

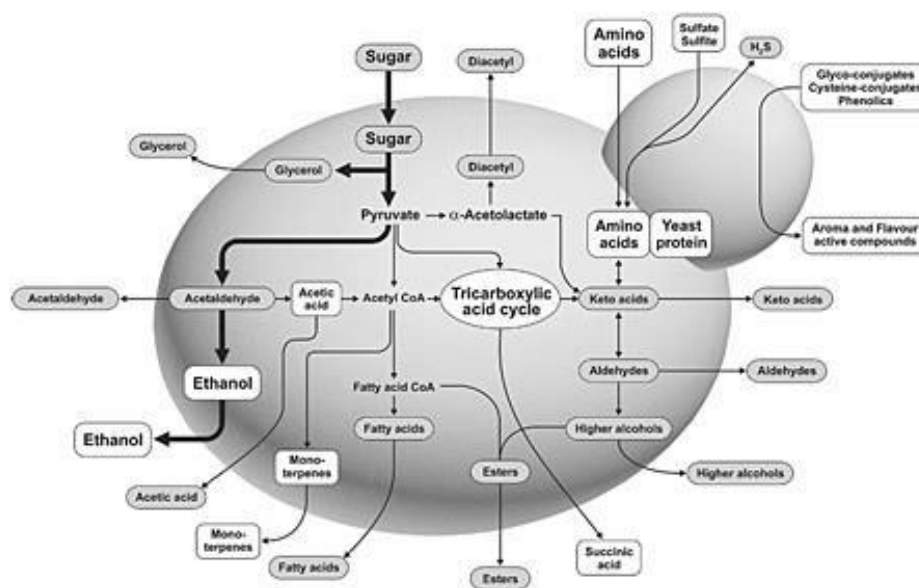
# Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήματα: Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου και  
Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων  
Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών  
«Αμπελουργία – Οινολογία»

## Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μελέτη της παραγωγής αιθανόλης κατά την αύξηση άγριων ζυμών σε  
σακχαρούχα υποστρώματα υπό αερόβιες συνθήκες και ο έλεγχος της  
δυνατότητας χρήσης των στελεχών αυτών στη βιομηχανία οίνου



Δήμητρα Ε. Αντωνάτου

Αθήνα 2017

Επιβλέπων καθηγητής: κ. Παπανικολάου Σεραφείμ

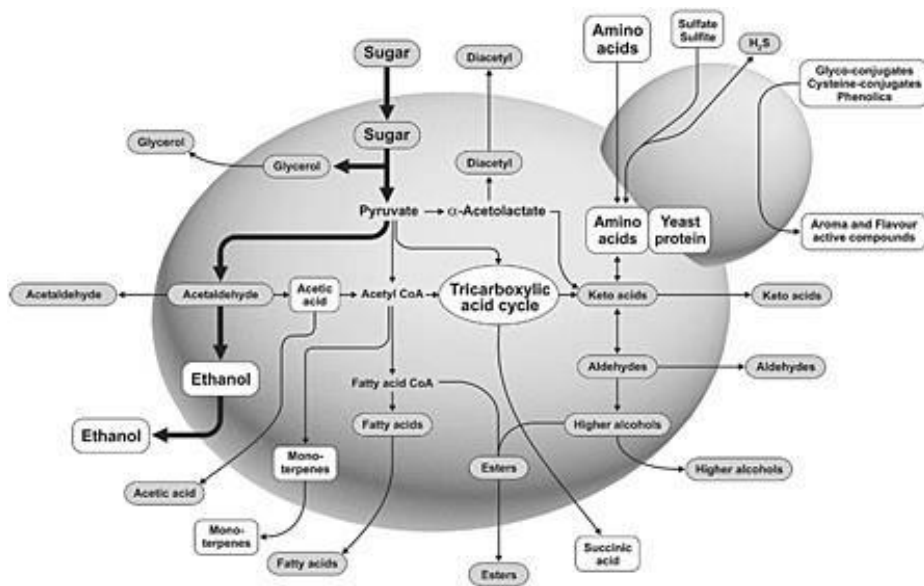
# Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήματα: Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου και  
Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων  
Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών  
«Αμπελουργία – Οινολογία»

## Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μελέτη της παραγωγής αιθανόλης κατά την αύξηση άγριων ζυμών σε  
σακχαρούχα υποστρώματα υπό αερόβιες συνθήκες και ο έλεγχος της  
δυνατότητας χρήσης των στελεχών αυτών στη βιομηχανία οίνου



Δήμητρα Ε. Αντωνάτου

Αθήνα 2017

Επιβλέπων καθηγητής: κ. Παπανικολάου Σεραφείμ

# **Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

## **Μεταπτυχιακή Διατριβή**

**Μελέτη της παραγωγής αιθανόλης κατά την αύξηση  
άγριων ζυμών σε σακχαρούχα υποστρώματα υπό  
αερόβιες συνθήκες και ο έλεγχος της δυνατότητας  
χρήσης των στελεχών αυτών στη βιομηχανία οίνου**

**Δήμητρα Ε. Αντωνάτου**

**Επιβλέπων καθηγητής: κ. Παπανικολάου Σεραφείμ**

**Τριμελής επιτροπή**

- 1. κ. Παπανικολάου Σεραφείμ, αναπληρωτής καθηγητής**
- 2. κ. Κουτίνας Απόστολος, επίκουρος καθηγητής**
- 3. κ. Τσαντίλη Ελένη, καθηγήτρια**

**Αθήνα 2017**

## Περίληψη

Ο διεθνής και συνεχόμενος ανταγωνισμός στην αγορά οίνου, σε συνδυασμό με τις απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού για νέα, πολύπλοκα και ενδιαφέροντα προϊόντα, έχουν δημιουργήσει στην επιστήμη της Οινολογίας, νέες προκλήσεις. Η ενασχόληση με αλκοολικές ζυμώσεις χωρίς την παρουσία του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί μία υποσχόμενη απάντηση σε αυτές. Επομένως, είναι σημαντική η διερεύνηση των ειδών των μικροοργανισμών που μπορούν να συμμετάσχουν στη διαδικασία παραγωγής οίνου.

Εκκινώντας από την ικανότητα των μικροοργανισμών να καταβολίσουν συγκεκριμένους υδατάνθρακες, στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, επελέγησαν οκτώ στελέχη, τα οποία ερευνήθηκαν ως προς την ανάπτυξή τους σε συγκεκριμένη ποσότητα σακχάρου και απολύτως αερόβιες συνθήκες. Εν ολίγοις, πρόκειται για τη μελέτη του φαινομένου Crabtree στα στελέχη αυτά. Μετά από δύο σειρές πειραμάτων στις οποίες ακολουθήθηκαν ακριβώς οι ίδιες διεργασίες, προέκυψαν συμπεράσματα ως προς την ικανότητα των μικροοργανισμών να εκτελέσουν αλκοολική ζύμωση στις συνθήκες του πειράματος, αλλά και πολλά άλλα ενδιαφέροντα στοιχεία της ανάπτυξής τους.

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii*, *Candida oleophila*, *Candida tropicalis*, *Metschnikowia pulcherrima* και *Williopsis saturnus* που αποδείχθηκαν θετικοί ως προς το φαινόμενο Crabtree και οι μικροοργανισμοί *Yarrowia lipolytica* και *Pichia ciferrii* που αποδείχθηκαν αρνητικοί. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων το υπόστρωμα αποτελούνταν από γλυκόζη 60g/L και στη δεύτερη συνυπόστρωμα αποτελούμενο από γλυκόζη 30g/L και φρουκτόζη 30g/L. Οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 29°C και σταθερό pH = 6.

**Λέξεις – Κλειδιά:** Αλκοολική ζύμωση, παραγωγή αιθανόλης, φαινόμενο Crabtree, ανακατανάλωση αιθανόλης, παραγωγή ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, παραγωγή μικροβιακού

λίπους

## Abstract

**Thesis title: Ethanol production during the growth of wild yeasts on sugar substrates under aerobic conditions and the examination of their potential use in the Wine Industry**

International and continuous competition in wine market, along with the demands of consumers for new, complex and more interesting products have created new challenges in the science of Enology. Fermentation with non – *Saccharomyces* yeasts, is a promising answer to these challenges. For this cause, it is important to find the yeast strains that can be used in the wine making procedure.

Starting from the ability of microbes to uptake specific hydrocarbons, in this study, eight different yeast strains were examined under aerated conditions, and the same amount of sugars as substrates. In other words this thesis is an investigation of the Crabtree effect for these yeasts. Two different experiments took place and in each one of them, the same procedures were occurred. The conclusions obtained were about the ability of the yeast strains to carry out alcoholic fermentation in these conditions and also many other interesting facts about their metabolic activity.

The yeast strain used were the following: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii*, *Candida oleophila*, *Candida tropicalis*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Williopsis saturnus*, which proved to be Crabtree positive, and *Yarrowia lipolytica* and *Pichia ciferrii*, which proved to be Crabtree negative. Glucose 60,0 g/L was used as substrate in the first experiment and a blend of Glucose 30,0 g/L and Fructose 30,0 g/L in the second. Fermentations performed in 250 mL flasks, containing 50 mL of the culture medium, T=29 °C and the pH was maintained to the value of ~ 6,0.

**Key – Words:** Alcoholic fermentation, ethanol production, Crabtree effect, “make – accumulate – consume” life strategy, intracellular polysaccharides production, microbiological lipids production

*Στον Κωνσταντίνο*

# Ευχαριστίες:

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή, κ. Παπανικολάου Σεραφείμ, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή διατριβή μου στο εργαστήριό του, για την εμπιστοσύνη του, για την επιστημονική καθοδήγηση καθώς και για τη βοήθεια και την κατανόηση που μου έδειξε, όποτε τη χρειάστηκα.

Στη συνέχεια, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της εργασίας μου, τον επίκουρο καθηγητή κ. Κουτίνα Απόστολο και την καθηγήτρια κ. Τσαντίλη Ελένη όλους τους διδάσκοντες του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς και τις κυρίες Προξενιά Νίκη και Καλαντζή Ουρανία.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα και φίλο, κ. Ξενόπουλο Ευάγγελο, για την εξαιρετική συνεργασία, την πολύτιμη καθοδήγηση και την απεριόριστη βοήθειά του.

Ακόμα, ευχαριστώ όλους τους υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου, τόσο για τις επιστημονικές συμβουλές, όσο και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου Ευάγγελο και Ελένη, τα αδέρφια μου Μαριάννα και Δημήτρη, τη γιαγιά μου Δήμητρα και τους φίλους μου, για την υλική και ηθική συμπαράσταση που μου προσφέρουν σε κάθε μου βήμα.

## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη .....	2
Abstract.....	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ .....	11
2.1 Οίνος .....	12
2.1.1 Τα βασικά συστατικά των οίνων:.....	13
2.2 Αιθανόλη.....	16
2.2.1 Αιθανόλη γεωργικής προέλευσης .....	16
2.2.2 Παραγωγή και κατανάλωση αιθανόλης .....	18
2.3 Διαδικασία παραγωγής οίνου .....	18
2.3.1 Λευκή οινοποίηση .....	19
2.3.2 Ερυθρά Οινοποίηση .....	22
2.4 Μεταβολισμός.....	25
2.4.1 Τριφωσφορική αδενοσίνη .....	26
2.5 Ζύμωση .....	26
2.5.1 Η γλυκόλυση Embden – Meyerhof – Parnas .....	27
2.5.2 Η γλυκόλυση Entner – Doudoroff.....	29
2.5.3 Πορεία φωσφορικών πεντοζών .....	30
2.5.4 Γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση .....	31
2.5.5 Μηλικογαλακτική Βιομετατροπή .....	32
2.5.6 Το πυροσταφυλικό οξύ .....	33
2.6 Κυτταρική αναπνοή .....	34
6.1 Ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων .....	34
2.6.2 Περιγραφή του κύκλου Krebs.....	35
2.6.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	37
2.6.4 Μικροβιακό λίπος .....	38



2.7	Μεταβολική ρύθμισή μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής.....	38
2.7.1	Φαινόμενο Crabtree.....	39
2.7.2	Προέλευση του φαινομένου Crabtree .....	40
2.7.3	Φαινόμενο «Σύνθεσης – Συσσώρευσης – Κατανάλωσης» αιθανόλης (Make – Accumulate – Consume Life strategy).....	42
2.7.4	Φαινόμενο Pasteur.....	43
2.7.5	Φαινόμενο Custers .....	44
2.7.6	Φαινόμενο Kluyver .....	44
2.8	Αρωματικές ενώσεις .....	44
2.8.1	Συνεισφορά μικροοργανισμών στο αρωματικό προφίλ.....	47
2.9	Μικροοργανισμοί.....	47
2.9.1	Οι ζυμομύκητες .....	48
2.10	Σκοπός της μελέτης.....	50
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
3.1	Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας .....	52
3.1.1	<i>Candida boidinii</i> .....	52
3.1.2	<i>Candida oleophila</i> .....	52
3.1.3	<i>Candida tropicalis</i> .....	53
3.1.4	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	54
3.1.5	<i>Pichia ciferrii</i> .....	54
3.1.6	<i>Williopsis saturnus</i> .....	55
3.1.7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	56
3.1.8	<i>Yarrowia lipolytica</i> .....	56
3.1.9	Προκαλλιέργεια.....	57
3.1.10	Καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες .....	57
3.2	Αναλύσεις .....	59
3.2.1	Προσδιορισμός ξηράς βιομάζας.....	59

3.2.2 Προσδιορισμός Αιθανόλης – Γλυκόζης – Φρουκτόζης.....	59
3.2.3 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων.....	60
3.2.4 Προσδιορισμός ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών .....	60
3.2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακού λίπους. ....	60
3.2.6 Σύσταση σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους. ....	61
3.2.7 Ποιοτικός προσδιορισμός αρωματικών ενώσεων.....	61
3.3 Αποτελέσματα.....	63
3.3.1 <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	63
3.3.2 <i>Pichia ciferriii</i> .....	63
3.3.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	65
3.3.4 <i>Candida boidinii</i> .....	69
3.3.5 <i>Candida oleophila</i> .....	70
3.3.6 <i>Candida tropicalis</i> .....	72
3.3.7 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	74
3.3.8 <i>Williopsis saturnus</i> .....	76
3.3.9 Ανάλυση ενδοκυτταρικού λίπους.....	77
3.3.10 Ποιοτική ανάλυση αρωματικών συστατικών.....	78
3.4 Συζήτηση.....	79
3.5 Οινολογικό ενδιαφέρον.....	83
4. Βιβλιογραφία .....	85
Διαδικτυακοί τόποι: .....	91

# **1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η ζωή θα μπορούσε να οριστεί ως: «Η αέναος κυκλοφορία ύλης και ενέργειας που καταλύεται από ένζυμα και ρυθμίζεται από μηχανισμούς κληρονομικότητας» ή ως: «Το σύνολο των μηχανισμών διαμέσου των οποίων, εξασφαλίζεται και διατηρείται σταθερό το περιβάλλον στο κύτταρο ή στον οργανισμό». Είναι προφανές πως η ίδια η ζωή βασίζεται σε μικροβιολογικές διεργασίες που εδώ και χιλιάδες χρόνια ο άνθρωπος παρατηρεί, εξερευνά και εκμεταλλεύεται. Από την πρώτη αναφορά παρασκευής άρτου, 8000 χιλιάδες χρόνια πριν από τους κατοίκους της Μεσοποταμίας, ως τη δημοσίευση της ανακάλυψης της διπλής έλικας του DNA από τους Dr. James Watson και Dr. Francis Crick στις 25/04/1953, έχουν μεσολαβήσει τεράστια άλματα στον τρόπο που ο άνθρωπος αντιλαμβάνεται το περιβάλλον. Η μικροβιολογία αναπτύσσεται ως μια εφαρμοσμένη επιστήμη που βρίσκεται στο επίκεντρο της ζωής. Η βιοτεχνολογία ορίζεται ως: «Η ελεγχόμενη χρήση κυττάρων, κυτταρικών και υποκυτταρικών οργανιδίων για την παραγωγή προϊόντων και την παροχή υπηρεσιών. Οι εφαρμογές των δύο αυτών κλάδων είναι τεράστιες και συνεχώς αυξανόμενες. Ενδεικτικά κάποιες από αυτές είναι η Βιομηχανική Μικροβιολογία, η Βιομηχανική Ενζυμολογία, η Βιοχημική Μηχανική, η Μοριακή Βιολογία, η Γενετική Μηχανική κ.α. Στην Οινολογία συγκεκριμένα, πρώτος ο Luis Pasteur υποστήριξε την αξιοπιστία των ζυμομυκήτων στην αλκοολική ζύμωση. Απέδειξε πως η αυθόρμητη ζύμωση των σπασμένων ή γλυκοποιημένων σταφυλών οφείλεται στην ύπαρξη των ζυμών και μάλιστα κατάφερε να απομονώσει και κάποιους από αυτούς. Ακόμα, συνέλαβε την ιδέα πως η ίδια η φύση των ζυμών επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (Rebèreau Gayon et al., 2006). Ο οίνος και η οινοποιητική διαδικασία αποτελούν επομένως, κλάδο της Τεχνολογίας Τροφίμων, η οποία με τη σειρά της, ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των εφαρμογών της Βιομηχανικής Μικροβιολογίας και της Βιοτεχνολογίας. Η μικροβιολογία ως επιστήμη, έχει βελτιώσει κατά πολύ τη ζωή του ανθρώπου και με την περαιτέρω ανάπτυξή της, οδηγείται σε σημαντικές ανακαλύψεις, που καθιστούν ακόμη επιτακτικότερη την ανάγκη, συνεχούς έρευνας.

Στα πλαίσια αυτά αναπτύσσεται και η παρούσα μελέτη, κατά την οποία παρατηρήθηκε και μελετήθηκε η συμπεριφορά επιλεγμένων μικροοργανισμών, σε συγκεκριμένες συνθήκες. Τα αποτελέσματα της εργασίας οδηγούν σε συμπεράσματα που αφορούν πιθανές χρήσεις των μικροοργανισμών αυτών στους διάφορους κλάδους της Βιομηχανικής μικροβιολογίας.

## **2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ**

## 2.1 Οίνος

Ο οίνος αποτελεί ένα από τα πρώτα και πλέον αγαπημένα προϊόντα της γεωργικής παραγωγής. Η καλλιέργεια της αμπέλου, πιο συγκεκριμένα του της αμπέλου Οινοφόρου (*Vitis vinifera*), έχει τις ρίζες της στα βάθη των αιώνων.

Σύμφωνα με έρευνα του Πανεπιστημίου της Πενσυλβάνια ο πρώτος οίνος χρονολογείται στα 5400 – 5000 π.Χ. και εντοπίστηκε στην περιοχή του Ιράν. Οι ερευνητές βάσισαν τα ευρήματά τους στην ανακάλυψη ενός πήλινου δοχείου στα βόρεια της οροσειράς Ζάγκρος, που αντιστοιχούσε στη Νεολιθική περίοδο, την εποχή που οι άνθρωποι έχτισαν εκεί τους πρώτους μόνιμους οικισμούς, άρχισαν να εξημερώνουν φυτά και ζώα και ανέπτυξαν τέχνες όπως ή αγγειοπλαστική. Στο δοχείο πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις μέσω φασματοφωτομετρίας υπερύθρου και υγρής χρωματογραφίας έδειξαν την παρουσία τρυγικού ασβεστίου, που μαζί με άλλα ευρήματα και υποθέσεις, ενίσχυσαν τους ισχυρισμούς αυτούς (McGovern et al, 1996).

Η παρουσία του οίνου είναι συνεχής και στην Ελληνική ιστορία. Κάποιοι ερευνητές ισχυρίζονται πως το πρώτο ίχνος οίνου στην Ελλάδα χρονολογείται μεταξύ του 6<sup>ου</sup> και του 5<sup>ου</sup> π.Χ. αιώνα (Hames G., 2012). Από την περίοδο του Μινωικού και του Μυκηναϊκού πολιτισμού, υπάρχουν αναρίθμητες ενδείξεις της παραγωγής, κατανάλωσης κι εμπορίας οίνου. Οι αρχαίοι Έλληνες αγαπούσαν το κρασί και υπηρετούσαν με πάθος τον θεό του, το Διόνυσο. Σύμφωνα με το μύθο ο Διόνυσος απήχθη από Ετρούσκους πειρατές στο δρόμο του για την Ιταλία. Φανέρωσε όμως, τη θεϊκή του υπόσταση φυτεύοντας ένα αμπέλι που αναρριχήθηκε στο κατάρτι και μετατρέποντας τους πειρατές σε δελφίνια. Η Αριάδνη, κόρη του Μίνωα βασιλιά της Κρήτης και σύζυγος του Διόνυσου, του χάρισε δύο γιους, τον Στάφυλο και τον Οινοπίωνα, καθώς και μία κόρη την Ευάνθη. Η πλούσια εικονογραφία των αγγείων της Αττικής κεραμικής μαρτυρά το εύρος της Διονυσιακής λατρείας. Το δράμα, κορυφαία έκφραση της εποχής, γεννήθηκε από τον Διονυσιακό διθύραμβο. Έντονο διονυσιακό χαρακτήρα είχαν οι πολυάριθμες γιορτές, και κυρίως τα αφιερωμένα στο Διόνυσο «Μικρά» και «Μεγάλα Διονύσια», στα οποία γίνονταν και θεατρικοί αγώνες. Αλλά και τα συμπόσια, ευκαιρία για πνευματικές συζητήσεις και ανταλλαγή ιδεών, είχαν άξονα την εθιμοτυπικά καθορισμένη οινοποσία (<http://greekwinefederation.gr/gr/home/>).

Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης, που αναφέρονται στην περίοδο 2015-2016 η συνολική παραγωγή οίνου στην Ελλάδα

υπολογίζεται στα 2.501.100 hL. Ωστόσο εμφανίζεται μεγάλη μείωση μέσα στα τελευταία χρόνια αφού το 2013 η παραγωγή είχε αγγίξει τα 3.343.330 hL, ενώ 30 χρόνια πριν έφτανε έως και τα 5.025.000 hL (<http://www.minagric.gr/index.php/el/>). Η πτώση αυτή μπορεί να οφείλεται σε πλήθος παραγόντων με πρωτεύοντα την οικονομική κρίση που μαστίζει τη χώρα τα τελευταία χρόνια. Επίσης σημαντικό ρόλο ενδέχεται να έχει διαδραματίσει και η κλιματική αλλαγή, αφού πλέον επικρατούν δυνατές βροχοπτώσεις κατά την περίοδο της ανθοφορίας που εμποδίζουν την καρπώδηση, πολύ υψηλές θερμοκρασίες τον Ιούλιο και ξανά χαμηλές θερμοκρασίες με βροχοπτώσεις από τέλος Αυγούστου, αλλάζουν τη φυσιολογική πορεία της ανάπτυξης της αμπέλου. Επιπλέον οι παράγοντες αυτοί συντελούν στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών όπως πχ ο περονόσπορος και το ωίδιο. Έτσι υποβαθμίζεται τόσο η ποσότητα όσο και η ποιότητα των σταφυλιών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η Ελλάδα είναι μία χώρα με ιδιαίτερη παράδοση στον οίνο, επομένως οι συστηματικές προσπάθειες των παραγωγών και των οινοποιών, συντηρούν τα ελληνικά οινοποιεία. Η εγχώρια παραγωγή είναι κατακερματισμένη μεταξύ πλήθους οινοποιητικών μονάδων. Στην πλειοψηφία, πρόκειται για παραγωγικές μονάδες που ασχολούνται αποκλειστικά με την οινοποίηση. Οι μεγάλες οινοβιομηχανίες αν και ολιγάριθμες, καλύπτουν σημαντικό μέρος της παραγωγής, διαθέτοντας στην πλειοψηφία τους σύγχρονες εγκαταστάσεις και ποικιλία προϊόντων, την οποία ενίοτε συμπληρώνουν με ορισμένα εισαγόμενα. Για να γίνουν τα ελληνικά κρασιά πιο ανταγωνιστικά σε σχέση με εκείνα του εξωτερικού, η νέα τάση είναι η στροφή στις ελληνικές ποικιλίες σταφυλής. Επιπροσθέτως, μία άλλη παράμετρος που ενισχύει τη μοναδικότητα ενός οίνου είναι το αμπελοτόπι (terroir), το οποίο είναι μία σύνθετη έννοια που περιλαμβάνει τόσο το έδαφος και το κλίμα, την επιλογή του κατάλληλου στελέχους ζύμης όσο φυσικά και τον ανθρώπινο παράγοντα. Έτσι, η σύγχρονες πρακτικές κατευθύνονται προς τη χρήση των γηγενών ζυμών είτε κατ' αποκλειστικότητα είτε σε συνδυασμό με σκευάσματα του εμπορίου.

### 2.1.1 Τα βασικά συστατικά των οίνων:

- Σάκχαρα. Τα σάκχαρα χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα αναγωγικά και τα μη αναγωγικά. Τα αναγωγικά διακρίνονται σε ζυμώσιμα (εξόζες) και μη ζυμώσιμα (πεντόζες), ενώ τα μη αναγωγικά είναι κυρίως οι πολυσακχαρίτες των σταφυλιών και των μικροοργανισμών.

Πίνακας 1 Ταξινόμηση των οίνων ως προς την περιεκτικότητά τους σε αζύμωτα σάκχαρα

Χαρακτηρισμός οίνου	Συγκέντρωση Σακχάρων
Ξηρός	<2 (g/L)
Ημίξηρος	2 – 18 (g/L)
Ημίγλυκος	18 – 40 (g/L)
Γλυκός	>40 (g/L)

- Αιθανόλη. Η αιθανόλη προκύπτει από την αλκοολική ζύμωση των ζυμώσιμων σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και επομένως η περιεκτικότητά ενός οίνου σε αιθανόλη είναι άμεσα εξαρτώμενη από τον βαθμό ωρίμανσης των σταφυλιών, δηλαδή από την συγκέντρωσή τους σε σάκχαρα τη στιγμή του τρυγητού. Τα ποσοστά της αιθανόλης κυμαίνονται μεταξύ 10% και 16% vol στους ξηρούς οίνους (Ribéreau-Gayon, et al., 2006), με τους γλυκούς οίνους να έχουν τις υψηλότερες περιεκτικότητες και τους ερυθρούς ξηρούς που προέρχονται από βόρειες χώρες να εμφανίζουν τις χαμηλότερες.
- Οργανικά οξέα. Τα οξέα στον οίνο προέρχονται είτε από την πρώτη ύλη, είτε από διάφορες χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη ζύμωση, αλλά και πιθανές βακτηριακές προσβολές.

Πίνακας 2: Τα σημαντικότερα οργανικά οξέα του σταφυλιού

Οργανικό οξύ Σταφυλιού	Ποσότητα στο γλεύκος	Ποσότητα στον οίνο
Τρυγικό οξύ	2 – 6 (g/L)	1,5 – 2,5 (g/L)
Μηλικό οξύ	2 – 4 (g/L)	1 – 2,5 (g/L)
Κιτρικό οξύ	0,3 – 2,25 (g/L)	0,0 – 1,0 (g/L)
Γλυκονικό οξύ	0,12 (g/L)	0,12 – 2,5 (g/L)
Ασκορβικό οξύ	0,05 – 0,1 (g/L)	Κατανάλωση από ζύμες

Υπάρχουν και ορισμένα οξέα που απαντούν στον οίνο, αλλά δεν προέρχονται από το σταφύλι.

Πίνακας 3: Τα σημαντικότερα οξέα που παράγονται κατά την οινοποίηση.

Οργανικό οξύ οίνου	Προέλευση στον οίνο	Ποσότητα στον οίνο
Ηλεκτρικό οξύ	Αλκοολική Ζύμωση	0,5 – 1 (g/L)
Κιτρομηλικό οξύ	Δευτερεύον προϊόν AZ	0,1 – 0,25 (g/L)
D (-) Γαλακτικό οξύ	Αλκοολική Ζύμωση	0,1 – 0,4 (g/L)



L (+) Γαλακτικό οξύ	Μηλογαλακτική Ζύμωση	3,0 (g/L)
Πυροσταφυλικό οξύ	Μεταβολισμός Γλυκόζης	0,0 – 0,5 (g/L)
A-κετογλουταρικό οξύ	Μεταβολισμός Γλυκόζης	0,0 – 0,2 (g/L)
Οξικό οξύ	Διάφορα Μονοπάτια	0,5 – 0,6 (g/L)

Τέλος υπάρχουν διάφορες μετρήσεις της οξύτητας των οίνων που δίνουν τις ακόλουθες τιμές:

Πίνακας 4: Μέσες τιμές των διαφόρων τύπων οξύτητας, ανά τύπο οίνου.

Οξύτητα	Λευκοί Οίνοι	Ροζέ Οίνοι	Ερυθροί Οίνοι	Γλυκείς Οίνοι
<b>Ολική</b>	7,0 – 8,5 (g/L)	7,0 – 8,5 (g/L)	6,0 – 8,0 (g/L)	5,5 – 8,0 (g/L)
<b>Ενεργός (pH)</b>	3,1 – 3,5	3,1 – 3,5	3,3 – 3,8	3,5 – 3,8
<b>Πτητική</b>	18 meq/L	18 meq/L	20 meq/L	

- Αζωτούχες ενώσεις: Αμινοξέα, ολιγοπεπτίδια και πρωτεΐνες, απαραίτητες για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων. Η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 4 (g/L). Πολλές φορές προκαλούν θολώματα στους οίνους που για το λόγο αυτό υφίστανται πρωτεϊνική σταθεροποίηση (Σουφλερός, 2012).
- Ανόργανα ανιόντα και κατιόντα σε διάφορες συγκεντρώσεις, κάποια εκ των οποίων (Fe και Cu) δημιουργούν θολώματα, που κι αυτά απομακρύνονται με τεχνικές σταθεροποίησης.
- Πτητικές ενώσεις: Το άρωμα ενός οίνου οφείλεται σε πτητικές ενώσεις, που δημιουργούνται είτε στο σταφύλι πριν την οινοποίηση (πρωτογενές άρωμα), είτε από τη δράση των ζυμών (δευτερογενές άρωμα), είτε οφείλονται σε χημικές και ενζυμικές δράσεις, που πραγματοποιούνται κατά την ωρίμανση (τριτογενές άρωμα). Εκτενέστερη αναφορά στις πτητικές ενώσεις του οίνου θα πραγματοποιηθεί στο αντίστοιχο εδάφιο.
- Φαινολικές ενώσεις: Οι ενώσεις αυτές απαντούν στους ερυθρούς και τους ροζέ οίνους και αποτελούν τις ουσίες που είναι υπεύθυνες το χρώμα. Εκχυλίζονται από τους φλοιούς και τους βόστρυχες των σταφυλιών. Οι ουσίες αυτές είναι οι ανθοκυάνες, οι ταννίνες, οι φλαβόνες και τα φαινολικά οξέα (πανεπιστημιακές παραδόσεις Καλλίθρακα 2015).

## 2.2 Αιθανόλη

Η αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη ή οινόπνευμα) είναι η αλκοόλη με μοριακό τύπο  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ . Το 93% της παραγωγής αιθανόλης παγκοσμίως προέρχεται από τη ζύμωση αγροτικών πρώτων υλών, ενώ το υπόλοιπο 7% προέρχεται από την χημική αντίδραση της ενυδάτωσης του αιθενίου ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ). Στη γεωργία η αιθανόλη προέρχεται από ζύμωση τεράστιου εύρους υποστρωμάτων, όπως κριθάρι, ρύζι, σταφύλι, καλαμπόκι κ.α.

### 2.2.1 Αιθανόλη γεωργικής προέλευσης

Η φυσική αιθανόλη χρησιμοποιείται τόσο στη Βιομηχανία, όσο και στην άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο υπό μορφήν αλκοολούχων ποτών όπως είναι ο οίνος, ο ζύθος, τα αποστάγματα στεμφύλων σταφυλής (π.χ. τσίπουρο), βύνης (whiskey), πατάτας (vodka) κ.α. Μάλιστα, η Βιομηχανία παραγωγής αλκοολούχων ποτών, είναι ένας επικερδής κλάδος σε παγκόσμια κλίμακα, με πωλήσεις που στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής επί παραδείγματι, ξεπερνούν τα 223 δισεκατομμύρια δολάρια (The statistic portal).

