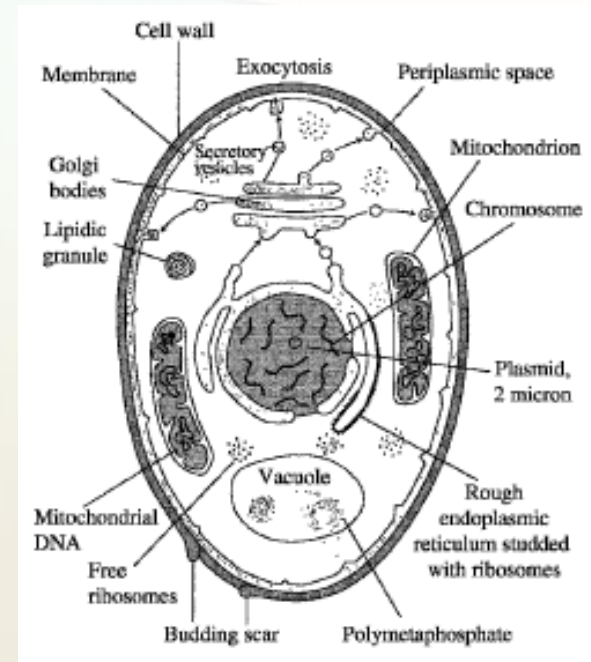


# Παραγωγή αιθανόλης από μικροοργανισμούς

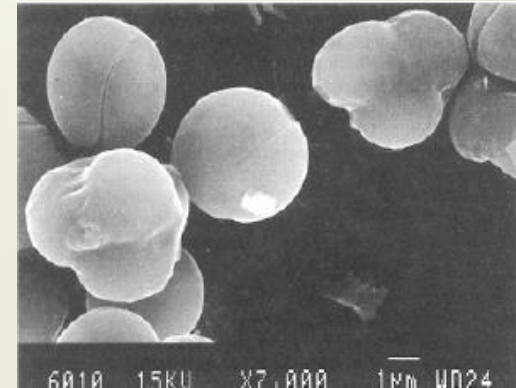
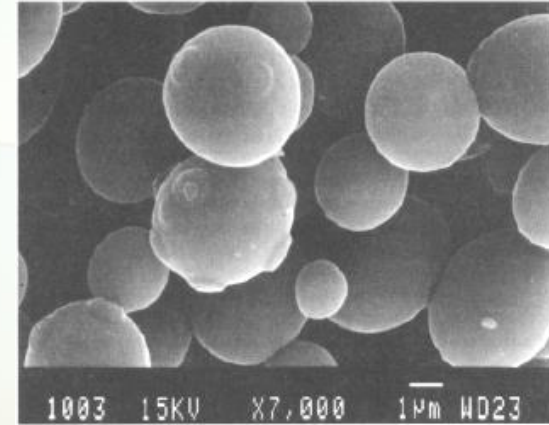
# Ζύμες

- Από την εποχή του Pasteur, οι ζύμες και η αλκοολική ζύμωση τράβηξαν το ενδιαφέρον πολλών μελετών σε επίπεδο Μικροβιολογίας, Βιοχημείας, Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας
- Οι ζύμες είναι μονοκυττάρια μύκητες
- Αναπαράγονται με εκκόλαψη (εκβλάστηση) ή διαίρεση
- Σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζονται ως πολυκυττάρια, αλλά πρόκειται για ομαδοποιήσεις μονοκυττάρων οργανισμών
- Διακρίνονται σε τρεις τάξεις, ανάλογα με την αναπαραγωγή τους
  - **sac fungi (Ascomycetes)**
  - **club fungi (Basidiomycetes)**
  - **imperfect fungi (Deuteromycetes)**
- Οι ζύμες της επιφάνειας των σταφυλιών και του κρασιού ανήκουν στους Ascomycetes και Deuteromycetes



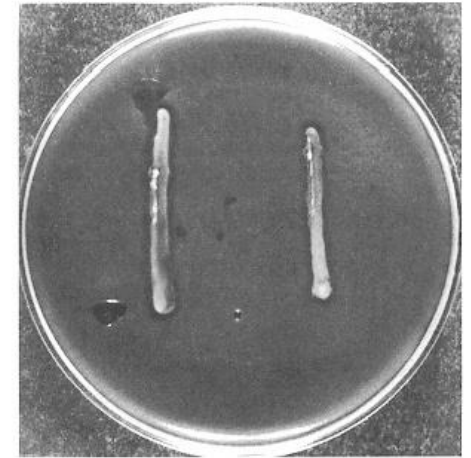
# Αναπαραγωγή στις ζύμες

- Ο *S. Cerevisiae*, όπως και άλλες ζύμες της τάξης των Ascomycetes, αναπαράγονται είτε μέσω αγενούς πολλαπλασιασμού είτε σεξουαλικά σχηματίζοντας ακροσπόρια
- Εξ ορισμού, οι ζύμες της τάξης των imperfect fungi αναπαράγονται μέσω αγενούς πολλαπλασιασμού
  - Πραγματοποιείται με τη δημιουργία εκβλαστημάτων
- Όταν οι σποριοπαραγωγικές ζύμες (διπλοειδή κύτταρα) διατηρούνται σε εχθρικό θρεπτικό μέσο
  - **χωρίς σάκχαρα ή φτωχό σε άζωτο**
  - δεν αναπαράγονται
- Μερικές μετατρέπονται σε μορφή σάκου, που καθένας περιέχει 4 απλοειδή ακροσπόρια, έπειτα από μειωτική διαίρεση
- Όταν μεταφερθούν σε ιδανικές συνθήκες θρεπτικών συστατικών, τα ακροσπόρια εκβλαστάνουν, σπάζουν το σάκο και αρχίζουν την αναπαραγωγή τους



# Τα στελέχη-δολοφόνοι

- Ορισμένα στελέχη, τα killer strains (K), εκκρίνουν τοξίνες στο περιβάλλον και μπορούν να θανατώσουν τα ευαίσθητα στελέχη (S)
- Τα στελέχη-δολοφόνοι, χωρίς να είναι ευαίσθητα στις δικές τους τοξίνες, μπορούν να θανατωθούν από ξένες τοξίνες
- Τα ουδέτερα στελέχη (N) δεν παράγουν τοξίνες, είναι όμως ανθεκτικά
- Η δράση ενός στελέχους-δολοφόνου επιδεικνύεται εργαστηριακά με καλλιέργεια σε άγαρ σε pH 4.2–4.7 στους 20°C
- Το ευαίσθητο στέλεχος ενσωματώνεται στο άγαρ πριν αυτό πήξει
- Το εξεταζόμενο στέλεχος τοποθετείται στο άγαρ σε μορφή ράβδου
- Αν είναι στέλεχος-δολοφόνος, τότε σχηματίζεται μια καθαρή ζώνη γύρω από τις ραβδώσεις, στην οποία το ευαίσθητο στέλεχος δεν μπορεί να αναπτυχθεί
- Αυτό το φαινόμενο ανακαλύφθηκε στον *S. Cerevisiae*, όμως υφίσταται και σε άλλες ζύμες, όπως *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Kluyveromyces* και *Debaryomyces*



Identification of the K2 killer phenotype in *S. cerevisiae*. The presence of a halo around the two streaks of the killer strain is due to the death of the sensitive strain cultivated on the medium

# Τα στελέχη-δολοφόνοι

- Οι ζύμες-δολοφόνοι ταξινομούνται σε 11 ομάδες, ανάλογα με την ευαισθησία της αντίδρασης, τη φύση και τις ιδιότητες της τοξίνης
- Στον *S. Cerevisiae*, το φαινόμενο σχετίζεται με την παρουσία διπλοελικωμένου RNA (virus-like particles - VLP) στο κυτταρόπλασμα
  - Πρόκειται για την κατηγορία των μη-λοιμωδών mycovirus
- Υπάρχουν δύο μορφές VLP: M και L
  - Το γονιδίωμα M (1.3–1.9 kb) κωδικοποιεί την K τοξίνη και τον ανοσογόνο παράγοντα (R)
  - Το γονιδίωμα L (4.5 kb) κωδικοποιεί μια RNA πολυμεράση και την καψιδική πρωτεΐνη που ενκαψυλιώνει τα δύο γονιδιώματα
- Τα στελέχη-δολοφόνοι (K+R+) εκκρίνουν την τοξίνη και ταυτόχρονα έχουν ανοσία σ' αυτή
- Τα ευαίσθητα κύτταρα (K-R-) δεν διαθέτουν M VLP, όμως πολλά από αυτά έχουν L VLP
- Τα ουδέτερα στελέχη (K-R+) έχουν ανοσία στην τοξίνη χωρίς να την παράγουν
- Οι δύο μορφές των ιικών σωματιδίων είναι απαραίτητες ώστε να εκδηλωθεί ο δολοφονικός φαινότυπος (K+R+) από τις ζύμες δεδομένου ότι ο L mycovirus είναι απαραίτητος για να επιβιώσει και ο τύπος M

# Στελέχη-δολοφόνοι και οινοποίηση

- Τρία είδη δραστηριότητας υφίστανται, ανάλογα με την κωδικοποιούμενη τοξίνη από τα M1, M2 και M3 VLPs (1.9, 1.5 and 1.3 kb) και αναφέρονται ως K1, K2 και K3
  - Οι τύποι K2 και K3 είναι παρόμοιοι
  - Το M3 VLP προέρχεται από μετάλλαξη του M2 VLP
- Τα στελέχη K2 είναι τα πλέον διαδεδομένα στον *S. cerevisiae*
- Η συχνότητα εμφάνισης τέτοιων στελεχών (σε σταφύλια ή μούστο) ποικίλλει, αλλά γενικά τα στελέχη-δολοφόνοι τύπου K2 φαίνεται να αντιπροσωπεύουν πάνω από το 50% των αγρίων στελεχών
  - Στα αμπέλια Μεσογειακών περιοχών της Γαλλίας και σε εκείνα της περιοχής Beaujolais ανέρχονται σε 65-90%
  - Στα αμπέλια της περιοχής Tourraine δεν ανιχνεύονται
  - Στα αμπέλια της περιοχής Bordeaux το 100% των στελεχών εμφανίζουν το φαινόμενο
  - Στα Ιταλικά αμπέλια αντιπροσωπεύουν ως 80%
  - Ανάλογη παρουσία τέτοιων στελεχών εμφανίζεται και στο νότιο ημισφαίριο (Αυστραλία, Ν. Αφρική και Βραζιλία)
- Στα αμπέλια της Ιαπωνίας τα στελέχη-δολοφόνοι εμφανίζουν τον τύπο K1
- Οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται σε *S. Cerevisiae*, αλλά το φαινόμενο υφίσταται και σε άλλες ζύμες (*Hanseniaspora uvarum* και *Pichia kluyveri*), ενώ σε άλλες (*Candida*, *Hanseniaspora*, *Hansenula* και *Torulaspora*) όχι

# Στελέχη-δολοφόνοι και οινοποίηση

- Έχει γίνει εκτεταμένη μελέτη της δραστικότητας και σταθερότητας της K2 τοξίνης σε συνθήκες οινοπαραγωγής
- Η τοξίνη είναι δραστική στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των κυττάρων
- Τα κύτταρα κατά τη στατική φάση φαίνεται να είναι σχετικά σταθερά
- Το ποσό της αιθανόλης ή του SO<sub>2</sub> στο κρασί φαίνεται πως δεν έχει επίδραση στη δραστικότητα της τοξίνης
- Η τοξίνη καταστρέφεται γρήγορα με θέρμανση
  - Ο χρόνος ημιζωής της είναι περίπου 30 min στους 32°C
- Η τοξίνη ανενεργοποιείται ταχύτατα από την παρουσία φαινολικών συστατικών
- Η τοξίνη απορροφάται από μπεντονίτη

# Ταξινόμηση των ζυμών της οινοποιίας

<i>Saccharomycetaceae</i> family (sporogeneous)			<i>Spermophthoraceae</i> family (asporogeneous)	<i>Cryptococcaceae</i> family (asporogeneous)
Sub-family	Sub-family	Sub-family		—
<i>Schizosaccharomycetoideae</i>	<i>Nadsonioideae</i>	<i>Saccharomycetoideae</i>		
Genus	Genus	Genus	Genus	Genus
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Saccharomycodes</i> <i>Hanseniaspora</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Dekker</i> <i>Hansenula</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Zygosaccharomyces</i> <i>Torulaspota</i>	<i>Metschnikowia</i>	<i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Kloeckera</i> <i>Rhodotorula</i>



# Ποικιλίες του Σακχαρομύκητα

	Fermentation					
	Ga	Su	Ma	Ra	Me	St
<i>Saccharomyces</i>						
<i>aceti</i>	-	-	-	-	-	-
<i>bayanus</i>	-	+	+	+	-	-
<i>capensis</i>	-	+	-	+	-	-
<i>cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-
<i>chevalieri</i>	+	+	-	+	-	-
<i>coreanus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>diastaticus</i>	+	+	+	+	-	+
<i>globosus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>heterogenicus</i>	-	+	+	-	-	-
<i>hienipiensis</i>	-	-	+	-	+	-
<i>inusitatus</i>	-	+	+	+	+	-
<i>norbensis</i>	-	-	-	-	+	-
<i>oleaceus</i>	+	-	-	+	+	-
<i>oleaginosus</i>	+	-	+	+	+	-
<i>prostoserdovii</i>	-	-	+	-	-	-
<i>steineri</i>	+	+	+	-	-	-
<i>uvarum</i>	+	+	+	+	+	-

