

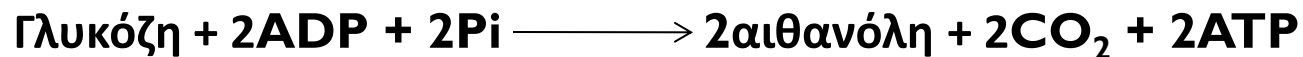


Οινολογία Ι

Ζυμώσεις και ενζυμικές δράσεις κατά την
οινοποίηση

Ζυμομύκητες

- ▶ Οι ζύμες είναι σπουδαίοι μικροοργανισμοί γλεύκους και οίνου.
- ▶ Ζύμες επιτελούν την **αλκοολική ζύμωση**, και έτσι τη μετατροπή του γλεύκους σε οίνο.
- ▶ Επίσης, ζύμες είναι **μικροοργανισμοί αλλοίωσης** των οίνων.
- ▶ Στην αλκοολική ζύμωση χρησιμοποιείται η γλυκολυτική οδός Embden Meyerhof.



- ▶ Η αντίδραση είναι σε σύζευξη με την μετατροπή του NADH σε NAD⁺.
- ▶ Πέρα από τα κύρια προϊόντα της ζύμωσης, αιθανόλη και CO₂, παράγονται σε μικρά ποσά και δευτερογενή προϊόντα, όπως ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, γλυκερόλη, ηλεκτρικό οξύ, διακετύλιο, ακετοΐνη.
- ▶ Επίσης, διάφορες ενώσεις του γλεύκους μεταβολίζονται από τις ζύμες.

Ζυμομύκητες

- ▶ Οι ζυμομύκητες είναι **ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί** και ανήκουν στους **μύκητες**.
- ▶ Είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί, και δεν σχηματίζουν μικκύλιο όπως σχηματίζουν οι υφομύκητες.
- ▶ Τα κύτταρα των ζυμών έχουν διαστάσεις της τάξεως των 5 μέχρι 8 μm , και είναι συνήθως μεγαλύτερα από τα κύτταρα των βακτηρίων.
- ▶ Τα περισσότερα κύτταρα ζυμομυκήτων έχουν απλή μορφολογία και έχουν **σχήμα ωοειδές ή ραβδίου**.
- ▶ Οι ζυμομύκητες **γλεύκους και οίνου** ανήκουν στους **ασκομύκητες** και στους **ατελείς μύκητες**.

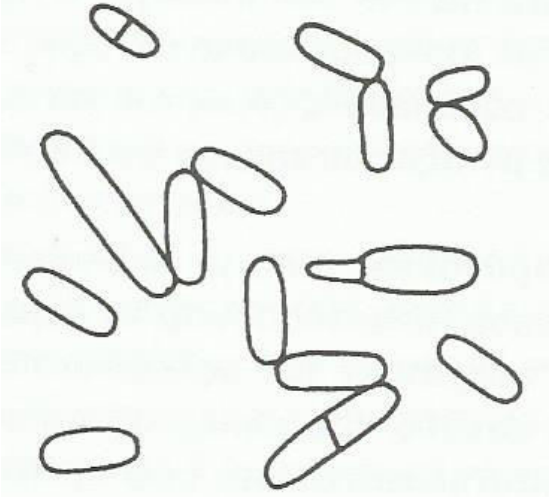


Ζυμομύκητες

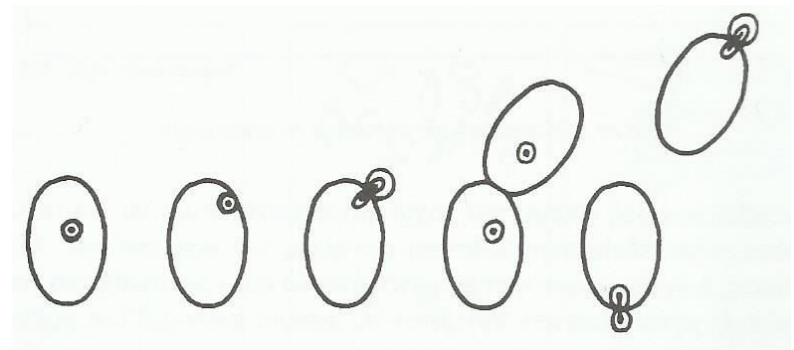
- ▶ Οι ασκομύκητες πολλαπλασιάζονται είτε αγενώς είτε εγγενώς. Δηλαδή με βλαστική αναπαραγωγή είτε με σεξουαλική αναπαραγωγή / σχηματισμό σπορίων (ασκοσπορίων).
- ▶ Στους ασκομύκητες ανήκει το γένος ***Saccharomyces***.
- ▶ Οι ατελείς ζυμομύκητες αναπαράγονται μόνο με βλαστική αναπαραγωγή.
- ▶ Οι περισσότερες ζύμες πολλαπλασιάζονται με βλαστική αναπαραγωγή με την πορεία της εκβλάστησης.
- ▶ Ορισμένες ζύμες, όπως είδη του γένους ***Schizosaccharomyces*** πολλαπλασιάζονται με κυτταρική διαίρεση (σχάση).
- ▶ Όταν σπορογόνες ζύμες βρίσκονται σε δυσμενές περιβάλλον, όπως εξάντληση ζυμούμενων ζαχάρων, φτωχά επίπεδα αζώτου, υψηλός αερισμός, σταματούν να πολλαπλασιάζονται. Μετατρέπονται σε ασκούς με παχύ κυτταρικό τοίχωμα, και σχηματίζουν ασκοσπόρια.

Αναπαραγωγή Ζυμομυκήτων

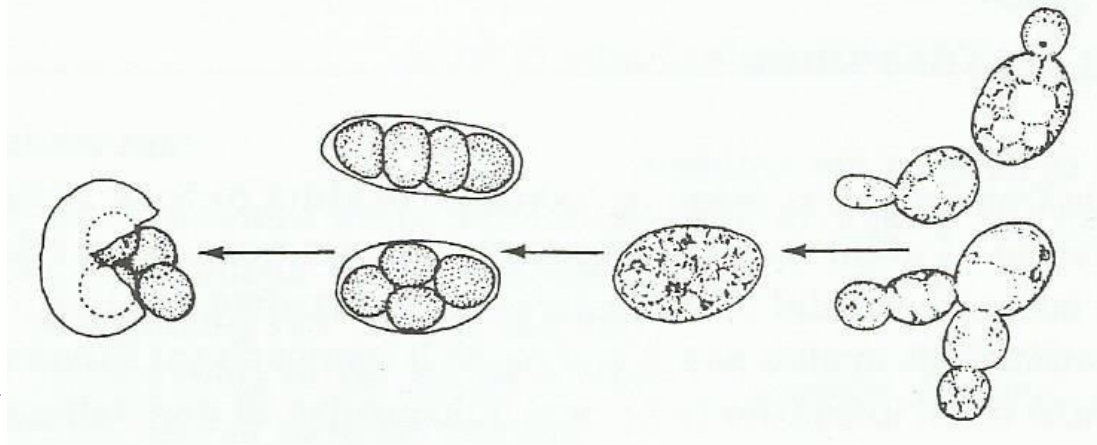
Αναπαραγωγή ζυμομυκήτων με σχάση



Αναπαραγωγή ζυμομυκήτων με εκβλάστηση

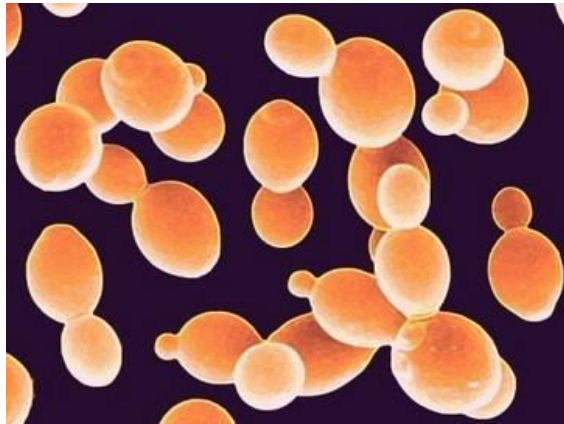


Αναπαραγωγή ζυμομυκήτων με σχηματισμό σπορίων

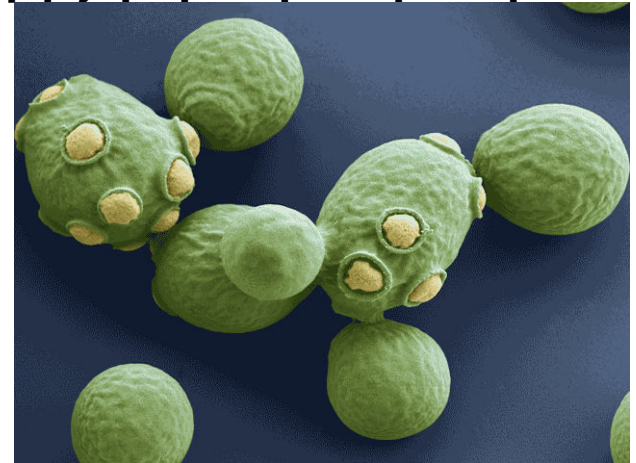


Αναπαραγωγή Ζυμομυκήτων

Αναπαραγωγή ζυμομυκήτων με σχάση



Αναπαραγωγή ζυμομυκήτων με εκβλάστηση



Σπορογόνες ζύμες σε ασκούς(ασκοσπόρια)



Ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου

- ▶ Οι ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου ταξινομούνται στους **σπορογόνους** και **ασπορογόνους**.
- ▶ Μεταξύ των **σπορογόνων** είναι τα γένη ***Saccharomyces***, ***Hanseniaspora***, ***Dekkera***, ***Pichia***, ***Torulaspota***, ***Kluuyveromyces***, ***Debaryomyces***.
- ▶ Μεταξύ των **ασπορογόνων** είναι τα γένη ***Kloeckera***, ***Candida***, ***Brettanomyces***.
- ▶ Σημειώνεται ότι κάποια γένη συνιστούν τις ατελείς μορφές άλλων γενών / κάποια γένη τις σπορογόνες μορφές ατελών μορφών.
- ▶ Ο *Kloeckera* είναι ατελής μορφή του *Hanseniaspora*.
- ▶ Ο *Dekkera* είναι σπορογόνα μορφή του *Brettanomyces*.
- ▶ Επίσης, υπάρχουν διαχρονικά νέες ταξινομήσεις των ζυμομυκήτων και νέες ονομασίες



Ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου

- ▶ Μία διάκριση που συχνά γίνεται είναι αυτή σε **σαχαρομύκητες** και **μη-ζαχαρομύκητες**.
- ▶ Δηλαδή του γένους *Saccharomyces* και οι *non-Saccharomyces* ζυμομύκητες.
- ▶ Οι **μη ζαχαρομύκητες** εμπλέκονται σε **αλλοιώσεις** των οίνων.
- ▶ Όμως, διάφοροι από αυτούς βρίσκονται σε αυθόρμητες ζυμώσεις (φυσική μικροχλωρίδα) και επίσης δοκιμάζονται σε συνδυασμό με ζαχαρομύκητα.
- ▶ Θεωρείται ότι συνεισφέρουν στην πολυπλοκότητα του flavour των οίνων.
- ▶ Μεταξύ αυτών είναι τα γένη *Kloeckera* / *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Torulasporea*.