Από τις χρήσεις της βιοαιθανόλης η σημαντικότερη ίσως είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων, καθώς από την αρχή του τρέχοντος αιώνα, υπάρχει όλο και πιο επιτακτική η ανάγκη αντικατάστασης της βενζίνης από αυτά. Οι βασικοί λόγοι που έχουν ήδη οδηγήσει αρκετές χώρες του πλανήτη να στραφούν προς τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας είναι:

- Η αναγνώριση της εξάντλησης των πετρελαϊκών πηγών που επέφερε ραγδαία αύξηση στις τιμές του πετρελαίου.
- Η ανησυχία για τις περιβαλλοντικές συνέπειες της χρήσης του πετρελαίου.
- Οι αξιώσεις συμφωνιών, όπως το πρωτόκολλο του Κιότο, σχετικά με τις εκπομπές αερίων (Sarris & Papanikolaou, 2016).
- Η πρόνοια για τη διαφορετική διακίνηση των αγροτικών προϊόντων.

Η βιοαιθανόλη θεωρείται ο κατάλληλος αντικαταστάτης του πετρελαίου παρότι το ενεργειακό της ισοδύναμο είναι κατά 68% χαμηλότερο. Η χρήση της βιοαιθανόλης στις μετακινήσεις, αντί της βενζίνης που χρησιμοποιείται σήμερα, οδηγεί σε μείωση 80% των εκπομπών  $\text{CO}_2$  ενώ αποφεύγεται εντελώς η εκπομπή  $\text{SO}_2$ , αερίου υπεύθυνου για την όξινη βροχή (Mussatto et al., 2010).

Ακόμα, μελετάται επί του παρόντος η χρήση του καταλληλότερου μικροοργανισμού για το κάθε πιθανό υπόστρωμα προς την παραγωγή βιοαιθανόλης (Mohd Azhar et al., 2017).

Επίσης, εμφανίζεται ραγδαία αύξηση και στη χρήση βιοαιθανόλης προς παραγωγή αιθανίου, το οποίο είναι πολύ σημαντικό στην Βιομηχανία Πολυμερών. Η συνθετική αιθανόλη χρησιμοποιείται είτε στη Χημική Βιομηχανία, ως ενδιάμεσο της παραγωγής σημαντικών προϊόντων, όπως αιθέρες και αιθυλαμίνες, αλλά και ως διαλύτης στην παραγωγή ευρείας γκάμας σκευασμάτων όπως καλλυντικά, φάρμακα, απορρυπαντικά κλπ. Η συνθετική αιθανόλη σε αντίθεση ως προς την αιθανόλη γεωργικής προέλευσης, χρησιμοποιείται αυστηρά και μόνο στη Βιομηχανία.

Η αιθανόλη γεωργικής προέλευσης παράγεται με τη δράση μικροοργανισμών οι οποίοι καταναλώνουν σακχαρούχα υποστρώματα και δίνουν εν αρχή πυροσταφυλικό οξύ. Στη συνέχεια, το πυροσταφυλικό οξύ υφίσταται οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση, και δίνει ακεταλδεΐδη, που με τη σειρά της ανάγεται σε αιθανόλη. Ανάλογα με το είδος του υποστρώματος, αλλά και με το μικροοργανισμό, ο οποίος αναπτύσσεται σε αυτό, η διεργασία ακολουθεί διαφορετικές ατραπούς (Sarris & Papanikolaou, 2016). Για τους ζυμομύκητες που λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία παραγωγής οίνου, η ακολουθούμενη οδός καλείται Γλυκόλυση Embden – Meyerhoff – Parnas. Εκτενέστερη αναφορά θα ακολουθήσει στο αντίστοιχο εδάφιο.

Σε σύγκριση με άλλα είδη μικροοργανισμών, οι ζυμομύκητες (ειδικά ο *Saccharomyces cerevisiae*) είναι οι μικροοργανισμοί που επιστρατεύονται για την παραγωγή αιθανόλης, λόγω της ταχύτητας με την οποία καταναλώνουν τα σάκχαρα, της υψηλής τους απόδοσης, αλλά και της αντοχής τους σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (Dashko et al, 2014).

Οι υδατάνθρακες χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: τα απλά σάκχαρα (προερχόμενα από ζαχαροκάλαμα, ζαχαρότευτλα, τον ορό του γάλακτος, μελάσσες κλπ), το άμυλο (προερχόμενο από σπόρους σίτου και αραβόσιτου και καλλιέργειες ριζών) και την λιγνοκυτταρίνη (προερχόμενη από ξύλο, καλάμια, γεωργικά απόβλητα και κατάλοιπα καλλιιεργειών). Η διαδικασία όσον αφορά τα απλά σάκχαρα συγκεντρώνεται σε 3 βήματα:

- i. Δημιουργία διαλύματος από τα ζυμώσιμα σάκχαρα
- ii. Αλκοολική ζύμωση των σακχάρων
- iii. Διαχωρισμός και καθαρισμός της παραχθείσας αιθανόλης μέσω μίας σειράς διεργασιών απόσταξης – διόρθωσης – αφυδάτωσης.

Ενώ οι ζυμομύκητες μπορούν να μετατρέψουν απευθείας τα απλά σάκχαρα σε αιθανόλη, για τα πολυμερή τους χρειάζεται επιπλέον διεργασίες. Αρχικά, το άμυλο με τη βοήθεια δύο ενζύμων (α-αμυλάση και αμυλογλυκοσιδάση) διασπάται σε απλά

σάκχαρα και τότε μπορεί να ζυμωθεί από τους μικροοργανισμούς. Όσον αφορά την λιγνοκυτταρίνη, πρέπει αρχικά να διασπαστεί ώστε η λιγνίνη και η κυτταρίνη να καταστούν εδώδιμες στα επόμενα βήματα. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως με χημικά μέσα όπως κατεργασίες με οξέα ή βάσεις, εκχύλιση κ.α. Ακολουθεί όξινη ή ενζυμική υδρόλυση με την οποία οι πολυσακχαρίτες μετατρέπονται σε απλά σάκχαρα και ακολουθεί η προαναφερθείσα διαδικασία (Mussatto et al., 2010). Εκτός από ζυμομύκητες και άλλοι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν, όπως τα βακτήρια *Zygomonas mobilis* και *Escherichia coli*. Η γλυκόλυση που εκτελούν τα βακτηριακά αυτά στελέχη είναι η γλυκόλυση Entner – Doudoroff.

### 2.2.2 Παραγωγή και κατανάλωση αιθανόλης

Η ετήσια παραγωγή της συνθετικής αιθανόλης αγγίζει τους 850.000 τόνους, ενώ οι 470.000 προέρχονται από την Ευρωπαϊκή Βιομηχανία (Renewable Fuels Association 2016). Η παραγωγή της αιθανόλης γεωργικής προέλευσης από το 2008 υπολογίστηκε στα 65,4 δισεκατομμύρια λίτρα ενώ αντίστοιχα στοιχεία για το έτος 2016 αναφέρουν πως η παγκόσμια παραγωγή ξεπέρασε 100 δισεκατομμύρια λίτρα.

*Πίνακας 5: Παραγωγή βιοαιθανόλης παγκοσμίως και στις πρώτες σε παραγωγή περιοχές, για τα τελευταία 10 έτη.*

	Περιοχή*				
Παραγωγή	ΗΠΑ	Βραζιλία	Ε.Ε.	Κίνα	Παγκόσμια
2007	6,52	5,02	0,57	0,49	13,12
2008	9,31	6,47	0,73	0,50	17,64
2009	10,94	6,58	1,04	0,54	20,30
2010	13,30	6,92	1,21	0,54	21,31
2011	13,95	5,57	1,17	0,55	22,40
2012	13,30	5,58	1,18	0,56	21,81
2013	13,30	6,27	1,37	0,70	23,43
2014	14,30	6,19	1,45	0,64	24,21
2015	14,81	7,09	1,39	0,81	25,68
2016	15,33	7,30	1,38	0,85	26,58

\* *billions of gallons*

## 2.3 Διαδικασία παραγωγής οίνου

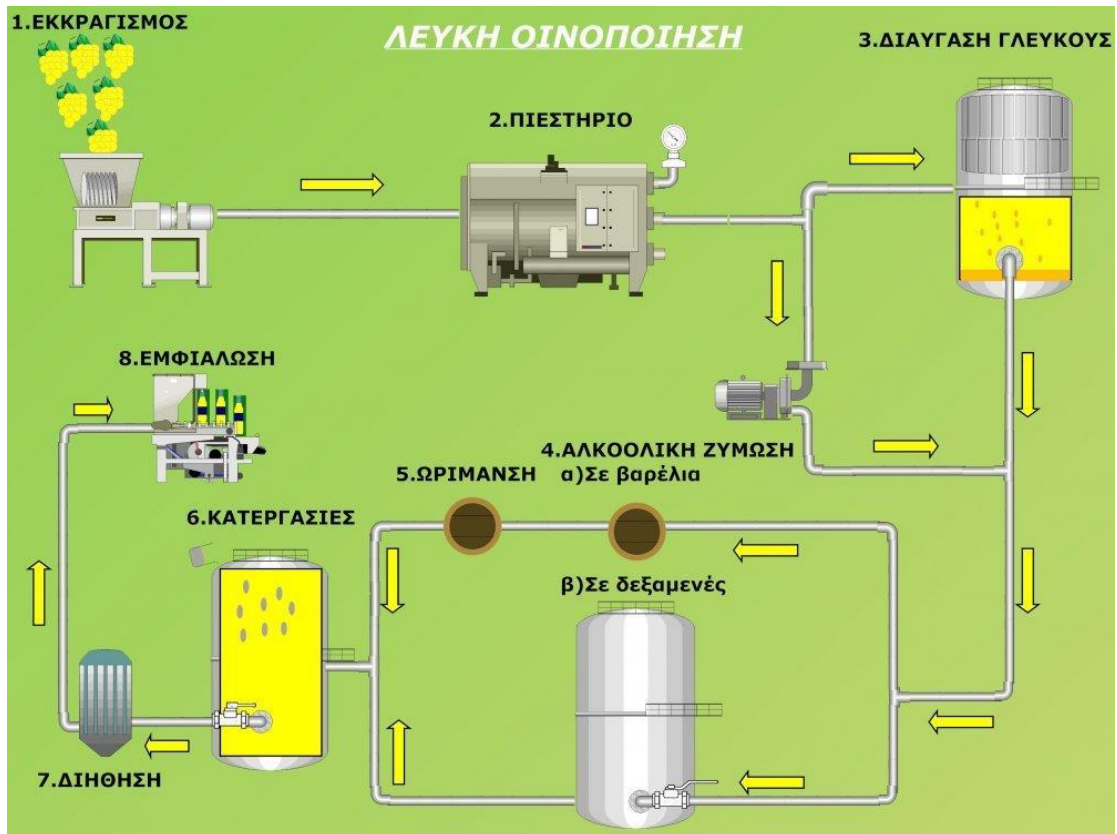
Ο όρος «Οινοποίηση» αναφέρεται στο σύνολο των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα για την μετατροπή των σταφυλιών σε οίνο. Η διαδικασία της παραγωγής οίνου, είναι μία διαδικασία που ξεκινά κάθε έτος σε διαφορετικό χρόνο, ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειας, τα καιρικά φαινόμενα, με την ποικιλία της σταφυλής καθώς και άλλους

παράγοντες. Η διαδικασία έχει κάποιες κοινές αρχές, ωστόσο υπάρχουν διαφορές ως προς το είδος του παραγόμενου ανά περίπτωση οίνου. Οι κατηγορίες της οινοποίησης είναι η Λευκή (ποσοστό 70% της εγχώριας οινοποιίας), η Ερυθρά Οινοποίηση (30% στην Ελλάδα), η Ροζέ Οινοποίηση (10% επί της ερυθράς οινοποίησης) και οι ειδικές οινοποιήσεις που αναφέρονται σε αφρώδεις και γλυκούς οίνους, με τις επιμέρους κατηγορίες αυτών. Οι κατεργασίες που πραγματοποιούνται στην οινοποίηση χωρίζονται σε μηχανικές και χημικές. Μια σημαντική παράμετρος που λαμβάνουν υπόψιν οι παραγωγοί οίνου είναι η επιλογή του κατάλληλου στελέχους μικροοργανισμού για να πραγματοποιηθεί η επιθυμητή διαδικασία. Υπάρχουν διαφορετικά στοιχεία που καθιστούν τον κάθε μικροοργανισμό κατάλληλο για την εκάστοτε οινοποίηση, όπως είναι η δυνατότητά τους να ζυμώνουν αρκετές κατηγορίες σακχαρούχων υποστρωμάτων. Επίσης, κάποιο μικροοργανισμοί είναι σε θέση να ανταπεξέλθουν πιο εύκολα σε κάποιες δυσκολίες που εμφανίζονται στην αλκοολική ζύμωση όπως είναι οι υψηλές θερμοκρασίες, ή οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Τέλος, κάποιοι έχουν την ικανότητα ζύμωσης και των πεντοζών που εμπεριέχονται στο υπόστρωμα της ζύμωσης (Mohd Azhar et al., 2017).

### 2.3.1 Λευκή οινοποίηση

Στην Ελλάδα, η πρώτη διεργασία που λαμβάνει χώρα κατά την λευκή οινοποίηση μετά τον τρυγητό, είναι εκείνη της ψύξης των σταφυλιών. Η εποχή της συγκομιδής είναι η καλοκαιρινή περίοδος, (Ιούλιος – Σεπτέμβριος), κι έτσι, λόγω των υψηλών εξωτερικών θερμοκρασιών είναι απαραίτητη η ψύξη πριν την έναρξη των διεργασιών. Μετά την ψύξη ακολουθεί η διαλογή, με σκοπό την βελτίωση της ποιότητας κατά 3 – 5%. Η ταινία διαλογής οδηγεί τα σταφύλια στη σταφυλοδόχο, από όπου συνεχίζουν την πορεία τους προς το εκτραγιστήριο. Εκεί πραγματοποιείται η αποβοστρίχωση (προαιρετικά), δηλαδή ο διαχωρισμός από τα στέμφυλα. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η έκθλιψη των ραγών και η απελευθέρωση της σάρκας. Οι λευκοί οίνοι παράγονται από την ζύμωση του γλεύκους που αποτελείται αποκλειστικά από το χυμό, λευκών ποικιλιών. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις παραγωγής λευκών οίνων από ερυθρές ποικιλίες, καθώς και περιπτώσεις ζύμωσης παρουσία των στεμφύλων (Σουφλερός, 2000). Κατόπιν, η σταφυλομάζα εισέρχεται στα πιεστήρια όπου και γλευκοποιείται. Ο χυμός που συλλέγεται από το πιεστήριο χωρίς να ασκηθεί πίεση ή με την εφαρμογή χαμηλής πίεσης στη σταφυλομάζα καλείται πρόρογος χυμός και είναι διαφορετικός από τους χυμούς που προκύπτουν έπειτα από πίεση. Οι διαφορές του εντοπίζονται στην τιμή της ενεργού

οξύτητας (pH), της περιεκτικότητας σε κάλλιο, της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες κ.α. Σε πολλές περιπτώσεις οινοποιείται ξεχωριστά, αφού δίνει ανώτερης ποιότητας προϊόντα. Όταν πλέον έχει ληφθεί το γλεύκος, υποβάλλεται στη διαδικασία της απολάσπωσης. Η διαδικασία αυτή έχει ως σκοπό την απομάκρυνση από το γλεύκος αιωρούμενων σε αυτό σωματιδίων, όπως πηκτινικές ουσίες, στερεά σωματίδια που προέρχονται από τη σταφυλή κ.α. Μετά την απολάσπωση ο οίνος είναι πιο διαυγής, ενώ ενισχύεται το αρωματικό προφίλ του. Η οινοποίηση δεν αποτελεί απλώς την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους, αλλά κυρίως τη διαδικασία εξαγωγής του καλύτερου μέρους των ραγών, ώστε να περιοριστεί η διάχυση συστατικών, ικανών να προκαλέσουν οσφρητικά και γευστικά ελαττώματα (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Όταν ολοκληρωθούν οι προαναφερθείσες διεργασίες εκκινεί η αλκοολική ζύμωση συνήθως υπό του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*. Κατά κανόνα, η βέλτιστη θερμοκρασία για την αλκοολική ζύμωση είναι περίπου στους 15 – 18 °C, ενώ είναι αρκετοί οι παραγωγοί που προτιμούν χαμηλότερες θερμοκρασίες που όμως έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση των αρωματικών ενώσεων. Είναι σημαντικό στο σημείο αυτό να αναφερθεί, πως στην επιδερμίδα των ραγών του σταφυλιού υπάρχουν προσκολλημένοι οι ζυμομύκητες που δύνανται να εκκινήσουν την αλκοολική ζύμωση, όμως, για λόγους υψηλότερων αποδόσεων, προστίθενται εξωγενώς και καλλιέργειες μικροοργανισμών, ώστε να ενισχυθεί η περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Επίσης, σε πολλές περιπτώσεις οι μικροοργανισμοί που έχουν αναπτυχθεί στην επιδερμίδα του φλοιού, σκοτώνονται στα αρχικά στάδια της οινοποίησης, με την πρώτη προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (πανεπιστημιακές παραδόσεις Κοτσερίδης, 2008).



Εικόνα 1: Η λευκή οινοποίηση (Πηγή: Δρ Καρβέλα Ευαγγελία, Οινοπνευματώση ποτά)

Όσον αφορά στις χημικές κατεργασίες του οίνου αυτές είναι:

- i. Αύξηση της περιεκτικότητας σε σάκχαρα.  
 Σε περιπτώσεις μη ικανοποιητικής ωρίμανσης των σταφυλών την περίοδο του τρυγητού, πραγματοποιείται εμπλουτισμός του γλεύκους σε σάκχαρα, με βιολογικό, φυσικό ή χημικό τρόπο.
- ii. Μείωση ογκομετρούμενης οξύτητας – Αύξηση pH  
 Σε περιπτώσεις άγουρης πρώτης ύλης, εκτός από αύξηση σακχάρων πραγματοποιείται και μείωση της ογκομετρούμενης οξύτητας, με βιολογικές ή φυσικοχημικές μεθόδους.
- iii. Αύξηση ογκομετρούμενης οξύτητας.  
 Στην Ελλάδα, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών την περίοδο της συγκομιδής, είναι συνηθέστερη η υπερωρίμανση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αναπνευστική καύση των βασικών οργανικών οξέων του οίνου (για το τρυγικό οξύ 35°C), αρχικά του μηλικού και σε ακραίες περιπτώσεις συνεχούς καύσινα και του τρυγικού. Η αύξηση της οξύτητας επιτυγχάνεται συνήθως με προσθήκη τρυγικού οξέος.

iv. Προσθήκη θειώδους ανυδρίτη

Λαμβάνει χώρα σε διάφορα στάδια της οινοποίησης, κυρίως όπου υπάρχει μετάγγιση καθώς η πρωταρχική του ιδιότητα είναι η αντιοξειδωτική. Άλλες ιδιότητες του SO<sub>2</sub> είναι η αντιμικροβιακή, η αντιαλδεϋδική, η όξινη, η εκχυλιστική και η διαυγαστική (πανεπιστημιακές παραδόσεις Κοτσερίδης, 2008).

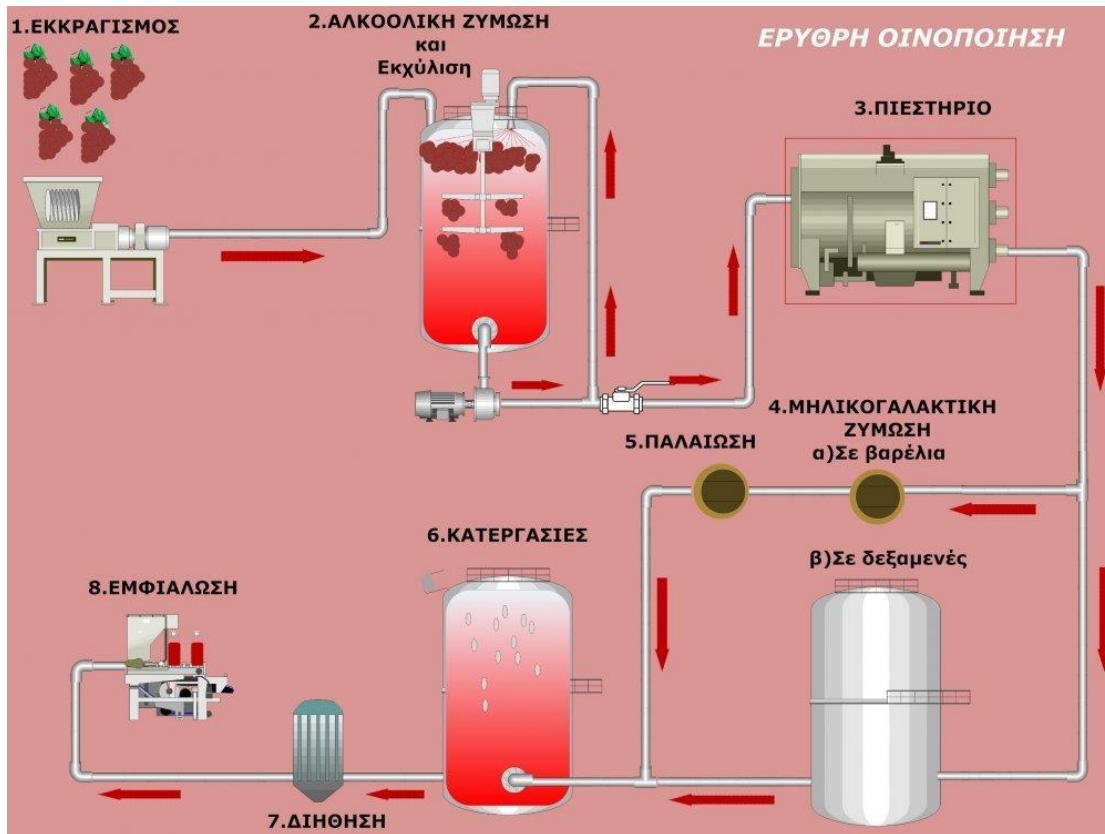
### 2.3.2 Ερυθρά Οινοποίηση

Η ερυθρά οινοποίηση διαφέρει σε αρκετά σημεία από τη λευκή, ενώ προφανώς υπάρχουν και αρκετές ομοιότητες. Ο σημαντικότερος λόγος για τον οποίο εμφανίζονται οι διαφορές είναι το χρώμα των ερυθρών οίνων που οφείλεται στις χρωστικές ουσίες οι οποίες βρίσκονται στους φλοιούς των σταφυλιών. Έτσι, η ερυθρά οινοποίηση ξεκινά με την εκχύλιση των χρωστικών, από τους φλοιούς, τα γίγαρτα και σε κάποιες περιπτώσεις και τους βόστρυχες (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί, πως επειδή οι χρωστικές των σταφυλιών βρίσκονται αποκλειστικά στους φλοιούς, με προσεκτική εξαγωγή της σάρκας από την σταφυλή, υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής λευκών οίνων από ερυθρές ποικιλίες (π.χ. η ελληνική ποικιλία μοσχοφίλερο, είναι ερυθρή, όμως ο παραγόμενος οίνος είναι λευκός). Υπάρχει μάλιστα ο διαχωρισμός μεταξύ των λευκών οίνων που προέρχονται από λευκές ποικιλίες (blanc de blanc) από εκείνους που προέρχονται από ερυθρές (blanc de noir). Εκτός αυτού, ο χρόνος και η ένταση της εκχύλισης ποικίλουν ανάλογα με διάφορους παράγοντες, όπως ο τύπος του οίνου που επιθυμεί ο παραγωγός, η κατάσταση της πρώτης ύλης κ. α. (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Αρχικά, ο χρόνος παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα, είναι ανάλογος με την εκχύλιση των χρωστικών. Δεύτερον, ο βαθμός ωρίμανσης επηρεάζει το πλήθος των ανθοκυανών και των ταννινών των φλοιών, οι οποίες εκχυλίζονται πιο εύκολα, ενώ μειώνονται οι σκληρές ταννίνες των γιγάρτων. Η θερμοκρασία διαδραματίζει επίσης πρωτεύοντα ρόλο, καθώς η υψηλή θερμοκρασία ενισχύει την εκχύλιση, ενώ η πολύ υψηλή επιφέρει δυσμενή αποτελέσματα, καθυστερώντας την αλκοολική ζύμωση. Ένας ακόμα σημαντικός παράγων είναι το είδος του μικροοργανισμού που επιλέγεται, καθώς κάποιες ζύμες έχουν το ένζυμο β – γλυκοσιδάση το οποίο διασπά το δεσμό α (1 – 6) και απελευθερώνει τις αρωματικές ενώσεις που είναι σημαντικές και πολύπλοκες στους ερυθρούς οίνους. Σε ορισμένες περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητη και η εξωγενής προσθήκη πηκτινοληκτικών ενζύμων, προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη θραύση των



τοιχωμάτων των φλοιών. Η αιθανόλη επίσης, προκαλεί αύξηση της εκχύλισης από τους φλοιούς, αλλά και από τα γίγαρτα, τα οποία δεν είναι διαπερατά στο νερό. Επομένως χρώμα και άρωμα αυξάνονται ταχύτατα στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, όμως στην πορεία εμφανίζεται μείωση λόγω προσρόφησης των ουσιών στα κύτταρα των ζυμών. Η εκχύλιση επομένως, είναι η πρώτη μεγάλη διαφορά μεταξύ λευκής και ερυθράς οινοποίησης. Γενικά, τα βασικά στάδια της ερυθράς οινοποίησης είναι τα ακόλουθα: Αποβοστρύχωση και εκρραγισμός υποχρεωτικά, ενώ σε πολύ ταννικές ποικιλίες αποφεύγεται η έκθλιψη για να μην απελευθερωθούν οι πικρές και στυφές ταννίνες των γιγάρτων. Ακολούθως η σταφυλομάζα οδηγείται στον οινοποιοητή, όπου πραγματοποιείται η αλκοολική ζύμωση παράλληλα με την εκχύλιση που συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της διεργασίας. Πριν την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης εφαρμόζονται η πίεση και η στράγγιση του χυμού και έπειτα ζυμώνονται και τα τελευταία γραμμάρια σακχάρων, ενώ πραγματοποιείται και η μηλικογαλακτική βιομετατροπή. Σημειώνεται, πως οι πεντόζες που είναι μη ζυμώσιμα σάκχαρα όσον αφορά τους ζυμομύκητες, αποτελούν θρεπτικό υλικό για τα γαλακτικά βακτήρια. Οι διάφορες ζυμώσεις που πραγματοποιούνται κατά την ερυθρά οινοποίηση θα αναλυθούν εκτενώς στο αντίστοιχο εδάφιο. Μία ακόμα διαφορά των ερυθρών από τους λευκούς οίνους είναι πως οι ερυθροί, κατά μεγάλη πλειονότητα, υφίστανται χρόνια παλαίωση, προκειμένου να βελτιστοποιηθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Βέβαια, υπάρχει και μία κατηγορία λευκών οίνων οι οποίοι είναι σε θέση να παλαιωθούν για κάποια χρονικά διαστήματα. Από τη διαδικασία της παλαίωσης οι οίνοι, εμπλουτίζονται σε αρωματικά συστατικά, ενώ αλλάζει η δομή των ταννινών τους, καθώς αυξάνεται ο βαθμός πολυμερισμού τους. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται η στυπτικότητα, όμως αν η ωρίμανση πραγματοποιείται σε βαρέλι και όχι σε φιάλη, λόγω της εκχύλισης γαλλοταννινών και ελαγοταννινών εκ της δρυός, αυξάνεται κάπως η τραχύτητα. Καθίσταται προφανές λοιπόν, πως η επιλογή των συνθηκών ωρίμανσης πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεκτική (πανεπιστημιακές παραδόσεις Κοτσερίδης, 2008).

Μετά το τέλος των ζυμώσεων ακολουθεί τόσο για τους λευκούς όσο και για τους ερυθρούς οίνους μία σειρά διεργασιών που καθορίζουν τον τύπο του τελικού προϊόντος. Οι διεργασίες αυτές έχουν σκοπό την διαύγαση του οίνου, τη ρύθμιση της χημικής του σύστασης καθώς και τη μικροβιακή, χημική και μεγαλομοριακή σταθεροποίησή του.



Εικόνα 2: Η ερυθρά οινοποίηση (Πηγή: Δρ Καρβέλα Εναγγελία, Οινοπνευματώση ποτά)

## 2.4 Μεταβολισμός

Οι ζώντες οργανισμοί χρειάζονται συνεχή τροφοδότηση ελεύθερης ενέργειας για τρεις κύριους σκοπούς:

- i. Εκτέλεση μηχανικής εργασίας στη σύσπαση των μυών και άλλων κυτταρικών κινήσεων
- ii. Ενεργητική μεταφορά μορίων και ιόντων
- iii. Σύνθεση μακρομορίων και άλλων βιομορίων από απλά πρόδρομα μόρια.

Στη φύση υπάρχουν δύο κατηγορίες οργανισμών. Η πρώτη κατηγορία είναι οι αυτότροφοι οργανισμοί που χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα το CO<sub>2</sub> και ως πηγή ενέργειας είτε την ηλιακή ενέργεια (φωτοαυτότροφοι), είτε απλά ανόργανα και οργανικά μόρια (χημειοαυτότροφοι). Η δεύτερη κατηγορία είναι οι ετερότροφοι οργανισμοί που χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα, οργανικές ουσίες, η οξείδωση των οποίων παρέχει στους μικροοργανισμούς αυτούς ενέργεια (πανεπιστημιακές παραδόσεις Παπανικολάου 2015).

Η χημική ενέργεια που αποκτάται από την οξείδωση των τροφίμων μετατρέπεται σε μηχανική ενέργεια που παρέχει την ισχύ για τις βιολογικές λειτουργίες του κάθε κυττάρου. Σε κάθε δεδομένη στιγμή, μέσα στο κύτταρο λαμβάνουν χώρα χιλιάδες μετασχηματισμοί ενέργειας. Εξάγεται ενέργεια από τα καύσιμα και χρησιμοποιείται για να ωθεί τις βιοσυνθετικές πορείες. Οι μετασχηματισμοί αυτοί ονομάζονται «Μεταβολισμός» ή «Ενδιάμεσος Μεταβολισμός». Με άλλα λόγια, ο μεταβολισμός είναι κατ' ουσίαν μία σειρά συνδεδεμένων αντιδράσεων οι οποίες εκκινούν από ένα ιδιαίτερο μόριο, το οποίο μετατρέπουν σε ένα ή περισσότερα άλλα μόρια με έναν προσεκτικά καθορισμένο τρόπο.

Οι προαναφερθείσες αντιδράσεις μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- i. Οι αντιδράσεις εκείνες που μετασχηματίζουν τα μόρια σε κυτταρική ενέργεια και ονομάζονται καταβολικές αντιδράσεις ή «Καταβολισμός».
- ii. Οι αντιδράσεις εκείνες που απαιτούν την ενέργεια προκειμένου να συνθέσουν πολύπλοκα μόρια που χρειάζεται το κύτταρο και καλούνται αναβολικές αντιδράσεις ή «Αναβολισμός».

Υπάρχει και μία κατηγορία αντιδράσεων όπου ανάλογα με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου μπορούν να είναι είτε αναβολικές είτε καταβολικές. Οι πορείες αυτές καλούνται αμφιβολικές πορείες (Berg et al, 2002).

### 2.4.1 Τριφωσφορική αδενοσίνη

Για να μπορεί η ενέργεια να μεταφέρεται με ευκολία μέσα στο κύτταρο και να μετασχηματίζεται ταχύτατα από τη μία μορφή στην άλλη, απαιτείται η ύπαρξη ενός κοινού «νομίματος» το οποίο να είναι προσιτό και να έχει υψηλή ενέργεια. Το μόριο αυτό ονομάζεται «Τριφωσφορική Αδενοσίνη» ή απλά ATP.

Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), αποτελεί το συστατικό – κλειδί του μεταβολισμού των κυττάρων. Περιέχει 2 πλούσιους σε ενέργεια δεσμούς φωσφορικού ανυδρίτη, η διάνοιξη των οποίων απελευθερώνει ενέργεια στο κύτταρο, ώστε να εκτελέσει τις βιολογικές του λειτουργίες (κίνηση, βιοσύνθεση, ενεργός μεταφορά). Η ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση της ATP είναι ασυνήθιστα μεγάλη για το κύτταρο. Η απαραίτητη ενέργεια για τη σύνθεση του ATP εξασφαλίζεται από τη διάσπαση άλλων μορίων. Η ATP δημιουργείται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης της ADP. Επομένως, αυτός ο αένας κύκλος ATP – ADP είναι ο βασικός τρόπος ανταλλαγής ενέργειας στα βιολογικά συστήματα. Τέλος, δύο ακόμα πολύ σημαντικά μόρια για τα κύτταρα, το  $\text{NAD}^+$  και το  $\text{FAD}^+$  αποτελούν παράγωγα της ATP. Επομένως, είναι εμφανής ο πρωταρχικός ρόλος του μορίου αυτού στο μεταβολισμό (Berg et al, 2002).

## 2.5 Ζύμωση

Υπάρχουν διάφοροι ορισμοί για τον όρο «ζύμωση». Πρώτος είναι ο καλούμενος βιοχημικός ορισμός, δοθείς από τον Dr. Louis Pasteur εν έτει 1860 και αναφέρει τη ζύμωση ως τη ζωή απουσία αέρος (fermentation c'est la vie sans air). Ωστόσο, ο όρος δε χρησιμοποιείται μόνο με τη στενή αρχική έννοια. Ο όρος «ζύμωση» παραμένει δόκιμος παρ' ότι στις σύγχρονες πρακτικές, οι διεργασίες λαμβάνουν χώρα σε αερόβιες συνθήκες κατά κύριο λόγο (πανεπιστημιακές παραδόσεις Παπανικολάου Σ. 2016). Επίσης υπάρχει πλέον και ο όρος «Βιομηχανική Ζύμωση» ο οποίος αναφέρεται στη διεργασία κατά την οποία προϊόντα παράγονται από γεωργικές ή βιομηχανικές πρώτες ύλες και υπο- ή πάρα- προϊόντα, με την ανάπτυξη σε αυτά ζώντων μικροοργανισμών (Αγγελής, 2007). Η αλκοολική ζύμωση, θα μπορούσε εύκολα να χαρακτηριστεί και ως αλκοολική βιομετατροπή καθώς πρόκειται για την μετατροπή της γλυκόζης σε αιθανόλη, μέσω απλών βιοχημικών αντριδράσεων, καταλυόμενων από ένζυμα.

Για να πραγματοποιηθεί ζύμωση, είναι προφανές πως πρέπει να υπάρχει πρώτη ύλη που να περιέχει κάποιας μορφής σάκχαρα. Στην περίπτωση του οίνου τα σάκχαρα αυτά είναι κατά κύριο λόγο γλυκόζη και φρουκτόζη οι οποίες συσσωρεύονται στη σάρκα της ράγας της σταφυλής από την καρπόδεση μέχρι την ωρίμανση. Η μεταξύ τους αναλογία μάλιστα, είναι και ένδειξη του σταδίου ωρίμανσης της ράγας και τη χρονική στιγμή που επιλέγεται για να πραγματοποιηθεί ο τρυγητός, βρίσκεται σε τιμές περίξ του 50:50. Τα σάκχαρα στις ράγες τις σταφυλής προέρχονται τόσο από τα ξυλώδη μέρη του πρέμνου, όσο και από τα φύλλα, στα οποία συντίθενται μέσω της φωτοσύνθεσης (Σταυρακάκης, 2013). Τα σάκχαρα αυτά αποτελούν το θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών καθώς και τα υποστρώματα για τις ενζυμικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα.

### 2.5.1 Η γλυκόλυση Embden – Meyerhof – Parnas

Η αλκοολική ζύμωση ξεκινά από τη γλυκόλυση, τη διαδικασία αποικοδόμησης γλυκόζης και φρουκτόζης σε μικρότερα μόρια που καταλήγει στην παραγωγή αιθανόλης. Το μονοπάτι που ακολουθείται είναι η γλυκόλυση, που ανακαλύφθηκε από τους Gustav Embden, Otto Meyerhof, και Jakub Karol Parnas, που ξεκινά από γλυκόζη ( $C_6H_{12}O_6$ ) και καταλήγει σε πυροσταφυλικό οξύ ( $C_3H_3O_3$ ). Η γλυκόλυση πραγματοποιείται στο κυτοσόλιο των ευκαρυωτικών κυττάρων και η συνολική της αντίδραση είναι η ακόλουθη:

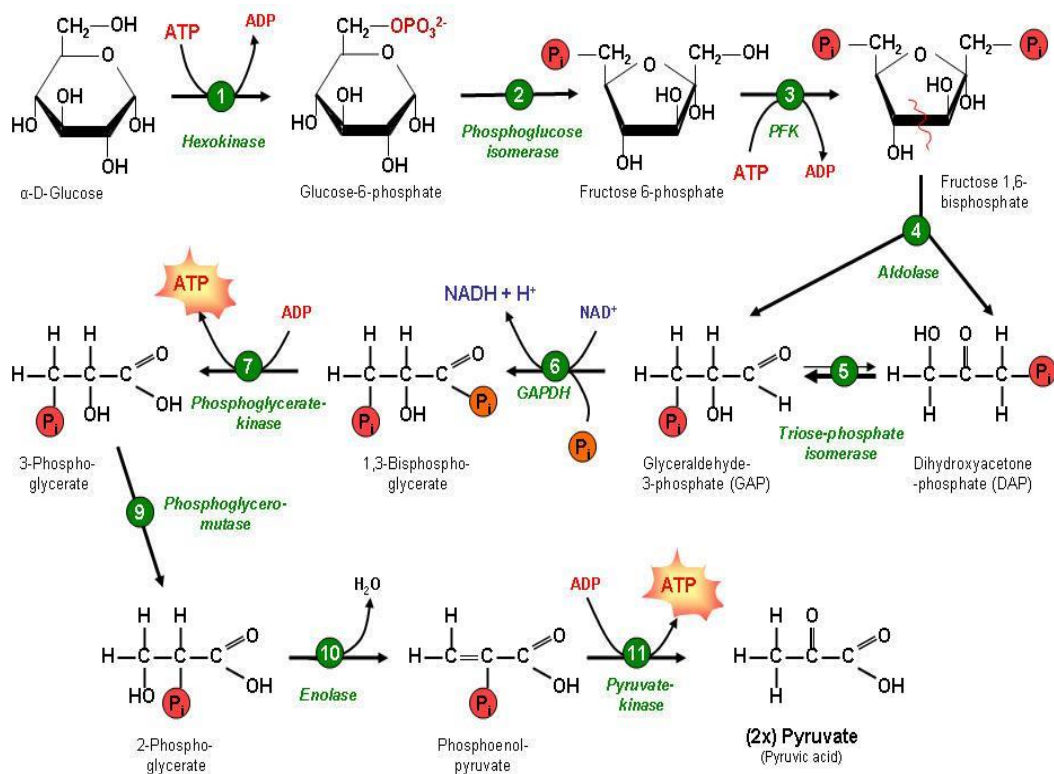


Η γλυκόλυση ξεκινά από τη φωσφοριλύωση ενός μορίου γλυκόζης, με τη βοήθεια του ενζύμου της εξωκινάσης, δημιουργώντας το μόριο της 6 – φωσφορικής γλυκόζης. Η φωσφορική ομάδα που μεταφέρεται στη γλυκόζη, προέρχεται από ένα μόριο ATP. Η αντίδραση αυτή είναι μονόδρομη. Ακολούθως το ένζυμο ισομεράση της φωσφοφρουκτόζης, με μία αμφίδρομη αντίδραση μετατρέπει την 6 – φωσφορική γλυκόζη σε 6 – φωσφορική φρουκτόζη. Το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης τελειώνει καθώς η 6 – φωσφορική φρουκτόζη μετατρέπεται σε 1, 6 – διφωσφορική φρουκτόζη μέσω του ενζύμου της φωσφοφρουκτοκινάσης, καταναλώνοντας ένα ακόμα μόριο ATP. Στο δεύτερο στάδιο της γλυκόλυσης EMP, η εξόζη 1, 6 – διφωσφορική φρουκτόζη διασπάται αμφίδρομα σε δύο ισομερείς τριόζες, την φωσφορική διυδροξυ – ακετόνη και την 3 – φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, μέσω του ενζύμου της αλδολάσης. Μεταξύ των δύο

τριοζών επενεργεί το ένζυμο της ισομεράσης των φωσφορικών τριοζών που διατηρεί τη χημική ισορροπία. Από το στάδιο αυτό και μέχρι την παραγωγή του πυροσταφυλικού οξέος, κάθε βήμα πραγματοποιείται εις διπλούν. Παρά το γεγονός πως η φωσφορική διυδροξύ ακετόνη βρίσκεται σε αφθονία, μέσω της ισομεράσης, μετατρέπεται σε 3 – φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, καθώς εκείνη είναι που συνεχίζει στην πορεία της γλυκόλυσης και άρα απομακρύνεται από την ισορροπία. (Berg et al, 2002).

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο, η 3 – φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. Το μόριο αυτό φωσφοριλώνεται και με τη βοήθεια το ενζύμου αφυδρογονάση της 3 – φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης οξειδώνεται. Το προαναφερθέν ένζυμο ταυτόχρονα καταλύει την αναγωγή ενός μορίου  $\text{NAD}^+$  (νικοτιναμινο – αδενο – δινουκλεοτίδιο) σε  $\text{NADH}$  κι έτσι το τελικό προϊόν είναι το 1, 3 διφώσφογλυκερινικό οξύ. Η μία φωσφορική ομάδα που φέρει το οξύ, μεταφέρεται σε ένα μόριο  $\text{ADP}$  δημιουργώντας ένα μόριο  $\text{ATP}$  μέσω του ενζύμου κινάση του φωσφογλυκερινικού και η αμφίδρομη αυτή αντίδραση δίνει το μόριο του 3 – φωσφογλυκερινικού οξέος. Το ένζυμο μουτάση του φωσφογλυκερινικού, μεταφέρει τη φωσφορική ομάδα από τον C3 στον C2 του οξέος δίνοντας το 2 – φωσφογλυκερινικό οξύ. Με τη δράση του ενζύμου ενολάση και την απώλεια ενός μορίου νερού λαμβάνεται αμφίδρομα το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ. Η τελευταία αντίδραση της γλυκόλυσης είναι η μονόδρομη μετατροπή του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω του ενζύμου κινάση του πυροσταφυλικού και με την παραγωγή ενός ακόμα μορίου  $\text{ATP}$ .

Η παραγωγική φάση της γλυκόλυσης περιλαμβάνει τα βήματα φωσφορυλίωσης κατά τα οποία ένα μέρος της ελεύθερης ενέργειας του μορίου της γλυκόζης διατηρείται υπό μορφή  $\text{ATP}$ . Η μετατροπή των δύο μορίων της 3 – φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού, συνοδεύεται από το σχηματισμό τεσσάρων μορίων  $\text{ATP}$ , από το  $\text{ADP}$ . Ωστόσο η καθαρή απόδοση  $\text{ATP}$  ανά μόριο γλυκόζης είναι μόνο δύο μόρια, επειδή δύο μόρια  $\text{ATP}$  είχαν δαπανηθεί κατά την προπαρασκευαστική φάση της γλυκόλυσης για τη φωσφορυλίωση των δύο άκρων του μορίου της εξόζης (Nelson et al., 2008).



Graphic©E.Schmid-2004

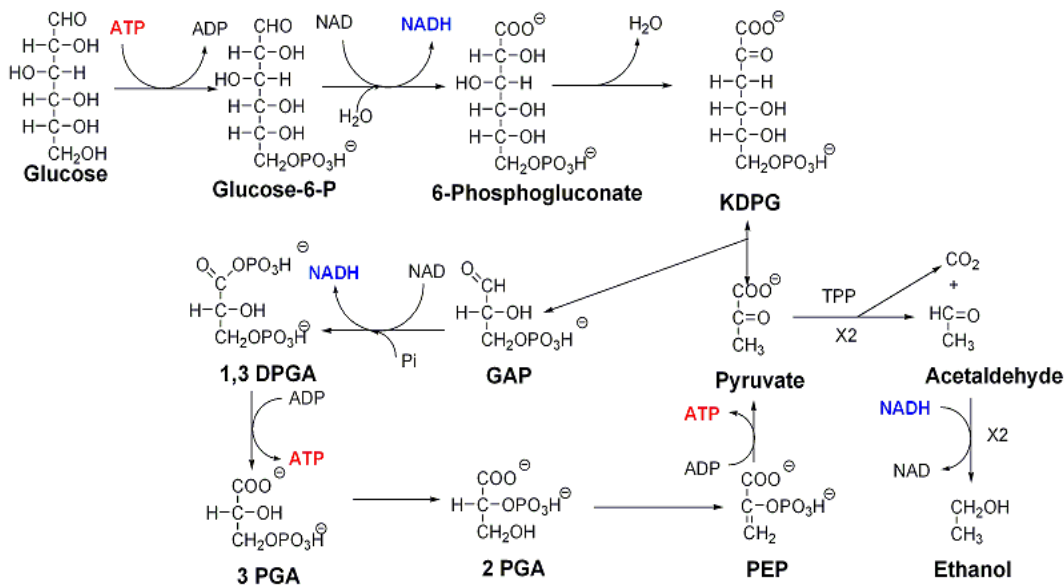
Εικόνα 3: Η γλυκόλυση Embden – Meyerhof – Parnas (Πηγή: <http://www.cram.com/>)

Ξεκινώντας με δεδομένα πως λαμβάνονται δύο μόρια αιθανόλης ανά μόριο γλυκόζης, και υπολογίζοντας με βάση τα μοριακά βάρη των δύο ενώσεων (180 για τη γλυκόζη και 46 για την αιθανόλη) καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η μέγιστη θεωρητική απόδοση της γλυκόλυσης είναι 0,51 g/g. (Sarris & Papanikolaou, 2016).

### 2.5.2 Η γλυκόλυση Entner – Doudoroff

Εκτός από της γλυκόλυση EMP, υπάρχουν και άλλες ατραποί αποικοδόμησης της γλυκόζης. Κάποια βακτηριακά στελέχη έχουν τη δυνατότητα να εκτελέσουν γλυκόλυση, όχι όμως με την ίδια διεργασία που χρησιμοποιούν οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Η αντίστοιχη διεργασία για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, διαφέρει στα αρχικά βήματα, ενώ στη συνέχεια είναι παρεμφερής με την EMP. Η γλυκόλυση των προκαρυωτικών οργανισμών ανακαλύφθηκε από τους Nathan Entner και Michael Doudoroff και δημοσιεύθηκε το 1951, στον μικροοργανισμό *Pseudomonas saccharophila* (Conway, 1992). Βιοχημικά, οι προαναφερθείσες διαφορές μεταξύ των δύο οδών είναι μέχρι το σημείο που παράγεται η 3 – φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. Από το σημείο αυτό και μετά η πορεία είναι η ίδια μέχρι την παραγωγή του πυροσταφυλικού.

Ο τρόπος με τον οποίο καταλήγει όμως η ED οδός στο σημείο αυτό, είναι ο εξής: Το πρώτο βήμα είναι κοινό και έτσι η διαφορά ξεκινά από την 6 – φωσφορική γλυκόζη, η οποία μέσω της αφυδρογονάσης της 6 – φωσφορικής γλυκόζης, οξειδώνεται σε 6 – φωσφορική γλυκολακτόνη με ταυτόχρονη αναγωγή ενός  $\text{NADP}^+$  σε  $\text{NADPH}$ . Εν συνεχεία το ένζυμο της λακτονάσης μετατρέπει την 6 – φωσφορική γλυκολακτόνη σε 6 – φωσφογλυκονικό με ταυτόχρονη κατανάλωση ενός μορίου νερού, το οποίο ακολούθως απομακρύνεται δίνοντας 2 – κετοξυ – 3 – διοξυ – 6 – φωσφογλυκονικό. Το μόριο αυτό, ακολούθως διασπάται δίνοντας ένα πυροσταφυλικό και μία 3 – φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. Από το σημείο αυτό ακολουθείται η πορεία EMP που καταλήγει στην παραγωγή ενός ακόμα πυροσταφυλικού. Επομένως και από αυτήν την γλυκολυτική διεργασία λαμβάνονται 2 μόρια αιθανόλης. Ωστόσο, στην γλυκόλυση EMP παράγονται δύο ATP, ανά μόριο γλυκόζης έναντι ενός που παράγεται στην ED. Ο μικροοργανισμός *Zymomonas mobilis* είναι ένα βακτήριο που επιλέγεται στη βιομηχανία ώστε να παράγει αιθανόλη, καθώς η απόδοσή του είναι ίδια με αυτήν του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (0,51 g/g). Ωστόσο, το βακτήριο αυτό, παράγει χαμηλότερη ποσότητα βιομάζας εξαιτίας της παραγωγής μικρότερης ποσότητας ATP (πανεπιστημιακές παραδόσεις, Παπανικολάου, 2015).



Εικόνα 4: Η γλυκόλυση Entner – Doudoroff (Πηγή: Wikipedia)

### 2.5.3 Πορεία φωσφορικών πεντοζών

Η τελευταία πορεία που διαθέτουν οι μικροοργανισμοί για να καταβολίζουν τα σάκχαρα είναι η οδός των φωσφορικών πεντοζών. Οι πεντόζες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ανήκουν στα μη ζυμώσιμα από τους μικροοργανισμούς σάκχαρα, όμως



αποικοδομούνται καθώς στις αντιδράσεις αυτές παράγονται NADPH, 5 – φωσφορική ριβόζη (σύνθεση νουκλεοτιδίων) και 4 – φωσφορική ερυθρόζη (σύνθεση αρωματικών αμινοξέων). Επομένως, η πορεία αυτή αποτελεί την τρόπο αποκατάστασης της ενέργειας και των πρόδρομων μορίων, που σπαταλούνται κατά τη βιοσυνθετική διαδικασία (Kruger & von Schaewen, 2003).

#### 2.5.4 Γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση

Μία ακόμα πορεία που λαμβάνει χώρα κατά το μεταβολισμό της γλυκόζης από τους ζυμομύκητες είναι η παραγωγή γλυκερόλης. Η ένωση αυτή περιέχεται στους οίνους σε ποσότητα 6 – 10% (πανεπιστημιακές παραδόσεις Καλλίθρακα 2015). Η γλυκερόλη είναι μία τριόλη, η οποία είναι πολύ σημαντική για τα κύτταρα καθώς είναι η ουσία με την οποία ενώνονται με εστερικούς δεσμούς τα λιπαρά οξέα δημιουργώντας τα τριγλυκερίδια. Στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, το ενοφθάλμισμα συνίσταται από μικροοργανισμούς που έχουν αναπτυχθεί εν τη παρουσία οξυγόνου. Τα ένζυμα μετατροπής του πυροσταφυλικού σε αιθανόλη (πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση και αλκοολική αφυδρογονάση) είναι ανενεργά, καθιστώντας έτσι περιορισμένη τη συσσώρευση της αιθανάλης. Επομένως η αναγέννηση των NADH γίνεται μέσω της διυδρόξυ ακετόνης. Με τον τρόπο αυτό, παράγονται γλυκερόλη και πυροσταφυλικό και μέσω αυτού και άλλα δευτερογενή προϊόντα (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

Ωστόσο, η παραγωγή της γλυκερόλης, από τους μικροοργανισμούς της αλκοολικής ζύμωσης, επηρεάζεται και από την παρουσία του θειώδους ανυδρίτη. Ο θειώδης ανυδρίτης προστίθεται στο γλεύκος στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, προκαλεί την παραγωγή γλυκερόλης και CO<sub>2</sub>, ενώ δεσμεύει μόνιμα την αιθανάλη. Η συνδεδεμένη με SO<sub>2</sub> αιθανάλη δεν μπορεί να αναχθεί σε αιθανόλη κι έτσι ο τελικός αποδέκτης των e<sup>-</sup> είναι η φωσφορική διυδρόξυ ακετόνη. Η παραγωγή της γλυκερόλης γίνεται μέσω της αναγωγής της τελευταίας, που πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την οξείδωση ενός NADH προς NAD<sup>+</sup>. Η γλυκερόλη, στη συνέχεια εξέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη. Η αντίδραση αυτή αποτελούσε τη μέθοδο για τη βιομηχανική παραγωγή της γλυκερόλης. Η αναλογία στον οίνο είναι 1 μόριο γλυκερόλης ανά 10 μόρια αιθανόλης. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:

- i. Αρχικά η φωσφορική διυδρόξυ ακετόνη ανάγεται σε 3 – φωσφορική γλυκερόλη, με τη βοήθεια του ενζύμου αφυδρογονάση της 3 – φωσφορικής γλυκερόλης και με ταυτόχρονη οξείδωση NADH προς NAD<sup>+</sup>.

- ii. Εν συνεχεία η φωσφορική ομάδα απομακρύνεται ως φωσφορικό οξύ από το μόριο μέσω του ενζύμου φωσφατάση της 3 – φωσφορικής γλυκερόλης.

### 2.5.5 Μηλικογαλακτική Βιομετατροπή

Η μηλικογαλακτική βιομετατροπή είναι μία αντίδραση που πραγματοποιείται κυρίως στην ερυθρά οινοποίηση και ουσιαστικά αναφέρεται στην αντίδραση μετατροπής του L - μηλικού οξέος σε L - γαλακτικό. Η βιομετατροπή αυτή πραγματοποιείται από στελέχη βακτηρίων, που ανήκουν στα γένη *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc*. Το στέλεχος *Oenococcus oeni* παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τη Μικροβιολογία Οίνου, καθώς είναι το στέλεχος με τη μεγαλύτερη αντοχή στις αντίξοες συνθήκες του οίνου (Lern et al 2010). Η μηλικογαλακτική βιομετατροπή συνήθως λαμβάνει χώρα μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις τα γαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται πριν το πέρας αυτής, ενώ σε κάποιες περιοχές, οι οινοπαραγωγοί επιλέγουν την πραγματοποίηση της μηλικογαλακτικής βιομετατροπής, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης.

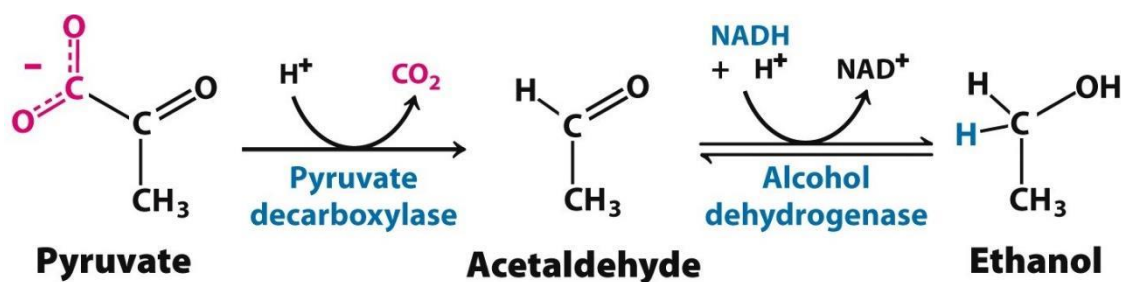
Η μηλικογαλακτική βιομετατροπή μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω τριών διαφορετικών οδών:

1. Μετατροπή του L – μηλικού οξέος σε L – γαλακτικό οξύ χωρίς ενδιάμεσα προϊόντα. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο μηλική αποκαρβοξυλάση και για την πραγματοποίησή της απαιτείται  $\text{NAD}^+$  και  $\text{Mn}^{2+}$  ως συνένζυμα.
2. Αποκαρβοξυλίωση του L – μηλικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της μηλικής αποκαρβοξυλάσης και στη συνέχεια αναγωγή του πυροσταφυλικού σε L – γαλακτικό οξύ, μέσω του ενζύμου L – γαλακτική αφυδρογονάση.
3. Αναγωγή του L – μηλικού οξέος σε οξαλοξικό, με τη βοήθεια του ενζύμου, μηλική αφυδρογονάση, αποκαρβοξυλίωση του οξαλοξικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια αναγωγή του τελευταίου σε L – γαλακτικό οξύ.

Μέσω της διεργασίας αυτής επιτυγχάνεται μείωση του pH του οίνου, καθώς και της ολικής οξύτητάς του, μικροβιακή σταθεροποίηση του οίνου, αλλά και τροποποίηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του.

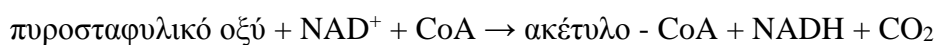
### 2.5.6 Το πυροσταφυλικό οξύ

Το πυροσταφυλικό οξύ, που παράγεται από τη γλυκόλυση μπορεί να ακολουθήσει 2 δρόμους: το ζυμωτικό και τον αναπνευστικό. Στις αναερόβιες συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης μετά την μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ, επενεργούν δύο ένζυμα. Το πρώτο είναι η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση που μετατρέπει το πυροσταφυλικό οξύ σε αιθανάλη (ακεταλδεΐδη), με την απομάκρυνση ενός μορίου CO<sub>2</sub>. Η παραχθείσα αιθανάλη, είναι ο τελικός αποδέκτης των e<sup>-</sup> όταν δεν υπάρχει οξυγόνο. Το δεύτερο ένζυμο, η αλκοολική αφυδρογονάση, ανάγει την αιθανάλη δίνοντας το τελικό προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης, την αιθανόλη. Η αναγωγή αυτή πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την εκ νέου οξείδωση του NADH που παρήχθη κατά τη γλυκόλυση σε NAD<sup>+</sup>, ώστε το τελευταίο να συμμετάσχει στη γλυκόλυση επόμενου μορίου γλυκόζης.



Εικόνα 5: Μετατροπή πυροσταφυλικού σε αιθανόλη (Πηγή: oregonstate.edu)

Στην κυτταρική αναπνοή, το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης των e<sup>-</sup> και το πυροσταφυλικό οξύ, με τη βοήθεια του ενζυμικού συμπλέγματος της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, μετατρέπεται σε ακέτυλο συνένζυμο Α (ακέτυλο - CoA), με συνολική αντίδραση την ακόλουθη:

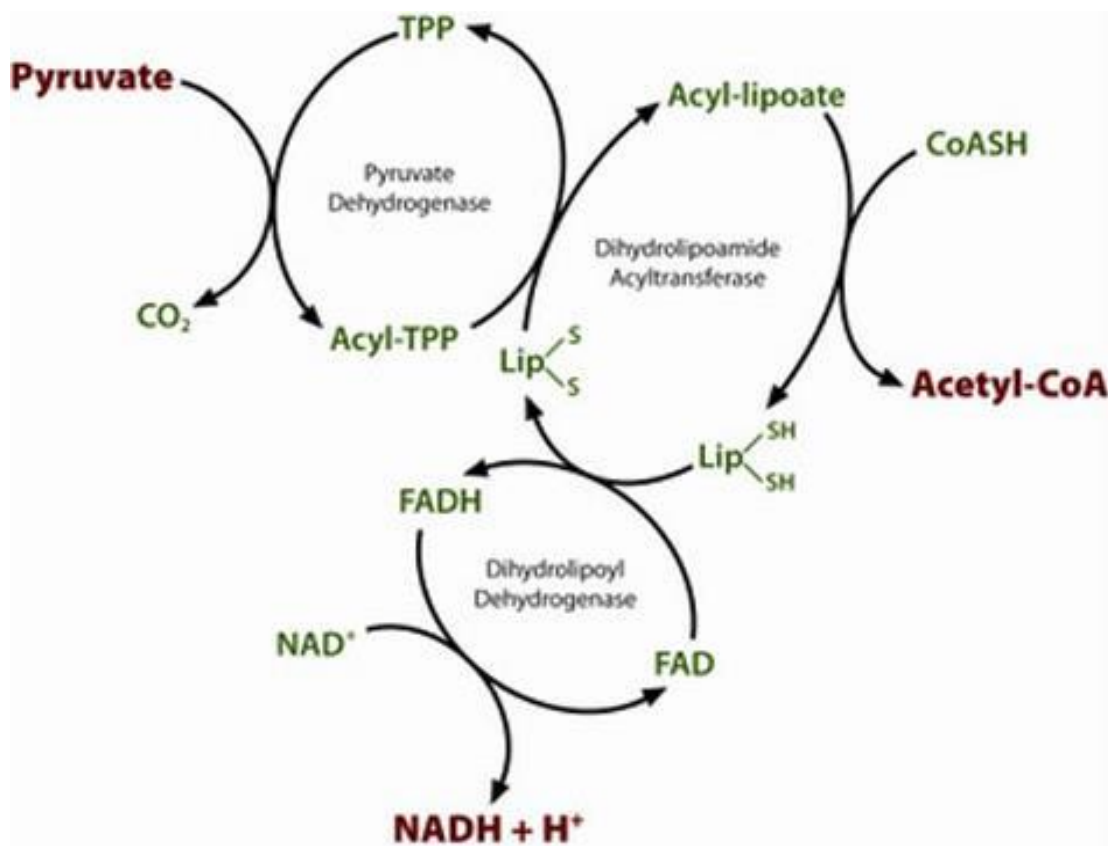


Η αντίδραση αυτή καλείται αντίδραση Swanson και εμπλέκει 3 ένζυμα και 2 συνένζυμα. Αναλυτικά οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται για τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακέτυλ – συνένζυμο Α είναι οι εξής:

- i. Το πυροσταφυλικό οξύ αποτελεί το υπόστρωμα της συνιστώσας E1 της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης που με τη βοήθεια του συνενζύμου της πυροφωσφορικής θειαμίνης (TPP) δίνει υδροξυαιθυλο – πυροφωσφορική θειαμίνη, ενώ απομακρύνεται ένα μόριο CO<sub>2</sub>.
- ii. Η υδροξυαιθυλική ομάδα που είναι ενωμένη με την TPP οξειδώνεται και μετατρέπεται σε ακετυλική ομάδα, ενώ συγχρόνως μεταφέρεται στο λιποαμίδιο

που αποτελεί παράγωγο λιποϊκού οξέος και ενός καταλοίπου λυσίνης. Το λιποϊκό οξύ είναι το δεύτερο συνένζυμο που χρησιμοποιεί το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. Τον ένζυμο που επενεργεί είναι επίσης η E1 συνιστώσα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης.

- iii. Η ακετυλική ομάδα μεταφέρεται από το ακέτυλο – λιποαμίδιο στο συνένζυμο A και δημιουργείται έτσι το ακέτυλο – συνένζυμο A (ακέτυλο - CoA) και διυδρολιποαμίδιο. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο διυδρολιπούλο – τρανσακετυλάση.
- iv. Τέλος, η οξειδωμένη μορφή του λιποαμιδίου αναγεννάται από τη διυδρολιπούλο αφυδρογονάση. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια του FAD που δέχεται  $e^-$  τα οποία στη συνέχεια μεταφέρει στο  $NAD^+$ .



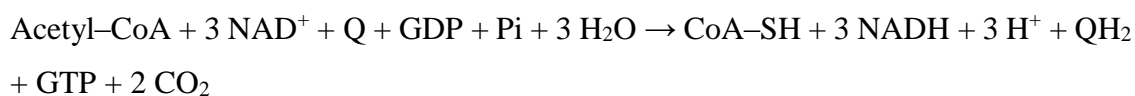
Εικόνα 6: Μετατροπή πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-συνένζυμο A (Πηγή: [www.abcam.com](http://www.abcam.com))

## 2.6 Κυτταρική αναπνοή

### 6.1 Ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων

Το ακέτυλο - CoA, εν τη παρουσία οξυγόνου και μόνο ακολουθεί μία διεργασία καλούμενη «κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων» (άλλες ονομασίες είναι κύκλος του

κιτρικού οξέος και κύκλος του Krebs). Η διεργασία αυτή αποτελεί τον περαιτέρω καταβολισμό του. Η συνολική αντίδραση του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων είναι η εξής:



Ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων είναι η τελική κοινή πορεία για την οξείδωση των καύσιμων οργανικών μορίων, αμινοξέων, λιπαρών οξέων και υδατανθράκων. Τα μόρια αυτά εισέρχονται στον κύκλο ως ακέτυλο – CoA. Οι αντιδράσεις του κύκλου λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών οργανισμών.

