύει από μόνος του συχνά έως και το 80% του συνόλου των πτητικών εστέρων.

Η παρουσία του οξικού αιθυλεστέρα στους οίνους οφείλεται τόσο στην εστεροποίηση του οξικού οξέος και της αιθυλικής αλκοόλης, που πραγματοποιείται

κατά την διάρκεια της παλαίωσης αυτών δια της χημικής οδού, όσο και στην σύνθεση αυτού από τους μικροοργανισμούς κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Το τεχνολογικό ενδιαφέρον του οξικού αιθυλεστέρα βρίσκεται στο γεγονός ότι το συστατικό αυτό είναι υπεύθυνο για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων που έχουν προσβληθεί από οξικά βακτήρια και όχι το οξικό οξύ, όπως πιστευόταν παλιότερα [24].

Οι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, κυρίως ο καπροϊκός και ο καπρυλικός, παράγονται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Οι εστέρες αυτοί έχουν ευχάριστη λιπαρή οσμή και οσμή μελιού, συνεισφέροντας ιδιαίτερα στο άρωμα λευκών οίνων.

Οι οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών (isoamyl acetate, phenylethyl acetate), συμπεριλαμβάνονται επίσης ανάμεσα στους εστέρες ζύμωσης. Έχουν ιδιαίτερα έντονη οσμή -μπανάνας και μήλου- συνεισφέροντας έτσι στην αρωματική πολυπλοκότητα ουδέτερων οίνων, όμως είναι πιθανό να καλύψουν το ποικιλιακό άρωμα. Ο σχηματισμός των εστέρων αυτών προωθείται κυρίως όταν η ζύμωση είναι αργή, λόγω απουσίας οξυγόνου και χαμηλών θερμοκρασιών (*Bertrand, 1983; Dubois, 1993*).

Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση. Ο σχηματισμός του είναι συνδεδεμένος με την μηλογαλακτική ζύμωση και δεν μπορεί να αποκλειστεί η συμμετοχή μιας εστεράσης βακτηριακής προέλευσης. Οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού αιθυλεστέρα αυξάνουν κατά την παλαίωση, μέσω χημικών αντιδράσεων. Σύμφωνα με το *Arctander (1969)*, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας έχει οσμή που θυμίζει βούτυρο ή ακόμη και ξινόγαλα [15].

## **ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

Οι αλδεΐδες αποτελούν επίσης μέρος των πτητικών ενώσεων που συμμετέχουν στο άρωμα του οίνου. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι η βανιλίνη, που σχετίζεται με την παλαίωση σε βαρέλια και έχει χαρακτηριστικό άρωμα βανίλιας. Στον φλοιό του σταφυλιού όμως περιέχεται μικρή ποσότητα αλδεϋδών.

Η σημαντικότερη αλδεΐδη που εντοπίζεται στους οίνους είναι η ακεταλδεΐδη η οποία αποτελεί δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και παράγεται μετά την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος (ενζυματική οδός).

Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά μόρια με τις ιδιότητες των κετονών, συμπεριλαμβανομένων των προπανόνη, βουτανόνη και πεντανόνη. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι η ακετυλομεθυλο καρβιτόλη και το διακετύλιο. Επίσης έχουν ταυτοποιηθεί η γλυοξάλη, η μεθυλογλυοξάλη και η υδροξυπροπανεδιάλη με αρκετές από τις ιδιότητες αλδευδών και κετονών [15].

Άλλες καρβονυλικές ενώσεις όπως η υδροξυ-μεθυλο-φουρφουράλη, η ακετοΐνη και το διακετύλιο ή 2,3-βουτανεδιόνη (οσμή βουτύρου) συνεισφέρουν επίσης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Οι ακετάλες συντίθενται από την ένωση μιας αλδεΐδης με μια αλκοόλη. Σημαντικότερη θεωρείται το διαιθοξυαιθάνιο, λόγω του ότι χαρακτηρίζεται από ισχυρή οσμή αλδεΐδης.

Οι λακτόνες σχηματίζονται κατά την αντίδραση μιας εσωτερικής εστεροποίησης που συμβαίνει μεταξύ ενός οξέος και μιας αλκοόλης στο ίδιο μόριο. Η πιο διαδεδομένη είναι η γ-βουτυρολακτόνη, η οποία εντοπίζεται στους οίνους σε συγκεντρώσεις της τάξης των mg/l. Οι λακτόνες μπορεί επίσης να προέρχονται από το σταφύλι συμμετέχοντας στο ποικιλιακό άρωμα (περίπτωση Riesling). Στα προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea* σταφύλια παράγεται επίσης σοτολόνη, η οποία συμβάλει στο χαρακτηριστικό «ψημένο» άρωμα των οίνων που παράγονται από σταφύλια τα οποία έχουν προσβληθεί από «ευγενή σήψη».

Τέλος, η δρυς απελευθερώνει λακτόνες στον οίνο κατά την διάρκεια παλαίωσής του σε αντίστοιχα βαρέλια. Το cis- και trans- ισομερές της 3-μεθυλο-γ-οκταλακτόνης είναι γνωστά ως λακτόνες δρυός ή ουσκυλακτόνες. Τα συστατικά αυτά έχουν οσμή καρύδας και κατά την διάλυσή τους δίνουν το χαρακτηριστικό άρωμα οίνου παλαιωμένου σε δρύ [15].

## ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Από την κατηγορία των λιπαρών οξέων σημαντικότερο θεωρείται το μικρομοριακό οξικό οξύ, το βασικό στοιχείο της πτητικής οξύτητας. Η συγκέντρωσή

του υποδηλώνει την ύπαρξη και δράση βακτηρίων (γαλακτικών ή οξικών) που εξηγεί την επερχόμενη αλλοίωση του οίνου. Άλλα οξέα όπως το προπιονικό και το βουτυρικό, σχετίζονται επίσης με βακτηριακές αλλοιώσεις. Τα C6, C8 και C10 λιπαρά οξέα σχηματίζονται από τους ζυμομύκητες. Τα στοιχεία αυτά είναι ενεργοποιητές ζύμωσης, κυρίως υπό ανερόβιες συνθήκες. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι το ελεϊκό και το λινελεϊκό οξύ. Είναι ενεργά ακόμη και σε ελάχιστες ποσότητες και προέρχονται από την κηρώδη επιφάνεια του φλοιού των σταφυλιών [15]. Τα λιπαρά αυτά οξέα, δύναται να ενσωματωθούν μέσω της ex novo Βιοχημικής διεργασίας σύνθεσης λιπιδίων από τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Paranikolaou & Agg, 2010) και να αποτελέσουν κύρια λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών του μύκητα. Ως γνωστόν, όσο πιο ακόρεστα είναι τα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης του μικροοργανισμού, τόσο μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη εμφανίζει ο μικροοργανισμός αυτός [17].

Περαιτέρω, τα λιπαρά οξέα συνιστούν προαγγέλους βιοσύνθεσης αρωματικών συστατικών. Το άρωμα των λιπαρών οξέων έχει περιγραφεί να μοιάζει με αυτό του ξυδιού, του βουτύρου, του τυριού και των λαχανικών.

### **1.11. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΟΔΩΝ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ**

Η αλκοολική ζύμωση παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε γλεύκος το οποίο, αφού αφέθηκε στην τύχη του για μικρό χρονικό διάστημα, παρουσίασε ένα φαινόμενο αντίδρασης που εκδηλώθηκε με έντονο αναβρασμό. Το φαινόμενο αυτό συνοδευόταν από ύψωση της θερμοκρασίας και απελευθέρωση αερίου, με αποτέλεσμα το σάκχαρο του γλεύκους να μετατρέπεται σε αλκοόλη [24].

Το φαινόμενο αυτό ήταν το πρώτο που μελετήθηκε θεωρητικά και παρουσίασε μεγάλο ενδιαφέρον από πρακτικής σκοπιάς, ακόμη και από την αρχαιότητα. Οι ερευνητές εκείνης της εποχής παρατήρησαν μια αυθόρμητη και αυτόματη ζύμωση του γλεύκους, μια ευκολότερη και καλύτερη διατήρηση του οίνου σε σχέση με το χυμό των σταφυλιών, μια ανωτερότητα στην ποιότητα και ποικιλία στην έκφραση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων.

Σε έναν αναπτυσσόμενο οργανισμό, η ενέργεια που παράγεται από αντιδράσεις αποικοδόμησης (καταβολισμός) μεταφέρεται στην αλυσίδα των αντιδράσεων σύνθεσης (αναβολισμός). Σύμφωνα με τους νόμους της θερμοδυναμικής, η ενέργεια που παράγεται από την υποβάθμιση ενός υποστρώματος μετατρέπεται μόνο εν μέρει σε εργασία. Αυτό ονομάζεται ελεύθερη ενέργεια (το υπόλοιπο διαχέεται με τη μορφή θερμότητας). Μέρος αυτής της ελεύθερης ενέργειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεταφορά, κίνηση ή σύνθεση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο ελεύθερος ενεργειακός μεταφορέας, ειδικά για τα βιολογικά συστήματα, είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP).

Η υδρόλυση του ATP σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μιας μεγάλης ποσότητας ελεύθερης ενέργειας (7,3 kcal / mol). Η βιοσύνθεση και η ενεργός μεταφορά των μεταβολιτών κάνουν χρήση της ελεύθερης ενέργειας.



Σε αυτήν την αντίδραση, το  $\text{G}^\circ$  είναι η αλλαγή στην ελεύθερη ενέργεια. Το ATP  $\text{G}^\circ$  θεωρείται «το ενεργειακό νόμισμα της ελεύθερης ενέργειας σε βιολογικά συστήματα» (Stryer, 1992) [14].

## 1.12. ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Ανάλογα με τις αερόβιες συνθήκες, η ζύμη μπορεί να αποικοδομεί τα σάκχαρα χρησιμοποιώντας δύο μεταβολικές οδούς: την αλκοολική ζύμωση και την αναπνοή. Αυτές οι δύο διαδικασίες αρχίζουν με τον ίδιο τρόπο, τον κοινό κορμό της γλυκόλυσης.

Αν και οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να μεταβολίζουν ένα μεγάλο αριθμό σακχάρων, η γλυκόζη συνιστά για την πλειονότητα αυτών την προτιμητέα πηγή άνθρακα και ενέργειας. Οι σπουδαιότερες καταβολικές οδοί της γλυκόζης είναι η οδός Embden-Meyerhof-Parnas και ο οξειδωτικός κύκλος των φωσφορικών πεντοζών.

### 1.12.1 EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (Γλυκόλυση)

Η μεταφορά της εξόζης του γλεύκου (γλυκόζη και φρουκτόζη) μέσω της πλασματικής μεμβράνης ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο σύστημα πρωτεϊνικών μεταφορέων που δεν εξηγείται πλήρως. Αυτός ο μηχανισμός διευκολύνει τη διάχυση των εξόζων του μούστου στο κυτταρόπλασμα, όπου μεταβολίζονται ταχέως. Δεδομένου ότι η διαλυμένη ουσία κινείται προς την κατεύθυνση της βαθμίδας συγκέντρωσης, από το συμπυκνωμένο εξωτερικό μέσο έως το αραιωμένο εσωτερικό μέσο, δεν είναι ένα ενεργό σύστημα μεταφοράς που απαιτεί ενέργεια.

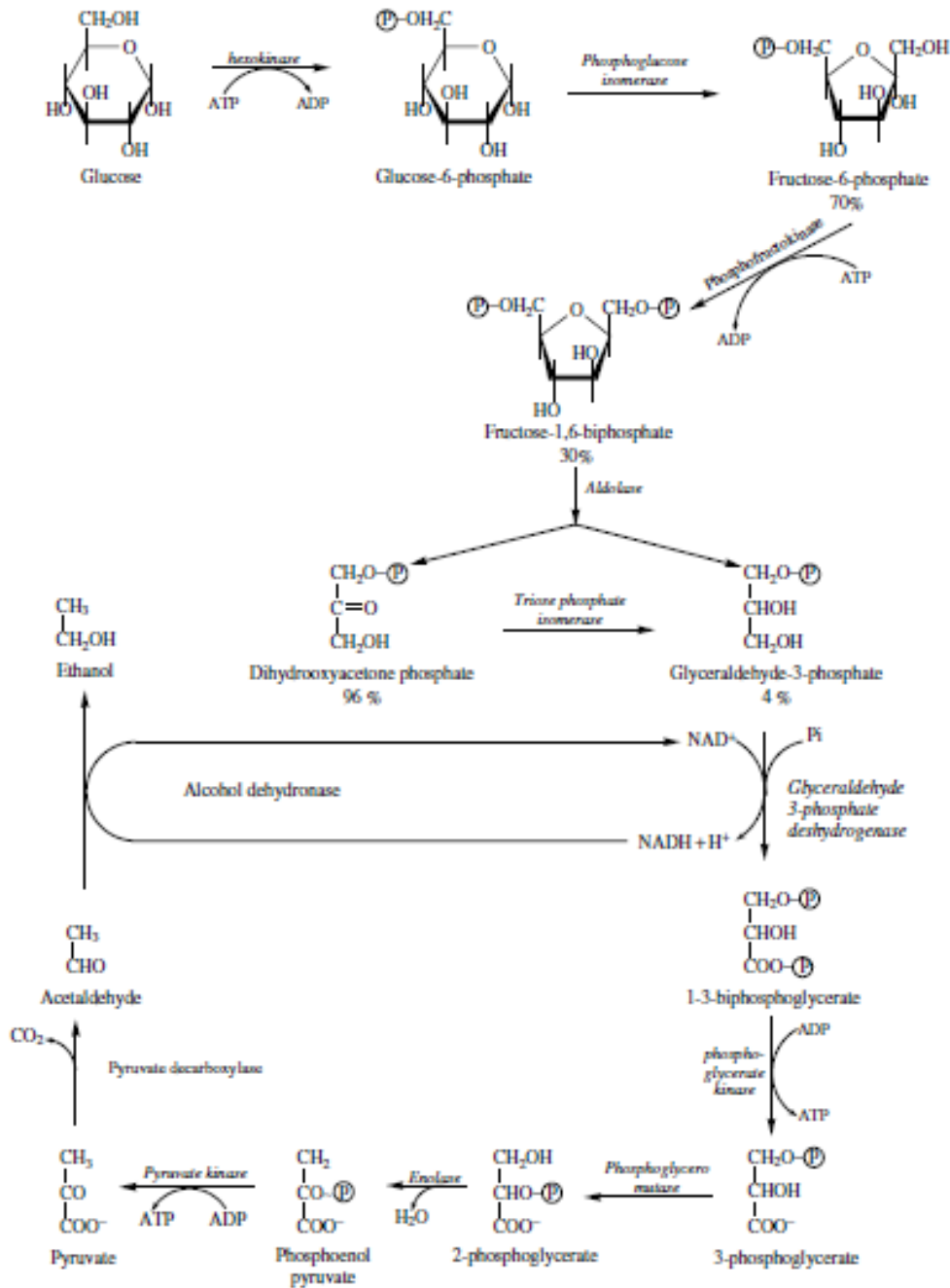
Στη συνέχεια, η γλυκόλυση διεξάγεται εξ ολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Περιλαμβάνει ένα πρώτο στάδιο το οποίο μετατρέπει τη γλυκόζη σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, που απαιτεί δύο μόρια ATP. Ο ίδιος αυτός ο μετασχηματισμός περιλαμβάνει τρία στάδια: μια αρχική φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη, τον ισομερισμό της τελευταίας σε 6-φωσφορική φρουκτόζη και μια δεύτερη φωσφορυλίωση που σχηματίζει την 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη. Αυτές οι τρεις αντιδράσεις καταλύονται από τα ένζυμα: εξοκινάση, ισομεράση φωσφογλυκόζης και φωσφογλυκοκινάση, αντίστοιχα.

Στην πραγματικότητα, ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* έχει δύο εξοκινάσες (PI και PII) ικανές να φωσφορυλιώσουν τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Η εξοκινάση PII είναι απαραίτητη και ενεργή κυρίως κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης του ζυμομύκητα, σε ένα μέσο με μία υψηλή συγκέντρωση σακχάρου. Η εξοκινάση PI, καταστέλλεται μερικώς από τη γλυκόζη και δεν είναι ενεργή μέχρι την στατική φάση (Bisson, 1991) [10] [17].

Στο δεύτερο στάδιο της γλυκόλυσης σχηματίζεται η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. Κάτω από την καταλυτική δράση της αλδολάσης, η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη διασπάται σχηματίζοντας δύο ισομερή φωσφορικής τριόζης: την 3-φωσφορική διυδροξυακετόνη και την 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. Η ισομεράση φωσφορικής τριόζης καταλύει τον ισομερισμό αυτών των δύο ενώσεων. Αν και σε ισορροπία, η κετονική μορφή είναι πιο άφθονη, ο μετασχηματισμός της 3-φωσφορικής διυδροξυακετόνης σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη είναι ταχύς, καθώς αυτή η ένωση απομακρύνεται συνεχώς από τις επακόλουθες αντιδράσεις γλυκόλυσης. Με άλλα λόγια, ένα μόριο γλυκόζης οδηγεί στο σχηματισμό δύο μορίων 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης.