Φαινόμενο killer

- ▶ Στις ζύμες εμφανίζεται το φαινόμενο **killer**.
- ▶ Στελέχη ζυμομυκήτων, **killer στελέχη**, εκκρίνουν **τοξίνες** πρωτεϊνικής φύσης που **θανατώνουν άλλα ευαίσθητα στελέχη ζυμών**.
- ▶ Τα killer στελέχη δεν είναι ευαίσθητα στις τοξίνες τους, αλλά μπορεί να είναι ευαίσθητα σε τοξίνες που δεν παράγουν.
- ▶ Το φαινόμενο killer παρουσιάζουν στελέχη του ***Saccharomyces cerevisiae***, αλλά υπάρχει επίσης και σε άλλα γένη, όπως *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida*, *Kloeckera*.
- ▶ Τα στελέχη των ζυμών διακρίνονται σε στελέχη Killer (K) που παράγουν τοξίνες για άλλες ζύμες, σε Killer (K)-Sensitive (S) που παράγουν τοξίνες και είναι ευαίσθητοι σε τοξίνες άλλων ζυμών, σε στελέχη Neutral (N), που δεν παράγουν και δεν είναι ευαίσθητοι σε τοξίνες, και σε στελέχη Sensitive (S) που δεν παράγουν τοξίνες και είναι ευαίσθητοι σε τοξίνες).



Ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου

- Από τις ιδιότητες των ζυμών σημαντικές είναι η ζυμωτική είτε η οξειδωτική χρησιμοποίηση ζαχάρων (πηγές άνθρακα), όπως και η χρησιμοποίηση αζωτούχων ενώσεων (πηγές αζώτου).
- Με βάση την ανάπτυξή τους με αυξητικούς παράγοντες, οι ζύμες διακρίνονται στις αυξότροφες που μπορούν να πολλαπλασιαστούν απουσία αυξητικών παραγόντων, και στις εξώτροφες που δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν όπως των γενών *Kloeckera*, *Hanseniaspora*.
- Στην οινολογία, σημαντική είναι και η ανθεκτικότητα στο θειώδη ανυδρίτη.
- Άλλες ζύμες είναι ευαίσθητες, όπως οι *Kloeckera*, *Hanseniaspora* και *Torulaspora delbrueckii*, άλλες λιγότερο ευαίσθητες όπως οι *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida stellata*, και άλλες ανθεκτικές, όπως οι *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bailli*.

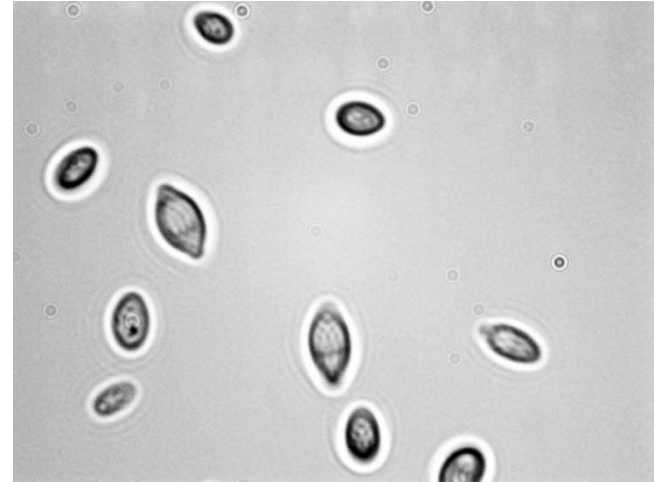


Ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου

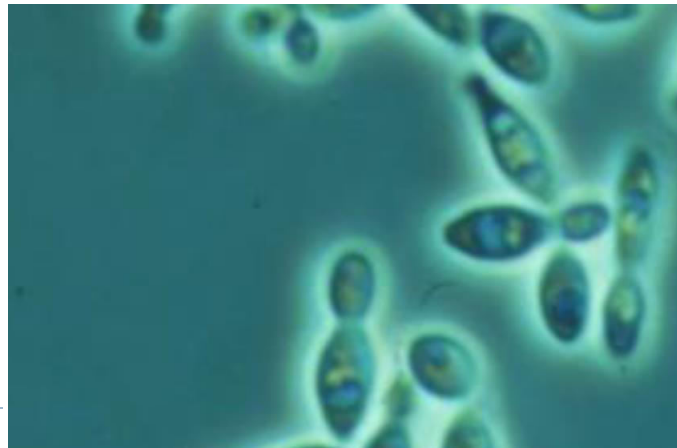
Saccharomyces cerevisiae



Hanseniaspora uvarum



Pichia



Ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου

- ▶ Οι ζύμες γλεύκους και οίνου μπορούν να διακριθούν σε **ζύμες οινοποίησης**, **ζύμες επαναζυμώσεων** ή **ασθενειών** και **ζύμες επιμολύνσεων**.
- ▶ Στις **ζύμες οινοποίησης** είναι οι *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces bayanus*.
- ▶ Στις **ζύμες επαναζυμώσεων** είναι οι *Saccharomyces bayanus* και *Zygosaccharomyces bailli*. Επίσης, οι *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomyces chavalieri*, *Saccharomyces unarum*. Στις ζύμες επιμολύνσεων (ή οινοποιείων) είναι οξειδωτικές ζύμες κυρίως των γενών *Candida*, *Pichia*, *Brettanomyces*.



Κύριοι Ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου

- ▶ ***Hanseniaspora uvarum*** και η ατελής μορφή του ***Kloeckera apiculata*** : αποτελεί περίπου το 90 % των ζυμομυκήτων που υπάρχουν στο σταφύλι. Έχει μικρή ζυμωτική ικανότητα, μέχρι περίπου 4 % vol., ενώ στελέχη παράγουν αυξημένη πτητική οξύτητα και οξικό αιθυλεστέρα. Παρουσιάζει ευαισθησία στο θειώδη ανυδρίτη, και έτσι γρήγορα σταματάει η δράση του.
- ▶ ***Saccharomyces cerevisiae*** : αποτελεί περίπου το 80% του γλεύκους σε ζύμωση. Αυξάνεται γρήγορα και έχει τη δυνατότητα να ζυμώσει μέχρι 12 με 14% vol. Μπορεί να μετέχει και σε αναζυμώσεις.
- ▶ ***Saccharomyces chevalieri*** : έχει δράση παρόμοια με τον *S. cerevisiae*, και δεν ζυμώνει την μαλτόζη. Μπορεί να μετέχει και σε αναζυμώσεις.



Κύριοι Ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου

- ▶ ***Saccharomyces bayanus*** : στο σταφύλι υπάρχει μόνο σε μικρούς πληθυσμούς. Έχει δυνατότητα ζύμωσης μέχρι 18% vol. και έτσι συνεχίζει την ζύμωση μετά τον *S. cerevisiae*. Είναι ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη και υπεύθυνος πολλών αναζυμώσεων.
- ▶ ***Schizosaccharomyces pombe*** : ζυμώνει το μηλικό οξύ σε αιθανόλη, και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βιολογική μείωση της οξύτητας του γλεύκους. Είναι πολύ ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη, και έτσι μπορεί να ζυμώνει θειωμένα γλεύκη (έχουν θειώδη ανυδρίτη μέχρι 200 g/hl). Επίσης, μπορεί να έχει συμμετοχή στη ζύμωση.



Κύριοι Ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου

- ***Zygosaccharomyces bailli*** : Σπάνια υπάρχει στο σταφύλι, ενώ συναντάται στα γλυκά κρασιά και είναι υπεύθυνος αναζυμώσεων.
- ***Saccharomyces ludwigii*** : Είναι ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη και έχει δυνατότητα ζύμωσης μέχρι 17 % vol. Προκαλεί αναζυμώσεις στα εμφιαλωμένα κρασιά, και σχηματίζει οξικό αιθυλεστέρα. Είναι ιδιαίτερα ανεπιθύμητος.
- ***Saccharomyces uvarum*** : Μπορεί να μετατρέψει τον θειώδη ανυδρίτη σε θειϊκά, γεγονός που τον κάνει επικίνδυνο.



Κύριοι Ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου

- ***Brettanomyces*** : με περιορισμένη συμμετοχή μπορεί να συμβάλει στο σύνθετο του flavour του οίνου. Όμως, συνήθως η παρουσία του έχει αρνητική επίδραση και πρέπει να ελέγχεται. Παράγει 4-αιθυλοφαινόλη και 4-αιθυλογουαϊκόλη, που σε κάποιες περιπτώσεις έχουν θετική επίδραση αλλά συνήθως αρνητική και θεωρείται ελάτωμα. Παράγει οξικό οξύ/οξικό αιθυλεστέρα.
- ***Candida*** : εμπλέκεται σε αλλοίωση, σχηματίζει υμένιο στην επιφάνεια διατηρημένων κρασιών. Υπάρχει σε υψηλούς πληθυσμούς στο σταφύλι-γλεύκος. Ο *Candida stellata* είναι ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη και ζυμώνει και μέχρι σχετικά υψηλά επίπεδα αλκόλης.
- ***Pichia*** : Αναπτύσσεται στην επιφάνεια των κρασιών με δημιουργία υμενίου, ενώ επίσης δημιουργεί αυξημένη πτητική οξύτητα και οξικό αιθυλεστέρα. Μπορεί να μετέχει στη ζύμωση, όπως ο *P. etchellsii*, και έχει μικρή ζυμωτική ικανότητα



Ζύμωση γλεύκους

- Οι ζυμομύκητες, όπως και άλλοι μικροοργανισμοί, βρίσκονται στον αμπελώνα, στο έδαφος και στα κλήματα.
- Η ζυμοχλωρίδα του γλεύκους προέρχεται από τα ώριμα σταφύλια, όπου βρίσκεται στην κηρώδη ουσία που περιβάλλει τις ράγες.
- Στην αρχή της πορείας οινοποίησης, διάφορα είδη ζυμών βρίσκονται στο γλεύκος.
- Ακόμη και παρουσία θειώδη ανυδρίτη, στην αυθόρμητη ζύμωση του γλεύκους συμμετέχουν διάφορα είδη ζυμών.



Ζύμωση γλεύκους

- Συνήθως, **στα αρχικά στάδια** της αλκοολικής ζύμωσης κύρια είναι τα γένη *Kloeckera*, *Hanseniaspora* και *Candida*, ακολοθούμενα από τα γένη *Pichia* και *Metschnikowia*. Οι περισσότεροι non-*Saccharomyces* είναι ευαίσθητοι στην αλκοόλη σε επίπεδα 4 ή 5-6 % vol., και έτσι δεν αντέχουν. Η αντοχή τους φαίνεται να είναι μεγαλύτερη σε χαμηλές θερμοκρασίες. Καθώς ο πληθυσμός τους μειώνεται τη σκυτάλη παίρνουν οι ζαχαρομύκητες.
- Στα **επόμενα στάδια** της ζύμωσης κυριαρχεί ο *Saccharomyces cerevisiae* καθόσον είναι ανθεκτικός σε υψηλά επίπεδα αλκοόλης. Επίσης, κατά τη ζύμωση μπορεί να βρίσκονται και άλλες ζύμες όπως των γενών *Torulasporea*, *Kluveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* και *Brettanomyces*.
- Σε **υψηλά επίπεδα** αλκοόλης ζυμώνει ο *Saccharomyces bayanus*. Ο *Saccharomyces cerevisiae* ζυμώνει μέχρι περίπου 11,0-13,5 % vol. Εάν υπάρχουν ζάχαρα και είναι επιθυμητό η ζύμωση συνεχίζεται με τον *Saccharomyces bayanus* σε υψηλά επίπεδα αλκοόλης (14-17% vol.).

