



**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ <<ΧΗΜΕΙΑΣ>>
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ <<ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ>>**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Παραγωγή Αφρώδους Οίνου με Χρήση Ακίνητοποιημένων
Ζυμών Προεγκλιματισμένων σε Κανονικές Συνθήκες και σε
Συνθήκες Ωσμωτικού Στρες**

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΑΓΝΑΝΤΗΣ
ΟΙΝΟΛΟΓΟΣ-ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΠΟΤΩΝ**

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Παραγωγή Αφρώδους Οίνου με Χρήση Ακίνητοποιημένων Ζυμών
Προεγκλιματισμένων σε Κανονικές Συνθήκες και σε Συνθήκες Ωσμωτικού Στρες

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΑΓΝΑΝΤΗΣ

A.M. :41406

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Κα. Μ. Λιούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κα. Μ Λιούνη

Κος Σ. Κορίνης

Κα. Α. Δέτση

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ:11/10/2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Μαρία Λιούνη για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή της στην ολοκλήρωση της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Στέλιο Λογοθέτη για την βοήθεια του και τις οδηγίες του στην εκπόνηση της εργασίας καθώς και για την παραχώρηση του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του Α.Τ.Ε.Ι. Αθήνας για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της ερευνητικής εργασίας.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
Α' ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	9
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΜΑΔΡΟΜΗ	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΣΑΜΠΑΝΙΑ	12
2.1 ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΜΠΑΝΙΑ	12
2.1.1 ΚΛΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	14
2.1.2 ΕΔΑΦΟΣ	14
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΣΑΜΠΑΝΙΑΣ	14
2.2.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟ	14
2.2.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΟΙΝΟΥ ΒΑΣΗΣ	15
2.2.1.2 ΑΝΑΜΙΞΗ ΟΙΝΩΝ ΒΑΣΗΣ	16
2.2.1.3 ΔΕΥΤΕΡΗ ΖΥΜΩΣΗ(ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΦΡΟΥ)	17
2.2.1.4 ΑΝΑΚΙΝΗΣΗ ΦΙΑΛΩΝ(REMUAGE)	17
2.2.1.5 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΙΖΗΜΑΤΟΣ(disgorgement).....	19
2.2.1.6 ΛΙΚΕΡ ΑΠΟΓΕΜΙΣΗΣ(liqueur d' expédition/liqueur de dosage).....	20
2.2.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΚΛΕΙΣΤΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ.....	21
2.2.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΝ	23
2.2.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΕ ΘΗΚΕΣ	26
2.2.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΥΤΟΛΥΣΗ ΖΥΜΩΝ	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ	34
4.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΖΥΜΩΝ	37
4.2 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΙΑ	39
4.3 ΖΥΜΩΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΖΥΜΗΣ.....	41
4.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ	41
4.4.1 ΖΥΜΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ Ή ΕΠΑΝΑΖΥΜΩΣΕΩΝ	41

4.4.2 ΖΥΜΕΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΕΩΝ	42
4.4.3 ΖΥΜΕΣ ΘΕΙΩΜΕΝΩΝ ΓΛΕΥΚΩΝ.....	42
4.4.4 ΖΥΜΕΣ KILLER.....	42
4.5 ΘΡΕΨΗ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ	43
4.5.1 ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ	43
4.5.2 ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	45
4.5.3 ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	45
4.5.4 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ.....	45
4.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ	46
4.6.1 ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΟΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	47
4.7 ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ.....	50
4.8 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ – ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ	50
4.9 ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ – ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ	52
4.9.1 ΖΥΜΕΣ – ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΑΛΑΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	54
4.9.2 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ – ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΣΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ...	54
4.9.3 Yap1p, ΚΥΡΙΟΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΕ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	56
4.9.4 Yap2p / Cad1p ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΛΟΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ Yap	57
4.9.5 Yap4p και Yap6p ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	58
4.10 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	60
4.10.1 Η ΓΛΥΚΕΡΙΝΗ ΚΑΙ ΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	60
4.10.2 Η ΤΡΕΧΑΛΟΖΗ ΚΑΙ ΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	62
4.11 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	64
4.12 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΩΣΜΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ.....	66
5.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ	66
5.1.1 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΣΕ ΣΤΑΘΕΡΟ ΦΟΡΕΑ.....	68
5.1.2 ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ	68
5.1.3 ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ	69
5.1.4 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΑΨΟΥΛΕΣ Η ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ.....	70
5.1.5 ΔΙΑΔΙΚΤΥΩΣΗ	71
5.2 ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ	72
5.3 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ.....	72
5.4 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ.....	74
5.5 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	75
5.6 ΠΡΟΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ	75

5.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	76
5.8 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	77
5.9 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ	81
5.10 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΕΣ.....	82
5.11 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ	85
5.12 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΠΥΡΑΣ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	85
5.13 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΗΛΙΤΗ ΟΙΝΟΥ	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΛΓΙΝΙΚΟ	88
6.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ	88
6.2 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΞΑΓΩΓΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ	88
6.3 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ	89
6.4 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ	92
6.5 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	97
Β΄ ΜΕΡΟΣ.....	98
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	98
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	98
8.1 Μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για ανάπτυξη και ζυμώσεις	98
8.2 ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ	99
8.3 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	100
8.4 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	100
8.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΦΡΩΔΟΥΣ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ – ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ	103
8.6 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	105
9.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΖΥΜΗΣ ΣΕ ΚΑΝΟΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΩΣΜΟΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ	105
9.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ ΝΑΤΡΙΩΝ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑ ΤΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ	106
9.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΣΥΣΚΕΥΗ ΥΟΚΟΤΣΟΥΚΑ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΑ	107
9.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΖΥΜΗΣ ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΑ ΣΕ ΚΑΝΟΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΩΣΜΟΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ	108
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	117
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	118

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	123
ΛΕΞΙΚΟ ΟΡΩΝ	124

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίηση ζυμομυκήτων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου διπλής στιβάδας για την παραγωγή αφρώδη οίνου σε κανονικές συνθήκες και σε συνθήκες ωσμωτικού stress. Γνωρίζοντας τις συμβατικές μεθόδους παραγωγής αφρωδών οίνων, τους αφρώδεις οίνους σαν ποτό καθώς και τις τεχνικές ακινητοποίησης πειραματιστήκαμε γύρω από την μέθοδο παραγωγής τους . Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν ζυμομύκητες ανεπτυγμένοι σε κανονικές αλλά και σε συνθήκες ωσμωτικού στρες και αξιολογήθηκαν διαφορετικοί τύποι αλγινικών νατρίων. Επίσης έγινε ενδελεχής ανάλυση των αποτελεσμάτων συγκρίνοντας την πορεία της ζύμωσης σε κανονικές συνθήκες και συνθήκες ωσμωτικού στρες παρουσίας χλωριούχου νατρίου.

Λέξεις Κλειδιά: Ακινητοποίηση, Αλγινικό, Ωσμωτικό Στρες, Ζυμομύκητες

ABSTRACT

In this paper we took the yeast immobilization on beads double layer of calcium alginate for the production of sparkling wine in normal conditions and under conditions of osmotic stress. Knowing the traditional sparkling wine production methods, sparkling wine as a drink and immobilization techniques experimented around their method of production. For this purpose were used yeast developed under normal conditions but also in osmotic stress and evaluated different types of alginate natrion. That a thorough analysis of the results, comparing the course of the fermentation in normal conditions and conditions of osmotic stress presence of sodium chloride.

Keywords: Immobilization, Alginate, Osmotic stress, Yeast

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι διπλός και αφορά την ανάλυση των μεθόδων παραγωγής αφρώδων οίνων σε βάθος καθώς και την παραγωγή αφρώδους οίνου με ακινητοποιημένους ζυμομύκητες σε συνθήκες κανονικές και ωσμωτικού στρες. Η παρούσα αυτή εργασία εκτείνεται σε δυο σκέλη, το θεωρητικό και το πειραματικό. Το πρώτο αφορά ένα ευρύ φάσμα θεωρητικής προσέγγισης των αφρώδων οίνων, ξεκινώντας από την ιστορική αναδρομή τους, μέχρι και την ανάλυση κάθε επιμέρους σταδίου, μέχρι την παραγωγή του τελικού προϊόντος. Από την άλλη το πειραματικό μέρος που αφορά την παρασκευή αφρώδους οίνου με την μέθοδο ακινητοποιημένων ζυμών σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου.

Αναλυτικότερα στο πρώτο μέρος ξεκινάμε την ιστορική αναδρομή του πιο διάσημου αφρώδους οίνου, της σαμπάνιας, από την ομώνυμη περιοχή της Καμπανίας. Στην συνέχεια γίνεται μια ανάλυση των μεθόδων παραγωγής αφρώδων οίνων οι οποίοι περιλαμβάνουν την παραδοσιακή μέθοδο, την μέθοδο μεταφοράς, την μέθοδο κλειστών δεξαμενών καθώς και την παραγωγή με ακινητοποιημένες ζύμες. Ύστερα γίνεται μια μνεία στα αφρώδη κρασιά του κόσμου και την μέθοδο παρασκευής τους.

Στην συνέχεια γίνεται μνεία στους ζυμομύκητες, την επίδραση που έχουν στην οινοποιητική διαδικασία καθώς και τους παράγοντες – αναστολείς που εμποδίζουν την ανάπτυξή τους. Ένας όμως αναστολέας – παράγοντας μας ενδιαφέρει και θα μελετηθεί εκτενέστερα στην παρούσα εργασία είναι η ωσμωτική πίεση. Θα παρουσιαστούν τα μονοπάτια αντίληψης αλλαγών στο περιβάλλον, τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται με αλλαγή της ωσμωτικής πίεσης καθώς και τις ουσίες – προστάτες απέναντι στην τροποποίηση της. Στη συνέχεια εξετάζουμε τις πτυχές της ακινητοποίησης των ζυμών από το τεχνικό σκέλος μέχρι την μηχανική συγκράτησης, τις επιδράσεις καθώς και τις εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Εδώ εξετάζονται και οι ιδιότητες του αλγινικού νατρίου καθώς και ο ρόλος τους στην παραγωγή σφαιριδίων που θα συγκρατούν τις ζύμες.

Όσον αφορά το πειραματικό μέρος, αρχικά διασαφηνίζεται ο σκοπός της παρούσας εργασίας. Ύστερα παρουσιάζεται το πειραματικό πλάνο καθώς και οι αναλυτικές τεχνικές που θα ακολουθηθούν. Έπειτα θα γίνει ενδελεχής ανάλυση των αποτελεσμάτων συγκρίνοντας την πορεία της ζύμωσης σε κανονικές συνθήκες και συνθήκες ωσμωτικού στρες παρουσίας χλωριούχου νατρίου. Τέλος όλα τα δεδομένα των αποτελεσμάτων θα αναλυθούν και από αυτά θα προκύψουν τα συμπεράσματα τα οποία και θα σχολιαστούν

1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΜΑΔΡΟΜΗ

Για πολλούς ανθρώπους το αφρώδες κρασί είναι συνώνυμο της σαμπάνιας. Αυτό, φυσικά δε είναι σωστό, αλλά σε ότι αφορά την ιστορία, το γνωστό τουλάχιστον τμήμα της, αυτή αφορά τη σαμπάνια και την εξέλιξή της. Θα περιοριστούμε λοιπόν στην ιστορία της σαμπάνιας, γιατί η πρώιμη ιστορία του αφρώδους κρασιού ταυτίζεται με την ιστορία των κρασιών της περιοχής της Καμπανίας της Γαλλίας.

Κανένας δεν ξέρει ποιος ανακάλυψε ή αν πράγματι ανακάλυψε τη σαμπάνια. Και αυτό γιατί τα κρασιά της περιοχής αυτής έχουν, και είχαν μια φυσική τάση να αφρίζουν. Τα κρύα του χειμώνα διέκοπταν την δραστηριότητα των ζυμών, οι οποίες επαναδραστηριοποιούνταν με τον ερχομό της άνοιξης και την άνοδο της θερμοκρασίας. Το αποτέλεσμα ήταν ένα κρασί με ελαφρύ αφρισμό, το οποίο ήταν χοντροκομμένο, θολό και σέρβιραν κατευθείαν από τα βαρέλια, όχι μόνο στην περιοχή της Καμπανίας αλλά και σε άλλες περιοχές της Γαλλίας. Καθώς οι άνθρωποι δεν συνήθιζαν να καταγράφουν τα επιτεύγματά τους, δεν υπήρχαν άλλες πηγές, παρά μόνο μύθοι, τόσο αναπόσπαστα συνδεδεμένοι με το κρασί από καταβολής του, για την περίοδο πριν το 1531 μ.Χ., χρονιά κατά την οποία οι Βενεδικτινοί μοναχοί του St. Hillarie της Limoux ισχυρίζονταν ότι παρασκεύασαν, πρώτοι αυτοί, αφρώδες κρασί με τη λεγόμενη σήμερα rural method (αγροτική μέθοδος). Το κρασί αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί πρόδρομος των κρασιών Blanquette de Limoux που κυκλοφορούν και σήμερα στη Γαλλία.

Άλλοι υποστηρίζουν ότι αυτός που ανακάλυψε τη σαμπάνια είναι επίσης Βενεδικτίνος μοναχός, ο Dom Perignon, τυφλός αρχι-αποθηκάριος του Αβαείου του Hartville's από το 1668 ως το 1715 μ.Χ. ο μύθος αυτός καλλιεργήθηκε ιδίως από τον μεγαλύτερο οίκο παραγωγής σαμπάνιας στον κόσμο, Moët & Chandon, ιδιοκτήτη του Αβαείου από το 1822 και μετά. Αυτό που μπορούμε με σιγουριά να αποδώσουμε στον Dom Perignon, και που υπήρξε σημαντική καινοτομία στην εποχή του, είναι το ότι κατάφερε να φτιάξει λευκό κρασί από κόκκινα σταφύλια, το ότι συνειδητοποίησε ότι έπρεπε να αναμίξει πολλούς διαφορετικούς οίνους βάσης για να πετύχει ένα πιο αρμονικό αποτέλεσμα, και ακόμα μελέτησε και ασχολήθηκε με όλες τις λεπτομέρειες της διαδικασίας παραγωγής της σαμπάνιας που, κατά βάση ακολουθείται μέχρι σήμερα. Υπάρχει η άποψη ότι έβλεπε τον αφρισμό των κρασιών σαν ένα πρόβλημα και όχι σαν κάτι που έπρεπε να ενθαρρύνει. Τελικά ύστερα από λεπτομερείς μελέτες, και ίσως απρόθυμα παρασκεύασε σαμπάνια το 1690.

Ο Dom Perignon ανήκει στην παράδοση της παρασκευής κρασιών στα μοναστήρια της περιοχής, στα οποία γίνονταν γενναιόδωρες δωρεές από τους βασιλείς της Γαλλίας των οποίων η στέψη γινόταν στη Reims. Αυτό ώθησε τα μοναστήρια στο να γίνουν θαυμάσια ινστιτούτα παρασκευής κρασιών μέχρι τη Γαλλική Επανάσταση(1789). Μια παράδοση που όχι μόνο στη Γαλλία, αλλά σε όλη την κεντρική Ευρώπη, δεν σχετίζεται μόνο με το κρασί, αλλά και με την τέχνη και την επιστήμη. Ο πολωνός ιερέας Νικόλαος Κοπέρνικος και ο Γαλιλαίος ανήκουν στην ίδια παράδοση, των οποίων οι επιστημονικές εργασίες οδήγησαν

σε ένα ιστορικό παράδοξο, στην υπονόμηση της κυρίαρχης ιδεολογίας της εποχής, της θρησκείας, από ανθρώπους της ίδιας της Εκκλησίας, παρά τις προθέσεις τους, και στην επικράτηση της επιστημονικής αντίληψης για τον κόσμο. Ο Dom Perignon δε συμμετείχε στο παράδοξο αυτό. Αποτελεί όμως παράδοξο, σήμερα, το ότι έχει συνδεθεί το όνομα του, ενός ασκητή καλόγερου, με ένα κρασί συνώνυμο του εορταστικού κλίματος και της γλυκιάς ζωής.

Πέρα από την πραγματικότητα, αλλά και τους μύθους που συνοδεύουν τον Dom Perignon, η μέθοδος παραγωγής της σαμπάνιας, όπως ξέρουμε σήμερα, χρειάστηκε 200 χρόνια για να εξελιχθεί. Στην πορεία αυτή συνείσφεραν και οι Άγγλοι. Πρώτοι αυτοί κατασκεύασαν μπουκάλια για κρασί το 1660 μ.Χ., γνωρίζοντας το μυστικό της ίδιας της σαμπάνιας από 1676. Αγόραζαν κρασί σε βαρέλια από την περιοχή της Καμπανίας, το οποίο εμφιάλωναν και σφράγιζαν με φελλούς. Το αποτέλεσμα που είχαν ήταν ένα ελαφρά αφρώδες κρασί. Γνώριζαν ακόμη ότι η προσθήκη ζάχαρης παρήγαγε μεγαλύτερο αφρισμό. Φαίνεται ότι οι Γάλλοι χρειάστηκε να φτάσουν ως το 1700 για να το επινοήσουν.

Η χρήση μπουκαλιού υπήρξε καθοριστική. Ουσιαστικά μπορούμε να μιλάμε για σαμπάνια από τη στιγμή που το αφρώδες κρασί της περιοχής μπήκε σε μπουκάλια και σφραγίστηκε. Οι αρχές του εμπορίου της σαμπάνιας ανάγονται στο 1728 όταν ο Λουδοβίκος ο 15^{ος} απέσυρε τους περιορισμούς στη μεταφορά κρασιού σε μπουκάλια. Το 1729 ιδρύθηκε η φίρμα Ruinart, η πρώτη καταγεγραμμένη φίρμα παρασκευής σαμπάνιας, και το 1743 η φίρμα που επρόκειτο να γίνει η μεγαλύτερη εταιρεία παραγωγής σαμπάνιας στον κόσμο, η Moët & Chandon.

Σε συνδυασμό με δύο ανακαλύψεις, η πρώτη το 1818, από τον Antoine Muller, αρχιποθηκάριο της Veuve Clicquot, που ανακάλυψε μια συσκευή για την ανακίνηση της σαμπάνιας και τη συσσωμάτωση των ζυμών, τα ruytires και η δεύτερη το 1836 από τον M. Francois, που ανακάλυψε μια μέθοδο για τον προσδιορισμό των σακχάρων, τότε η παραγωγή της σαμπάνιας γνώρισε μεγάλη άνθηση. Παραγόταν σε μεγάλες ποσότητες και μπορούσε να πωληθεί σε πολύ φθηνή τιμή και κάτω από οποιαδήποτε ταμπέλα, κυρίως μετά το 1840 και με αφορμή τις δύο ανακαλύψεις που προηγήθηκαν. Η χαμηλή ποιότητα όμως πολλών παραγωγών, έστρεψε τους καταναλωτές, που ανήκαν κυρίως στην ανώτερη τάξη και φυσικά σ' αυτούς ανήκαν και οι αυλές των ανακτόρων της Ευρώπης, σε παραγωγούς στους οποίους μπορούσαν έχουν εμπιστοσύνη. Το αποτέλεσμα ήταν μια αυξανόμενη επιτυχία των γνωστών φερμών.

Η ιστορία της σαμπάνιας είναι τμήμα της συνολικής ιστορίας και συνδέεται αναπόσπαστα μ' αυτή από την εμφάνιση της μέχρι που η σαμπάνια κατέκτησε τις διεθνείς αγορές και βρήκε μιμητές ανά τον κόσμο[111].

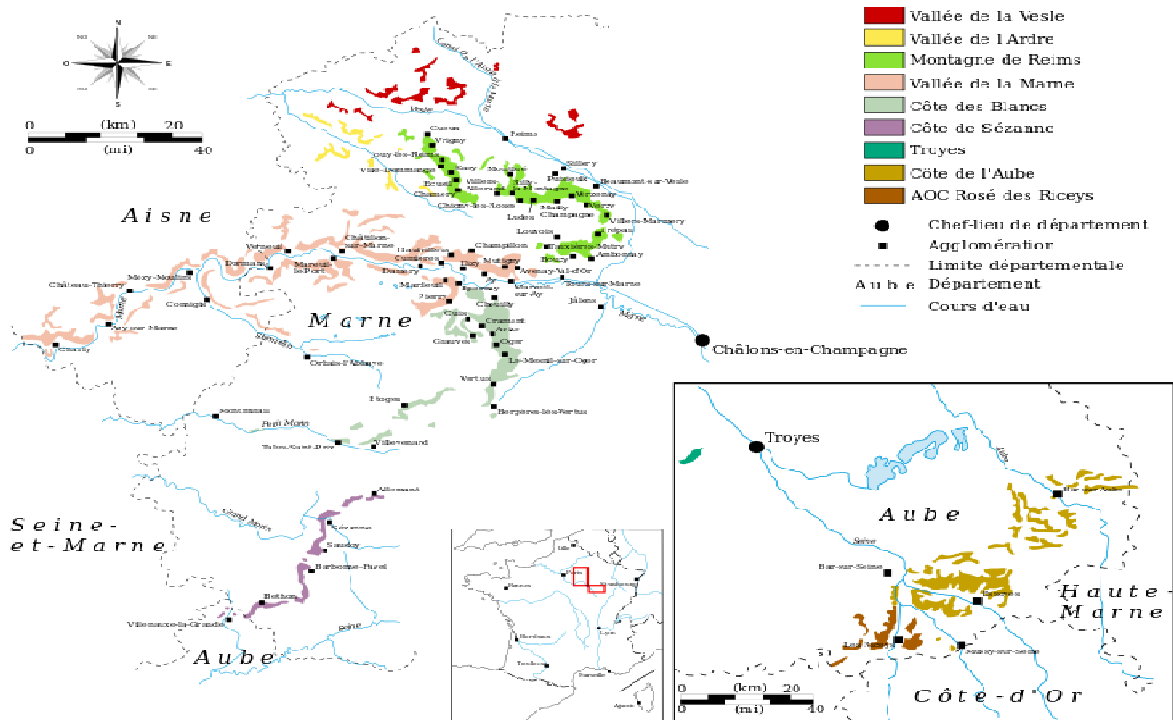
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΣΑΜΠΑΝΙΑ

2.1 ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΜΠΑΝΙΑ

Η Καμπανία, περιοχή παραγωγής κρασιού είναι μια ιστορική επαρχία εντός της διοικητικής επαρχίας της Καμπανίας στα βορειοανατολικά της Γαλλίας. Η περιοχή είναι περισσότερο γνωστή για την παραγωγή του λευκού αφρώδους οίνου που φέρει το όνομα της περιοχής. Η νομοθεσία της ΕΕ και των περισσότερων χωρών διατηρεί τον όρο "Champagne" αποκλειστικά για τους οίνους που προέρχονται από την περιοχή αυτή που βρίσκεται περίπου 100 μίλια (160 χιλιόμετρα) ανατολικά του Παρισιού. Τα αμπελουργικά όρια της Καμπανίας είναι νομικά καθορισμένα και χωρίζονται σε πέντε οινοπαραγωγικές περιοχές: Aube, Côte des Blancs, Côte de Sezanne, Montagne de Reims και Vallée de la Marne.

Βρίσκεται στη , η ιστορία της οποίας είχε σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αυτού του μοναδικού terroir. Η εγγύτητα της περιοχής με το Παρίσι προώθησε την οικονομική επιτυχία της περιοχής με το εμπόριο του κρασιού. Η περιοχή ανέπτυξε μια φήμη για την παραγωγή ποιοτικού κρασιού στις αρχές του Μεσαίωνα και ήταν σε θέση να συνεχίσει τη φήμη ως παραγωγός αφρωδών οίνων με την έλευση των μεγάλων οίκων σαμπάνιας κατά τον 17ο και 18ο αιώνα. Οι κύριες ποικιλίες που καλλιεργούνται στην περιοχή περιλαμβάνουν Chardonnay, Pinot noir, και Pinot Meunier. Το Pinot Noir είναι η πιο ευρέως καλλιεργήσιμη ποικιλία σταφυλιού στην περιοχή Aube και αναπτύσσεται πολύ καλά και στην Montagne de Reims. Το Pinot Meunier είναι το κυρίαρχο σταφύλι στην περιοχή Vallée de la Marne. Η Côte des Blancs είναι αφιερωμένη αποκλειστικά στο Chardonnay.

ΓΕΩΓΡΑΦΙΑ



Εικόνα 1. Ο χάρτης της Καμπανίας

Η σαμπάνια παράγεται στην αμπελουργική περιοχή που οριοθετείται από το νόμο της 22 Ιουλίου 1927. Αυτή η περιοχή δεν είναι ένα ενιαίο κομμάτι, άλλα χωρίζεται σε 4 επιμέρους ζώνες που εμπεριέχουν τους 17 αμπελώνες της Καμπανίας και είναι:

Montagne de Reims (τμήμα της Marne): κυρίως με νότιο προσανατολισμό, οι λόφοι βρίσκονται σε ασβεστολιθικά εδάφη. Η κυρίαρχη ποικιλία είναι το Pinot Noir. Αυτή η ποικιλία δίνει κρασιά γεμάτου σώματος και βάθους και προσφέρει δομή στις περισσότερες αναμίξεις.

Vallee de la Marne (Marne, Aisne και Seine-et-Marne): οι πλαγιές βρίσκονται σε πηλώδη και ασβεστολιθικά εδάφη, έχοντας μια τάση προς τα αργιλώδη. Κυρίαρχη ποικιλία είναι Pinot Meunier. Οι σαμπάνιες της κοιλάδας της Μάρνης, χάρη στη μεγάλη ποικιλομορφία τους, έχουν ένα σαγηνευτικό μπουκέτο από φρουτώδη αρώματα.

Cotes des Blancs(Marne): εδώ μια ποικιλία σταφυλιού βασιλεύει : το Chardonnay. Στα εδάφη κυριαρχεί η κιμωλία, που επιτρέπει στο ριζικό σύστημα της αμπέλου να πηγαίνει βαθιά. Οι λευκές ακτές γεννούν κρασιά με ελαφρύ σώμα και υψηλή οξύτητα, με χαρακτήρα λουλουδιών και εσπεριδοειδών

Οι αμπελώνες της Aube, στις ακτές του Μπαρ (Bar-sur-Aube και Bar-sur-Seine στο Aube): το υπέδαφος τείνει να είναι μαργικό και είναι φυτεμένο κυρίως με Pinot Noir. Οι σαμπάνιες

από την ακτή της Bar είναι κρασιά χαρκτήρα, με ωραία στρογγυλάδα και σύνθετα αρώματα.

2.1.1 ΚΛΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Η Καμπανία έχει δροσερό ηπειρωτικό κλίμα. Η μέση θερμοκρασία κατά την καλλιεργητική περίοδο είναι 16 βαθμοί. Πρόκειται για ένα δύσκολο κλίμα για την αμπελουργία και οι καλλιεργητές συχνά αντιμετωπίζουν τους χειμωνιάτικους και ανοιξιάτικους παγετούς, όπως και κακές καιρικές συνθήκες διαταράσσοντας έτσι την ανάπτυξη του αμπελιού. Ακόμα και τα θερμότερα έτη, τα επίπεδα σακχάρων παραμένουν χαμηλά και τα επίπεδα οξύτητας πολύ υψηλά, με αποτέλεσμα τα σταφύλια να μην είναι κατάλληλα για την παραγωγή του οίνου βάσης.

2.1.2 ΕΔΑΦΟΣ

Τα εδάφη της Καμπανίας είναι κυρίως κρητιδικά, με εξαίρεση την Cote des Bars, όπου είναι αργιλικά, παρόμοια με αυτά του Chablis. Το κρητιδικό έδαφος στραγγίζει καλά, αλλά διατηρεί ταυτόχρονα επαρκή ποσότητα νερού. Το μέσο επίπεδο βροχόπτωσης είναι μόλις 650 χιλιοστά, αλλά το ανθρακικό ασβέστιο διασφαλίζει ότι πάντα θα υπάρχει νερό, όταν θα είναι αναγκαίο. Τα εδάφη είναι φτωχά σε θρεπτικά συστατικά **[διαδικτυακοί τόποι]**.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΣΑΜΠΑΝΙΑΣ

Όσον αφορά τις μεθόδους παραγωγής αφρωδών οίνων, αυτές διακρίνονται ανάλογα με το μέσο όπου πραγματοποιείται η δεύτερη ζύμωση και κάτω τις συνθήκες που λαμβάνουν χώρα. Οι κυριότερες μέθοδοι παραγωγής αφρωδών οίνων:

- α) Η παραδοσιακή μέθοδος (champenoise)
- β) Η μέθοδος Bulk ή Charmat (Μέθοδος κλειστής δεξαμενής)
- γ) Η παραγωγή με χρήση ακινητοποιημένων ζυμών
- δ) Η παραγωγή με χρήση ζυμών σε θήκες
- ε) Η μέθοδος Transfer (μέθοδος μεταφοράς)[103]

2.2.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟ

Η μέθοδος αυτή είναι η πιο δαπανηρή και η πιο χρονοβόρα σε σχέση με όλες τις άλλες μεθόδους, παράγοντας έτσι οίνους ανώτερης ποιότητας. Μόνο με τη μέθοδο αυτή νομιμοποιείται η παραγωγή των οίνων της περιοχής της Καμπανίας απ' όπου πήρε και το όνομά της η μέθοδος (methode Champenoise).

Το κυριότερο χαρακτηριστικό του κρασιού της περιοχής Καμπανίας είναι η μεγάλη του περιεκτικότητα σε άζωτο, κυρίως πρωτεϊνικό, στο οποίο αποδίδεται η ευκολία ζύμωσης και η ιδιαιτερότητα αφρισμού, μικρές φυσαλίδες και ο παρατεταμένος χρόνος έκλυσης τους[118].

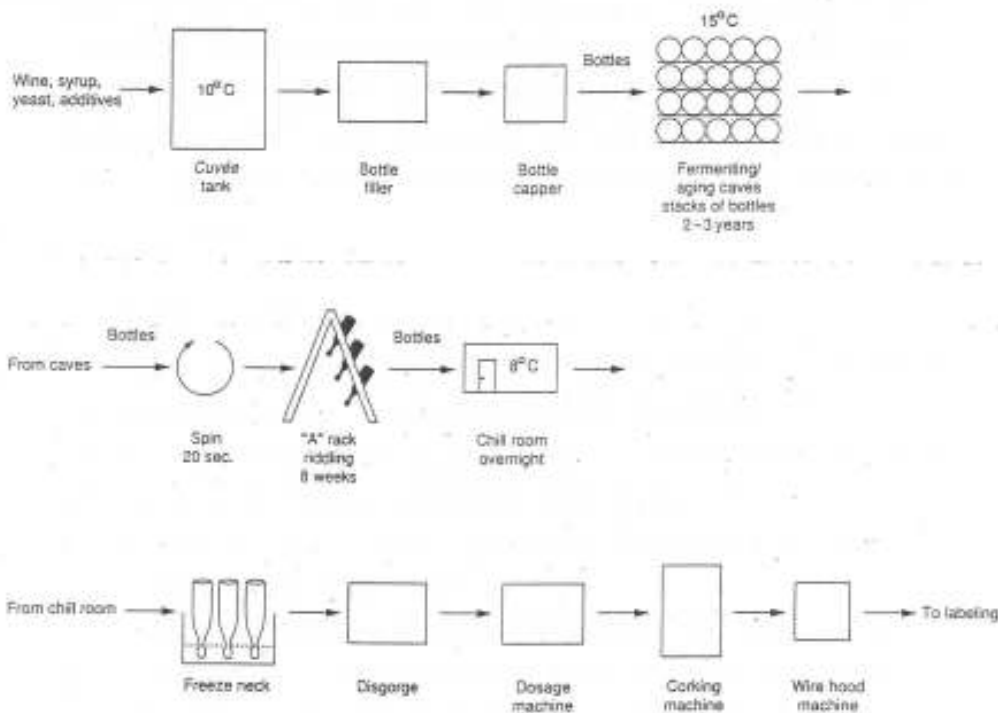


Figure 9.11 Traditional method of sparkling wine production. (Reprinted with permission from Berté, 1981. Copyright 1981 American Chemical Society.)

Εικόνα 2. Παραδοσιακή μέθοδος παρασκευής αφρωδών οίνων

2.2.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΟΙΝΟΥ ΒΑΣΗΣ

Ο οίνος βάσης για την παραγωγή της σαμπάνιας δεν είναι τίποτε άλλο παρά ένας λευκός ξηρός οίνος που προέρχεται από τρεις ποικιλίες σταφυλιών εκ των οποίων οι δύο είναι ερυθρές: Pinot Noir, Pinot Meunier και η τρίτη λευκή: Chardonnay. Στην ουσία η σαμπάνια είναι ένας λευκός οίνος που προέρχεται κατά το μεγαλύτερο μέρος από κόκκινα σταφύλια.

Κατά τον τρυγητό γίνεται αυστηρή επιλογή των σταφυλιών απομακρύνοντας μέρος αυτών που είναι προσβεβλημένα από σήψη. Η συγκομιδή των σταφυλιών γίνεται σε ένα στάδιο ωριμότητας όχι πολύ προχωρημένο, έτσι ώστε να αποφεύγεται η ταχεία εκχύλιση των χρωστικών κατά το στάδιο της πίεσης. Παράλληλα ο βαθμός ωριμότητας πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να εξασφαλίζει στο σταφύλι την απαραίτητη περιεκτικότητα σε σάκχαρα και αρωματικά.

Για να αποφύγουμε την εκχύλιση των ανθοκυανών στο γλεύκος, η πίεση των σταφυλιών πρέπει να γίνεται γρήγορα. Η πίεση των σταφυλιών πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε το γλεύκος να χωρίζεται σε τμήματα. Χρησιμοποιούνται κάθετα πιεστήρια μικρού ύψους και μεγάλης επιφάνειας (coquard) ή οριζόντια χωρίς αλυσίδες και πιο πρόσφατα πνευματικά. Η πίεση των σταφυλιών γίνεται χωρίς προηγούμενη έκθλιψη, αποβοστρύχωση, στα ειδικά πιεστήρια της Καμπανίας. Τα πιεστήρια αυτά χαρακτηρίζονται για την μεγάλη επιφάνειάς τους και το μικρό ύψος (80-90cm), έτσι ώστε να επιτρέπουν την παραλαβή γλεύκους με μικρή πίεση και χωρίς μεγάλη συγκέντρωση σε χρωστικές. Τα πιεστήρια αυτά έχουν χωρητικότητας 4.000kg σταφυλιών και η πίεση τους μεθοδεύεται με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχει δυνατότητα διαχωρισμού του γλεύκους σε συγκεκριμένες ποσότητες.



Εικόνα 3. Παραδοσιακά πιεστήρια στην περιοχή της Καμπανίας

Έτσι από 4.000 κιλά σταφύλι με τις 2 πρώτες πιέσεις παίρνουμε 2.050 λίτρα γλεύκους. Με τις επόμενες 410 και 205 λίτρα αντίστοιχα. Η τελευταία πίεση δίνει 200 με 300 λίτρα, τα οποία δεν συμμετέχουν στην παραγωγή του οίνου βάσης. Η όλη διαδικασία πρέπει να διαρκεί μέχρι 2 ½ ώρες. Η γρήγορη αυτή γλευκοποίηση έχει ως αποτέλεσμα το γλεύκος των πρώτων πιέσεων να είναι πλούσιο σε ελεύθερα οξέα. Οι τελευταίες πιέσεις είναι πιο πλούσιες σε κιτρικό οξύ, λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας του στην περιφέρεια της ράγας. Ακολουθεί θείωση, απολάσπωση του γλεύκους. Το καθαρό πλέον γλεύκος τοποθετείται σε βαρέλια ή σε μικρές δεξαμενές και αφήνεται να ζυμωθεί πλήρως σε θερμοκρασία 15-20°C. Ο οίνος που προκύπτει καλείται οίνος βάσης και περιέχει 10-12%vol. Περιεκτικότητα σε αλκοόλη μικρότερη από 10% δημιουργεί πρόβλημα διατηρησιμότητας οίνου, ενώ μεγαλύτερη από 12% προκαλεί δυσκολίες στην εξέλιξη της δεύτερης ζύμωσης που πραγματοποιείται στη φιάλη. Ο νέος οίνος βάσης υφίσταται τις απαραίτητες διεργασίες για την απαιτούμενη διαύγεια όπως: μεταγγίσεις, κολλάρισμα και φιλτράρισμα.

2.2.1.2 ΑΝΑΜΙΞΗ ΟΙΝΩΝ ΒΑΣΗΣ

Πριν προχωρήσουμε στις διαδικασίες για την παραγωγή αφρού, προβαίνουμε στην προετοιμασία ενός μίγματος που προέρχεται από ανάμιξη πολυάριθμων οίνων βάσης συχνά διαφορετικής προέλευσης, ποιότητας και ηλικίας.

Η διαδικασία της ανάμιξης έχει ως σκοπό την εξασφάλιση της αρμονίας και ισορροπίας των διαφόρων συστατικών του οίνου βάσης, έτσι ώστε το παραγόμενο προϊόν να έχει σταθερή ποιότητα. Η ανάμιξη των οίνων βάσης γίνεται με κριτήριο τόσο τα αναλυτικά όσο και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, αρχικά σε δοκιμαστικό επίπεδο(μικροποσότητες) και στη συνέχεια σε μεγάλες δεξαμενές.

2.2.1.3 ΔΕΥΤΕΡΗ ΖΥΜΩΣΗ(ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΦΡΟΥ)

Για την διεξαγωγή της 2^{ης} ζύμωσης που πραγματοποιείται μέσα στη φιάλη, γίνεται προσθήκη ζαχάρων στον οίνο βάσης, με τη μορφή ζαχαρούχου διαλύματος και καλλιέργειας ζυμομυκήτων της Καμπανίας. Ως σάκχαρο επιτρέπεται μόνο η καθαρή κρυσταλλική ζάχαρη από σακχαρότευτλα που διαλύεται σε ειδικές συσκευές μέσα σε λίγο κρασί(liqueur de tirage).

Για τη διεξαγωγή της ζύμωσης χρησιμοποιούνται καθαρά στελέχη ζύμης που έχουν δοκιμαστεί όσο αφορά την ζυμωτική τους ικανότητα και τα οποία είναι ανθεκτικά στο διοξείδιο του άνθρακα που δημιουργείται.

Η πίεση μέσα στην φιάλη εξαρτάται από την ποσότητα σακχάρου που ζυμώνεται, για αυτό συνήθως απαιτούνται 4 g/L ζάχαρης για να παράξουν, μετά τη ζύμωση, πίεση ίση με μια ατμόσφαιρα στους 10°C και σε οίνους με αλκοολικό τίτλο ίσο με 10%vol.

Μετά από καλή ανάδευση ο οίνος τοποθετείται σε φιάλες με χοντρά τοιχώματα, οι οποίες αφού πωματιστούν προσωρινά με φελλούς ή με άλλα ειδικά πώματα αφήνονται να ζυμωθούν. Η αποθήκευση των φιαλών κατά τη ζύμωση αλλά και μετά για ωρίμανση γίνεται σε υπόγειες στοές όπου η θερμοκρασία διατηρείται περίπου στους 11°C.

Αρχικά οι φιάλες τοποθετούνται σε οριζόντια θέση όπου και παραμένουν για όλη την διάρκεια της ζύμωσης, η οποία διαρκεί εβδομάδες ή και μήνες. Στην ίδια θέση παραμένουν και κατά την παλαίωση όπου ο οίνος παραμένει με το ίζημα των ζυμών για 1-3 χρόνια ανάλογα με την ποιότητα της σαμπάνιας. Η παραμονή των ζυμών μέσα στο μπουκάλι εξασφαλίζει την αυτόλυση τους, έχοντας επακόλουθο την απελευθέρωση αμινοξέων, ολιγοπεπτιδίων, λιπαρών οξέων και λιπιδίων, αλλά και πρωτεϊνών και εστερών, ουσιών που συνδέονται με την παραγωγή των αρωμάτων του λεγόμενου μπουκέτου. Το είδος των ζυμών, η ποικιλία των σταφυλιών, οι συνθήκες αποθήκευσης, και η διάρκεια επαφής με τις οινολάσπες επηρεάζουν την παραπάνω διαδικασία.

Μετά το τέλος της ζύμωσης η πίεση που δημιουργείται στο εσωτερικό των φιαλών από την έκλυση του διοξειδίου του άνθρακα ανέρχεται περίπου σε 5-6 ατμόσφαιρες, για αυτό απαιτείται προσεκτική μεταχείριση των φιαλών και λήψη μέτρων προφύλαξης.

2.2.1.4 ΑΝΑΚΙΝΗΣΗ ΦΙΑΛΩΝ(REMUAGE)

Προς το τέλος της παλαίωσης αρχίζει η διαδικασία απομάκρυνσης του ιζήματος. Βάσει της μεθόδου, οι φιάλες βγαίνουν από την οριζόντια θέση και τοποθετούνται κεκλιμένες θέσεις, με το στόμιο προς τα κάτω σε ειδικά αναλόγια(rupitres).



Εικόνα4.

Στην θέση αυτή οι φιάλες υφίστανται κατά τακτά χρονικά διαστήματα μια ελάχιστη απότομη περιστροφική κίνηση και μια ελάχιστη ανόρθωση έτσι ώστε σε μερικούς μήνες να φθάσουν στην κατακόρυφη θέση με τον λαιμό προς τα κάτω. Συνήθως περιστρέφονται κατά το $1/8$ ή $1/4$ της περιφέρειας κάθε φορά, αυτό εξαρτάται από τον κάθε οινοποιό. Η ενδιαφέρουσα αυτή εργασία γίνεται από εξειδικευμένους εργάτες, καθένας από τους οποίους έχει την ικανότητα να περιστρέφει 30.000 φιάλες τη μέρα.



Εικόνα 5. Ειδικά αναλόγια για την διευκόλυνση απομάκρυνσης τους ιζήματος από τη φιάλη

Λόγω του κόστους της ανακίνησης των μπουκαλιών, στη σημερινή εποχή χρησιμοποιούνται ευρέως οι γυροπαλέτες(αυτόματη μηχανική περιστροφή). Η μηχανική ανακίνηση διαρκεί 1 εβδομάδα έως και 10 ημέρες. Ένας σύγχρονος ανακινητής περιστρέφει 10.000 μπουκάλια ανά ώρα έως 50.000 κάθε μέρα.



Εικόνα 6. Οι λεγόμενες γυροπαλέτες, που αυτοματοποιούν την απομάκρυνση του ιζήματος

Αποτέλεσμα όλης αυτής της διαδικασίας είναι η μετακίνηση του ιζήματος στο στόμιο της φιάλης.



Εικόνα 7. Αποτέλεσμα της διαδικασίας της ανακίνησης της φιάλης

2.2.1.5 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΙΖΗΜΑΤΟΣ(disgorgement)

Συνέχεια της παραπάνω διαδικασίας είναι η απομάκρυνση του ιζήματος από τον λαιμό της φιάλης. Ο λαιμός του μπουκαλιού βυθίζεται σε πολύ κρύο διάλυμα άλμης, παγώνοντας το κρασί στο συγκεκριμένο σημείο. Τα μπουκάλια κατόπιν αναστρέφονται σε όρθια θέση όπου και με την εκπωματίση απομακρύνεται το παγάκι των ζυμών.

Παλαιότερα η απομάκρυνση αυτή γινόταν όπως εξάλλου και σήμερα στα μικρά οινοποιεία από ειδικούς τεχνίτες, οι οποίοι με δεξιοτεχνία ανοίγουν γρήγορα την φιάλη με τη βοήθεια της εσωτερικής πίεσης που σπρώχνει το ίζημα προς τα έξω.



Εικόνα 8. Παραδοσιακός τρόπος εκπωματισμού στον αέρα για απομάκρυνση ιζήματος

Σήμερα στα μεγάλα οινοποιεία η τεχνική αυτή έχει απλοποιηθεί: ο λαιμός της φιάλης βυθίζεται σ'ένα ψυκτικό υγρό π.χ. υγρό άζωτο έτσι ώστε το ίζημα να εγκλωβιστεί στο παγοτεμάχιο που σχηματίζεται στη θέση αυτή. Στην συνέχεια οι φιάλες ανοίγονται προσεκτικά και το παγοτεμάχιο εκδιώκεται από την εσωτερική πίεση του διοξειδίου του άνθρακα.



Εικόνα 9. Μηχάνημα για την εκπωμάτιση

2.2.1.6 ΛΙΚΕΡ ΑΠΟΓΕΜΙΣΗΣ(*liqueur d' expédition/liqueur de dosage*)

Το κενό που δημιουργείται από την απομάκρυνση του ιζήματος συμπληρώνεται με το λικέρ απογέμισης. Το λικέρ αυτό είναι ένα μίγμα σαμπάνιας, στην οποία διαλύεται καθαρή κρυσταλλική ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο. Μπορεί επίσης να είναι γλεύκος σταφυλιών μερικώς συμπυκνωμένο, συμπυκνωμένο γλεύκος σταφυλιών, ανακαθαρισμένο συμπυκνωμένο γλεύκος σταφυλιών, γνωστό και ως MCR (*moût concentré rectifié*). Η ιδιαιτερότητά του είναι ότι δεν επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος . Ωστόσο το ζαχαρούχο διάλυμα περιέχει 625 ή 750 g/L ζάχαρης.



Εικόνα 9.

Ανάλογα με τον τύπο της σαμπάνιας που επιθυμούμε να διαμορφώσουμε, προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα ζαχαρούχου διαλύματος, που θα εξασφαλίσει την απαιτούμενη συγκέντρωση σακχάρων.

Πίνακας 1.

ΕΝΔΕΙΞΗ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΑ ΣΑΚΧΑΡΑ (g/l)
brut nature	< 3
extra brut	0 – 6
brut	< 15
extra dry	12 – 20
sec	17 – 35
demi-sec	33 – 50
doux	> 50

Μετά την απογέμιση ακολουθεί το οριστικό κλείσιμο των φιαλών με το ιδιόσημο πώμα από φελλό και η τοποθέτηση της συρμάτινης αγκράφας. Στην συνέχεια οι φιάλες δίνονται στην κατανάλωση αφού επικολληθούν οι ετικέτες και γίνει η κατάλληλη συσκευασία[118].

2.2.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΚΛΕΙΣΤΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ

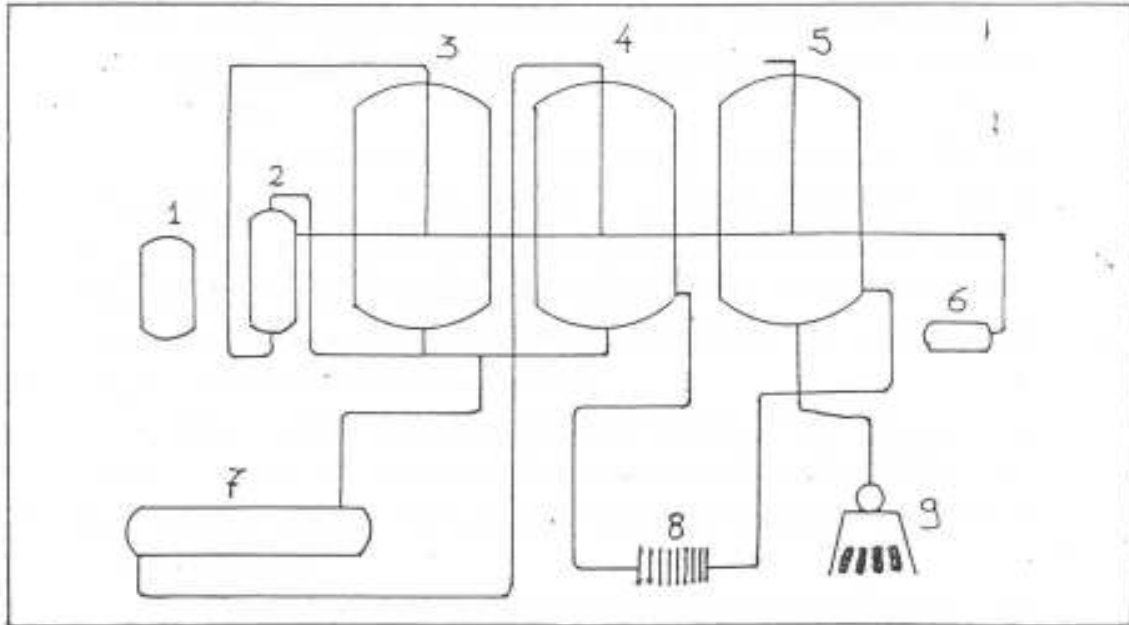
Η μέθοδος αυτή επινοήθηκε από τον Γάλλο ερευνητή Eugene Charmat θέλοντας να κερδίσει χρόνο και χρήμα σε σχέση με την παραδοσιακή μέθοδο. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή συνήθως γλυκών αφρωδών οίνων.

Για τους αφρώδεις οίνους χαμηλότερης ποιότητας, προορισμένους για πρώιμη κατανάλωση, επινοήθηκε ένα εύκολο σύστημα παραγωγής, πιο οικονομικό και καλύτερα προσαρμοσμένο σε βιομηχανική κλίμακα. Πρόκειται για τη μέθοδο διεξαγωγής της δεύτερης ζύμωσης σε κλειστές δεξαμενές.

Η διαφοροποίηση αυτής της μεθόδου σε σχέση με την παραδοσιακή μέθοδο και την μέθοδο της Καμπανίας, έγκειται στο γεγονός ότι η δεύτερη ζύμωση για την παραγωγή αφρού δεν γίνεται στη φιάλη, αλλά σε μεταλλικές δεξαμενές με ερμητικό κλείσιμο.

Η οινοποίηση και οι διάφορες κατεργασίες του οίνου μέχρι το στάδιο της ανάμιξης των οίνων βάσης κατά κανόνα είναι ίδιες. Ωστόσο δεν δίνεται ιδιαίτερη σημασία στην συγκομιδή και μεταφορά των σταφυλιών καθώς και κατά την οινοποίηση.

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται μια απλοποιημένη εγκατάσταση της μεθόδου που συντίθεται από μεταλλικές ή ανοξείδωτες δεξαμενές. Η εγκατάσταση αυτή επιτρέπει πιο γρήγορη εξέλιξη της παραγωγής αφρού.



Σχήμα 3

Σχήμα εγκατάστασης για την παραγωγή αφρώδων κρασιών με τη μέθοδο της κλειστής δεξαμενής: 1. δεξαμενή προετοιμασίας της μαγιάς, 2. δεξαμενή που επιτρέπει την προσθήκη διαφόρων, απαραίτητων συστατικών, εφοδιασμένη με σύστημα ανάμιξης, 3. δεξαμενή ζύμωσης υπό πίεση, 4. δεξαμενή ψύξης, 5. δεξαμενή μεταγγίσης, 6. κομπρεσέρ για μεταγγίσεις υπό σταθερή πίεση, 7. σύστημα ψύξης, 8. φίλτρο, 9. γεμιστική.

Εικόνα 10. Διάγραμμα ροής της μεθόδου κλειστής δεξαμενής (Charmat ή Bulk method)

Η δεξαμενή 1 χρησιμεύει για την προετοιμασία της καλλιέργειας των ζυμών, που αποτελείται από οίνο, ζάχαρη και κατάλληλο στέλεχος ζυμομυκήτων. Στην δεξαμενή 3 τοποθετείται ο οίνος βάσης που πρόκειται να μετατραπεί σε αφρώδη. Στην ίδια δεξαμενή προστίθεται ζάχαρη και ζύμη, στοιχεία απαραίτητα για την διεξαγωγή της 2^{ης} ζύμωσης. Η δεξαμενή αυτή είναι εφοδιασμένη με σύστημα ρύθμισης της θερμοκρασίας έτσι ώστε η ζύμωση να εξελίσσεται στους 20-25°C. Η ευνοϊκή αυτή θερμοκρασία και η σχετικά μεγάλη ποσότητα ζυμών συντελούν στην πραγματοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η ζύμωση παρακολουθείται με μανόμετρο και όταν η εσωτερική πίεση φθάσει τα 5-6kg/cm, η ζύμωση διακόπτεται με ψύξη και ελαφριά θείωση.

Στην συνέχεια προστίθεται το ζαχαρούχο διάλυμα που θα καθορίσει τον τύπο του αφρώδη οίνου. Η προσθήκη αυτή του ζαχαρούχου διαλύματος συχνά, γίνεται τη στιγμή που γεμίζει η δεξαμενή 3, δηλαδή πριν ακόμα αρχίσει η δεύτερη ζύμωση. Στην περίπτωση αυτή η ζύμωση σταματά με ψύξη ανάλογα με το επιθυμητό ποσό αζύμωντων ζαχάρων. Ο αφρώδης πλέον οίνος οδηγείται στην δεξαμενή 4, όπου και ψύχεται για μερικές μέρες στους -5°C για την καταβύθιση των τρυγικών αλάτων. Ακολουθεί διήθηση σε χαμηλή θερμοκρασία πάντα υπό πίεση και οδηγείται στην δεξαμενή 5 από όπου θα ξεκινήσει η εμφιάλωση.

Συγκρίνοντας την μέθοδο παραγωγής αφρώδη οίνου σε κλειστές δεξαμενές με την παραδοσιακή, διαπιστώνεται ότι η μέθοδος κλειστής δεξαμενής δίνει προϊόντα χαμηλότερης ποιότητας. Υπεύθυνοι παράγοντες για το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να είναι η γρήγορη εξέλιξη της δεύτερης ζύμωσης και ο γρήγορος διαχωρισμός του οίνου από τις ζύμες. Στην κλασική μέθοδο της Καμπανίας, η αυτόλυση των ζυμών μέσα στον οίνο συντελεί στην βελτίωση της σύστασης του οίνου.

Παρόμοια μέθοδος με την παραπάνω είναι και αυτή που εφαρμόζεται στο Άστι της Ιταλίας για την παραγωγή του ομώνυμου κρασιού, κατά την οποία με διαδοχικές διηθήσεις αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος των ζυμών και επιβραδύνεται η ταχύτητα επαναζύμωσης.

Η τεχνική οινοποίησης του Asti που εφαρμόζεται έχει σκοπό τη διατήρηση του ποικιλιακού αρώματος, διακόπτοντας τη ζύμωση και σταθεροποιώντας το κρασί σε μια υψηλή ποσότητα σακχάρων. Αυτό δεν πετυχαίνεται, όταν εφαρμόζεται η κλασική μέθοδος, γιατί όλα τα σάκχαρα μεταβολίζονται κατά την διάρκεια της δεύτερης ζύμωσης και η επιθυμητή γλυκύτητα συμπληρώνεται αργότερα με το γευστικό διάλυμα (διάλυμα ζάχαρης).

Αρχικά για την παραγωγή του Asti συλλέγονται τα σταφύλια, πολτοποιούνται σε σπαστήρες με κυλίνδρους και πιέζονται σε οριζόντιο πιεστήριο. Στη συνέχεια στο χυμό προστίθεται θειώδης ανυδρίτης και γίνεται διαύγαση με λεύκωμα αυγού ή ζελατίνη. Ακολουθεί διπλή απολάσπωση, φιλτράρισμα με πανί ή φυγοκέντριση. Ο χυμός ψύχεται στους 6°C και διατηρείται όσο χρειάζεται. Η ζύμωση γίνεται σε κλειστή δεξαμενή. Στην αρχή η θερμοκρασία του ζυμωμένου χυμού είναι 18-20° C και μετά μειώνεται σε 14-15° C. Ο χυμός ζυμώνει μέχρι η αλκοολική περιεκτικότητα να φθάσει περίπου 5% Vol και η πίεση στις 5 Atm. Αυτό διαρκεί δύο εβδομάδες. Έπειτα το κρασί ψύχεται για να σταματήσει η ζύμωση και τοποθετείται σε περιέκτες κατάλληλα κατασκευασμένους για να μην υπάρχουν διαρροές CO₂. Μόλις αυτοί συμπληρωθούν, η θερμοκρασία αυξάνεται για να συνεχιστεί η ζύμωση και να φθάσει στα 7-9,5% Vol. Τότε το κρασί ψύχεται στους 0°C και φιλτράρεται. Στη συνέχεια ψύχεται στους -4° C για 10-15 ημέρες. Ξαναφιλτράρεται και εμφιαλώνεται. Η διάρκεια παραγωγής του κρασιού είναι περίπου ένας μήνας.