### 2.6.2 Περιγραφή του κύκλου Krebs

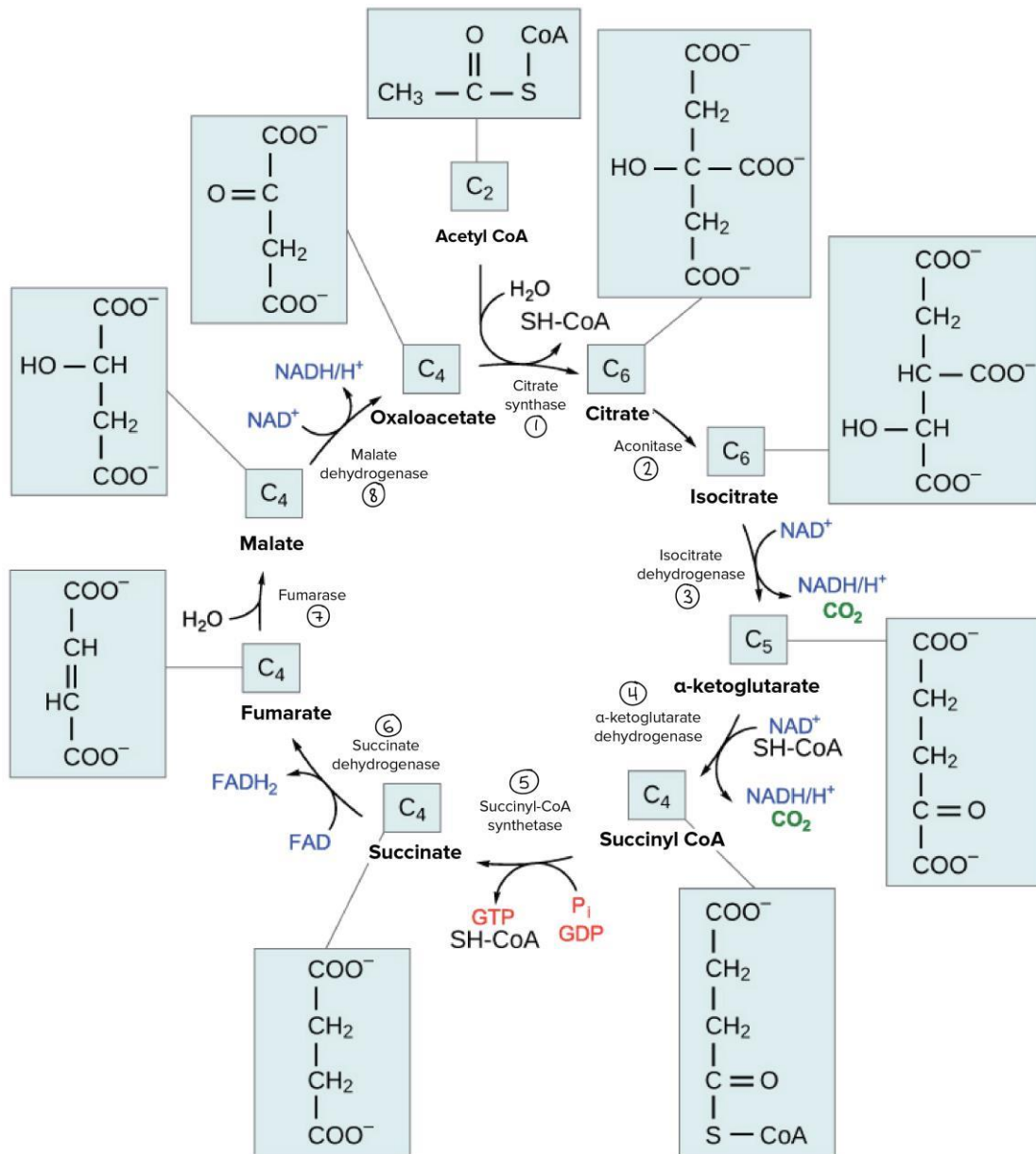
- i. Ο κύκλος αρχίζει με το οξαλοξικό που συμπυκνώνεται με το ακέτυλο – CoA, δίνοντας κίτρυλο – CoA, το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται σε κιτρικό και CoA. Πρόκειται για μία αλδολική συμπύκνωση που ακολουθείται από υδρόλυση και καταλύεται από την κιτρική συνθάση.
- ii. Το κιτρικό για λόγους στερεοχημικής παρεμπόδισης ισομεριώνεται σε ισοκιτρικό. Η ισομερίωση πραγματοποιείται σε δύο βήματα, μία αφυδάτωση και στη συνέχεια μία ενυδάτωση, που όμως καταλύονται από το ίδιο ένζυμο, την ακονιτάση.
- iii. Το ισοκιτρικό οξειδώνεται και αποκαρβοξυλιώνεται σε α-κετογλουταρικό, μέσω της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται και η αναγωγή ενός  $\text{NAD}^+$  σε  $\text{NADH}$ . Στο στάδιο αυτό υπάρχει η πρώτη απώλεια C με τη μορφή  $\text{CO}_2$ . Επιπλέον, το στάδιο είναι σημαντικό για τη συνολική ταχύτητα του κύκλου, καθώς αποτελεί ένα από τα σημεία ελέγχου του.
- iv. Το επόμενο βήμα είναι η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του α-κετογλουταρικού σε ηλεκτρυλο – CoA. Το σύμπλεγμα της α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης που καταλύει αυτήν την αντίδραση, είναι ομόλογο με εκείνο της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, ενώ και οι αντιδράσεις (η παρούσα με την Swanson) είναι μεταξύ τους αντίστοιχες. Αυτό είναι το στάδιο με τη δεύτερη απώλεια C με τη μορφή  $\text{CO}_2$ .
- v. Ακολουθεί η διάσπαση του θειοεστερικού δεσμού του ηλεκτρυλο – CoA, που είναι συζευγμένη με τη φωσφορυλίωση ενός διφωσφορικού νουκλεοζίτη μίας πουρίνης, (συνήθως γουανίνης GDP). Το ένζυμο που καταλύει την

συγκεκριμένη αντίδραση είναι η συνθετάση του ηλεκτρυλο – CoA, ενώ τα προϊόντα είναι το ηλεκτρικό και η GTP.

- vi. Τελικό βήμα της διεργασίας του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων είναι η αναπαραγωγή του οξαλοξικού από την οξειδωση του ηλεκτρικού. Αυτό πραγματοποιείται από μία σειρά αντιδράσεων που παραπέμπουν στην β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα, αρχικά το ηλεκτρικό οξειδώνεται σε φουμαρικό, από την ηλεκτρική αφυδρογονάση και με ταυτόχρονη αναγωγή ενός FAD σε FADH<sub>2</sub>. Εν συνεχεία, το φουμαρικό ενυδατώνεται προς L – μηλικό, με τη βοήθεια της φουμαράσης. Τέλος, το L – μηλικό οξειδώνεται σε οξαλοξικό με ταυτόχρονη αναγωγή ενός NAD<sup>+</sup> σε NADH. Το ένζυμο που καταλύει αυτήν την αντίδραση είναι η μηλική αφυδρογονάση.

Συνοψίζοντας, η λειτουργία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων είναι:

1. Η συγκομιδή ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας από τις πηγές οργανικών καύσιμων μορίων (Berg et al, 2002)
2. Μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος παράγονται ενδιάμεσοι μεταβολίτες, όπως το α-κετογλουταρικό που η μετατροπή του σε γλουταμινικό είναι βασική στη βιοσύνθεση πλήθους αμινοξέων, καθώς και στην αφομοίωση της NH<sub>3</sub> (όπως και η μετατροπή του οξαλοξικού σε ασπαραγινικό).
3. Οι αναερόβιοι οργανισμοί επίσης επιδίδονται σε κάποιες από τις αντιδράσεις του κύκλου για να συνθέσουν τους ενδιάμεσους μεταβολίτες που χρειάζονται για τη βιοσύνθεση κυτταρικών τους υλικών. Ο κύκλος όμως σταματά, σε ορισμένα σημεία πέραν των οποίων δεν υπάρχουν χρήσιμοι μεταβολίτες.



Εικόνα 7: Ο κύκλος του κίτρικού οξέος (Πηγή: <https://www.boundless.com/>)

### 2.6.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Εκτός από την αλκοολική ζύμωση, οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί διαθέτουν και άλλον έναν τρόπο καταβολισμού των οργανικών ουσιών, την κυτταρική αναπνοή. Μάλιστα, ο τρόπος αυτός είναι ιδιαίτερος πιο προσοδοφόρος ενεργειακά για το μικροβιακό κύτταρο. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η ζύμωση μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Ανάλογα με τις συνθήκες όμως, διαφορετικά φαινόμενα καθορίζουν την πορεία μιας ζύμωσης και διαφορετικά μονοπάτια ακολουθούνται από τους μικροοργανισμούς για τον καταβολισμό των υποστρωμάτων. Ένα από αυτά, είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η

οποία αποτελεί τη συνέχεια του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, ή ακριβέστερα, την εξαργύρωση των ενεργειακών «νομισμάτων» που αποκομίζει το κύτταρο από αυτόν. Συγκεκριμένα, πρόκειται για τη διεργασία παραγωγής ATP μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από NADH και FADH<sub>2</sub> με τελικό αποδέκτη το O<sub>2</sub> διαμέσου μίας σειράς φορέων ηλεκτρονίων. Για τους αερόβιους οργανισμούς αυτή είναι η σημαντικότερη πηγή ATP (26 – 30 ATP).

#### 2.6.4 Μικροβιακό λίπος

Στο εδάφιο αυτό θα πραγματοποιηθεί μία μικρή αναφορά στο ενδοκυτταρικό λίπος που βρίσκεται στους μικροοργανισμούς. Βάσει της ιδιότητας τους να συνθέτουν μεγάλες ποσότητες λιπαρών οξέων, οι μικροοργανισμοί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες

Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί. Εκείνοι που σε συνθήκες έλλειψης εξοκυτταρικού αζώτου, διασπών τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), με αποτέλεσμα το μικροβιακό κύτταρο να αυξάνεται η ATP και να παρεμποδίζεται αλλοστερικά η δράση της ισοκυτρικής αφυδρογονάσης. Με τον τρόπο αυτό, συσσωρεύονται ισοκυτρικό και κιτρικό οξύ, τα οποία μετά από μία σειρά διεργασιών οδηγούν σε παραγωγή λιπιδίων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, σε συνθήκες έλλειψης N, δίνουν ποσοστό λίπους επί ξηράς βιομάζας > 20%.

Μη ελαιογόνοι. Εκείνοι οι οποίοι σε συνθήκες έλλειψης N υφίστανται αλλοστερική παρεμπόδιση της φωσφοφρουκτοκινάσης από την συσσώρευσή της ATP. Επομένως, καθίσταται αδύνατη η σύνθεση της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης και επέρχεται συσσώρευση της 6 φωσφορικής φρουκτόζης που αυξάνει την ωσμωτική πίεση κι έτσι προκαλεί διάρρηξη των κυττάρων. Αντ' αυτού, πραγματοποιείται πολυμερισμός της 6 – φωσφορικής γλυκόζης προς πολυσακχαρίτες (γλυκογόνο).

## 2.7 Μεταβολική ρύθμισή μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ζυμομύκητες είναι μικροοργανισμοί που μπορούν να εκτελέσουν, τόσο κυτταρική αναπνοή, όσο και αλκοολική ζύμωση. Τα εξαρτόμενα από το οξυγόνο φαινόμενα φυσιολογίας, κατηγοριοποιούνται σε τέσσερα διαφορετικά φαινόμενα, η εμφάνιση καθενός εκ των οποίων εξαρτάται τόσο από το είδος του μικροοργανισμού, όσο και από το σακχαρούχο υπόστρωμα (Weusthuis, et al., 1994). Τα φαινόμενα αυτά επιγραμματικά περιγράφονται ως εξής:



- Φαινόμενο Crabtree. Αναστολή της κυτταρικής αναπνοής, σε συνθήκες περίσσειας σακχάρου, εν τη παρουσία οξυγόνου.
- Φαινόμενο Pasteur. Αναστολή της αλκοολικής ζύμωσης από την παρουσία οξυγόνου.
- Φαινόμενο Custers. Αναστολή της αλκοολικής ζύμωσης από την απουσία οξυγόνου
- Φαινόμενο Kluyver. Ικανότητα ζυμών να χρησιμοποιούν συγκεκριμένους δισακχαρίτες αερόβια, αλλά όχι αναερόβια, ενώ μπορούν μόνο αναερόβια να χρησιμοποιήσουν τα κατάλοιπά τους (Weusthuis, et al., 1994).

Ακολουθεί σύντομη περιγραφή των φαινομένων, με έμφαση στο φαινόμενο Crabtree που αποτελεί το θέμα της παρούσας μελέτης.

### 2.7.1 Φαινόμενο Crabtree

Σε καλλιέργειες μικροοργανισμών όπου η πηγή άνθρακα (γλυκόζη) είναι περιορισμένη, η παραγωγή του CO<sub>2</sub> ισούται με την κατανάλωση του O<sub>2</sub>. Το επίπεδο της βιομάζας είναι υψηλό στις συνθήκες αυτές (περίπου 0,5 g/g) και η συγκέντρωση εναπομεινάντων σακχάρων είναι χαμηλή. Όσο η συγκέντρωση της γλυκόζης ανεβαίνει, ο μικροοργανισμός αναγκάζεται να αναπαραχθεί ταχύτερα ώστε να διατηρήσει ένα σταθερό πληθυσμό στο θρεπτικό μέσο. Αυτό συνεπάγεται αύξηση στη συγκέντρωση των εναπομεινάντων σακχάρων. Τόσο η παραγωγή του CO<sub>2</sub> όσο και η κατανάλωση του O<sub>2</sub> αυξάνονται αναλογικά με την αύξηση των εναπομεινάντων σακχάρων, αλλά παραμένουν αλληλένδετες έως ενός ορισμένου κρίσιμου σημείου ( $\approx 9$  g/L). Από τη στιγμή που η συγκέντρωση της γλυκόζης θα ξεπεράσει το κρίσιμο σημείο ξεκινά η ζύμωση. Η παραγωγή του CO<sub>2</sub> εξακολουθεί να αυξάνεται ταχέως αλλά δεν είναι πλέον συνυφασμένη με την κατανάλωση του O<sub>2</sub>. Η έναρξη της ζύμωσης ακολουθείται από κατακόρυφη πτώση της βιομάζας σε επίπεδα κάτω από 0,2 g/g (Pfeiffer & Morley, 2014). Εν ολίγοις, τα κύτταρα δισαθάνονται την παρουσία της γλυκόζης και μεταδίδουν το σήμα για την παύση της αναπνευστικής δραστηριότητας (Postma et al, 1989).

Η ικανότητα της σύνθεσης αιθανόλης από σάκχαρα αποτελεί την κύρια μεταβολική οδό των ζυμών. Υπό αερόβιες συνθήκες, η κυτταρική αναπνοή είναι δυνατή καθώς το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων, όμως ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* και κάποιοι άλλοι μικροοργανισμοί (μόλις 3 γενεές μικροοργανισμών) εξακολουθούν να εκτελούν αλκοολική ζύμωση έως ότου η γλυκόζη (σάκχαρο) εξαλειφθεί από το μέσο. Η ικανότητα αυτή καλείται φαινόμενο Crabtree

(Hagman & Piškur, 2015). Η δυνατότητα των μικροοργανισμών αυτών να επιδίδονται σε αλκοολική ζύμωση τόσο σε αναερόβιες όσο και σε αερόβιες συνθήκες αποτελεί μια από τις πιο υποσχόμενες ιδιότητές τους (Hagman et al., 2013). Παρά ταύτα, είναι δυνατή η διατήρηση του μεταβολισμού μέσω της κυτταρικής αναπνοής ως μόνης μεταβολικής οδού, σε απολύτως αερόβιες συνθήκες, εάν το σάκχαρο στο θρεπτικό μέσο, δεν υπερβαίνει μία συγκεκριμένη, αρκετά χαμηλή, συγκέντρωση που καλείται κρίσιμη συγκέντρωση, ή χρησιμοποιώντας ημισυνεχείς καλλιέργειες (fed-batch). Με άλλα λόγια, όταν ο ρυθμός ανάπτυξης στο μέσω καλλιέργειας για μικροοργανισμούς όπως ο *S. cerevisiae* υπερβαίνει τον αποκαλούμενο κρίσιμο ρυθμό ανάπτυξης, η αιθανόλη ξεκινά να συσσωρεύεται (Compagno et al., 2014).

Στην περίπτωση της αλκοολικής ζύμωσης ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι η αιθανάλη (ακεταλδεΐδη) που στη συνέχεια ανάγεται σε αιθανόλη. Οι θετικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες, επιδίδονται σε ζύμωση ακόμα και εν τη παρουσία O<sub>2</sub>, όταν θα μπορούσαν εν αρχή να βασίζονται στην αναπνοή. Το γεγονός αυτό προκαλεί έκπληξη, καθώς η ζύμωση, έχει σαφώς χαμηλότερο επίπεδο παραγωγής ATP από την κυτταρική αναπνοή. Όμως, η αλκοολική ζύμωση δεν απαιτεί την παρουσία οξυγόνου κι έτσι επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να συνθέτουν ATP και σε σχεδόν αναερόβιες συνθήκες (Pfeiffer & Morley, 2014). Σε συνθήκες πλήρους αναεροβίωσης καθίσταται αδύνατη η επιβίωση των ζυμών καθώς χρειάζονται κάποιο πολύ μικρό ποσοστό οξυγόνου ώστε να μπορέσουν τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης και άλλων συστατικών των κυτταρικών τους μεμβράνων.

### 2.7.2 Προέλευση του φαινομένου Crabtree

Το φαινόμενο Crabtree αναφέρεται για πρώτη φορά στην εργασία του Herbert Grace Crabtree με τίτλο «Observations on the carbohydrate metabolism of tumours» το 1929. Συγκεκριμένα η αναφορά έγινε ως προς την αποτυχία της εμφάνισης του φαινομένου Pasteur και την ανάπτυξη αερόβιας ζύμωσης έναντι αναπνοής, χωρίς όμως περαιτέρω διερεύνηση (Crabtree, 1929).

Πλήθος γενετικών γεγονότων, όπως ο διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος (WGD), που έλαβε χώρα περίπου 100.000.000 χρόνια πριν, η επαναρύθμιση του μεταβολισμού των ζυμών και ο διπλασιασμός των μεταφορέων των εξοζών, πιθανώς συνέβαλαν στο φαινόμενο Crabtree. Ωστόσο, παρά τη γνώση του μηχανισμού, οι εξελικτικές δυνάμεις που οδήγησαν στο φαινόμενο δεν είναι απόλυτα γνωστές (Pfeiffer

& Morley, 2014). Σε κάποιες έρευνες, στα προαναφερθέντα εξελικτικά γεγονότα αναφέρεται ο διπλασιασμός της αλκοολικής αφυδρογονάσης και ο διαχωρισμός της σε δύο διακριτά ένζυμα. Άλλες έρευνες αναφέρουν πως η προέλευση του φαινομένου εμφανίζεται ταυτόχρονα με άλλα εξελικτικά γεγονότα, όπως η οριζόντια μεταφορά του γονιδίου URA 1 (γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή του ενζύμου «αφυδρογονάση του διυδροοροτικού οξέος»), η εμφάνιση του πολλαπλασιασμού υπό αναερόβιες συνθήκες και την εξάλειψη του αναπνευστικού συμπλέγματος I (Hagman & Piškur, 2015). Από την άλλη πλευρά, η ικανότητα του ζυμομύκητα *Lachancea* να εκτελεί ζύμωση σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, υποδεικνύει πως η εμφάνιση της ζύμωσης ως τρόπος ανάπτυξης των μικροοργανισμών προϋπήρχε του διαχωρισμού των γενεών *Saccharomyces* και *Lachancea* (πραγματοποιήθηκε περίπου 120-150.000.000 χρόνια πριν). Με άλλα λόγια η προέλευση του φαινομένου Crabtree είτε τοποθετείτε ωρίς στην εξέλιξη των Ασκομυκήτων, αλλά στη συνέχεια εξαφανίστηκε από κάποιες γενεές, είτε η ζυμωτική διαδικασία εμφανίστηκε και επελέγη ταυτόχρονα σε συγκεκριμένες γενεές (Hagman et al., 2013). Ανεξάρτητη, ωστόσο, θεωρείται η προέλευση του ζυμωτικού τρόπου ζωής.

Είναι δυνατό σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και οξυγόνου, οι ζύμες να εκτελέσουν αλκοολική ζύμωση, κυτταρική αναπνοή, ή κάποιο συνδυασμό των δύο ατραπών, ανάλογα με τις συνθήκες. Σε έρευνες του παρελθόντος που έχουν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά σάκχαρα, είναι εμφανές πως το φαινόμενο Crabtree είναι καθοριστικό για τη ανάπτυξη, των θετικών σε αυτό, μικροοργανισμών σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Σε άλλα υποστρώματα όπως μαννόζη και γαλακτόζη, η ζύμωση πραγματοποιείται ταυτόχρονα με κυτταρική αναπνοή, με την αναπνοή να εμφανίζει σε ακόμα και υψηλότερο ρυθμό. Το χαμηλό επίπεδο της αναπνοής στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε γλυκόζη οφείλεται σε αναστολή της σύνθεσης των κυτοχρωμάτων a, b, c που συμμετέχουν της αναπνευστικής αλυσίδας (De Deken, 1966). Τα γεγονότα τα οποία με βεβαιότητα σχετίζονται με το φαινόμενο Crabtree είναι δύο: οι αρνητικές κατά Crabtree ζύμες είναι σε θέση να εκτελούν μόνο κυτταρική αναπνοή, ενώ οι θετικές μπορούν να εκτελούν ταυτόχρονα αναπνοή και ζύμωση (Pfeiffer & Morley, 2014). Σε πιο πρόσφατες έρευνες έχει αποδειχθεί πως εκτός της σύνθεσης των κυτοχρωμάτων, οι υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρου καταστέλλουν τη δράση των πρώτων ενζύμων του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, (π.χ. της NAD<sup>+</sup> - ισοκιτρικής αφυδρογονάσης). Επομένως, οι ζύμες ανάλογα με τον κορεσμό σε οξυγόνο και τη συγκέντρωση του σακχάρου, μπορούν να εμφανίσουν συμπεριφορές που συνοψίζονται ακολούθως:

Οι αρνητικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες

- i. Παρουσία O<sub>2</sub>, δίνουν βιομάζα και δεν δίνουν αιθανόλη
- ii. Απουσία O<sub>2</sub>, δεν δίνουν βιομάζα, ούτε αιθανόλη

Οι θετικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες

- i. Υψηλή συγκέντρωση σακχάρου οδηγεί σε παραγωγή αιθανόλης
- ii. Χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου οδηγεί σε παραγωγή βιομάζας

Από τις γενεές των θετικών κατά Crabtree μικροοργανισμών, περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την γενεά *Saccharomycetaceae*, καθώς ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος στην Βιομηχανία Τροφίμων και κυρίως στην Οινολογία. Ωστόσο, οι θετικοί στο φαινόμενο Crabtree μικροοργανισμοί, έχουν ένα μειονέκτημα έναντι των αρνητικών. Λόγω της χρήσης μέρους του σακχάρου προς την παραγωγή αιθανόλης, δεν προκαλείται μεγάλη αύξηση του πληθυσμού τους, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τον ανταγωνισμό τους με άλλους μικροοργανισμούς στη φύση (Hagman et al., 2013).

### 2.7.3 Φαινόμενο «Σύνθεσης – Συσσώρευσης – Κατανάλωσης» αιθανόλης (Make – Accumulate – Consume Life strategy)

Ενώ οι γενεές των ζυμών μετά το WGD έχουν εξεφρασμένο το φαινόμενο Crabtree, η αλκοολική ζύμωση δεν περιορίζεται στις γενεές αυτές. Ένα άλλο γεγονός που έχει λάβει μεγάλη προσοχή είναι ο διπλασιασμός της αλκοολικής αφυδρογονάσης και ο διαχωρισμός της σε δύο διακριτά ένζυμα την Adh 1 και την Adh 2 (Pfeiffer & Morley, 2014). Το γεγονός αυτό παρέχει την έναρξη μίας προσπάθειας εξήγησης της επιλογής της επιζήμιας (ενεργειακά) αλκοολικής ζύμωσης, έναντι της συμφέρουσας κυτταρικής αναπνοής από τις θετικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες (Piškur, et al., 2006).. Η θεωρία αυτή, καλούμενη «Σύνθεση – Συσσώρευση – Κατανάλωση» αιθανόλης (Make – Accumulate – Consume Life strategy), βασίζεται στην ιδέα πως οι θετικοί στο φαινόμενο Crabtree μικροοργανισμοί, ζυμώνουν τη γλυκόζη προκειμένου να αμυνθούν έναντι των άλλων μικροοργανισμών που συνυπάρχουν σε πλούσια σε σάκχαρα υποστρώματα (Sarris, et al., 2014). Μέσω της αλκοολικής ζύμωσης στο υπόστρωμα προκαλείται έκρηξη τοξικότητας από την παραγόμενη αιθανόλη στην οποία όμως οι ζυμομύκητες είναι ανθεκτικότεροι, των λοιπών μικροοργανισμών. Το σημαντικότερο όμως είναι το γεγονός, πως οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν στη συνέχεια να καταβολίσουν την παραγόμενη αιθανόλη, όταν οι προτιμώμενοι υδατάνθρακες στο

υπόστρωμα έχουν καταναλωθεί. Σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα, έχει παρατηρηθεί η έναρξη της κατανάλωσης της αιθανόλης, ενώ υπάρχει ακόμα σάκχαρο στο μέσο καλλιέργειας, γεγονός που υποδεικνύει πως ο μεταβολισμός πραγματοποιείται και με τους δύο τρόπους, δηλαδή ζύμωση και κυτταρική αναπνοή (Hagman et al., 2013). Σε αερόβιες συνθήκες, η αιθανόλη, οξειδώνεται σε αιθανάλη μέσω το ενζύμου της αλκοολικής αφυδρογονάσης (Adh 2). Η αιθανάλη οξειδώνεται σε οξικό οξύ, το οποίο μετατρέπεται σε ακέτυλο συνένζυμο Α και εισέρχεται στο μιτοχόνδριο και τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων. Τα εξελικτικά γεγονότα που οδήγησαν στην εμφάνιση του φαινομένου αυτού είναι πιθανώς τα ίδια με εκείνα που συνετέλεσαν στην εμφάνιση του φαινομένου Crabtree. Χρονικά το φαινόμενο κατανάλωσης της συσσωρευμένης αιθανόλης αποδίδεται στο διάστημα που συνδέει την απαρχή της ικανότητας ανάπτυξης σε αναερόβιες συνθήκες, την οριζόντια μεταφορά του γονιδίου URA 1 και την απώλεια του συμπλέγματος I από την αναπνευστική αλυσίδα. Ωστόσο, ταυτόχρονα με αυτά τα φαινόμενα, εμφανίστηκε και μία μετάλλαξη (petite mutation), η οποία ορίζεται ως η αδυναμία κάποιων ζυμών να αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μόνο μη ζυμώσιμα σάκχαρα όπως γλυκερόλη ή αιθανόλη. Σε άλλες έρευνες, που αφορούν την εμφάνιση του φαινομένου στο μικροοργανισμό *Dekkera bruxellensis*, αναφέρεται χαρακτηριστικά πως τόσο στις μετά – WGD γενεαλογίες, όσο και στη γενεαλογία *Dekkera* έχει χρησιμοποιηθεί το ίδιο μοριακό εργαλείο, ο επαναπρογραμματισμός του καθολικού υποκινητή (global promoter rewiring), για να αλλάξουν τα πρότυπα ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αναπνοή, έχοντας σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση αιθανόλης και συνεπαγωγικά την ανάπτυξη της στρατηγικής «σύνθεσης – συσσώρευσης – κατανάλωσης» αιθανόλης (Rozpedowska, et al., 2011).

#### 2.7.4 Φαινόμενο Pasteur

Εκτός της συγκεντρώσεως του σακχάρου, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σημαντικός παράγων στην κατεύθυνση του κυτταρικού μεταβολισμού των ζυμών είναι ο κορεσμός του μέσου καλλιέργειας σε οξυγόνο. Η επίδραση του οξυγόνου στην επιλογή ατραπού αποικοδόμησης της γλυκόζης εξαρτάται από ένα φαινόμενο, που καλείται φαινόμενο Pasteur. Αρχικά, το φαινόμενο Pasteur θεωρούνταν η καταστολή της αλκοολικής ζύμωσης, από την κυτταρική αναπνοή (De Deken, 1965). Εν συνεχεία, ανακαλύφθηκε πως το κιτρικό οξύ λειτουργεί ως αναστολέας της φωσφοφρουκτοκινάσης. Εν τη παρουσία οξυγόνου, κάτω από ένα συγκεκριμένο ποσοστό οξυγόνου, καταστέλλονται

τα ένζυμα του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (π.χ. α-κετογλουταρική αφυδρογονάση) ενώ ενεργοποιούνται τα ένζυμα του γλυκολυτικού σχήματος (π.χ. φωσφοφρουκτοκινάση). Με άλλα λόγια, η παρουσία O<sub>2</sub> ενεργοποιεί την αναπνευστική αλυσίδα, και την παραγωγή βιομάζας, ενώ ταυτόχρονα, μειώνεται η κινητική της αλκοολικής ζύμωσης και άρα της παραγωγής αιθανόλης. Συγκεκριμένα, οι συνθήκες αυτές χρησιμοποιούνται στην βιομηχανική παραγωγή επιλεγμένων ζυμών (Sarris & Papanikolaou 2016). Με τον τρόπο αυτό αποδεικνύεται πως η ζύμωση είναι η διαδικασία που χωρεί υπό αναερόβιες συνθήκες. Μεταξύ των 2 φαινομένων (Pasteur και Crabtree), φαίνεται πως εκείνο που υπερτερεί είναι το φαινόμενο Crabtree, καθώς άνωθεν της κρίσιμης συγκέντρωσης σακχάρου, οι θετικοί κατά Crabtree μικροοργανισμοί, πραγματοποιούν αλκοολική ζύμωση ακόμη και σε πλήρως αερόβιες συνθήκες (πανεπιστημιακές σημειώσεις Παπανικολάου Σ. 2016).

### 2.7.5 Φαινόμενο Custers

Το φαινόμενο Custers αναφέρεται στην αναστολή της αλκοολικής ζύμωσης σε αναερόβιες συνθήκες και θεωρείται ένα κοινό βιοχημικό χαρακτηριστικό κυρίως ζυμών που ανήκουν στις γενεές *Brettanomyces* και *Dekkera*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μετατρέπουν τη γλυκόζη σε αιθανόλη και οξικό οξύ σε αερόβιες συνθήκες. Ωστόσο, αν οι συνθήκες αλλάξουν από αερόβιες σε αναερόβιες, η αλκοολική ζύμωση δέχεται ισχυρή αναστολή. Ο μόνος τρόπος να επανέλθει η διεργασία, είναι η εκ νέου εισαγωγή οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας (Sarris & Papanikolaou, 2016).

