

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ

Ενότητα 5^η: Μικροοργανισμοί & βιοχημεία ζυμώσεων

Δημήτρης Π. Μακρής *PhD DIC*

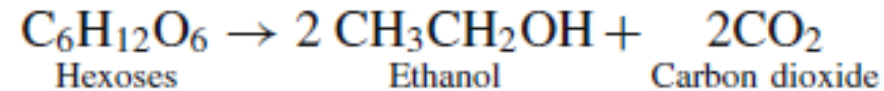
Αναπληρωτής Καθηγητής



© 2022 - 2023

1. Εισαγωγή

Η αλκοολική ζύμωση είναι η αναερόβιος μετατροπή των σακχάρων, κυρίως γλυκόζης και φρουκτόζης, σε αιθανόλη και CO₂. Αυτή η διεργασία, που πραγματοποιείται από ζύμες αλλά και από κάποια βακτήρια όπως η *Zygomonas mobilis*, μπορεί να περιγραφεί από την συνολική αντίδραση:



Εντούτοις, η αλκοολική ζύμωση είναι μια μακράν πιο πολύπλοκη διεργασία, καθώς πολλές παράλληλες βιοχημικές και φυσικοχημικές διεργασίες λαμβάνουν χώρα, μετατρέποντας το γλεύκος σε οίνο.

Εκτός από την αιθανόλη, πολλές άλλες ουσίες παράγονται μέσω της αλκοολικής ζύμωσης, όπως ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, γλυκερόλη, κτλ.

Ταυτόχρονα, κάποιες άλλες ουσίες του γλεύκους επίσης υπόκεινται σε βιομετατροπή από τις ζύμες.

1. Εισαγωγή

Στο ξεκίνημα της οινοποίησης, πολλά είδη ζυμομυκήτων μπορεί να βρίσκονται στο γλεύκος. Αυτή η βιοποικιλότητα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία του σταφυλιού, το στάδιο ωριμότητας κατά τον τρύγο, την εφαρμογή μυκητοκτόνων, τις κλιματικές συνθήκες και τις καλλιεργητικές τεχνικές.

Όσον αφορά στην αυθόρμητη ζύμωση, πολλά είναι τα είδη ζυμών που μπορεί να συμμετέχουν, ακόμα και υπό την παρουσία SO₂. Συνήθως, τα είδη *Kloeckera*, *Hanseniaspora* και *Candida* υπερέχουν στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης.

Κατόπιν, τα είδη *Pichia* και *Metschnikowia* δεσπόζουν στα ενδιάμεσα στάδια. Τελικά, κατά τα τελευταία στάδια της ζύμωσης, δεσπόζει ο *S. cerevisiae* λόγω της μεγαλύτερης αντοχής στα αυξημένα επίπεδα αιθανόλης.

Μερικές άλλες ζύμες, όπως η *Torulasporea*, ο *Kluyveromyces*, ο *Schizosaccharomyces*, ο *Zygosaccharomyces* και ο *Brettanomyces* μπορούν επίσης να βρίσκονται στο γλεύκος κατά την αλκοολική ζύμωση, αλλά και στους οίνους, και μπορούν ν' αποτελέσουν κίνδυνο ανάπτυξης ανεπιθύμητων οργανοληπτικών χαρακτήρων.

1. Εισαγωγή

Προφανώς, η διαδοχή αυτών των διαφορετικών ειδών ζυμών κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης επηρεάζει την τελική σύσταση των οίνων με τέτοιο τρόπο, ώστε να προσδίδει είτε θετικά είτε αρνητικά χαρακτηριστικά.

Για την ανάσχεση ανάπτυξης ανεπιθύμητων ζυμών, γίνεται προσθήκη SO_2 στα γλεύκη και ακολούθως εμβολιασμός με επιλεγμένα στελέχη *S. cerevisiae*. Το SO_2 έχει δραστική επιρροή στην μικροβιακή σύσταση, μιας και ο *S. cerevisiae* είναι πιο ανθεκτικός στο SO_2 απ' ότι οι υπόλοιπες ζύμες, κι έτσι ευνοείται επιλεκτικά η ανάπτυξή του.

Από την άλλη, ο εμβολιασμός με επιλεγμένα στελέχη αυξάνει δραστικά τον αρχικό πληθυσμό του *S. cerevisiae*, γι' αυτό πλέον ο εμβολιασμός είναι κανόνας έτσι ώστε να εξασφαλιστεί μια ομαλή ζύμωση.

Εντούτοις, η πρακτική της αυθόρμητης ζύμωσης συνεχίζει να χρησιμοποιείται από πολλά οινοποιία, επειδή θεωρείται ότι παράγονται οίνοι με μεγαλύτερη γευστική και αρωματική πολυπλοκότητα.

2. Ανάπτυξη ζυμών κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης

Στο ξεκίνημα της οινοποίησης, οι ζύμες αρχίζουν να μεταβολίζουν σάκχαρα και άλλα θρεπτικά συστατικά του γλεύκους. Οι ζύμες χρησιμοποιούν αυτά τα συστατικά για να παράξουν ενέργεια και ν' αυξήσουν τον πληθυσμό τους.

Κατά τις πρώτες ώρες, ο πληθυσμός των ζυμών δεν αυξάνει. Σ' αυτήν την περίοδο, που ονομάζεται **λανθάνουσα φάση** (latency phase), είναι απαραίτητο να εγκλιματιστούν τα κύτταρα στο περιβάλλον του γλεύκους. Ο αρχικός πληθυσμός εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες. Αν δεν υπάρξει εμβολιασμός, ο πληθυσμός είναι περίπου 10^4 κύτταρα/mL.