Ζύμωση γλεύκους

- ▶ Οι ζυμομύκητες της φυσικής χλωρίδα (αυτόχθονες, γηγενείς, αυθόρμητη ζύμωση) έχουν επίδραση στη σύσταση και ποιότητα του οίνου, που μπορεί να είναι θετική ή αρνητική.
- ▶ Για αποφυγή ανάπτυξης ανεπιθύμητων ζυμών προστίθεται θειώδης ανυδρίτης και γίνεται ενοφθαλμισμός με επιλεγμένα στελέχη ξηρών ενεργών ζυμών (*Saccharomyces cerevisiae*).
- ▶ Ο ζυμομύκητας αυτός είναι πιο ανθεκτικός στο θειώδη ανυδρίτη από τις περισσότερες άλλες ζύμες, και έτσι η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη ευνοεί την ανάπτυξή του. Επίσης, με τον ενοφθαλμισμό αυξάνεται σημαντικά ο αρχικός πληθυσμός του *Saccharomyces cerevisiae*.
- ▶ Σήμερα, στα οινοποιεία κυρίως γίνεται χρήση ξηρών ενεργών ζυμών (καθαρές καλλιέργειες, starters), για έλεγχο της ζύμωσης.
- ▶ Όμως, σε κάποια οινοποιεία συνεχίζουν την οινοποίηση με αυθόρμητη ζύμωση καθόσον θεωρούν ότι έτσι παράγεται οίνος με πιο πλούσια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Ζύμωση γλεύκους

- ▶ **Στην αρχή** της πορείας οينوποίησης οι ζύμες αρχίζουν να μεταβολίζουν τα ζάχαρα και άλλα θρεπτικά του γλεύκους. Χρησιμοποιούν τα θρεπτικά για παραγωγή ενέργειας και να αυξήσουν τους πληθυσμούς τους.
- ▶ **Τις πρώτες ώρες** δεν συμβαίνει αύξηση του πληθυσμού, και τα κύτταρα προσαρμόζονται στις συνθήκες. Ο αρχικός πληθυσμός εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες. Στις αυθόρμητες ζυμώσεις ο πληθυσμός είναι περίπου 10^4 κύτταρα/mL. Όταν γίνεται ενοφθαλμισμός με επιλεγμένες ξηρές ζύμες, ο αρχικός πληθυσμός είναι περίπου 5×10^6 κύτταρα/mL.
- ▶ **Μετά την προσαρμογή τους** στις συνθήκες, οι ζύμες αρχίζουν να αναπτύσσονται/πολλαπλασιάζονται (εκθετική φάση). Στη φάση αυτή η ανάπτυξη εξαρτάται από τη θερμοκρασία, από τη συγκέντρωση πηγών αζώτου (αμμωνιακά, αμινοξέα) και άλλων θρεπτικών, από την παρουσία οξυγόνου. Κατά την εκθετική φάση ο πληθυσμός των ζυμομυκήτων αυξάνεται στα 10^7 – 10^8 κύτταρα/mL. Η φάση αυτή διαρκεί 3-6 ημέρες.



Ζύμωση γλεύκους

- ▶ Στη συνέχεια **σταματά η ανάπτυξη των ζυμών** λόγω έλλειψης κάποιων θρεπτικών συστατικών. Κατά τη φάση αυτή, ονομάζεται στατική φάση, ο πληθυσμός των ζυμών παραμένει σχεδόν σταθερός, με μικρή μόνο μείωση του πληθυσμού όπως στα 2×10^7 κύτταρα/mL. Η φάση διαρκεί 2-10 ημέρες.
- ▶ Στη συνέχεια αρχίζει η **φάση θανάτου**, και ο πληθυσμός των ζυμών σταδιακά μειώνεται μέχρι σχεδόν μηδενισμού. Ο ολικός πληθυσμός (ζώντων και μη) παραμένει σταθερός. Οι ζύμες πεθαίνουν λόγω της έλλειψης θρεπτικών και λόγω της τοξικής δράσης της αλκοόλης και άλλων προϊόντων της ζύμωσης. Η διάρκεια της φάσης θανάτου είναι μεγάλη, μέχρι 15 ημέρες.
- ▶ Ο **κύκλος ανάπτυξης σε γλεύκη πλούσια σε σάκχαρα** μπορεί να είναι μεγάλου χρόνου, όπως 40 ημέρες. Τη μεγαλύτερη διάρκεια έχει η φάση θανάτου. Η επιτυχία της ζύμωσης εξαρτάται από τη διατήρηση του πληθυσμού των ζώντων ζυμών σε επαρκή επίπεδα μέχρι πλήρη ζύμωση των ζαχάρων. Διαφορετικά συμβαίνει αργή ζύμωση είτε διακοπή της ζύμωσης.



Ανάπτυξη Ζυμομυκήτων

- ▶ Η ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και ο επακόλουθος πολλαπλασιασμός εξαρτάται από τα θρεπτικά συστατικά, το pH, το οξυγόνο, τη θερμοκρασία, τις αντιμικροβιακές ενώσεις.
- ▶ **Θρεπτικά συστατικά:** Οι ζύμες χρησιμοποιούν το γλεύκος ως πηγή θρεπτικών συστατικών. Επίσης, γίνεται προσθήκη στο γλεύκος διάφορων θρεπτικών συστατικών. Με ισχυρή απολάσπωση μπορεί να συμβεί εξάντληση θρεπτικών συστατικών του γλεύκους, όπως και ζυμών, και ως αποτέλεσμα διακοπή της ζύμωσης.
- ▶ Οι ομάδες των θρεπτικών συστατικών είναι οι παρακάτω:
Πηγή άνθρακα : με αναπνοή (οξειδωση) οι ζύμες χρησιμοποιούν ζάχαρα, αμινοξέα, γλυκερόλη, αλκοόλες, αλδεύδες και άλλες ενώσεις άνθρακα ως πηγές άνθρακα. Τελικά προϊόντα της οξειδωσης είναι το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό.



Πηγή άνθρακα

- Με ζύμωση χρησιμοποιούν μόνο ζάχαρα, κυρίως τις εξόζες γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, και ορισμένες ζύμες και τη γαλακτόζη. Επίσης, ορισμένους διζαχαρίτες, τη ζαχαρόζη και τη μαλτόζη.
- **Προϊόντα της ζύμωσης είναι η αλκοόλη, το διοξείδιο του άνθρακα, και δευτερεύοντα προϊόντα.**
- Σημειώνεται ότι η **συγκέντρωση ζαχάρων του γλεύκους** έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των ζυμών.
- **Πολύ υψηλές και πολύ χαμηλές** συγκεντρώσεις ζαχάρων έχουν **αρνητική επίδραση**, ενώ μπορεί να συμβεί και διακοπή της ζύμωσης.



Πηγή αζώτου

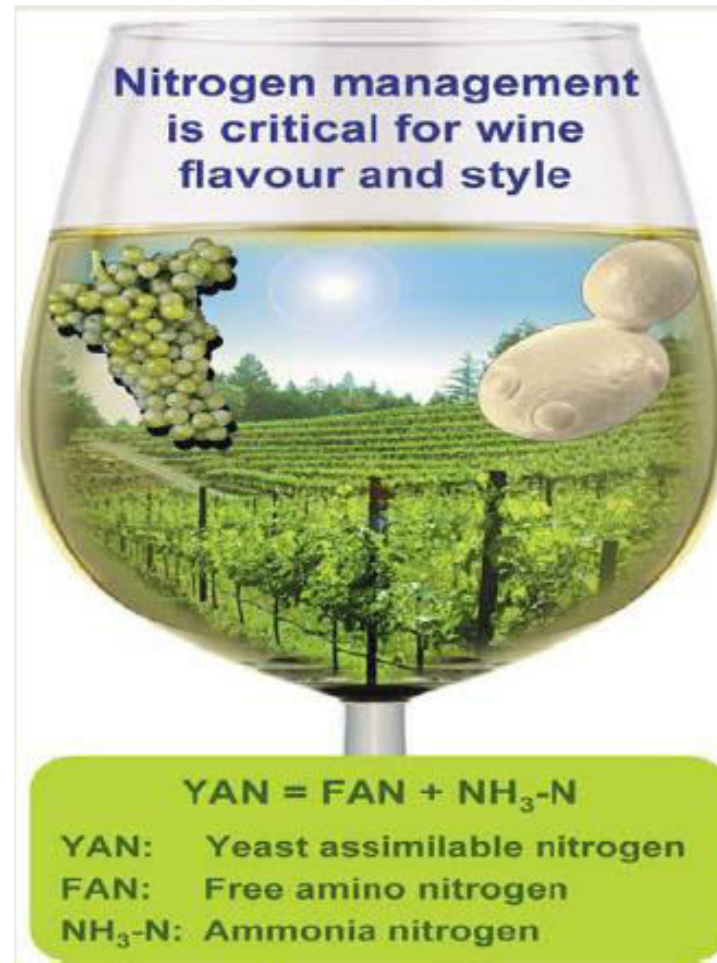
- για τη βιοσύνθεση των αμινοξέων τους οι ζύμες χρειάζονται πηγή αζώτου. Το αμμωνιακό άζωτο είναι εύκολα αφομοιώσιμη πηγή αζώτου. Μάλιστα το αμμωνιακό άζωτο που υπάρχει στο γλεύκος εξαντλείται από την πρώτη ημέρα.
- Άλλη πηγή αζώτου στο γλεύκος είναι αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες. Η επαρκής πηγή αφομοιώσιμου αζώτου είναι σημαντική για τη ζύμωση, ενώ σε έλλειψή του μπορεί να διακοπεί η ζύμωση.
- Στο γλεύκος προστίθενται παρασκευάσματα που περιέχουν άζωτο αφομοιώσιμο από τις ζύμες. Χρησιμοποιούνται φωσφορικό αμμώνιο και αμινοξέα, αλλά και θειικό αμμώνιο.

Ανόργανα συστατικά:

- οι ζύμες χρειάζονται ανόργανα συστατικά για την ανάπτυξή τους και τη ζύμωση. Αυτά είναι τα K, Mg, P. Επίσης Ca, Cl, Cu, Fe, Mn, Zn και άλλα.
-



Άζωτο αφομοιώσιμο από τους ζυμομύκητες



Παράγοντες επιβίωσης

- Αυτοί είναι στερόλες και μεγάλης αλυσίδας ακόρεστα λιπαρά οξέα. Οι ενώσεις αυτές διατηρούν την ακεραιότητα και διαπερασιμότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.
- Αυτό είναι σημαντικό καθόσον η αιθανόλη έχει τοξική επίδραση, αυξάνει τη διαπερασιμότητα της μεμβράνης που έχει αρνητική επίδραση στο μεταβολισμό.
- Οι παράγοντες επιβίωσης βιοσυντίθενται από τις ζύμες παρουσία οξυγόνου.
- Η προσθήκη πηγής στερολών και λιπαρών οξέων έχει θετική επίδραση στο ρυθμό ζύμωσης και στην ολοκλήρωση της ζύμωσης. Καλή πηγή τους είναι παρασκευάσματα αδρανοποιημένων ζυμομυκήτων ή τοιχωμάτων τους.



Παράγοντες επιβίωσης

- ▶ **Βιταμίνες** : Οι ζύμες χρειάζονται κυρίως τις βιταμίνες **βιοτίνη (H)**, **θειαμίνη (B1)**, **παντοθενικό οξύ (B5)** και **πυριδοξίνη (B6)**.
- ▶ Η **βιοτίνη** είναι σημαντική για την ανάπτυξη των ζυμών και τη ζύμωση, όπως και για την παραγωγή ανώτερων αλκοολών και εστέρων.
- ▶ Σε διάφορες περιπτώσεις παρατηρείται έλλειψη θειαμίνης (καταστρέφεται σε υψηλά επίπεδα θείωσης), και γίνεται προσθήκη (0,5-1 mg/L). Ο πυροφωσφορικός εστέρας της θειαμίνης είναι συνένζυμο αντιδράσεων αποκαρβοξυλίωσης, και της αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλλικού οξέος προς ακεταλδεύδη.
- ▶ Δηλαδή, **παρουσία θειαμίνης** άλλες ενώσεις (εκτός ακεταλδεύδης) που μπορούν να δεσμεύουν τον θειώδη ανυδρίτη σχηματίζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Έτσι, τα επίπεδα του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη είναι υψηλότερα, και δεν χρειάζεται προσθήκη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων θειώδη ανυδρίτη.