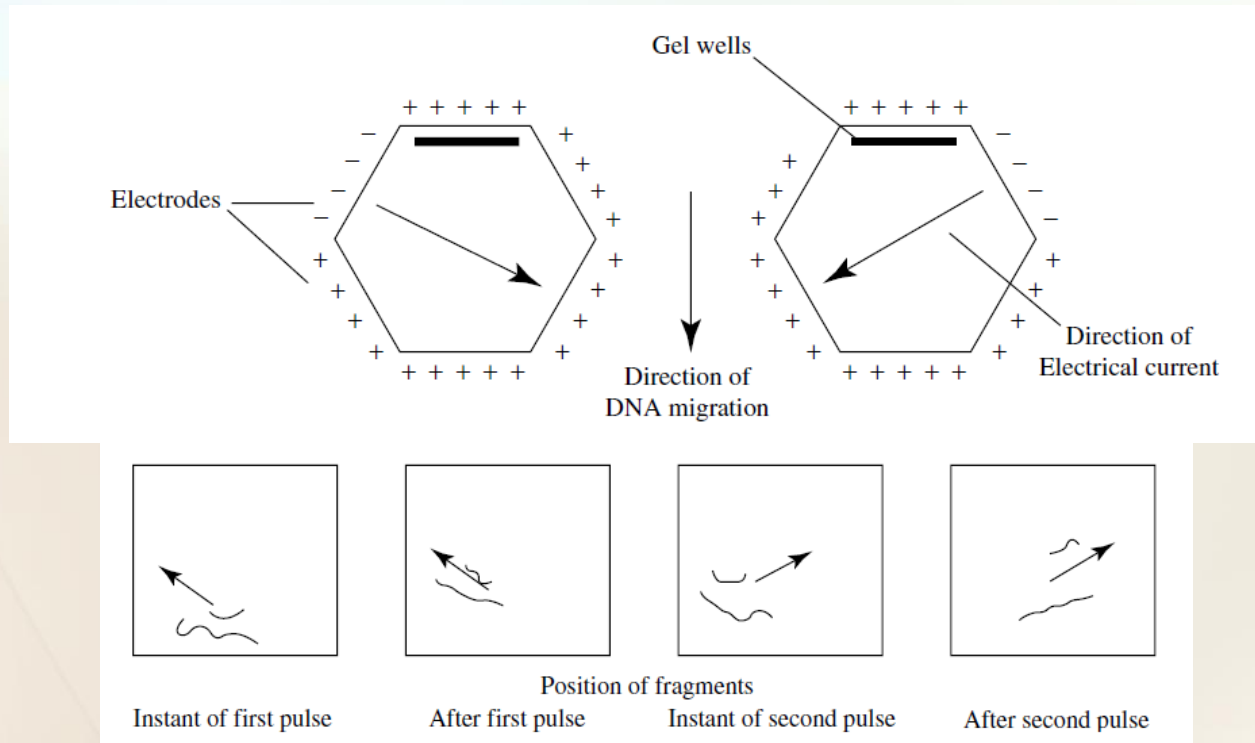
Ga = D-galactose; Su = saccharose; Ma = maltose; Ra = raffinose; Me = melibiose; St = soluble starch.

# Ταυτοποίηση των ειδών των οινοποιητικών ζυμών: Γενικές αρχές

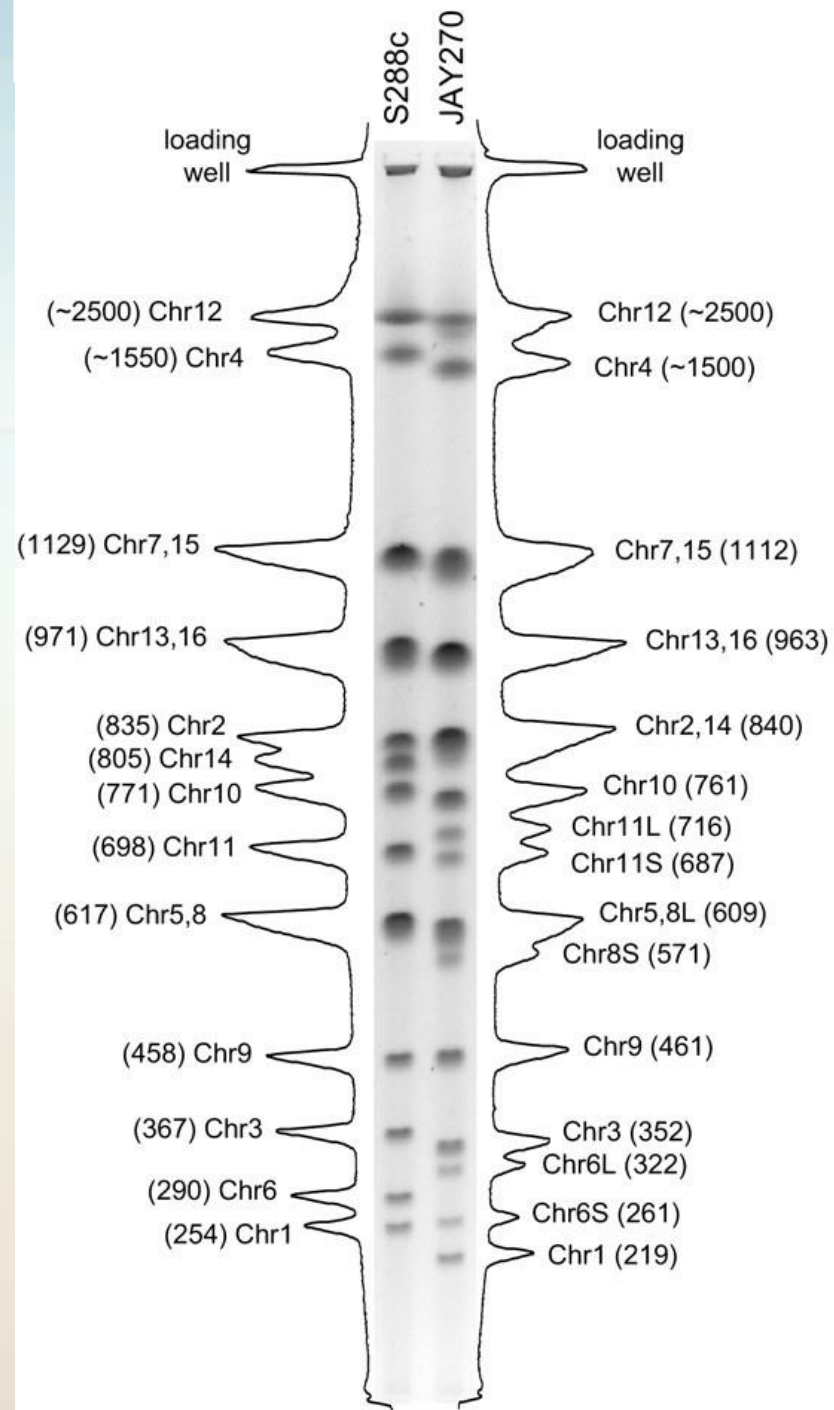
- Το κύριο είδος ζύμης που χρησιμοποιείται στη ζύμωση του γλεύκους, ο *S. Cerevisiae*, που περιέχει πλήθος στελεχών διαφορετικών τεχνολογικών ιδιοτήτων
- Τα οινοποιητικά στελέχη επιδρούν διαφορετικά στην ταχύτητα οινοποίησης, στη φύση και ποσότητα των δευτεροταγών προϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης και στο άρωμα του κρασιού
- Η ικανότητα διάκρισης μεταξύ διαφορετικών στελεχών του *S. cerevisiae* είναι απαραίτητη για
  - την οικολογική μελέτη άγριων ζυμών υπεύθυνων για τη ζύμωση γλεύκους
  - την επιλογή στελεχών με τη βέλτιστη ικανότητα οινοποίησης
  - τον παραγωγικό και εμπορικό έλεγχο
  - την επαλήθευση των επιλεχθεισών ζυμών ως εκκινητών ζύμωσης
  - την ανασύσταση και διατήρηση των άγριων και των επιλεχθεισών ζυμών
- Η ταυτοποίηση των στελεχών γίνεται μέσω
  - των εξωκυττάριων πρωτεϊνών
  - των ενδοκυττάριων πρωτεϊνών
  - των λιπαρών οξέων
- και πρόσφατα μέσω
  - πολυμορφισμών σε επίπεδο DNA

# Ταυτοποίηση των ειδών των οινοποιητικών ζυμών: Καρυοτυπική ανάλυση

- *O S. cerevisiae* διαθέτει 16 χρωμοσώματα μεγέθους 250-2500 Kb
- Το γενωμικό DNA είναι λίαν πολυμορφικό
  - **συνεπώς τα στελέχη διαφοροποιούνται σύμφωνα με την κατανομή μεγέθους των χρωμοσωμάτων**
- Με ηλεκτροφόρηση παλμικού πεδίου διαχωρίστηκαν και συγκρίθηκαν τα χρωμοσώματα των στελεχών του *S. cerevisiae*



# Καρυοτυπική ανάλυση οινοποιητικής ζύμης (μέγεθος σε kb)



# Γλυκόλυση

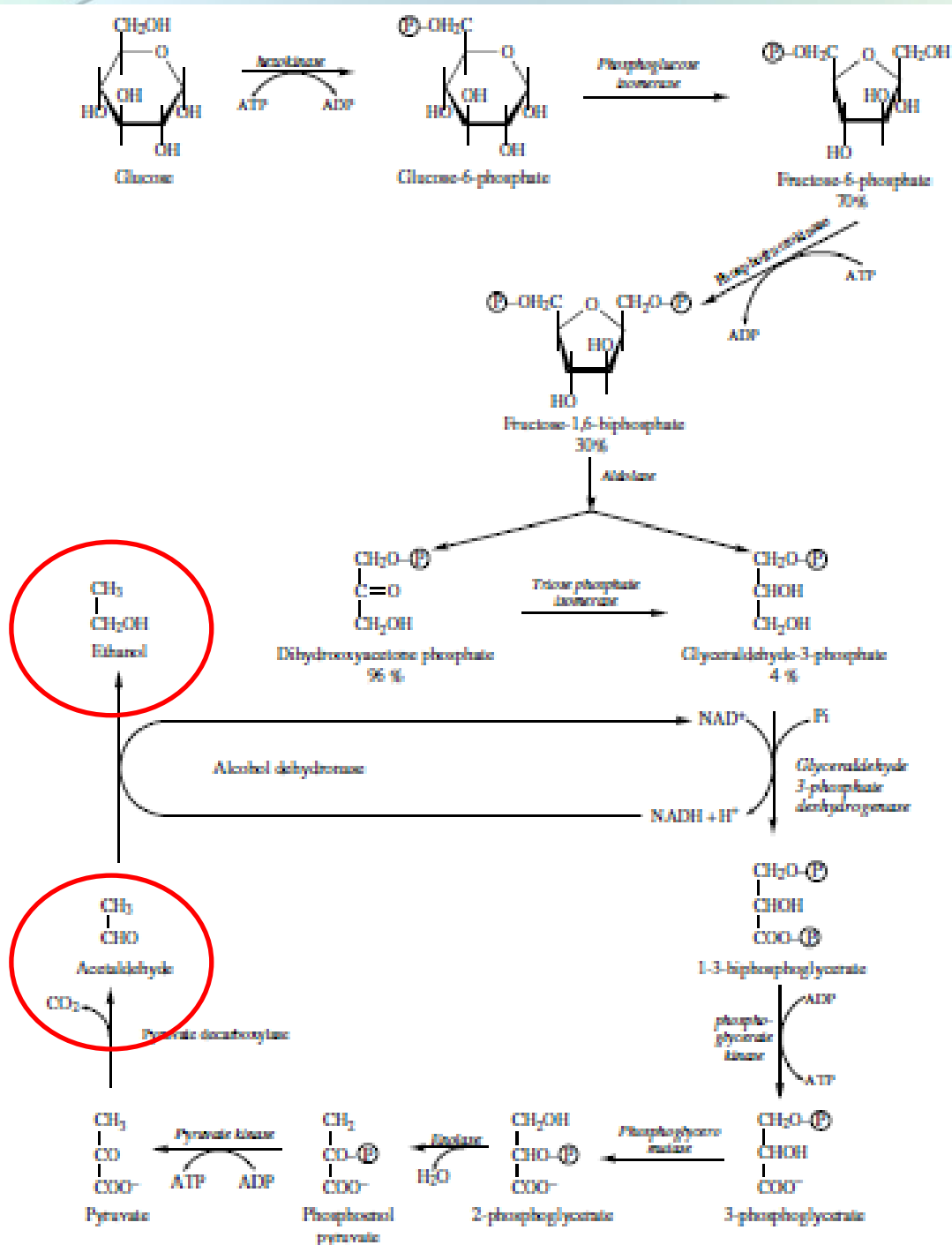
- Η μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό είναι η συνήθης πορεία στα βιολογικά συστήματα
- Το πρώτο βήμα της διαπίστωσης προήλθε το 1897, από τη ζύμωση της σάκχαρης από εκχύλισμα ζύμης
- που οδηγεί σε παραγωγή αλκοόλης
- Πολλά χρόνια αργότερα, δείχτηκε ότι ανόργανος P πρέπει να προστεθεί για να υπάρχει σταθερή ταχύτητα παραγωγής γλυκόζης
- Αυτό οδήγησε στην άποψη ότι ο ανόργανος P ενσωματώνεται σε σάκχαρο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης
- Διαπιστώθηκε ότι η δραστηριότητα οφειλόταν σε μεγαλομοριακή ουσία, ευαίσθητη στη θέρμανση, αλλά και σε μικρομοριακή μη θερμοευαίσθητη ουσία
- Τα συστατικά ονομάστηκαν 'zymase' και 'cozymase'
- Σήμερα, έγινε γνωστό ότι η zymase αποτελείται από σειρά ενζύμων και συνενζύμων και η cozymase από συμπράγοντες, μεταλλικά ιόντα και ATP
- Η πλήρης περιγραφή της γλυκόλυσης έγινε στη δεκαετία του 1940, από τις εργασίες των Embden, Meyerhoff και Neuberg
- Η γλυκόλυση έγινε γνωστή ως η οδός Embden–Meyerhoff