### 2.7.6 Φαινόμενο Kluuyver

Πολλά είδη σακχάρων μπορούν να αποτελέσουν υποστρώματα για την ανάπτυξη ζυμομυκήτων. Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις, η αύξηση των μικροοργανισμών, σε συγκεκριμένα σάκχαρα (κυρίως ολιγσακχαρίτες), χωρεί αποκλειστικά σε αερόβιες συνθήκες και όχι σε συνθήκες αναεροβίωσης, ή σε αναστολή της κυτταρικής αναπνοής. Η αλκοολική ζύμωση αναστέλλεται υπό αυτές τις συνθήκες. Αυτή η εξάρτηση που εμφανίζεται μεταξύ του καταβολισμού ορισμένων σακχάρων από την κυτταρική αναπνοή, καλείται «φαινόμενο Kluuyver» και οι μικροοργανισμοί που το εκδηλώνουν καλούνται θετικοί κατά Kluuyver μικροοργανισμοί (Fukuhara, 2003).

## 2.8 Αρωματικές ενώσεις

Το άρωμα είναι ένα από τα πλέον ξεχωριστά χαρακτηριστικά του οίνου (Lambrechts & Pretorius, 2000). Η χημική σύσταση του οίνου είναι το θεμέλιο της αρωματικής του

ποιότητας. Μαζί με τα συστατικά της ποικιλίας της σταφυλής, πολλές από τις αρωματικές ενώσεις που υπάρχουν στον οίνο, παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους από τις ζύμες (Rodríguez, et al., 2010). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το άρωμα των οίνων οφείλεται στις πτητικές ενώσεις που περιέχονται σε αυτούς, και χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:

- Πρωτογενές άρωμα. Άρωμα ποικιλίας
- Δευτερογενές άρωμα. Ενώσεις που παράγονται από την αλκοολική ζύμωση
- Τριτογενές άρωμα. Άρωμα που αποκτά ο οίνος από τις διεργασίες ωρίμανσης

Ακολουθεί περιγραφή των ενώσεων αυτών και κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με τη χημική τους ταυτότητα, αλλά και τη συνεισφορά τους στο άρωμα του τελικού προϊόντος.

Πίνακας 6: Κατηγοριοποίηση των αρωματικών ουσιών σύμφωνα με την προέλευσή τους

Πρωτογενές άρωμα	Δευτερογενές άρωμα	Τριτογενές άρωμα
Τερπένια	Ανώτερες αλκοόλες	Εστέρες
Τερπενόλες	Εστέρες	Λακτόνες
Πυραζίνες	Πτητικά λιπαρά οξέα	Φουμαρικές ενώσεις
θειόλες	Αλδεΐδες	Αλδεΐδες

Οι ενώσεις που απαντούν συχνότερα στον οίνο ανήκουν στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Τερπένια. Τα τερπένια αποτελούνται από μονάδες ισοπρενίου, σε υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες ή εστέρες, ενώ μπορεί να είναι ελεύθερα ή με τη μορφή γλυκοζιτών. Υπάρχουν περίπου 40 που έχουν ήδη αναγνωριστεί σε ποικιλίες σταφυλιών (González-Barreiro, et al., 2015). Σε τερπένια οφείλονται τα αρώματα της βιολέτας, του τριαντάφυλλου, αλλά και κάποιων εξωτικών φρούτων.
- Πυραζίνες. Οι πυραζίνες είναι ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις που περιέχουν άτομα N. Ανήκουν στα πρωτογενή αρώματα και δίνουν στους οίνους χαρακτήρα λαχανικών με αρώματα όπως αυτά της πατάτας, της πιπεριάς, του φασολιού κ.α. (González-Barreiro, et al., 2015).
- Κετόνες. Ενώσεις όπως τα νορισοπρενοειδή με παρεμφερή αρώματα με αυτά των τερπενίων. Κάποιες από αυτές προϋπάρχουν στο σταφύλι, όπως η β-ιονόνη (οσμή βιολέτας) και η β-δαμασκινόνη (τριαντάφυλλο). Η σημαντικότερη κετόνη που μπορεί να εμφανιστεί στον οίνο, είναι το διακετύλιο, που δίνει

άρωμα βουτύρου και καραμέλας ανάλογα με τη συγκέντρωσή του. Ανήκει στα δευτερογενή αρώματα και προέρχεται κυρίως από τη μηλικογαλακτική βιομετατροπή, ή από την αλκοολική ζύμωση, αν αυτή πραγματοποιηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία (πανεπιστημιακές παραδόσεις Καλλίθρακα 2015).

- Αλδεΐδες. Κάποιες αλδεΐδες υπάρχουν στο φρούτο και δίνουν χορτώδεις οσμές, πολλές προέρχονται από δράση ενζύμων σε λιπαρά οξέα και άλλες από επίδραση υψηλών θερμοκρασιών σε σάκχαρα ενώ υπάρχουν και οι αλδεΐδες της βελανιδιάς που εκχυλίζονται στον οίνο κατά την ωρίμανση. Τέλος, υπάρχει η ακεταλδεΐδη που είναι προϊόν οξείδωσης της αιθανόλης και δίνει δυσάρεστη οσμή οξείδωσης στον οίνο.
- Αλκοόλες. Παράγονται από τη δράση των ζυμομυκήτων είτε απευθείας στα σάκχαρα, είτε στα αμινοξέα των σταφυλιών (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν θετικά αρώματα, ενώ σε υψηλές επιφέρουν αρνητικά αποτελέσματα. Στις αλκοόλες και συγκεκριμένα στις πολυόλες ανήκει και η γλυκερόλη, που αναφέρθηκε ανωτέρω, η οποία όμως, αν καταναλωθεί από βακτήρια δίνει ακρολεΐνη που αντιδρώντας με φαινόλες και ανθοκυάνες, δίνει πικρή γεύση στον οίνο.
- Εστέρες. Οι εστέρες είναι δευτερογενή αρώματα και κυρίως πρόκειται για οξικούς εστέρες ανώτερων αλκοολών ή αιθυλεστέρες (προερχόμενους από αντιδράσεις της αιθανόλης με πτητικά οξέα). Οι εστέρες μικρής αλύσου δίνουν οσμές φρούτων όπως μπανάνα, ανανάς και μήλο, και οι ενώσεις μακράς αλύσου, αρώματα σαπουνιού και κολόνιας. Ωστόσο, ο οξικός αιθυλεστέρας, που συχνά υπάρχει στον οίνο, δίνει την οσμή της κόλλας και θεωρείται ελάττωμα (González-Barreiro, et al., 2015).
- Λακτόνες. Οι λακτόνες είναι κυκλικοί εστέρες που προέρχονται από αντιδράσεις εστεροποίησης μεταξύ μίας καρβοξυλομάδας και ενός υδροξυλίου του ίδιου μορίου (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Οι ενώσεις αυτές αποδίδονται στην ποικιλία, στη δράση των μικροοργανισμών αλλά και στην ωρίμανση σε δρύινα βαρέλια. Δίνουν αρώματα καραμέλας, βουτύρου, καρύδας κ.α.
- Θειούχες ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να προκύψουν είτε από την αποικοδόμηση των αμινοξέων που περιέχουν θείο (κυστεΐνη, μεθειονίνη) από τους μικροοργανισμούς, την αυτόλυση των ζυμών και άλλων αντιδράσεων (δευτερογενές άρωμα) είτε από την αναγωγική παλαίωση των οίνων (τριτογενές άρωμα). Οι επί μέρους κατηγορίες, είναι οι θειόλες, οι θείο – αλκοόλες, τα



σουλφίδια και τα σουλφοξειδία. Οι ενώσεις αυτές έχουν πολύ άσχημα αρώματα, όπως οσμές από σκόρδο και λάστιχο. Επομένως είναι ιδιαίτερος ανεπιθύμητες για τον οίνο (González-Barreiro, et al., 2015).

### 2.8.1 Συνεισφορά μικροοργανισμών στο αρωματικό προφίλ

Η πολυπλοκότητα τόσο της γεύσης όσο και του αρώματος των οίνων οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στη δράση των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τους. Συχνά χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία λέξεις όπως *flavor*, *aroma* ή *bouquet* που μεταφράζονται με σχετική ακρίβεια ως «άρωμα στόματος» και αναφέρονται στον συνδυασμό μεταξύ οσμής και γεύσης. Την πλειονότητα των πτητικών ουσιών που προέρχονται από το μεταβολισμό του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* αποτελούν η αιθανόλη, η γλυκερόλη και το διοξειδίο του άνθρακα (Fleet, 2003). Οι ενώσεις αυτές είναι σημαντικές για τη γεύση του οίνου, όμως την πολυπλοκότητα του αρώματος και της γεύσης τη διαμορφώνουν τα υπόλοιπα συστατικά που αναφέρθηκαν ανωτέρω. Η συνεισφορά των άγριων ζυμών στα πτητικά χαρακτηριστικά φαίνεται να είναι καθοριστική στην σύνθεση των συστατικών αυτών. Σε αρκετές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί φαίνεται πως η ζύμωση από καλλιέργειες άγριων ζυμών είτε ταυτόχρονα, είτε πριν τη ζύμωση από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* επιφέρει καλύτερο οργανοληπτικό αποτέλεσμα (Lambrechts & Pretorius, 2000). Μάλιστα, αιτία για την παραγωγή των πτητικών αρωματικών ενώσεων, από τις άγριες ζύμες, στις περιπτώσεις αυτές θεωρείται πως είναι ο ανταγωνισμός μεταξύ των στελεχών αυτών με το μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* (Garde – Cerdan & Ancin – Azpilicueta, 2005).

## 2.9 Μικροοργανισμοί

Οι περισσότερες μελέτες που ασχολούνται με τη Μικροβιολογία οίνου, εστιάζουν στον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* και άλλα είδη του γένους *Saccharomyces*, καθώς είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο στην Οινική Βιομηχανία. Ωστόσο, στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, συμμετέχει και μεγάλο πλήθος μικροοργανισμών *non – Saccharomyces*, οι οποίοι συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στα χαρακτηριστικά του οίνου. (Fernandez et al., 2000). Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μία αυξανόμενη ζήτηση για νέα και βελτιωμένα στελέχη μικροοργανισμών τα οποία να μπορούν να προσαρμοστούν στους διάφορους τύπους οίνου. (Pretorius, 2000)

### 2.9.1 Οι ζυμομύκητες

Οι ζύμες ορίζονται ως μονοκύτταροι μύκητες που αναπαράγονται με μονογονία, είτε μέσω διχοτόμησης είτε μέσω εκβλάστησης. Οι ζυμομύκητες μπορούν να χωριστούν σε τρεις επί μέρους κατηγορίες: τους Ασκομύκητες, τους Ατελείς Μύκητες και τους Βασιδιομύκητες. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται βάσει της αναπαραγωγικής μεθόδου που ακολουθούν οι τρεις αυτές κατηγορίες. Οι ζύμες που απαντούν στους φλοιούς των σταφυλών, ανήκουν στις δύο πρώτες από τις προαναφερθείσες ομάδες (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

Η συνεισφορά πλήθους ζυμομυκήτων που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* στην αλκοολική ζύμωση είναι ένα θέμα που εξετάζεται από τη σύγχρονη οινολογία και προκαλεί εκτενείς διενέξεις. Οι ζυμομύκητες αυτοί υπάρχουν αρχικά σε όλες τις ζυμώσεις των οίνων, είναι μεταβολικά ενεργοί και τα προϊόντα τους επηρεάζουν την ποιότητα του οίνου. Παρότι κάποιες φορές θεωρούνται μικροβιακή προσβολή, υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις για το αντίθετο και έτσι θεωρείται πως έχουν θετικό αντίκτυπο στους οίνους. (Jolly et al., 2006). Επίσης, οι μικροοργανισμοί των άλλων γενών θεωρούνταν πως παράγουν μικρές ποσότητες αιθανόλης και έχουν μικρή ανθεκτικότητα στα υψηλά ποσοστά αυτής. Πλέον οι θεωρίες αυτές έχουν διαψευστεί καθώς υπάρχουν αρκετά στελέχη μικροοργανισμών, που επιβιώνουν σε προχωρημένα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Είναι λοιπόν προφανές, πως η μελέτη των γενών αυτών όσον αφορά τη συμμετοχή τους στην αλκοολική ζύμωση καθίσταται απαραίτητη, καθώς ενδέχεται να δώσει αποτελέσματα που θα οδηγήσουν σε χρήση τους από την οικιακή βιομηχανία. (Ciani & Maccarelli, 1997).

Ένας ακόμα σημαντικός λόγος για τον οποίο καθίσταται σημαντική η μελέτη των άγριων ζυμών, είναι η ενζυμική τους δραστηριότητα. Στις ζύμες αυτές έχουν βρεθεί ένζυμα όπως είναι οι πηκτινάσες, οι πρωτεάσες και οι πολυγαλακτουρονάσες, που επηρεάζουν τον οίνο καθώς συμμετέχουν σε διεργασίες που αφορούν κυρίως την παραγωγή αρωματικών ουσιών, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Ακόμα τα ένζυμα αυτά διασπούν τις πρωτεΐνες που προκαλούν θολερότητα κι έτσι συμμετέχουν τόσο τη διαύγαση όσο και στην πρωτεϊνική σταθεροποίηση του οίνου. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να διαπιστωθεί η δυνατότητα της εξωκυτταρικής παραγωγής των ενζύμων αυτών από τις άγριες ζύμες. (Fernandez M. et al., 2000).

Μία ακόμα τάση που έχει δημιουργηθεί και μελετάται τα τελευταία χρόνια, είναι η ζύμωση από ελεγχόμενη κοινή καλλιέργεια άγριας ζύμης και σακχαρομύκητα. Με τον τρόπο αυτό είναι εκμεταλλεύσιμη η διαδικασία της αυθόρμητης έναρξης της ζύμωσης ενώ παράλληλα αποφεύγεται ο κίνδυνος παρακώλυσης της ζύμωσης. (Ciani et al., 2009). Άλλωστε, επειδή το φυσικό υπόστρωμα της αλκοολικής ζύμωσης δεν είναι αποστειρωμένο, η διεργασία χωρίς την ανθρώπινη παρέμβαση ξεκινά από ζύμες του φυτού και μετά από 3 – 4 μέρες αντικαθίστανται από τον *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2.10 Σκοπός της μελέτης

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν φαινόμενα ζύμωσης από διαφορετικά στελέχη μικροοργανισμών για την παραγωγή προϊόντων όπως είναι η αιθανόλη, τα λιπαρά οξέα, τα αρωματικά συστατικά κ.α., με σκοπό την διερεύνηση της πιθανότητας χρήσης τους στη βιομηχανία οίνου. Ο όρος «ζύμωση» αναφέρεται στην διεργασία μετατροπής ορισμένων πρώτων υλών που καλούνται «υπόστρωμα», με την παρέμβαση πάντοτε μικροοργανισμών, προς προϊόντα περισσότερο χρήσιμα προς τον άνθρωπο σε σχέση με το υλικό εκκινήσεως. Οι συνθήκες μιας ζύμωσης είναι, θεωρητικά, εντελώς αναερόβιες.

Ο λόγος της επιλογής του συγκεκριμένου θέματος μελέτης είναι η νέα τάση της βιομηχανίας οίνου να στραφεί προς τις αυθόρμητες ζυμώσεις, με τις ιθαγενείς ζύμες των σταφυλιών. Τέτοιου είδους ζυμώσεις, προσφέρουν στον οίνο, χαρακτηριστικότερα αρώματα και αυξάνουν την πολυπλοκότητα και ενισχύουν τα μοναδικά και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε προϊόντος (Ciani et al., 2009).

Μια ακόμα παράμετρος που οδήγησε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι η αυξημένη ανάγκη που παρουσιάζεται σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας, όπως επί παραδείγματι, στον τομέα των μεταφορών, προς τη χρήση αιθανόλης παραγόμενης με βιολογικό τρόπο. Στον προαναφερθέντα τομέα, η χρήση βιοκαυσίμων καθίσταται επιτακτική ανάγκη, τόσο λόγω περιβαλλοντικών παραμέτρων, όσο και εξαιτίας της συνεχούς μείωσης των ορυκτών καυσίμων και κατ' επέκτασιν της αύξησης της αξίας τους (Mecado et al., 2008). Έτσι, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η βιο – κινητική συμπεριφορά στελεχών, με έμφαση στην παραγωγή αιθανόλης, ώστε να ευρεθούν και να μελετηθούν τα στελέχη που είναι κατάλληλα για χρήση, τόσο στην οινοποιητική διαδικασία, όσο και στη βιομηχανία παραγωγής βιοαιθανόλης.

Το φαινόμενο Crabtree, που όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι η ικανότητα κάποιων μικροοργανισμών να εκτελούν αλκοολική ζύμωση, παρουσία οξυγόνου, όταν το σάκχαρο στο μέσο καλλιέργειας υπερβαίνει μία κρίσιμη συγκέντρωση. Οι εργασίες σχετικά με την «ποσοτικοποίηση» του φαινομένου, καθώς και με την περαιτέρω μελέτη της ανάλωσης της παραχθείσας αλκοόλης σε συνθήκες πενίας άνθρακα, είναι επί του παρόντος περιορισμένες, όσον αφορά πολλούς θετικούς στο φαινόμενο μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα ένα από τα στοιχεία πρωτοτυπίας της παρούσας εργασίας είναι και η επιλογή μικροοργανισμών που δεν έχουν μελετηθεί στο παρελθόν.

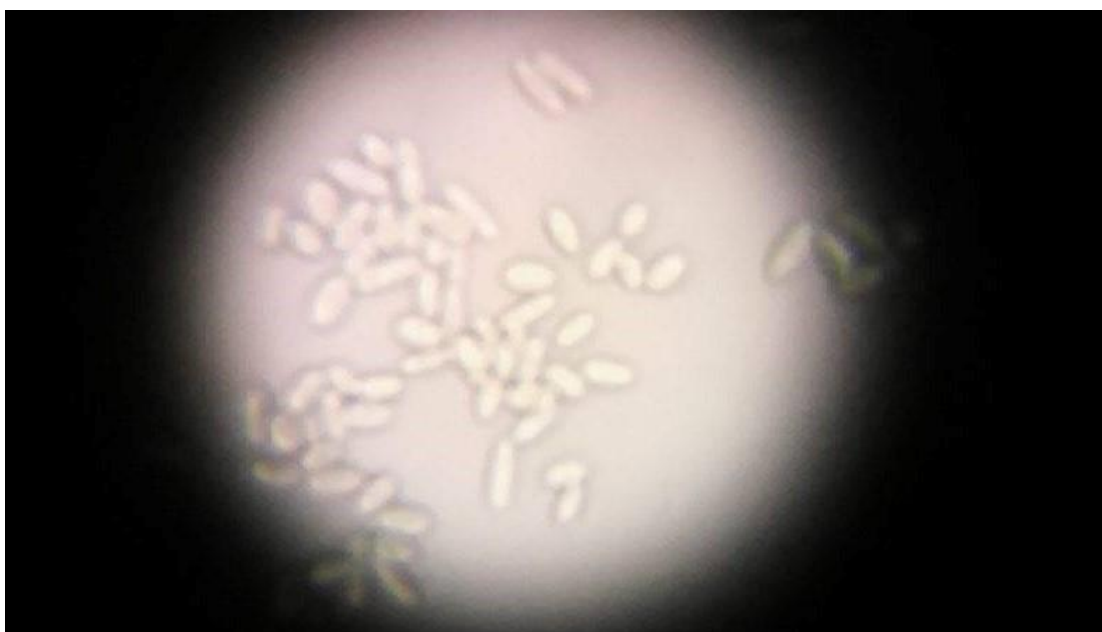
### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### 3.1 Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η αλκοολική ζύμωση για 8 είδη ζυμομυκήτων κατά την αύξησή τους σε κλειστές καλλιέργειες υπό αερόβιες συνθήκες σε αναδευόμενες κωνικές φιάλες. Τα στελέχη αυτά αποθηκεύονται στους 4°C και ανήκουν στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ακολουθεί σύντομη παρουσίαση των βασικών χαρακτηριστικών για τον καθέναν από αυτούς:

#### 3.1.1 *Candida boidinii*

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Candida boidinii* ATCC 32195. Ο μικροοργανισμός *Candida boidinii* χρησιμοποιείται συνήθως για την παραγωγή αιθανόλης από ξυλόζη, (Gonçalves et al., 2013) και την παραγωγή ξυλιτόλης από ξυλόζη, με παραπροϊόντα την αιθανόλη και τη γλυκερόλη (Vandeska et al., 1995).

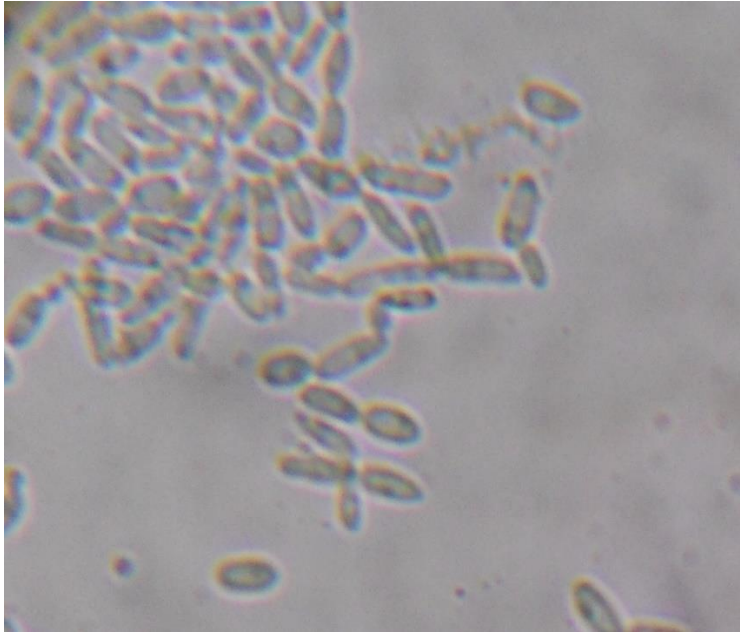


Εικόνα 8: ο μικροοργανισμός *Candida boidinii*

#### 3.1.2 *Candida oleophila*

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Candida oleophila* NRRL Y-1613. Ο μικροοργανισμός *Candida oleophila* έχει μελετηθεί ως προς την ικανότητά του να παράγει κιτρικό οξύ με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, σε συνθήκες έλλειψης αζώτου (Anastassiadis et al., 2005), αλλά και οι τρόποι με τους οποίους μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα ως προς την παραγωγή γευστικών και αρωματικών πτητικών

οργανικών ενώσεων (Buzzini et al., 2003). Το υπό μελέτη στέλεχος έχει καλλιεργηθεί, σε περιοριστικές συνθήκες N, σε υποστρώματα με την ακάθαρτη γλυκερόλη ως υλικό εκκίνησης της ζύμωσης και ουδόλως παρήχθηκε αιθανόλη, ενώ και η σύνθεση λιπιδίων χαρακτηρίστηκε περιορισμένη (Chatzifragkou et al., 2011)



Εικόνα 9: ο μικροοργανισμός *Candida oleophila*

### 3.1.3 *Candida tropicalis*

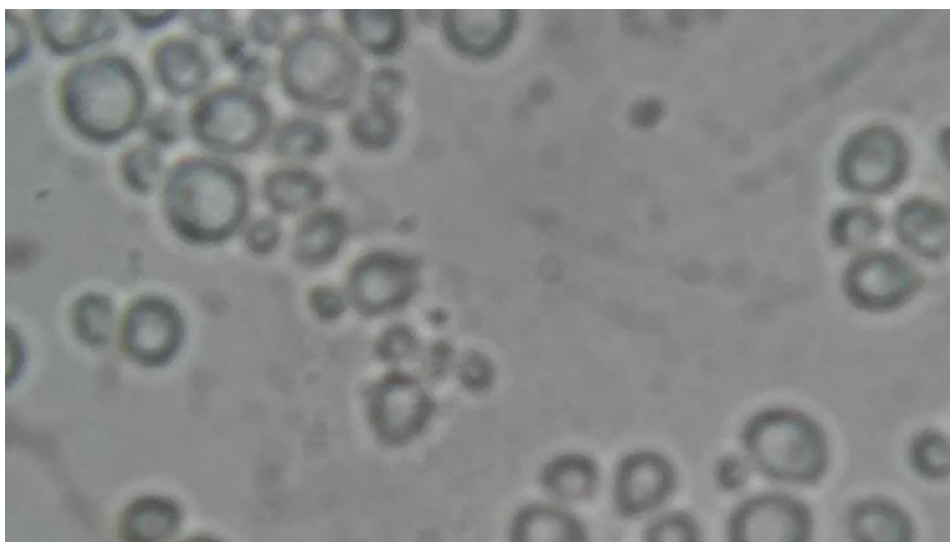
Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Candida tropicalis* NRRL Y-12968. Ο μικροοργανισμός *Candida tropicalis* έχει μελετηθεί ως προς την παραγωγή αιθανόλης από ξυλόζη υπό αερόβιες συνθήκες, διεργασία που υπό αναερόβιες συνθήκες δεν πραγματοποιείται (Jeffers, 1981), ενώ αποδεικνύεται πως βελτιώνει την παραγωγή αιθανόλης σε συνδυασμό με το μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* σε ορισμένα υποστρώματα (Sopandi & Wardah, 2017).



Εικόνα 10: Ο μικροοργανισμός *Candida tropicalis*.

### 3.1.4 *Metschnikowia pulcherrima*

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Metschnikowia (Candida) pulcherrima* LFMB 1. Ο μικροοργανισμός *Metschnikowia pulcherrima* έχει αποδειχθεί πως είναι από τις πιο σημαντικές άγριες ζύμες με ενδιαφέρον στην παραγωγή οίνου, καθώς συμμετέχει σε αρκετές περιπτώσεις στις αυθόρμητες ζυμώσεις (Goold et al., 2017). Επίσης, έχει μελετηθεί αρκετά ως προς τη δραστικότητα των ενζύμων που διαθέτει και ευνοούν την ποιότητα του οίνου (Fernandez et al., 2000).



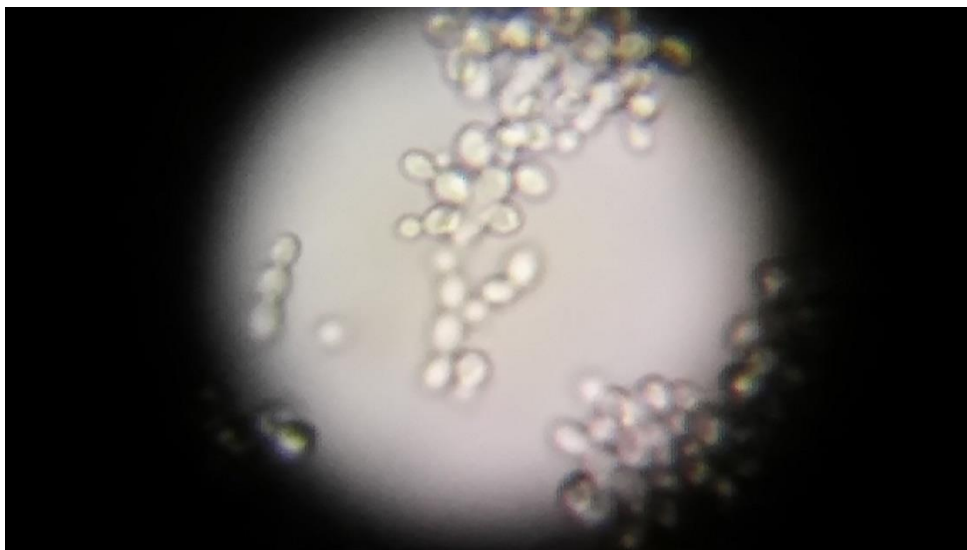
Εικόνα 11: Ο μικροοργανισμός *Metschnikowia pulcherrima*

### 3.1.5 *Pichia ciferrii*

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Pichia ciferrii* NRRL Y-1031 F-60-10A. Ο μικροοργανισμός *Pichia ciferrii* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς στο είδος αυτό



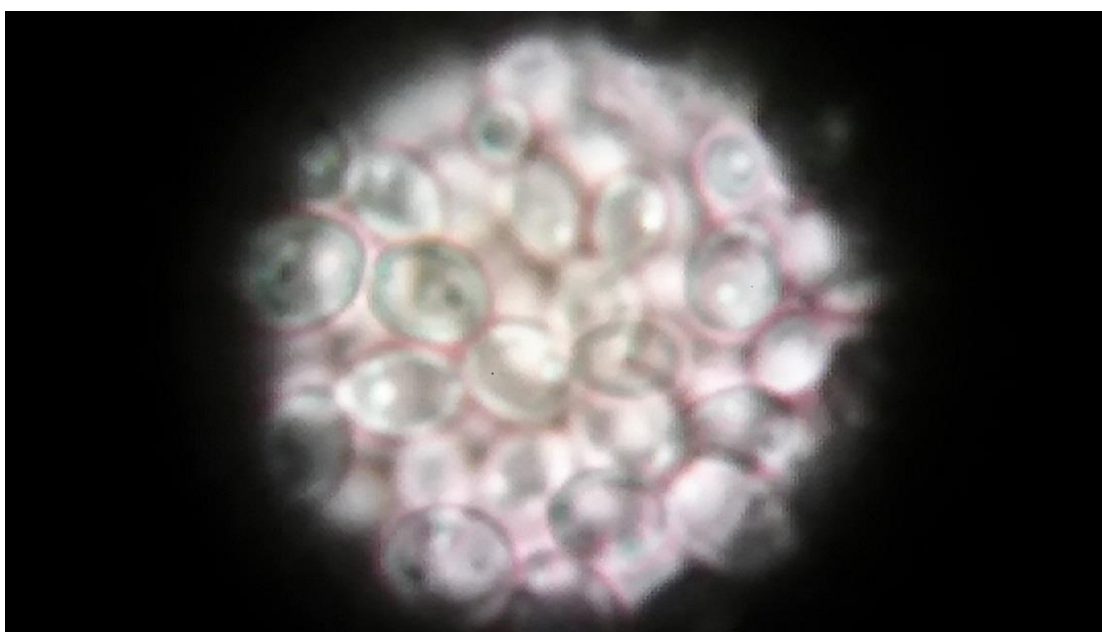
ανήκουν στελέχη που είναι σε θέση να παράγουν αιθανόλη (Papanikolaou et al, 2017) καθώς και στελέχη αμιγώς ελαιογόνα (Börgel et al, 2012).



Εικόνα 12: Ο μικροοργανισμός *Pichia ciferrii*

### 3.1.6 *Williopsis saturnus*

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Williopsis saturnus* NRRL Y-17396. Ο μικροοργανισμός *Williopsis saturnus* έχει μελετηθεί ως προς την επίδρασή του σε οινικές ζυμώσεις σε συνδυασμό με καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* (Erten & Tanguer, 2010). Ο μικροοργανισμός αυτός έχει απασχολήσει ακόμα την επιστημονική κοινότητα με την ικανότητά του να παράγει ισοαμυλικό αιθυλεστέρα (Yilmaztekin et al., 2008).