Η τρίτη φάση της γλυκόλυσης περιλαμβάνει δύο στάδια που ανακτούν μέρος της ενέργειας από την 3-φωσφορική γλυκεραλδεύδη (G3P). Αρχικά, το GA3P μετατρέπεται σε 1,3 διφωσφογλυκερικό (1,3-BPG). Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την αφυδρογονάση 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης. Είναι μια οξειδωση συνδυασμένη με φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Το νικοτιναμιδο-αδενινο δινουκλεοτίδιο (NAD<sup>+</sup>) είναι ο συμπαράγοντας της αφυδρογόνωσης. Σε αυτό το στάδιο, είναι στην οξειδωμένη του μορφή. Το νικοτιναμίδιο είναι το μέρος του μορίου που αντιδρά. Ταυτόχρονα, δημιουργείται ένας πλούσιος σε ενέργεια δεσμός μεταξύ του οξειδωμένου άνθρακα του υποστρώματος και του ανόργανου φωσφορικού. Το NAD<sup>+</sup> δέχεται δύο ηλεκτρόνια και ένα άτομο υδρογόνου που χάνεται από το οξειδωμένο υπόστρωμα. Στη συνέχεια, η φωσφογλυκερική κινάση καταλύει τη μεταφορά της φωσφορυλικής ομάδας του ακυλοφωσφορικού από 1,3-BPG σε ADP και σχηματίζονται 3-φωσφογλυκερικός εστέρας και ATP.

Η τελευταία φάση της γλυκόλυσης μετατρέπει το 3-φωσφογλυκερικό σε πυροσταφυλικό. Η φωσφογλυκερομουτάση καταλύει τη μετατροπή του 3-φωσφογλυκερικού σε 2-φωσφογλυκερικό άλας. Η ενολάση καταλύει την αφυδρογόνωση του τελευταίου, σχηματίζοντας φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP). Αυτή η ένωση έχει υψηλό δυναμικό μεταφοράς ομάδας φωσφορυλίου. Με τη φωσφορυλίωση του ADP σχηματίζεται πυροσταφυλικό οξύ και ATP. Η πυροσταφυλική κινάση καταλύει αυτήν την αντίδραση. Με αυτό τον τρόπο, η γλυκόλυση δημιουργεί τέσσερα μόρια ATP. Δύο χρησιμοποιούνται αμέσως για την ενεργοποίηση ενός νέου μορίου εξόζης και το καθαρό κέρδος της γλυκόλυσης είναι δύο μόρια ATP ανά μόριο εξόζης που μεταβολίζεται.



Εικόνα 1: Μεταβολικό μονοπάτι γλυκόλυσης και αλκοολικής ζύμωσης

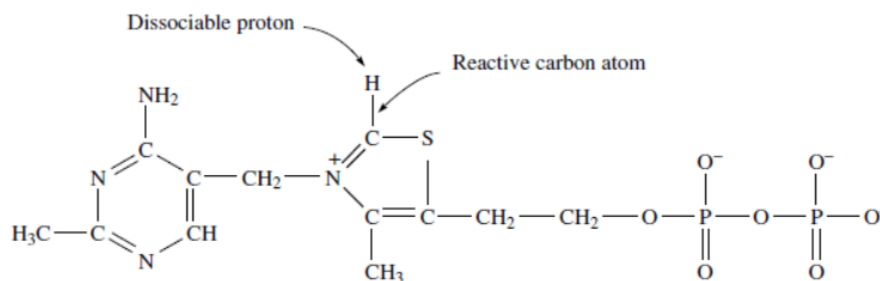
Μετά το τέλος της γλυκόλυσης, το πυροσταφυλικό οξύ που σχηματίζεται μπορεί να μεταβολιστεί μέσω 3 μεταβολικών μονοπατιών, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Συνεπώς, είτε θα προχωρήσει στις αντιδράσεις της αλκοολικής ζύμωσης, είτε θα πραγματοποιηθεί γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση, είτε θα συνεχίσει στην αναπνευστική αλυσίδα [16].



### 1.12.2. ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Η αναγωγική ισχύς του NADH, που παράγεται από τη γλυκόλυση, πρέπει να μεταφερθεί σε έναν δέκτη ηλεκτρονίων για να αναγεννηθεί το NAD<sup>+</sup>. Στην αλκοολική ζύμωση, δεν είναι πυροσταφυλικό, αλλά μάλλον ακεταλδεΐδη, το προϊόν αποκαρβοξυλίωσής του, το οποίο χρησιμεύει ως τελικός δέκτης ηλεκτρονίων. Η αλκοολική ζύμωση περιέχει δύο επιπρόσθετες ενζυμικές αντιδράσεις, η πρώτη από τις οποίες αποκαρβοξυλιώνει το πυροσταφυλικό οξύ, καταλυόμενη από την πυροσταφυλική δεκαρβοξυλάση.

Ο συμπαράγοντας είναι η πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP). Η TPP και το πυροσταφυλικό οξύ σχηματίζουν μια ενδιάμεση ένωση. Πιο συγκεκριμένα, το άτομο άνθρακα που βρίσκεται μεταξύ του αζώτου και του θείου του κύκλου θιαζολίου της TPP ιονίζεται. Δημιουργεί ένα καρβανιόν, το οποίο συνδυάζεται άμεσα με την ομάδα πυροσταφυλικού καρβονυλίου. Το δεύτερο στάδιο μειώνει την ακεταλδεΐδη σε αιθανόλη μέσω του NADH. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογονάση, της οποίας η δραστική θέση περιέχει ένα ιόν Zn<sub>2</sub><sup>+</sup>.



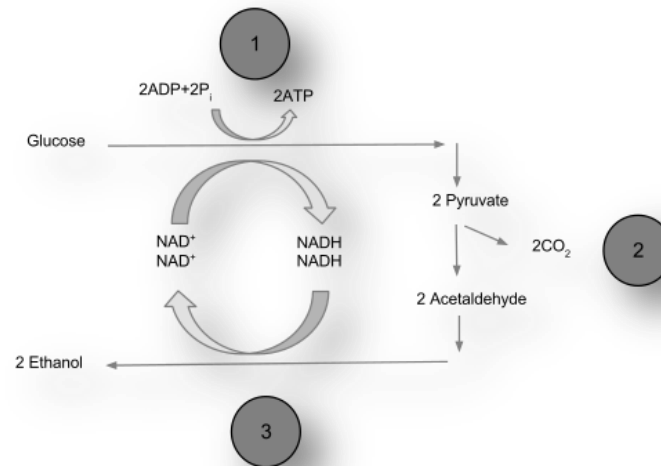
Εικόνα 2: Δομή της πυροφωσφορικής θειαμίνης (TPP)

Η πυροσταφυλική δεκαρβοξυλάση του *Saccharomyces cerevisiae* (PDC) περιλαμβάνει δύο ισοένζυμα: μια κύρια μορφή, PDC1, που αντιπροσωπεύει το 80% της δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης και μια δευτερεύουσα μορφή PDC5, της οποίας η λειτουργία παραμένει αβέβαιη.

Από ενεργειακής άποψης, η γλυκόλυση που ακολουθείται από αλκοολική ζύμωση προμηθεύει τη ζύμη με δύο μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης που αποικοδομείται ή 14,6 βιολογικά χρησιμοποιήσιμα kcal / mol ζυμωμένης γλυκόζης.

Από θερμοδυναμικής άποψης, η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά την αποικοδόμηση ενός γραμμομορίου γλυκόζης σε αιθανόλη και  $CO_2$  είναι -40 kcal. Η διαφορά (25,4 kcal) διαχέεται με τη μορφή θερμότητας.

Η αντίδραση συνεπώς της αλκοολικής ζύμωσης είναι ως:



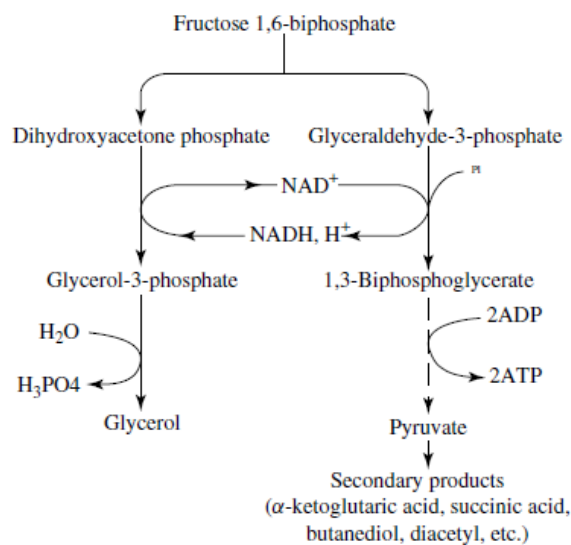
### 1.12.3. ΓΛΥΚΕΡΟΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ - ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Οι οίνοι περιέχουν περίπου 8 g γλυκερόλης ανά 100 g αιθανόλης. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε γλεύκος σταφυλιών, περίπου το 8% των μορίων σακχάρου υποβάλλεται σε γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση και το 92% υποβάλλεται σε αλκοολική ζύμωση. Η ζύμωση των πρώτων 100 g σακχάρου αποτελεί την πλειοψηφία της γλυκερόλης, μετά την οποία η παραγωγή της γλυκερόλης επιβραδύνεται αλλά ποτέ δεν τερματίζεται. Η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση είναι συνεπώς περισσότερο από μια επαγωγική ζύμωση που αναδημιουργεί  $NAD^+$  όταν η ακεταλδεΐδη, κανονικά μειωμένη σε αιθανόλη, δεν είναι ακόμη παρούσα. Η αλκοολική ζύμωση και η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση επικαλύπτονται ελαφρώς κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Το πυροσταφυλικό οξύ προέρχεται από τη γλυκόλυση. Όταν το μόριο αυτό δεν χρησιμοποιείται από την αλκοολική ζύμωση, συμμετέχει στο σχηματισμό δευτερογενών προϊόντων. Σε αυτή την περίπτωση, ένα μόριο γλυκερόλης σχηματίζεται με τη μείωση της διυδροξυακετόνης.

Συνεπώς, η παραγωγή γλυκερόλης εξισορροπεί το δυναμικό ενδοκυτταρικής οξειδωσης-αναγωγής του ζυμομύκητα ή το υπόλοιπο  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ . Αυτή η «ανακουφιστική βαλβίδα» εξαλείφει το πλεόνασμα  $\text{NADH}$  που εμφανίζεται στο τέλος της σύνθεσης αμινοξέων και πρωτεϊνών.

Παρουσία θειώδους ανυδρίτη, η ζύμωση της γλυκόζης από τις ζύμες παράγει ισοδύναμες ποσότητες γλυκερόλης, διοξειδίου του άνθρακα και ακεταλδεΐδης στην δισουλφιδική της μορφή (Neuberg, 1946). Αυτή η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση λαμβάνει χώρα με τον ακόλουθο τρόπο: Δεδομένου ότι η ακεταλδεΐδη σε συνδυασμό με θειώδες άλας δεν μπορεί να αναχθεί σε αιθανόλη, η 1-φωσφορική διυδροξυακετόνη καθίσταται ο τερματικός ηλεκτρονικός υποδοχέας. Προέρχεται από την οξείδωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και ανάγεται σε 3-φωσφορική γλυκερόλη, η οποία αφ'εαυτής αποφωσφορυλιώνεται σε γλυκερόλη. Ο μηχανισμός αυτός χρησιμοποιήθηκε για τη βιομηχανική παραγωγή γλυκερόλης. Σε αυτή τη ζύμωση, παράγονται μόνο δύο μόρια  $\text{ATP}$  για κάθε μόριο αποικοδομημένης εξόζης. Το  $\text{ATP}$  απαιτείται για να ενεργοποιήσει τη γλυκόζη στο πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης. Η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση, της οποίας το καθαρό κέρδος σε  $\text{ATP}$  είναι μηδενικό, δεν παρέχει βιολογικά αφομοιώσιμη ενέργεια για τις ζύμες.



Εικόνα 3: Μεταβολικό μονοπάτι της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης

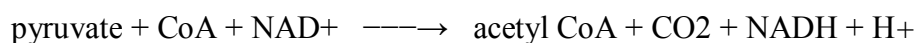
Η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση δεν εμφανίζεται μόνο σε ένα εξαιρετικά θειικό περιβάλλον. Στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους σταφυλιών, το

εμβόλιο αποτελείται από ζυμομύκητες που αναπτύχθηκαν αρχικά παρουσία οξυγόνου. Η πυροσταφυλική τους αποκαρβοξυλάση και η αλκοολική αφυδρογονάση εκφράζονται ασθενώς. Ως αποτέλεσμα, η συσσώρευση αιθανάλης είναι περιορισμένη. Η επανα-οξείδωση του NADH δεν περιλαμβάνει αιθανάλη, αλλά μάλλον διυδροξυακετόνη. Γλυκερόλη, πυροσταφυλικό και κάποια δευτερεύοντα προϊόντα ζύμωσης σχηματίζονται. Αυτά τα δευτερογενή προϊόντα είναι παράγωγα πυροσταφυλικού άλατος, συμπεριλαμβανομένων, αλλά χωρίς περιορισμό, του ηλεκτρικού οξέος και του διακετυλίου. Στις βιομηχανίες παραγωγής βιοαιθανόλης και οίνου, ένα απόνερο το οποίο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες περιέχοντας σε μη αμελητέα ποσά γλυκερόλη, είναι το λεγόμενο ... stillage. Το πλούσιο σε γλυκερόλη απόβλητο παράγεται ουσιαστικά μέσω της γλυκοροπυροσταφυλικής ζύμωσης [17].

Ορισμένοι οινοποιοί δίνουν μεγάλη σημασία στον οργανοληπτικό ρόλο της γλυκερόλης. Αυτή η ένωση έχει μια γλυκιά γεύση παρόμοια με τη γλυκόζη. Ωστόσο, παρουσία άλλων συστατικών του οίνου, η γλυκύτητα της γλυκερόλης είναι πρακτικά ανεπαίσθητη. Για την πλειοψηφία των δοκιμαστών, ακόμη και καλά εκπαιδευμένοι, η προσθήκη 3-6 g γλυκερόλης ανά λίτρο σε κόκκινο κρασί δεν είναι διακριτή και επομένως η επιδίωξη των συνθηκών οινοποίησης που είναι περισσότερο ευνοϊκές για την γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση δεν έχει οινολογικό ενδιαφέρον. Αντίθετα, οι οινοποιοί θα πρέπει να ευνοούν μια καθαρή αλκοολική ζύμωση και να περιορίζουν τη γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση. Η παραγωγή γλυκερόλης συνοδεύεται από το σχηματισμό άλλων δευτερογενών προϊόντων, που προέρχονται από το πυροσταφυλικό οξύ, η αυξημένη παρουσία των οποίων (όπως ενώσεις καρβονυλίου και οξικού οξέος) μειώνει την ποιότητα του οίνου.

#### 1.12.4. ΑΝΑΠΝΟΗ

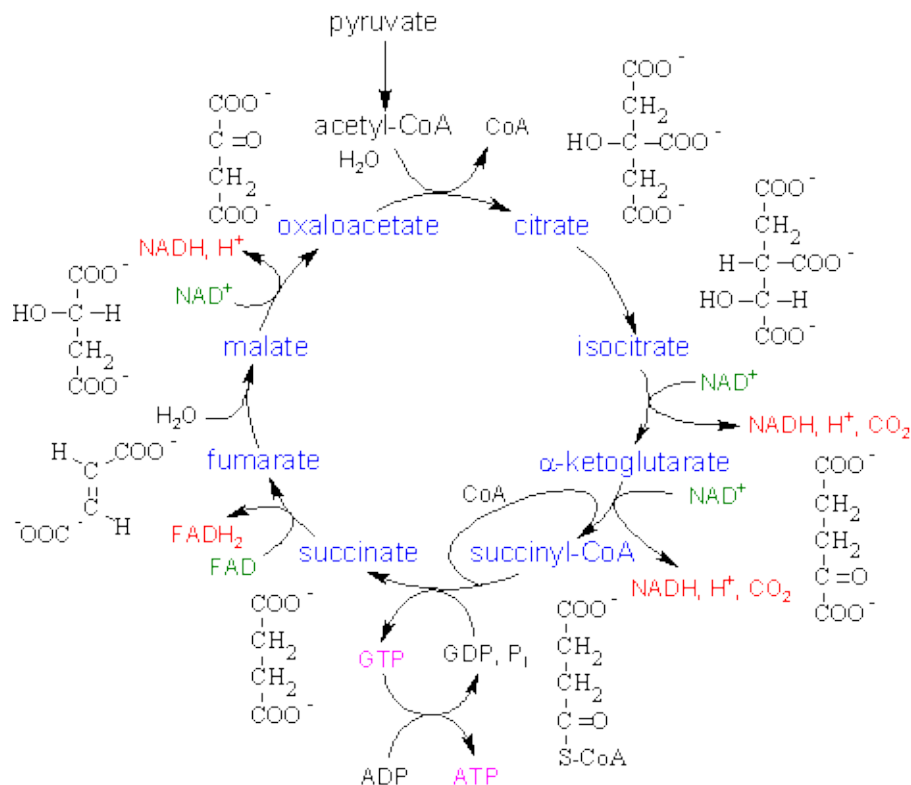
Όταν τα σάκχαρα χρησιμοποιούνται από την αναπνευστική οδό, το πυροσταφυλικό οξύ που προέρχεται από τη γλυκόλυση, υφίσταται οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση, παρουσία συνενζύμου A (CoA) και NAD<sup>+</sup>. Αυτή η διαδικασία δημιουργεί διοξείδιο του άνθρακα, NADH και ακετυλο-CoA.