Εντούτοις, ο πληθυσμός μπορεί να είναι υψηλότερος αν τα σταφύλια ήταν προσβεβλημένα από μύκητες. Αυτό συμβαίνει και όταν πραγματοποιείται εμβολιασμός (περίπου 5×10^6 κύτταρα/mL).

Όταν τα κύτταρα έχουν πλέον προσαρμοστεί στις περιβαλλοντικές συνθήκες, αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Αυτή η περίοδος, που ονομάζεται **εκθετική φάση** (exponential phase), επηρεάζεται σημαντικά από την θερμοκρασία, την συγκέντρωση των αμμωνιακών, των αμινοξέων, άλλων θρεπτικών συστατικών, αλλά και του O_2 .

2. Ανάπτυξη ζυμών κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης

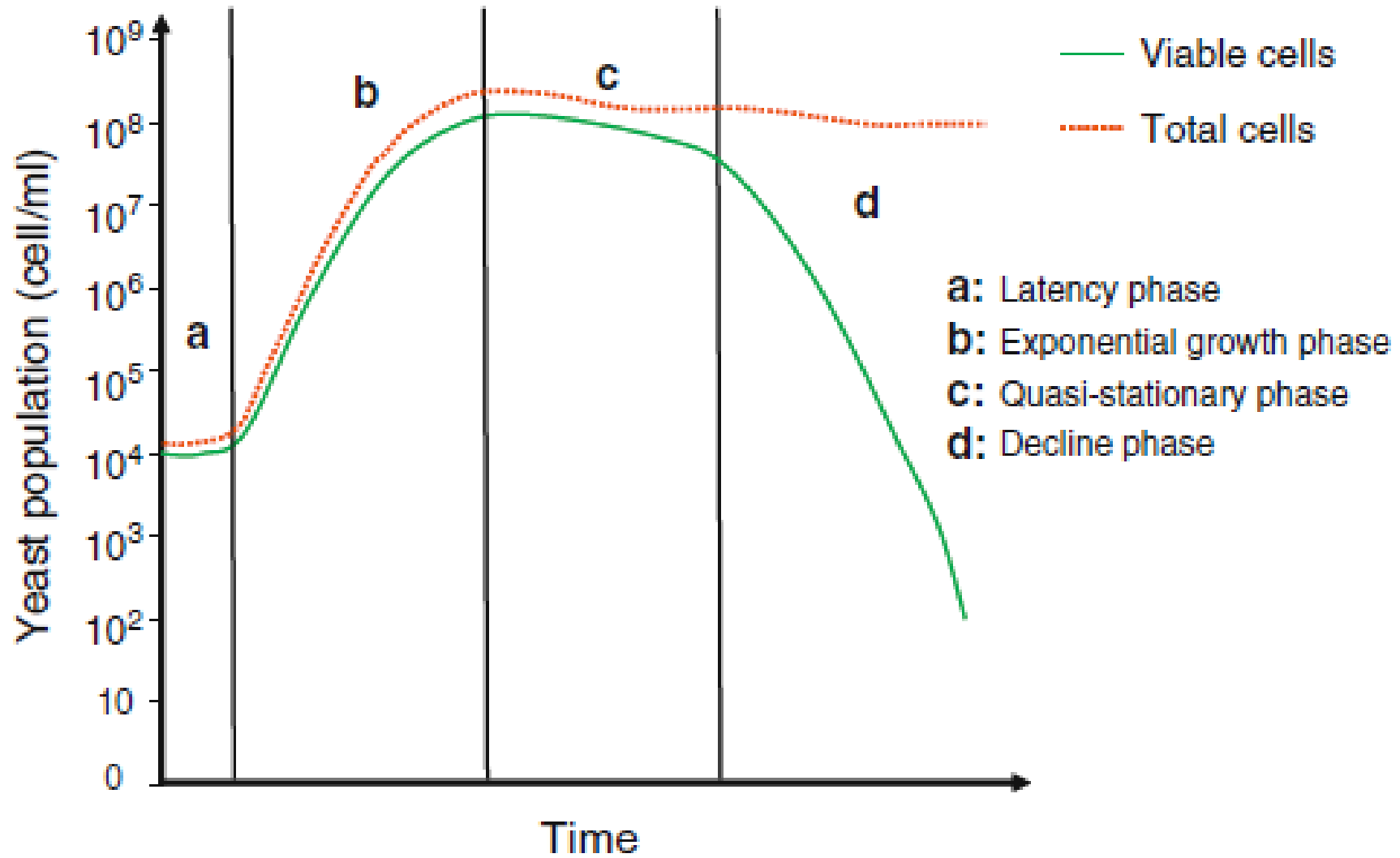
Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, οι ζύμες αυξάνουν τον πληθυσμό τους σε 10^7 – 10^8 κύτταρα/mL. Αυτή η φάση μπορεί να διαρκέσει από 3 έως 6 ημέρες. Ακολούθως, οι ζύμες παύουν ν' αναπτύσσονται γιατί αρχίζει έλλειψη ορισμένων απαραίτητων θρεπτικών συστατικών.

Σ' αυτήν την φάση, που ονομάζεται **ημι-στατική φάση** (quasi-stationary phase), ο πληθυσμός των ζυμών παραμένει σχεδόν σταθερός. Αυτή η φάση διαρκεί 2 - 10 ημέρες.