Εικόνα 13: Ο μικροοργανισμός *Williopsis saturnus*

### 3.1.7 *Saccharomyces cerevisiae*

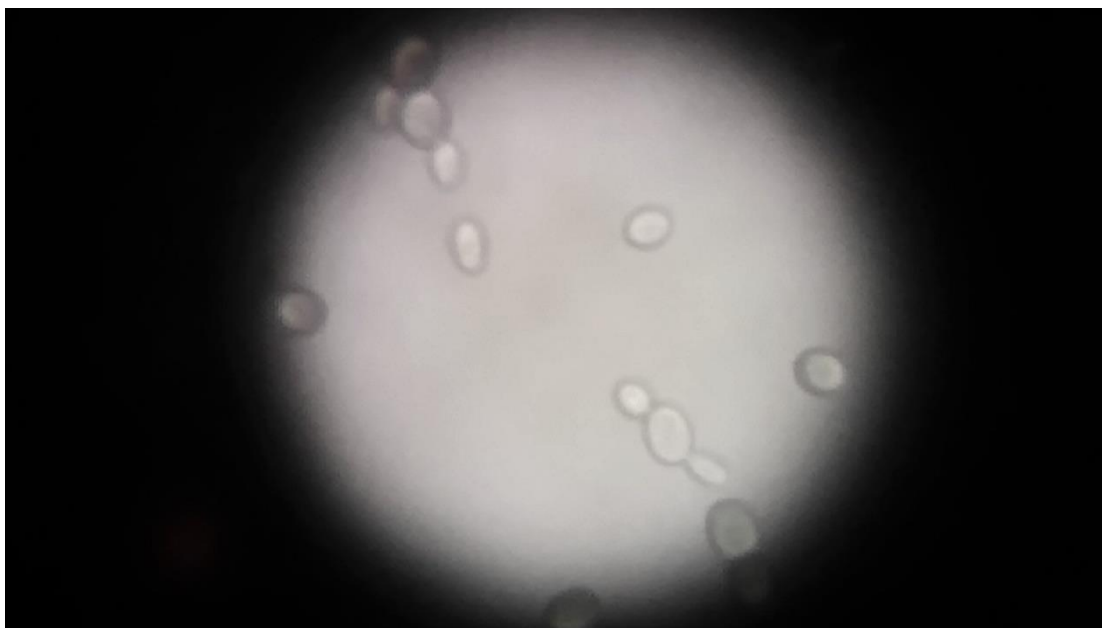
Ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος στην οινική βιομηχανία καθώς είναι εκείνος που αποδίδει τα μεγαλύτερα ποσοστά αιθανόλης ενώ εμφανίζει και τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε αυτά (Sarris & Papanikolaou 2016). Είναι ο μικροοργανισμός στον οποίο έχουν γίνει οι περισσότερες έρευνες για τα φαινόμενα που εξετάζει η παρούσα μελέτη και για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε ως μικροοργανισμός αναφοράς, ως χαρακτηριστική θετική κατά Crabtree ζύμη. (Hagman et al., 2013). Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Saccharomyces cerevisiae* Rhone.



Εικόνα 14: Ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae*

### 3.1.8 *Yarrowia lipolytica*

Ο μικροοργανισμός *Yarrowia lipolytica* είναι μία αρνητική κατά Crabtree ζύμη, που δεν έχει τη δυνατότητα εκτέλεσης αλκοολικής ζύμωσης και για το λόγο αυτό επελέγη ως μικροοργανισμός αναφοράς, αρνητικός στο φαινόμενο Crabtree. Είναι ωστόσο ένας πολύ ενδιαφέρων μικροοργανισμός ως προς την ικανότητά του να παράγει λιπίδια (Beoroulos et al., 2009). Το στέλεχος το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Yarrowia lipolytica* LGAM S (7) 1. Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς την παραγωγή κιτρικού οξέος και λιπιδίων που εμφανίζουν προκαθορισμένης σύστασης συμμετρικά τριγλυκερίδια (Papanikolaou et al., 2002, 2008, Makri et al., 2010).



Εικόνα 15: Ο μικροοργανισμός *Yarrowia lipolytica*

Η επιλογή των στελεχών αυτών έγινε βάσει της ικανότητάς τους να καταβολίζουν τη γλυκόζη και εξετάζεται υπό τις συνθήκες των πειραμάτων, η μεταβολική τους δραστηριότητα.

### 3.1.9 Προκαλλιέργεια

Έκαστος εκ των μικροοργανισμών, αναπτύχθηκε αρχικά σε προκαλλιέργεια για 24 ώρες. Οι προκαλλιέργειες ετοιμάζονται σε κωνικές φιάλες των 250 mL και περιέχουν 50 mL απιονισμένο νερό (d H<sub>2</sub>O) και 1% D – Glucose, 1% peptone, 1% yeast extract. Εν συνεχεία, αποστειρώνονται και όταν έλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εμβολιάζονται με κύτταρα των μικροοργανισμών, υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, τοποθετούνται σε αναδευτήρα και αφήνονται να αναπτυχθούν υπό σταθερές T= 29±1°C και 180±5 rpm (New Brunswick Sci N.J. – USA).

### 3.1.10 Καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες

Μετά το πέρας των 24 ωρών που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί για να αναπτυχθούν στις προκαλλιέργειες και συγκεκριμένα να φτάσουν στη φάση εκθετικής αύξησης, έγινε η παρασκευή των κυρίων καλλιεργειών σε κωνικές φιάλες των 250 mL που περιείχαν θρεπτικό υλικό αποτελούμενο από 50 mL d H<sub>2</sub>O (για κάθε φιάλη) και διάφορα αντιδραστήρια που παρατίθενται στον πίνακα 6. Οι καλλιέργειες αποστειρώθηκαν και

όταν ήλθαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εμβολιάστηκαν με 1 mL από την προκαλλιέργεια.

*Πίνακας 7: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των κυρίων καλλιιεργειών των μικροοργανισμών στην πρώτη σειρά πειραμάτων.*

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (g/L)
D - Glucose	60,0
Yeast extract	4,0
peptone	3,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	3,0
FeCl <sub>3</sub>	0,15
CaCl <sub>2</sub>	0,15
ZnSO <sub>4</sub>	0,02
MnSO <sub>4</sub>	0,06

Οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν στους αναδευτήρες του εργαστηρίου και ανάλογα με το χρόνο επώασης, καθεμία από αυτές, αποτελούσε σημείο της ανάπτυξης και της μεταβολικής δραστηριότητας του κάθε μικροοργανισμού.

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, η διεργασίες παρασκευής προκαλλιιεργειών και καλλιιεργειών ήταν ακριβώς ίδιες με τη μόνη διαφορά, πως το θρεπτικό υλικό αποτελούνταν από συνυπόστρωμα γλυκόζης – φρουκτόζης σε αναλογία 50/50 (30 g/L D – Glucose, 30 g/L D – Fructose), ενώ όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια προστέθηκαν στις ίδιες ποσότητες.

*Πίνακας 8: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των κυρίων καλλιιεργειών των μικροοργανισμών στην δεύτερη σειρά πειραμάτων.*

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (g/L)
D - Glucose	30,0
D - Fructose	30,0
Yeast extract	4,0
peptone	3,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	3,0
FeCl <sub>3</sub>	0,15
CaCl <sub>2</sub>	0,15
ZnSO <sub>4</sub>	0,02
MnSO <sub>4</sub>	0,06



Κάθε δείγμα που εισέρχεται στη στήλη έχει όγκο 10  $\mu\text{L}$ , ενώ πριν την ένεση πραγματοποιείται φιλτράρισμα του δείγματος με φίλτρο 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων είναι μία φασματοφωτομετρική μέθοδος, στην οποία χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο DNS [για 500 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 150 g τρυγικό κάλιο – νάτριο ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ) και 3 g  $\text{NaOH}$ ]. Πραγματοποιούνται στα δείγματα οι κατάλληλες αραιώσεις ώστε να ανταποκρίνονται στην πρότυπη καμπύλη της μεθόδου (έως 2 g/L Glucose). Εν συνεχεία δημιουργούνται διαλύματα από 0,5 mL αραιωμένου δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS και δύο διαλύματα μάρτυρες αποτελούμενα από 0,5 mL d  $\text{H}_2\text{O}$  και 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS, που αναδεύονται σε μηχανήμα Vortex και εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 5 λεπτά ακριβώς. Κατόπιν κρύνονται με νερό βρύσης και προστίθενται σε καθένα από αυτά 5 mL απιονισμένο  $\text{H}_2\text{O}$  αναδεύονται μέσω Vortex. Ακολουθεί φασματοφωτομετρία σε μηχανήμα HITACHI U-2000 σε μήκος κύματος 540nm.

### 3.2.4 Προσδιορισμός ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών

Στον προσδιορισμό των παραγομένων από τους μικροοργανισμούς, ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, ως δείγμα χρησιμοποιείται ποσότητα 0,05 g από την ξηρά βιομάζα του μικροοργανισμού. Προστίθεται σε αυτό διάλυμα  $\text{HCl}$  2M 10mL, και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 80°C, για 30 λεπτά. Ακολούθως, εξουδετερώνεται με προσθήκη  $\text{NaOH}$  και κατόπιν πραγματοποιείται διήθηση του δείγματος με διπλό διηθητικό χαρτί. Τέλος, ακολουθεί η ίδια διαδικασία με την μέτρηση των αναγόντων σακχάρων μέσω φωτομετρίας με αντιδραστήριο DNS.

### 3.2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακού λίπους.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του παραγομένου λίπους, χρησιμοποιείται η ξηρά βιομάζα του μικροοργανισμού, η οποία ομογενοποιείται με τη βοήθεια μίγματος διαλυτών Folch ( $\text{CH}_3\text{Cl} - \text{CH}_3\text{OH}$  2:1) κι αφήνεται προς εκχύλιση για τουλάχιστον τρεις ημέρες. Με το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, τα δείγματα διηθούνται σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες εξάτμισης και ακολουθεί εξάτμιση των διαλυτών. Η εξάτμιση πραγματοποιείται σε περιστροφικό εξάτμιστήρα Buchi Rotavapor R – 114, υπό κενό, στους 60 °C. Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών, πραγματοποιείται εκ νέου

ζύγιση των φιαλών που περιέχουν το συνολικό μικροβιακό λίπος, το οποίο υπολογίζεται από τη διαφορά των 2 μετρήσεων.

### 3.2.6 Σύσταση σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται σε 2 στάδια καθώς πριν τον προσδιορισμό με αέρια χρωματογραφία GC, τα λιπαρά οξέα, πρέπει να μετατραπούν στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Σε σφαιρική φιάλη, όπου περιέχεται η ποσότητα των λιπαρών οξέων που αναφέρθηκε ανωτέρω, προστίθεται ποσότητα 10 mL μεθανολικού Νατρίου ( $\text{MeO}^- \text{Na}^+$ ) και δείκτης φαινολοφθαλεΐνης. Η φιάλη θερμαίνεται ελεγχόμενα έως ήπιου βρασμού για 20 λεπτά. Εν συνεχεία προστίθενται 10 mL υδροχλωρικής μεθανόλης ( $\text{MeOCl}$ ) με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος από ερυθρώδες σε άχρωμο. Συνέχεια του βρασμού για άλλα 20 λεπτά και στο πέρας αυτών προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}$  μέχρις ότου το διάλυμα αποκτήσει γαλακτώδες χρώμα. Τέλος, στο διάλυμα προστίθεται ποσότητα 6 mL εξανίου ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των φάσεων, ενώ συλλέγεται η οργανική που περιέχει τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων.

Ακολουθεί ανάλυση της οργανικής φάσεως που περιέχει τους μεθυλεστέρες των οργανικών οξέων μέσω αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας GC – FID. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Fisons 8000 Series MFC 800. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα είναι στους  $250^\circ\text{C}$ , η θερμοκρασία του ανιχνευτή, στους  $270^\circ\text{C}$  το φέρον αέριο είναι He ( $1.38 \text{ mL/min}$ ), ενώ η πίεση προκύπτει από μίγμα αέρα ( $120 \text{ kPa}$ ) και  $\text{H}_2$  ( $60 \text{ kPa}$ ). Ο τύπος της στήλης είναι Fused Silica WCOT Cp Sill 88  $\mu\text{L}$ , το μήκος της είναι 50 m, η διάμετρος 0,2mm και το πάχος της εσωτερικής επικάλυψης που έρχεται σε επαφή με το δείγμα είναι 0,2  $\mu\text{L}$ .

### 3.2.7 Ποιοτικός προσδιορισμός αρωματικών ενώσεων

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των αρωματικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω GC – FID SPME (solid phase micro extracton) της εταιρείας Hewlett – Packard series II 5890. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το Ήλιο (He) με ρυθμό ροής  $1 \text{ mL/min}$ . Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν πολική DB-WAX (length 30m x 0.320mm I.D.), επικαλυμμένη με film 0.25 $\mu\text{m}$ , στατικής φάσης. Για την ταυτοποίηση των ουσιών χρησιμοποιούνται πρότυπες ουσίες της εταιρίας Sigma – Aldrich.

SUPELCO Solid Phase Micro-extraction Holder (Bellefonte, PA, USA) με ίνα τριστηρωματικής σύνθεσης (SUPELCO SPME Fiber assembly 2 cm, 50/30  $\mu\text{m}$

divinylbenzene – carboxen – poly(dimethylsiloxane) (DVB-CAR-PDMS, gray). Η ίνα έχει ικανότητα δέσμευσης ενώσεων από 3 έως 20 άτομα άνθρακα.

Η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

Δείγμα 10 mL από υπερκείμενο υγρό ζύμωσης, θερμαίνεται σε υδατόλουτρο 35°C για 10 min. Μετά το πέρας αυτών, η ίνα εισάγεται στο δείγμα και αφήνεται για 30 min, ώστε να προσροφήσει τις πτητικές ουσίες. Εν συνεχεία, η ίνα εξέρχεται του δείγματος και εισάγεται στην υποδοχή έγχυσης. Εντός 10 λεπτών, που παραμένει στο μηχάνημα, η ίνα αποβάλλει τις πτητικές ουσίες, που έχει προσροφήσει και καθαρίζεται για να δεχτεί τις ουσίες του επόμενου δείγματος.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε, υπό αρχικές συνθήκες η θερμοκρασία εισόδου είναι 220°C, η θερμοκρασία ανιχνευτή 250°C και η θερμοκρασία φούρνου 40°C. Σε αυτή τη θερμοκρασία διατηρείται ο φούρνος για 5min και στη συνέχεια με ρυθμό 3°C/min ανεβαίνει στους 220°C, όπου παραμένει 5min.



### 3.3 Αποτελέσματα

Στην ενότητα αυτή, θα παρουσιαστούν τα προϊόντα που παρήγαγε ο κάθε μικροοργανισμός, καθώς και οι πληροφορίες που προκύπτουν από την παρατήρηση αυτών. Αρχικά θα παρουσιαστούν τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως στελέχη αναφοράς και στη συνέχεια τα στελέχη που προσομοίαζαν με αυτά.

#### 3.3.1 *Yarrowia lipolytica*

Ο μικροοργανισμός *Y. lipolytica* χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ως μικροοργανισμός αναφοράς των αρνητικών κατά Crabtree μικροοργανισμών. Στους μικροοργανισμούς αυτούς πραγματοποιήθηκε μόνο η πρώτη σειρά πειραμάτων, δηλαδή τα πειράματα σε υπόστρωμα γλυκόζης καθώς θεωρήθηκε πως δεν ήταν απαραίτητη η μελέτη τους σε συνυπόστρωμα, αφού δεν δύνανται να παράξουν αιθανόλη. Ο μικροοργανισμός αυτός δεν επέδειξε ταχεία κατανάλωση του υποστρώματος. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται στοιχεία της μεταβολικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού. Είναι εμφανές πως ο μικροοργανισμός αρχικά συνθέτει σημαντική ποσότητα ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, τους οποίους στη συνέχεια καταναλώνει, ενώ ξεκινά να παράγει ενδοκυτταρικό λίπος. Στη συνέχεια της ανάπτυξής του, ωστόσο και ενώ ευρίσκεται πλέον σε συνθήκες πηνίας πηγής άνθρακα, διασπά και το ενδοκυτταρικό λίπος, προκειμένου να διατηρήσει τον πληθυσμό του και να αυξήσει την βιομάζα του.

Πίνακας 9: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Yarrowia lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Συνθήκες αύξησης: Καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες, ανάδευση  $180 \pm 5$  rpm,  $T = 29 \pm 1^\circ C$ ,  $DOT \geq 8\%$  (v/v). Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. time (h), Glc: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L),  $Y_{L/DW}$ : % (g/g) περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $Y_{Ips/DW}$ : % (g/g) περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες. a:  $DW_{max}$  (g/L), b:  $Y_{L/DW_{max}}$ , c:  $Y_{Ips/DW_{max}}$

<i>Y. lipolytica</i> ( $\approx 60$ g/L Glc)	time	Glc (g/L)	DW (g/L)	$Y_{L/DW}$	$Y_{Ips/DW}$
a	216,0	59,7	13,2	18,2	8,8
b	168,0	54,4	12,5	26,3	18,3
c	26,0	13,8	5,9	5,1	73,3

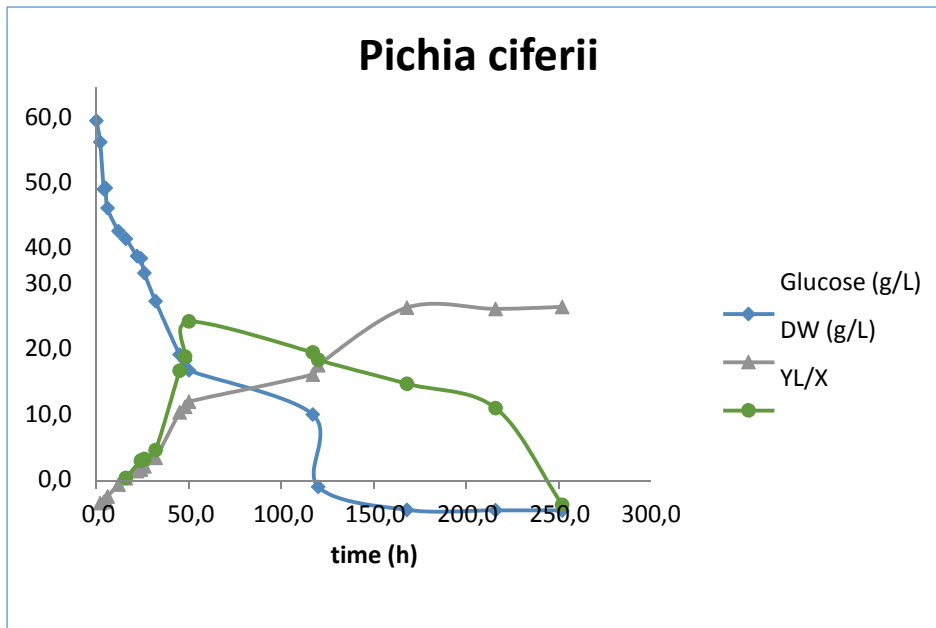
#### 3.3.2 *Pichia ciferrii*

Ο μικροοργανισμός *P. ciferrii* ήταν από τους πιο ενδιαφέροντες μικροοργανισμούς της παρούσας έρευνας καθώς ήταν ο μόνος μικροοργανισμός στον οποίο ανήκουν μεν κάποια θετικά στο φαινόμενο Crabtree στελέχη (Papanikolaou et al., 2017), αλλά τα

περισσότερα στελέχη είναι αρνητικά και ελαιογόνα (Liu et al., 2013). Επελέγη η χρήση ενός αρνητικού κατά Crabtree στελέχους, προκειμένου να μελετηθεί ενδελεχώς το φαινόμενο. Όπως και ο μικροοργανισμός αναφοράς έτσι και ο μικροοργανισμός *P. ciferrii* δεν επιδίδεται σε ταχεία κατανάλωση του υποστρώματος. Όσον αφορά τα προϊόντα της αποικοδόμησης της γλυκόζης, πλην της προφανούς αύξησης της ξηράς βιομάζας του, ο μικροοργανισμός συνθέτει αρχικά υπολογίσιμη ποσότητα ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών. Μάλιστα η ποσότητα αυτή στο μέγιστό της υπερβαίνει το μισό της ξηράς βιομάζας του μικροοργανισμού (51,5%), τη δεδομένη χρονική στιγμή. Από το σημείο αυτό και μετά ξεκινά η πτώση των πολυσακχαριτών, η οποία συνοδεύεται από ταυτόχρονη αύξηση της ποσότητας του ενδοκυτταρικού λίπους. Οι συνθήκες έλλειψης αζώτου συντελούν στην ανάπτυξη λιπαρών οξέων που φτάνουν έως και το 29,1 % επί ξηράς βιομάζας. Παρά ταύτα, από τη στιγμή που το σάκχαρο καταναλώθηκε πλήρως, τόσο οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες όσο και τα λιπίδια καταναλώθηκαν επίσης.

Πίνακας 10: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Pichia ciferrii* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9. *time* (h), *Glc*: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), *DW*: ξηρά βιομάζα (g/L),  $Y_{L/DW}$ : % (g/g) περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $Y_{Ips/DW}$ : % (g/g) περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες. *a*:  $DW_{max}$  (g/L), *b*:  $Y_{L/DW_{max}}$ , *c*:  $Y_{Ips/DW_{max}}$

<i>P. ciferrii</i> (≈60g/L Glc)	<b>time</b>	<b>Glc (g/L)</b>	<b>DW (g/L)</b>	<b><math>Y_{L/DW}</math></b>	<b><math>Y_{Ips/DW}</math></b>
<b>a</b>	252,0	59,6	31,3	1,1	1,6
<b>b</b>	50,0	38,2	16,8	29,1	22,0
<b>c</b>	26,0	23,3	6,9	8,1	51,5



Διάγραμμα 1: Κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Pichia ciferrii*, σε υπόστρωμα γλυκόζης. Glucose (g/L): καταναλισκόμενη γλυκόζη, DW (g/L): παραγόμενη βιομάζα, YL/X: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος (g/g)

### 3.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Ο μικροοργανισμός *S. cerevisiae* είναι ο κατ' εξοχήν χρησιμοποιούμενος μικροοργανισμός στην παραγωγή οίνου, είναι θετικός κατά Crabtree και είναι προφανές πως δε θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί άλλος μικροοργανισμός αναφοράς, πέραν αυτού.

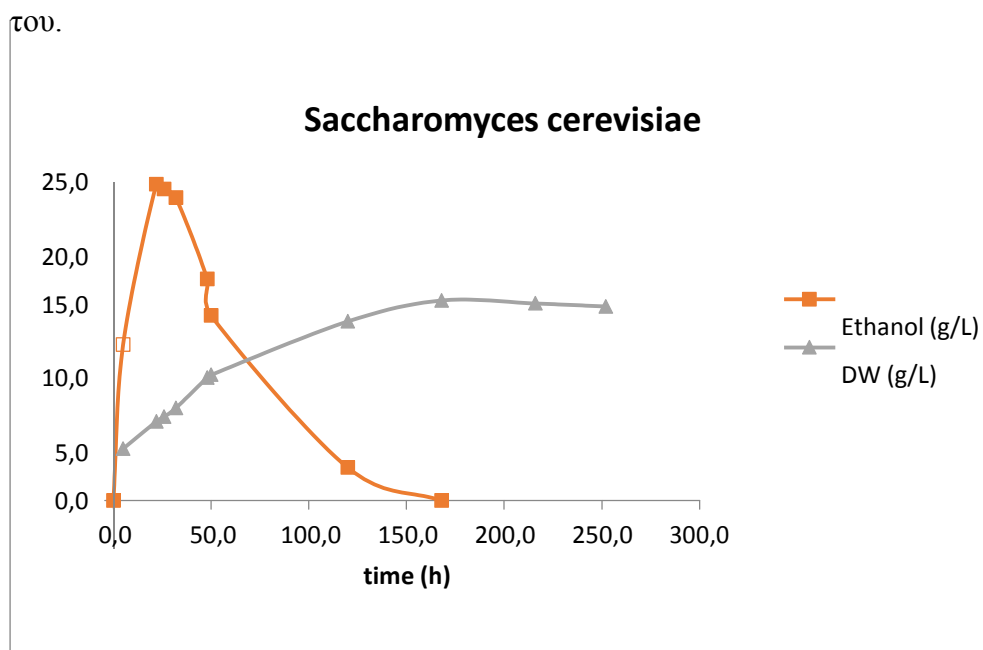
Όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα, η κατανάλωση της γλυκόζης για τον μικροοργανισμό αυτόν, είναι άμεση και ιδιαίτερος ταχεία. Ο μικροοργανισμός έχει καταναλώσει σχεδόν όλο το διαθέσιμο σάκχαρο, παράγοντας τη μέγιστη για το συγκεκριμένο πείραμα αιθανόλη, εντός 26 ωρών. Από το σημείο αυτό και μετά εκκινεί η κατανάλωση της συσσωρευμένης αιθανόλης, ελλείψει άλλης πηγής άνθρακα. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός φαίνεται να συνθέτει ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες από την αρχή της ανάπτυξής του στο συγκεκριμένο μέσο καλλιέργειας, τους οποίους όμως καταναλώνει όταν βρίσκεται σε συνθήκες πενίας πηγής άνθρακα, όμως η κατανάλωση φαίνεται να είναι αρκετά αργή. Ταυτόχρονα με την πτώση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών παρατηρείται σύνθεση μικρής ποσότητας λιπιδίων, όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 11: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9. time (h), Glc: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L), YL<sub>DW</sub>: (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,

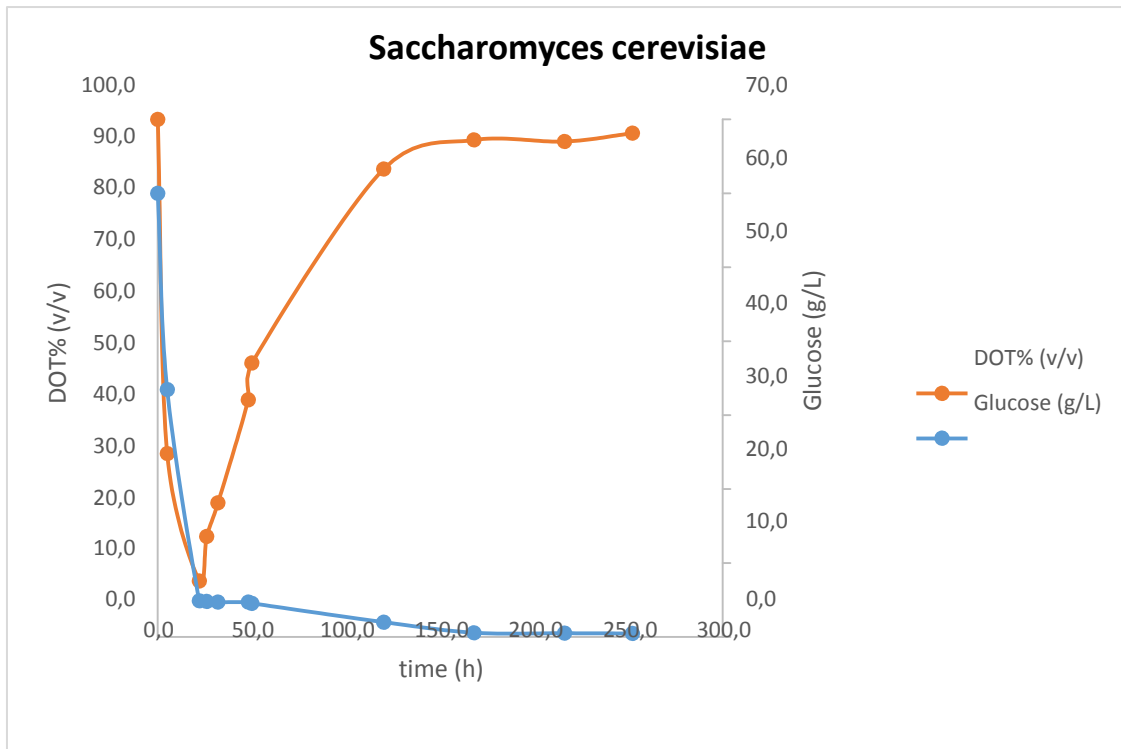
$Y_{Ips/DW}$ : (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες.  $Y_{EtOH/Glc}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. a: DW max (g/L), b: EtOH (g/L) c:  $Y_{L/DW}$  max, d:  $Y_{Ips/DW}$  max

<i>S. cerevisiae</i> (≈60g/L Glc)	time	Glc	DW	EtOH	$Y_{L/DW}$	$Y_{Ips/DW}$	$Y_{EtOH/Glc}$
a	168,0	59,4	13,4	0,0	15,7	15,9	0,0
b	22,0	55,1	5,3	21,2	1,0	35,8	0,38
c	216,0	59,5	13,2	0,0	16,4	17,1	0,0
d	5,0	25,6	3,5	10,4	0,2	57,2	0,39

Η κινητική της αύξησης και της εξέλιξης της βιομάζας και της αιθανόλης εμφανίζονται στο διάγραμμα 1. Φαίνεται πως, όπως αναλύθηκε και στα προηγούμενα εδάφια, η κατανάλωση του σακχάρου ήταν τάχιστα και η αποζύμωση συνέπεσε με τη μέγιστη συγκέντρωση παραχθείσας αιθανόλης ( $Y_{EtOH/Glc} \approx 0,38$ ). Στο διάγραμμα φαίνεται επίσης, πως η αύξηση της βιομάζας είναι έντονη στην περίπτωση της κατανάλωσης του σακχάρου και συνεχίζεται και στην ανακατανάλωση της αιθανόλης. Ωστόσο, από την κατανάλωση της αιθανόλης και μετά, ο μικροοργανισμός απλώς διατηρεί τον πληθυσμό του.



Διάγραμμα 2: Κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. Ethanol (g/L): παραχθείσα αιθανόλη και DW (g/L): ξηρά βιομάζα (g/L).



Διάγραμμα 3: Συσχέτιση κατανάλωσης σακχάρου με παρουσία οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας. DOT% (v/v): τάση του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας.

Στα παραπάνω διαγράμματα παρουσιάζεται η κινητική του μικροοργανισμού αναφοράς *Saccharomyces cerevisiae*, καθώς αναπτύσσεται σε υπόστρωμα γλυκόζης. Στο δεύτερο διάγραμμα, εμφανίζεται η τάση του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας, ως συνάρτηση του χρόνου και αντιπαραβάλλεται με την κατανάλωση του σακχάρου. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, παρατηρείται κατακόρυφη πτώση του οξυγόνου στο μέσο, ενώ εμφανίζεται σταδιακή άνοδος κατά την κατανάλωση της παραχθείσας αιθανόλης. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδίδεται στην έντονη μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού και στην παραγωγή αερίου CO<sub>2</sub> κατά την αλκοολική ζύμωση. Αντίστοιχη σχέση με το χρόνο ανάπτυξης εμφάνισε η τάση του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας και στις δύο σειρές πειραμάτων για όλους τους μικροοργανισμούς.

Τα επόμενα πειραματικά δεδομένα αφορούν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* σε συνυπόστρωμα γλυκόζης – φρουκτόζης που έχουν προστεθεί στο μέσο καλλιέργειας σε ίσες ποσότητες (30 g/L). Παρά τις αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές που θέλουν τις ζύμες να είναι επιλεκτικές ως προς τη γλυκόζη, παρατηρήθηκε ταυτόχρονη αφομοίωση των 2 σακχάρων από τον μικροοργανισμό. Εντούτοις, παρατηρήθηκε πλήρης εξάλειψη της φρουκτόζης, ενώ ο μικροοργανισμός κατανάλωσε

τη γλυκόζη μέχρι ενός σημείου, πέραν του οποίου ξεκίνησε την ανακατανάλωση της αιθανόλης, γεγονός που συμπίπτει με παρατηρήσεις των Hagman et al., (2013). Όπως και στο προαναφερθέν πείραμα, η κατανάλωση των σακχάρων ήταν τάχιστα, όπως και η παραγωγή αιθανόλης. Η ποσότητα της αιθανόλης που παρήχθη ήταν και στις δύο περιπτώσεις περίπου ίδια ενώ η ίδια ανακαταναλώθηκε, μετά την εξάλειψη των σακχάρων από το μέσο και λόγω των αερόβιων συνθηκών που επικρατούσαν. Εντούτοις, η κατανάλωση της δεν είναι πλήρης μέχρι το τελικό σημείο του πειράματος, γεγονός που υποδεικνύει πως ο μικροοργανισμός χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Ο ρυθμός αύξησης της ξηράς βιομάζας φαίνεται να είναι στα ίδια επίπεδα στα δύο πειράματα. Όσον αφορά την απόλυτη τιμή της μέγιστης ξηράς βιομάζας, φαίνεται να έχει ανοδική πορεία μέχρι και το τελευταίο σημείο του δεύτερου πειράματος, επομένως, θα μπορούσε να θεωρηθεί πως η τιμή που έχει αγγίξει δεν είναι η μέγιστη. Κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* σε συνυπόστρωμα γλυκόζης φρουκτόζης, παρήχθη υψηλή ποσότητα ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, από τα πρώτα κιόλας σημεία του πειράματος. Φαίνεται πάντως, όπως και στο προηγούμενο πείραμα, ότι υψηλές σχετικές ποσότητες ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών ( $Y_{Ips/DW}$ ) παρήχθησαν κατά τα πρώτα στάδια της αύξησης, με τις σχετικές αυτές τιμές να μειώνονται όσο εξελισσόταν η ζύμωση. Μάλιστα, τα μόρια αυτά δεν φαίνεται να καταναλώνονται μέχρι και το τελευταίο σημείο του πειράματος, όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης η τάση τους σε συνθήκες απόλυτης πενίας πηγής άνθρακα, καθώς ούτε η γλυκόζη, ούτε η αιθανόλη έχουν καταναλωθεί πλήρως. Λίπος παρήχθη σε αμελητέες ποσότητες, υπήρξε όμως τάση βιοσύνθεσης υπολογίσιμων ποσοτήτων λιπιδίων κατά τη διάσπαση της αιθανόλης.