Το ενζυματικό σύστημα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης καταλύει αυτήν την αντίδραση. Λαμβάνει χώρα στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Η πυροφωσφορική

θειαμίνη (TPP), το λιποαμίδιο και το διουκλεοτίδιο της φλαβίνης-αδενίνης (FAD) συμμετέχουν στην αντίδραση αυτή και χρησιμεύουν ως καταλυτικοί συμπράγοντες.

Η μονάδα ακετυλίου που προέρχεται από το πυροσταφυλικό ενεργοποιείται με τη μορφή ακετυλο-CoA. Οι αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος, που ονομάζεται επίσης κύκλος τρικαρβοξυλικών οξέων και κύκλος Krebs, οξειδώνουν πλήρως το ακετυλο-CoA σε  $CO_2$ .



Εικόνα 4: Κύκλος του Krebs

Αυτός ο κύκλος ξεκινά με τη συμπύκνωση μονάδας ακετυλίου 2 ατόμων άνθρακα με οξαλοξική ένωση 4 ατόμων άνθρακα για να παραχθεί ένα τρικαρβοξυλικό οξύ με 6 άτομα άνθρακα (το κιτρικό οξύ). Τέσσερις αντιδράσεις οξειδωσης-αναγωγής αναδημιουργούν τον οξαλοξικό εστέρα. Η οξειδωτική οδός αποκαρβοξυλιώνει την ισοκυτταρίνη, ένα ισομερές του κιτρικού άλατος, σε  $\alpha$ -κετογλουταρικό άλας. Το ένζυμο ισοκυτταρική δεϋδρογενάση καταλύει αυτήν την αντίδραση. Το  $\alpha$ -κετογλουταρικό, ένωση 5 ατόμων άνθρακα, υποβάλλεται σε οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση για να καταστεί ηλεκτρικό από την  $\alpha$ -κετογλουταρική αφυδρογονάση. Σε αυτές τις δύο αντιδράσεις, το  $NAD^+$  είναι ο δέκτης υδρογόνου. Η

φουμαρική αφυδρογονάση είναι υπεύθυνη για τη μείωση του ηλεκτρικού άλατος σε φουμαρικό άλας. Ο FAD είναι ο δέκτης υδρογόνου. Τέλος, το φουμαρικό άλας ενυδατώνεται σε L-μηλικό. Το τελευταίο ανάγεται σε οξαλοξικό με τη δράση της μηλεϊνικής αφυδρογονάσης. Σε αυτή την περίπτωση, το NAD + είναι για άλλη μια φορά ο δέκτης ηλεκτρονίων.

Από το οξικό οξύ, κάθε πλήρης κύκλος παράγει δύο μόρια  $CO_2$ , τρία ιόντα υδρογόνου μεταφέρονται σε τρία μόρια NAD<sup>+</sup> (έξι ηλεκτρόνια) και ένα ζεύγος ατόμων υδρογόνου (δύο ηλεκτρόνια) μεταφέρονται σε ένα μόριο FAD. Η αλυσίδα του κυτοχρώματος μεταφέρει αυτά τα ηλεκτρόνια προς το οξυγόνο. Το ATP σχηματίζεται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Αυτή η οξειδωτική φωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιεί τρία ενζυματικά συστήματα (την αναγωγή NADH-Q, την αναγωγή του κυτοχρώματος και την κυτοχρωμική οξειδάση). Δύο συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ουβικινόνη ή συνένζυμο Q και κυτόχρωμα c) συνδέουν αυτά τα ενζυματικά συστήματα.

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποδίδει τρία μόρια ATP ανά ζεύγος ηλεκτρονίων που μεταφέρονται μεταξύ του NADH και των δύο οξυγόνου, και δύο μορίων ATP με  $FADH_2$ . Στον κύκλο Krebs, η φωσφορυλίωση στο επίπεδο υποστρώματος σχηματίζει ένα μόριο ATP κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού ηλεκτρικού CoA σε ηλεκτρικό οξύ.

Η αναπνοή ενός μορίου γλυκόζης παράγει 36 έως 38 μόρια ATP. Δύο προέρχονται από τη γλυκόλυση, 28 από την οξειδωτική φωσφορυλίωση του NADH και του  $FADH_2$  που παράγονται από τον κύκλο Krebs, και δύο από τη φωσφορυλίωση των επιπέδων υποστρώματος κατά τη διάρκεια του σχηματισμού ηλεκτρικού άλατος. Τέσσερα έως έξι μόρια ATP προκύπτουν από την οξειδωτική φωσφορυλίωση δύο μορίων NADH που παράγονται στη γλυκόλυση. Ο ακριβής αριθμός εξαρτάται από το σύστημα μεταφοράς που χρησιμοποιείται για τη μετακίνηση των ηλεκτρονίων του κυτοσολικού NADH στην αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια. Η αναπνοή της ίδιας ποσότητας σακχάρου παράγει 18 έως 19 φορές περισσότερη βιολογικά χρησιμοποιήσιμη ενέργεια διαθέσιμη στις ζύμες από ό, τι η ζύμωση. Η αναπνοή χρησιμοποιείται για τη βιομηχανική παραγωγή ζύμης.

### 1.13. ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ CRABTREE ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ PASTEUR

Ο Pasteur ήταν ο πρώτος που συνέκρινε την ανάπτυξη ζύμης στην αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Για χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης σε μέσα καλλιέργειας, οι ζύμες χρησιμοποιούν σάκχαρα είτε μέσω αναπνοής είτε μέσω ζύμωσης. Ο αερισμός προκαλεί αύξηση της σχηματισμένης βιομάζας (συνολικά και ανά μονάδα καταναλισκόμενου σακχάρου) και μείωση της παραγωγής αλκοόλης και της κατανάλωσης σακχάρων. Ο Pasteur συνεπώς συνήγαγε ότι η αναπνοή εμποδίζει τη ζύμωση.

Το φαινόμενο Pasteur έχει ερμηνευτεί με διάφορους τρόπους. Δύο ένζυμα ανταγωνίζονται για να καταλύσουν είτε την αναπνοή είτε τη ζύμωση του πυροσταφυλικού οξέος. Αυτός ο ανταγωνισμός εξηγεί την αναπνευστική αναστολή της ζύμωσης. Η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση εμπλέκεται στο ζυμωτικό μονοπάτι. Έχει χαμηλότερη συγγένεια προς το πυροσταφυλικό από την πυροσταφυλική αφυδρογονάση. Επιπλέον, η οξειδωτική φωσφορυλίωση καταναλώνει πολλά ADP και ανόργανα φωσφορικά, τα οποία μεταναστεύουν στα μιτοχόνδρια. Στο κυτταρόπλασμα υπάρχει έλλειψη ADP και ανόργανου φωσφορικού άλατος που μπορεί να περιορίσει τη φωσφορυλίωση και έτσι να επιβραδύνει τη γλυκοολική ροή. Η αναστολή των ενζύμων της γλυκόλυσης από το ATP εξηγεί το φαινόμενο Pasteur για το μεγαλύτερο μέρος. Το ATP που παράγεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση αναστέλλει ιδιαίτερα την φωσφοφρουκτοκινάση. Έτσι, συσσωρεύονται φωσφορυλιωμένες εξόζες και η διαμεμβρανική μεταφορά σακχάρων και συνεπώς η γλυκόλυση επιβραδύνεται.

Για υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, όπως για παράδειγμα σε γλεύκος σταφυλιών, ο *S. cerevisiae* μεταβολίζει μόνο τα σάκχαρα από το ζυμωτικό μονοπάτι. Ακόμα και με την παρουσία οξυγόνου, η αναπνοή είναι αδύνατη. Το φαινόμενο αυτό ανακαλύφθηκε από τον Crabtree το 1929 σε καρκινικά κύτταρα και είναι γνωστό με διάφορα ονόματα όπως καταβολική καταστολή από τη γλυκόζη, αντίθετο φαινόμενο Pasteur και φαινόμενο Crabtree. Κατά το φαινόμενο αυτό, οι ζύμες εκδηλώνουν έναν εκφυλισμό των μιτοχονδρίων, μια μείωση στην αναλογία κυτταρικών στερολών και λιπαρών οξέων και μια καταστολή τόσο της σύνθεσης των μιτοχονδριακών ενζύμων του κύκλου του Krebs όσο και των συστατικών της αναπνευστικής αλυσίδας. Με τον

*S. cerevisiae*, πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον 9 g σακχάρου ανά λίτρο για να συμβεί το φαινόμενο Crabtree. Η καταβολική καταστολή που ασκείται από τη γλυκόζη στις ζύμες του κρασιού είναι πολύ δυνατή. Σε γλεύκος σταφυλιών, σε οποιοδήποτε επίπεδο αερισμού, οι ζύμες είναι ικανές να ζυμώνουν μόνο λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης και φρουκτόζης. Από τεχνολογικής άποψης, οι ζύμες καταναλώνουν σάκχαρα από την αναπνευστική οδό για τη βιομηχανική παραγωγή ξηρής μαγιάς, αλλά αυτό δεν συμβαίνει κατά την οινοποίηση. Αν πρέπει ο αερισμός να βοηθήσει τη διαδικασία αλκοολικής ζύμωσης, τα λιπαρά οξέα και οι στερόλες που συντίθενται από τις ζύμες, οι οποίες πολλαπλασιάζονται παρουσία οξυγόνου, είναι υπεύθυνες αλλά όχι το φαινόμενο της αναπνοής.

Ο *S. cerevisiae* μπορεί να μεταβολίσει την αιθανόλη μέσω της αναπνευστικής οδού παρουσία μικρών ποσοτήτων γλυκόζης. Μετά την αλκοολική ζύμωση, οι οξειδωτικές ζύμες αναπτύσσονται με παρόμοιο τρόπο στην επιφάνεια του κρασιού ως μέρος της διαδικασίας παραγωγής ορισμένων κρασιών (Sherry, Yellow Wine of Jura).

#### **1.14. ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΩΣ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΟ**

Η πλειονότητα των περιβαλλοντικών προβλημάτων προέρχεται από τη χρήση συμβατικών πηγών ενέργειας. Η ευθύνη για αυτά τα προβλήματα μαζί με τη μείωση των ορυκτών πηγών ενέργειας οδηγούν στην παγκόσμια ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Η παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της μετατροπής των αποβλήτων και της υπολειμματικής βιομάζας, μπορεί να αποτελέσει μία βιώσιμη και σημαντική προοπτική.

Η αιθανόλη χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως χημικά, καύσιμα (βιοαιθανόλη), ποτά, φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά. Η πλειοψηφία (90-95%) του ποσοστού αιθανόλης που παράγεται παγκοσμίως προέρχεται από την τεχνολογία βιολογικής ζύμωσης (βιοαιθανόλη), ενώ το υπόλοιπο παράγεται με τη χρήση αιθενίου (που προέρχεται από πυρόλυση αργού πετρελαίου ή / και φυσικού αερίου) με ατμό και φωσφορικό οξύ ως καταλύτη (συνθετική αιθανόλη). Η αντίδραση της συνθετικής παραγωγής αιθανόλης παράγει επίσης τοξικά υποπροϊόντα και για αυτό το λόγο δεν χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση,



Η βιοαιθανόλη, ως προϊόν ζύμωσης, υφίσταται επεξεργασία που περιλαμβάνει εμπλουτισμό της με απόσταξη και αφυδάτωση. Η κύριες πηγές παραγωγής αιθανόλης στην Ευρώπη είναι τα σιτηρά και τα ζαχαρότευτλα, ενώ στην Αμερική η αιθανόλη παράγεται από υδρολυμένο άμυλο που προέρχεται από καλαμπόκι.

Η αιθανόλη ως καύσιμο μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, δεδομένου ότι μειώνει τα ρυπογόνα αέρια, κυρίως το διοξείδιο του άνθρακα. Επιπλέον, η χρήση των γεωργικών – βιομηχανικών υπολλειμάτων ως πρώτη ύλη στην αλκοολική ζύμωση δεν αποτελεί μόνο εναλλακτική λύση σε υποστρώματα, αλλά δίνει τη λύση στο πρόβλημα διάθεσής τους. Η αιθανόλη, ως ένα βιοδιασπώμενο και σχετικά υψηλά διαλυτό στο νερό υλικό, έχει χαμηλή τοξικότητα και ως εκτούτου, οι συνέπειες των μεγάλων διαρροών καυσίμων απειλούν λιγότερο το περιβάλλον από ό,τι εκείνων που συνδέονται με το αργό πετρέλαιο ή τη βενζίνη. Τέλος, το δυναμικό της παραγωγής βιοαιθανόλης κάτω από εντελώς μη ασηπτικές συνθήκες, καθιστά αυτή τη βιοδιεργασία πολύ σημαντική σε εφαρμογές στον βιομηχανικό τομέα.

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 ενός από τους σημαντικότερους παραγωγούς αιθανόλης, κυρίως του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και του βακτηρίου *Zymomonas mobilis*. Η ξυλόζη μπορεί να υποστεί ζύμωση με ζύμες, όπως *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* και *Pichia stipis*, ή με ισομερισμό της ξυλόζης σε ξυλουλόζη με το ένζυμο ισομεράση της γλυκόζης (ξυλόζης) και μετέπειτα ζύμωσής της με τις ζύμες αρτοποιήσης *Saccharomyces cerevisiae*.

Η βιοχημεία της αλκοολικής ζύμωσης περιλαμβάνει τις οδούς αποδόμησης του υποστρώματος (γλυκόλυση, αλκοολική ζύμωση, γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση και αναπνοή στην περίπτωση χρήσης εξόζης, τις καταβολικές οδούς της ξυλόζης για την περίπτωση χρησιμοποίησης πεντόζης και την αφομοίωση της γλυκόλης και τη γλυκόλυση για την περίπτωση μικροοργανισμών μετατροπής της γλυκερόλης) και ρύθμιση μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής (φαινόμενο Pasteur, φαινόμενο Crabtree, φαινόμενο Kluyver και φαινόμενο Custer). Η γλυκόλυση θα γίνει με την καταβολική οδό Embed-Meyerhof-Parnas (για τον *S. cerevisiae* και μικροοργανισμούς που

καταναλώνουν γλυκερόλη), με την καταβολική οδό των φωσφορικών πεντοζών (PP) (για τους μικροοργανισμούς που καταναλώνουν ξυλόζη) και με την καταβολική οδό Entner-Dudoroff (για τα βακτήρια *Z. mobilis*) [17].

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ

Ο μικροοργανισμός που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι ο ζυμομύκητας *Kazachstania* και πιο συγκεκριμένα τα είδη *Kazachstania hellenica* και *Kazachstania zonata*. Το γένος *Kazachstania* ανήκει στην οικογένεια Saccharomycetaceae και ταυτοποιήθηκε το 1971 με βάση ένα μόνο είδος, το *Kazachstania viticola*, απομονωμένο από ζυμώμενα σταφύλια στο Καζακστάν. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν, για το πρώτο είδος τα: Y8, Y58, Y59, Y60 και για το δεύτερο είδος τα: Y31, Y32, τα οποία προήλθαν από το εργαστήριο Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

### 2.2. ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Σε κωνικές φιάλες των 250 ml προστέθηκαν 50 ml θρεπτικού μέσου που απαρτιζόταν από 3,0 g/L Yeast Extract, 3,0 g/L Peptone και 3,0 g/L Γλυκόζη σε απιονισμένο νερό, με συνολικό όγκο τα 300 ml. Ακολουθήσε αποστείρωση των φιαλών και εμβολιασμός με το εκάστοτε στέλεχος υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα για 24 ώρες έως ότου αναπτυχθεί η προκαλλιέργεια.



Εικόνα 5: Προκαλλιέργεια σε κωνικές φιάλες

### 2.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΚΩΝΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ

Τα στελέχη του γένους *Kazachstania* καλλιιεργήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 ml, οι οποίες ήταν τοποθετημένες σε αναδευτήρα καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, με σταθερή θερμοκρασία στους  $29 \pm 01^\circ \text{C}$  και 190 rpm.

Το θρεπτικό μέσο για την κάθε καλλιέργεια αποτελούνταν από 4,0 g/L Tartaric Acid, 5,0 g/L Yeast Extract και 10,0 g/L Peptone σε απιονισμένο νερό. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις ζυμώσεις ήταν γλυκόζη και φρουκτόζη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η συγκεκριμένη σύσταση επιλέχθηκε για να παρομοιάζεται το συνθετικό μέσο με ζυμούμενο γλεύκος.

Ο όγκος του θρεπτικού μέσου σε κάθε κωνική φιάλη ήταν 70 ml πριν τον εμβολιασμό. Για κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές κωνικές φιάλες, μία με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και μία με πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη. Οι κωνικές φιάλες με το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκαν και μόλις έφτασαν σε θερμοκρασία δωματίου εμβολιάστηκαν με 1 ml προκαλλιέργειας και τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα.