Αργότερα, η **φάση ελάττωσης** (decline phase) ξεκινάει και ο πληθυσμός των ζυμών σταδιακά μειώνεται, έως ότου εξαλειφθεί πλήρως. Σ' αυτήν την περίοδο οι ζύμες θανατώνονται εξαιτίας της έλλειψης θρεπτικών συστατικών αλλά και επειδή η αιθανόλη και άλλοι μεταβολίτες που προέρχονται από την ζύμωση, είναι τοξικοί για τις ζύμες.

Η επιτυχία μιας αλκοολικής ζύμωσης εξαρτάται από την διατήρηση ενός βιώσιμου πληθυσμού ζυμών, σε επίπεδα επαρκή για τον μεταβολισμό σχεδόν του συνόλου των σακχάρων.

Διαφορετικά, υπάρχει σοβαρός κίνδυνος η ζύμωση να εξελιχθεί σ' αυτό που χαρακτηρίζεται ως «κολλημένη» ή «νωθρή» ζύμωση.



3. Γλυκόλυση

Η διαδικασία της γλυκόλυσης είναι η ενδοκυτταρική μετατροπή της γλυκόζης (και φρουκτόζης) σε πυροσταφυλικό οξύ. Αυτή η βιοχημική οδός είναι η αρχική διεργασία του καταβολισμού των υδατανθράκων στους περισσότερους οργανισμούς και λαμβάνει χώρα εξολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα.

Οι ζύμες χρησιμοποιούν την γλυκόλυση ως την κύρια οδό καταβολισμού των σακχάρων. Η οδός των πεντοζών, που χρησιμοποιείται από μερικούς οργανισμούς όπως π.χ. οξικά βακτήρια ως κύρια οδός για τον καταβολισμό των σακχάρων, χρησιμοποιείται από τις ζύμες μόνο ως πηγή ριβόζης και NADPH. Η ριβόζη είναι απαραίτητη για την σύνθεση των νουκλεοτιδίων και των νουκλεϊκών οξέων, ενώ το NADPH απαιτείται από μερικές μεταβολικές διεργασίες, όπως η σύνθεση των λιπών.

Επομένως, οι ζύμες δεν χρησιμοποιούν την οδό των πεντοζών για την παραγωγή ενέργειας, αλλά για να εφοδιαστούν με ουσίες απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η γλυκόλυση εμπεριέχει μια διαδοχή από 11 χημικές αντιδράσεις για την διάσπαση των εξοζών και την απελευθέρωση ενέργειας υπό την χημική μορφή του ATP.

Αρχικά, οι εξόζες μεταφέρονται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω διάχυσης. Καθώς η εσωτερική συγκέντρωση σακχάρων είναι χαμηλότερη από την εξωτερική, δεν δαπανάται ενέργεια γι' αυτήν την διεργασία.

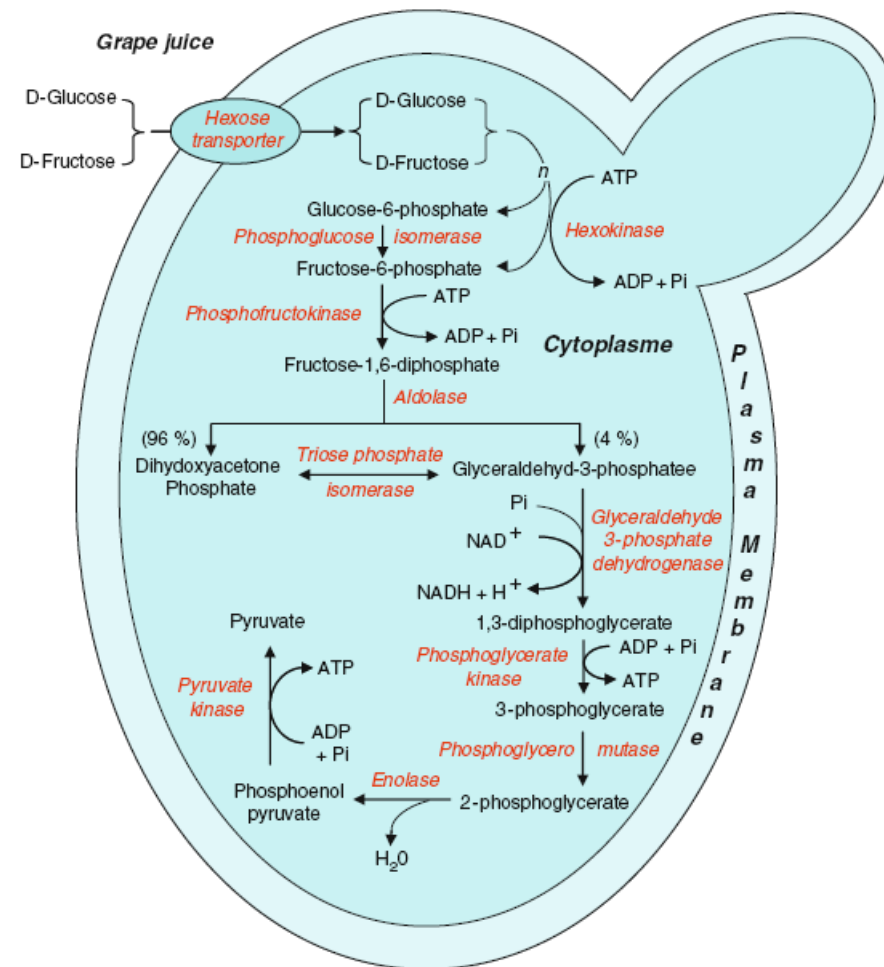
3. Γλυκόλυση

Το πρώτο βήμα στην γλυκόλυση είναι η φωσφορυλίωση της γλυκόζης και φρουκτόζης από μια οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται εξοκινάσες, προς σχηματισμό 6-φωσφορικής γλυκόζης και 6-φωσφορικής φρουκτόζης.