# Γλυκόλυση

- Η μεταφορά των εξοζών (γλυκόζη και φρουκτόζη) του μούστου κατά πλάτος της πλασματικής μεμβράνης ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο σύστημα πρωτεϊνικών μεταφορέων, μη διευκρινισμένο μέχρι σήμερα
- Αυτός ο μηχανισμός διευκολύνει τη διάχυση των εξοζών του μούστου στο κυτταρόπλασμα και το μεταβολισμό τους
- Δεν πρόκειται για ενεργό μεταφορά που να απαιτεί ενέργεια
- Ακολουθεί η πορεία της γλυκόλυσης στο κυτταρόπλασμα
- Ο *Saccharomyces cerevisiae* διαθέτει δύο εξοκινάσες (PI και PII) ικανές για φωσφορυλίωση γλυκόζης και φρουκτόζης
- Η **εξοκινάση PII** είναι σημαντική και δραστική κυρίως στη **λογαριθμική φάση**, σε μέσο καλλιέργειας πλούσιο σε σάκχαρο
- Η **εξοκινάση PI** είναι δραστική στη **στάσιμη φάση**
  - **καταστέλλεται μερικώς από τη γλυκόζη**

# Γλυκόλυση - Αλκοολική Ζύμωση

- Η αναγωγική ισχύς του NADH, που παράγεται κατά τη γλυκόλυση, πρέπει να μεταφερθεί σε ηλεκτρονιοαποδέκτη, ώστε να αναγεννηθεί το NAD<sup>+</sup>
- Στην αλκοολική ζύμωση το ρόλο τον έχει η ακεταλδεΐδη
  - **αντί του πυροσταφυλικού που συμμετέχει στη γλυκόλυση**
- Σε σχέση με τη γλυκόλυση, η αλκοολική ζύμωση περιέχει δύο παραπάνω ένζυμα
  - την πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση – συνένζυμο η πυροφωσφορική θειαμίνη
    - **αποκαρβοξυλιώνει το πυροσταφυλικό παράγοντας ακεταλδεΐδη**
  - την αλκοολική αφυδρογονάση (το ενεργό της κέντρο περιέχει Zn<sup>2+</sup>) – συνένζυμο το NADH
    - **ανάγει την ακεταλδεΐδη σε αιθανόλη**





# Γλυκόλυση - Γλυκεροπυροσταφυλική Ζύμωση

- Παρουσία **θειώδους** ( $\text{SO}_2$ ), η ζύμωση της γλυκόζης παρέχει ισοδύναμες ποσότητες **γλυκερόλης, διοξειδίου του άνθρακα** και **ακεταλδεΐδης** στη μορφή του παραγώγου της με θειώδες
- Η γλυκεροπυροσταφυλική (όπως αποκαλείται) ζύμωση προχωρά ως εξής
- **Το παράγωγο της ακεταλδεΐδης με θειώδες δεν μετατρέπεται σε αιθανόλη**
- Η 1-φωσφορική διυδροξυακετόνη γίνεται ο τελικός ηλεκτρονιοαποδέκτης και ανάγεται σε 3-φωσφορική γλυκερόλη, η οποία αποφωσφορυλιώνεται σε γλυκερόλη
  - **Η πορεία χρησιμοποιείται για τη βιομηχανική παραγωγή γλυκερόλης**
- Στην πορεία παράγονται 2 μόρια ATP για κάθε μόριο εξόζης και δεν πρόκειται για αφομοιώσιμη ενέργεια για τη ζύμη, δεδομένου ότι απαιτείται ATP για την ενεργοποίηση της γλυκόζης στο πρώτο βήμα της γλυκόλυσης
- **Η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση πραγματοποιείται στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης**
- λόγω χαμηλής έκφρασης των: πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, αλκοολική αφυδρογονάση
  - **έτσι η επανοξείδωση του NADH γίνεται μέσω της διυδροξυακετόνης**
    - παράγοντας γλυκερόλη, πυροσταφυλικό και δευτερογενή προϊόντα, όπως ηλεκτρικό οξύ και διακετύλιο

# Αναπνοή

Στον καταβολισμό των εξοζών παρουσία οξυγόνου, η μεταβολική τύχη του πυροσταφυλικού περιγράφεται ως εξής



Το ένζυμο πυροσταφυλική αφυδρογονάση εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και είναι το πρώτο που οδηγεί στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων

# Ρύθμιση μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής

## Επίπτωση Pasteur και επίπτωση Crabtree

- Ο Pasteur ήταν ο πρώτος που συνέκρινε μεταξύ αερόβιας και αναερόβιας ανάπτυξης των ζυμών
- Σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, οι ζύμες την χρησιμοποιούν είτε για ζύμωση είτε για αναπνοή
- Ο αερισμός επάγει αύξηση στην παραγωγή βιομάζας
  - ολική και ανά μονάδα αποικοδομούμενης γλυκόζης
- Ο αερισμός επάγει μείωση στην παραγόμενη αιθανόλη και στην κατανάλωση σακχάρου
- Ως συμπέρασμα, ο Pasteur υποστήριξε ότι η αναπνοή αναστέλλει τη ζύμωση

# Ρύθμιση μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής

## Επίπτωση Pasteur και επίπτωση Crabtree

- Η επίπτωση Pasteur δείχνει ότι δύο ένζυμα συναγωνίζονται για την κατάλυση του πυροσταφυλικού στα πλαίσια της ζύμωσης ή της αναπνοής
  - και ερμηνεύει την αναστολή της ζύμωσης από την αναπνοή
- Η αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού (ζύμωση) έχει μικρότερη συγγένεια για το πυροσταφυλικό σε σχέση με την πυροσταφυλική αφυδρογονάση (αναπνοή)
- Παράλληλα, η οξειδωτική φωσφορυλίωση καταναλώνει ADP και ανόργανο P, τα οποία κινούνται στα μιτοχόνδρια
  - με αποτέλεσμα την ελάττωσή τους στο κυτταρόπλασμα
- Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της φωσφορυλίωσης στη γλυκολυτική οδό και μείωση της ταχύτητάς της
- Η επιπλέον αναστολή των γλυκολυτικών ενζύμων λόγω της αύξησης του ATP ερμηνεύει την επίπτωση Pasteur
- Το ATP που προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση αναστέλλει τη δράση της φωσφοφρουκτοκινάσης, με αποτέλεσμα
  - τη συσσώρευση φωσφορυλιωμένων εξοζών
  - την αναστολή της διαμεμβρανικής εισόδου σακχάρων
  - τη μείωση του ρυθμού της γλυκόλυσης

# Ρύθμιση μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής

## Επίπτωση Pasteur και επίπτωση Crabtree

- Σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, πχ στο γλεύκος, ο *S. cerevisiae* μεταβολίζει τα σάκχαρα μόνο μέσω γλυκόλυσης
- **Ακόμα και παρουσία οξυγόνου είναι αδύνατη η αναπνοή**
- Το φαινόμενο περιγράφηκε πρώτα από τον Crabtree (1929) σε καρκινικά κύτταρα και είναι γνωστό ως
  - **catabolic repression by glucose**
  - **the Pasteur contrary effect**
  - **the Crabtree effect**
- Στις ζύμες, κατά τη διάρκεια αυτής της επίδρασης, συμβαίνουν τα εξής
  - **Εκφύλιση των μιτοχονδρίων**
  - **Μείωση στα ποσοστά των στερολών και λιπαρών οξέων**
  - **Καταστολή της σύνθεσης των ενζύμων του κύκλου του Krebs και των συστατικών της αναπνευστικής αλυσίδας**

# Ρύθμιση μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής

## Επίπτωση Pasteur και επίπτωση Crabtree

- Στην περίπτωση του *S. cerevisiae*, απαιτούνται τουλάχιστο 9 g σακχάρου ανά L για να εμφανιστεί η επίπτωση Crabtree
- **Η καταβολική καταστολή στις οινοποιητικές ζύμες, που οφείλεται στη γλυκόζη, είναι πολύ ισχυρή**
- Στο γλεύκος, σε οποιοδήποτε επίπεδο αερισμού, οι ζύμες υφίστανται αποκλειστικά ζύμωση, λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης και φρουκτόζης
  - **Από τεχνολογικής πλευράς βέβαια, οι ζύμες υποβάλλονται σε αναπνοή μόνο για την παραγωγή ξηρής ζύμης (παραγωγική διαδικασία της βιομηχανίας) και όχι για οινοποίηση**
- Ο *S. cerevisiae* μπορεί να πραγματοποιήσει αλκοολική ζύμωση σε συνδυασμό με αναπνοή παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης
  - **Στην περίπτωση αυτή πολλαπλασιάζονται οι στερόλες και τα λιπαρά οξέα**
- Μετά την αλκοολική ζύμωση, οι ζύμες της επιφάνειας του οίνου αναπτύσσονται με αντίστοιχο τρόπο ως μέρος της πορείας παραγωγής οίνου εξειδικευμένου τύπου (Sherry, Yellow Wine of Jura)

# Ρύθμιση μεταξύ αλκοολικής και γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης

## Συσσώρευση γλυκερόλης

- Οι οίνοι περιέχουν περίπου 8 g γλυκερόλης ανά 100 g αιθανόλης
- Κατά τη ζύμωση του γλεύκους, περίπου 8% των σακχάρων υφίστανται γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση και 92% αλκοολική ζύμωση
- Η ζύμωση των πρώτων 100 g σακχάρου δημιουργεί την πλειοψηφία της γλυκερόλης
- Στη συνέχεια μειώνεται η παραγωγή γλυκερόλης, χωρίς να μηδενίζεται
- **Συνεπώς η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση είναι η εισαγωγική ζύμωση που οδηγεί στην ανάκτηση του  $\text{NAD}^+$**
- ενώ η ακεταλδεΐδη (που αυτή ανάγεται σε αιθανόλη) δεν είναι ακόμη παρούσα
- **Δηλαδή συμβαίνουν ταυτόχρονα και οι δύο μορφές ζύμωσης**
- Όταν το πυροσταφυλικό δεν χρησιμοποιείται σε αλκοολική ζύμωση κατευθύνεται στην παραγωγή δευτερογενών προϊόντων
- Τότε η πορεία οδηγείται στην παραγωγή γλυκερόλης

# Ρύθμιση μεταξύ αλκοολικής και γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης

## Συσσώρευση γλυκερόλης

- Η παραγωγή γλυκερόλης εξισορροπεί το ενδοκυττάριο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, δηλ. την ισορροπία  $NAD^+/NADH$
- Από την άλλη πλευρά, οι οινοπαραγωγοί δίνουν μεγάλη σημασία στον οργανοληπτικό ρόλο της γλυκερόλης
- **Η γλυκερόλη έχει γλυκιά γεύση**
- Παρουσία άλλων συστατικών δεν γίνεται αντιληπτή η γεύση της γλυκερόλης
  - Σύμφωνα με τους ειδικούς γευσιγνώστες, η προσθήκη 3–6 g γλυκερόλης ανά L κόκκινου κρασιού δεν είναι διακριτή
  - **άρα η οινοποίηση με κατεύθυνση προς τη γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση δεν έχει οινολογικό ενδιαφέρον**
- Επιπρόσθετα, ο οινοποιός πρέπει να κατευθύνει τις ζύμες σε αλκοολική ζύμωση και να ελαττώσει την γλυκεροπυροσταφυλική
- Η παραγωγή γλυκερόλης συνοδεύεται από το σχηματισμό δευτερογενών προϊόντων (από το πυροσταφυλικό)
- **Η αυξημένη παρουσία τους (κυρίως οι καρβονυλικές ενώσεις και το οξικό οξύ) μειώνει την ποιότητα του οίνου**

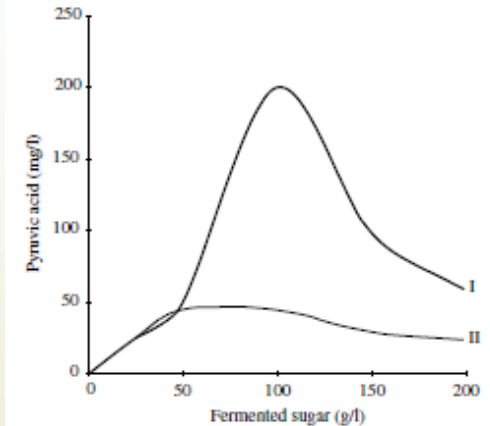


# Δευτερογενή προϊόντα της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης

- Στις συνθήκες της οινοποίησης τα μιτοχόνδρια δεν είναι λειτουργικά
- Τα ένζυμά τους είναι υπαρκτά
- Η πυροσταφυλική καρβοξυλάση καταλύει την καρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε οξαλοξικό με τη δαπάνη ενός ATP
$$\text{biotin-PC} + \text{ATP} + \text{CO}_2 \text{ ---} \rightarrow \text{CO}_2\text{-biotin-PC} + \text{ADP} + [\text{iP}]$$
$$\text{CO}_2\text{-biotin-PC} + \text{pyruvate} \text{ ---} \rightarrow \text{biotin-PC} + \text{oxaloacetate}$$
- Στις αναερόβιες συνθήκες δεν μπορεί να ολοκληρωθεί ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων γιατί απαιτείται FAD, ένα συνένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας
- Η σειρά των αντιδράσεων διακόπτεται στο **ηλεκτρικό** οξύ, το οποίο συσσωρεύεται (0.5–1.5 g/l)
- Το NADH που δημιουργείται (από το οξαλοξικό στο ηλεκτρικό) επανοξειδώνεται κατά το σχηματισμό γλυκερόλης από τη διυδροξυακετόνη

# Δευτερογενή προϊόντα της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης

- Επί πλέον ποσότητες ηλεκτρικού μπορούν να παραχθούν σε περιβάλλον πλούσιο σε γλουταμινικό
- Το γλουταμινικό απαμινώνεται σε α-κετογλουταρικό που οξειδώνεται σε ηλεκτρικό
- Τα διάφορα κετονικά δευτερογενή προϊόντα παράγονται κατά τη φάση πολλαπλασιασμού της ζύμης και ελαττώνονται διαρκώς στη συνέχεια
- **Τα κετονικά οξέα αυξάνονται σε ανεβασμένες τιμές pH και θερμοκρασίας, σε αναερόβιες συνθήκες, σε έλλειψη θειαμίνης και παντοθενικού οξέος**
- Επί πλέον δευτερογενή προϊόντα της ζύμωσης είναι το οξικό, το γαλακτικό, η βουτανοδιόλη, το διακετύλιο και η ακετοΐνη