Πραγματοποιήθηκαν δύο ζυμώσεις, η πρώτη με 30 g/L σακχάρου και η δεύτερη με 100g/L, με λόγο άνθρακα – αζώτου  $\frac{C}{N}$  8,4 mol/mol και 25,14 mol/mol αντίστοιχα.

Το pH καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης παρέμεινε σταθερό στο 3,4 για όλα τα στελέχη του γένους *Kazachstania* και δεν χρειάστηκε διόρθωση.



Εικόνα 6: Κύρια καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες

## 2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Από κάθε κωνική φιάλη λαμβανόταν δείγμα 5 ml με ασηπτικές συνθήκες, και τοποθετούνταν σε φυγόκεντρο. Το διήθημα με απιονισμένο νερό τοποθετούνταν σε φιάλη Mc Carntey η οποία μεταφερόταν σε φούρνο ξήρανσης στους 80° C.

## 2.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗΣ

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης γλυκόζης και φρουκτόζης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC).

Η συσκευή όπου πραγματοποιήθηκαν όλες οι μετρήσεις ήταν Waters 600E με ανιχνευτές RI 410 για τον προσδιορισμό των σακχάρων και UV 486 για τον προσδιορισμό των οξέων. Η στατική φάση αποτελούταν από τη στήλη Bio – rad RICHMOND USA Aminex HPX – 87H, 30cm x 7.8mm ενώ η κινητή φάση ήταν 5 mM  $H_2SO_4$  σε δις – απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό. Η ροή της κινητής φάσης ήταν στα 0,6 ml/min και η θερμοκρασία της στήλης ήταν στους 40° C.

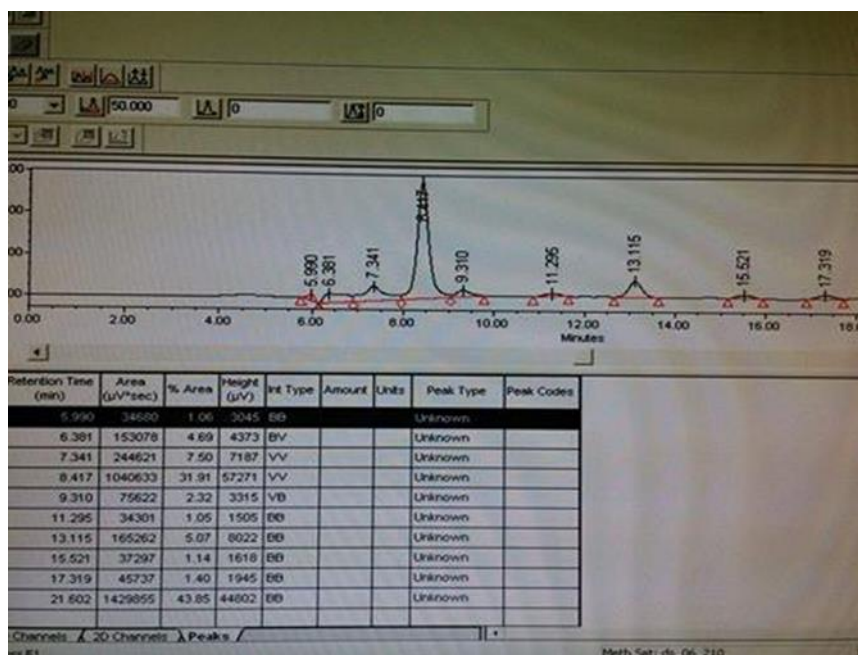
Η ανάλυση κάθε δείγματος διαρκούσε 24 λεπτά και από το εμφανιζόμενο χρωματογράφημα πραγματοποιούνταν ολοκλήρωση των κορυφών της Γλυκόζης και της Φρουκτόζης με τη χρήση του λογισμικού Empower. Στο τέλος, με τη βοήθεια των προτύπων καμπυλών αναφοράς, ταυτοποιούνταν η συγκέντρωση μελετούμενης ουσίας κάθε δείγματος.

## 2.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Ο προσδιορισμός της παραγόμενης αιθανόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με χρήση HPLC, ακριβώς με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω για τον προσδιορισμό Γλυκόζης και Φρουκτόζης.

## 2.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Ο προσδιορισμός της παραγόμενης γλυκερόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με χρήση HPLC, ακριβώς με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω για τον προσδιορισμό Γλυκόζης και Φρουκτόζης.



Εικόνα 7: Καταγραφή κορυφών μέσω HPLC

## 2.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

Ο προσδιορισμός των μικροβιακών ενδοπολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε ως εξής: λήφθηκαν 0,05 g ξηρής βιομάζας από κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες. Προστέθηκαν στον κάθε σωλήνα 10ml υδροχλωρικό οξύ 2M και ακολούθησε βρασμός των δειγμάτων για 30 λεπτά στους 80° C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml καυστικού νατρίου 2M για να επέλθει εξουδετέρωση. Τα δείγματα ανακενήθηκαν και με διηθητικό χαρτί λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Από αυτούς προστέθηκαν σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες 0,5 ml υπερκείμενου υγρού και 0,5 ml αντιδραστήριου DNS. Για το δείγμα που αποτέλεσε το τυφλό, αντί για υπερκείμενο υγρό προστέθηκε απιονισμένο νερό. Ακολούθησε βρασμός για 5 λεπτά και προστέθηκαν 5 ml απιονισμένου νερού σε όλα τα δείγματα. Τέλος έγινε φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο, όπου καταγράφηκε η απορρόφηση του κάθε

δείγματος στα 540 nm, η οποία και τοποθετήθηκε σε εξίσωση, υπολογίζοντας έτσι τα ανάγωνα σάκχαρα στο καθένα.

## 2.9. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Η ξηρή βιομάζα, αφού ομογενοποιήθηκε, εκχυλίστηκε με τη μέθοδο (Folch et al. 1957) τροποποιηθείσα κατά Papanikolaou et al. 2001. Ειδικότερα, ξηρά και ομογενοποιημένη βιομάζα παρέμεινε σε μίγμα διαλυτών C/M 2/1 (v/v) για τουλάχιστον 3 ημέρες, σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια έγινε διήθηση της βιομάζας. Το εκχύλισμα συλλέχθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη και οι διαλύτες απομακρύνθηκαν μέσω περιστροφικού εξατμιστήρα Rotavapor R-114 υπό κενό και σε θερμοκρασία 60-70° C. Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών ζυγίστηκαν οι σφαιρικές φιάλες σε ζυγό ακριβείας για τον προσδιορισμό των ολικών ενδοκυτταρικών λιπιδίων.



Εικόνα 8: Προετοιμασία δειγμάτων προς εξάτμιση



Εικόνα 9: Περιστροφικός εξατμιστήρας Rotavapor R-114

## 2.10. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

Στην παρούσα μελέτη ο ποιοτικός προσδιορισμός των αρωματικών ενώσεων έγινε με GC-FID (Gas-Chromatography-Flame Ionization Detector), της εταιρείας Hewlett- Packard series II 5890. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το Ήλιο (He) με ρυθμό ροής  $1\text{ml}\times\text{min}^{-1}$ . Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν πολική DB-WAX (length  $30\text{m} \times 0.320\text{mm I.D.}$ ), επικαλυμμένη με film  $0.25\mu\text{m}$ , στατικής φάσης.



Εικόνα 10: GC-FID (Gas-Chromatography-Flame Ionization Detector)

Σε γυάλινο vial SPME των 20 ml (βιδωτό πώμα με septum), προστέθηκαν 10 ml του προς ανάλυση δείγματος. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα και παρέμεινε υπό ανάδευση στις 400 rpm, για 10 min σε υδατόλουτρο  $35^{\circ}\text{C}$ . Με το πέρας των 10 min, εισήχθη η ίνα στο εσωτερικό του vial και απελευθερώθηκε ώστε να προσροφήσει τις πτητικές ενώσεις και παρέμεινε για 30min, υπό ανάδευση. Τέλος, η ίνα μεταφέρθηκε στην υποδοχή έγχυσης (injector), όπου παρέμεινε για 10min ώστε να αποκολληθούν από την ίνα οι αρωματικές ενώσεις αλλά και να γίνει ο καθαρισμός της ίνας ώστε να είναι έτοιμη για το επόμενο δείγμα. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε, υπό αρχικές συνθήκες η θερμοκρασία εισόδου (inlet) είναι  $220^{\circ}\text{C}$ , η θερμοκρασία ανιχνευτή (detector)  $250^{\circ}\text{C}$  και η θερμοκρασία φούρνου (oven)  $40^{\circ}\text{C}$ . Σε αυτή τη θερμοκρασία διατηρείται ο



φούρνος για 5min και στη συνέχεια με ρυθμό  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ανεβαίνει στους  $220^{\circ}\text{C}$ , όπου παραμένει 5 min. Όλο το πρόγραμμα διαρκεί 70 min.



Εικόνα 11: Μαγνητικός αναδευτήρας με κρυο-vial SPME



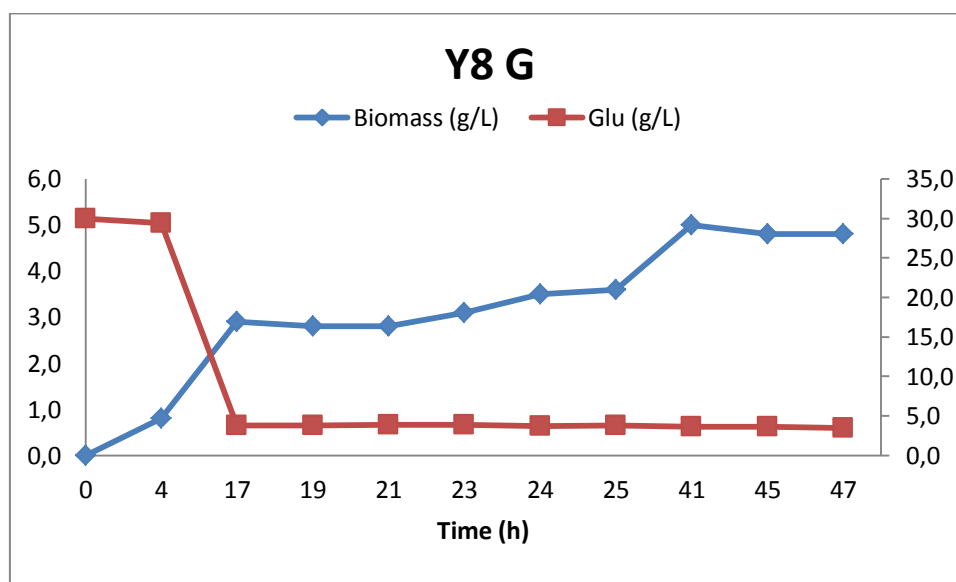
Εικόνα 12: Ίνα στην υποδοχή έγχυσης

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετώνται στελέχη του γένους *Kazachstania* για πρώτη φορά σε επίπεδο αλκοολικής ζύμωσης, καθώς και ταυτοποίησης των παραγόμενων αρωματικών ενώσεων μετά το πέρας αυτής. Ο σκοπός ήταν να σχηματιστεί το προφίλ του μικροοργανισμού μέσα από ζυμώσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων σακχάρου σε τεχνητό υπόστρωμα με τις ιδιότητες του γλεύκους. Η ένδειξη G ή F που αναγράφεται δίπλα από κάθε στέλεχος του ζυμομύκητα, αναφέρεται στη χρήση γλυκόζης ή φρουκτόζης αντίστοιχα, σαν κύρια πηγή άνθρακα του υποστρώματος.

### 3.1. ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Kazachstania hellenica* και *Kazachstania zonata* ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΟΥ 30 g/L

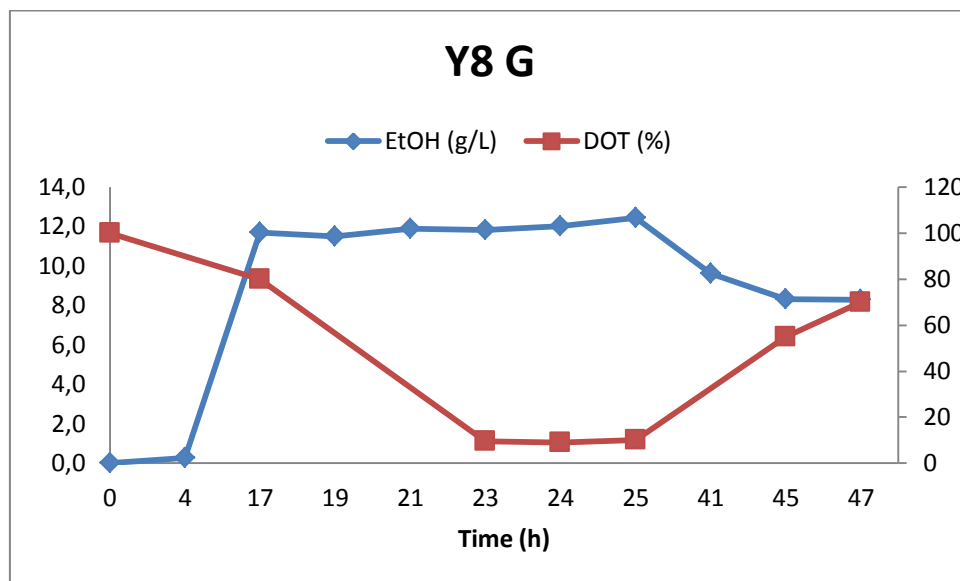
#### 3.1.1. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. hellenica* Y8 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ



Διάγραμμα 1: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *K. hellenica* Y8.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση γλυκόζης για τον μικροοργανισμό *K.*

*hellenica* Y8. Παρατηρείται πως το σάκχαρο του υποστρώματος δεν καταναλώνεται πλήρως, αφήνοντας αζύμωτα 3,5 g/L γλυκόζης κατά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Η βιομάζα παρουσιάζει ανοδική πορεία, η οποία σταθεροποιείται στο σημείο όπου έχει καταναλωθεί σχεδόν όλο το σάκχαρο του υποστρώματος. Εν συνεχεία, υπάρχει πάλι άνοδος της συγκέντρωσης βιομάζας, η οποία στο μέγιστο σημείο φτάνει τα 5,0 g/L, που πιθανώς επισυμβαίνει όταν ο μικροοργανισμός συνηθίζει στο περιβάλλον της αιθανόλης και αρχίσει να παράγει μεταβολικά προϊόντα.



Διάγραμμα 2: Παραγωγή αιθανόλης και πορεία οξυγόνου κατά την αλκοολική ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκόζης του μ/ου *K. hellenica* Y8.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η παραγωγή αιθανόλης από τον μικροοργανισμό, καθώς και η πορεία του διαλυτού οξυγόνου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η παραγόμενη αιθανόλη κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης αυξάνεται και κατόπιν παραμένει σχετικά σταθερή. Στο σημείο όμως που το σάκχαρο του μέσου φαίνεται να έχει καταναλωθεί, ο μικροοργανισμός ανακαταναλώνει την αιθανόλη, προς κάλυψη των ενεργειακών του αναγκών.

Το διαλυτό οξυγόνο μειώνεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, λόγω της έντονης μεταβολικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού, και στο τέλος της επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα.

Πίνακας 3: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του *μ/ου Kazachstania hellenica* Y8 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

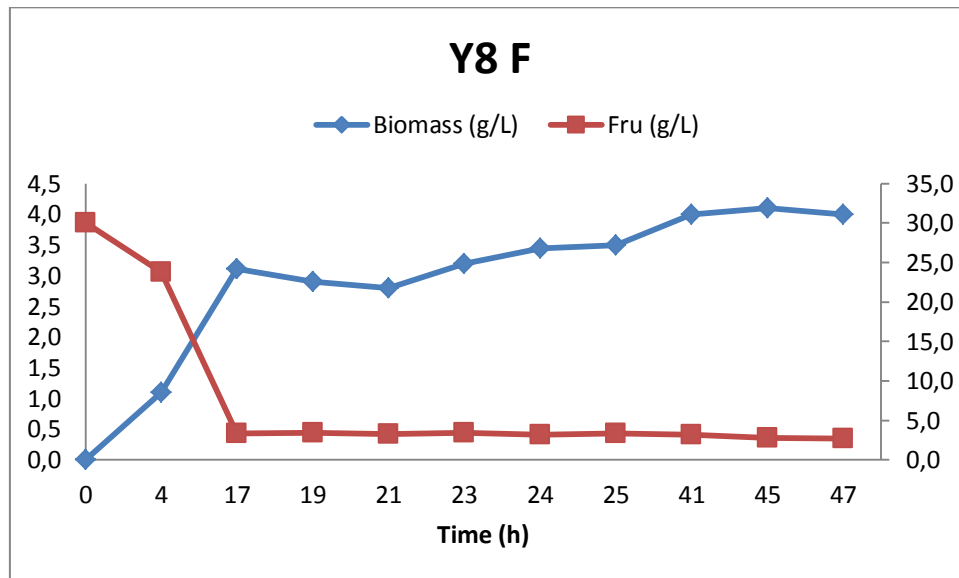
Strain Y8, Glc <sub>0</sub> ~30g/L	Time (h)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (% w/w)	iPs/X (% w/w)
a	25	3,6	26,2	12,4	1,0	3,5	3,0
b	41	5,0	26,4	9,6	1,0	3,5	3,1

Στον παραπάνω πίνακα περιγράφεται η κινητική του στελέχους Y8 της ζύμης *Kazachstania hellenica* σε υπόστρωμα γλυκόζης. Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης 12,4 g/L παρουσιάστηκε την 25<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης και ο συνλεστής απόδοσης είναι  $Y_{\text{EtOH}/\text{Glc}} = 0,41 \text{ g EtOH/g Glc}$ .

