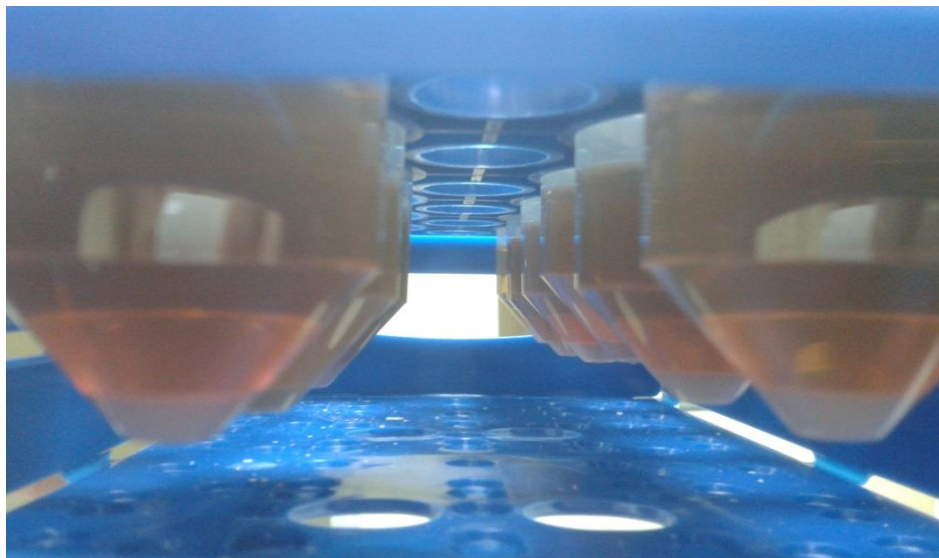


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



<<ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ ΣΗΜΕΙΑΚΕΣ
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΕΠΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
MSN2 ΚΑΙ MSN4>>



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΓΕΝΝΑΙΟΣ ΦΩΤΗΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2018

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

<<ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ
ΣΗΜΕΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΕΠΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ MSN2 ΚΑΙ MSN4>>

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΓΕΝΝΑΙΟΣ ΦΩΤΗΣ

Επιβλέπων καθηγητής :
Δρ. Σωτήριος Σπυρίδων Βαμβακάς

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Χημείας & Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας, του Α.Τ.Ε.Ι. Πελοποννήσου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέλαβαν στη διεκπεραίωση της με την καθοδήγηση, την στήριξη και την βοήθεια τους.

Κατά κύριο λόγο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Σωτήρη Βαμβακά για την καθοδήγηση και απεριόριστη βοήθειά του στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας, τόσο στην εκτέλεση του πειραματικού της μέρους όσο και στη συγγραφή της. Αλλά και για την στήριξη του και την κατανόηση που έδειξε σε όλη την διάρκεια της.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ τον κύριο Καπόλο για τις γνώσεις που μου μετέφερε και τη συμβολή του στη συγκέντρωση των αποτελεσμάτων και διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης οφείλω στην πολύ καλή φίλη και συνάδελφο Μαριαλένα Δαμιανάκη που δουλέψαμε μαζί στο εργαστήριο και συνέβαλε ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η πτυχιακή μελέτη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου καθώς και όλους τους φίλους μου που με στήριξαν και με βοήθησαν στο μέγιστο σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή τροφίμων και ποτών. Η πιο γνωστή και με τις περισσότερες εφαρμογές ζύμη, είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Η ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας επιτρέπει σήμερα την χρήση της αλκοολικής ζύμωσης για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Ο *S. cerevisiae* είναι ένας εξαιρετικός παραγωγός αιθανόλης, μεταξύ άλλων ζυμωτικών μικροοργανισμών και έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

Η δημιουργία ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους ζύμης που θα εμφάνιζε καλύτερα χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, θα επιτελούσε ταχύτερα την ζύμωση, θα ήταν ανθεκτικότερο στην αιθανόλη, καθώς και σε άλλες αντίξοες συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης θα μπορούσε να αποφέρει καλύτερα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Συνεπώς η βελτίωση της απόδοσης των ζυμώσεων αποτελεί σημαντικό αντικείμενο έρευνας και αφορά την τροποποίηση των συνθηκών ζύμωσης ή τη γενετική βελτίωση του μικροοργανισμού.

Όταν το κύτταρο βρεθεί σε κατάσταση stress οι μεταγραφικοί παράγοντες Msn2 και Msn4 ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλιώσεων από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες ώστε να εισέλθουν στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που βοηθούν το κύτταρο να αποκριθεί στο δυσμενές περιβάλλον. Ταυτόχρονα όμως ο έλεγχος της εισόδου των Msn2/4 στο πυρήνα ελέγχεται μέσω φωσφορυλιώσεων από το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση των Msn2/4 πρωτεϊνών από την PKA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου τους στον πυρήνα του κυττάρου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της ικανότητας ζύμωσης 8 διαφορετικών γενετικά τροποποιημένων στελεχών του ζυμομύκητα που έχουν κατασκευαστεί στο εργαστήριό μας χρησιμοποιώντας ως γενετικό υπόβαθρο, αυτό του αγρίου τύπου στελέχους W303-1a. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν τόσο η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) για τον προσδιορισμό του ρυθμού κατανάλωσης σακχάρων, όσο και η αέρια χρωματογραφία (GC) για τον προσδιορισμό του ρυθμού παραγωγής της αιθανόλης. Τα αποτελέσματα των δυο τεχνικών συνδυάστηκαν προκειμένου να

προσδιοριστεί η σταθερά της ταχύτητας της αντίδρασης έτσι ώστε να δειχθεί ποια γενετική τροποποίηση δίνει τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Λέξεις κλειδιά : Ζύμη, *Saccharomyces cerevisiae*, αλκοολική ζύμωση, Msn2, Msn4, μεταγραφικός παράγοντας, stress, στελέχη, υγρή χρωματογραφία, αέρια χρωματογραφία

ABSTRACT

Yeasts are widely used for food and beverage production. The best known yeast and with the most applications is *Saccharomyces cerevisiae*. The development of science and technology today allows the use of alcoholic fermentation to produce bioethanol. *S. cerevisiae* is an excellent ethanol producer, among other fermentative microorganisms and has the ability to survive in aerobic and anaerobic conditions.

The construction of a genetically modified yeast strain which could yield better results during alcoholic fermentation, showing a greater fermentation rate, increased resistance to ethanol as well as in any stress condition, would be more effective during ethanol fermentation. Therefore, improving the efficiency of fermentation is an important research field via either changing the conditions of fermentation or genetic improvement of the microorganism.

When the cell exposed to stress conditions, transcription factors Msn2/4 are activated via phosphorylation by various protein kinases in order to enter the cell nucleus and control the expression of genes that help cell to respond to stress. At the same time the translocation of Msn2/4 to nucleus is also controlled by protein kinase A (PKA) phosphorylation. Specifically, Msn2/4 proteins phosphorylation by PKA preventing the entry of Msn2/4 in the cell's nucleus.

The purpose of this thesis is the study of fermentation's capability of 8 different genetically modified strains which have been formulated in our lab, using as genetic background the wild type W303-1a strain. To accomplish this, high pressure liquid chromatography (HPLC) has been used, to determine the rate of sugar consumption and gas chromatography (GC) for the delineation of ethanol's production rate. The results of these to determination were combined in order to determine which of these genetically modified strains show the best results.

Key words: Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, alcoholic fermentation, *Msn2*, *Msn4*, , transcription factor, stress, HPLC, GC

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Λίγα λόγια για τις ζύμες.	3
1.2 Το γένος <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και η επικράτηση του.	3
1.2.1 Βιολογικός κύκλος ανάπτυξης των κυττάρων της ζύμης	5
1.3 Εφαρμογή του ζυμομύκητα στη βιομηχανία	7
1.4 Ο <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε συνθήκες στρες	7
1.5 Στρεσογόνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες	11
1.5.1 Επίδραση της αιθανόλης.....	11
1.5.2 Επίδραση της γλυκόζης (οσμωτικό στρες).....	12
1.6 Ο ρόλος των πρωτεϊνών Msn2 και Msn4	13
1.7 Η αλκοολική ζύμωση	14
1.7.1.Βιοχημεία της αλκοολικής ζύμωσης.	14
1.7.2 Σακχαρομύκητες και οινοποίηση.....	16
1.8 Χημική Ανάλυση	17
1.8.1 Χρωματογραφία	17
1.8.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός	19
1.8.3 Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών	20
1.8.4 Αέρια χρωματογραφία (GC).....	21
1.8.5 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου	33
1.8.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)	34
2. ΣΚΟΠΟΣ	46
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	48
3.1 Υλικά	48
3.2 Πειραματικές πορείες	49
3.2.1 Παρασκευή θρεπτικού μέσου 4x yep	49
3.2.2 Παρασκευή διαλύματος γλυκόζης	49
3.2.3 Ποσότητες στα falcon.....	50
3.2.4 Καλλιέργειες στελεχών	50
3.2.5 Εμβολιασμός με τα στελέχη	50
3.2.6 Δειγματοληψία	51
3.2.7 Θερμοκρασίες	51

3.2.8 Ποσότητες σε HPLC.....	52
3.2.9 Ποσότητες σε GC.....	55
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	58
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70
6.1 Ξενόγλωσση.....	70
6.2 Ελληνική.....	74

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λίγα λόγια για τις ζύμες.

Οι ζύμες είναι μία ομάδα μονοκύτταρων μυκήτων που ποικίλουν στην φυσιολογία και στην δομή. Πολλαπλασιάζονται ταχύτατα κάτω από αερόβιες συνθήκες, ενώ απουσία οξυγόνου μετατρέπουν τη γλυκόζη σε αιθυλική αλκοόλη. Αποτελούν την πιο σημαντική και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία μικροοργανισμών στον κλάδο τροφίμων και ποτών λαμβάνοντας μέρος σε διάφορες διεργασίες. Είναι σημαντικοί στην βιομηχανία τροφίμων ως τρόφιμα λόγω της ικανότητας τους να μετασχηματίζουν κοινά τρόφιμα, μέσω ζυμώσεων, σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Καλλιεργούνται με σκοπό την παραγωγή ζύμης αρτοποιίας (μαγιά), τη χρήση τους στις αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης και την παραγωγή διάφορων προϊόντων όπως οι βιταμίνες C και D. Μια από τις πιο γνωστές και ευρύτατα διαδεδομένη εφαρμογή από την αρχαία Ελλάδα είναι αυτή της αλκοολικής ζύμωσης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή οίνου και άλλων αλκοολούχων ποτών ενώ τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας επιτρέπει την χρήση της για την παραγωγή βιοαιθανόλης.

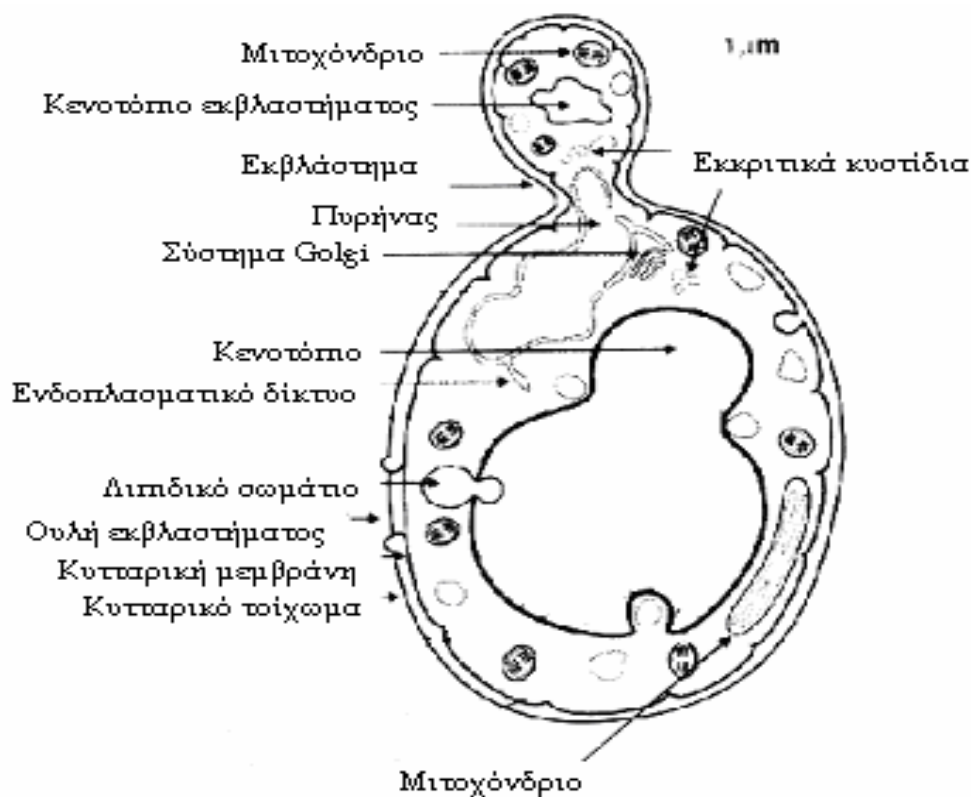
Ο μικροοργανισμός που διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο κατά την αλκοολική ζύμωση είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, είναι ο πιο καλά μελετημένος και χαρακτηρισμένος ευκαρυωτικός οργανισμός (Μπατρίνου, 2011).

1.2 Το γένος *Saccharomyces* και η επικράτηση του.

Η ονομασία "*Saccharomyces Cerevisiae*", μπορεί να διασπαστεί σε δύο λατινικές λέξεις, "*Saccharo*", που σημαίνει ζάχαρη και "*myces*", που σημαίνει μύκητας, ενώ "*Cerevisiae*", σημαίνει μπύρα, επομένως, μπορεί να μεταφραστεί ως ο "σακχαρούχος μύκητας της μπύρας" (VandenLangernberg, 2012).

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

δίκτυο και άλλα οργανίδια. Ο κυτταρικός φάκελος περιβάλλει και περικλείει τα κυτταρικά στοιχεία και συνίσταται, από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του κυττάρου, από την πλασματική μεμβράνη, τον περιπλασματικό χώρο, το κυτταρικό τοίχωμα, την κάψουλα και άλλες εξωκυτταρικές δομές (Εικ.1.2). Ο κυτταρικός φάκελος καταλαμβάνει περίπου το 15% του συνολικού όγκου του κυττάρου και παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της όσμωσης και της διαπερατότητας του κυττάρου (Walker, 1998).



Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση τυπικού κυττάρου *Saccharomyces cerevisiae* με εκβλάστημα.

Η συστηματική κατάταξη του *Saccharomyces cerevisiae* είναι:

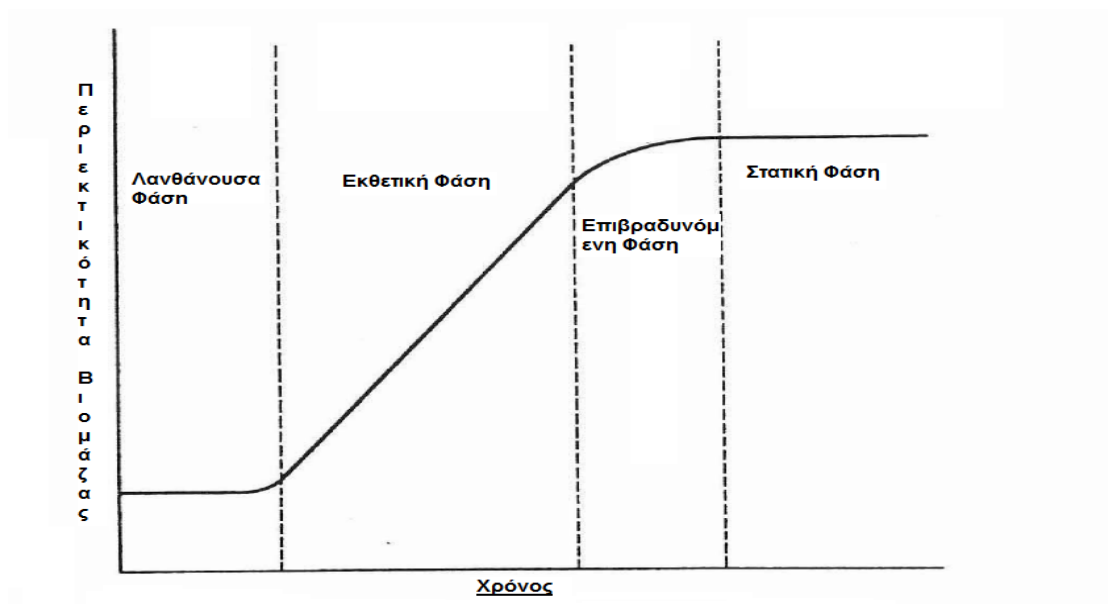
ΒΑΣΙΛΕΙΟ: Μύκητες

ΦΥΛΟ: Μυκόφυτα

ΚΛΑΣΗ: Ασκομύκητες
ΥΠΟΚΛΑΣΗ: Πρωτοασκομύκητες
ΤΑΞΗ: Ενδομύκητες
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: *Saccharomycetaceae*
ΓΕΝΟΣ: *Saccharomyces*
ΕΙΔΟΣ: *Saccharomyces cerevisiae*

(Παπανικολάου, 2006)

1.2.1 Βιολογικός κύκλος ανάπτυξης των κυττάρων της ζύμης



Εικόνα 1.2.1: Καμπύλη ανάπτυξης ζυμών

Η καμπύλη ανάπτυξης των ζυμών περιλαμβάνει τις εξής φάσεις:

Λανθάνουσα φάση αύξησης. Είναι η περίοδος μηδενικής αύξησης και λαμβάνει χώρα αμέσως μετά τον εμβολιασμό, όταν τα κύτταρα αντιμετωπίζουν αλλαγή στη θρέψη ή αλλαγές στις συνθήκες ανάπτυξης. Η φάση αυτή αντανακλά τον χρόνο που απαιτείται, ώστε να προσαρμοστούν τα κύτταρα στο νέο περιβάλλον. Κατά της φάση αυτή συντίθενται ριβοσωμάτια και τα ένζυμα που απαιτούνται για την απόκτηση ενός μεγαλύτερου ρυθμού αύξησης. Η διάρκεια της

λανθάνουσας φάσης εξαρτάται από τις συνθήκες, την πυκνότητα του εμβολιάσματος και το ιστορικό ανάπτυξης του μύκητα.

Επιταχυντική φάση αύξησης. Κατά την φάση αυτή η καλλιέργεια αρχίζει να αναπτύσσεται σε αριθμό και σε υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης.

Εκθετική φάση αύξησης. Ο ρυθμός της αύξησης σε αυτή τη φάση είναι μέγιστος και τα περισσότερα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση. Η διάρκεια της εκθετικής φάσης είναι σχετικά μικρή λόγω εξάντλησης των θρεπτικών στοιχείων, υπερβολικής συσσωμάτωσης κυττάρων ή συσσώρευσης ανασταλτικών μεταβολιτών.

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

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

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

Το γένος *S.cerevisiae*, όπως προαναφέρθηκε, είναι ο κύριος μικροοργανισμός που παίρνει μέρος στις αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης. Στην επικράτησή του αυτή συνεισφέρουν πολλοί παράγοντες. Η ταχεία παραγωγή αιθανόλης, η οποία είναι μια ισχυρά τοξική ουσία για αρκετούς μικροοργανισμούς, είναι ίσως το σημαντικότερο πλεονέκτημα του συγκεκριμένου ζυμομύκητα.

Εκτός από την ικανότητα ταχείας παραγωγής αιθανόλης σε μεγάλες ποσότητες, τα είδη του γένους *Saccharomyces* παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες που είναι δυνατόν να δημιουργηθούν κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η άνοδος της θερμοκρασίας είναι αποτέλεσμα της παραγωγή ενέργειας σε μορφή θερμότητας κατά τη ζύμωση. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι ορισμένα στελέχη του συγκεκριμένου είδους διατηρούν τη ζωτικότητά τους και συνεχίζουν τη ζύμωση ακόμα και όταν η θερμοκρασία πλησιάζει στους 38 °C ενώ οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αδυνατούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 25 °C (Μπέλκα, 2007).

1.3 Εφαρμογή του ζυμομύκητα στη βιομηχανία

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Σημαντική έρευνα επιτελείται για την βελτίωση της απόδοσης των ζυμώσεων είτε με την τροποποίηση των συνθηκών είτε με τη γενετική βελτίωση των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών. Η αλκοολική ζύμωση είναι γνωστή και εφαρμόζεται από την αρχαία Ελλάδα μέχρι σήμερα για την παραγωγή οίνου. Η ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας επιτρέπει σήμερα την χρήση της αλκοολικής ζύμωσης για την παραγωγή βιοαιθανόλης χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα διάφορες πηγές σακχάρων όπως καλλιεργήσιμα φυτά, απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων κ.α. Με ανανεωμένο ενδιαφέρον για την αιθανόλη ως βιώσιμο και καθαρό καύσιμο για τις μεταφορές και για την οικονομική παραγωγή αιθανόλης χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη πηγές κυτταρίνης, τον τελευταίο καιρό έχει γίνει ένα κομβικό σημείο σημαντικής έρευνας και προσπάθεια ανάπτυξης σε παγκόσμιο επίπεδο (Outlaw et al., 2005; Sanchez και Cardona, 2008; Wall et al., 2008; Vertes et al., 2010). Η παραγωγή αιθανόλης χαμηλού κόστους και υψηλής ποιότητας είναι σημαντικές προκλήσεις όσον αφορά την ανάπτυξη μιας βιοοικονομίας. Ο *S. cerevisiae* είναι ένας θαυμάσιος παραγωγός αιθανόλης, μεταξύ των πολυάριθμων ζυμοτικών μικροοργανισμών (Lin και Tanaka, 2006; Liu et al., 2008), ο οποίος συχνά καλείται ως ζύμη αρτοποιίας ή ως εκβλαστανούσα ζύμη, λόγω του τρόπου με το οποίο αναπαράγεται όπου είναι η εκβλάστηση και ο οποίος έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

1.4 Ο *Saccharomyces cerevisiae* σε συνθήκες στρες

Όλα τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να ανταποκριθούν σε ακραίες αλλαγές περιβαλλοντικών συνθηκών, ικανών να απειλήσουν τη βιωσιμότητά τους. Οι μηχανισμοί αντιμετώπισης των κυττάρων περιλαμβάνουν αισθητήρες και μονοπάτια μεταγωγής σημάτων από το περιβάλλον, που οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στα προγράμματα της γονιδιακής έκφρασης. Η επαγωγή ή η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης κάτω από συνθήκες stress επιτρέπει τη γρήγορη

προσαρμογή σε διαφορετικές συνθήκες, με αποτέλεσμα την αύξηση της “φυσικής κατάστασης” των κυττάρων και την επιβίωσή τους (Gasch et al., 2000). Στη ζύμη, έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες (TFs) που προωθούν τη μεταγραφή των εκατοντάδων διαφορετικών γονιδίων σε απόκριση σε ποικίλες συνθήκες stress (Estruch, 2000). Ενώ ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες προωθούν την μεταγραφή συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων, επιτρέποντας έτσι την προσαρμογή σε συγκεκριμένες καταπονήσεις, άλλοι προωθούν την μεταγραφή πολλών γονιδίων σε απόκριση σε μία ευρεία ποικιλία περιβαλλοντικών καταπονήσεων (Estruch, 2000).