I: κοντρόλ II: +θειαμίνη

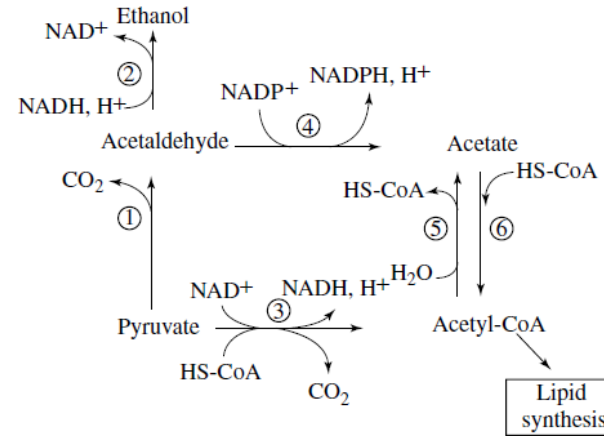
# Σχηματισμός και συσσώρευση οξικού

- Το οξικό είναι το κύριο πτητικό οξύ των οίνων
- Οφείλεται σε βακτηριακή μόλυνση (οξικά και γαλακτικά βακτήρια)
- **αλλά παράγεται και από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση**
- Πέρα από ένα όριο (εξαρτάται από το είδος του οίνου) το οξικό έχει επιβλαβή οργανοληπτική επίπτωση στην ποιότητα του οίνου
- Σε γλεύκος από υγιή σταφύλια με ενδιάμεση συγκέντρωση σακχάρου (κάτω από 220 g/l), ο *S. cerevisiae* παράγει σχετικά μικρές ποσότητες (100–300 mg/l) οξικού, εξαρτώμενες από το στέλεχος
- Σε ορισμένες συνθήκες οινοποίησης, ακόμα και χωρίς βακτηριακή μόλυνση, μπορεί να υπάρξει υπερπαραγωγή οξικού δημιουργώντας προβλήματα στον οινοπαραγωγό

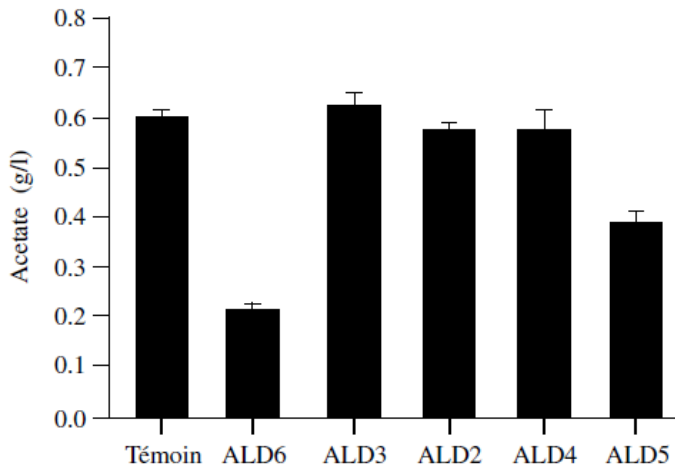
# Σχηματισμός και συσσώρευση οξικού

- Τα βιοχημικά μονοπάτια παραγωγής οξικού δεν έχουν επαρκώς διευκρινιστεί
- Η υδρόλυση του ακετυλο-CoA μπορεί να παράγει οξικό
  - Το ακετυλο-CoA παράγεται από την πυροσταφυλική αφυδρογονάση πριν δράσει η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση
    - Η αντίδραση γίνεται στο μιτοχόνδριο και περιορίζεται σε αναερόβιες συνθήκες
- Η αλδεϋδική αφυδρογονάση μπορεί να σχηματίσει οξικό με την οξείδωση της ακεταλδεϋδης
- Το ένζυμο είναι ενεργό κατά την αλκοολική ζύμωση
- Αν υπάρχει καταστολή της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, το μονοπάτι οδηγεί σε παραγωγή ακετυλο-CoA μέσω της συνθετάσης του ακετυλο-CoA

# Σχηματισμός και συσσώρευση οξικού



Acetic acid formation pathways in yeasts.  
 1 = pyruvate decarboxylase; 2 = alcohol dehydrogenase; 3 = pyruvate dehydrogenase; 4 = aldehyde dehydrogenase; 5 = acetyl-CoA hydrolase; 6 = acetyl-CoA synthetase



Acetate production by strains of *S. cerevisiae* (V5) following deletion of different genes coding for isoforms of acetaldehyde dehydrogenase

Effect of initial sugar concentration of the must on the formation of secondary products of the fermentation

Initial sugar (g/l)	Fermented sugar (g/l)	Secondary products		
		Acetic acid (g/l)	Glycerol (g/l)	Succinic acid (g/l)
224	211	0.26	4.77	0.26
268	226	0.45	5.33	0.25
318	211	0.62	5.70	0.26
324	179	0.84	5.95	0.26
348	152	1.12	7.09	0.28

# Σχηματισμός και συσσώρευση οξικού

- Οι συνθήκες οινοποίησης που οδηγούν σε αυξημένα ποσά οξικού από τον *S. cerevisiae* είναι πολύ καλά γνωστές
- Η παραγωγή οξικού
  - **εξαρτάται από το αρχικό σάκχαρο του μούστου**
  - **ανεξάρτητο από την ποσότητα του ζυμωμένου σακχάρου**
- Όσο υψηλότερο το σάκχαρο του μούστου, τόσο υψηλότερο το οξικό (και η γλυκερόλη)
  - **Αυτό οφείλεται στην προσπάθεια της ζύμης να προσαρμοστεί στο περιβάλλον υψηλού σακχάρου (οσμωτική πίεση)**
- Πραγματοποιείται με ένα καταρράκτη σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγεί σε
  - Αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή γλυκερόλης (*GPD1*), αλλά και οξικού (*ALD2* και *ALD3*)
  - Ο σχηματισμός οξικού έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική ισορροπία των ζυμών, μέσω της αναγέννησης του NADH
    - **Έτσι, είναι εύκολο να μειωθεί το ποσό του οξικού με εξωγενή προσθήκη NADH**

# Σχηματισμός και συσσώρευση οξικού

- Το διαθέσιμο άζωτο του μούστου έχει επίσης κομβικό ρόλο
- Σε μούστους με υψηλό σάκχαρο, η παραγωγή οξικού είναι αντίστροφα συνδεδεμένη με τον κυτταρικό πληθυσμό, που σχετίζεται με το άζωτο του μούστου
- Είναι απαραίτητο να καταγράφεται το διαθέσιμο άζωτο σε ειδικά μouxλιασμένους (*Botrytis cinerea*) μούστους και να προστίθεται θειικό αμμώνιο, αν είναι απαραίτητο
- Η βέλτιστη διαθέσιμη συγκέντρωση αζώτου σ' αυτό τον τύπο μούστου, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η παραγωγή οξικού, είναι 190 mg/l
- Η προσθήκη πρέπει να γίνει πολύ νωρίς στη διεργασία
- Αν γίνει σε άλλη χρονική στιγμή υπάρχει κίνδυνος αυξημένης παραγωγής οξικού
- Η αιτία είναι η ύπαρξη συγκεκριμένων πεπτιδογλυκανών (10% πρωτεΐνη, botryticine substances), οι οποίες προστιθέμενες σε υγιή σταφύλια αυξάνουν τη γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση και την παραγωγή οξικού στο τέλος της ζύμωσης

# Σχηματισμός και συσσώρευση οξικού

- Άλλοι παράγοντες που ενισχύουν την παραγωγή οξικού από τον *S. cerevisiae* είναι:
  - Αναεροβίωση
  - Πολύ χαμηλό pH (<3.1) ή πολύ υψηλό pH (>4)
  - Έλλειψη του μούστου σε ορισμένα αμινοξέα
  - Έλλειψη του μούστου σε βιταμίνες
  - Πολύ υψηλή θερμοκρασία (25–30°C) στη διάρκεια της φάσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

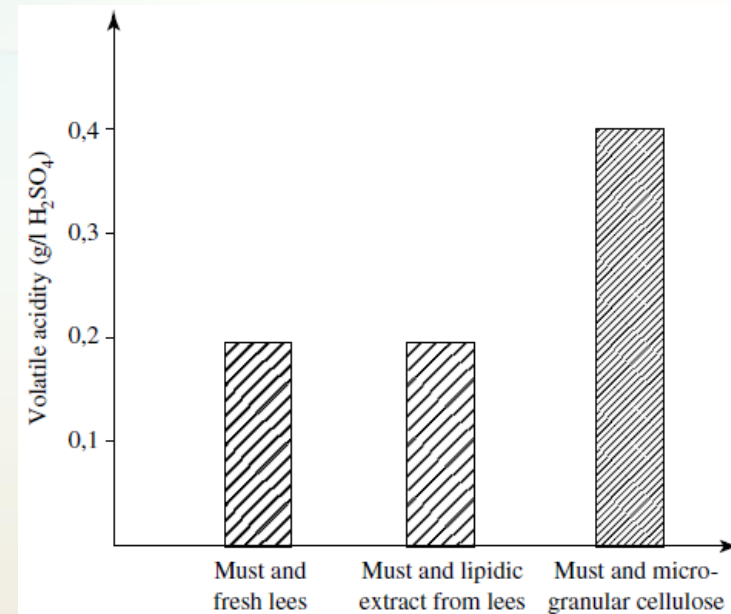


# Σχηματισμός και συσσώρευση οξικού

- Στην οينوποίηση κόκκινων κρασιών, η θερμοκρασία είναι ο πλέον σημαντικός παράγοντας, ειδικά όταν ο μούστος έχει πολύ υψηλή συγκέντρωση σακχάρων
  - Στα ζεστά κλίματα πρέπει να ψύχονται τα σταφύλια μετά τη συγκομιδή
  - Η θερμοκρασία δεν πρέπει να ξεπερνά τους 20°C στο ξεκίνημα της ζύμωσης
    - Η ίδια πορεία πρέπει να ακολουθείται στη θερμοοينوποίηση αμέσως μετά τη θέρμανση των σταφυλιών
- Στην οينوποίηση λευκών και ροζέ κρασιών, η υπερβολική διαύγαση του μούστου μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πτητικής οξύτητας από ζύμες
  - Συνεπώς, πρέπει να προσεχθεί η θολερότητα του μούστου
- **Επίσης η παρουσία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ενισχύει την παραγωγή οξικού**

# Σχηματισμός και συσσώρευση οξικού

- Σύγκριση πτητικής οξύτητας τριών οίνων ληφθέντων από τον ίδιο μούστο Sauvignon Blanc
- Μετά τη διήθηση, η θολερότητα ρυθμίστηκε στις 250 NTU
- Η ενοφθαλμίωση έγινε με τρεις διαφορετικούς τρόπους
- Επανενσωμάτωση φρέσκιας οινολάσπης (control)
- Προσθήκη σκόνης κυτταρίνης
- Συμπλήρωση της ίδιας ποσότητας οινολάσπης , προσροφημένης σε κυτταρίνη, με ένα λιπιδικό εκχύλισμα (μεθανόλη – χλωροφόρμιο)
- Η πτητική οξύτητα ήταν ίδια πριν τη ζύμωση, όμως διαφοροποιείται μετά από αυτήν
- Η συμπλήρωση του μέσου με λιπίδια φαίνεται ότι διευκολύνει την είσοδο των αμινοξέων στα κύτταρα, περιορίζοντας το σχηματισμό οξικού



# Σχηματισμός και συσσώρευση οξικού

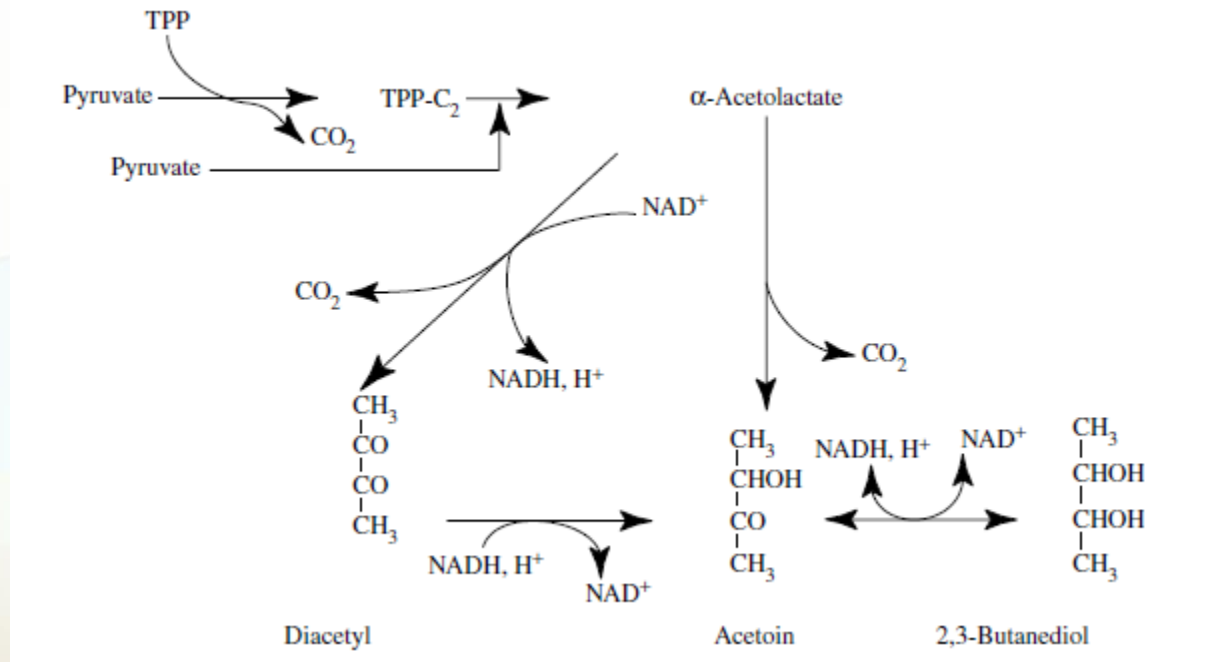
- Κατά την αλκοολική ζύμωση κόκκινων ή ελαφρά διαυγασμένων λευκών οίνων, δεν παράγεται συνεχώς οξικό
  - **Η ζύμη μεταβολίζει μεγάλο μέρος του οξικού που εκκρίνεται στο μούστο κατά τη ζύμωση των πρώτων 50–100 g σακχάρου**
- Μπορεί επίσης να αφομοιώσει το οξικό, αν αυτό προστεθεί στο μούστο στο ξεκίνημα της ζύμωσης – ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος
  - Το οξικό ανάγεται σε ακεταλδεΐδη, που διευκολύνει την αλκοολική ζύμωση έναντι της βλαβερής γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης
- **Στην πράξη, η προσθήκη οξικού στο μούστο μειώνει την παραγωγή γλυκερόλης, αλλά αυξάνει το σχηματισμό ακετοΐνης και βουτανοδιόλης**
- Φαίνεται ότι οι ζύμες χρησιμοποιούν το αρχικό (παραγόμενο ή προστιθέμενο) οξικό μέσω του μονοπατιού του ακετυλο- CoA στη βιοσύνθεση λιπιδίων
- Σε ορισμένες συνθήκες οινοποίησης παράγονται απρόσμενα υψηλά ποσά οξικού
  - Αυτό το οξικό συσσωρεύεται στο τέλος της ζύμωσης, αλλά μπορεί ο οίνος να επαναζυμωθεί με φρέσκα σταφύλια