Αυτή η αντίδραση καταναλώνει ATP, αλλά διατηρεί την εσωκυτταρική συγκέντρωση εξοζών χαμηλή, ευνοώντας έτσι την συνεχή μεταφορά σακχάρων μέσα στο κύτταρο μέσω της κυτταρικής μεμβράνης.

Ως συνέπεια της γλυκόλυσης, κάθε μόριο εξόζης παράγει 2 μόρια πυροσταφυλικού, 4 μόρια ATP και 1 μόριο NADH. Εφόσον 2 μόρια ATP καταναλώνονται στην φωσφορυλίωση των εξοζών, η καθαρή ενέργεια για το κύτταρο είναι 2 μόρια ATP ανά εξόζη.

Το πυροσταφυλικό που παράγεται από την γλυκόλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τις ζύμες σε διάφορες μεταβολικές οδούς. Εντούτοις, οι ζύμες πρέπει να αναγεννήσουν NAD⁺ από το NADH για να επαναφέρουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω ζύμωσης ή αναπνοής.



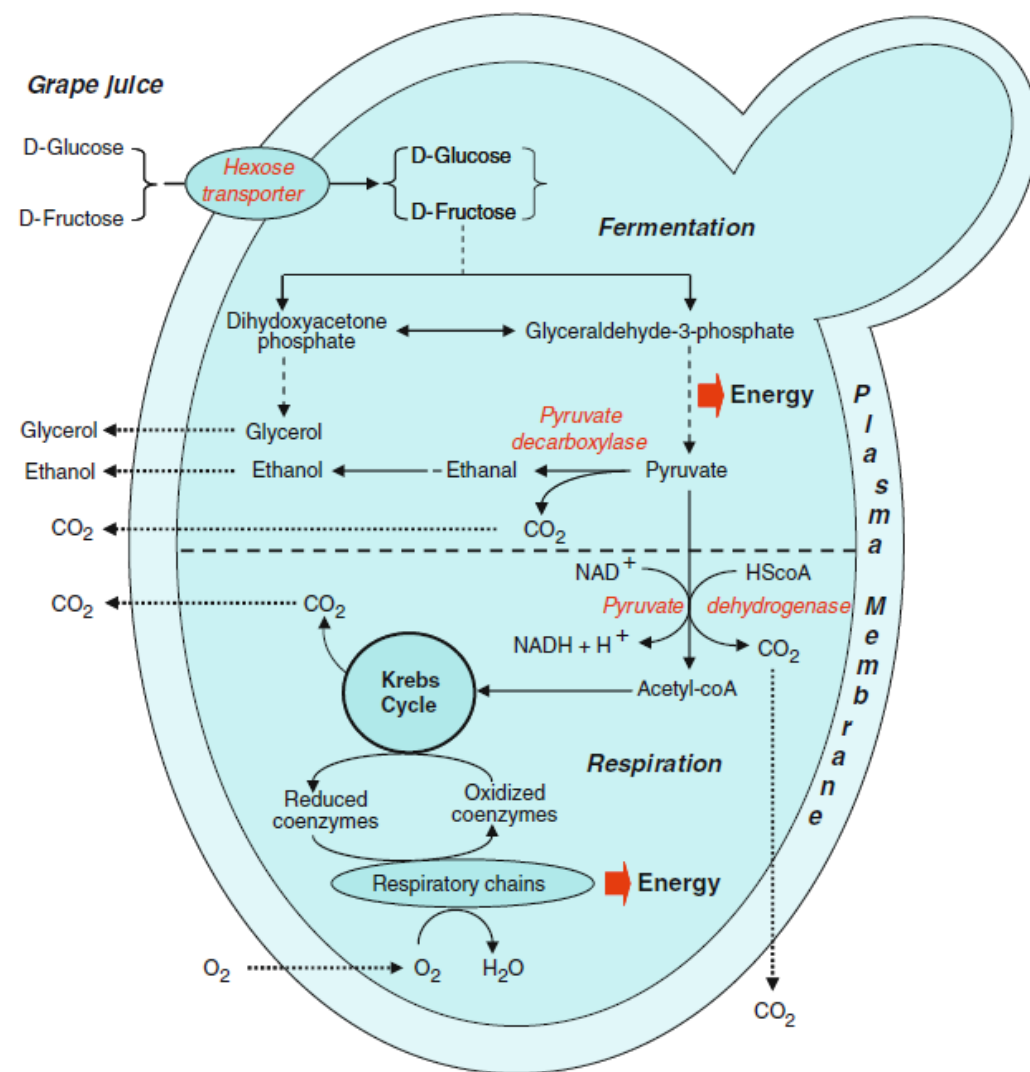
4. Ζύμωση και αναπνοή

Οι ζύμες είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί γιατί διαθέτουν τις μεταβολικές οδούς για να μεταβολίζουν τα σάκχαρα αεροβίως ή αναεροβίως. Επομένως, οι ζύμες μπορούν να καταναλώσουν σάκχαρα χρησιμοποιώντας αναπνοή και ζύμωση.

Αμφότερες αυτές οι οδοί ξεκινούν με γλυκόλυση, η οποία έχει ως τελικό προϊόν το πυροσταφυλικό. Το πυροσταφυλικό μπορεί να μετατραπεί σε ακεταλδεΐδη και CO_2 και κατόπιν η ακεταλδεΐδη να αναχθεί σε αιθανόλη. Αυτή η διεργασία, που ονομάζεται αλκοολική ζύμωση, λαμβάνει χώρα μέσα στο κυτταρόπλασμα.