Παράγοντες επιβίωσης

- ▶ Σε περιπτώσεις έλλειψης θειαμίνης, όπως σε προσβολές από βοτρυτή, το ελεύθερο θειώδες είναι πολύ χαμηλό ενώ το δεσμευμένο υψηλό. Η κατάλληλη στιγμή της προσθήκης του θεωρείται ότι είναι μετά ακριβώς μετά τη ζωηρή έναρξη της ζύμωσης.
- ▶ **Το παντοθενικό οξύ και η πυριδοξίνη** συμμετέχουν στη βιοσύνθεση θειούχων αμινοξέων.
- ▶ Με έλλειψή τους μπορεί να παραχθούν υψηλά επίπεδα υδροθείου ακόμη και με επαρκές αφομοιώσιμο άζωτο.
- ▶ Το παντοθενικό οξύ συμμετέχει στο σχηματισμό εστέρων.
- ▶ Γενικά **με επάρκεια σε βιταμίνες** ο οίνος που παράγεται είναι πιο **ποιοτικός**.



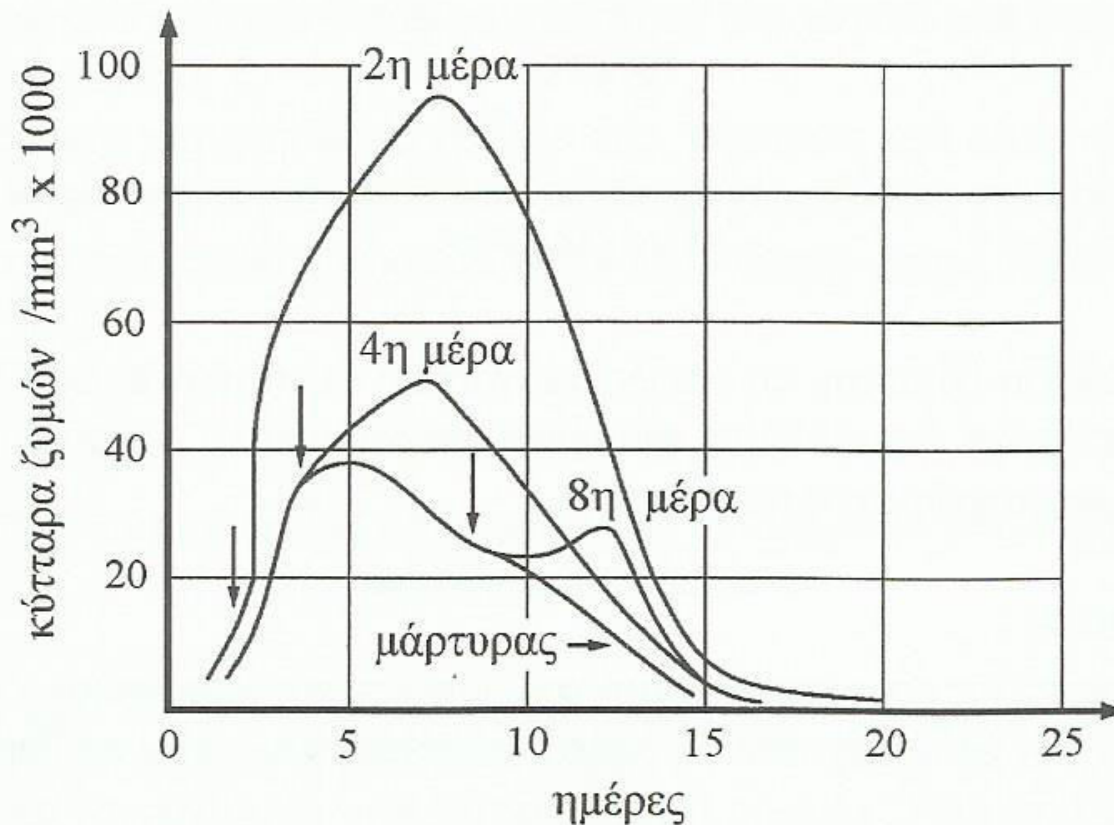
Παράγοντες επιβίωσης- Οξυγόνο

- ▶ Οι **ζύμες** είναι προαιρετικά **αναερόβιοι** μικροοργανισμοί.
- ▶ Η ζύμωση είναι **αναερόβια** πορεία.
- ▶ Όμως, η **ύπαρξη οξυγόνου στην αρχή** είναι σημαντική για την **επιτυχή ολοκλήρωση** της ζύμωσης. Το οξυγόνο είναι σημαντικό στη σύνθεση στερολών που συμβάλλουν στην επιλεκτική διαπερατότητα από την κυτταρική μεμβράνη και έτσι στην προστασία των ζυμών.
- ▶ Με τη ζύμωση παράγεται υποπολλαπλάσια ποσότητα ενέργειας από τις ζύμες σε σχέση με την αναπνοή. Έτσι, για την απαραίτητη ενέργεια χρησιμοποιούν μεγάλες ποσότητες ζαχάρων. Βέβαια, η ένταση της αναπνοής και η ένταση της ζύμωσης είναι αντίστροφα ανάλογα, και στην πράξη συμβαίνει διαδοχική μετάβαση από την αναπνοή στη ζύμωση.



Επίδραση αερισμού στον πληθυσμό των ζυμομυκήτων.

Όμως, για τη ζύμωση απαιτείται **υψηλός πληθυσμός κυττάρων ζυμών**. Υψηλοί πληθυσμοί κυττάρων πετυχαίνονται με **αναπνοή**. Έτσι, για καλή ζύμωση γίνεται αερισμός, με καλύτερα αποτελέσματα τη δεύτερη ημέρα (εκθετική φάση). Με αυστηρή αναεροβίωση μπορεί να συμβεί διακοπή της ζύμωσης.



Παράγοντες επιβίωσης- θερμοκρασία

- Οι ζύμες είναι **ψυχρόφιλοι και μεσόφιλοι** μικροοργανισμοί.
- Ο **ρυθμός της ζύμωσης** είναι ανάλογος της **θερμοκρασίας**.
- Όμως, **όσο πιο υψηλή** η θερμοκρασία τόσο πιο **ατελής η ζύμωση** δηλαδή τόσο μεγαλύτερο είναι ποσοστό των σακχάρων που παραμένουν αζύμωτα.
- Έτσι, σε υψηλότερες θερμοκρασίες ζυμώνονται λιγότερα ζάχαρα και λαμβάνεται χαμηλότερη συγκέντρωση αλκοόλης.
- Η **κατάλληλη επιλογή της θερμοκρασίας** ζύμωσης είναι σημαντική για την **αποφυγή διακοπής της ζύμωσης**.
- Σταθερή θερμοκρασία ζύμωσης ευνοεί την ανάπτυξη των ζυμών και διευκολύνει τη ζύμωση.



Παράγοντες επιβίωσης- θερμοκρασία

- Σε χαμηλές θερμοκρασίες μπορεί να συμβεί αργή ζύμωση ή διακοπή της ζύμωσης.
- Επίσης, η θερμοκρασία ζύμωσης έχει σημαντική επίδραση στην παραγωγή ανώτερων αλκοολών και εστέρων, και κατά συνέπεια στο άρωμα του παραγόμενου οίνου.
- Με ζύμωση σε χαμηλή θερμοκρασία ο οίνος έχει πιο λεπτό άρωμα.
- Στη λευκή οινοποίηση οι θερμοκρασίες ζύμωσης μπορεί να είναι **18-20 °C**, και με τις σύγχρονες προσεγγίσεις χαμηλότερα όπως **16 °C**.
- Στην ερυθρή οινοποίηση οι θερμοκρασίες ζύμωσης είναι υψηλότερες, **25 °C** και μεγαλύτερες, καθόσον λαμβάνει χώρα η εκχύλιση.



Παράγοντες επιβίωσης-pH

- ▶ Το **άριστο pH** ανάπτυξης των ζυμών είναι **4-6**.
- ▶ Το **pH των γλευκών** είναι **2,8-3,8**, και έτσι η ανάπτυξη των ζυμών ευνοείται σε υψηλότερα pH γλευκών.
- ▶ Επίσης, σε **υψηλότερα pH** διάφορα προϊόντα της ζύμωσης όπως ανώτερες αλκοόλες και εστέρες παράγονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.



Αντιμικροβιακές ενώσεις

- ▶ **θειώδης ανυδρίτης:** προστίθεται στο γλεύκος και στον οίνο.
- ▶ **Σορβικό οξύ :** προστίθεται στο γλεύκος και στον οίνο.
- ▶ **Αιθανόλη:** μπορεί να προκαλέσει επιβράδυνση της ανάπτυξης των ζυμομυκήτων, και σε υψηλές συγκεντρώσεις και διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης.
- ▶ **CO₂:** ασκεί μικρή παρεμποδιστική δράση.
- ▶ **Οξικό οξύ:** η παρεμποδιστική του δράση αρχίζει σε συγκέντρωση 0,1 g/L και είναι σημαντική σε 0,5 g/L. Οξικό οξύ μπορεί να υπάρχει στο γλεύκος. Η περιεκτικότητα σε οξικό οξύ είναι αυξημένη προς το τέλος της ζύμωσης. Στη συνέχεια μεταβολίζεται σε άλλα προϊόντα.

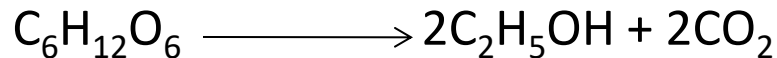
Αλκοολική Ζύμωση

- Η αλκοολική ζύμωση παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε **γλεύκος το οποίο αφού αφέθηκε στην τύχη του** για μικρό χρονικό διάστημα, παρουσίασε ένα **φαινόμενο αντίδρασης που εκδηλώθηκε με έντονο αναβρασμό**.
- Το φαινόμενο αυτό συνοδευόταν από **ύψωση της θερμοκρασίας και απελευθέρωση αερίου**, με αποτέλεσμα το ζάχαρο του γλεύκους να μετατρέπεται σε αλκοόλη.
- Η αλκοολική ζύμωση έγινε η αιτία να δημιουργήσει ο Pasteur τη βιοχημεία και να αποκλείσει την «αυτόματη γένεση».
- Μέσα στην αλκοολική ζύμωση υπάρχει ένα **βιολογικό φαινόμενο** (πολλαπλασιασμός και ανάπτυξη των ζυμών) και ένα **φαινόμενο χημικό** (μετατροπή των ζαχάρων σε αλκοόλη), που οφείλονται στα ένζυμα του περιέχουν τα κύτταρα των ζυμών