Σύμφωνα με τους ιταλικούς κανονισμούς του D.O.C.G. (κρασιά από αμπελουργικές περιοχές αυστηρά ελεγχόμενες) η ελάχιστη περιεκτικότητα των αζύμωντων σακχάρων στο Asti, μετά την ζύμωση μπορεί να είναι 7,5-9 g/100 ml.

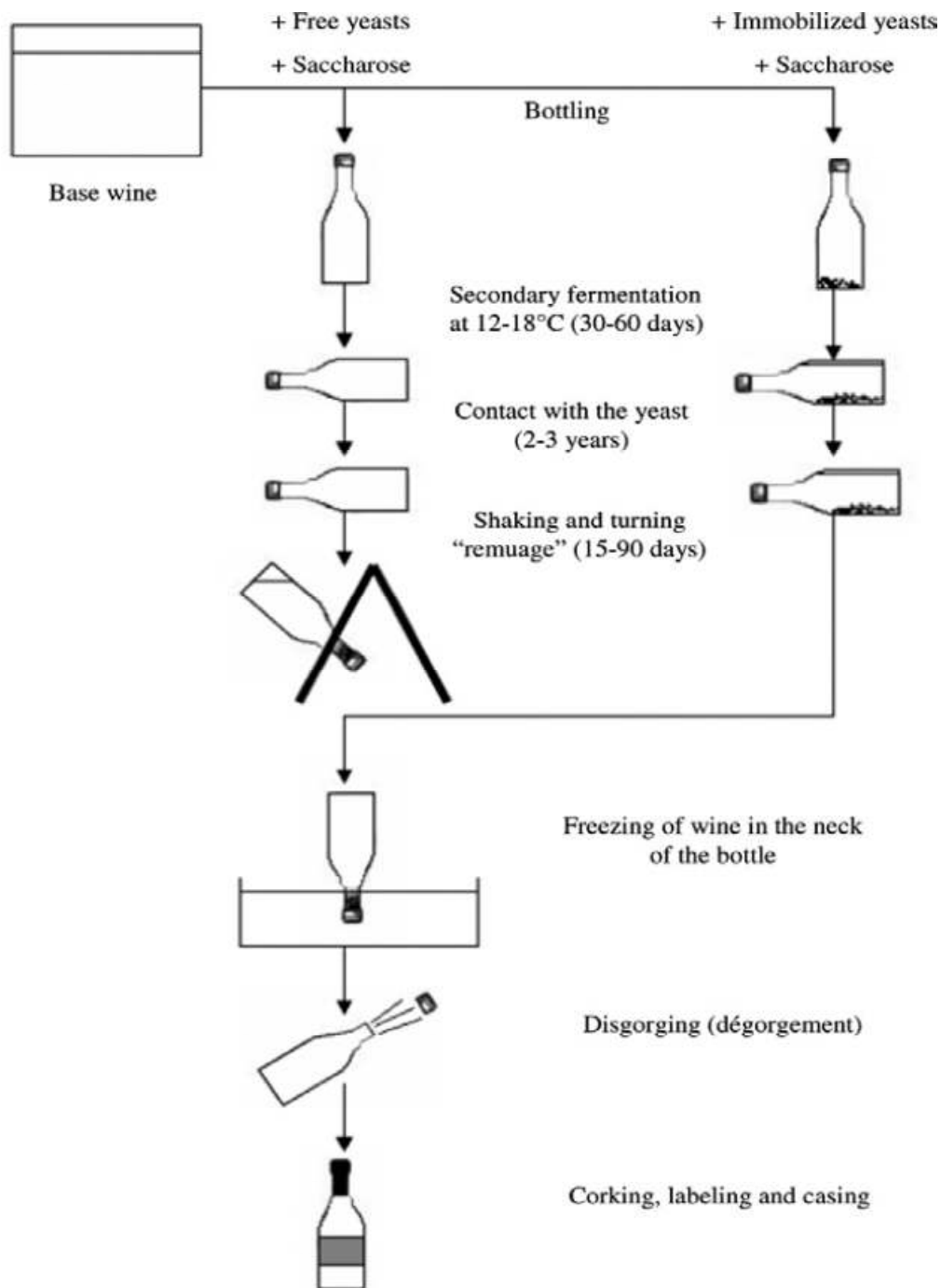
Τελικά, το Asti έχει αχυροκίτρινο ή χρυσοκίτρινο χρώμα, λεπτό, πικάντικο άρωμα το οποίο θυμίζει άνθος πορτοκαλιάς, ροδάκινο, αχλάδι και βερίκοκο. Έχει οσμή άγριου μελιού, άνθη ακακίας και φασκόμηλου. Είναι γλυκό και έχει αρμονία, με γεύση του σταφυλιού Μοσχάτο, με ισορροπία οξύτητας και διάρκεια γεύσεως. Η οξύτητά του κυμαίνεται συνήθως σε 3,2- 4 gr H₂SO₄ (4,9 - 6,1 g τρυγικό οξύ/ L)[103].

2.2.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΝ

Προκειμένου για να αποκτήσουμε αποτελεσματικούς βιοκαταλύτες για αφρώδεις οίνους που παράγονται με ζύμωση μέσα στο μπουκάλι γίνεται με χρήση των ακινητοποιημένων ζυμών. Στην παραγωγή αφρωδών κρασιών με παραδοσιακό τρόπο, η αφαίρεση των οινολασπών είναι μια πολύ έντονη και χρονοβόρα διαδικασία και η χρήση ακινητοποιημένων ζυμών έχει ερευνηθεί ώστε να μειωθούν και να απλουστευθούν οι διαδικασίες ανακίνησης και εκπωματισμού. Η ακινητοποίηση των ζυμών συνίσταται στην εισαγωγή μέσα στο μπουκάλι ενός ορισμένου αριθμού σφαιριδίων που περιέχουν κύτταρα ζύμης. Καθώς τα κύτταρα μεγαλώνουν, παραμένουν παγιδευμένα στα σφαιρίδια διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο την διαύγεια του κρασιού. Οι πρώτες εφαρμογές των ακινητοποιημένων ζυμών για βιομηχανικούς σκοπούς είχαν πραγματοποιηθεί σε κ-καραγενάνη από Wada et al. (1979), και αλγινικού νατρίου από Veliky και Williams (1981). Οι Bidan et al. (1980), στη Γαλλία, ήταν οι πρώτοι που απέκτησαν δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για την παραγωγή αφρώδους οίνου με χρήση ακινητοποιημένων ζυμών. Όπως επίσης δίπλωμα ευρεσιτεχνίας είχαν και οι Divies et al. (1997) που δημιούργησαν ένα υπόστρωμα αποτελούμενο από ξηρή πηκτή πολυσακχαριτών και υδρόφιλης ουσίας, όπως είναι η

γλυκερόλη, μέσα στο οποίο είχαν εγκλωβίσει ζυμομύκητες για τη δευτερογενή ζύμωση παραγωγής αφρωδών οίνων. Η ξηρή πηκτή ήταν σε μορφή σφαιριδίων ή ινών με διπλή στοιβάδα. Η εσωτερική περιέκλειε τους ζυμομύκητες και η εξωτερική ήταν το περίβλημα. Με τα χρόνια, οι ακινητοποιημένες ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά στην παραγωγή αφρωδών κρασιών, η πρώτη εφαρμογή έχει αναφερθεί από Fumi et al. (1987), Fumi et al. (1988) και Fumi et al. (1994). Υποστηρικτικά υλικά ακινητοποίησης κατάλληλα για τη βιομηχανία οίνου πρέπει να έχουν πρόσθετες προϋποθέσεις, όπως η καθαρότητα, το χαμηλό κόστος, η αφθονία, η μη διασπασή τους και η καταλληλότητα για ζύμωση σε χαμηλή θερμοκρασία. Παρά το γεγονός ότι πολλά στηρίγματα ακινητοποίησης έχουν προταθεί για εφαρμογές οινοποίησης, η βιομηχανική χρήση αυτής της τεχνολογίας είναι ακόμα αβέβαιη[56]. Μεταξύ των τεχνικών ακινητοποίησης που είναι διαθέσιμες, ο εγκλεισμός σε πηκτώματα πολυσακχαρίτη όπως άγαρ, αλγινικό και καραγενάνη είναι τα πιο σημαντικά και χρησιμοποιούνται ευρέως. Οι Yokotsuka et al. (1997), χρησιμοποίησαν ακινητοποιημένες ζύμες σε σφαιρίδια γέλης διπλής στρώσης για ζύμωση στο μπουκάλι, τα σφαιρίδια εισάγονται εύκολα μέσα στις φιάλες και εύκολα αφαιρούνται με την εκτόξευση του παγοτεμαχίου ζυμών κατά τον εκποματισμό.

Όταν μια φιάλη που περιέχει ακινητοποιημένες ζύμες αναστραφεί, τα σφαιρίδια γρήγορα εγκαθίστανται στο λαϊμό της φιάλης και μπορούν εύκολα να αφαιρεθούν. Επιπλέον, οι Yokotsuka et al. (1997) βρήκαν ότι αυτή η τεχνική επιτρέπει στους αφρώδεις οίνους να αποκτήσουν παρόμοια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, με εκείνες που γίνονται με τη χρήση ελεύθερων ζυμών. Οι Diviès et al. (1994), έδειξαν ότι η χρήση των ακινητοποιημένων κυττάρων ζύμης για την παραγωγή αφρώδους κρασιού θα μπορούσε να απλοποιήσει σημαντικά τη διαδικασία του «remuage». Η σύγκριση του μεταβολισμού των παγιδευμένων και ελεύθερων κυττάρων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε φιάλη δείχνει κάποιες διαφορές, αλλά τα τελικά προϊόντα δεν αποκαλύπτουν σημαντικές διαφορές. Οι Efrementko et al. (2005), προσδιόρισαν τις συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων, προκειμένου να διασφαλιστεί η συσσώρευση βιομάζας ζύμης για περαιτέρω ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού βιοκαταλύτη για την παραγωγή αφρωδών οίνων, πολύ (βινύλ αλκοόλη) κρουογέλη (PVA C) χρησιμοποιήθηκαν για την παγίδευση κυττάρων ζύμης. Οι συνθήκες καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται για τη συσσώρευση βιομάζας πριν από την ακινητοποίηση τους θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα χαρακτηριστικά του βιοκαταλύτη και, ως εκ τούτου, τα χαρακτηριστικά της παραγωγής αφρωδών κρασιών. Ακόμη και αν η χρήση ακινητοποιημένων ζυμών στην κλασική μέθοδο παραγωγής αφρωδών οίνων επιτρέπει την απλοποίηση της διαδικασίας του remuage, ορισμένα μειονεκτήματα μπορεί να συμβούν. Πράγματι, αφρώδης οίνος συχνά χάνει τη διαύγεια του εξαιτίας της απελευθέρωσης των κυττάρων ζύμης από τον φορέα μήτρας. Οι Gòdia et al.,[38] χρησιμοποίησαν κύτταρα ζύμης ακινητοποιημένα σε απλά σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου και σε στήριξη με ένα εξωτερικό στρώμα ελεύθερων κυττάρων γύρω τους, προκειμένου να μειωθούν τα κύτταρα που απελευθερώνονται από την μήτρα. Βρήκαν ότι εξωτερικά επικαλυμμένα σφαιρίδια επιτρέπουν να ληφθεί, στο τέλος της διαδικασίας, ένα κρασί χωρίς κύτταρα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ήταν και στις δύο περιπτώσεις βελτιωμένα σε σύγκριση με την παραδοσιακή μέθοδο.



Εικόνα 11. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή αφρώδη οίνου με την παραδοσιακή μέθοδο και με ακινητοποιημένες ζύμες.

Οι Martynenko et al. [70], μελέτησαν μια διαδικασία που συνίσταται στη χρήση ζυμών σαμπάνιας ακινητοποιημένες με εγκλεισμό σε κρουογέλη πολυβινυλαλκοόλης. Τα κύτταρα επίσης, αντιμετωπίζονται με την αυτόματη ρυθμιστικού παράγοντα d1, εμποδίζοντας έτσι τα κύτταρα να απελευθερώνονται από τον φορέα μήτρας. Επιπλέον, προκειμένου να αποφευχθεί η απαλλαγή των κυττάρων από τα υλικά υποστήριξης, η αγορά επίσης παρέχει επιλεγμένες ζύμες που περιορίζονται σε μια μεμβράνη μικροδιήθησης όπως " η κασέτα 'Millispark », η οποία αναπτύχθηκε από την Millipore για την παραγωγή αφρώδους οίνου με ζύμωση στη φιάλη (Ramon-Πορτογαλία et al., 2003). Η τεχνική αυτή παρουσιάζει, ωστόσο, διάφορα μειονεκτήματα όπως περιορισμός μαζικής μεταφοράς και πιθανότητα biofouling μεμβράνης που προκαλείται από την ανάπτυξη των κυττάρων. Ακόμη και αν, σε πειραματικές συνθήκες, οι ακινητοποιημένες ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για

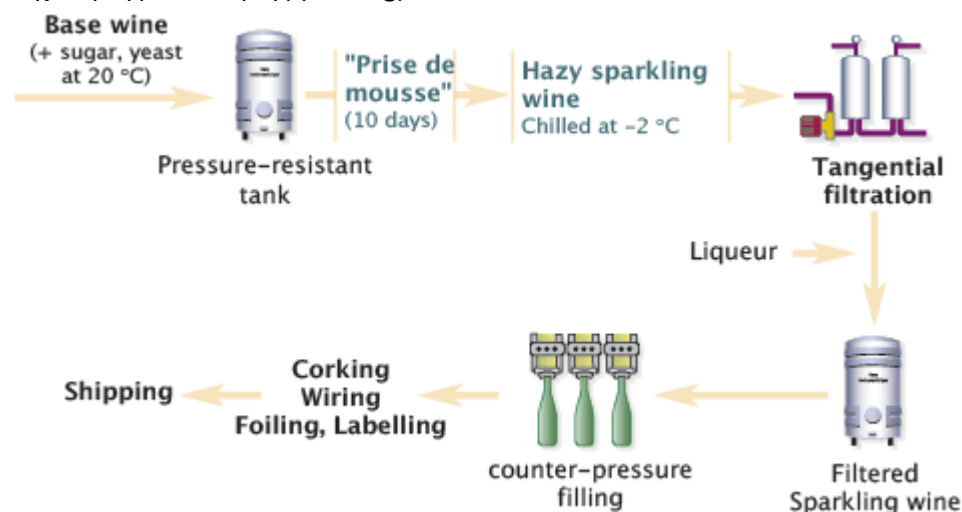
παραγωγή αφρωδών κρασιών, η εφαρμογή τους στις οινολογικές πρακτικές είναι ακόμα unfrequent[94].

2.2.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΕ ΘΗΚΕΣ

Μια μέθοδος που χρησιμοποιεί τις μεμβράνες διήθησης μπορεί να απλοποιήσει την παραδοσιακή μέθοδο ζύμωσης στη φιάλη. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι καταργεί τα προβλήματα απομάκρυνσης της λάσπης που δημιουργείται από τις ζύμες. Πρόκειται για μια μικρή θήκη που τοποθετείται στο λαιμό της φιάλης και γεμίζει με ζύμες. Η θήκη έχει διάμετρο 12mm περίπου, μερικά εκατοστά μήκος και είναι ανοιχτή στο άκρο που μένει έξω από τη φιάλη. Η μεμβράνη αυτή χρησιμοποιείται για να εγκλωβίσει τις ζύμες, επιτρέποντας ταυτόχρονα τη διαπίδυση των μεταβολιτών. Το έτοιμο για δεύτερη ζύμωση κρασί, αφού του προσθέσουμε την απαραίτητη ζάχαρη, το διηθούμε και γεμίζουμε τη φιάλη. Εισάγουμε τη θήκη και αμέσως μετά τη γεμίζουμε με καλλιέργεια ζυμών και την κλείνουμε μηχανικά με ένα πώμα. Η φιάλη στη συνέχεια θα κλείσει με μεταλλικό πώμα. Θα μένει σε πλάγια θέση για όσο χρόνο επιθυμούμε ώστε να γίνει η ζύμωση και το κρασί να πάρει χαρακτηριστικά από την αυτόλυση των ζυμών. Κατά τον αποπωματισμό, όλη η θήκη απομακρύνεται από τη φιάλη χάρη στην πίεση του εσωτερικού. Η μεμβράνη πρέπει να επιτρέπει την έξοδο του σχηματιζόμενου διοξειδίου του άνθρακα προς το κρασί. Η θήκη είναι κατασκευασμένη από ένα πολυμερές εξαιρετικά ουδέτερο, δεδομένου ότι μένει σε επαφή με το κρασί για χρονική περίοδο που φτάνει τα 3 χρόνια[117].

2.2.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Η μέθοδος αυτή ανακαλύφθηκε στην Γερμανία την δεκαετία του 1930, για να αποφευχθεί η χαμηλή ποιότητα των κρασιών, που παράγονται με την μέθοδο των κλειστών δεξαμενών. Είναι μια παραλλαγή της μεθόδου σαμπάνιας. Στην πραγματικότητα οι δύο μέθοδοι είναι εντελώς όμοιες, εκτός από το ότι στην μέθοδο μεταφοράς δεν εφαρμόζεται η τεχνική της ανακίνησης (riddling).



Εικόνα 12. Διάγραμμα ροής για τη μέθοδο μεταφοράς

Στα κρασιά της μεθόδου αυτής δεν εφαρμόζεται η ανακίνηση και ούτε προστίθενται διαυγαστικά μέσα για την απομάκρυνση των ζυμών. Το κρασί παλαιώνει μέσα στα μπουκάλια, όσο κρίνει αναγκαίο ο οينوποιός. Έπειτα, με πίεση απομακρύνονται οι φελλοί από τα μπουκάλια και το κρασί χύνεται σε μεγάλες δεξαμενές, όπου ψύχεται στους 0° C.

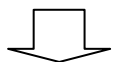
Μετά προστίθεται γευστικό διάλυμα, θειώδης ανυδρίτης και φιλτράρεται. Το φιλτράρισμα είναι αυτό που μπορεί να βελτιώσει το κρασί απαλλάσσοντας το από τις άσχημες οσμές. Αν χρειαστεί μπορεί και να αποχρωματιστεί. Τελικά, το κρασί αποστειρώνεται και εμφιαλώνεται. Τα κρασιά που παράγονται μ' αυτή την μέθοδο αναγράφουν στην ετικέτα τους την ένδειξη «ζυμωμένα σε μπουκάλι»[103].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΥΤΟΛΥΣΗ ΖΥΜΩΝ

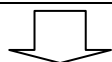
Ο όρος αυτόλυση εισήχθη από Salkowsky το 1875. Μπορεί να οριστεί ως η υδρόλυση βιοπολυμερών υπό την επίδραση υδρολυτικών ενζύμων που απελευθερώνουν κυτταροπλασματικές ενώσεις(πεπτίδια, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και νουκλεοτίδια) και ενώσεις κυτταρικού τοιχώματος (γλυκάνες, μαννοπρωτείνες) στο κρασί [7]. Γενικά η αυτόλυση εμφανίζεται όταν εξαντληθούν τα σάκχαρα και τα θρεπτικά συστατικά, έτσι σε αυτές τις συνθήκες λιμοκτονίας οι ζύμες χρησιμοποιούν το δικό τους απόθεμα σε θρεπτικά συστατικά, καταναλώνοντας γλυκογόνο και άλλες ενώσεις. Όταν, τα εσωτερικά αποθέματα έχουν εξαντληθεί, τότε η αυτόλυση ξεκινά[6]. Η διαδικασία της αυτόλυσης αποτελείται από πέντε φάσεις, όπως αναφέρεται στο παρακάτω σχήμα. Κατά την πρώτη φάση, το σύστημα των κυτταρικών μεμβρανών της ζύμης σπάει και τα υδρολυτικά ένζυμα απελευθερώνονται. Μετά από την ενεργοποίηση των ενζύμων, η ενζυματική αποικοδόμηση των συστατικών των κυττάρων οδηγεί στη συσσώρευση προϊόντων αποικοδόμησης. Το κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης γίνεται πιο πορώδες και τα αυτολυτικά προϊόντα βγαίνουν έξω από το κύτταρο[33]. Οι ενώσεις που απελευθερώνονται στο μέσο είναι χαμηλού μοριακού βάρους και βιολογικώς ανενεργές. Αυτή η διαδικασία έχει πολλές επιπτώσεις στην οινοποίηση. Αυτό συμβαίνει κατά την αποθήκευση του κρασιού στις οινολάσπες και σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο απελευθερώνοντας συστατικά ζύμης στο κρασί που επηρεάζουν έντονα τις οργανοληπτικές του ιδιότητες. Επιπλέον, έχει μια μοναδική σημασία κατά τη διάρκεια παραγωγής του αφρώδους οίνου με την κλασική μέθοδο. Κατά τη διάρκεια μιας παρατεταμένης γήρανσης σε επαφή με τις οινολάσπες, ένα τυπικό βήμα στην παραγωγή αφρώδη κρασιού με την παραδοσιακή μέθοδο, συντελείται η αυτόλυση ζύμης και οι οργανοληπτικές και αφριστικές ιδιότητες τροποποιούνται, αντανακλώντας έτσι αλλαγές στη σύνθεση του οίνου [7].

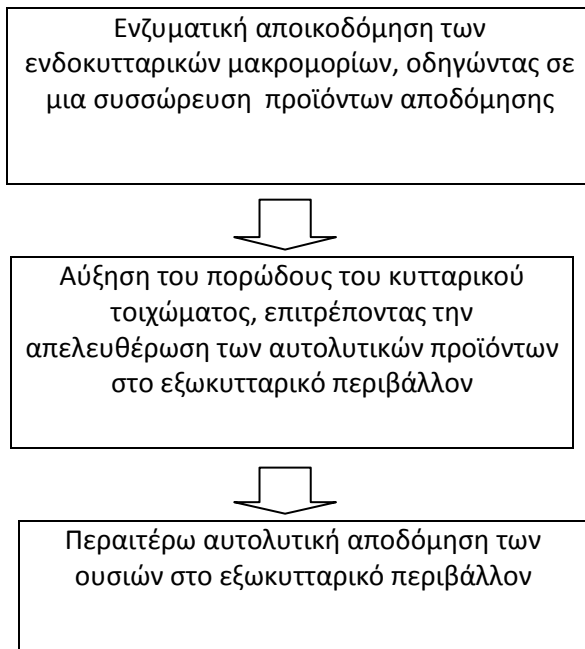
Πίνακας 2. Στάδια της διαδικασίας αυτόλυσης

Αποδιοργάνωση των μεμβρανών συστημάτων του κυττάρου (λυσosώματα, κυτταροπλασματική μεμβράνη, άλλα οργανίδια) που επιτρέπουν την απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων



Αδρανοποίηση των ειδικών αναστολέων αυτών των ενζύμων με τη δράση των πρωτεασών ή, εναλλακτικά, η πρωτεολυτική ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων



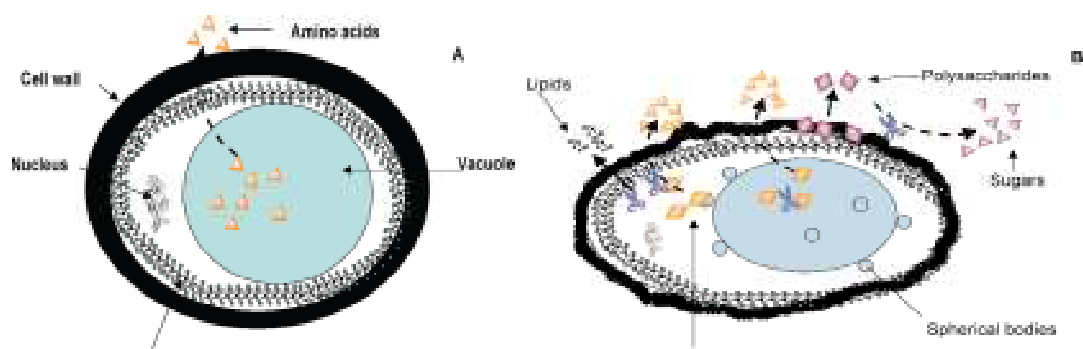


Ωστόσο, η αυτόλυση των ζυμών είναι μια αργή διαδικασία που διαρκεί από μερικούς μήνες έως και χρόνια και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, η ποικιλία σταφυλιών, ή το στέλεχος ζυμομύκητα που χρησιμοποιείται.

Το κυτταρικό τοίχωμα του *S. cerevisiae* είναι η κύρια κυτταρική δομή που εμπλέκεται στη διαδικασία αυτόλυσης. Αποτελείται από μαννοπρωτεΐνες και διασχίζεται από ίνες γλυκάνης και χιτίνης. Οι γλυκάνες του *S. cerevisiae* είναι κυρίως β-D-1,3 μονάδες γλυκόζης που συνδέονται με β-D-1,6- πλευρικές αλυσίδες γλυκόζης. Μερικές διακλαδισμένες β-1,6- γλυκάνες με β-1,3-δεσμούς είναι επίσης παρόντες. Οι β-γλυκανάσες, που ταξινομούνται ως ενδο- και εξω-γλυκανάσες, υδρολύουν τον β-O-γλυκοσιδικό δεσμό των αλυσίδων της β-γλυκάνης, οδηγώντας σε απελευθέρωση γλυκόζης και ολιγοσακχαριτών.

Κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης, το κυτταρικό τοίχωμα σταδιακά υποβαθμίζεται λόγω της θραύσης αυτών των γλυκανών και των ινών χιτίνης που προκαλούνται από ενδογενή ένζυμα συμπεριλαμβανομένων των γλυκανασών (τα οποία υπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα για μέχρι 4 μήνες μετά το θάνατο των ζυμών») και των μαννοσιδασών.

Η διαδικασία της αυτόλυσης περιλαμβάνει κύτταρα ζύμης κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των αφρωδών οίνων σε οινολάσπες και έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση αρκετών αυτολυτικών προϊόντων, οι ενώσεις αυτές είναι τόσο κυτταροπλασματικές (πεπτίδια, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και νουκλεοτίδια) και πλευρικές (γλυκάνες, μαννοπρωτεΐνες) που έχουν μια θετική επίδραση στην ποιότητα του αρώματος, της γεύσης και του αφρού στο κρασί.





Εικόνα 12. Τα στάδια της αυτολυτικής διαδικασίας

Στο παραπάνω σχήμα, εμφανίζονται οι μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων. Στο τέλος της δεύτερης ζύμωσης, τα κύτταρα δείχνουν ένα ελλειπτικό σχήμα και το κυτταρικό τοίχωμα εμφανίζεται παχύ και λείο, στο εσωτερικό του κυττάρου, ένα μεγάλο χυμοτόπιο περιβάλλεται από πολυάριθμα σφαιρικά σώματα. Μεταξύ τριών και έξι μηνών μετά την έναρξη της διαδικασίας αυτόλυσης, τα κύτταρα και τα κενοτόπια είναι μικρότερα σε μέγεθος και τα σφαιρικά σώματα είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα μέσα στο κενοτόπιο, στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος, ράχες και πτυχώσεις εμφανίζονται. Μεταξύ εννέα και δώδεκα μηνών αντί το κύτταρο να καταρρέει, είναι μικρότερο σε μέγεθος. Το κυτταρικό τοίχωμα παραμένει αδιάσπαστο, αλλά πολλές ρυτίδες εμφανίζονται στην εξωτερική επιφάνεια, χάνοντας επιπλέον, το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος. Κατά τη διαδικασία της αυτόλυσης, συμβαίνουν επίσης βιοχημικές αλλαγές. Στην αρχή της διαδικασίας, λαμβάνει χώρα μια παθητική διάχυση των αμινοξέων. Στη συνέχεια, ο αφρώδης οίνος εμπλουτίζεται από αμινοξέα πρωτεϊνών και υδρόλυσης πεπτιδίων παρατηρώντας μία αύξηση πολυσακχαριτών που προέρχεται από το κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης. Η πλασματική μεμβράνη είναι υποβαθμισμένη και επίσης, λιπίδια ελευθερώνονται στον αφρώδη οίνο. Μεταξύ εννέα και δώδεκα μηνών μετά την αρχή της διαδικασίας της αυτόλυσης, μειώνεται η συγκέντρωση των αμινοξέων και πρωτεΐνες και πεπτίδια απελευθερώνονται. Οι πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, τα λιπίδια και τα ριβονουκλεοτίδια αυξάνονται κατά πολύ.

Αρκετές ερευνητικές ομάδες απευθύνουν την μελέτη τους προς τις σχέσεις μεταξύ της αυτόλυσης της ζύμης και της αυτοφαγίας. Η αυτοφαγία είναι μια καταβολική πανταχού παρούσα διαδικασία στα ευκαρυωτικά κύτταρα που περιλαμβάνει την υποβάθμιση κυτταροπλάσματος στα χυμοτόπια ή στα λυσοσώματα. Αυτή η διαδικασία φαίνεται να είναι απαραίτητη για την προσαρμογή των κυττάρων σε εξωτερικούς και εσωτερικούς παράγοντες στρες. Για την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, σε συνθήκες πείνας, ο μηχανισμός της αυτοφαγίας ενεργοποιείται και παράγει μια εσωτερική πηγή θρεπτικών συστατικών, ώστε να επιτραπεί η επιβίωση κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης ανεπάρκειας συνθηκών διατροφής. Σε ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως οι ζυμομύκητες, η αρχή της αυτοφαγίας προκαλεί τη μεταφορά κυτταροπλάσματος στο χυμοτόπιο, που διαμεσολαβείται από τα αυτοφαγοσώματα: διπλή μεμβράνη που οριοθετείται από κυστίδια. Κατά τη διάρκεια αυτού του λιμού, η διάλυση των ενδοκυτταρικών οργανιδίων συμβαίνει, οδηγώντας στην απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων από το κενοτόπιο στο κυτταρόπλασμα. Πολλές μελέτες έχουν γίνει για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν επιπτώσεις αυτοφαγίας στη διαδικασία αυτόλυσης και πολλές πρόοδοι. Η επιλογή ελαττωματικών ή υπερεκφρασμένων αυτοφαγικών στελεχών για δευτερογενή ζύμωση μπορεί να είναι ένα ενδιαφέρον εργαλείο για την ενίσχυση της ποιότητας των αφρωδών κρασιών[94].

3.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΥΤΟΛΥΣΗ

Οι κύριοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την αυτόλυση είναι το pH, η θερμοκρασία, η παρουσία αιθανόλης και η φύση του στελέχους της ζύμης. Το pH και η περιεκτικότητα σε αιθανόλη ουσιαστικά δεν μπορούν να αλλάξουν, και για αυτό δεν θα εξεταστούν προς το παρόν. Οι υψηλές θερμοκρασίες, έως 60 ° C, έχουν αναφερθεί ως ευνοϊκές για αυτόλυση σε μοντέλο κρασιού. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την πρωτεόλυση στην παραδοσιακή μέθοδο είναι μεταξύ 10 και 12 ° C. Η αυτόλυση ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το στέλεχος ζύμης. Η αυτολυτική ικανότητα μπορεί να αξιολογηθεί μετρώντας τα αμινοξέα που απελευθερώνονται από τη ζύμη σε διαφορετικές θερμοκρασίες, δέκα ημέρες μετά τη ζύμωση. Ως εκ τούτου, το στέλεχος ζυμομύκητα επηρεάζει την ποσότητα του αζώτου που απελευθερώνεται στο μέσο, το οποίο θα μπορούσε να είναι δυνητικά χρήσιμο για την παραγωγή αφρώδους κρασιού. Οι Martinez-Rodriguez et al. (2001) προτείνουν ότι ένα στέλεχος ζύμης με καλή αυτολυτική ικανότητα παράγει καλύτερης ποιότητας αφρώδη οίνο από ζύμη με χαμηλή αυτολυτική ικανότητα[44].

3.2 ΑΥΤΟΛΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΦΡΩΔΩΝ ΟΙΝΩΝ

Η αυτόλυση των ζυμών στην παραγωγή αφρώδη οίνου έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών. Στις ερευνητικές εργασίες που διεξάγονται κατά τη διάρκεια ετών, δύο προσεγγίσεις έχουν προσδιορισθεί: η μελέτη των διαρθρωτικών και υπερδομικών αλλαγών των κυττάρων ζύμης κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης και η ανάλυση των διαφόρων προϊόντων που απελευθερώνονται εντός του μέσου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, ακολουθώντας την αλλαγή σε αζωτούχες ενώσεις, πολυσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, λιπίδια και άλλα μακρομόρια. Μεταξύ αυτών, οι αζωτούχες ενώσεις έχουν θεωρηθεί ότι είναι οι καλύτεροι δείκτες της πρωτεολυτικής δραστηριότητας της ζύμης.

Ακόμη και αν οι πρωτεΐνες είναι λίγες στο κρασί, συμβάλλουν σημαντικά στην ποιότητα του προϊόντος, στην πραγματικότητα, είναι υπεύθυνα για την αίσθηση του " σώματος ", μπορούν να δεσμεύουν πτητικές ενώσεις διατηρώντας το άρωμα κρασιού και επίσης να έχουν θετική επίδραση στη σταθερότητα του αφρού. Οι πρωτεΐνες φαίνεται να είναι δραστικές ουσίες στον αφρό, λόγω των επιφανειακών τους ιδιοτήτων, ενεργώντας ως τασιενεργές ενώσεις και ενισχύοντας την σταθερότητα του αφρού. Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του οίνου στις οινολάσπες, παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνών. Για αυτό το λόγο, οι αφρώδεις οίνοι παρουσιάζουν φτωχότερο περιεχόμενο σε πρωτεΐνες από τον οίνο βάσης από τους οποίους προέρχονται. Μεταξύ των διαφόρων τύπων των πρωτεϊνών που εμπλέκονται, η πρωτεΐνη A είναι το κύριο ένζυμο, υπεύθυνο για αυτή τη διαδικασία. Πρόσφατα, οι Alexandre et al. (2001), βρήκαν ότι το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για το 60% του αζώτου που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης στο κρασί, αλλά διαπίστωσε επίσης ότι ο συσχετισμός μεταξύ της πρωτεΐνης A, τον κυτταρικό θάνατο και της αυτόλυσης ήταν ασαφής. Ως συνέπεια της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, η συγκέντρωση των πεπτιδίων αυξάνεται και στη συνέχεια υδρολύονται προς ελεύθερα αμινοξέα.

Κατά τη διάρκεια της γήρανσης του αφρώδους οίνου πάνω στις οινολάσπες, οι Martínez-Rodríguez et al. (2002), καθιέρωσαν ότι το στέλεχος ζυμομύκητα που

χρησιμοποιήθηκε για τη δεύτερη ζύμωση, επηρεάζει την περιεκτικότητα των ελεύθερων αμινοξέων και πεπτιδίων. Έχουν εντοπιστεί επίσης τέσσερα κύρια στάδια παλαίωσης των οίνων με ζύμες: στο πρώτο, τα αμινοξέα και οι πρωτεΐνες μειώνουν την απελευθέρωση των πεπτιδίων κατά το δεύτερο στάδιο, υπάρχει απελευθέρωση αζωτούχων ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως θρεπτικές ουσίες για τα βιώσιμα κύτταρα τα οποία σε αυτό το στάδιο συνυπάρχουν με τα νεκρά κύτταρα. Ενδοκυτταρική δραστηριότητα πρωτεάσης ανιχνεύεται επίσης και οι πρωτεΐνες αποικοδομούνται σε πεπτίδια τα οποία στη συνέχεια υδρολύονται σε αμινοξέα. Στο τρίτο στάδιο, το μη βιώσιμο κύτταρο είναι παρόν και οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια απελευθερώνονται λόγω της ενζυματικής δραστηριότητας που εξακολουθεί να είναι παρούσα στο κρασί. Η τελευταία φάση εμφανίζεται μετά από περίπου 270 ημέρες μετά το τираζ και οι συγγραφείς διαπίστωσαν μια μείωση των αμινοξέων σε ορισμένα από τα κρασιά που μελετήθηκαν.

Ακόμη και αν τα πεπτίδια και τα αμινοξέα θεωρούνται γενικά ως οι πιο σημαντικές ενώσεις που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης, οι ζύμες μπορεί να απελευθερώσουν αμινοξέα στο κρασί, ακόμη και πριν από την αυτόλυση. Αυτό οφείλεται στην απόκριση των κυττάρων στο στρες που προκαλείται από συνθήκες πείνας, Ωστόσο, το φαινόμενο αυτό δεν θα πρέπει να συγχέεται με την αυτόλυση, η οποία ξεκινά αργότερα (μετά από τρεις εννέα μήνες). Η αρχή της αυτόλυσης εξαρτάται κυρίως και από τη σύνθεση του κρασιού και από το στέλεχος της ζύμης. Έχει αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της γήρανσης των αφρωδών οίνων, τα συνολικά αμινοξέα αυξάνονται πριν απελευθερωθούν τα ελεύθερα αμινοξέα. Αυτό αποδεικνύει ότι τα πεπτίδια πρώτα απελευθερώνονται και έπειτα υδρολύονται σε ενώσεις χαμηλότερου μοριακού βάρους. Οι Moreno-Arribas et al. (1996), μελέτησαν τα κλάσματα εξέλιξης του αζώτου κατά τη διάρκεια της γήρανσης ενός αφρώδους οίνου που γίνεται μέσω της παραδοσιακής μεθόδου. Μεταξύ τριών και εννέα μήνες μετά το τираζ, οι συγγραφείς δεν βρήκαν διαφορές στη συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων. Μετά από εννέα μήνες γήρανσής του αντ' αυτού, η συγκέντρωση αυτή αυξάνεται, αποδεικνύοντας την αρχή της αυτόλυσης. Μελετώντας τα πεπτίδια, η σύνθεση των αμινοξέων των αφρωδών οίνων, σερίνη και θρεονίνη είναι η πιο άφθονη. Τα πεπτίδια που προέρχονται από τη αυτόλυση προέρχονται κυρίως από ζυμομύκητες και το μοριακό βάρος τους τείνει να μειώνεται κατά τη διάρκεια του χρόνου γήρανσης. Ο εμπλουτισμός των αφρωδών οίνων με πεπτίδια μπορεί να έχει θετική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Τα πεπτίδια στην πραγματικότητα είναι οι πρόδρομοι μερικών αρωματικών μορίων που προκύπτουν από αποαμίνωση και αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης. Ακόμη και αν τα πεπτίδια θεωρούνται υπεύθυνα για την πλειονότητα των ενώσεων που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης, έχουν λιγότερο ερευνηθεί σε σχέση με άλλες ενώσεις αζώτου, κυρίως λόγω των προβλημάτων που σχετίζονται με την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό στους οίνους.

Οι Moreno-Arribas et al. (2002) βρήκαν ότι η τελική συγκέντρωση των πεπτιδίων στους αφρώδεις οίνους μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος γήρανσης, το στέλεχος ζυμομύκητα κλπ. Οι Pozo-Bayón et al. (2009), ανέφεραν επίσης ότι κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της αυτόλυσης, τα υδρόφοβα πεπτίδια υψηλού μοριακού βάρους απελευθερώνονται, οι ενώσεις αυτές υδρολύονται παράγοντας ύστερα υδρόφοβες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και ελεύθερα αμινοξέα. Τα χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια έχουν σημαντικές λειτουργικές ιδιότητες στα κρασιά, όπως τασιενεργές, βιοδραστικές, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιυπερτασικές ιδιότητες όντας μια καλή πηγή θρεπτικών συστατικών για τις ζύμες και τα βακτηρίδια, παίζουν ρόλο στην σταθερότητα του αφρού και συμμετέχουν στις οργανοληπτικές ιδιότητες.

Οι Alcaide-Hidalgo et al. (2007), διαπίστωσαν ότι τα πεπτίδια που απελευθερώνονται από τον *S. cerevisiae* EC1118 κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης σε μοντέλο κρασιού θα μπορούσαν να παρουσιαστούν ως μια πολυλειτουργική δραστηριότητα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης στους αφρώδεις οίνους, οι γλυκανάσες και οι πρωτεάσες επιτρέπουν την απελευθέρωση των πολυσακχαριτών, μακρομορίων που περιέχουν κυρίως μαννόζη (43%) και γλυκόζη (31%). Κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης στην πραγματικότητα, οι ενζυματικές δραστηριότητες κάνουν το κυτταρικό τοίχωμα λιγότερο άκαμπτο και προκαλούν την κατανομή των γλυκανών και την απελευθέρωση των μαννοπρωτεϊνών κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία έχουν ιδιαίτερα μελετηθεί τα τελευταία χρόνια για τις ιδιότητές τους. Οι μαννοπρωτεΐνες είναι γλυκοπρωτεΐνες που βρίσκονται στο εξωτερικό στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης, όπου συνδέονται με μια μήτρα από άμορφη β-1,3-γλυκάνη με ομοιοπολικούς δεσμούς. Όταν βρεθούν στο κρασί, αυτοί υφίστανται ως τμήματα πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών.

Οι πολυσακχαρίτες είναι οι πιο μελετημένες μεταξύ των αυτολυτικών ενώσεων που προέρχονται από ζυμομύκητες. Οι ενώσεις διαφοροποιούνται από πολυσακχαρίτες σταφυλιών επειδή αποτελούνται κυρίως από μαννόζη και γλυκόζη, αντί αραβινόζης. Η αύξηση της αναλογίας μαννόζη / γλυκόζη κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης, έχει ως συνέπεια την υποβάθμιση των γλυκανών που προέρχονται από τις μαννοπρωτεΐνες. Η δραστηριότητα των πρωτεασών και των γλυκανασών κατά τη διάρκεια της λύσης της ζύμης στην πραγματικότητα, μπορεί να οδηγήσει στην υδρόλυση των γλυκανών με την επακόλουθη αύξηση του μαννοπρωτεϊνών του τοιχώματος στους αφρώδεις οίνους. Μεταξύ των διαφόρων γλυκοπρωτεϊνών στο κρασί, οι μαννοπρωτεΐνες των ζυμών έχουν διερευνηθεί ευρέως, λόγω των ενδιαφέρουσων ιδιοτήτων τους. Αυτές οι ενώσεις μπορεί να έχουν χρησιμότητα σε ζύμωση στη φιάλη, διότι συμβάλλουν στην κροκίδωση των ζυμών. Επιπλέον, οι Nunez et al. (2006), βρήκαν μια σχέση μεταξύ μαννοπρωτεϊνών και ιδιότητες αφρισμού των αφρωδών οίνων. Οι μαννοπρωτεΐνες διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του πορώδους του κυτταρικού τοιχώματος του, με τον τρόπο αυτό ρυθμίζουν τη διαρροή των πρωτεϊνών από τον περιπλασμικό χώρο και την είσοδο των μακρομορίων από το περιβάλλον. Το αυξημένο πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος διευκολύνει την απελευθέρωση των αυτολυτικών προϊόντων προς το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Ωστόσο, η παραγωγή και η απελευθέρωση των μαννοπρωτεϊνών στο κρασί εξαρτάται τόσο από το στέλεχος ζύμης όσο και από την αυτόλυση που είναι πολύ αργή και μπορεί να διαρκέσει αρκετούς μήνες. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η συγκέντρωση των πολυσακχαριτών που περιέχουν μαννόζη και γλυκόζη αυξάνεται κατά τρεις με τέσσερις φορές κατά τη διάρκεια της παλαίωσης των αφρωδών οίνων στις οινολάσπες. Ο Charpentier (2000), ανίχνευσε μία αύξηση συγκέντρωσης σε πολυσακχαρίτες από 366 g L⁻¹ σε κρασί βάσης σε 602 g L⁻¹ στο λαμβανόμενο αφρώδες κρασί, μετά από εννέα μήνες από την επαφή με τις οινολάσπες.

Επίσης τα λιπίδια είναι μεταξύ των συστατικών που απελευθερώνονται από τις ζύμες κατά την διάρκεια της αυτόλυσης. Ακόμα κι αν είναι υπάρχουν σε μικρή ποσότητα, μπορεί να έχουν ένα σημαντικό ρόλο στον οργανοληπτικό χαρακτήρα των αφρωδών οίνων. Στην πραγματικότητα, η απελευθέρωση των λιπαρών οξέων θα μπορούσε να παράγει πτητικά συστατικά με χαμηλά όρια αντίληψης, είτε άμεσα είτε μέσω της χρήσης παραγώγων όπως εστέρες, κετόνες και αλδεΐδες. Κατά τη διάρκεια της γήρανσης σε επαφή με τις οινολάσπες, μάλιστα, αυξάνεται η περιεκτικότητα των λιπιδίων και συμβαίνουν ποιοτικές αλλαγές, ανάλογα με τον χρόνο γήρανσης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μελετών σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ των λιπιδίων και των ιδιοτήτων αφρισμού είναι αντιφατικά.

Οι Gallart et al. (2002), ανέφεραν μια αρνητική επιρροή των λιπαρών οξέων με C8, C18 και C10 άτομα άνθρακα στην ικανότητα σχηματισμού αφρού, ενώ οι αιθυλεστέρες του εξανοϊκού, οκτανοϊκού και δεκανοϊκού οξέος επιδρούν θετικά όσο αφορά αυτή την παράμετρο. Οι Maujean et al. (1990), ανέφεραν μια αρνητική επίδραση στη σταθερότητα αφρού μετά την προσθήκη οκτανοϊκού και δεκανοϊκού οξέος, αντ' αυτού, τα αποτελέσματα δεν ήταν αυτά που βρέθηκαν σε αυτήν την παράμετρο από Dussaud et al. (1994).

Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων μεταβάλλεται επίσης κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης. Σε γενικές γραμμές, το περιεχόμενό τους τείνει να μειώνεται και ο ρυθμός αυτής της καταστροφής εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της δευτεροβάθμιας ζύμωσης. Αυτό εξηγεί πιθανώς την μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων μελετών. Στην πραγματικότητα, μερικοί συγγραφείς διαπίστωσαν μια πλήρη αποδόμηση του DNA, ενώ οι Trevelyan (1978) και Zhao και Stolow (2003), δεν ανίχνευσαν καμιά μείωση DNA. Δεδομένου ότι η τάση για το σχηματισμό των συμπλόκων DNA-πρωτεϊνών είναι γνωστή, αυτό μπορεί να προστατεύσει τα νουκλεϊκά οξέα από τη δραστηριότητα της DNAάσης κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης. Ωστόσο, η αποδόμηση του DNA εξαρτάται από πολλές ενζυματικές δραστηριότητες και οδηγεί σε ολιγονουκλεοτίδια, νουκλεοτίδια και υποβάθμιση νουκλεοσιδικών προϊόντων. Επίσης το RNA αποδομείται κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης, ακόμη και οι χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης και η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (τυπικό των αφρωδών οίνων), θα μπορούσε να επιβραδύνει τη διαδικασία. Οι Zhao και Fleet (2005) ανέφεραν ότι η αποικοδόμηση του RNA παίζει καθοριστικό ρόλο στην αυτόλυση ζύμης, αυτή η αντίδραση οδηγεί στην απελευθέρωση των 2', 3' και 5' ριβονουκλεοτιδίων. Πρόσφατα, οι Charpentier et al. (2005) αναγνώρισαν τα 5'-UMP (ουριδινο-5'-μονοφωσφορική), 5'-GMP (γουανοσίνη 5'-μονοφωσφορική) και 5'-IMP (ινοσίνη-5'-μονοφωσφορική) σε σαμπάνια παλαιωμένη σε οινολάσπες. Ακόμη και αν αυτές οι ενώσεις είναι καλά αναγνωρισμένες ως αρωματικές ενώσεις, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να προσδιορισθεί το αντίκτυπό τους στις οργανοληπτικές ιδιότητες των αφρωδών οίνων. Τέλος, πολλές πτητικές ενώσεις απελευθερώνονται ή σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης, μερικές από αυτές με χαμηλά όρια αντίληψης. Η πιο αντιπροσωπευτική οικογένεια είναι οι εστέρες, όταν η αυτόλυση ξεκινά, οι μικρής αλυσίδας (C3-C4) και μέσης αλυσίδας (C6-C12) ακυλ εστέρες, εμφανίζουν τυπικά φρουτώδη αρώματα που στη συνέχεια μειώνονται. Επίσης ακυλο εστέρες μακράς αλυσίδας έχουν ανιχνευθεί σε αφρώδεις οίνους.

Πολλοί συγγραφείς σχετίζουν την ποιότητα του αφρώδη οίνου με τη συγκέντρωση αυτών των ουσιών όπως ισοαμυλικό-καπροϊκό, οκτυλο-οξικό, φαινυλαιθύλ-οξικό, αιθυλ-λινολεϊκό. Τερπενικές αλκοόλες και ανώτερες αλκοόλες επίσης σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης, μεταξύ αυτών, γερανιόλη, α-τερπινεόλη, κιτρονελλόλη και φαρνεσόλη των οποίων το όριο αντίληψής τους είναι μεταξύ 100 και 300 μg l⁻¹. Επιπλέον, ένας ταχύς σχηματισμός ισοαμυλικής αλκοόλης και 2-φαινυλαιθανόλης έχει παρατηρηθεί σε μοντέλο οίνου.

Επιπλέον, αλδεΐδες έχουν ανιχνευθεί, μεταξύ των οποίων, 3-μεθυλβουτανάλη είναι η πλέον άφθονη (40% του συνόλου), η ένωση αυτή προέρχεται από την οξειδωση του ισοαμυλικής αλκοόλης. Μερικές αλδεΐδες έχουν αρνητική επίδραση στην ποιότητα του αφρώδη οίνου, λόγω της χορταριασμένης οσμής τους, αλλά οι περισσότερες από αυτές εξαφανίζονται κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Οι Francioli et al., (2003), χαρακτήρισαν μερικές πτητικές ενώσεις που απελευθερώνονται κατά τη διαδικασία αυτολύσεως οι οποίες μπορεί να χρησιμεύσουν ως δείκτες ηλικίας[94].

Πίνακας 3. Αυτολυτικά προϊόντα που προέρχονται από τις ζύμες και η επίδραση τους στο κρασί

Compound	Contribution to wine
Lipids	Foam quality
Proteins	Foam quality and flavour
Peptides	Aroma, flavour and foam quality
Amino acids	Aroma, flavour and foam quality
Nucleotides	Flavour
Nucleosides	Flavour

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ

Ως ζύμες ορίζονται εκείνοι οι βασιδιομύκητες ή ασκομύκητες, οι οποίοι έχουν μονοκύτταρη βλασθητική φάση. Αποτελούν μια ευρεία ομάδα μονοκύτταρων, ευκαρυωτικών μυκήτων με ετερογενή ταξινόμηση. Ευρέως διαδεδομένες στο φυσικό περιβάλλον, ποικίλουν σε μέγεθος, σχήμα και χρώμα αναλόγως του γένους ή του είδους. Μπορούν να παρατηρηθούν μόνο με μικροσκόπιο λόγω των μικρών τους διαστάσεων. Το μήκος των κυττάρων διαφέρει πολύ, μπορεί να είναι μόνο 2-3 μm ή ακόμη και 20-50 μm σε μερικά είδη. Το πλάτος τους κυμαίνεται μεταξύ 1-10 μm. Το κυτταρικό τους σχήμα είναι στενά συνδεδεμένο με τη λειτουργία του κυττάρου και έχει τη δυνατότητα να μεταβάλλεται υπό την επίδραση εξωτερικών συνθηκών όπως της επιφανειακής τάσης και της σύστασης του θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα της ζύμης μπορεί να είναι ελλειψοειδή - ωοειδή (*Saccharomyces* spp.), κυλινδρικά με ημισφαιρικά άκρα (*Schizosaccharomyces* spp.), φιαλόμορφα (*Pityrosporum* spp.), νηματοειδή (με ψευδοϋφές και υφές με διαφράγματα π.χ. *Candida albicans*), τριγωνικά (*Trigonopsis* spp.), καμπυλωτά (*Cryptococcus cereanus*), σφαιρικά ή επιμηκυμένα. Έχουν περιγραφεί περίπου 500 είδη «αληθινών» ζυμών, τα οποία κατατάσσονται σε 69 γένη. Υπάρχει επίσης ένας σημαντικός αριθμός οργανισμών, οι οποίοι υπό ορισμένες συνθήκες ανάπτυξης έχουν μια φάση ζωής, που μοιάζει με αυτή των ζυμών[112].

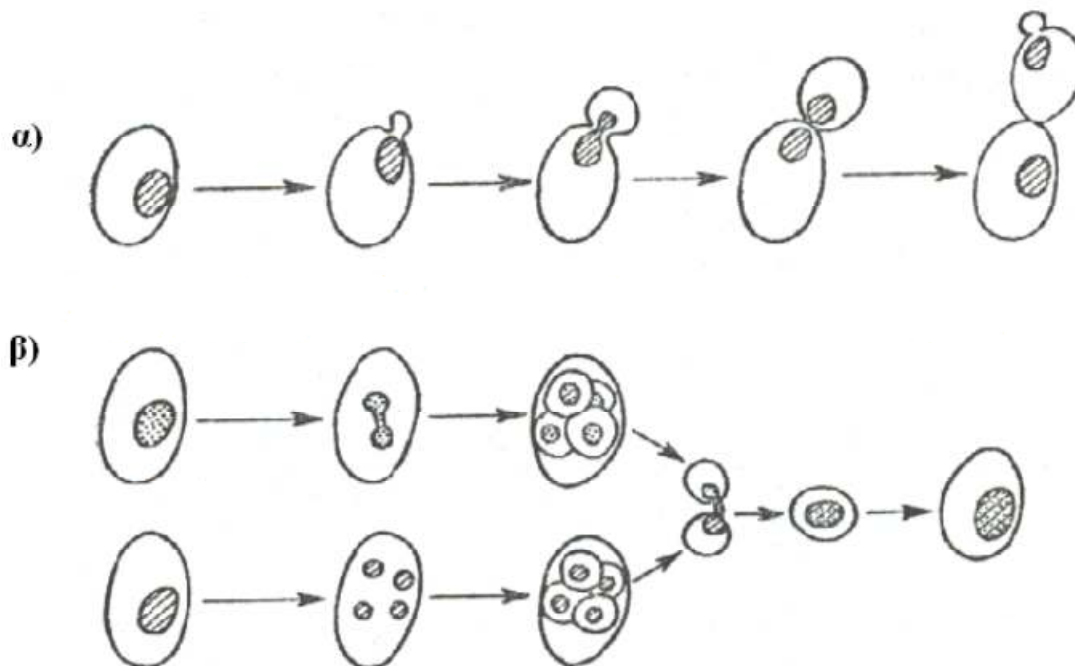
Πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση ή διχοτόμηση και δεν σχηματίζουν πάντα σπόρια. Ο εγγενής πολλαπλασιασμός γίνεται με ασκοσπόρια, υπάρχουν και ορισμένα είδη ζυμών που δεν σχηματίζουν σπόρια. Ο αγενής πολλαπλασιασμός γίνεται με εκβλάστηση ή διχοτόμηση. Οι ζυμομύκητες ανάλογα με τον τρόπο αναπαραγωγής τους χωρίζονται σε δυο κατηγορίες στους άσπορους και στους σπορογόνους. Οι πρώτοι δεν σχηματίζουν σπόρια αλλά πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλαστήσεις, είναι ατελείς μύκητες και είναι γνωστές ως «άγριες ζύμες». Οι δεύτεροι πολλαπλασιάζονται τόσο με εκβλάστηση (αγενώς) όσο και με σπόρια (εγγενώς) και ονομάζονται και «ευγενείς ζύμες» .

Ο αγενής πολλαπλασιασμός γίνεται με τρεις τρόπους, με εκβλάστηση, με κυτταρική διαίρεση και με συνδυασμό των δυο αυτών τρόπων. Η αναπαραγωγή με εκβλάστηση είναι ο πιο συνηθισμένος τρόπος πολλαπλασιασμού των ζυμών. Σύμφωνα με τον τρόπο αυτό, ο πυρήνας του κυττάρου της ζύμης μετατοπίζεται προς την περιφέρεια, επιμηκύνεται και μετά διαιρείται σε δυο μέρη, ενώ πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης του κυττάρου εμφανίζεται ένας μικρός οφθαλμός, που γρήγορα αναπτύσσεται. Όταν ο οφθαλμός αποκτήσει μέγεθος ίσο περίπου με το μέγεθος του μητρικού κυττάρου χωρίζεται με

σύσφιξη και αφού απομακρυνθεί αναπαράγεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο ή αναπαράγεται χωρίς να διαχωριστεί οπότε μπορεί να σχηματιστεί μια ολόκληρη «αποικία» όμοιων κυττάρων . Το μητρικό κύτταρο μπορεί να παράγει μερικές δεκάδες νέα κύτταρα, μέχρι να «γεράσει» και να πεθάνει. Η θραύση (αυτόλυση) των «γερασμένων» κυττάρων, μπορεί να συμβάλλει στην εξασφάλιση θρεπτικών συστατικών για τα εναπομείναντα δραστικά κύτταρα.