Η αλκοολική ζύμωση αναγεννά το NAD^+ που καταναλώνεται κατά την γλυκόλυση και παρέχει στις ζύμες ενέργεια μόνο 2 μορίων ATP από τον μεταβολισμό των εξοζών.

Η αναπνοή αποδίδει συνολική ενέργεια 36–38 μορίων ATP ανά εξόζη. Είναι δηλαδή πιο επικερδής ενεργειακά απ' ό,τι η ζύμωση. Εντούτοις, απαιτεί O_2 και αναστέλλεται από την υψηλή συγκέντρωση σακχάρων.



5. Ρύθμιση μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής: Φαινόμενα Crabtree και Pasteur

Ο αερισμός αυξάνει την παραγωγή βιομάζας και μειώνει την ταχύτητα κατανάλωσης σακχάρων και παραγωγής αιθανόλης. Επομένως, ο αερισμός αναστέλλει την αλκοολική ζύμωση. Αυτό το φαινόμενο, το οποίο ονομάζεται **φαινόμενο Pasteur**, έχει αποδοθεί σε διάφορους μηχανισμούς.

Προφανώς, όταν οι ζύμες αρχίσουν να καταναλώνουν σάκχαρα, παράγονται μεγάλες ποσότητες CO₂. Η απελευθέρωση CO₂ εκτοπίζει το O₂ και δημιουργεί ημι-αναερόβιες συνθήκες που ευνοούν την ζύμωση. Εντούτοις, ακόμα και υπό την παρουσία O₂, ο *S. cerevisiae* θα διεξάγει ζύμωση αν η συγκέντρωση σακχάρων είναι τουλάχιστον 9 g/L. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως **Crabtree**, καταβολική καταστολή μέσω γλυκόζης (catabolic repression by glucose) ή ανάστροφο φαινόμενο Pasteur (contrary effect).

Όταν ο *S. cerevisiae* αναπτύσσεται σε υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, όπως συμβαίνει στο γλεύκος, τα μιτοχόνδριά του εκφυλίζονται. Ταυτόχρονα, τα ένζυμα του κύκλου Krebs και τα συστατικά των αναπνευστικών αλυσίδων καταστέλλονται.

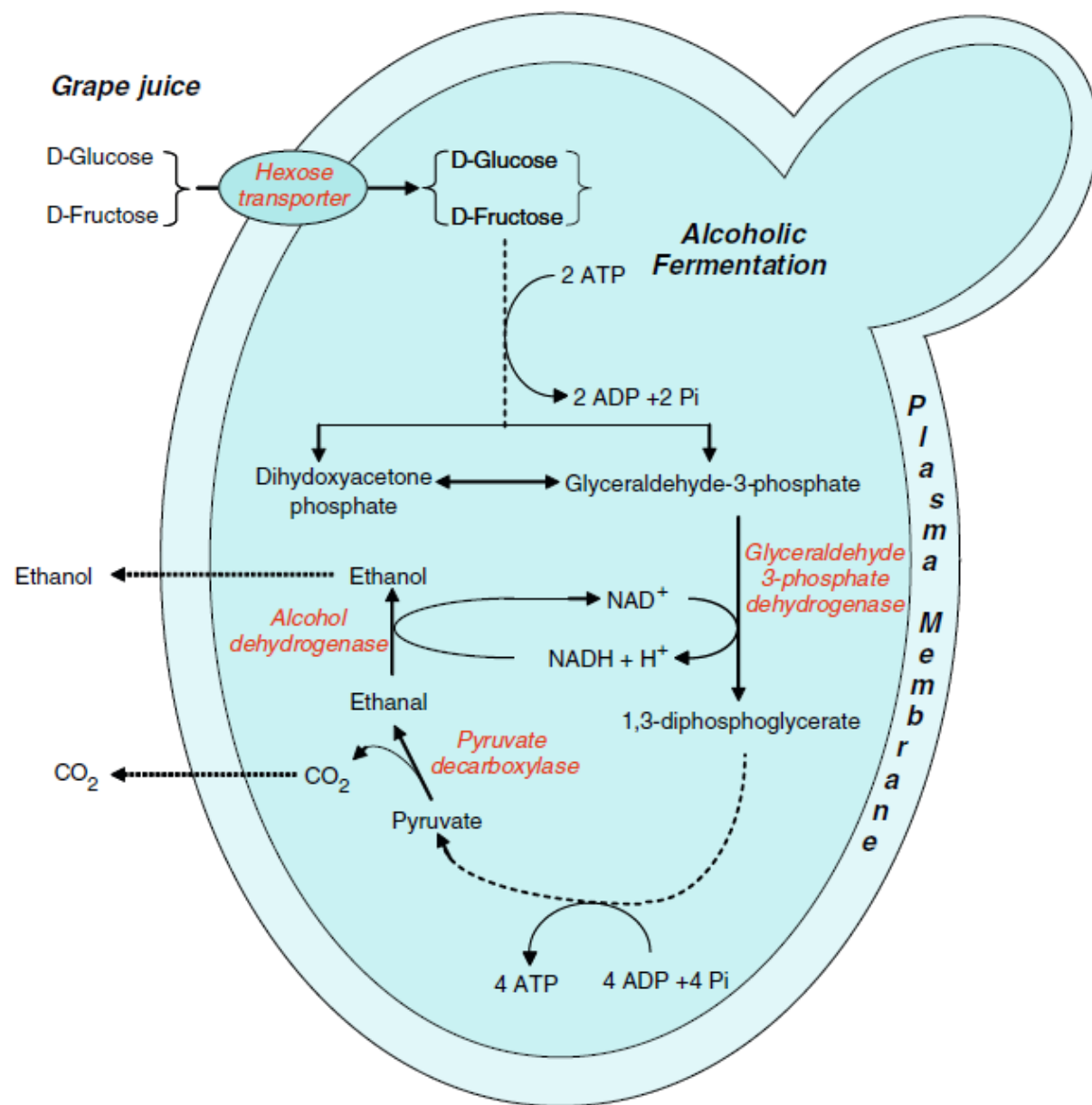
Επομένως, υπό τις συνθήκες ζύμωσης του γλεύκους, ο *S. cerevisiae* μπορεί μόνο να ζυμώσει σάκχαρα. Ο *S. cerevisiae* μπορεί να διεξάγει αναπνοή μόνο όταν η συγκέντρωση των σακχάρων είναι χαμηλή, υπό την παρουσία O₂.

