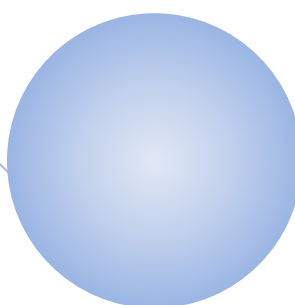




ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ MSN2 ΚΑΙ MSN4 ΣΤΗΝ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: καθηγ. ΒΑΜΒΑΚΑΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

A.M.: 2010059

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία διενεργήθηκε στα πλαίσια της εκπόνησης πτυχιακής εργασίας στο τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων του Ανώτατου Τεχνολογικού Ιδρύματος Πελοποννησου. Το θέμα της εργασίας που μου ανατέθηκε είναι ο ρόλος των παραγόντων *msn2* και *msn4* στην αλκοολική ζύμωση. Στην αρχή παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των μυκήτων και κυρίως του είδους *Saccharomyces cerevisiae*, που έχει ιδιαίτερος μελετηθεί από την επιστημονική κοινότητα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλκοολική ζύμωση. Εν συνεχεία αναφέρεται η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης και οι παράγοντες που προκαλούν στρες στους ζυμομύκητες. Όπως αναφέρεται στην παρούσα εργασία οι μεταγραφικοί παράγοντες *msn2* και *msn4* σχετίζονται με την ανταπόκριση των ζυμομυκήτων στις αιτίες του στρες. Εν κατακλείδι το συμπέρασμα είναι ότι η έρευνα για την βελτιστοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης πρέπει να στραφεί σε επίπεδο γενετικής ρύθμισης των ζυμομυκήτων και όχι σε προσπάθειες ελέγχου των παραγόντων στρες.

ABSTRACT

This thesis was conducted at the Department of Food Technology, of the Technological Educational Institute of Peloponnese. The content of this work is to present the catalytic role of *msn2* and *msn4* factors in alcoholic fermentation. In the beginning, we cite the general characteristics of fungi and especially the *Saccharomyces cerevisiae* strain which has been extensively studied for its significant role in alcoholic fermentation. Furthermore, we present the process of alcoholic fermentation while we refer to the factors that cause oxidative stress to yeast. Herein, we investigate the effect of *msn2* and *msn4* factors regarding the yeast's response during oxidative stress. Ultimately, we concluded that research must be focused on genetic level in order to fine-tune the aforementioned genes of yeast rather than trying to control the stress factors.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Βαμβακά Σωτήριο που με έκανε δεκτή στο εργαστήριο του και που μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα και με τη καθοδήγηση του με βοήθησε να ολοκληρώσω την διπλωματική μου εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ηθική συμπαράσταση κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	11
3. ΖΥΜΩΣΗ	14
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
3.2 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	15
3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΖΥΜΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΟΗΣ.....	18
4. ΜΥΚΗΤΕΣ.....	19
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
4.2 ΔΟΜΗ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	21
4.2.1 ΖΥΜΕΣ.....	23
4.3 ΘΡΕΨΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ.....	24
4.4 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ.....	25
5. ΖΥΜΕΣ ΠΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ.....	29
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	29
5.2 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ.....	32
5.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ.....	33

5.4 ΤΟ ΓΕΝΟΣ SACCHAROMYCES.....	34
5.4.1 ΤΟ ΕΙΔΟΣ S. CEREVISIAE.....	35
6. Η ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	36
7. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟΥΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ.....	41
7.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ.....	43
7.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΘΕΙΩΔΟΥΣ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ..	44
7.2.1 ΑΝΤΙΣΗΠΤΙΚΟ.....	44
7.2.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ.....	44
7.2.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΑΣΙΚΟ.....	45
7.2.4 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΡΩΜΑΤΟΣ.....	45
7.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΘΕΥΓΟΝΟΥ.....	46
7.4 CO ₂ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	47
7.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	48
7.5.1 pH.....	48
7.5.2 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ.....	48
7.6 Η ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ.....	48

7.7 ΓΕΝΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΣΤΡΕΣ.....	49
7.7.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ – ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΣΤΟ ΟΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	52
7.7.2 ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΟΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	53
8. Msn2 /Msn4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	54
9. ΠΩΣ ΔΡΟΥΝ ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ Msn2 / Msn4.....	56
9.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	56
9.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΣΤΡΕΣ.....	58
9.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	58
9.4 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	59
10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	60
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗΣ ΟΡΩΝ.....	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	63

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με τον όρο ζύμωση στη χημεία εννοείται η διαδικασία παραγωγής ενέργειας κατά την μετατροπή μίας ή περισσότερων οργανικών ενώσεων, όπως είναι οι υδατάνθρακες, σε ένα οξύ ή σε μία αλκοόλη. Ειδικότερα ο όρος ζύμωση αναφέρεται στη χρήση μιας ειδικής κατηγορίας μυκήτων, τους λεγόμενους ζυμομύκητες, για την μετατροπή ενός σακχάρου (υδατάνθρακα) σε αλκοόλη ή στη χρήση βακτηρίων για την παραγωγή γαλακτικού οξέος σε μερικά τρόφιμα. Κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες η ζύμωση πραγματοποιείται αυθόρμητα σε πολλές τροφές. Πρόκειται για μια διαδικασία που εδώ και χιλιάδες χρόνια οι άνθρωποι εκμεταλλεύτηκαν για την παραγωγή τροφίμων, όπως άρτου και αλκοολούχων ποτών. Υπάρχουν πολλοί τύποι ζύμωσης οι οποίοι διαφέρουν ως προς τα τελικά προϊόντα που σχηματίζονται. Οι δύο συνηθέστεροι τύποι ζυμώσεων είναι η αλκοολική και η γαλακτική ζύμωση.

Η αλκοολική ζύμωση είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο με πολλά ενδιάμεσα στάδια που μπορεί συνοπτικά να αποδοθεί με την χημική εξίσωση [3]:

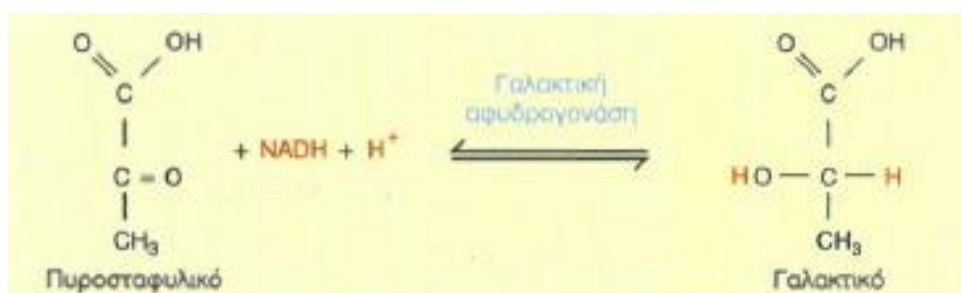


Πρόκειται δηλαδή για την αναερόβια διάσπαση από το ένζυμο ζυμάση απλών σακχάρων του τύπου $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη) προς αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα κυρίως. (Σε μικρότερα ποσά μπορούν να παραχθούν: γλυκερίνη, ακεταλδεύδη, ηλεκτρικό οξύ και ανώτερες αλκοόλες). Η ζυμάση είναι μίγμα πολλών ενζύμων και παράγεται από ζυμομύκητες ή σακχαρομύκητες του είδους *Sacharomyces cerevisiae*, κοινώς ζύμη ή μαγιά μύρας (Εικόνα 1). Η ζύμη, εκτός από το ένζυμο ζυμάση, περιέχει και τα ένζυμα ιμπερτάση και μαλτάση. Η ιμπερτάση καταλύει το δισακχαρίτη καλαμοσάκχαρο (ζάχαρη) προς ισομοριακό μίγμα γλυκόζης και φρουκτόζης.



Εικόνα 1: Χρήση της αλκοολικής ζύμωσης.

Κατά τη γαλακτική ζύμωση [3] σχηματίζεται γαλακτικό οξύ από τη ζύμωση των σακχάρων (Εικόνα 2). Οι μικροοργανισμοί που υπεισέρχονται στη γαλακτική ζύμωση είναι τα βακτήρια της ομάδας των γαλακτοβακίλλων (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*). Τα βακτήρια αυτά έχουν πολύ μικρές απαιτήσεις σε οξυγόνο. Οι κύριες μέθοδοι ελέγχου της ζύμωσης είναι η εξασφάλιση μικρής τάσης οξυγόνου, η προσθήκη αλατιού και σε ορισμένες περιπτώσεις η θερμοκρασία. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος αναφέρονται σε μια μεγάλη ομάδα ωφέλιμων βακτηρίων, τα οποία έχουν παρόμοιες ιδιότητες και παράγουν γαλακτικό οξύ ως το τελικό προϊόν της ζύμωσης. Είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση, ενώ βρίσκονται και στο πεπτικό μας σύστημα. Παρόλο που είναι γνωστά κυρίως για τον ρόλο τους στην παρασκευή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, χρησιμοποιούνται επίσης στην παρασκευή πίκλας λαχανικών, κρασιού, στο ψήσιμο και στην αλιπάσωση του ψαριού, του κρέατος και των λουκάνικων.



Εικόνα 2 : Μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ

Οι αερόβιοι οργανισμοί εκτίθενται στην τοξικότητα των οξειδωτικών ενώσεων του οξυγόνου (*ROS*) που παράγονται κατά την κυτταρική αναπνοή, την β – οξείδωση των λιπαρών οξέων, στην έκθεση σε ακτινοβολία, στα μέταλλα και σε ουσίες που παράγονται γενικότερα σε οξειδοαναγωγικούς κύκλους. Για να προστατευτούν εναντίον του οξειδωτικού στρες και να διατηρήσουν ισορροπία στην κυτταρική οξειδοαναγωγή, οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται στις οξειδοαναγωγικές διαταραχές. Σημαντικές αλλαγές συμβαίνουν κατά την έκφραση των γονιδίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης επηρεάζοντας περισσότερα από 2000 γονίδια καθώς οι ζύμες προσαρμόζονται στις αλλαγές των θρεπτικών συστατικών, του περιβάλλοντος και άλλων παραγόντων στρες. Γονίδια πολλών βιοχημικών οδών ρυθμίζονται με ένα εξαιρετικά συντονισμένο τρόπο και γονίδια που έχουν σημαντικές θέσεις στις μεταβολικές πορείες εκφράζονται έντονα. Η έκθεση σε πολλά είδη στρες, συμπεριλαμβάνοντας την έλλειψη θρεπτικών συστατικών και την αιθανόλη προκαλεί αύξηση στην μοναδική ανταπόκριση στο στρες όπου συμμετέχουν εκατοντάδες γονίδια κωδικοποιώντας πρωτεΐνες όπου συμμετέχουν σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες με άγνωστους μηχανισμούς.

Οι *Msn2/Msn4* είναι παράγοντες που σχετίζονται με την ανταπόκριση στο στρες καθώς προσδένονται στην αλληλουχία *CCCT* και ενεργοποιούν γονίδια τα οποία εμπεριέχουν τον παράγοντα ανταπόκρισης στο στρες, που ονομάζεται *STRE* (*stress response element*), έτσι ώστε να αποκριθούν στα διάφορα περιβαλλοντικά και μεταβολικά ερεθίσματα όπως η θέρμανση, η όσμωση και η οξύτητα. Οι πορείες των *Msn2/Msn4* δεν έχουν πλήρως χαρακτηριστεί, εκτός από αυτή που αφορά τα επίπεδα της οσμωτικής πίεσης τα οποία περιλαμβάνουν την βιοχημική πορεία της *HOG1* κινάσης.

2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Με βάση τα απολιθώματα αποδεικνύεται η εμφάνιση των μυκήτων πριν από 900-750 εκατομμύρια χρόνια (Προτεροζωϊκός αιώνας), ενώ απολιθωμένες υφές που προκαλούσαν από ότι φαίνεται σήψη του ξύλου καθώς και απολιθώματα χυτρίδιομυκήτων εμφανίστηκαν πριν από 400 εκατομμύρια χρόνια (Δεβόνιος περίοδος). Οι μύκητες είναι γνωστοί στον άνθρωπο από αρχαιοτάτων χρόνων. Οι Αιγύπτιοι τους θεωρούσαν ως δώρο του θεού Όσιρις στην ανθρωπότητα, ενώ οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι παρασκεύαζαν άφθονο οίνο για να γιορτάσουν.

Αποτελούν τη δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα οργανισμών στη βίωση, μετά από τα έντομα, ενώ μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί μόνο 80.000 με 120.000 είδη μυκήτων (εκ των οποίων μόνο τα 200 έχουν προσδιοριστεί ως παθογόνα), από τα 1,5 εκατομμύρια είδη που εκτιμάται ότι υπάρχουν. Από αυτά, τα 16.000 αντιπροσωπεύουν μακρομύκητες, τα 2000 εκ των οποίων είναι εδώδιμα μανιτάρια και πολύ λιγότερα (30–40) είναι αυτά που καλλιεργούνται για διατροφικούς και βιομηχανικούς σκοπούς. Αυτό καθιστά τους μύκητες μία από τις λιγότερο εξερευνημένες πηγές βιοποικιλότητας στον πλανήτη, καθώς είναι γνωστό ένα ποσοστό μικρότερο του 5%. Οι μύκητες παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, τόσο επιστημονικό όσο και πρακτικό. Από επιστημονικής πλευράς, η πολύ γρήγορη ανάπτυξή τους καθώς και οι μεγάλες ποσότητες στις οποίες μπορούν να παραχθούν, εφόσον χρειαστεί, τους καθιστούν πολύ σημαντικά εργαλεία για θεμελιώδεις βιολογικές ανακαλύψεις. Επίσης αποτελούν εργαλεία – μοντέλα για τη μελέτη της δομής και της λειτουργίας των γονιδίων. Με την ολοκλήρωση της αλληλούχησης του γονιδιώματος της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, το 1996, οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι ανάμεσα στα ζώα και στους μύκητες εκτός από αρκετά γονίδια υπάρχουν και πολλές κοινές κυτταρικές λειτουργίες.

Οι ζύμες συγκέντρωσαν την προσοχή του επιστημονικού κόσμου πριν από 200 περίπου χρόνια, όταν ανακαλύφθηκε το σύνθετο μικροσκόπιο και εξελίχθηκε σε ιδιαίτερη επιστήμη η μελέτη των ζυμών και των μικροβίων γενικότερα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το ενδιαφέρον της επιστήμης και της έρευνας για τις ζύμες παραμένει αμείωτο και με την πάροδο του χρόνου απλώνεται συνεχώς σε νέα πεδία. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι, ενώ η μελέτη των ζυμών στα πλαίσια της Μικροβιολογίας απασχόλησε τον άνθρωπο πριν από πολλά χρόνια, η Ζυμολογία, ως ιδιαίτερος επιστημονικός κλάδος διαμορφώθηκε κατά τα τελευταία χρόνια και έχει

σημειώσει αλματώδη εξέλιξη. Αυτό οφείλεται αφενός στην ιδιομορφία των ζυμών ως μικροοργανισμών και αφετέρου στην ιδιαίτερη σημασία την οποία οι ζύμες συγκεντρώνουν για την επιστήμη και τον άνθρωπο γενικότερα.

Οι τυπικές ή ευγενείς ζύμες έχουν την ικανότητα να διασπούν τα απλά σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη κ.τ.λ.) προς διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και αλκοόλη (C_2H_6) υπό έκλυση μικρών ποσοτήτων θερμότητας. Μάλιστα το διοξείδιο του άνθρακα εμφανίζεται υπό μορφή φυσαλίδων, που είναι ανάλογες με τις σχηματιζόμενες κατά το βρασμό του νερού, η δε εκλυόμενη θερμότητα απορροφάται από το ζυμούμενο ζαχαρούχο υγρό με αποτέλεσμα να ανεβάζει τη θερμοκρασία του. Για τους ανωτέρω λόγους η ζύμωση του οινογλεύκου (μούστου), του βυνογλεύκου και άλλων σακχαρούχων υποστρωμάτων, ονομάζεται βρασμός.

Το αίτιο της ζυμώσεως, δηλαδή τα κύτταρα της ζύμης, γνώρισε και μελέτησε για πρώτη φορά ο Antony Leeuwenhoek,[2] το 1680, τα οποία ονόμασε «ζωάρια» (κατά πάσα πιθανότητα ήταν το γένος *Saccharomyces*). Ο Antony Leeuwenhoek [2] παρουσίασε στη Βασιλική εταιρία του Λονδίνου τις πρώτες παρατηρήσεις του επί των ζυμών, που όμως δεν έτυχαν της δέουσας προσοχής από τους επιστήμονες εκείνης της εποχής. Χρειάστηκαν να περάσουν άλλα 150 χρόνια, μετά την ανακάλυψη των ζυμών, για να αναληφθεί εκ νέου μελέτη και έρευνα επί τη σημασία τους. Τον 19^ο αιώνα υπήρξε έντονη διαμάχη μεταξύ εκείνων που υποστήριζαν ότι οι ζύμες λόγω των συνεχών μετασχηματισμών τους βρίσκονται σε διηλεκτική κίνηση την οποία μεταδίδουν στα μόρια του σακχάρου, τα οποία ως ασταθή διασπώνται λόγω μηχανικής ενέργειας που δέχονται από τα κύτταρα της ζύμης (Μηχανιστική Θεωρία) και εκείνων που υποστήριζαν τη βιταλιστική θεωρία των ζυμώσεων κατά την οποία οι ζύμες χρησιμοποιούν τα σάκχαρα ως υπόστρωμα και αποβάλλουν αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Τελικά το 1864 χάρις στα κλασσικά πειράματα του Παστέρ διαψεύστηκε πλήρως η μηχανιστική θεωρία των ζυμώσεων και επικράτησε η βιταλιστική. Κατά τον Παστέρ [2] οι ζύμες δεν ήταν το αποτέλεσμα των ζυμώσεων αλλά το αίτιο. Αργότερα, το 1897, αποδείχθηκε από τον Edward Büchner [2] ότι τα περιεχόμενα σε αυτά ένζυμα (το σύνολο των οποίων ονομάστηκε ζυμάση) ήταν υπεύθυνα για την αλκοολική ζύμωση. Η άποψη όμως αυτή δεν ήταν τελείως ορθή, γιατί τα κύτταρα της ζύμης δεν εκκρίνουν μόνο τα απαραίτητα για την ομαλή πορεία της ζυμώσεως ένζυμα, αλλά αναλίσκουν και μέρος των σακχάρων για αύξηση και πολλαπλασιασμό. Κατά συνέπεια ο ρόλος τους στη ζύμωση είναι ενεργητικός και όχι παθητικός.