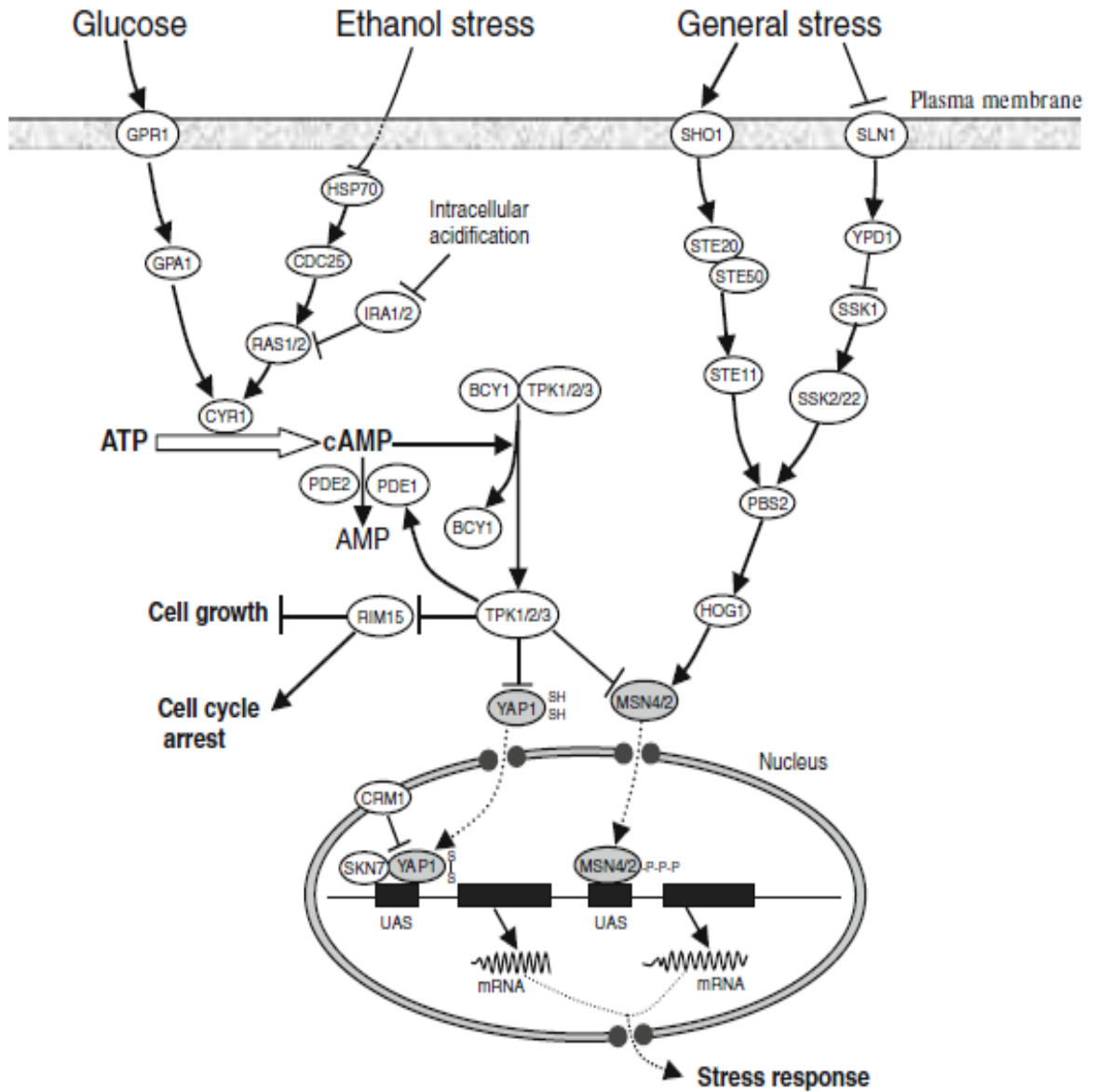
Όταν ο *S. cerevisiae* βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη κλπ, αφ’ ενός τα σάκχαρα αυτά εισέρχονται στο κύτταρο προκειμένου να αποδομηθούν και να παραχθεί ενέργεια, αφ’ ετέρου τα ίδια τα μόρια των σακχάρων κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης δρώντας ως προσδέτες (ligand). Η ρύθμιση της δραστηριότητας του μονοπατιού της cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) /PKA (πρωτεϊνική κινάση A) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού και του πολλαπλασιασμού κυττάρων ζύμης, που συνδέεται κατά κύριο λόγο με τη διαθέσιμη πηγή άνθρακα. Στον *S. cerevisiae*, σε απάντηση σε μια ραγδαία ζυμώσιμη πηγή άνθρακα όπως είναι η γλυκόζη, ενεργοποιείται η πρωτεΐνη Cyr1 (αδενυλική κυκλάση). Η δράση της αδενυλικής κυκλάσης έχει ως αποτέλεσμα την παροδική αύξηση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης, cAMP. Η Πρωτεϊνική κινάση A (PKA) είναι ένα ετεροτετραμερές που αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες. Οι καταλυτικές υπομονάδες κωδικοποιούνται από τρία γονίδια (TPK1, TPK2 και TPK3), ενώ οι ρυθμιστικές υπομονάδες κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο (BCY1). Η cAMP δρα ως αγγελιοφόρο μόριο δεσμεύοντας και απομακρύνοντας τις ρυθμιστικές υπομονάδες έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA. Η αποκατάσταση των επιπέδων της cAMP ελέγχεται από τις φωσφοδιεστεράσες χαμηλής και υψηλής συγγένειας, που κωδικοποιούνται από τις PDE1 και PDE2 αντίστοιχα, οι οποίες υδρολύουν την cAMP σε AMP. Ακολούθως, η ενεργοποιημένη PKA επηρεάζει διάφορους στόχους συχνά στο επίπεδο της μεταγραφής γονιδίων, όπως τη διέγερση της κυτταρικής ανάπτυξης και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την επαγωγή της γλυκόλυσης, την αναστολή της γλυκονεογένεσης, και την κινητοποίηση του γλυκογόνου και της τριαλόζης

(Thevelein και Winde, 1999; Santangelo, 2006; Tamaki, 2007; Gancedo, 2008; Smets et al., 2010).

Η PKA μπορεί να ενεργοποιηθεί σε απόκριση στην γλυκόζη από δύο παράλληλα μονοπάτια σηματοδότησης. Το πρώτο εμπλέκει τις Ras1 και Ras2 μικρές GTPases, οι οποίες ενεργοποιούνται από την πρόσληψη γλυκόζης και την εν συνεχεία φωσφορυλίωση τους. Το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει την Gpr1 (ένας υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνες) και την Gα πρωτεΐνη του Gra2. Και τα δύο αυτά μονοπάτια συγκλίνουν προς την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή της cAMP (Thevelein και Winde, 1999; Santangelo, 2006; Gancedo, 2008).

Η ενεργοποίηση της PKA έχει σημαντική επίδραση στη γονιδιακή έκφραση. Συνεπώς, αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν ενδοκυττάριους στόχους της PKA. Δύο από αυτούς είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες Msn2 και Msn4, οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που ελέγχονται από τις αλληλουχίες απόκρισης στο stress (Stress Responsive Elements (STRE)) (Estruch και Carlson, 1993; Martinez-Pastor et al., 1996; Schmitt και McEntee, 1996).

Ως STRE ορίζονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται στους προαγωγείς των γονιδίων στόχων και οι αλληλουχίες αυτές αναγνωρίζονται από τους Msn2 και Msn4 μεταγραφικούς παράγοντες, δεσμεύονται πάνω σε αυτές και ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων στόχων(Εικ.1.4). Οι Msn2 και Msn4 είναι δύο ομόλογες, κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική απόκριση σε συνθήκες stress, μεταγράφοντας εκατοντάδες γονίδια μετά από έκθεση σε ποικίλες συνθήκες (Boy-Marcotte et al., 1998; Görner et al., 2002;. Hasan et al., 2002; Kandrор et al., 2004). Οι Msn2/4 βρίσκονται στην καρδιά ενός πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει πολλές φυσικές και γενετικές αλληλεπιδράσεις με διάφορες κινάσες, φωσφατάσες, μεταφορείς και αναδιαμορφωτές χρωματίνης.



Εικόνα 1.4: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που εμπλέκονται στην απόκριση σε συνθήκες stress λόγω της γλυκόζης, της αιθανόλης και των γενικών περιβαλλοντικών συνθηκών στο *S. cerevisiae*. Σκιασμένοι είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες. Οι γραμμές που καταλήγουν με ένα βέλος δείχνουν θετική αλληλεπίδραση, και αυτές που καταλήγουν με μία κάθετη προς το βέλος γραμμή, δείχνουν αρνητική αλληλεπίδραση.

1.5 Στρεσογόνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στρεσογόνοι ονομάζονται οι παράγοντες εκείνοι που με την παρουσία τους επιδρούν αρνητικά στην λειτουργικότητα των κυττάρων των ζυμών και συνεπώς στις αποδόσεις των ζυμώσεων. Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται σε: Φυσικούς παράγοντες: Σε αυτούς περιλαμβάνονται η υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία, η υψηλή οσμωτική πίεση, η έλλειψη νερού, οι υψηλές υδροστατικές και ατμοσφαιρικές πιέσεις και οι διάφορες ακτινοβολίες. Χημικούς παράγοντες: Τέτοιοι είναι η αιθανόλη και άλλοι τοξικοί μεταβολίτες, τα περιορισμένα θρεπτικά συστατικά, το οξειδωτικό στρες, το pH και τα χημικά μεταλλαξιγόνα. Βιολογικούς παράγοντες: Φαινόμενα όπως η γήρανση των κυττάρων, οι γενοτυπικές αλλαγές, ο ανταγωνισμός από άλλους οργανισμούς κ.α. επηρεάζουν επίσης αρνητικά τον μεταβολισμό των κυττάρων. Από τους παραπάνω στρεσογόνους παράγοντες αυτοί που ενδιαφέρουν και μελετώνται είναι η συγκέντρωση της αιθανόλης και η οσμωτική πίεση (μεγάλη συγκέντρωση γλυκόζης).

1.5.1 Επίδραση της αιθανόλης

Η αιθανόλη όπως και άλλες αλκοόλες όταν συγκεντρώνονται στο θρεπτικό υλικό δρουν ως χημικοί στρεσογόνοι παράγοντες για τους μικροοργανισμούς. Η αιθανόλη μπορεί να είναι τοξική για τα κύτταρα των ζυμών σε συγκεντρώσεις 8-18 % κ.ο. γεγονός που εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και τη μεταβολική κατάσταση της καλλιέργειας. Μάλιστα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αιθανόλης, τόσο πιο έντονες γίνονται οι αρνητικές επιδράσεις της. Σε συγκέντρωση αιθανόλης 2% αρχίζει η καταστολή της πρόσληψης γλυκόζης και καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση καταστέλλεται και η μετακίνηση αμμωνιακών ιόντων και μερικών αμινοξέων. Η ζύμωση αναστέλλεται συνήθως πλήρως σε συγκεντρώσεις αιθανόλης περίπου 11% κ.ο. (Glazer et al., 1995). Οι ανασταλτικές επιδράσεις της αιθανόλης ενισχύονται από υψηλές θερμοκρασίες και από την έλλειψη θρεπτικών ουσιών (ιδιαίτερα ιόντων Mg^{+}) και άλλων μεταβολικών παραπροϊόντων όπως άλλες αλκοόλες, εστέρες, λιπαρά οξέα, αλδεΐδες, οργανικά οξέα, καρβονυλικές και φαινολικές ενώσεις (Jackson 1994, Walker 1998). Οι ανώτερες αλκοόλες εμφανίζουν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από την αιθανόλη

όμως η τοξικότητά τους περιορίζεται λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων στις οποίες παράγονται. Μια από τις κύριες τοξικές επιδράσεις της αιθανόλης είναι η κατάρρευση της ημίρρευστης κατάστασης της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς η αιθανόλη εισχωρεί στην μεμβράνη και διασπά τους δεσμούς λιπιδίου–πρωτεΐνης και λιπιδίου–λιπιδίου. Το αποτέλεσμα είναι η κυτταρική μεμβράνη να γίνεται ολοένα και πιο διαπερατή. Η ιοντική διαβάθμιση που αποτελεί την πρωτονιακή κινητήρια δύναμη διαμέσου της μεμβράνης, καταρρέει σιγά σιγά και μικρά μόρια διαρρέουν από το κύτταρο στο περιβάλλον με κατάληξη τον θάνατο του κυττάρου (Jackson 1994). Έχει βρεθεί πως η ανθεκτικότητα των διαφόρων στελεχών στην αιθανόλη σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη (You et al., 2003). Η κυτταρική μεμβράνη είναι από τους πρώτους και σημαντικότερους στόχους της αιθανόλης στον *S. cerevisiae* όμως δεν είναι ο μοναδικός.

1.5.2 Επίδραση της γλυκόζης (οσμωτικό στρες)

Υπεροσμωτικές συνθήκες μπορεί να δημιουργηθούν μετά από απώλεια ενδοκυτταρικού υγρού π.χ. κατά την παρασκευή ξηρής ζύμης ή ως αποτέλεσμα έκθεσης σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης (Walker, 1998). Έχει βρεθεί ότι η ικανότητα του *S. cerevisiae* να ζυμώνει σε μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι ανάλογη της ενεργότητας της ιμπερτάσης, η οποία υδρολύει την σακχαρόζη. Η υδρόλυση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη αυξάνει την οσμωτική πίεση και σύντομα η ζύμωση αναστέλλεται. Όταν ο *S. cerevisiae* εκτίθεται σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις, επάγεται μια πολύπλοκη αντίδραση που περιλαμβάνει γρήγορη ελάττωση του ενδοκυτταρικού όγκου λόγω εκροής νερού (Marechal et al. 1994, Meikle et al. 1988). Η γλυκερόλη είναι η πιο αποτελεσματική οσμωρυθμιστική διαλυτή ουσία στις ζύμες. Γι' αυτό και κάτω από υπεροσμωτικές συνθήκες, επάγεται η έκφραση ορισμένων γονιδίων, που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση της γλυκερόλης (Brewster et al., 1993, Schuller et al., 1994, Hirayama et al., 1995).

1.6 Ο ρόλος των πρωτεϊνών Msn2 και Msn4

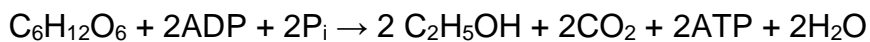
Ο ζυμομύκητας όπως και κάθε άλλος ζωντανός οργανισμός έχει την ικανότητα να προσαρμόζει τις λειτουργίες του ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Γενικά, κάθε συνθήκη η οποία αποκλίνει από τις βέλτιστες συνθήκες επιβίωσης και ανάπτυξης του ζυμομύκητα, χαρακτηρίζεται ως αντίξοη συνθήκη ή συνθήκη stress. Όπως αναφέρεται και στα προηγούμενα κεφάλαια η μεταβολή του pH, της θερμοκρασίας, της ωσμωτικής πίεσης, η παρουσία αιθανόλης είναι οι πιο συνήθεις αντίξοες συνθήκες στις οποίες ο ζυμομύκητας καλείται να όχι μόνο να επιβιώσει αλλά και να λειτουργήσει.

Οι πρωτεΐνες Msn2 και Msn4 είναι δύο μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε καταστάσεις κυτταρικού στρες. Η είσοδος τους στον πυρήνα είναι ένα σημείο ελέγχου καθοριστικής σημασίας. Ο έλεγχος της εισόδου αυτών των πρωτεϊνών στον πυρήνα γίνεται μέσω φωσφορυλίσεων συγκεκριμένων αμινοξέων σερίνης στην περιοχή σηματοδότησης της πυρηνικής μετανάστευσης (Nuclear Localization Signal (NLS)). Η φωσφορυλίωση αυτών των αμινοξέων, η οποία γίνεται από την πρωτεϊνική κινάση A, αναστέλλει την είσοδό τους στον πυρήνα. Το αμινοξύ Ser532 είναι ένα από αυτά τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται και εμποδίζουν την είσοδο των Msn2 και Msn4 στον πυρήνα.

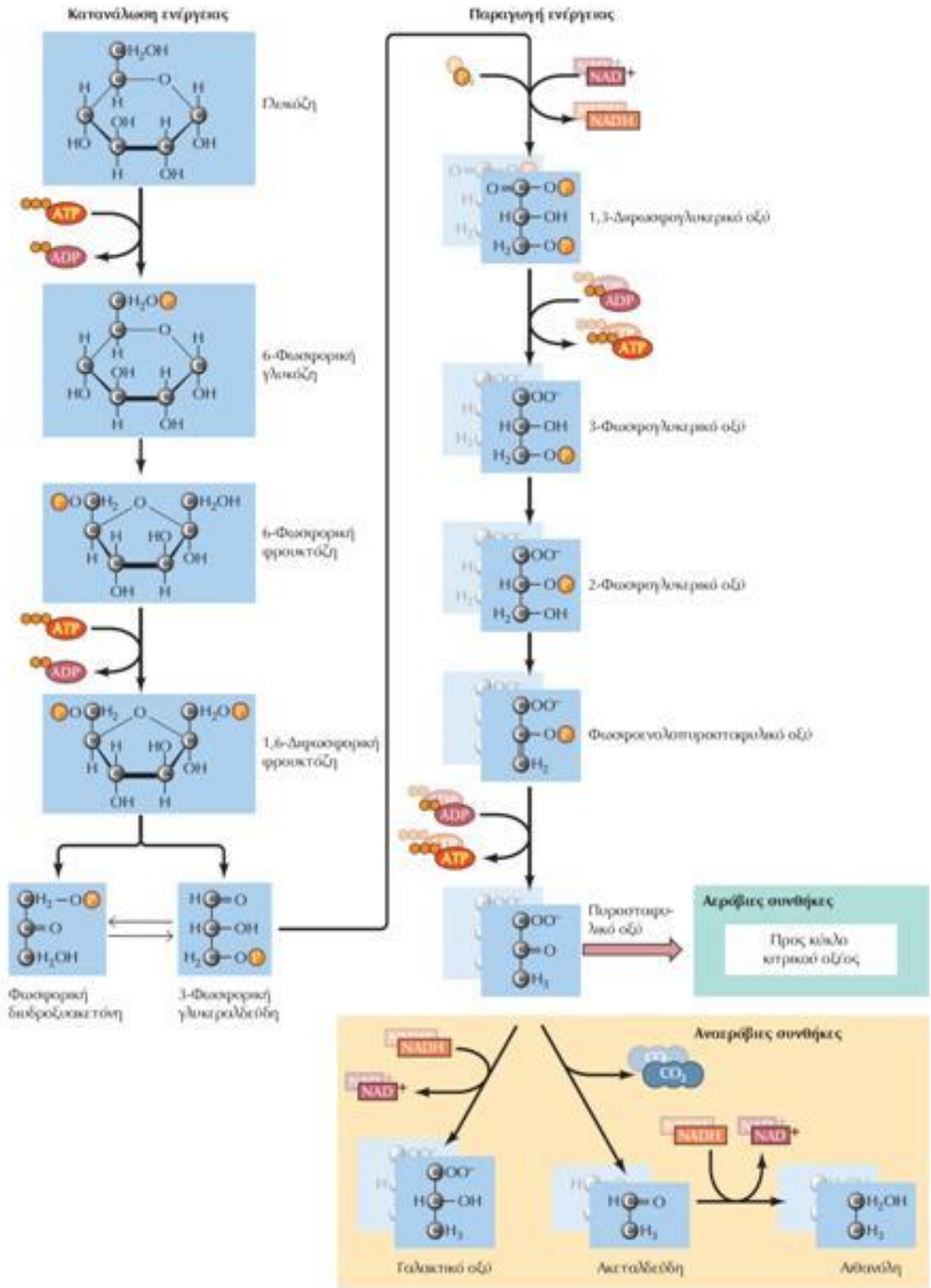
1.7 Η αλκοολική ζύμωση

1.7.1.Βιοχημεία της αλκοολικής ζύμωσης.

Αλκοολική ζύμωση ονομάζεται η βιοχημική μετατροπή των σακχάρων του τύπου $C_6H_{12}O_6$ (εξόζων) σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα με ταυτόχρονη έκλυση ενέργειας υπό τη μορφή ATP . Η όλη της διεργασία είναι αναερόβια . Η συνολική αντίδραση είναι η εξής :



Η μετατροπή του σακχάρου προς αιθανόλη γίνεται με έναν πολύπλοκο μηχανισμό , τα διάφορα στάδια του οποίου καταλύονται από μια σειρά ενζύμων (Σχήμα 1.7.1). Στην αλκοολική ζύμωση η αιθανόλη είναι ο τελικός δέκτης των ηλεκτρονίων ενώ η γλυκόζη ο δότης . Η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης φαίνεται στο Σχήμα 1.7.1, όπου περιγράφεται η αποικοδόμηση της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ (πορεία γνωστή ως γλυκόλυση) και στη συνέχεια σε αιθανόλη (πορεία γνωστή ως αλκοολική ζύμωση). Η ποσότητα όμως της αλκοόλης , καθώς και των πτητικών παραπροϊόντων εξαρτάται , εκτός από τις ζύμες και τις συνθήκες αερισμού και από τη θερμοκρασία της ζύμωσης. Γενικά ζυμώσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες δίνουν υψηλότερες συγκεντρώσεις αλκοόλης, λόγω εξάτμισής της σε υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 1.7.1: Η γλυκολυτική οδός

Η πολύπλοκη για τον άνθρωπο χημική αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης, γίνεται απλούστατη με τη δράση του ενζυμικού συστήματος των σακχαρομυκητών.

Πιο ειδικά τα είδη του γένους *Saccharomyces* ανήκουν στην υποκατηγορία των ασκομυκήτων. Οι σακχαρομύκητες διακρίνονται από τις άλλες ζύμες γιατί καταναλώνουν διάφορους υδατάνθρακες στα πλαίσια των μεταβολικών τους οδών μετατρέποντας τους σε αλκοόλη ενώ δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα νιτρικά ως πηγή αζώτου .

Οι σακχαρομύκητες είναι ο πιο διαδεδομένος μικροοργανισμός στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών γιατί είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός στην αλκοόλη και το SO₂, καταναλώνει πλήρως τα σάκχαρα του γλεύκους, τα οποία μετατρέπει σε αναερόβιες συνθήκες κυρίως σε αλκοόλη και αρωματικά συστατικά κι όχι σε βιομάζα, αναπτύσσεται και ζυμώνει ταχύτατα σε μικρές τιμές pH ή και σε χαμηλές θερμοκρασίες και μεγάλες πιέσεις, παράγει λίγο SO₂, H₂S, οξικό οξύ και ουρία, είναι ανθεκτικό απέναντι σε ανταγωνιστές μικροοργανισμούς, και καταβυθίζεται σχεδόν πλήρως μετά το πέρας της ζύμωσης. Η εμπειρική εφαρμογή του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης περιλαμβάνει την χρήση άγριων στελεχών ζυμών που υπάρχουν στις φλούδες των ραγών των σταφυλιών. Ο επιστημονικός χειρισμός του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης περιλαμβάνει την χρήση επιλεγμένων στελεχών που έχουν απομονωθεί στη φύση ή έχουν τροποποιηθεί στο εργαστήριο (Jackson, 1994).

1.7.2 Σακχαρομύκητες και οινοποίηση.