6. Αλκοολική ζύμωση

Όταν ζυμώνει το γλεύκος, ο *S. cerevisiae* κατευθύνει το πυροσταφυλικό κυρίως στην παραγωγή αιθανόλης, με σκοπό την αναγέννηση του NAD^+ που καταναλώθηκε στην γλυκόλυση. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται **αλκοολική ζύμωση**.

Το πυροσταφυλικό αρχικά αποκαρβοξυλιώνεται σε ακεταλδεΐδη και ακολούθως ανάγεται σε αιθανόλη, ανακυκλώνοντας το NADH σε NAD^+ .

Αμφότερα τα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης, αιθανόλη και CO_2 , μεταφέρονται έξω από το κύτταρο με απλή διάχυση.



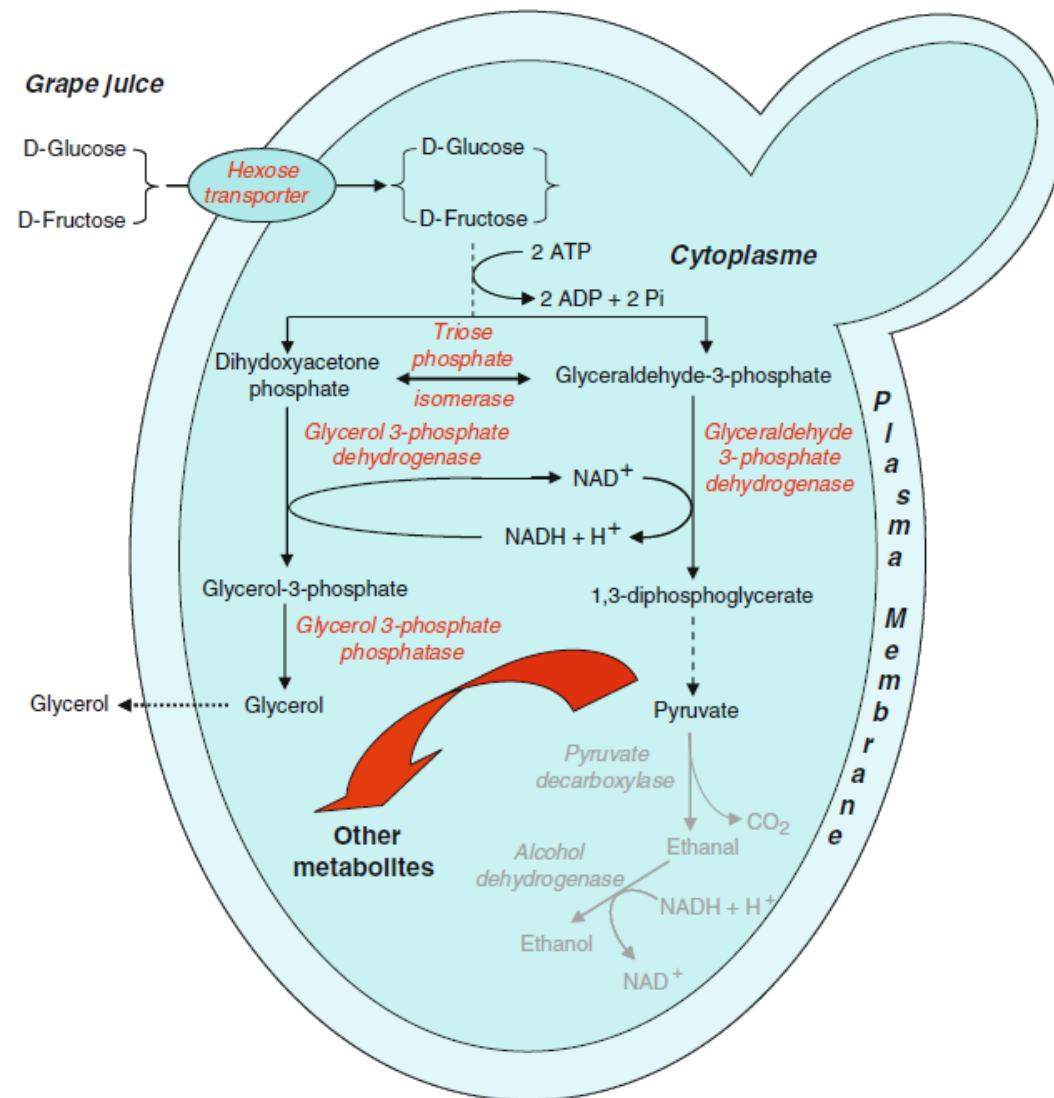
7. Γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση

Αν και η παραγωγή αιθανόλης είναι η κυριότερη οδός για την αναγέννηση NAD^+ , υπάρχει και μία εναλλακτική οδός γι' αυτόν τον σκοπό. Αυτή η οδός, που ονομάζεται **γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση**, δημιουργεί γλυκερόλη ως τελικό προϊόν.