Η αναπαραγωγή με κυτταρική διαίρεση γίνεται με το σχηματισμό ενός εγκάρσιου τοιχώματος στο εσωτερικό του κυττάρου, το τοίχωμα αυτό διχοτομεί το κύτταρο κάθετα προς τον επιμήκη άξονά του με αποτέλεσμα τη δημιουργία δυο νέων κυττάρων . Ο τρίτος τρόπος αναπαραγωγής που απαντάται μόνο σε ένα είδος ζύμης είναι συνδυασμός των δυο προηγούμενων, δηλαδή γίνεται εκβλάστηση και το θυγατρικό κύτταρο αρχίζει να αποχωρίζεται με σύσφιξη που ολοκληρώνεται με εγκάρσιο τοίχωμα.

Οι σπορογόνες ζύμες αναπαράγονται τόσο με εκβλαστήσεις όσο και με σπόρια. Όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ευνοϊκές για τη ζωή και τον πολλαπλασιασμό της ζύμης αναπαράγονται αγενώς με εκβλάστηση, ενώ σε αντίξοες συνθήκες σταματούν να εκβλαστάνουν και σχηματίζουν ασκούς. Δηλαδή ο πυρήνας του κυττάρου διαιρείται σε δυο μέρη καθένα από τα οποία μπορεί να διαιρεθεί σε άλλα δυο μέρη. Ο καθένας από τους νέους πυρήνες περιβάλλεται από ένα μέρος του κυτοπλάσματος και σχηματίζουν έτσι ένα νέο κύτταρο μέσα στην παλιά κυτταρική μεμβράνη, που συγχρόνως σκληραίνει και γίνεται ένας ασκός. Οι ασκοί των ζυμών περιέχουν συνήθως από 1 έως 4 ασκοσπόρια, ορισμένα όμως είδη μπορεί να σχηματίσουν και 8. Τα ασκοσπόρια έχουν διάφορα σχήματα και ο αριθμός και το σχήμα των ασκοσπορίων αποτελούν ένα από τα κριτήρια για την αναγνώριση μιας ζύμης, δηλαδή την κατάταξή της σε γένος και είδος[100].



Εικόνα 13. Τα στάδια πολλαπλασιασμού των ζυμομυκήτων α) με εκβλάστηση (αγενώς), β) με σπόρια (εγγενώς)

Τα κύτταρα των ευκαρυωτικών έχουν πιο πολύπλοκη δομή από ότι τα προκαρυωτικά κύτταρα. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα εσωτερικό δίκτυο που αποτελείται από μεμβράνες και μικροσωληνίσκους που συνδέονται με υποκυτταρικά οργανίδια. Αναλυτικότερα ένα ευκαρυωτικό κύτταρο αποτελείται από:

Πλασματική μεμβράνη: αποτελεί τα όρια κάθε κυττάρου και διατηρεί τις στοιχειώδεις διαφορές μεταξύ του εσωτερικού του κυττάρου και του περιβάλλοντος. Η μεμβράνη είναι

ένα έντονα επιλεκτικό φίλτρο και ένας μηχανισμός για ενεργό μεταφορά. Ρυθμίζει την είσοδο των θρεπτικών ουσιών και την έξοδο άχρηστων προϊόντων και δημιουργεί διαφορές στη συγκέντρωση ιόντων ανάμεσα στο εσωτερικό και εξωτερικό του κυττάρου, που είναι απαραίτητες για τη ζωή. Αποτελείται από μόρια λιπιδίων και πρωτεϊνών που ενώνονται με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι δυναμικές ρευστές δομές και τα πλείστα των λιπιδίων και πρωτεϊνών μπορούν να κινούνται στο επίπεδο της μεμβράνης.

Κυτταρικά Συστήματα Μεμβρανών: το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύμπλεγμα Golgi και τα λυσοσώματα εμπλέκονται στην σύνθεση και τροποποίηση πρωτεϊνών και λιπιδίων και στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών, πολυσακχαριτών και λιπιδίων και επικοινωνούν μέσω κυστιδίων.

Ενδοπλασματικό Δίκτυο: υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αποτελείται από μια σύμπλοκη μάζα ενδοκυτταρικών μεμβρανών που περικλείουν χώρους γεμάτους με υγρό. Οι μεμβράνες του ΕΔ χωρίζουν το κύτταρο σε πολλαπλά διαμερίσματα, στα οποία μπορεί να συμβαίνουν διαφορετικές ομάδες ενζυμικών αντιδράσεων. Λειτουργεί επίσης σα σύστημα για τη μεταφορά ποικίλων χημικών ουσιών από το ένα τμήμα του κυττάρου στο άλλο και πιθανόν και έξω από το κύτταρο αλλά και μέσα στον πυρήνα. Επίσης διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις βιοσυνθετικές διεργασίες του κυττάρου.

Σύμπλεγμα Golgi: υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, εκτός από ώριμα ερυθροκύτταρα. Βρίσκεται συνήθως κοντά στον πυρήνα και στα ζωικά κύτταρα είναι συνήθως κοντά στο κεντροσωμάτιο. Αποτελείται από ένα σύνολο, πολυάριθμων αθροισμάτων δισκοειδών κυστιδίων, που εμφανίζουν προς την πλευρά του ΕΔ, μικρά κυστίδια, ενώ προς την πλευρά της πλασματικής μεμβράνης υπάρχουν διογκωμένα εκκριτικά κυστίδια.

Πλην της γενετικής πληροφορίας, τα κύτταρα απαιτούν ενέργεια και πρώτες ύλες. Το κύτταρο χρησιμοποιεί ενέργεια για την μετατροπή πρώτων υλών σε ειδικά βιομόρια που απαιτούνται για την αύξηση, αναπαραγωγή και κίνηση. Η ενέργεια μετατρέπεται από μια μορφή σε άλλη στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες.

Μιτοχόνδρια: υπάρχουν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και είναι τα οργανίδια στα οποία συμβαίνουν οι περισσότερες αντιδράσεις της κυτταρικής αναπνοής. Αποτελούν συνήθως το 20% περίπου του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου. Η δομή τους είναι χαρακτηριστική, όπως φαίνεται με ηλεκτρονική μικροσκοπία λεπτών τομών. Αποτελούνται από μια εξωτερική μεμβράνη και μια εσωτερική που αναδιπλώνεται σχηματίζοντας παράλληλες πτυχωσεις, τα λεγόμενα ελάσματα. Ο χώρος που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη, καταλαμβάνεται από ημίρυστο υλικό που ονομάζεται μιτοχονδριακός χυμός. Ο πολύ μικρότερος χώρος που υπάρχει μεταξύ εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης ονομάζεται ενδιάμεσος χώρος.

Χλωροπλάστες: είναι η σπουδαιότερη κατηγορία μιας ομάδας οργανιδίων που ονομάζονται πλαστίδια και βρίσκονται στα φυτικά κύτταρα και στα φύκη. Οι χλωροπλάστες είναι σχετικά μεγάλα οργανίδια και αρκετά πολύπλοκα στη δομή. Εξωτερικά περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη είναι πολύ διαπερατή, ενώ η εσωτερική λιγότερο και επ' αυτής εδράζονται ειδικές πρωτεϊνες μεταφοράς. Ανάμεσα τους υπάρχει στενό μεσομεμβρανικό διάστημα. Η εσωτερική μεμβράνη περικλείει ένα πολύ μεγάλο χώρο που ονομάζεται στρώμα και περιέχει πολλά ένζυμα και ριβοσώματα. Οι χλωροπλάστες μπορούν να αναπαράγονται και να βιοσυνθέτουν πρωτεϊνες, αν και πολλές άλλες βιοσυντίθεται στο κυτταρόπλασμα με πληροφορία από τον πυρήνα.

Οι ζώντες οργανισμοί εξαρτώνται από την ακριβή και κατάλληλη γενετική πληροφορία, η οποία είναι αποθηκευμένη σαν αλληλουχία των βάσεων του DNA. Το DNA των

ευκαρυωτικών κυττάρων βρίσκεται στο εσωτερικό του πυρήνα. Η πληροφορία μεταφράζεται σε πρωτεΐνες με την βοήθεια των ριβοσωμάτων.

Πυρήνας: είναι σφαιρικό ή ωοειδές οργανίδιο των ευκαρυωτικών κυττάρων, που καταλαμβάνει το 10% περίπου του όγκου του κυττάρου και περιέχει σχεδόν όλο το DNA του κυττάρου. Ο πυρήνας είναι πρωταρχικής σημασίας οργανίδιο εφόσον περιέχει τα γονίδια που καθορίζουν τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά του κυττάρου και του οργανισμού. Ο πυρήνας περιβάλλεται από τον πυρηνικό φάκελο, που αποτελείται από δύο ομόκεντρες μεμβράνες: την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη, που βρίσκεται σε συνέχεια με την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και την εσωτερική μεμβράνη. Οι δύο μεμβράνες συντήκονται κατά διαστήματα και σχηματίζουν τους πυρηνικούς πόρους, μέσω των οποίων διακινούνται τα ριβοσώματα και τα RNA μόρια από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα, ενώ όλες οι πρωτεΐνες που λειτουργούν στον πυρήνα μεταφέρονται σ' αυτόν από το κυτταρόπλασμα όπου συντίθενται.

Κενοτόπια: πολλά ευκαρυωτικά κύτταρα, αλλά ιδιαίτερα τα φυτικά και των πρωτίστων, περιέχουν οργανίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη και φαίνονται κενά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αυτά τα οργανίδια ονομάζονται κενοτόπια, στην πραγματικότητα δεν είναι κενά, αλλά μάλλον γεμάτα με υδατικά διαλύματα πολλών ουσιών. Τα κενοτόπια έχουν μια ποικιλία λειτουργιών[98].

4.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΖΥΜΩΝ

ΟΜΑΔΑ I: ΑΣΚΟΣΠΟΡΟΓΟΝΕΣ ΖΥΜΕΣ(ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΥΝ ΑΣΚΟΣΠΟΡΙΑ)

ΚΛΑΣΗ: ASCOMYCETES

ΤΑΞΗ: ENDOMYCETALES

- 1) **ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:** SPERMOPHTHORACEAE
ΓΕΝΗ: METSCHNIKOWIA, NEMATOSPORA, COCCIDIASCUS

- 2) **ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:** SACCHAROMYCETACEAE
 - A) **ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:** SCHIZOSACCHAROMYCOIDEAE
ΓΕΝΟΣ: SCHIZOSACCHAROMYSES
 - B) **ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:** NADSONIOIDEAE
ΓΕΝΟΣ: NADSOINA, SACCHAROMYCODES, HANSENIASPORA
 - Γ) **ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:** LIPOMYCETOIDEAE
ΓΕΝΟΣ: LIPOMYCES
 - Δ) **ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:** SACCHAROMYCOIDEAE
ΓΕΝΟΣ: SACCHAROMYCES, ZYGOSACCHAROMYCES, SACCHAROMYCOPSIS, PICHIA, HANSENULA, DEKKERA, KLUVEROMYCES, TORULASPORA

ΟΜΑΔΑ II) ΑΣΠΟΡΟΓΟΝΕΣ ΖΥΜΕΣ(ΨΕΥΔΕΙΣ ΖΥΜΕΣ-ΔΕΝ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΥΝ ΣΠΟΡΙΑ)

ΚΛΑΣΗ: DEUTEROMYCETES

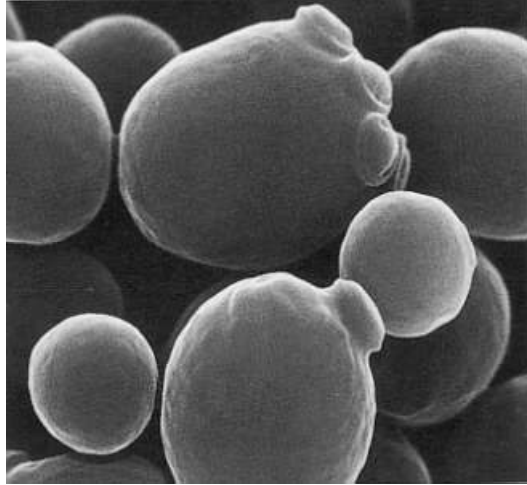
ΤΑΞΗ: MONILIALES

1) **ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:** CRYPTOCOCCACEAE

ΓΕΝΗ: CANDIDA, KLOECKERA, BRETTANOMYCES, TRICHOSPORON, CRYPTOCOCCUS, RHODOTORULA[102]

Η ΖΥΜΗ *Saccharomyces cerevisiae*

Η πιο γνωστή ζύμη, και με τις περισσότερες εφαρμογές είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*.



Εικόνα 14. Η ζύμη *S. cerevisiae* μέσα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

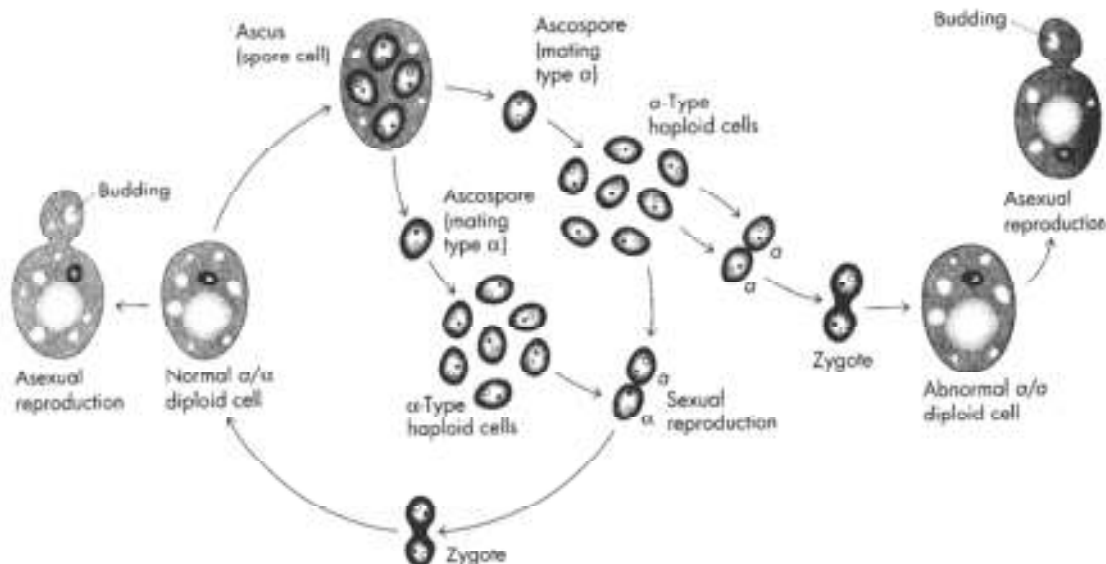
Πρόκειται για μονοκύτταρο και μονοπύρηνο οργανισμό, με κυτταρικό σχήμα ελλειψοειδές. Αναλόγως το στέλεχος το σχήμα ποικίλει από σφαιρικό, ωοειδές ή κυλινδρικό. Το μήκος του κυττάρου ποικίλει από 5-10 μm και το πλάτος από 1-3 έως 1-7 μm. Τα κύτταρα της αποτελούνται από τον κυτταρικό φάκελο, το κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και άλλα οργανίδια.

Η συστηματική της κατάταξη του *Saccharomyces cerevisiae* είναι:

<u>ΒΑΣΙΛΕΙΟ:</u>	Μύκητες
<u>ΦΥΛΟ:</u>	Μυκόφυτα
<u>ΚΛΑΣΗ:</u>	Ασκομύκητες
<u>ΥΠΟΚΛΑΣΗ:</u>	Πρωτοασκομύκητες
<u>ΤΑΞΗ:</u>	Ενδομύκητες
<u>ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:</u>	<i>Saccharomycetaceae</i>
<u>ΓΕΝΟΣ:</u>	<i>Saccharomyces</i>
<u>ΕΙΔΟΣ:</u>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

5.1.1. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΣ

Ο βιολογικός κύκλος του *S. cerevisiae*, αποτελείται από δύο φάσεις: την απλοειδή και τη διπλοειδή. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ετερόθαλλος και χρειάζονται επομένως δύο συμβατά στελέχη **α** και **α** για εγγενή αναπαραγωγή



Εικόνα 15. Ο βιολογικός κύκλος του *S. Cerevisiae*

Δύο ασκοσπόρια αντίθετου συζευκτικού τύπου (ή εκβλαστήματά τους), έρχονται σε φυσική επαφή και μετά συγχωνεύονται (πλασμογαμία). Ακολουθεί καρυογαμία (συγχώνευση πυρήνων) και δημιουργία ζυγωτού κυττάρου. Το ζυγωτό παράγει μεγάλο αριθμό διπλοειδών εκβλαστημάτων. Υπό ορισμένες συνθήκες, που δεν είναι πλήρως γνωστές, μερικά διπλοειδή κύτταρα υφίστανται μείωση και μετατρέπονται σε ασκούς, καθένας από τους οποίους φέρει τέσσερα ασκοσπόρια. Τα ασκοσπόρια πολλαπλασιάζονται με εκβλαστήματα και παράγουν πολλά απλοειδή κύτταρα. Η έλξη των αντίθετων κυττάρων (α και α) οφείλεται σε οργανικές ουσίες ορμονικής φύσης που παράγονται από τα δύο είδη κυττάρων.

Η αγενής αναπαραγωγή γίνεται με εκβλάστηση. Κατά την εκβλάστηση, το κυτταρικό πρωτόπλασμα που περιβάλλεται από λεπτή μεμβράνη, σπάει σε ένα σημείο το κυτταρικό τοίχωμα και σχηματίζει το θυγατρικό κύτταρο. Το εκβλάστημα μεγαλώνει και τελικά αποχωρίζεται από το μητρικό κύτταρο με σύσφιξη της βάσης, αφήνοντας στο σημείο μια ουλή. Το θυγατρικό κύτταρο έχει τη δυνατότητα να εκβλαστάνει ευρισκόμενο σε επαφή με το μητρικό κύτταρο δημιουργώντας έτσι μια αλυσίδα κυττάρων (ψευδομυκήλιο). Κατά την εκβλάστηση πραγματοποιείται πυρηνική διαίρεση και ο ένας θυγατρικός πυρήνας περνάει στο εκβλάστημα, ενώ ο άλλος μένει στο μητρικό κύτταρο[112].

4.2 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΑ

Είναι σημαντικές στην οينوποίηση και απαντώνται παντού, όπου υπάρχουν σακχαρούχα διαλύματα. Σε κανονικές συνθήκες υπάρχουν στην επιφάνεια των ραγών αρκετές ζύμες που μπορούν να ξεκινήσουν τη ζύμωση. Στο γλεύκος μετά την έκθλιψη των σταφυλιών σχεδόν όλος ο αριθμός των ζυμομυκήτων στο φλοιό ανήκει στις άγριες ζύμες με μικρή ζυμωτική ικανότητα, ενώ ο αριθμός του σακχαρομύκητα (*S. Cerevisiae*) είναι πολύ χαμηλότερος. Κατά την διάρκεια όμως της αυθόρμητης ζύμωσης μεταβάλλεται εκ βάθρων η σύνθεση της ζυμοχλωρίδας του γλεύκους. Το ποσοστό των ζυμών με μικρή ζυμωτική ικανότητα μειώνεται γρήγορα καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της αιθανόλης και οι σακχαρομύκητες με μεγάλη ζυμωτική ικανότητα πολλαπλασιάζονται σε μεγάλο βαθμό με αποτέλεσμα να είναι επικρατέστεροι, με τον σακχαρομύκητα (*S. Cerevisiae*) να είναι ο μοναδικός που

παραμένει στο κρασί. Τα διάφορα είδη ζυμών, τα οποία έχουν απομονωθεί από γλεύκη, μπορούν να κατανεμηθούν στις εξής κατηγορίες σύμφωνα με την σημασία τους για την οينوποίηση:

- 1) Οι ζύμες με μεγάλη ζυμωτική ικανότητα, οι οποίες κυρίως πραγματοποιούν την αλκοολική ζύμωση και οι οποίες εκτός από υψηλή παραγωγή αλκοόλης παράγουν και μια σειρά δευτερευόντων προϊόντων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν αποκλειστικά στελέχη του *S. cerevisiae*.
- 2) Οι ζύμες με μικρή ζυμωτική ικανότητα, οι οποίες αποτελούν τις λεγόμενες άγριες ζύμες, μερικές από τις οποίες υπάρχουν σε μεγάλο αριθμό μέσα στο γλεύκος. Τα προϊόντα ζύμωσης που παράγουν δεν έχουν αρνητική επίδραση στο κρασί σε κανονικές συνθήκες ζύμωσης. Ανήκουν στα γένη *Kloeckera* και *Hanseniaspora* τις λεγόμενες λεμονοειδείς ζύμες.
- 3) Οι ζύμες που σχηματίζουν υμένιο στην επιφάνεια, οι λεγόμενες ζύμες επιφάνειας ή ζύμες άνθησης. Οι ζύμες αυτές έχουν μεγάλη ανάγκη οξυγόνου και για το λόγο αυτό πολλαπλασιάζονται μετά το τέλος της ζύμωσης πάνω στην επιφάνεια του κρασιού, όταν το επιτρέπουν οι συνθήκες.
- 4) Οι ζύμες χωρίς ζυμωτική ικανότητα, οι οποίες απαντώνται σποραδικά στα γλεύκη και είναι άνευ σημασίας για την παραγωγή κρασιού[102].

Οι εφαρμογές των ζυμομυκήτων στη βιομηχανία είναι αρκετές, με σημαντικότερες την παραγωγή κρασιού, μπύρας, ψωμιού και αιθανόλης. Στον τομέα της οινολογίας και συγκεκριμένα στα γλεύκη απαντώνται διάφορα είδη ζυμών, δυο όμως είναι τα κυριότερα είδη αυτών που αποτελούν και το 90 % περίπου της φυσικής ζυμοχλωρίδας των σταφυλιών και των γλευκών κατά τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Αυτά είναι :

α) Ο σακχαρομύκητας *Kloeckera apiculata* ή άσπορη ζύμη. Η ζύμη αυτή είναι άγρια και τα κύτταρά της βρίσκονται πάνω στο σταφύλι, όπου πολλαπλασιάζονται έντονα και προκαλούν ζωηρή ζύμωση στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Ο μύκητας αυτός δεν αντέχει όμως στην αιθανόλη γι' αυτό μόλις σχηματισθούν 4 – 6° αλκοολικοί βαθμοί παύει να αναπτύσσεται και καθιζάνει στην υποστάθμη. Επίσης, ο μύκητας αυτός καταναλώνει περισσότερο ποσό σακχάρου από τις άλλες ζύμες (2,1 - 2,3 g σακχάρου για την παραγωγή 1 ml αλκοόλης) και είναι ευαίσθητος στο SO₂.

β) Ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* ή ελλειψοειδής που ανήκει στους ασκομύκητες. Ονομάζεται έτσι λόγω του ελλειψοειδούς σχήματος των κυττάρων του (το σχήμα τους δεν είναι πάντα ελλειψοειδές αλλά μεταβάλλεται από ελλειψοειδές - στρογγυλό έως ελλειψοειδές - επιμηκυμένο ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος και την ηλικία των κυττάρων). Οι μύκητες αυτοί είναι οι επικρατέστεροι στην αλκοολική ζύμωση και έχει παρατηρηθεί ότι στην υποστάθμη του οίνου μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης το 80% των ζυμομυκήτων είναι ελλειψοειδείς. Αυτοί παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα όπως ότι προκαλούν κανονική και ταχεία ζύμωση (σε 2-3 εβδομάδες φέρουν σε πέρας την αλκοολική ζύμωση όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές), καταναλώνουν λιγότερο ποσό σακχάρου από τις άλλες ζύμες (1,7-1,8 g σακχάρου για την παραγωγή 1 ml αλκοόλης), σχηματίζουν υψηλά ποσά αιθανόλης μέχρι 16-18ο αλκοολικούς βαθμούς, παρουσιάζουν αντοχή στο SO₂ και σε χαμηλές θερμοκρασίες.

γ) Άλλος σακχαρομύκητας είναι ο *Pastorianus*, που έχει σχήμα επίμηκες και ακανόνιστο, παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στην αιθανόλη, αλλά έχει βραδεία ζυμωτική ικανότητα και δεν μπορεί να ολοκληρώσει την αλκοολική ζύμωση. Από τις υπόλοιπες ζύμες που αποτελούν το 10 % περίπου της φυσικής ζυμοχλωρίδας των σταφυλιών και του γλεύκους, άλλες έχουν μικρή αντοχή στην αιθανόλη, οπότε η συμμετοχή τους στη ζύμωση των σακχάρων είναι

πολύ μικρή γιατί γρήγορα εξαφανίζονται από το ζυμούμενο γλεύκος, ενώ άλλες που αντέχουν στην αιθανόλη αντιπροσωπεύουν σημαντικό ποσοστό της ζυμοχλωρίδας στο τέλος της ζύμωσης, όπως ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces oniformis* που έχει μεγάλη αντοχή στην αλκοόλη και μαζί με τον ελλειψοειδή ολοκληρώνει την αλκοολική ζύμωση[100].

4.3 ΖΥΜΩΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΖΥΜΗΣ

Παράλληλα με τους νέους τρόπους παραγωγής επιλεγμένων ζυμών υπάρχουν συνεχώς εξελίξεις στις προτεινόμενες μεθόδους εμβολιασμού και στη χρήση θρεπτικών σε συνδυασμό με αδρανοποιημένες ζύμες σε διάφορα στάδια της ζύμωσης. Ενδιαφέροντα αποτελέσματα φαίνεται να έχει η χρήση των λεγόμενων άγριων ζυμών και οι νέες τεχνικές εμβολιασμού όπως συν εμβολιασμός ή διαδοχικός εμβολιασμός.

Χρειάζεται λοιπόν ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή της ζύμης που θα πραγματοποιήσει τη σωστή αλκοολική ζύμωση και θα δώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Για να είναι επιτυχημένη η επιλογή αυτή θα πρέπει το στέλεχος που θα έχουμε επιλέξει να έχει τα ζυμωτικά χαρακτηριστικά που επιζητούμε και όχι τα εντελώς αντίθετα[102].

Θετικά ζυμωτικά χαρακτηριστικά:

- Γρήγορη εκκίνηση και αποπεράτωση ζύμωσης
- Μεγάλη ανοχή στην αιθανόλη
- Αντοχή σε μεγάλη ωσμωτική πίεση για ζύμωση υψηλών συγκεντρώσεων σακχάρων
- Αντοχή στο θειώδες
- Ζύμωση σε χαμηλές θερμοκρασίες
- Παραγωγή γλυκερίνης
- Αποικοδόμηση μηλικού οξέος
- Παράγον killer
- Παραγωγή β-γλυκοζιδάσης

Αρνητικά ζυμωτικά χαρακτηριστικά:

- Παραγωγή πτητικής οξύτητας
- Παραγωγή διοξειδίου του θείου
- Παραγωγή υδρόθειου
- Παραγωγή ακεταλδεύδης και πυροσταφυλικού
- Παραγωγή αφρού

4.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ

4.4.1 ΖΥΜΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ Ή ΕΠΑΝΑΖΥΜΩΣΕΩΝ

Κατά τη διάρκεια της διατήρησης οίνων με αζύμωτα σάκχαρα, παρατηρείται ανάπτυξη των περιεχόμενων σ' αυτούς ζυμών με αποτέλεσμα το θόλωμα των οίνων, το σχηματισμό ιζήματος και τη δημιουργία διοξειδίου του άνθρακα.

Σε τέτοιους είδους ατυχήματα, τη μεγαλύτερη συχνότητα παρουσιάζει ο άλλοτε ονομαζόμενος *Saccharomyces oniformis*. Με την καινούργια ονομασία, υπεύθυνος για τα

προβλήματα των επαναζυμώσεων φαίνεται ότι είναι ο *Saccharomyces bayanus*. Είναι η ζύμη που συναντάται, επίσης, στις καλλιέργειες που αναπτύσσονται στην ελεύθερη επιφάνεια του οίνου και συμμετέχει στο σχηματισμό μυκοδερμικού υμενίου στους τοπικούς οίνους του Jura και του Xeres.

Δεύτερος σε συχνότητα, στις περιπτώσεις των επαναζυμώσεων, έρχεται ο *Saccharomyces bailii*. Πρόκειται για ένα είδος αρκετά ανθεκτικό στο θειώδη ανυδρίτη.

4.4.2 ΖΥΜΕΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΕΩΝ

Στην κατηγορία αυτή των ζυμών, ανήκουν κυρίως οι μυκοδερμικές ζύμες, οι οποίες προκαλούν την άνθηση των οίνων. Αναπτύσσονται συνήθως στις ελεύθερες επιφάνειες των βαρελιών, των πλαστικών σωλήνων, στα επιφανειακά στρώματα του δαπέδου κλπ. Οι ζύμες αυτές δε ζυμώνουν αλλά μόνο αναπνέουν. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα γένη *Candida*, *Pichia*, *Bretanomyces*.

Η άνθηση εκδηλώνεται με την εμφάνιση μυκηλίου(επιδερμίδα) λευκωπού ή υποκίτρινου χρώματος, στην επιφάνεια του οίνου. Το μυκήλιο αυτό σε προχωρημένο στάδιο μετατρέπεται σε παχύ κοκκώδες στρώμα, γνωστό ως άνθος του οίνου.

Μικροσκοπικά, οι ζύμες αυτές αναγνωρίζονται από τις διακλαδώσεις που σχηματίζουν και από τις δύο γυαλιστερές κηλίδες που φαίνονται στο κάθε κύτταρο. Οι μυκοδερμικές ζύμες οξειδώνουν την αιθυλική αλκοόλη σε ακεταλδεύδη και αποσυνθέτουν τα οργανικά οξέα, μειώνοντας έτσι τη σταθερή οξύτητα του οίνου.

4.4.3 ΖΥΜΕΣ ΘΕΙΩΜΕΝΩΝ ΓΛΕΥΚΩΝ

Τη μικρότερη αντοχή στο θειώδη ανυδρίτη φαίνεται να έχουν οι ζύμες του γένους *Kloeckera*, ενώ με τη μεγαλύτερη είναι οι ζύμες του γένους *Saccharomyces*, οι οποίες εξάλλου προκαλούν και τα περισσότερα προβλήματα μεταζυμώσεων σε οίνους με αζύμωτα σάκχαρα.

Η προσθήκη του θειώδη ανυδρίτη σε δόσεις υψηλότερες από 500mg/L κάνει την ανάπτυξη των ζυμών προβληματική. Σ' αυτή την αδυναμία των ζυμών βασίστηκε η διατήρηση των θειωμένων λευκών. Σ' όλες τις περιπτώσεις ζύμωσης θειωμένων γλευκών απομονώθηκαν ζύμες που ανήκουν μόνο σ' ένα γένος και είδος, το *Schzosaccharomyces rombe*. Το είδος αυτό αποτελεί μια ζύμη με σπάνια ανθεκτικότητα σε τόσο μεγάλη συγκέντρωση θειώδη ανυδρίτη. Πρόκειται επίσης, επίσης για μια ζύμη που δεν πολλαπλασιάζεται με εκβλάστηση, αλλά με κυτταρική διαίρεση που αποτελεί σπάνιο φαινόμενο για τα γένη και είδη που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση.

4.4.4 ΖΥΜΕΣ KILLER

Είναι ορισμένα στελέχη ζυμών, που είναι σε θέση να παράγουν εξωκυτταρικές τοξίνες πρωτεϊνικής φύσεως που καταστρέφουν άλλες ευαίσθητες ζύμες. Το φαινόμενο killer παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε ένα στέλεχος του *S. Cerevisiae*. Εν τω μεταξύ, όμως έχει παρατηρηθεί και σε άλλα γένη ζυμομυκήτων όπως: *Candida*, *Pichia*, *Kluveromyces*, *Debaryomyces* και *Rhodotorula*.

Οι ζύμες killer αποτελούν μέρος της φυσικής ζυμοχλωρίδας των σταφυλιών και του γλεύκους. Η ανάπτυξη και η τοξική δράση αυτών των ζυμών μπορεί να οδηγήσει σε καθυστέρηση στην έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης καθώς σε πρόωρη διακοπή της και να μας δώσει κρασιά με αυξημένες ποσότητες ακεταλδεύδης, γαλακτικού και οξικού οξέος και άλλα αρνητικά χαρακτηριστικά[102, 114].

4.5 ΘΡΕΨΗ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Οι ζυμομύκητες για να μπορέσουν να αναπτυχθούν χρειάζονται ορισμένα θρεπτικά συστατικά, που είναι τα εξής :

4.5.1 ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

Οι ζυμομύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί και παραλαμβάνουν τον άνθρακα από τα σάκχαρα και κυρίως από τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιήσουν και τη σακχαρόζη γιατί περιέχουν το ένζυμο ιμπερτάση που μετατρέπει τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Μερικοί υδατάνθρακες όπως οι πεντόζες δε μπορούν να αφομοιωθούν από τους ζυμομύκητες με συνέπεια σε αρκετές ζυμώσεις να υπάρχει ένα υπόλειμμα αζύμωτων σακχάρων της τάξης του 1-2 g/L.

Εκτιμάται ότι περίπου 85% των σακχάρων που αφομοιώνονται από τον *S. cerevisiae* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας, ενώ περίπου το 15% για βιοσυνθετικές αντιδράσεις. Η πρόσληψη και ο μεταβολισμός ποικίλων υποστρωμάτων σε ένα μίγμα συμβαίνει με μια σειρά που καθορίζεται από ρυθμιστικούς μηχανισμούς στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα η γλυκόζη είναι το υπόστρωμα που προτιμάται. Εάν είναι παρούσα, οι περμεάσες για τα άλλα υποστρώματα όπως η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη δεν επάγονται αν δεν εξαφανιστεί η γλυκόζη. Τα υποστρώματα αυτά φαίνεται ότι ζυμώνονται διαδοχικά. Οι δι- και τρισακχαρίτες αφού μεταφερθούν στο εσωτερικό του κυττάρου υδρολύονται από μια α-γλυκοσιδάση. Οι ζυμώσεις πρέπει να διεξάγονται έτσι ώστε να επιτρέπουν την επαγωγή των ενζυμικών συστημάτων και την πλήρη χρησιμοποίηση των ποικίλων υποστρωμάτων.

Πίνακας 4. Διαθέσιμες πηγές άνθρακα που μπορούν να ζυμώσουν οι ζυμομύκητες

Πηγή άνθρακα	Τυπικά παραδείγματα	Παρατηρήσεις
Εξόζες	D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη, D-φρουκτόζη, D-μαννόζη	<ul style="list-style-type: none"> ☹ Η γλυκόζη μεταβολίζεται από όλες τις ζύμες. ☹ Αν μια ζύμη δεν ζυμώνει τη γλυκόζη δεν θα ζυμώνει κανένα άλλο σάκχαρο. ☹ Αν μια ζύμη ζυμώνει τη γλυκόζη, επίσης θα μεταβολίζει τη φρουκτόζη και τη μαννόζη όχι όμως απαραίτητα τη γαλακτόζη.

Πεντόζες	L-αραβινόζη, D-ξυλόζη, D-ξυλουλόζη	⌚ Ο σακχαρομύκητας μπορεί να χρησιμοποιεί τη ξυλουλόζη όχι όμως τη ξυλόζη.
Δισακχαρίτες	μαλτόζη, σακχαρόζη, λακτόζη, τρεχαλόζη	⌚ Αν μια ζύμη χρησιμοποιεί τη μαλτόζη δε σημαίνει ότι το ίδιο συμβαίνει και για τη λακτόζη. ⌚ Μεγάλος αριθμός ζυμών μεταβολίζει δισακχαρίτες.
Τρισακχαρίτες	Ραφινόζη, Μαλτοτριόζη	⌚ Η ραφινόζη χρησιμοποιείται μερικώς από τον σακχαρομύκητα.
Ολιγοσακχαρίτες	Μαλτοτετραόζη, Μαλτοδεξτρίνες	⌚ Μεταβολίζονται από τις αμυλολυτικές ζύμες.
Πολυσακχαρίτες	άμυλο, ινσουλίνη	⌚ Ζύμες που ζυμώνουν πολυσακχαρίτες είναι σπάνιες.
Οργανικά οξέα	Οξικό, κιτρικό, γαλακτικό	⌚ Λίγες ζύμες μπορούν να ζυμώσουν οργανικά οξέα.
Λιπαρά οξέα	ολεϊκό, παλμιτικό	⌚ Μερικά είδη μπορούν να αφομοιώσουν τα λιπαρά οξέα.

4.5.2 ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

Για να πολλαπλασιαστούν οι ζύμες καταναλώνουν μεγάλη ποσότητα αζωτούχων συστατικών. Από τα συστατικά αυτά το αμμωνιακό άζωτο είναι αυτό που αφομοιώνεται πιο εύκολα με αποτέλεσμα να εξαντλείται πρώτο. Όταν το αμμωνιακό άζωτο τελειώσει οι ζύμες προμηθεύονται άζωτο από τα αμινοξέα, τα πολυπεπίδια και ορισμένες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* δε μπορεί να υδρολύσει τα πολυπεπίδια και τις πρωτεΐνες και έτσι τα συστατικά αυτά δε βοηθούν στην ανάπτυξή του. Όσο αφορά τα αμινοξέα μπορεί να τα συνθέσει ο ίδιος και έτσι ούτε και αυτά τα συστατικά του είναι απαραίτητα. Παρόλα αυτά η προσθήκη των αμινοξέων διεγείρει περισσότερο από τα ιόντα αμμωνίου την αύξηση του *Saccharomyces cerevisiae*. Η αφομοίωση του αζώτου από τους ζυμομύκητες εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τη ζύμωση και την αυξημένη περιεκτικότητα του υποστρώματος σε σάκχαρα. Όσο περισσότερο άζωτο έχουν στη διάθεσή τους οι ζύμες τόσο πιο έντονη είναι η ζυμωτική τους ικανότητα.

4.5.3 ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Η ποσότητα των ανόργανων συστατικών που απαιτούν οι ζύμες είναι πολύ μικρή (κυρίως S, P, K και Mg).

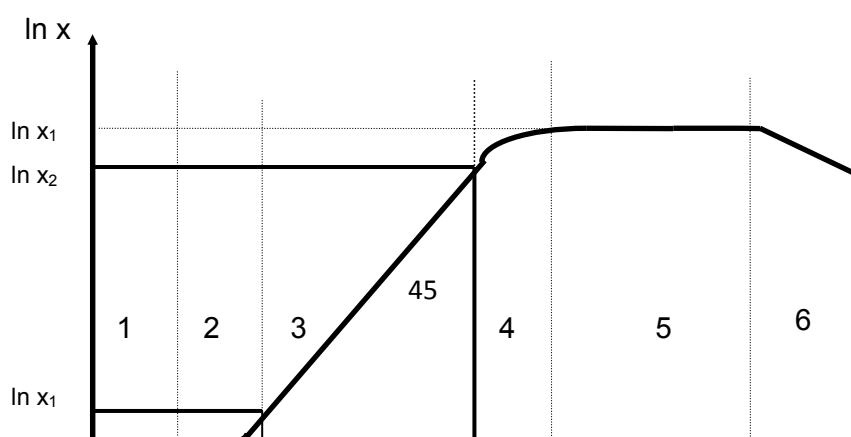
4.5.4 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Οι βιταμίνες και ειδικότερα αυτές της ομάδας B είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ζυμομυκήτων. Οι σπουδαιότερες από αυτές είναι :

- Η θειαμίνη. Η προσθήκη της θειαμίνης αυξάνει τον πληθυσμό των ζυμών και δραστηριοποιεί τη ζύμωση. Η κυριότερη δράση της όμως είναι ότι παρεμποδίζει τη συσσώρευση των κετονοξέων, τα οποία δεσμεύουν σημαντικές ποσότητες SO_2 .
 - Η βιοτίνη, η οποία συμμετέχει στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.
 - Το παντοθενικό οξύ. Το παντοθενικό οξύ αποτελεί τη βάση για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων και των λιπιδίων. Η έλλειψή του από το θρεπτικό υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό αυξημένων ποσοτήτων οξικού οξέος από τους ζυμομύκητες.
 - Η πυριδιξίνη, συνένζυμο των τρανσαμινασών συμμετέχει στη βιοσύνθεση των αμινοξέων.
- Όλα τα παραπάνω θρεπτικά συστατικά οι ζύμες μπορούν να τα βρουν από το γλεύκος των σταφυλιών, ενώ σε περιπτώσεις όπου προς το τέλος της ζύμωσης κάποια από αυτά εξαντληθούν, τότε επιβάλλεται η προσθήκη τους[100].

ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ

Ο κύκλος ζωής των ζυμομυκήτων αποτελείται από διάφορες φάσεις. Οι φάσεις αυτές αναλυτικά είναι:



Σχήμα 4: Φάσεις Ανάπτυξης Ζυμομυκήτων

1. ΦΑΣΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ – ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ:

Κατά τη φάση αυτή οι μικροοργανισμοί προσαρμόζονται στο νέο μέσο καλλιέργειας. Η διάρκεια της φάσης αυτής ποικίλλει ανάλογα με τις νέες συνθήκες καθώς και από τον όγκο του εμβολίου. Όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος αυτός, τόσο πιο σύντομη είναι η πρώτη φάση. Αντιστοιχεί στη σύνθεση των απαραίτητων ενζύμων, ώστε να γίνει δυνατή η αποικοδόμηση του νέου υποστρώματος. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, δεν γίνονται κυτταρικοί διπλασιασμοί.

2. ΦΑΣΗ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ:

Ακολουθεί τη φάση προσαρμογής. Κατά τη φάση αυτή παρατηρείται η εκκίνηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

3. ΕΚΘΕΤΙΚΗ ΦΑΣΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ:

Ο ρυθμός της αύξησης σε αυτή τη φάση είναι μέγιστος και τα περισσότερα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση. Στις ζυμώσεις μιας παρτίδας η διάρκεια της εκθετικής φάσης είναι σχετικά μικρή λόγω εξάντλησης των θρεπτικών στοιχείων, υπερβολικής συσσώματωσης κυττάρων ή συσσώρευσης ανασταλτικών μεταβολιτών.

3. ΦΑΣΗ ΕΠΙΒΡΑΔΥΝΣΗΣ:

Μετά την εκθετική φάση ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων επιβραδύνεται, πριν αυτά περάσουν στην επόμενη φάση.

4. ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ:

Στη φάση αυτή, η μάζα της ζύμης παραμένει σχετικά σταθερή και μάλιστα μετά από μεγάλη περίοδο στη στατική φάση τα κύτταρα μπορεί να νεκρωθούν και να αυτολυθούν. Αυτό μπορεί να επηρεάσει την αύξηση και επιβίωση των λοιπών ζωντανών κυττάρων.

5. ΦΑΣΗ ΘΑΝΑΤΟΥ:

Τα ενεργειακά αποθέματα των κυττάρων εξαντλούνται. Η φάση θανάτου είναι εκθετική με αντίθετη κλίση προς την λογαριθμική αύξηση.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι φάσεις 5 και 6, έχουν μεγάλη σημασία για τη βιοτεχνολογία, στο βαθμό που κατά τη διάρκεια των φάσεων αυτών παράγονται διάφορα προϊόντα που χαρακτηρίζονται σαν δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως είναι τα αντιβιοτικά, οι αυξητικοί παράγοντες, αρωματικές ενώσεις κλπ.[112].

4.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Στο φυσικό τους περιβάλλον, οι ζύμες εκτίθενται συνεχώς σε μια μυριάδα μεταβολών στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να συμβούν ξαφνικά ή μπορεί να λαμβάνουν χώρα πάνω από μια παρατεταμένη χρονική περίοδο και μπορούν να

αποτελούν μια ενιαία αλλαγή ή ένα συνδυασμό αλλαγών. Είναι σαφές ότι οι ακραίες μεταβολές, π.χ. στις φυσικές και χημικές συνθήκες, θα αντιπροσωπεύουν πάντα το στρες στα κύτταρα και θα απαιτούν ειδικούς μηχανισμούς αντιμετώπισης με σκοπό την προστασία και την προσαρμογή των κυττάρων στη νέα κατάσταση. Το ίδιο ισχύει και για την πείνα και κάθε δραματική αλλαγή στην παροχή θρεπτικών ουσιών. Τέτοιες προϋποθέσεις αναφέρονται γενικά ως συνθήκες στρες και μηχανισμούς προσαρμογής που προκαλούν αντιδράσεις, όπως το άγχος. Από την άλλη, στην περίπτωση της μέτριας αλλαγής στις συνθήκες ανάπτυξης, το ποσοστό του στρες που βιώνουν τα κύτταρα δεν είναι πάντα σαφές. Η διαφορά μεταξύ της απόκρισης σε στρες και την προσαρμογή σε μια νέα κατάσταση της ανάπτυξης δεν είναι σαφής και πιθανότατα, στην πραγματικότητα, να αντιπροσωπεύει μια σταδιακή μετάβαση. Τα κύτταρα ζύμης πρέπει να είναι πάντα σε επιφυλακή για την προστασία τους προκειμένου να συνεχίσουν να επιβιώνουν, να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Για να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν κάτω από διάφορες συνθήκες, οι μικροοργανισμοί, έχουν αναπτύξει ένα περίπλοκο σύνολο ανίχνευσης και σηματοδότησης μηχανισμών που τους επιτρέπουν να προσαρμοστούν γρήγορα στις νέες συνθήκες.

4.6.1 ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΟΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Στρεσογόνοι παράγοντες ονομάζονται εκείνοι που με την παρουσία τους επιδρούν αρνητικά στην λειτουργικότητα των κυττάρων των ζυμών και συνεπώς στις αποδόσεις των ζυμώσεων. Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται σε:

Φυσικούς παράγοντες: Σε αυτούς περιλαμβάνονται η υψηλή θερμοκρασία, η υψηλή ωσμωτική πίεση, η έλλειψη νερού, οι υψηλές υδροστατικές και ατμοσφαιρικές πιέσεις και οι διάφορες ακτινοβολίες.

Χημικούς παράγοντες: Τέτοιοι είναι η αιθανόλη και άλλοι τοξικοί μεταβολίτες, τα περιορισμένα θρεπτικά συστατικά, το οξειδωτικό στρες και το pH.

Βιολογικούς παράγοντες: Φαινόμενα όπως η γήρανση των κυττάρων, οι γενοτυπικές αλλαγές, ο ανταγωνισμός από άλλους οργανισμούς κ.α. επηρεάζουν επίσης αρνητικά των μεταβολισμό των κυττάρων.

Από τους παραπάνω στρεσογόνους παράγοντες αυτοί που έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και ενδιαφέρουν την βιομηχανία παραγωγής αιθανόλης είναι η αιθανόλη, η θερμοκρασία, το οξυγόνο, η συγκέντρωση σακχάρων, το pH, τα προϊόντα μεταβολισμού και η ωσμωτική πίεση[112].

4.6.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Οι ζυμομύκητες ανάλογα με τις ποσότητες οξυγόνου που έχουν στη διάθεσή τους αναπτύσσουν δυο διαφορετικές πορείες του μεταβολισμού τους, την αναπνοή η οποία ευνοείται σε αερόβιο περιβάλλον και την αλκοολική ζύμωση που ευνοείται σε αναερόβιο. Οι δυο αυτές πορείες του μεταβολισμού έχουν σαν αποτέλεσμα, την απελευθέρωση ενέργειας. Η ενέργεια αυτή χρησιμοποιείται από το κύτταρο του ζυμομύκητα για να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες και γι' αυτό ο αερόβιος τρόπος ζωής είναι αυτός που εξασφαλίζει τις καλύτερες συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ζύμης. Αντίθετα το ποσό της ενέργειας που εκλύεται κατά τη ζύμωση είναι σημαντικά μικρότερο. Οι ζυμομύκητες είναι υποχρεωμένοι να διασπάσουν μεγάλες ποσότητες σακχάρων για να εξασφαλίσουν λίγη ενέργεια και επιπλέον η αιθανόλη που σχηματίζεται κατά τη ζύμωση δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξή τους. Έτσι ο πολλαπλασιασμός των ζυμομυκήτων σε

αυτήν την περίπτωση είναι περιορισμένος. Όταν ο ζυμομύκητας έχει τη δυνατότητα να αποικοδομήσει τα σάκχαρα και με τους δυο τρόπους, τότε η παρουσία του οξυγόνου ευνοεί την αναπνοή και το σχηματισμό βιομάζας και μειώνει την παραγωγή της αιθανόλης. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως «επίδραση Pasteur»[100].

4.6.1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Η αιθανόλη όπως και άλλες αλκοόλες όταν συγκεντρώνονται στο θρεπτικό υλικό δρουν ως χημικοί στρεσογόνοι παράγοντες για τους μικροοργανισμούς. Η αιθανόλη μπορεί να είναι τοξική για τα κύτταρα των ζυμών σε συγκεντρώσεις 8-18 % κ.β. γεγονός που εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και τη μεταβολική κατάσταση της καλλιέργειας. Μάλιστα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αιθανόλης, τόσο πιο έντονες γίνονται οι αρνητικές επιδράσεις της. Σε συγκέντρωση αιθανόλης 2% αρχίζει η καταστολή της πρόσληψης γλυκόζης και καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση καταστέλλεται και η μετακίνηση αμμωνιακών ιόντων και μερικών αμινοξέων. Η ζύμωση αναστέλλεται συνήθως πλήρως σε συγκεντρώσεις αιθανόλης περίπου 11% κ.ο. Οι ανασταλτικές επιδράσεις της αιθανόλης ενισχύονται από υψηλές θερμοκρασίες και από την έλλειψη θρεπτικών ουσιών (ιδιαίτερα ιόντων Mg⁺) και άλλων μεταβολικών παραπροϊόντων όπως άλλες αλκοόλες, εστέρες, λιπαρά οξέα, αλδεΐδες, οργανικά οξέα, καρβονυλικές και φαινολικές ενώσεις. Οι ανώτερες αλκοόλες είναι πιο ανασταλτικές από την αιθανόλη όμως η τοξικότητά τους περιορίζεται από τις χαμηλές τους συγκεντρώσεις.

Μια από τις κύριες τοξικές επιδράσεις της αιθανόλης είναι η κατάρρευση της ημίρρευστης κατάστασης της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς η αιθανόλη εισχωρεί στην μεμβράνη και διασπά τους δεσμούς λιπιδίου-πρωτεΐνης και λιπιδίου-λιπιδίου. Το αποτέλεσμα είναι η κυτταρική μεμβράνη να γίνεται ολοένα και πιο διαπερατή. Η ιοντική διαβάθμιση που αποτελεί την πρωτονιακή κινητήρια δύναμη διαμέσου της μεμβράνης, καταρρέει σιγά σιγά και μικρά μόρια διαρρέουν από το κύτταρο στο περιβάλλον με κατάληξη τον θάνατο του κυττάρου. Έχει βρεθεί πως η ανθεκτικότητα των διαφόρων στελεχών στην αιθανόλη σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη. Η κυτταρική μεμβράνη είναι από τους πρώτους και σημαντικότερους στόχους της αιθανόλης στον *S. Cerevisiae*.

4.6.1.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις να την σταματήσουν. Υπάρχει μια βέλτιστη περιοχή θερμοκρασιών που μπορούν να αναπτυχθούν οι ζύμες, έξω από τα όρια της οποίας μπορεί να προκληθεί κυτταρικός θάνατος. Οι ζύμες μπορούν να ομαδοποιηθούν, σύμφωνα με τις θερμοκρασίες στις οποίες αναπτύσσονται, σε ψυχρόφιλες, μεσόφιλες και θερμόφιλες[112].

Η θερμοκρασία στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί η αλκοολική ζύμωση είναι μεταξύ 10 - 35° C, ενώ η ζύμωση με ακινητοποιημένους ζυμομύκητες μπορεί να πραγματοποιηθεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες μέχρι και στους 0° C. Όσο πιο υψηλή είναι η θερμοκρασία ζύμωσης τόσο πιο γρήγορα εξελίσσεται η ζύμωση, αλλά και τόσο πιο γρήγορα εξαντλείται η ζύμη με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος να μην αντέξει να ολοκληρώσει τη ζύμωση των σακχάρων, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει και ο φόβος της δράσης

των οξικών βακτηρίων. Αλλά και σε αρκετά χαμηλές θερμοκρασίες η ζύμωση επιβραδύνεται σημαντικά και πάλι υπάρχει φόβος να μην ολοκληρωθεί η ζύμωση. Η πραγματοποίηση της ζύμωσης στη σωστή θερμοκρασία συμβάλλει στο σχηματισμό διαφόρων αρωματικών συστατικών, όπως οι ανώτερες αλκοόλες και οι ανώτεροι εστέρες, ενώσεις που συμμετέχουν σημαντικά στη διαμόρφωση της καλής ποιότητας του οίνου[100].

4.6.1.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΙΕΣΗΣ

Οι συνήθεις πιέσεις που δημιουργούνται από την έκλυση του CO₂ κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (2 - 4 atm) δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα τη δράση των ζυμομυκήτων. Σε ειδικές περιπτώσεις όπως στην παραγωγή αφρωδών οίνων, όπου η πίεση μπορεί να δράσει αρνητικά στην ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, χρησιμοποιούνται ειδικοί ζυμομύκητες που είναι ανθεκτικοί στις πιέσεις αυτές. Σε υψηλότερες πιέσεις της τάξης των 7 μέχρι 10 atm οι ζύμες δεν μπορούν να αναπτυχθούν και αυτές οι συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο παρεμπόδισης της ζύμωσης[100].

4.6.1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό υπόστρωμα είναι υψηλή, όπως συμβαίνει στο γλεύκος των σταφυλιών, τότε οι ζυμομύκητες όπως ο *Saccharomyces cerevisiae* αποικοδομούν τα σάκχαρα μόνο με τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης. Ακόμα και παρουσία οξυγόνου (αερόβιες συνθήκες) η ζύμωση υπερισχύει της αναπνοής. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται καταβολική καταστολή της γλυκόζης ή «φαινόμενο Crabtree». Το φαινόμενο αυτή εκδηλώνεται στο *Saccharomyces cerevisiae* όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι μεγαλύτερη από 9 g/L. Το φαινόμενο αυτό προκαλείται από τον εκφυλισμό των μιτοχονδρίων, μείωση του συνόλου των στερολών και των λιπαρών οξέων του κυττάρου και καταστολή της σύνθεσης των μιτοχονδριακών ενζύμων του κύκλου του κιτρικού οξέος και των συστατικών της αναπνευστικής αλυσίδας.

Όταν η συγκέντρωση των σακχάρων στο θρεπτικό υπόστρωμα είναι μεγαλύτερη από 250 g/L τότε η δράση των ζυμομυκήτων αρχίζει να παρεμποδίζεται. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 600 g/L η αλκοολική ζύμωση σταματά. Το γεγονός της παρεμποδιστικής αυτής δράσης των πυκνών θρεπτικών υποστρωμάτων, οφείλεται στο φαινόμενο της ωσμωτικής πίεσης. Το νερό αποβάλλεται από τα κύτταρα προς το πυκνό υπόστρωμα, με αποτέλεσμα την πλασμόλυση των κυττάρων. Παρόλα αυτά υπάρχουν ορισμένα είδη ζυμομυκήτων που αντέχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις σακχάρων και έτσι πολλές φορές παρατηρούνται επιφανειακές ζυμώσεις σε συμπυκνωμένα υποστρώματα.

Επίσης και το είδος των σακχάρων επηρεάζει το ρυθμό της αλκοολικής ζύμωσης, οι περισσότερες ζύμες ζυμώνουν τη γλυκόζη πιο γρήγορα από τη φρουκτόζη, αν και σε μερικές περιπτώσεις συμβαίνει το αντίθετο[100].