# Άλλα δευτερογενή προϊόντα της ζύμωσης

## Γαλακτικό οξύ

- Παράγεται από τις ζύμες με τη δράση των L(+) και D(-) αφυδρογονασών
- Σε αναερόβιες συνθήκες (όπως στην αλκοολική ζύμωση), η ζύμη συνθέτει κυρίως D(-) αφυδρογονάση
- Παράγονται 200–300 mg D(-) γαλακτικού ανά L και 12 mg L(+) γαλακτικού
  - Το δεύτερο παράγεται ουσιαστικά στην έναρξη της ζύμωσης
- Προσδιορίζοντας τη συγκέντρωση του D(-) γαλακτικού σε έναν οίνο, μπορεί να διευκρινιστεί αν η προέλευσή του οφείλεται σε ζύμες ή γαλακτικά βακτήρια
  - Οίνοι που έχουν υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση περιέχουν αρκετά gr ανά L αποκλειστικά L(+) γαλακτικού
  - Στην περίπτωση γαλακτικής ζύμωσης σχηματίζεται D(-) γαλακτικό
    - ✓ Τα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούν υποστρώματα διαφορετικά από το μηλικό, όταν η συγκέντρωση του D(-) γαλακτικού ξεπερνά τα 200-300 mg/l

# Άλλα δευτερογενή προϊόντα της ζύμωσης



Οι ζύμες χρησιμοποιούν το πυροσταφυλικό για να σχηματίσουν ακετοΐνη, διακετύλιο και βουτανοδιόλη

Τα βήματα είναι:

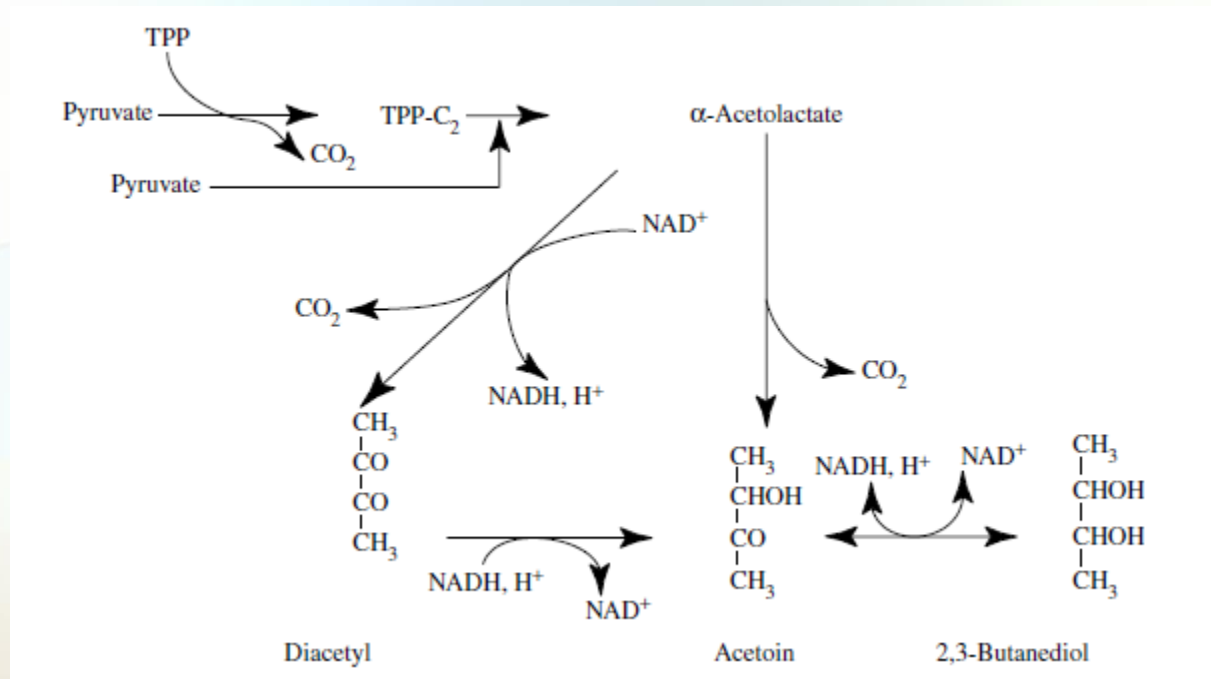
**Συμπύκνωση** πυροσταφυλικού με ενεργή ακεταλδεΐδη - - - παραγωγή α-ακετογαλακτικού

**Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση** του α-ακετογαλακτικού - - - παραγωγή διακετυλίου

**Μη οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση** του α-ακετογαλακτικού ή **αναγωγή** του διακετυλίου - - - παραγωγή ακετοΐνης

**Αναγωγή** της ακετοΐνης - - - σχηματισμός 2,3-βουτανοδιόλης

# Άλλα δευτερογενή προϊόντα της ζύμωσης



Η αναγωγή του διακετυλίου συμβαίνει μετά το πέρας της ζύμωσης, κατά την παραμονή του οίνου στην κυτταρική βιομάζα

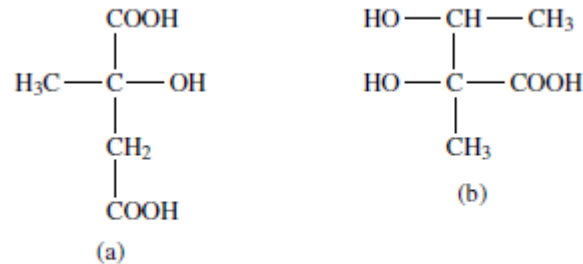
Η **ακετοΐνη**, αλλά ειδικά το **διακετύλιο**, έχουν χαρακτηριστική οσμή

Πάνω από ορισμένη συγκέντρωση έχουν αρνητική συνέπεια στο άρωμα του οίνου

Στους οίνους που έχουν υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση οι συγκεντρώσεις τους είναι χαμηλές και δεν έχουν καμία επίδραση στο άρωμα

Τα γαλακτικά βακτήρια μπορούν να αποικοδομησουν το κιτρικό, παράγοντας πολύ μεγάλες ποσότητες **καρβονυλο-ενώσεων**

# Άλλα δευτερογενή προϊόντα της ζύμωσης

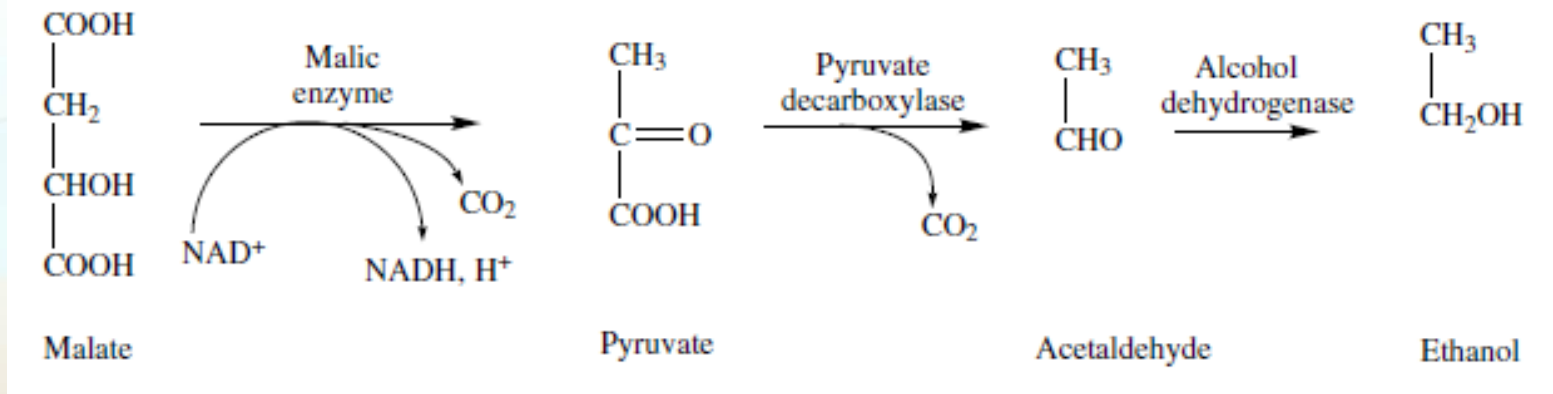


(a) Citramalic acid and (b) dimethylglyceric

Τέλος, οι ζύμες συμπυκνώνουν οξικό (ακετυλο-CoA) και πυροσταφυλικό προς παραγωγή **κιτρομηλικού** (0–300 mg/l) και **διμεθυλογλυκερικού** (0–600 mg/l) Έχουν πολύ μικρή οργανοληπτική επίπτωση

# Αποικοδόμηση του μηλικού από τις ζύμες

- Ο *S. cerevisiae* αποικοδομεί μερικώς (10–25%) το μηλικό οξύ του μούστου κατά την αλκοολική ζύμωση
- Τα διαφορετικά στελέχη αποικοδομούν διαφορετικά το μηλικό



- Η αποικοδόμηση είναι καλύτερη σε χαμηλό pH
- Η αλκοολική ζύμωση του μηλικού είναι πλήρης στους *Schizosaccharomyces*, επειδή έχουν ενεργό σύστημα μεταφοράς του μηλικού
  - Στον *S. cerevisiae*, το μηλικό εισέρχεται στο κύτταρο με απλή διάχυση
- Δεν έχουν ευδοκιμήσει οι προσπάθειες χρήσης του *Schizosaccharomyces* στην οινοποίηση
- Δεν μπορούν να συνυπάρξουν με τον *S. cerevisiae* σε μη αποστειρωμένο μούστο
- Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (30°C) είναι υψηλότερη εκείνης του *S. cerevisiae*, και απαιτεί υψηλότερες ζυμωτικές θερμοκρασίες

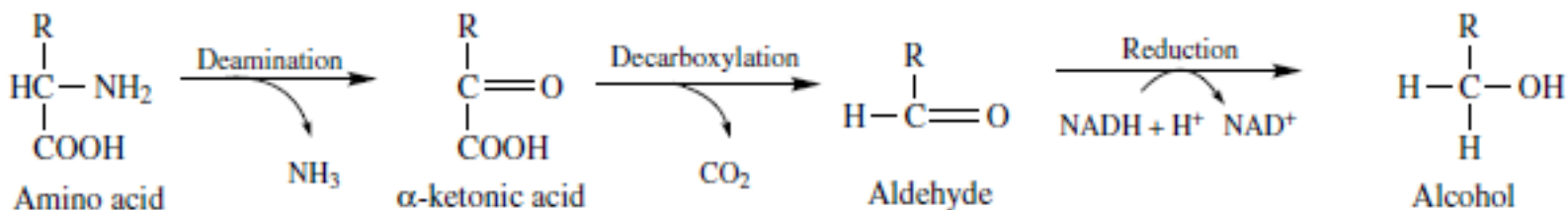


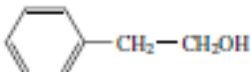
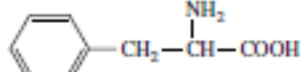
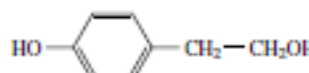
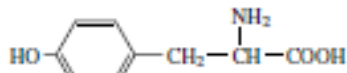
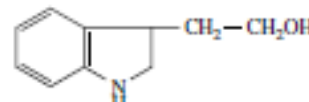
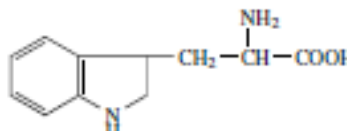
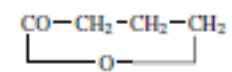
# Αποικοδόμηση του μηλικού από τις ζύμες

- Η υψηλότερη θερμοκρασία συνήθως επιδρά μη αντιστρεπτά στις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου
- Πολλά είδη σταφυλιών, όταν ζυμωθούν με *Schizosaccharomyces* δεν παράγουν τα αρώματά τους
- Η ποικιλία Gros Manseng παράγει ένα φρουτώδες κρασί όταν οινοποιείται από *S. cerevisiae*, αλλά δεν εμφανίζει το άρωμα όταν ζυμώνεται από *Schizosaccharomyces*
- Προς επίλυση, δοκιμάστηκε η εφαρμογή ακινητοποιημένου *Schizosaccharomyces* σε αλγινικό σε κρασιά που είχαν ήδη υποστεί αλκοολική ζύμωση, με καλά αποτελέσματα
- Η τεχνική δεν επηρεάζει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού, όμως δεν έχει τύχει εφαρμογής
- ίσως γιατί προτιμάται η προσπάθεια ανάπτυξης υβριδικών κυττάρων *S. cerevisiae* που να περιέχουν τα συστήματα μεταφοράς και αποικοδόμησης του μηλικού του *Schizosaccharomyces*