Η ζύμη που χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή και βιομηχανική οινοποίηση είναι ο *S. cerevisiae*. Ο μικροοργανισμός αυτός μπορεί να παράγει μέχρι και 12-15 αλκοολικούς βαθμούς, ενώ γενικά η βιωσιμότητά του μειώνεται πάνω από τους 8° και η δυνατότητα πολλαπλασιασμού του πάνω από τους 5 % νοί, ανάλογα με το στέλεχος. Είναι ο πιο διαδεδομένος μικροοργανισμός στην τεχνολογία των ζυμώσεων και ο πιο μελετημένος όσον αφορά της ιδιότητες και τις προοπτικές βελτίωσής του με επιλογή ή γενετική μηχανική. Η βελτίωση αφορά τη δημιουργία νέων στελεχών με αντοχή σε υψηλούς αλκοολικούς βαθμούς και σε ακραίες συνθήκες, όπως οι υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες, ιδιότητες με τεράστια τεχνολογική σημασία. (Margaritis και Merchant, 1984).

1.8 Χημική Ανάλυση

Ο στόχος της χημικής ανάλυσης είναι αρχικά, η ποιοτική ανίχνευση των συστατικών ενός δείγματος και στη συνέχεια, η ποσοτική αποτίμηση αυτών στο συγκεκριμένο δείγμα ενός φυσικού μεγέθους (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001). Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πείραμα και την ταξινόμηση των αναλυτικών μεθόδων προκύπτει:

Ταξινόμηση των αναλυτικών μεθόδων

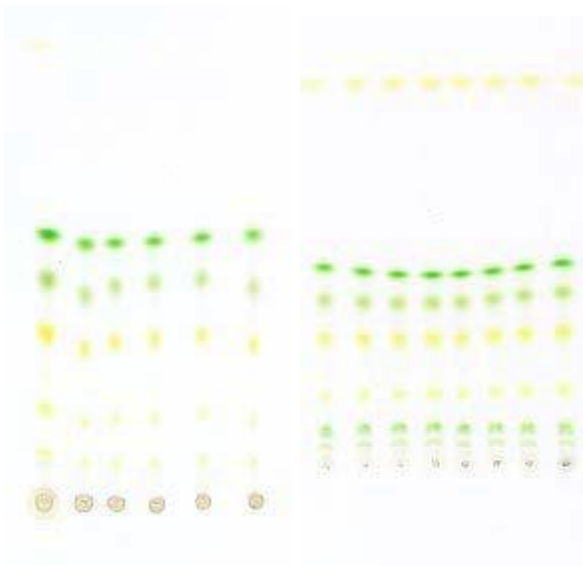
- Ενόργανες
 - Διαχωριστικές
 - Χρωματογραφικές τεχνικές
 - Αέρια Χρωματογραφία (GC)
 - Υγρή Χρωματογραφία (HPLC)

1.8.1 Χρωματογραφία

Σύμφωνα με τον ορισμό που δίνει η IUPAC, ως χρωματογραφία ορίζεται η τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μιγμάτων ουσιών στα συστατικά τους, με βάση την κατανομή αυτών σε δύο μη αναμιγνυόμενες φάσεις, η μία από τις οποίες είναι στατική, ενώ η άλλη κινείται. Η στατική φάση μπορεί να είναι υποστηριζόμενη από ένα στερεό ή μια πηκτή. Αφετέρου μπορεί να βρίσκεται πακτωμένη σε στήλη, τοποθετημένη ως στιβάδα, ή υμένιο κλπ. Η κινητή φάση μπορεί να είναι υγρή ή αέρια, ή υπερκρίσιμο ρευστό.

Ο έλεγχος της ποιότητας, η ανάλυση των τροφίμων και του περιβάλλοντος, αλλά επίσης και ο έλεγχος και η βελτιστοποίηση των χημικών αντιδράσεων και διαδικασιών βασίζονται όλα σε έναν αναλυτικό προσδιορισμό των ποσοτήτων των υλικών. Μια σπουδαία τεχνολογία στην ανάλυση και τον ποσοτικό διαχωρισμό μιγμάτων υλικών είναι η χρωματογραφία. Οι αρχές της χρωματογραφίας, όπως χρησιμοποιούνται σήμερα έχουν σαν αφετηρία τον βοτανολόγο Mikhail Semenovich Tswett. (1872 - 1919). Την εφηύρε στις αρχές του 20ου αιώνα (1903) ο Ρώσος βοτανολόγος Mikhail Tswett σε μια προσπάθεια του να διαχωρίσει

φυτικές χρωστικές, όπως χλωροφύλλες και ξανθοφύλλες, με διαβίβαση διαλύματός τους μέσω γυάλινου σωλήνα. Ως κινητή φάση (mobile phase) ο **Tswett** χρησιμοποίησε πετρελαϊκό αιθέρα και ως στατική φάση (stationary phase) στερεό προσροφητικό ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3). Οι διαχωριζόμενες ουσίες εμφανίζονταν ως χρωματιστές ζώνες στη στήλη και αυτός ήταν ο λόγος που η τεχνική αυτή πήρε τη συγκεκριμένη ονομασία. Επειδή οι πρώτες αυτές ουσίες ήταν έγχρωμες, η μέθοδος ονομάστηκε χρωματογραφία. (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001)



Εικόνα 1.8.1: Η εικόνα δείχνει τον διαχωρισμό με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας του εκχυλίσματος από φύλλα σφεντάμης (αριστερά) και φλαμουριάς. Το 1906 έγινε η δημοσίευση της συστηματικής του μελέτης.

Στη συνέχεια ο Kuhn χρησιμοποίησε τη χρωματογραφία υγρού-στερεού το 1931 για το διαχωρισμό των ξανθοφυλλών στο λευκό (ασπράδι) του αυγού. Το 1940 ο Tiselius διαμόρφωσε την τεχνική της χρωματογραφίας προσρόφησης. Ο ίδιος το 1941 διαμόρφωσε την υγρή χρωματογραφία. Ταυτόχρονα σχεδόν οι Martin και Synge διαμόρφωσαν την χρωματογραφία υγρού-υγρού. Το 1944 οι Conden, Gordon και Marlin διαμόρφωσαν τη χαρτοχρωματογραφία. Το 1951 ο Cremer διαμόρφωσε τη χρωματογραφία αερίου-στερεού, ενώ το 1952 εισήγαγε τη χρωματογραφία στερεού-υγρού. Το 1956 ο Van Deemter διατύπωσε τη θεωρητική επεξεργασία της αέριας χρωματογραφίας και ο Giddings το 1965 ανασκόπησε και συμπλήρωσε τη θεωρία της χρωματογραφίας.

1.8.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός

Η διεργασία διέλευσης της κινητής φάσης από τη χρωματογραφική στήλη καλείται έκλουση και για το λόγο αυτό η κινητή φάση αναφέρεται και ως διάλυμα έκλουσης. Τα συστατικά που εξέρχονται από τη στήλη ανιχνεύονται με διάφορους ανιχνευτές με βάση κάποια ιδιότητα. Κάθε συστατικό δίνει μια κορυφή με τη μορφή της καμπύλης του Gauss. Η γραφική παράσταση της απόκρισης του ανιχνευτή ως προς το χρόνο έκλουσης αποτελεί το **χρωματογράφημα**. Ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να εξέλθει από τη στήλη και να καταγραφεί από τον ανιχνευτή ονομάζεται **χρόνος συγκράτησης t_R (retention time)**, ενώ ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλουση ενός συγκεκριμένου συστατικού από τη στήλη, ονομάζεται **όγκος συγκράτησης V_R** .

Όπως αναφέρθηκε, τα συστατικά ενός μίγματος κατανέμονται μεταξύ της κινητής και ακίνητης φάσης και μάλιστα η κατανομή αυτή βρίσκεται σε μια δυναμική ισορροπία δηλαδή τα μόρια των ουσιών του μίγματος κινούνται γρήγορα από τη μία φάση στην άλλη και αντίστροφα. Η κατανομή αυτή ελέγχεται από μια σταθερά ισορροπίας που ονομάζεται συντελεστής κατανομής και συμβολίζεται με K :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

όπου C_s η συγκέντρωση της ουσίας στη στατική φάση και C_m η συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση. Η ταχύτητα κίνησης των μορίων ενός δείγματος κατά τη διάρκεια μιας χρωματογραφικής ανάλυσης δίνεται από τη σχέση

$$\text{ταχύτητα} = u \frac{1}{1 + K \frac{V_s}{V_m}}$$

όπου u είναι η γραμμική ταχύτητα της κινητής φάσης και V_s V_m οι όγκοι της στατικής και κινητής φάσης αντίστοιχα. Από την ανωτέρω εξίσωση της ταχύτητας, εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο συντελεστής κατανομής είναι αυτός που καθορίζει την ταχύτητα με την οποία θα κινούνται τα συστατικά του μίγματος κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Μάλιστα, όσο υψηλότερος είναι ο συντελεστής κατανομής για κάποιο συστατικό (δηλαδή όσο περισσότερα μόρια του συγκεκριμένου

συστατικού βρίσκονται στη στατική φάση) τόσο μικρότερη θα είναι η ταχύτητα κίνησης του συστατικού αυτού.

Με βάση τα ανωτέρω επιτυγχάνεται και ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος εφόσον αυτά ξεκινούν από την ίδια θέση, την ίδια χρονική στιγμή, όμως λόγω του διαφορετικού συντελεστή κατανομής κινούνται με διαφορετική ταχύτητα με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται μέσα στη στήλη και κατά συνέπεια να εμφανίζονται στην έξοδο αυτής σε διαφορετικούς χρόνους όπου και καταγράφεται το σήμα τους (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).

1.8.3 Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών

Αρχικά να διευκρινιστεί ότι οι χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι η αέρια (Gas Chromatography / GC) και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography / HPLC).

1.8.3.1 Ανάλογα με το μηχανισμό διαχωρισμού

1. Χρωματογραφία Προσρόφησης (adsorption), όταν ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική προσρόφηση των συστατικών του δείγματος στην επιφάνεια της ακίνητης φάσης που είναι συνήθως το διοξείδιο του πυριτίου (σίλικα). Η ισορροπία που αποκαθίσταται μεταξύ των προσροφημένων σωματιδίων και των σωματιδίων στην κινητή φάση, πετυχαίνει τον διαχωρισμό. Η αέρια χρωματογραφία που εκτελέστηκε ακολούθησε το διαχωρισμό προσρόφησης.

2. Χρωματογραφία Κατανομής (partition ή absorption), τα συστατικά του μίγματος κατανέμονται μεταξύ λεπτής στιβάδας υγρής στατικής φάσεως, που σχηματίζεται στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος και της υγρής κινητής φάσεως. Εάν η υγρή στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή φάση, πρόκειται για χρωματογραφία **κανονικής φάσεως**, ενώ στην αντίθετη περίπτωση έχουμε χρωματογραφία **ανάστροφης φάσεως** (**reversed phase chromatography**). Με βάση αυτό το διαχωρισμό εκτελέστηκε η υγρή χρωματογραφία στο πείραμα.

1.8.3.2 Ανάλογα με τη φύση της κινητής φάσης

Ανάλογα με τη φύση της κινητής φάσης διακρίνονται σε:

- Υγρή χρωματογραφία: η κινητή φάση είναι κάποιος διαλύτης ή μίγμα διαλυτών.
- Αέρια χρωματογραφία: η κινητή φάση είναι κάποιο αδρανές αέριο, συνήθως άζωτο, ήλιο ή αργό.

1.8.3.3 Ανάλογα με τη διάταξη της στατικής φάσης

Αποτελεί σημαντική παράμετρο στη διάταξη χρωματογραφικών τεχνικών. Και οι δύο κατατάσσονται ξανά στην ίδια κατηγορία, αυτή της **χρωματογραφίας στήλης**.

1.8.3.4 Ανάλογα με τη διεργασία ανάπτυξης

Και στις δύο τεχνικές πραγματοποιείται έκλουση των συστατικών του μίγματος με την κινητή φάση η οποία έχει μικρότερη συγγένεια προς τη στατική από τα συστατικά. Η συγγένεια των συστατικών προς τη στατική φάση καθορίζει τη διαφορετική ταχύτητα μετακίνησή τους.

Δύο βασικές τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν στην εργαστηριακή μελέτη είναι η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography – GC) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). Οι δύο αυτές τεχνικές, λόγω της μεγάλης ανάπτυξης της τεχνολογίας, προσφέρουν μεγάλη αναλυτική ακρίβεια σε ελάχιστο χρόνο και έχουν πολύ καλή εφαρμογή σε παρασκευαστικούς σκοπούς. (Παπαδόγιαννη και Σαμανίδου, 2001)

1.8.4 Αέρια χρωματογραφία (GC)

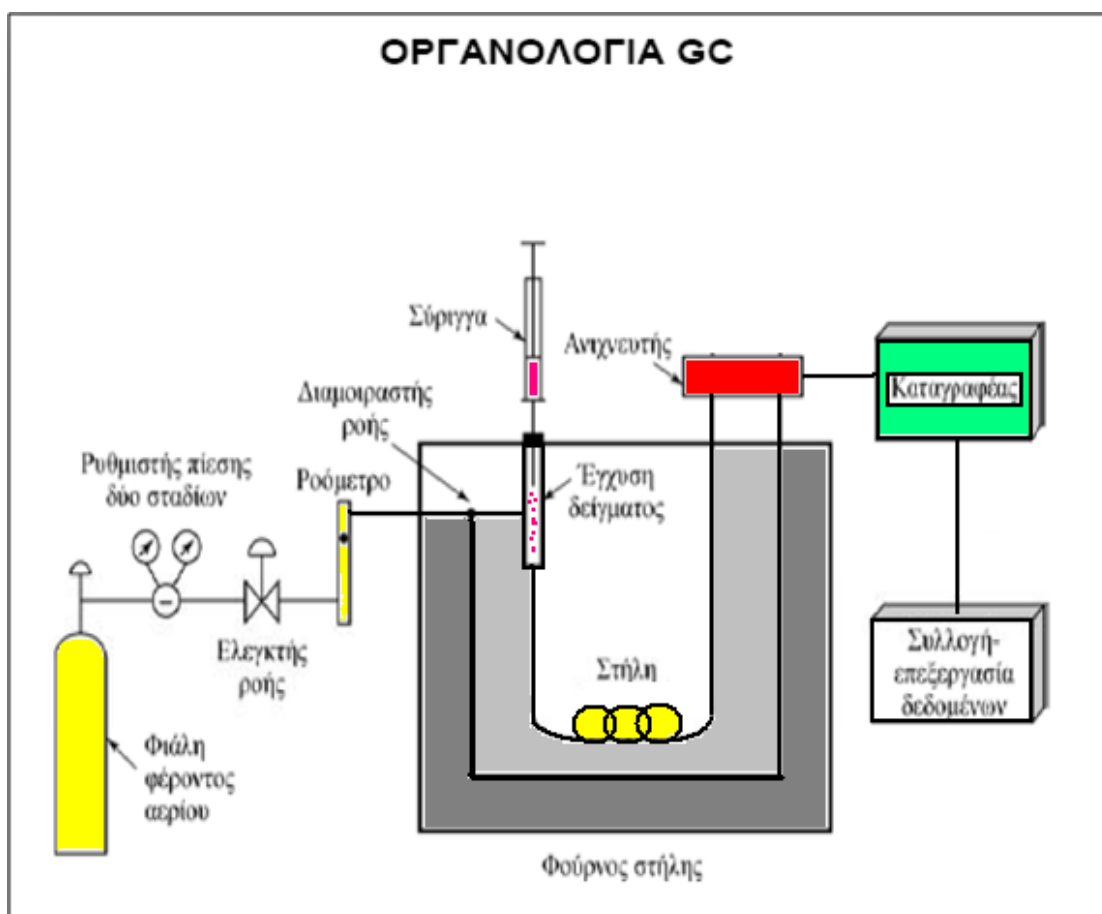
Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ιδιαίτερα ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία πενήντα χρόνια. Αποτελεί μία από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους

διαχωρισμού λόγω των χαρακτηριστικών που τη διακρίνουν, όπως η υψηλή επιλεκτικότητα, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή εάν λάβουμε υπ' όψιν τις μεγάλες δυνατότητες εφαρμογής που παρέχει. Οι Archer John Porter **Martin** και Richard Laurence Millington **Synge** το 1941 παρατήρησαν ότι η χρήση της αέριας φάσης διευκολύνει κατά πολύ το χρωματογραφικό διαχωρισμό. Επιπρόσθετα αναπτύχθηκε το 1952 από τους Martin και James, ενώ ο πρώτος αεριοχρωματογράφος διατέθηκε στο εμπόριο το 1959. Εφαρμόζεται κυρίως σε αναλυτική κλίμακα, δηλαδή σε ποσότητες δειγμάτων μικρότερες από 10^{-6} g, και οι ενώσεις πρέπει να είναι ή να καθίστανται πτητικές. Χρησιμοποιείται τόσο για ποσοτική (προσδιορισμός ποσότητας), όσο και για ποιοτική ανάλυση (προσδιορισμός ταυτότητας). Η βάση της εφαρμογής της είναι η κατανομή των συστατικών ενός πτητικού δείγματος ανάμεσα σ' ένα μη πτητικό διαλύτη (στατική φάση) και ένα αέριο (κινητή φάση/ φέρον αέριο). Η στατική φάση μπορεί να είναι στέρεα (GSC) ή υγρή (GLC). Στην GSC, ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση ή το μοριακό αποκλεισμό των συστατικών του μίγματος στη στατική φάση. Στην GLC/ GC, ο διαχωρισμός των συστατικών (αέριων ή πτητικών) βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού (στατική φάση) που είναι καθηλωμένο στο στέρεο φορέα ή τα τοιχώματα των ανοικτών τριχοειδών στηλών και ενός αερίου (κινητή φάση/φέρον αέριο).

Στα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας περιλαμβάνονται:

- Αρκεί το δείγμα να έχει μικρό μέγεθος και δεν απαιτείται εκτεταμένη προεργασία.
- Είναι αποτελεσματική στο διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων στα συστατικά τους ($N \sim 1,3 \cdot 10^6$).
- Γρήγορα αποτελέσματα.
- Υψηλή ακρίβεια (1-5% RSD).
- Κατάλληλη ευαισθησία για τον προσδιορισμό πτητικών οργανικών ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιεί ειδική συσκευή, τον αέριο χρωματογράφο, τα βασικά στοιχεία του οποίου φαίνονται στην εικόνα 1.8.4.



Εικόνα 1.8.4: Διάταξη αέριου χρωματογράφου

1.8.4.1 Φέρων αέριο

Στην αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται ως κινητή φάση ένα αέριο (φέρον αέριο), το οποίο συνήθως είναι ήλιο, άζωτο, αργό ή υδρογόνο. Βρίσκεται σε υψηλή πίεση από 100 έως 200 ατμόσφαιρες σε οβίδες από ανοξείδωτο υλικό. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται από τα συστατικά του προς εξέταση μίγματος. Δε θα πρέπει, παρολαυτά, να χρησιμοποιηθεί αέριο που περιέχει οξυγόνο, γιατί θα οξειδώσει τη στατική φάση και κατά συνέπεια, θα καταστρέψει τη στήλη. Η επιτυχής χρησιμοποίηση του αερίου ως κινητή φάση σ' ένα χρωματογραφικό σύστημα οφείλεται στα εξής πλεονεκτήματα:

- Το χαμηλό ιξώδες των αερίων επιτρέπει τη χρήση στηλών μεγάλου μήκους, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της στήλης.
- Η αδράνεια των αερίων όσον αφορά την αλληλεπίδραση τους με τα προς προσδιορισμό συστατικά καθιστά την ισορροπία κατανομής μεταξύ των δύο φάσεων πρακτικώς ανεξάρτητη από το αέριο.
- Υπάρχουν πολλοί απλοί, ευαίσθητοι και ταχείας αποκρίσεως ανιχνευτές, ικανοί να παρακολουθούν τις συγκεντρώσεις των ουσιών στην αέρια φάση.

1.8.4.2 Ρυθμιστές πίεσης- Ροόμετρο

Το φέρον αέριο διαβιβάζεται από τις οβίδες στο ρυθμιστή πίεσης, ο οποίος με σύστημα βαλβίδων και ενδιάμεσων θαλάμων μειώνει δραστικά την πίεση. Στη συνέχεια, το φέρον αέριο διέρχεται μέσα από ένα ροόμετρο, το οποίο μετρά με ακρίβεια την ταχύτητά του. Συνήθως η πίεση στην είσοδο της στήλης είναι 2-3 Atm, ενώ στην έξοδο ισούται προς την ατμοσφαιρική. Η τιμή της διαφοράς πίεσης εισόδου-εξόδου (ΔP) παίζει καθοριστικό ρόλο στον διαχωρισμό, γιατί αν μεν είναι πολύ χαμηλή, τα προς διαχωρισμό συστατικά λόγω διάχυσης θα συνενωθούν (αλληλεπικαλυφθούν) και η διαχωριστική ικανότητα της στήλης θα μειωθεί. Αν πάλι η ΔP είναι πολύ μεγάλη, η αντίσταση στη μεταφορά της μάζας των προς διαχωρισμό ουσιών αυξάνεται υπερβολικά και πάλι η διαχωριστική ικανότητα της στήλης μειώνεται.

1.8.4.3 Θερμοστατούμενο σύστημα εισαγωγής δείγματος

Το δείγμα εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου με μία μικροσύριγγα, διαμέσου ενός ελαστικού διαφράγματος (septum) ή βαλβίδας (sampling valve). Ο θάλαμος του δείγματος είναι ήδη προθερμασμένος σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 50 °C), ώστε να εξαερωθούν τα υγρά δείγματα, και να μεταφερθεί το προς εξέταση δείγμα στη στήλη σχεδόν ακαριαία. Υφίστανται δύο τρόποι εισαγωγής του δείγματος:

i) Χωρίς διαμοιρασμό (splitless injection):

Σε αυτήν τη μέθοδο ο εγχυτής αποτελείται από ένα θερμαινόμενο θάλαμο που περιέχει στο εσωτερικό του έναν υάλινο σωλήνα εντός του οποίου εγχέεται το

δείγμα μέσω ενός διαφράγματος. Συνήθως ο χώρος εισαγωγής του δείγματος θερμαίνεται σε θερμοκρασία ελαφρώς υψηλότερη από την τελική θερμοκρασία έκλουσης του χρωματογράφου.

Εν τέλει, το φέρον αέριο εξέρχεται έχοντας διαχωριστεί σ' ένα μίγμα που το περιέχει, στο διαλύτη και τις διαλυμένες ουσίες.

ii) Προγραμματιζόμενη Θερμοκρασία Εξαέρωσης (PTV injection):

Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιείται μικρότερος σε μέγεθος εγχυτής. Ο σωλήνας εξαέρωσης περιέχει χαλαζιοβάμβακα, ο οποίος κατακρατεί τα σταγονίδια νερού. Η αρχική θερμοκρασία έκχυσης είναι κατά 10 °C μικρότερη από το σημείο ζέσης του διαλύτη. Μετά την έξοδο της σύριγγας, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 300 °C.