4.6.1.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥΣ

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης σχηματίζονται διάφορες ουσίες που μπορούν να έχουν παρεμποδιστική δράση στη δράση των ζυμομυκήτων. Τέτοιες ουσίες είναι τα λιπαρά οξέα με έξι άτομα άνθρακα (εξανοϊκό οξύ), με οκτώ άτομα άνθρακα (οκτανοϊκό οξύ) και με δέκα άτομα άνθρακα (δεκανοϊκό οξύ). Τα συγκεκριμένα οξέα σχηματίζονται σε πολύ

μικρές ποσότητες (μερικά mg/L) και επιδρούν στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να εμποδίζουν τις ανταλλαγές του κυττάρου με το εξωτερικό περιβάλλον του. Σε μια τέτοια περίπτωση τα ενζυμικά συστήματα του μύκητα λειτουργούν, αλλά τα σάκχαρα δεν μπορούν να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου για να μεταβολισθούν. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση κυτταρικών τοιχωμάτων ζυμομυκήτων, τα οποία δρουν προσροφώντας τα παραπάνω λιπαρά οξέα και αποκαθιστώντας με αυτόν τον τρόπο τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης[100].

4.6.1.7 pH

Το pH κανονικά έχει μικρή επίπτωση στην πορεία της ζύμωσης ή στη σύνθεση και την απελευθέρωση των αρωματικών ενώσεων κατά την οινοποίηση. Παρόλα αυτά, το χαμηλό pH μπορεί να βοηθήσει στην πρόσληψη κάποιων αμινοξέων. Οι πιο σημαντικές επιδράσεις του pH στη ζύμωση είναι έμμεσες όπως η αντιμικροβιολογική δράση του διοξειδίου του θείου. Επίσης, το pH επηρεάζει την παραγωγή κάποιων υποπροϊόντων της ζύμωσης όπως η υδρόλυση των αιθυλικών και οξικών εστέρων. Έχει βρεθεί ότι στη ζύμωση το χαμηλό pH εκτιμάται και βοηθά στην παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

4.7 ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ

Οι ζύμες ζουν σε ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον, όπου η ενδοκυτταρική δράση του νερού μπορεί να παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια ζωής του κυττάρου λόγω αλλαγών στην εξωκυτταρική ενεργότητα του νερού. Όταν τα κύτταρα του ζυμομύκητα εκτίθενται σε συνθήκες υψηλής ωσμωτικότητας, η άμεση επίδραση είναι η απώλεια του νερού με ώσμωση του κυτοσολίου. Η διαδικασία αυτή οδηγείται από την διαφορά ωσμωτικής πίεσης κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης, που τελικά οδηγεί σε μεταβολές του όγκου και του σχήματος των κυττάρων, απώλεια της πίεσης σπαργής και της κυτταρικής πολικότητας, συμπίεση του κυτταροπλάσματος και αλλαγές στον μεταβολισμό. Για τους λόγους αυτούς, η διατήρηση ενός σταθερού εσωτερικού περιβάλλοντος κάτω από συνθήκες ανάπτυξης υψηλής ωσμωτικότητας είναι σημαντική για την λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων.

Οι ζύμες έχουν εξελιχθεί σε εξειδικευμένα βιοχημικά μονοπάτια για να προσαρμοστούν στα στρεσογόνα και συχνά μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα. Μέσα στο κύτταρο, υπάρχουν εξειδικευμένα συστήματα ανίχνευσης και σηματοδότησης πρωτεϊνών σχηματίζουν μονάδες που λειτουργούν για την παρακολούθηση των περιβαλλοντικών συνθηκών του κυττάρου, και τη μεσολάβηση σε κατάλληλες αντιδράσεις στρες[42].

4.8 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ – ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ

Όλοι οι οργανισμοί έχουν την ικανότητα να προσαρμόζουν τη λειτουργία τους, προς απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς αναγνώρισης των διεγέρσεων και κατάλληλης προσαρμογής, ώστε να διασφαλίζεται η σωστή λειτουργία και επιβίωσή τους. Ιδιαίτερα στους πολυκύτταρους οργανισμούς είναι απαραίτητη η εξασφάλιση της αποτελεσματικής επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων και ο συντονισμός των αποκρίσεών τους. Έτσι, όλα τα κύτταρα διαθέτουν σηματοδοτικά συστήματα για την αναγνώριση και την επεξεργασία της πληροφορίας που προέρχεται από

το περιβάλλον τους. Η σηματοδότηση περιλαμβάνει, γενικά, την αναγνώριση, μέσω κατάλληλου υποδοχέα, ενός φυσικού ή χημικού μηνύματος που φτάνει σε ένα κύτταρο, την ενδοκυτταρική μεταγωγή του και τελικά την απόκριση του κυττάρου και τον τερματισμό της σηματοδότησης.

Τα κύρια συστατικά της ενδοκυτταρικής μεταγωγής του μηνύματος είναι οι πρωτεΐνες, όπως πρωτεϊνικές κινάσες, πρωτεϊνικές φωσφατάσες, ρυθμιστικές πρωτεΐνες που διασπών GTP και πρωτεΐνες που φέρουν θέσεις για πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών, ή αλλιώς πρωτεΐνες «σκαλωσιάς». Ένας κύριος μηχανισμός για τη μετάδοση του σήματος σε ένα κύτταρο είναι η ενεργοποίηση και απενεργοποίηση πρωτεϊνών μέσω αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης ρυθμίζονται από τη δράση: α) των πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες μεταφέρουν μια φωσφορική ομάδα από το ATP σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης, και β) των πρωτεϊνικών φωσφατασών, οι οποίες απομακρύνουν υδρολυτικά φωσφορικές ομάδες από συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η φωσφορυλίωση μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία και δράση μιας πρωτεΐνης μέσω της επαγωγής αλλοστερικής τροποποίησης, της άμεσης εμπλοκής της φωσφορικής ομάδας στην πρόσδεσή της με άλλες πρωτεΐνες και της δημιουργίας θέσεων πρόσδεσης με πρωτεΐνες που φέρουν κατάλληλες δομές αλληλεπίδρασης με φωσφορυλιωμένα αμινοξικά κατάλοιπα (όπως με πρωτεΐνες που περιέχουν ομόλογες περιοχές Sre 2 και περιοχές πρόσδεσης σε φωσφο-τυροσίνη, PTB, που μπορούν να προσδένονται σε φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης). Για τη μεταβολή της λειτουργίας των πρωτεϊνών, τα κύτταρα χρησιμοποιούν επίσης και άλλους μηχανισμούς, όπως την πρωτεολυτική διάσπαση, την ακετυλίωση και την υδροξυλίωση.

Μέσω της διαδοχικής ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης μορίων, σχηματίζεται ένα μονοπάτι μεταφοράς της πληροφορίας που οδηγεί, τελικά, στην τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης καθώς και σε μεταβολές στη λειτουργία δομικών κυτταρικών συστατικών. Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα μόρια που συμμετέχουν στη μεταγωγή του μηνύματος ρυθμίζονται με πολύπλοκο τρόπο και τα μονοπάτια που μεταφέρουν την πληροφορία αλληλεπιδρούν σε πολλά επίπεδα, ώστε να επιτυγχάνεται η απαραίτητη εξειδίκευση και ολοκλήρωση της σηματοδότησης. Έτσι, η αρχική αντίληψη για γραμμικά βιοχημικά μονοπάτια δίνει τη θέση της στη θεώρηση πολύπλοκων δικτύων επικοινωνίας, τα οποία επηρεάζουν σχεδόν κάθε φυσιολογική διαδικασία.

Μηχανισμοί σηματοδότησης

Η μεταγωγή του μηνύματος ξεκινά από κάποιο μόριο - υποδοχέα, που μπορεί να ανιχνεύσει ένα συγκεκριμένο ερέθισμα. Οι υποδοχείς που δέχονται χημικά μηνύματα αποτελούν συνήθως πρωτεΐνες που βρίσκονται είτε στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου είτε στο εσωτερικό του. Ανάλογα με το μηχανισμό της μεταφοράς της πληροφορίας, οι υποδοχείς διακρίνονται σε: α) υποδοχείς συζευγμένους με ένζυμο, δηλαδή υποδοχείς που είτε διαθέτουν οι ίδιοι κάποια ενζυμική δραστικότητα (όπως οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, RTKs), είτε σχετίζονται άμεσα με κάποιο ένζυμο, β) υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες (GPCRs), των οποίων η ενεργοποίηση στη μεμβράνη του κυττάρου προκαλεί την ενεργοποίηση ετεροτριμερών G πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, γ) υποδοχείς συζευγμένους με κανάλια ιόντων, των οποίων η ενεργοποίηση προκαλεί το άνοιγμα ή το κλείσιμο καναλιών ιόντων στη μεμβράνη και δ) υποδοχείς που αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι βρίσκονται είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα των κυττάρων και η ενεργοποίησή τους προκαλεί αύξηση της μεταγραφικής τους ενεργότητας και επαγωγή των γονιδίων-στόχων τους.

Σε πολλές περιπτώσεις μεταβολής μιας φυσικής ιδιότητας του κυτταρικού περιβάλλοντος, όπως της θερμοκρασίας ή της ωσμωμοριακότητας, δεν είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα αντιλαμβάνονται το ερέθισμα, αφού δεν υπάρχει κάποιος υποδοχέας γι' αυτό, τουλάχιστον με την κλασική σημασία του όρου. Είναι πιθανό, το ρόλο του υποδοχέα να παίζουν μόρια των οποίων η στερεοδομή και, κατ' επέκταση, η λειτουργία μεταβάλλεται κατά την έκθεση των κυττάρων στις παραπάνω συνθήκες. Έτσι, ορισμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως είναι τα κανάλια ιόντων της οικογένειας παροδικών υποδοχέων δυναμικών (TRP), μπορεί να παίζουν ρόλο στην ανίχνευση μηχανικών πιέσεων και μεταβολών της ωσμωμοριακότητας.

Την αναγνώριση του μηνύματος ακολουθεί η ενδοκυτταρική μεταγωγή του. Ακόμη και στις περιπτώσεις που ο υποδοχέας του ερεθίσματος δεν είναι γνωστός, αρκετά δεδομένα υπάρχουν για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από κάποια διέγερση. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών μπορεί να εξαρτάται από ποικίλα σηματοδοτικά μόρια και ιόντα (όπως υποδοχείς, πρωτεϊνικές κινάσες, δομικά κυτταρικά συστατικά και ιόντα ασβεστίου) ανάλογα με το συγκεκριμένο ερέθισμα και τον κυτταρικό τύπο.

Στα κύρια μονοπάτια μεταγωγής του μηνύματος περιλαμβάνονται:

- *Τα μονοπάτια των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs).* Η οικογένεια των MAPKs των θηλαστικών αποτελείται από 4 διακριτές ομάδες, τις ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα κινάσες 1 και 2 (ERK1/2), τις κινάσες του αμινοτελικού άκρου του c-Jun (JNKs), τις ισομορφές της p38-MAPK και τη ρυθμιζόμενη από εξωκυτταρικά σήματα κινάση 5 (ERK5). Η ενεργοποίησή τους περιλαμβάνει μοριακούς καταρράκτες κινασών, όπου κάθε μόριο ενεργοποιεί το επόμενο μέσω φωσφορυλίωσης. Οι ενεργοποιημένες MAPKs κινάσες φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματα στόχους τους στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα, ρυθμίζοντας πολλές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, το μεταβολισμό και τον κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, εμπλέκονται στις κυτταρικές αποκρίσεις σε ποικίλους στρεσογόνους παράγοντες και η δράση τους έχει συσχετιστεί τόσο με την προστασία των κυττάρων, όσο και με την επαγωγή κυτταρικού θανάτου.
- *Τα μονοπάτια των κινασών που εξαρτώνται από κυκλικά νουκλεοτίδια.* Το κυκλικό AMP (cAMP) και το κυκλικό GMP (cGMP) αποτελούν σημαντικούς ενδοκυτταρικούς μηνύτορες. Τα επίπεδά τους στο κύτταρο εξαρτώνται από τη δράση της αδενυλικής και γουανυλικής κυκλάσης (σύνθεση του cAMP και του cGMP, αντίστοιχα) και των φωσφοδιεστερασών (υδρόλυση των cAMP και cGMP). Τα κυκλικά αυτά νουκλεοτίδια προκαλούν, μεταξύ άλλων, την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και της εξαρτώμενης από το cGMP κινάσης (PKG) αντίστοιχα, οι οποίες παίζουν ρόλο στη ρύθμιση ποικίλων φυσιολογικών λειτουργιών του κυττάρου. Συμμετοχή της PKA στην απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες έχει αναφερθεί κατά το οξειδωτικό και ωσμωτικό στρες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους[104].

4.9 ΩΣΜΟΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ – ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Η επίδραση του ΩΣΜΟΤΙΚΟΥ στρες στα κύτταρα έχει μελετηθεί ευρέως. Κατά την τελευταία δεκαετία, η εφαρμογή του υπερΩΣΜΟΤΙΚΟΥ στρες στους μικροοργανισμούς έχει χρησιμοποιηθεί για να μελετηθούν δευτερεύουσες μεταβολικές διαδικασίες και άλλες κυτταρικές μεταβολές που προκαλούνται κάτω από τέτοιες συνθήκες.

Τα κύτταρα των ζυμών χρησιμεύουν ως οργανισμοί για την έρευνα των μηχανισμών που υπόκεινται κατά το ωσμωτικό στρες γενικά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ζυμομύκητες

διαθέτουν παρόμοια συστήματα μεταφοράς ιόντων με τους ανώτερους φυτικούς οργανισμούς και μυκητες, και έχουν παρόμοιους αποτοξινωτικούς μηχανισμούς και γονιδιακούς σχηματισμούς. Στο κύτταρο του ζυμομύκητα, το ωσμωτικό στρες προκαλεί μια σειρά από βιολογικές αντιδράσεις κατά την προσπάθειά του να διατηρήσει τη βιωσιμότητά του και το βιολογικό του κύκλο.

Οι αντιδράσεις των ζυμών στα στρες μπορούν να διαχωριστούν σε διάφορα στάδια όπως:

1. Άμεσες κυτταρικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα ως άμεση συνέπεια των φυσικο-χημικών δυνάμεων που λειτουργούν κάτω από αυτές τις συνθήκες
2. Πρόωρα καθορισμένες εξελίξεις
3. Μεταβολές στην ομοιόσταση του κυττάρου ως επακόλουθο του νέου ΩΣΜΩΤΙΚΟΥ περιβάλλοντος

Όταν τα κύτταρα του ζυμομύκητα εκθέτονται σε ωσμωτικό στρες, μια σειρά από φυσιολογικές μεταβολές λαμβάνουν χώρα. Αυτές περιλαμβάνουν: εκροή ενδοκυττάρου H_2O , γρήγορη μείωση του συνολικού όγκου του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένου του χυμοτοπίου, προσωρινή αύξηση των γλυκολυτικών διαμέσων, συσσώρευση της γλυκερίνης στο κυτταρόπλασμα [22], και ενεργοποίηση της HOG (High Osmotic Glycerol) μεταβολικής οδού [2]. Μικροοργανισμοί σαν τον *S. cerevisiae* αναπτύσσουν μηχανισμούς για να εξουδετερώνουν τις επιβλαβείς συνέπειες του Ωσμωτικού στρες. Είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι η ποσοτική επίδραση στη σύνθεση ή τον όγκο του κυττάρου κατά την ανάπτυξη σε ένα μέσο, με ωσμωτική αφυδάτωση (προκαλείται από συνθήκες στρες όπως του χλωριούχου νατρίου) διαφέρει μεταξύ των διάφορων ειδών των ζυμών [41]. Στα κύτταρα του *S. cerevisiae*, η γλυκερίνη παράγεται ως μια συμβιβάσιμη λύση μέσω των μεταβολικών διαδικασιών.

Μια άλλη ένωση που παράγεται κάτω από συνθήκες στρες είναι η τραχαλόζη η οποία, μαζί με το γλυκογόνο μπορεί να εκπροσωπήσει το 25% w/w της μάζας της ξηρής ζύμης ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Ο δισακχαρίτης τραχαλόζη συσσωρεύεται κατά την προσαρμογή στο στρες [20] και μάλιστα φαίνεται ότι προστατεύει τα κύτταρα από τις υψηλές θερμοκρασίες σταθεροποιώντας τις πρωτεΐνες, και από την ξήρανση με τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και ότι διαφυλάσσει την ακεραιότητα της μεμβράνης. Η έκθεση των κυττάρων του ζυμομύκητα σε υπερωσμωτικό περιβάλλον ή μέσο, οδηγεί σε μια ραγδαία αρχική κυτταρική εκροή νερού μέσα στο μέσο, το οποίο με άλλα λόγια, είναι η κυτταρική αφυδάτωση.

Η αφυδάτωση είναι μια ραγδαία διαδικασία και διαρκεί περίπου ένα λεπτό για τα περισσότερα κύτταρα. Η εκροή του νερού μεσολαβεί αποκλειστικά μέσω του λιπιδιακού στρώματος. Επίσης, το ενδοκυττάριο νερό αναπληρώνεται Ο κυτταροσκελετός της ζύμης επίσης καταρρέει. Αυτή η κυτταρική αφυδάτωση και απώλεια του κυτταρικού νερού οδηγεί σε μια διακοπή (αναστολή) της ανάπτυξης. Κάτω από τέτοιες συνθήκες, ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός είναι ο μόνος αμυντικός μηχανισμός. Ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός είναι συνώνυμο της κυτταρικής προσαρμογής. Κατά τον επαναπρογραμματισμό αυτόν, τα περισσότερα κύτταρα μαζεύουν συμβατές λύσεις για να εξισορροπήσουν την ενδοκυτταρική ωσμωτική πίεση με το εξωτερικό περιβάλλον. Τα συμβατά διαλυτά μπορεί να είναι: γλυκερίνη, τραχαλόζη, αμινοξέα και λιπαρά οξέα στην κυτταρική μεμβράνη[105].

4.9.1 ΖΥΜΕΣ – ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΑΛΑΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων άλατος προκαλεί όχι μόνο ωσμωτικό στρες αλλά επίσης ιονικό στρες. Τα συστήματα μεταφοράς της πλασματικής μεμβράνης όπως οι εξαιρετικά πλούσιες H + ATPάσες, μεταφορείς και νατρίου Na + / H + του *S. cerevisiae* είναι εμφανή κυτταρικά συστατικά που εμπλέκονται στον αποκλεισμό του NaCl από το κύτταρο, διατηρώντας έτσι υψηλή την ενδοκυτταρική αναλογία K + με Na + και ομοιόσταση ιόντων. Η έκφραση των *Ena1*, η κύρια πλασματική μεμβράνη - αντλία εκροής Na + σε κύτταρα ζύμης, ελέγχεται στο μεταγραφικό επίπεδο από ένα πολύπλοκο δίκτυο από οδούς, συμπεριλαμβανομένων της HOG, PKA και Ca²⁺ / καλσινευρίνης. Τα Na + διεγείρουν το στρες μέσω του μονοπατιού εισόδου Ca²⁺ / καλσινευρίνης του παράγοντα μεταγραφής σε *Crz1* πυρήνα, όπου επάγει την έκφραση *ENA1* μέσω της καλσινευρίνης-dependent response στοιχείου (CDRE) στον υποκινητή. Ο ρόλος του *Crz1* σε ανοχή NaCl υποστηρίζεται από την αποτυχία του μεταλλαγμένου *crz1Δ* να επάγει την έκφραση *ENA1* και από την υπερευαίσθησία τους σε NaCl στρες. Η συσσώρευση Na + στο κενοτόπιο είναι ένας μηχανισμός προστασίας που χρησιμοποιούνται δευτερόλεπτα για να διατηρήσει μια χαμηλή συγκέντρωση Na + στο κυτοσόλιο κατά NaCl στρες. Από την άλλη πλευρά, η σύγκριση των μεταγραφικών αποκρίσεων σε *S. cerevisiae* με ισοωσμωτικό σορβιτόλη και NaCl έχουν δείξει παρόμοια πρότυπα έκφρασης. Μόνο δέκα επιπλέον γονίδια επάγονται σημαντικά πιο έντονα από 0.7 M NaCl από μια ισοοσμωτική συγκέντρωση της σορβιτόλης[84].

4.9.2 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ – ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΣΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Η κυτταρική απόκριση στο στρες είναι εξελικτικά συντηρημένη σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, σημαντικός ρόλος που αποδίδεται στις προκαλούμενες πρωτεΐνες θερμικού σοκ και άλλων μορίων που προσδίδουν προστασία κατά του στρες. Οι μοριακές αποκρίσεις που προκαλούνται από τα κύτταρα υπαγορεύουν την προσαρμογή, την επιβίωση ή τον θάνατο του οργανισμού. Η ρύθμιση της απόκρισης στο στρες περιλαμβάνει μεταγραφικούς, μετα-μεταγραφικούς και μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς. Η μεταγραφική ρύθμιση διαμεσολαβεί από μια προ υπάρχουσα μεταγραφική ενεργοποίησή, π.χ. ο συντελεστής θερμικής καταπληξίας (HSF), συνδέεται με συστοιχίες ενός 5-bp στοιχείου θερμικού σοκ παρουσία όλων των γονιδίων θερμικού σοκ. Παρόλα αυτά, ένας μεγάλος αριθμός των ευρημάτων έχουν καταδείξει ότι η έκφραση του γονιδίου υπό συνθήκες στρες στο *S. cerevisiae* εκμαιεύει επίσης HSF-ανεξάρτητους μηχανισμούς, εκ των οποίων η απόκριση των *Msn2p* και *Msn4p* με τη μεσολάβηση γενικού στρες έχει μελετηθεί εκτενώς. Αυτά τα δύο περιττά δάκτυλα ψευδαργύρου, παράγοντες μεταγραφής ρυθμίζουν την πλειοψηφία των γονιδίων που εμπλέκονται σε μια πληθώρα αντιδράσεων στο στρες. Τα *Msn2p* και *Msn4p* συνδέονται με το στοιχείο απόκρισης στρες (StRE), μια ακολουθία 5-bp, C4T. Επιπλέον, οι δυο βασικές λευκίνες φερμουάρ (bZIP) μεταγραφικοί παράγοντες, *Yap1p* *Yap2p*, μαζί με έξι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες, σχηματίζουν μια οικογένεια trans-ρυθμιστών που έχουν ενοχοποιηθεί σε διάφορες μορφές αντίδρασης στο στρες.

Ταυτοποίηση των *Yap1p* και *Yap2p* μεταγραφικών παραγόντων

Yap1p, το πρώτο μέλος της οικογένειας των YAPS, αρχικά ταυτοποιήθηκε από την

ικανότητά της να δεσμεύει και να ενεργοποιεί το AP-1 στοιχείο αναγνώρισης SV-40. Με βάση την παραγωγική ικανότητα δέσμευσης του, αυτός ο παράγοντας καθορίστηκε ως πρωτεΐνη 90 kDa και το αντίστοιχο γονίδιο κλωνοποιήθηκε με διαλογή μιας βιβλιοθήκης kgt11 με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στη Yap1p. Στη συνέχεια, αυτό το γονίδιο βρέθηκε επίσης σε πολλαπλούς μετασχηματισμούς ανθεκτικούς στις χηλικές ενώσεις σιδήρου: 1,10-φαινανθρολίνη και 1-νιτρωδο-2-ναφθόλη, καθώς και μια ποικιλία ναρκωτικών συμπεριλαμβανομένων 4-νιτροκινολινο-N-οξείδιο, N-μεθυλ-NO-νιτρο- N-νιτροζογουανιδίνη, τριαζίνη και κυκλοεξιμίδιο. Εκτός από το YAP1, ένα δεύτερο γονίδιο, YAP2, προσδίδει αντίσταση σε 1,10-φαινανθρολίνη σε μετασχηματισμένα κύτταρα που υπερεκφράζουν μια πολλαπλή βιβλιοθήκη ζύμης, έχει επίσης περιγραφεί. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 45 kDa που δεσμεύει επίσης το ARE δρών στοιχείο. Ομολογίες αλληλουχίας το προσδιορίζουν όπως η CAD1, λόγω της απόκτησης αντίστασης στο κάδμιο στα κύτταρα υπερεκφράζοντας μια πολλαπλή γονιδιωματική βιβλιοθήκη. Αργότερα, δείχθηκε ότι αυτά τα κύτταρα αποκτούν αντίσταση στην κυκλοεξιμίδη. Η αλληλουχία των γονιδίων YAP1 και YAP2 αποκάλυψε την παρουσία μιας β-ταχυδρομικής οικογένειας τομέα στο N-άκρο ομόλογων προς την αληθινή

Μια εκτεταμένη οικογένεια γονιδίων YAP

Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές αναλύσεις έχουν προηγουμένως ορίσει το σύμπλοκο Gcn4p-DNA και τη βέλτιστη θέση AP-1. Εντός της βασικής περιοχής, πέντε υπολείμματα είναι υπεύθυνα για τη βάση ειδικής επαφής σε Gcn4p και Jun / Fos όντας καλά συντηρημένα. Κάνοντας χρήση ενός μοτίβου εκφυλισμού με βάση τις αλληλουχίες ενός μεγάλου αριθμού βασικών περιοχών στις πρωτεΐνες β-ZIP από διάφορους οργανισμούς, το πλήρες γονιδίωμα του ζυμομύκητα ήταν η αναζήτηση για την ταυτοποίηση της β-ZIP πρωτεΐνης του *S. cerevisiae*. Η αναζήτηση αποκάλυψε 14 πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων, Gcn4p, Yap1p, Yap2p, Met28p, Sko1p και Hac1p, που πιθανότατα αντιπροσωπεύουν το πλήρες σύνολο των β-ZIP πρωτεϊνών της ζύμης. Η ευθυγράμμιση αυτών των αλληλουχιών αποκάλυψε μία οικογένεια έξι ταυτοποιημένων πρωτεϊνών, Yap3p-Yap8p, που περιέχουν διατηρημένα κατάλοιπα αμινοξέων παρόμοια με αυτά που υπάρχουν στις Yap1p και Yap2p. Τα χαρακτηριστικά που διακρίνουν αυτή την οικογένεια από τη Yap Gcn4p είναι τα αμινοξέα που έρχονται σε επαφή με το DNA. Πράγματι, στη θέση 238 μια γλουταμίνη αντικαθιστά την αλανίνη και στη θέση 242, μια φαινυλαλανίνη / τυροσίνη αντικαθιστά μια σερίνη. Επιπλέον, υπάρχουν δύο οικογένειες-ειδικά υπολείμματα, δηλαδή, μια γλουταμίνη στη θέση 234 και μια αλανίνη στη θέση 241. Η θέση δέσμευσης της οικογένειας Yap ήταν έτσι και στη συνέχεια χαρακτηρίζεται ως TTAC / GTAA για Yap1p-Yap4p. Μέχρι τώρα η αντίστοιχη θέση πρόσδεσης για Yap5p-Yap8p δεν έχει χαρακτηριστεί, αν και στην περίπτωση του Yap8p, φαίνεται να είναι το TTAATAA. Δεν μπορούμε, ωστόσο, να αποκλείσουμε την ύπαρξη και των άλλων θέσεων πρόσδεσης. Τα ορθόλογα της Yap1p, αλλά όχι τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, έχουν βρεθεί σε άλλους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων *Schizosaccharomyces pombe* (Pap1p), *Candida albicans* (Cap1p) και *K. lactis* (Klap1p). Με αναφορά στις δομικές ομοιότητες μεταξύ των μελών της οικογένειας Yap, η Yap1p συμμερίζεται την μεγαλύτερη ομολογία με Yap2p και σε μικρότερο βαθμό με Yap3p, η Yap4p είναι ομόλογη με Yap6p και η Yap5p με Yap7p, ενώ η Yap8p είναι αυτή που σχετίζεται ελάχιστα με την οικογένεια. Περίπου το 15% του γονιδιώματος περιέχει μια ή περισσότερες καλά τοποθετημένες συναινέσεις Yap, στοιχεία απόκρισης αλληλουχίας (YRE) εντός της περιοχής προαγωγέα, τονίζοντας τις πιθανές ρυθμιστικές επιδράσεις αυτής της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων.

4.9.3 Yap1p, ΚΥΡΙΟΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΕ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Η απόκριση του οξειδωτικού στρες ορίζεται ως το φαινόμενο με την οποία ένα κύτταρο ανταποκρίνεται σε αλλαγές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του λόγω της παραγωγής ριζών οξυγόνου (ROS) που προκαλούνται από την ατελή αναγωγή του O_2 κατά την αναπνοή, καθώς και με την έκθεση σε μια ποικιλία χημικών και μετάλλων.

Ο ρόλος της Yap1p στη ρύθμιση των ενζύμων που προστατεύουν ενάντια στο οξειδωτικό στρες προτάθηκε για πρώτη φορά όταν η μεταλλαγμένη Yap1 βρέθηκε να είναι υπερευαίσθητη στο H_2O_2 και στο t-BOOH καθώς και σε χημικές ουσίες που παράγουν ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου (μεναδιόνη, μεθύλιο βιολογόνιο και πλουμπαγκίνη). Τέτοιες μεταλλαγμένες Yap1 μειώνουν συγκεκριμένες δραστηριότητες πολλών ενζύμων που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση οξυγόνου όπως δισμουτάση υπεροξειδίου, αφυδρογονάση 6-φωσφορικής γλυκόζης και αναγωγή γλουταθειόνης. Παράλληλες μελέτες μεταλλαγμένων Yap1 αναφέρουν περαιτέρω ευαισθησία στη μεθυλογλουτάλη, στο κάδμιο και κυκλοξείδιο. Αργότερα, οι Cuyie et al. έδωσαν την πρώτη σαφή ένδειξη για το ρόλο της Yap1p σε αυτό τον μηχανισμό αντίδρασης, μέσω της αναγνώρισης του στόχου Yap1p, το TgX2, δείχνοντας ότι η επαγωγή της από H_2O_2 , t-BOOH, διαμίδη και diethylmaleate (DEM) είναι Yap1p-εξαρτώμενη και διαμεσολαβεί από δύο YREs παρούσες. Επί πλέον, κατέδειξαν ότι το διαγραμμένο στέλεχος Yap1 είναι υπερευαίσθητο στη διαμίδη και DEM. Μελέτες έχουν προσθέσει επίσης έναν αυξανόμενο αριθμό διαφορετικών στόχων Yap1p που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση του ROSs. Μπορεί κανείς να βρει, μεταξύ των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια, τις περισσότερες κυτταρικές αντιοξειδωτικές άμυνες καθώς και εκείνων που εμπλέκονται στον οξειδοαναγωγικό έλεγχο της θειόλης. Παρά το γεγονός ότι πολλά αδημοσίευτα στοιχεία υποδεικνύουν μια ήπια επαγωγή της Yap1 κατά την έκθεση σε στρες, τον έλεγχο στη μεσολάβηση της γονιδιακής ρύθμισης της Yap1p που επιτυγχάνεται μέσω κυτταρικού εντοπισμού. Οι Cuyie et al. απέδειξαν ότι η πυρηνική συγκράτηση των Yap1p διαμεσολαβεί από την πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή που βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (c-CRD). Η απομάκρυνση αυτής της περιοχής δημιουργεί μια ιδιοσυστατική πυρηνική, και ως εκ τούτου, δραστική πρωτεΐνη. Επιπλέον, τρία συντηρημένα υπολείμματα κυστεΐνης (C598, C620 και C629), προσδιορίστηκαν ως σημαντικά για αυτή την μετα-μεταφραστική ρύθμιση. Οι Yan et al. στη συνέχεια έδειξαν ότι η πυρηνική εξαγωγή της Yap1p διαμεσολαβεί από την exportin Crm1p, δεσμευτική στην εξαγωγή του πυρηνικού σήματος Yap1p. Αργότερα, οι Delaunay et al. απέδειξαν, σε *in vivo* συνθήκες, ότι δύο κυστεΐνες, C303 από το N-τερματικό CRD (n-CRD) και C598 από το C-τερματικό CRD, οξειδώνονται σε απόκριση προς H_2O_2 , σχηματίζοντας έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό που συγκαλύπτει τα NES, θέτοντας έτσι σε κίνδυνο τη δέσμευση των Crm1p οδηγώντας στην ενεργοποίηση της μέσα από την πυρηνική κράτηση. Περαιτέρω, *in vitro* εργασία εκτελείται από Wood et al., η οποία έδειξε ότι ένας πρόσθετος ενδομοριακός δισουλφιδικός δεσμός, δηλαδή μεταξύ C310 και C629, είναι αυτός που σχηματίζεται μεταξύ του n-CRD και c-EAP κατά την έκθεση σε H_2O_2 . Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, ως εκ τούτου η δραστηριότητα της Yap1p ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς αυξάνοντας το ερώτημα εάν η οξείδωση της Yap1p πραγματοποιείται απευθείας από τα υδروπεροξειδία ή αν υπάρχει ένα ενδιάμεσο μόριο που μπορεί να επιτρέψει την οξείδωση του. Πειράματα από την ομάδα των Tolodano et al. έχουν δείξει ότι η Yap1p δεν οξειδώνεται άμεσα από H_2O_2 . Αντίθετα, μια υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx) συμπεριφέρεται ως πρωτεΐνη (Gpx3p / Orp1p) λειτουργώντας ως αισθητήρας, που μεταφέρει το οξειδωτικό σήμα στη Yap1p μέσω της δημιουργίας ενός διαμοριακού δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των Gpx3p Cys36 και των

Yap1p Cys598 που στη συνέχεια διαχωρίζονται στην προηγουμένως χαρακτηριζόμενη Yap1p C303-C598 ενδομοριακή γέφυρα. Επιπλέον, μια άλλη πρωτεΐνη, Ybr1p, έχει επίσης δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τη Yap1p σε *in vivo* μετά από έκθεση σε H₂O₂ και να ενεργεί με το ίδιο μονοπάτι ως Grx3p. Αν και ο ειδικός ρόλος της δεν είναι κατανοητός, είναι σαφές ότι η αλληλεπίδραση αυτής της πρωτεΐνης με τη Yap1p είναι αυτό που απαιτείται για την οξείδωση της Yap1p από Grx3p όπου και η συμβολή της εξετάζεται. Σε αντίθεση, η απόκριση στο διαμίδιο δεν περιλαμβάνει την υπεροξειδάση, Grx3p, ούτε τη C303 που απαιτείται για την ενεργοποίηση της Yap1p. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, η Yap1p έχει περιγραφεί ότι διαθέτει ένα επιπλέον κέντρο οξειδοαναγωγής. Πράγματι, το N-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM), ηλεκτρόφιλο, η κινόνη και μεναδιόνη, τόσο ηλεκτρονιόφιλες όσο και γεννήτριες ανιόντων υπεροξειδίου, φαίνεται να τροποποιούν τις κυστεΐνες c-CRD ανεξαρτήτως του μονοπατιού Grx3p και αυτό είναι αρκετό για να οδηγήσει στη μετατόπιση της Yap1p στον πυρήνα.

4.9.4 Yap2p / Cad1p ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΛΟΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ Yap

Η Yap2p (Cad1p) είναι ικανή, όταν υπερεκφράζεται, να προσδώσει αντοχή σε παράγοντες στρες όπως 1,10-φαινανθρολίνη, κάδμιο, κυκλοεξιμίδιο και κερουλενίνη, υποδηλώνοντας ένα ρόλο για τον μεταγραφικό παράγοντα στην απόκριση σε τοξικές ενώσεις. Αναλύσεις μικροσυστοιχιών DNA δείχνουν ότι η Yap2p ρυθμίζει ένα σύνολο πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη σταθεροποίηση και το δίπλωμα των πρωτεϊνών σε οξειδωτικό περιβάλλον. Με ενδιαφέρον αρκετές YAP2 που περιέχουν ως ηγέτη δύο μικρά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, αποδείχθηκε ότι παίζουν ρόλο στην σταθερότητα του mRNA. Εάν αυτό έχει ένα ρόλο στην απόκριση σε στρες, παραμένει να διευκρινιστεί. Παρόλο που η μεταγραφική δραστηριότητα της Yap2p βρέθηκε να διεγείρεται σε συνθήκες καδμίου, ο μηχανισμός ενεργοποίησης αυτού του παράγοντα μεταγραφής χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Ο τομέας εναλλαγής της Yap1p από εκείνη της Yap2p έχει δείξει ότι η σύντηξη πρωτεΐνης ρυθμίζεται από το κάδμιο και όχι από το H₂O₂.

Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν, ως εκ τούτου, ότι η εξειδίκευση προς H₂O₂ και κάδμιο βρίσκεται στο καρβοξυλ-τερματικό τομέα της Yap1p και Yap2p, αντίστοιχα. Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι η θεραπεία με κάδμιο ενεργοποιεί την πλήρους μήκους Yap2 πρωτεΐνη που προάγει εκ νέου τον εντοπισμό της στον πυρήνα μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει μια οργανωμένη Yap2p-Crm1p αλληλεπίδραση. Επιπλέον, ο πυρηνικός εντοπισμός της πρωτεΐνης συσχετίζεται με την Yap2p εξαρτώμενη από μεταγραφή του γονιδίου-στόχου του, FRM2, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με ισχυρή ομολογία με νιτροαναγωγή. Με σύντηξη του GFP η Yap2p (αμινοξέα 328 έως 409) και η Gal4p DBD, που περιέχουν τόσο το σήμα πυρηνικής εισαγωγής εντός της Gal4p DBD και Yap2p NES, αποκρίνονται στο κάδμιο. Η σύντηξη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε μη επεξεργασμένα κύτταρα και αναδιανέμεται στον πυρήνα σε στρες καδμίου. Λαμβάνοντας υπόψη τον υψηλό βαθμό ομολογίας προς Yap1p, ο ρόλος των υπολειμμάτων κυστεΐνης μπορεί να αποδειχθεί σχετικός με την ενεργοποίηση της Yap2p, πιθανώς με ανάλογο τρόπο με αυτό που παρατηρήθηκε για Yap1p. Δεδομένου ότι η υπερέκφραση των φαινότυπων δεν απέχει κατ'ανάγκη από μια βιολογική λειτουργία και ότι ο φαινότυπος δεν συνδέεται με τη μεταλλαγμένη Yap2, ένας ρόλος της Yap2p που μένει να αποκρυπτογραφηθεί.

4.9.5 Yap4p και Yap6p ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΟ ΩΣΜΟΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Το τέταρτο μέλος της οικογένειας, Yap4p (Cin5p / Hal6p), είναι μια πρωτεΐνη 33 kDa που αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ένα μεταλλαγμένο ασταθές χρωμόσωμα. Οι γονιδιωματικές μικροσυστοιχίες αναλύσεις του DNA δείχνουν μια σαφή πρόκληση των YAP4 και YAP6 γονιδίων υπό συνθήκες οξειδωτικού και ΩΣΜΟΤΙΚΟΥ στρες, θερμότητας, μεταξύ άλλων. Αν και δεν χρειάζονται περαιτέρω πληροφορίες έχουν ληφθεί για μελέτες οι YAP6, σχετικά με τη ρύθμιση των YAP4 υπό όρους της υπερωσμωτικότητας για να καθορίσουν ότι δεν είναι τα μόνα μεταλλαγμένα ωσμο ευαίσθητα αλλά και ότι η μεσολάβηση του Msn2p για επαγωγή της YAP4 συμβαίνει σε ένα Hog1p με τέτοιο τρόπο που εξαρτάται από τουλάχιστον δύο παράγοντες στρες στην περιοχή του υποκινητή του. Το υπερωσμωτικό στρες οδηγεί σε μια σύλληψη στην κυτταρική ανάπτυξη και στην μεταγραφή που μεταβάλλει τα γονίδια που εμπλέκονται στην απόκριση σε στρες με αποκορύφωμα την προσαρμογή του κυττάρου ζυμομύκητα σε νέες περιβαλλοντικές συνθήκες. Κρίσιμης σημασίας για την προσαρμογή σε αυτή τη διαδικασία είναι η ικανότητά του να αυξάνει τη βιοσύνθεση της γλυκερόλης, κυτταρικός οσμολύτης, που επιτυγχάνεται μέσω της δραστηριότητας της κινάσης MAP HOG. Οι αλλαγές της εξωτερικής ωσμοτικότητας και της σπαργής των κυττάρων στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κορυφώνεται με φωσφορυλίωση της κινάσης Hog1p και με μετατόπιση στον πυρήνα, όπου και ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου μέσω της αλληλεπίδρασης με διάφορους παράγοντες μεταγραφής. Η υπερευαίσθησία του μεταλλαγμένου στελέχους HOG1 ακόμη και υπό ήπιες συνθήκες υπερωσμωτικού στρες προέρχεται από μια μείωση της ενδοκυτταρικής περιεκτικότητας σε γλυκερίνη και είναι μια σαφή αντανάκλαση του θεμελιώδους ρόλου του σε αυτό το μονοπάτι απόκρισης.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ακόμη και τα μεταλλαγμένα στελέχη HOG1 μπορούν να ευδοκιμήσουν σε μέτρια υπερωσμωτικότητα όταν η ανάπτυξη διεξάγεται σε 37° C, λόγω της ταυτόχρονης ενεργοποίησης, κατόπιν θερμικού σοκ, ενός εναλλακτικού βιοσυνθετικού μονοπατιού γλυκερόλης μέσω της διυδροξυακετόνης. Το γεγονός ότι η υπερέκφραση της YAP4 απαλλάσσει σαφώς τον ωσμο ευαίσθητο φαινότυπο HOG1 έχει τοποθετήσει μια πρόσθετη σημασία για την αναγνώριση των γονιδίων στόχων του. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, οι μικροσυστοιχίες αναλύουν τη χρήση της μεταλλαγμένης Yap4p υπό συνθήκες υπερωσμωτικότητας λαμβάνοντας δεδομένα, που επικυρώνουν τα τρία γονίδια ως εξαρτημένα από την Yap4p σε ποικίλους βαθμούς. Δύο από αυτά εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της γλυκερόλης, δηλαδή το GCY1, που κωδικοποιεί μια υποθετική αφυδρογονάση γλυκερόλης, και GPP2, το οποίο κωδικοποιεί μια εξαρτώμενη από NAD γλυκερολική 3-φωσφορική φωσφατάση. Αυτά τα γονίδια παρουσιάζουν μειωμένη επαγωγή στο Yap4 μεταλλαγμένο στέλεχος.

Αν και εμφανίζεται το εσωτερικό περιεχόμενο γλυκερόλης ανεπηρέαστο στη μεταλλαγμένη Yap4, τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η συμβολή της Yap4p στη βιοσύνθεση της μπορεί να θεωρηθεί ως επίπεδο εξομάλυνσης των βραχυχρόνιων διακυμάνσεων της ρύθμισης της. Επιπλέον, το DCS2, γονίδιο ομόλογο με το DCS1-κωδικοποιημένο ένζυμο δείχνει εξάντληση 80% στα επίπεδα επαγωγής στη μεταλλαγμένη Yap4. Πρόσφατα, το DCS1 έχει περιγραφεί ως αναστολέας της δραστηριότητας τρεχαλάσης που ενδέχεται να έχει επιπτώσεις στην ωσμο απόκριση λόγω του ρόλου της τρεχαλόζης ως ανώτερος κυτταρικός οσμολύτης που παρέχει προστασία από την αφυδάτωση και την ξήρανση. Η πλήρης αναγνώριση του υπολοίπων γονιδίων στόχων της Yap4 θα συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στην

κατανόηση των λειτουργικών της ρόλων. Αδημοσίευτα αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι οι Yap4 και Yap6 επάγονται σε απόκριση προς διάφορες συνθήκες στρες, συμπεριλαμβανομένων οξειδωτικού στρες, θερμότητας, και έκθεση στο κάδμιο και ενώσεις του αρσενικού. Ωστόσο, η περιοχή υποκινητή της YAP4 περιέχει πολλαπλές θέσεις συναίνεσης HSE, η οποία, μαζί με τα στρες μπορεί να αντιπροσωπεύσουν μια γενική απόκριση. Ωστόσο, δυο φαινότυποι για τη μεταλλαγμένη Yap4 έχουν ακόμη περιγραφεί για αυτές τις συνθήκες στρες. Η λειτουργική συνάφεια των στοιχείων αυτών δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή, αλλά μπορεί να αντιπροσωπεύει μια λεπτή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σύμφωνα με την αντίδραση στο στρες.

Είναι αξιοσημείωτο να αναφέρουμε και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των YAPs, που όμως δεν θα μας απασχολήσουν στην παρούσα εργασία.

ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΩΣΜΟΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η προσαρμογή σε αυξημένη ωσμωτικότητα είναι μία ενεργή διαδικασία που εξαρτάται από την ανίχνευση ωσμωτικών αλλαγών, ενεργοποιώντας έτσι κατάλληλες κυτταρικές αποκρίσεις που προστατεύουν τα κύτταρα από το στρες. Η κύρια κυτταρική απόκριση των ζυμών είναι η ενεργοποίηση της οδού υψηλής ωσμωτικότητας της γλυκερόλης (HOG). Η οδός HOG ενεργοποιείται από τον καταρράκτη μιτογονικής πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) που, όταν διεγείρεται, τα αποτελέσματα τόσο σε μεταγραφικό και όσο και μη μεταγραφικό αποκρίνονται για να επιτρέψουν στα κύτταρα να αντιμετωπίσουν τις αλλαγές στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Εκτός από την απόκριση στη HOG, η ζύμη διαθέτει επίσης μια γενική απόκριση σε στρες η οποία έχει ένα σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή και την επιβίωση, επιτρέποντας στα κύτταρα να αντιμετωπίζουν καταπονήσεις υπό μία κλίμακα συνθηκών συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης σε υπερωσμωτικότητα[42].

HOG ΚΑΙ MAPK ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Η οδός HOG είναι το πιο κατανοητό σύστημα στα ευκαρυωτικά κύτταρα και συνεπώς εξυπηρετεί, μαζί με το μονοπάτι Sty1 του *S. pombe*, ως πρωτότυπα μονοπάτια σηματοδότησης ωσμωρρύθμισης. Επιπλέον, η οδός HOG είναι ένα από τα πιο κατανοητά μονοπάτια MAP κινάσης.

Η διαδικασία HOG περιλαμβάνει δύο μεταφορικές πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, τις Sho1 και Sln1 που ενεργούν για να ρυθμίσουν τελικά τη διαδικασία MAPK. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν δυο διαφορετικά ενεργά κέντρα και επικοινωνούν άμεσα με τις διαφορετικές πρωτεΐνες που ελέγχουν την ροή των ουσιών. Από την άλλη μεριά, η δραστηριότητα του κλάδου Sln1 απαιτείται να παρακινήσει την έκφραση διάφορων αναφορικών γονιδίων ως αντίδραση στα υψηλά επίπεδα διάλυτοτητας και αυτό υποδηλώνει ότι ο κλάδος Sln1 λειτουργεί πάνω από ένα συγκεκριμένο ποσοστό ωσμώσεων από,τι ο κλάδος Sho1. Ο Sln1 έχει δύο μεταφορικές περιοχές και μια ενδοκυτταρική περιοχή ιστιδίνικης κινάσης που αντανάκλα σε δύο άλλες πρωτεΐνες, τις Ypd1 και Ssk1, που μαζί σχηματίζουν ένα σύστημα μεταφοράς φωσφόρου. Τα συστήματα μεταφοράς φωσφόρου περιλαμβάνουν μια ιστιδίνικη κινάση που μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα σε μια ενδιάμεση πρωτεΐνη, η οποία μετά μεταφέρει το φώσφορο σε μια πρωτεΐνη-ρυθμιστή της αντίδρασης[105].

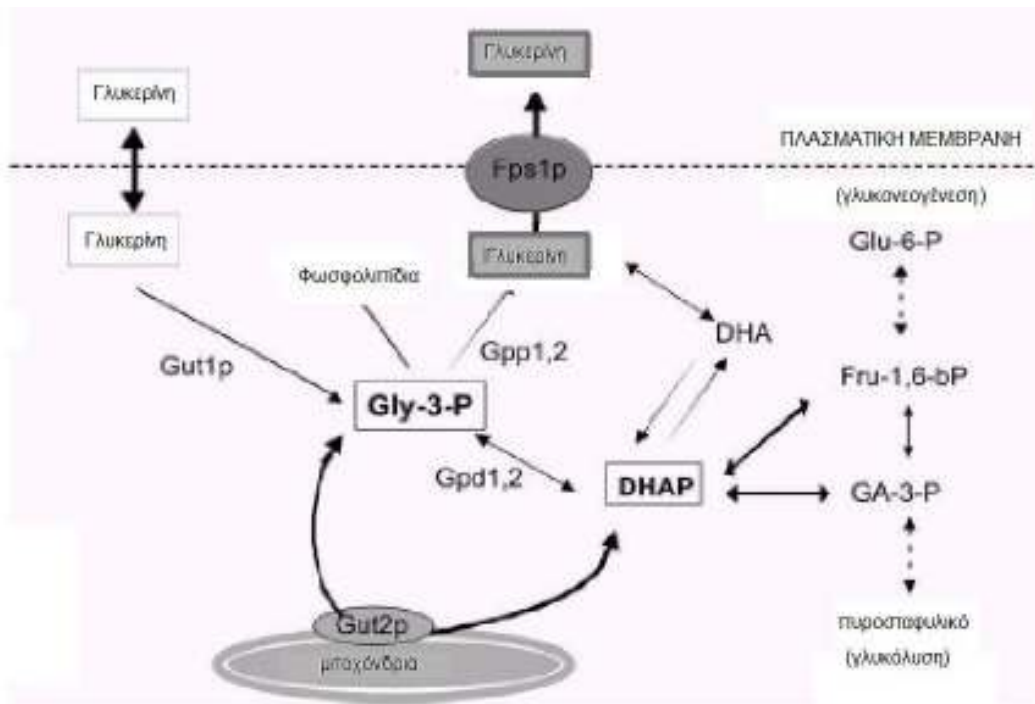
4.10 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΟ ΩΣΜΟΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Οι οδοί για την παραγωγή γλυκερόλης, τρεχαλόζης, και γλυκογόνου ξεκινούν από τα ενδιάμεσα στάδια της γλυκόλυσης. Οι τρεις ενώσεις έχουν διαφορετικούς φυσιολογικούς ρόλους: η γλυκερόλη χρησιμεύει ως οσμολύτης, η τρεχαλόζη μπορεί να είναι ένα πιο γενικό προστατευτικό απέναντι στο στρες και βοηθά τα *chaperones* στον έλεγχο μετουσίωσης και επαναφοράς πρωτεϊνών, και το γλυκογόνο είναι ένας υδατάνθρακας αποθήκευσης. Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα στην παραγωγή και την κατανομή αυτών των ενώσεων ρυθμίζουν και ενισχύουν όλες τις συνθήκες στρες. Ενώ η έκφραση σημαντικών γονιδίων για τον μεταβολισμό της γλυκερόλης, της τρεχαλόζης, και του γλυκογόνου επάγονται από πολλές συνθήκες στρες, η καθαρή παραγωγή αυτών των ενώσεων παρατηρείται μόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Οι οδοί για γλυκερόλη και τρεχαλόζη χρησιμεύουν όχι μόνο για την παραγωγή των αντίστοιχων ενώσεων, αλλά επίσης αποδεικνύουν τον ρόλο τους στον έλεγχο και την εξισορρόπηση του κυτταρικού μεταβολισμού[45,46].

4.10.1 Η ΓΛΥΚΕΡΙΝΗ ΚΑΙ ΤΟ ΩΣΜΟΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Η γλυκερίνη είναι μια πολύ-υδρόφιλη ένωση, η οποία μπορεί να συσσωρευτεί σε μεγάλες ποσότητες μέσα στα κύτταρα του ζυμομύκητα χωρίς τοξικές ή παρεμποδιστικές συνέπειες[22]. Η συσσώρευση της γλυκερίνης συσχετίζεται με το ποσοστό νερού του μέσου. Κάτω από συνθήκες ΩΣΜΟΤΙΚΟΥ στρες, η παραγωγή γλυκερίνης σχετίζεται με το ωσμωτικό στρες [77] και μπορεί να εκπροσωπήσει το 25% της ξηρής μάζας των κυττάρων[58]. Η γλυκερίνη είναι το πιο σπουδαίο συμβατό «διάλυτο» και όλο και περισσότερες αποδείξεις υποδεικνύουν ότι το επίπεδο της ενδοκυτταρικής γλυκερίνης είναι ρυθμισμένο σύμφωνα με τις εξωτερικές δραστηριότητες του νερού.

Στο *S. cerevisiae*, η γλυκερόλη συντίθεται από τη φωσφορική διυδροξυακετόνη (DHAP), ένα γλυκολυτικό ενδιάμεσο σε δύο ενζυμικές αντιδράσεις. Η πρώτη αντίδραση, καθώς επίσης και το βήμα περιορισμού του ρυθμού σύνθεσης γλυκερίνης, απαιτεί τη μείωση του DHAP σε 3-φωσφορική γλυκερόλη, μαζί με την οξείδωση του NADH σε NAD⁺. Αυτό το βήμα καταλύεται από ένα NAD⁺ εξαρτώμενο από την δεϋδρογενάση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης που κωδικοποιείται από δύο ισομορφές, τα GPD1 και GPD2. Στην δεύτερη και τελική αντίδραση, η 3-φωσφορική γλυκερόλη αποφωσφορυλιώνεται σε γλυκερόλη μέσω της 3- γλυκερικής φωσφατάσης, που κωδικοποιείται από GPP1 και GPP2[45].



Εικόνα 22. Οι μηχανισμοί εξόδου και εισόδου της γλυκερίνης στο κύτταρο της ζύμης κατά το ωσμωτικό στρες

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ισομορφές της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκερόλης και 3-γλυκερικής φωσφατάσης εκφράζονται διαφορετικά υπό συνθήκες ΩΣΜΟΤΙΚΟΥ και αναερόβιου στρες, επιτρέποντας στα κύτταρα ζύμης να προσαρμοστούν στις αλλαγμένες συνθήκες ανάπτυξης. Σε απάντηση προς υπερωσμωτικό στρες, η αυξημένη παραγωγή γλυκερόλης έχει δείχθει ότι οφείλεται κυρίως στην αυξημένη έκφραση των GPD1 και GPP2. Από τις ισομορφές, το GPD1 έχει αποδειχθεί να είναι κυρίαρχα υπεύθυνο για το σχηματισμό γλυκερόλης υπό συνθήκες υψηλής ωσμωτικότητας ως έκφραση του σε απόκριση στο υπερωσμωτικό στρες. Σε σύγκριση, το GPD2 έχει προσδιοριστεί να μην έχει κανένα ρόλο στην απόκριση σε ωσμωτικό στρες, και είναι ελαφρώς σε καταστολή υπό υπερωσμωτικές συνθήκες, και να είναι προς τα πάνω ρυθμισμένο σε απουσία οξυγόνου. Υπό αναερόβιες συνθήκες, η έκφραση του GPD2 είναι να διατηρηθεί η ισορροπία του ενδοκυτταρικού οξειδοαναγωγικού μεταξύ αναγωγικών ισοδύναμων, NAD⁺ και NADH.

Ο οσμωλύτης που χρησιμοποιείται κοινώς σε πειράματα με σκοπό να προκαλέσει ωσμωτικό στρες είναι το χλωριούχο νάτριο. Ισχύει ότι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση γλυκερίνης αυξάνεται παράλληλα με την εξωτερική περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο. Γενικά, μια αύξηση στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση της γλυκερίνης μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της αυξημένης σύνθεσης, της αυξημένης κυτοπλασματικής συγκράτησης ή της μειωμένης αποικοδόμησης ή την αντίληψη της γλυκερίνης από το μέσο. Η γλυκερίνη παράγεται κατά τη γλυκόλυση με αναγωγή του διυδρόξυ-ακετονικού φωσφορικού άλατος σε 3-φωσφορική γλυκερίνη από τη αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερίνης (GPD)[17]. Κάτω από το ωσμωτικό στρες, τα αυξημένα επίπεδα της γλυκερίνης δημιουργούνται εξαιτίας της αύξησης της δραστηριότητας της κυταροπλασματικής GPD (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκόζης). Αυτή η μορφή γλυκερίνης απαιτεί μια ισομοριακή ποσότητα κυτοπλασματικού NADH. Όταν τα κύτταρα είναι ωσμωτικά στρεσαρισμένα, αυτή η απαίτηση φαίνεται να συναντιέται τμηματικά αφενός με την μειωμένη μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη και αφετέρου με μια αυξημένη οξείδωση σε οξικό. Το ένζυμο-κλειδί cGPD παρακινείται σημαντικά από συγκεκριμένα

μονοπάτια μεταγωγής σήματος, όπως το HOG (High Osmotic Glycerol pathway) και HOG MAPK (High Osmotic Glycerol Mitogen Activated Protein Kinase pathway)[19,21,45,105].