Την ίδια περίοδο με τον Παστέρ, ο Exleben [2] διατύπωσε την άποψη ότι τα κύτταρα των ζυμών είναι ζωντανοί φυτικοί οργανισμοί, υπεύθυνοι για την αλκοολική ζύμωση. Νέο ενδιαφέρον εκδηλώθηκε από τους Cagniard de la Tour [2] στη Γαλλία το 1835 και Schwann [2] και Kützing [2] στη Γερμανία το 1837, σχετικά με τη μορφολογία των ζυμών. Διαπίστωσαν αγενή πολλαπλασιασμό διαμέσου εκβλαστήσεως. Μάλιστα ο Schwann [2] το 1839 διαπίστωσε σχηματισμό ασκοπορίων μέσα στο κύτταρο. Αργότερα ο De Bary [2] συνέκρινε τα ασκοπόρια των σποριογόνων ζυμών με τα ασκοπόρια των τυπικών Ασκομυκήτων. Προς την ίδια κατεύθυνση εργάστηκε και ο Reess, [2] ο οποίος εισήγαγε τους όρους «ασκός», «ασκομύκητας» και «σακχαρομύκητας». Ο τελευταίος όρος υιοθετήθηκε ως όνομα του γένους για όλες τις ζύμες που πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση. Ο Stelling – Dekker [2] δημοσίευσε εμπειριστατωμένη κλείδα ταξινομήσεως των σπορογόνων ζυμών και στη συνέχεια ο Lodder και ο Diddens [2] το 1941 δημοσίευσαν δύο κλείδες ταξινομήσεως των ασποριογόνων (ατελών) ζυμών. Με τη δημοσίευση των άνω τριών κλείδων ταξινομήσεως τέθηκε μια τάξη στο χάος που επικρατούσε στον τομέα της Ζυμολογίας.

3. ΖΥΜΩΣΗ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

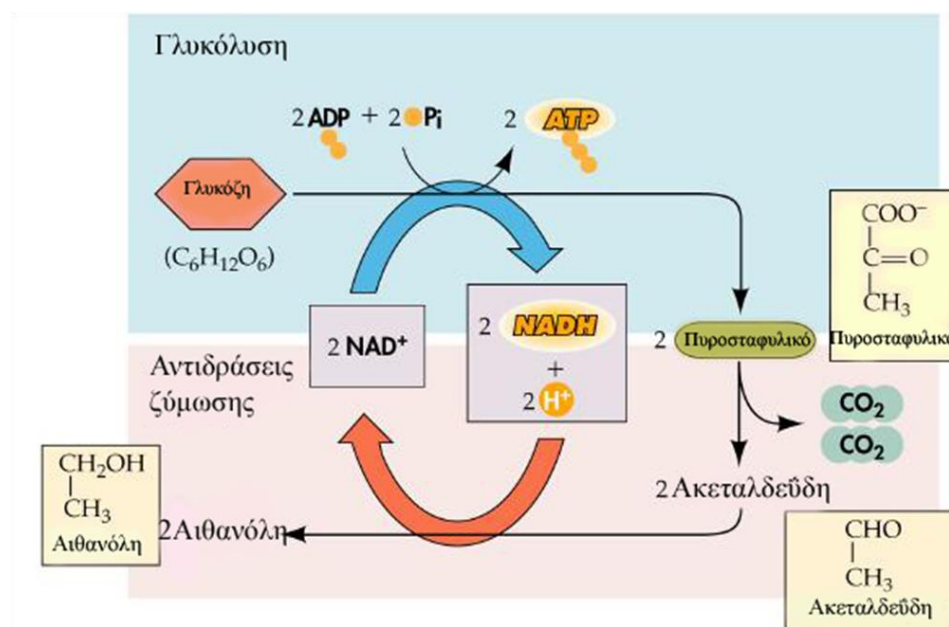
Η ζύμωση είναι ένας τρόπος αξιοποίησης της χημικής ενέργειας στον οποίο δεν χρειάζεται ούτε οξυγόνο ούτε αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στον μηχανισμό αυτό, με άλλα λόγια, δεν διενεργείται καθόλου κυτταρική αναπνοή. Εδώ χρειάζεται να θυμηθούμε ότι οξείδωση είναι ουσιαστικά η απώλεια και η μεταβίβαση ηλεκτρονίων σε κάποιο δέκτη που όμως δεν απαιτείται να είναι υποχρεωτικά το οξυγόνο. Η γλυκόλυση οξειδώνει τη γλυκόζη προς δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος, χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό παράγοντα το NAD^+ (*Nicotinamide adenine dinucleotide*) χωρίς την ανάμιξη οξυγόνου και αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Συνολικά, η γλυκόλυση είναι μια εξώεργη διεργασία όπου ένα τμήμα της απελευθερούμενης ενέργειας χρησιμοποιείται για την καθαρή παραγωγή δύο μορίων ATP (*Adenosine triphosphate*) με φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Στην περίπτωση που υπάρχει οξυγόνο, το $NADH$ μπορεί να μεταφέρει τα ηλεκτρόνια της γλυκόζης στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων επιτρέποντας έτσι την παραγωγή πρόσθετου ATP . Ωστόσο, η γλυκόλυση έχει παράγει δύο μόρια ATP είτε υπάρχει οξυγόνο είτε δεν υπάρχει, δηλαδή τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες [1].

Η ζύμωση αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο οξείδωσης των τροφών οργανικής προέλευσης, στον οποίο παρατείνεται η λειτουργία της γλυκόλυσης, επιτρέποντας τη συνεχή παραγωγή ATP με φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Προκειμένου να συμβεί αυτό, θα πρέπει να υπάρχει επάρκεια σε NAD^+ , έτσι ώστε να έχουμε ένα μόριο υποδοχής των ηλεκτρονίων που παράγονται στο οξειδωτικό στάδιο της γλυκόλυσης. Χωρίς κάποιον μηχανισμό ανακύκλωσης του NAD^+ από το $NADH$, η γλυκόλυση σύντομα θα εξαντλούσε τα αποθέματα του κυττάρου σε NAD^+ , καθώς όλα τα NAD^+ θα ανάγονταν σε $NADH$, γεγονός που θα διέκοπτε τη γλυκόλυση λόγω έλλειψης οξειδωτικού παράγοντα. Όταν επικρατούν αερόβιες συνθήκες, το NAD^+ μπορεί να ανακυκλωθεί στο $NADH$ μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Όταν όμως επικρατούν αναερόβιες συνθήκες (δηλαδή έλλειψη οξυγόνου), τότε μια εναλλακτική λύση είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων από $NADH$ στο πυροσταφυλικό, τελικό προϊόν της γλυκόλυσης. Η ζύμωση περιλαμβάνει τη γλυκόλυση και διάφορες αντιδράσεις αναγέννησης του NAD^+ , με τις οποίες τα

ηλεκτρόνια του *NADH* μεταφέρονται στο πυροσταφυλικό ή σε κάποιο παράγωγό του. Το αναγεννημένο *NAD*⁺ μπορεί κατόπιν να χρησιμοποιηθεί εκ νέου στη γλυκόλυση για την οξείδωση σακχάρων, απ' όπου αποδίδονται εκ νέου δύο μόρια *ATP* με φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος [1].

3.2 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Στην αλκοολική ζύμωση το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε αιθανολική αλκοόλη (αιθανόλη) μέσω δύο βημάτων. Στο πρώτο βήμα, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε ακεταλδεΐδη (αιθανάλη) με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός μορίου διοξειδίου του άνθρακα. Στο δεύτερο βήμα, η ακεταλδεΐδη ανάγεται προς αιθανόλη με τη μεσολάβηση του $NADH$. Αυτό το βήμα αναγεννά τα αποθέματα του NAD^+ που είναι απαραίτητα για να συνεχιστεί η γλυκόλυση. Αλκοολική ζύμωση συναντάμε σε πολλά βακτήρια που ζουν υπό αναερόβιες συνθήκες, αλλά και στον κοινό σακχαρομύκητα (τη μαγιά της μύρας) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Απουσία οξυγόνου, πολλά κύτταρα χρησιμοποιούν τη διαδικασία της ζύμωσης για να παράγουν ATP με φωσφορλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Το πυροσταφυλικό, τελικό προϊόν της γλυκόλυσης, λειτουργεί ως δέκτης ηλεκτρονίων για την επανοξείδωση του $NADH$ προς NAD^+ , που μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκ νέου στη γλυκόλυση. Εδώ ως τελικό προϊόν έχουμε την αιθανόλη.

Οι κυριότερες εφαρμογές της αλκοολικής ζύμωσης είναι:

α. *Παραγωγή Κρασιού:* Σαν υπόστρωμα της αλκοολικής ζύμωσης χρησιμοποιείται ο χυμός σταφυλιού. Η πλήρης ζύμωση των σακχάρων οδηγεί στην παραγωγή ξηρών οίνων, ενώ αντίθετα η μη πλήρης ζύμωση σε γλυκούς και ημίγλυκους οίνους.

β. *Παραγωγή Μπίρας:* Το υπόστρωμα στην περίπτωση αυτή είναι ένα διάλυμα σακχάρων τα οποία προέρχονται από υδρόλυση του αμύλου του κριθαριού και

άλλων δημητριακών. Η υδρόλυση γίνεται με ένζυμα που παραλαμβάνονται από το φύτρο του κριθαριού (βύνη).

γ. *Παραγωγή Αλκοολούχων ποτών*: Η διαδικασία είναι παραπλήσια, αλλά ακολουθεί η απόσταξη της αλκοόλης. Για κάθε προϊόν χρησιμοποιούνται διαφορετικές πηγές αμύλου.

3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΖΥΜΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΕΡΟΒΙΑΣ

ΑΝΑΠΝΟΗΣ

Η ζύμωση και η κυτταρική αναπνοή είναι οι δύο τρόποι που έχουν στη διάθεσή τους τα κυρίως οι ζυμομόκητες για την αερόβια και αναερόβια παραγωγή *ATP*, αντίστοιχα, από τη χημική ενέργεια των τροφών. Και οι δύο οδοί χρησιμοποιούν την γλυκόλυση για να οξειδώσουν τη γλυκόζη και άλλα οργανικά μόρια προς πυροσταφυλικό οξύ με καθαρό κέρδος δύο μόρια *ATP* (μέσω φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος). Επίσης, τόσο στη ζύμωση όσο και στην αναπνοή, οξειδωτικός παράγοντας που δέχεται κατά τη γλυκόλυση τα ηλεκτρόνια από τα μόρια των τροφών είναι το NAD^+ . Το σημείο στο οποίο οι δύο αυτές οδοί διαφέρουν καθοριστικά είναι οι διαφορετικοί μηχανισμοί οξείδωσης του $NADH^+$, προκειμένου να αναγεννηθεί το NAD^+ που απαιτείται για να συνεχιστεί η γλυκόλυση. Στην αναερόβια ζύμωση δέκτης ηλεκτρονίων είναι ένα οργανικό μόριο, όπως η ακεταλδεΐδη στην αλκοολική ζύμωση. Στην αερόβια αναπνοή, αντίθετα, ο τελικός δέκτης των ηλεκτρονίων του $NADH$ είναι το οξυγόνο. Αυτή η διαδικασία όχι μόνο αναγεννά το NAD^+ που απαιτείται για τη γλυκόλυση, αλλά επιπλέον παράγει μια πρόσθετη ποσότητα *ATP* λόγω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που ενεργοποιείται από τη σταδιακή μεταβίβαση των ηλεκτρονίων του $NADH$ στο οξυγόνο. Ακόμα μεγαλύτερη απόδοση σε *ATP*, έχουμε με την οξείδωση του πυροσταφυλικού στον κύκλο του κιτρικού οξέος, που χαρακτηρίζει αποκλειστικά την αναπνοή. Χωρίς το οξυγόνο, η ενέργεια που το πυροσταφυλικό διατηρεί αποθηκευμένο στο μόριο του δεν μπορεί να δοθεί για εκμετάλλευση στο κύτταρο. Έτσι η κυτταρική αναπνοή δρέπει συγκριτικά με τη ζύμωση, για την ακρίβεια η αναπνοή αποδίδει σχεδόν 19 φορές περισσότερο *ATP* ανά μόριο γλυκόζης σε σχέση με τη ζύμωση (η αναπνοή δίνει 38 μόρια *ATP* ανά μόριο γλυκόζης σε σχέση με τα 2 μόρια *ATP* που παράγονται μέσω της ζύμωσης από τη φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος).[3]

4. ΜΥΚΗΤΕΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μύκητες ανήκουν στον κλάδο των ευκαρυωτικών οργανισμών ως ξεχωριστό βασίλειο. Οι μικροβιολόγοι χρησιμοποιούν τον όρο *fungus* (που στη λατινική γλώσσα σημαίνει μανιτάρι), που περιλαμβάνει ευκαρυωτικούς σποριογόνους οργανισμούς χωρίς χλωροφύλλη με απορροφούσα θρέψη και φυλετική και αφυλετική αναπαραγωγή.

Οι μύκητες είναι κυρίως εδαφικοί μικροοργανισμοί αν και υπάρχουν μερικοί των θαλασσινών και γλυκών νερών. Πολλοί είναι φυτοπαθογόνοι και άλλοι μολύνουν τα ζώα. Χωρίζονται σε παρασιτικούς (λοιμογόνους) και σαπροφυτικούς (μη παθογόνους, που όμως μπορεί να έχουν εφαρμογές σε παρασκευή κρασιού, ψωμιού κ.α.).

Οι μύκητες δύναται να παράγουν αντιβιοτικά. Το πρώτο αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε ήταν η πενικιλίνη από τον Fleming η οποία προέρχεται από ένα είδος *Penicillium* (υφομύκητα). Υπάρχουν τέλος μύκητες τοξινογόνοι των οποίων οι τοξίνες προκαλούν μεγάλες ζημιές στα ζώα αλλά ίσως και στον άνθρωπο.

Οι μακρομύκητες (Εικόνα 4) είναι τα μανιτάρια (βασιδιομύκητες) που πολλοί είναι εδώδιμοι αλλά και πολλοί είναι δηλητηριώδεις για τον άνθρωπο (π.χ του γένους *Amanita*).

Οι μικρομύκητες (Εικόνα 5) είναι οι μυκηλιακοί μύκητες που παράγουν υφές και οι βλαστομύκητες ή οι ζύμες. Επίσης υπάρχουν οι δίμορφοι μύκητες που έχουν τα χαρακτηριστικά τόσο των μυκηλιακών όσο και των βλαστομυκήτων.

Παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον για τον άνθρωπο γιατί είναι επωφελείς με πάρα πολλούς τρόπους. Αποικοδομούν πολύπλοκα οργανικά υλικά του περιβάλλοντος, κυρίως νεκρή ύλη, τα οποία καθιστούν κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν από τους άλλους οργανισμούς στη συνέχεια. Επίσης οι μύκητες και κυρίως οι ζύμες είναι σημαντικοί για τις βιομηχανικές διαδικασίες που εμπλέκουν πολύπλοκες ζυμώσεις, για παράδειγμα στην αρτοποιεία, στην οινοποιεία και στη ζυθοποιεία. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία τυριών, της σάλτσας από σόγια, της εμπορικής παραγωγής των οξέων, όπως κιτρικό και γαλλικό οξύ και κυρίως φαρμάκων όπως η εργομετίνη και η κορτιζόνη. Είναι παραγωγείς επίσης αρκετών αντιβιοτικών, όπως η πενικιλίνη, η γρισεοφουλβίνη και το ανοσοκατασταλτικό φάρμακο κυκλοσπορίνη.

Οι μύκητες βάσει του τρόπου αναπαραγωγής και των μορφολογικών τους γνωρισμάτων διακρίνονται σε [2]:

- Μυξομύκητες: κατώτεροι μύκητες (παράσιτα σε φυτά)
- Φυκομύκητες: νηματοειδής μύκητες, χωρίς εγκάρσια τοιχώματα (σαπρόφυτα ή παράσιτα)
- Ασκομύκητες: φέρουν εγκάρσια τοιχώματα, χαρακτηρίζονται από την παρουσία σπορίων εντός ασκών (ασκοπόρια)
- Βασιδιομύκητες: χαρακτηρίζονται από την παρουσία σπορίων φερόμενων επί βασιδίων (μικροσκοπικών εκφύσεων)
- Ατελείς μύκητες: χαρακτηρίζονται από έλλειψη σταδίου εγγενούς αναπαραγωγής.

Τέλος οι μύκητες είναι σημαντικά επιστημονικά εργαλεία για τη μελέτη των μεταβολικών λειτουργιών. Οι κυτταρολόγοι, οι γενετιστές, οι βιοχημικοί, οι βιοφυσικοί και οι μικροβιολόγοι χρησιμοποιούν τους μύκητες στην έρευνα τους.