Πίνακας 12: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9. *time* (h), *Glc*: συγκέντρωση καταναλωθείσας γλυκόζης (g/L), *Fru*: συγκέντρωση καταναλωθείσας φρουκτόζης (g/L), *DW*: ξηρά βιομάζα (g/L), *EtOH*: αιθανόλη (g/L), *Y<sub>L/DW</sub>*: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος, *Y<sub>Ips/DW</sub>*: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, *Y<sub>EtOH/Sc</sub>* (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα, *a*: *DW max* (g/L), *b*: *EtOH* (g/L) *c*: *Y<sub>L/DW max</sub>*, *d*: *Y<sub>Ips/DW max</sub>*

<i>S. cerevisiae</i> (≈30g/L Glc + 30g/L Fru)	<b>time</b>	<b>Glc</b>	<b>Fru</b>	<b>DW</b>	<b>EtOH</b>	<b>Y<sub>L/DW</sub></b>	<b>Y<sub>Ips/DW</sub></b>	<b>Y<sub>EtOH/Sc</sub> ons</b>
<b>a, c</b>	96,0	24,2	30,0	9,4	6,0	3,5	39,4	0,11
<b>b</b>	24,0	24,0	29,6	5,1	22,2	1,1	41,4	0,41
<b>d</b>	10,0	14,5	14,6	2,0	9,0	0,6	56,1	0,14

### 3.3.4 *Candida boidinii*

Στον πίνακα που ακολουθεί, καθίσταται εμφανές πως ο μικροοργανισμός *Candida boidinii* αφομοιώνει τάχιστα το διαθέσιμο υπόστρωμα και παράγει σημαντική ποσότητα αιθανόλης, για τα δεδομένα του πειράματος. Η παραχθείσα αιθανόλη, καταναλώνεται και από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό, αφού το σάκχαρο έχει πλέον εξαντληθεί. Από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, ο μικροοργανισμός επιδίδεται σε σύνθεση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, το ποσοστό των οποίων μειώνεται, μετά την ανακατανάλωση της συσσωρευμένης αιθανόλης. Αξιοσημείωτο είναι, πως ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός από την αρχή της ανάπτυξής του, εκτελεί βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους, το οποίο μάλιστα, κατά τη φάση ανακατανάλωσης της αλκοόλης, αυξάνεται σημαντικά. Η αύξηση αυτή που ανέρχεται σε ποσοστό 24,8% επί ξηράς βιομάζας, όπως φαίνεται στον πίνακα, παρατηρείται ταυτόχρονα με την διάσπαση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών.

Πίνακας 13: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Candida boidinii* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9 time (h), Glc: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L),  $Y_{L/DW}$ : (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $Y_{Ips/DW}$ : (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες.  $Y_{EtOH/Glc}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. a: DW max (g/L), b: EtOH (g/L) c:  $Y_{L/DW}$  max, d:  $Y_{Ips/DW}$  max

<i>C. boidinii</i> (≈60g/L Glc)	time	Glc	DW	EtOH	$Y_{L/DW}$	$Y_{Ips/DW}$	$Y_{EtOH/Glc}$
a, c	252,0	60,0	13,1	0,0	24,8	7,6	0,0
b	32,0	55,6	5,5	22,2	3,9	30,9	0,40
d	22,0	47,1	3,0	15,3	3,4	43,6	0,32

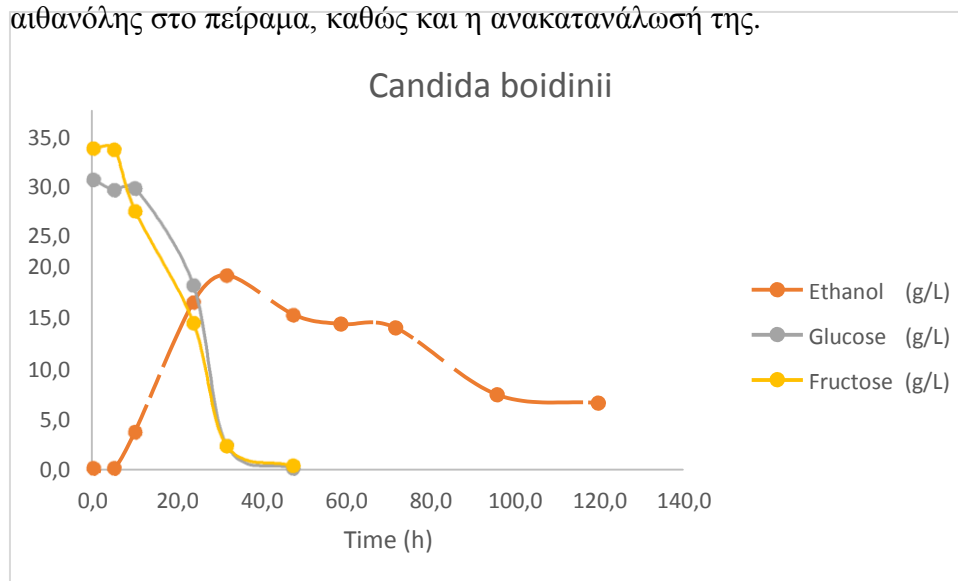
Κατά την καλλιέργεια στο μίγμα γλυκόζης - φρουκτόζης φαίνεται πως ο μικροοργανισμός *Candida boidinii*, καταναλώνει, αρχικά, ταχύτερα τη φρουκτόζη από τη γλυκόζη, ωστόσο τα σάκχαρα εξαντλούνται από τα μέσο σχεδόν ταυτόχρονα. Η παραγωγή της αιθανόλης στην περίπτωση αυτή είναι χαμηλότερη από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε γλυκόζη ( $EtOH$  max = 19,0 g/L,  $Y_{EtOH/Scons} \approx 0,34$  g/g, έναντι ( $EtOH$  max = 22,2 g/L,  $Y_{EtOH/Glc} \approx 0,40$  g/g), ωστόσο η ανακατανάλωσή της παρουσιάζει αντίστοιχη πορεία. Ομοίως, οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, συντίθενται και στην περίπτωση αυτή στα αρχικά στάδια της ζύμωσης και εν συνεχεία εμφανίζουν πτωτική τάση. Αξιοσημείωτη διαφορά παρατηρείται στην περίπτωση αυτή, όσον αφορά το ενδοκυτταρικό λίπος. Ενώ ο μικροοργανισμός αυτός στην ανάπτυξή τους σε γλυκόζη

παρήγαγε σημαντική ποσότητα λίπους επί ξηρά βιομάζας (πίνακας 13), στο παρόν πείραμα η αντίστοιχη τιμή έφτασε μόλις το 8,9%.

Πίνακας 14: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Candida boidinii* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9. *time* (h), *Glc*: συγκέντρωση καταναλωθείσας γλυκόζης (g/L), *Fru*: συγκέντρωση καταναλωθείσας φρουκτόζης (g/L), *DW*: ξηρά βιομάζα (g/L), *EtOH*: αιθανόλη (g/L), *YL/DW*: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος, *Y<sub>Ips</sub>/DW*: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, *Y<sub>EtOH/Sc</sub>ons* (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα, *a*: *DW max* (g/L), *b*: *EtOH* (g/L) *c*: *YL/DW max*, *d*: *Y<sub>Ips</sub>/DW max*

<i>C. boidinii</i> (≈30g/L Glc + 30g/L Fru)	time	Glc	Fru	DW	EtOH	YL/DW	Y <sub>Ips</sub> /DW	Y <sub>EtOH/Sc</sub> ons
a, c	120,0	28,4	31,5	7,9	6,5	8,9	16,5	0,11
b, d	32,0	26,2	29,3	4,8	19	2,1	45,9	0,34

Στο διάγραμμα 4 εμφανίζεται η εκλεκτικότητα του μικροοργανισμού *Candida boidinii*, ως προς την κατανάλωση της φρουκτόζης, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, που αναφέρουν πως οι ζυμομύκητες (κυρίως ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae*) είναι εκλεκτικοί ως προς τη γλυκόζη (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Στο διάγραμμα αυτό, φαίνεται ακόμα, η παραγωγή της αιθανόλης στο πείραμα, καθώς και η ανακατανάλωσή της.



Διάγραμμα 4: Κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Candida boidinii* σε μίγμα σακχάρων.

### 3.3.5 *Candida oleophila*

Ο μικροοργανισμός *Candida oleophila* φαίνεται να καταναλώνει το διαθέσιμο σάκχαρο με ταχύ ρυθμό. Επίσης ταχεία, είναι και η παραγωγή αιθανόλης, η οποία όμως είναι σχετικά χαμηλότερη από τις υπόλοιπες περιπτώσεις ( $EtOH\ max = 18,8\ g/L$ ,  $Y_{EtOH/Glc} \approx 0,34\ g/g$ ). Εν συνεχεία εκκινεί σταδιακά η κατανάλωση της αιθανόλης, η οποία στην



περίπτωση αυτή είναι αρκετά αργή. Στο χρονικό διάστημα αυτό, η βιομάζα του μικροοργανισμού, παρουσιάζει κάποια αύξηση, όχι αξιοσημείωτη, δηλαδή από ξηρά βιομάζα 8,4 g/L που έχει ο μικροοργανισμός στο σημείο που εκκινεί η ανακατανάλωση της αιθανόλης, φτάνει τα 10,5 g/L, στο σημείο που έχει ολοκληρωθεί. Συγκεκριμένα, από ένα σημείο και μετά ο μικροοργανισμός φαίνεται να βρίσκεται στη στάσιμη φάση ανάπτυξής του. Ο μικροοργανισμός συνέθεσε κάποια ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους κατά τη διάρκεια της ανακατανάλωσης της αιθανόλης, η οποία μάλιστα έδειξε να μειώνεται μετά την εξάλειψη της αιθανόλης από το μέσο. επομένως, ελλείψει άλλης πηγής άνθρακα, ο μικροοργανισμός διασπά το παραχθέν λίπος ώστε να διατηρήσει τον πληθυσμό του (252h: EtOH = 0,0 g/L, DW = 10,3 g/L,  $Y_{L/DW} = 6,8\%$ ). Στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης ο μικροοργανισμός *C. oleophila*, φαίνεται να συνθέτει υψηλή ποσότητα ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, για την βιομάζα του. Στην πορεία της ανάπτυξής του όμως η αύξηση δεν συνεχίζεται και η περιεκτικότητα της ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, μειώνεται σημαντικά (πίνακα 15). Αναφορικά με το ενδοκυτταρικό λίπος, η ποσότητά του ανά ξηρά βιομάζα είναι μικρή ακόμα και στη μέγιστη τιμή της, που εμφανίζεται στο προτελευταίο σημείο του πειράματος, ενώ στο τελευταίο είναι ακόμη χαμηλότερη.

Πίνακας 15: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Candida oleophila* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9, time (h), Glc: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L),  $Y_{L/DW}$ : (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $Y_{Ips/DW}$ : (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες,  $Y_{EtOH/Glc}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. a: DW max (g/L), b: EtOH (g/L) c:  $Y_{L/DW}$  max, d:  $Y_{Ips/DW}$  max

<i>C. oleophila</i> (≈60g/L Glc)	time	Glc	DW	EtOH	$Y_{L/DW}$	$Y_{Ips/DW}$	$Y_{EtOH/Glc}$
a, c	216,0	59,6	10,5	0,0	10,5	17,3	0,24
b	26,0	55,5	8,4	18,8	3,6	19,9	0,34
d	5,0	12,7	3,7	3,1	1,5	38,5	0,0

Στην περίπτωση της αύξησης του μικροοργανισμού *C. oleophila* σε καλλιέργεια που περιείχε γλυκόζη και φρουκτόζη, η αφομοίωση των δύο σακχάρων παρατηρήθηκε να είναι ταχεία, όμως παρουσιάστηκε εκλεκτικότητα ως προς τη γλυκόζη. Τελικά, τα δύο σάκχαρα εξαλείφθηκαν ταυτόχρονα από το μέσο. Η μέγιστη ποσότητα αιθανόλης μετρήθηκε πριν την πλήρη κατανάλωση των σακχάρων. Περαιτέρω, όπως και στις περιπτώσεις των προηγούμενων θετικών στο φαινόμενο Crabtree ζυμών, παρατηρήθηκε αποικοδόμηση της αιθανόλης. Η διάσπαση της αιθανόλης παρατηρήθηκε αρκετά αργή

και μέχρι το τελευταίο σημείο του πειράματος, είχε απομείνει ποσότητα, όπως και στην περίπτωση του μικροοργανισμού αναφοράς αλλά και του μικροοργανισμού *Williopsis saturnus* που ακολουθεί. Η ξηρά βιομάζα του μικροοργανισμού εμφανίστηκε αυξανόμενη σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Κατά το χρονικό διάστημα της αλκοολικής ζύμωσης των δύο σακχάρων, η αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού πραγματοποιήθηκε ταχέως, όμως κατά την αφομοίωση της αιθανόλης η ξηρά βιομάζα δεν εξακολούθησε να αυξάνεται με τον ίδιο ρυθμό. Στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, ο μικροοργανισμός συνέθεσε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, οι οποίοι όμως στη συνέχεια μειώθηκαν σημαντικά. Στα τελικά σημεία παρατηρήθηκε μικρή ποσότητα μικροβιακού λίπους η οποία έδειξε τάση αύξησης και θα μπορούσε πιθανώς να σχετίζεται με τη συνεχιζόμενη διάσπαση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών.

Πίνακας 16: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Candida oleophila* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9. *time* (h), *Glc*: συγκέντρωση καταναλωθείσας γλυκόζης (g/L), *Fru*: συγκέντρωση καταναλωθείσας φρουκτόζης (g/L), *DW*: ξηρά βιομάζα (g/L), *EtOH*: αιθανόλη (g/L), *YL/DW*: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος, *Y<sub>Ips</sub>/DW*: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, *Y<sub>EtOH/Sc</sub>ons* (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα, *a*: *DW max* (g/L), *b*: *EtOH* (g/L) *c*: *YL/DW max*, *d*: *Y<sub>Ips</sub>/DW max*

<i>C. oleophila</i> (≈28,5g/L Glc + 32g/L Fru)	<b>time</b>	<b>Glc</b>	<b>Fru</b>	<b>DW</b>	<b>EtOH</b>	<b>YL/DW</b>	<b>Y<sub>Ips</sub>/DW</b>	<b>Y<sub>EtOH/Sc</sub> ons</b>
<b>a, c</b>	96,0	28,4	31,5	9,9	8,1	8,1	10,1	0,14
<b>b</b>	24,0	28,4	30,8	8,2	18,4	0,7	25,0	0,31
<b>d</b>	10,0	8,6	4,4	4,0	3,2	0,5	47,8	0,24

### 3.3.6 *Candida tropicalis*

Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *C. tropicalis* παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Αρχικά, ο μικροοργανισμός, όπως και οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί, κατανάλωσε τάχιστα τη διαθέσιμη ποσότητα σακχάρου, αυτό όμως που παρουσίασε μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι ο ρυθμός κατανάλωσης της παραχθείσας αιθανόλης. Ο μικροοργανισμός, πριν καν εξαφανιστεί εντελώς το σάκχαρο από το θρεπτικό μέσο, εκκινεί την αφομοίωση της αιθανόλης. Η διεργασία αυτή παρατηρείται ταυτόχρονα με την αφομοίωση των τελευταίων ποσοτήτων του σακχάρου (4,5 g/L ποσότητα εναπομείναντος σακχάρου όταν η αιθανόλη είναι μέγιστη δηλαδή 23,3 g/L,  $Y_{EtOH/Glc} \approx 0,43$  g/g). Ο πληθυσμός του μικροοργανισμού εμφάνισε την αναμενόμενη αύξηση. Ο μικροοργανισμός *Candida tropicalis*, από τα αρχικά στάδια της ανάπτυξής του, εμφανίζει σύνθεση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, το ποσοστό των οποίων επί ξηράς βιομάζας αγγίζει το 49,3% (πίνακας 17). Εν συνεχεία παρατηρείται πτώση ταυτόχρονη

με την ανακατανάλωση της παραχθείσας αιθανόλης. Όσον αφορά το μικροβιακό λίπος, ο μικροοργανισμός, εκκινεί να συνθέτει λιπίδια αμέσως μετά την κατανάλωση του σακχάρου, ενώ μετά την κατανάλωση της αιθανόλης, το λίπος φαίνεται να διασπάται (από 17,0% στις 120 h, φτάνει στο 2,5% στις 252h). Συμπερασματικά, ο μικροοργανισμός *Candida tropicalis* όπως και ο μικροοργανισμός *Candida oleophila*, διασπούν το ενδοκυτταρικό λίπος, σε συνθήκες πενίας πηγής άνθρακα.

Πίνακας 17: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Candida tropicalis* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9, time (h), Glc: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L),  $Y_{L/DW}$ : (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $Y_{Ips/DW}$ : (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες.  $Y_{EtOH/Glc}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. a: DW max (g/L), b: EtOH (g/L) c:  $Y_{L/DW}$  max, d:  $Y_{Ips/DW}$  max

<i>C. tropicalis</i> (≈60g/L Glc)	time	Glc	DW	EtOH	$Y_{L/DW}$	$Y_{Ips/DW}$	$Y_{EtOH/Glc}$
a	168,0	58,8	15,2	0,0	16,4	11,8	0,0
b	48,0	54,4	7,9	23,3	2,4	32,9	0,43
c	120,0	54,6	11,2	1,4	17	20,5	0,03
d	26,0	54,4	7,1	19,9	1,1	49,3	0,37

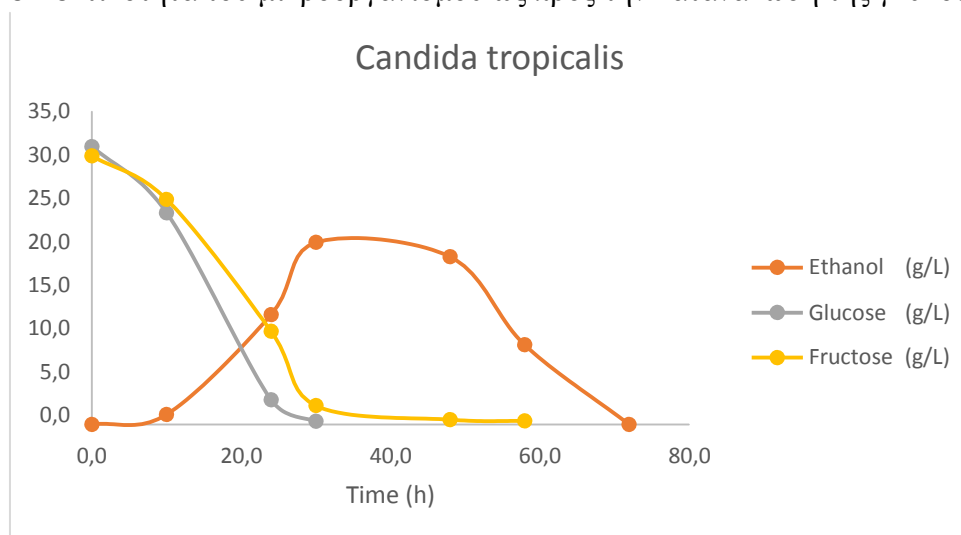
Αναφορικά με την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *C. tropicalis* σε μίγμα σακχάρων, παρατηρείται εκλεκτικότητα ως προς την κατανάλωση της γλυκόζης, καθώς ο ρυθμός κατανάλωσής της φαίνεται υψηλότερος από τον αντίστοιχο της φρουκτόζης. Η μέγιστη ποσότητα της αιθανόλης δεν έφτασε στα ίδια επίπεδα με την προηγούμενη σειρά πειραμάτων ενώ και ο ρυθμός παραγωγής της ήταν πιο χαμηλός. Παρά το γεγονός πως η αφομοίωση της αιθανόλης εκκίνησε και στις δύο περιπτώσεις ταυτόχρονα και ενώ υπήρχε ακόμα μικρή ποσότητα σακχάρου, διαθέσιμη στο μέσο καλλιέργειας, ο ρυθμός κατανάλωσής της ήταν υψηλότερος κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε θρεπτικό μέσο αποτελούμενο αποκλειστικά από γλυκόζη. Η ξηρά βιομάζα του μικροοργανισμού, είχε χαμηλότερη αύξηση από την προηγούμενη περίπτωση. Επίσης, αυξήθηκε ελάχιστα από την κατανάλωση της αιθανόλης, σε αντίθεση με την ανωτέρω διεργασία, όπου αυξήθηκε σημαντικά. Υψηλές σχετικές ποσότητες ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών παρήχθησαν κατά τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης οι οποίες μειώθηκαν κατά την ανακατανάλωση της αλκοόλης, (πίνακας 18). Τέλος, σε αντίθεση με την αύξηση σε γλυκόζη, στο συνυπόστρωμα ο μικροοργανισμός δεν εμφάνισε αξιόλογη παραγωγή λιπιδίων σε κανένα σημείο της ανάπτυξής του.

Πίνακας 18: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Candida tropicalis* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9. time (h), Glc: συγκέντρωση καταναλωθείσας γλυκόζης (g/L), Fru: συγκέντρωση καταναλωθείσας φρουκτόζης (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L),  $Y_{L/DW}$ :

% περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $Y_{Ips/DW}$ : % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες,  $Y_{EtOH/Scons}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα, a:  $DW_{max}$  (g/L), b:  $EtOH$  (g/L) c:  $Y_{L/DW_{max}}$ , d:  $Y_{Ips/DW_{max}}$

<i>C. tropicalis</i> (≈31g/L Glc + 30g/L Fru)	time	Glc	Fru	DW	EtOH	$Y_{L/DW}$	$Y_{Ips/DW}$	$Y_{EtOH/Scons}$
a	72,0	31,1	30,0	8,5	0,0	1,7	28,2	0,0
b	30,0	30,8	27,9	7,4	20,4	0,5	33,1	0,36
c	96,0	31,1	30,0	8,3	0,0	2,2	26,5	0,0
d	24,0	28,3	10,4	7,3	12,3	0,3	39,6	0,26

Στο διάγραμμα 5 φαίνεται η κινητική της αύξησης του μικροοργανισμού *Candida tropicalis* στην καλλιέργεια που περιείχε μίγμα γλυκόζης και φρουκτόζης ως υπόστρωμα. Το διάγραμμα αυτό σε αντιδιαστολή με το διάγραμμα 4 δείχνει την εκλεκτικότητα του μικροοργανισμού ως προς την κατανάλωση της γλυκόζης.



Διάγραμμα 5: Κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Candida tropicalis* σε μίγμα σακχάρων.

### 3.3.7 *Metschnikowia pulcherrima*

Κατά την αύξηση στη γλυκόζη, ο μικροοργανισμός *M. pulcherrima*, εμφάνισε ταχεία πρόσληψη γλυκόζης που οδηγεί σε ταυτόχρονη παραγωγή, χαμηλής ποσότητας αιθανόλης ( $EtOH_{max} = 17,4$  g/L,  $Y_{EtOH/Glc} \approx 0,32$  g/g), τη χαμηλότερη από όλους τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς. Μετά την κατανάλωση της γλυκόζης, ο μικροοργανισμός προκειμένου να διατηρήσει τη βιομάζα του, διασπά την παραχθείσα αιθανόλη. Στο σημείο αυτό ο μικροβιακός πληθυσμός βρέθηκε στη στάσιμη φάση της ανάπτυξης κι επομένως ο ρυθμός αύξησης ισούται με το ρυθμό θανάτου. Οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες και η σύνθεση λιπιδίων έχουν αντίστροφη μεταξύ τους πορεία. Ο μικροοργανισμός εκκινεί να συνθέτει ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες στην

έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, οι οποίοι παρουσιάζουν μέγιστο, στο σημείο που έχει καταναλωθεί το διαθέσιμο σάκχαρο, ενώ στη συνέχεια η συγκέντρωσή τους μειώνεται. Αντίθετα, η σύνθεση λιπιδίων εκκινεί ταυτόχρονα με την αρχή της σύνθεσης των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών και εξακολουθεί παράλληλα με την πτώση των πολυσακχαριτών και την ανάλωση της εξοκυτταρικής αιθανόλης. Ωστόσο, η ποσότητα του ενδοκυτταρικού λίπους ανά ξηρά βιομάζα είναι σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας περιορισμένη.

Πίνακας 19: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Metschnikowia pulcherrima* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9, time (h), Glc: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L), Y<sub>L/DW</sub>: (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος, Y<sub>Ips/DW</sub>: (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, Y<sub>EtOH/Glc</sub> (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. a: DW max (g/L), b: EtOH (g/L) c: Y<sub>L/DW</sub> max, d: Y<sub>Ips/DW</sub> max

<i>M. pulcherrima</i> (≈60g/L Glc)	time	Glc	DW	EtOH	Y <sub>L/DW</sub>	Y <sub>Ips/DW</sub>	Y <sub>EtOH/Glc</sub>
a, c	252,0	59,2	10,1	0,0	8,5	14,9	0,0
b	26,0	54,6	8,7	17,4	2,3	25,2	0,32
d	50,0	57,7	9,0	10,6	5,6	37,9	0,18

Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *M. pulcherrima* σε συνυπόστρωμα γλυκόζης και φρουκτόζης, παρουσίασε ομοιότητα σε σχέση με την ανάπτυξή του σε θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από γλυκόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Κατ' αρχάς η αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε περίπου το ίδιο χρονικό διάστημα, με μικρή εκλεκτικότητα ως προς τη γλυκόζη. Η παραγωγή του κύριου προϊόντος (της αιθανόλης) παρουσίασε αντίστοιχη πορεία με την προηγούμενη πειραματική διαδικασία, τόσο ως προς το ρυθμό όσο και ως προς το επίπεδο της μέγιστης τιμής. Επίσης, η παραγωγή των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών εκκίνησε από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ η συγκέντρωσή τους και σε αυτήν τη περίπτωση μειώνεται όσο διαρκεί η ανακατανάλωση της αλκοόλης (από DW = 6,2 g/L, έως DW = 11,2 g/L). Ταυτόχρονα, παρατηρείται σημαντική αύξηση της βιομάζας του μικροοργανισμού κατά την ανακατανάλωση της αιθανόλης η οποία δε συμβαδίζει με την συμπεριφορά του μικροοργανισμού, στην προηγούμενη περίπτωση. Η συμπεριφορά αυτή θα μπορούσε ενδεχομένως να αποδοθεί σε λύση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών ταυτόχρονα με την πτώση της αιθανόλης. Τέλος, σε κανένα σημείο της πειραματικής πορείας δεν εμφανίστηκε αξιοσημείωτη λιποσυσσώρευση.

Πίνακας 20: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Candida oleophila* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9. time (h), Glc: συγκέντρωση καταναλωθείσας γλυκόζης (g/L), Fru: συγκέντρωση καταναλωθείσας φρουκτόζης (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L), Y<sub>L/DW</sub>: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος, Y<sub>Ips/DW</sub>: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε

ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες,  $Y_{EtOH/Sc ons}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα, a:  $DW_{max}$  (g/L), b:  $EtOH$  (g/L) c:  $Y_{L/DW}$  max, d:  $Y_{Ips/DW}$  max

<i>M. pulcherrima</i> (≈31g/L Glc + 30g/L Fru)	time	Glc	Fru	DW	EtOH	$Y_{L/DW}$	$Y_{Ips/DW}$	$Y_{EtOH/Sc ons}$
a, c	96,0	31,1	30,0	11,2	0,0	3,0	6,6	0,0
b, d	24,0	31,1	29,2	6,1	17,1	1,0	26,1	0,28

### 3.3.8 *Williopsis saturnus*

Ο μικροοργανισμός *Williopsis saturnus*, εμφανίζει ταχεία πρόσληψη της γλυκόζης. Η παραγωγή της αιθανόλης είναι άμεση, όπως και η ανακατανάλωσή της, όταν ο μικροοργανισμός βρεθεί σε συνθήκες πείνας πηγής άνθρακα κατά τα τυπικά, τα οποία εμφανίζονται στους θετικούς στο φαινόμενο Crabtree μικροοργανισμούς. Η βιομάζα του μικροοργανισμού αυξάνεται όσο ο μικροοργανισμός έχει στη διάθεσή του οιαδήποτε πηγή άνθρακα, ενώ οι μεταβολές στο ρυθμό της αύξησης είναι οι αναμενόμενες. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Williopsis saturnus* οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες καθώς, σε αντίθεση με όλους τους προαναφερθέντες μικροοργανισμούς, η σχετικές ποσότητες των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, συνέχισαν να αυξάνονται και κατά την ανακατανάλωση της αιθανόλης. Παρατηρήθηκε δε, σημαντική πτώση στις ποσότητες αυτές μετά την αφομοίωση της αλκοόλης. Ταυτόχρονα, παρατηρείται αύξηση του μικροβιακού λίπους. Συγκεκριμένα, στα τελευταία σημεία του πειράματος εμφανίζεται σημαντική ποσότητα των λιπιδίων επί της ξηράς βιομάζας  $Y_{L/DW} = 19,1\%$  με την απόλυτη τιμή των λιπιδίων να ανέρχεται στην τιμή  $L = 2,5$  g/L.

Πίνακας 21: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Williopsis saturnus* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9, time (h), Glc: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L),  $Y_{L/DW}$ : (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $Y_{Ips/DW}$ : (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες.  $Y_{EtOH/Glc}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. a:  $DW_{max}$  (g/L), b:  $EtOH$  (g/L) c:  $Y_{L/DW}$  max, d:  $Y_{Ips/DW}$  max

<i>W. saturnus</i> (≈60g/L Glc)	time	Glc	DW	EtOH	$Y_{L/DW}$	$Y_{Ips/DW}$	$Y_{EtOH/Glc}$
a, c	252,0	59,8	13,1	-	19,1	3,1	0,0
b	24,0	55,3	7,5	21,0	5,4	20,0	0,38
d	117,0	56,8	10,0	3,6	2,9	47,0	0,06

Στον πίνακα 22 αναγράφονται τα στοιχεία για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε συνυπόστρωμα γλυκόζης – φρουκτόζης. Η κατανάλωση των σακχάρων είναι άμεση, ταυτόχρονη και όχι επιλεκτική ως προς κάποιο από τα σάκχαρα. Η παραχθείσα αιθανόλη ανέρχεται στα ίδια επίπεδα με την αντίστοιχη ποσότητα που δημιουργήθηκε στην ανάπτυξη σε υπόστρωμα γλυκόζης, ενώ η πρόσληψή της επιφέρει αύξηση του πληθυσμού όπως παρατηρήθηκε και προηγουμένως. Ωστόσο, όπως και στους μικροοργανισμούς *Candida oleophila* και *Saccharomyces cerevisiae* η αιθανόλη δεν καταναλώνεται πλήρως μέχρι το τελευταίο σημείο της παρατήρησης. Οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες δείχνουν να έχουν την ίδια τάση με το προηγούμενο πείραμα. Σε αντιδιαστολή με το προηγούμενο πείραμα και σε συνάφεια με τα δεδομένα, τα οποία προέκυψαν με τους περισσότερους από τους θετικούς στο φαινόμενο Crabtree μικροοργανισμούς η ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους ήταν ελάχιστη και δεν φαίνεται να υπάρχει περίπτωση αύξησής της από την κατανάλωση της εναπομείνουσας αιθανόλης ή της ποσότητας ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών.