Κατά την αλκοολική ζύμωση του στελέχους Y8, παρατηρήθηκε παραγωγή γλυκερόλης. Η μέγιστη συγκέντρωση ήταν 1,0 g/L που σημειώθηκε την 21η ώρα της ζύμωσης και κατόπιν παρέμεινε σταθερή μέχρι το τέλος της. Η παραγωγή γλυκερόλης ξεκινάει από τη στιγμή που το σάκχαρο έχει καταναλωθεί.

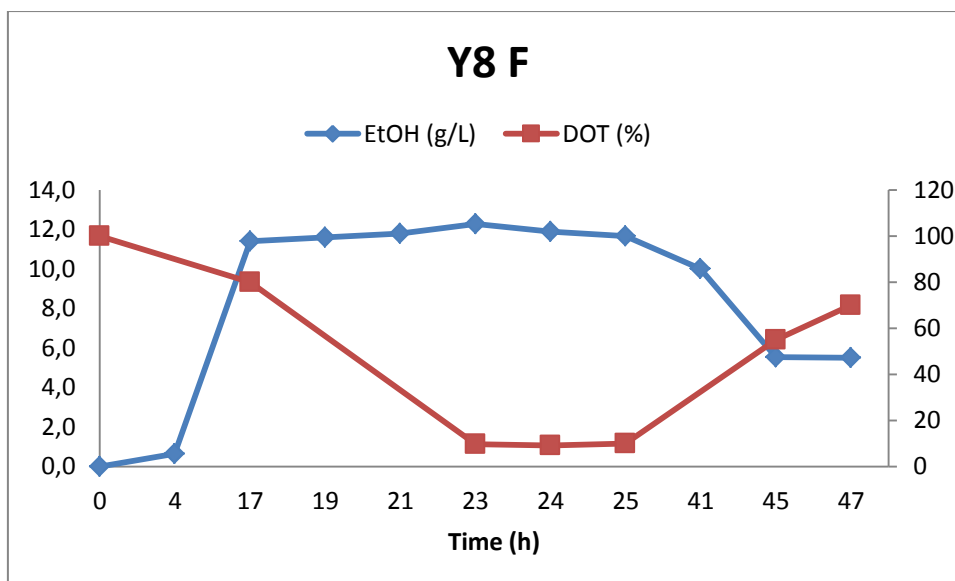
Μετρήθηκαν επίσης οι ενδοπολυσακχαρίτες και το ποσοστό λιποσυσσώρευσης του μικροοργανισμού. Και στις δύο περιπτώσεις οι τιμές ήταν αρκετά χαμηλές, όπως διαπιστώνεται στον πίνακα 3. Συμπεραίνεται συνεπώς πως η ανάλωση της αιθανόλης δεν οδήγησε σε λιποσυσσώρευση και πως το στέλεχος Y8 δεν παρήγαγε μεγάλες ποσότητες αποθησαυριστικών στοιχείων.

### 3.1.2. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. hellenica* Y8 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ



Διάγραμμα 3: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση φρουκτόζης από τον μ/ο *K. hellenica* Y8.

Κατ' αντιστοιχία με την προηγούμενη περίπτωση, έτσι και στο υπόστρωμα της φρουκτόζης παρατηρείται πως το σάκχαρο δεν καταναλώνεται πλήρως, αφήνοντας αζύμωτα 2,7 g/L φρουκτόζης κατά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Η βιομάζα παρουσιάζει ανοδική πορεία, η οποία στο μέγιστο σημείο φτάνει τα 4,1 g/L.



Διάγραμμα 4: Παραγωγή αιθανόλης και πορεία οξυγόνου κατά την αλκοολική ζύμωση σε υπόστρωμα φρουκτόζης του μ/ου *K. hellenica* Y8.

Η κινητική της αιθανόλης είναι αντίστοιχη με αυτή του υποστρώματος γλυκόζης. Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης 12,3 g/L παρουσιάστηκε την 23<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης και ο συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Fru} = 0,41$  g EtOH/g Fru.

Η πορεία του διαλυτού οξυγόνου είναι πανομοιότυπη και στα δύο υποστρώματα.

Πίνακας 4: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania hellenica* Y8 σε υπόστρωμα φρουκτόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y8, Fru <sub>0</sub> ~30g/L	Time (h)	X (g/L)	Fru cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (% w/w)	iPs/X (% w/w)
a	23	3,2	26,5	12,3	1,2	6,4	3,1
b	45	4,1	27,2	5,5	0,8	6,7	2,2

Και στο υπόστρωμα της φρουκτόζης το στέλεχος παρήγαγε γλυκερόλη. Η μέγιστη συγκέντρωση ήταν 1,2 g/L, όπου σημειώθηκε την 21<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης και κατόπιν παρέμεινε σταθερή μέχρι το τέλος της. Η παραγωγή γλυκερόλης ξεκινάει από τη στιγμή που το σάκχαρο έχει καταναλωθεί.

Σε αυτή τη περίπτωση σημειώθηκε μεγαλύτερο ποσοστό λιποσυσσώρευσης και χαμηλή παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών.

### 3.1.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *K. hellenica* Y8 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του ίδιου στελέχους σε υποστρώματα με διαφορετικό σάκχαρο ως πηγή άνθρακα παρατηρούνται τα εξής:

Γενικά τα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* προτιμούν τη γλυκόζη και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του γλεύκους είναι το πρώτο σάκχαρο που καταναλώνεται έναντι της φρουκτόζης. Στο πείραμα αυτό παρατηρήθηκε πως μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας έλαβε χώρα στο υπόστρωμα της γλυκόζης, στο σημείο της ανακατανάλωσης της αιθανόλης από το στέλεχος.

Η πορεία παραγωγής της αιθανόλης και στα δύο υποστρώματα φαίνεται κοινή, με μοναδική διαφορά στις τελικές ώρες της ζύμωσης όπου στο υπόστρωμα της φρουκτόζης η ανακατανάλωσή της είναι πιο έντονη, φτάνοντας σε τελική συγκέντρωση τα 5,5 g/L.

Στην περίπτωση της κατανάλωσης σακχάρου από το στέλεχος Y8, παρατηρείται ότι ήταν ελαφρώς γρηγορότερη στο υπόστρωμα της φρουκτόζης. Ενδιαφέρον εστιάζεται στο γεγονός ότι σε κάθε περίπτωση, μη αμελητέες ποσότητες σακχάρου υπάρχουν στο υπόστρωμα.

Όσον αφορά τη παραγωγή γλυκερόλης, σημειώνεται πως στο υπόστρωμα της φρουκτόζης είναι ελαφρώς μεγαλύτερη απ' ό τι στο υπόστρωμα της γλυκόζης, και ανακαταναλώνεται προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών του μικροοργανισμού με πιο γρήγορο ρυθμό.

### 3.1.4. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. hellenica* Y58 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ

Πίνακας 5: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania hellenica* Y58 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL, t=29±01°C, ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y58, Glc <sub>0</sub> ~30g/L	Time (h)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (% w/w)	iPs/X (% w/w)
a	17	3,5	26,4	12,1	0,6	2,5	4,0
b	47	5,6	26,5	7,5	0,8	4,7	4,5

Η κινητική του στελέχους *K. hellenica* Y58 στο υπόστρωμα της γλυκόζης, ακολουθεί την ίδια πορεία με το στέλεχος Y8. Η συγκέντρωση της γλυκόζης σταθεροποιείται από την 17<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης στα 3,5 g/L τα οποία δεν καταναλώνονται. Η αιθανόλη σημειώνει μέγιστη συγκέντρωση στις 17 ώρες ζύμωσης στα 12,1 g/L και στη συνέχεια αρχίζει να ανακαταναλώνεται από το μικροοργανισμό έτσι ώστε μετά το πέρας της ζύμωσης να σταθεροποιηθεί στα 7,5 g/L. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Glc} = 0,40$  g EtOH/g Glc.

Στο συγκεκριμένο στέλεχος παρατηρείται ότι η βιομάζα παρουσιάζει φθίνουσα πορεία μετά τις 19 ώρες ζύμωσης και κατόπιν μετά τις 25 ώρες έχει και πάλι ανοδική πορεία παρουσιάζοντας μέγιστο στο τέλος της ζύμωσης με συγκέντρωση 5,6 g/L.

Η γλυκερόλη που παράγεται από το στέλεχος Y58 παρουσιάζει μέγιστο στις 23 ώρες ζύμωσης και παραμένει σταθερή, κυμαινόμενη μεταξύ 0,8 – 0,9 g/L.

Όταν καταναλώνεται η γλυκόζη εμφανίζεται το μέγιστο της αιθανόλης. Πιθανώς, μέχρι ο μεταβολισμός να μετατοπιστεί προς την κατανάλωση της αιθανόλης, για την κάλυψη ενεργειακών αναγκών η ζύμη καταναλώνει ποσότητα γλυκερόλης και ενδοπολυσακχαριτών. Το ποσοστό των λιπιδίων του στελέχους Y58 είναι 4,7% και σημειώνεται την 41<sup>η</sup> ώρα ζύμωσης. Το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών παρουσιάζει μέγιστο στο τέλος της ζύμωσης στο 4,5%.

### 3.1.5. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. hellenica* Y58 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ

Πίνακας 6: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania hellenica* Y58 σε υπόστρωμα φρουκτόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y58, <i>Fru</i> <sub>0</sub> ~30g/L	Time (h)	X (g/L)	Fru cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (%, w/w)	iPs/X (%, w/w)
<b>a</b>	17	3,5	26,6	12,3	0,7	0,5	6,2
<b>b</b>	19	3,7	26,7	11,7	0,7	0,7	4,3

Και σε αυτή τη περίπτωση το σάκχαρο, εδώ η φρουκτόζη, δεν καταναλώνεται πλήρως από τον μικροοργανισμό και κατά το πέρας της ζύμωσης έχει συγκέντρωση



3,1 g/L. Η αιθανόλη παρουσιάζει μέγιστο την 17<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης με συγκέντρωση 12,3 g/L και κατόπιν ανακαταναλώνεται φτάνοντας τελική συγκέντρωση τα 7,1 g/L. . Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Fru} = 0,41$  g EtOH/g Fru.

Η βιομάζα έχει ανοδική πορεία και παρουσιάζει μέγιστο στις 19 ώρες ζύμωσης με συγκέντρωση 3,7 g/L. Κατόπιν, η συγκέντρωση φθίνει στα 3,0 g/L και όταν ο μικροοργανισμός συνηθήσει στο περιβάλλον της αιθανόλης, τα μεταβολικά προϊόντα αυξάνονται και η συγκέντρωση της βιομάζας φτάνει τα 3,4 g/L.

Η συγκέντρωση της γλυκερόλης είναι αυξανόμενη, παρουσιάζοντας μέγιστο στις 41 ώρες ζύμωσης με 1,2 g/L. Κατόπιν, πιθανότατα ο μικροοργανισμός την ανακαταναλώνει προς κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του και κατά το πέρας της ζύμωσης σημειώνει συγκέντρωση 1,0 g/L.

Το ποσοστό λιπιδίων του στελέχους Y58 σημειώνεται στο 2,1% στις 45 ώρες ζύμωσης. Το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών παρουσιάζει μέγιστο στις 17 ώρες ζύμωσης με τιμή 6,2%. Στη συνέχεια μειώνεται πιθανώς προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών του μικροοργανισμού και στο τέλος της ζύμωσης σημειώθηκε 4,3%.

### **3.1.6. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *K. hellenica* Y58 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ**

Στην περίπτωση της κινητικής της βιομάζας του στελέχους Y58 παρατηρήθηκε ότι ο μικροοργανισμός προσαρμόστηκε πιο εύκολα στο υπόστρωμα της γλυκόζης, με αποτέλεσμα να αρχίσει να πολλαπλασιάζει τα κύτταρά του στο περιβάλλον της αιθανόλης, φτάνοντας σε συγκέντρωση 5,6 g/L έναντι 3,4 g/L που σημείωσε στο υπόστρωμα της φρουκτόζης. Κατά τις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης, η κινητική τους ήταν πανομοιότυπη.

Η αιθανόλη και στα δύο υποστρώματα δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτες διαφορές. Να σημειωθεί ότι η μέγιστη συγκέντρωση σημειώθηκε στις 17 ώρες ζύμωσης και στις δύο περιπτώσεις, με ελάχιστα μεγαλύτερη στο υπόστρωμα της φρουκτόζης, στα 12,3 g/L.

Στην κινητική των σακχάρων δεν παρατηρείται καμία διαφορά ανάμεσα στα δύο υποστρώματα. Και στις δύο περιπτώσεις, ούτε η γλυκόζη, ούτε η φρουκτόζη καταναλώνονται πλήρως από το στέλεχος.

Στην περίπτωση της γλυκερόλης, παράγεται μεγαλύτερη συγκέντρωση στο υπόστρωμα της φρουκτόζης.

Παρατηρώντας συνολικά όλα τα δεδομένα, φαίνεται ότι στο σημείο που η βιομάζα αρχίζει και μειώνεται, η ζύμη καταναλώνει ταυτόχρονα γλυκερόλη, πολυσακχαρίτες και αιθανόλη. Στη συνέχεια ο μικροοργανισμός, έχοντας προσαρμόσει το μεταβολισμό του, συνεχίζει την παραγωγή γλυκερόλης, ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων.

### 3.1.7. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. hellenica* Y59 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ

Πίνακας 7: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania hellenica* Y59 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y59, $Glc_0 \sim 30\text{g/L}$	Time (h)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (% w/w)	iPs/X (% w/w)
a	17	2,5	26,1	12,7	0,8	0,5	2,0
b	41	5,3	26,3	8,5	0,8	1,3	4,1

Και στην περίπτωση του στελέχους Y59 παρατηρείται μία ομαλή κινητική, με την γλυκόζη να καταναλώνεται προς παραγωγή αιθανόλης. Η μεγιστη συγκέντρωση της αιθανόλης σημειώθηκε την 17<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης στα 12,7 g/L. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Glc} = 0,42 \text{ g EtOH/g Glu}$ . Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί πως το συγκεκριμένο στέλεχος παρήγαγε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης απ' όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Η πορεία της βιομάζας δεν αποκλίνει από αυτήν των προηγούμενων στελεχών. Στο σημείο που παρατηρείται το μέγιστο της αιθανόλης αρχίζει και φθίνει, μέχρις ότου ο μικροοργανισμός να προσαρμόσει το μεταβολισμό του και έτσι να αυξηθεί και πάλι η βιομάζα λόγω της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. Μέγιστο

παρουσιάζει στις 41 ώρες με συγκέντρωση 5,3 g/L, λόγω της ανάλωσης της αιθανόλης.

Η γλυκερόλη παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση την 21<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης με 1,0 g/L και κατόπιν όταν το σάκχαρο εξαντλείται απ' το μέσο, αρχίζει και ανακαταναλώνεται προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών.

Το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών παρουσιάζει ομαλή αυξανόμενη πορεία, φτάνοντας μέγιστο το 4,9% στο τέλος της ζύμωσης. Από την άλλη η παραγωγή λιπιδίων είναι πολύ περιορισμένη και εμφανίζεται την 41<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης με ποσοστό μόλις 1,3% που θα παραμείνει σταθερό μέχρι το τέλος της.

### 3.1.8. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. hellenica* Y59 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ

Πίνακας 8: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania hellenica* Y59 σε υπόστρωμα φρουκτόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL, t=29±01°C, ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y59, <i>Fru</i> <sub>0</sub> ~30g/L	Time (h)	X (g/L)	Fru cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (%, w/w)	iPs/X (%, w/w)
<b>a</b>	23	2,4	26,6	11,8	1,1	4,5	5,5
<b>b</b>	47	3,7	26,6	8,7	0,9	5,7	4,6

Στην περίπτωση που ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η φρουκτόζη, η μέγιστη συγκέντρωση παραγώμενης αιθανόλης είναι 11,8 g/L και παρατηρείται στις 23 ώρες ζύμωσης. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Fru}=0,39$  g EtOH/ g Fru. Και σε αυτή τη περίπτωση η φρουκτόζη δεν καταναλώνεται πλήρως από το στέλεχος Y59 με τελική συγκέντρωση κατά το πέρας της ζύμωσης 3,4 g/L.

Αντίστοιχη πορεία με τα προηγούμενα στελέχη παρουσιάζει και η βιομάζα στο Y59 με πηγή άνθρακα του μέσου τη φρουκτόζη. Στο μέγιστο της αιθανόλης παρατηρείται πτώση της συγκέντρωσης βιομάζας, για να αυξηθεί όταν ο μικροοργανισμός προσαρμοστεί στο περιβάλλον και αρχίζει να ανακαταναλώνει αιθανόλη. Μέγιστη συγκέντρωση σημειώνεται στο τέλος της ζύμωσης με 3,7 g/L.