Εικόνα 4: Μακρομύκητας

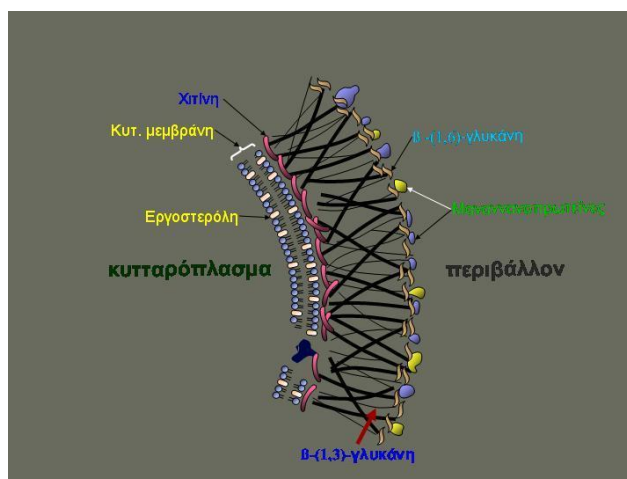


Εικόνα 5: Μικρομύκητας

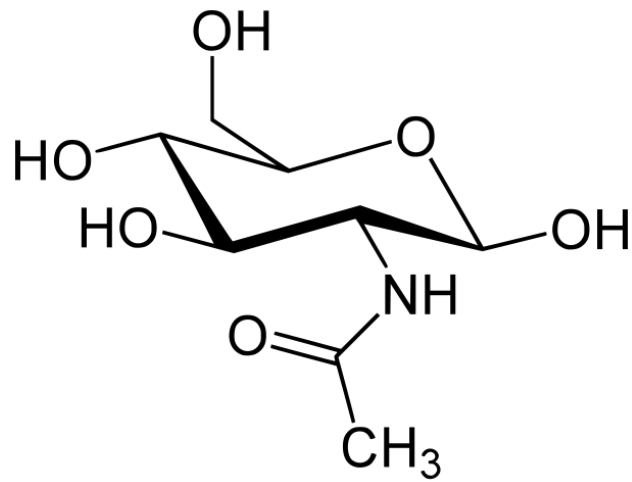
4.2 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Το σώμα ή η βλαστική δομή των μυκήτων καλείται θάλλος και ποικίλει σε μέγεθος (από ένα απλό κύτταρο μιας ζύμης μέχρι ένα πολυκύτταρο μύκητα) (Εικόνα 8). Η χημική σύσταση του κυττάρου ποικίλει ανάλογα με την σύσταση του περιβάλλοντος. Η παρουσία λιπών, υδατανθράκων, αζωτούχων ενώσεων στο κυτταρόπλασμα του μύκητα καθώς και τα συστατικά του κυτταρικού του τοιχώματος εξαρτώνται σε μεγάλο ποσοστό από την σύνθεση του υποστρώματος στο οποίο βρίσκονται και αναπτύσσονται οι μύκητες.

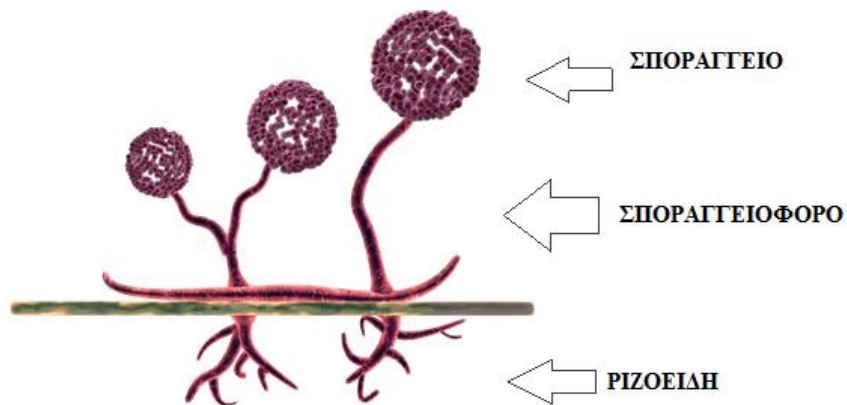
Ως προς την χημική σύνθεση μια μεγάλη διαφορά μεταξύ μυκήτων και βακτηρίων είναι η παρουσία μεγάλης ποσότητας χιτίνης στο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων. Το μυκητιακό κύτταρο συνήθως περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα χιτίνης (Εικόνα 6). Η χιτίνη είναι ένας δυνατός αλλά ευέλικτος πολυσακχαρίτης που αποτελείται από κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης (Εικόνα 7). Μια άλλη διαφορά τους είναι η μεγαλύτερη ποσότητα λιποειδών στους μύκητες με μόνη εξαίρεση τα μυκοβακτηρίδια.



Εικόνα 6: Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από δύο επίπεδα. Περιέχει φωσφολιπίδια και στερόλες (εργοστερόλη, ζυμοστερόλη). Συμβάλλει στην προστασία του κυτταροπλάσματος, την οσμωτική ρύθμιση και διευκολύνει τη σύνθεση του ελύτρου και του κυτταρικού τοιχώματος.



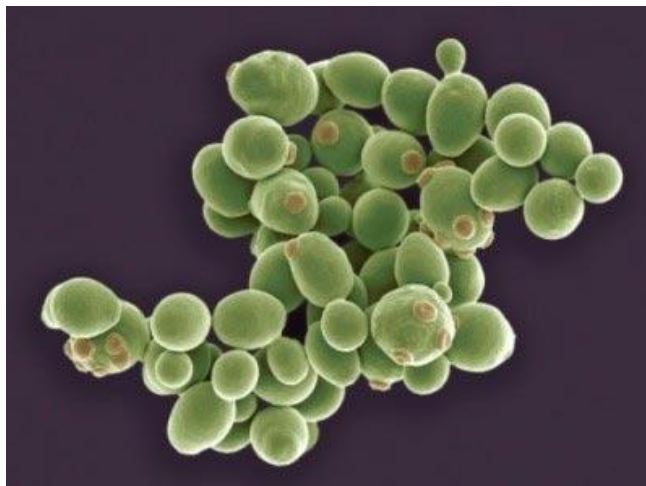
Εικόνα 7: Δομή της Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης



Εικόνα 8: Γενική δομή μυκήτων, το σποράγγειο είναι το σώμα που παράγει σπόρια, το σποραγγειοφόρο είναι νηματοειδής μίσχος στην οποία σχηματίζεται το σποράγγειο, ριζοειδή είναι οι υποκείμενες υφές που εξειδικεύονται στην απορρόφηση ουσιών.

4.2.1 ΖΥΜΕΣ

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι μύκητες με απλό πυρήνα οι οποίοι αναπαράγονται αφυλετικά ή εκβλαστάνοντας καθώς και με εγκάρσια διαίρεση ή φυλετικά μέσω σχηματισμού σπορίων. Συνήθως τα κύτταρα των ζυμών είναι μεγαλύτερα των βακτηρίων σε μέγεθος και είναι είτε σφαιρικά είτε ωοειδή. Δε φέρουν μαστίγια αλλά περιέχουν ευκαρυωτικά οργανίδια. Ένα κύτταρο ζύμης μπορεί να παράγει μέχρι και 24 θυγατρικά κύτταρα εκβλαστάνοντας. Μερικές ζύμες παράγουν εκβλαστήσεις οι οποίες αποτυγχάνουν να αποχωριστούν από το αρχικό σώμα και δημιουργούν μια αλυσίδα κυττάρων που καλείται ψευδομυκήλιο. Οι ζύμες πάνω σε στερεοποιημένο θρεπτικό άγαρ αναπτύσσουν αποικίες παρόμοιες με εκείνες των βακτηρίων (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι οργανισμοί. Μακροσκοπικά σχηματίζουν λείες αποικίες που μοιάζουν με αυτές των βακτηρίων. Μικροσκοπικά παρατηρούνται οβάλ ή σφαιρικά.

4.3 ΘΡΕΨΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΜΥΚΗΤΩΝ

Οι μύκητες αυξάνονται κυρίως στο σκοτάδι, σε υγρά περιβάλλοντα πλούσια σε οργανικό υλικό. Οι περισσότεροι είναι σαπροφυτικοί (αποκτούν τα θρεπτικά συστατικά από τη νεκρή ύλη). Εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα τα οποία πέπτουν τα υποστρώματα του περιβάλλοντος τα οποία στη συνέχεια απορροφά ο μύκητας υπό μορφή διαλύματος. Είναι χημειοοργανότροφοι και χρησιμοποιούν οργανικά υλικά σαν πηγή άνθρακα, ηλεκτρονίων και ενέργειας. Το γλυκογόνο είναι το πρωταρχικό αποταμιευτικό υλικό των μυκήτων. Χρησιμοποιούν υδατάνθρακες (κατά προτίμηση γλυκόζη και μαλτόζη) και αζωτούχες ουσίες για να συνθέσουν τα αμινοξέα και τις πρωτεΐνες τους. Συνήθως είναι αερόβιοι αλλά υπάρχουν και μερικές ζύμες που είναι δυνητικά αναερόβιοι οργανισμοί και αποκτούν την ενέργεια που χρειάζονται μέσω των ζυμώνσεων. Αποκλειστικά αναερόβιοι μύκητες έχουν βρεθεί στο στομάχι κάποιων μηρυκαστικών. Οι μύκητες αυξάνονται καλύτερα σ' ένα περιβάλλον με pH = 5 το οποίο είναι ιδιαίτερα όξινο για τα κοινά βακτήρια.

Προτιμούν να αυξάνονται πάνω σ' επιφάνειες παρά μέσα στα υποστρώματα. Είναι ανθεκτικότεροι οργανισμοί των βακτηρίων στην οσμωτική πίεση και άρα είναι ικανοί να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και αλάτων. Απαιτούν επίσης μικρότερες ποσότητες αζώτου από τα βακτήρια για την ίδια παραγωγή βιομάζας.

4.4 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Η αναπαραγωγή των μυκήτων είναι φυλετική ή αφυλετική. Η αφυλετική αναπαραγωγή γίνεται με τους εξής τρόπους:

- I. Ένα γονικό κύτταρο διαιρείται σε δύο θυγατρικά
- II. Βλαστικά κύτταρα εκβλαστάνουν δημιουργώντας νέους οργανισμούς

Η φυλετική αναπαραγωγή είναι η αναπαραγωγή σπορίων διαμέσου της μίτωσης κατά την οποία στη συνέχεια ακολουθεί κυτταρική διαίρεση. Υπάρχουν πολλοί τύποι φυλετικών σπορίων:

I. Οι υφές τεμαχίζονται και σχηματίζουν κύτταρα που συμπεριφέρονται ως σπόρια. Αυτά καλούνται αθροκονίδια ή αρθροσπόρια (Εικόνα 10, 11, 12, 13)

II. Τα κύτταρα περιβάλλονται από ένα παχύ τοίχωμα πριν το διαχωρισμό και καλούνται γλαμυδοσπόρια (Εικόνα 11, 12, 13)

III. Τα σπόρια αναπτύσσονται εντός ενός σάκου που καλείται σποριοαγγαιοφορέας (Εικόνα 11, 12, 13)

IV. Αντίστοιχη περίπτωση με της III είναι εκείνη των κονιδιοσπορίων (Εικόνα 11, 12, 13)

V. Τα σπόρια παράγονται από το βλαστικό μητρικό κύτταρο με εκβλάστηση και καλούνται βλαστοπόρια (Εικόνα 11, 12, 13)

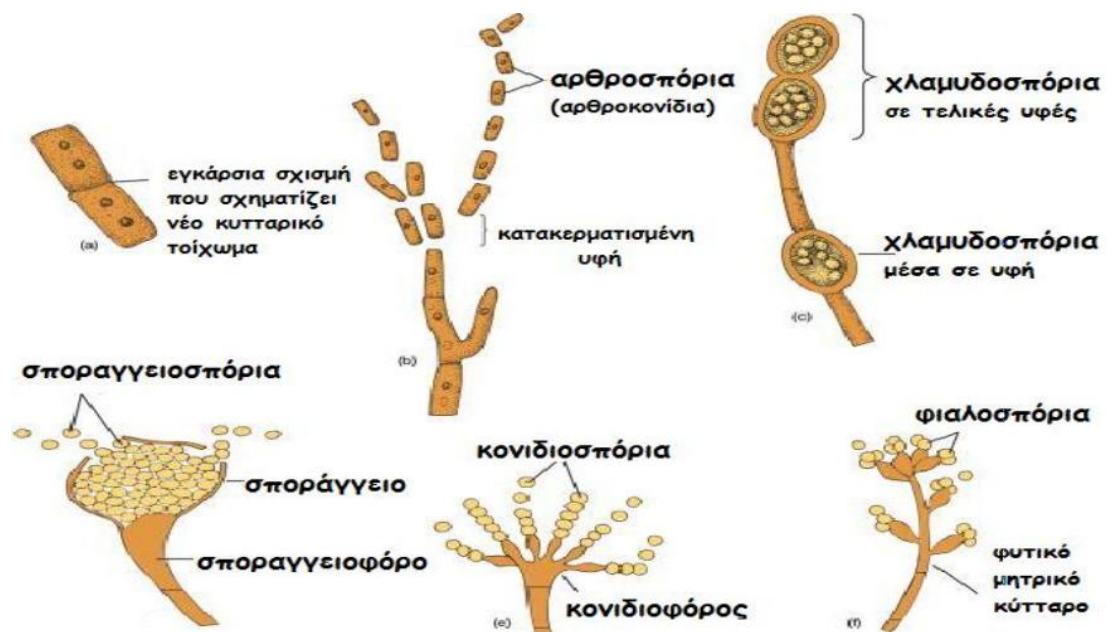
Η φυλετική αναπαραγωγή μυκήτων εμπλέκει την ένωση συμβατών πυρήνων. Μερικοί μύκητες αυτοαναπαράγουν φυλετικά γαμέτες στο ίδιο μυκήλιο ενώ άλλα είδη απαιτούν διασταύρωση μεταξύ διαφορετικών φυλετικών μυκηλίων. Φυλετική σύντηξη μπορεί να συμβεί ανάμεσα σε απλοειδείς γαμέτες ή υφές. Μερικές φορές το κυτόπλασμα του απλοειδούς πυρήνα συντήκεται για την παραγωγή διπλοειδούς ζυγώτη. Συνήθως υπάρχει καθυστέρηση μεταξύ της κυτοπλασματικής και της πυρηνικής σύντηξης. Αποτέλεσμα είναι ένα δικαρυωτικό στάδιο κατά το οποίο τα κύτταρα περιέχουν δύο ξεχωριστούς απλοειδούς πυρήνες. Η φυλετική αναπαραγωγή μπορεί επίσης να δημιουργήσει σπόρια (Εικόνα 14).

Μερικές φορές αναπτύσσουν ένα ζυγοσπόριο (ζυγομύκητας), ασκοπόριο (ασκομύκητας), ή βασιδιοσπόριο (βασιδιομύκητας). Τα σπόρια είναι σημαντικά για τους μύκητες. Το μέγεθος, το χρώμα, το σχήμα και ο αριθμός είναι χρήσιμα για την αναγνώριση των μυκητιακών ειδών. Συνήθως τα σπόρια είναι μικρά και ελαφριά και μπορούν να αιωρούνται στον αέρα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Αυτό εξηγεί τη μεγάλη διασπορά των μυκήτων στο περιβάλλον. Τα σπόρια των μυκήτων συχνά

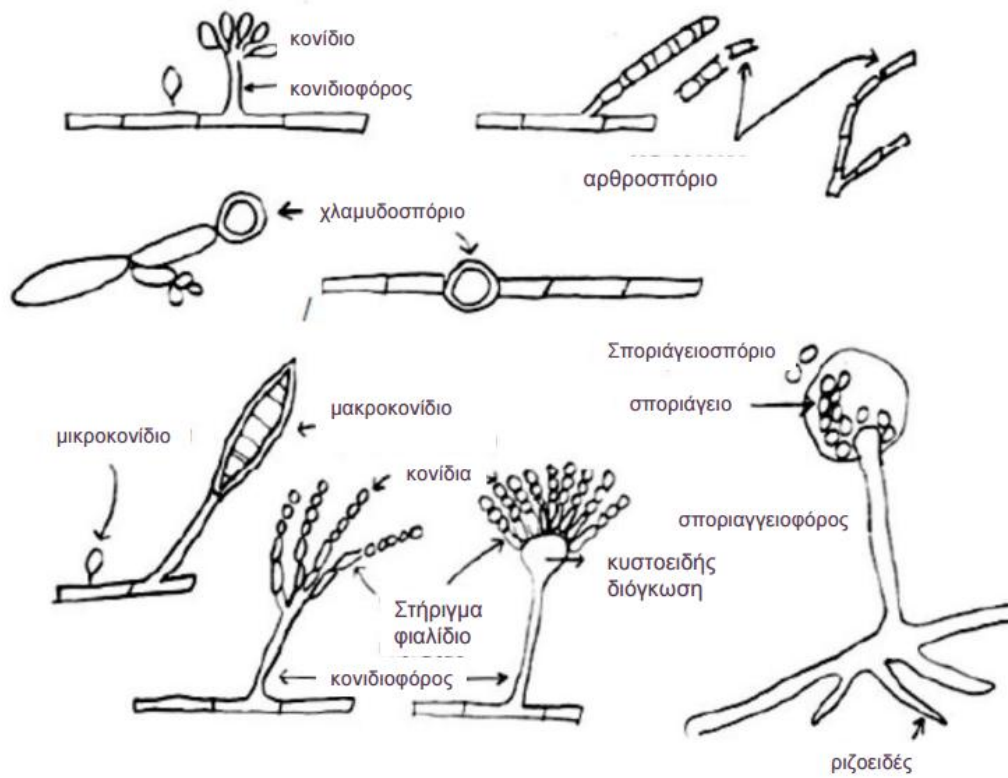
διασπείρονται μέσω του σώματος των πτηνών και άλλων ζώων. Τα λαμπερά χρώματα και η χνουδωτή υφή των αποικιών οφείλεται στις αέριες υφές και γι' αυτό η ταξινόμηση τους έχει ως πρότυπο αυτά τα χαρακτηριστικά.