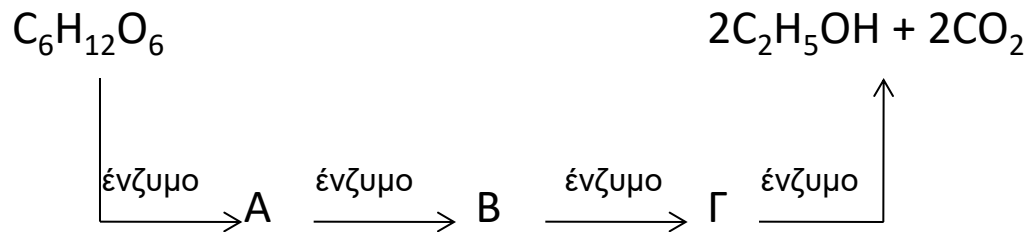


Η βιοχημεία της αλκοολικής ζύμωσης- Τα ένζυμα την αλκοολικής ζύμωσης

- ▶ Το μόριο της εξόζης δεν κόβεται, έτσι απλά, για να μας δώσει 2 μόρια αιθυλικής αλκοόλης και 2 μόρια CO₂.
- ▶ Υφίσταται μια πολύπλοκη μετατροπή έτσι ώστε το σύνολο των αντιδράσεων της αλκοολικής ζύμωσης να περιλαμβάνει 30 περίπου ξεχωριστές αντιδράσεις, που γίνονται με την παρέμβαση ενζύμων κατάλληλων για κάθε μια από αυτές.
- ▶ Μ' αυτό τον τρόπο η αλκοολική ζύμωση δεν περιορίζεται σε μια μόνο εξίσωση:



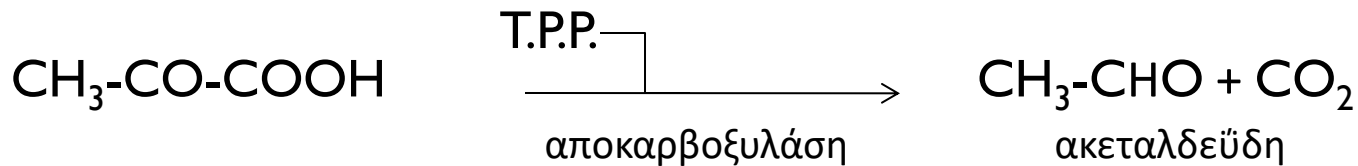
Αλλά περιλαμβάνει ολόκληρη σειρά αντιδράσεων, που δίνεται σχηματικά με την παρακάτω σχέση:



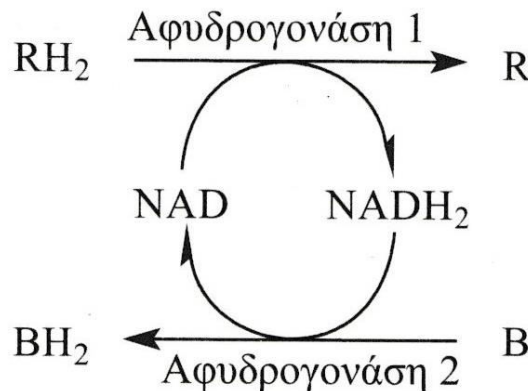
Η βιοχημεία της αλκοολικής ζύμωσης- Τα ένζυμα την αλκοολικής ζύμωσης

- Τα κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση είναι:
 - Η αποκαρβοξυλάση TPP (πυροφωσφορικός εστέρας της θειαμίνης ή της βιταμίνης B₁)

Καταλύει τις αποκαρβοξυλιώσεις, όπως εκείνη του πυροβικού οξέος σε ακεταλδεΐδη και CO₂

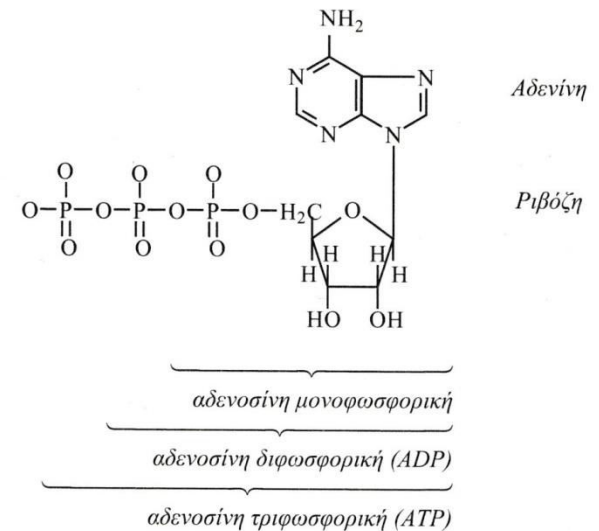
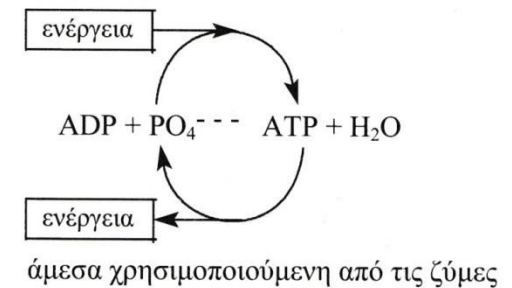


- Η νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NAD)
- Είναι μια αφυδρογονάση και καταλύει τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής



Η βιοχημεία της αλκοολικής ζύμωσης- Τα ένζυμα την αλκοολικής ζύμωσης

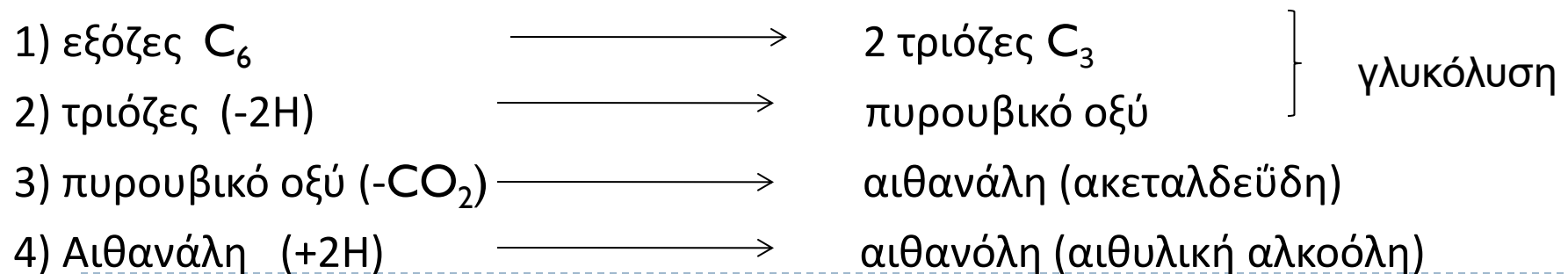
- Η διφοσφωρική αδενοσίνη (ADP) και η τριφοσφωρική αδενοσίνη (ATP) είναι σώματα που παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς μεταφοράς ενέργειας ανάμεσα στις βιοχημικές αντιδράσεις.



- Το συνένζυμο A (CoA-SH). Συμμετέχει στη σύνθεση κυρίως των λιπαρών οξέων και των λιπιδίων

Τα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης

- ▶ Η **πρώτη** χημική πράξη της αλκοολικής ζύμωσης είναι η **γλυκόλυση**, γνωστή και ως οδός **Embden- Meyerhof**.
- ▶ Περιλαμβάνει το σύνολο των αντιδράσεων που επιτρέπουν στα ζώντα κύτταρα να μετατρέψουν τις **εξόζες** (γλυκόζη, φρουκτόζη) σε **πυροσταφυλικό (πυρουβικό) οξύ**.
- ▶ Η **αποκαρβοξυλίωση του πυρουβικού οξέος** οδηγεί στο σχηματισμό της **ακεταλδεΐδης**, η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε αιθυλική αλκοόλη.
- ▶ Παραστατικότερα, η αλκοολική ζύμωση περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

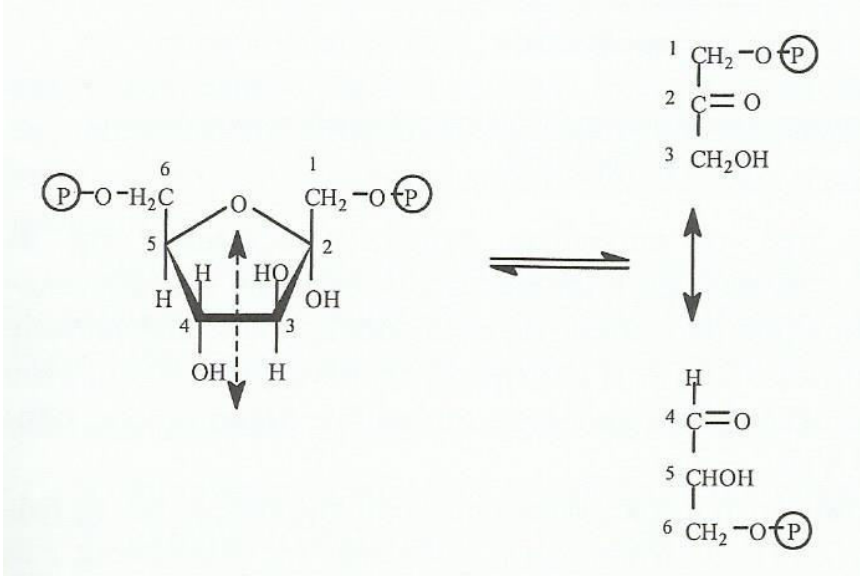
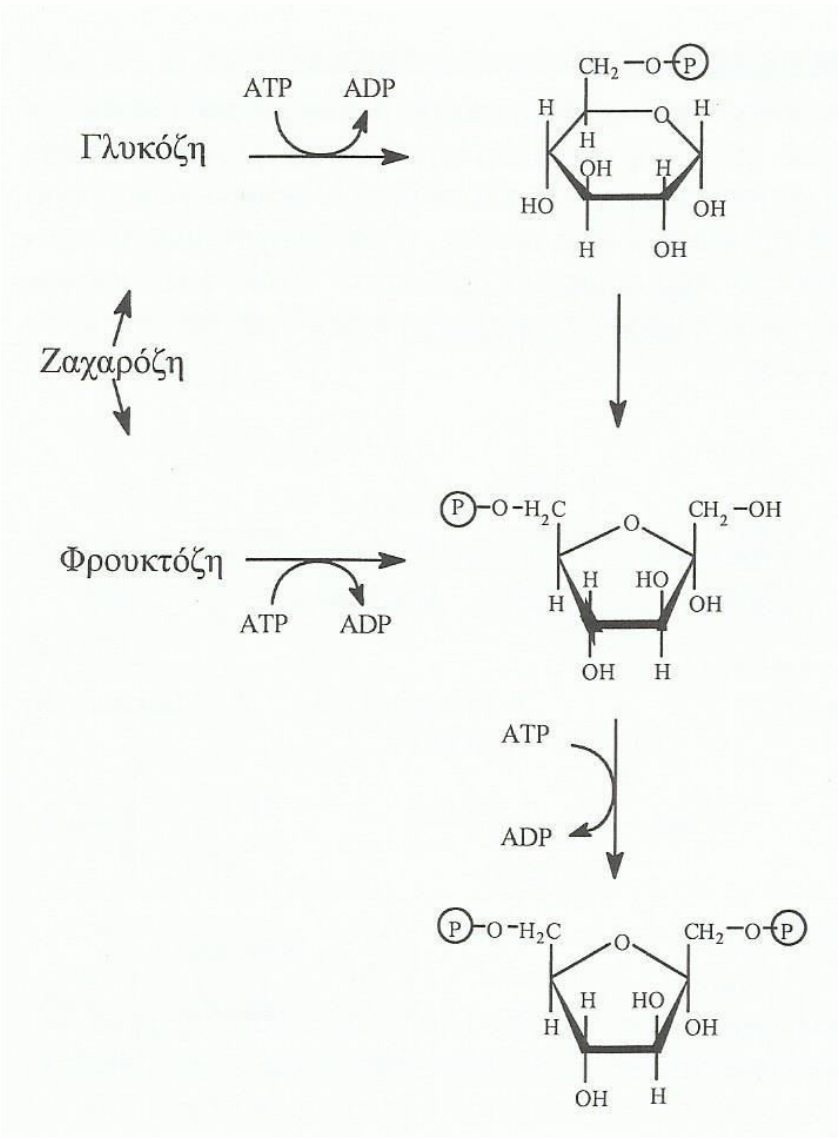


Η μετατροπή των εξοζών στις τριόζες

- ▶ Ο μηχανισμός της αλκοολικής ζύμωσης αρχίζει με τη **φωσφορυλίωση των εξοζών για το σχηματισμό των φωσφορικών εστέρων**, από όπου τα ζώντα κύτταρα μπορούν να αντλήσουν **ενέργεια**.
- ▶ Το H_3PO_4 ενωμένο με ορισμένες οργανικές ενώσεις σχηματίζει δεσμούς πλουσίους σε ενέργεια.
- ▶ Στη συνέχεια, από τους φωσφορικούς εστέρες των εξοζών προκύπτουν οι **φωσφορικές τριόζες**: διϋδροξυακετόνη-P , και γλυκεραλδεϋδη-3-P.
- ▶ Από τις 2 αυτές φωσφοτριόζες, η φωσφογλυκεραλδεϋδη υπεισέρχεται στις παραπέρα αντιδράσεις για το **σχηματισμό του πυροσταφυλικού ή πυρουβικού οξέος**, ενώ η φωσφορική διϋδροξυακετόνη μετατρέπεται προοδευτικά σε αυτή.