Πίνακας 22: Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Williopsis saturnus* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Συνθήκες αύξησης: βλ. πίνακας 9. *time* (h), *Glc*: συγκέντρωση καταναλωθείσας γλυκόζης (g/L), *Fru*: συγκέντρωση καταναλωθείσας φρουκτόζης (g/L), *DW*: ξηρά βιομάζα (g/L), *EtOH*: αιθανόλη (g/L), *Y<sub>L/DW</sub>*: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος, *Y<sub>Ips/DW</sub>*: % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, *Y<sub>EtOH/Scns</sub>* (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα, *a*: *DW max* (g/L), *b*: *EtOH* (g/L) *c*: *Y<sub>L/DW max</sub>*, *d*: *Y<sub>Ips/DW max</sub>*

<b><i>W. saturnus</i></b> <b>(≈30g/L Glc</b> <b>+ 30g/L Fru)</b>	<b>time</b>	<b>Glc</b>	<b>Fru</b>	<b>DW</b>	<b>EtOH</b>	<b>Y<sub>L/DW</sub></b>	<b>Y<sub>Ips/DW</sub></b>	<b>Y<sub>EtOH/Scns</sub></b>
<b>a, c</b>	96,0	24,6	29,9	9,6	7,0	3,4	32,2	0,13
<b>b</b>	24,0	23,9	29,8	6,6	21,6	0,5	32,9	0,40
<b>d</b>	30,0	24,0	29,9	5,5	18,4	1,4	35,4	0,34

### 3.3.9 Ανάλυση ενδοκυτταρικού λίπους

Κατά το σημείο στο οποίο εμφανίστηκε η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ανά μικροοργανισμό, συλλέχθηκε το σύνολο του λίπους με τις διεργασίες που αναφέρθηκαν στο αντίστοιχο εδάφιο. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων και ταυτοποίησή τους μέσω αέριας χρωματογραφίας. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφορικά με τη σύσταση των συνολικών λιπιδίων σε λιπαρά οξέα, με τον πίνακα 23, ελήφθησαν και κατά την αύξηση των μικροοργανισμών σε μίγμα γλυκόζης και φρουκτόζης. Τα λιπαρά οξέα που ανιχνεύτηκαν καθώς και το

ποσοστό του καθενός επί του συνολικού λίπους του μικροοργανισμού εμφανίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 23: Σχετικά ποσοστά λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν από τους μικροοργανισμούς. Παλμιτικό οξύ (C 16:0), Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), Στεατικό οξύ (C18:0), Ελαϊδικό οξύ (C18:1), Λινελαϊκό οξύ (C18:2)

	<b>C 16:0</b>	<b>C16:1</b>	<b>C18:0</b>	<b>C18:1</b>	<b>C18:2</b>
<i>C. boidinii</i>	21,2	6,4	9,1	42,4	21,1
<i>C. oleophila</i>	13,5	2,6	8,5	64,3	12,4
<i>C. tropicalis</i>	26,6	4,8	16,5	40,2	11,9
<i>M. pulcherrima</i>	24,1	4,3	5,4	45,1	17,8
<i>P. ciferrii</i>	20,9	7,5	15,7	10,2	13,6
<i>S. cerevisiae</i>	14,8	32,4	6,4	39,5	5,0
<i>W. saturnus</i>	18,4	6,5	13,6	33,1	28,4
<i>Y. lipolytica</i>	15,6	10,9	11,1	19,6	31,7

### 3.3.10 Ποιοτική ανάλυση αρωματικών συστατικών

Παρά το γεγονός πως πραγματοποιήθηκε μόνο ποιοτική και όχι και ποσοτική ανάλυση στις αρωματικές ενώσεις των εξεταζόμενων ζυμώσεων, τα αποτελέσματα έδειξαν να έχουν μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά κάποιους εκ των μικροοργανισμών. Σε ένα πρώτο επίπεδο, μόνο οι μικροοργανισμοί οι οποίοι απέδωσαν αιθανόλη υποβλήθηκαν σε αέρια χρωματογραφία προς τη μελέτη των πτητικών συστατικών τους. Σε όλους τους μικροοργανισμούς ανιχνεύτηκαν οι ακόλουθες ουσίες:

- Μεθανόλη
- Οξικός αιθυλεστέρας
- Ακεταλδεΐδη
- Αιθανόλη
- Ισοαμυλική αλκοόλη

Εκτός των ανωτέρω, οι μικροοργανισμοί παρήγαγαν και κάποιες ακόμα ενώσεις, οι οποίες δεν ήταν κοινές για όλους και για το λόγο αυτό, θα αναφερθούν ξεχωριστά. Στους μικροοργανισμούς *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* και *W. saturnus* εμφανίστηκε επίσης κορυφή που αντιστοιχεί στον 2 – φαινυλαιθυλικό αιθυλεστέρα. Ο μικροοργανισμός *C. oleophila* εμφάνισε κορυφές στον εξαλκό αιθυλεστέρα και τον αιθυλικό βουτυρεστέρα. Τέλος, στους μικροοργανισμούς *C. boidinii* και *W. saturnus* ανιχνεύθηκε και ισοαμυλικός αιθυλεστέρας. Στην περίπτωση δε, του μικροοργανισμού *W. saturnus* η παρουσία της συγκεκριμένης ένωσης ήταν εμφανής και οργανοληπτικά καθώς καθ’



όλη τη διάρκεια της μελέτης οι καλλιέργειες του μικροοργανισμού είχαν έντονη οσμή μπανάνας που είναι το άρωμα που αποδίδεται στον ισοαμυλικό αιθυλεστέρα.

### 3.4 Συζήτηση

Από τους οκτώ μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν κατά την παρούσα διπλωματική διατριβή, οι έξι αποδείχθηκαν θετικοί στο φαινόμενο Crabtree, ενώ οι δύο αρνητικοί. Οι θετικοί στο φαινόμενο μικροοργανισμοί κατανάλωσαν τις διαθέσιμες ποσότητες σακχάρων προς παραγωγή αιθανόλης, καθώς οι ποσότητες αυτές υπερέβαιναν την κρίσιμη συγκέντρωση σακχάρου, πάνω από την οποία εμφανίζεται το φαινόμενο Crabtree. Εν συνεχεία, όλοι ανεξαιρέτως οι θετικοί μικροοργανισμοί, αφομοίωσαν την αιθανόλη (όλη την παραχθείσα ποσότητα, ή μέρος αυτής) προκειμένου να διατηρήσουν ή και να αυξήσουν τον πληθυσμό τους. Σε ορισμένους από τους μικροοργανισμούς (π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii*) η ανάλωση της αιθανόλης οδήγησε σε αξιοσημείωτη διαφασική αύξηση της βιομάζας (Sarris et al., 2013, Hagman et al., 2013). Σε άλλες περιπτώσεις (π.χ. *Candida oleophila*, *Metschnikowia pulcherrima*) η αφομοίωση της αιθανόλης οδήγησε σε μικρή ή ελάχιστη αύξηση της βιομάζας (Hagman et al., 2013).

Η μέγιστη θεωρητική απόδοση της αλκοολικής ζύμωσης μέσω της γλυκόλυσης EMP από το μικροοργανισμό *S. cerevisiae* που ανέρχεται στο 0,51 g/g (Sarris & Papanikolaou, 2016). Σε αντίστοιχες εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί για τη μελέτη της αλκοολικής ζύμωσης από στελέχη που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*, φαίνεται πως οι μικροοργανισμοί δεν είναι σε θέση να προσεγγίσουν τη μέγιστη θεωρητική απόδοση. Μάλιστα, σε έρευνες που έχουν δημοσιευθεί, πολλές φορές ακόμα και τα είδη του γένους *Saccharomyces* δεν είναι σε θέση να δώσουν τέτοιες αποδόσεις, με τη μέγιστη απόδοση να φτάνει στα 0,34 g/g για τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*, δηλαδή λίγο χαμηλότερα από την παρούσα μελέτη (Domizio et al., 2011).

Ακολουθεί πίνακας με πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών όσον αφορά την παραγωγή αιθανόλης από μεγάλο εύρος υποστρωμάτων και μεγάλη ποικιλία μικροβιακών στελεχών που εκτελούν τις αντίστοιχες ζυμώσεις. Στο τέλος του πίνακα παρατίθενται και τα στοιχεία της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 24: Παραγωγή αιθανόλης από διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Αιθανόλη (g/L): μέγιστη ποσότητα που παρήχθη σε έκαστο εκ των πειραμάτων, Υ<sub>ΕΙΟΗ/SCG</sub> (g/g): μέγιστη ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα, SCG: spent coffee ground (contained several polysaccharides), DAH: dilute - acid hydrolyzate, Glc: Glucose, Gal: Galactose, Man: Mannose, Xyl: Xylose, SCM: Sugar cane Molasses, Mol: Molasses, OMW: Olive mill wastewaters, Fru:

Στέλεχος	Πηγή C	Αιθανόλη (g/L)	Y <sub>EtOH/Scons</sub> (g/g)	Τύπος ζύμωσης	Αναφορά
<i>S. cerevisiae</i>	SCG	11,7	0,26	flasks	Mussatto et al., 2012
<i>P. stipitis</i>	SCG	11,7	0,26	flasks	Mussatto et al., 2012
<i>M. indicus</i>	Γλυκόζη	9,52	0,40	flasks	Sues et al., 2005
<i>M. indicus</i>	Γαλακτόζη	8,1	0,34	flasks	Sues et al., 2005
<i>M. indicus</i>	Μαννόζη	9,28	0,39	flasks	Sues et al., 2005
<i>M. indicus</i>	Ξυλόζη	4,2	0,18	flasks	Sues et al., 2005
<i>M. indicus</i>	DAH	10,0	0,42	bioreactor	Sues et al., 2005
<i>P. tannophilus</i>	Γλυκόζη	6,9	0,29	flasks	Zhao et al., 2005
<i>P. tannophilus</i>	Glc + Xyl 3:1	5,8	0,40	flasks	Zhao et al., 2005
<i>P. tannophilus</i>	Glc + Xyl 1:1	4,8	0,20	flasks	Zhao et al., 2005
<i>P. tannophilus</i>	Glc + Xyl 1:3	3,9	0,16	flasks	Zhao et al., 2005
<i>P. tannophilus</i>	Ξυλόζη	2,7	0,11	flasks	Zhao et al., 2005
<i>S. cerevisiae</i>	Cane molasses	80,0 – 100,0	0,45	batch	Claassen et al., 1999
<i>S. cerevisiae</i>	Cane molasses	53,7 - 98,1	0,41	Fed - batch	Echegaray et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i>	Cane molasses	89,3 – 92,0	0,41	Repeated batch	Morimura et al., 1997
<i>S. cerevisiae</i>	Cane molasses	30,0 – 70,0	0,48	Continious	Kosaric & Velikonjia 1995
<i>S. cerevisiae</i>	Molasses	37,3	0,44	flasks	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 10%	34,3	0,4	flasks	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 20%	33,9	0,41	flasks	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 30%	31,0	0,35	flasks	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 40%	28,4	0,35	flasks	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 50%	24,2	0,27	flasks	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 20%	44,4	0,49	batch bioreactor	Sarris et al., 2014

<i>S. cerevisiae</i>	Γλυκόζη	21,2	0,38	flasks	current study
<i>S. cerevisiae</i>	Glc + Fru	22,2	0,41	flasks	current study
<i>C. boidinii</i>	Γλυκόζη	22,2	0,39	flasks	current study
<i>C. boidinii</i>	Glc + Fru	19,0	0,34	flasks	current study
<i>C. oleophila</i>	Γλυκόζη	18,8	0,34	flasks	current study
<i>C. oleophila</i>	Glc + Fru	18,4	0,32	flasks	current study
<i>C. tropicalis</i>	Γλυκόζη	23,3	0,43	flasks	current study
<i>C. tropicalis</i>	Glc + Fru	20,4	0,39	flasks	current study
<i>M. pulcherrima</i>	Γλυκόζη	17,4	0,32	flasks	current study
<i>M. pulcherrima</i>	Glc + Fru	17,1	0,28	flasks	current study
<i>W. saturnus</i>	Γλυκόζη	21,0	0,38	flasks	current study
<i>W. saturnus</i>	Glc + Fru	21,6	0,40	flasks	current study

Τα στοιχεία του πίνακα 24 αποδεικνύουν, πως οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν τη δυνατότητα να εκτελέσουν αλκοολική ζύμωση με σχετικά καλές αποδόσεις για την πλειονότητα αυτών. Η μέγιστη απόδοση επετεύχθη από το μικροοργανισμό *Candida tropicalis* στην ανάπτυξή του σε υπόστρωμα γλυκόζης, ενώ σε συνυπόστρωμα που αποτελείτο από γλυκόζη και φρουκτόζη σε ίσες συγκεντρώσεις, ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* παρουσίασε την υψηλότερη απόδοση. Ο μικροοργανισμός *Candida tropicalis* έχει απασχολήσει κι άλλες μελέτες εξαιτίας της ικανότητάς του να παράγει αιθανόλη σε υψηλές θερμοκρασίες και σχετικά χαμηλό pH (Rattanachomsri et al., 2009). Ο μικροοργανισμός *Metschnikowia pulcherrima* είναι εκείνος, ο οποίος παρουσίασε τη χαμηλότερη απόδοση και στις δύο περιπτώσεις, γεγονός που παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς ο μικροοργανισμός αυτός ανήκει στις καλούμενες «άγριες ζύμες», δηλαδή εκείνες που ευθύνονται για την αυθόρμητη έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης στα γλεύκη (Fernández, et al., 2000). Ο μικροοργανισμός *Williopsis saturnus* επέδειξε αντίστοιχες αποδόσεις με το μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*. Ο μικροοργανισμός *Candida boidinii* εμφάνισε υψηλότερη απόδοση κατά την ανάπτυξή του με μόνη πηγή άνθρακα τη

γλυκόζη, ενώ ο μικροοργανισμό *Candida oleophila* επέδειξε παραπλήσια συμπεριφορά και στις δύο σειρές πειραμάτων, επιφέροντας μέτρια απόδοση.

Ιδιαίτερη προσοχή, δόθηκε κατά την παρούσα μελέτη, στην ικανότητα παραγωγής ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών που εμφάνισαν σχεδόν όλοι οι μικροοργανισμοί στα πρώτα στάδια της αύξησής τους, υπό συνθήκες παρουσίας αζώτου. Τούτο είναι αντίθετο με τις θεωρήσεις της βιβλιογραφίας (Ratledge et al., 1988, Papanikolaou et al., 2011), καθώς θεωρείται πως οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, όπως και τα λιπίδια, συσσωρεύονται κατά τη στάσιμη φάση της αύξησης των μικροοργανισμών και υπό περιοριστικές ως προς το άζωτο συνθήκες. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν τη συσσώρευση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών και των λιπιδίων και στα πρώτα στάδια της αύξησης και παρά την παρουσία αζώτου στο μέσο ζύμωσης. Στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών της παρούσας μελέτης (*Yarrowia lipolytica*, *Pichia ciferrii*), υπήρξε η τάση σύνθεσης κάποιας ποσότητας λιπιδίων στα πρώτα στάδια της αύξησης, ακολουθούμενη από πτώση του % ποσοστού των λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας συνάδει με αρκετές μελέτες της βιβλιογραφίας (Makri et al., 2010, Papanikolaou et al., 2017)

Ακόμα ένα ενδιαφέρον στοιχείο που ανέκλυψε κατά την πειραματική διαδικασία είναι η λιποσυσσώρευση που παρουσίασαν οι μικροοργανισμοί. Αρχικά, οι μικροοργανισμοί *Yarrowia lipolytica* και *Pichia ciferrii* που αποδείχθηκαν αρνητικοί ως προς το φαινόμενο Crabtree είναι εκείνοι παρήγαγαν αξιόλογες ποσότητες λιπιδίων. Οι ποσότητες έφτασαν ως και το 26,3% ποσοστό λίπους επί ξηράς βιομάζας για το μικροοργανισμό. *Y. lipolytica* και το 39,1% για το μικροοργανισμό *P. ciferrii*. Παραδόξως, κάποιοι ζυμωτικοί μικροοργανισμοί εμφάνισαν αντίστοιχη μεταβολική δραστηριότητα, μετά την κατανάλωση του υποστρώματος και την ανακατανάλωση της αιθανόλης. Ο μικροοργανισμός *Candida boidinii* παρήγαγε στο τελευταίο σημείο της ζύμωσής του, 3,2 g/L λιπιδίων που αντιστοιχούν στο 24,8% επί της ξηράς βιομάζας του. Επίσης, ο μικροοργανισμός *W. saturnus* στο τέλος της παρατήρησής του είχε συνθέσει 2,5 g/L ενδοκυτταρικού λίπους, δηλαδή 19,1% επί ξηράς βιομάζας. Οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* και *M. pulcherrima* εμφάνισαν μέγιστα ποσοστά λίπους επί ξηράς βιομάζας 17,0%, 15,9% και 8,5% αντίστοιχα. Τέλος, ο μικροοργανισμός *C. oleophila* εμφάνισε το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς βιομάζας πριν καταναλωθούν ολόκληρες οι ποσότητες του σακχάρου και της αιθανόλης. Το ποσοστό αυτό ήταν 11,8%, το οποίο στο τελικό σημείο της ζύμωσης έπεσε στο 6,8%. Τα ποσοστά αυτά εμφανίστηκαν μόνο στην περίπτωση ανάπτυξής τους σε γλυκόζη. Στην

περίπτωση του συνυποστρώματος κανείς εκ των μικροοργανισμών, δεν εμφάνισε ποσοστό ανώτερο του 10,0%.

### 3.5 Οινολογικό ενδιαφέρον

Από τις ζύμες που μελετήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, κάποιες έχουν ήδη απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα ως προς τη δυνατότητα χρήσης τους στην οινολογία. Αρχικά, ο μικροοργανισμός *Williopsis saturnus* έδειξε μεταβολική δραστηριότητα πανομοιότυπη με εκείνη του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* και στην περίπτωση της ανάπτυξης σε υπόστρωμα γλυκόζης και στην περίπτωση ανάπτυξης σε συνυπόστρωμα γλυκόζης – φρουκτόζης. Ο μικροοργανισμός αυτός έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όπως έχει ήδη αναφερθεί, λόγω της ικανότητάς του να μετατρέπει τις ανώτερες αλκοόλες στους αντίστοιχους αιθυλεστέρες. Παράγει υψηλά επίπεδα πτητικών εστέρων, ενώ σε υποστρώματα YPD (yeast extract – peptone – D+ Glucose) δίνει υψηλές ποσότητες ισοαμυλικού αιθυλεστέρα (Iwase et al., 1995). Έχουν επίσης πραγματοποιηθεί μελέτες σε κοινές καλλιέργειες του μικροοργανισμού με το μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*, στις οποίες έχει αποδειχθεί η συνεισφορά του πρώτου στη σύνθεση πτητικών ενώσεων, όμως αναφέρεται αυξημένη και η παραγωγή οξικού οξέος (Erten & Tanguler, 2010). Στον οίνο, αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα πιθανή αύξηση της πτητικής οξύτητας, του παραγόμενου προϊόντος. Επιπλέον, θεωρείται από τους μικροοργανισμούς που παράγουν αρκετά μεγάλο εύρος αρωματικών και γευστικών συστατικών, που ενισχύουν την πολυπλοκότητα των οίνων (Lee et al., 2010). Ακόμα, στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή παρουσιάστηκε η αρκετά ενδιαφέρουσα για περαιτέρω μελέτη, ικανότητά του να παράγει ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους ενώ εξαντλείται η πηγή άνθρακα.

Εν συνεχεία, ο μικροοργανισμός *Metschnikowia pulcherrima* ανήκει στις λεγόμενες «άγριες ζύμες», τις ζύμες που απομονώνονται από τους φλοιούς των σταφυλιών και ευθύνονται για περιπτώσεις αυθόρμητων ζυμώσεων. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός αυτός, έχει χαρακτηριστεί από την ικανότητά του να σκοτώνει κάποιους άλλους μικροοργανισμούς ανεπιθύμητους στη διαδικασία παραγωγής οίνου, όπως είναι οι μικροοργανισμοί *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* και *Alternaria alternata* (Saravanakumar et al., 2008). Ο μικροοργανισμός αυτός έχει τη δυνατότητα να παραβρίσκεται σε αλκοολικές ζυμώσεις που χωρούν σε σχετικά χαμηλές τιμές pH, είναι ανθεκτικός σε περιεκτικότητα αιθανόλης έως 5% v/v και είναι ψυχρόφιλος.

Ακολούθως, ο μικροοργανισμός *Candida boidinii*, παρουσιάζει ενδιαφέρον ως προς την ικανότητά του να συνθέσει αξιόλογο ποσοστό ενδοκυτταρικού λίπους επί ξηράς βιομάζας. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός παρήγαγε και αρκετά σημαντική ποσότητα αιθανόλης, και έτσι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στα αρχικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Τέλος, στο υπερκείμενο υγρό των ζυμώσεων του ανιχνεύτηκαν ποσότητες ουσιών, σημαντικών για την πολυπλοκότητα του οίνου.

Ο μικροοργανισμός *Candida oleophila* ήταν ο μόνος από τους μικροοργανισμούς που εμφάνισε τάση παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους σε συνυπόστρωμα γλυκόζης και φρουκτόζης και είναι ίσως το μόνο στοιχείο του, που παρουσιάζει ενδιαφέρον για περαιτέρω διερεύνηση.

Ο μικροοργανισμός *Candida tropicalis* ήταν ο μικροοργανισμός εκείνος, ο οποίος σε υπόστρωμα γλυκόζης έδωσε την υψηλότερη απόδοση αιθανόλης. Ωστόσο, είναι το μόνο στοιχείο του που τον καθιστά ενδιαφέροντα και μάλιστα ίσως παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον η έρευνα πάνω στην παραγωγή βιοαιθανόλης όσον αφορά το μικροοργανισμό αυτόν.

Τέλος, ο μικροοργανισμός *Pichia ciferrii* δεν παρουσιάζει οινολογικό ενδιαφέρον καθώς το συγκεκριμένο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε απεδείχθη πως ανήκε στα ελαιόγωνα και αρνητικά στο φαινόμενο Crabtree στελέχη.

## 4. Βιβλιογραφία

- Aggelis, G., Margariti, N., Kralli, C., & Flouri, F. (2000). Growth of *Candida boidinii* on methanol and the activity of methanol-degrading enzymes as affected from formaldehyde and methylformate. *Journal of Biotechnology*, 80(2), 119–125.
- Aggelis, G., & Komaitis, M. (1999). Enhancement of single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing in the presence of *Teucrium polium* L. aqueous extract. *Biotechnology Letters*, 21(9), 747–749.  
<https://doi.org/10.1023/A:1005591127592>
- Anastassiadis, S., Wandrey, C., & Rehm, H. J. (2005). Continuous citric acid fermentation by *Candida oleophila* under nitrogen limitation at constant C/N ratio. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 695–705.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribe Larrea, J. L., Molina-Jouve, C., & Nicaud, J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 48(6), 375–387.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Biochemistry. 5th. New York: WH Freeman, 38(894), 76.
- Börgel, D., van den Berg, M., Hüller, T., Andrea, H., Liebisch, G., Boles, E., Schaffer, S. (2012). Metabolic engineering of the non-conventional yeast *Pichia ciferrii* for production of rare sphingoid bases. *Metabolic Engineering*, 14(4), 412–426.
- Buzzini P., Martini A., Pagnonib U. M., Davoli P., (2003). Production of flavoured volatile organic compounds (VOCs) by *Candida oleophila* GK10: Optimisation using factorial design and response surface analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5), 668–675.
- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36(2), 1097–1108.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10(2), 123–133.
- Ciani, M., & Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 199–203.
- Claassen, P.A.M., van Lier, J.B., Lopez Contreras, A.M., van Niel, E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., de Vries, S.S., Weusthuis, R.A., 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 741–755.

- Compagno C, Dashko S & Piškur J (2014) Introduction to carbon metabolism in yeast. In: *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism* (Compagno C & Piskur J, eds), pp. 1–21. Springer, Heidelberg. (in press) ISBN 978-3-642-55012-6.
- Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiology Letters*, 103(1), 1-27.
- Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal*, 23(3), 536–545.
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., & Piskur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, 14(6), 826–832.
- De Deken, R. (1966). The Crabtree Effects: A Regulatory System in Yeast. *J Gen Microbiol*, 44(1), 149–156.
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Outlining a future for non-Saccharomyces yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 170–180.
- Echegaray, O., Carvalho, J., Fernandes, A., Sato, S., Aquarone, E., Vitolo, M., 2000. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugarcane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. *Biomass and Bioenergy* 19, 39–50.
- Erten, H., & Tanguler, H. (2010). Influence of *Williopsis saturnus* yeasts in combination with *saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 50(5), 474–479.
- Fernández, M., Úbeda, J. F., & Briones, A. I. (2000). Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1–2), 29–36.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 11–22.
- Fukuhara, H. (2003). The Kluuyver effect revisited. *FEMS yeast research*, 3(4), 327-331.
- Garde-Cerdan, T., & Ancin-Azpilicueta, C. (2006). Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. *European Food Research and Technology*, 222(1–2), 15–25.
- Gil, J. V, Mateo, J. J., JimÉNez, M., Pastor, A., & Huerta, T. (1996). Aroma Compounds in Wine as Influenced by Apiculate Yeasts. *Journal of Food Science*, 61(6), 1247–1250.



- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(2), 202-218
- Gonçalves, D. B., Batista, A. F., Rodrigues, M. Q. R. B., Nogueira, K. M. V., & Santos, V. L. (2013). Ethanol production from macauba (*Acrocomia aculeata*) presscake hemicellulosic hydrolysate by *Candida boidinii* UFMG14. *Bioresource Technology*, 146, 261–266.
- Goold, H. D., Kroukamp, H., Williams, T. C., Paulsen, I. T., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2017). Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 264–278.
- Hagman, A., & Piškur, J. (2015). A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast. *PLoS ONE*, 10(1), 1–24.
- Hagman, A., Torbjorn S., T., Compagno, C., & Piskur, J. (2013). Yeast “Make-Accumulate-Consume” Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication. *PLoS ONE*, 8(7).
- Hames, G. (2014). *Alcohol in world history*. Routledge.
- Iwase, T., Morikawa, T., Fukuda, H., Sasaki, K. & Yoshitake, M. (1995). Production of fruity odor by genus *Williopsis*. *Journal of the Brewing Society of Japan*, 90, 394–396.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 15–39.
- Καλλίθρακα Σ., (2015), Χημεία Οίνου, Πανεπιστημιακές σημειώσεις.
- Κοτσερίδης Γ., (2008), Τεχνολογία Οίνου I, Πανεπιστημιακές σημειώσεις.
- Κοτσερίδης Γ., (2008), Τεχνολογία Οίνου II, Πανεπιστημιακές σημειώσεις.
- Kosaric, N., Velikonja, J., 1995. Liquid and gaseous fuels from biotechnology: challenge and opportunities. *FEMSMicrobiology Reviews* 16, 111–142.
- Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 236-246.
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(Special Issue), 97–129.
- Lerm, E., & Engelbrecht, L. (2010). Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF. *S. Afr. J. Enol. Vitic*, 31(2), 186–212. Retrieved from [http://www.sasev.org/journal-sajev/sajev-articles/volume-31-2/Lerm et al pp 186 to 212.pdf](http://www.sasev.org/journal-sajev/sajev-articles/volume-31-2/Lerm%20et%20al%20pp%20186%20to%20212.pdf)

- Lee, P. R., Ong, Y. L., Yu, B., Curran, P., & Liu, S. Q. (2010). Evolution of volatile compounds in papaya wine fermented with three *Williopsis saturnus* yeasts. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(10), 2032–2041.
- Liu, L., Redden, H., & Alper, H. S. (2013). Frontiers of yeast metabolic engineering : diversifying beyond ethanol and *Saccharomyces*. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 1023–1030. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.03.005>
- Macedo, I. C., Seabra, J. E. A., & Silva, J. E. A. R. (2008). Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy*, 32(7), 582–595.
- Makri, A., Fakas, S., & Aggelis, G. (2010). Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology*, 101(7), 2351–2358.
- McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., & Voigt, M. M. (1996). Neolithic resinated wine. *Nature*, 381(6582), 480.
- Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10(March), 52–61.
- Morimura, S., Zhong, Y.L., Kida, K., 1997. Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermo- tolerant flocculating yeast with improved salt-tolerance. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83 (3), 271–274
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M. R., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., ... Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, 28(6), 817–830.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M., Carneiro, L. M., & Teixeira, J. A. (2012). Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied energy*, 92, 763-768.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Παπανικολάου Σ., (2015), Μικροβιολογία Οίνου, Πανεπιστημιακές σημειώσεις.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single stage continuous culture. *Bioresource Technology*, 82(1), 43–49.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1052–1073.

- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2008). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*, *99*(7), 2419–2428.
- Papanikolaou, S., Kampsopoulou, E., Blanchard, F., Rondags, E., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Chevalot, I., Aggelis, G. (2017). Production of secondary metabolites through glycerol fermentation under carbon-excess conditions by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodosporidium toruloides*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *119*(9).
- Papanikolaou, S., Rontou, M., Belka, A., Athenaki, M., Gardeli, C., Mallouchos, A., Aggelis, G. (2016). Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Engineering in Life Sciences*, *17*(3), 262–281.
- Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *1*(October), 17.
- Piškur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., & Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, *22*(4), 183–186.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1989). Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(2), 468–477.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, *16*(8), 675–729.
- Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L., & Champreda, V. (2009). Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, *107*(5), 488-493.
- Ratledge, C., Grant, W. D., & Sundaram, T. K. (1988). Biotechnology group meeting extremophiles. *J Chem Technol Biotechnol*, *42*(December), 289–322.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications. Handbook of Enology* (Vol. 1).
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition. Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition* (Vol. 2).
- Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Barbagelata, R. J., Barda, N. B., & Caballero, A. C. (2010). Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic

- fermentation behaviour and wine aroma. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), 19–25.
- Rozpedowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Piškur, J. (2011). Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nature Communications*, 2(May), 302.
- Σουφλερός Ευάγγελος (2012) Οινολογία Επιστήμη και Τεχνολογία, Τόμος Ι, Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.
- Σουφλερός, Ε. (2000). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνολογία, Τομός ΙΙ, Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.
- Σταυρακάκης Εμμανουήλ (2013) Αμπελουργία. Εκδόσεις Τροπή σελ. 305 – 309.
- Saravanakumar, D., Ciavarella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 121–128.
- Sánchez, Ó. J., & Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270–5295.
- Sarris, D., Matsakas, L., Aggelis, G., Koutinas, A. A., & Papanikolaou, S. (2014). Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. *Industrial Crops and Products*, 56, 83-93.
- Sarris, D., & Papanikolaou, S. (2016). Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Engineering in Life Sciences*, 16(4), 307–329.
- Sues, A., Millati, R., Edebo, L., & Taherzadeh, M. J. (2005). Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS yeast research*, 5(6-7), 669-676.
- Thomson, J. M., Gaucher, E. A., Burgan, M. F., De Kee, D. W., Li, T., Aris, J. P., & Benner, S. A. (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature Genetics*, 37(6), 630–5.
- Vandeska, E., Kuzmanova, S., & Jeffries, T. W. (1995). Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(5), 513–516.
- Weusthuis, R. A., Visser, W., Pronk, J. T., Scheffers, W. A., & van Dijken, J. P. (1994). Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiology*, 140(4), 703-715.

Yilmaztekin, M., Erten, H., & Cabaroglu, T. (2009). Enhanced production of isoamyl acetate from beet molasses with addition of fusel oil by *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *Food Chemistry*, 112(2), 290–294.

Διαδικτυακοί τόποι:

The Essential Chemical Industry – online <http://www.essentialchemicalindustry.org/>

Industrial Ethanol Association <http://www.industrial-ethanol.org/index.php>

Renewable Fuels Association <http://www.ethanolrfa.org/>

Σύνδεσμος Ελληνικού Οίνου

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων <http://www.minagric.gr/index.php/el/>

The statistic portal <https://www.statista.com/>