1.8.4.4 Κλίβανος ισόθερμης ή κυμαινόμενης θερμοκρασίας

Οι πληροφορίες που παίρνουμε από την αέρια χρωματογραφία, τόσο οι ποιοτικές, όσο και οι ποσοτικές, βασίζονται στην απόλυτη επαναληψιμότητα των δεδομένων των χρόνων συγκράτησης. Σε αυτό το χώρο βρίσκεται η στήλη. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή ή δύναται να μεταβάλλεται με βάση κάποιο καθορισμένο πρόγραμμα, ώστε να εμφανιστούν οι διακριτές κορυφές για τις ενώσεις, των οποίων τα σημεία ζέσεως βρίσκονται σε ευρεία περιοχή θερμοκρασιών. Ο χρόνος συγκράτησης για κάθε συστατικό είναι δυνατό να υποδιπλασιαστεί, αν αυξηθεί η θερμοκρασία κατά 30°C. Για το λόγο αυτό πρέπει να υπάρχουν φούρνοι ακριβείς, συνήθως με ακρίβεια 0,1°C και η αύξηση της θερμοκρασίας κατά την πορεία της ανάλυσης, πρέπει να είναι η ελάχιστη δυνατή. Ο φούρνος μέσα στον οποίο τοποθετείται η στήλη πρέπει να μπορεί να καλύπτει θερμοκρασίες από 50 °C μέχρι 450 °C. Εκτός από αυτό, πρέπει και οι συνθήκες που επικρατούν μέσα στο φούρνο, να είναι αυστηρά επαναλήψιμες. (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001)

1.8.4.5 Στήλη (Column)

Η στήλη αποτελεί ένα από τα βασικότερα εξαρτήματα της χρωματογραφίας, αφού περιέχει τη στατική φάση όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των

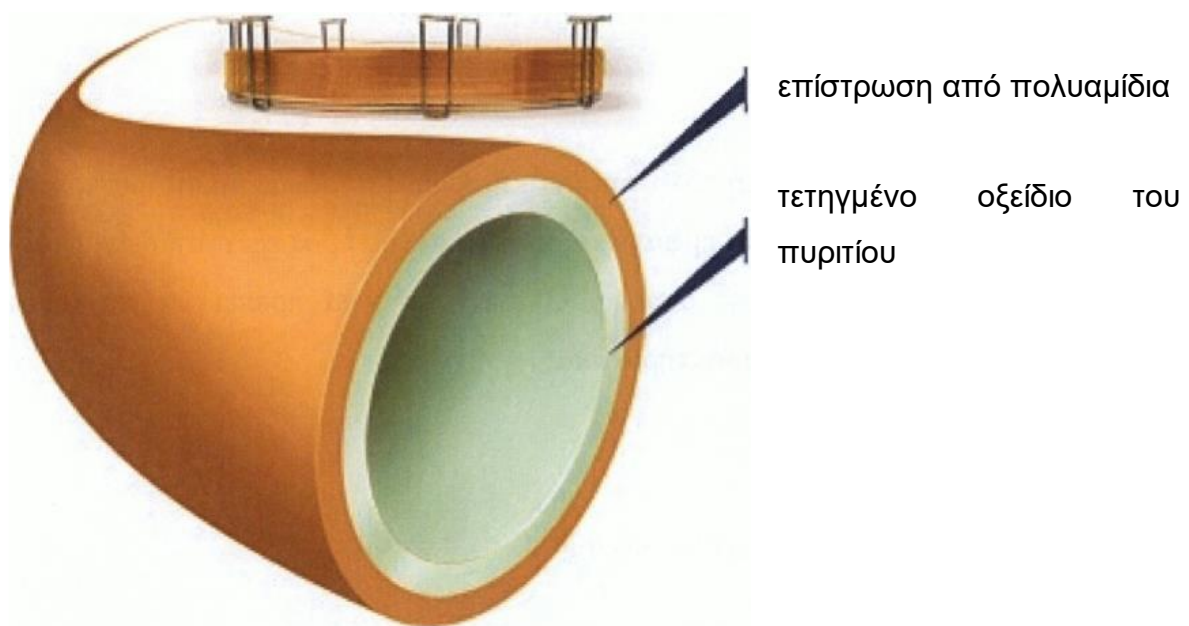
συστατικών του δείγματος. Η ποιότητα της χρωματογραφικής στήλης εξαρτάται από τα εξής χαρακτηριστικά:

- Διαχωριστικότητα
- Αριθμός θεωρητικών πλακών
- Απαιτούμενος χρόνος για την ανάλυση
- Διαφυγή υποβάθρου-σταθερότητα στήλης
- Πολικότητα στατικής φάσης
- Γεωμετρικά χαρακτηριστικά στήλης (εσωτερική διάμετρος, μήκος, πάχος στιβάδας στατικής φάσης)

Μία στήλη αποτελείται από το υλικό σωλήνα (tubing material) και τη στατική φάση (στέρεο υπόστρωμα, υγρή φάση, πορώδη πολυμερή ή προσροφητικά υλικά). Οι στήλες διχοτομούνται σε πακεταρισμένες και τριχοειδείς. Οι τριχοειδείς στήλες χαίρουν σήμερα ευρείας εφαρμογής. Έχουν διάμετρο 0,1mm με 0,6mm και το μήκος τους κυμαίνεται από 15 έως 80 μέτρα. Συνήθως έχουν τη μορφή σπείρας, ώστε να μην καταλαμβάνουν πολύ χώρο. Είναι κατασκευασμένες από ύαλο, μέταλλο ή οργανικά πολυμερή και σπανίως από στέρεο υπόστρωμα. Η χωρητικότητά τους είναι μικρή, αλλά δίνουν τη δυνατότητα χρησιμοποίησης εξαιρετικά μικρών δειγμάτων (1μg). Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από υψηλή διαχωριστικότητα που οφείλεται στον πολύ μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών (έως 10^6). Ο σωλήνας παραμένει ανοικτός με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρή πτώση πίεσης και να μην εμποδίζεται η κατασκευή μεγάλου μήκους στηλών. Οι κορυφές που δημιουργούνται είναι οξύληκτες και όχι πεπλατυσμένες, χάρη στην αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης, η οποία προκαλεί μείωση του χρόνου κατακράτησης της ουσίας (tr).

Οι τριχοειδείς στήλες, με κριτήριο τον τρόπο τοποθέτησης της στατικής φάσης διακρίνονται σε:

- WCOT (wall coated open tubular column) η υγρή στατική φάση προσδένεται απευθείας στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης.
- SCOT (support coated open tubular column) η υγρή στατική φάση προσδένεται σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο καλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα της στήλης
- PLOT (porous layer open tubular column) τα σωματίδια της στερεάς στατικής φάσης προσδένονται απευθείας στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης.



Σχήμα 1.8.4.5: Τριχοειδής στήλη τετηγμένου οξειδίου του πυριτίου, με προστατευτική επίστρωση από πολυαμίδια. Ένας δημοφιλής τύπος WCOT χρωματογραφικής στήλης.

Πλεονεκτήματα τριχοειδών στηλών:

1. Μεγάλος αριθμός θεωρητικών πλακών (μέχρι 500.000 σε σχέση με τις στήλες πλήρωσης 20.000).
2. Μικρότερη ποσότητα δείγματος (ng).
3. Μικρότερος χρόνος έκλουσης και ανάλυσης.
4. Μικρότερες θερμοκρασίες διαχωρισμού (20°C).
5. Η εξέλιξη της τεχνολογίας επιτρέπει διαχωρισμό μιγμάτων που δεν θα μπορούσαν να επιτευχθούν.
6. Με 3-4 στήλες καλύπτεται όλο το φάσμα των ενώσεων που μπορούν να διαχωριστούν.
7. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύζευξη με ανιχνευτές που επιτυγχάνουν ταυτοποίηση των ενώσεων.
8. Οι διαδρομές μέσα στη στήλη δεν έχουν κανέναν περιορισμό, άρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες μεγάλου μήκους και να επιτευχθεί μεγάλη διαχωριστική ικανότητα.

9. Υπάρχει μεγαλύτερη ευελιξία στην επιλογή ταχύτητας ροής φέροντος αερίου, λόγω πιο αμβλείας μορφής της καμπύλης Van Deemter. (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001)

Οι πακεταρισμένες στήλες περιέχουν στέρεο υπόστρωμα (χημικά αδρανές), συνήθως από γη διατομών ή κονιοποιημένο πυρίμαχο υλικό ή πορώδη οργανικά πολυμερή διαποτισμένα με κατάλληλο υγρό. Η εσωτερική τους διάμετρος κυμαίνεται από 1 έως 4mm και το μήκος τους από 1 έως 4 m. Χρησιμοποιούνται κυρίως στην ανάλυση αερίων και, κατά τη χρήση τους, παρατηρείται διεύρυνση του πλάτους των κορυφών λόγω της διάχυσης κατά ζώνη.

1.8.4.6 Ανιχνευτές (Detectors)

Η επιλογή του ανιχνευτή είναι σημαντική, καθώς αποτελεί το τμήμα του αερίου χρωματογράφου που καθιστά εμφανή τα συστατικά του προς εξέταση δείγματος στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης. Ο ανιχνευτής θα πρέπει να συγκεντρώνει κάποια από τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

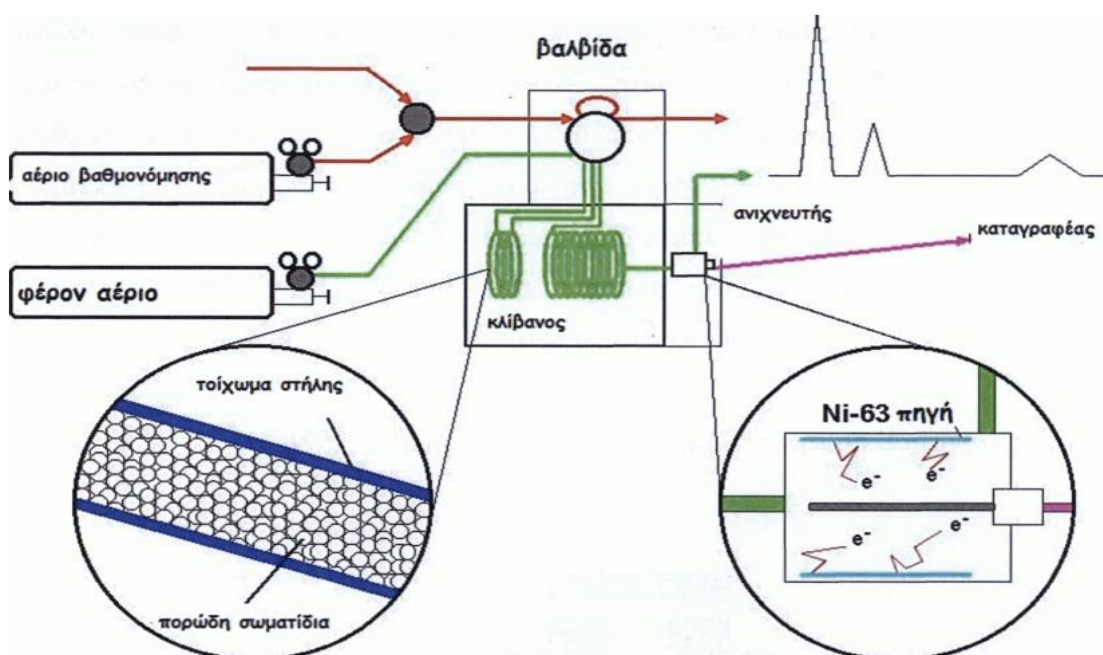
- Ευαισθησία
- Εκλεκτικότητα
- Θερμοκρασία λειτουργίας έως 400° C
- Αξιοπιστία
- Ευχρηστία
- Σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα
- Γραμμικά απόκριση στους αναλυτές, η οποία πρέπει να καλύπτει ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων.
- Μικρός χρόνος απόκρισης

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι οι εξής:

Ανιχνευτής δέσμησης ηλεκτρονίων - Electron Capture Detector (ECD)

Ο ανιχνευτής δέσμησης ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενώσεων που στο μόριό τους έχουν N ή O. Είναι ιδιαίτερα εκλεκτικός σε ενώσεις που περιέχουν αλογόνο-ομάδες (10^{-15} g/s για DDT, PCB κ.α.). Παρουσιάζει, όμως, μικρή ευαισθησία σε αμίνες, αλκοόλες και υδρογονάνθρακες. Τα εκχυλίσματα που

θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να είναι καθαρά, γιατί ο ανιχνευτής είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος.



Εικόνα 1.8.4.6.1: Ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων

Η λειτουργία του ανιχνευτή βασίζεται στη μεταβολή της αγωγιμότητας του αερίου που διέρχεται απ' αυτόν, εξαιτίας των ηλεκτρονίων που παράγονται από μια ραδιενεργή πηγή (Ni-63), η οποία υπάρχει μέσα στον ανιχνευτή. Τα εκπεμπόμενα ηλεκτρόνια ιονίζουν το φέρον αέριο N_2 δημιουργώντας ρεύμα. Από το 1960 που εισήχθη η μέθοδος ανίχνευσης δέσμευσης ηλεκτρονίων επιτράπη η ταυτόχρονη ανάλυση ποικίλων χλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε επίπεδα ανίχνευσης 100 φορές μικρότερα από αυτά που επιτύγχαναν οι ανιχνευτές φλόγας. Το πρόβλημα, βέβαια, λύθηκε μερικώς, μόνο για τις ενώσεις όπου ο συγκεκριμένος ανιχνευτής παρουσιάζει ευαισθησία, όπως προαναφέρθηκε.

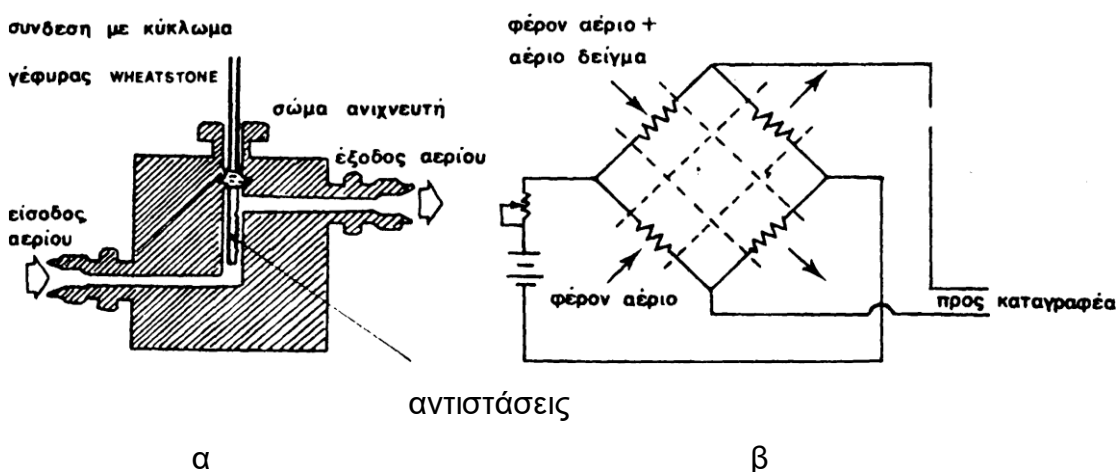
Ανιχνευτής Αζώτου-Φωσφόρου (N-PD)

Χρησιμοποιείται για τις ενώσεις που στο μόριό τους περιέχουν άζωτο ή/και φώσφορο. Αναφέρεται συχνά και ως θερμιοϊονικός ανιχνευτής. Τα βασικά του σημεία είναι ένα ακροφύσιο φλόγας, μία πηγή άλατος αλκάλεως και ένα θερμαινόμενο ηλεκτρόδιο συλλογής. Η χρήση των αλκάλων κάλιο, ρουβίδιο,

καΐσιο και νάτριο δημιουργεί τάση περίπου 300V στο συλλεκτικό ηλεκτρόδιο. Η ευαισθησία αυξάνεται με τον ατομικό αριθμό, ενώ η καθαρότητα και συγκέντρωση του αλκαλικού άλατος επηρεάζουν την απόδοση της ανίχνευσης. Το έκλουσμα της στήλης αναμιγνύεται με αέριο υδρογόνο και διέρχεται από τη φλόγα, η οποία δημιουργείται από το μίγμα υδρογόνου-αέρα. Τα άτομα του αλκάλειου ιονίζονται με την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται συλλέγονται, ενώ ταυτόχρονα παράγουν μία ροή ανάλογη του αριθμού των ιόντων. Η παρουσία αζώτου ή φωσφόρου αυξάνει το ρυθμό ροής και, ως αποτέλεσμα, αυξάνεται το σήμα.

Ανιχνευτής Θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector, TCD)

Αποτελείται από σύρμα-αντίσταση κατασκευασμένο από βολφράμιο και κατάλληλα τοποθετημένο στο θερμικά μονωμένο θάλαμο του ανιχνευτή. Το σύρμα θερμαίνεται με τη βοήθεια ρεύματος σταθερής έντασης.



Εικόνα 1.8.4.6.2: Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας

Το φέρον αέριο διερχόμενο μέσω του ανιχνευτή ψύχει το σύρμα με αποτέλεσμα την ελάττωση της ηλεκτρικής αντίστασής του. Επειδή τα διαχωριζόμενα συστατικά του μίγματος έχουν διαφορετικές τιμές θερμικής αγωγιμότητας από εκείνη του φέροντος αερίου, τόσο η θερμοκρασία όσο και η τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας

του σύρματος θα μεταβάλλονται καθώς το κάθε συστατικό του μίγματος θα διέρχεται μέσω του ανιχνευτή. Όσο μεγαλύτερη η διαφορά στην τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας των συστατικών του μίγματος και του φέροντος αερίου, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ευαισθησία της μεθόδου.

Τα παραπάνω σύρματα (filaments) συνήθως τοποθετούνται ανά ζεύγη, ένα ζεύγος που διαρρέεται από το δείγμα και το φέρον αέριο και ένα ζεύγος που διαρρέεται από το φέρον αέριο. Η σύνδεση τους είναι τέτοια ώστε να αποτελούν τις τέσσερις πλευρές γέφυρας Wheatstone.. Όταν μέσω του ανιχνευτή δεν διέρχεται δείγμα και οι τέσσερις αντιστάσεις αλληλοεξουδετερώνονται αφού έχουν την ίδια τιμή, με αποτέλεσμα να μην φθάνει σήμα στον καταγραφέα. Αντίθετα η είσοδος κάποιου συστατικού στον ανιχνευτή θα ελαττώσει την θερμική αγωγιμότητα του φέροντος αερίου που με τη σειρά της θα προκαλέσει μεταβολή στην ηλεκτρική αντίσταση των συρμάτων του δείγματος, με αποτέλεσμα την καταστροφή της ισορροπίας στην γέφυρα και τη δημιουργία κάποιου σήματος που θα φθάσει στον καταγραφέα.

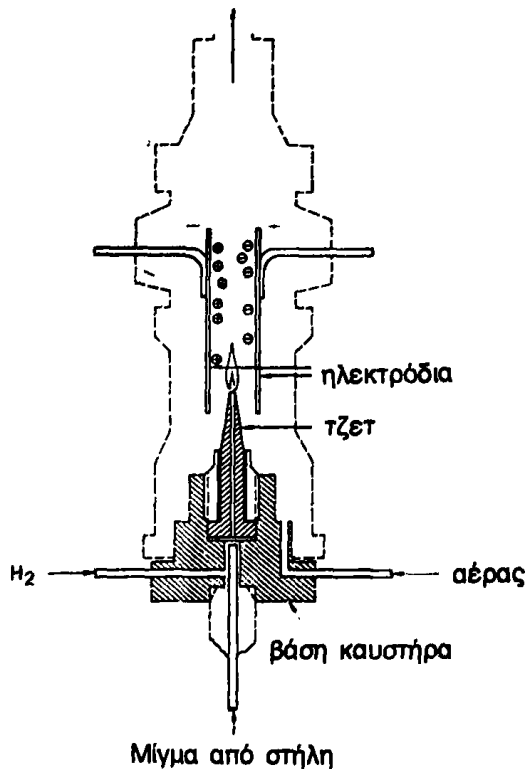
Ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- (α) ενδείκνυνται για τον προσδιορισμό ουσιών που δεν καίγονται π.χ. H_2O , CO_2 , N_2 κ.τ.λ.
- (β) παρέχει ευθύγραμμη απόκριση μεταξύ ευρέων ορίων συγκέντρωσης (γ) έχει αυξημένη ευαισθησία έναντι μεταβολών στη ροή του φέροντος αερίου και τη θερμοκρασία.
- (δ) δέχεται σαν φέρον αέριο τα: He, H_2 , N_2 , Ar, CO_2 .
- (ε) έχει σαν ανώτατο όριο λειτουργίας τους $500^{\circ}C$.

Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame ionization detector F.I.D.)

Αποτελείται από καυστήρα αερίου στο άκρο του οποίου καίγεται μίγμα υδρογόνου και αέρα παρουσία του φέροντος αερίου, οπότε δημιουργείται φλόγα θερμοκρασίας $2100^{\circ}C$.

έξοδος αερίου



Εικόνα 1.8.4.6.3: Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας

Όταν από τη στήλη εκτός του φέροντος αερίου εξέρχεται κάποιο συστατικό, καίγεται στο ακροφύσιο και ιονιζόμενο παράγει θετικά και αρνητικά φορτισμένα ιόντα, (Το H_2 παράγει πολύ λιγότερα ιόντα από οποιαδήποτε οργανική ουσία περιέχουσα άνθρακα). Γύρω από το ακροφύσιο υπάρχουν δύο ηλεκτρόδια (συλλέκτες ιόντων) τα οποία έλκουν τα σχηματιζόμενα ιόντα. Η κίνηση αυτή των ιόντων δημιουργεί ρεύμα της τάξης των 10^{-14} amp το οποίο αφού πολλαπλασιαστεί μετατρέπεται σε μηχανική κίνηση της γραφίδας του καταγραφέα (λήψη κορυφής που αντιστοιχεί στο εκλούόμενο από τη στήλη συστατικό).

Ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- (α) Ενδεικνύται για όλες σχεδόν τις οργανικές ουσίες.
- (β) Αντενδείκνυται για ανόργανες ουσίες, H_2O και αέρια, όπως O_2 , H_2S , CO_2 , NO_2 .
- (γ) Παρέχει ευθύγραμμη απόκριση μεταξύ ευρέων ορίων συγκέντρωσης,
- (δ) Έχει σαν ανώτατο όριο λειτουργίας την θερμοκρασία 40 CFC.
- (ε) Χρησιμοποιεί σαν φέρον αέριο το N_2 , He ή το Ar.
- (στ) Είναι περίπου 103 φορές πιο ευαίσθητος από τον ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (όριο ανίχνευσης $\sim 1ng$).

Ενισχυτές

Το σήμα που παράγεται από τον ανιχνευτή συνήθως δεν μπορεί να καταγραφεί όπως έχει. Οι σύγχρονοι ενισχυτές μπορούν, εκτός από απλή ενίσχυση συνεχούς τάσης, να μας δώσουν και ενισχυμένη παλλόμενη τάση (π.χ. στους ανιχνευτές δέσμευσης ηλεκτρονίων).

Σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας του σήματος

Μετά την ανίχνευση, το ηλεκτρικό σήμα που αντιστοιχεί σε κάθε συστατικό επεξεργάζεται και καταγράφεται είτε σε ολοκληρωτές, είτε σε υπολογιστές με κατάλληλο πρόγραμμα ολοκλήρωσης. Τελικά λαμβάνεται στον καταγραφέα το αεριο-χρωματογράφημα, το οποίο είναι μια σειρά κορυφών. Η μέτρηση της επιφάνειας των κορυφών οδηγεί στον ποσοτικό προσδιορισμό του δείγματος.