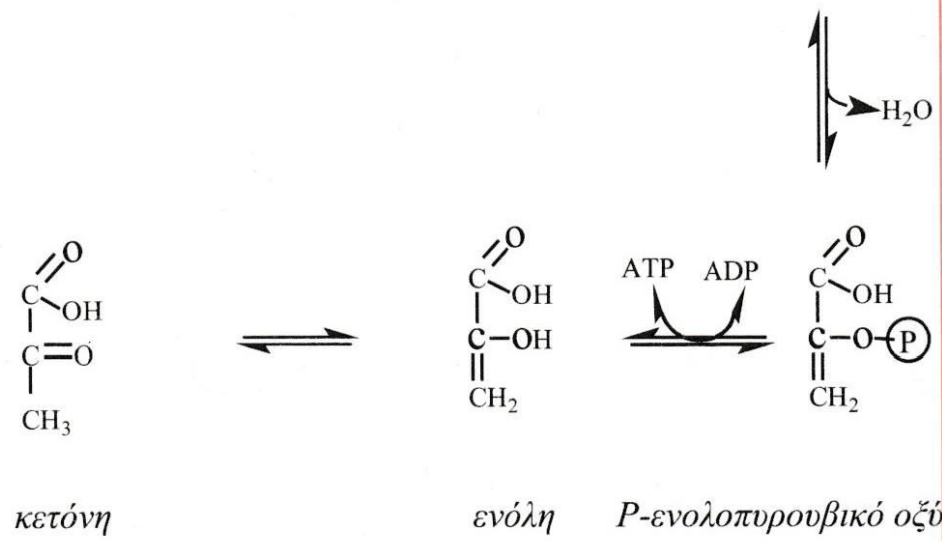
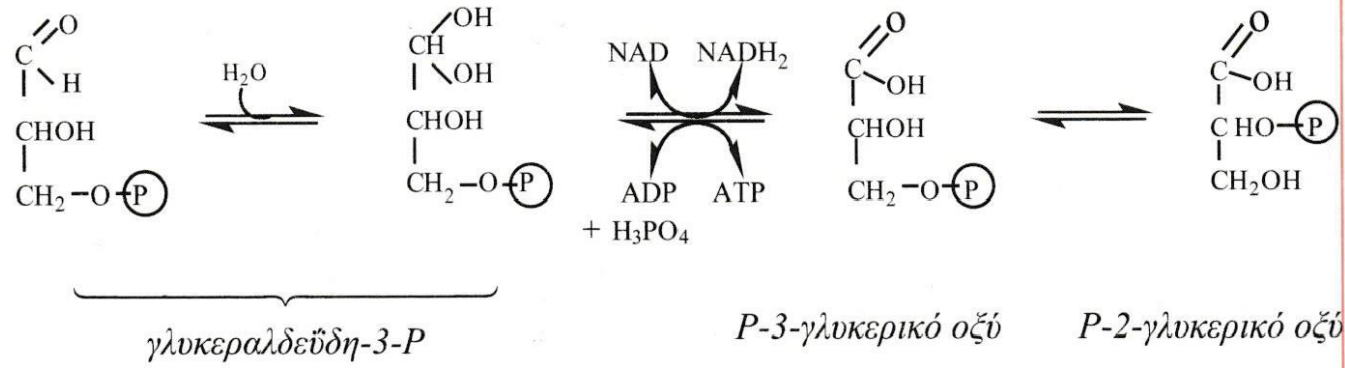


Σχηματισμός φωσφορικών εστέρων των ζαχάρων (αριστερά), και σχηματισμός φωσφορικών τριοζών (δεξιά).

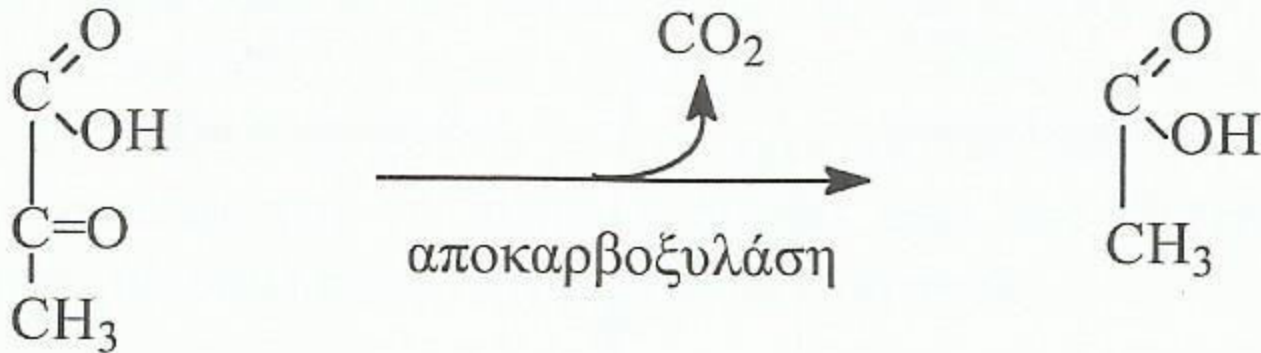


Η μετατροπή της φωσφοτριόζης σε πυρουβικό οξύ

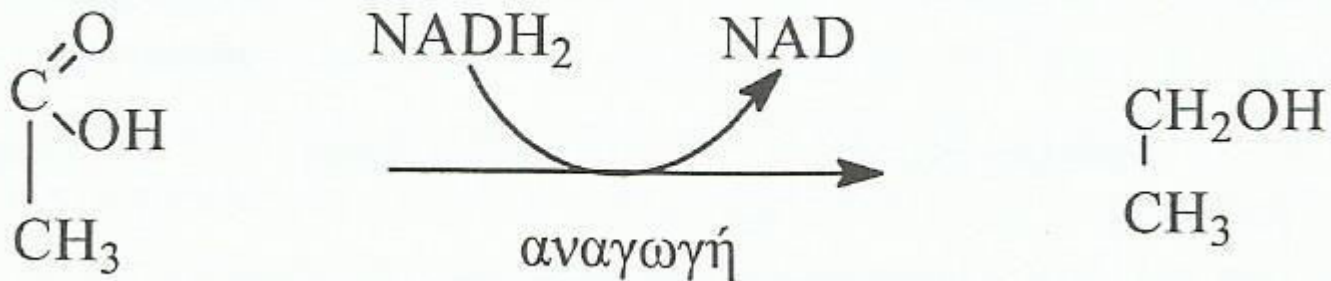
Και ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει επίσης μια σειρά από ενδιάμεσα στάδια όπως είναι: η οξείδωση της 3-φωσφογλυκεραλδεΐδης μετά από ενυδάτωση, η ισομερίωση του παραγόμενου φωσφο-γλυκερικού οξέος με τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας, η αφυδάτωση μιας αλκοολικής ομάδας σε αλκένιο που αποτελεί τον τύπο -ενόλ του φωσφο-πυρουβικού οξέος και τέλος η αποφωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του πυρουβικού οξέος



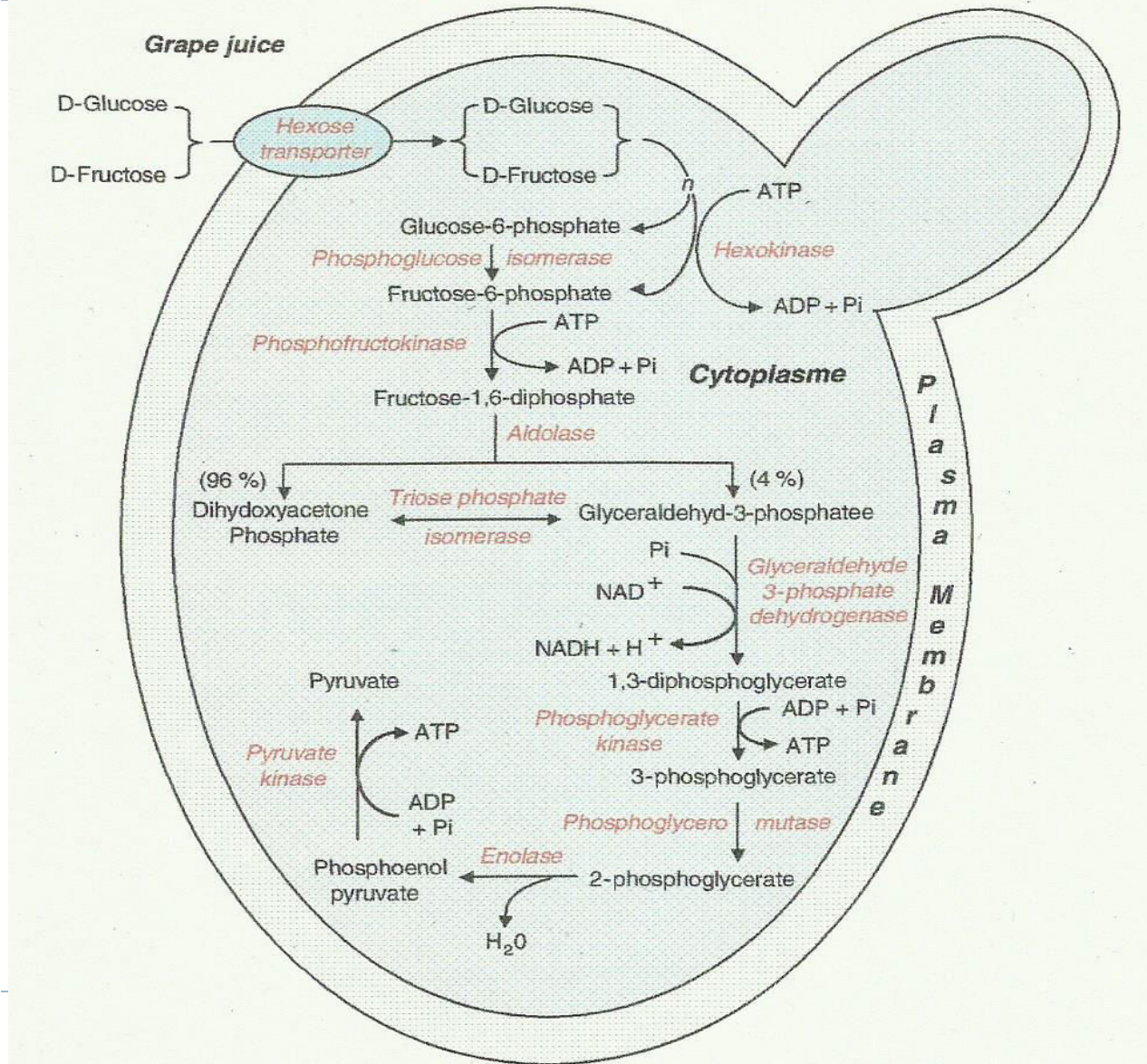
Αποκαρβοξυλίωση πυροσταφυλικού οξέος προς ακεταλδεΐδη