Η γλυκερόλη έχει ανοδική πορεία με μέγιστη συγκέντρωση τα 1,1 g/L που σημειώνονται την 23<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης. Στη συνέχεια ανακαταναλώνεται προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών, φτάνοντας τελική συγκέντρωση τα 0,9 g/L.

Στο στέλεχος Y59 που χρησιμοποίησε ως πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη, παρατηρήθηκε πως το ποσοστό των λιπιδίων στο τέλος της ζύμωσης ήταν 5,7% . Οι ενδοπολυσακχαρίτες σημείωσαν μέγιστο ποσοστό 6,0% στις 19 ώρες ζύμωσης και κατόπιν ανακαταναλώθηκαν προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών, φτάνοντας τελικό ποσοστό το 4,7%.

### **3.1.9. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *K. hellenica* Y59 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ**

Στην περίπτωση του στελέχους Y59 παρατηρήθηκε πως μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας παρουσίασε ο μικροοργανισμός στο υπόστρωμα της γλυκόζης. Και στα 2 υποστρώματα φαίνεται πως στο μέγιστο της αιθανόλης η βιομάζα φθίνει, και μόλις καταναλωθεί το σάκχαρο η συγκέντρωσή της αυξάνεται λόγω παραγωγής μεταβολικών προϊόντων και ανακατανάλωση της αιθανόλης.

Η κινητική της αιθανόλης και στα δύο υποστρώματα δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές, όμως μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα της γλυκόζης.

Και στα δύο υποστρώματα η κινητική των σακχάρων είναι πανομοιότυπη. Κανένα από τα δύο δεν καταναλώνεται πλήρως από το μικροοργανισμό.

Στην περίπτωση της παραγωγής γλυκερόλης, παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στα δύο υποστρώματα. Στο υπόστρωμα της φρουκτόζης σημειώνεται παραγωγή γλυκερόλης νωρίτερα απ' ότι στο υπόστρωμα της γλυκόζης, καθώς και η μέγιστη συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη.

### 3.1.10. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. hellenica* Y60 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ

Πίνακας 9: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania hellenica* Y60 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y60, Glc <sub>0</sub> ~30g/L	Time (h)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (% w/w)	iPs/X (% w/w)
a	17	4,1	26,5	12,4	0,9	1,6	3,8
b	47	5,2	26,9	8,6	0,7	2,6	2,7

Το τελευταίο στέλεχος της *Kazachstania hellenica* που μελετήθηκε ήταν το Y60. Η κινητική του στελέχους Y60 στο υπόστρωμα της γλυκόζης, ακολουθεί την ίδια πορεία με τα υπόλοιπα στελέχη του είδους. Η συγκέντρωση της γλυκόζης σταθεροποιείται από την 17<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης κοντά στα 3,5 g/L τα οποία δεν καταναλώνονται. Η αιθανόλη σημειώνει μέγιστη συγκέντρωση στις 17 ώρες ζύμωσης στα 12,4 g/L και στη συνέχεια αρχίζει να ανακαταναλώνεται από το μικροοργανισμό έτσι ώστε μετά το πέρας της ζύμωσης να σταθεροποιηθεί στα 8,6 g/L. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{\text{EtOH}/\text{Glc}} = 0,41$  g EtOH/g Glc.

Η βιομάζα έχει ανοδική πορεία και παρουσιάζει μέγιστο στο τέλος της ζύμωσης με συγκέντρωση 5,2 g/L. Η μεγάλη αυτή αύξηση οφείλεται στο ότι η αιθανόλη ανακαταναλώνεται από τη ζύμη.

Η συγκέντρωση της γλυκερόλης παρουσιάζει μέγιστο στις 17 ώρες ζύμωσης με 0,9 g/L και κατόπιν παραμένει σταθερή.

Παρατηρείται ότι το ποσοστό των λιπιδίων είναι πολύ χαμηλό, με μέγιστο το 2,6% στις 41 ώρες. Επιπλέον, το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών παρουσιάζει αρχικά άνοδο με μέγιστο το 3,8% στις 17 ώρες και κατόπιν σημειώνει φθίνουσα πορεία μέχρι το σημείο που το σάκχαρο του υποστρώματος έχει καταναλωθεί. Κατόπιν, όταν ο μεταβολισμός της ζύμης συνηθίσει στο περιβάλλον της αιθανόλης, συνεχίζεται η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών. Με αυτή την πορεία συμπεραίνεται πως ο μικροοργανισμός καταναλώνει τους ενδοπολυσακχαρίτες για να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες.

### 3.1.11. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. hellenica* Y60 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ

Πίνακας 10: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania hellenica* Y60 σε υπόστρωμα φρουκτόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y60, Fru <sub>0</sub> -30g/L	Time (h)	X (g/L)	Fru cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (% w/w)	iPs/X (% w/w)
a	17	3,4	26,7	12,3	0,8	1,3	5,7
b	45	3,9	27,3	8,2	0,8	2,4	3,6

Στην περίπτωση που ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η φρουκτόζη, η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης είναι 12,3 g/L και παρατηρείται στις 17 ώρες ζύμωσης. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Fru}=0,41$  g EtOH/ g Fru. Και σε αυτή τη περίπτωση η φρουκτόζη δεν καταναλώνεται πλήρως από το στέλεχος Y8 με τελική συγκέντρωση κατά το πέρας της ζύμωσης 2,6 g/L.

Η βιομάζα έχει αρχικά ανοδική πορεία, κατόπιν φθίνει και όταν ο μικροοργανισμός συνηθήσει στο περιβάλλον της αιθανόλης, τα μεταβολικά προϊόντα αυξάνονται και η συγκέντρωση της βιομάζας φτάνει μέγιστη συγκέντρωση τα 3,9 g/L. Η άνοδος αυτή είναι πολύ μικρότερη απ' ό τι στην περίπτωση του υποστρώματος της γλυκόζης.

Η συγκέντρωση της γλυκερόλης είναι αυξανόμενη, παρουσιάζοντας μέγιστο στις 25 ώρες ζύμωσης με 1,2 g/L. Κατόπιν, πιθανότατα ο μικροοργανισμός την ανακαταναλώνει προς κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του και κατά το πέρας της ζύμωσης σημειώνει συγκέντρωση 0,8 g/L.

Στο στέλεχος Y60 που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα η φρουκτόζη, παρατηρήθηκε πως το ποσοστό των λιπιδίων στο τέλος της ζύμωσης ήταν 2,4%. Οι ενδοπολυσακχαρίτες σημείωσαν μέγιστο ποσοστό 6,1% στις 19 ώρες ζύμωσης και κατόπιν ανακαταναλώθηκαν προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών, φτάνοντας τελικό ποσοστό το 3,6%.

### **3.1.12. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *K. hellenica* Υ60 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ**

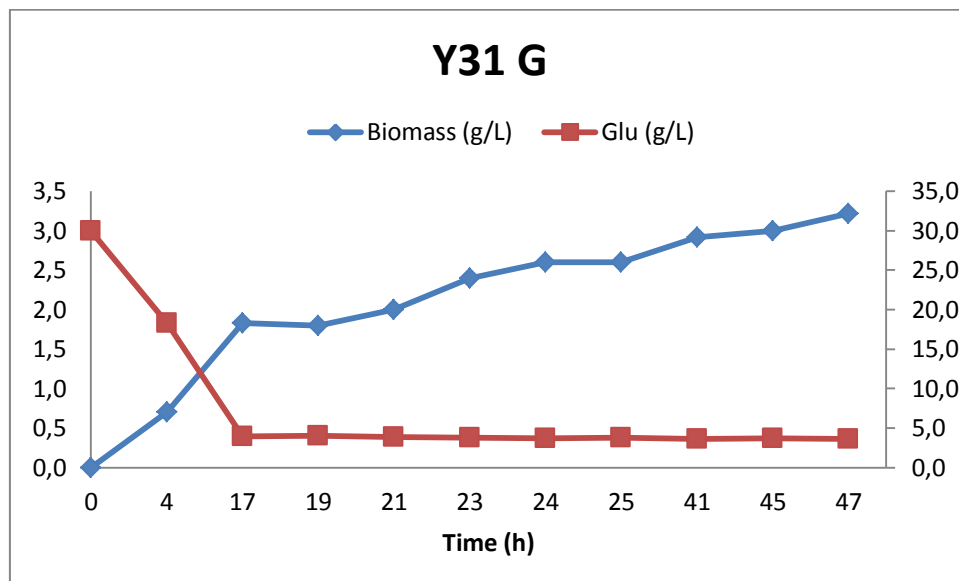
Στην περίπτωση του στελέχους Υ60 παρατηρήθηκε πως μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας παρουσίασε ο μικροοργανισμός στο υπόστρωμα της γλυκόζης. Και στα 2 υποστρώματα φαίνεται πως στο μέγιστο της αιθανόλης η βιομάζα φθίνει, και μόλις καταναλωθεί το σάκχαρο η συγκέντρωσή της αυξάνεται λόγω παραγωγής μεταβολικών προϊόντων.

Η κινητική της αιθανόλης και στα δύο υποστρώματα δεν παρουσιάζει διαφορές, όμως μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα της γλυκόζης.

Και στα δύο υποστρώματα η κινητική των σακχάρων είναι πανομοιότυπη. Κανένα από τα σάκχαρα δεν καταναλώνεται πλήρως στο τέλος της ζύμωσης.

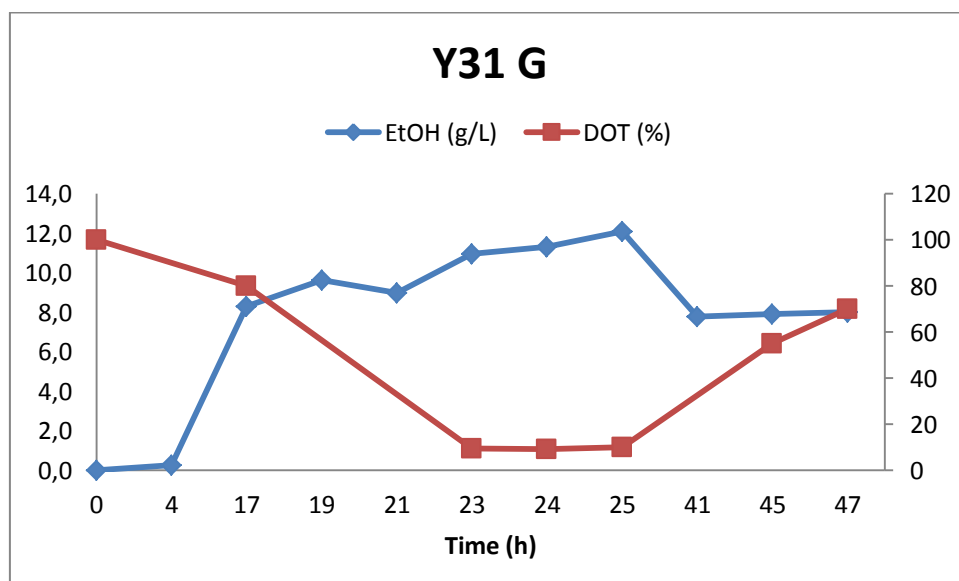
Στην περίπτωση της παραγωγής γλυκερόλης, παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στα δύο υποστρώματα. Στο υπόστρωμα της φρουκτόζης σημειώνεται μεγαλύτερη παραγωγή γλυκερόλης και παρόλο που υπάρχει και στις δύο περιπτώσεις φθίνουσα πορεία, εξακολουθεί να έχει τελική συγκέντρωση μεγαλύτερη απ' ότι στο υπόστρωμα της γλυκόζης.

### 3.1.13. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. zonata* Y31 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ



Διάγραμμα 5: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *K. zonata* Y31.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση γλυκόζης για τον μικροοργανισμό *K. zonata* Y31. Παρατηρείται πως και για αυτόν το μικροοργανισμό, το σάκχαρο του υποστρώματος δεν καταναλώνεται πλήρως, αφήνοντας αζύμωτα 3,6 g/L γλυκόζης κατά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Η βιομάζα παρουσιάζει ανοδική πορεία, όχι όμως με τόσο μεγάλες διακυμάνσεις όσο στα στελέχη της *K. hellenica*.



Διάγραμμα 6: Παραγωγή αιθανόλης και πορεία οξυγόνου κατά την αλκοολική ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκόζης του μ/ου *K. zonata* Y31.



Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η παραγωγή αιθανόλης από τον μικροοργανισμό, καθώς και η πορεία του διαλυτού οξυγόνου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η παραγόμενη αιθανόλη κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης αυξάνεται και κατόπιν παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις. Στο σημείο όμως που το σάκχαρο του μέσου φαίνεται να έχει καταναλωθεί, ο μικροοργανισμός ανακαταναλώνει την αιθανόλη, προς κάλυψη των ενεργειακών του αναγκών.

Η πορεία του διαλυτού οξυγόνου είναι ακριβώς ίδια με του στελέχους *K. hellenica* Y8.

**Πίνακας 11:** Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του *μ/ου Kazachstania zonata* Y31 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y31, <i>Glc</i> <sub>0</sub> ~30g/L	Time (h)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (%, w/w)	iPs/X (%, w/w)
a	25	2,6	26,2	12,1	1,7	2,5	6,8
b	47	3,2	26,4	8,0	1,7	4,5	7,5

Η μέγιστη τιμή της αιθανόλης είναι 12,1 g/L και σημειώθηκε στις 25 ώρες ζύμωσης και ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Glc} = 0,40$  g EtOH/g Glc.

Παρατηρείται ακόμη, πως το σάκχαρο καταναλώνεται σχεδόν πλήρως από τον μικροοργανισμό, παραμένοντας μετά τις 17 ώρες ζύμωσης σε σταθερή συγκέντρωση 3,7 g/L.

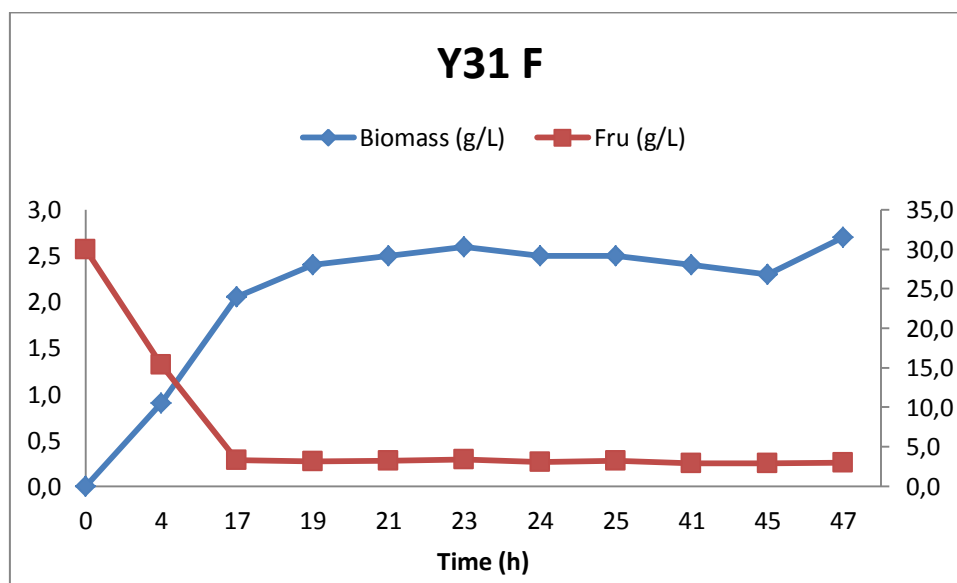
Και στην περίπτωση της βιομάζας, φαίνεται πως στο σημείο που το σάκχαρο έχει καταναλωθεί, η συγκέντρωσή της φθίνει και όταν ο μικροοργανισμός προσαρμοστεί στο περιβάλλον της αιθανόλης, τότε αρχίζουν και παράγονται μεταβολικά προϊόντα και η βιομάζα αυξάνεται φτάνοντας τα 3,2 g/L στο τέλος της ζύμωσης λόγω της ανακατανάλωσης της αιθανόλης. Η αύξηση της βιομάζας ήταν μικρή σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη που μελετήθηκαν.

Η γλυκερόλη παράγεται με ανοδική πορεία από τις πρώτες ώρες της ζύμωσης. Σημειώνει μέγιστο την 19<sup>η</sup> ώρα με συγκέντρωση 2,0 g/L και κατόπιν, ίσως προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών της ζύμης, ανακαταναλώνεται με τελική συγκέντρωση τα 1,7 g/L στο τέλος της ζύμωσης. Στην περίπτωση του στελέχους Y31, σημειώνεται

η μεγαλύτερη παραγωγή γλυκερόλης από όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία.