1.8.4.7 Εφαρμογές της αέριας χρωματογραφίας

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ενώσεων σε:

- τρόφιμα
- φάρμακα,
- προϊόντα πετρελαίου,
- βιομηχανίες αρωματοποιίας,
- περιβαλλοντικά δείγματα (PCB's, DDT, οργανοφωσφορικά, παρασιτοκτόνα κ.α.),
- τοξικολογία, δικονομική ανάλυση (π.χ. αιθανόλη στο αίμα οδηγών, ναρκωτικά σε βιολογικά υγρά, αίμα, ούρα, υγρά στομάχου). (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001)

1.8.5 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Οι αβεβαιότητες που εισάγονται κατά την έγχυση του δείγματος μειώνονται δραστικά με τη χρήση εσωτερικών προτύπων. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μια προσεκτικά μετρημένη ποσότητα μιας ουσίας, που αποτελεί το εσωτερικό πρότυπο, προστίθεται σε κάθε πρότυπο διάλυμα και σε κάθε δείγμα. Ως αναλυτική παράμετρος χρησιμοποιείται ο λόγος της επιφάνειας ή ύψους της κορυφής του αναλυτή προς την αντίστοιχη του εσωτερικού προτύπου.

Η χρήση του εσωτερικού προτύπου επιλέγεται για να ξεπεραστούν προβλήματα που προέρχονται από τυχαία και συστηματικά σφάλματα, καθώς τα σήματα του δείγματος και του εσωτερικού προτύπου θα επηρεάζονται στον ίδιο βαθμό, με αποτέλεσμα ο λόγος των σημάτων να είναι πιο σταθερός και επαναλήψιμος.

Για να είναι επιτυχής η μέθοδος, είναι απαραίτητο:

1. Η κορυφή του εσωτερικού προτύπου να διαχωρίζεται καλά από τις κορυφές των άλλων συστατικών του δείγματος ($R_s > 1,25$).
2. Η κορυφή του προτύπου να μην απέχει πολύ από την κορυφή του αναλυτή.
3. Να μην υπάρχει στο υπόστρωμα των πραγματικών δειγμάτων που θα αναλυθούν.
4. Να μην αντιδρά με την προσδιοριζόμενη ένωση ή να φθορίζει.
5. Να είναι σταθερή για μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να μη μεταβάλλεται η συγκέντρωσή της.

Με κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο, μπορούν να επιτευχθούν σχετικές επαναληψιμότητες καλύτερες από 1%.

1.8.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

Η HPLC διαμορφώθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '60 και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως στην αρχή της δεκαετίας του '70. Υπερτερεί της αερίου χρωματογραφίας διότι: (α) αναλύει απ' ευθείας και μη πτητικές ουσίες (μόνο το 20% των οργανικών ουσιών είναι πτητικές) π.χ. αμινοξέα, νουκλεϊνικά οξέα, χρωστικές, πολικά λιπίδια, πολυμερή, πρωτεΐνες κ.α. β) παρέχει τη δυνατότητα συνδυασμού δύο φάσεων (κινούμενη, στατική) για καλύτερο διαχωρισμό έναντι της μιας (στατικής) φάσης που παρέχει η GC, (γ) λειτουργεί σε θερμοκρασίες πολύ

χαμηλότερες της GC, οπότε ελαχιστοποιείται η πιθανότητα αποικοδόμησης ή απώλειας όλου ή μέρους του δείγματος,

Είδη και τεχνικές υγρής χρωματογραφίας:

Η χρωματογραφία προσρόφησης βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι ηλεκτροστατικής φύσης. Η χρωματογραφία προσρόφησης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ουσιών με παρόμοια δομή, αλλά με διαφορετική πολικότητα.

Στη χρωματογραφία κατανομής ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης και εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων μη ιονικών ενώσεων.

Στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστηκής ομάδας της στατικής φάσης, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία.

Κατά τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας, οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκατάστατες, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου.

Στη χρωματογραφία διάχυσης πηκτής, ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων των αναλυόμενων ενώσεων και βρίσκει εφαρμογές στην ανάλυση και τον χαρακτηρισμό των πολυμερών. Τα μεγάλα μόρια εξέρχονται πρώτα απ' τη στήλη, τα μικρά μόρια, καθώς εισέρχονται στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, καθυστερούν και βγαίνουν αργότερα.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί τη σημαντικότερη εξέλιξη στην τεχνική της χρωματογραφικής ανάλυσης. Η ανάπτυξη της τεχνικής HPLC είναι αρκετά πρόσφατη και με ιδιαίτερες εφαρμογές στα ιονικά, μη πτητικά και θερμοδιαλυτά φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας έχει αρκετά κοινά σημεία με την αέρια, όπως για παράδειγμα κατά την έγχυση του δείγματος σε στήλη με κατάλληλο υλικό[^], αυτό παρασύρεται σε κατάλληλο ανιχνευτή. Η διαφορά της έγκειται στο ότι η ουσία έχει την ίδια κατάσταση που είχε και πριν την έγχυση. Επιπλέον, η κινητή φάση είναι υγρή

(διαλύτης, μείγμα διαλυτών, μείγμα διαλυτών και νερού και ρυθμιστικών διαλυμάτων). Το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκκλούνται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

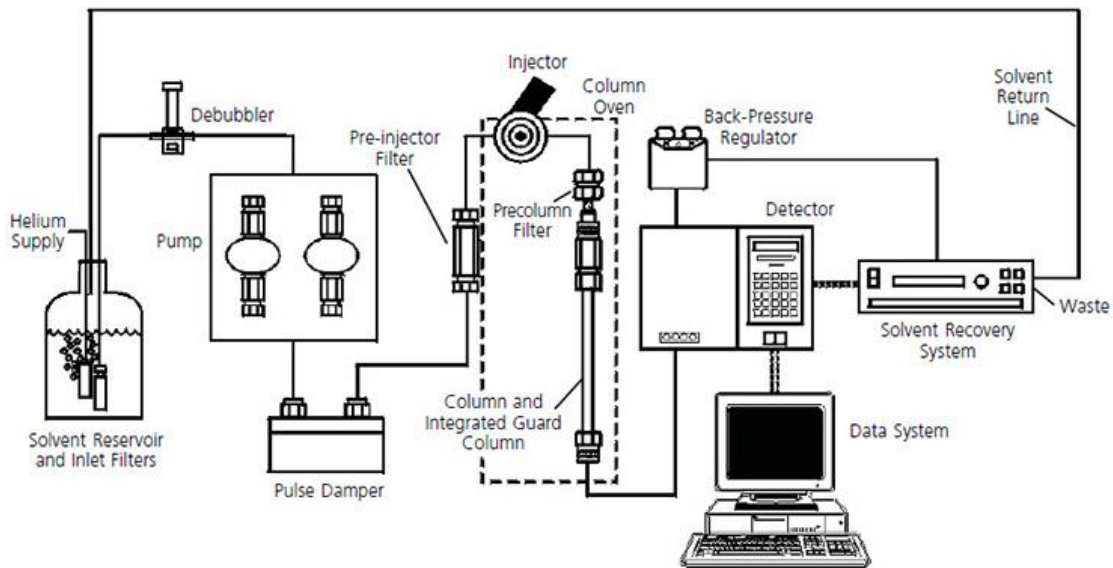
Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα που την καθιστούν ελκυστική για την ανάλυση δειγμάτων. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας, η οποία επέτρεψε την κατασκευή χαλύβδινων στηλών πολύ μικρής διαμέτρου με υψηλή ανθεκτικότητα σε πιέσεις και ενίσχυσε την εξέλιξη της επιστήμης των πληρωτικών υλικών, τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης, καθώς και την ανάπτυξη διαφόρων τύπων ανιχνευτών, έχει καταστήσει τη μέθοδο αυτή ισχυρό εργαλείο στη σύγχρονη χρωματογραφική ανάλυση. Το κύριο πλεονέκτημα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι η λειτουργία της σε χαμηλές θερμοκρασίες, γι' αυτό χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών ευπαθών στις υψηλές θερμοκρασίες της αέριας χρωματογραφίας, πχ πρωτεΐνες νουκλεοτίδια κτλ, καθώς και ουσιών που δεν μπορούν να εξαερωθούν. Συν τοις άλλοις, διαθέτει υψηλή ευαισθησία και εύκολη προσαρμογή σε ακριβείς ποσοτικούς διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών. Τέλος, στην HPLC μπορούν να συμπεριληφθούν και να εφαρμοστούν όλα τα είδη που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με την κατάλληλη χρήση υλικού πληρώσεως της στήλης και του διαλύτη έκλουσης.

Σ' αυτή την τεχνική υγρής χρωματογραφίας, η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης, μέσα από την στατική φάση που αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντίστασης σωματίδια υψηλής διαχωριστικής απόδοσης, γίνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης. Η HPLC είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική τεχνική για την ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων.

Στην κλασική υγρή χρωματογραφία στήλης, η ταχύτητα μερισμού των συστατικών του μίγματος μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης εξαρτάται κυρίως από τη διάχυση. Η διάχυση στα υγρά είναι εξαιρετικά αργή και για την ελαχιστοποίηση του χρόνου που απαιτείται για τη μετακίνηση των συστατικών, πρέπει να τηρούνται δύο προϋποθέσεις. Πρώτον, το υλικό πληρώσεως της στήλης να είναι λεπτότατου διαμερισμού και δεύτερο, σε περιπτώσεις διαχωρισμού

κατανομής, η υγρή στατική φάση να είναι της μορφής λεπτότατου ομοιόμορφου υμένα. Η υψηλή πυκνότητα πλήρωσης με αυτά τα πολύ μικρά σωματίδια μειώνει την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη (μεγάλη αντίσταση μεταφοράς) και για να επιτευχθεί μια λογική ταχύτητα ροής, απαιτείται η εφαρμογή υψηλής πίεσης στην κινητή φάση. Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη τεχνική αναφέρεται και ως *Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)* και επειδή με αυτή πετυχαίνονται ταχείς διαχωρισμοί και αναλύσεις, αναφέρεται και ως *Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Ταχύτητας (High Speed Liquid Chromatography, HSLC)*.

Με την τεχνική της H.P.L.C. επιτυγχάνουμε το διαχωρισμό των συστατικών ενός υγρού μίγματος, περνώντας το μέσα από μια χρωματογραφική στήλη, με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης. Στην H.P.L.C. διακρίνουμε δυο φάσεις: α) τη στατική φάση, που αποτελείται από στερεό πορώδες υλικό, ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη και β) την κινητή φάση που είναι ένας διαλύτης, ή μίγμα διαλυτών. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική, πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης (έως 5000 psi) και έτσι επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολύπλοκων ανόργανων και οργανικών μιγμάτων καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων ουσιών ποικίλης προέλευσης, έτσι μέσω αυτής μπορεί να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, υδρογονανθράκων, βιταμινών, λιπών, στεροειδών, τερπενοειδών, αντιβιοτικών, νουκλεοτιδίων, λιπαρών οξέων, σακχάρων, μυκοτοξινών και άλλων ουσιών. Αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη, μη καταστρεπτική και αποτελεσματική τεχνική για το διαχωρισμό μοριακών, ή ιοντικών ενώσεων με χαμηλές τάσεις ατμών με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, μεγάλη ευαισθησία, που ανιχνεύει ng ή pg (10⁻⁹ ή 10⁻¹² g), κατάλληλη την ανάλυση μιγμάτων ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους και πολικότητας, για μη πτητικές και θερμικά ασταθών ενώσεων, που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Η τεχνική της H.P.L.C. είναι η πιο διαδεδομένη από όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού και έχει πολύ μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση βιολογικών και φαρμακευτικών μιγμάτων καθώς και των μεταβολιτών τους. Στην ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιούνται οι ίδιες τεχνικές με την αέρια χρωματογραφία (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου 2001).



Εικόνα 1.8.6.1: Διάταξη υγρού χρωματογράφου

Δοχεία διαλυτών

Ένα σύστημα HPLC είναι εφοδιασμένο με ένα ή περισσότερα υάλινα ή ανοξείδωτα δοχεία τα οποία περιέχουν τους διαλύτες έκλουσης. Οι διαλύτες αποτελούν την κινητή φάση. Μετά την επιλογή της στατικής φάσης, η οποία πρέπει να έχει παρόμοια πολικότητα με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, επιλέγεται η κινητή φάση, ώστε διαφέρει από την πολικότητα της στατικής, για να είναι ικανοποιητικός ο διαχωρισμός.

Επιλογή κινητής φάσης

Αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο όσον αφορά την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων. Η εύρεση της καταλληλότερης κινητής φάσης εξαρτάται από ορισμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες των διαλυτών και γίνεται με κριτήριο τον επιτυχή διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος σε εύλογο χρονικό διάστημα. Οι ιδιότητες που εξετάζονται είναι:

α) Πολικότητα: Η πολικότητα ενός διαλύτη καθορίζει, σε συνδυασμό με την πολικότητα των αναλυόμενων ενώσεων, το χρόνο συγκράτησης τους. Έτσι, όσο πιο πολικός είναι ο διαλύτης, τόσο πιο γρήγορα εκλύονται οι πολικές ενώσεις και τόσο πιο αργά οι μη πολικές.

β) Βασικότητα ή δυνατότητα διπολικών αλληλεπιδράσεων, που υπεισέρχονται στην εκλεκτικότητα του κάθε διαλύτη.

γ) Τοξικότητα: Οι διαλύτες με τοξικές και ερεθιστικές ιδιότητες συνήθως αποφεύγονται.

δ) Συμβατότητα με το χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή. Επιπλέον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης θα πρέπει να είναι χημικά αδρανής, χρωματογραφικά καθαρός και να μη δημιουργεί καταβυθίσεις των συστατικών του δείγματος στην αναλυτική στήλη.

Είδος έκλουσης:

- **ισοκρατική**: Ονομάζεται η έκλουση κατά την οποία διατηρείται σταθερή η σύσταση της κινητής φάσης σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Η ισοκρατική έκλουση επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, έχει χαμηλότερο κόστος από τη βαθμωτή και παρέχει σταθερότερη βασική γραμμή. Το κύριο μειονέκτημά της είναι ότι δεν εξασφαλίζει το διαχωρισμό ενώσεων με παρόμοιες ιδιότητες και παρόμοια δομή, όπως π.χ. αμινοξέα, πρωτεΐνες κ.ά.
- **βαθμωτή**: Χαρακτηρίζεται από μεταβολή της κινητής φάσης με το χρόνο για το διαχωρισμό μιγμάτων ενώσεων, οι οποίες παρουσιάζουν συνήθως παρόμοια δομή και ιδιότητες. Γενικότερα, σκοπός της βαθμωτής έκλουσης είναι η ταχύτερη μετακίνηση των συστατικών που συγκρατούνται ισχυρά στη στήλη και ο ικανοποιητικός διαχωρισμός αυτών που συγκρατούνται ελάχιστα.

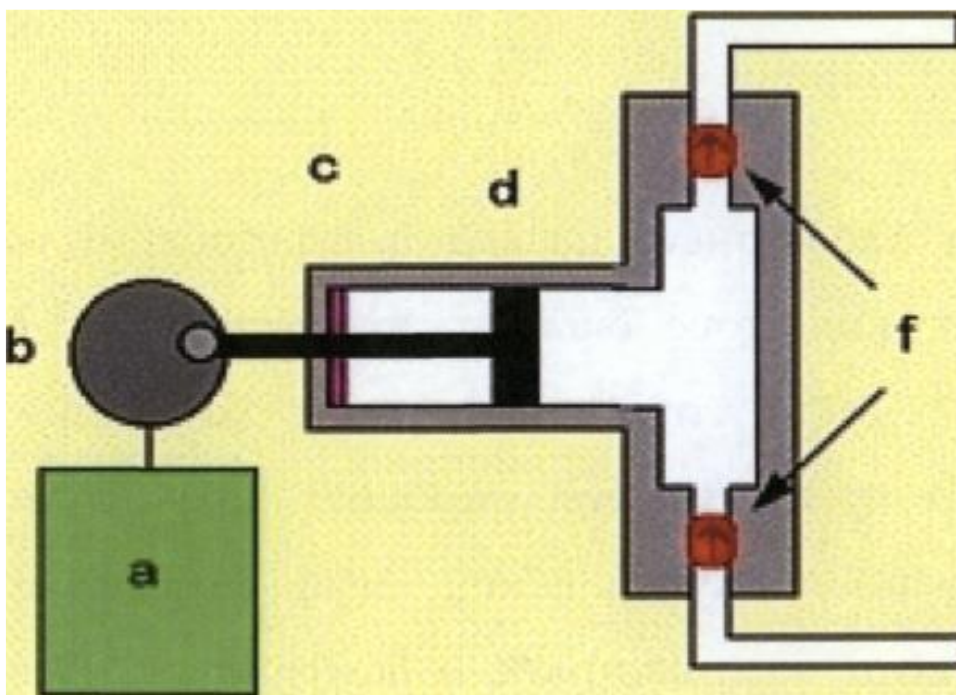
Απαερωτές

Τα δοχεία αυτά είναι συχνά εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων -συνήθως οξυγόνου και αζώτου-που παρεμποδίζουν το σχηματισμό φυσαλίδων στη στήλη και τον ανιχνευτή των συστημάτων. Οι φυσαλίδες αυτές προκαλούν τη διεύρυνση των κορυφών ή ακόμα τη φραγή της ροής της κινητής φάσης. Οι απαερωτές αποτελούνται από ένα σύστημα άντλησης κενού, ένα σύστημα απόσταξης και από συστήματα εισαγωγής μικρών φυσαλίδων αδρανούς αερίου χαμηλής διαλυτότητας. Συχνά τα συστήματα αυτά περιλαμβάνουν και φίλτρα απομάκρυνσης σκόνης και αιωρούμενων σωματιδίων από τους διαλύτες για να προληφθούν πιθανές βλάβες στις αντλίες ή στα συστήματα έγχυσης.

Σύστημα άντλησης.

Οι απαιτήσεις ενός συστήματος άντλησης περιλαμβάνει την ανάπτυξη πιέσεων έως 600 psi, απαλλαγή από παλμούς ροής, ταχύτητες ροής που κυμαίνονται από 0,1 έως 10 mL/min, έλεγχο ροής και επαναληψιμότητα ροής 0,5% ή καλύτερη και τμήματα ανθεκτικά στη διάβρωση. Οι τύποι αντλιών που χρησιμοποιούνται είναι παλινδρομικές αντλίες (reciprocation pumps), αντλίες εκτόπισης (displacement pumps) και πνευματικές αντλίες (pneumatic pumps).

Αντλία παλινδρόμησης



Εικόνα 1.8.6.2: Αντλία παλινδρόμησης:

a) κινητήρας, b) έκκεντρο παλινδρόμησης, c) Στεγανωτικός δακτύλιος, d) βύσμα, e) διαλύτης, f) βαλβίδες ελέγχου, g) στήλη

Ανήκει στις αντλίες σταθερής ροής. Το 90% των εμπορικών συστημάτων χρησιμοποιούν παλινδρομικές αντλίες που συνήθως αποτελούνται από ένα μικρό θάλαμο στον οποίο ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά με ένα μηχανικά κινούμενο έμβολο. Δύο σφαιρικές βαλβίδες ανοίγουν και κλείνουν εκ περιτροπής ελέγχοντας τη ροή του διαλύτη μέσα και έξω από τον κύλινδρο, ενώ ο διαλύτης βρίσκεται σ

επαφή με το έμβολο. Εναλλακτικά μπορεί να μεταδίδεται πίεση στο διαλύτη μέσω ενός εύκαμπτου διαφράγματος αντλούμενο πνευματικά από ένα παλινδρομικό έμβολο.

Σύστημα ελέγχου ροής

Πολλά εμπορικά όργανα είναι εφοδιασμένα με συσκευές ελεγχόμενες από υπολογιστή για τη μέτρηση της ταχύτητας ροής, η οποία υπολογίζεται από την πτώση της πίεσης σε ένα αναστολέα τοποθετημένο στην έξοδο της αντλίας. Κάθε παρατηρούμενη διαφορά στο σήμα από μια προκαθορισμένη τιμή χρησιμοποιείται ακολούθως για την αύξηση ή μείωση της ταχύτητας του κινητήρα της αντλίας.

Σύστημα έγχυσης δείγματος

Συχνά ο περιοριστικός παράγοντας στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην υγρή χρωματογραφία είναι ο τρόπος εισαγωγής των δειγμάτων στη στήλη. Οι όγκοι πρέπει να είναι οι ελάχιστοι δυνατοί-από μερικά μL έως $500\mu\text{L}$ και η εισαγωγή θα πρέπει να επιτυγχάνεται χωρίς να προκαλείται αποσυμπύεση του συστήματος. Ο παλιότερος και πλέον απλός τρόπος εισαγωγής του δείγματος ήταν η έγχυση με σύριγγα μέσω ενός ελαστικού διαφράγματος. Σήμερα, η πλέον συνηθισμένη μέθοδος εισαγωγής δείγματος βασίζεται στη βαλβίδα δειγματοληψίας που δίνουν δυνατότητα έγχυσης από $0,5-500 \mu\text{L}$.

Αναλυτική στήλη

Η αναλυτική στήλη είναι η καρδιά ενός χρωματογραφικού συστήματος. Πρέπει να είναι υψηλής ποιότητας ώστε να δίνει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η χρωματογραφική στήλη αποτελείται από τον εξωτερικό κύλινδρο και το υλικό πλήρωσης. Ο κύλινδρος μπορεί να είναι κατασκευασμένος από μέταλλο, ανοξείδωτο ατσάλι, γυαλί ή πολυμερές. Το υλικό πλήρωσης βρίσκεται στο εσωτερικό του κυλίνδρου και επιλέγεται ανάλογα με τις ενώσεις που θα διαχωριστούν. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται σήμερα έχουν μήκος 3-30 cm και εσωτερική διάμετρο $0,4-0,8 \text{ mm}$. Τα διάφορα υλικά πλήρωσης που υπάρχουν στο

εμπόριο παρέχουν διαφορετικής απόδοσης διαχωρισμούς, εξαιτίας των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων του υλικού πλήρωσης.

1.8.6.1: Ανιχνευτές Υγρής Χρωματογραφίας

Οι ανιχνευτές στην υγρή χρωματογραφία είτε ανταποκρίνονται σε μια βασική ιδιότητα της κινητής φάσης όπως ο δείκτης διάθλασης, η πυκνότητα οι τιμές των οποίων επηρεάζονται από την παρουσία των εκλουόμενων συστατικών, είτε ανταποκρίνονται σε ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού, όπως είναι η απορρόφηση στο υπεριώδες και ο φθορισμός. Οι πιο συνήθεις ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία είναι οι κάτωθι:

- Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (Refraction index detector, RI)
- Φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους με διάταξη διόδων (Diodearray detector ή Photo diode array από 190-800 nm)
- Ανιχνευτής φθορισμού (Fluorescence detector, RF από 180-450nm)
- Ανιχνευτής υπερύθρου (Infrared detector)
- Εξατμιστικός ανιχνευτής σκέδασης ακτινοβολίας (Evaporative light scattering detector, ELSD).

Ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Η απορρόφηση ακτινοβολίας από μια χημική ένωση εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και τις ομάδες της χημικής ένωσης. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο ανάλογα με την ενέργεια του αλληλεπιδρά με ηλεκτρόνια και προκαλεί διέγερση και μεταφορά τους σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα, ή ακόμη προκαλεί δόνηση ή περιστροφή μοριακών δεσμών ορισμένων ομάδων της ένωσης.