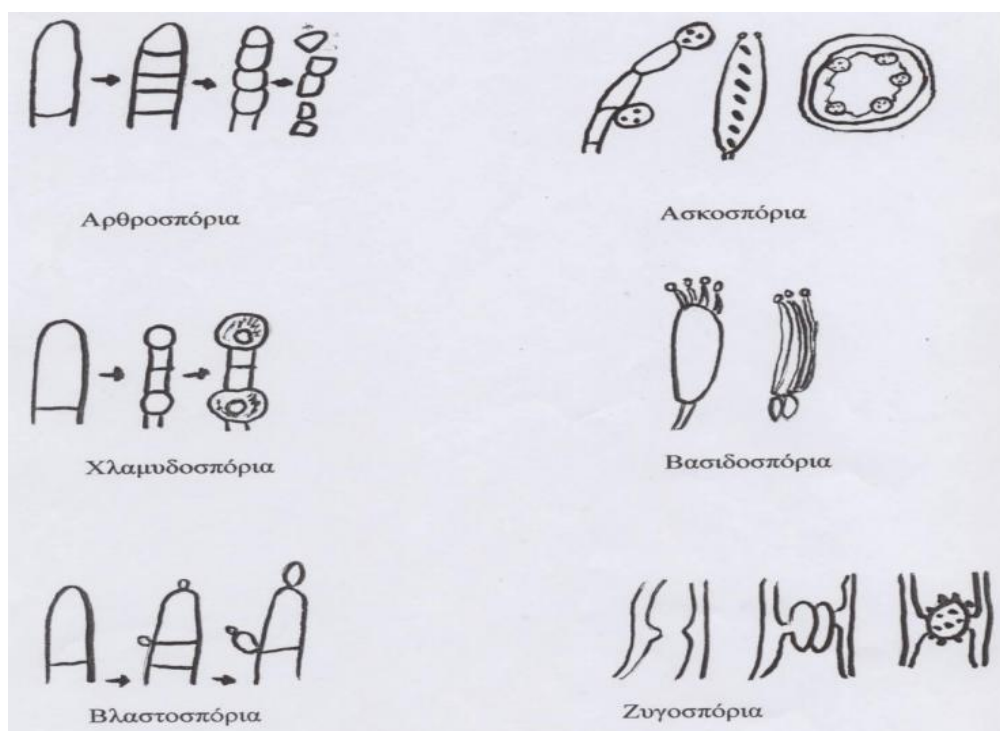
Εικόνα 10: Αρθροσπόρια ή Αθροκονίδια



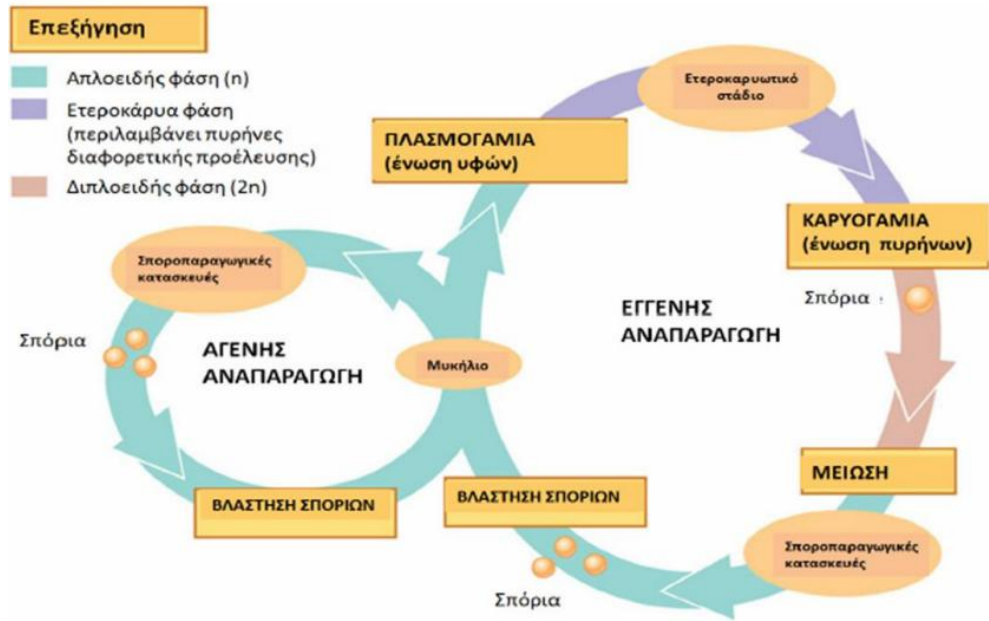
Εικόνα 11: Τεμαχισμός υφών με σχηματισμό αρθροσπορίων, χλαμυδοσπορίων, κονιδιοσπορίων, βλαστοσπορίων



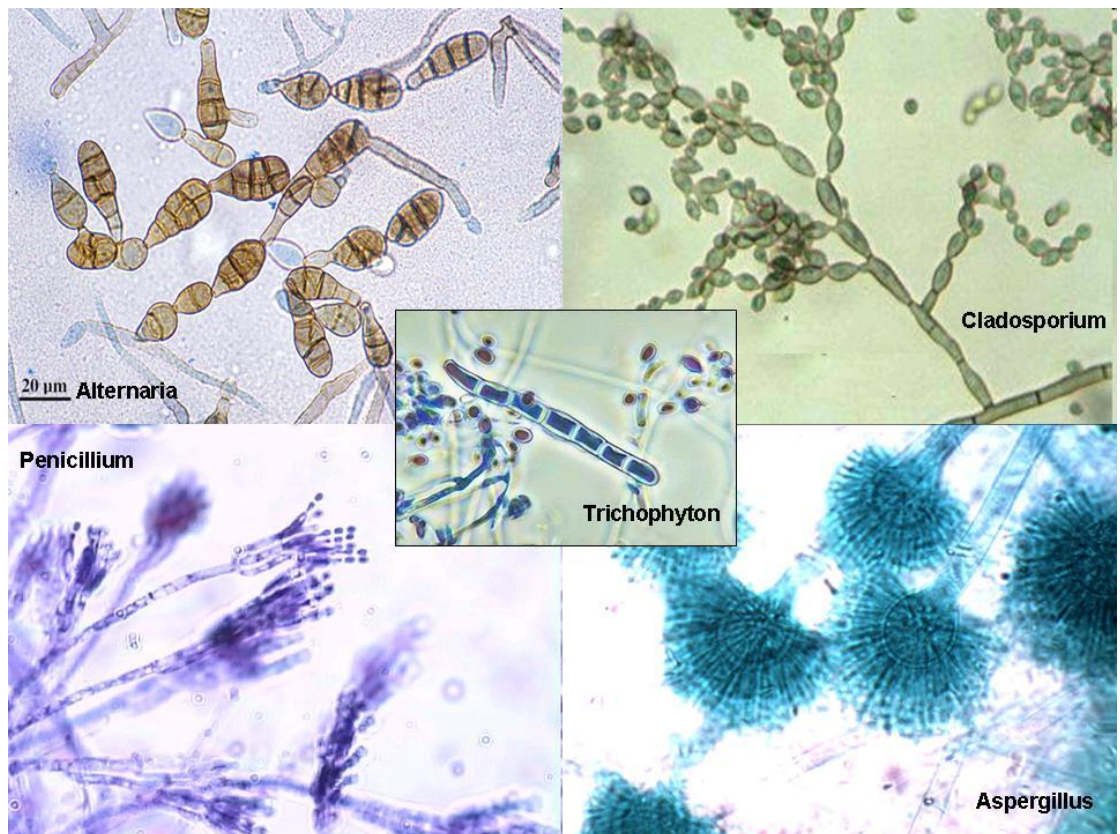
Εικόνα 12: Χαρακτηριστικά γνωρίσματα που απαντώνται στους μύκητες.



Εικόνα 13: Στην αριστερή στήλη βλέπουμε τα μονογονικά σπόρια (κονίδια) και στη δεξιά στήλη βλέπουμε τα αμφιγονικά σπόρια.



Εικόνα 14: Αναπαραγωγή μυκήτων

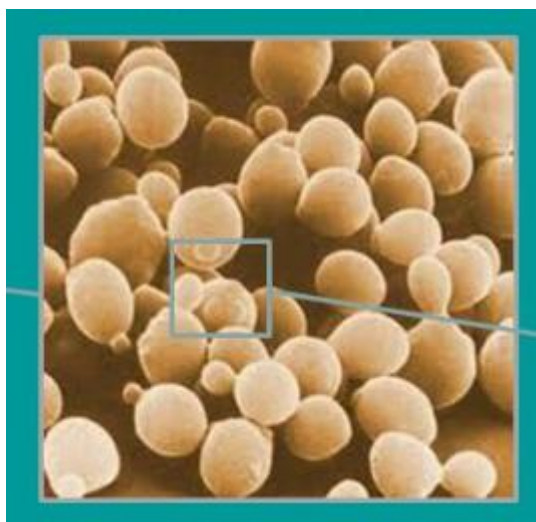


Εικόνα 15: Διάφορα είδη μυκήτων

5. ΖΥΜΕΣ ΠΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ

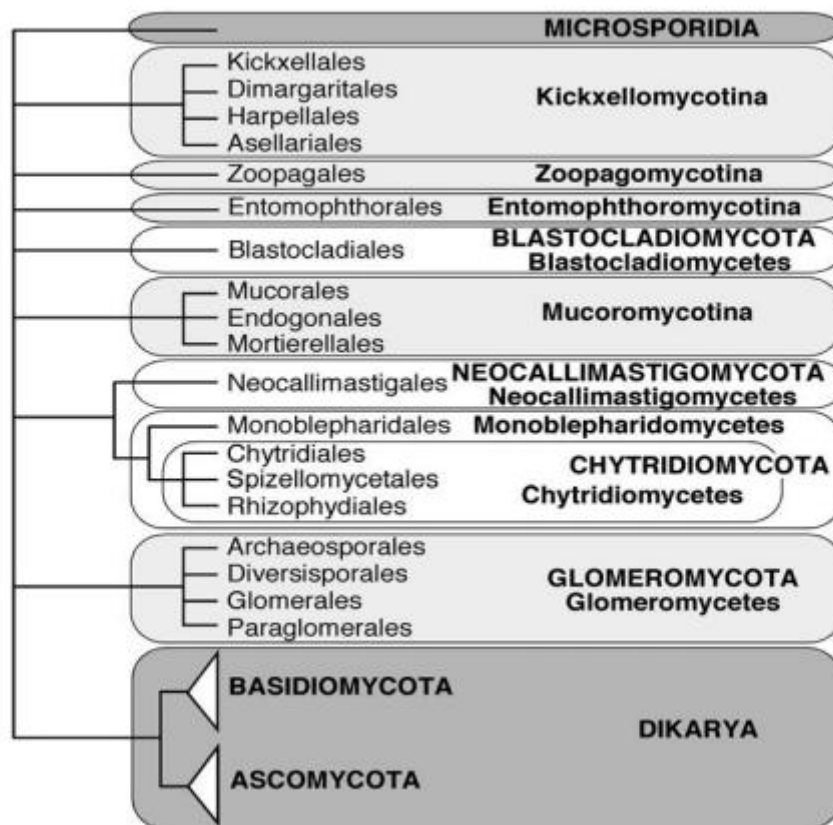
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος ζύμη είναι ένας όρος της Τεχνολογίας και όχι όρος της Συστηματικής Βοτανικής και χαρακτηρίζει μια ανομοιογενή ομάδα μικροβίων, τα μέλη της οποίας έχουν πολλές φορές μεγαλύτερες διαφορές από ότι ομοιότητες. Από πλευράς Βοτανικής όλες οι ζύμες είναι μικρομύκητες, δηλαδή μύκητες που διαφέρουν από τους τυπικούς κατά το ότι το μυκήλιο τους είναι περιορισμένο ή ανύπαρκτο και ο θαλλός, όταν υπάρχει, παρουσιάζει όλες τις διαβαθμίσεις, του πραγματικού μυκηλίου, του ψευδομυκηλίου και των απλών κυττάρων ανάλογα με το γένος και το είδος. Θα μπορούσε όμως να λεχθεί, με μικρές επιφυλάξεις για τους οριακούς οργανισμούς που καταλαμβάνουν το χώρο μεταξύ των τυπικών μυκήτων και των ζυμών, ότι σε όλες τις ζύμες ο θαλλός σε κάποιο στάδιο του βιολογικού τους κύκλου περιορίζεται δραστικά και φθάνει σε επίπεδο των απλών κυττάρων (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Απεικόνιση ζυμών.

Οι ζύμες ως μικρομύκητες είναι μικρόβια του Βασιλείου ή και Υπερβασιλείου των Πρωτίστων, του Βασιλείου των μυκήτων και της διαιρέσεως των Ευμυκήτων (Εικόνα 17). Κατανέμονται με βάση τον τρόπο πολλαπλασιασμού και μεταξύ των τριών υποδιαιρέσεων *Ascomycotina*, *Deuteromycotina* και *Basidiomycotina* και επομένως έχουν εκπροσώπους τους Ασκομύκητες, τους Δευτερομύκητες και τους Βασιδιομύκητες, όχι όμως τους Φυκομύκητες.



Εικόνα 17: Διάγραμμα δένδρο που απεικονίζει τις φυλογενετικές σχέσεις εντός του Βασιλείου των Μυκήτων.

Λόγω της ειδικής σημασίας που έχουν οι ζύμες για τον άνθρωπο έχει διαμορφωθεί ειδικός κλάδος επιστήμης, η Ζυμολογία, που έχει ως αντικείμενο την μελέτη παντός θέματος που ανάγεται στις ζύμες.

Αναλυτικότερα οι τυπικές ζύμες συγκεντρώνουν τις κύριες ιδιότητες των ανωτέρων μυκήτων, αλλά και των βακτηρίων και ως τέτοιοι μικροοργανισμοί :

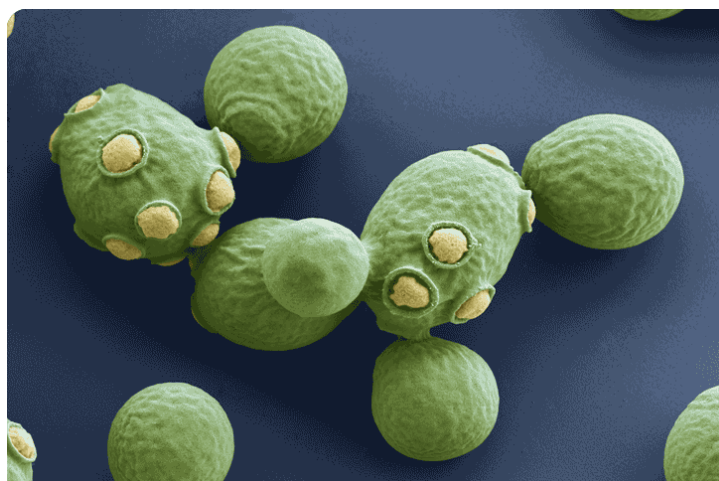
- Πολλαπλασιάζονται γρήγορα (συμπληρώνουν τον αγενή πολλαπλασιασμό τους υπό ευνοϊκές συνθήκες μέσα σε 40 λεπτά και υπό δυσμενείς συνθήκες μέσα σε 60 έως 90 λεπτά).
- Έχουν διακριτό πυρήνα όπως οι ανώτεροι μύκητες.
- Αναπτύσσονται εύκολα στο εργαστήριο και σε κοινά θρεπτικά υποστρώματα.
- Είναι δεκαπλασίων διαστάσεων από ότι τα τυπικά βακτήρια.
- Εμφανίζουν έντονη μεταβολική δραστηριότητα.

Για όλους τους ανωτέρους λόγους οι ζύμες, πέραν του ότι έχουν βρει ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές για παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων της διασπάσεως της ύλης, τα οποία είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τον άνθρωπο, έχουν οι ίδιες αποτελέσει φθινό και πολύτιμο πειραματικό υλικό για μελέτη και διερεύνηση θεμάτων της Γενετικής, της Φυσιολογίας και της Βιοχημείας. Επιπλέον, ορισμένες από αυτές συγκεντρώνουν ενδιαφέρον ως μικροοργανισμοί αλλοιώσεως των τροφίμων και άλλες ως παθογόνα αίτια για τον άνθρωπο, τα ανώτερα ζώα και τα φυτά.

5.2 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Ζύμες ή ζυμομύκητες (Εικόνα 18) είναι μικρομύκητες που ο θαλλός τους σε κάποιο στάδιο του βιολογικού τους κύκλου, περιορίζεται σε απλά κύτταρα. Πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλαστήσεις (*budding*) και μόνο ορισμένα γένη με κυτταρική διαίρεση (*fission*) ή με συνδυασμό των δύο τρόπων (*budding – fission*), ποτέ όμως με κονίδια ή άλλης μορφής εναέριες καρποφορίες. Εγγενώς πολλαπλασιάζονται (οι εγγενείς ή σποριογόνες) με ασκοπόρια ή βαλλιστοσπόρια και όσοι ανήκουν στους Βασιδιομύκητες με τελειοσπόρια. Στερούνται χλωροφύλλης και είναι σαπρόφυτοι οργανισμοί και σπανίως παράσιτοι ή παθογόνοι και επομένως στο σύνολο τους είναι μικροοργανισμοί ετερότροφοι. Έχουν καθορισμένο κυτταρικό τοίχωμα, μάλλον δύσκαμπτο, διακριτό και καλώς οργανωμένο πυρήνα και στερούνται μέσω μετακινήσεων (βλεφαρίδων). Από πλευράς μεταβολισμού είναι οξειδωτικοί οργανισμοί κατά πλειονότητα, εξαίρεση των ευγενών ζυμών που μπορούν να αποδεσμεύουν ενέργεια και ενδιάμεσα προϊόντα και διαμέσου της αλκοολικής ζυμώσεως.

Οι ζύμες, ως ομάδα μικροβίων συγκεντρώνουν ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον ανά τον κόσμο, γιατί η δράση τους επηρεάζει βαθύτατα τη ζωή του ανθρώπου.



Εικόνα 18: Απεικόνιση ζυμομύκητα

5.3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Η ταξινόμηση των ζυμών, όπως και των άλλων ομάδων μικροβίων, πέρασε από διάφορα εξελικτικά στάδια. Ειδικότερα θα ακολουθήσουμε τη μονοφυλετική προέλευση των ζυμών από τους Φοικομύκητες στην τάξη των *Saccharomycetales*, διαμέσου της τάξεως των *Dipodascales*. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι ζύμες, με την ευρεία έννοια πρέπει να συμπεριλάβουν τις ακόλουθες πέντε τάξεις των μυκήτων:

- a) *Dipodascales*
- b) *Taphrinales*
- c) *Saccharomycetales*
- d) *Cryptococcale*
- e) *Sporobolomycetales*

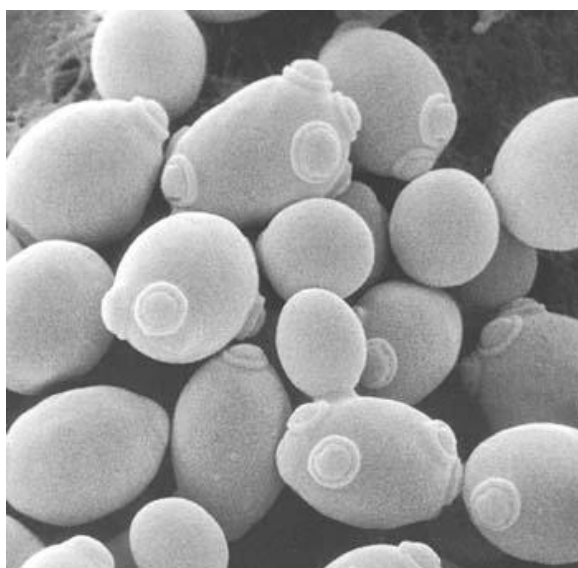
Οι τρεις πρώτες τάξεις είναι όλοι οι Ημιασκομύκητες, η τέταρτη τάξη ανήκει στους Δευτερομύκητες και έχει συμπεριλάβει όλες τις ασποριογόνες (πολλαπλασιάζονται μόνο αγενώς) κι η πέμπτη ανήκει στους Βασιδιομύκητες. Η τάξη των *Taphrinales* είναι φυτοπαθογόνοι, εξώασκοι που δεν ενδιαφέρουν τον μικροβιολόγο τροφίμων. Οι άλλες τέσσερις τάξεις είναι περισσότερο ενδιαφέρουσες, είτε από πλευράς φυλογενετικής εξελίξεως, είτε από πλευράς μικροβιολογίας τροφίμων.