# Δημιουργία ανωτέρων αλκοολών και εστέρων

- Οι ζύμες μπορούν να μετατρέψουν τα κετονικά οξέα που προέρχονται από την απαμίνωση αμινοξέων σε αλδεΐδες και αλκοόλες (αντίδραση Ehrlich)
- Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν γνωστά αμινοξέα – πρόδρομα για όλες τις αλκοόλες (πχ προπανόλη και βουτανόλη)
- Δεδομένου ότι ορισμένα μεταλλαγμένα, ως προς τη σύνθεση αμινοξέων, στελέχη δεν παράγουν την αντίστοιχη αλκοόλη, ακόμα κι αν προστεθεί εξωγενώς το αμινοξύ
- Δεδομένου ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των ποσών των αμινοξέων στο μούστο και εκείνων των αλκοολών στο κρασί
- **Φαίνεται ότι η παραγωγή αλκοολών από τις ζύμες γίνεται και μέσω σύνθεσης των αντίστοιχων κετονικών οξέων (προερχόμενων από το μεταβολισμό των σακχάρων)**
- Η προπανόλη παράγεται από α-κετοβουτυρικό, που δημιουργείται από πυροσταφυλικό και ακετυλο-CoA
- Η ισοαμυλική αλκοόλη παράγεται από το α-κετοϊσοκαπροϊκό, που δημιουργείται από το α-κετογαλακτικό, που προέρχεται από το πυροσταφυλικό



Higher alcohol	Concentration in wine (mg/l)	Amino acid precursor
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ <p><i>3-methyl-butan-1-ol</i> or <i>isoamyl alcohol</i></p>	80-300	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ <p><i>Leucine</i></p>
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ <p><i>2-methyl-butan-2-ol</i> or <i>active amyl alcohol</i></p>	30-100	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ <p><i>Isoleucine</i></p>
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ <p><i>2-methyl-propan-1-ol</i> or <i>isobutyl alcohol</i></p>	50-150	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ <p><i>Valine</i></p>
 <p><i>Phenylethanol</i></p>	10-100	 <p><i>Phenylalanine</i></p>
 <p><i>Tyrosol</i></p>	20-50	 <p><i>Tyrosine</i></p>
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p><i>Propan-1-ol</i></p>	10-50	?
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p><i>Butan-1-ol</i></p>	1-10	?
 <p><i>Thryptophol</i></p>	0-1	 <p><i>Tryptophane</i></p>
 <p><i>γ-Butyrolactone</i></p>	0-5	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ <p><i>Glutamic acid</i></p>
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p><i>Methionol</i></p>	0-5	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ <p><i>Methionine</i></p>

# Δημιουργία ανωτέρων αλκοολών και εστέρων

- Δεν είναι γνωστός ο ρόλος της παραγωγής των ανωτέρων αλκοολών στο κρασί
- Μπορεί να είναι απλά απόβλητα του μεταβολισμού των σακχάρων ή μια πορεία αποτοξίνωσης του μέσου ή ένας τρόπος ρύθμισης του μεταβολισμού των αμινοξέων
- Με εξαίρεση την φαινυλο-αιθανόλη, που έχει άρωμα τριαντάφυλλου, οι ανώτερες αλκοόλες έχουν άσχημη οσμή
- **Οι υψηλές τιμές pH, η υψηλή θερμοκρασία ζύμωσης και ο αερισμός συμβάλλουν στη δημιουργία των ανωτέρων αλκοολών**
- Στα λευκά κρασιά η παραγωγή τους περιορίζεται με ζύμωση στους 20 - 22°C
- Η έλλειψη σε αμμωνία και αμινοξέα στο μούστο οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ανωτέρων αλκοολών
- Αυτό γιατί η ζύμη προσπαθεί να ανακτήσει όλο το διαθέσιμο άζωτο κι έτσι αποκαρβοξυλιώνει τα αμινοξέα και ο ανθρακικός σκελετός τους καταλήγει στην παραγωγή ανωτέρων αλκοολών

# Δημιουργία ανωτέρων αλκοολών και εστέρων

- Η φύση της χρησιμοποιούμενης ζύμης (είδος, στέλεχος) επηρεάζει την παραγωγή των ανωτέρων αλκοολών
- Ορισμένα είδη (*Hansenula anomala*) εμφανίζουν υπερπαραγωγή, ειδικά σε αερόβιες συνθήκες
- Η παραγωγή τους είναι περιορισμένη στις οινοποιητικές ζύμες
- Οι *S. bayanus* (ex *uvareum*) παράγουν περισσότερη φαινυλο-αιθανόλη από τον *S. cerevisiae*
- Η παραγωγή ανώτερων αλκοολών από τον *S. cerevisiae* εξαρτάται από το στέλεχος
- Η μειωμένη παραγωγή τους – με εξαίρεση τη φαινυλο-αιθανόλη – αποτελεί κριτήριο για την επιλογή της οινοποιητικής ζύμης
- Οι ζύμες εμφανίζουν δραστικότητα εστεράσης, ως εκ τούτου παράγουν διάφορους εστέρες (σε ποσότητες mg ανά L)
- **Οι πλέον σημαντικοί εστέρες είναι: οξικός ισοαμυλεστέρας (άρωμα μπανάνας) και οξικός φαινυλαιθυλεστέρας (άρωμα τριαντάφυλλου)**

# Δημιουργία ανωτέρων αλκοολών και εστέρων

- Επί πλέον παράγονται εστέρες λιπαρών οξέων μεσαίου μεγέθους
- Δεν σχετίζεται η παραγωγή τους με τον μεταβολισμό του αζώτου
- Οι εστέρες αυτοί σχηματίζονται με **συμπύκνωση** ακετυλο-CoA
- Έχουν ενδιαφέρον άρωμα
- **Οι εστέρες του εξανοϊκού έχουν το φρουτώδες και λουλουδέσιο άρωμα του μήλου**
- **Ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας έχει άρωμα σάπωνος**
- Στους λευκούς οίνους, η παραγωγή αυτών των εστέρων μπορεί να αυξηθεί
  - Με μείωση της θερμοκρασίας
  - Με αύξηση της διαύγασης του μούστου
- Ορισμένα στελέχη ζύμης παράγουν μεγάλες ποσότητες αυτών των εστέρων, και είναι υπεύθυνοι για το άρωμα που εμφανίζουν κατά τη ζύμωση οι νεοπαραγόμενοι οίνοι
- Οι εστέρες όμως υδρολύονται ταχύτατα (εντός έτους) στο εμφιαλωμένο κρασί και δεν έχουν πλέον επίπτωση στο άρωμα των λευκών κρασιών

# Φυσικοχημικοί χαρακτήρες της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηριδίων

- Τέσσερες παράμετροι καθορίζουν κυρίως την ταχύτητα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηριδίων στους οίνους: **pH, θερμοκρασία, αλκοολικό περιεχόμενο και συγκέντρωση SO<sub>2</sub>**
  - Συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες, αλλά σε μικρότερο βαθμό, που γίνονται καθοριστικοί κάτω από ορισμένες συνθήκες
- Οι τέσσερες παράμετροι είναι ευρέως μελετημένες και θεωρούνται ως **«οινολογικοί κανόνες»**
- Μέσω της τεχνολογικής ανάπτυξης των εγκαταστάσεων του οινοποιείου είναι πολύ πιο εύκολο να ακολουθηθούν αυτοί οι κανόνες
- Κανένας από τους παράγοντες δεν λογίζεται ανεξάρτητα από τους άλλους
  - **Και οι τέσσερες δρουν ταυτόχρονα σαν ένας**
- Το ευνοϊκό επίπεδο ενός αντισταθμίζει το δυσμενές επίπεδο άλλου ή πολλών άλλων
- Φαίνεται δύσκολο να αποδοθούν οριακές τιμές για καθεμιά παράμετρο
- πχ, τα βακτηρίδια ανέχονται υψηλές ποσότητες ανώτερων αλκοολών και SO<sub>2</sub> σε κρασιά με ευνοϊκές τιμές pH απ' ότι σε κρασιά με χαμηλό pH

# Φυσικοχημικοί χαρακτήρες της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηριδίων: pH

- Οι διακυμάνσεις στο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με το pH παρουσιάζουν βέλτιστη τιμή και ακραία όρια
- Τα περισσότερα βακτήρια αναπτύσσονται σε ουδέτερο pH
- **Όχι όμως τα οξεογόνα βακτήρια (όπως είναι τα γαλακτικά βακτήρια)**
- Οι οξεοφιλικές ιδιότητές τους επιτρέπουν ενεργό ανάπτυξη σε κρασιά με χαμηλό pH, γύρω στο 3,5
  - Σε χαμηλότερο pH (2,9–3,0) η ανάπτυξή τους είναι πιθανή, αλλά ο ρυθμός αργός
  - Σε υψηλότερο pH (3,7–3,8) γίνεται πιο γρήγορος
- Η ανάπτυξη μπορεί να διακοπεί εξ αιτίας της οξύτητας του κυτταρικού περιβάλλοντος
  - Κάτι τέτοιο εξαρτάται και από το είδος των οξέων
- Το κατώτερο όριο ανοχής του pH εξαρτάται από το είδος του βακτηρίου
- Είναι περίπου 4,7 για το *L. plantarum* και 5.5 για το *L. mesenteroides*
- Μπορεί να είναι και πιο μικρή η τιμή του οριακού pH ανοχής



# Φυσικοχημικοί χαρακτήρες της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηριδίων: $\text{SO}_2$

- Στο κρασί, το  $\text{SO}_2$  βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ ελεύθερου και δεσμευμένου
- **Η αποτελεσματικότητά του ως μικροβιοκτόνο και αντιοξειδωτικό εξαρτάται άμεσα από τη σύσταση του οίνου και το pH**
- Η ενεργή μορφή είναι το μοριακό  $\text{SO}_2$ , που εξαρτάται από την ελεύθερη μορφή του και το pH
- Σε pH 3,2 είναι περίπου 3,91% και μειώνεται σε 2,00% και 1,01% σε pH 3,5 και 3,8
- **Άρα, για να επιτευχθεί η ίδια αποτελεσματικότητα, πρέπει να υπάρχει αυξημένη ποσότητα ελεύθερου  $\text{SO}_2$  όσο αυξάνεται το pH**
- Ο μηχανισμός της δράσης του έχει ως εξής
  - Το μοριακό  $\text{SO}_2$  διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη μέσω διάχυσης
  - Στο κυτταρόπλασμα (υψηλό pH) διίσταται και αντιδρά με βιολογικά μόρια (ένζυμα, συνένζυμα, βιταμίνες)
    - με αποτέλεσμα τη διακοπή της ανάπτυξης και τελικά τον κυτταρικό θάνατο
- Γενικά, τα γαλακτικά βακτήρια δεν αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις  $\geq 100$  mg ολικού  $\text{SO}_2$  ανά λίτρο και 10 mg ελεύθερου  $\text{SO}_2$  ανά λίτρο
  - που όμως εξαρτώνται από το pH και το βακτηριακό είδος

# Φυσικοχημικοί χαρακτήρες της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηριδίων: $SO_2$

- Οι κόκκοι φαίνεται ότι είναι λιγότερο ανθεκτικοί σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια
- Πάντα εξαρτάται από το είδος
- πχ ο *Pediococcus damnosus* είναι ανθεκτικός στο  $SO_2$  σε δόσεις που εξοντώνουν ή αδρανοποιούν άλλα βακτήρια
- Οι τεχνολογικές συνέπειες έχουν ως εξής
- Όταν ο επεξεργαζόμενος οίνος πρόκειται να υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση, είναι σημαντικό να προστεθεί θειώδες με προσοχή
- Ο μούστος με θειώδες εξασκεί προσωρινή αναστολή στα γαλακτικά βακτήρια
- Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, το δεσμευμένο  $SO_2$  παραμένει και καθυστερεί τη βακτηριακή ανάπτυξη
- Προφανώς, η προσθήκη θειώδους στο κρασί μετά το πέρας της ζύμωσης δεν συνιστάται, εκτός ίσως ασυνήθιστων περιπτώσεων

# Φυσικοχημικοί χαρακτήρες της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηριδίων: **Αιθανόλη**

- Όπως οι περισσότεροι μικροοργανισμοί, τα γαλακτικά βακτήρια είναι ευαίσθητα στην αιθανόλη
- Σε εργαστηριακές συνθήκες, τα βακτήρια που απομονώνονται από κρασί καταστέλλονται σε συγκέντρωση αιθανόλης μεταξύ 8–10% κ.ο.
- Τα αποτελέσματα εξαρτώνται από το γένος, το είδος και το στέλεχος
- Γενικά, οι κόκκοι είναι πιο ευαίσθητοι από τους γαλακτοβάκιλλους
  - Σε συγκέντρωση αιθανόλης 13% κ.ο., πάνω από 50% των γαλακτοβάκιλλων επιβιώνουν, σε αντίθεση με το 14% των κόκκων
- Η ανάπτυξη στελεχών *Oenococcus oeni* απομονωμένων από κρασί και καλλιεργημένων στο εργαστήριο ενεργοποιείται σε 5–6% κ.ο. αιθανόλη, αλλά αναστέλλεται πάνω από 13–14% κ.ο.
- Η ανοχή στην αιθανόλη των εργαστηριακών στελεχών είναι πολύ μικρότερη σε πραγματικές συνθήκες, δηλ. μέσα στο κρασί
- Τα βακτήρια που αναπτύσσονται στο κρασί προσαρμόζονται τόσο στην παρουσία αιθανόλης, όσο και γενικότερα στο κρασί
  - Συνεπώς είναι δύσκολο να καθοριστεί το όριο επιβίωσης των γαλακτικών βακτηρίων
  - Στελέχη *Lactobacillus fructivorans*, *L. brevis* και *L. hilgardii* έχουν απομονωθεί από κρασιά με αλκοολική συγκέντρωση από 16 ως 20% κ.ο.
- Τα φαινόμενα προσαρμογής είναι ανόμοια στη φύση
- Συνήθως πρόκειται για δομικές (λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες) και λειτουργικές τροποποιήσεις των μεμβρανών