Ανιχνευτής φθορισμού (RF)

Οι φθορισμομετρικοί ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για ενώσεις που φθορίζουν και δίνουν σήμα ανάλογο προς τη συγκέντρωση του συστατικού που φθορίζει. Οι φθορισμομετρικοί ανιχνευτές είναι ειδικοί και εκλεκτικοί για ενώσεις οι

οποίες έχουν στο μόριό τους ομάδες που διεγείρονται σε ενέργεια μικρότερου μήκους κύματος και εκπέμπουν ακτινοβολία υψηλότερου μήκους κύματος που ονομάζεται φθορισμός. Η εκπομπή συνήθως μετριέται σε κάθετη διεύθυνση ως προς τη διέγερση. Περίπου το 15% των ενώσεων έχουν φθορίζουσα ομάδα. Η γραμμική περιοχή του φθορισμομετρικού ανιχνευτή είναι $10^{-5} - 5 \cdot 10^{-6}$ g/ml.

Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (RI)

Ο ανιχνευτής αυτός μετρά τις διαφορές του δείκτη διάθλασης της κινητής φάσης πριν και μετά την έκλυση της ουσίας. Χρησιμοποιείται κυρίως στην ανάλυση σακχάρων, καθώς επίσης και στο διαχωρισμό και ανάλυση των πολυμερών. Η αρχή λειτουργίας του στηρίζεται στη μέτρηση της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του εκλουστικού που εξέρχεται από τη στήλη και περνά μέσα από την κυψελίδα συνεχούς ροής. Η ευαισθησία της ανίχνευσης εξαρτάται από τη διαφορά στο δείκτη διάθλασης που μπορεί να επιτευχθεί ανάμεσα στην κινητή φάση και στο δείγμα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε ισοκρατικά συστήματα έκλυσης. Η λειτουργία τους στηρίζεται στη χρήση κυψελίδας δύο διαδρόμων, όπου η πλευρά που περιέχει το δείγμα συγκρίνεται συνεχώς με την πλευρά αναφοράς η οποία δεν περιέχει το δείγμα.

Ανιχνευτής εκτροπής: Η αρχή λειτουργίας του ανιχνευτή αυτού στηρίζεται στην αρχή της εκτροπής στη διαθλασιμετρία, όπου η εκτροπή της οπτικής δέσμης μεταβάλλεται με τη μεταβολή της σύστασης του δείγματος που βρίσκεται στην κυψελίδα συνεχούς ροής σε σχέση με την κυψελίδα αναφοράς. Απουσία δείγματος η δέσμη που περνά και από τις δύο πλευρές οδηγείται στον φωτοανιχνευτή, συνήθως φωτοαντιστάτη. Καθώς εκλύεται το συστατικό από τη μία πλευρά η μεταβολή της γωνίας διάθλασης μετακινεί τη δέσμη με αποτέλεσμα να υπάρξει μείωση του ρεύματος φωτονίων που φτάνουν στον ανιχνευτή και άρα διαταράσσεται η ισορροπία του. Η καταγραφή αυτής της μεταβολής μπορεί να εκφραστεί σε σχέση με τη συγκέντρωση του δείγματος.

Ανιχνευτής σκεδασμού φωτός

Στον ανιχνευτή σκεδασμού φωτός το υγρό που εξέρχεται από τη στήλη πεκάζεται με τη βοήθεια ρεύματος αερίου ως αερόλυμα και στη συνέχεια

εξατμίζεται ο διαλύτης, παράγοντας μικρού μεγέθους σταγονίδια του συστατικού, τα οποία ανιχνεύονται στην κυψελίδα σκεδασμού φωτός. Μέσα Στην κυψελίδα, τα σωματίδια σκεδάζουν την ακτινοβολία laser, ενώ η κινητή φάση όχι. Η σκεδασμένη ακτινοβολία ανιχνεύεται με φωτοδίοδο σιλικόνης, η οποία τοποθετείται σε γωνία 90° ως προς την πηγή laser. Η φωτοδίοδος παράγει σήμα το οποίο οδηγείται στο καταγραφικό.

Σύστημα καταγραφής χρωματογραφήματος

Το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή, με τη βοήθεια ειδικών σημάτων καταγραφής, καταγράφεται ως ένα σύνολο κορυφών (καμπύλες του Gauss) που αποτελούν το χρωματογράφημα. Η καταγραφή του χρωματογραφήματος μπορεί να γίνει με απλό καταγραφικό σύστημα, ολοκληρωτή ή ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στην περίπτωση χρήσης του ηλεκτρονικού υπολογιστή είναι απαραίτητη η μετατροπή του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό, με τη χρήση ειδικού μετατροπέα. Τα πλεονεκτήματα που απορρέουν από τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή για τη συλλογή και την επεξεργασία των αναλυτικών δεδομένων είναι:

1. Αποθήκευση των δεδομένων στη μνήμη του Η/Υ.
2. Η επεξεργασία ενός χρωματογραφήματος, ενώ ταυτόχρονα γίνεται συλλογή δεδομένων.
3. Η δυνατότητα παρέμβασης στον τρόπο ολοκλήρωσης.
4. Η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών ενός δείγματος με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

1.8.6.2 Εφαρμογές HPLC

Η HPLC βρίσκει εφαρμογές σε όλους τους τομείς της χημικής ανάλυσης σε αναλυτική, αλλά και σε παρασκευαστική κλίμακα.

- Φαρμακοβιομηχανίες: Αντιβιοτικά, στεροειδή, βιταμίνες, αναλγητικά, ηρεμιστικά.
- Τρόφιμα: Αρωματικές ύλες, συντηρητικά, αντιοξειδωτικά, τεχνητές γλυκαντικές ύλες πρόσθετα, αφλατοξίνες.
- Βιοχημεία: Αμινοξέα, πρωτεΐνες, υδαάνθρακες, λιπίδια.
- Χημικές βιομηχανίες: Απορρυπαντικά, βαφές.

- Δικονομικές/τοξικολογικές μελέτες: Φάρμακα, ναρκωτικά, αλκοόλη στο αίμα, απαγορευμένες ουσίες.
- Περιβαλλοντικές μελέτες: Παρασιτοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, φαινόλες, διοξίνες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια.
- Κλινική χημεία: Χολικά οξέα, μεταβολίτες φαρμάκων, οιστρογόνα, ορμόνες.
(Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η σύγχρονη οινοποίηση 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 οίνων και στις βασικές οινοποιητικές διαδικασίες.

Ο *S. cerevisiae* ως ζωντανός μικροοργανισμός έχει την ικανότητα να προσαρμόζει τις λειτουργίες του ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Όταν ο *S. cerevisiae* βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη κλπ, αφ' ενός τα σάκχαρα αυτά εισέρχονται στο κύτταρο προκειμένου να αποδομηθούν και να παραχθεί ενέργεια, αφ' ετέρου τα ίδια τα μόρια των σακχάρων κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης δρώντας ως προσδέτες (ligand).

Έρευνες επιτελούνται για τη βελτίωση της απόδοσης των ζυμώσεων είτε με την τροποποίηση των συνθηκών είτε με τη γενετική βελτίωση των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν, ότι προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης από τον *S. cerevisiae* χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα, θα ήταν χρήσιμο να επιτευχθούν κατάλληλες γενετικές τροποποιήσεις. Κυρίαρχο ρόλο στη ενδοκυτταρική σηματοδότηση διαδραματίζει το μονοπάτι της PKA και ειδικότερα ο έλεγχος των Msn2 και Msn4 από αυτή. Η αποτροπή της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών αυτών από την PKA είναι μία πιθανή προσέγγιση με σκοπό την γενετική βελτίωση του *S. cerevisiae*.

Στα 8 διαφορετικώς γενετικά τροποποιημένα στελέχη του ζυμομύκητα που κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο, χρησιμοποιήθηκε ως γενετικό υπόβαθρο, το αγρίου τύπου στέλεχος W303-1a με απώτερο σκοπό τη μελέτη της ικανότητας ζύμωσής τους. Οι χημικές αναλυτικές μέθοδοι της HPLC και της GC χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη αυτού του στόχου. Η HPLC συνέβαλε στον προσδιορισμό του ρυθμού κατανάλωσης σακχάρων και η GC στον προσδιορισμό του ρυθμού παραγωγής αιθανόλης.

Τα αποτελέσματα των δυο τεχνικών συνδυάστηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί η σταθερά της ταχύτητας της αντίδρασης έτσι ώστε να δειχθεί ποια γενετική τροποποίηση δίνει τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

Όλα τα στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων βρίσκονται στον Πίν. 3.1.α και τα αντιδραστήρια στον πίνακα 3.1.β αντίστοιχα.

Πίνακας 3.1.1: Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ
W303-1a Yeast Strain	Αγρίου τύπου
W303-1a_MSN4_531	Ser531Ala
W303-1a_MSN4_532	Ser532Ala
W303-1a_MSN4_533	Ser533Ala
W303-1a_MSN4_558	Ser558Ala
W303-1a_MSN2_582	Ser582Ala
W303-1a_MSN2_620	Ser620Ala
W303-1a_MSN2_625	Ser625Ala
W303-1a_MSN2_633	Ser633Ala

Πίνακας 3.1.2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

	Αντιδραστήρια	Εταιρία	Κωδικός
1	Acetonitrile	Chem-Lab ή Merck	
2	Ethanol	Sigma-Aldrich	24194-2.5L-R
3	Glucose Anhydrous	Sigma-Aldrich	G7021
4	Isopropanol	Penta	603-117-00-0
5	Meat Peptone	CONDA	
6	Yeast Extract Powder	Lab M	MC001

3.2 Πειραματικές πορείες

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- 4x Υερ
- 50% γλυκόζη αποστειρωμένη
- 3d H₂O

3.2.1 Παρασκευή θρεπτικού μέσου 4x Υερ

Πίνακας 3.2.1: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του 4x Υερ.

Yeast extract:	10 g x4 = 40g
Bacto Peptone ή Meat Peptone:	20 g x4 = 80g

Προσθέτω νερό μέχρι το 1 L

Υγρή αποστείρωση

3.2.2 Παρασκευή διαλύματος γλυκόζης

Η παρασκευή 50% γλυκόζης προσθήκης 3d H₂O έγινε σε falcon και αποστειρώθηκε κάτω από φλόγα με υδροφιλικό αποστειρωμένο φίλτρο σύριγγας πόρων 0,2μm.

3.2.3 Ποσότητες στα falcon

Κάθε falcon 50ml περιέχει 20 ml διαλύματος το οποίο προέκυψε από:

- 10ml γλυκόζης 50%
- 5ml 4x Υερ
- 5ml 3d H₂O

Η τελική συγκέντρωση του θρεπτικού υλικού είναι 25% σε γλυκόζη (Υερ 25% Glucose).

3.2.4 Καλλιέργειες στελεχών

1. Σε falcon 50ml βάζουμε περίπου 10ml Υερ και 20 μl από έτοιμη υγρή καλλιέργεια (stock) που υπάρχει στην ψύξη. Κάνουμε αυτή τη διαδικασία και για τα 9 στελέχη.
2. Τοποθετούμε τα falcon σε επωαστικό θάλαμο ανάδευσης στους 30°C για μία ημέρα ώστε να εμβολιάσουμε την επόμενη.

3.2.5 Εμβολιασμός με τα στελέχη

1. Αφαίρεση των falcon από τον επωαστικό ανάδευσης, την επόμενη ημέρα.
2. Μετάγγιση του περιεχομένου σε falcon των 15ml.
3. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min.
4. Αφαίρεση υπερκείμενου υγρού.
5. Αναδιάλυση κυττάρων με 500μl 4x Υερ από τα falcon τα οποία θα εμβολιαστούν με τα στελέχη.
6. Μετάγγιση όλου το περιεχομένου πίσω στα falcon των 50ml (εμβολιασμός)

7. Δειγματοληψία για τη στιγμή 0 (μηδέν).

3.2.6 Δειγματοληψία

1. Μεταφορά 1 ml από κάθε falcon σε αντίστοιχο erpendorf.
2. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5-7 min.
3. Μετάγγιση από το υπερκείμενο υγρό 750μl σε ένα νέο erpendorf για HPLC ανάλυση και 100μl σε ένα άλλο για GC.

3.2.7 Θερμοκρασίες

Οι καλλιέργειες επωάσθηκαν σε θερμοκρασία 30°C η οποία θεωρείται κατά μέσο όρο βέλτιστη για την ερυθρή οينوποίηση και 18°C αντίστοιχα για την λευκή. Προέκυψαν τα εξής δείγματα:

Για τους 30°C (15 δείγματα):

- 0 (hours). Πριν τον εμβολιασμό.
- 20 hours
- 24 hours (Day 1)
- 48 hours (Day 2)
- Day 3
- Day 4
- Day 5
- Day 6
- Day 7
- Day 8
- Day 9
- Day 10
- Day 11
- Day 12

- Day 13

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές.

Για τους 18°C (6 δείγματα):

- 0 hours. Πριν τον εμβολιασμό
- 2 Days
- 4 Days
- 7 Days
- 10 Days
- 15 Days

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές.

3.2.8 Ποσότητες σε HPLC

Σε erpendorf κατασκευάστηκαν πρότυπα δείγματα γλυκόζης συνολικού όγκου 1ml με σκοπό τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης και σύγκριση των αποτελεσμάτων πάνω σε αυτή.

Πίνακας 3.2.8.1: Πρότυπα δείγματα γλυκόζης

Γλυκόζη %	50% γλυκόζη (μl)	4x Υερ (μl)	H ₂ O (μl)
30	600	250	150
20	400	250	350
10	200	250	550
5	100	250	650
2	40	250	710
0	0	250	750

Πρότυπα:

Για την LC έγινε μετάγγιση όλου του πρότυπου δείγματος από το erpendorf σε vial. Ο όγκος ήταν 1ml με τις ποσότητες του πίνακα 3.

Για τα δείγματα των καλλιεργειών:

Για την LC έγινε μετάγγιση όλου του υπερκείμενου υγρού από το erpendorf στο vial συνολικού όγκου ~750μl.

Υγρός Χρωματογράφος - Συνθήκες

Το μοντέλο του υγρού χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Shimadzu με τα ακόλουθα μέρη:

- αντλία LC – 20AD
- controller CBM – 20A
- δειγματολήπτης (auto-sampler) SIL – 20AC
- φούρνος στήλης (column oven) CTO – 20AC
- ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους (diode array detector) CTO – M 20A
- ανιχνευτής φθορισμού (fluorescence detector) RF – 20A XS
- ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (refractive index detector) RID – 10A



Εικόνα 3.2.8: Υγρός χρωματογράφος εργαστηρίου

Η κινητή φάση ήταν διάλυμα σύστασης Ακετονιτριλίου (C_2H_3N) /Νερό : 80/20 %
 Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Luna 5u NH_2 100A (250*4,60mm).

Πίνακας 3.2.8.2: Συνθήκες

Ροή (Flow)	3ml/min
Όγκος ένεσης (Injection Volume)	10 μ l
Θερμοκρασία φούρνου στήλης (Column oven temperature)	40 °C

Συνολικός χρόνος προγράμματος: \approx 8 min

3.2.9 Ποσότητες σε GC

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την HPLC

Πίνακας 3.2.9.1: Πρότυπα δείγματα αιθανόλης (EtOH)

EtOH %	EtOH (μl)	H ₂ O (μl)
0	-	1000
3	30	970
6	60	940
9	90	910
12	120	880
15	150	850

Τα πρότυπα δείγματα αλλά και τα δείγματα των καλλιεργειών τοποθετήθηκαν σε υγρό χρωματογράφο. Οι ποσότητες που περιείχαν τα vials ήταν οι εξής:

Για την GC είχαμε τις ακόλουθες ποσότητες:

- 960μl H₂O 3D
- 20μl Ισοπροπανόλη
- 20μl από το πρότυπο διάλυμα (6 φορές)

Συνολικού όγκου 1ml.

Για τον GC ακολούθησε η ίδια διαδικασία έχοντας στο φιαλίδιο:

- 960μl H₂O 3D
- 20μl Ισοπροπανόλη
- 20μl από τα διαλύματα των στελεχών (15 φορές)

Συνολικού όγκου 1ml.

Αέριο χρωματογράφος – Συνθήκες

Το μοντέλου του αέριου χρωματογράφου (GC - 2010) ήταν της ίδιας εταιρείας (Shimadzu).



Εικόνα 2.2.9: Αέριο χρωματογράφος εργαστηρίου

- Αυτόματος δειγματολήπτης (auto sampler) AOC – 20s
- Θάλαμος ένεσης (auto injector) AOC – 20i

Το φέρων αέριο ήταν Ήλιο (He).

Πίνακας 3.2.9.2: Αέρια στη GC

Ροή He (He flow)	30 mL/min
Ροή H₂	40 mL/min
Ροή αέρα	400 mL/min

Πίνακας 3.2.9.3: Χαρακτηριστικά στήλης

Στήλη (μοντέλο)	BPX5 (5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane)
Μήκος (Length)	30m
Εσωτερική διάμετρος (Inner diameter)	0,22mm
Πάχος επίστρωσης (Film thickness)	0,25um
Αριθμός θεωρητικών πλακών ανά μέτρο	4.515/m
Συνολικός αριθμός θεωρητικών πλακών	135.450

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID).

Πίνακας 3.2.9.4: Συνθήκες πειράματος

Όγκος ένεσης (Injection Volume)	0,5 µL
Split ratio	100
Ελάχιστη θερμοκρασία (θερμοκρασία έναρξης προγράμματος)	31°C
Μέγιστη θερμοκρασία	150°C

Πίνακας 3.2.9.5: Πρόγραμμα θερμοκρασιών πειράματος

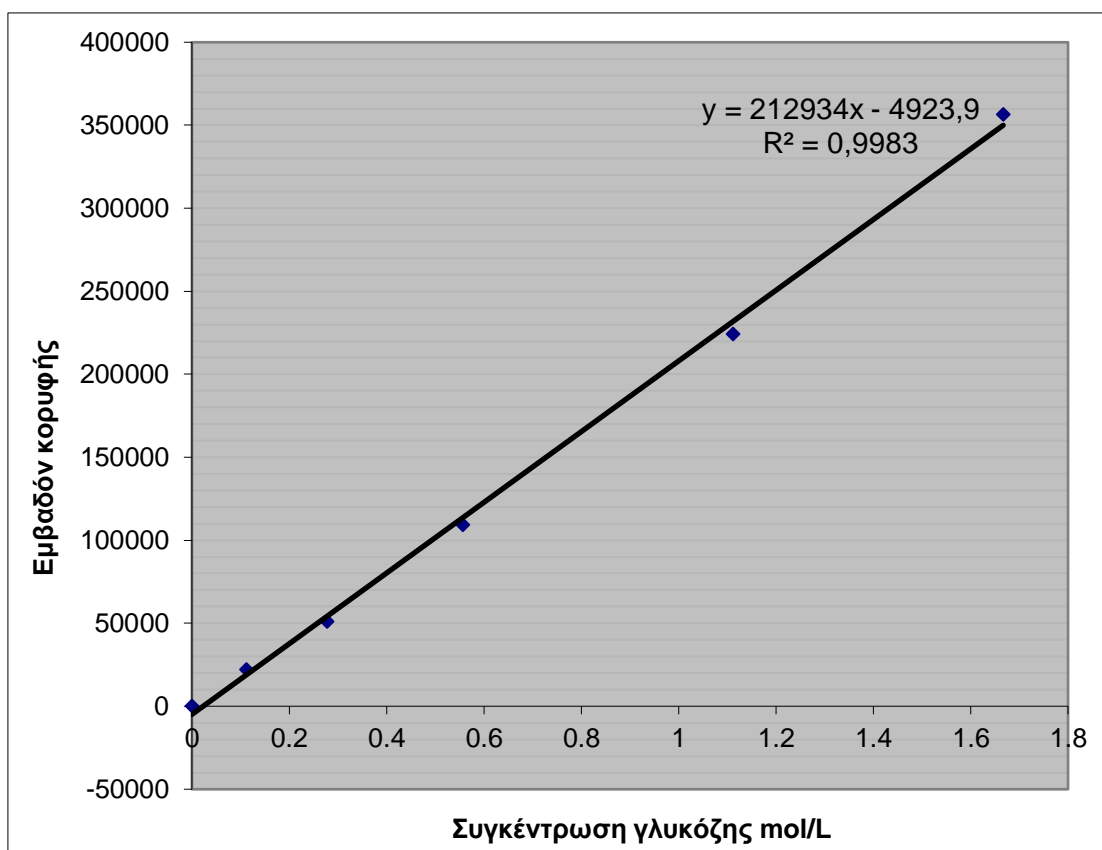
	Rate	Temperature	Hold time
0	-	31	1
1	10	70	0.5
2	100	150	1
3	0	0	0

Συνολικός χρόνος προγράμματος: 7,20 min

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

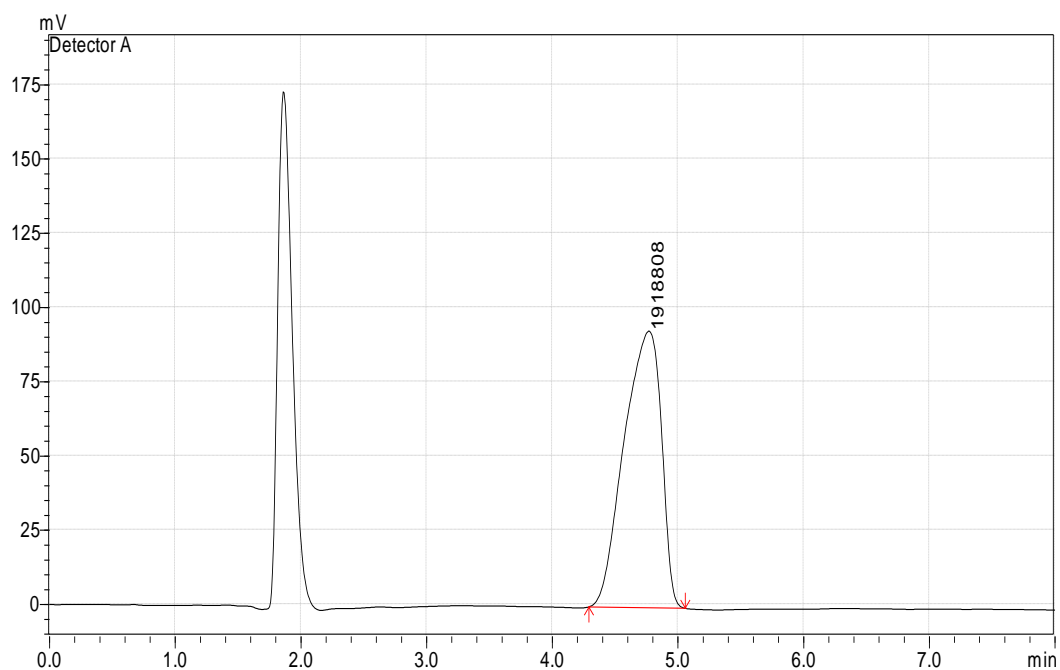
Προσπαθώντας να συσχετίσουμε τη μείωση-κατανάλωση των σακχάρων με την αύξηση-παραγωγή αιθανόλης στο συνθετικό γλεύκος 25% w/v σε γλυκόζη, κατασκευάσαμε πρότυπες καμπύλες. Αρχικά με διαλύματα γλυκόζης διαφόρων περιεκτικότητας εύρους 0-30% w/v και έπειτα αιθανόλης εύρους 0-15% v/v. Επιπρόσθετα έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων (της καμπύλης) του ζυμομύκητα αγρίου τύπου W303 με τα 8 στελέχη, με σκοπό τη διερεύνηση της ικανότητας ζύμωσής τους.