5.4. ΤΟ ΓΕΝΟΣ *SACCHAROMYCES*

Έχει μεγάλη ιστορία στη χρήση του στην αρτοποιία για την διόγκωση του ψωμιού και για την παραγωγή αλκοόλης. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων όπως η ινσουλίνη και για τη ζύμωση σακχάρων από το ρύζι, το σιτάρι, το κριθάρι, το καλαμπόκι, και από το χυμό σταφυλιών. Έχει χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας για την παραγωγή της βιοαιθανόλης στη ζύμωση στο κρασί, στο ψωμί και στη μύρα.

Τα κύτταρα είναι σφαιρικά, ωοειδή αλλά και επιμήκη στα πρώτα στάδια της εξέλιξής τους. Στο γένος *Saccharomyces* τάσσονται 30 είδη σύμφωνα με την κλείδα ταξινομήσεως του Lodder. [1] Το σπουδαιότερο όμως είδος είναι του *Saccharomyces cerevisiae* (Εικόνα 19) το οποίο είναι υπεύθυνο κατά κύριο λόγο για την αλκοολική ζύμωση υπό βιομηχανικές συνθήκες. Επίσης υπάρχουν στελέχη του ίδιου είδους με διαφορετική αντοχή στο ψύχος, στο διοξείδιο του θείου και στους αλκοολικούς βαθμούς.

Στο γένος *Saccharomyces* άλλα είδη παράγουν ψευδομυκήλιο και άλλα όχι, κανένα όμως δεν σχηματίζει κανονικό μυκήλιο. Το ψευδομυκήλιο είναι διασύνδεση κυττάρων που παρήχθησαν με εκβλάστηση, ενώ το πραγματικό μυκήλιο σχηματίζεται με πολλαπλασιασμό των κυττάρων δια μέσου κυτταρικής διαίρεσης. Το σχήμα των σπορίων είναι σφαιρικό, ωοειδές, νεφρόσχιμο ή πιλόμορφο και ο αριθμός τους είναι μικρότερος ή ίσος με τέσσερα.



Εικόνα 19: Φωτογραφία του γένους *Saccharomyces cerevisiae*

5.4.1 ΕΙΔΟΣ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

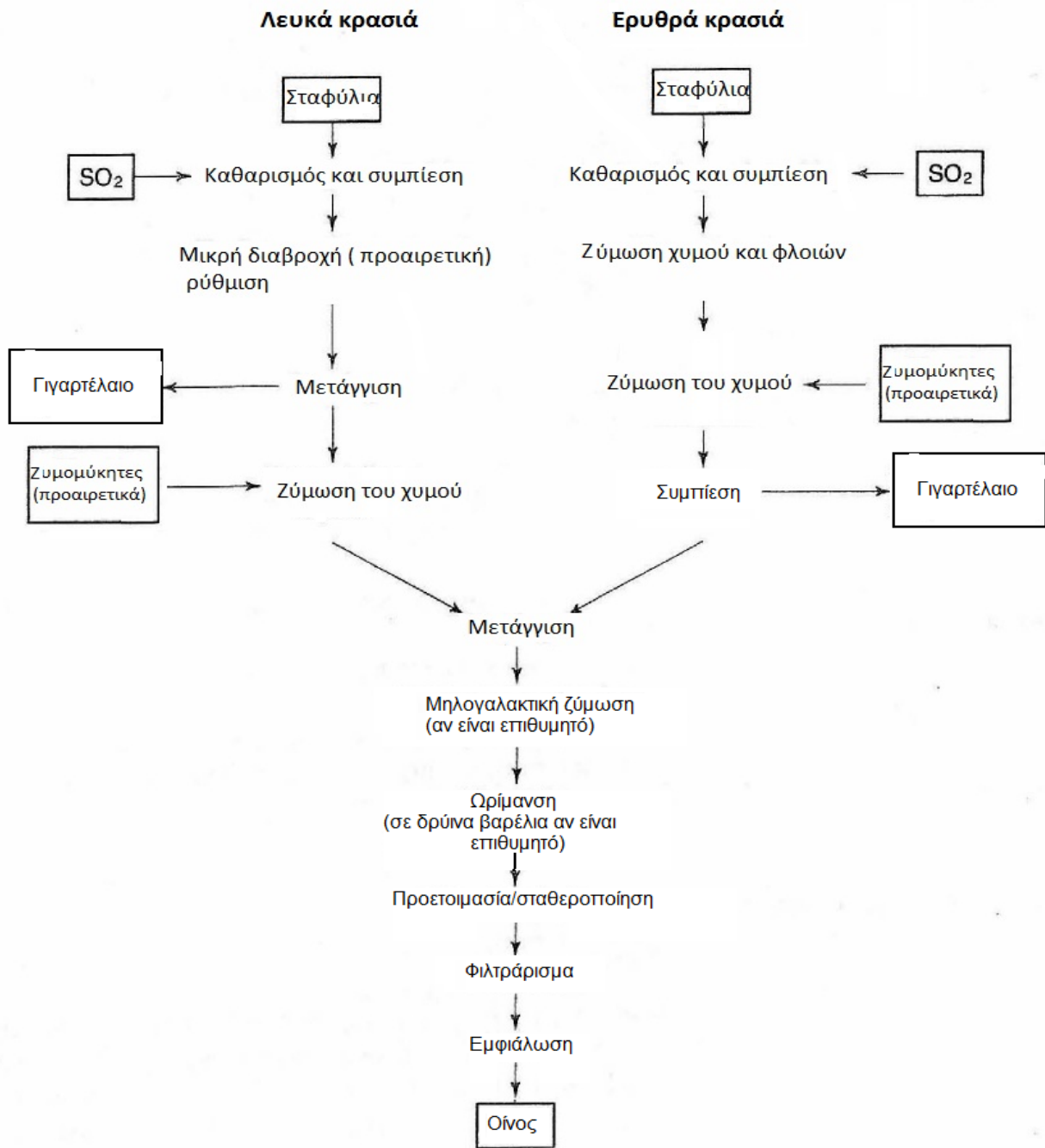
. Το πιο γνωστό είδος ζύμης είναι το *Saccharomyces cerevisiae* λόγω της ικανότητας του να επιτελεί ζυμώσεις. Ανήκει στην οικογένεια των *Saccharomycetaceae* και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή κρασιού, ψωμιού και μύρας. Επιπλέον, το είδος αυτό αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τους επιστήμονες λόγω της ευκολίας που παρέχει στον χειρισμό του κατά τις γενετικές τροποποιήσεις. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια έχει ολοκληρωθεί η αποκωδικοποίηση του γονιδιώματός του, το οποίο αποτελείται από περίπου 6.000 γονίδια, αποτελώντας πλέον πρότυπο σύστημα μελέτης.

Το είδος *Saccharomyces cerevisiae* συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στη βιομηχανία τροφίμων γενικά, στη ζυμολογία και στη μικροβιολογία τροφίμων. Στις κλείδες ταξινομήσεως των ζυμών έχουν γίνει δραματικές ανακατατάξεις για το γένος *Saccharomyces* σε μια προσπάθεια να καθοριστούν με ακρίβεια τα χαρακτηριστικά του είδους, ώστε να υπάρχει σταθερό σημείο αναφοράς. Χαρακτηρίζεται από έντονο ζυμωτικό σφίγγος, υψηλή αλκοολογέννηση και αλκοολοαντοχή, αυξημένη αντοχή στα αντισηπτικά και ευρεία εφαρμογή σε ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών. Ακόμη έχει παρατηρηθεί θερμική αντοχή των συγκεκριμένων ζυμών όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπόστρωμα. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλες τις φάσεις οινοποίησης, της παραγωγής ζύθου και άρτου.

6. Η ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η σύγχρονη οινοποίηση (Εικόνα 20) έχει αξιοπρόσεκτες απαιτήσεις όπως συνέπεια και ποιότητα παραγωγής και οδηγεί τους οινοποιούς να κάνουν τις σωστές επιλογές σε κάθε στάδιο παραγωγής, από τον τρύγο μέχρι την εμφιάλωση. Στις μέρες μας, η βιομηχανία της οινοποίησης είναι ευρεία και συνεισφέρει στην οικονομία πολλών χωρών. Ειδικά για τις χώρες του Νέου Κόσμου, η έρευνα πάνω στην ζύμωση και στα νέα στελέχη ζυμών παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ποιότητας των κρασιών και στις βασικές οινοποιητικές διαδικασίες. Τα τελευταία χρόνια, ακόμα κι αν έχουμε σταφύλια από την ίδια ποικιλία και από την ίδια περιοχή, το παραγόμενο κρασί βασίζεται στο στέλεχος της ζύμης που θα χρησιμοποιηθεί. Περιληπτικά, η επιλογή του στελέχους ορίζει τα ακόλουθα:

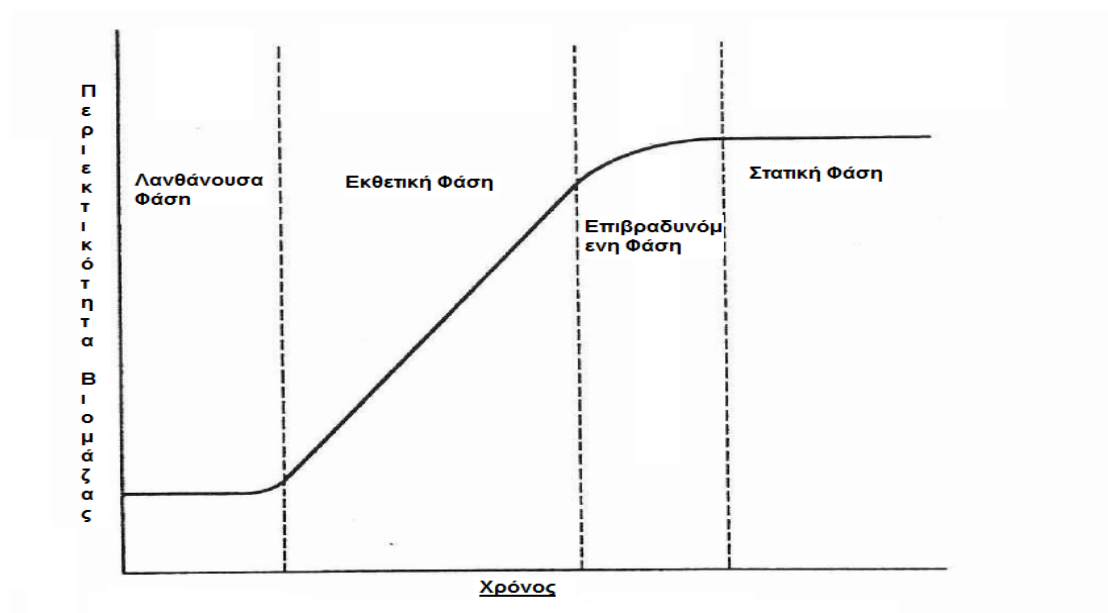
- Διαδικασία ζύμωσης
- Ανεκτικότητα στα διάφορα είδη στρες
- Χρήση τυποποιημένων μεθόδων
- Σύνθεση πτητικών ουσιών
- Επίπεδο ανάπτυξης του ζυμομύκητα
- Παραγωγή αλκοόλης
- Καθορισμός ανώτερου επιπέδου αλκοόλης
- Σύνθεση εστέρων
- Καρβονυλικές ενώσεις
- Ενώσεις θείου



Εικόνα 20: Σύντομη περιγραφή της λευκής και ερυθρή οινοποίησης

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει εστιαστεί στις γενετικές προσεγγίσεις των χαρακτηριστικών της βιομηχανικής ζύμης. Με την ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας έχουμε καταφέρει να αποκωδικοποιήσουμε το γονιδίωμα για 46 διαφορετικά στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*. Η μοριακή γενετική έρευνα έχει επίσης περιλάβει μελέτες της γενετικής έκφρασης στη ζύμη του κρασιού κατά τη ζύμωση, όταν αυτή

πραγματοποιείται σε καταστάσεις στρες όπως υψηλή συγκέντρωση σακχάρων ή τοξικότητα της αιθανόλης και όταν οι ζύμες είναι αφυδατωμένες ή ενυδατωμένες. Όσον αφορά την ανάπτυξη των ζυμών κατά την αλκοολική ζύμωση, αυτό συνήθως παρατηρείται σε ζυμώσεις *batch* (στατικής φάσης). Αυτό σημαίνει ότι τα θρεπτικά συστατικά είναι διαθέσιμα στην αρχή της ζύμωσης και σταδιακά εξασθενούν κατά την αύξηση της περιεκτικότητας της αλκοόλης προς το τέλος. Η ζύμωση στις περισσότερες περιπτώσεις μπορεί να περιγραφεί σε τέσσερις φάσεις: επιβράδυνσης, εκθετική, στατική και λανθάνουσα (Εικόνα 21)



Εικόνα 21: Διάγραμμα φάσεως ανάπτυξης μικροβιακής καλλιέργειας σε batch συνθήκες.

Αμέσως μετά τον εμβολιασμό, έχουμε μια χρονική περίοδο κατά την οποία δεν υπάρχει ανάπτυξη, και αυτό συμβαίνει διότι οι ζυμομύκητες πρέπει πρώτα να προσαρμοστούν στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτή η χρονική περίοδος ονομάζεται λανθάνουσα φάση. Μετά την προσαρμογή στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες, ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων θα αυξηθεί (εκθετική φάση) σύμφωνα με την εξίσωση: $Dx/dt = \mu \cdot x$. Το μέγεθος του αυξητικού εκθέτη (μ) διευρύνεται ανάμεσα στο 0 (λανθάνουσα φάση) και το μέγιστο (εκθετική φάση).

Κατά τη ζύμωση και μετά την εκθετική φάση, η περιεκτικότητα των θρεπτικών στοιχείων μειώνεται και η περιεκτικότητα της αλκοόλης αυξάνεται. Ταυτόχρονα, η τοξικότητα των προϊόντων των κυττάρων αυξάνεται, και ο αριθμός

των ζώντων και μεταβολικώς ενεργών κυττάρων πλησιάζει τον αριθμό των νεκρών κυττάρων. Η καλλιέργεια τώρα μπαίνει στη στατική φάση. Αυτό οδηγεί σε σημαντική γονιδιακή τροποποίηση. Σε βιομηχανικές καταστάσεις όπως είναι οι ζυμώσεις του κρασιού, η λανθάνουσα φάση είναι ένα μεγάλο μέρος της διαδικασίας, η εκθετική φάση είναι πολύ μικρή, η στατική μπορεί να είναι μικρή και να αρχίσει πολύ πριν το υπόστρωμα εξαντληθεί και η φάση θανάτου είναι μεγάλη με τον αριθμό των ζώντων κυττάρων να παραμένει σε υψηλά επίπεδα για αρκετούς μήνες. Όταν ο ζυμομύκητας εμβολιαστεί σε φρέσκο γλεύκος, οι φυσιολογικές μετατροπές στη ζύμη εμφανίζονται πολύ μικρές. Αυτό συμβαίνει διότι συνθήκες όπως η χαμηλή θερμοκρασία και η «θειώση» του μούστου (προσθήκη διοξειδίου του θείου ως αντιοξειδωτικό και αντιμικροβιακό παράγοντα) κατά την έκθλιψη των σταφυλιών προστατεύουν το ζυμομύκητα από το οξυγόνο. Παρόλα αυτά, η προσθήκη του διοξειδίου του θείου για προστασία κατά των μικροοργανισμών φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των ζυμών. Επίσης, η έλλειψη του αζώτου και το χαμηλό pH (<3.3 για τα λευκά κρασιά και <3.4 για τα κόκκινα κρασιά) μπορούν να παρατείνουν τη λανθάνουσα φάση. Επίσης οι υψηλές περιεκτικότητες σε σάκχαρα στην αρχή της ζύμωσης εμποδίζουν την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και την πρόοδο της ζύμωσης.

Το επόμενο βήμα στις ζυμώσεις των κρασιών είναι η εκθετική φάση κατά την οποία τα κύτταρα των ζυμών αναπτύσσονται και αναπαράγονται σε ένα μέγιστο επίπεδο καθώς τους επιτρέπεται από τις επικρατούσες συνθήκες. Σε αυτό το στάδιο η παρουσία ή η απουσία οξυγόνου δεν επηρεάζει το επίπεδο ανάπτυξης των ζυμομυκήτων.