# Φυσικοχημικοί χαρακτήρες της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηριδίων: **Θερμοκρασία**

- Η θερμοκρασία επιδρά στο ρυθμό αύξησης όλων των μικροοργανισμών
- Η θερμοκρασία επιταχύνει τις βιοχημικές αντιδράσεις
- **Η κυτταρική δραστικότητα (το σύνολο των ενζυμικών δραστικοτήτων) και η κυτταρική ανάπτυξη εμφανίζουν μια κωδωνοειδή καμπύλη σε σχέση με την θερμοκρασία**
- Στη βέλτιστη θερμοκρασία ο χρόνος κάθε γενεάς είναι μικρότερος
- Η καμπύλη διαφοροποιείται με το είδος και το στέλεχος, αλλά και το περιβάλλον ανάπτυξης των μικροβίων
- Σε εργαστηριακές συνθήκες, τα γαλακτικά βακτηριακά στελέχη που απομονώνονται από το κρασί πολλαπλασιάζονται μεταξύ 15 και 45°C, με βέλτιστες συνθήκες μεταξύ 20 και 37°C
- Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *O. oeni* είναι μεταξύ 27 – 30°C
- σε αιθανολικό μέσο και ακόμα περισσότερο σε κρασί η βέλτιστη είναι 20 – 23°C
- Όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης αυξηθεί σε 13–14% κ.ο., η βέλτιστη T μειώνεται
- Ο ρυθμός ανάπτυξης χαμηλώνει όσο η T μειώνεται και είναι σχεδόν μηδενικός στους 14–15°C

# Φυσικοχημικοί χαρακτήρες της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηριδίων: **Θερμοκρασία**

- Η ιδανική  $T$  για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων (κυρίως *O. oeni*) και την αποικοδόμηση του μηλικού στο κρασί είναι γύρω στους  $20^{\circ}\text{C}$
- Σε  $T$  πάνω από  $25^{\circ}\text{C}$  καθυστερεί η μηλογαλακτική ζύμωση, κυρίως μέσω αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης
- Σε υψηλές  $T$  αυξάνεται ο κίνδυνος βακτηριακής επιμόλυνσης και υψηλής πτητικής οξύτητας
- Προτείνεται η διατήρηση του οίνου στους  $20^{\circ}\text{C}$
- Δεν πρέπει να ελαττωθεί πολύ η  $T$  μετά την αλκοολική ζύμωση
- Αν η  $T$  της οινοποιίας είναι χαμηλή, πρέπει το κρασί να θερμαίνεται
- Σε  $T < 18^{\circ}\text{C}$ , η έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης καθυστερεί και αυξάνεται η διάρκειά της
- Η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να συνεχιστεί στο κρασί ακόμα και σε  $T$  μεταξύ  $10$  και  $15^{\circ}\text{C}$
- Ο απαιτούμενος χρόνος για την αποικοδόμηση όλου του μηλικού οξέος μπορεί να είναι από 5–6 ημέρες έως μερικές εβδομάδες ή μήνες
- Μαζί με το  $\text{pH}$ , η  $T$  είναι παράγοντας που επιδρά έντονα στη μηλογαλακτική ζύμωση σε ένα σωστά οινοποιημένο κρασί που δεν έχει υπερβολική ποσότητα θειώδους
- Ο παράγοντας  $T$  είναι ο πλέον επιτηρούμενος και ελεγχόμενος

# Άλλοι παράγοντες στην ανάπτυξη και δραστικότητα των γαλακτικών βακτηρίων

## Προσαρμογή της ανάπτυξης των βακτηρίων σε οίνους

- Είναι σχετικά άγνωστη η επίδραση φαινολικών συστατικών στην ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων
- Οι πολυφαινόλες, μόνες ή σε μίγμα, δρουν ανασταλτικά
- Οι συμπυκνωμένες ανθοκυανίνες δρουν ανασταλτικά
- Οι ελεύθερες ανθοκυανίνες δρουν διεγερτικά
- Το γαλλικό οξύ διεγείρει τις ζύμες και τα γαλακτικά βακτήρια
- Άλλα φαινολικά οξέα (κουμαρικό, πρωτοκατεχικό, κλπ) δρουν ανασταλτικά
- Οι οινολογικές ταννίνες έχουν αντιβακτηριακή δράση
- Οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται στην ανάπτυξη του *O. oeni*, αλλά μπορεί να ισχύουν και για άλλα βακτηριακά είδη
- Το γαλλικό οξύ και οι ανθοκυανίνες, ευνοώντας την βακτηριακή ανάπτυξη, ενεργοποιούν τη μηλογαλακτική ζύμωση
- Τα βακτήρια αποικοδομούν αυτές τις δύο ενώσεις
- Οι ανθοκυανίνες ενεργοποιούν τη β-γλυκοσιδάση, η οποία απελευθερώνει τις ανθοκυανιδίνες (φλαβονοειδή) και γλυκόζη, που μεταβολίζεται από τα βακτήρια

# Άλλοι παράγοντες στην ανάπτυξη και δραστικότητα των γαλακτικών βακτηρίων

## Προσαρμογή της ανάπτυξης των βακτηρίων σε οίνους

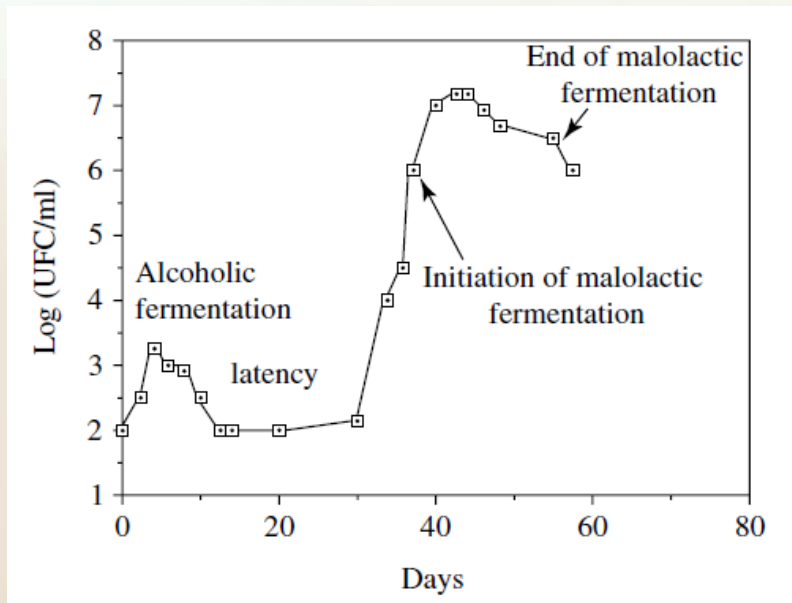
- Οι πολυφαινόλες, μαζί με τα άλλα συστατικά του οίνου, επηρεάζουν τα βακτήρια
  - Μερικές ευνοούν, άλλες όχι, τη βακτηριακή ανάπτυξη και δράση, όμως έχουν δεύτερο ρόλο σε σχέση με τους 4 κύριους παράγοντες
- Αυτά τα συστατικά (και άλλα, μάλλον άγνωστα ακόμα) καθορίζουν την ικανότητα μηλογαλακτικής ζύμωσης στους οίνους
- Το οξυγόνο διευκολύνει το βακτηριακό πολλαπλασιασμό στο κρασί, άγνωστο πως
- Στην πράξη, η συμπεριφορά των βακτηριακών ειδών του οίνου μπορεί να διαφέρει σε σχέση με το οξυγόνο
- Μπορεί να είναι **αδιάφορα** για την παρουσία του, να **προσαρμόζονται** καλύτερα στην απουσία του (προαιρετική αναεροβίωση), να ανέχονται το οξυγόνο του αέρα, αλλά είναι **ανίκανα** να το χρησιμοποιήσουν (αεροανεκτικά) ή τέλος να **απαιτούν** μικρή συγκέντρωση οξυγόνου για βέλτιστη ανάπτυξη (μικροαερόφιλα)
- Η συμπεριφορά δεδομένου στελέχους ποικίλλει με το περιβάλλον
- Σε εργαστηριακές συνθήκες η ανάπτυξη ενεργοποιείται σε αδρανή ατμόσφαιρα: CO<sub>2</sub> και N<sub>2</sub>
- Είναι δύσκολο να προσδιοριστούν οι απαιτήσεις σε οξυγόνο των γαλακτικών βακτηρίων στο κρασί
- Ο περιορισμός του αερισμού μετά τη μετάγγιση του κρασιού, ευνοεί έντονα την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης

# Εξέλιξη των γαλακτικών βακτηριδίων κατά τη ζύμωση και παλαίωση

## Επίδραση στη σύσταση του οίνου

### Εξέλιξη του συνολικού πληθυσμού γαλακτικών βακτηρίων

- Κατά την παραγωγή οίνων που απαιτούν μηλογαλακτική ζύμωση, η μικροβιακή μικροχλωρίδα περνά από πολλές φάσεις
- Στις πρώτες ημέρες ποικίλλει η ποσότητά τους ( $10^2$  -  $10^4$  UFC/ml)
- Η έκταση του πληθυσμού εξαρτάται από τις κλιματικές συνθήκες κατά τις τελευταίες ημέρες της ωρίμανσης



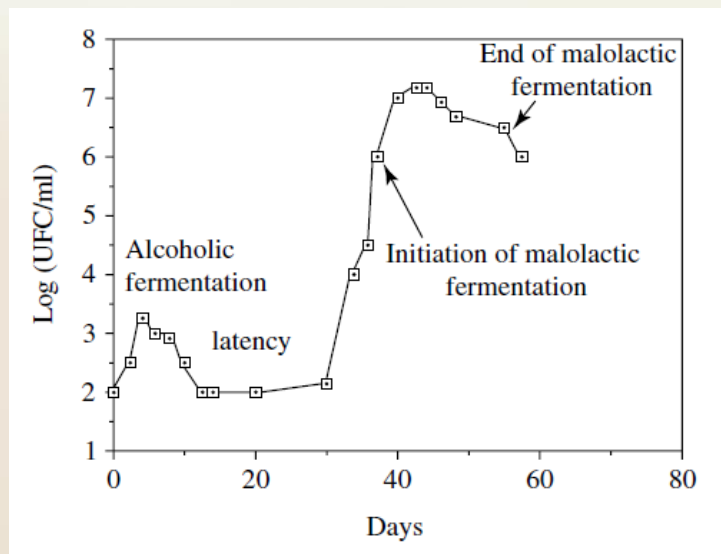


# Εξέλιξη των γαλακτικών βακτηριδίων κατά τη ζύμωση και παλαίωση

## Επίδραση στη σύσταση του οίνου

### Εξέλιξη του συνολικού πληθυσμού γαλακτικών βακτηρίων

- Κατά τις πρώτες ημέρες της αλκοολικής ζύμωσης, βακτήρια και ζύμες πολλαπλασιάζονται
- Οι ζύμες προσαρμόζονται πιο εύκολα στο μούστο και μεγάλος αριθμός κινείται προς το θρεπτικό μέσο
- Ταυτόχρονα, πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό (όχι πάνω από  $10^5$  UFC/ml)
- Αυτή η συμπεριφορά οφείλεται στο pH του μέσου και την ποσότητα του θειώδους ( $\text{SO}_2$ )



# Εξέλιξη των γαλακτικών βακτηριδίων κατά τη ζύμωση και παλαίωση

## Επίδραση στη σύσταση του οίνου

- Μετά την αλκοολική ζύμωση, ο βακτηριακός πληθυσμός παραμένει σε εφησυχάζουσα κατάσταση για ποικίλο χρονικό διάστημα, έως και μερικοί μήνες, όταν το pH, η αιθανόλη και η θερμοκρασία είναι σε πολύ χαμηλές τιμές
- Συνήθως, αυτή η φάση διαρκεί λίγες ημέρες ή καθόλου ή πιο συχνά, συμβαίνει μετά την απόχυση του οίνου
- Ο ένας μικροοργανισμός ακολουθεί τον άλλο – πρώτα οι ζύμες και μετά τα βακτήρια
- Αυτές είναι οι ιδανικές συνθήκες οινοποίησης, δηλ. όλα τα ζυμώσιμα σάκχαρα να έχουν ζυμωθεί, πριν ξεκινήσει η ανάπτυξη των βακτηρίων
- Στην αντίθετη περίπτωση, δηλ. ανάπτυξη των βακτηρίων προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης: Αυτά ζυμώνουν σάκχαρα ακολουθώντας διαφορετικά ζυμωτικά μονοπάτια με αποτέλεσμα την αύξηση της πτητικής οξύτητας του οίνου

Population (UFC/ml) of the different lactic acid bacteria species during the alcoholic fermentation of Cabernet Sauvignon must

Day	Alcohol Content (% vol.)	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
0	0	nd	$2.9 \times 10^2$	$6.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	nd	$7.5 \times 10^1$
3	7	nd	$1.7 \times 10^4$	$3.8 \times 10^4$	$8.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$
6	9	nd	$9.6 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$	$4.5 \times 10^3$	nd
10	13	$4.2 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$	$4.9 \times 10^3$	$4.4 \times 10^3$	nd	nd

# Εξέλιξη των γαλακτικών βακτηριδίων κατά τη ζύμωση και παλαίωση

- Το πρώτο βήμα για να προλάβει ο οινοποιός τη γαλακτική νόσο είναι η κατάλληλη επεξεργασία με θειώδες των σταφυλιών, ειδικά όταν είναι πολύ ώριμα
- Οι μούστοι από τα ώριμα σταφύλια μπορεί αλλιώς να αποκλειστούν από τη ζύμωση
- Ο οινοποιός πρέπει να δράσει κατάλληλα και αν χρειάζεται να προσθέσει άζωτο, βιταμίνες και σπόρους ζύμης (έχει δειχθεί η αποτελεσματικότητά τους)
- Και βέβαια, η σωστή λειτουργία, ειδικά ο αερισμός και η σωστή ρύθμιση της θερμοκρασίας πρέπει να ελέγχονται συνεχώς με σεβασμό στο προϊόν