Οι επί τοις εκατό περιεκτικότητες μετατράπηκαν σε συγκέντρωση Molarity (mol/L). Η πρότυπη καμπύλη γλυκόζης προσδιορίστηκε στην HPLC. προκύπτοντας συντελεστής σύγκλισης 0,9983, ο οποίος είναι αποδεκτός διότι δηλώνει γραμμική συσχέτιση.



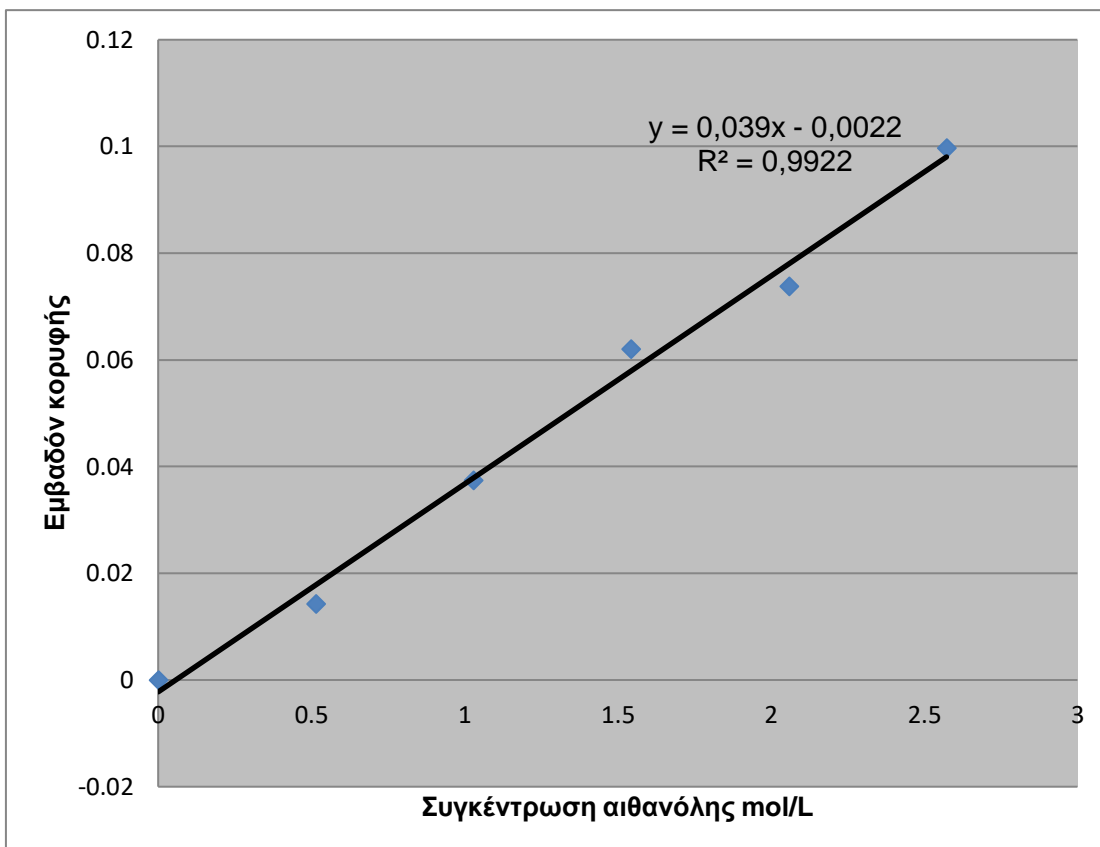
Γράφημα 4.1: Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης

Ακολουθεί ένα τυχαίο χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος γλυκόζης. Στα $\approx 2\text{min}$ έχουμε μία κορυφή λόγω διατάραξης της στήλης. Στα $\approx 4,8\text{min}$ παρατηρούμε την καμπύλη της γλυκόζης.



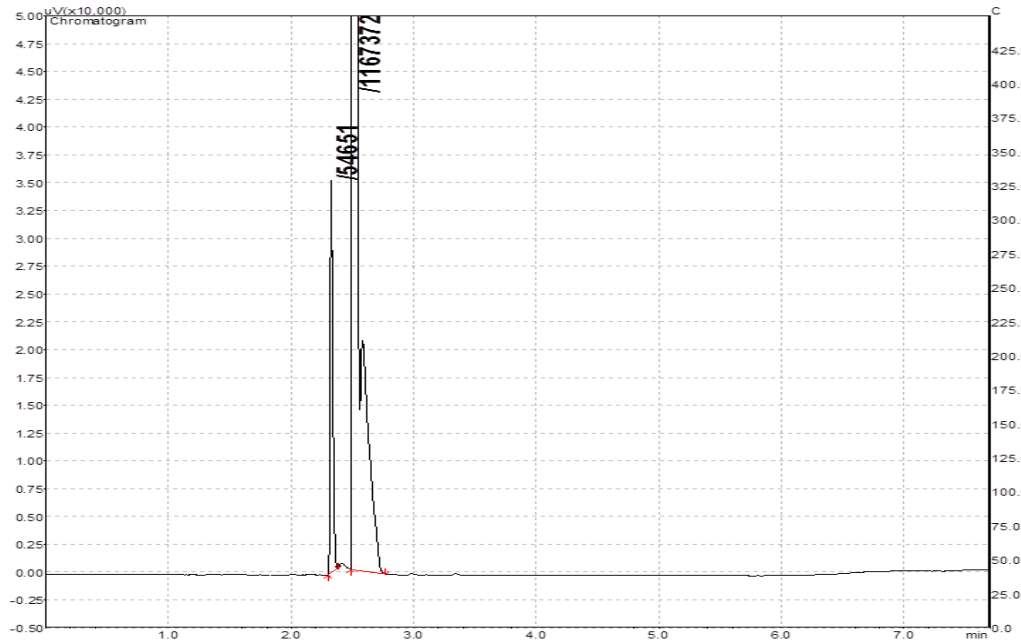
Εικόνα 4.1: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος γλυκόζης 5%

Παρόμοια για την αιθανόλη. Η πρότυπη καμπύλη μετρήθηκε στην GC. Κατασκευάστηκε, και προέκυψε συντελεστής σύγκλισης 0,9922.



Γράφημα 3.2: Πρότυπη καμπύλη αιθανόλης

Ακολουθεί χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος αιθανόλης στην GC. Στα $\approx 2,3\text{min}$ έχουμε την κορυφή της αιθανόλης και στα $\approx 2,6\text{min}$ της ισοπροπανόλης. Οι δύο κορυφές ξεχώριζαν ικανοποιητικά με αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς η ισοπροπανόλη ως εσωτερικό πρότυπο.



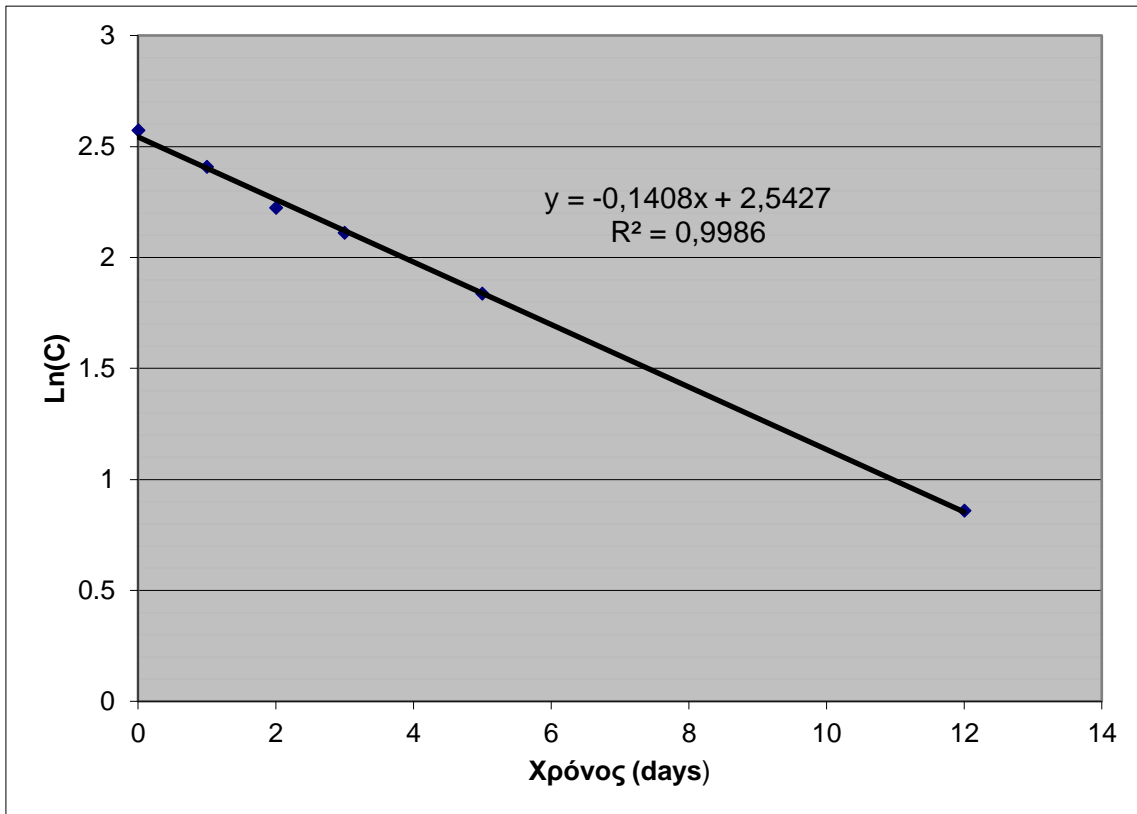
Εικόνα 4.2: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος αιθανόλης 6%

Έπειτα αναλύθηκαν τα δείγματα του W303 και των 8 στελεχών στον υγρό χρωματογράφο για τη γλυκόζη και στον αέριο χρωματογράφο για την αιθανόλη αφού είχαν επωασθεί αναερόβια σε θερμοκρασίες 30 και 18°C. Οι 30°C επιλέχθηκαν ως βέλτιστη θερμοκρασία για την ερυθρή οينوποίηση και οι 18°C ως βέλτιστη για την παραγωγή λευκών οίνων (Τσακίρης 2014).

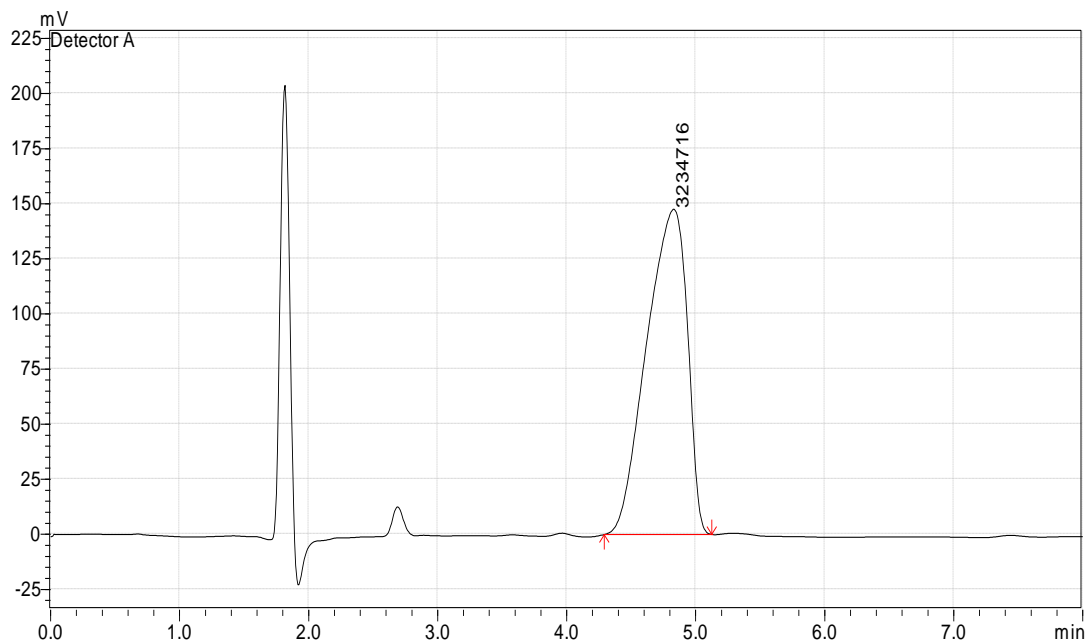
Από τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν για κάθε στέλεχος κατασκευάστηκαν οι γραφικές παραστάσεις

$$\frac{\ln(C-C_0)}{t}$$

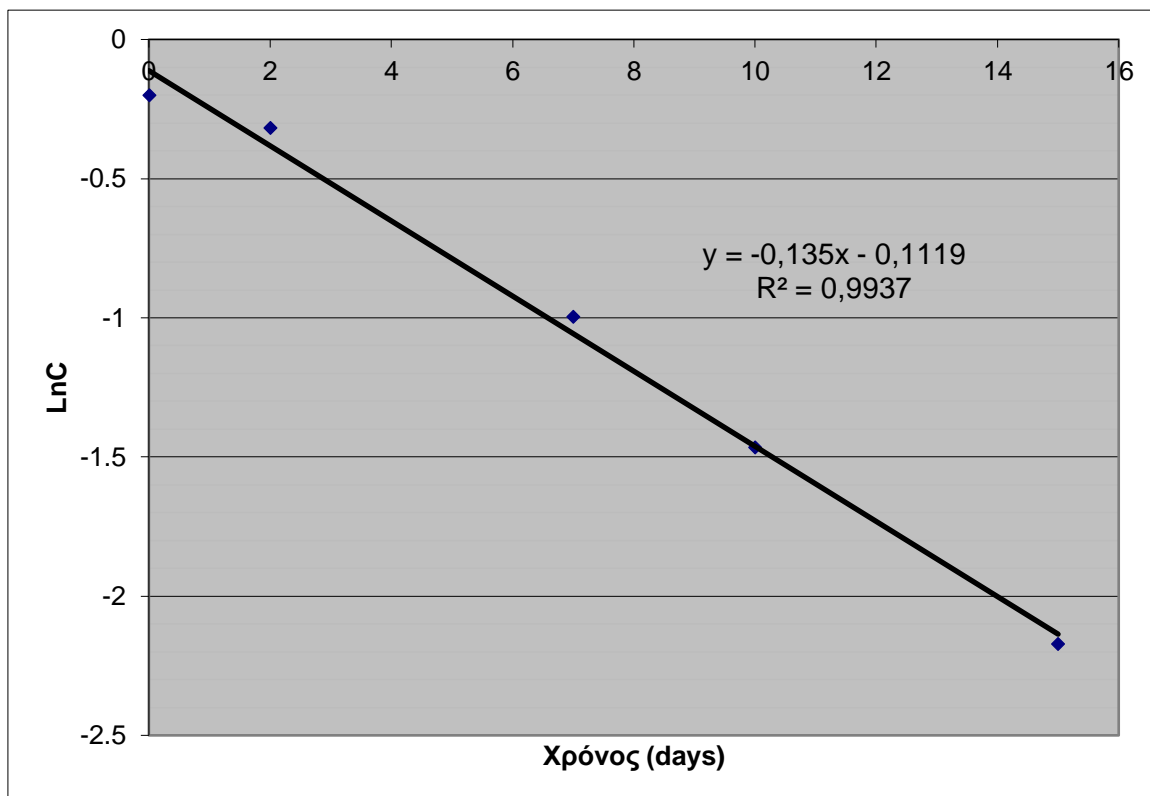
Από υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η ζύμωση ακολουθεί κινητική 1^{ης} τάξης όπου η γραφική παράσταση του άνωθεν μαθηματικού τύπου είναι μία ευθεία, η κλίση της οποίας αντιστοιχεί στην σταθερά ταχύτητας (-k). Από τις επόμενες ενδεικτικές γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε ότι επαληθεύεται αυτή η θεωρία.



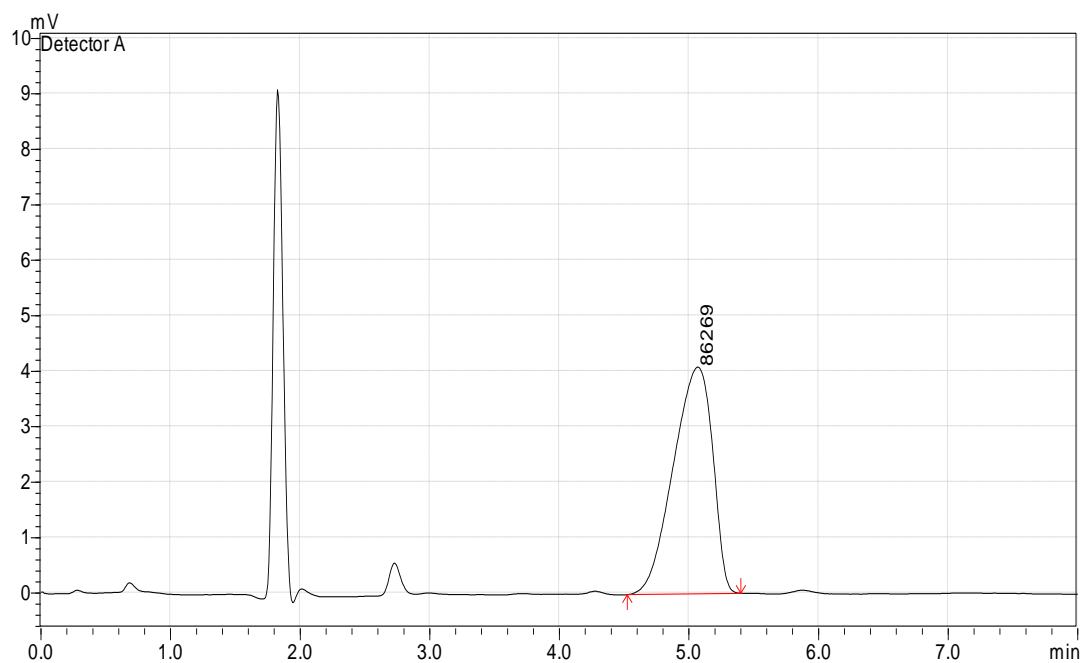
Γράφημα 4.3: Γραφική παράσταση του νεπερίου λογαρίθμου της συγκέντρωσης της καταναλισκόμενης γλυκόζης του W303-1a (mol/L) έναντι του χρόνου σε θερμοκρασία 30 °C.



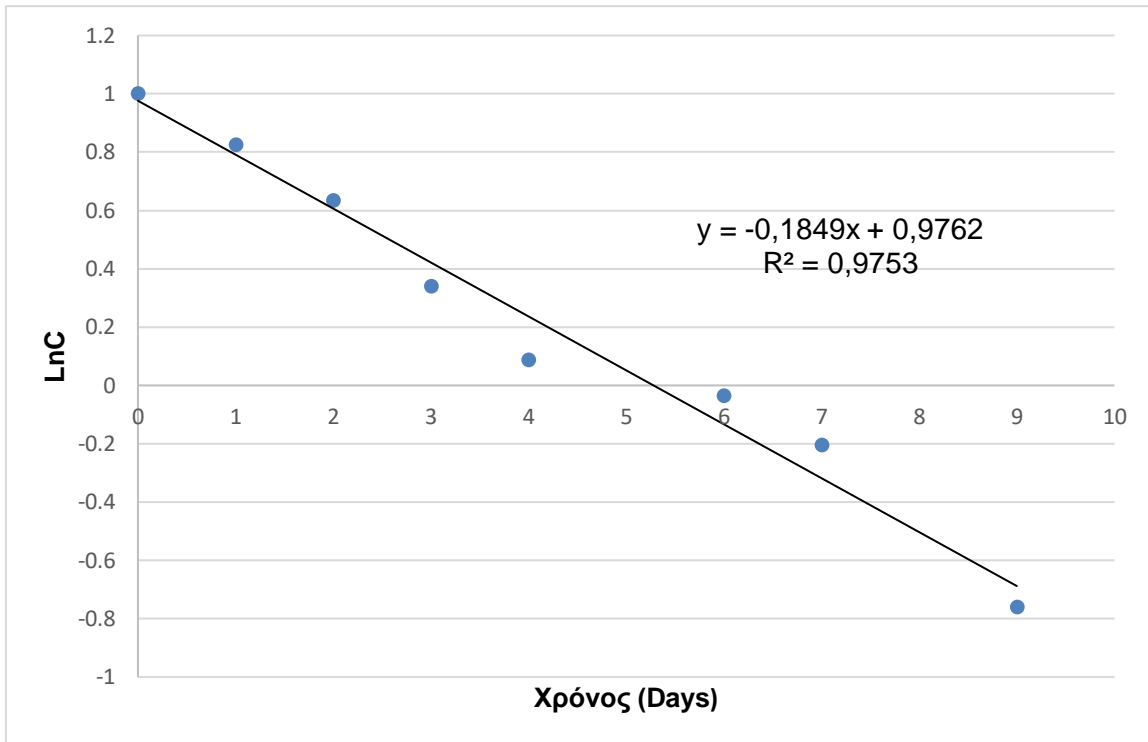
Εικόνα 4.3: Χρωματογράφημα του δείγματος W303-1a Day 3 σε θερμοκρασία 30 °C .



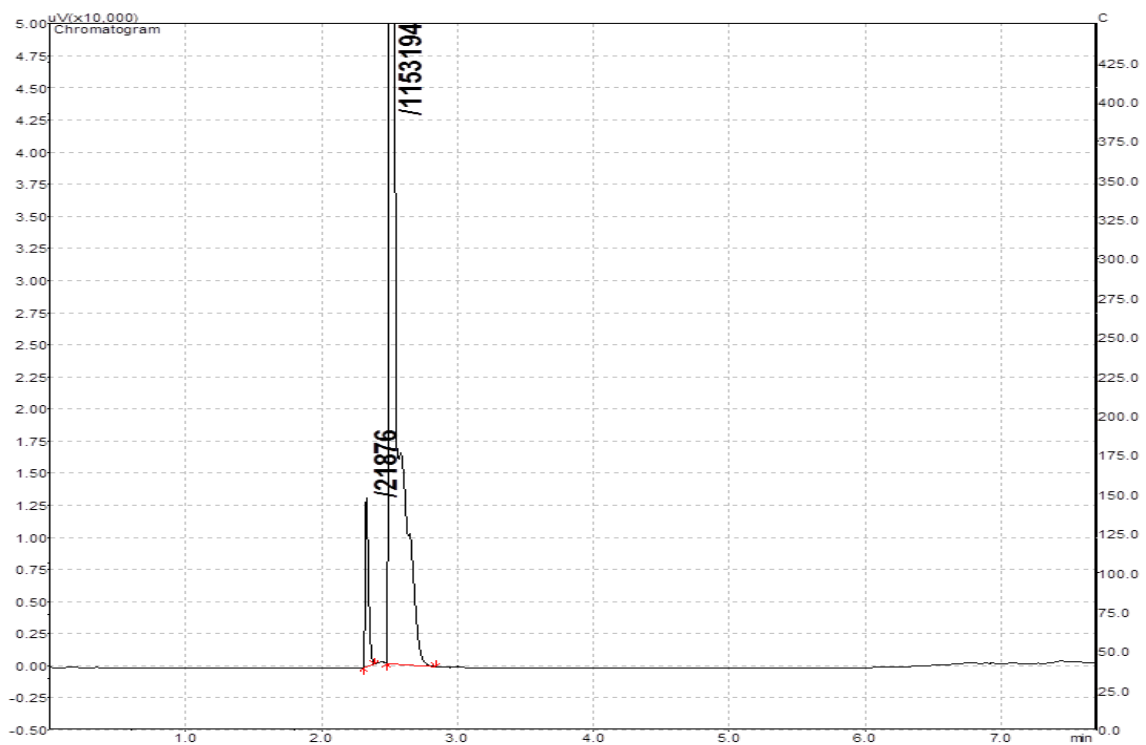
Γράφημα 4.4: Γραφική παράσταση του νεπερίου λογαρίθμου της συγκέντρωσης της καταναλισκόμενης γλυκόζης του στελέχους 620 (mol/L) έναντι του χρόνου σε θερμοκρασία 18 °C.