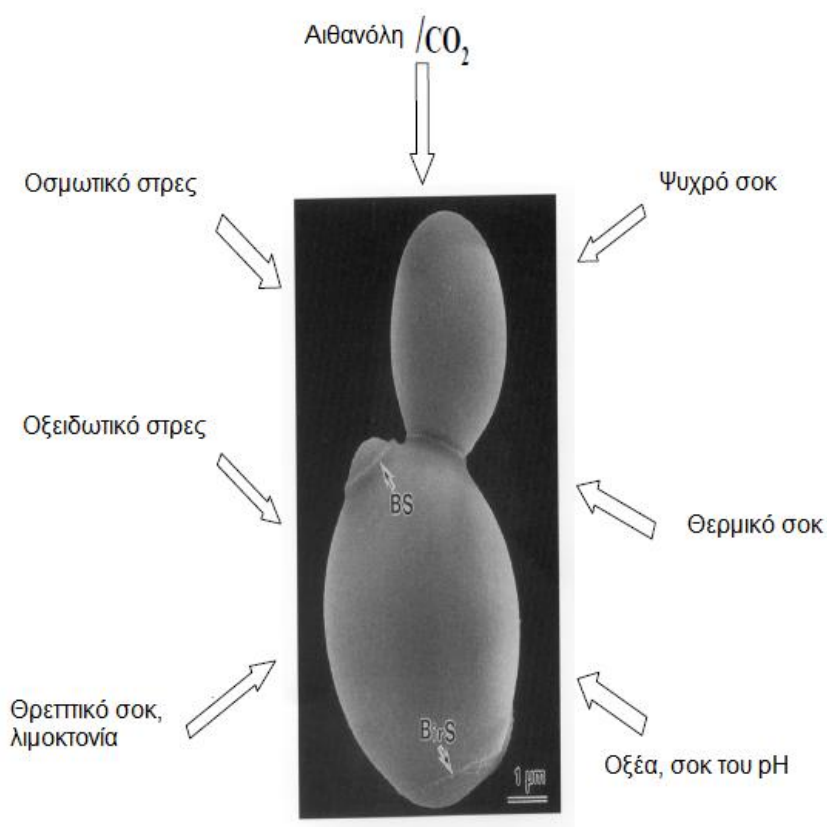
Η γλυκερίνη και η τρεχαλόζη συσσωρεύονται και αυτό είναι αξιοπρόσεκτο για τη φυσιολογία του στρες των μυκήτων, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Όσο τα κύτταρα των ζυμών μπαίνουν στη στατική φάση επέρχεται αλλαγή στο ενζυμικό συμπλήρωμα – παράγονται αρκετές πρωτεΐνες που προκαλούν στρες (πρωτεΐνες θερμικού σοκ, Hsp) και από την άλλη μεριά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα γλυκερίνης και τρεχαλόζης αυξάνονται και ενεργούν ως προστατευτικά μόρια κατά του στρες. Η τρεχαλόζη σταθεροποιεί τη ρευστότητα της μεμβράνης και ορίζει τη μετουσίωση της πρωτεΐνης, ενώ η γλυκερίνη παίζει ένα σημαντικό ρόλο για τη συντήρηση της ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Έχει αναφερθεί ότι η σύνθεση της γλυκερίνης, τουλάχιστον κατά τη στατική φάση, έχει άμεση σχέση με την

οξειδοαναγωγική ισορροπία και με το να ελέγχει το ενεργειακό ισοζύγιο του κυττάρου.

Κατά τη φάση θανάτου, η δυσλειτουργία της μεμβράνης των ζυμομυκήτων αυξάνεται κάτω από τη συνδυαστική επίδραση της αιθανόλης και την τοξικότητα των λιπαρών οξέων επιφέροντας το θάνατο του μικροοργανισμού.

7. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟΥΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ

Η επίδραση του μείζονος παράγοντα στρες που συναντούν οι ζυμομύκητες κατά την οينوποίηση απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Απεικόνιση των αιτιών στρες των ζυμομυκήτων.

Στην αρχή της ζύμωσης τα κύτταρα των ζυμών υπόκεινται σε οσμωτικό και οξειδωτικό στρες εξαιτίας της υψηλής σε περιεκτικότητα ζάχαρης και του διαλυμένου οξυγόνου. Καθώς προχωρεί η ζύμωση το οξειδωτικό στρες οφείλεται πλέον στην υψηλή συγκέντρωση της αιθανόλης και στην εξάντληση των θρεπτικών συστατικών. Ένας από του πιο κοινούς οξειδωτικούς παράγοντες κατά την διάρκεια της ζύμωσης είναι η μεγάλη συγκέντρωση της αιθανόλης. Η μεγάλη τοξικότητα κατά την ενδογενή παραγωγή της αιθανόλης μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, τον ρυθμό ανάπτυξης, και το ποσοστό της ζύμωσης. Πολλοί μηχανισμοί έχουν

αναπτυχθεί για να βοηθήσουν τους οργανισμούς να αντέξουν ή και να προστατευτούν από την βλαβερή επίδραση της αιθανόλης που προκαλείται κατά την διάρκεια της ζύμωσης, όπως με τη χρήση υβριδίων ζυμών που βασίζονται σε οινολογικό χαρακτηρισμό, με αναδιαμόρφωση μεμβρανών (παλμιτελαϊκό οξύ, ελαϊκό οξύ και εργοστερόλη) και σύνθεση νέου κυτταρικού τοιχώματος (λιπαρά οξέα, λιπίδια και ισοπρενοειδής μεταβολισμός), συσσώρευση αμινοξέων (προλίνη και τρυπτοφάνη) και διαλυμένων ουσιών (τρεχαλόζη και γλυκόζη), ενεργοποίηση του μορίου *ATPάση* και των υπεροξειδοσωμάτων, ενίσχυση της αναγέννησης του *NADPH* και της οξειδωτικής ισορροπίας, γενετική εξέλιξη μέσω του φυλετικού κύκλου ή μέσω παραφυλετικού υβριδισμού και γενετικής μηχανικής, αναδιαμόρφωση των μεταγραφικών παραγόντων. Ωστόσο αυτοί οι μέθοδοι έχουν τον εγγενή περιορισμό ότι οι ζύμες προσαρμόζονται αυτόματα στα διαφορετικά μεταβολικά περιβάλλον.

Θεωρείται τελευταίως πολύ σημαντικό ότι το κλειδί για τη βελτιστοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης είναι τα επίπεδα στρες των ζυμών. Οι τελευταίες έρευνες σε επίπεδο βιομηχανικής παραγωγής αιθανόλης επικεντρώνονται στην παραγωγή της δια μέσου της βελτιστοποίησης των μηχανισμών απόκρισης του κυττάρου στο στρες. Οι πρωτεΐνες *Msn2p* και *Msn4p* είναι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι έχουν πλήρως χαρακτηριστεί μεταξύ των ρυθμιστών του περιβαλλοντικού στρες.

7.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Οι περισσότεροι υδατάνθρακες και πηγές ενέργειας στο γλεύκος είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Άλλα θρεπτικά στοιχεία όπως τα αμινοξέα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν με αυτό τον τρόπο, αλλά υπάρχουν σε μικρές ποσότητες και μόνο η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη μπορούν να ζυμωθούν εύκολα από τους ζυμομύκητες. Η γλυκόζη στα πρώτα στάδια της ζύμωσης μεταφέρεται μέσα στην πλασματική μεμβράνη από διάφορους μεταφορικούς μηχανισμούς. Η συγκέντρωση της γλυκόζης δεν επηρεάζει μόνο τη λειτουργία των μηχανισμών μεταφοράς των σακχάρων αλλά καθορίζει και την έκφραση των ενζύμων στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (*TCA*). Παράλληλα η συνεχής έκφραση των επιλεγμένων χρωμοσωμικών και μιτοχονδριακών γονιδίων καταλήγει σε μερικά ένζυμα *TCA* που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, ακόμα και σε υψηλές περιεκτικότητες σακχάρου. Απαιτούνται για τις βιοσυνθετικές αντιδράσεις που είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη. Στα ώριμα σταφύλια, η περιεκτικότητα σε σάκχαρα φτάνει αισίως τα 20-25% w/v. Σε αυτή τη συγκέντρωση, η οσμωτική επίδραση των σακχάρων μπορεί να καθυστερήσει την έναρξη της ζύμωσης, Η μερική πλασμόλυση των κυττάρων των ζυμών μπορεί να είναι μια από τις αιτίες της ύπαρξης μιας λανθάνουσας φάσης πριν την ενεργοποίηση της ζύμωσης. Επίσης, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται, η κυτταρική διαίρεση καθυστερεί και η ευαισθησία στην αλκοόλη αυξάνεται. Σε περιεκτικότητες σακχάρων υψηλότερες από 25% w/v, η πιθανότητα να εμφανιστεί πρόωρος τερματισμός της ζύμωσης αυξάνεται σημαντικά. Η προσαρμογή και η ανεκτικότητα των ζυμών του κρασιού στις υψηλές περιεκτικότητες σακχάρου σχετίζεται με την αύξηση της σύνθεσης της γλυκερίνης και τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Οι αντιδράσεις στην αυξημένη οσμωτικότητα επιτρέπουν στη γλυκερίνη να ισορροπήσει το οσμωτικό δυναμικό του κυτταροπλάσματος με αυτό του περιβάλλοντος χυμού του σταφυλιού. Υψηλές περιεκτικότητες σακχάρων αυξάνουν την παραγωγή του οξικού οξέος και των οξικών εστέρων.

7.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΘΕΙΩΔΟΥΣ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Το διοξείδιο του θείου (SO_2) μπορεί να προστεθεί στο γλεύκος σε επίπεδα μεταξύ 50-100 mg/L, ανάλογα με την κατάσταση των σταφυλιών και τη θερμοκρασία της διαβροχής. Πρόσφατες έρευνες έχουν θέσει ερωτηματικά σχετικά με τα οφέλη της χρήσης του SO_2 , ειδικά σε υγιή σταφύλια που διαβρέχονται σε ήπιες θερμοκρασίες. Η προσθήκη του διοξειδίου του θείου κατά τη διάρκεια της οινοποίησης δεν ευνοεί μόνο την ανάπτυξη των στελεχών που είναι ανθεκτικά στο διοξείδιο του θείου, αλλά επίσης φαίνεται να ευνοεί στελέχη που παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες διοξειδίου του θείου. Το SO_2 είναι αντιοξειδωτικό και αντισηπτικό, και χρησιμοποιείται σε πολλά στάδια της οινοποίησης. Για να αποτρέψει την πρόωρη έναρξη της ζύμωσης, μπορεί να προστεθεί για να αναστείλει την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των άγριων ζυμών και των βακτηρίων. Αυτοί οι οργανισμοί χρειάζονται οξυγόνο για την ανάπτυξή τους, και φυσιολογικά βρίσκονται στο φλοιό των ρογών. Γενικά, η χρήση του διοξειδίου του θείου αφορά στις ακόλουθες ιδιότητές του:

7.2.1 ΑΝΤΙΣΗΠΤΙΚΟ

Εμποδίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Έχει μεγαλύτερη επίδραση στα βακτήρια απ' ότι στις ζύμες. Σε μικρές συγκεντρώσεις η αναστολή είναι αντιστρεπτή. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις καταστρέφει ένα ποσοστό του μικροβιακού πληθυσμού. Η επίδραση μιας δεδομένης συγκέντρωσης αυξάνεται με τη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού, για παράδειγμα με τη διήθηση.

7.2.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ

Προστατεύει τους οίνους από τις χημικές οξειδώσεις, αλλά δεν επιδρά στις ενζυμικές οξειδώσεις, που είναι πολύ γρήγορες. Το διοξείδιο του θείου προστατεύει το κρασί από μια υπερβολική και έντονη οξείδωση των φαινολικών και συγκεκριμένων αρωματικών ενώσεων του. Αποτρέπει την μαδεροποίηση η οποία είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης των φαινολικών ενώσεων με το οξυγόνο και μετατρέπει το χρώμα των λευκών κρασιών από ανοιχτό κίτρινο σε σκούρο κίτρινο και των κόκκινων από σκούρο κόκκινο σε σκούρο κεραμιδί. Επίσης συμβάλλει στην

εγκαθίδρυση μιας επαρκούς χαμηλής οξειδωσης-μείωσης δυναμικού, υπέρ της βελτίωσης του αρώματος και της γεύσης κατά την αποθήκευση και την παλαίωση.

7.2.3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΑΣΙΚΟ

Αναστέλλει στιγμιαία τη διαδικασία της οξειδωσης των ενζύμων (τυροσινάση, λακκάση) και μπορεί να διασφαλίσει την καταστροφή τους στο χρόνο. Πριν τη ζύμωση, το διοξείδιο του θείου προστατεύει τα γλεύκη από την οξείδωση με αυτό το μηχανισμό. Επίσης βοηθά στην αποφυγή των οξειδωτικών αντιδράσεων στα λευκά και κόκκινα κρασιά που παράγονται από σάπια σταφύλια.

7.2.4. ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΡΩΜΑΤΟΣ

Δεσμεύοντας την αιθανόλη και άλλα παρόμοια προϊόντα, το διοξείδιο του θείου προστατεύει τα αρώματα του κρασιού και εξαφανίζει τον επίπεδο χαρακτήρα.

7.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Ανεξάρτητα από το γεγονός ότι η ζύμωση είναι από μόνη της αναερόβια διαδικασία και δεν απαιτεί οξυγόνο, ίχνη οξυγόνου ευνοούν τη ζύμωση επιτρέποντας τη βιοσύνθεση των στερολών και μεγάλων αλυσίδων ακόρεστων λιπαρών οξέων. Κατά την οиноποίηση το γλεύκος οξειδώνεται κατά τις προζυμωτικές διαδικασίες όπως η αποβοστρύωση, συμπίεση, skin contact, κρυοεκχύλιση και εμβολιασμός. Το οξυγόνο προωθεί την ανάπτυξη των ζυμών και τη ζύμωση και μειώνει την αναγωγική επιρροή.

7.4. ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Είναι γνωστό ότι κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται μεγάλες ποσότητες διοξειδίου του άνθρακα. Οι ποσότητες αυτές φτάνουν τα 260 mg/g της ζυμωμένης γλυκόζης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η συγκέντρωση των σακχάρων του γλεύκους είναι περίπου 200-230 g/L και το ποσό του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται κατά την διάρκεια μιας αλκοολικής ζύμωσης με αυτή τη συγκέντρωση είναι 50 φορές ο όγκος του ζυμωμένου χυμού που παράγεται. Κατά την παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα, μεγάλες ποσότητες πτητικών συστατικών απομακρύνονται και η απώλεια της αιθανόλης εκτιμάται στο 1-2% από το παραγόμενο προϊόν, παρόλα αυτά, αυτό ποικίλλει ανάλογα τα σάκχαρα και τη θερμοκρασία της ζύμωσης.

7.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

7.5.1 pH

Το pH κανονικά έχει μικρή επίπτωση στην πορεία της ζύμωσης ή στη σύνθεση και την απελευθέρωση των αρωματικών ενώσεων κατά την οινοποίηση. 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 βοηθά στην παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

7.5.2 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Η θερμοκρασία έχει άμεσες και έμμεσες επιδράσεις στο μεταβολισμό του ζυμομύκητα, αλλά είναι και μια από τις παραμέτρους της ζύμωσης, στην οποία οι οινοποιοί έχουν το μεγαλύτερο έλεγχο. Τόσο οι υψηλές όσο και οι χαμηλές θερμοκρασίες μπορούν να επηρεάσουν τη φυσιολογία του κυττάρου της ζύμης. Γενικά προτιμούνται υψηλότερες θερμοκρασίες για τις θετικές τους επιδράσεις στην εκχύλιση των φαινολών και ειδικά στην εκχύλιση των ανθοκυανών και των ταννινών που είναι οι πιο κοινές χημικές συνθέσεις που επιδρούν στο άρωμα και τη γεύση του κρασιού.

7.6 Η ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Το κύριο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης των σακχάρων είναι η αιθανόλη. Πολλές έρευνες έχουν γίνει σχετικά με το μηχανισμό της τοξικότητας της αιθανόλης και την αντοχή των ζυμών του κρασιού στην αιθανόλη. Πολλοί μηχανισμοί φαίνονται να σχετίζονται με την αντοχή στην αιθανόλη. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν:

α) Ενεργοποίηση της σύνθεσης της γλυκερίνης και της τρεχαλόζης [21], β) συσσώρευση *Hsp104* και *Hsp12* [22] και γ) τροποποίηση της πλασματικής μεμβράνης. Σχετικά με το τελευταίο, η αιθανόλη επηρεάζει την ενεργοποίηση της *ΑΤΡάσης*, την αντικατάσταση της εργοστερόλης με την λανοστερόλη, την αναλογία της φωσφατιδινοσιτόλης και της φωσφατιδινοχλωρίνης (Arneborg *et al.*, 1995) και αυξάνει την ενσωμάτωση του παλμιτικού οξέος. Αυτές οι μεταβολές στη μεμβράνη ελαττώνουν τη διαπερατότητα και περιορίζουν στο ελάχιστο την απώλεια θρεπτικών συστατικών και των συμπαραγόντων από το κύτταρο ειδικά του μαγνησίου και του ψευδαργύρου [25].

Γενικά, η αλκοόλη καθυστερεί τη ζύμωση και διακόπτει το μεταβολισμό των ζυμών σε μικρές συγκεντρώσεις, παρόλο που τα περισσότερα βιομηχανικά στελέχη του *S.cerevisiae* μπορούν να ζυμώνουν μέχρι το 13-15% v/v αιθανόλης. Γενικά πιστεύεται ότι η τοξικότητα της αιθανόλης ακυρώνει την ημίρρευση κατάστασης της κυτταρικής μεμβράνης με την επιβράδυνση της δραστηριότητας του ζυμομύκητα στο υγρό [22]. Αυτές οι μεταβολές στην πλασματική μεμβράνη της ζύμης οδηγούν στην καταστροφή της ικανότητας των κυττάρων να ελέγχουν την κυτοπλασματική λειτουργία, να αντλούν τα θρεπτικά συστατικά και να διαφυλάσσουν την ηλεκτροχημική κλίση κατά μήκος της μεμβράνης [24].