4.10.2 Η ΤΡΕΧΑΛΟΖΗ ΚΑΙ ΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

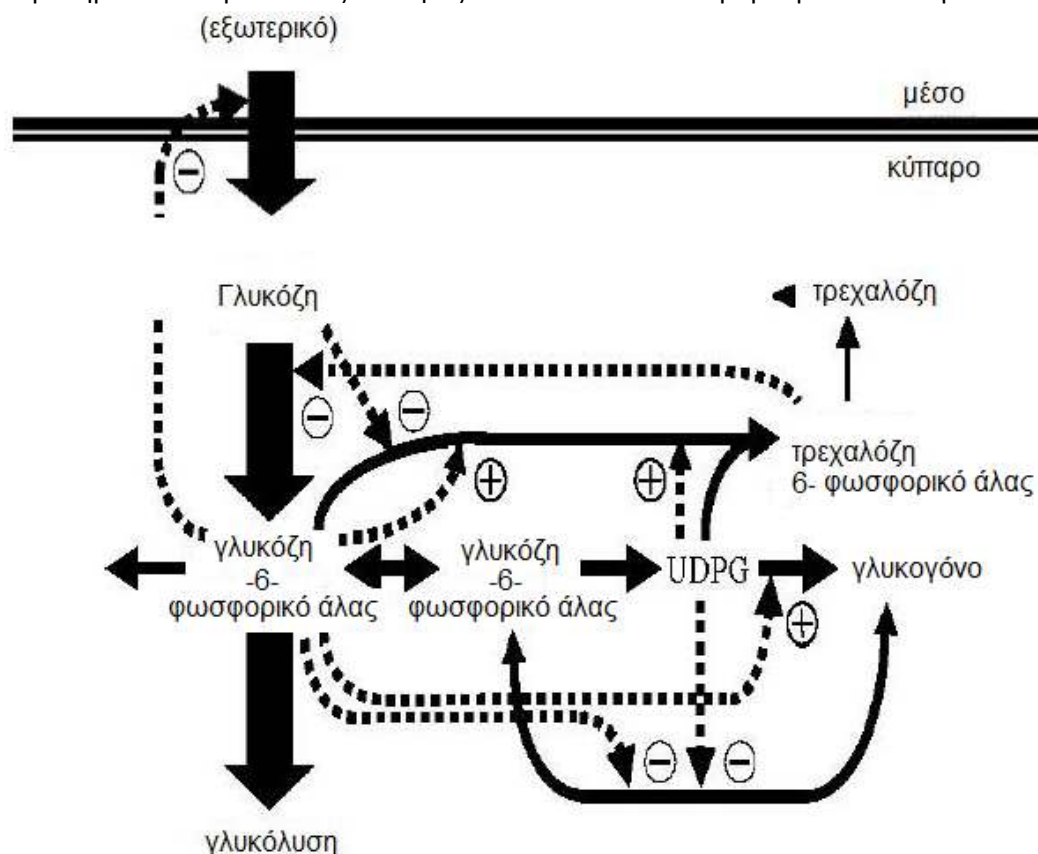
Η τρεχαλόζη είναι ένας σημαντικός, μη αναγόμενος δισακχαρίτης και εκτός από τη λειτουργία του ως ένας αποθηκευτικός υδατάνθρακας, έχει αναγνωριστεί ως ένας από τους πιο βασικούς προστάτες ενάντια στο στρες μέσα στα κύτταρα των ζυμών. Σχηματίζεται από μια α,1,1σύνδεση δύο μορίων D-γλυκόζης. Η μοριακή μορφή και βάρος είναι $C_{12}H_{22}O_{11}$ και 342.31 αντίστοιχα. Η τρεχαλόζη έχει έναν υψηλό βαθμό οπτικής αντιστροφής και ρευστοποιείται στους 97°C. Η α,α μορφή είναι το ισομερές το οποίο αναφέρεται ως τρεχαλόζη (α,α- τρεχαλόζη) είναι σύνηθες στα φυτικά και ζωικά βασίλεια. Είναι ένα από τα πιο ενεργά προστατευτικά μόρια για τις κυτταρικές μεμβράνες κάτω από συνθήκες ΩΣΜΩΤΙΚΟΥ στρες και βοηθά στην παρεμπόδιση φθορών στο λιπιδιακό στρώμα. Τέτοιου είδους προστασία λαμβάνει χώρα διότι η τρεχαλόζη ελαττώνει τη μετάβαση στη θερμοτροπική φάση των λιπιδίων της μεμβράνης στην ξηρή κατάσταση με σκοπό τη διατήρηση της περατότητας του μεμβρανικού στρώματος λιπιδίων. Αυτή είναι η δεύτερη απόκριση των κυττάρων κατά του ΩΣΜΩΤΙΚΟΥ στρες. Η παραγωγή και η συσσώρευση της τρεχαλόζης, επίσης πραγματοποιείται κατά το θερμικό στρες, την έλλειψη θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος, το οξειδωτικό στρες, το χημικό στρες και το ψυχρό στρες. Βασικά, η προστατευτική ιδιότητα της τρεχαλόζης έχει εκφραστεί με δύο διαφορετικές υποθέσεις:

1. Σύμφωνα με την πρώτη υπόθεση η τρεχαλόζη αντικαθιστά τα υδατικά μόρια που είναι δεσμευμένα με υδρογόνο στην επιφάνεια βιολογικών μακρομορίων και είναι βασικά. Αυτό συμβαίνει διότι το υδρογόνο δεσμεύει την τρεχαλόζη με πολλές ομάδες υδροξυλίου διευκολύνοντας τη δεσμευτική τους σταθερότητα κάτω από συνθήκες όπως ψύξη, ωσμωτικό στρες, θέρμανση και αποξήρανση που παρεμβάλλεται στους δεσμούς υδρογόνου με τα υδατικά μόρια.
2. Η δεύτερη υπόθεση βασίζεται στην τάση της τρεχαλόζης να παίρνει κρυσταλλική μορφή κάτω από συνθήκες ξήρανσης. Η κάψουλα γύρω από τα μακρομόρια θα πάγωνε τη φυσιολογική τους μορφή και θα απέτρεπε οποιαδήποτε παραμόρφωση από την φυσιολογία τους κατά την αφυδάτωση.

Προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει ότι η αντίληψη της τρεχαλόζης είναι γραμμική με το χρόνο και πραγματοποιείται στο κυτόπλασμα. Πρόσφατη έρευνα έχει δείξει πως μια μονάδα συμπλέγματος τρεχαλόζης-6-φωσφορικής συνθάσης/φωσφατάσης εμπλέκεται στην εκροή γλυκόζης κατά τη γλυκόλυση.

Η περιεκτικότητα σε τρεχαλόζη στις εμπορικά διαθέσιμες ζύμες πιστεύεται ευρέως ότι είναι ένα κρίσιμο στοιχείο για την ανθεκτικότητά τους στο στρες και έχει κερδίσει ένα μεγάλο μερίδιο προσοχής, ειδικά αναφορικά με την παραγωγή της «στιγμιαίας ξηρής ζύμης» και τη διατήρηση της βιωσιμότητας της κατεψυγμένης ζύμης. Η παρουσία του χλωριούχου νατρίου στα χαρακτηριστικά του μέσου αυξάνει τη συσσώρευση της τρεχαλόζης[24]. Έχει σημειωθεί ότι κάτω από υπεραλατικές συνθήκες, τα κύτταρα του ζυμομύκητα αυξάνουν την περιεκτικότητά τους σε τρεχαλόζη για να αντέξουν τις συνθήκες με υψηλά επίπεδα αιθανόλης. Πιστεύεται ότι η αιθανόλη αλληλεπιδρά με τις μεμβράνες με το να εισέρχεται στις υδροφοβικές περιοχές αυξάνοντας την πολικότητα και έτσι εξασθενεί το υδροφοβικό φράγμα για την ελεύθερη συναλλαγή πολικών μορίων και επηρεάζει τη ρύθμιση των συστατικών της μεμβράνης[5]. Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων με υψηλές

περιεκτικότητες σε τρεχαλόζη είναι ανθεκτικά σε εχθρικές περιβαλλοντικές συνθήκες όπως οι αλατικές συνθήκες. Μια υψηλή περιεκτικότητα σε τρεχαλόζη επίσης προστατεύει τα κύτταρα από την αυτόλυση και αυξάνει τη ανθεκτικότητα της ζύμης[4]. Η τρεχαλόζη συμπληρώνει δύο μοναδικές ιδιότητες που κάνουν αυτό το μόριο μια ασπίδα για το στρες.



Εικόνα 23. Η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης από τον *S. cerevisiae*. Τα βέλη δείχνουν τη ροή της ουσίας, με την πάχυνση να υποδηλώνει την ένταση της. Τα διακεκομμένα βέλη αναπαριστούν την παρεμπόδιση (-) και την ενεργοποίηση (+). (Voit, 2003)

Πρώτον, είναι η χωρητικότητα της τρεχαλόζης που προστατεύει τις μεμβράνες από την αφυδάτωση. Αυτή η ενέργεια είναι γνωστή ως «η υπόθεση αναπλήρωσης νερού»[40]. Μια δεύτερη σημαντική και πολύπολοκη λειτουργία του διασακχαρίτη αυτού είναι η ικανότητά του να αποκλείει το νερό από την επιφάνεια των πρωτεϊνών και έτσι να προστατεύει τις πρωτεΐνες από την καταστροφή μέσα στα αφυδατωμένα κύτταρα. Ένα υψηλό επίπεδο τρεχαλόζης μπορεί να προστατέψει τις πρωτεΐνες από την καταστροφή και επίσης να καταστείλει το σύνολο των κατεστραμμένων πρωτεϊνών, οι οποίες αποτρέπουν την ακόλουθη επαναδίπλωση από μοριακά συνοδευτικά. Η αυξημένη παραγωγή τρεχαλόζης αντικατοπτρίζεται στη βιοσυνθετική διαδικασία από 6 φωσφορική τρεχαλόζη σε τρεχαλόζη. Κατά το αλατικό στρες, παρατηρείται μια δραματική αύξηση της 6 φωσφορικής τρεχαλόζης. Η ποσότητα αυτή έχει μια παρεμποδιστική δράση στις δύο από τις τρεις ισομορφές του πρώτου ενζυματικού βήματος της γλυκόλυσης, τις εξοκινάσες. Η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης έχει αναφερθεί ότι ποικίλλει στους διάφορους οργανισμούς. Στην έναρξη της διαδικασίας αυτής, ένα υπόλειμμα glycosyl μεταφέρει από uridinediphospho-γλυκόζη σε γλυκόζη 6- φωσφορικό άλας και παρέχει τρεχαλόζη-6- φωσφορικό άλας. Τα δύο ένζυμα που καταλύουν τη βιοσύνθεση της τρεχαλόζης είναι η T6P συνθετάση και η T6P φωσφατάση. Τα δύο αυτά ένζυμα είναι μέρη ενός συμπλόκου στο οποίο δύο άλλες πρωτεΐνες Ts11 και Trp3 συμμετέχουν αλλά χωρίς καμία καταλυτική δραστηριότητα[105].

4.10.3 ΑΛΛΟΙ ΩΣΜΟΛΥΤΕΣ ΩΣ ΜΕΣΟ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Προφανώς ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιεί την γλυκερόλη αποκλειστικά ως οσμωλύτη σε αναπτυσσόμενα κύτταρα. Ωστόσο, η μαννιτόλη, σορβιτόλη και η ξυλιτόλη μπορεί να εκτελέσουν την ίδια λειτουργία, με την προϋπόθεση τα κύτταρα ζύμης να μπορούν να παράγουν αυτές τις ενώσεις. Χρησιμοποιώντας ένα σύστημα δοκιμής που κάνει χρήση του *Fps1p*, επιτρέπει τη διάχυση μέσα στο κύτταρο μιας σειράς από πολυόλες. Οι Hohmann et al. έδειξαν πρόσφατα ότι ουσιαστικά όλες οι πολυόλες μεταφέρονται από το σύστημα και είναι συμβατές με την ανάπτυξη της ζύμης, υποδεικνύοντας ότι τα υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα πολλών πολυολών είναι πράγματι ανεκτικά.

Άλλες ζύμες και μύκητες είναι γνωστό ότι παράγουν ή και συσσωρεύουν από το περιβάλλον διαφορετικές πολυόλες ως συμβατές διαλυτές ουσίες, αν και γενετικές μελέτες που επιβεβαιώνουν τη σημασία των ενώσεων αυτών για την ανάπτυξη κάτω από ωσμωτικό στρες δεν έχουν αναφερθεί. Έχουν όμως αναφερθεί παραδείγματα τέτοιων ενώσεων και περιλαμβάνουν ερυθριτόλη, ριβιτόλη, αραβιτιτόλη, ξυλιτόλη, σορβιτόλη, μαννιτόλη, γαλακτιτόλη, και άλλες[45].

4.11 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Κατά το ωσμωτικό στρες, η έκφραση της αφυδρογονάσης της 3 φωσφορική γλυκερίνης που έχει κωδικοποιηθεί από το γονίδιο *GPD1*, είναι υποκινούμενη. Αυτό το ένζυμο βρίσκεται πάντα να παρακινείται από χαμηλό υδατικό δυναμικό[74]. Το *ENA1* είναι το γονίδιο που συνδέεται άμεσα με την αντλία του νατρίου που αντλεί την ΑΤΡάση και, κατά το αλατικό στρες είναι αυξημένη. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, τα *ALD2*, *GTT1*, *HSP104*, *HSP12* εκφράζονται και μέλη της οικογένειας των γενών *HAL* που φαίνεται να εμπλέκονται ως παραγωγοί που θα επηρεάσουν την ανοχή στην αυξημένη ώσμωση [37]. Τα γένη *GTT1*, *HSP 104*, *HSP12* και *HSP26* είναι γένη του θερμικού σοκ αλλά είναι πολύ αυξημένα στο ωσμωτικό στρες. Άλλες κοινές απόψεις για τις αντιδράσεις στο θερμικό και το ωσμωτικό στρες, μπορούν να βρεθούν με τη λειτουργία των γενών *MSN2* και *MSN4*. Αυτά τα γένη κωδικοποιούν πρωτεΐνες zinc-finger που δεσμεύονται συγκεκριμένα με τα μέλη της απόκρισης στο στρες (STREs). Τα STREs παρουσιάζονται ως ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που αυξάνονται με το θερμικό ή ωσμωτικό στρες. Το γένος *YAP1* έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί ακολουθίες που περιλαμβάνουν και τα STREs. Επίσης, το γένος *ROX1* έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στις αποκρίσεις του θερμικού και του Ωσμωτικού σοκ. Το *CYC7* είναι ένα άλλο γένος που παρακινείται στα κύτταρα που έχουν υποστεί θερμικό και ωσμωτικό στρες. Η τρεχαλόζη κωδικοποιείται από το *CIF1* το οποίο είναι ένα γένος που κωδικοποιεί το σύμπλοκο της συνθετάσης της τρεχαλόζης. Τα γένη ζυμών *HAL1* και *HAL3* φαινομενικά συνεισφέρουν στη μείωση του επιπέδου του ενδοκυτταρικού νατρίου με την αύξηση της έκφρασης *ENA1*. Η τοποθεσία *ENA/PMR2 I*, μια συστοιχία παράλληλων γονιδίων κωδικοποιεί ισομορφές μιας υποθετικής P-ΑΤΡάσης[105].

4.12 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΩΣΜΟΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ

Μια στρεσογόνος συνθήκη μπορεί να προκαλέσει, σε κυτταρικό επίπεδο, ένα μεγάλο εύρος αποκρίσεων, από την επαγωγή του πολλαπλασιασμού, έως την αναστολή αυτού και τον κυτταρικό θάνατο. Το αποτέλεσμα που παρατηρείται σε κάθε περίπτωση μπορεί να είναι διαφορετικό ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, τον συγκεκριμένο παράγοντα που εξετάζεται, την ένταση και τη διάρκεια του ερεθίσματος. Σε κάθε περίπτωση, πάντως, η τελική κυτταρική απόκριση αντανακλά τις ισορροπίες μεταξύ ποικίλων εξαρτώμενων από το στρες σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία ενεργοποιούνται στις παραπάνω συνθήκες. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της επίδρασης των ROS, των οποίων, συνήθως, τα χαμηλά επίπεδα είναι μιτογόνα και επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τα υψηλότερα επίπεδα προκαλούν είτε παροδική είτε μόνιμη παύση του πολλαπλασιασμού, ενώ τα ακόμη υψηλότερα επίπεδα προκαλούν κυτταρικό θάνατο.

Η επιβίωση των κυττάρων κατά την επίδραση μιας στρεσογόνου συνθήκης σχετίζεται με την κατάλληλη τροποποίηση της κυτταρικής λειτουργίας. Αυτή περιλαμβάνει τη ρύθμιση της λειτουργίας ποικίλων ενζύμων, την τροποποίηση δομικών συστατικών του κυττάρου καθώς και την ενεργοποίηση προστατευτικών μορίων. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, όπως όταν ένα στρεσογόνο ερέθισμα είναι πολύ έντονο ή παρατεταμένο, οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί του κυττάρου δεν επαρκούν για να διατηρήσουν την ομοιόσταση, με αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου. Ο θάνατος των κυττάρων μπορεί να διακριθεί σε δύο τύπους, την απόπτωση και τη νέκρωση. Η απόπτωση (ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) είναι μια διαδικασία εξελικτικά συντηρημένη, ρυθμιζόμενη και γενετικά καθορισμένη, η οποία απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας. Χρησιμοποιείται, «φυσιολογικά», για τον έλεγχο του αριθμού των κυττάρων και τη διατήρηση της ομοιόστασης σε καθορισμένους ιστούς και σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους, καθώς και για την απομάκρυνση των κατεστραμμένων ή/και βλαβερών, για τον υπόλοιπο οργανισμό, κυττάρων. Εκτός όμως από τα προαναφερθέντα, η απόπτωση έχει εμπλακεί και σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις. Από την άλλη πλευρά, η νέκρωση, η οποία έχει χαρακτηριστεί και ως «μη φυσιολογικός» θάνατος, είναι το αποτέλεσμα πολύ ισχυρής τοξικής διέγερσης ή εκτεταμένης κυτταρικής βλάβης και σχετίζεται με παθολογικά φαινόμενα.

Οι δύο αυτοί τύποι κυτταρικού θανάτου παρουσιάζουν διαφορετικά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά. Έτσι, κατά την απόπτωση παρατηρείται, αρχικά, συρρίκνωση του κυττάρου, απώλεια της επαφής με τα γειτονικά κύτταρα ή το υπόστρωμα και έκθεση ορισμένων ενδοκυτταρικών συστατικών (όπως του φωσφολιπιδίου φωσφατυδυλοσερίνη) στην επιφάνεια[104].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ

ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΗΣ Είναι κάθε ουσία οργανική ή ανόργανη που είναι απαραίτητη σε ελάχιστες δόσεις στους οργανισμούς για την πραγματοποίηση της λειτουργικής τους δραστηριότητας.

Η πρώτη αναφορά ακινητοποίησης βιολογικού καταλύτη έγινε το 1916 και ήταν η απορρόφηση της ιμβερτάσης από ενεργό άνθρακα. Μεγάλο ενδιαφέρον όμως εκδηλώθηκε από τα μέσα της δεκαετίας του 1950. Στα επόμενα χρόνια, εκατοντάδες επιστημονικές δημοσιεύσεις, πατέντες και ανασκοπήσεις έχουν ως βασικό αντικείμενό τους την ακινητοποίηση βιοκαταλυτών.

Με τον όρο ακινητοποίηση ενός βιοκαταλύτη, εννοούμε την τεχνική εκείνη η οποία έχει σαν στόχο να περιορίσει την ελευθερία της κίνησης του βιοκαταλύτη.

Ο μεγάλος όγκος δουλειάς που έχει γίνει με επίκεντρο την ακινητοποίηση βιοκαταλυτών οφείλεται στο ότι η διαδικασία αυτή παρέχει πολλά και σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη δράση των ελεύθερων μικροοργανισμών. Επίσης, υπάρχουν διάφορες τεχνικές για την ακινητοποίηση ενός βιοκαταλύτη. Από τις τεχνικές αυτές, δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι υπάρχει το ιδανικό υλικό ή η ιδανική μέθοδος για τη χρήση και την αποτελεσματικότητα ενός βιοκαταλύτη. Η επιλογή του υλικού και της μεθόδου ακινητοποίησης γίνεται εκτιμώντας πολλές παραμέτρους όπως το είδος του βιοκαταλύτη, το σκοπό της χρήσης του, τις συνθήκες υπό τις οποίες θα δράσει αλλά και τις ιδιότητες, περιορισμούς, χαρακτηριστικά του υλικού αυτού. Εάν αναλογιστούμε σε συνδυασμό με τα παραπάνω και το μεγάλο αριθμό βιοκαταλυτών αλλά και την πληθώρα των εφαρμογών τους, τότε εύκολα καταλαβαίνουμε γιατί η ακινητοποίηση των βιοκαταλυτών απασχολεί στις ημέρες μας έναν τόσο σημαντικό αριθμό επιστημόνων – ερευνητών[100].

5.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ

Οι μηχανισμοί ακινητοποίησης καθώς και οι μέθοδοι διαφέρουν και εξαρτώνται από το είδος του μικροοργανισμού που θα χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση. Γενικά η παρατήρηση βιολογικών αντιδράσεων (που πραγματοποιούνται από μικροοργανισμούς) ή βιοχημικών αντιδράσεων (που πραγματοποιούνται από ένζυμα) αποδεικνύει ότι μπορούν να πραγματοποιηθούν σε δύο διαφορετικά συστήματα:

- Ένα σύστημα στο οποίο οι μικροοργανισμοί είναι διασκορπισμένοι σε ένα μέσο καλλιέργειας
- Ένα σύστημα στο οποίο οι μικροοργανισμοί δεν είναι ελεύθεροι αλλά παρουσιάζονται εγκλωβισμένοι πάνω σε ένα υποστήριγμα δημιουργώντας ένα σύστημα δύο διαφορετικών φάσεων.

Ακόμα όπως ήδη αναφέρθηκε υπάρχουν διαφορετικές τεχνικές ακινητοποίησης. Σύμφωνα με τις τεχνικές αυτές ορίζονται δύο είδη ακινητοποίησης:

- Η παθητική ακινητοποίηση, η οποία επιτρέπει την προσκόλληση του μικροοργανισμού χωρίς την προεργασία του υποστρώματος ή την προεργασία του μικροοργανισμού ή του θρεπτικού μέσου
- Η ενεργητική ακινητοποίηση που γίνεται κατόπιν επεξεργασίας του υποστρώματος ή και του οργανισμού[102].

Όσον αφορά τις τεχνικές ακινητοποίησης είναι οι:

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά που θα πρέπει να λάβουμε υπόψη για την επιλογή του υλικού – φορέα ακινητοποίησης.

ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
Φυσική	Δύναμη, διαθέσιμη επιφάνεια επαφής, σχήμα (σφαιρίδια, κάψουλες, νήματα κ.α.), πορώδες, μέγεθος πόρων, διαπερατότητα, πυκνότητα, χώρος για ανάπτυξη βιομάζας
Χημική	Υδροφιλικότητα, αδράνεια σε σχέση με το βιοκαταλύτη, ύπαρξη δραστικών ομάδων, δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του υλικού
Σταθερότητα	Αποθήκευση, υπολειμματική ενζυμική ενεργότητα, παραγωγικότητα κυττάρων, ανανέωση της ενζυμικής ενεργότητας, διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, μηχανική σταθερότητα του υλικού
Αντοχή	Βακτηριακή - κυτταρική δράση, διάβρωση από χημικές ουσίες, pH, θερμοκρασία, οργανικοί διαλύτες, αμυντικοί μηχανισμοί κυττάρων
Ασφάλεια	Βιοσυμβατότητα, τοξικότητα του υλικού αλλά και των συστατικών που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία, απαραίτητες προδιαγραφές για εφαρμογές σε τρόφιμα, φάρμακα, ιατρική
Οικονομία	Διαθεσιμότητα και κόστος του υλικού, κόστος χημικών συστατικών που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία, ειδικός εξοπλισμός, περιβαλλοντική επίδραση, δυνατότητα για βιομηχανική εφαρμογή, δυνατότητα για συνεχή διαδικασία, επαναχρησιμοποιήσιμο υλικό
Αντίδραση	Κινητική αντιδράσεων, καταλυτική παραγωγικότητα, παράπλευρες αντιδράσεις, δυνατότητα πολλαπλών

	ενζυμικών - κυτταρικών συστημάτων, δυνατότητα για χρήση σε διάφορα είδη βιοαντιδραστήρων συνεχούς ή μη συνεχούς ροής, περιορισμοί διάχυσης στη μεταφορά μάζας υποστρωμάτων, συνενζύμων και προϊόντων
--	--

5.1.1 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΣΕ ΣΤΑΘΕΡΟ ΦΟΡΕΑ

Η ακινητοποίηση με την τεχνική της προσρόφησης είναι η απλούστερη από τις υπόλοιπες τεχνικές και αποτελείται από αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βιοκαταλύτη και της επιφάνειας του υλικού-φορέα. Οι δυνάμεις οι οποίες αναπτύσσονται μεταξύ του βιοκαταλύτη και της επιφάνειας του φορέα είναι κυρίως ηλεκτροστατικής φύσης όπως δυνάμεις van der Waals, ιοντικές, δυνάμεις δεσμού υδρογόνου, αλλά και υδρόφοβες δυνάμεις. Αυτές οι δυνάμεις θεωρούνται ασθενείς, αλλά αρκετά μεγάλες στον αριθμό ώστε να προκαλέσουν τη δέσμευση του βιοκαταλύτη. Η διαδικασία της ακινητοποίησης περιλαμβάνει την ανάμιξη του βιοκαταλύτη με το υλικό, υπό κατάλληλες συνθήκες όπως pH, ιοντική ισχύς κ.α., για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και ύστερα την επαναλαμβανόμενη έκπλυση του υλικού για την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου βιοκαταλύτη.

Μερικά από τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η μικρή ή και μηδαμινή καταστροφή του βιοκαταλύτη, δεν πραγματοποιούνται χημικές μεταβολές στο υλικό - φορέα αλλά και στο βιοκαταλύτη, η αντιστρεπτότητα της τεχνικής επιτρέπει την ανανέωση του φορέα με φρέσκο βιοκαταλύτη καθώς και η απλότητα και το χαμηλό κόστος.

Μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι η εύκολη διαφυγή ή μετακίνηση του βιοκαταλύτη από το υλικό - φορέα, η μη συγκεκριμένη δέσμευση του βιοκαταλύτη και η υπερφόρτωση του βιοκαταλύτη στην επιφάνεια του φορέα. Το σημαντικότερο από αυτά είναι η διαφυγή του βιοκαταλύτη από το υλικό-φορέα η οποία μπορεί να προκύψει από περιβαλλοντολογικές αλλαγές στο pH, στη θερμοκρασία, στην ιοντική ισχύ ή και υπό άλλες συνθήκες όπως την αντίδραση του υποστρώματος με το φορέα, τη δέσμευση ανεπιθύμητων προσμίξεων που υπάρχουν στο υπόστρωμα, την παραγωγή προϊόντος, τη ροή του υποστρώματος, την ανάδευση, την απελευθέρωση αερίων κατά τη διάρκεια αντιδράσεων, την τριβή κομματιών του φορέα μεταξύ τους ή με τα τοιχώματα των δοχείων στα οποία βρίσκονται. Βέβαια η εύκολη απομάκρυνση του βιοκαταλύτη από το φορέα έχει σαν πλεονέκτημα και την εύκολη ανανέωσή του.

Η μη συγκεκριμένη δέσμευση του βιοκαταλύτη στο φορέα μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην περίπτωση όπου το υπόστρωμα, το προϊόν ή οι διάφορες προσμίξεις έχουν φορτίο και αλληλεπιδρούν με το φορέα. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμό της διάχυσης υποστρώματος-προϊόντος και προβλήματα στην κινητική της αντίδρασης. Επίσης, η δέσμευση πρωτονίων από το φορέα είναι δυνατό να μεταβάλλει το pH σε ορισμένες περιοχές του φορέα, επιδρώντας έτσι στη δράση του βιοκαταλύτη.

5.1.2 ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ

Αυτή η τεχνική ακινητοποίησης πραγματοποιείται με το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του βιοκαταλύτη και του φορέα ακινητοποίησης. Ο δεσμός αυτός

σχηματίζεται μεταξύ δραστικών ομάδων που ανήκουν στο βιοκαταλύτη και δραστικών ομάδων που ανήκουν στην επιφάνεια του φορέα. Στην περίπτωση των ενζύμων υπάρχουν διάφορες τέτοιες δραστικές ομάδες όπως οι αμινομάδες (-NH₂), οι καρβοξυλομάδες (-COOH), οι υδροξυλομάδες (-OH). Δύο είναι κυρίως οι μέθοδοι που ακολουθούνται στην ακινητοποίηση με ομοιοπολικό δεσμό. Η πρώτη έχει να κάνει με την ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων του φορέα και μετά την επαφή του με το βιοκαταλύτη, ενώ κατά τη δεύτερη μέθοδο χρησιμοποιούμε ένα διδραστικό αντιδραστήριο για την απ' ευθείας σύνδεση του φορέα με το βιοκαταλύτη. Πολλά υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς και υπάρχουν αρκετοί συνδυασμοί βιοκαταλύτη - φορέα που μπορούν να εφαρμοσθούν. Ανάμεσα σε αυτές τις δυνατές περιπτώσεις η κυριότερη παράμετρος που θα πρέπει να λάβουμε υπόψη είναι ο ομοιοπολικός δεσμός βιοκαταλύτη - φορέα να μη μειώνει σημαντικά την ενεργότητα του βιοκαταλύτη, απενεργοποιώντας τις δραστικές ομάδες του βιοκαταλύτη. Σε σχέση με την τεχνική της προσρόφησης, η τεχνική αυτή παρουσιάζει το σημαντικό πλεονέκτημα της μεγαλύτερης σταθερότητας του δεσμού βιοκαταλύτη - φορέα, περιορίζοντας σημαντικά το φαινόμενο διαφυγής του βιοκαταλύτη από το φορέα. Το υψηλό κόστος και η πολυπλοκότητα της τεχνικής αυτής, είναι ο κυριότερος λόγος για τον οποίο έχει αρκετές εφαρμογές σε εργαστηριακό επίπεδο, αλλά όχι και σε βιομηχανικό.

5.1.3 ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ

Η ακινητοποίηση με την τεχνική της παγίδευσης χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι ο βιοκαταλύτης περιορίζεται σε ένα συγκεκριμένο χώρο από κάποιο πορώδες υλικό. Το χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής, όπως και της τεχνικής του εγκλεισμού που θα αναλυθεί παρακάτω, είναι ότι δεν απαιτείται αλληλεπίδραση του βιοκαταλύτη με το φορέα για να επιτευχθεί η διαδικασία της ακινητοποίησης. Το μέγεθος των πόρων του υλικού θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να μην επιτρέπει στο βιοκαταλύτη να ξεφύγει προς το εξωτερικό διάλυμα αλλά και ταυτόχρονα να επιτρέπει την είσοδο ουσιών απαραίτητων για το βιοκαταλύτη (π.χ. θρεπτικά συστατικά για ζυμομύκητες) αλλά και την έξοδο των προϊόντων προς το διάλυμα. Αναπόφευκτα ο φορέας επιδρά ως φράγμα για τη μεταφορά μάζας από και προς το βιοκαταλύτη και παρ' όλο που το γεγονός αυτό έχει σημαντική επίδραση στην κινητική της αντίδρασης του βιοκαταλύτη, μπορεί να έχει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως την παρεμπόδιση συστατικών που μπορούν να βλάψουν το βιοκαταλύτη όταν έρθουν σε άμεση επαφή με αυτόν. Οι βασικότερες μέθοδοι παγίδευσης βιοκαταλυτών είναι οι εξής :

- α) Ιονοτροπική ζελατινοποίηση μακρομορίων με πολυσθενή κατιόντα (π.χ. αλγινικό)
- β) Ζελατινοποίηση με την επίδραση της θερμοκρασίας (π.χ. αγαρόζη, ζελατίνη)
- γ) Πολυμερισμός με χημική / φωτοχημική αντίδραση (π.χ. πολυακρυλαμίδιο)
- δ) Καταβύθιση από μη αναμίξιμο διαλύτη (π.χ. πολυστυρένιο)

Στην πρώτη περίπτωση, ο βιοκαταλύτης αναμειγνύεται με κατάλληλο πολυανιόντικό πολυμερές και στην συνέχεια η προσθήκη ενός πολυσθενούς κατιόντος οδηγεί σε μια αντίδραση ιοντοανταλλαγής με το πολυμερές, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας δικτυωτής δομής που παγιδεύει το βιοκαταλύτη. Συνήθως το σχήμα τέτοιων δομών είναι σφαιρικό με διάμετρο που ποικίλει από μερικά μm μέχρι και 5 mm. Στη δεύτερη περίπτωση ο διαλυτός φορέας αναμειγνύεται με το βιοκαταλύτη και στη συνέχεια με μεταβολή της θερμοκρασίας προκαλείται η ζελατινοποίησή του, επιτυγχάνοντας έτσι την παγίδευση του βιοκαταλύτη. Επίσης, μια αρκετά διαδεδομένη τεχνική είναι η ανάμειξη του βιοκαταλύτη με χημικά μονομερή, τα οποία στη συνέχεια πολυμερίζονται δημιουργώντας με αυτόν τον

τρόπο μια δικτυωτή δομή ικανή να παγιδεύσει το βιοκαταλύτη σε ένα συγκεκριμένο χώρο. Η τεχνική της καταβύθισης προκαλείται περισσότερο από διαχωρισμό φάσης ενός υδατικού από ένα μη υδατικό διάλυμα, παρά με χημική αντίδραση. Το γεγονός όμως ότι στην τεχνική αυτή μπορούν να χρησιμοποιηθούν λίγα υδατοδιαλυτά οργανικά διαλύματα που να μην καταστρέφουν το βιοκαταλύτη, περιορίζει σημαντικά την εφαρμογή της σε εξαιρετικά σταθερά ένζυμα ή μη ζωντανά κύτταρα.

Μερικά από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι η απλότητα και το χαμηλό κόστος, η δυνατότητα για ταυτόχρονη ακινητοποίηση περισσοτέρων του ενός βιοκαταλύτη και η διατήρηση της υψηλής ενεργότητας των βιοκαταλυτών κατά τη διαδικασία της ακινητοποίησης. Ένα από τα συχνότερα προβλήματα της τεχνικής αυτής είναι η περίπτωση που ο βιοκαταλύτης είναι μικροοργανισμός (π.χ. ζυμομύκητας) που έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται στην περιφέρεια του φορέα και να διαφεύγει προς το κύριο διάλυμα, δημιουργώντας έτσι ένα σύστημα από ακινητοποιημένους και ελεύθερους μικροοργανισμούς. Μια κοινή αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος είναι η επικάλυψη του φορέα από μια άλλη στοιβάδα του ίδιου φορέα, που δεν περιέχει όμως μικροοργανισμούς ή η επικάλυψή του από μεμβράνη.

5.1.4 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΑΨΟΥΛΕΣ Η ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, ο βιοκαταλύτης περιορίζεται σε συγκεκριμένο χώρο από την παρουσία μιας ημιπερατής μεμβράνης, που λαμβάνει τη μορφή μικροσφαιριδίου ή μικροκαψυλλίου. Η τεχνική αυτή μοιάζει με αυτήν της παγίδευσης στο γεγονός ότι ο βιοκαταλύτης περιορίζεται σε ένα συγκεκριμένο χώρο, αλλά τώρα ο βιοκαταλύτης έχει μεγαλύτερη ελευθερία και δυνατότητα κίνησης. Το μέγεθος των πόρων της ημιπερατής μεμβράνης μπορεί να ρυθμιστεί κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτρέπει τη διέλευση του υποστρώματος και των προϊόντων ελεύθερα, αλλά όχι και την έξοδο του βιοκαταλύτη προς το εξωτερικό περιβάλλον, όπως και μορίων μεγαλύτερου μεγέθους από αυτό των πόρων. Η ακινητοποίηση με την τεχνική αυτή, επιτυγχάνεται συνήθως με τη δημιουργία της μεμβράνης σε διάλυμα, όπου συνυπάρχει και ο βιοκαταλύτης. Ο σχηματισμός της μεμβράνης εγκλωβίζει το βιοκαταλύτη μέσα στα όρια που ορίζει η μεμβράνη αυτή. Πολλά υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση βιοκαταλυτών με την τεχνική αυτή όπως φυσικά πολυμερή (π.χ. αλγινικό), τεχνητά πολυμερή (π.χ. νάιλον) αλλά και βιολογικά κύτταρα (π.χ. ερυθρά αιμοσφαίρια). Τα κυριότερα προβλήματα με αυτήν την τεχνική έχουν να κάνουν με το φαινόμενο της διάχυσης. Η παρουσία της μεμβράνης εμποδίζει την μεταφορά υποστρώματος και προϊόντος από και προς το βιοκαταλύτη. Πολύ συχνά η μεμβράνη μπορεί να σπάσει εάν τα προϊόντα της αντίδρασης του βιοκαταλύτη συσσωρευτούν απότομα μέσα στην κάψουλα ή το σφαιρίδιο (π.χ. συσσώρευση αερίου CO₂ κατά τη διάρκεια ζύμωσης από ακινητοποιημένους ζυμομύκητες). Επίσης, πρόβλημα μπορεί να δημιουργηθεί όταν το ακινητοποιημένο σύστημα φορέα-βιοκαταλύτη έχει παρόμοια πυκνότητα με την κύρια μάζα του διαλύματος, ειδικά όταν δουλεύουμε με συστήματα συνεχούς ροής σε αντιδραστήρες. Ένα χαρακτηριστικό πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής, είναι η δυνατότητα για την ταυτόχρονη ακινητοποίηση περισσοτέρων του ενός βιοκαταλύτη.

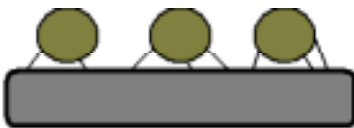
5.1.5 ΔΙΑΔΙΚΤΥΩΣΗ

Η τεχνική αυτή της ακινητοποίησης δεν απαιτεί κάποιο μέσο – φορέα, αλλά πραγματοποιείται όταν τα μόρια του βιοκαταλύτη έρχονται σε επαφή μεταξύ τους, με συνέπεια τη δημιουργία μεγαλύτερων τρισδιάστατων δομικών μονάδων. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να προκληθεί με φυσικές ή χημικές μεθόδους. Οι χημικές μέθοδοι βασίζονται στη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των μορίων του βιοκαταλύτη από κάποιο δι- ή πολυδραστικό αντιδραστήριο, όπως η γλουταραλδεΐδη και το δισοκυανικό τολουόλιο. Βασική προϋπόθεση για τη χρήση αυτών των αντιδραστηρίων είναι η μη τοξικότητά τους προς τους βιοκαταλύτες. Οι φυσικές μέθοδοι διαδικτύωσης, κυρίως με συσσωμάτωση, είναι αρκετά διαδεδομένες στη βιοτεχνολογία. Συστατικά όπως πολυαμίνες, πολυαιθυλενοδιαμίνη, φωσφορικά άλατα έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό. Η διαδικτύωση όμως σπάνια χρησιμοποιείται ως η τεχνική ακινητοποίησης, καθώς χαρακτηρίζεται από χαμηλή μηχανική αντοχή και σταθερότητα, αλλά και δυσκολία στο να ελέγξουμε το μέγεθος των δομικών μονάδων του βιοκαταλύτη, που προκύπτουν. Συχνά εφαρμόζεται σε συνδυασμό με κάποια από τις άλλες τεχνικές ακινητοποίησης, με σκοπό να τις ενισχύσει και κυρίως για να περιορίσει τη διαφυγή των μορίων του βιοκαταλύτη προς την κύρια μάζα του διαλύματος.

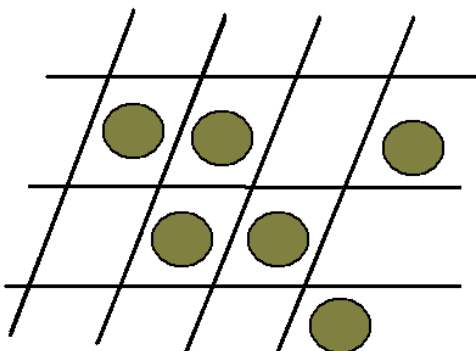
Τέλος, κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί ότι υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις κατά τις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί και συνδυασμός των παραπάνω τεχνικών, ανάλογα με το σκοπό και τον τρόπο χρήσης των ακινητοποιημένων βιοκαταλύτων[100].



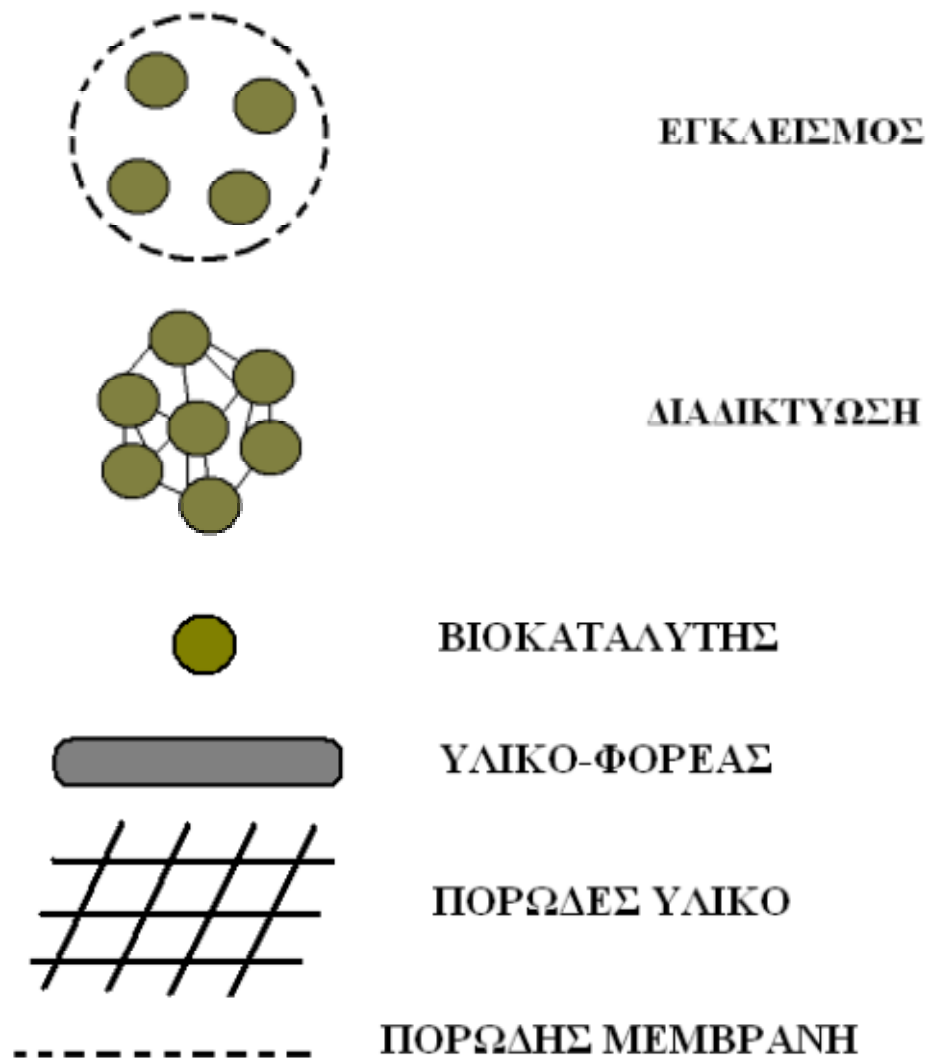
ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ



ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ



ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ



Εικόνα 33. Τεχνικές ακινητοποίησης μικροοργανισμών

5.2 ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ

Η μηχανική συγκράτηση των βιοκαταλυτών μπορεί να επιτευχθεί είτε με παγίδευση των κυττάρων με τη βοήθεια ενός μικροπορώδους φίλτρου μεμβράνης, είτε με παγίδευση των κυττάρων σε μικροκάψουλες, είτε με ακινητοποίηση κυττάρων πάνω σε μια μεσεπιφάνεια μεταξύ δύο μη αναμειγνυόμενων υγρών. Η τεχνική αυτή ακινητοποίησης χρησιμοποιείται κυρίως στην ανακύκλωση κυττάρων σε συνεχείς διαδικασίες. Ένα σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής ακινητοποίησης με μεμβράνες μικρών πόρων είναι η πιθανότητα χημικής μετατροπής της επιφάνειας των μεμβρανών των κυττάρων, που δημιουργείται λόγω της ανάπτυξης των κυττάρων, έχοντας σαν αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγικότητας τους καθώς και τη δημιουργία λειτουργικών προβλημάτων των μεμβρανών[112].

5.3 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ

Το ολοένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών, πηγάζει από το γεγονός ότι η τεχνολογία αυτή προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη δράση των ελεύθερων βιοκαταλυτών, όπως :

(α) Προστασία του βιοκαταλύτη από φυσικοχημικά φαινόμενα όπως θερμοκρασία, pH, οργανικούς διαλύτες, βαρέα μέταλλα, τοξικά συστατικά. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση της δραστικότητας του βιοκαταλύτη και τη δυνατότητα χρησιμοποίησής του σε συνθήκες που θα ήταν πολύ δύσκολο να δράσει υπό «ελεύθερη» μορφή (δράση σε ευρύτερα όρια pH και θερμοκρασίας),

(β) Εύκολος και άμεσος έλεγχος της αντίδρασης, με απλή προσθήκη ή αφαίρεση του βιοκαταλύτη,

(γ) Εύκολος και άμεσος διαχωρισμός του προϊόντος από το βιοκαταλύτη, αφού ο βιοκαταλύτης και το προϊόν βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις,

(δ) Οικονομία, αφού υπάρχει η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη, κάτι που είναι αρκετά δύσκολο με τη χρήση «ελεύθερων» βιοκαταλυτών. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα για αποθήκευση του βιοκαταλύτη για μεγάλο χρονικό διάστημα και η επαναχρησιμοποίησή του, χωρίς να μειωθεί σημαντικά η δραστικότητά του και

(ε) Δυνατότητα συνεχούς λειτουργίας της βιοκαταλυτικής αντίδρασης. Η προσάρτηση του βιοκαταλύτη σε κάποιο φορέα, εμποδίζει την απομάκρυνσή του από συστήματα συνεχούς ροής και επιτρέπει τη διατήρηση της βιομάζας σε σταθερή συγκέντρωση μέσα στους αντίστοιχους βιοαντιδραστήρες, ακόμα και σε υψηλές ταχύτητες αραίωσης.

Στην περίπτωση που ο βιοκαταλύτης είναι ζωντανός μικροοργανισμός, όπως οι ζυμομύκητες, υπάρχουν πολλά πειραματικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η ακινητοποίηση επιδρά τόσο στη φυσιολογία, όσο και στο μεταβολισμό τους.

Ειδικά για τη χρήση των ακινητοποιημένων ζυμομυκήτων στις διαδικασίες των ζυμώσεων, τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν σε σχέση με τους «ελεύθερους» ζυμομύκητες, είναι αρκετά και σημαντικά. Τα κυριότερα από αυτά αναφέρονται παρακάτω:

- Επιτυγχάνεται υψηλότερη πυκνότητα κυττάρων ανά όγκο διαλύματος – υποστρώματος, στο βιοαντιδραστήρα. Αυτό οδηγεί σε υψηλότερη παραγωγικότητα, μείωση του χρόνου ζύμωσης και μείωση των μη παραγωγικών φάσεων ανάπτυξης των κυττάρων,

- Αύξηση του ρυθμού κατανάλωσης του θρεπτικού υποστρώματος (σακχάρων), με αποτέλεσμα τη βελτίωση της απόδοσης της ζύμωσης,

- Αυξημένη ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικού υποστρώματος και μεγαλύτερη ευκολία ολοκλήρωσης της ζύμωσης,

- Αυξημένη ανθεκτικότητα στην ανασταλτική δράση των προϊόντων μεταβολισμού τους (π.χ. αιθανόλη),

- Καλύτερη μεταφορά μάζας. Σε συστήματα με «ελεύθερα» κύτταρα, η πυκνότητα των κυττάρων και του υποστρώματος είναι παραπλήσια, με αποτέλεσμα χαμηλές ταχύτητες μεταφοράς μάζας. Η αυξημένη πυκνότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερες ταχύτητες μεταφοράς μάζας,

- Δυνατότητα για πραγματοποίηση της ζύμωσης σε υψηλότερες ή χαμηλότερες θερμοκρασίες, σε σχέση με τους «ελεύθερους» μύκητες, βελτιώνοντας έτσι την ποιότητα του προϊόντος, ανάλογα με την περίπτωση (π.χ. οινοποίηση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες),

- Μείωση του κινδύνου μικροβιακής μόλυνσης λόγω της υψηλής κυτταρικής πυκνότητας.

Στην περίπτωση της συνεχούς ζύμωσης, επιτυγχάνεται απομάκρυνση των ελαφρύτερων βακτηρίων με τη βοήθεια της ροής, σε σχέση με τους βαρύτερους ακινητοποιημένους ζυμομύκητες. Δυνατότητα για ταυτόχρονη χρήση περισσότερου του ενός ζυμομύκητα ή συνδυαστική δράση ζυμομυκήτων και ενζύμων, αλλάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο το είδος και την ποιότητα του προϊόντος της ζύμωσης, αλλά και απλουστεύοντας πολύπλοκες διαδικασίες,

- Ειδικότερα, για αναερόβιους μικροοργανισμούς, το υλικό ακινητοποίησης τους προστατεύει από την τοξικότητα του οξυγόνου,

- Ακίνητοποιημένοι ζυμομύκητες που αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χαμηλές θερμοκρασίες, εμφανίζουν αυξημένη βιωσιμότητα και ενεργότητα σε σχέση με τους «ελεύθερους» ζυμομύκητες, υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες,
- Η παραγωγή οίνων με ακίνητοποιημένους ζυμομύκητες μπορεί να δώσει προϊόντα με καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, βελτιώνοντας έτσι την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

Ειδικότερα για την παρασκευή αφρωδών οίνων, η χρήση των ακίνητοποιημένων ζυμομυκήτων για την πραγματοποίηση της δεύτερης ζύμωσης μέσα στη φιάλη, μπορεί να απλουστεύσει τη διαδικασία παραγωγής τους (απαλλαγή από το στάδιο της ανακίνησης) και να μειώσει παράλληλα και το κόστος της όλης διαδικασίας[3].

5.4 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ

Η ακινητοποίηση των βιοκαταλυτών, πέρα από την πληθώρα των πλεονεκτημάτων που παρέχει σε σχέση με την δράση των «ελευθέρων» βιοκαταλυτών, παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα, τα οποία θα πρέπει να λάβουμε υπόψη πριν αποφασίσουμε για τον τρόπο με τον οποίο θα χρησιμοποιήσουμε κάποιον βιοκαταλύτη. Μερικά από τα πιο σημαντικά και πιο συχνά προβλήματα από τη χρήση των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών, είναι τα εξής:

(α) Μείωση της δραστηριότητας του βιοκαταλύτη κατά τη διαδικασία της ακινητοποίησης. Μερικές από τις τεχνικές ακινητοποίησης που αναφέρθηκαν παραπάνω, απαιτούν τη χρήση ουσιών που μπορεί να βλάψουν ή να απενεργοποιήσουν πλήρως κάποιον βιοκαταλύτη ή ακόμα και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες θα βρεθεί ο βιοκαταλύτης κατά τη διαδικασία της ακινητοποίησης, να έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητάς του. Επίσης, κάποιες από τις τεχνικές αυτές είναι δυνατό να απενεργοποιήσουν ενεργά κέντρα δράσης του βιοκαταλύτη (π.χ. απενεργοποίηση ενζύμων),

(β) Αποσταθεροποίηση του φορέα κατά τη χρήση των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών. Η αποσταθεροποίηση του φορέα, είναι δυνατό να έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή απελευθέρωση του βιοκαταλύτη προς το κυρίως διάλυμα. Το πρόβλημα αυτό είναι αρκετά σημαντικό, στην περίπτωση της χρήσης του βιοκαταλύτη σε διαδικασίες που έχουν σχέση με τρόφιμα ή φάρμακα όταν τα συστατικά του φορέα είναι επιβλαβή ή μη συμβατά με τους κανόνες που ισχύουν για τις περιπτώσεις αυτές,

(γ) Διαφυγή του βιοκαταλύτη από το μέσο ακινητοποίησης. Το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο σε μερικές τεχνικές (προσρόφησης). Στην περίπτωση που το φαινόμενο της διαφυγής είναι ανεπιθύμητο, τότε ανάλογα με την εφαρμοζόμενη τεχνική της ακινητοποίησης, είναι δυνατό να περιοριστεί ή και να αντιμετωπιστεί πλήρως,

(δ) Προβλήματα διάχυσης από και προς το φορέα. Τέτοια προβλήματα δημιουργούνται όταν ο φορέας εμποδίζει ή περιορίζει την είσοδο συστατικών απαραίτητων για την ανάπτυξη των βιοκαταλυτών. Πιο συχνά εμφανιζόμενη είναι η περίπτωση της ακινητοποίησης αερόβιων μικροοργανισμών, όπου η έλλειψη οξυγόνου γίνεται ο περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης και δράσης τους. Πρόβλημα όμως, μπορεί να δημιουργηθεί και όταν το προϊόν της αντίδρασης δε διαχέεται με ικανοποιητικό ρυθμό από το βιοκαταλύτη προς το εξωτερικό διάλυμα, με αποτέλεσμα η αύξηση της συγκέντρωσής του στο περιβάλλον του βιοκαταλύτη να περιορίζει τη δράση του,

(ε) Οικονομική αντιμετώπιση του θέματος. Η εφαρμογή των νέων διαδικασιών που προκύπτουν από τη χρήση των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών είναι εφικτή στη

βιομηχανία, μόνο όταν μπορεί να ανταγωνιστεί οικονομικά τις ήδη εφαρμοζόμενες διαδικασίες ή όταν τα νέα προϊόντα που προκύπτουν από τη χρήση των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών, έχουν προοπτική για οικονομικά κέρδη στις βιομηχανίες. Σε διαφορετική περίπτωση, η χρήση των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών περιορίζεται σε εργαστηριακό επίπεδο[100].

5.5 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ακινητοποίησης, γίνεται με βάση ακόλουθα κριτήρια:

1. Η μέθοδος πρέπει να είναι αρκετά ήπια ώστε να εξασφαλίζεται η ικανότητα αναγέννησης του βιοκαταλύτη αλλά και του ίδιου του φορέα.
2. Η διαδικασία πρέπει να είναι ικανή να επανενεργοποιηθεί μετά από απενεργοποίηση, η οποία μπορεί να συμβεί μετά από μακροχρόνια χρήση.
3. Η τεχνική της ακινητοποίησης πρέπει να επιτρέπει την επίτευξη υψηλής συγκέντρωσης βιομάζας μέσα στο βιοαντιδραστήρα και τη διατήρηση της σε αυτό το επίπεδο για μεγάλη χρονική περίοδο.
4. Η τεχνική της ακινητοποίησης πρέπει να είναι απλή και σχετικά οικονομική.
5. Το ακινητοποιημένο κυτταρικό σύστημα πρέπει να είναι σταθερό στις συνθήκες λειτουργίας (pH, θερμοκρασία)[112].

5.6 ΠΡΟΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ

Για την ακινητοποίηση βιοκαταλυτών, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγική διαδικασία (πχ. παραγωγή αλκοολούχων ποτών), πρέπει να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις όσο αφορά τα μέσο στο οποίο θα γίνει η ακινητοποίηση.