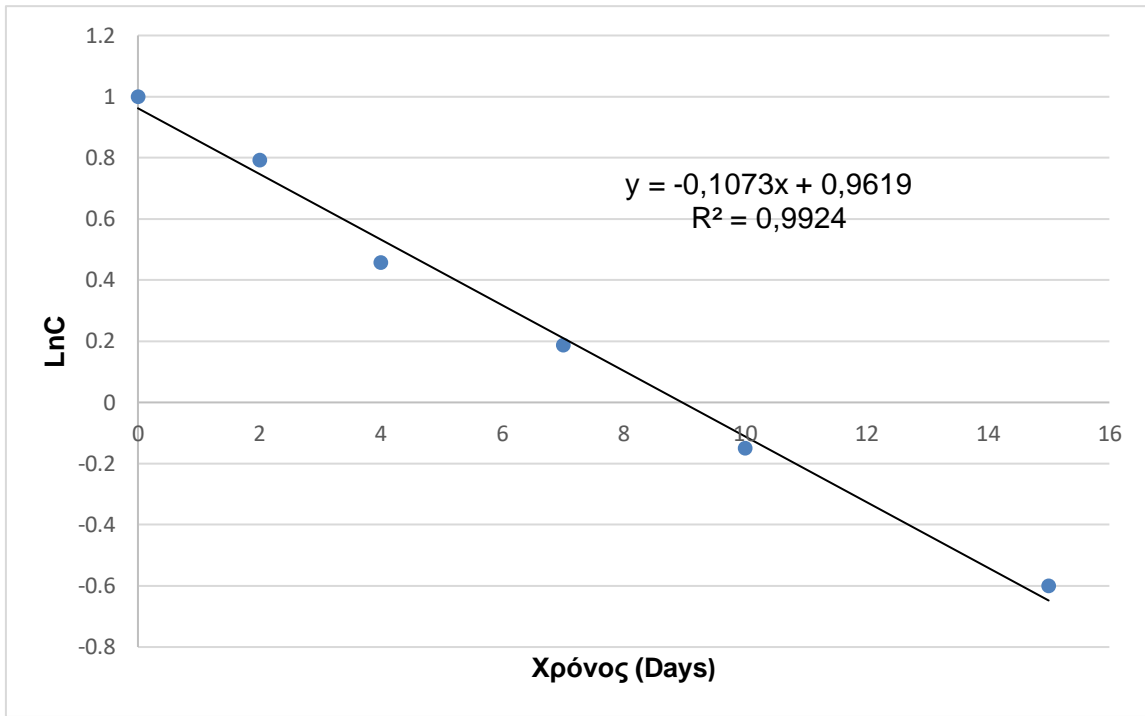
Εικόνα 4.4: Χρωματογράφημα του δείγματος W303-1a Day 7 στους 18 °C.



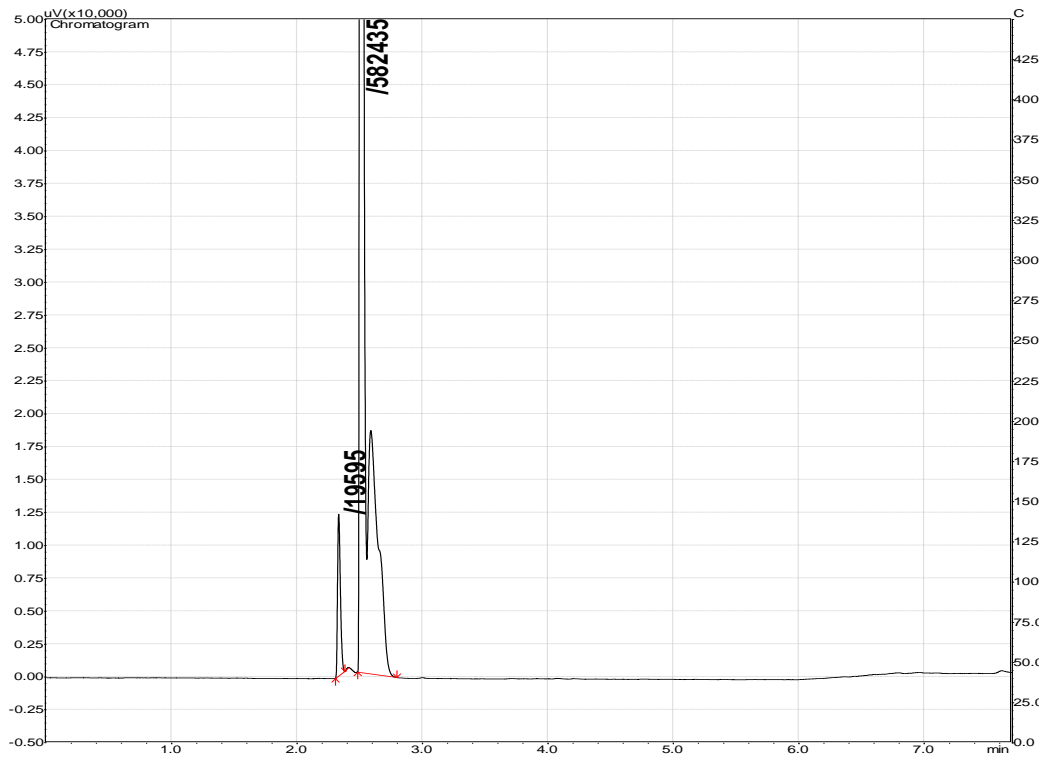
Γράφημα 4.5: Γραφική παράσταση του νεπερίου λογαρίθμου της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης του στελέχους 633 (mol/L) έναντι του χρόνου σε θερμοκρασία 30 °C.



Εικόνα 4.5: Χρωματογράφημα παραγωγής αιθανόλης του στελέχους 532 Day 2 στους 30 °C.



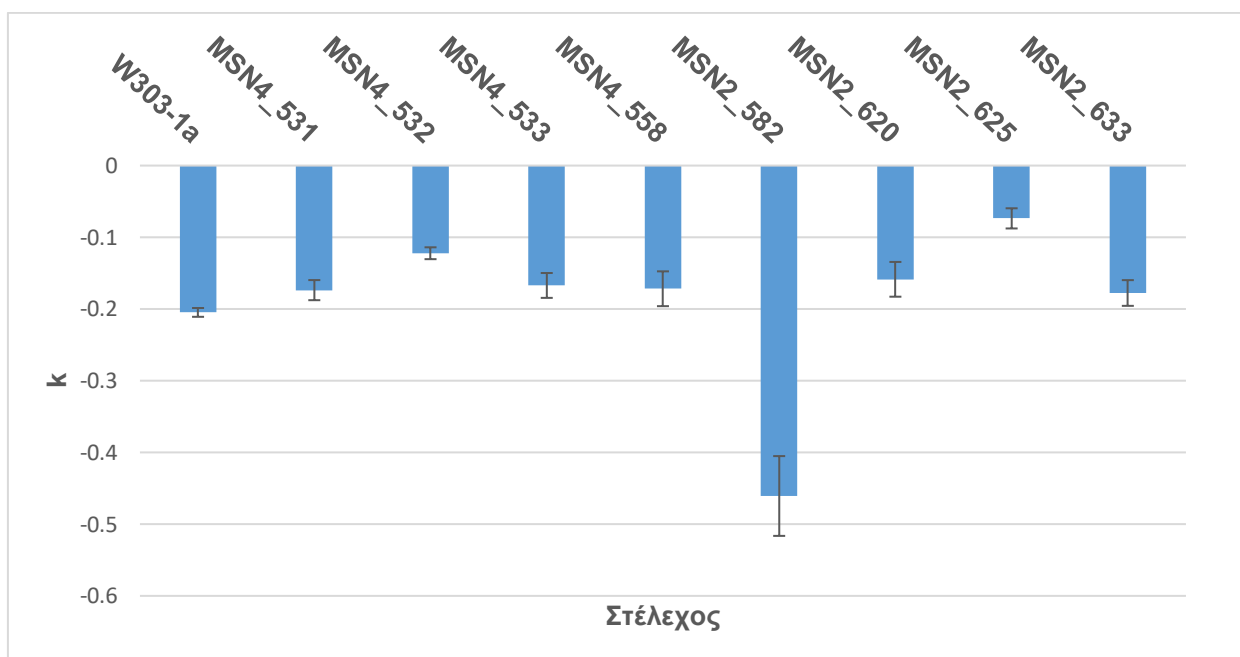
Γράφημα 4.6: Γραφική παράσταση του νεπερίου λογαρίθμου της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης του στελέχους 633 (mol/L) έναντι του χρόνου σε θερμοκρασία 18 °C.



Εικόνα 4.6: Χρωματογράφημα παραγωγής αιθανόλης του στελέχους 582 Day 2 στους 18 °C

Πίνακας 4.1: Συγκεντρωτικός πίνακας τιμών της σταθεράς ταχύτητας της ζύμωσης (-κ) σε θερμοκρασία 30 °C.

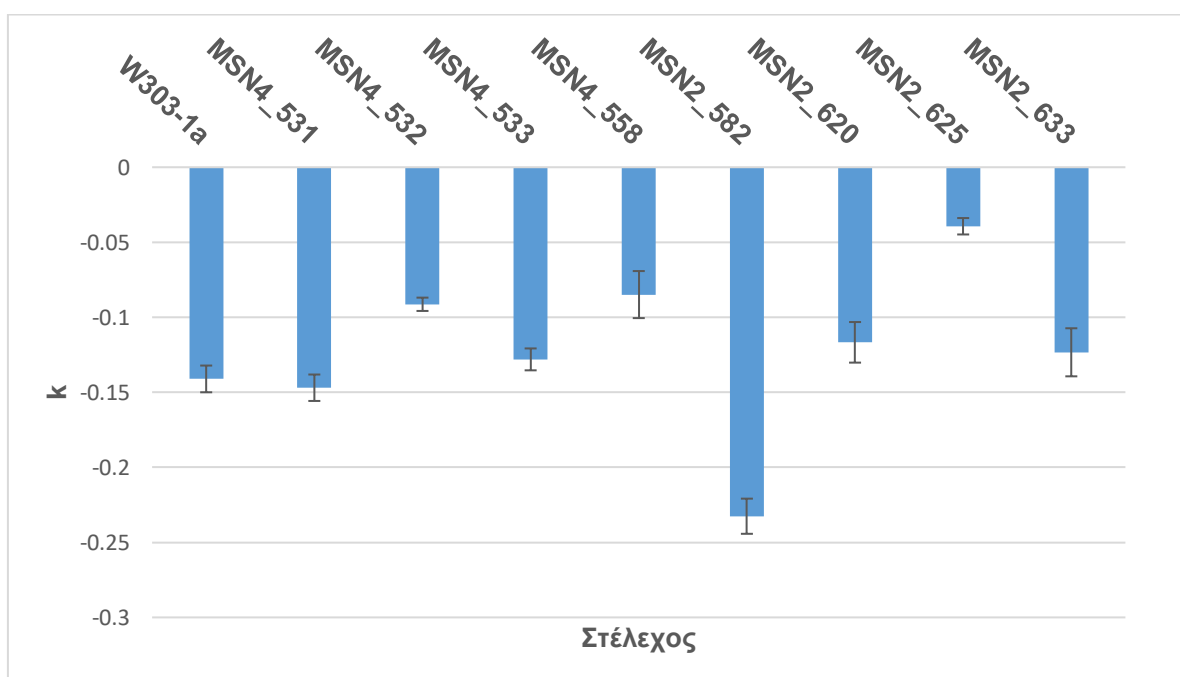
30°C	Glucose	Ethanol	Glucose	Mean	SE	t-test
W303-1a	-0,21086	-0,1986		-0,20473	0,006131	
MSN4_531	-0,18654	-0,18884	-0,14566	-0,17368	0,014023	0,194899
MSN4_532	-0,13872	-0,11452	-0,11346	-0,12223	0,00825	0,005705
MSN4_533	-0,1928	-0,17443	-0,13413	-0,16712	0,017327	0,198035
MSN4_558	-0,21217	-0,1749	-0,12824	-0,17177	0,024279	0,374556
MSN2_582	-0,55777	-0,36511	-0,45919	-0,46069	0,055622	0,037893
MSN2_620	-0,20622	-0,1426	-0,12696	-0,15859	0,024237	0,240619
MSN2_625	-0,07449	-0,04884	-0,09755	-0,07362	0,014067	0,005984
MSN2_633	-0,21243	-0,16787	-0,15265	-0,17765	0,017936	0,334458



Γράφημα 4.7: Γραφική απεικόνιση των τιμών της σταθεράς ταχύτητας της ζύμωσης (-κ) σε θερμοκρασία 30 °C.

Πίνακας 4.2: Συγκεντρωτικός πίνακας τιμών της σταθεράς ταχύτητας της ζύμωσης (-κ) σε θερμοκρασία 18 °C.

18°C	Glucose	Ethanol	Mean	SE	t-test
W303-1a	-0,14998	-0,13217	-0,14107	0,008907	
MSN4_531	-0,15576	-0,13813	-0,14695	0,008812	0,68541
MSN4_532	-0,0869	-0,09576	-0,09133	0,004434	0,037759
MSN4_533	-0,13534	-0,12074	-0,12804	0,0073	0,375256
MSN4_558	-0,10054	-0,06919	-0,08486	0,015678	0,089331
MSN2_582	-0,24427	-0,22086	-0,23256	0,011709	0,024895
MSN2_620	-0,1302	-0,10317	-0,11668	0,013515	0,270837
MSN2_625	-0,0448	-0,03387	-0,03933	0,005468	0,010389
MSN2_633	-0,13935	-0,10731	-0,12333	0,016018	0,435086



Γράφημα 4.8: Γραφική απεικόνιση των τιμών της σταθεράς ταχύτητας της ζύμωσης (-κ) σε θερμοκρασία 18 °C.

Από τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα του πίν.4.1 παρατηρείται ότι το στέλεχος που φέρει τη μετάλλαξη Ser582Ala επί του μεταγραφικού παράγοντα Msn2 εμφανίζει ρυθμό ζύμωσης 2 φορές μεγαλύτερο από αυτόν του αγρίου τύπου στελέχους. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη τροποποίηση πιθανόν να επηρεάζει την λειτουργία της γλυκολυτικής πορείας και της ακόλουθης μετατροπής του παραγόμενου πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη σε θερμοκρασία 30°C. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και κατά την μελέτη της ικανότητας ζύμωσης σε θερμοκρασία 18°C (πίν. 4.2) όπου επίσης το συγκεκριμένο στέλεχος εμφανίζει αυξημένο ρυθμό κατανάλωσης γλυκόζης και παραγωγής αιθανόλης κατά περίπου 1,5 φορές. Προκειμένου να διερευνηθεί η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε το students t-test. Παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα και των δυο προσδιορισμών βρίσκονται σε συμφωνία όσον αφορά την στατιστική σημαντικότητα των παρατηρούμενων διαφορών

Επίσης (πίν. 4.1, 4.2) παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές διαφορές για τα στελέχη που φέρουν τις αλλαγές Ser→Ala στις θέσεις: 532 επί του μεταγραφικού παράγοντα Msn4 και 625 επί του μεταγραφικού παράγοντα Msn2. Για τα στελέχη που φέρουν αυτές τις γενετικές τροποποιήσεις, τα αποτελέσματα δεν είναι ενθαρρυντικά καθώς εμφανίζεται μικρότερη σταθερά ταχύτητας ζύμωσης σε σχέση με το W303-1a αγρίου τύπου. Οπότε η αλλαγή της Σερίνης σε Αλανίνη σε αυτές τις θέσεις δεν ήταν ωφέλιμη για την πορεία της ζύμωσης.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βελτίωση της απόδοσης της αλκοολικής ζύμωσης είναι ένα από τα κρίσιμα ζητήματα που αφορά τόσο τον τομέα της βιομηχανίας τροφίμων και ποτών, όσο και το τομέα της περιβαλλοντικής διαχείρισης αποβλήτων. Το συγκεκριμένο γεγονός λοιπόν χρησιμοποιήθηκε ως έναυσμα για την δημιουργία και μελέτη γενετικά τροποποιημένων στελεχών του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Οι MSN 2/4 ενεργοποιούνται μετά την έκθεση της ζύμης σε μια ευρεία ποικιλία από περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως άζωτο ή έλλειψη άνθρακα, ωσμωτική πίεση, παράγοντες που βλάπτουν το DNA, αιθανόλη και θερμική καταπόνηση.

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν ο έλεγχος της ικανότητας ζύμωσης των 8 στελεχών σε συγκεκριμένες και σταθερές συνθήκες. Τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποκάλυψαν ότι για τα περισσότερα στελέχη η αλλαγή του αμινοξέος δεν είχε κάποια επίδραση στη ζύμωση. Όμως για τα στελέχη MSN4_532 και MSN2_625 η πορεία της ζύμωσης κινήθηκε σε αρνητικά επίπεδα σε σύγκριση με του W303_1a αγρίου τύπου ενώ για το MSN2_582 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της ταχύτητας ζύμωσης η οποία ήταν εμφανείς ακόμα και κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος. Να σημειωθεί ότι η ζύμωση των δειγμάτων με εμβόλιο από το 582 είχε ολοκληρωθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό της σε 4 ημέρες. Ενώ τα υπόλοιπα κυμαίνονταν κοντά στις 7 ημέρες.

Η επαναληψιμότητα βοήθησε στη συλλογή πιο έγκυρων αποτελεσμάτων. Βεβαίως, απαιτείται η περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής αιθανόλης χρησιμοποιώντας φυσικά υποστρώματα όπως γλεύκος προκειμένου να επιβεβαιωθεί η πλήρης επίδραση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων επί της λειτουργίας του ζυμομύκητα καθώς και η μελέτη της ικανότητας επιβίωσης τους κατά την πρόοδο της αλκοολικής ζύμωσης. Υπάρχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα ότι στην περαιτέρω μελέτη θα προκύψουν σημαντικά επιστημονικά στοιχεία.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξενόγλωσση

- Auesukaree C. (2017). Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *Bioscience and Bioengineering*, pp. 1-10
- Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M. (1998). 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*, 180, pp. 1044–1052.
- Brewster J.L., De Valoir T., Dwyer N.D., Winter E., Gustin M.C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*. vol. 259 pp. 1760-1763.
- Estruch F. and Carlson M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13, pp. 3872–3881.
- Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24, pp. 469–486.
- Gancedo J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol., Rev.* 32, pp. 673–704.
- Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, 11, pp. 4241–4257.

- Glazer A.N. and Nikaido H. (1995). *Microbial Biotechnology- Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Görner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schuller C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J*, 21, pp. 135–144.
- Haitani Y., Shimoï H., Takagi H. (2006). Rsp5 regulates expression of stress proteins via post-translational modification of Hsf1 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 580, pp. 3433–3438
- Hasan R., Leroy C., Isnard A.D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol*, 45, pp. 233-241.
- Hirayama T., Maeda T., Saito H., Shinozaki K. (1995). Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*. vol. 249 pp.127-138.
- Jackson R.S. (1994). *Wine Science-Principles and applications*. Carolina: Academic Press.
- Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg A.L. (2004). Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell*, 13, pp. 771–781.
- Lin Y., Tanaka S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69, pp. 627–642.

- Liu Z.L., Saha B.C., Slininger P.J. (2008). Lignocellulosic biomass conversion to ethanol by *Saccharomyces*. In: Wall J., Harwood C., Demain A. (eds) Bioenergy. ASM, Washington, DC, pp. 17–36.
- Marechal P.A., Gervais P. (1994). Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 42 pp. 617-622
- Margaritis A., Merchant F.J.A., Advances in ethanol production using immobilized cell systems. *Critical Rev. Biotechnol.* 1984, 2, 339-393p.
- Martinez-Pastor M. T., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H. and 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, pp. 2227–2235.
- Outlaw J., Collins K.J., Duffield J.A. (2005). Agriculture as a producer and consumer of energy. CABI, Oxfordshire.
- Perez-Ortin E. J., Garcia-Martinez J., Alberola M. T. (2002). DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *Biotechnology*, 98, 227-241
- Sanchez O.J., Cardona C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol*, 99, pp. 5270–5295
- Santangelo G. M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol., Rev.* 70, pp. 253–282.
- Sasano Y., Watanabe D., Ukibe K., Inai T., Ohtsu I., Shimoi H., Takagi H. (2012). Overexpression of the yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production. *Bioscience and Bioengineering*, 113, pp. 451-455

- Schmitt A.P. and McEntee K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, pp. 5777–5782
- Smets B., Ghillebert R., De Snijder P., Binda M., Swinnen E., De Virgilio C. and Winderickx J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet., 56, pp. 1–32.
- Schuller C., Brewster J.L., Alexander M.R., Gustin M.C., Ruis H. (1994). The HOG pathway controls osmotic regulations of transcription via the stress response element (STRE) of *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. EMBO Journal. vol. 13 pp. 4382-4389.
- Tamaki H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biosci. Bioeng, 104, pp. 245–250.
- Thevelein J. M. and de Winde J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol., 33, pp. 904–918.
- VandenLangernberg B. (2012). Baker's and Brewer's Yeast. Available at: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/vandenla_beth/contact.htm.
Τελευταία επίσκεψη 14/5/2018_
- Vertes A., Qureshi N., Yukawa H., Blaschek H. (2010). Biomass to biofuels. Wiley, West Sussex.
- Walker G. M. (1998). Yeast Physiology and Biotechnology. New York: John Wiley and Sons.

- Watanabe M., Watanabe D., Akao T., Shimo H. (2009). Overexpression of MSN2 in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *Bioscience and Bioengineering*, 107, pp. 516-518
- You K.M., Rosenfield C.L., Knipple D.C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and environmental microbiology*.

6.2 Ελληνική

- Αγγελής Γ. (2007). *Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη
- Διαμαντίδης Χ. Γ. (2010). *Εισαγωγή στη Βιοχημεία*. 3^η έκδοση. Θεσσαλονίκη: University studio press
- Κατσάνου Α. Ν . (1999). *Φυσικοχημεία: Βασική Θεώρηση*. 3^η έκδοση. Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση
- Μπαλατσούρας Γ. (2006). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο
- Μπατρίνου Α.Μ. (2011). *Σύγχρονη Βιοτεχνολογία Τροφίμων-γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα*. Αθήνα : Π.Χ. Πασχαλίδης.

- Μπέλκα Α. (2007). *Επίδραση υπολειμάτων φυτοφαρμάκων στη βιοχημική συμπεριφορά στελεχών του είδους Saccharomyces cerevisiae*. Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη.
- Παπαδογιάννης Ν. Ι., Σαμανίδου Φ. Β. (2001). *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Πήγασος
- Παπανικολάου Β. (2006). *Μέθοδοι και Υλικά Ακινητοποίησης Βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης Βιομηχανικής Αλκοόλης σε Βιοαντιδραστήρα*. Διαλείποντος έργου. Πάτρα: s.n.
- Τσακίρης Α. (2014). *Οινολογία: από το Σταφύλι στο Κρασί*. 4^η έκδοση. Αθήνα: Εκδόσεις Ψύχαλου