7.7 ΓΕΝΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΟΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

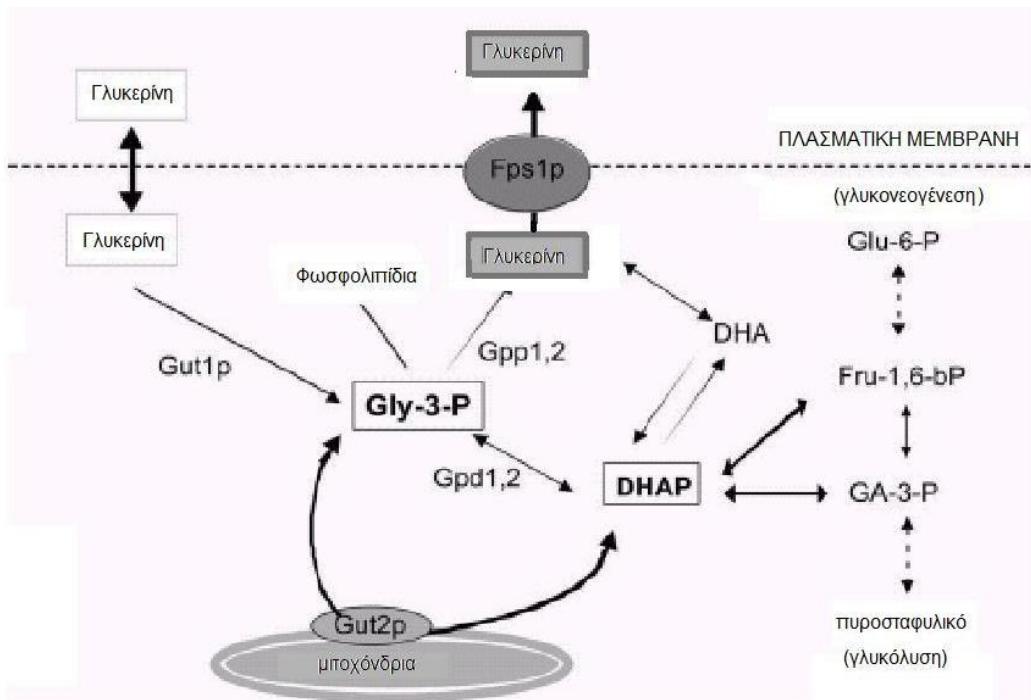
Τα κύτταρα των ζυμών χρησιμοποιούνται ως οργανισμοί για την έρευνα των μηχανισμών κατά του οσμωτικού στρες γενικά, και το στρες που οφείλεται στο αλάτι ειδικά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ζυμομύκητες διαθέτουν παρόμοια συστήματα μεταφοράς ιόντων με τους ανώτερους φυτικούς οργανισμούς και μυκητοειδή, και έχουν παρόμοιους αποτοξινωτικούς μηχανισμούς και μονοπάτια μεταγωγής σήματος.

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

1. Άμεσες κυτταρικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα ως άμεση συνέπεια των φυσικοχημικών δυνάμεων που λειτουργούν κάτω από αυτές τις συνθήκες
2. Πρόωρα καθορισμένες εξελίξεις

3. Μεταβολές στην ομοιόσταση του κυττάρου ως επακόλουθο του νέου οσμωτικού περιβάλλοντος

Όταν τα κύτταρα του ζυμομύκητα εκθέτονται στο οσμωτικό στρες, μια σειρά από φυσιολογικές μεταβολές λαμβάνουν χώρα. Αυτές περιλαμβάνουν: εκροή ενδοκυτταρικού H_2O , γρήγορη μείωση του συνολικού όγκου του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των κενотоπίων [26] προσωρινή αύξηση των γλυκολυτικών διαμέσων, συσσώρευση της γλυκερίνης στο κυτταρόπλασμα [27] και ενεργοποίηση της *HOG* (υπεροσμωτική γλυκερίνη) μεταβολικής οδού [25]. Μικροοργανισμοί σαν τον *S. cerevisiae* αναπτύσσουν μηχανισμούς για να εξουδετερώνουν τις επιβλαβείς συνέπειες του οσμωτικού στρες που οφείλεται στο χλωριούχο νάτριο ($NaCl$). Πιο συγκεκριμένα, το στρες άλατος δημιουργεί δύο διαφορετικά φαινόμενα, την τοξικότητα των ιόντων και το οσμωτικό στρες. Οι αμυντικές αντιδράσεις στο στρες άλατος βασίζονται στις οσμωτικές ρυθμίσεις από την οσμωλυτική σύνθεση και τα συστήματα μεταφοράς κατιόντων. Παρόλο που είναι κοινώς αποδεκτό ότι κατά το στρες άλατος τα κύτταρα θα πρέπει να κρατούν σε ισορροπία τη σχέση μεταξύ Na^+ και K^+ η οποία βασίζεται στη $Na^+ / K^+ ATPάση$ της πλασματικής μεμβράνης, ένας P-τύπος αντλίας ιόντων ενεργοποιείται που οδηγεί τα ιόντα Na^+ έξω από το κύτταρο και τα ιόντα K^+ μέσα στο κύτταρο. Αρκετές διαδρομές φαίνεται να μεσολαβούν στην ομοιόσταση του κυτταρικού Na^+ στα κύτταρα της ζύμης. Μια διαδρομή εισόδου του Na^+ επιδιώκεται να γίνουν οι μεταφορείς του K^+ , *TRK1* και *TRK2*. Όμως το *TRK1* είναι το γένος που οριοθετεί την είσοδο των Na^+ και K^+ ανιόντων. Είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι η ποσοτική επίδραση στη σπαργή ή τον όγκο του κυττάρου κατά την ανάπτυξη σε ένα μέσο, με οσμωτική αφυδάτωση (προκαλείται από συνθήκες στρες όπως του χλωριούχου νατρίου) διαφέρει μεταξύ των διάφορων ειδών των ζυμών. Στα κύτταρα του *S. cerevisiae*, η γλυκερίνη παράγεται ως μια «συμβιβαστική λύση» μέσω των μεταβολικών διαδικασιών που περιγράφονται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4: Οι μηχανισμοί της γλυκερίνης στο κύτταρο της ζύμης κατά το οσμωτικό στρες

Μια άλλη ένωση που παράγεται κατά τις συνθήκες στρες είναι η τρεχαλόζη 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 τρεχαλόζη συσσωρεύεται κατά την προσαρμογή στο άλας και μάλιστα φαίνεται ότι προστατεύει τα κύτταρα από τις υψηλές θερμοκρασίες σταθεροποιώντας τις πρωτεΐνες καθώς και από την ξήρανση και ότι διαφυλάσσει την ακεραιότητα της μεμβράνης [27]. Η έκθεση των κυττάρων του ζυμομύκητα σε υπεροσμωτικό 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. Ο κυτταροσκελετός της ζύμης επίσης καταρρέει. Η κυτταρική αφυδάτωση και η απώλεια του κυτταρικού νερού οδηγεί σε μια αναπτυξιακή διακοπή. Κάτω από τέτοιες συνθήκες ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός είναι ο μόνος αμυντικός μηχανισμός. Ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός είναι συνώνυμος με την κυτταρική προσαρμογή. Κατά τον επαναπρογραμματισμό, τα περισσότερα κύτταρα αποθηκεύουν ουσίες κατάλληλες

για να εξισορροπήσουν την ενδοκυτταρική οσμωτική πίεση με το εξωτερικό περιβάλλον. Τα συμβατά διαλυτά συστατικά μπορεί να είναι: γλυκερίνη, τρεχαλόζη, αμινοξέα και λιπαρά οξέα στην κυτταρική μεμβράνη.

7.7.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ-ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΣΤΟ ΟΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ

Οι κυτταρικές μεμβράνες πρέπει να επιτρέπουν την πορεία σημαντικών πολικών μορίων όπως ιόντα, σάκχαρα, αμινοξέα, νουκλεοτίδια και πολλοί κυτταρικοί μεταβολίτες που περνούν μόνο από τις αντλίες της μεμβράνης πολύ αργά. Για αυτού του είδους τη μεταφορά, ειδικές πρωτεΐνες της μεμβράνης είναι υπεύθυνες και αναφέρονται ως μεταφορικές πρωτεΐνες της μεμβράνης. Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες μεταφορικών πρωτεϊνών: οι πρωτεΐνες-μεταφορείς και οι πρωτεΐνες-κανάλια.

Οι πρωτεΐνες-μεταφορείς δεσμεύουν τη συγκεκριμένη ουσία για να μεταφερθούν και να δεχτούν μια σειρά από διαμορφωτικές αλλαγές με σκοπό να την μεταφέρουν δια μέσου της μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες-κανάλια δε χρειάζεται να δεσμεύσουν την ουσία και σχηματίζουν υδροφοβικούς πόρους που εκτείνονται σε όλο το λιπιδιακό στρώμα. Όταν αυτοί οι πόροι είναι ανοιχτοί, επιτρέπουν σε συγκεκριμένες ουσίες, συνήθως ανόργανες, να περάσουν τη μεμβράνη. Όλες οι πρωτεΐνες-κανάλια και κάποιες μεταφορείς επιτρέπουν την διαπερατότητα μόνο παθητικά («downstream»). Αυτή η λειτουργία ονομάζεται παθητική μεταφορά απλοποιημένης εξάπλωσης. Τα κύτταρα επίσης απαιτούν μεταφορικές πρωτεΐνες που θα αντλήσουν ενεργώς συγκεκριμένες ουσίες κατά μήκος της μεμβράνης αντίθετα από το βαθμό ηλεκτροχημικότητάς τους («upstream»). Αυτή η λειτουργία ονομάζεται ενεργητική μεταφορά.

Στην περίπτωση του στρες που υφίσταται λόγω του χλωριούχου νατρίου οι πρωτεΐνες-ενεργοποιητές, για τα κύτταρα των ζυμών, είναι οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια Yap (n). Ειδικά υπεύθυνο για την αντίδραση στο οσμωτικό στρες είναι το τέταρτο μέλος της οικογένειας: *Yap4p* (*Cin5p/Hal6p*) και *Yap6p*.

Πολλές έρευνες [23] Wysocki *et al.*,2004; Rodrigues-Pousada *et al.*,2004) έχουν δείξει ότι τα *YAP4* και τα *YAP6* γένη ενεργοποιούνται κάτω από οσμωτικό στρες, θερμικές και οξειδωτικές συνθήκες. Τρία άλλα γένη έχουν επικυρωθεί ως εξαρτώμενα στη *Yap4p*. Δύο από αυτά έχουν εμπλακεί στη βιοσύνθεση της γλυκερίνης, το *GCY1* κωδικοποιώντας μια φερόμενη ως γλυκερίνη αφυδρογονάση και το *GPP2* το οποίο κωδικοποιεί μια *NAD*-εξαρτώμενη γλυκερίνη-3-φωσφορικό άλας φωσφατάση.

7.7.2 ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΤΟ ΟΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ

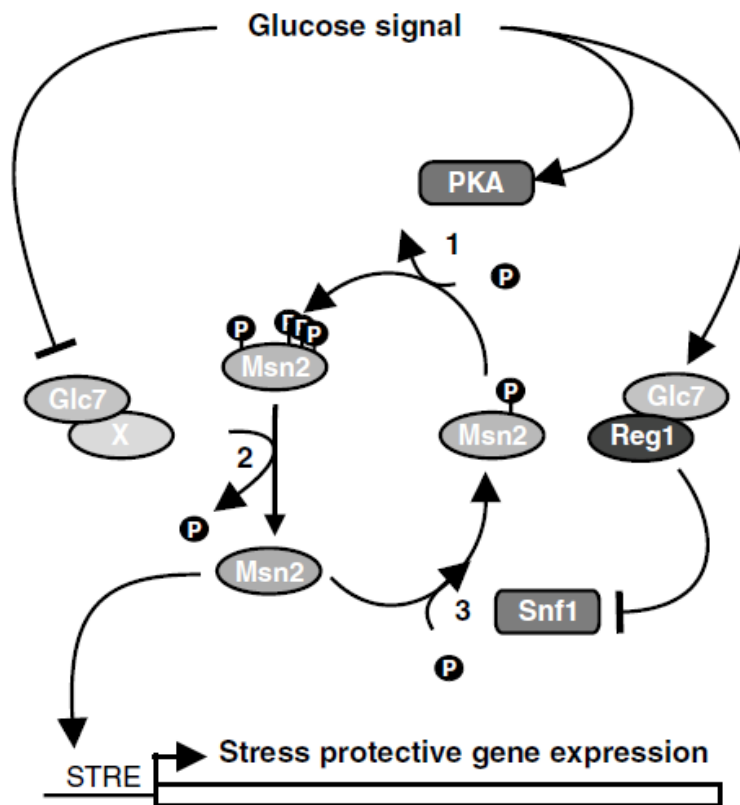
Κατά το οσμωτικό στρες το οποίο οφείλεται στην παρουσία χλωριούχου νατρίου, η έκφραση της γλυκερίνη-3-φωσφορικό άλας αφυδρογονάση που έχει κωδικοποιηθεί από το γένος *GPD1*, είναι υποκινούμενη. Αυτό το ένζυμο βρίσκεται πάντα να παρακινείται από χαμηλό υδατικό δυναμικό. Το *ENA1* είναι το γονίδιο που συνδέεται άμεσα με την αντλία του νατρίου που αντλεί την ΑΤΡάση [23]. 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 όσμωση. Τα γένη *GTT1*, *HSP 104*, *HSP12* και *HSP26* είναι γένη του θερμικού σοκ αλλά είναι πολύ αυξημένα στο οσμωτικό στρες. Άλλες κοινές απόψεις για τις αντιδράσεις στο θερμικό και το οσμωτικό στρες μπορούν να βρεθούν με τη λειτουργία των παραγόντων *MSN2* και *MSN4*. Αυτά τα γένη κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δεσμεύονται συγκεκριμένα με τα μέλη της απόκρισης στο στρες (*STREs*). Τα *STREs* παρουσιάζονται ως ένας μεγάλος αριθμός γενών που αυξάνονται με το θερμικό ή οσμωτικό 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 οσμωτικού σοκ. Το *CYC7* είναι ένα άλλο γένος που παρακινείται στα κύτταρα που έχουν υποστεί θερμικό και οσμωτικό στρες. Η τρεχαλόζη κωδικοποιείται από το *CIF1* το οποίο είναι ένα γένος που κωδικοποιεί το σύμπλοκο της συνθεάσης (Igraxte *et al.*, 1998). Τα γένη ζυμών *HAL1* και *HAL3* φαινομενικά συνεισφέρουν στη μείωση του επιπέδου του ενδοκυτταρικού νατρίου με την αύξηση της έκφρασης του *ENA1*.

8. ΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ *Msn2* / *Msn4*

Οι *Msn2* / *Msn4* είναι μικροί μεταγραφικοί παράγοντες που αποτελούνται από δακτυλίους με ιόντα ψευδαργύρου (*zinc finger*) και ρυθμίζουν την γενική αντίδραση στο στρες.[7] Αυτοί ρυθμίζουν την έκφραση 200 γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στο στρες, συμπεριλαμβανομένου του θερμικού σοκ, του ωσμωτικού σοκ, του οξειδωτικού στρες, το χαμηλό pH, την έλλειψη σε γλυκόζη, το ασκορβικό οξύ και την υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, καθώς προσδένονται σε συγκεκριμένη αλληλουχία στο DNA η οποία καλείται στοιχείο απόκρισης στο στρες (*Stress Response Element (STRE)*). Οι μεταγραφικοί παράγοντες *Msn2* / *Msn4* είναι ισχυρά λειτουργικοί μεταγραφικοί παράγοντες με κοινή δράση, υπάρχουν όμως ενδείξεις για την ατομική ρυθμιστικότητα τους ότι διαφέρει για συγκεκριμένα γονίδια κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες στρες. Στο άμινο τελικό τους άκρο περιέχουν μεταγραφικές δραστικές περιοχές. Στο καρβόξυλο τελικό άκρο και οι δύο πρωτεΐνες περιέχουν ένα δακτύλιο με ψευδάργυρο (*zinc finger*) που είναι συνδεδεμένος με την ακολουθία που αναγνωρίζει τον παράγοντα ανταπόκρισης στο στρες (*STRE*). Η σύζευξη του DNA από τον παράγοντα *Msn2* μεταβάλλεται από το στρες και την κινάση *c-AMP*. Κοντά στο δακτύλιο *zinc finger* υπάρχει μια περιοχή, η οποία αναστέλλεται μέσω φωσφορυλίωσης με την κινάση *c-AMP*, ενώ μπορεί πάλι να ενεργοποιηθεί μέσω αποφωσφορυλίωσης από την πρωτεΐνη φωσφατάση 1. Σε καταστάσεις όπου δεν υπάρχει στρες οι παράγοντες *Msn2/Msn4* βρίσκονται φυσιολογικά στο κυτταρόπλασμα. Όταν όμως υπάρχει στρες τότε οι παράγοντες υπερφωσφορυλιώνονται σε συγκεκριμένες θέσεις και ταυτόχρονα απόφωσφορυλιώνονται σε άλλες και μεταναστεύουν στον πυρήνα. Η ρύθμιση της τοποθεσίας τους ρυθμίζεται από την κινάση *c-AMP*. [9]

Στις ζύμες η δραστικότητα της πρωτεΐνη *c-APM* κινάση (*PKA*) είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη και ως επακόλουθο ανταγωνίζεται στη γενική απόκριση στο στρες, καθώς και εξίσου καλά στη συσσώρευση των αποθεμάτων της γλυκόζης. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι οι επιδράσεις της *PKA* στις δύο τελευταίες διαδικασίες έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής. Η μεταγραφή και η μείωση της *PKA* εξαρτάται από την παρουσία δύο μεταγραφικών παραγόντων, του *Msn2* και του *Msn4*. Οι *Msn2* και *Msn4* είναι μεταγραφικοί παράγοντες που δρουν θετικά σε βιοχημικές οδούς ανταπόκρισης στο στρες, καθώς επίσης μεσολαβούν στην επίδραση της *PKA* στην ανταπόκριση στο στρες καθώς και στα γονίδια που

ευθύνονται για το γλυκογόνο. Ενδιαφέρον προκαλεί ότι η δραστηριότητα της *PKA* είναι περιττή σε στελέχη όπου δεν δρουν οι παράγοντες *Msn2* και *Msn4* [6].



Εικόνα : Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει την ρύθμιση του παράγοντα *Msn2* υπό έντονες συνθήκες έλλειψης γλυκόζης. Στη φάση ο *Msn2* φωσφορυλιώνεται από την *PKA* όταν αναπτύσσεται σε υπόστρωμα γλυκόζης, ενώ η κινάση *Snf 1* παραμένει σε ανενεργή κατάσταση από την *PP1* - *Glc7*. Στη φάση 2 η μείωση της γλυκόζης έχει ως αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση του από την *PP1* - *Glc7* συσχετίζοντας με άγνωστες ρυθμιστικές μονάδες, εν συνεχεία έχουμε συσσώρευση του *Msn2* στον πυρήνα και ενεργοποίηση του από τους παράγοντες ανταπόκρισης στο στρες. Επίσης προκαλεί ταχύτατη ενεργοποίηση της *Snf 1* κινάσης. Στη φάση 3 το κύτταρο προσαρμόζεται στην έλλειψη της γλυκόζης καθώς αυξάνεται ταυτόχρονα η *Snf 1* κινάση εμποδίζοντας την είσοδο του *Msn2* στον πυρήνα.

9. ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ Msn2 ΚΑΙ Msn4 ΣΤΗΝ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

9.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

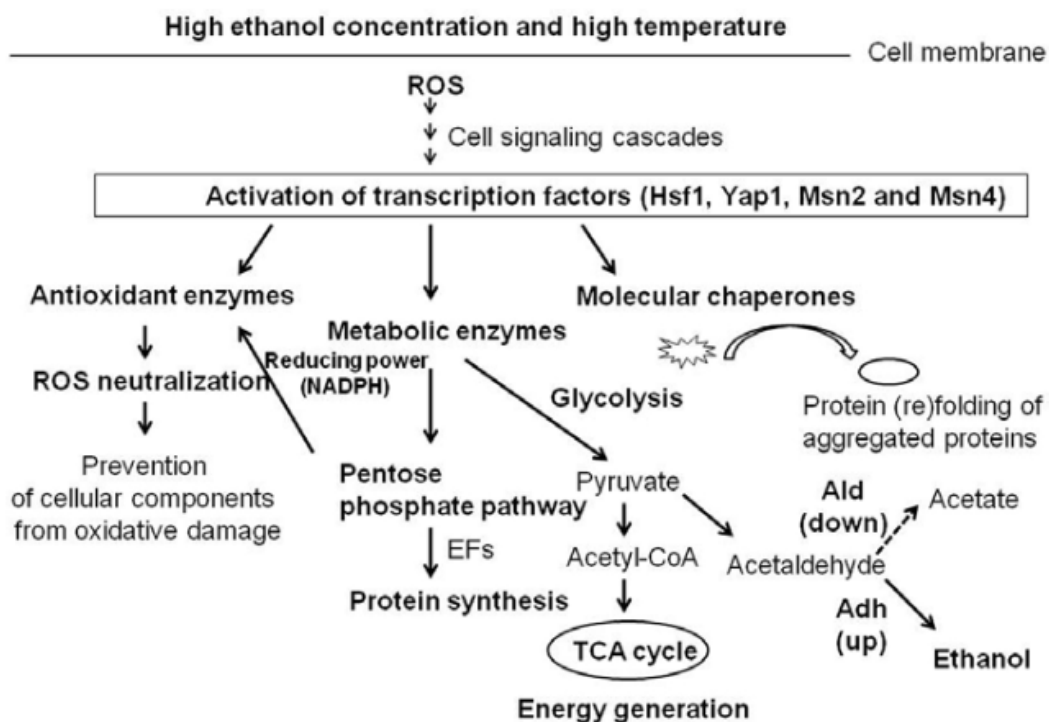
Οι ζύμες είναι αναγκασμένες, εντός του φυσικού τους περιβάλλοντος, να κάνουν μεταβολικές τροποποιήσεις όταν μεταβάλλονται τα επίπεδα θρεπτικών συστατικών έξω από το κύτταρο. Τέτοιες μεταβολές σχετίζονται συνήθως με ευρείες επιδράσεις στην γενετική έκφραση. Σε επιβλαβή περιβάλλοντα, τα γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της γλυκόζης μειώνονται ενώ γονίδια (λ.χ. *HSPs/CTT1*) που συσχετίζονται με μηχανισμούς προστασίας (*stress protection*) αυξάνονται. [9] Ταυτόχρονα, οι ζύμες πρέπει να είναι έτοιμες να επιστρέψουν σε άριστες μεταβολικές συνθήκες όταν το περιβάλλον γίνει ιδανικό. Κάτω από συνήθεις συνθήκες, όταν υπάρχει διαθέσιμη πηγή θρεπτικών συστατικών (π.χ. γλυκόζη), τα κύτταρα των ζυμών πολλαπλασιάζονται εκθετικά μέχρι όπου τα επίπεδα γλυκόζης αρχίσουν να εξαντλούνται. Τελικώς, τα κύτταρα θα φτάσουν σε μία στάσιμη φάση και στη συνέχεια θα εισέλθουν σε μία ήρεμη φάση. Όλες αυτές οι σχετικά αργές μεταβάσεις συνδέονται με μεγάλες αλλαγές στη μεταγραφή. Μία ξαφνική έλλειψη γλυκόζης στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων μπορεί να προκαλέσει μεγάλη μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων. Ο μηχανισμός αυτός μιμείται σε ένα σημαντικό βαθμό το μηχανισμό που εκδηλώνεται σε καταστάσεις μεγάλου περιβαλλοντικού στρες, υποδηλώνοντας ότι και οι δύο προαναφερθέντες μηχανισμοί ρυθμίζονται από το ίδιο “κέντρο” [9], [16], [17].

Μεταξύ των πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στη διαδικασία, οι κινάσες παίζουν καθοριστικό ρόλο στις φάσεις ανάπτυξης που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η *PKA* έχει κεντρικό ρόλο σε φαινόμενα αύξησης μεγέθους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Μέσω στοχοποίησης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, η *PKA* ελέγχει ταυτοχρόνως τη επαγωγή των γονιδίων που σχετίζονται με το μέγεθος.

Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης αλλά και καθ'όλη τη διαυξητική φάση μετάβασης, η μεταγραφική ικανότητα των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την προστασία κατά του στρες ρυθμίζεται από δύο στενά συσχετιζόμενους μεταγραφικούς παράγοντες, το *Msn2* και το *Msn4*. Πράγματι, μεταβολές στη δραστηριότητα του *Msn2* έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες

διατροφικών διακυμάνσεων και ποικίλων περιβαλλοντικών παραγόντων στρες. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, ο παράγοντας *Msn2* ελέγχει 150 γονίδια και συνήθως εδρεύει στο κυτταρόσωμο όταν η δραστηριότητα του *PKA* είναι υψηλή.[20] Παρόλα αυτά, είτε σε καταστάσεις στρες είτε χαμηλών επιπέδων γλυκόζης το *Msn2* αρχίζει να συσσωρεύεται στον πυρήνα φαινόμενο το οποίο είναι εύκολα αντιστρέψιμο με την απομάκρυνση του στρεσογόνου παράγοντα ή με την αύξηση της δραστηριότητας του *PKA*.[8]

Τα κύτταρα έχουν την εκπληκτική ικανότητα να προσαρμόζονται στις αλλαγές του περιβάλλοντος διαμέσου πολύπλοκων βιοχημικών μονοπατιών. Το γλυκογόνο καθώς και η τρεχαλόζη αποτελούν τυπικά σημάδια-κόμβους της ταχύτατης προσαρμογής των ζυμών στις διάφορες περιβαλλοντικές μεταβολές.



Εικόνα 10: Σχηματικό διάγραμμα του μηχανισμού απόκρισης σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης

9.2 Γενετικός και μεταβολικός έλεγχος αναφορικά με το στρες

Τα κύτταρα τα οποία έρχονται σε επαφή με παράγοντες στρες αναπτύσσουν εντός λεπτών γενετικές και μεταβολικές αποκρίσεις οι οποίες εν τέλει οδηγούν το κύτταρο σε μια φάση-κατάσταση ανοχής απέναντι σε αυτούς τους παράγοντες. Η τρεχαλόζη και το γλυκογόνο ανήκουν πιθανότατα στην πρώιμη μεταβολική “απάντηση” όταν τα εκθετικώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα εκτεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες, $NaCl$, H_2O_2 και υψηλές συγκεντρώσεις $EtOH$ (>7%) ή σε ασθενή οργανικά οξέα (σορβικό οξύ, βενζοϊκό οξύ). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία αύξηση ενός από τους δύο υδατάνθρακες. Ένα γενικό γενετικό χαρακτηριστικό είναι η επαγωγή μίας μεγάλης ομάδας γονιδίων η οποία βασίζεται στην παρουσία ενός τουλάχιστον *cis* στοιχείου στον εκκινητή, ο λεγόμενος *STRE/CCCCT* (*stress responsive element*), [6] ο οποίος βρίσκεται υπό τον έλεγχο των παραγόντων *Msn2p* και *Msn4p*. Είναι σαφές ότι η ικανότητα των κυττάρων να αποθηκεύουν τους δύο αυτούς υδατάνθρακες συνδέεται άμεσα στον αριθμό των ενζύμων που έχουν πριν την έκθεση στο στρες.

9.3 Γενετικός και μεταβολικός έλεγχος αναφορικά με τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών

Σε αυτό το τμήμα εξετάζονται δύο ακραίες περιπτώσεις, όσο αφορά τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, για το γένος του *S. Cerevisiae*. Η πρώτη αφορά τη παντελή έλλειψη ενός απαραίτητου θρεπτικού συστατικού (*Nutrient Starvation*) η οποία προκαλεί διαταραχή στο τμήμα G_0/G_1 του κυτταρικού κύκλου και ακολουθείται από υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκογόνο και τρεχαλόζη. Η δεύτερη αφορά την περίσσεια σε όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, η οποία επιτρέπει στα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν με το μεγαλύτερο δυνατό ρυθμό. Η διατροφική “πείνα” προκαλείται με τη μεταφορά των εκθετικώς πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων σε ένα μέσο που έχει έλλειψη σε κάποιο απαραίτητο χημικό στοιχείο π.χ. άζωτο, άνθρακας, φωσφόρος και θείο. Η γενετική απόκριση των γονιδίων στο μεταβολισμό των αποθηκευμένων υδατανθράκων είναι αυστηρά

εξαρτώμενη από τη παρουσία των “*STRE*” cis-στοιχείων (*Stress Response Elements*) ή των παραγόντων *Msn2p/Msn4p*. [6], [8]

9.4 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Μεταξύ των δύο περιπτώσεων που αναφέρθηκαν προηγουμένως, τα κύτταρα ζύμης μπορεί να βρεθούν αντιμέτωπα στο φυσικό τους περιβάλλον και με κάποια πιο ήπια και συνήθη κατάσταση, όπως της προοδευτική μεταβολή στη συγκέντρωση κάποιου απαραίτητου θρεπτικού στοιχείου κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού. Μία τέτοια περίπτωση οδηγεί σε μόνιμη μεταβολή του γενετικού και μεταβολικού μηχανισμού του κυττάρου. Πειραματικώς, η κατάσταση αυτή μπορεί να παρομοιαστεί με μία συνεχή καλλιέργεια παρουσία ενός θρεπτικού συστατικού που βρίσκεται σε έλλειμμα ή με μία καλλιέργεια όπου ένα συστατικό μειώνεται σταδιακά ενώ όλα τα υπόλοιπα συστατικά παραμένουν σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η διαυξητική ανάπτυξη των ζυμών παρουσία πηγής άνθρακα, όπου παρατηρούνται μοναδικές μεταβολικές και γενετικές αλλαγές συμπεριλαμβανομένης της πρώιμης συσσώρευσης γλυκογόνου και της ταυτόχρονης μείωσης της διαδικασίας της γλυκόλυσης πριν τα κύτταρα εισέλθουν σε διαυξητική φάση ανάπτυξης.

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία έγινε μελέτη και αναφορά των μυκήτων και ειδικότερα το γένος *Saccharomyces cerevisiae*. Έγινε καταγραφή της πορεία της αλκοολικής ζύμωσης και αναλύθηκαν οι παράγοντες που επιδρούν αρνητικά στη πορεία της ζύμωσης. Έγινε, εν συνεχεία, διεξοδική αναφορά στη σύγχρονη οινοποιία και μελετήθηκαν οι μηχανισμοί απόκρισης αντιμετώπισης του περιβαλλοντικού στρες από το ζυμομύκητα μέσω των μεταγραφικών παραγόντων *Msn2* / *Msn4*. Κατέστη φανερό το γεγονός ότι οποιαδήποτε προσπάθεια βελτίωσης της απόδοσης της αλκοολικής ζύμωσης μπορεί να γίνει και σε γενετικό επίπεδο και όχι μόνο στηριζόμενη στον έλεγχο των επιμέρους περιβαλλοντικών παραμέτρων.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗΣ ΟΡΩΝ

Msn2 : Μεταγραφικός ενεργοποιητής που σχετίζεται με το Msn4p, ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες, που προκύπτει στη μετατόπιση από κυτόπλασμα στον πυρήνα, δεσμεύει το DNA στα μέλη της απόκρισης στο στρες στα γένη της απόκρισης.

STRE: Παράγοντες ανταπόκρισης στο στρες

HOG1 κινάσης: Ενεργοποιούμενη πρωτεΐνη κινάση που εμπλέκεται στη ρύθμιση της όσμωσης

NADH / NAD⁺ : Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο, είναι ένα συνένζυμο και καταλύει την μεταφορά ηλεκτρονίων.

ATP : **Τριφωσφορική αδενοσίνη**, τα μόρια ATP ενεργούν ως βραχυπρόθεσμες "βιολογικές μπαταρίες" οι οποίες διατηρούν την ενέργεια μέχρι να απαιτηθεί αυτή σε διάφορες βιολογικές διεργασίες

Θαλλός: Βλαστικό σώμα πολυάριθμων κατωτέρων φυτικών οργανισμών

Hsp : Πρωτεΐνη θερμικού σοκ

Ζυμώσεις batch : Ζυμώσεις στατικής φάσης.

TCA: Τρικαρβοξυλικό οξύ, ανάλογο του οξικού οξέος

PKA: Πρωτεΐνη κινάση, είναι μια οικογένεια ενζύμων, που σχετίζεται με την ρύθμιση της γλυκόζης, των σακχάρων και με τον μεταβολισμό των λιπιδίων

CIF1 : Σειρά γονιδίων που κωδικοποιεί την τρεχαλόζη.

CYC7 : Γενικός μεταγραφικός καταστολέας

YAP1 : μεταγραφικός παράγοντας, μεσολαβεί στην ανεκτικότητα στο άλας, εντοπίζει κυρίως στον πυρήνα

ROX1: είναι μια γονιδιακή ακολουθία που κωδικοποιεί τον αναστολέα υπό ανοξικές συνθήκες. Η γονιδιακή του ακολουθία έχει μελετηθεί και έχουν βρει ότι κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 368 αμινοξέων.

HAL1, HAL3: Γένη ζυμών.

ENA1: ATPάση άντληση νατρίου

Snf 1: είναι ένας από τους κύριους ρυθμιστές από τη ζύμωση μέχρι την αναερόβια αναπνοή, είναι ευαίσθητος στο θερμικό στρες και στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών.

GPD1: γλυκερόλη – φωσφορικό υδρογενάση, αυτή η πρωτείνη παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπιδίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γεώργιος Μπαλατσούρας, Μικροβιολογία Τροφίμων, εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα 2006.
2. Αμαλία Δ. Καραγκούνη – Κύρτσου, Γενική Μικροβιολογία, εκδόσεις Αθ. Σταμούλη, Αθήνα 2012
3. H.D. Belitz, W. Grosh, P.Schieberle, Χημεία Τροφίμων, 4^η έκδοση, εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη 2011.
4. Neil A. Campbell, Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steve A. Wasserman, Peter V. Minorsky, Robert B. Jackson, Βιολογία, τόμος 1, εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2010.
5. Rukhsana Hasan,¹ Christophe Leroy, Anne-Dominique Isnard, Jean Labarre, Emmanuelle Boy-Marcotte¹ and Michel B. Toledano², *Molecular Microbiology* (2002) 45(1), 233–241
6. Veerle De Wever, Wolfgang Reiter, Annalisa Ballarini, Gustav Ammerer and Cécile Brocard, A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation, *The EMBO Journal* (2005) 24, 4115–4123
7. Il-Sup Kim¹, Young-Saeng Kim², Hyun Kim³, Ingyol Jin³, and Ho-Sung Yoon^{1,2,*}, *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 Stress Response during High-Temperature Ethanol Fermentation *Mol. Cells* 35, 210-218, March 31, 2013

8. Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. & Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J* 15, 2227±2235.
9. Mager, W. H. & De Kruijff, A. J. J. (1995). Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev* 59, 506±531.
10. Gerner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H. & Schuller, C. (1998). Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* 12, 586±597.
11. Herve! Garreau,1 Rukhsana Nilofer Hasan,1 Georges Renault,1 Francisco Estruch,2 Emmanuelle Boy-Marcotte1 and Michel Jacquet1 Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiology* (2000), 146, 2113–2120
12. Gerner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., et al. (1998) Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* 12: 586–597.
13. Tristan Rossignol1, Laurent Dulau2, Anne Julien2 and Bruno Blondin1, Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation, *Yeast* 2003; 20: 1369–1385.
14. Χρηστιάς Χ. (1999). Μυκητολογία. Αγρότυπος Αθήνα
15. Webster, J. and Weber, R.W.S. (2007). Introduction to fungi. Cambridge : Cambridge University Press: 850 p., 3rd. edition

16. Daisuke Watanabe, Naoya Hashimoto, Megumi Mizuno, Yan Zhou, Takeshi Akao, Hitoshi Shimoi, Accelerated Alcoholic Fermentation Caused by Defective Gene Expression Related to Glucose Derepression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci, Biotechnol. Biochem.*, 77(11), 2255-2262, 2013
17. Daisuke Watanabe, Hong Wu, Chiemi Noguchi, Yan Zhou, Takeshi Akao, and Hitoshi Shimoi*, Enhancement of the Initial Rate of Ethanol Fermentation Due to Dysfunction of Yeast Stress Response Components Msn2p and/or Msn4p *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Feb. 2011, p. 934–941
18. John E. Hallsworth Ethanol-induced water stress in yeast, Volume 85, Issue 2, 1998, Pages 125–137
19. Jean Franc°ois *, Jean Luc Parrou , Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *FEMS Microbiology Reviews* 25 (2001) 125^145
20. Boy-Marcotte E¹, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M, Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1998 Mar;180(5):1044-52.
21. Hallsworth J.E., Nomura Y., Iwahara M. Ethanol-induced water stress and fungal growth. *J Ferment Bioeng.* 1998; 86:451–456.
22. Sales K., Brandt W., Rumbak E., and Lindsey G. (2000) The LEA-like protein HSP 12 in *saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta* 1463: 267-278
23. Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol.* 1997 Dec; 17(12):6982-93.

24. Alexandre H., Ansanay-Galeote V., Dequin S., Blondin B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2001;498:98–103.

25. Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M. & Prior, B. (1994b). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* 14, 4135–4144

26. Blomberg, A. & Adler, L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microbiol Physiol* 33, 145–212

27. Crowe J.H., Crowe L.M., Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms – the role of trehalose. *Science.* 1984;223:701–703

28. Bruning AR, Bauer J, Krems B, Entian KD, Prior BA (1998) Physiological and genetic characterization of osmosensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 170:99-105