Η ζύμωση της γλυκόζης από τις ζύμες υπό την παρουσία SO_2 παράγει υψηλές ποσότητες γλυκερόλης. Το SO_2 συνδυάζεται με την ακεταλδεΐδη, κι έτσι παρεμποδίζεται η αναγέννηση του NAD^+ μέσω της αλκοολικής δεϋδρογονάσης.

Υπό αυτές τις συνθήκες, οι ζύμες πρέπει να οξειδώσουν το NADH μέσω μιας εναλλακτικής οδού, με σκοπό την εξισορρόπηση της έλλειψης NAD^+ και ο μοναδικός τρόπος είναι η παραγωγή γλυκερόλης.

Η παραγωγή γλυκερόλης καταναλώνει ATP αλλά είναι απαραίτητη για την εξισορρόπηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μέσα στο κύτταρο.



7. Γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση

Κατά την έναρξη της ζύμωσης, οι ζύμες χρειάζονται πολλά υποστρώματα για την ανάπτυξή τους. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εμπλέκει μια πολύ ενεργή βιοσύνθεση πρωτεϊνών, λιπιδίων, νουκλεοτιδίων, κτλ., και τα περισσότερα από αυτά τα βιομόρια συντίθενται χρησιμοποιώντας πυροσταφυλικό.

Κάθε φορά που ένα μόριο πυροσταφυλικού χρησιμοποιείται αναεροβίως, δημιουργείται έλλειψη ενός μορίου NAD^+ , η οποία πρέπει ν' αναπληρωθεί μέσω της γλυκεροπυροσταφυλικής οδού.

Γι' αυτόν τον λόγο, η γλυκερόλη παράγεται κυρίως κατά τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, όταν οι ζύμες αναπτύσσονται και χρειάζονται μεγάλες ποσότητες πυροσταφυλικού για ν' αυξήσουν την βιομάζα τους. Επιπλέον, οι ζύμες παράγουν γλυκερόλη ως προστασία από το υψηλό ωσμωτικό στρες.

Γι' αυτούς τους λόγους, η γλυκερόλη είναι το τρίτο άφθονο συστατικό των ξηρών οίνων (μετά το νερό και την αιθανόλη). Η συγκέντρωσή της είναι συνήθως μεταξύ 6 και 10 g/L.

8. Μεταβολισμός αζώτου

Όταν ο *S. cerevisiae* αναπτύσσεται στο γλεύκος χρειάζεται σημαντικές ποσότητες αφομοιώσιμου αζώτου για την σύνθεση βιομάζας. Το γλεύκος περιέχει μια ποικιλία αζωτούχων ενώσεων, όπως αμμωνιακά άλατα, αμινοξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες, κτλ., αλλά μόνο μερικά από αυτά μπορούν ν' αφομοιωθούν από τον *S. cerevisiae*.

Κατά την διάρκεια της ζύμωσης του γλεύκου, ο *S. cerevisiae* μπορεί να χρησιμοποιήσει μόνο αμμωνιακά και αμινοξέα, με την εξαίρεση της προλίνης, ως αφομοιώσιμες πηγές αζώτου. Η προλίνη μπορεί ν' αφομοιωθεί από τον *S. cerevisiae* μόνο υπό αερόβιες συνθήκες. Γι' αυτόν τον λόγο, η όρος «ευκόλως αφομοιώσιμο άζωτο» (easily-assimilable nitrogen) έχει προταθεί για να περιγράψει συνολικά τα αμμωνιακά και τ' αμινοξέα (πλην προλίνης).

Το γλεύκος είναι σχετικά φτωχό σε αμμωνιακά και αμινοξέα. Συνεπώς, η κατανάλωση αυτών των συστατικών από τις ζύμες μπορεί να είναι κρίσιμη σε ορισμένες περιπτώσεις. Ένα χαμηλό επίπεδο ευκόλως αφομοιώσιμου αζώτου μπορεί ν' αποτελεί κίνδυνο για νωθρές ή κολλημένες ζυμώσεις.