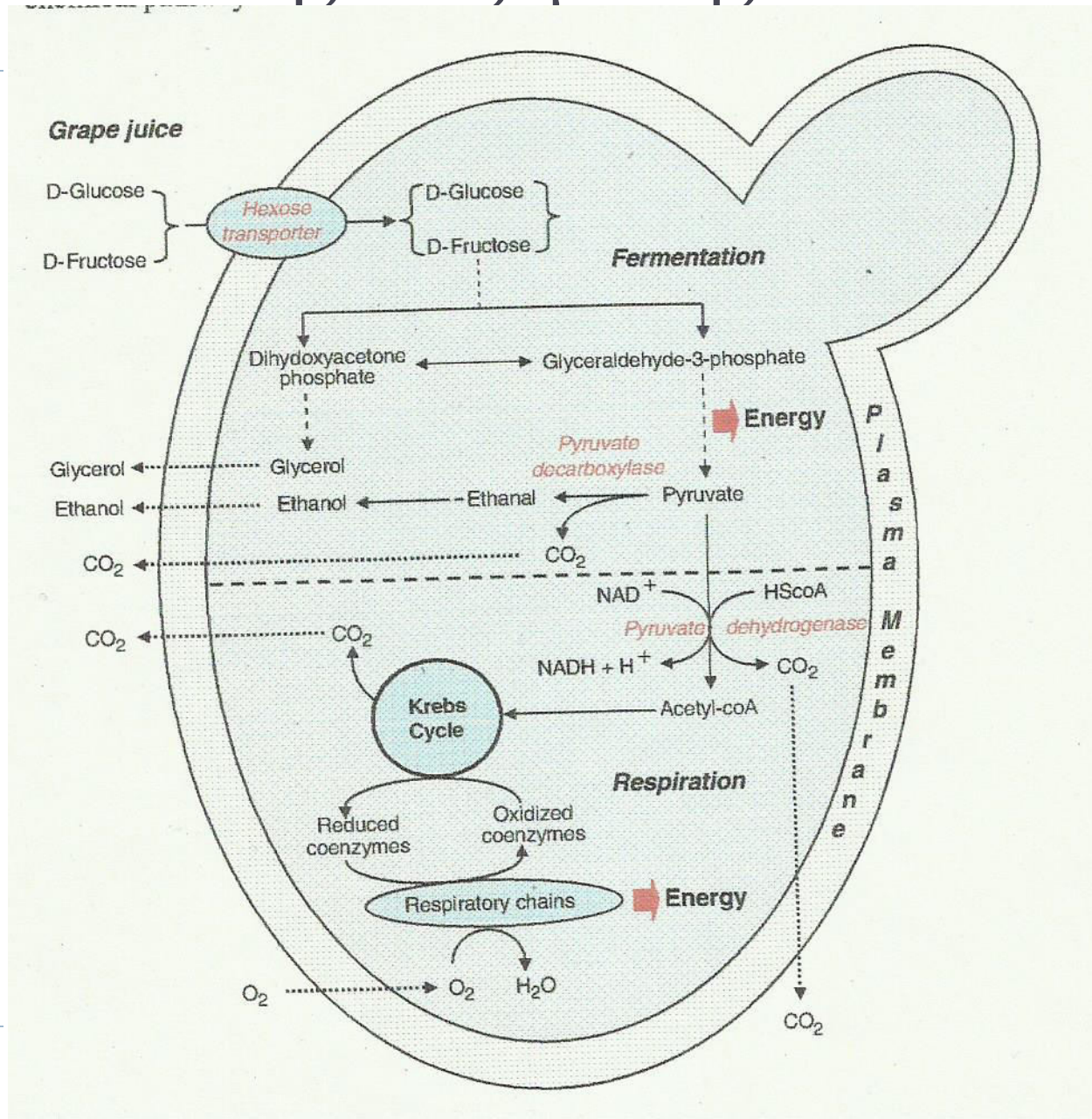
Αναγωγή της ακεταλδεΐδης προς αιθανόλη



Βιοχημικός μηχανισμός της γλυκόλυσης



Πορεία αναπνοής και ζύμωσης



Αλκοολική ζύμωση

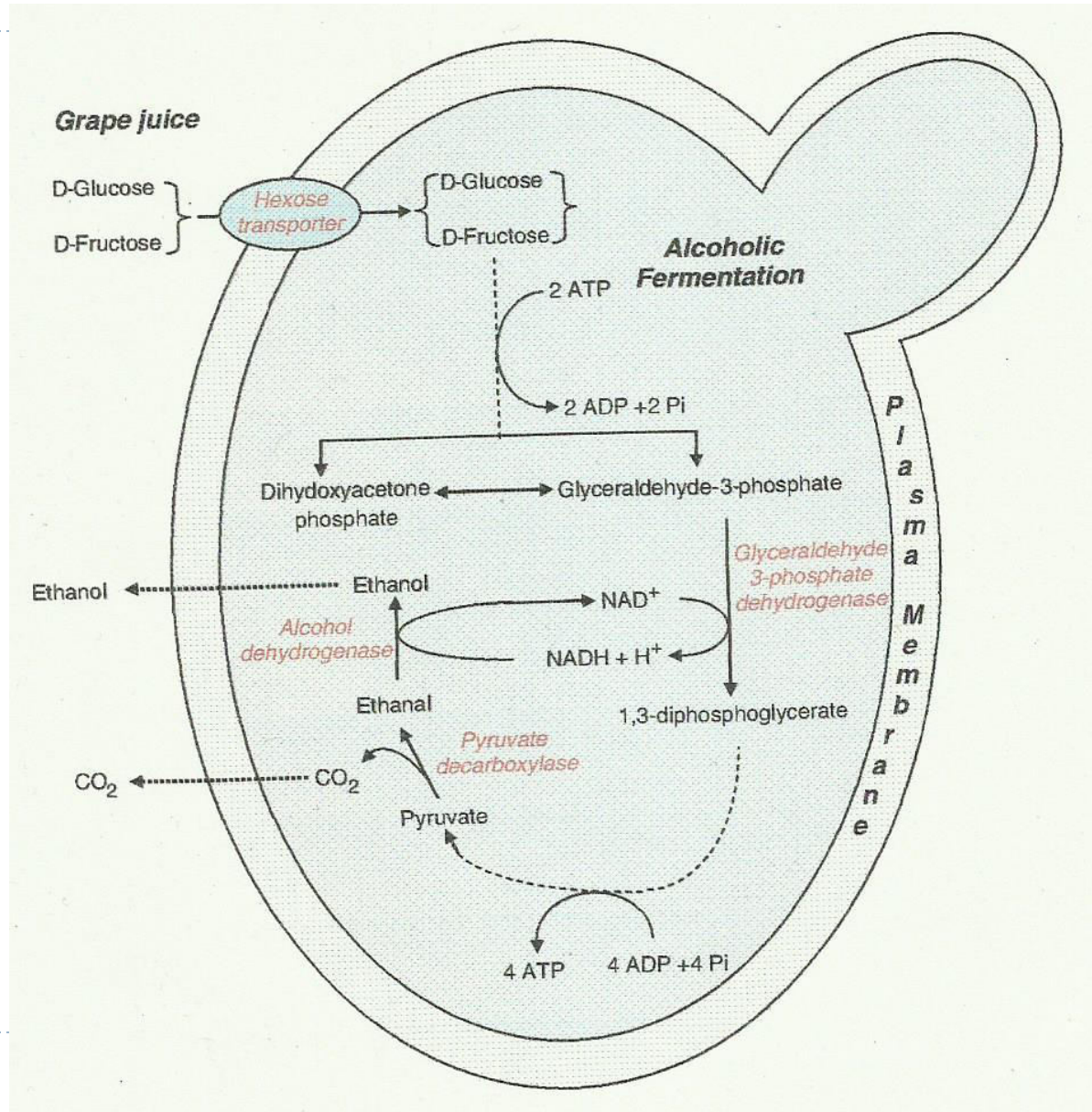
- ▶ Το πυροσταφυλικό οξύ με αποκαρβοξυλίωση μετατρέπεται σε ακεταλδεύδη, με δράση πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης.
- ▶ Το **ένζυμο** χρειάζεται **μαγνήσιο και πυροφωσφορική θειαμίνη** ως **συνένζυμα**.
- ▶ Στη συνέχεια η ακεταλδεύδη με αναγωγή από την αλκοολική δευδρογονάση μετατρέπεται σε αιθανόλη, παρουσία NADH_2 .
- ▶ Το ένζυμο έχει ψευδάργυρο ως συνένζυμο.
- ▶ Η αντίδραση αυτή είναι συζευγμένη με την οξείδωση της φωσφογλυκεραλδεύδης σε φωσφογλυκερικό από την οποία προκύπτει το NADH_2 .
- ▶ Τα τελικά προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης, η αλκοόλη και το διοξείδιο του άνθρακα, μεταφέρονται έξω από το κύτταρο με απλή διάχυση.