1. Το μέσο ακινητοποίησης θα πρέπει να διαθέτει μεγάλη επιφάνεια επαφής,
2. Το μέσο ακινητοποίησης θα πρέπει να είναι εύκολο στην χρήση και να μπορεί να αναγεννηθεί,
3. Η βιωσιμότητα των κυττάρων καθώς και η σταθερότητα της λειτουργικότητας του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη θα πρέπει να διατηρούνται σταθερά για μεγάλο χρονικό διάστημα,
4. Η βιολογική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών δεν θα πρέπει να επηρεάζεται από τη διαδικασία ακινητοποίησης τους,
5. Το πορώδες του μέσου ακινητοποίησης θα πρέπει να διευκολύνει την ανταλλαγή ουσιών και παραγομένων προϊόντων,
6. Το μέσο ακινητοποίησης θα πρέπει να παραμένει βιολογικά, μηχανικά και χημικά σταθερό και να μην επηρεάζεται από ένζυμα, διαλύματα ή αλλαγές της πίεσης. Σε αυτήν την περίπτωση όμως, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στην αποφυγή της πιθανότητας εκβλάστησης των ζυμών,
7. Το μέσο καθώς και η τεχνική ακινητοποίησης θα πρέπει να είναι εύχρηστα και με χαμηλό κόστος παρασκευής,
8. Το μέσο ακινητοποίησης θα πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας και να μην επηρεάζει την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος[119].

5.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η ακινητοποίηση κυττάρων σε κάποιο φορέα είναι γενικά αποδεκτό ότι επιφέρει αλλαγές στην ανάπτυξη των κυττάρων, στη φυσιολογία τους καθώς και στη μεταβολική τους δραστηριότητα. Οι αλλαγές αυτές είναι άμεσα συνδεδεμένες με το γεγονός ότι το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα ακινητοποιημένα κύτταρα συχνά διαφέρει από το περιβάλλον μιας καλλιέργειας ελευθέρων κυττάρων. Η ακινητοποίηση επιδρά κυρίως στην αλλαγή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, στην αλλαγή της μορφολογίας του κυττάρου και στην διάχυση των υποστρωμάτων και των προϊόντων από και προς το κύτταρο.

Συνοπτικά η ακινητοποίηση των κυττάρων οδηγεί σε:

- (1) Αλλαγή της μορφολογίας, όπου το σχήμα των κυττάρων που είναι εγκλωβισμένα σε πηκτή λόγω του περιορισμένου χώρου ανάπτυξης χάνει τη συμμετρία του,
- (2) Αυξημένη αντοχή τους στην αποθήκευση για μεγάλο χρονικό διάστημα,
- (3) Μεγάλη σταθερότητα σε διακυμάνσεις του pH, σε ότι αφορά τη ζυμωτική ικανότητα των κυττάρων που δε φαίνεται να επηρεάζεται για τιμές pH από 2,5 έως 6,2,
- (4) Μείωση του ενδοκυτταρικού pH που οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας της φωσφορικής φρουκτοκινάσης, της εξοκινάσης και της H⁺-ΑΤΡάσης. Το μειωμένο ενδοκυτταρικό pH των ακινητοποιημένων κυττάρων αποδόθηκε στην αυξημένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε πρωτόνια, πράγμα που οδήγησε σε ταχύτερο ρυθμό κατανάλωσης ATP για να διατηρείται σταθερό το ενδοκυτταρικό pH και άρα σε μειωμένη συγκέντρωση ATP στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μειωμένη συγκέντρωση του ATP είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας της φωσφοφρουκτοκινάσης, τη μείωση της συγκέντρωσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης και τον αυξημένο ρυθμό μεταφοράς της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό προκάλεσε αυξημένη γλυκολυτική δράση με παράλληλη αύξηση της παραγωγικότητας,
- (5) Αλλαγή του ενδοκυτταρικού περιεχομένου σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα, που αφορά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλυκογόνου, τρεχαλόζης, δομικών πολυσακχαριτών, DNA και RNA,
- (6) Μεγαλύτερα ποσά κεκορεσμένων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η διαπερατότητά της. Αυτό ευνοεί την ταχύτερη απομάκρυνση της αιθανόλης από το εσωτερικό των ακινητοποιημένων κυττάρων, καθιστώντας τα έτσι περισσότερο αλκοολοανθεκτικά,
- (7) Ποσοτικές αλλαγές στη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης που αφορούν υψηλότερες συγκεντρώσεις εργοστερόλης και φωσφολιπιδίων και εμφάνιση διαφορετικών ειδών μαννοπρωτεϊνών, σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Η πυκνή επαφή των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με το φορέα ακινητοποίησης ίσως να επηρεάζει απευθείας τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης,
- (8) Αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων εξοκινάσης, πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης και αλκοολικής αφυδρογονάσης σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα, καθώς επίσης και αυξημένη παραγωγή των κύριων προϊόντων μεταβολισμού με ταυτόχρονη μείωση της παραγωγής βιομάζας,
- (9) Αλλαγή στο μεταβολισμό και την ανάπτυξη των κυττάρων με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης. Η διαφορετική συμπεριφορά των ακινητοποιημένων κυττάρων σε σχέση με τα ελεύθερα οφείλεται στον περιορισμό της πρόσληψης θρεπτικών ουσιών εξαιτίας της

ύπαρξης διαφορετικού περιβάλλοντος γύρω από τα κύτταρα και της φυσικής επαφής των κυττάρων με το φορέα και τα γειτονικά κύτταρα,

(10) Αύξηση της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, μειωμένο χρόνο ζύμωσης, βελτιωμένη λειτουργική σταθερότητα και ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρου, σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Η ανθεκτικότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων στην ωσμωτική πίεση οφείλεται στην ύπαρξη βαθμωτής συγκέντρωσης σακχάρου γύρω από τα κύτταρα. Εάν ο ρυθμός διάχυσης της γλυκόζης στα κύτταρα είναι μικρότερος από το ρυθμό ζύμωσης, τότε η συγκέντρωση του σακχάρου γύρω από τα κύτταρα δεν παρεμποδίζει τη ζύμωση,

(11) Αυξημένη βιωσιμότητα και σταθερότητα κατά την ψύξη και τη λυοφιλίωση σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα,

(12) Βελτίωση της σύστασης των αρωματικών συστατικών στα προϊόντα της ζύμωσης με αύξηση της αναλογίας εστέρων/αλκοολών που περιέχονται σε αυτά. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην αλλαγή της μεταβολικής δραστηριότητας των ακινητοποιημένων ζυμών που σχετίζεται με τον ελαττωμένο ρυθμό πρόσληψης των αμινοξέων,

(13) Αυξημένη αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, που αποδίδεται στον προστατευτικό ρόλο του φορέα ακινητοποίησης,

(14) Αύξηση της δραστηριότητας της ιμπερτάσης, σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα[55,87,119].

5.8 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την ανάπτυξη και τις προοπτικές της τεχνολογίας των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών. Ειδικότερα αυτές αναφέρονται στην τεχνολογία των ζυμώσεων, στην επίδραση της ακινητοποίησης στις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των κυττάρων και την ποιότητα του προϊόντος. Ως υποστρώματα ακινητοποίησης κυττάρων για την παραγωγή αιθανόλης έχουν χρησιμοποιηθεί ανόργανα και οργανικά, συνθετικά και φυσικά προϊόντα, τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6. Υποστρώματα ακινητοποίησης στην παραγωγή αιθανόλης

ΦΟΡΕΑΣ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΥΛΙΚΑ	
Χρυσολίτης	Joeke et al., 1998
Σφαιρίδια από ανοξείδωτο ατσάλι επεξεργασμένα με TiCl ₄	Bekers et al., 1999
Κίσηρη	Kana et al., 1989a
γ-Αλουμίνα	Koutinas et al., 1988
Σφαιρίδια από ανοξείδωτο ατσάλι, granules αλουμίνας	Bekers et al., 2001
Μικροσφαίρες κεραμικών με οπές	Salter et al., 1990
Κεραμικά υλικά	Zhang et al., 1996
ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΥΛΙΚΑ	

Πολυπυρρόλιο	Baici et al., 2002
Πηκτή 2-υδρόξυ-μεθακρυλικού αιθυλεστέρα και ακρυλαμιδίου	Oztop et al., 2002
Πηκτή 2-ακρυλάμιδο-2-μέθυλοπροπανοθειϊκού οξέος και ακρυλικού διμεθυλεστέρα της πολυαιθυλενογλυκόλης	Lu & Fuj inaura, 2000
ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	
Πηκτίνη	Navvaro et al., 1983
Αλγινικό ασβέστιο	Yamagiwa et al., 1994
Μίσχος σακχαροκάλαμου	De Vasconcelos et al., 1998
Χιτοζάνη	Prakasham et al., 1999
Φυσικό καουτσούκ	Harris et al., 1998
Άγαρ	Nigam et al, 1998
Τεμάχια ξύλου	Razmovski & Pejin, 1996
Γλουτένη	Bardi et al., 1996a
Λυοφιλωμένη γλουτένη	Bekatorou et al., 2001a
Απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά	Bardi & Koutinas, 1994
Λυοφιλωμένα απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά	Iconomopoulou et al., 2000
Τραχανάς	Plessas et al., 2005a

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα έχουν γίνει αρκετές ερευνητικές προσπάθειες για την παραγωγή αιθανόλης, καθώς οι απαιτήσεις για αιθανόλη από τις βιομηχανίες αλκοολούχων ποτών ολοένα και αυξάνουν. Η φύση του φορέα ακινητοποίησης δεν επηρεάζει τη σύστασή της, καθώς τα μη πτητικά συστατικά, που πιθανά μεταφέρονται από το φορέα στο τελικό προϊόν, δεν αποσπάζονται. Έτσι στην περίπτωση αυτή η προϋπόθεση της καταλληλότητας του φορέα για παραγωγή τροφίμων δεν είναι απαραίτητη.

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των ακινητοποιημένων κυττάρων ευνοεί τη χρήση βιοαντιδραστήρων συνεχούς λειτουργίας, όπου επιτυγχάνονται υψηλές τιμές παραγωγικότητας με αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους της διεργασίας. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ερευνητικές εργασίες που αφορούν την παραγωγή αιθανόλης με ακινητοποιημένα κύτταρα σε βιοαντιδραστήρες συνεχούς λειτουργίας[119].

Πίνακας 7. Υποστρώματα ακινητοποίησης στη συνεχή παραγωγή αιθανόλης

ΦΟΡΕΑΣ
ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΥΛΙΚΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αλγινικό ασβέστιο, κίσηρη	Love étal., 1998
Χρυσολίτης	Wendhausen et al., 2001
Μίγμα έποξυρητίνης και οξειδίου του διαμινοπολυαιθυλενίου	Jirku, 1999
γ-Αλουμίνα	Koutinas & Kanellaki, 1990
Κίσηρη	Koutinas et al., 1991
Ζεόλιθος	Shindo et al., 2001
ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	
Αλγινικό ασβέστιο	Grote et al., 1980
Αγαρ	Lebeau et al., 1998
κ-καρραγενάνη	Nigam, 2000
Τεμάχια ξύλου	Guennete & Duvnjak, 1996
Σπόγγος Isofa, χιτοζάνη	Ogbonna et al., 1997
Τροποποιημένα σφαιρίδια κυτταρίνης	Szajani et al., 1996
Απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά	Kourkoutas et al., 2002c

Τρόφιμα ως φορείς ακινητοποίησης

Η χρήση ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών και αιθανόλης έχει μελετηθεί αρκετά και έχουν προταθεί κατάλληλοι φορείς ακινητοποίησης. Πρέπει όμως οι φορείς που θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ποτών να είναι κατάλληλοι για την παραγωγή τροφίμων. Για το λόγο αυτό έχουν γίνει αρκετές εργασίες με τη χρήση τροφίμων ως φορέων ακινητοποίησης. Έτσι οι φορείς αυτοί είναι ακίνδυνοι για τον καταναλωτή και ταυτόχρονα συνεισφέρουν στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Πίνακας 8. Φορείς ακινητοποίησης κυττάρων που είναι τρόφιμα στην παραγωγή οίνου, μύρας και αιθανόλης

ΦΟΡΕΑΣ	ΠΡΟΙΟΝ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Γλουτένη	Οίνος	Bardi et al., 1996
Φλοιοί σταφυλιών	Οίνος	Mallouchos et al., 2002, 2003b,d
Αχλάδι	Οίνος	Mallios et al., 2004
Μήλο	Οίνος	Kourkoutas et al., 2001, 2002a
Κυδώνι	Οίνος	Kourkoutas et al., 2002b, 2003 b
Καρπούζι	Οίνος	Reddy et al., 2008
Γκουάβα	Οίνος	Reddy et al., 2006
Σταφίδες	Οίνος	Tsakiris et al., 2004a,b, 2006
Φλοιοί πορτοκαλιών	Αιθανόλη	Plessas et al., 2007
Τραχανάς	Αιθανόλη	

		Plessas et al., 2005
Σακχαρότευτλο	Αιθανόλη	Yu et al., 2007
Μίσχος σακχαροκάλαμου	Αιθανόλη	De Vasconcelos et al., 1998
Σακχαροκάλαμο	Αιθανόλη	Liang et al., 2008
Λυοφιλιώμενη γλουτένη	Μπύρα	Bekatorou et al., 200 lb
Ξερά σύκα	Μπύρα	Bekatorou et al., 2002

Στην αλκοολική ζύμωση έχουν χρησιμοποιηθεί κύτταρα *S. cerevisiae* ακινητοποιημένα σε τραχανά, που είναι παραδοσιακό ελληνικό τρόφιμο, και έγιναν επαναλαμβανόμενες ασυνεχείς ζυμώσεις γλυκόζης σε διάφορες θερμοκρασίες με μεγάλη λειτουργική σταθερότητα. Φλοιοί πορτοκαλιών χρησιμοποιήθηκαν επίσης με επιτυχία για την ακινητοποίηση κυττάρων *S. cerevisiae*. Ο βιοκαταλύτης που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την παραγωγή αιθανόλης μέσω επαναλαμβανόμενων ζυμώσεων γλυκόζης, μελάσσας και εκχυλισμάτων σταφίδας, παρουσιάζοντας μάλιστα λειτουργική σταθερότητα και υψηλές τιμές παραγωγικότητας αιθανόλης. Τέλος έχει προταθεί και η χρήση του σακχαροκάλαμου ως φορέα ακινητοποίησης κυττάρων *S. cerevisiae* για την παραγωγή αιθανόλης μέσω επαναλαμβανόμενων ζυμώσεων συνθετικών θρεπτικών μέσων και μελάσσας. Οι βιοκαταλύτες επέδειξαν λειτουργική σταθερότητα κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων, ενώ οι παραγωγικότητες αιθανόλης ήταν μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες ζυμώσεις με ελεύθερα κύτταρα. Ακόμα μεγαλύτερες παραγωγικότητες επιτεύχθηκαν με τη χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων *S. cerevisiae* σε σακχαρότευτλο και σακχαροκάλαμο σε συνεχείς ζυμώσεις μελάσσας.

Στην παραγωγή οίνου και μπύρας έχουν προταθεί ως φορείς ακινητοποίησης διάφορα τρόφιμα όπως η γλουτένη, προϊόντα της βιομηχανίας οινοποίησης, δηλαδή φλοιοί σταφυλιών, σταφίδες και φρούτα. Συγκεκριμένα η γλουτένη έχει προταθεί ως φορέας ακινητοποίησης κυττάρων ζύμης για την παραγωγή οίνου και μπύρας. Τα προϊόντα είχαν πολύ καλή διαύγεια και μάλιστα περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα και χαμηλές ανωτέρων αλκοολών, σύσταση που συνεισφέρει θετικά στο άρωμα. Επίσης έχει μελετηθεί η χρήση πρώτων υλών οινοποιίας ως φορέων ακινητοποίησης κυττάρων για την παραγωγή ξηρών οίνων. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν ακινητοποιημένα κύτταρα *S. cerevisiae* σε σταφίδες για την παραγωγή ξηρών λευκών οίνων. Οι οίνοι που παράχθηκαν είχαν χαμηλή πτητική οξύτητα, χαμηλή συγκέντρωση μεθανόλης και ακεταλδεΐδης, ενώ ο οργανοληπτικός έλεγχος έδειξε την υπεροχή των οίνων με ακινητοποιημένα κύτταρα σε σχέση με αυτούς από ελεύθερα κύτταρα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν φλούδες σταφυλιών ως φορείς ακινητοποίησης και αναπτύχθηκε σύστημα για την παραγωγή ερυθρού οίνου με ακινητοποιημένα κύτταρα. Ο σχηματισμός αρωματικών ενώσεων κατά την οινοποίηση με ακινητοποιημένα και ελεύθερα κύτταρα έδειξε ότι οι βιοκαταλύτες που παράχθηκαν με ακινητοποίηση κυττάρων σε φλούδες σταφυλιών έδωσαν μεγαλύτερους ρυθμούς παραγωγής αρωματικών ενώσεων και ιδιαίτερα εστέρων. Η πτώση της θερμοκρασίας ζύμωσης οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης των εστέρων και μείωση των ανωτέρων αλκοολών. Τέλος μελετήθηκε και η χρήση φρούτων ως φορέων ακινητοποίησης όπως, το αχλάδι, το μήλο, το κυδώνι, το καρπούζι, η γκουάβα και τα ξερά σύκα [101].

5.9 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ

Η χρήση των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών έχει βρει πολλές εφαρμογές στη σύγχρονη ζωή τόσο σε εργαστηριακό - ερευνητικό, όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο. Οι πιο διαδεδομένες εφαρμογές είναι: η παραγωγή ξυδιού, μπύρας αλλά και μηλίτη οίνου. Ακόμη, ακινητοποιημένα κύτταρα σε διάφορα υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε εργαστηριακή κλίμακα για την παραγωγή άρτου, τυριού, αλκοολούχου ποτού από μέλι, για την κατεργασία αποβλήτων επεξεργασίας ανανά, για την κατεργασία τυρογάλακτος με σκοπό την παραγωγή αιθανόλης και γαλακτικού οξέος, καθώς και για την κατεργασία γάλακτος.

Επίσης η τεχνολογία τους έχει εισχωρήσει ακόμα και στην ιατρική με κέρια σημεία: την κατασκευή βιοτεχνητών οργάνων, όπως πάγκρεας, συκώτι, βιοτεχνητού δέρματος αλλά και βιοτεχνητά κύτταρα ως υποκατάστατα αίματος. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται πιο αναλυτικά οι εφαρμογές των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών[100].

Πίνακας 9. Οι σημαντικότερες εφαρμογές των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ-ΧΡΗΣΕΙΣ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
Παραγωγή οίνων - ποτών	[56], [75], [70], [36], [38], [91]
Βιοαισθητήρες	[35]
Τρόφιμα	[39], [15], [57]
Παραγωγή καυσίμων	[6]
Παραγωγή βιομάζας	[32]
Επεξεργασία αποβλήτων	[29], [69]

Βιομηχανικές εφαρμογές ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών

Γενικότερα, οι εφαρμογές των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών στη βιομηχανία είναι περιορισμένες. Αυτό οφείλεται στις δυσκολίες αλλαγής της υπάρχουσας τεχνολογίας, στην έλλειψη εξειδικευμένου προσωπικού και στην ανάγκη ανάπτυξης της απαραίτητης τεχνολογίας, ώστε να επιτυγχάνεται μεγάλη λειτουργική σταθερότητα. Οι πιο διαδεδομένες εφαρμογές τους είναι η παραγωγή ξυδιού, οργανικών οξέων και η επεξεργασία υδατικών αποβλήτων. Επίσης, η τεχνολογία των ακινητοποιημένων κυττάρων έχει εφαρμοσθεί στη γαλακτοβιομηχανία και τη βιομηχανία του κρέατος. Βιομηχανική εφαρμογή της ακινητοποίησης κυττάρων κατά την παραγωγή οίνου είναι η χρήση της πηκτής αλγινικού νατρίου σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας. Τέλος, πολλά διπλώματα ευρεσιτεχνίας έχουν γίνει για την παραγωγή αφρωδών οίνων με ακινητοποιημένα κύτταρα αλλά η μέθοδος σπάνια εφαρμόζεται σε βιομηχανική κλίμακα και σε εμπορικό επίπεδο[100].

5.10 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΕΣ

Παραγωγή οίνου με ακινητοποιημένα κύτταρα

Η χρησιμοποίηση των ακινητοποιημένων ζυμών στην παραγωγή κρασιού γίνεται με σκοπό την αύξηση της παραγόμενης αλκοόλης καθώς και για την βελτίωση του αρώματος, της γεύσης και της ποιότητας του τελικού προϊόντος.

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την ακινητοποίηση στην παραγωγή κρασιού είναι κυρίως οργανικοί πολυσακχαρίτες ή ανόργανα υλικά. Οι ουσίες αυτές μπορεί είτε να χρησιμοποιηθούν ύστερα από μια μικρή τροποποίηση, είτε ύστερα από μια μικρή κατεργασία ώστε οι ιδιότητες τους να μεταβληθούν, όπως για παράδειγμα το πορώδες, είτε παραλαμβάνοντας τις μετά από σύνθεση. Παραδείγματα μέσω και τεχνικών ακινητοποίησης που προτείνονται για την παραγωγή κρασιού θα αναφερθούν παρακάτω[55].

ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΜΕΣΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΡΑΣΙΟΥ

Κίσσηρη έχει βρεθεί στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στο ηφαίστειο της Σαντορίνης. Είναι ένα πορώδες και φτηνό ορυκτό που αποτελείται κυρίως από SiO₂. Χρησιμοποιήθηκε στην ακινητοποίηση ζυμών για την παραγωγή κρασιού με συνεχόμενη και σε χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωση[10,11]. Στο παραγόμενο κρασί παρατηρήθηκε βελτίωση του αρώματος του, αύξηση της περιεκτικότητας του σε οξικό αιθυλεστέρα καθώς και μείωση της περιεκτικότητας του σε ανώτερες αλκοόλες σε σχέση με την ολική συγκέντρωση των πτητικών συστατικών που περιέχονται στο κρασί. Η παραγωγικότητα, με τη χρήση του σε ζύμωση όπου η θερμοκρασία ήταν χαμηλή, της τάξεως των 5° C, ήταν ίδια με την παραδοσιακή ζύμωση όπου η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 22-25° C. Οι Argiriou et al.[3] στην εργαστηριακή τους έρευνα ακινητοποίησαν τον *S. Cerevisiae* με τη βοήθεια του ορυκτού κίσσηρη. Η ζύμωση λάμβανε χώρα στους 0 °C χωρίς αυξομειώσεις. Παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής σε αιθανόλη καθώς και της σταθερότητας του βιοκαταλύτη που διατηρήθηκε για 2,5 χρόνια τόσο σε μια παρτίδα ζύμωσης όσο και σε παρτίδα από συνεχόμενες ζυμώσεις.

Οι Loukatos et al. [63] χρησιμοποίησαν για την ακινητοποίηση των ζυμών γ-οξείδιο του αργιλίου για συνεχείς ζυμώσεις. Παρατήρησαν ότι η περιεκτικότητα των ανώτερων αλκοολών μειώθηκε στο τελικό προϊόν. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ποιότητας του κρασιού και της μείωσης της τοξικότητας του[55].

Τα ανόργανα μέσα ακινητοποίησης αν και αυξάνουν την παραγωγικότητα της ζύμωσης και σε πολλές περιπτώσεις το άρωμα του παραγόμενου κρασιού θεωρούνται ανεπιθύμητα στην παραγωγή κρασιού, λόγω της πιθανής εναπόθεσης μεταλλικών υποπροϊόντων στο προϊόν.

ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΜΕΣΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΡΑΣΙΟΥ

Τα οργανικά μέσα ακινητοποίησης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών είναι κυρίως ουσίες πολυμερισμού όπως οι πολυσακχαρίτες. Στην παραγωγή κρασιού με ακινητοποιημένες ζύμες χρησιμοποιούνται συνήθως άγαρ, κυτταρίνη και χιτοζάνη[57].

Οι Ciani and Ferraro[27] έκαναν δοκιμαστικές ζυμώσεις χρησιμοποιώντας το στέλεχος *Candida stellata* ακινητοποιημένο σε αλγινικό ασβέστιο και σε συνδυασμό με το στέλεχος *S. Cerevisiae* αποσκοπώντας στην αύξηση της περιεκτικότητας σε γλυκερόλη στο παραγόμενο κρασί. Τα ακινητοποιημένα κύτταρα των στελεχών της *Candida stellata* και του *S. Cerevisiae* έδειξαν γύρω στις 30 και 2 φορές αντίστοιχα, αύξηση της παραγόμενης γλυκερόλης συγκρινόμενα με τη ζύμωση ελεύθερων κυττάρων της *Candida stellata* και του *S. Cerevisiae*. Σε ζυμώσεις με ακινητοποιημένα στελέχη της *Candida stellata* παρατηρήθηκε αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης κατά 2 φορές και αισθητή μείωση της ακεταλδεύδης και της ακετόνης στο τελικό προϊόν σε σύγκριση με ζυμώσεις με ελεύθερα κύτταρα του ίδιου στελέχους. Οι Ferraro et al.[32] χρησιμοποίησαν ακινητοποιημένα κύτταρα του στελέχους *Candida stellata* σε αλγινικό ασβέστιο για την παραγωγή κρασιού με σκοπό την καταστολή των άγριων ζυμών που περιέχονταν στο γλεύκος στην αρχή της ζύμωσης. Παρατηρήθηκε ότι οι άγριες ζύμες ήταν παρούσες σε σημαντική αναλογία μετά από ζύμωση τριών ημερών αλλά η παρουσία τους αυτή δεν επηρέασε την μεταβολική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων της *Candida stellata*. Η χρήση θειώδη ανυδρίτη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης έκανε δυνατή τη μείωση της δραστηριότητας άγριων ζυμών που δεν ανήκουν στο είδος *S. Cerevisiae*. Παρόλα αυτά όμως η αύξηση των άγριων ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης θα έπρεπε να αυξηθεί η συγκέντρωση των ακινητοποιημένων κυττάρων της *Candida stellata*. Η αύξηση της συγκέντρωσης της *Candida stellata* αύξησε την παραγωγικότητα του επιτρέποντας όμως και την αύξηση της συγκέντρωσης του *S. Cerevisiae*. Συμπερασματικά, δεν ήταν δυνατή η πλήρης καταστολή της δραστηριότητας των άγριων ζυμών σε μη στειρωμένο περιβάλλον. Παρόλα αυτά όμως, το παραγόμενο κρασί παρουσίαζε ένα ενδιαφέρον φάσμα αρωμάτων.

Η καταλληλότητα τη χρήσης των υδροπηκτών για την ακινητοποίηση ενζύμων στην παραγωγή κρασιού, έχει επίσης ερευνηθεί. Υποστρώματα ακινητοποίησης όπως η χιτίνη, η χιτοζάνη και η δυεθυλ-αμινο-εθυλ χιτοζάνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση του ενζύμου α-L-ραμο-πυρανοσιντάσης. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως με σκοπό την αύξηση του αρώματος των κρασιών, του γλεύκους, των χυμών φρούτων και των ποτών μέσω της διάσπασης των γλυκοσιδικών δεσμών της ραμνόζης με άλλες ενώσεις όπως πρόδρομους αρωματικών στοιχείων τα οποία βρίσκονται στη γλυκοσιδική τους μορφή. Η δυεθυλ-αμινο-εθυλ χιτοζάνη σε συνδυασμό με το ένζυμο από το καρβο-διιμιδιο έχει προταθεί ως η καταλληλότερη μέθοδος για την παρασκευή κρασιού[55,89,99].

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΡΑΣΙΟΥ

Αναφορές σχετικά με την χρήση μεμβρανών στην παραγωγή κρασιού είναι περιορισμένες. Οι Takaya et al.[91] μελέτησαν την ικανότητα, δύο συστημάτων αποτελούμενων από μεμβράνες συνεχούς παραγωγής ξηρού κρασιού. Το πρώτο σύστημα τους αποτελείται από ένα μόνο βιοαντιδραστήρα όπου τα κύτταρα παγιδεύονταν από ένα μικρόφιλτρο διασταυρούμενης ροής. Το δεύτερο σύστημα αποτελούσαν από δύο δοχεία. Το ένα λειτουργούσε ως αντιδραστήρας δεξαμενής κίνησης και το άλλο ήταν ο μεμβρανοβιοαντιδραστήρας. Το πρώτο σύστημα δεν ήταν κατάλληλο για την παραγωγή ξηρού κρασιού εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων υπολειμματικών σακχάρων που περιέχονταν

σε αυτό. Σε αντίθεση στο δεύτερο σύστημα παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγικότητας κατά 28 φορές σε σύγκριση με το απλό σύστημα παραγωγής κρασιού[55].

ΦΥΣΙΚΑ ΜΕΣΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΡΑΣΙΟΥ

Η χρήση φυσικών μέσων για την ακινητοποίηση ζυμών όπως υλικά κυτταρίνης[12] καθώς και σφαιρίδια γλουτένης[11,12] για την παραγωγή κρασιού αποδείχθηκε αποτελεσματική τόσο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όσο και σε χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης. Συγκρίνοντας ζυμώσεις μεταξύ ακινητοποιημένων ζυμών με τη χρήση κάποιου από τα παραπάνω μέσα και ελεύθερων ζυμών, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της ζυμωτικής ικανότητας των ακινητοποιημένων ζυμών. Τα παραγόμενα κρασιά περιείχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανώτερων αλκοολών και υψηλότερες συγκεντρώσεις σε οξικό αιθυλεστέρα σε σχέση με την συνολική συγκέντρωση των πτητικών συστατικών του κρασιού. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την βελτίωση της οργανοληπτικής ποιότητας των παραγόμενων κρασιών[48]. Συμπεράναν ότι, ο συνδυασμός τόσο της θερμοκρασίας όσο και των ακινητοποιημένων κυττάρων στην παραγωγή κρασιών δίνει στο παραγόμενο προϊόν περισσότερα φρουτώδη χαρακτηριστικά από ότι αν χρησιμοποιούνταν ελεύθερες ζύμες λόγω της καλύτερης αναλογίας μεταξύ των εστέρων με τις αλκοόλες και της οξύτητας.

Τα υλικά κυτταρίνης και σφαιρίδια γλουτένης είναι μέσα υψηλής καθαρότητας, φθηνά, βρίσκονται σε αφθονία και μπορούν να παρασκευαστούν με ευκολία. Σε σύγκριση με άλλα μέσα ακινητοποίησης, όπως για παράδειγμα κομμάτια φρούτων, παρουσιάζουν μεγαλύτερη λειτουργική σταθερότητα. Στην προσπάθεια εμπορευματοποίησης των ακινητοποιημένων ζυμών με τη χρήση τους σε υλικά κυτταρίνης και σφαιρίδια γλουτένης διεξήχθησαν πειράματα ψύξης – ξήρανσης τους. Η χρήση ακινητοποιημένων ζυμών με την διαδικασία ψύξης – ξήρανσης οδήγησε στην παρασκευή κρασιών της ίδιας ποιότητας σε σχέση με την χρήση φρέσκων ακινητοποιημένων κυττάρων και βελτιωμένης ποιότητας συγκρινόμενα με κρασιά που είχαν παραχθεί από ζύμωση ελεύθερων ζυμών[47,48]. Γενικά, η διάρκεια της ζύμωσης τους ήταν μικρότερη. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι ήταν κατάλληλα για ζυμώσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η ψύξη – ξήρανση των κυττάρων κάνει δυνατή την αποθήκευσή τους για μεγάλες χρονικές περιόδους, χωρίς να χάσουν τη βιωσιμότητα ή την ικανότητα ζύμωσης τους. Κομμάτια φρούτων έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα ακινητοποίησης για την παρασκευή κρασιού, λόγω της ευκολίας των τεχνικών ακινητοποίησης οι οποίες απαιτούνται. Οι Kourkoutas et al. έχουν προτείνει το μήλο[51] και το κυδώνι[54] ως υποστρώματα ακινητοποίησης κυττάρων ψυχρόφιλης και αλκοολοανθεκτικής ζύμης για παραγωγή οίνου. Τα υποστρώματα αυτά είναι φθηνά, υγιεινά και κατάλληλα για παραγωγή τροφίμων, ενώ η ακινητοποίηση κυττάρων σε τέτοια υποστρώματα είναι απλή. Τα τελικά προϊόντα που προέκυψαν είχαν βελτιωμένο οργανοληπτικό χαρακτήρα, ενώ οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν τα ανωτέρω υποστρώματα για τη συνεχή παραγωγή οίνου. Ανάλογα αποτελέσματα με τα προηγούμενα έχουν αναφερθεί σε ασυνεχείς και συνεχείς ζυμώσεις γλεύκους με κύτταρα ακινητοποιημένα σε σταφίδες[95], σε φλοιούς σταφυλιών[67] και σε αχλάδι[65,119].

Κύτταρα του στελέχους *S. Cerevisiae* ακινητοποιήθηκαν πάνω σε ξηρές σταφίδες για την παραγωγή λευκού ξηρού κρασιού[95]. Ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης βρέθηκε να είναι κατάλληλος για την παραγωγή κρασιού σε ζυμώσεις δωματίου. Το παραγόμενο κρασί είχε μικρές συγκεντρώσεις πτητικών οξέων, μεθανόλης και ακεταλδεύδης, ενώ τα πτητικά παραπροϊόντα δεν έδειξαν σημαντική διαφορά από αυτή των κρασιών που παράγονται με ελεύθερες ζύμες[67]. Το υπόστρωμα ήταν κατάλληλο για παραγωγή κρασιού και η περαιτέρω χρήση του ερευνάται σε άλλες διαδικασίες συμπεριλαμβανομένων της πρωτογενούς και δευτερογενούς ζύμωσης του κρασιού[55,99].

5.11 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Η μέθοδος της ακινητοποίησης κυττάρων έχει ερευνηθεί και στη μηλογαλακτική ζύμωση των οίνων, η οποία μετατρέπει το μηλικό οξύ σε γαλακτικό με σκοπό τη μείωση της οξύτητας[32,46].

Οι Kosseva & Kennedy [49] χρησιμοποίησαν κύτταρα *Lactobacillus casei* ακινητοποιημένα σε πηκτή πηκτικού ασβεστίου και λυοφιλιωμένα κύτταρα *Oenococcus oeni* για μηλογαλακτική ζύμωση σε οίνους Chardonnay. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της οξύτητας, του διοξειδίου του θείου και η περιεκτικότητα των οργανικών οξέων. Τα ακινητοποιημένα βακτήρια οδήγησαν στη βιομετατροπή του μηλικού οξέος κατά 30% και σε αύξηση του pH των οίνων από 3.15 σε 3.4, ενώ τα λυοφιλιωμένα κύτταρα σε βιομετατροπή 48% και αύξηση του pH από 3.15 σε 3.6, αντίστοιχα. Ο βαθμός μετατροπής του μηλικού οξέος στους οίνους ήταν δύο φορές μεγαλύτερος όταν χρησιμοποιήθηκε ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης αντί των ελευθέρων κυττάρων *L.casei*. Επίσης, ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης επέδειξε μεγάλη λειτουργική σταθερότητα που έφθασε τους 6 μήνες χωρίς τη μείωση της δραστηριότητάς του, ενώ η χρήση του οδήγησε σε αυξημένους ρυθμούς ζύμωσης οίνου[64].

Οι Agouridis et al.[1] ακινητοποίησαν κύτταρα *Lactobacillus casei* σε απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά και ο βιοκαταλύτης χρησιμοποιήθηκε για μηλογαλακτική ζύμωση οίνων που παρήχθησαν με τη χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων *S. cerevisiae* σε απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά. Συνολικά, έγιναν 11 επαναλαμβανόμενες παρτίδες αλκοολικής ζύμωσης, ακολουθούμενες από επαναλαμβανόμενες παρτίδες μηλογαλακτικής. Παρατηρήθηκε αποικοδόμηση του μηλικού, το pH ελαττώθηκε κατά 0.5-1 μονάδα, ενώ η συγκέντρωση του οξικού οξέος ελαττώθηκε λίγο ή παρέμεινε σταθερή. Τέλος, οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών ελαττώθηκαν, ενώ η συγκέντρωση του οξικού αιθυλεστέρα αυξήθηκε, οδηγώντας σε βελτίωση της ποιότητας των τελικών προϊόντων της μηλογαλακτικής[55,119].

Η τεχνική των ακινητοποιημένων ζυμών αποτελεί μια βελτιωμένη και ασφαλέστερη μέθοδο. Η ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση με τη χρήση επιλεγμένων βακτηρίων παρέχει πλεονεκτήματα όπως:

- Απαιτεί μικρότερο χρόνο ενώ η ανάπτυξη των στελεχών των βακτηρίων στη φυσική μηλογαλακτική ζύμωση επηρεάζεται άμεσα από τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τα φυσικά στοιχεία του κρασιού, όπως λιπαρά οξέα και αιθανόλη,
- Είναι δυνατή η ανάπτυξη του επιθυμητού αρώματος με τη χρήση επιλεγμένων στελεχών βακτηρίων,
- Παρέχεται η δυνατότητα επιτάχυνσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης,
- Η δυνατότητα εφαρμογής και εμπορευματοποίησης της διαδικασίας της ζύμωσης μέσω λυοφιλοποιημένων και ακινητοποιημένων στελεχών,
- Η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων κυττάρων σε συνεχόμενες διαδικασίες μηλογαλακτικών ζυμώσεων[99].

5.12 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΠΥΡΑΣ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η αλκοολική ζύμωση, κατά τη διάρκεια παραγωγής μπύρας, απαιτεί έξι με επτά μέρες για να ολοκληρωθεί. Ο Linko [59] υποστηρίζει ότι με τη χρήση ακινητοποιημένων ζυμών ο χρόνος ζύμωσης μπορεί να μειωθεί χωρίς να παρατηρηθεί αρνητική επίδραση στην

ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος. Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί έρευνες που αφορούν τις τεχνικές ακινητοποίησης για την παραγωγή μπύρας με συνεχείς διαδικασίες ζύμωσης καθώς και για τη μείωση του χρόνου ωρίμανσης της. Με τη βοήθεια των ακινητοποιημένων ζυμών, έχουν γίνει έρευνες για την παραγωγή μπύρας χωρίς αλκοόλη.

ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΜΕΣΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΠΥΡΑΣ

Πολλά οργανικά υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα ακινητοποίησης των ζυμών για την παραγωγή μπύρας, όπως ταινία πολυαιθυλενίου, αλγινική πηκτή. Σε έρευνες εργαστηρίου έχει χρησιμοποιηθεί ένα σύστημα αντιδραστήρα δύο φάσεων χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένες ζύμες[31].

Η κύρια ζύμωση πραγματοποιούνταν, με τη χρήση ακινητοποιημένων ζυμών, σε έναν αντιδραστήρα στον οποίο διοχετεύονταν ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα. Η θερμοκρασία ζύμωσης διατηρούνταν στους 15° C. Το παραγόμενο προϊόν από τον πρώτο αντιδραστήρα συλλεγόταν σε μια δεξαμενή. Η δευτερεύουσα ζύμωση διεξαγόταν σε κολώνες, οι οποίες αποτελούνταν από οχτώ στρώματα τα οποία περιείχαν ζύμες παγιδευμένες σε τρεις διαφορετικές πηκτές πολυσακχαριστών και από ελεύθερες ζύμες. Και τα τρία υποστρώματα ακινητοποίησης βρέθηκαν κατάλληλα για την αξιοποίηση τους σε συνεχόμενες δευτερεύουσες ζυμώσεις.

Σε μια άλλη έρευνα παρατηρήθηκε ότι η αξιοποίηση βυθοζυμών *S. Carlsbergensis*, ακινητοποιημένων σε πηκτή ασβεστίου και καραγηνικού ασβεστίου έδωσε προϊόν με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε διακετύλιο και ανώτερες αλκοόλες σε θερμοκρασίες ζύμωσης από 5°C μέχρι 20° C. Επίσης οι Smogronίcova και Domeny[88] ισχυρίστηκαν ότι τα χαρακτηριστικά της μπύρας που παράχθηκε με τη χρήση ζυμών προσροφημένων σε διαθυλαμινοαιθυλο-κυτταρίνη ήταν ίδια με μπύρες που παράγονται με χρήση ελεύθερων κυττάρων ζύμης. Η συγκέντρωση του διακετύλιου σε μπύρες που παρήχθησαν με χρήση ακινητοποιημένων ζυμών σε πηκτή ασβεστίου και καραγηνικού ασβεστίου μειωνόταν όσο η θερμοκρασία ζύμωσης αυξανόταν. Αντίθετα στις μπύρες που παρήχθησαν με τη χρήση ακινητοποιημένων ζυμών σε διαιθυλαμινοαιθυλο-κυτταρίνη καθώς και ελεύθερων ζυμών παρατηρήθηκε ακριβώς το αντίθετο φαινόμενο.

Έχει χρησιμοποιηθεί επίσης, αλγινικό ασβέστιο για την ακινητοποίηση ζυμών με επιτυχία σε ζυμώσεις ζυθογλεύκους υψηλής πυκνότητας μέσα σε οχτώ μέρες. Ο χρόνος αυτός είναι ο μισός από αυτόν που απαιτείται για ζυμώσεις τέτοιου ζυθογλεύκους με ελεύθερες ζύμες. Παρατηρήθηκε ακόμα ότι όταν η πυκνότητα του ζυθογλεύκους μειωνόταν ο ρυθμός παραγωγής παρέμενε σταθερός και η βιωσιμότητα των ζωντανών κυττάρων δεν έπεφτε κάτω από 95%, επιβεβαιώνοντας την προστασία που παρέχει από την ωσμωτική πίεση η πηκτή στα κύτταρα[55].

ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΜΕΣΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΠΥΡΑΣ

Ένας από τους λόγους για τον μεγάλο χρόνο ωρίμανσης είναι το γεγονός ότι οι ζύμες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή μπύρας στερούνται του ενζύμου α-κετογαλακτική αποκαρβοξυλάση το οποίο μετατρέπει το συντιθέμενο κατά τη ζύμωση α-κετογαλακτικό οξύ. Το α-κετογαλακτικό οξύ στερείται οσμής αλλά με τη μετατροπή του σε διακετύλιο δίνει στη μπύρα ανεπιθύμητη οσμή. Η απομάκρυνση του διακετύλιου περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο το α-κετογαλακτικό μετατρέπεται μη ενζυμικά σε διακετύλιο ενώ στο δεύτερο το διακετύλιο ενζυμικά σε ακετοίνη. Η επιτάχυνση του δεύτερου σταδίου είναι δυνατόν να

επιτευχθεί με τη χρήση αντιδραστήρα και ακινητοποιημένων ζυμών σε ανόργανα συστατικά, όπως διατομίτης και πορώδες γυαλί[55].

ΦΥΣΙΚΑ ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΜΕΣΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΠΥΡΑΣ

Η χρήση ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών, σε φυσικά οργανικά μέσα, βρέθηκε ότι παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα στην παραγωγή μπύρας. Η ακινητοποίηση των ζυμών έγινε σε σφαιρίδια γλουτένης και υλικά κυτταρίνης παρατηρήθηκε ότι διατήρησαν την ικανότητα ζύμωσής τους για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι παραγόμενες μπύρες ήταν διαυγείς και η περιεκτικότητά τους σε ελεύθερες ζύμες ήταν χαμηλή. Επίσης σε σύγκριση με μπύρες που παρήχθησαν με ελεύθερες ζύμες η περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες και σε διακετύλιο ήταν χαμηλότερη. Έτσι, η μεγαλύτερη σε διάρκεια σταθερότητα της παραγόμενης μπύρας, η δυνατότητα παραγωγής της σε χαμηλές θερμοκρασίες, η διαύγεια και το βελτιωμένο άρωμα της μπύρας μετά την κύρια ζύμωση, η αφθονία και το χαμηλό κόστος των συγκεκριμένων μέσων ακινητοποίησης είναι παράγοντες που ευνοούν την χρήση ακινητοποιημένων ζυμών σε υλικά κυτταρίνης και σφαιρίδια γλουτένης για συνεχείς ζυμωτικές διαδικασίες.

Επίσης ως μέσο ακινητοποίησης του *S. Cerevisiae* έχουν χρησιμοποιηθεί και τα ξερά σύκα[17]. Με επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις του ζυθογλεύκου σε χαμηλές θερμοκρασίες καθώς και σε θερμοκρασία δωματίου παρατηρήθηκε μείωση του χρόνου που απαιτείται για την ολοκλήρωση της ζύμωσης. Επίσης, η ερευνητική ομάδα ισχυρίστηκε ότι η παραγόμενη μπύρα ήταν διαυγής, είχε γλυκιά γεύση, με απαλό και διακριτικό άρωμα σύκου που την έκαναν να ξεχωρίζει αισθητά από τις μπύρες του εμπορίου[55,99].

5.13 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΗΛΙΤΗ ΟΙΝΟΥ

Η χρήση της τεχνολογίας των ακινητοποιημένων κυττάρων ερευνήθηκε και στην παραγωγή μηλίτη οίνου[23,80,86]. Οι Nedovic et al. [73] συνακίνητοποίησαν κύτταρα *S. bayanus* και *L. oenos* σε πηκτή αλγινικού ασβεστίου με σκοπό ταυτόχρονη αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση χυμού μήλου για την παραγωγή μηλίτη οίνου σε συνεχή βιοαντιδραστήρα κλίνης. Σε σχέση με την παραδοσιακή παραγωγή μηλίτη οίνου, το σύστημα αυτό οδήγησε σε υψηλότερους ρυθμούς αλκοολικής και μηλογαλακτικής ζύμωσης και σε καλύτερο έλεγχο στο σχηματισμό του αρώματος. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε δραστική ελάττωση των ανώτερων αλκοολών, του οξικού ισοαμυλεστέρα και του διακετυλίου. Η επίδραση αυτή αποδόθηκε στην αλλαγή του μεταβολισμού των ακινητοποιημένων κυττάρων. Τέλος, έγινε δυνατή η παραγωγή ξηρού μηλίτη, καθώς και μηλίτη με υψηλή συγκέντρωση αζύμωτου σακχάρου με τον έλεγχο της τροφοδοσίας του βιοαντιδραστήρα.

Επίσης, κύτταρα *Oenococcus oeni* απομονώθηκαν από βιομηχανία παραγωγής μηλίτη και ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια αλγινικών. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως αρχική καλλιέργεια για την μηλογαλακτική ζύμωση μηλίτη οίνου[43]. Τα ακινητοποιημένα κύτταρα οδήγησαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις οξικού οξέος και οξικού αιθυλεστέρα, καθώς και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλκοολών. Τα αποτελέσματα αυτά θεωρήθηκαν από τους συγγραφείς ως θετική συνεισφορά στο άρωμα του μηλίτη οίνου[119].

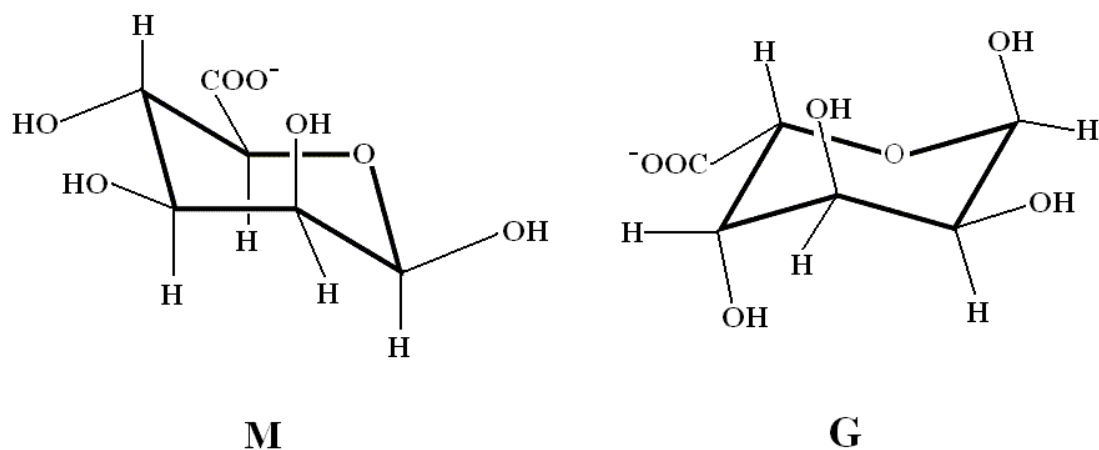
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΛΓΙΝΙΚΟ

Το αλγινικό είναι ένας υδρόφιλος πολυσακχαρίτης που βρίσκεται σε καφέ φύκη, και αποτελεί το 40 κ.β. επί του ξηρού βάρους. Απαντάται επίσης στην μεσοκυττάρια μήτρα ως ένα μίγμα γέλης νατρίου-μαγνησίου-ασβεστίου-στροντίου, οι σχετικές αναλογίες των ιόντων αυτών προσδιορίζονται μέσω μία αντίδρασης ανταλλαγής ιόντων ισορροπίας με θαλασσινό νερό. Η κύρια λειτουργία τους είναι σκελετική, παρέχοντας τόσο τη δύναμη και την ευελιξία στον ιστό των φυκιών. Αυτά τα πολυμερή έχουν βρει μεγάλη βιομηχανική χρήση λόγω της ικανότητά τους να σχηματίζουν μια γέλη με δισθενή κατιόντα όπως Ca^{2+} και Sr^{2+} .

Ο όρος «αλγινικό», συνήθως χρησιμοποιείται για τα άλατα του αλγινικού οξέος, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τα παράγωγα του αλγινικού οξέος καθώς και για το ίδιο το αλγινικό οξύ.

6.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ

Το αλγινικό οξύ είναι ένα γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από δύο είδη μονοσακχαριτών, το 1,4 διασυνδεδεμένο β-D μαννουρονικό οξύ και το 1,4 διασυνδεδεμένο α-L γουλουρονικό οξύ. Αυτά τα δύο είδη μονομερών συνήθως αναφέρονται ως M και G αντίστοιχα. Στη μοριακή δομή του αλγινικού, τα μονομερή αυτά μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους δημιουργώντας ομοιόμορφες συστάδες (MM και GG δομές) ή ανάμικτες συστάδες από M και G δομές με ακανόνιστη αναλογία. Η αναλογία των μονομερών αυτών εξαρτάται από την πηγή προέλευσης του αλγινικού[3].



Εικόνα 34. Η χημική δομή των β-D μαννουρονικού οξέος (M) και α-L γουλουρονικού οξέος (G)

6.2 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΞΑΓΩΓΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ

Το αλγινικό οξύ είναι το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των θαλάσσιων καφέ φυκών. Υπάρχουν κυρίως τέσσερα είδη από τα θαλάσσια καφέ φύκη τα οποία είναι η πηγή προέλευσης του αλγινικού. Υπάρχουν και άλλα είδη θαλάσσιων καφέ φυκών που χρησιμοποιούνται, όπως *Laminaria japonica*, *Ecklonia*, *Durvillea*, *Fucus*, *Pelagorhycus*, *Undaria* κ.α. Η σύσταση του αλγινικού στα φύκη ποικίλει από 10 μέχρι 50 % και εξαρτάται όχι μόνο από το είδος αλλά και από την ηλικία και το τμήμα του φυτού. Το αλγινικό

εξάγεται από τα φύκη με άλεση, ξέπλυμα με όξινο διάλυμα για την απομάκρυνση των ιόντων που κάνουν το αλγινικό αδιάλυτο, διάλυση με θερμό αλκαλικό διάλυμα για την παραγωγή ενός παχύρρευστου διαλύματος που αποτελείται από αλγινικό και υπολείμματα του κυτταρικού τοιχώματος και τελικά καταβύθιση του αλγινικού με χλωριούχο ασβέστιο. Στη συνέχεια ακολουθεί αποχρωματισμός του προϊόντος με διάλυμα ανθρακικού νατρίου και ξήρανση. Τελικά, τα διάφορα είδη αλγινικών αναμιγνύονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αναλογία M:G στο τελικό προϊόν[100] .

6.3 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ

Το αλγινικό είναι ένα γραμμικό πολυμερές. Η χημική δομή του αλγινικού είναι αρκετά σταθερή σε διαλύματα με τιμές pH που κυμαίνονται από 5 μέχρι 10. Οι υψηλές συγκεντρώσεις οξέων προκαλούν αποκαρβοξυλίωση του αλγινικού . Τα αλγινικά άλατα με τα αλκάλια και την αμμωνία είναι υδατοδιαλυτά, ενώ τα αντίστοιχα άλατά τους με πολυσθενή κατιόντα, είναι αδιάλυτα στο νερό. Λόγω της ινώδους δομής του αλγινικού στο κυτταρικό τοίχωμα των φυκών, η αρχική χρήση του ήταν ως υποκατάστατο της κυτταρίνης για την παραγωγή ινών. Στη συνέχεια, το αλγινικό και τα προϊόντα του (κυρίως τα άλατα) βρήκαν πολλές εφαρμογές τόσο στη βιομηχανία, όσο και στην ιατρική, οι κυριότερες των οποίων είναι οι εξής[100]:

Παχυντικό συστατικό στη βιομηχανία χαρτιού και υφάσματος

Η ιδιότητα του αλγινικού να αυξάνει το ιξώδες των υδατικών διαλυμάτων, όταν προστίθεται σε αυτά, έχει σαν αποτέλεσμα τα αλγινικά να έχουν ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία υφάσματος και χαρτιού. Συγκεκριμένα τα αλγινικά εμφανίζονται ως το ιδανικό μέσο για τη βαφή υφασμάτων. Η υψηλή τιμή του ιξώδους των αλγινικών διαλυμάτων, επιτρέπει την αργή διάχυση της χρωστικής, γεγονός πολύ σημαντικό για τη διαδικασία της βαφής, ενώ η χημική αδράνεια του αλγινικού με τις χρωστικές σε αλκαλικές συνθήκες (λόγω της απουσίας πρωτοταγών υδροξυλικών ομάδων στο μόριο του αλγινικού), συμβάλλει ώστε πολύ μικρή ποσότητα της χρωστικής να χάνεται κατά τη διαδικασία αυτή. Παρόμοια είναι και η δράση των αλγινικών στη βιομηχανία χαρτιού, που έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση της ποιότητας των εκτυπώσεων.

Θεραπεία των πληγών

Στην ιατρική, η σημαντικότερη εφαρμογή των αλγινικών είναι στη θεραπεία των πληγών. Είναι γνωστό από την αρχαιότητα, ότι οι πληγές θεραπεύονται γρηγορότερα, όταν διατηρούνται σε υγρό και αποστειρωμένο περιβάλλον, παρά να αφήνονται σε ξηρό περιβάλλον. Η ιδιότητα των ινών και μεμβρανών που είναι κατασκευασμένες από αλγινικό ασβέστιο να διατηρούν υγρό το περιβάλλον της πληγής και ταυτόχρονα να έχουν αιμοστατική δράση, οδήγησε πολλές εταιρίες τις τελευταίες δεκαετίες στην κατασκευή προϊόντων για τη θεραπεία των πληγών, με κύριο συστατικό το αλγινικό ασβέστιο.

Δημιουργία πηκτωμάτων (ζελατινοποίηση)

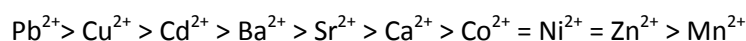
Μια ιδιότητα του αλγινικού με αρκετές εφαρμογές, είναι η δημιουργία πηκτωμάτων. Η διαδικασία αυτή είναι απλή και πραγματοποιείται όταν σε διαλύματα αλγινικού (κυρίως αλάτων του με ιόντα Na^+) προστεθούν δισθενή ή τρισθενή κατιόντα (το Ca^{2+} είναι το πιο διαδεδομένο κατιόν για τη διαδικασία αυτή). Η αντικατάσταση των ιόντων Na^+ από ιόντα Ca^{2+} οδηγεί στη δημιουργία πηκτωμάτων, των οποίων οι ιδιότητες εξαρτώνται από το είδος

του αλγινικού, την πειραματική πορεία κατασκευής του πηκτώματος, αλλά και το είδος του δισθενούς κατιόντος.