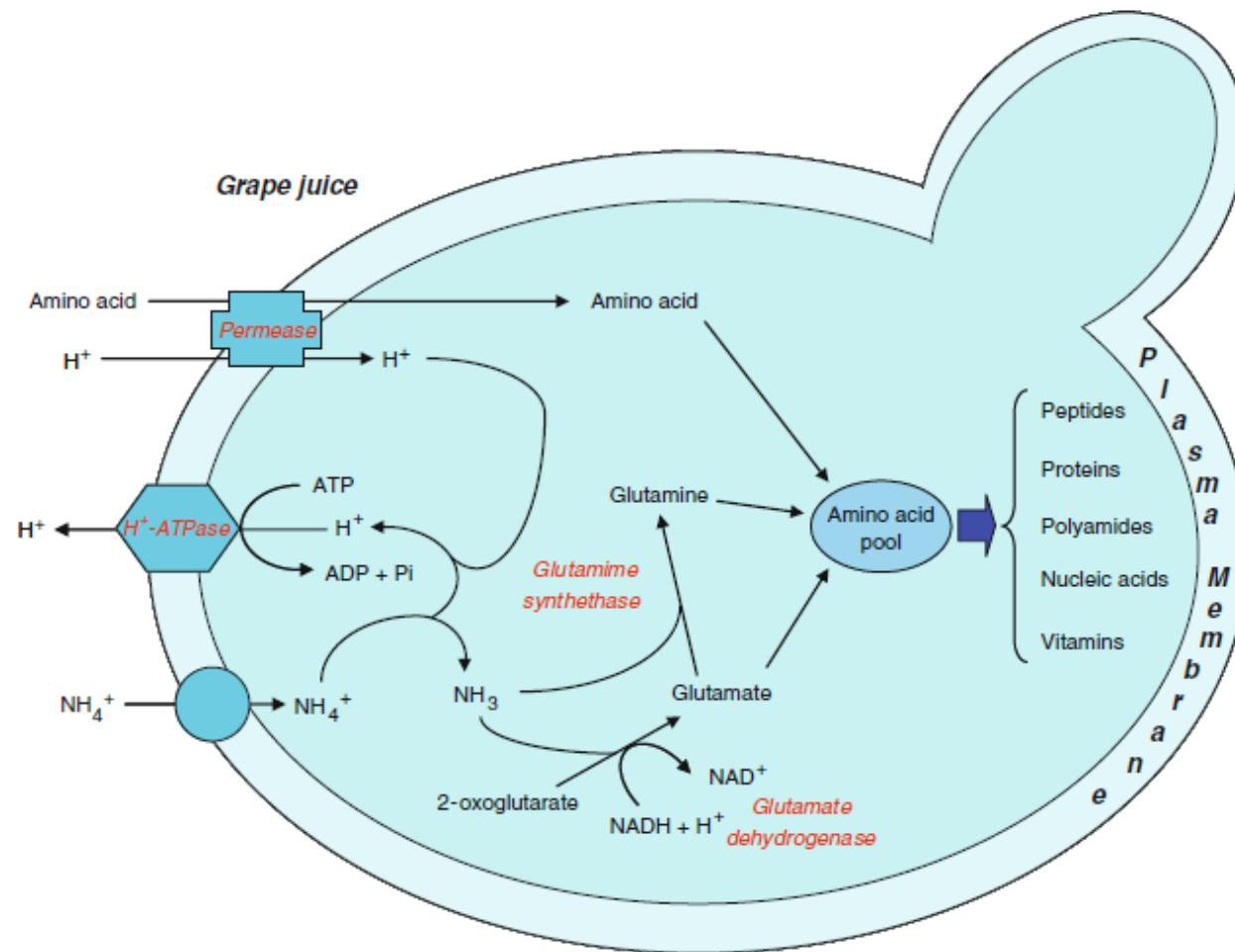
Γι' αυτόν τον λόγο, σε αρκετές περιπτώσεις απαιτείται προσθήκη αμμωνιακών. Η απαίτηση σε ευκόλως αφομοιώσιμο άζωτο για να ολοκληρωθεί μια ζύμωση εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και τον δυναμικό αλκοολικό τίτλο.

8. Μεταβολισμός αζώτου

Γενικά, θεωρείται ότι ευκόλως αφομοιώσιμο άζωτο χαμηλότερο από 130 mg/L μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την σωστή εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης.

Εν αντιθέσει, μεγάλη περίσσεια αζώτου μπορεί να οδηγήσει στην παρουσία εναπομείναντος, μη-αφομοιώσιμου αζώτου στον οίνο, κάτι το οποίο είναι παράγοντας μικροβιακής αστάθειας, και μπορεί να ευνοήσει την δημιουργία καρβαμικού αιθυλεστέρα (ethyl carbamate) και βιογενών αμινών.

Συνεπώς, το άζωτο πρέπει να προστίθεται προσεκτικά και να λαμβάνεται υπόψη η αρχική συγκέντρωση του ευκόλως αφομοιώσιμου αζώτου, καθώς και ο δυναμικός αλκοολικός τίτλος.



8. Μεταβολισμός αζώτου

Ο *S. cerevisiae* μπορεί κατά την διάρκεια της ζύμωσης να χρησιμοποιήσει όλα τα αμινοξέα, εκτός της προλίνης. Τα αμινοξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για την σύνθεση πρωτεϊνών, αλλά η σύσταση των αμινοξέων του γλεύκους δεν αντιστοιχεί απαραίτητα τις ανάγκες των ζυμών.

Γι' αυτό, οι ζύμες πρέπει να χρησιμοποιήσουν τα εναπομείναντα αμινοξέα για να συνθέσουν αυτά που τους λείπουν. Σ' αυτήν την περίπτωση, η αμμωνία ενσωματώνεται πάνω σε άλλα αμινοξέα, ενώ αντιθέτως ο ανθρακικός σκελετός μεταβολίζεται.

Η έλλειψη επαρκούς ευκόλως αφομοιώσιμου αζώτου αναγκάζει τις ζύμες να χρησιμοποιήσουν θειούχα αμινοξέα (κυστεΐνη και μεθειονίνη), κι έτσι δημιουργείται υδρόθειο και μερκαπτάνες.

Συνεπώς, η προσθήκη αμμωνιακών αλάτων, εκτός από την αποφυγή προβληματικών ζυμώσεων, συμβάλλει και στην αποφυγή δημιουργίας δυσάρεστων οσμών.

Βιβλιογραφία

Zamora F., **2009**. Biochemistry of alcoholic fermentation. In “**Wine Chemistry & Biochemistry**”, Moreno-Arribas M.V. and Carmen Polo M. Ed., Springer, ISBN: 978-0-387-74116-1.