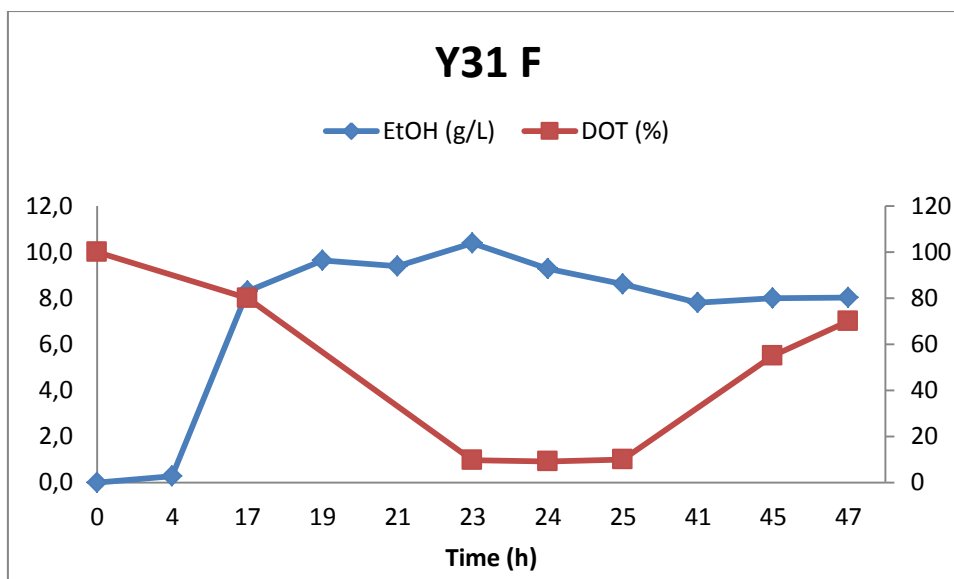
Το ποσοστό λιπιδίων του στελέχους Y31 σημειώνεται στο 4,5% στις 45 ώρες ζύμωσης. Το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών παρουσιάζει μια πτώση στο σημείο που έχει καταναλωθεί το σάκχαρο, πιθανώς προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών του μικροοργανισμού και στο τέλος της ζύμωσης φτάνει σε ποσοστό 7,5%. Το στέλεχος αυτό παράγει περισσότερους ενδοπολυσακχαρίτες απ' όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν.

### 3.1.14. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. zonata* Y31 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ



Διάγραμμα 7: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση φρουκτόζης από τον μ/ο *K.zonata* Y31.

Κατ' αντιστοιχία με την προηγούμενη περίπτωση, έτσι και στο υπόστρωμα της φρουκτόζης παρατηρείται πως το σάκχαρο δεν καταναλώνεται πλήρως, αφήνοντας αζύμωτα 3,0 g/L φρουκτόζης κατά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Η βιομάζα παρουσιάζει ανοδική πορεία, η οποία στο μέγιστο σημείο φτάνει τα 2,7 g/L.



Διάγραμμα 8: Παραγωγή αιθανόλης και πορεία οξυγόνου κατά την αλκοολική ζύμωση σε υπόστρωμα φρουκτόζης του μ/ου *K. zonata* Y31.

Η κινητική της αιθανόλης είναι αντίστοιχη με αυτή του υποστρώματος γλυκόζης. Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης 10,4 g/L παρουσιάστηκε την 23<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης και ο συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Fru} = 0,34$  g EtOH/g Fru.

Η πορεία του διαλυτού οξυγόνου είναι ακριβώς ίδια με του στελέχους *K. hellenica* Y8.

Πίνακας 12: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania zonata* Y31 σε υπόστρωμα φρουκτόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y31, Fru <sub>0</sub> ~30g/L	Time (h)	X (g/L)	Fru cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (% w/w)	iPs/X (% w/w)
a,b	23	2,6	26,6	10,4	1,7	2,9	6,3

Στην περίπτωση του υποστρώματος της φρουκτόζης, η βιομάζα και η αιθανόλη παρουσιάζουν μέγιστο ταυρόχρονα, την 23<sup>η</sup> ώρα ζύμωσης. Βέβαια, η βιομάζα δεν αυξήθηκε παρ' όλο που ο μικροοργανισμός ανακατανάλωσε την αιθανόλη προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών.

Η γλυκερόλη παράγεται από τις πρώτες ώρες της ζύμωσης και παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση 2,0 g/L στις 24 ώρες. Κατόπιν φαίνεται να ανακαταναλώνεται

από το στέλεχος προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών. Και σε αυτή τη περίπτωση σημειώθηκε πολύ μεγάλη παραγωγή γλυκερόλης από όλα τα υπόλοιπα στελέχη.

Το ποσοστό των λιπιδίων σημειώθηκε 4,2% στις 45 ώρες ζύμωσης. Οι ενδοπολυσακχαρίτες είχαν ανοδική πορεία με ποσοστό 7,5% στο τέλος της ζύμωσης.

### 3.1.15. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *K. zonata* Y31 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Στην περίπτωση της βιομάζας και στα δύο υποστρώματα δεν παρατηρούνται μεγάλες διακυμάνσεις στη συγκέντρωσή της, ακόμα και όταν ο μικροοργανισμός ανακαταναλώνει την αιθανόλη.

Όσον αφορά την παραγωγή αιθανόλης, είναι σαφές ότι στο υπόστρωμα της γλυκόζης η μέγιστη συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη.

Η κινητική των σακχάρων και στα δύο υποστρώματα είναι πανομοιότυπη. Κανένα δεν καταναλώνεται πλήρως από το μικροοργανισμό.

Η μέγιστη συγκέντρωση γλυκερόλης στο υπόστρωμα της γλυκόζης εμφανίζεται κατά 5 ώρες νωρίτερα απ' ότι στο υπόστρωμα της φρουκτόζης. Επιπλέον στην πρώτη περίπτωση η τελική συγκέντρωση γλυκερόλης είναι μεγαλύτερη.

### 3.1.16. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. zonata* Y32 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ

Πίνακας 13: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania zonata* Y32 σε υπόστρωμα φρουκτόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL, t=29±01°C, ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y32, Glc <sub>0</sub> ~30g/L	Time (h)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (% w/w)	iPs/X (% w/w)
a,b	17	4,5	25,9	11,7	0,3	1,3	3,0

Η κινητική του στελέχους Y32 στο υπόστρωμα της γλυκόζης, ακολουθεί την ίδια πορεία με όλα τα προηγούμενα στελέχη που μελετήθηκαν. Η αιθανόλη σημειώνει μέγιστη συγκέντρωση στις 17 ώρες ζύμωσης στα 11,7 g/L και στη συνέχεια αρχίζει

να ανακαταναλώνεται από το μικροοργανισμό έτσι ώστε μετά το πέρας της ζύμωσης να σταθεροποιηθεί στα 8,2 g/L. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Glc} = 0,39$  g EtOH/g Glc.

Η βιομάζα φαίνεται να μη σημειώνει αξιοσημείωτη άνοδο, παρόλο που υπάρχει ανακατανάλωση αιθανόλης από το μικροοργανισμό.

Η γλυκερόλη παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση την 21<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης με 0,6 g/L και κατόπιν όταν το σάκχαρο εξαντλείται απ' το μέσο, αρχίζει και ανακαταναλώνεται προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών. Στο τέλος της ζύμωσης έχει σχεδόν εξαντληθεί. Να σημειωθεί πως το στέλεχος αυτό δίνει την μικρότερη συγκέντρωση γλυκερόλης από όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν.

Οι ενδοπολυσακχαρίτες έχουν ανοδική πορεία καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Παρουσιάζουν μέγιστο την 41<sup>η</sup> ώρα με ποσοστό 8,6%.

Η παραγωγή λιπιδίων είναι σταθερή και δεν παρουσιάζει αυξομειώσεις, με ποσοστό 1,5%.

### 3.1.17. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. zonata* Y32 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ

Πίνακας 14: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania zonata* Y32 σε υπόστρωμα φρουκτόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max.

Strain Y32, <i>Fru</i> <sub>0-30g/L</sub>	Time (h)	X (g/L)	Fru cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)	L/X (%, w/w)	iPs/X (%, w/w)
<b>a</b>	23	3,8	26,6	11,0	0,5	1,4	7,9
<b>b</b>	41	4,9	2,0	9,2	0,2	2,2	6,7

Η κινητική του στελέχους Y32 στο υπόστρωμα της φρουκτόζης, είναι αντίστοιχη με εκείνη του υποστρώματος της γλυκόζης. Η αιθανόλη σημειώνει μέγιστη συγκέντρωση στις 23 ώρες ζύμωσης στα 11,0 g/L και στη συνέχεια αρχίζει να ανακαταναλώνεται από το μικροοργανισμό έτσι ώστε μετά το πέρας της ζύμωσης να σταθεροποιηθεί στα 8,7 g/L. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Fru} = 0,37$  g EtOH/g Fru.

Η πορεία της βιομάζας είναι σε αντιστοιχία με των υπολοίπων στελεχών. Παρατηρείται πτώση της συγκέντρωσής της στο μέγιστο της αιθανόλης και στη συνέχεια, μετά την προσαρμογή του μικροοργανισμού, αύξηση λόγω των αυξανόμενων μεταβολικών προϊόντων. Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας τα 4,9 g/L που σημειώθηκαν την 41<sup>η</sup> ώρα ζύμωσης.

Το ποσοστό λιπιδίων του στελέχους Y32 σημειώνεται στο 2,2% στις 45 ώρες ζύμωσης. Το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών παρουσιάζει μια πτώση στο σημείο που έχει καταναλωθεί το σάκχαρο, πιθανώς προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών του μικροοργανισμού και στο τέλος της ζύμωσης φτάνει σε ποσοστό 6,7%.

### **3.1.18. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Y32 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ**

Η κινητική της βιομάζας του στελέχους Y32 ακολουθεί την ίδια πορεία και στα δύο υποστρώματα, με μεγαλύτερη συγκέντρωση να παρουσιάζεται στο υπόστρωμα της φρουκτόζης.

Στην περίπτωση της αιθανόλης παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο υπόστρωμα της γλυκόζης, αλλά και παραγωγή της μέγιστης συγκέντρωσής της νωρίτερα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Το στέλεχος Y32 φαίνεται να καταναλώνει πιο γρήγορα τη φρουκτόζη απ' ότι τη γλυκόζη, αλλά η τελική συγκέντρωση και των δύο σακχάρων είναι όμοια.

Η πορεία της συγκέντρωσης την γλυκερόλης και στα δύο υποστρώματα είναι παρόμοια. Η μέγιστη συγκέντρωση είναι η ίδια και στις δύο περιπτώσεις και παρατηρείται στο ίδιο χρονικό σημείο της ζύμωσης. Αυτό το στέλεχος έχει τη μικρότερη παραγωγή γλυκερόλης από όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν.

### 3.2. ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Kazachstania hellenica* και *Kazachstania zonata* ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΕ ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΟΥ 100 g/L

Από τα 6 στελέχη που μελετήθηκαν στο προηγούμενο πείραμα, επιλέχθηκαν 2 πιο αντιπροσωπευτικά στις ζυμώσεις και με μεγαλύτερο οινοποιητικό ενδιαφέρον, το Y8 από το είδος *Kazachstania hellenica* και το Y31 από το είδος *Kazachstania zonata*.

#### 3.2.1. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. hellenica* Y8 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ

Πίνακας 15: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania hellenica* Y8 σε υπόστρωμα φρουκτόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max, c= μέγιστη κατανάλωση γλυκόζης.

Strain Y8, $Glc_0 \sim 100\text{g/L}$	Time (h)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)
a	24	3,5	37,4	14,5	1,2
b	72	7,6	45,3	12,2	1,5
c	120	2,9	51,0	11,0	1,3

Το στέλεχος Y8 ξεκινάει τη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 99,4 g/L. Από το πρώτο 24ωρο η συγκέντρωση αρχίζει και μειώνεται σταδιακά για να καταλήξει στο τέλος της ζύμωσης, η οποία είχε διάρκεια 120 ώρες, στα 48,4 g/L. Θεωρητικά το σάκχαρο δεν καταναλώνεται πλήρως λόγω παρεμπόδισης του υποστρώματος. Η παραγόμενη αιθανόλη σημειώνει μέγιστο στις 24 ώρες της ζύμωσης με συγκέντρωση 14,5 g/L και κατόπιν ανακαταναλώνεται από τη ζύμη για να καταλήξει στο τέλος σε σταθερή συγκέντρωση 11,0 g/L. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Glc} = 0,15 \text{ g EtOH/ g Glc}$ .

Η βιομάζα παρουσιάζει ανοδική πορεία τα 3 πρώτα 24ωρα της ζύμωσης, σημειώνοντας μέγιστη συγκέντρωση 7,6 g/L στις 72 ώρες και κατόπιν έχει μια έντονη πτώση, καταλήγοντας στο τέλος της ζύμωσης στα 2,9 g/L. Σε αυτό το σημείο είναι σαφές ότι επισυμβαίνει αυτόλυση των κυττάρων.

Η παραγόμενη γλυκερόλη παραμένει θεωρητικά σταθερή από το πρώτο 24ωρο, σημειώνοντας μέγιστη συγκέντρωση 1,5 g/L στις 72 ώρες.

Στο τέλος της ζύμωσης μετρήθηκε ακόμη το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών, που ανέρχεται σε 12,3%.

### 3.2.2. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. hellenica* Y8 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ

Πίνακας 16: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania hellenica* Y8 σε υπόστρωμα φρουκτόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max, c= μέγιστη κατανάλωση φρουκτόζης.

Strain Y8, $Fru_0 \sim 100\text{g/L}$	Time (h)	X (g/L)	Fru cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)
a	48	2,2	26,2	8,3	1,6
b	72	4,0	28,2	8,2	1,8
c	120	1,5	37,0	4,0	1,2

Η αρχική συγκέντρωση της φρουκτόζης είναι 94,6 g/L. Το στέλεχος Y8 φαίνεται να την καταναλώνει μέχρι τα 57,6 g/L στο τέλος της ζύμωσης. Και σε αυτή τη περίπτωση θεωρητικά υπάρχει παρεμπόδιση υποστρώματος στην κατανάλωση του σακχάρου.

Η αιθανόλη σημειώνει μέγιστη συγκέντρωση 8,3 g/L στις 48 ώρες ζύμωσης και κατόπιν ανακαταναλώνεται από τον μικροοργανισμό προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{EtOH/Fru} = 0,08$  g EtOH/ g Fru.

Η πορεία της βιομάζας είναι αντίστοιχη με εκείνη του υποστρώματος της γλυκόζης. Σημειώνει μέγιστη συγκέντρωση 4,0 g/L στις 72 ώρες ζύμωσης και κατόπιν μειώνεται για να καταλήξει σταθερή στα 1,5 g/L στο τέλος της ζύμωσης. Και εδώ παρατηρείται αυτόλυση κυττάρων.

Η γλυκερόλη έχει ελαφρώς ανοδική πορεία μέχρι τις 72 ώρες ζύμωσης όπου παρουσιάζει και μέγιστο 1,8 g/L και στη συνέχεια ανακαταναλώνεται πιθανώς προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών του μικροοργανισμού. Στο τέλος της ζύμωσης έχει συγκέντρωση 1,2 g/L.

Στο τέλος της ζύμωσης μετρήθηκε ακόμη το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών, που ανέρχεται σε 8,9%.



### 3.2.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *K. hellenica* Y8 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Συγκρίνοντας τα δύο υποστρώματα, παρατηρείται πως στο υπόστρωμα της φρουκτόζης η βιομάζα σημειώνει μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η κινητική και στις δύο περιπτώσεις ακολουθεί την ίδια πορεία. Είναι σαφές πως επισυμβαίνει αυτόλυση κυττάρων.

Είναι φανερό ότι στην περίπτωση της αιθανόλης, μεγαλύτερη παραγωγή παρατηρείται στο υπόστρωμα της γλυκόζης.

Παρ' όλο που και τα δύο σάκχαρα δεν καταναλώνονται πλήρως από το στέλεχος Y8, μεγαλύτερη κατανάλωση έχει η γλυκόζη.

Περισσότερη παραγωγή γλυκερόλης παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα της φρουκτόζης. Όμως η συγκέντρωσή της στο τέλος της ζύμωσης και στα δύο υποστρώματα είναι παρόμοια.

### 3.2.4. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. zonata* Y31 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΛΥΚΟΖΗ

Πίνακας 17: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania zonata* Y31 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max, c= μέγιστη κατανάλωση γλυκόζης.

Strain Y31, <i>Glc</i> <sub>0</sub> ~100g/L	Time (h)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)
a,b	72	5,8	73,6	17,6	6,3
c	120	2,1	78,2	16,6	6,9

Το στέλεχος Y31 φαίνεται να καταναλώνει περισσότερη γλυκόζη απ' ότι το στέλεχος Y8. Στο τέλος της ζύμωσης έχουν παραμείνει αζύμωτα 21,2 g/L γλυκόζης. Παρατηρείται και εδώ παρεμπόδιση εκ του υποστρώματος.

Η παραγόμενη αιθανόλη παρουσιάζει μέγιστο στις 72 ώρες ζύμωσης με συγκέντρωση 17,6 g/L και κατόπιν φαίνεται να ανακαταναλώνεται προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών του μικροοργανισμού. Η τελική συγκέντρωση ανέρχεται σε 16,6 /L. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{\text{EtOH}/\text{Glc}} = 0,18 \text{ g EtOH/ g Glc}$ .

Η βιομάζα παρουσιάζει ανοδική πορεία τα 3 πρώτα 24ωρα της ζύμωσης, σημειώνοντας μέγιστη συγκέντρωση 5,8 g/L στις 72 ώρες και κατόπιν έχει μια έντονη πτώση, καταλήγοντας στο τέλος της ζύμωσης στα 2,1 g/L. Παρατηρείται και εδώ αυτόλυση των κυττάρων.