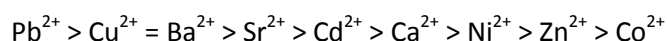
Όσον αφορά το είδος του αλγινικού, η αναλογία των συστάδων (M:G) στη δομή του αλγινικού δείχνει να επηρεάζει σημαντικά τις ιδιότητες του πηκτώματος που θα προκύψει. Και αυτό γιατί τα ιόντα του Ca^{2+} δείχνουν μια προτίμηση στο να δεσμεύονται με τις συστάδες του α-L γουλουρονικού (G-block). Η προτίμηση αυτή, οφείλεται στο γεγονός ότι όταν δυο μονομερή του α-L γουλουρονικού ενωθούν μεταξύ τους, δημιουργούν μια δομή «διαμαντιού» που σχηματίζει κενό. Αυτό το κενό έχει διαστάσεις ιδανικές για τη δημιουργία δεσμού με δισθενή κατιόντα, όπως του Ca^{2+} . Η ισχύς του δεσμού αυτού γίνεται υπολογίσιμη, όταν η συστάδα αποτελείται από τουλάχιστο 20 μονομερή. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων Ca^{2+} , δημιουργούνται σε πρώτη φάση συσσωματώματα που αποτελούνται από δύο αλυσίδες. Η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} οδηγεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των συσσωματωμάτων, γεγονός που οδηγεί τελικά στη δημιουργία ενός τρισδιάστατου πολυμερικού δικτύου. Κάτι ανάλογο δεν παρατηρείται στην περίπτωση των β-D μαννουρονικών συστάδων (M- blocks).

Γίνεται επομένως κατανοητό, ότι η αναλογία των συστάδων (M:G), παίζει σημαντικό ρόλο στις ιδιότητες του αλγινικού. Αλγινικά των οποίων η σύσταση αποτελείται σε μεγαλύτερο ποσοστό από L γουλουρονικό (μεγαλύτερο από 70 %), μπορούν να δώσουν πηκτώματα με υψηλή μηχανική αντοχή, άκαμπτα, περισσότερο διαφανή, με καλή θερμική αντοχή, αλλά με έκκριση νερού από το πηκτωμα κατά τη διαδικασία πήξης - τήξης, ενώ αλγινικά με υψηλότερο ποσοστό σε D μαννουρονικό, δίνουν πηκτώματα με χαμηλότερη μηχανική αντοχή, πιο ελαστικά, περισσότερο αδιαφανή και με καλή συμπεριφορά κατά τη διαδικασία πήξης – τήξης.

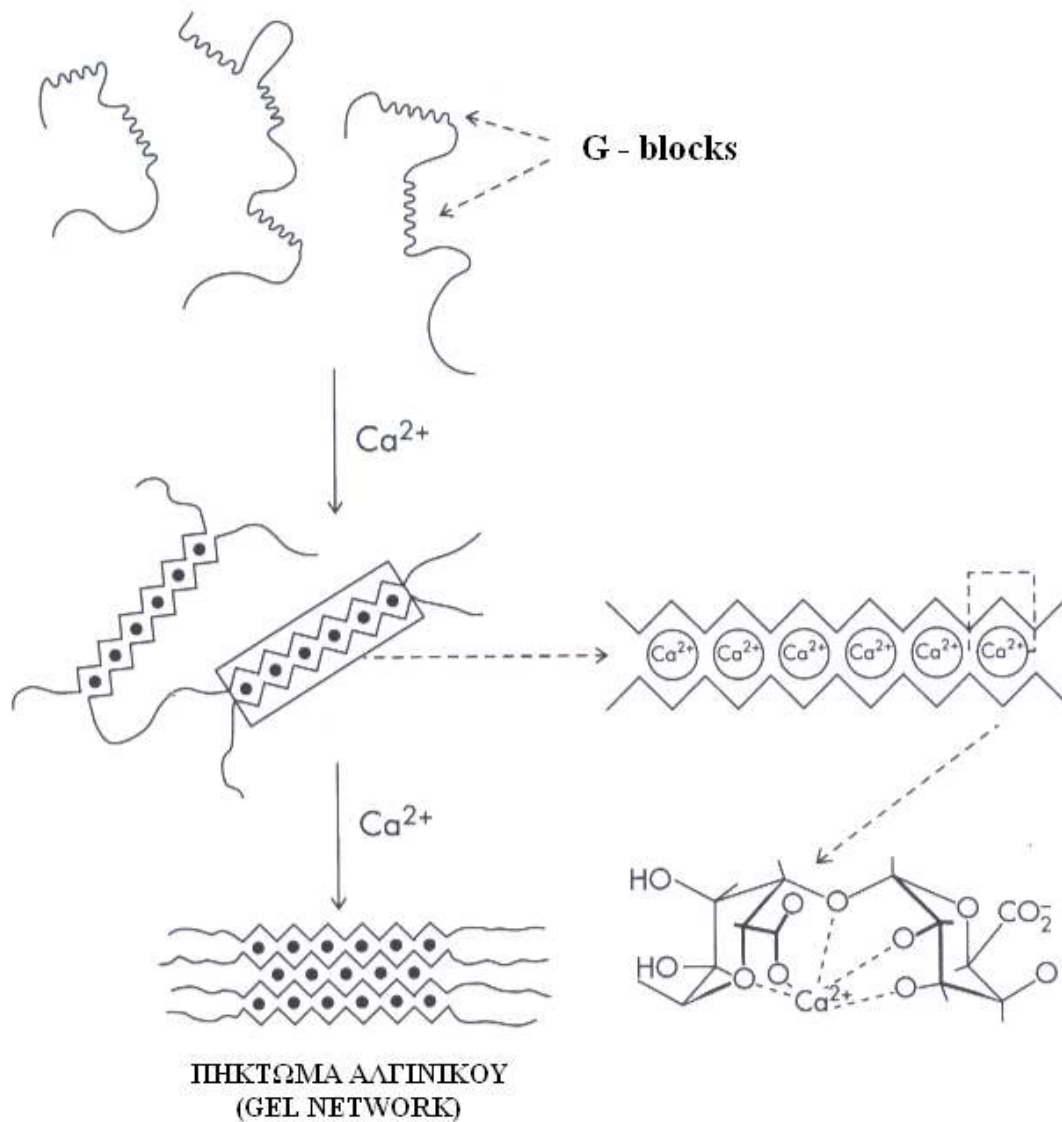
Ένας άλλος παράγοντας που παίζει ρόλο στις ιδιότητες του πηκτώματος είναι το κατιόν με το οποίο προκαλείται η δημιουργία του πηκτώματος. Έχει βρεθεί, ότι ανάλογα με τη συγγένειά τους με το αλγινικό, μερικά από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα δισθενή κατιόντα κατατάσσονται ως εξής :



ενώ η κατάταξη αυτή είναι παρόμοια, όσο αφορά την ικανότητά τους να σχηματίζουν ισχυρά και άκαμπτα πηκτώματα :



Η ισχυρή τοξικότητα για τους ζωντανούς οργανισμούς, μερικών από τα παραπάνω κατιόντα (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+}), θα πρέπει να ληφθεί υπόψη για την επιλογή τους, κατά τη διαδικασία παραγωγής των πηκτωμάτων.



Εικόνα 35. Ο μηχανισμός δημιουργίας του πηκτώματος του αλγινικού. Η αλληλεπίδραση των ιόντων Ca^{2+} με τις συστάδες του α -L γουλουρονικού (G-blocks) και η αλληλεπίδραση των συστάδων μεταξύ τους, οδηγούν τελικά στη δημιουργία του πηκτώματος. Ο δεσμός των ιόντων Ca^{2+} με τις συστάδες του α -L γουλουρονικού, φαίνεται δεξιά

Οι τελικές ιδιότητες του πηκτώματος, επηρεάζονται επίσης και από τον τρόπο με τον οποίο προστίθεται το δισθενές κατιόν, για να αντιδράσει με το αλγινικό. Στην περίπτωση που το κατιόν είναι το Ca^{2+} , η απότομη προσθήκη του, οδηγεί σε τμηματική ζελατινοποίηση και ασυνεχή δομή του πηκτώματος. Στην περίπτωση, όμως που η προσθήκη γίνει ελεγχόμενα (π.χ. με ένα αργά διαλυόμενο άλας του ασβεστίου), τότε παράγονται πηκτώματα με μεγαλύτερη συνοχή στη δομή. Από το μηχανισμό δημιουργίας του πηκτώματος, καταλαβαίνουμε πως και η συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} , παίζει ρόλο στη μηχανική αντοχή του πηκτώματος. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων Ca^{2+} , οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστάδων του L γουλουρονικού είναι ασθενείς, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αδύναμων και εύκαμπτων πηκτωμάτων. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} , τόσο πιο σκληρά και άκαμπτα γίνονται τα πηκτώματα.

Τα αλγινικά πηκτώματα δεν επηρεάζονται από τη θερμότητα, για εύρος θερμοκρασίας από 0-100 °C. Ενώ η διαδικασία παρασκευής τους είναι απλή, γρήγορη, ασφαλής και με χαμηλό οικονομικό κόστος, έχουν όμως και μερικά μειονεκτήματα που θα πρέπει να

αναλογιστούμε. Η διαδικασία παραγωγής τους είναι αντιστρεπτή και τα ιόντα του Ca^{2+} μπορούν να αντικατασταθούν, αποσταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο τη δομή του πηκτώματος. Ιόντα που μπορούν να προκαλέσουν αυτή την αποσταθεροποίηση είναι μονοθενή κατιόντα όπως K^+ και Na^+ , δισθενή κατιόντα που όμως δε δημιουργούν πηκτώματα ή τα πηκτώματα που δημιουργούν δεν έχουν επιθυμητές ιδιότητες όπως Mg^{2+} , αλλά και ιόντα όπως φωσφορικά κιτρικά και γαλακτικά τα οποία έχουν υψηλή συγγένεια με τα ιόντα του Ca^{2+} και τα οποία μπορούν να τα αποσπάσουν από τη δομή του αλγινικού πηκτώματος. Επίσης, η τιμή του pH μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα των αλγινικών πηκτωμάτων, καθώς σε χαμηλές τιμές του pH, μειώνεται η σταθερότητά τους. Η θολερότητα των πηκτωμάτων του αλγινικού ασβεστίου, είναι συνήθως αντιστρόφως ανάλογη με τη μηχανική αντοχή τους. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των αλγινικών πηκτωμάτων, είναι η σταθερότητά τους σε ένα εύρος οργανικών διαλυμάτων, σε αντίθεση με άλλα πηκτώματα.

Τα αλγινικά πηκτώματα βρίσκουν πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Λόγω της υψηλής τιμής του ιξώδους τους, είναι απαραίτητο συστατικό στις σάλτσες και τα σιρόπια, καθώς τους δίνει τα κατάλληλα ρεολογικά χαρακτηριστικά και παρατείνει το χρόνο ζωής τους. Πολύ διαδεδομένη είναι και η χρήση τους ως σταθεροποιητικά συστατικά στη βιομηχανία των παγωτών. Η κατασκευή ινών και μεμβρανών από αλγινικά πηκτώματα έχει βρει πολλές εφαρμογές στη συσκευασία τροφίμων, καθώς η επικάλυψη κρεάτων και ψαριών από τέτοια υλικά, τα προστατεύει από τις βακτηριακές μολύνσεις και από την αφυδάτωση.

Ακίνητοποίηση μικροοργανισμών – Συστήματα μεταφοράς και ελεγχόμενης απελευθέρωσης συστατικών

Η ιδιότητα του αλγινικού να δημιουργεί πηκτώματα με μια διαδικασία, η οποία είναι εύκολα αντιστρεπτή, έχει βρει πάρα πολλές εφαρμογές και ένας μεγάλος όγκος επιστημονικής βιβλιογραφίας έχει σαν κύριο θέμα της, τη χρήση του αλγινικού για την ακίνητοποίηση διαφόρων μικροοργανισμών.

Πίνακας 10. Παραδείγματα της ακίνητοποίησης μικροοργανισμών με τη χρήση του αλγινικού

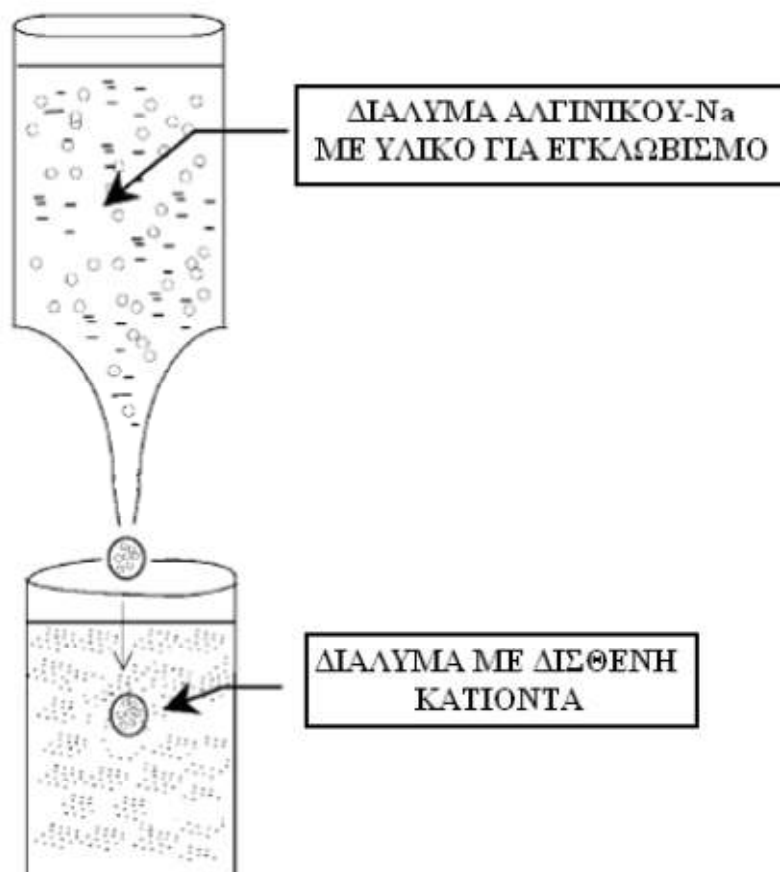
Βακτήρια <i>Erwinia rhapontici</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i> <i>Zymonas mobilis</i>	Ισομαλτόζη Πόσιμο νερό Αιθανόλη
Μύκητες <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> <i>Claviceps purpurea</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces bajanus</i>	Πενικιλίνη Υδρόλυση του τυρογάλακτος Αλκαλοειδή Αιθανόλη Αφρώδεις οίνοι

6.4 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ

Τα αλγινικά πηκτώματα συνήθως κατασκευάζονται υπό τη μορφή σφαιριδίων ή καψυλίων ενώ έχουν λιγότερες εφαρμογές υπό τη μορφή ινών ή φύλλων. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα, που κάνει τα αλγινικά πηκτώματα να είναι τα πιο διαδεδομένα υλικά στην ακίνητοποίηση μικροοργανισμών, είναι η απλότητα της τεχνικής, σε συνδυασμό με τις ήπιες συνθήκες και το χαμηλό κόστος. Επίσης η δομή των αλγινικών πηκτωμάτων είναι

τέτοια που επιτρέπει την παγίδευση μικροοργανισμών μέσα στο πήκτωμα, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει και την είσοδο και έξοδο συστατικών, που πολλές φορές είναι αναγκαία για την επιβίωση των μικροοργανισμών (θρεπτικά συστατικά).

Η συνήθης διαδικασία της κατασκευής των αλγινικών σφαιριδίων, αποτελείται από την ανάμιξη αρχικά του αλγινικού νατρίου με το συστατικό ή τους μικροοργανισμούς που θέλουμε να εγκλωβίσουμε. Στη συνέχεια το μίγμα αυτό προστίθεται υπό μορφή σταγόνων, σε διάλυμα που περιέχει τα δισθενή κατιόντα (συνήθως διάλυμα CaCl_2). Οι σταγόνες που πέφτουν δημιουργούν τα σφαιρικά πήκτωμα ακαριαία, εγκλωβίζοντας το υλικό που επιθυμούμε. Υπάρχουν και άλλες τεχνικές για την κατασκευή αλγινικών σφαιριδίων με πιο διαδεδομένη αυτή της δημιουργίας γαλακτωμάτων[100].



Εικόνα 40. Η διαδικασία εγκλωβισμού υλικών μέσα σε σφαιρίδια αλγινικού πήκτωματος

Τα αλγινικά σφαιρίδια τα οποία κατασκευάζονται με το σχηματισμό σταγόνων υπό την επίδραση μόνο του βάρους, έχουν διάμετρο που κυμαίνεται από 1 μέχρι και 4 mm. Το μέγεθος των σφαιριδίων αυτών, εξαρτάται κυρίως από την επιφανειακή τάση του διαλύματος του αλγινικού νατρίου και όχι από την διάμετρο της σύριγγας από την οποία φεύγει το διάλυμα του αλγινικού νατρίου.

Η σύσταση του αλγινικού, επίσης, επηρεάζει το μέγεθος των αλγινικών σφαιριδίων. Τα αλγινικά πήκτωμα συρρικνώνονται κατά τη διάρκεια της δημιουργίας του πήκτωματος, αποβάλλοντας ποσότητα νερού και οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην αύξηση της συγκέντρωσης του αλγινικού μέσα στο πήκτωμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό συρρίκνωσης πραγματοποιείται στα σφαιρίδια εκείνα τα οποία είναι κατασκευασμένα από αλγινικό με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε D μαννουρονικό. Οι μηχανικές ιδιότητες των αλγινικών σφαιριδίων, εξαρτώνται σε μεγάλο ποσοστό από τη σύσταση του αλγινικού. Η

συγκέντρωση του διαλύματος του αλγινικού επηρεάζει, επίσης, τις μηχανικές ιδιότητες των σφαιριδίων. Τα σφαιρίδια που κατασκευάζονται από χαμηλής συγκέντρωσης αλγινικά διαλύματα, είναι περισσότερο ελαστικά και εύθραυστα, ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης του αλγινικού κάνει τα σφαιρίδια πιο σκληρά και άκαμπτα. Η μηχανική αντοχή των σφαιριδίων μειώνεται και με την αύξηση της συγκέντρωσης του υλικού που εγκλωβίζεται στο αλγινικό πήκτωμα. Όσον αφορά το μοριακό βάρος των αλγινικών, δε δείχνει να παίζει σημαντικό ρόλο στις μηχανικές ιδιότητες των σφαιριδίων, με εξαίρεση τις περιπτώσεις αλγινικών με ιδιαίτερα χαμηλό μοριακό βάρος, που δίνουν πηκτώματα χαμηλής μηχανικής αντοχής. Γενικότερα, προτιμούνται αλγινικά που δίνουν διαλύματα με χαμηλό ιξώδες, αφού στην περίπτωση αυτή είναι ευκολότερος ο χειρισμός των διαλυμάτων αυτών, μπορούν ευκολότερα να αποστειρωθούν με φιλτράρισμα και δίνουν καλύτερο σχήμα στα σφαιρίδια (διαλύματα αλγινικού με υψηλή τιμή ιξώδους δίνουν σφαιρίδια με χαρακτηριστικές ουρές και κακή σφαιρικότητα). Το αλγινικό πήκτωμα είναι ένα πορώδες υλικό και επομένως το μέγεθος των πόρων του και η ευκολία διαφόρων μορίων να διαχέονται σε αυτό, κρίνεται αρκετά σημαντικός παράγοντας που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη, για την επιλογή του αλγινικού ως υλικό εγκλωβισμού κάποιου συστατικού. Η διάχυση μικρών μορίων, δε φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα από τη δομή του αλγινικού. Η ταχύτητα διάχυσης, για παράδειγμα, των μορίων της γλυκόζης και της αιθανόλης έχει αναφερθεί ότι είναι περίπου ίση με το 90 % της ταχύτητας διάχυσής τους στο νερό. Το γεγονός αυτό, είναι ένας από τους κύριους λόγους που το αλγινικό είναι το πιο διαδεδομένο υλικό για την ακινητοποίηση ζυμομυκήτων, με σκοπό την αλκοολική ζύμωση της γλυκόζης. Για μεγαλύτερα μόρια (π.χ. πρωτεΐνες), η ταχύτητα διάχυσής τους εξαρτάται από το μοριακό τους μέγεθος, αλλά και από το είδος και τη συγκέντρωση του αλγινικού. Τέλος, η αύξηση της συγκέντρωσης του αλγινικού μειώνει τη διαπερατότητα μορίων από το αλγινικό πήκτωμα, λόγω της πυκνότερης δομής του.

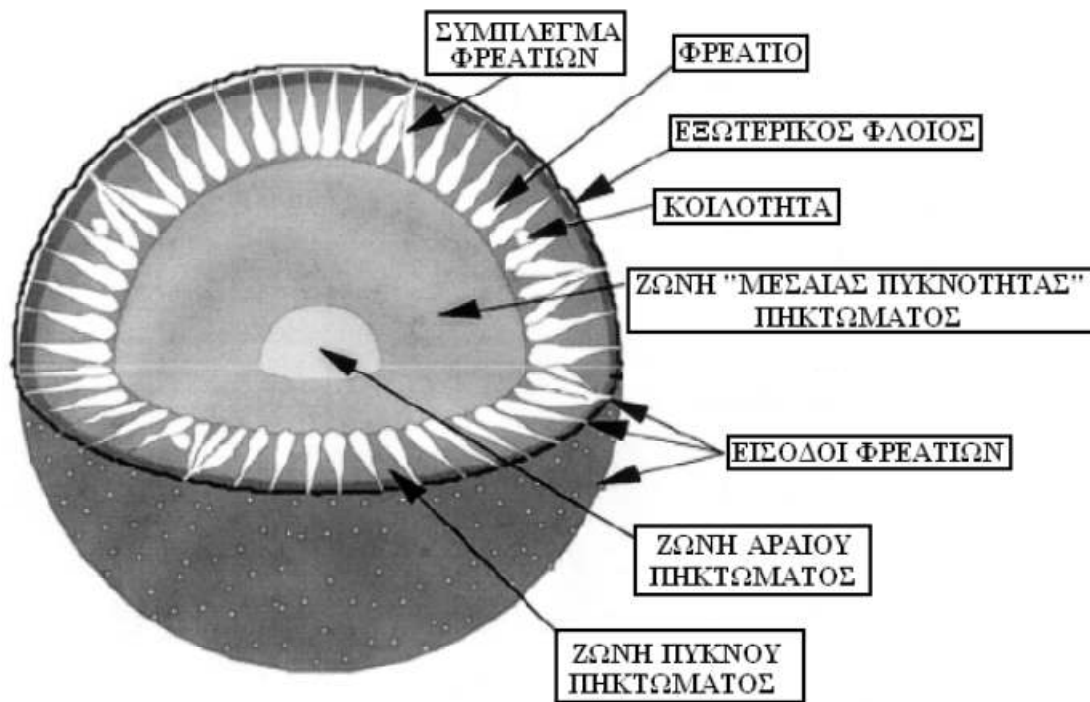
Η κατασκευή σφαιριδίων αλγινικού-ασβεστίου με τη μέθοδο της προσθήκης διαλύματος αλγινικού νατρίου σε διάλυμα CaCl_2 , είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική και έχει τις περισσότερες εφαρμογές. Για το λόγο αυτό, κρίνεται σκόπιμο η αναφορά ορισμένων χαρακτηριστικών και λεπτομερειών για τη δομή και τις ιδιότητες των σφαιριδίων αυτών :

- Η κατανομή των ιόντων του ασβεστίου στα σφαιρίδια αλγινικού-ασβεστίου είναι ανομοιογενής. Πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις $[\text{Ca}^{2+}]$ παρουσιάζονται στην περιφέρεια των σφαιριδίων και συγκεκριμένα στον εξωτερικό φλοιό τους, ενώ όσο προχωράμε προς το εσωτερικό του σφαιριδίου οι συγκεντρώσεις μειώνονται. Η ανομοιογένεια αυτή εξαρτάται από τις συνθήκες κατασκευής των σφαιριδίων και συγκεκριμένα είναι πιο έντονη όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των $[\text{Ca}^{2+}]$ στο διάλυμα του CaCl_2 και όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του διαλύματος του αλγινικού,
- Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται και για τη συγκέντρωση του αλγινικού μέσα στο σφαιρίδιο. Συγκεκριμένα η συγκέντρωση του αλγινικού στην περιφέρεια του σφαιριδίου είναι υψηλότερη, δημιουργώντας έτσι μια ζώνη πυκνού πηκτώματος, ενώ η συγκέντρωση αυτή μειώνεται προς το εσωτερικό του σφαιριδίου,
- Η ταχύτητα διάχυσης των ιόντων Ca^{2+} προς το εσωτερικό του σφαιριδίου κατά τη διαδικασία δημιουργίας του αλγινικού πηκτώματος, είναι μεγαλύτερη όσο υψηλότερη η συγκέντρωση των $[\text{Ca}^{2+}]$ στο διάλυμα του CaCl_2 και όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του διαλύματος του αλγινικού,
- Η προσθήκη των σφαιριδίων σε διαλύματα που περιέχουν μονοσθενή κατιόντα (π.χ. Na_2CO_3) διαλύει τα σφαιρίδια. Το φαινόμενο αυτό προκαλείται από την αντικατάσταση των ιόντων του Ca^{2+} από αυτά του Na^+ στο αλγινικό πήκτωμα. Η ένταση και η ταχύτητα του φαινομένου αυξάνονται με την αύξηση της συγκέντρωσης των $[\text{Na}^+]$ και τη μείωση της

συγκέντρωσης του αλγινικού στο πήκτωμα. Επίσης η τιμή του pH του διαλύματος επηρεάζει το παραπάνω φαινόμενο, συγκεκριμένα όσο χαμηλότερη είναι η τιμή αυτή, οι πολυσακχαρικές αλυσίδες του αλγινικού πρωτονιώνονται, εξασθενίζοντας έτσι τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και κάνοντας τη διάλυση του αλγινικού πηκτώματος πιο γρήγορη,

- Κατά τη δημιουργία του αλγινικού σφαιριδίου, πραγματοποιούνται μια σειρά γεγονότων, που έχουν σαν αποτέλεσμα τη διαμόρφωση της δομής του. Συγκεκριμένα, η διαδικασία δημιουργίας του σφαιριδίου ξεκινάει με το σχηματισμό του εξωτερικού φλοιού, ο οποίος προοδευτικά γίνεται πιο πυκνός, λόγω της διάχυσης των ιόντων του Ca^{2+} και της δημιουργίας του πηκτώματος. Η αύξηση της πυκνότητας αυτής, όμως, εμποδίζει και καθυστερεί την παραπέρα διάχυση των ιόντων του Ca^{2+} , προς το εσωτερικό του σφαιριδίου. Στη συνέχεια, η αντίδραση των μορίων του αλγινικού με τα ιόντα του Ca^{2+} , έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση νερού από το εσωτερικό του σφαιριδίου και τη μείωση του συνολικού του όγκου. Τα μόρια του αλγινικού που βρίσκονται στο εσωτερικό του σφαιριδίου και δεν έχουν αντιδράσει ακόμα, κινούνται σταδιακά προς την εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου, προκειμένου να αντιδράσουν με τα συσσωρευμένα ιόντα του Ca^{2+} που βρίσκονται στην περιφέρεια του σφαιριδίου. Το φαινόμενο αυτό είναι και ο κυριότερος λόγος που η πυκνότητα του αλγινικού σφαιριδίου είναι μεγαλύτερη στην περιφέρεια και μειώνεται, όσο πλησιάζουμε στον πυρήνα του. Η αλληλουχία των παραπάνω φαινομένων, κατά τη δημιουργία του αλγινικού σφαιριδίου, έχουν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας χαρακτηριστικής και ανομοιογενούς δομής, στην οποία εμφανίζονται διάφορες κοιλότητες, κενοί χώροι, φρεάτια και συμπλέγματα φρεατίων, δίνοντας έτσι την τελική δομή στο αλγινικό σφαιρίδιο.

Στην περίπτωση της ακινητοποίησης κυττάρων μέσα σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου, με την τεχνική της προσθήκης αλγινικού νατρίου υπό τη μορφή σταγόνων, σε διάλυμα CaCl_2 , η χαρακτηριστική δομή και ανομοιογένεια του σφαιριδίου, είναι ικανή να επηρεάσει τη συμπεριφορά και την ανάπτυξη των ακινητοποιημένων κυττάρων. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε αυτούς τους κενούς χώρους, μπορεί να εξελιχθούν διαφορετικά από αυτά που είναι παγιδευμένα στο πήκτωμα. Η διαδικασία μετακίνησης των μορίων του αλγινικού προς την περιφέρεια του σφαιριδίου, κατά το σχηματισμό του, ωθεί μαζί και τα κύτταρα προς την ίδια κατεύθυνση. Το αποτέλεσμα αυτού του φαινομένου είναι η αυξημένη πυκνότητα των κυττάρων στην περιφέρεια του σφαιριδίου. Στην περίπτωση που παρουσιάζονται και περιορισμοί ως προς τη διάχυση των θρεπτικών συστατικών προς το εσωτερικό τμήμα του σφαιριδίου, τότε το μεγαλύτερο ποσοστό των θρεπτικών συστατικών καταναλώνεται από τα κύτταρα της περιφέρειας, που είναι και τα πιο ενεργά, ενώ τα κύτταρα που βρίσκονται στο κέντρο του σφαιριδίου έχουν χαμηλή δραστηριότητα. Ένα επίσης σημαντικό φαινόμενο είναι η επίδραση της ανομοιομορφίας της κατανομής των ιόντων του Ca^{2+} μέσα στο σφαιρίδιο, στη δράση των κυττάρων. Η ανομοιομορφία αυτή δημιουργεί ηλεκτροστατικά πεδία, τα οποία επηρεάζουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των εγκλωβισμένων κυττάρων, αλλάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη φυσιολογική συμπεριφορά τους.



Εικόνα 41. Η δομή ενός σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου, το οποίο παρασκευάζεται με την τεχνική της προσθήκης αλγινικού νατρίου, υπό τη μορφή σταγόνων, σε διάλυμα CaCl_2

Μια επιπλέον ιδιότητα που κάνει τα αλγινικά σφαιρίδια κατάλληλα για τη μεταφορά ουσιών, είναι η ευαισθησία τους στο pH. Τα σφαιρίδια του αλγινικού ασβεστίου είναι αδιάλυτα σε ένα μεγάλο εύρος τιμών του pH. Όταν όμως η τιμή του pH γίνει αρκετά χαμηλή (μικρότερη από την τιμή του 2), τότε το αλγινικό πήκτωμα καταστρέφεται, ελευθερώνοντας με αυτόν τον τρόπο την ουσία που είναι εγκλωβισμένη στο πήκτωμα. Η ιδιότητα αυτή, έχει κάνει το αλγινικό ένα αρκετά διαδεδομένο υλικό για τη μεταφορά φαρμάκων, αφού τα σφαιρίδια του αλγινικού καταστρέφονται στις χαμηλές τιμές pH του στομαχίου των ζωντανών οργανισμών.

Η διαδικασία κατασκευής των αλγινικών πηκτωμάτων πραγματοποιείται χωρίς τη χρήση τοξικών αντιδραστηρίων κάτω από ήπιες συνθήκες. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την ακινητοποίηση διαφόρων συστατικών (π.χ. πρωτεΐνες) ή και ζωντανών μικροοργανισμών (π.χ. μύκητες, βακτήρια) με τη χρήση των αλγινικών πηκτωμάτων, χωρίς η διαδικασία αυτή να επηρεάζει αρνητικά τις ιδιότητες και τη δράση των παραπάνω ουσιών.

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα που παρέχει η τεχνική της ακινητοποίησης ουσιών σε αλγινικά πηκτώματα, θα πρέπει να αναλογιστούμε και κάποιους περιορισμούς, ικανούς να μας αποτρέψουν από τη χρήση των πηκτωμάτων αυτών για το σκοπό της ακινητοποίησης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η διαδικασία της δημιουργίας του αλγινικού πηκτώματος είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία. Και παρόλο που σε μερικές περιπτώσεις η ιδιότητα αυτή είναι επιθυμητή (π.χ. ελεγχόμενη απελευθέρωση συστατικών), σε άλλες περιπτώσεις είναι ανεπιθύμητη. Η ακινητοποίηση μικροοργανισμών σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου και η χρήση τους σε διάφορες διεργασίες (π.χ. ζυμώσεις), απαιτεί την όσο το δυνατό μεγαλύτερη σταθερότητα στη δομή αυτών των σφαιριδίων, ώστε να εκπληρώνεται όσο το δυνατό καλύτερα ο σκοπός της ακινητοποίησης. Η χρήση όμως των σφαιριδίων του αλγινικού ασβεστίου σε περιβάλλον που υπάρχουν κατιόντα και χειλικά συστατικά που μπορούν να αντικαταστήσουν τα κατιόντα Ca^{2+} και να αποσταθεροποιήσουν τη δομή των σφαιριδίων αυτών, δημιουργεί περιορισμούς στην εφαρμογή τους.

Κατά τη διαδικασία δημιουργίας των αλγινικών σφαιριδίων, η τάση των μορίων του αλγινικού να συσσωρεύονται στην περιφέρεια του σφαιριδίου, συμπαρασύρει και την ουσία που θέλουμε να εγκλωβίσουμε στα σφαιρίδια αυτά. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση της ουσίας στην περιφέρεια. Το φαινόμενο αυτό, είναι δυνατό να διευκολύνει τη διαφυγή της ουσίας από το σφαιρίδιο του αλγινικού. Ειδικά στην περίπτωση που η ουσία είναι κάποιος ζωντανός οργανισμός που μπορεί να πολλαπλασιαστεί (π.χ. μύκητες, βακτήρια) το φαινόμενο της διαφυγής είναι ακόμα πιο έντονο. Η αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, γίνεται είτε με την επικάλυψη των σφαιριδίων με μια εξωτερική στιβάδα αλγινικού η οποία δεν περιέχει μικροοργανισμούς (σφαιρίδια διπλής στιβάδας[100]).

6.5 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Πολλά έχουν ειπωθεί για την αύξηση της σταθερότητας όταν τα κύτταρα είναι ακινητοποιημένα. Οι εξηγήσεις επικεντρώνονται κυρίως στο ότι με την ακινητοποίηση παρέχονται στο κύτταρο καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης από ότι όταν είναι σε ελεύθερη φάση. Για παράδειγμα ορισμένες ουσίες όπως ορμόνες παρέχονται από τη μάζα του πολυμερούς στα κύτταρα με κανονικότερους ρυθμούς. Επίσης η μεμβράνη του κυττάρου βρίσκει πιο κατάλληλο το περιβάλλον της ακινητοποίησης για σταθεροποίηση. Πολλοί αναφέρονται στη σταθεροποίηση των φυτικών κυττάρων με ακινητοποίηση με αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας του κύκλου ζωής των φυτικών κυττάρων κατά 10 φορές ή και περισσότερο. Βέβαια οι συγκρίσεις έγιναν με ελεύθερα κύτταρα σε υγρές καλλιέργειες. Ένα πειραματικό δεδομένο είναι η περίπτωση της ακινητοποίησης του *Brevibacterium flavum* στη σταθερότητα του ενζύμου φουμαράση. Το ένζυμο αυτό παράγεται από το βακτήριο *B. flavum* ανεξάρτητα από το εάν ο μικροοργανισμός είναι ακινητοποιημένος ή ελεύθερος. Η διαφορά βρέθηκε στη σταθερότητα της δράσης του ενζύμου. Το πείραμα έδειξε ότι η σταθερότητα του ενζύμου ήταν 5 φορές μεγαλύτερη από ότι όταν ήταν ακινητοποιημένος σε πολυακρυλαμίδιο αλλά ήταν 10 φορές μεγαλύτερη όταν ήταν σε μείγμα πολυαιθυλαμίνης και κ-καραγενάνης. Η πολυαιθυλαμίνη έδειξε ότι έχει μια σταθεροποιητική επίδραση στη δράση της φουμαράσης στα ελεύθερα κύτταρα και επέτεινε τη σταθερότητα των κυττάρων που ήταν ακινητοποιημένα σε πολυακρυλαμίδιο[108].

Β' ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ακινητοποίηση ζυμομυκήτων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου διπλής στιβάδας για την παραγωγή αφρώδη οίνου σε κανονικές συνθήκες και σε συνθήκες Ωσμωτικού stress. Γνωρίζοντας τις συμβατικές μεθόδους παραγωγής αφρωδών οίνων, τους αφρώδεις οίνους σαν ποτό καθώς και τις τεχνικές ακινητοποίησης πειραματιστήκαμε γύρω από την μέθοδο παραγωγής τους . Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν ζυμομύκητες ανεπτυγμένοι σε κανονικές αλλά και σε συνθήκες Ωσμωτικού στρες καθώς και αξιολογήθηκαν διαφορετικοί τύποι αλγινικών νατρίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Οινολογική μαγιά από ANCHOR στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* VIN 13. Το ίδιο στέλεχος ζύμης χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ζύμωση και παραγωγή του οίνου βάσης και για τη διαδικασία ακινητοποίησης.

8.1 Μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για ανάπτυξη και ζυμώσεις

Συνθετικό θρεπτικό γλυκόζης

Για την καλλιέργεια και ανάπτυξη του μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκε συνθετικό θρεπτικό μέσο γλυκόζης που περιείχε:

- Γλυκόζη10g/L
- Όξινο Φωσφορικό Κάλιο (K_2HPO_4).....1 g/L
- Δισόξινο Φωσφορικό Κάλιο (KH_2PO_4).....1 g/L
- Θεϊκό Αμμώνιο $\{(NH_4)_2SO_4\}$2 g/L
- Θεϊκό Μαγνήσιο ($MgSO_4$).....0.2 g/L
- Θεϊκός Ψευδάργυρος ($ZnSO_4$).....0.2 g/L
- Εκχύλισμα Ζύμης (Yeast Extract).....2.0 g/L
- Extraferm detoxifiant pour mouts et vins.....3g/L
- Χλωριούχο νάτριο.....6g/L (6%)
- Νερό έως 1 L
- pH=4.0 (ρύθμιση με H_2SO_4 ή HCl)

Πριν τη χρήση του, το θρεπτικό υγρό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 130°C και σε πίεση 1,5-2 atm.. Η βιομάζα παραλαμβάνονταν έπειτα από φυγοκέντρηση στις 5000 rpm/min για 10 min. Για τα πειράματα ακινητοποίησης κυττάρων, αλλά και για ζυμώσεις που έγιναν με το συνθετικό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γλυκόζης 120 g/L. Το διάλυμα αποστειρωνόταν σε αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 120- 130 °C και πίεση 1,5-2,0 atm για 15 min

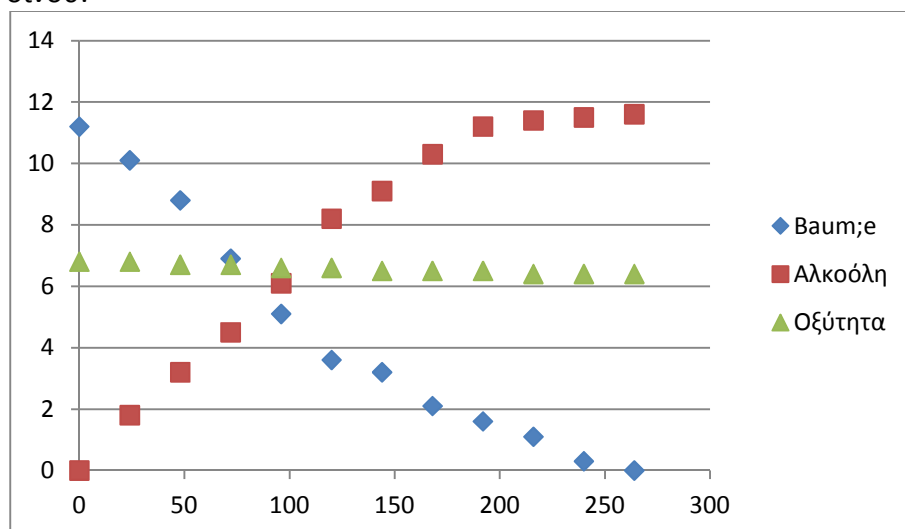
8.2 ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

- Σπάσιμο του σταφυλιού (ποικιλίας Μαλαγουζιας) χωρίς χρήση σπαστήρα με προσθήκη στην μόνο 20 γρ / τον Rapidashe X color και 20 γρ /τον Rapidasheexpression εναλλάξ. Επιθυμητή θερμοκρασία 6 °C.
- Με την πλήρωση της της δεξαμενής προσθήκη θειώδους έτσι ώστε να διαμορφωθεί 60-65 mg/L ελεύθερο θειώδες. Για χρήση SULFOSOL 400 τότε 150 ml/ton
- Ακολουθεί προζυμωτική κρυσταλλοποίηση για 1 ημέρα στους 6 °C κατά την οποία δεν θα γίνει καμία ανακύκλωση
- Κατά επόμενη μέρα γίνεται αποχωρισμός του γλεύκους από τα στέμφυλα και χρησιμοποιείται μόνο ο μούστος εκροής
- Εν συνεχεία εμβολιασμός με ζύμες 4F9 200 g /ton , προσθήκη Extraferm 200 g/ton .
- Θερμοκρασία ζύμωσης 15 – 17°C.
- Σε Μπωμέ = 1-1,5 προσθήκη MAXAFERM 200 g/ton

Με το τέλος της ζύμωσης ακολουθεί μετά από 3 ημέρες η πρώτη απολάσπωση και εν συνεχεία ακολουθεί φιλτράρισμα του οίνου και προσθήκη σε φιάλες για την διεξαγωγή της δευτερογενούς ζυμώσεως .

Ώρες	Baume'	αλκοόλη	Οξύτητα
0	11,2	0	6,8
24	10,1	1,8	6,8
48	8,8	3,2	6,7
72	6,9	4,5	6,7
96	5,1	6,1	6,6
120	3,6	8,2	6,6
144	3,2	9,1	6,5
168	2,1	10,3	6,5
192	1,6	11,2	6,5
216	1,1	11,3	6,4
240	0,3	11,4	6,4
264	0	11,8	6,4

Παρακολούθηση τιμών για Baume, Αλκοόλη, Οξύτητα κατά την 1^η Ζύμωση του οίνου.



Με το τέλος της ζύμωσης στις 264 ώρες ο οίνος βάσης είχε 11,8 αλκοολικούς βαθμούς 2,8 γ/λ ανάγοντα σάκχαρα και 6,4 g/l τρυγικού ογκομετρούμενη οξύτητα. Πριν την προσθήκη έχει προστεθεί στον οίνο σακχαρούχο διάλυμα όπως προβλέπεται από την παραγωγική διαδικασία έτσι ώστε να έχουμε 20-25 g/l ανάγοντα σάκχαρα. Πριν την προσθήκη του οίνου στις φιάλες για την δευτερογενή ζύμωση διεξάγεται ο προεγκλιματισμός των κυττάρων σε συνθήκες Ωσμωτικού στρες και μη και η διπλή ακινητοποίηση η οποία γίνεται με την μέθοδο Yokotsuka όπως φαίνεται και στις παρακάτω φωτογραφίες

8.3 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Τα όργανα και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν:

1. Συσκευή ακινητοποίησης Yokotsuka
6. Περισταλτική αντλία ακρίβειας (Masterflex C/L)
8. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο
9. Πεχάμετρο
10. Ζυγός αναλυτικής ακρίβειας
11. Αυτόκαυστο
12. Δονητής (vortex)
13. Θερμόμετρα

8.4 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Παρασκευή διαλύματος αλγινικού

Θερμαίνεται απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία περίπου 40-50 °C και στη συνέχεια προστίθεται το στερεό αλγινικό νάτριο, σταδιακά και υπό συνεχή ανάδευση, για την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων. Η θερμοκρασία του διαλύματος δεν πρέπει να ξεπεράσει τους 70-80 °C, αφού σε αυτήν την περίπτωση καταστρέφεται ένα ποσοστό από τις αλυσίδες της δομής του αλγινικού, με κίνδυνο να μειωθεί η μηχανική αντοχή του πηκτώματος που θα προκύψει. Το διάλυμα αφού ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, θα πρέπει να είναι διαυγές. Στην περίπτωση που το αλγινικό έχει διάφορες προσμίξεις που δε διαλύονται, το διάλυμα πρέπει να διηθηθεί. Στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 120- 130 °C και πίεση 1,5-2,0 atm για 20 min.

Παρασκευή διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου

Γνωρίζοντας το μοριακό βάρος του χλωριούχου ασβεστίου CaCl_2 (110,99), μπορούμε να παρασκευάσουμε τα αντίστοιχα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,01M και 0,1M που χρειαζόμαστε για την ακινητοποίηση. Ζυγίζονται οι αντίστοιχες ποσότητες που χρειαζόμαστε, τις διαλύουμε αρχικά σε ποτήρι ζέσεως και στη συνέχεια μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη μέχρι συμπληρώσεως του επιθυμητού όγκου. Στην συνέχεια αναδεύεται ζωηρά, και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 120-130 °C και πίεση 1,5-2,0 atm για 20 min.

Ζύμες αναπτύχθηκαν σε μέσο που περιέχει 10 g / L γλυκόζη, 1 g / L K_2HPO_4 , 1 g / L KH_2PO_4 , 0,2 g / L MgSO_4 , 2 g / L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g / L ZnSO_4 και 2 g / L εκχύλισμα ζύμης στους 30 ° C για 48 ώρες σε επωαστικό κλίβανο. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση στις 5000 rpm για 5 λεπτά και πλύθηκαν με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.

ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΑΠΛΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ

Το διάλυμα του αλγινικού νατρίου, μετά την αποστείρωση αφού ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου αναμιγνύεται με διάλυμα ενυδατωμένων ζυμομυκήτων.

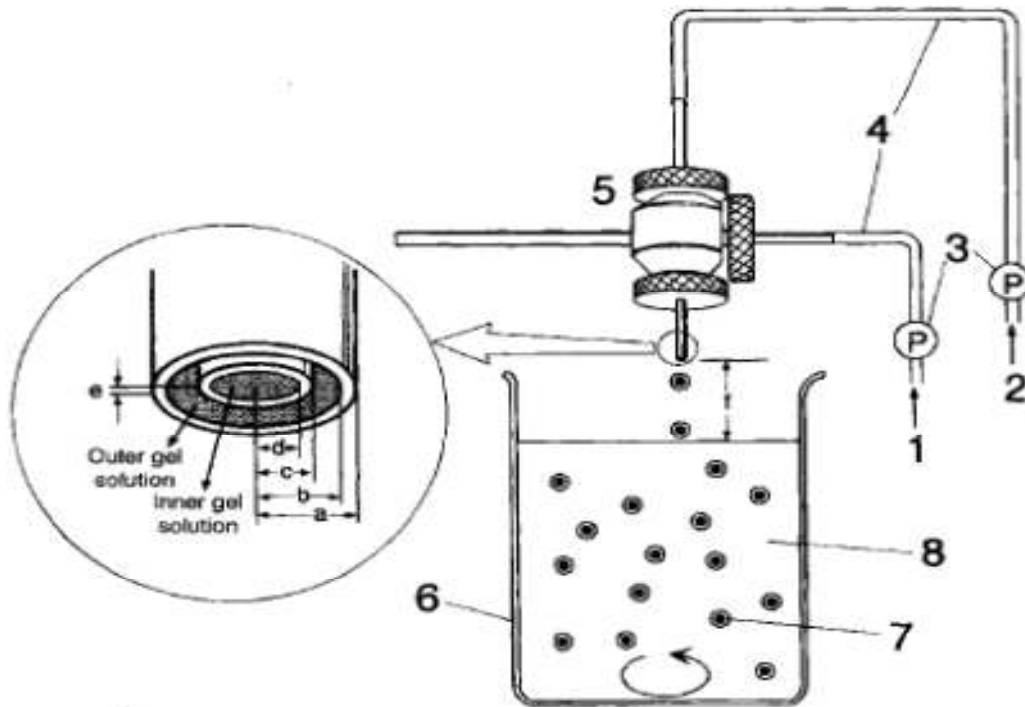
Στη συνέχεια το ομογενές διάλυμα του αλγινικού -ζυμομυκήτων με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας (Masterflex) οδηγείται μέσα από ανοξειδωτη σύριγγα και πέφτει υπό μορφή σταγόνων, σε υδατικό διάλυμα CaCl_2 . Τα σφαιρίδια που σχηματίζονται με αυτόν τον τρόπο αφήνονται στο διάλυμα του CaCl_2 για περίπου 30 λεπτά, μέχρι να σκληρύνουν.



Η πειραματική διάταξη της κατασκευής των σφαιριδίων απλής στιβάδας.

ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΔΙΠΛΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ

Για την κατασκευή των σφαιριδίων διπλής στιβάδας χρησιμοποιήθηκε η πειραματική διάταξη που φαίνεται παρακάτω:



Η πειραματική διάταξη κατασκευής σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου διπλής στιβάδας. 1 – είσοδος διαλύματος εσωτερικής στιβάδας, 2 - είσοδος διαλύματος εξωτερικής στιβάδας, 3 – περισταλτικές αντλίες, 4 – σωλήνες σιλικόνης, 5 – διάταξη ομοαξονικών σωλήνων, 6 – γυάλινο ποτήρι, 7 – σφαιρίδια διπλής στιβάδας, 8 – διάλυμα CaCl_2 . Διαστάσεις : a – 2.08 mm, b – 1.73 mm, c – 0.75 mm, d – 0.43 mm, e – 0.10 mm, f – 2 με 4 cm.

Η αρχή λειτουργίας της διάταξης αυτής βασίζεται στο ότι το διάλυμα του αλγινικού με τους ζυμομύκητες περνάει από τον εσωτερικό σωλήνα, ενώ από τον εξωτερικό διέρχεται το διάλυμα του αλγινικού, χωρίς ζυμομύκητες. Η ροή των δυο διαλυμάτων ρυθμίζεται με τη συμβολή δυο περισταλτικών αντλιών. Η ρύθμιση γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε κατά την έξοδό τους από τη διάταξη, το διάλυμα του αλγινικού χωρίς τους μύκητες (υπό μορφή σταγόνας), να καλύπτει επιφανειακά το διάλυμα του αλγινικού με τους μύκητες. Όταν η σταγόνα εισέλθει στο διάλυμα του CaCl_2 , τότε δημιουργείται το σφαιρίδιο, το οποίο εσωτερικά αποτελείται από αλγινικό πήκτωμα με ακινητοποιημένους μύκητες που περιβάλλεται από μια εξωτερική στιβάδα από αλγινικό πήκτωμα χωρίς μύκητες.



Μετά την παραγωγή τα σφαιρίδια σκληρύνθηκαν για 24 ώρες σε ένα διάλυμα από 0,1% CaCl₂ που σκληρύνει τα pellets και μειώνει τον όγκο τους μέχρι 30%. Έπειτα, τα σφαιρίδια τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης συγκέντρωσης 25 g/L για την ενεργοποίηση των ζυμομυκήτων. Η διαδικασία αυτή συμβάλλει και στην αποβολή του διαλύματος του CaCl₂ που βρίσκεται στο εσωτερικό των σφαιριδίων. Η απελευθέρωση σημαντικής ποσότητας CaCl₂ στον οίνο είναι ανεπιθύμητη, γιατί υποβαθμίζει την ποιότητά του. Μόλις τα σφαιρίδια καταναλώσουν την ποσότητα της γλυκόζης, απομακρύνονται από το διάλυμα, ξεπλένονται με νερό.

Τα σφαιρίδια πλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό και εισήχθησαν μέσα στις φιάλες για τη δεύτερη ζύμωση.

8.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΦΡΩΔΟΥΣ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ – ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

Κατασκευάζονται σφαιρίδια αλγινικού – ασβεστίου διπλής στιβάδας. Τα σφαιρίδια αυτά χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση δεύτερης ζύμωσης του οίνου βάσης με σκοπό την παραγωγή αφρώδους οίνου και μελετάται η συμπεριφορά των σφαιριδίων αλλά και των ακινητοποιημένων ζυμομυκήτων σε αυτά.

8.6 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

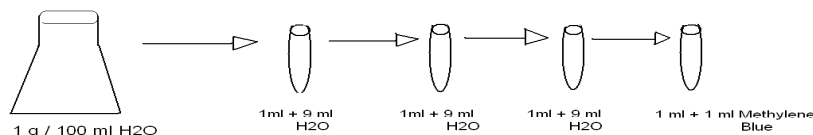
ΟΡΓΑΝΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Πλακίδιο Neubauer / Thoma
- Μικροσκόπιο
- Συσκευή Vortex

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ - ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ

Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίζεται με μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, με τη βοήθεια του πλακιδίου Neubauer. Το υγρό που πρόκειται να εξεταστεί μικροσκοπικά ανακινείται ζωηρά, έτσι ώστε να γίνει ομοιόμορφη η κατανομή των κυττάρων. Μια σταγόνα από το υγρό μεταφέρεται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur πάνω στο πλακίδιο και αφού περάσει μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να επικαθίσουν τα κύτταρα στην επιφάνειά του πλακιδίου, προβαίνουμε στην αρίθμηση τους.

Κάθε μέτρηση γίνεται σε πέντε μεγάλα τετράγωνα. Πρέπει να μετρούνται 30 έως 60 κύτταρα ανά τετράγωνο. Σε περίπτωση που ο αριθμός των κυττάρων είναι μικρός πρέπει να μετρηθούν περισσότερα τετράγωνα. Συνολικά πρέπει να μετρούνται τουλάχιστο 100 με 150 κύτταρα ανά πλακίδιο για να έχουμε ένα ποσοστό λάθους μικρότερο από 10 % στις μετρήσεις. Στην περίπτωση που ο αριθμός των κυττάρων είναι πολύ μεγαλύτερος, ο αριθμητικός προσδιορισμός δεν είναι αντικειμενικός και απαιτείται αραιώση του δείγματός μας. Σε αυτήν την περίπτωση η αραιώση θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στους υπολογισμούς μας.



Κατά τη φάση διπλασιασμού των κυττάρων, αν το νέο κύτταρο είναι σε μέγεθος όσο το 1/2 του μητρικού, τότε υπολογίζεται ως νέο κύτταρο. Επίσης, αν ένα κύτταρο είναι πάνω στη γραμμή του τετραγώνου και είναι το περισσότερο μέσα στο τετράγωνο, τότε προσμετράτε για τους υπολογισμούς μας. Σε διαφορετική περίπτωση δεν προσμετράτε. Η κυτταρική συγκέντρωση δίνεται από τη σχέση [174]:

$$C = \frac{n}{N} \times D \times 0.25 \times 10^6$$

όπου :

C είναι η συγκέντρωση των κυττάρων (κύτταρα/ml)

D είναι η αραίωση

n είναι ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν

N είναι ο αριθμός των τετραγώνων

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΣ ΕΝΕΡΓΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

ΟΡΓΑΝΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Πλακίδιο Neubauer / Thoma
- Μικροσκόπιο
- Συσκευή Vortex
- Διάλυμα κυανό του μεθυλενίου

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ - ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ

Η βιωσιμότητα υπολογίζεται ως το ποσοστό μεταβολικώς ενεργών κυττάρων σε σχέση με το συνολικό αριθμό. Ο αριθμός των μεταβολικώς ενεργών κυττάρων υπολογίζεται μετά από χρώση με διάλυμα κυανού του μεθυλενίου. Τα μη μεταβολικώς ενεργά κύτταρα, χρωματίζονται μπλε και θεωρούνται νεκρά, ενώ τα μεταβολικώς ενεργά κύτταρα είναι αυτά που δεν χρωματίζονται και θεωρούνται ζωντανά. Η μέτρηση της βιωσιμότητας και του συνολικού αριθμού των κυττάρων γίνονται στο ίδιο πλακίδιο.