# Εξέλιξη των γαλακτικών βακτηριδίων κατά τη ζύμωση και παλαίωση

- Στην ειδική περίπτωση των πλούσιων σε αιθανόλη οίνων δεν έχει ακόμα καθοριστεί η πορεία που πρέπει να ακολουθηθεί
  - Υγιεινή βαρελιών και οινοποιίου
  - Προσθήκη θειώδους – που δεν είναι αποδοτική σε όλες τις περιπτώσεις
  - Θερμική κατεργασία μόλις πριν την εμφιάλωση
- Ο καταβολισμός σακχάρων, μηλικού και κιτρικού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης είναι φυσιολογικά συμβάντα
- Η γαλακτική νόσος συμβαίνει μόνον εφ' όσον ο *O. oeni* πολλαπλασιάζεται πολύ νωρίς
- Πολλές άλλες μετατροπές συμβαίνουν και πολλές εξαρτώνται από το στέλεχος
- Η μηλογαλακτική ζύμωση επιφέρει στους οίνους
  - χρωματικές αλλαγές
  - μείωση στο άρωμα
  - **αλλά τους σταθεροποιεί**

# Εξέλιξη των γαλακτικών βακτηριδίων κατά τη ζύμωση και παλαίωση

- Η Met και η Cys, πιθανόν και άλλα συστατικά, μετατρέπονται σε πτητικές αρωματικές ενώσεις
  - πολυπλοκοποιώντας το θέμα του αρώματος μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση
- Ο *O. oeni* παράγει μεθανοθειόλη, διμεθυλοσουλφίδιο, 3-(μεθυλσουλφανυλ)προπαν-1-όλη, και 3(μεθυλσουλφανυλ)προπιονικό οξύ (άρωμα σοκολάτας, που μαζί με τα άλλα δίνει άρωμα κόκκινου μούρου)
- Τα μη επιζώντα βακτήρια ή αυτά που δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν, είναι δυνατόν να αλλοιώσουν τη σύσταση των οίνων
- Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ισταμίνη (αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης) που σχετίζεται και με την αυτόλυση των βακτηρίων (*O. oeni*)
- Η ισταμίνη αυξάνεται κατά την παλαίωση

# Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις κατά την οίνοποίηση

- Ο μούστος περιέχει πληθώρα μικροοργανισμών, μυκήτων, ζυμών και γαλακτικών και οξικών βακτηρίων
- Προέρχονται από τα σταφύλια και από τις μηχανές συλλογής, μεταφοράς και σύνθλιψης του καρπού
- Από το μίγμα επιλέγονται οι οίνοποιητικοί μικροοργανισμοί με φυσικό τρόπο, γρήγορα στην αρχή και πιο ελεγχόμενα αργότερα
- Αυτή η επιλογή πραγματοποιείται λόγω των αλλαγών στο περιβάλλον (σύσταση, οξειδοαναγωγικό δυναμικό) και των ειδικών ανταγωνιστικών και συνεργατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών

# Μεταβολισμός των οξικών βακτηρίων

## Μεταβολισμός των σακχάρων

- Η άμεση και ατελής οξείδωση των σακχάρων – χωρίς φωσφορυλίωση – οδηγεί στο σχηματισμό των αντιστοιχών κετονών
  - Οι αλδόζες οξειδώνονται σε αλδονικά οξέα
    - Η γλυκόζη οξειδώνεται σε γλυκονικό οξύ, η μαννόζη σε μαννονικό, κλπ
      - Ένζυμο: οξειδάση της γλυκόζης, συνένζυμο FAD
  - Στα οξικά βακτήρια, ηλεκτρόνια και πρωτόνια μεταφέρονται μέσω των κυτοχρωμάτων στον τελικό αποδέκτη, οξυγόνο
- Τα βακτήρια του γένους *Glucanobacter* έχουν επί πλέον την ικανότητα να οξειδώνουν το γλυκονικό οξύ σε
  - **κετο-5-γλυκονικό, κετο-2-γλυκονικό και δικετο-2,5-γλυκονικό**
  - Αυτά δεσμεύουν το SO<sub>2</sub>
  - Οι οίνοι που προέρχονται από σταφύλια με *Glucanobacter* δεν μπορούν να διατηρηθούν
  - Ορισμένα οξεοβακτήρια (*Acetobacter*) παράγουν επίσης δικετονικό οξύ

# Μεταβολισμός των οξικών βακτηρίων

## Μεταβολισμός σακχάρων

- Οι κετόζες οξειδώνονται δύσκολα από τα οξεοβακτήρια
  - Η οξείδωση της φρουκτόζης παρέχει γλυκονικό και κετο-5-φρουκτόζη
  - Η οξείδωση οδηγεί και σε διάσπαση του μορίου παρέχοντας γλυκερικό, γλυκολικό και ηλεκτρικό οξύ
- Ειδικά για το *Acetobacter*, τα τελικά προϊόντα της οξείδωσης είναι γλυκονικό και κετογλυκονικό
- Η πλήρης οξείδωση των σακχάρων παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τη βακτηριακή αύξηση
  - Ο μεταβολικός δρόμος είναι αυτός των μονοφωσφορικών εξοζών
  - Στο *Acetobacter*, χρησιμοποιείται ο κύκλος των TCA, αλλά απουσία *Gluconobacter*
  - Η γλυκόλυση είτε δεν υφίσταται ή υφίσταται εν μέρει στα οξεοβακτήρια
- Η οδός των μονοφωσφορικών εξοζών ελέγχεται από το pH του περιβάλλοντος και τη συγκέντρωση της γλυκόζης
- Αναστέλλεται σημαντικά σε χαμηλό pH (<3,5) και C γλυκόζης πάνω από 2g/L
- Κάτω από αυτές τις συνθήκες συσσωρεύεται γλυκονικό οξύ



# Μεταβολισμός των οξικών βακτηρίων

## Μεταβολισμός αιθανόλης

- Μεταξύ των μετασχηματισμών που πραγματοποιούνται από τα οξεοβακτήρια, το οινολογικό ενδιαφέρον εστιάζεται σ' εκείνον της **αιθανόλης**
- Παρέχει οξικό οξύ με ενδιάμεσο την ακεταλδεΐδη  
$$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH} \text{ ---} \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} \text{ ---} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH}$$
- Το *Acetobacter* οξειδώνει επίσης το οξικό οξύ, αλλά απουσία αιθανόλης
  - **κάτι που δεν συμβαίνει κατά την οινοποίηση**
- Το οξικό οξύ επιβραδύνει το δεύτερο στάδιο όταν συσσωρεύεται
- Σε **αερόβιες** συνθήκες, το δεύτερο στάδιο προχωρά πιο γρήγορα και το 75% της αιθανόλης μετατρέπεται σε οξικό
- Όσο το περιβάλλον γίνεται **πτωχότερο** σε οξυγόνο, συσσωρεύεται αιθανόλη
- Υπάρχει επίσης μεταβολικός έλεγχος εξαρτώμενος από το pH, ο οποίος κατευθύνει την οξειδωτική πορεία σε όξινο περιβάλλον

# Μεταβολισμός των οξικών βακτηρίων

## Μεταβολισμός αιθανόλης

- Τα ένζυμα που εμπλέκονται είναι η αλκοολική αφυδρογονάση (ADH ) και η αλδεϋδική αφυδρογονάση (ALDH)
- Και τα δύο ένζυμα ανευρίσκονται στα *Acetobacter* και *Gluconobacter*
- Υπάρχουν σε δύο μορφές
  - η NADP-εξαρτώμενη (και για τις δύο, ADH και ALDH)
    - διαλυτή , κυτταροπλασματική
  - η δεύτερη, που δεν έχει συνένζυμο (και για τις δύο, ADH και ALDH)
    - συνδεδεμένη με την πλασματική μεμβράνη
- Τα παραγόμενα ηλεκτρόνια από την οξειδωτική αντίδραση μεταφέρονται στο οξυγόνο με μεμβρανικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων
- **Πιθανόν τα μεμβρανικά ένζυμα είναι εκείνα που εμπλέκονται κατά κόρον στην οξείδωση της αιθανόλης στον οίνο, επειδή είναι λειτουργικά σε χαμηλές τιμές pH**
- Αντίθετα, τα κυτταροπλασματικά ένζυμα έχουν βέλτιστη δράση σε pH περίπου 8,0

# Μεταβολισμός των οξικών βακτηρίων

## Μεταβολισμός γαλακτικού οξέος

- Όλα τα είδη του γένους *Acetobacter* μπορούν *in vitro* να οξειδώνουν τα D- και L-γαλακτικό οξύ
- Πολλά είδη τα οξειδώνουν πλήρως σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O, αλλά τα περισσότερα διακόπτουν στο στάδιο του οξικού οξέος
- Πιο αποτελεσματική είναι η οξείδωση του D ισομερούς
  - Το πυροσταφυλικό είναι το πρώτο ενδιάμεσο
  - Αποκαρβοξυλιώνεται σε ακεταλδεΐδη
  - Οξειδώνεται σε οξικό από την ALDH
- Οι D- και L-γαλακτικές οξειδάσες είναι μεμβρανικά ένζυμα που δρουν με τα κυτοχρώματα
- Η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση είναι μεμβρανικό ένζυμο
- Οι D- και L-γαλακτικές αφυδρογονάσες είναι κυτταροπλασματικές
- Αυτός ο μηχανισμός δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ενεργός στους οίνους
  - Δεν υπάρχει απόδειξη ότι είναι πηγή μόλυνσης των οίνων

# Μεταβολισμός των οξικών βακτηρίων

## Μεταβολισμός γλυκερόλης

- Η οξείδωση της γλυκερόλης οδηγεί στο σχηματισμό  $\text{CH}_2\text{OH-CO-CH}_2\text{OH}$
- Τα οξικά βακτήρια, εκτός από το *A. Pasteurianus*, πράγματι παράγουν διυδροξυακετόνη
- Η αντίδραση απαιτεί εντονότατη οξυγόνωση του περιβάλλοντος
- Η αντίδραση αναστέλλεται από την αιθανόλη
- Δεν φαίνεται να συμβαίνει στους οίνους
- Φαίνεται να ευνοείται από επιμολυσμένα σταφύλια
- Πράγματι, τα οξικά βακτήρια είναι παρόντα στο μύκητα *Botrytis cinerea*, ο οποίος προσβάλλει τα σταφύλια
- Η γλυκερόλη είναι ένα από τα κύρια μεταβολικά του προϊόντα

# Εξέλιξη των οξεοβακτηριδίων κατά τη ζύμωση και παλαίωση

- Το κύριο χαρακτηριστικό των οξεοβακτηρίων είναι η απαίτησή τους για οξυγόνο
  - αλλιώς δεν πολλαπλασιάζονται
- Στους οίνους, τα *Acetobacter aceti* και *A. Pasteurianus* παίρνουν την ενέργεια που επιζητούν από την οξείδωση της αιθανόλης
- Οι έτοιμοι οίνοι περιέχουν 0,3–0,5 g πτητικής οξύτητας ανά λίτρο
  - που οφείλεται στο μεταβολισμό της ζύμης και των γαλακτικών βακτηρίων
- Τιμές μεγαλύτερες οφείλονται στη συσσώρευση οξικού από οξεοβακτήρια
  - **Το φαινόμενο ονομάζεται οξική μόλυνση**
- Αυτή η μόλυνση πρέπει να αποφεύγεται
  - **Χαμηλή ποιότητα του οίνου**
  - **Νόμιμα όρια πτητικής οξύτητας**

# Εξέλιξη των οξεοβακτηριδίων κατά τη ζύμωση και παλαίωση

- Η οξική μόλυνση συνοδεύεται από αύξηση του οξικού αιθυλεστέρα
- Τα επιτρεπτά όριά του είναι 160–180 mg/l
- Παράγεται και από τις ζύμες έως 50 mg/l
- Η παραγωγή του ευνοείται από την αποθήκευση του οίνου σε υψηλές T
- Τα οξεοβακτήρια αναπτύσσονται γρήγορα σε αερόβιες συνθήκες, δηλαδή
  - στο μούστο
  - στην επιφάνεια των οίνων
- Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει κατά τη ζύμωση
  - Το περιβάλλον γίνεται ταχύτατα πτωχό σε οξυγόνο όσο προχωρά η ζύμωση
- Κατά την αποθήκευση του οίνου, αυτός πρέπει να μην έρχεται σε επαφή με τον αέρα, ώστε να προστατεύεται από χημικές και βιολογικές οξειδώσεις
- Τα οξεοβακτήρια επιβιώνουν των ζυμώνσεων και μπορούν να αρχίσουν να αναπτύσσονται σε περιβάλλον πλούσιο σε αέρα
- Έτσι, η αποθήκευση του οίνου γίνεται σε κλειστά δοχεία, πλήρως γεμάτα
- Εναλλακτικά, μπορεί να εισαχθεί στο δοχείο ένα αδρανές αέριο

# Εξέλιξη των οξεοβακτηριδίων κατά τη ζύμωση και παλαίωση

- Ίσως το πιο κρίσιμο σημείο στην ανάπτυξη οξεοβακτηρίων είναι κατά την παλαίωση των οίνων, όπου υπάρχει πάντα ο κίνδυνος διάχυσης του οξυγόνου μέσω των ξύλινων βαρελιών
- Δεν υπάρχει αποδοτική μέθοδος ελαχιστοποίησης των οξεοβακτηρίων
- Ακόμα κι αν προστεθεί διοξείδιο του θείου 25–30 mg ανά λίτρο, οι οίνοι θα περιέχουν πάντα ζωντανό πληθυσμό βακτηρίων, μέχρι και  $10^3$  ως  $10^4$  UFC/ml κατά την παλαίωσή τους
- Η χαμηλή θερμοκρασία αποθήκευσης ( $15^\circ\text{C}$ ) μπορεί να περιορίσει το πρόβλημα
- Η σωστή καθαριότητα και υγιεινή του οινοποιείου είναι σημαντική
- Η σωστή οριοθέτηση των παραμέτρων οινοποίησης (pH, T, κλπ) εξ ίσου
- Η ανάπτυξη των οξεοβακτηρίων είναι μικρότερη στις μεγάλες δεξαμενές απ' ότι στα βαρέλια
- Ο αριθμός των βακτηρίων μειώνεται σε εμφιαλωμένους οίνους λόγω των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, που είναι πολύ περιοριστικές για την επιβίωσή τους