Και η γλυκερόλη παρουσιάζει ανοδική πορεία, φτάνοντας σε μέγιστη συγκέντρωση 6,9 g/L στο τέλος της ζύμωσης.

Στο τέλος της ζύμωσης μετρήθηκε ακόμη το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών, που ανέρχεται σε 14%.

### 3.2.5. ΣΤΕΛΕΧΟΣ *K. zonata* Y31 ΜΕ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ

Πίνακας 18: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *Kazachstania zonata* Y31 σε υπόστρωμα φρουκτόζης υπό αερόβιες συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250mL,  $t=29\pm 01^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση 190rpm. Όπου a= EtOH max, b= X max, c= μέγιστη κατανάλωση φρουκτόζης.

Strain Y31, <i>Fru</i> <sub>0</sub> ~100g/L	Time (h)	X (g/L)	Fru cons (g/L)	EtOH (g/L)	Glycerol (g/L)
a,b	72	7,4	58,5	16,2	6,6
c	120	2,2	63,6	14,5	6,8

Η αρχική συγκέντρωση της φρουκτόζης είναι 94,6 g/L. Το στέλεχος Y31 φαίνεται να την καταναλώνει μέχρι τα 31,0 g/L στο τέλος της ζύμωσης. Και σε αυτή τη περίπτωση θεωρητικά υπάρχει παρεμπόδιση υποστρώματος στην κατανάλωση του σακχάρου.

Η αιθανόλη σημειώνει μέγιστη συγκέντρωση 16,2 g/L στις 72 ώρες ζύμωσης και κατόπιν ανακαταναλώνεται από τον μικροοργανισμό προς κάλυψη ενεργειακών αναγκών. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι  $Y_{\text{EtOH}/\text{Fru}} = 0,17 \text{ g EtOH/ g Fru}$ .

Η πορεία της βιομάζας είναι και σ' αυτή τη περίπτωση ανοδική. Σημειώνει μέγιστη συγκέντρωση 7,4 g/L στις 72 ώρες ζύμωσης και έπειτα φθίνει για να καταλήξει στο τέλος της ζύμωσης στα 2,2 g/L λόγω αυτόλυσης κυττάρων κατά την ανακατανάλωση της αιθανόλης.

Η γλυκερόλη φαίνεται να αυξάνει συνεχώς συγκέντρωση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, για να καταλήξει στο τέλος στη μέγιστη που είναι 6,8 g/L.

### **3.2.6. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Y31 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ**

Συγκρίνοντας τα δύο υποστρώματα, παρατηρείται πως σε εκείνο της φρουκτόζης η βιομάζα παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στο μέγιστο, όμως στο τέλος της ζύμωσης οι συγκεντρώσεις είναι όμοιες. Και στις δύο περιπτώσεις επισυμβαίνει αυτόλυση κυττάρων λόγω ανακατανάλωσης της αιθανόλης.

Είναι φανερό πως η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης από το στέλεχος Y31 είναι μεγαλύτερη στο υπόστρωμα της γλυκόζης.

Η κινητική των σακχάρων είναι όμοια, είναι όμως σαφές ότι τη γλυκόζη έχει μεγαλύτερη κατανάλωση από το στέλεχος Y31 απ' ότι η φρουκτόζη. Και στις δύο περιπτώσεις το σάκχαρο δεν καταναλώνεται πλήρως, πιθανώς από παρεμπόδιση του υποστρώματος.

Η παραγωγή γλυκερόλης δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές στα δύο υποστρώματα. Η τελική της συγκέντρωση κατά το πέρας της ζύμωσης είναι η ίδια.

### 3.3. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΗΤΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ (GC-FID SPME)

Στην συγκεκριμένη ανάλυση έλαβαν μέρος τα στελέχη *K. hellenica* Y8, *K. hellenica* Y58 και *K. zonata* Y31 και στα δύο υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης.

Ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι εξής ενώσεις:

ethyl-2-methyl butyrate	φρουτώδες, τροπικά φρούτα
hexyl aceate	βοτανικό, γρασίδι, φρουτώδες, μήλο, αχλάδι
ethyl caprylate (ethyl octanoate)	οσμές ζύμης, γαλακτοκομικά
linalool	ανθικό, τριαντάφυλλο, φρουτώδες, πορτοκάλι
ethyl heptanoate (ethyl heptylate)	φρουτώδες, ανανάς, μπανάνα, μούρο

Παρατηρήθηκε πως και στα τρία στελέχη ανιχνεύτηκαν οι παραπάνω πτητικές ενώσεις, με μόνη εξαίρεση το στέλεχος Y58 στο οποίο δεν ανιχνεύτηκε η ένωση ethyl heptanoate (ethyl heptylate).

## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε ο μικροοργανισμός *Kazachstania* σε επίπεδο αλκοολικής ζύμωσης. Χρησιμοποιήθηκαν στελέχη από το είδος *Kazachstania hellenica* και *Kazachstania zonata*. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε υποστρώματα με περίσσεια άνθρακα. Το πρώτο πείραμα διεξήχθη σε υπόστρωμα 30g/L γλυκόζης και 30g/L φρουκτόζης. Στο δεύτερο πείραμα οι αρχικές συγκεντρώσεις των δύο σακχάρων ήταν 100g/L. Με τη βοήθεια της HPLC έγινε καταγραφή των καταναλωθέντων σακχάρων, της παραγόμενης αιθανόλης και γλυκερόλης, καθώς και του ενδοκυτταρικού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών που παράγαν οι μικροοργανισμοί. Στο τέλος του δεύτερου πειράματος ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι πτητικές ενώσεις που παράγει ο μικροοργανισμός σε τρία στελέχη με τη μέθοδο GC-FID SPME.

Πρώτο και κύριο συμπέρασμα είναι πως ο μικροοργανισμός *Kazachstania* μπορεί να χαρακτηριστεί ως Crabtree θετικός, εφόσον κατά τη διάρκεια της ζύμωσής του, υπό αερόβιες συνθήκες, σε σακχαρούχο υπόστρωμα με περίσσεια γλυκόζης και φρουκτόζης, παράγει αιθανόλη. Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως οινοποιητική ζύμη καθώς δίνει ικανή ποσότητα αιθανόλης και γλυκερόλης, καθώς επίσης καταναλώνει σε αρκετά μεγάλο βαθμό το σάκχαρο του υποστρώματος. Επιπλέον, παράγει πτητικές ενώσεις οι οποίες είναι ικανές να προσδώσουν άρωμα σε έναν παραγόμενο οίνο.

Από την πορεία των ζυμώσεων όλων των στελεχώς, ο μικροοργανισμός πιθανώς ανακαταναλώνει τις διαθέσιμες αποθησαυριστικές ουσίες (λιπίδια, ενδοπολυσακχαρίτες) για την κάλυψη ενεργειακών αναγκών. Στο σημείο της ζύμωσης που η αιθανόλη ανακαταναλώνεται, τα λιπίδια και οι ενδοπολυσακχαρίτες αυξάνονται εφόσον ο μεταβολισμός του μικροοργανισμού προσαρμόστηκε στο αλκοολικό περιβάλλον.

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης σε υπόστρωμα γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης 30 g/L ήταν του στελέχους Y59 του είδους *Kazachstania hellenica*. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης σε

υπόστρωμα φρουκτόζης αρχικής συγκέντρωσης 30 g/L ήταν των στελεχών Y8, Y58 και Y60 του είδους *Kazachstania hellenica*.

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης σε υπόστρωμα γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης 100 g/L ήταν του στελέχους Y31 του είδους *Kazachstania zonata*. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης σε υπόστρωμα φρουκτόζης αρχικής συγκέντρωσης 100 g/L ήταν επίσης του στελέχους Y31 του είδους *Kazachstania zonata*.

Μερική ανακατανάλωση αιθανόλης λόγω αερόβιων συνθηκών υπήρχε και στα δύο πειράματα, η οποία όμως τις περισσότερες φορές δεν ακολουθείται από πολύ υψηλή αύξηση της βιομάζας των μικροοργανισμών.

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενης γλυκερόλης σε όλα τα υποστρώματα και σε όλες τις αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρου, ήταν του στελέχους Y31 του είδους *Kazachstania zonata*. Γενικά η γλυκερόλη παράγεται με τον ίδιο τρόπο και στα δύο υποστρώματα.

Στο πρώτο πείραμα που η αρχική συγκέντρωση σακχάρου του υποστρώματος ήταν 30 g/L, παρατηρήθηκε πως η συγκέντρωση της βιομάζας των μικροοργανισμών ήταν μεγαλύτερη στα υποστρώματα γλυκόζης. Επιπλέον τα ποσοστά του ενδοκυτταρικού λίπους και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ήταν σχετικά χαμηλά και στα δύο υποστρώματα.

Στο δεύτερο πείραμα που η αρχική συγκέντρωση του σακχάρου του υποστρώματος ήταν 100 g/L, παρατηρήθηκε πως γίνεται κατανάλωση σακχάρου χωρίς περεταίρω παραγωγή αλκοόλης και γλυκερόλης. Ακόμη, σε όλα τα στελέχη παρατηρείται αυτόλυση κυττάρων.

Ακολουθεί ενδεικτικά ένας πίνακας με διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα κάποιων παραμέτρων της αλκοολικής ζύμωσης από διάφορους μικροοργανισμούς, αν και τα δεδομένα για τα στελέχη *Kazachstania* είναι πολύ περιορισμένα σε επίπεδο αλκοολικής ζύμωσης.

Yeast strains	Culture type	Substrate	EtOH (g/L)	YEtOH/S (g/g)	YEtOH (g/L/h)	X (g/L)	Glycerol (g/L)	L (g/L)	Y iPs (%)	Ref
<i>Sac. cerevisiae</i> A2	bioreactors	Glucose	-	0,38	-	-	-	-	-	A. Hagman et al.
<i>Sac. cerevisiae</i> A1	bioreactors	Glucose	-	0,39	-	-	-	-	-	A. Hagman et al.
<i>Kaz. servazzii</i>	bioreactors	Glucose	-	0,33	-	-	-	-	-	A. Hagman et al.
<i>Kaz. lodderae</i> A2	bioreactors	Glucose	-	0,31	-	-	-	-	-	A. Hagman et al.
<i>Kaz. lodderae</i> A1	bioreactors	Glucose	-	0,34	-	-	-	-	-	A. Hagman et al.
<i>Kaz. exiguus</i>	bioreactors	Glucose	-	0,43	-	-	-	-	-	A. Hagman et al.
<i>Kaz. Barnettii</i>	bioreactors	Glucose	-	0,36	-	-	-	-	-	A. Hagman et al.
<i>Candida diddensiae</i> NRRL Y-7589	shake flasks	Glucose	-	-	-	7,9	-	0,48	-	S. Papanikolaou et al.
<i>Candida tropicalis</i> NRRL Y-12968	shake flasks	Glucose	-	-	-	7,3	-	0,44	-	S. Papanikolaou et al.
<i>Pichia ciferrii</i> NRRL Y-1031	shake flasks	Glucose	-	-	-	7,8	-	0,55	-	S. Papanikolaou et al.
<i>Candida oleophila</i> NRRL Y-1613	shake flasks	Glucose	-	-	-	5,2	-	0,52	-	S. Papanikolaou et al.
<i>Kaz. hellenica</i> Y8	shake flasks	Glucose	12,4	0,41	0,50	5,0	1,0	0,16	4,4	Present study
<i>Kaz. hellenica</i> Y8	shake flasks	Fructose	12,3	0,41	0,53	4,1	1,2	0,22	7,5	Present study
<i>Kaz. hellenica</i> Y58	shake flasks	Glucose	12,1	0,40	0,71	5,6	0,9	0,20	4,5	Present study
<i>Kaz. hellenica</i> Y58	shake flasks	Fructose	12,3	0,41	0,72	3,7	1,2	0,06	6,2	Present study
<i>Kaz. hellenica</i> Y59	shake flasks	Glucose	12,7	0,42	0,75	5,3	1,0	0,05	4,9	Present study
<i>Kaz. hellenica</i> Y59	shake flasks	Fructose	11,8	0,39	0,51	3,7	1,1	0,20	6,0	Present study
<i>Kaz. hellenica</i> Y60	shake flasks	Glucose	12,4	0,41	0,73	5,2	0,9	0,12	3,8	Present study
<i>Kaz. hellenica</i> Y60	shake flasks	Fructose	12,3	0,41	0,72	3,9	1,0	0,11	6,1	Present study
<i>Kaz. zonata</i> Y31	shake flasks	Glucose	12,1	0,40	0,48	3,2	2,0	0,11	7,5	Present study
<i>Kaz. zonata</i> Y31	shake flasks	Fructose	10,4	0,35	0,45	2,6	2,0	0,11	7,5	Present study
<i>Kaz. zonata</i> Y32	shake flasks	Glucose	11,7	0,39	0,69	4,5	0,6	0,07	8,6	Present study
<i>Kaz. zonata</i> Y32	shake flasks	Fructose	11,0	0,37	0,48	4,9	0,6	0,10	8,1	Present study

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως και στην περίπτωση του πειράματος του A. Hagman, οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν είχαν μέγιστους συντελεστές απόδοσης  $Y_{EtOH/S}$  παρόμοιους με αυτούς των στελεχών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Μάλιστα, ο *Saccharomyces cerevisiae* εμφανίζει μικρότερο συντελεστή απόδοσης σε σχέση με τα στελέχη της *Kazachstania hellenica*.

Στο πείραμα του S. Papanikolaou, οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν παρουσίασαν μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας αλλά και μεγαλύτερη λιποσυσσώρευση. Ο μικροοργανισμός *Kazachstania* δεν παρήγαγε μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους και έτσι διαπιστώνεται ότι δεν ανήκει στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

### ΔΙΕΘΝΗΣ

1. Bisson, L.F., Waterhouse, L.A., Ebeler, S.F., Walker, M.A. & Lapsley J.T., The present and future of the international wine industry, 2002, 696-699.
2. Bizaj Etjen, Cordente1 Antonio G., Bellon Jennifer R., Raspor Peter, Curtin Chris D., Pretorius Isak S., A breeding strategy to harness flavor diversity of *Saccharomyces* interspecific hybrids and minimize hydrogen sulfide production, Cletus Kurtzman, 2012.
3. Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. & Kunkee, R.E., Principles and practices of winemaking, 1996. Chapman & Hall, New York.
4. Durao Vieira Erika, Andrietta Maria da Graca Stupiello, Andrietta Silvion Roberto, Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy, 2013.
5. Graeme M., Walker and Nia A. White, Introduction to Fungal Physiology, John Wiley & Sons Ltd, June 2011.
6. Hagman Arne, Sall Torbjorn, Compagno Concetta, Piskur Jure, Yeast “Make-Accumulate-Consume” Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process than Predates the Whole Genome Duplication, PLOS ONE, July 2013.
7. Jackson, R.S., Wine science principles and applications, Academic Press.
8. Messias Miranda Junior, Margareth Batistote and Jose Roberto Ermandes, Glucose and Fructose Fermentation by wine yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources, 2012.
9. Nisiotou Aspasia A. and Nychas George-John E., *Kazachstania hellenica* sp. nov., a novel ascomycetous yeast from a Botrytis-affected grapemust fermentation, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2008), 58, 1263–1267.
10. Papanikolaou S., Aggelis G., Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2011, 113, 1031-1051.



11. Papanikolaou S., Aggelis G., *Yarrowia lipolytica*: a model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010,112,639-654.
12. Pretorius Isak S., Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking yeast, 2000, 675-729.
13. Pretorius Isak S., Florian F. Baner, Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains, 2002.
14. Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., *Handbook of Enology Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
15. Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., *Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
16. Ribereau-Gayon P., *Les composés phénoliques du raisin et du vin*, Institute National de la Recherche Agronomique de Paris, 1964.
17. Sarris D., Papanikolaou S., Biotechnological production of ethanol: Biochemistry processes and technologies. *Eng. Life Sci.*, 2016, 16, 307-329.
18. Sarris D., Kotseridis Y., Linga M., Galiotou-Panayotou M., Papanikolaou S., Enhanced ethanol production, volatile compound biosynthesis and fungicide removal during growth of a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* strain on enriched pasteurized grape musts, *Eng. Life Sci.*, 2009, 29-37.
19. S. Afr., Yeast and its importance in wine aroma – a review, *J. Enol Vitic*: 97-129.
20. Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P.J., Stanley G.A., The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Applied Microbiology*, July 2010, 13-24.
21. Walker, *Yeast physiology and biotechnology*, 1998.

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ

22. Καλλίθρακα Σ., Σημειώσεις Μαθήματος Χημεία-Ανάλυση Γλεύκους και Οίνου, ΓΠΑ, 2015.
23. Παπανικολάου Σ., Σημειώσεις Μαθήματος Μικροβιολογία Οίνου, ΓΠΑ 2015.
24. Σουφλερός Ευάγγελος, Οινολογία: Επιστήμη και Τεχνογνωσία Τόμος 1, 2009.

## ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

1. [https://en.wikipedia.org/wiki/Flame\\_ionization\\_detector](https://en.wikipedia.org/wiki/Flame_ionization_detector)
2. <http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/diversity.html>
3. [www.thegoodscentcompany.com](http://www.thegoodscentcompany.com)