Αναμειγνύονται 0,5mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0,5mL διαλύματος κυανού του μεθυλενίου, αναδεύονται καλά και παραμένουν ακριβώς 10 λεπτά, έπειτα αναδεύονται πάλι και προχωράμε στη μέτρηση. Η βιωσιμότητα υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$\text{Βιωσιμότητα}\% = a/n * 100$$

Όπου:

a αριθμός μεταβολικώς ενεργών κυττάρων(άχρωμα)

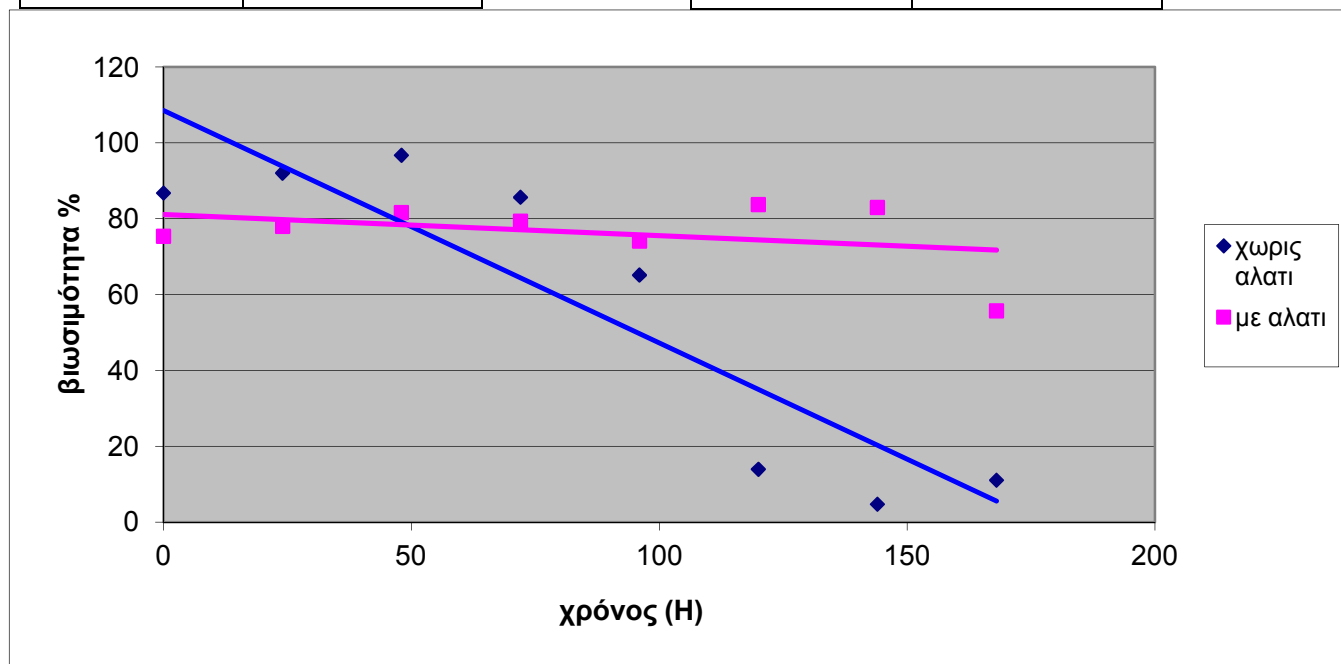
n συνολικός αριθμός κυττάρων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΖΥΜΗΣ ΣΕ ΚΑΝΟΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΩΣΜΟΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

Χρόνος (H)	Βιωσιμότητα % (χωρίς NaCl)
0	86,84
24	92,11
48	96,79
72	85,71
96	65,19
120	14,03
144	4,78
168	11,11

Χρόνος (H)	Βιωσιμότητα % (με NaCl)
0	75,47
24	78,05
48	81,67
72	79,41
96	74,19
120	83,81
144	83
168	55,77



9.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ ΝΑΤΡΙΩΝ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑ ΤΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ

Τα αλγινικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία είναι τα: Sodium alginate Safc Sigma-Aldrich, Sodium alginate Biochemica Applichem και Sodium alginate Danisco Roumboulakis. Παρακάτω θα αξιολογηθεί η σύσταση των πηκτωμάτων που προκύπτουν αλλά και η σταθερότητα που προσδίδουν στα ακινητοποιημένα κύτταρα.

Sodium alginate Safc Sigma-Aldrich: πρόκειται για αλγινικό νάτριο, το οποίο προέρχεται από καφέ φύκη. Κατά την δημιουργία των απαιτούμενων για την ακινητοποίηση διαλυμάτων δίνει διαλύματα χρώματος ανοικτού καφέ και χωρίς μεγάλο ιξώδες(ρευστά). Η στοιβάδα που δημιουργήθηκε κατά την ακινητοποίηση δεν μπορούσε να διακριθεί εύκολα αλλά επίσης δεν είχε καθόλου αντοχή και ήταν πολύ εύθραυστη, ανεξαρτήτως του χρόνου παραμονής των σφαιριδίων στο χλωριούχο ασβέστιο. Κατά τον προεγκλιματισμό των σφαιριδίων σε υπόστρωμα έστω και για 4 ώρες η δομή τους καταστρεφόταν, διαχωρίζονταν η αλγινική στοιβάδα με την μονή ακινητοποίηση. Όσο αφορά τώρα την παρασκευή αφρώδους οίνου, προστέθηκαν ορισμένα σφαιρίδια, τα οποία ήταν σε καλή κατάσταση για να δούμε τη συμπεριφορά τους. Η μετέπειτα πορεία του πειράματος ήταν σύντομη, λόγω της διάρρηξης της εξωτερικής στοιβάδας των σφαιριδίων και της απελευθέρωσης των κυττάρων των ζυμών. Συμπεραίνουμε ότι το αλγινικό αυτό δεν πληροί τις απαραίτητες προϋποθέσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Sodium alginate Biochemica Applichem: πρόκειται για αλγινικό νάτριο, το οποίο προέρχεται από φύκη και το χρώμα του οποίου είναι ολόλευκο. Κατά την δημιουργία των απαιτούμενων για την ακινητοποίηση διαλυμάτων δίνει διαφανή παχύρευστα διαλύματα με υψηλό ιξώδες. Στην διαδικασία της ακινητοποίησης η συμβολή του ήταν μεγάλη, λόγω της σκληρότητας που απέδιδε στην εξωτερική στοιβάδα αλλά και στο ότι ήταν ευδιάκριτη η μονή από τη διπλή ακινητοποίηση. Όσο αφορά την φάση προεγκλιματισμού των σφαιριδίων, η συμπεριφορά τους ήταν πολύ καλή, δηλαδή παρέμεναν σκληρά ανεξαρτήτως του χρόνου παραμονής στο υπόστρωμα αλλά και δεν διαχωρίζονταν. Όσο αφορά τώρα την παρασκευή αφρώδους οίνου, προστέθηκαν ορισμένα σφαιρίδια, τα οποία ήταν σε πολύ καλή κατάσταση για να δούμε τη συμπεριφορά τους. Τα σφαιρίδια για το χρονικό διάστημα παραμονής με το κρασί διατήρησαν τη φυσική τους κατάσταση, αλλά επίσης κατάφεραν να ζυμώσουν και μέρος των σακχάρων για την παραγωγή αφρού. Θα μπορούσαμε να τα χαρακτηρίσουμε ως το «ιδανικό» αλγινικό νάτριο για την κατασκευή των σφαιριδίων μας.

Sodium alginate Danisco Roumboulakis: πρόκειται για αλγινικό νάτριο που προέρχεται από φύκη και το χρώμα του είναι λευκό. Κατά την δημιουργία των απαιτούμενων για την ακινητοποίηση διαλυμάτων δίνει διαφανή παχύρευστα διαλύματα με υψηλό ιξώδες. Κατά την ακινητοποίηση η συμβολή του ήταν μεγάλη λόγω της σκληρότητας της εξωτερικής στοιβάδας αλλά και της ευκολίας διαχωρισμού της εξωτερικής από την εσωτερική στοιβάδα. Κατά τον εγκλιματισμό τους η συμπεριφορά τους ήταν πολύ καλή, παρέμεναν

σκληρά αλλά και δεν διαλύονταν. Όσο αφορά τώρα την παρασκευή αφρώδους οίνου, προστέθηκαν ορισμένα σφαιρίδια, τα οποία ήταν σε πολύ καλή κατάσταση για να δούμε τη συμπεριφορά τους. Τα σφαιρίδια για το χρονικό διάστημα παραμονής με το κρασί που ήταν πολύ μεγάλο διατήρησαν τη φυσική τους κατάσταση, αλλά επίσης κατάφεραν να ζυμώσουν και μέρος των σακχάρων για την παραγωγή αφρού. Θα μπορούσαμε επίσης να χαρακτηρίσουμε και αυτό το αλγινικό ως το «ιδανικό» για την κατασκευή των σφαιριδίων μας.

9.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΣΥΣΚΕΥΗ YOKOTSUKA ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΑ

Η κατασκευή ακινητοποιημένων κυττάρων ζύμης μπορεί να επιτευχθεί όπως γνωρίζουμε με δύο τρόπους: τον αυτοματοποιημένο όπως έχει ήδη περιγραφεί από Yokotsuka et al. 1997, τη λεγόμενη συσκευή Yokotsuka αλλά και τον χειροκίνητο μέσω ενός συστήματος προχοίδων. Στη συνέχεια θα αναλύσουμε τη πορεία κατασκευής των σφαιριδίων και με τους δύο τρόπους καθώς και τις μηχανικές ιδιότητες των σφαιριδίων που προκύπτουν.

Όσο αφορά την ακινητοποίηση με τη συσκευή Yokotsuka, η πορεία κατασκευής ήταν πιο απλή και σύντομη όπως έχει ήδη περιγραφεί πιο πάνω. Δηλαδή ο απαιτούμενος χρόνος σκλήρυνσης των σφαιριδίων ήταν πολύ μικρός σε σχέση με τον χειροκίνητο τρόπο. Τα σφαιρίδια που προκύπταν ήταν άψογου κυκλικού σχήματος και είχαν όλα το ίδιο μέγεθος.

Όσο αφορά την ακινητοποίηση με τον χειροκίνητο τρόπο, η πορεία κατασκευής ήταν πιο χρονοβόρα και λίγο περίπλοκη σε σχέση με τον αυτοματοποιημένο τρόπο. Λόγω του ότι με αυτό τον τρόπο η μονή ακινητοποίηση πραγματοποιείται μέσω της προχοίδας, ενώ η διπλή μέσω μεταφοράς των σφαιριδίων από το διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου στο διάλυμα αλγινικού με τη βοήθεια λαβίδας. Και επίσης ότι οι χρόνοι σκλήρυνσης των σφαιριδίων είναι μεγαλύτεροι σε σύγκριση με τον πιο πάνω. Το σχήμα των σφαιριδίων ποικίλει από ωοειδές μέχρι κυκλικό και το μέγεθος επίσης.

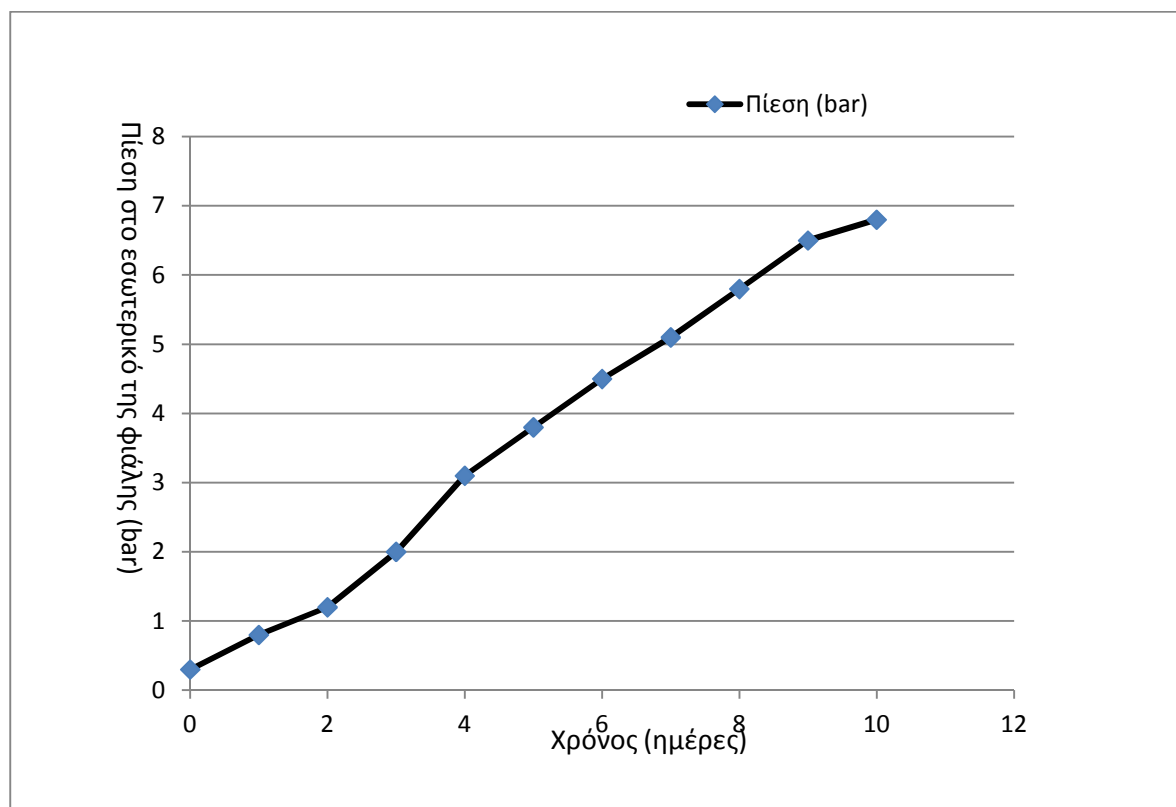
9.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΖΥΜΗΣ ΑΝΕΠΤΥΓΜΕΝΑ ΣΕ ΚΑΝΟΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΩΣΜΟΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

Με την τοποθέτηση των σφαιριδίων οι φιάλες κλείνονται με μεταλλικό καπάκι και αφήνονται πλαγιαστές για την διεξαγωγή της ζύμωσης

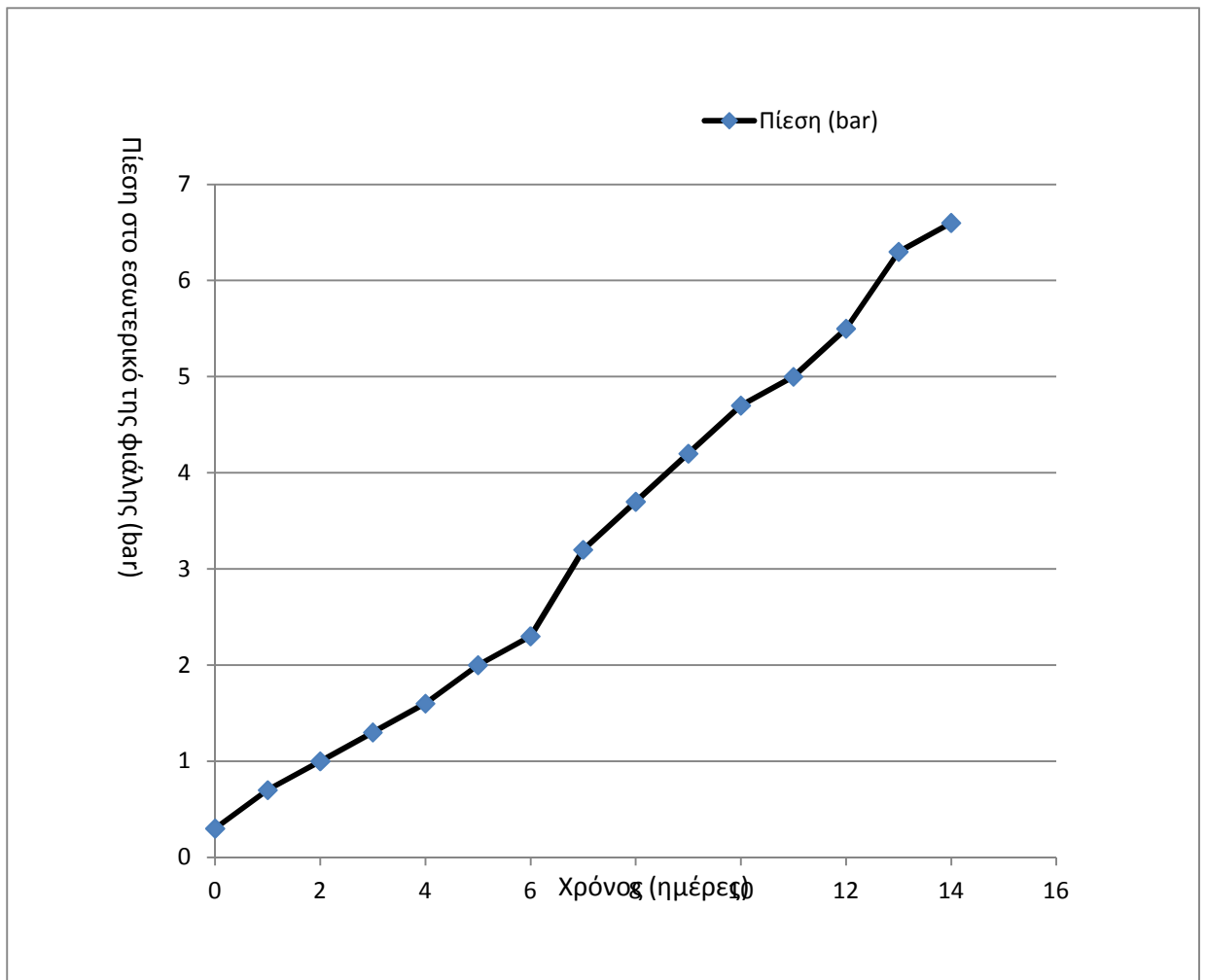


Κατά την δευτερογενή ζύμωση στην φιάλη παρακολουθήθηκαν οι εξής παράμετροι :

Μεταβολή της πίεσης στην φιάλη που παρουσιάζεται ακολούθως (Φιάλη με Ωσμωτικό στρες)



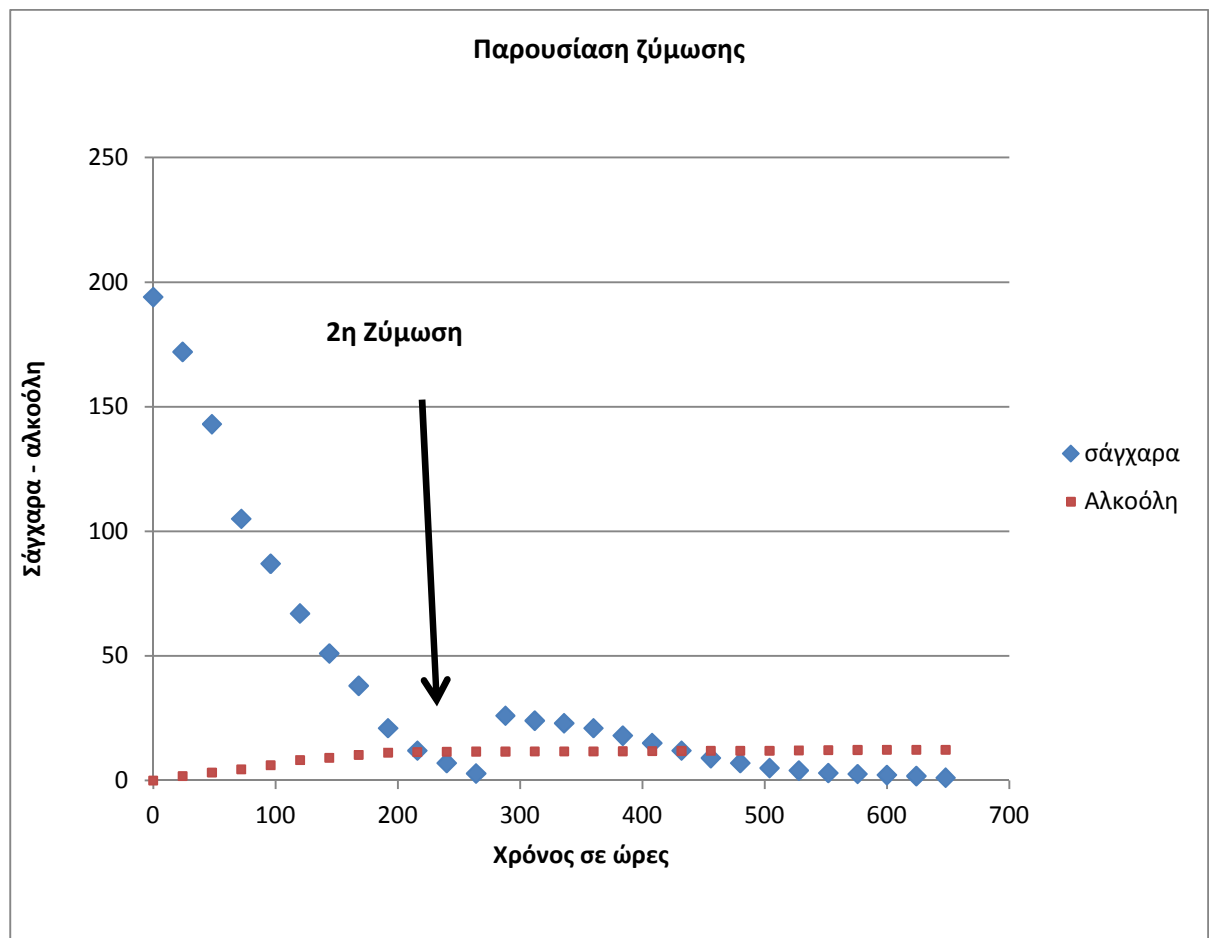
Μεταβολή της πίεσης στην φιάλη που παρουσιάζεται ακολούθως (Φιάλη χωρίς Ωσμωτικό στρες)



Η αποικοδόμηση των σακχάρων κατά την δευτερογενή ζύμωση και η παραγωγή αλκοόλης όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα(Χωρίς ωσμωτικό stress)

Ώρες	Baume'	αλκοόλη	Οξύτητα
0	194	0	6,8
24	172	1,8	6,8
48	143	3,2	6,7
72	105	4,5	6,7
96	87	6,1	6,6
120	67	8,2	6,6
144	51	9,1	6,5
168	48	10,3	6,5
192	40	11,2	6,5
216	38	11,4	6,4
240	33	11,5	6,4
264	28	11,6	6,4
288	26	11,6	
312	24	11,65	
336	23	11,67	
360	21	11,7	
384	18	11,72	
408	15	11,81	
432	12	11,85	
456	9	11,88	
480	7	11,9	
504	5	11,95	
528	4	12,1	
552	3	12,2	
576	2,6	12,25	
600	2,2	12,28	
624	1,8	12,2	
648	1,1	12,2	

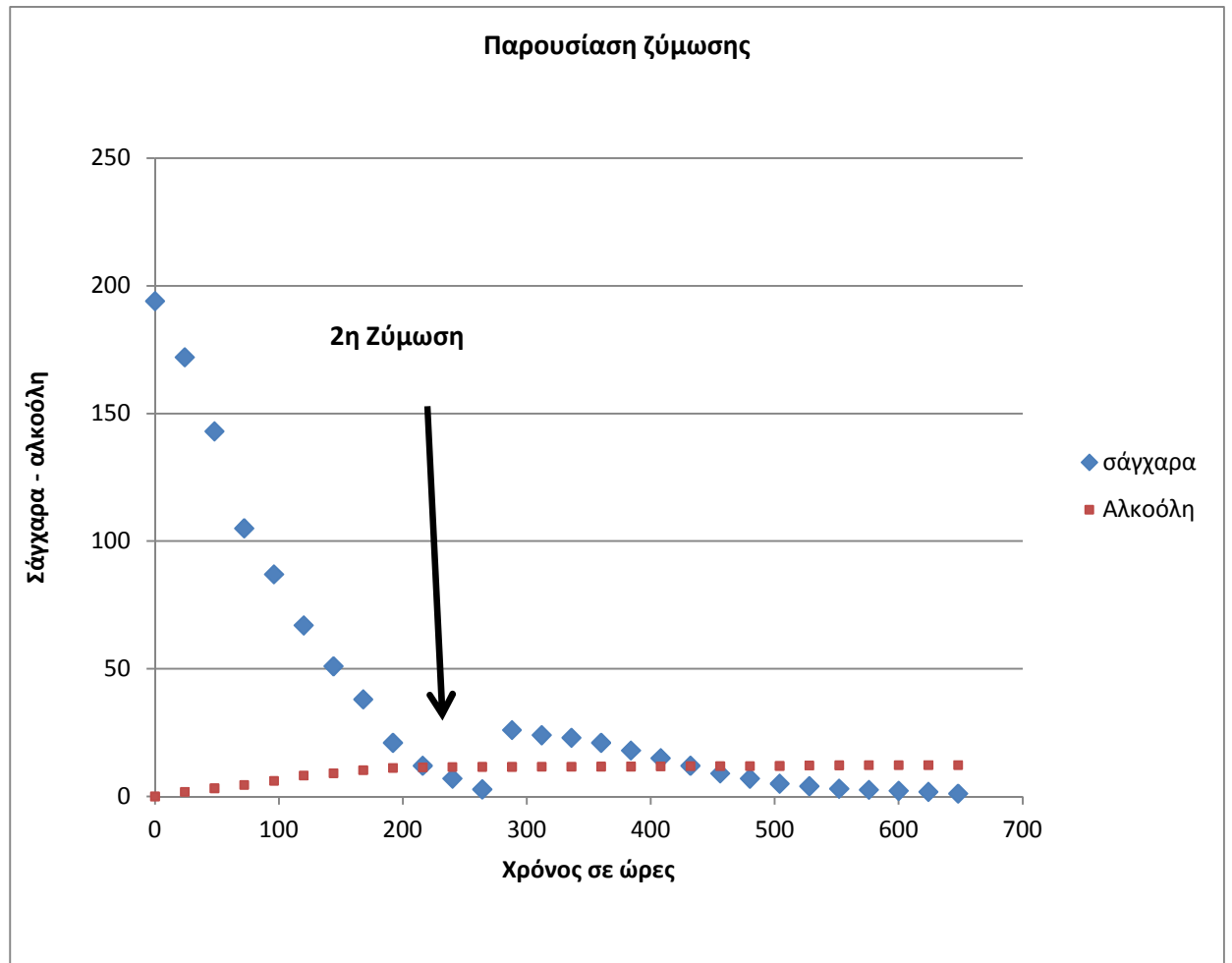
Αποικοδόμηση σακχάρων και παραγωγή αλκοόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο κατά την δευτερογενή ζύμωση. (Χωρίς ωσμωτικό stress)



Η αποικοδόμηση των σακχάρων κατά την δευτερογενή ζύμωση και η παραγωγή αλκοόλης όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα(Με ωσμωτικό stress)

Ώρες	Baume'	αλκοόλη	Οξύτητα
0	194	0	6,8
24	172	2	6,8
48	143	4,2	6,7
72	105	5,5	6,7
96	90	7,1	6,6
120	70	8,2	6,6
144	61	9,1	6,5
168	55	10,3	6,5
192	41	11,2	6,5
216	36	11,4	6,4
240	30	11,5	6,4
264	28	11,6	6,4
288	26	11,6	
312	24	11,65	
336	23	11,67	
360	21	11,7	
384	18	11,75	
408	15	11,81	
432	11	11,85	
456	9	11,88	
480	7	11,9	
504	5	11,95	
528	4	12,17	
552	3	12,2	
576	2,6	12,25	
600	2,2	12,3	
624	1,5	12,4	
648	0,7	12,4	

Αποικοδόμηση σακχάρων και παραγωγή αλκοόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο κατά την δευτερογενή ζύμωση. (Με ωσμωτικό stress)



Η σύσταση του τελικού προϊόντος απουσίας ωσμωτικού stress ήταν:

Αλκοολικός τίτλος 12,2% vol

Ολική οξύτητα 6,4 g/L σε τρυγικό

Πτητική οξύτητα 0,32 g/L σε οξικό

Πίεση CO₂ 6,7 bar

Ανάγοντα σάκχαρα 0,3 gr/l

Η σύσταση του τελικού προϊόντος με ωσμωτικό stress ήταν:

Αλκοολικός τίτλος 12,4% vol

Ολική οξύτητα 6,4 g/L σε τρυγικό

Πτητική οξύτητα 0,35 g/L σε οξικό

Πίεση CO₂ 6,9 bar

Ανάγοντα σάκχαρα 0,3 g/L

Με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης ακολούθησε η απομάκρυνση των ακινητοποιημένων κυττάρων από τις φιάλες διεργασία η οποία έγινε με δύο τρόπους

Με την παραδοσιακή μέθοδο της ψύξης

Με την χρήση κενών καπακιών πλαστικών (bidules) τα οποία τοποθετούνται στην φιάλη στο πάνω μέρος της πριν γίνει το κλείσιμο των φιαλών με το μεταλλικό καπάκι και πριν την διεξαγωγή της 2^{ης} ζύμωσης (εικόνα ποιο κάτω). Στο κενό μέρος των καπακιών είχε τοποθετηθεί η ποσότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε διάστημα 168 ωρών βάσει αποτελέσματος από την μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων είναι εμφανής η διαφορά ανάμεσα στις ζύμες που υπέστησαν ωσμωτικό στρες(55%) σε σχέση με τις ζύμες σε κανονικές συνθήκες(11%). Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι η μεθοδολογία έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα και ειδικότερα στο χρόνο διεξαγωγής της 2^{ης} ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα η ζύμωση παρουσία ωσμωτικού στρες ολοκληρώθηκε ταχύτερα από την κανονική. Επίσης ικανοποιητικά αποτελέσματα είχαμε στην συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα και στην οικονομικότερη λύση της απομάκρυνσης της λάσπης μετά την 2^η ζύμωση που είναι το σημαντικό και ίσχυσε και για τις δύο συνθήκες. Η ταχύτητα έναρξης της 2^{ης} ζύμωσης είναι ένα ακόμα προτέρημα της μεθοδολογίας. Δεν μπορεί να παραβλεφθεί πως ταχύτερα ξεκίνησε την ζύμωση η φιάλη με το ωσμωτικό στρες. Ακόμα ένα προτέρημα της μεθοδολογίας είναι πως η ίδια ποσότητα ακινητοποιημένων κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί τουλάχιστον ακόμα μία φορά. Τέλος μετά το πέρας της 2^{ης} ζύμωσης παρατηρούμε ο αφρώδης οίνος που προέρχεται από ζύμες που υπέστησαν ωσμωτικό στρες έχει παραπάνω τελικό αλκοολικό βαθμό 0,2% σε σχέση με αυτόν που οι ζύμες ήταν σε μη στρεσογόνες συνθήκες. Επίσης είχαμε και παραπάνω πίεση κατά 0,2 bar από τον αφρώδη οίνο που ήταν σε μη στρεσογόνες συνθήκες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Agouridis, N.; Bekatorou, A.; Nigam, P.; Kanellaki, M. Malolactic fermentation in wine with *Lactobacillus casei* cells immobilized on delignified cellulosic material. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53(7), 2546-2551
2. Albertyn, J., Hohmann, S., and Prior, B.A. 1994. Characterization of the osmotic stress response in *S. cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol 3-phosphate dehydrogenase independently. *Curr. Genet.* 25. pp 12-18.
3. Argiriou T., Kanellaki M., Viliotis S., Koutinas A. A., 1996. Kissiris-Supported Yeast Cells: High Biocatalytic Stability and Productivity Improvement by Successive Preservations at 0 °C. *J. Agric. Food Chem.*, 44, pp 4028–4031
4. Attfeld, P. V. 1987. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett.* 225. pp.259-263.
5. Attfeld, P. V. 1997. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.* 15, pp. 1351-1357.
6. Babayan, T.L., Bezrukov, M.G., Latov, V., Belikov, V.M., Belatseva, E.M. and Titova, E.F. (1981) Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. Morphological effects, rheological effects and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. *Current Microbiology* 5, 163–168
7. Babayan, T.L. and Bezrukov, M.G. (1985) Autolysis in yeast. *Acta Biotechnology*, 129–136
8. Babazadeh R., 2014. Integrative analysis of osmoregulation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
9. Bajpai P., A. Margaritis, 1986. Effect of temperature and pH on immobilized *Zymomonas mobilis* for continuous production of ethanol
10. Bakoyianis, V., Kana, K., Kalliafas, A. and Koutinas, A. A. (1993). Low-temperature continuous wine making by kissiris-supported biocatalyst: Volatile byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(3), 465-468.
11. Bakoyianis, V., Kanellaki, M., Kaliafas, A. and Koutinas, A. A. (1992). Low-temperature wine making by immobilized cells on mineral kissiris. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(7), 1293-1296.
12. Bardi, E. and Koutinas, A. A. (1994). Immobilization of yeast on delignified cellulosic material for room temperature and low-temperature wine making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 221– 226.
13. Bardi, E.P., Koutinas, A.A., Soupioni, M. and Kanellaki, M. 1996. Immobilization of Yeast on Delignified Cellulosic Material for Low Temperatures Brewing. *J. Agric. Food. Chem.*, 44(2), 463-467. (25 gia zi8opoia)

14. Bardi E., Koutinas A.A., Kanellaki M., 1997. Room and low temperature brewing with yeast immobilized on gluten pellets. *Process Biochemistry* Volume 32, Issue 8, November 1997, Pages 691–696
15. Barik J., 2014. Effect of immobilization on production of ethanol.
16. Becerra M., B. Baroli, A. M. Fadda, J. Blanco Méndez, M. I. González Siso, 2001. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis*
17. Bekatorou A., Sarellas A., Ternan N.G., Mallouchos A., Komaitis M., Koutinas A. A., Kanellaki M., 2002b. Low temperature brewing using yeast immobilized on dried figs. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7249 – 7257.
18. Bellinger, Y., and Larher, F., 1987. A ¹³C comparative nuclear magnetic resonance study of organic solute production and excretion by the yeast *Hansenula anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* in saline media *Can. J. Microbiol* 34, pp. 605-612.
19. Blomberg, A., and Adler, L. 1989. Roles of glycerol and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriology* 171, pp.1087-1092.
20. Blomberg, A., and Adler, L. 2000. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions some answers and a model *FEMS Microbiol. Lett.* 182, pp. 1-8.
21. Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E., and Gustin, M. C. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259, pp. 1760–1763.
22. Brown, A. D. 1978. Compatible Solutes and Extreme Water Stress in Eukaryotic Micro-Organisms. *Adv. Microbial. Phys.* 17, pp. 181-243.
23. Cabranes, C.; Moreno, J.; Mangas, J.J. Cider production with immobilized *Leuconostoc oenos*. *J. Inst. Brew.* 1998, 104, 127-130.
24. Carvalheiro, F., Roseiro, J.C., and Girio, F.M. 1999. Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 16, pp.543-550.
25. Cassidy M. B, H. Lee, J. T. Trevors, 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review
26. Charlemagne-Gilles Hounsa, E. Vincent Brandt, Johan The~elein,~ Stefan Hohmann³ⁿ⁴ and Bernard A. Prior¹, 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress.
27. Ciani M., Ferraro L., 1996. Enhanced Glycerol Content in Wines Made with Immobilized *Candida stellata* Cells. *Appl. Env. Microbiol.* 62, 128-132.
28. Delfini C., Formica J. *Wine Microbiology Science and Technology.*
29. Divies, C.; Cachon, R.; Cavin, J-F.; Prévost, H. Theme 4: Immobilized cell technology in wine production. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1994, 14(2), 135-153.
30. Doleyres Y. , I. Fliss, C. Lacroix, 2004. Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology
31. Domyeny Z., Smogrovicova ., Gemeiner P., Sturdik E., Patkova J., Malovikova A., 1998. Continuous secondary fermentation using immobilized yeast. *Biotechnol. Lett.* 20, 1041 – 1045.
32. Ferraro L., F. Fatichenti, M. Ciani, 2000. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*
33. Feuillat M., Charpentier C., 1982. Autolysis of Yeasts in Champagne. *Am. J. Enol. Vitic* 1982 vol. 33 no. 1 6-13
34. Fine T. , P. Leskinen, T. Isobe, H. Shiraishi, M. Morita, R. S. Marks, M. Virta, 2006. Luminescent yeast cells entrapped in hydrogels for estrogenic endocrine disrupting chemical biodetection
35. Fumi M. D. , G. Trioli, O. Colagrande, 1988. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottle-fermented sparkling wine production
36. Gaxiola, R., Dellarinoa, I.F., Villalba, J.M., and Serrano, R. 1992. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* 11, pp.3157-3164.

37. Genisheva Z., Macedo S., Mussatto I. S., Teixeira A. J., Oliveira M. J., 2012. Production of white wine by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on grape pomace. *J. Inst. Brew.* 2012; 118: 163–173
38. Godia, F., Casas, C., and Sola, C., Application of immobilized yeast cells to sparkling wine fermentation, *Biotechnol. Prog.*, 7, 468, 1991.
39. Groboillot A., D. K. Boadi, D. Poncelot, R. J. Neufeld, 1994. Immobilization of cells for application in the food industry
40. Growe. J.H. , H., F.A. , Inoue. And Sakurai, M. 1999. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, pp.579-599
41. Hamilton, A.C., Taylor, J.G., Good, G.A. 2002. Vacuolar H⁺-ATPase but not mitochondrial F1F0-ATPase is required for NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Let.* 208, pp. 227-232
42. Heit Caitlin, 2013. Hyperosmotic Stress and the Impact on Metabolite Formation and Redox Balance in *Saccharomyces cerevisiae* an *Saccharomyces bayanus* strains.
43. Herrero, M.; Laca, A.; Garcia, A.L.; Diaz, M. Controlled malolactic fermentation in cider using *Oenococcus oeni* immobilized in alginate beads and comparison with free cell fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 2001, 28, 35-41.
44. Herve A., Guilloux – Benatier M., 2006. Yeast autolysis in sparkling wine: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 119–127.
45. Hohmann S., 2002. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts.
46. Hohmann S., 2009. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
47. Iconomopoulou, M., Psarianos, K., Kanellaki, M. and Koutinas, A. A. (2002). Low temperature and ambient temperature wine making using freeze dried immobilized cells on gluten pellets. *Process Biochemistry*, 37, 707-717.
48. Iconomopoulou, M., Kanellaki, M., Soupioni, M. and Koutinas, A. A. (2003). Freeze dried immobilized cells on delignified cellulosic material in low-temperature and ambient temperature wine making. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104(1), 23-36.
49. Kosseva M., V. Beschkov, J. F. Kennedy, L. L. Lloyd, 1998. Malolactic fermentation in Chardonnay wine by immobilised *Lactobacillus casei* cells
50. Kostov Georgi, Mihail Angelov, Ivan Mihaylov, Denis Poncelot, 2010. Mechanical properties of Ca-alginate beads for ethanol fermentation with immobilized yeast.
51. Kourkoutas Y., M. Komaitis, A. A. Koutinas, M. Kanellaki, 2001. Wine Production Using Yeast Immobilized on Apple Pieces at Low and Room Temperatures.
52. Kourkoutas, Y., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., Banat, I. M. and Marchant, R. (2002a). Continuous wine fermentation using a psychrophilic yeast immobilized on apple cuts at different temperatures. *Food Microbiology*, 19, 127-134.
53. Kourkoutas, Y., Douma, M., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., Banat, I. M. and Marchant, R. (2002b). Continuous winemaking fermentation using quince-immobilized yeast at room and low temperatures. *Process Biochemistry*, 39, 143-148.
54. Kourkoutas Y., Komaitis M., Koutinas A. A., Kaliafas A., Kanellaki M., Marchant R. and Banat I. M. (2003b). Wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at temperatures between 30 and 0 °C. *Food Chemistry*. 82, 353-360.
55. Kourkoutas Y. , Bekatorou A. , Banat I.M., Marchant R., Koutinas , A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review *Food Microbiology* 21 (2004) 377–397
56. Krajewska B., 2004. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review
57. Leroy M. J., Charpentier M., Duteurtre B., Feuillat M., Charpentier C., 1990. Yeast Autolysis During Champagne Aging. *Am. J. Enol. Vitic* 1990 vol. 41 no. 1 21-28
58. Lillie, S.H., Pringle, J.R. 1980 Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol.* 143(3), pp.1384–1394.
59. Linko M., Haikara Auli, Ritala Anneli, Penttila Merja, 1998. Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology* 65 (1998) 85–98

60. Logothetis S., Walker G., Neratzis T. E., 2007. Effect of salt hyperosmotic stress on yeast cell viability.
61. Logothetis Stilianos, Elias T Nerantzis, Anna Gioulioti, Tasos Kanelis, Tataridis Panagiotis, Graeme Walker, 2010. Influence of sodium chloride on wine yeast fermentation performance.
62. Lonvand – Funel A., 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 209-214.
63. Loukatos, P., Kiaris, M., Ligas, I., Bourgos, G., Kanellaki, M, Komaitis, M. and Koutinas, A. A. (2000). Continuous wine making by γ -alumina-supported biocatalyst-Quality of the wine and distillates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 89, 1-13.
64. Maicas S., Pardo I., Ferrer S., 2001. The potential of positively charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 28, 415-419.
65. Mallios P., Kourkoutas Y., Iconomopoulou M., Koutinas A. A., Psarianos C., Marchant R., Banat IM., 2004. Low – temperature wine – making usinh yeast immobilized on pear pieces.
66. Mallouchos, P. Reppa, G. Aggelis, M. Kanellaki, A.A. Koutinas, M. Komaitis, 2002. Grape skins as a natural support for yeast immobilization.
67. Mallouchos, A., Reppa, P., Aggelis, G., Kanellaki, M., Koutinas, A. A. and Komaitis, M. (2003c). Grape skins as a natural support for yeast immobilization. *Biotechnology Letters*, 24(16), 1331-1335.
68. Martin A., M, 1991. Bioconversion of waste materials to industrial products, *Elvesier, Applied science.* 63-166
69. Martínez-Rodríguez AJ, Polo MC, Carrascosa AV, 2001. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int J Food Microbiol.* 2001 Dec 4;71(1):45-51.
70. Martynenko N. N., I. M. Gracheva, 2003. Physiological and Biochemical Characteristics of Immobilized Champagne Yeasts and Their Participation in Champagnizing Processes: A Review
71. Molin C., 2009. The oxidative and osmotic stress responses of *S. cerevisiae*.
72. Nagashima M., M. Azuma, S. Noguchi, K. Inuzuka, H. Samejim, 1984. Continuous Ethanol Fermentation Using Immobilized Yeast Cells
73. Nedovic, V.A.; Durieux, A.; Van Nedervelde, L; Rosseels, P.; Vandegans, J.; Plaisant, A-M.; Simon, J-P. Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, 26, 834-839.
74. Nedovic V. A., Manojlovic V., Bugarski B., Willaert R., 2011. State of the art in immobilizes/encapsulated cell technology in fermentation processes. *Food Engineering Interfaces*,
75. Norberg, J. and. Blomberg, A. 1997. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1,4 NaCl: Evidence of Osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J. Biol. Chem.* 272: 5544-5554.
76. Norton S., T. D'Amore, 1994. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing
77. Ntagas P. , P., Tataridis, M-C., Chinchilla Fandos, L., Esteve Justamante, E.T. Nerantzis , 2003. The use of immobilized yeast technology for the production of rose and white sparkling wine from grape varieties of the Zitsa region, in Greece.
78. Ölz, R., Larsson, K., Adler, L. & Gustafsson, L. 1993. Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J Bacteriol* 175, pp.2205-2213.
79. Orive Gorka, Rose Maria Hernandez, Alicia Rodriguez Gascon, Riccardo Calafiore, Thomas Ming Swi Chang, Paul de Vos, Gonzalo Hortelano, David Hunkeler, Igor Lacık, Jose Luis Pedraz, 2004. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation.

80. Polychroniadou, E.; Kanellaki, M.; Iconomopoulou, M.; Koutinas, A.A.; Marchant, R.; Banat, I.M. Grape and apple wines volatile fermentation products and possible relation to spoilage. *Bioresource Technol.* 2003, 87, 337-339.
81. Pueyo E¹, Martínez-Rodríguez A, Polo MC, Santa-María G, Bartolomé B, 2000. Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *J Agric Food Chem.* 2000 Jan;48(1):116-22
82. Pujol – Puig A., Bertran E., Martinez – Garcia T., Capdevila F., Minguez S., Mauricio C. J., 2013. Application of new organic yeast immobilization method for sparkling wine production. ARTICLE in AMERICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE · SEPTEMBER 2013
83. Rodrigues – Pousada Amelia Claudina, Nevvit T., Menezes R., Azevedo D., Pereira J., Amaral A., 2004. Yeast activator proteins and stress response : an overview. *Apt.* 127, 2781-901 Oeiras Codex,
84. Rosa Carlos, Gabor Peter, 2006. Biodiversity – Ecophysiology of Yeasts.
85. Saito H., Posas F., 2012. Response to Hyperosmotic Stress.
86. Scott, J.A.; O' Reilly, A. Co-immobilization of selected yeast and bacteria for controlled flavour development in an alcoholic cider beverage. *Process Biochem.* 1996, 31,111-117.
87. Shen H.-Y., N. Moonjai, K. J. Verstrepen, F. R. Delvaux, 2003. Impact of Attachment Immobilization on Yeast Physiology and Fermentation Performance.
88. Šmogrovičová D., Dömény Z., 1999. Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. *Process Biochemistry Volume 34, Issue 8, October 1999, Pages 785–794*
89. Spanga G., Barballa R. N., Casarini D., Pifferi P.G., 2001. A novel chitosan derivative to immobilize alpha-L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 427-438
90. Taillandier, P.; Cazottes, M.L.; Strehaiano, P. Deacidification of grape musts by *Schizosaccharomyces* entrapped in alginate beads-A continuous fluidized -bed process. *Chem. Eng. J. Biochem. Eng. J.* 1994, 55, B29-B33.
91. Takaya M., Matsuhoto N., Yanase H., 2002. Characterization of membrane bioreactor for dry wine production. *J. Biosci. Eng.* 55, B29-B33.
92. Thonart Ph., M. Custinnet , M. Paquot, 1981. Zeta potential of yeast cells: application in cell immobilization.
93. Torresi S., Frangipane T. M., Anelli G., 2011. Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: a review. *Food Chemistry* 129 (2011) 1232–1241
94. Torresi S., 2015. Yeast lysis during bottle-fermented sparkling wines ageing in presence of β -glucanase oenological preparation. UNIVERSITY OF TUSCIA, VITERBO
95. Tsakiris, A., Bekatorou, A., Psarianos, C., Koutinas, A. A., Marchant, R. and Banat, I. M. (2004a). Immobilization of yeast on dried raisin berries for use in dry white wine-making. *Food Chemistry*, 87, 11-15.
96. Willaert R. , V. A. Nedovic, 2006. Review Primary beer fermentation by immobilised yeast – a review on flavour formation and control strategies
97. K. Yokotsuka, M. Yajima, T. Matsudo, Production of bottle-fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands, *Am. J. Enol. Vitic.* 48, No. 4, 471-481, (1997).

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

98. Αλεξανδρή – Χατζηαντωνίου Ε., 2004. Βιολογία η μελέτη της ζωής
99. Βλαχάκη Ε., Καραάμπελα Σ., 2005. Εφαρμογές των ακινητοποιημένων ζυμών στην ζυθοποιία.
100. Δριχούτης Π. , 2007. Παραγωγή προϊόντων αλκοολικής ζύμωσης με χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων.
101. Κανδύλης Π., 2009. Χρήση ακινητοποιη μενών σε άμυλο και αμυλούχες πρώτες ύλες βιοκαταλυτών στην οινοποίηση σε πιεστή και λυοφιλωμένη μορφή
102. Καψοπούλου Αικ., 1995, Σημειώσεις Βιοχημείας, Τ.Ε.Ι. Αθήνας , Σ.ΤΕ.ΤΡΟ.Δ. σελ.15-16,26,30,32-33,35,38,39-40,60,82,114-115,119
103. Κιρμιζάκης Ι., Γκάβελας Ι., 2009. Παραγωγή αφρώδων οίνων στην Ελλάδα.
104. Κεφαλογιάννη Ε., 2007. Ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί σηματοδότησης κατά την επίδραση στρες σε οργανισμικό και κυτταρικό επίπεδο.
105. Λογοθέτης, Στρες και Ζυμομύκητες Αντίδραση και Φυσιολογία eclass
106. Λογοθέτης Σ., 1998. Συνεχής Παραγωγή Κρασιού σε Ζυμωτήρες τύπου Στήλης με Ακινητοποιημένους Μύκητες *Saccharomyces bayanus* killer. Πτυχιακή εργασία.
107. Μπαρδή Ε., 1997. Παραγωγή Κρασιού και Μπύρας με Ακινητοποιημένα Κύτταρα σε Απολιγνινοποιημένα Κυτταρινούχα Υλικά και Γλουτένη.
108. Νερατζής Ηλίας, 1997, Εισαγωγή στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Οινολογίας και Τεχνολογίας Ποτών, Τ.Ε.Ι. Αθήνας
109. Νεραντζής Η., 2009. Εισαγωγή στην Μικροβιολογία
110. Οικονομάκος Γ., 2011. Παρασκευή Παλαιωμένου Τσίπουρου. Πτυχιακή εργασία, Καλαμάτα.
111. Πανταζοπούλου Γ., Ντάγκας Π., 2001. Αφρώδεις Οίνοι. Πτυχιακή εργασία
112. Παπανικολαού Β., 2006. Μέθοδοι και Υλικά Ακινητοποίησης Βιοκαταλυτών για την Παραγωγή Καύσιμης και Βιομηχανικής Αλκοόλης σε Βιοαντιδραστήρα Διαλειπτός Έργου. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πάτρα.
113. Πολίτη Κ., 2012. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του pH στην καταλυτική δραστηριότητα εμπορικών στελεχών ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*.
114. Σουφλερός Ηρ. Ε., 2012. Οινολογία Επιστήμη και Τεχνολογία.
115. Ταταρίδης Π., Ντάγκας Π., Βούλγαρης Ι., Νερατζής Ε., Παραγωγή αφρώδους οίνου με χρήση ακινητοποιημένων ζυμών.
116. Ταταρίδης Π. Νομοθεσία οίνων και ποτών.
117. Τσακίρης Α. Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί.
118. Τσουκαλά Α. Αφρώδεις Οίνοι.
119. Συστα Κ. Β., 2007. Καινοτόμος Μέθοδος για Παραγωγή Οίνου σε Οικιακή Κλίμακα με Ξηρές Πρώτες Ύλες

ΛΕΞΙΚΟ ΟΡΩΝ

- Acr1p:** μεταφορέας σουκινικού/φουμαρικού
ADP: διφωσφορική αδενοσίνη
AMP: μονοφωσφορική αδενοσίνη
API: πρωτεΐνη ενεργοποίησης 1
Asp: ασπαρτικό οξύ
ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη cAMP: κυκλικό AMP
 β -zip protein: βασικός τομέας φερμουάρ λευκίνης
CAD1p: βασικό φερμουάρ λευκίνης, ενεργοποιητής μεταγραφής
Cla4p: πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης
Cdc42p: small rho-like GTPase
ctGPD:
CR1: συμπλήρωμα υποδοχέα τύπου 1
CR2: συμπλήρωμα υποδοχέα τύπου 2
DNA (complementary DNA) cGMP: κυκλικό GMP
CDRE: στοιχείο απόκρισης εξαρτώμενο από καλσινευρίνη
Crz1: παράγοντας μεταγραφής
ENA1: αντλία νατρίου Ρ-τύπου ATP
ERK5: extracellular regulated kinase 5
ERK1/2 : extracellular regulated kinases ½
Fus3p: πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης ενεργοποιούμενη από μιτογόνα
GAPDH: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης
Gcn4p: bZIP μεταγραφικός ενεργοποιητής της βιοσύνθεσης των γονιδίων των αμινοξέων
GDP: διφωσφορική γουανοσίνη GMP: μονοφωσφορική γουανοσίνη
GPD1: αφυδρογονάση 3-φωσφορικής γλυκερόλης εξαρτώμενη από NAD
GPD2: αφυδρογονάση 3-φωσφορικής γλυκερόλης εξαρτώμενη από NAD
GPCRs: υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες
GPx: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GPP1: 1 φωσφορική γλυκερόλη
Gpx3p: υπεροξειδάση γλουταθειόνης
GSH1: Gamma glutamylcysteine synthetase
GTT: τρσανσφεράση γλουταθειόνης
GTP: τριφωσφορική γουανοσίνη
Hac1p: βασικό φερμουάρ λευκίνης (bZIP), μεταγραφικός παράγοντας
H2O2: υπεροξειδίο υδρογονου
His: ιστιδίνη
HOG: υψηλή ωσμωτικότητα γλυκερόλη (high osmotic glycerol)
HOG1p: πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνα που εμπλέκεται σε οσμωρύθμιση
HSE: στοιχείο θερμικού σοκ
HSF: παράγοντας θερμικού σοκ
HSP: πρωτεΐνη θερμικού σοκ
JNKs: κινάσες του αμινοτελικού άκρου του c-Jun
Kss1p: πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνα (MAPK)
MAP: σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη (microtubule associated protein)

MAP3K: βλέπε MAPKKK

MAPK: ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (mitogen activated protein kinase)

ΜΑΡΚΑΡΚ: πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από τη MAPK (MAPK- activated protein kinase)

MAPKK: κινάση της MAPK

MAPKKK: κινάση της MAPKK

MEK: βλέπε MAPKK **MEKK:** βλέπε MAPKKK

MKK: βλέπε MAPKK

MKP: φωσφατάση της MAPK (MAPK phosphatase)

MNK: κινάση που αλληλεπιδρά με τη MAPK (MAPK-interacting kinase)

Msn2p: μεταγραφικός ενεργοποιητής σε απόκριση προς στρες

Msn4p: μεταγραφικός ενεργοποιητής σε απόκριση προς στρες

NADH: νικοτιναμίδιο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο

Pbs2p: MAP κινάση κινάσης του μονοπατιού σηματοδότησης HOG

p38: πρωτεϊνική κινάση 38

PCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction)

PKA: πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A)

PKB: πρωτεϊνική κινάση B (protein kinase B) ή **Akt** κινάση

PKC: πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C)

PKG: εξαρτώμενη από το cGMP κινάση (cGMP-dependent protein kinase)

PTB: περιόχες πρόσδεσης (phosphor-tyrosine binding)

Ptc1p: πρωτεϊνική φωσφατάση τύπου 2C

Ptc2p: πρωτεϊνική φωσφατάση τύπου 2C

Ptc3p: πρωτεϊνική φωσφατάση τύπου 2C

PTP2: πυρηνική φωσφοτυροσίνη – ειδική φωσφατάση που εμπλέκεται σε οσμоруθμιση

RNA: ριβοξυνοκλεϊνικό οξύ (ribonucleic acid)

ROS: ενεργές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species)

RSK: ριβοσωμική S6 κινάση (ribosomal S6 kinase)

RTKs: υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (receptor tyrosine kinases)

SAPK: ενεργοποιούμενη από το στρες κινάση (stress activated protein kinase)

Ser: σερίνη

SH2: περιοχές ομολογίας Sre 2 (Sre homology domain 2)

She: πρωτεΐνη που περιέχει SH2 περιοχή (SH2 containing protein)

Sho1p: διαμεμβρανικός οσμοσένσορας για ανάπτυξη του μονοπάτιου HOG

Sln1p: διαμεμβρανικός φωσφομεταφορέας ιστιδινικής κινάσης - οσμοσένσορας

Slt2: πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνα

Smk1p: Middle sporulation-specific mitogen-activated protein kinase (MAPK)

Sko1p: βασικός παράγοντας μεταγραφής φερμουάρ λευκίνης της οικογένειας ATF/CREB

Ssk1: κυταροπλασματικός phosphorelay ενδιάμεσος οσμοσένσορας και ρυθμιστής

Ssk2: MAPKKK της οδού σηματοδότησης HOG1 ενεργοποιημένη από μιτογόνα

Ssk2p: MAPKKK της οδού σηματοδότησης HOG1 ενεργοποιημένη από μιτογόνα

Sre: κινάση Sre

Ste2p: υποδοχέας για τον α – παράγοντα φερομόνης

Ste3p: υποδοχέας για παράγοντα φερομόνης

Ste5p: Pheromone-responsive MAPK scaffold protein

Ste7p: μεταγωγή σήματος MAPKK

Ste11p: μεταγωγή σήματος MEK κινάσης

STRE: μεταγραφικό στοιχείο απάντησης στο stress

Thr: θρεονίνη

Tps3: ρυθμιστική υπομονάδα συνθάσης/φωσφατάσης 6 φωσφορικής τρεχαλόζης

Tyr: τυροσίνη

Yap1p: μεταγραφικός παράγοντας

Ypd1: τρανσφεράση ομάδων φωσφόρου

Ypd1p: Osmotic stress-responsive phosphorelay intermediate sensor protein