Αλκοολική ζύμωση

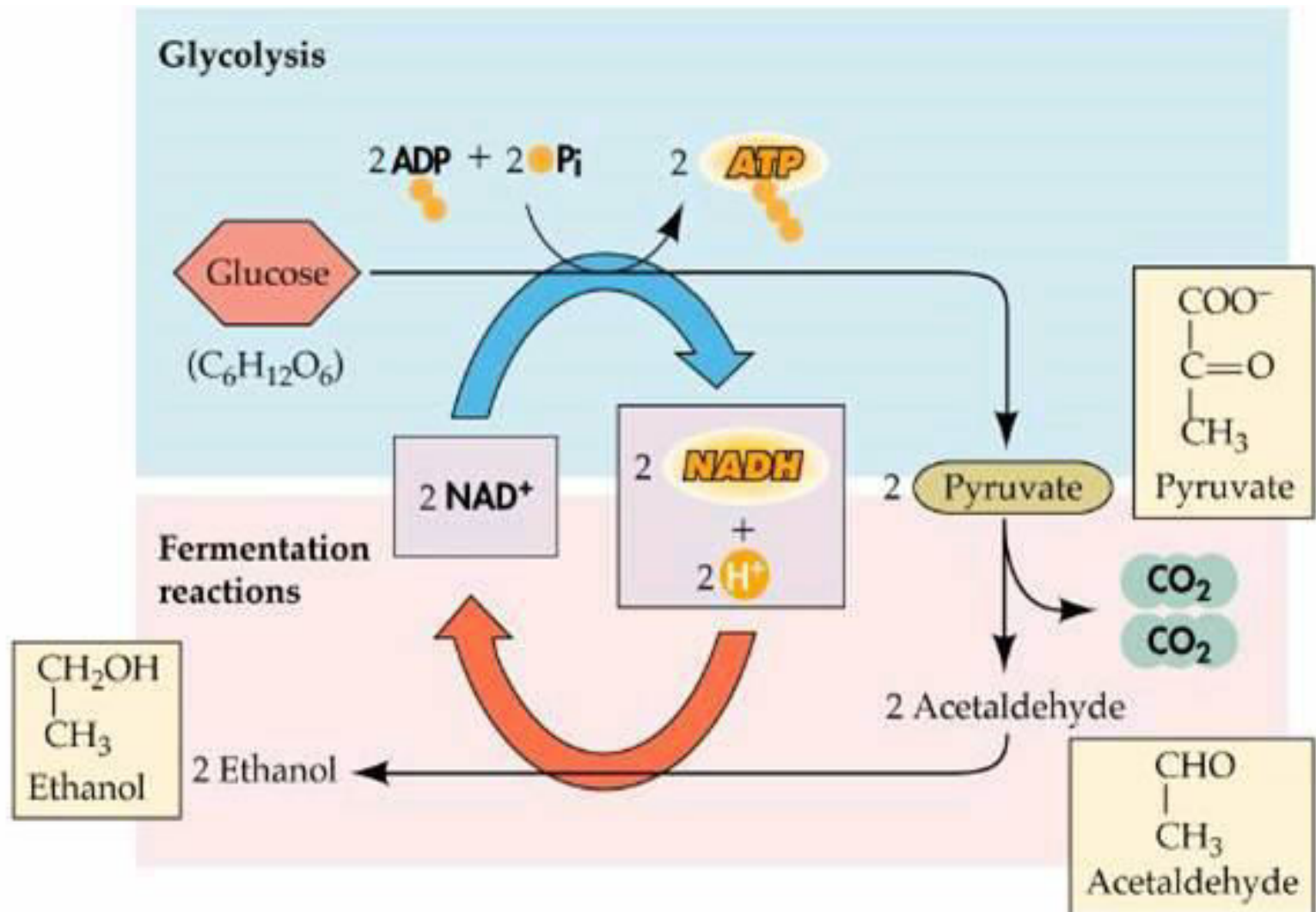
- ▶ Από τη συνολική πορεία ζύμωσης **ενός μορίου εξόζης/γλυκόζης σε δύο μόρια αιθανόλης προκύπτουν 2 μόρια ATP**, δηλαδή $2 \times 7,3 = 14,6$ kcal.
- ▶ Με τη μετατροπή ενός μορίου γλυκόζης εκλύεται ελεύθερη ενέργεια **40 kcal**.
- ▶ Το υπόλοιπο, 25,4 kcal ($40 - 14,6$) ελευθερώνεται με μορφή θερμότητας που προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας.
- ▶ Σημειώνεται ότι με τον **μεταβολισμό ενός μορίου γλυκόζης με αναπνοή** (πλήρης οξείδωση) παράγονται **38 μόρια ATP**, και η συνολική ελεύθερη ενέργεια που εκλύεται είναι 686 kcal.
- ▶ Έτσι, οι ζύμες για παραγωγή της ενέργειας που χρειάζονται μεταβολίζουν (ζυμώνουν) πολλά ζάχαρα.



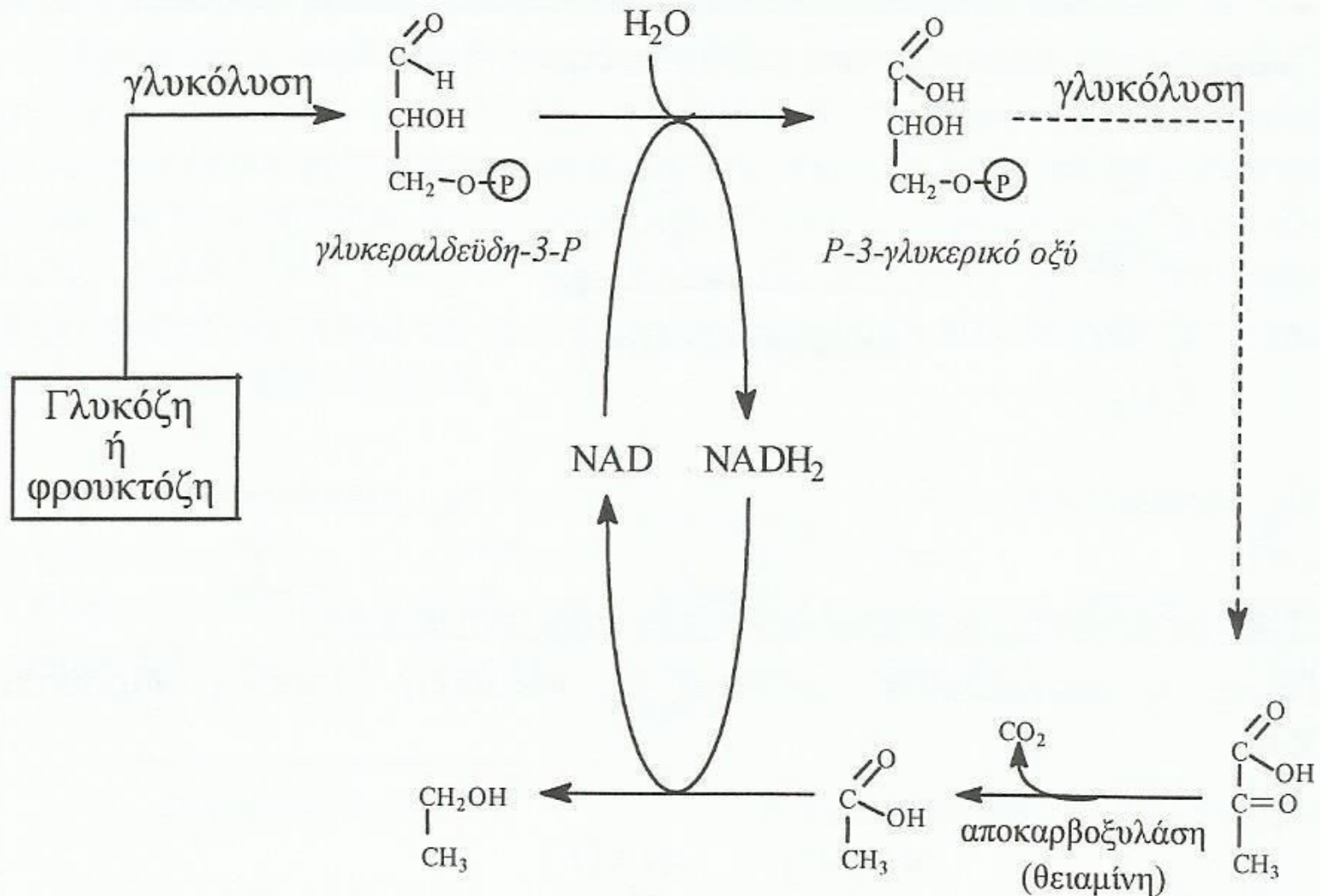
Πορεία της αλκοολικής ζύμωσης



Στάδια της αλκοολικής ζύμωσης



Στάδια της αλκοολικής ζύμωσης



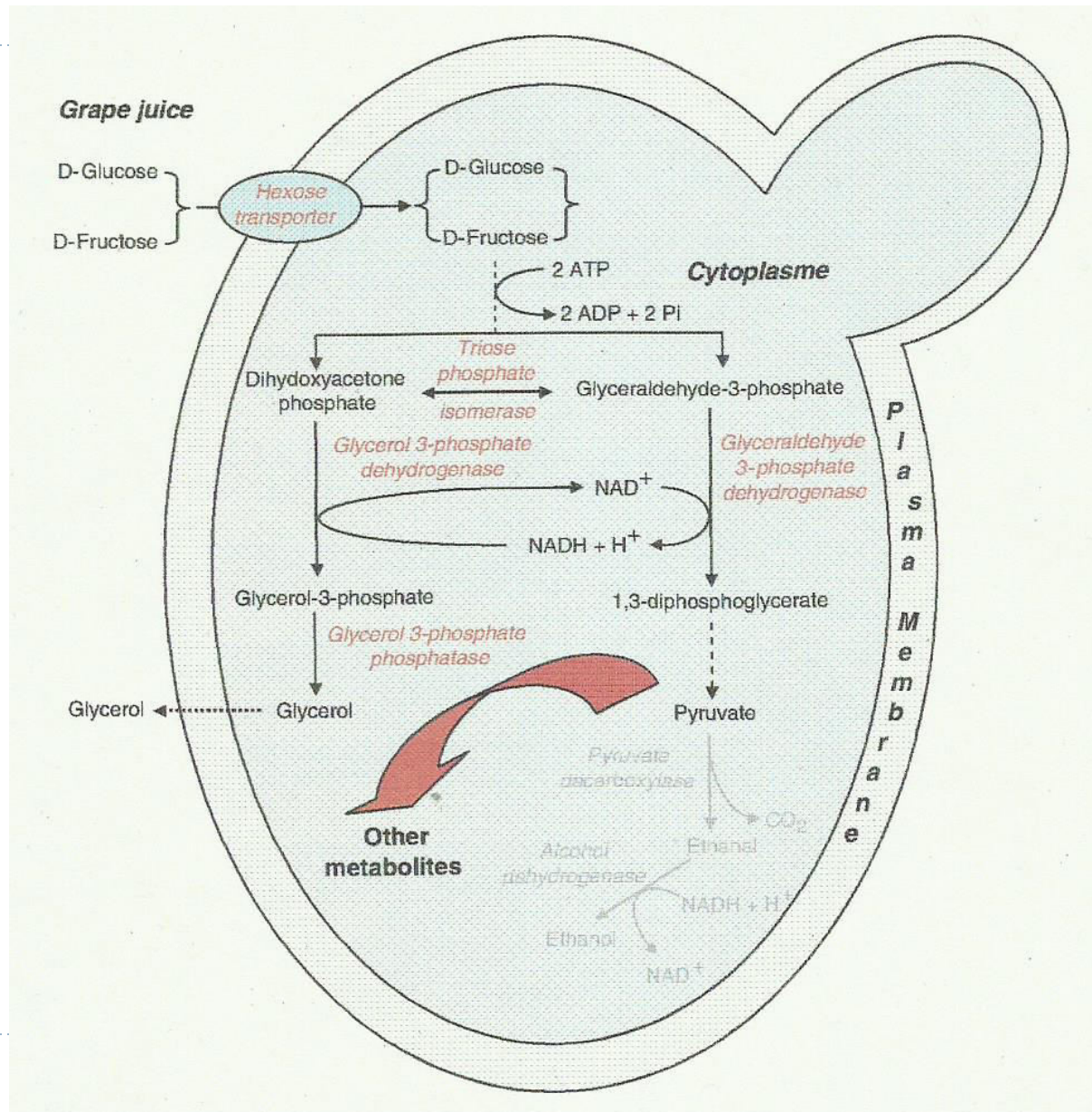
Γλυκεροπυροσταφυλλική ζύμωση

- ▶ Κατά τη γλυκεροπυροσταφυλλική ζύμωση παράγονται γλυκερόλη και πυροσταφυλλικό οξύ με διαφορετικές βιοχημικές πορείες.
- ▶ Κατά την αλκοολική ζύμωση αποδέκτης των υδρογόνων από τη μετατροπή του NADH_2 σε NAD είναι η ακεταλδεύδη.
- ▶ Στην αρχή της ζύμωσης οι ζύμες χρειάζονται πολλά υποστρώματα για να αναπτυχθούν.
- ▶ Για τον πολλαπλασιασμό βιοσυντίθενται σε σημαντικά επίπεδα πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεοτίδια και άλλες ενώσεις.
- ▶ Οι ενώσεις αυτές παράγονται με υπόστρωμα το πυροσταφυλλικό οξύ. Αποδέκτης των υδρογόνων είναι η φωσφορική διυδροξυακετόνη και παράγεται γλυκερόλη.
- ▶ Οι ζύμες παράγουν γλυκερόλη ως παράγοντα προστασίας από υψηλές ωσμωτικές πιέσεις.

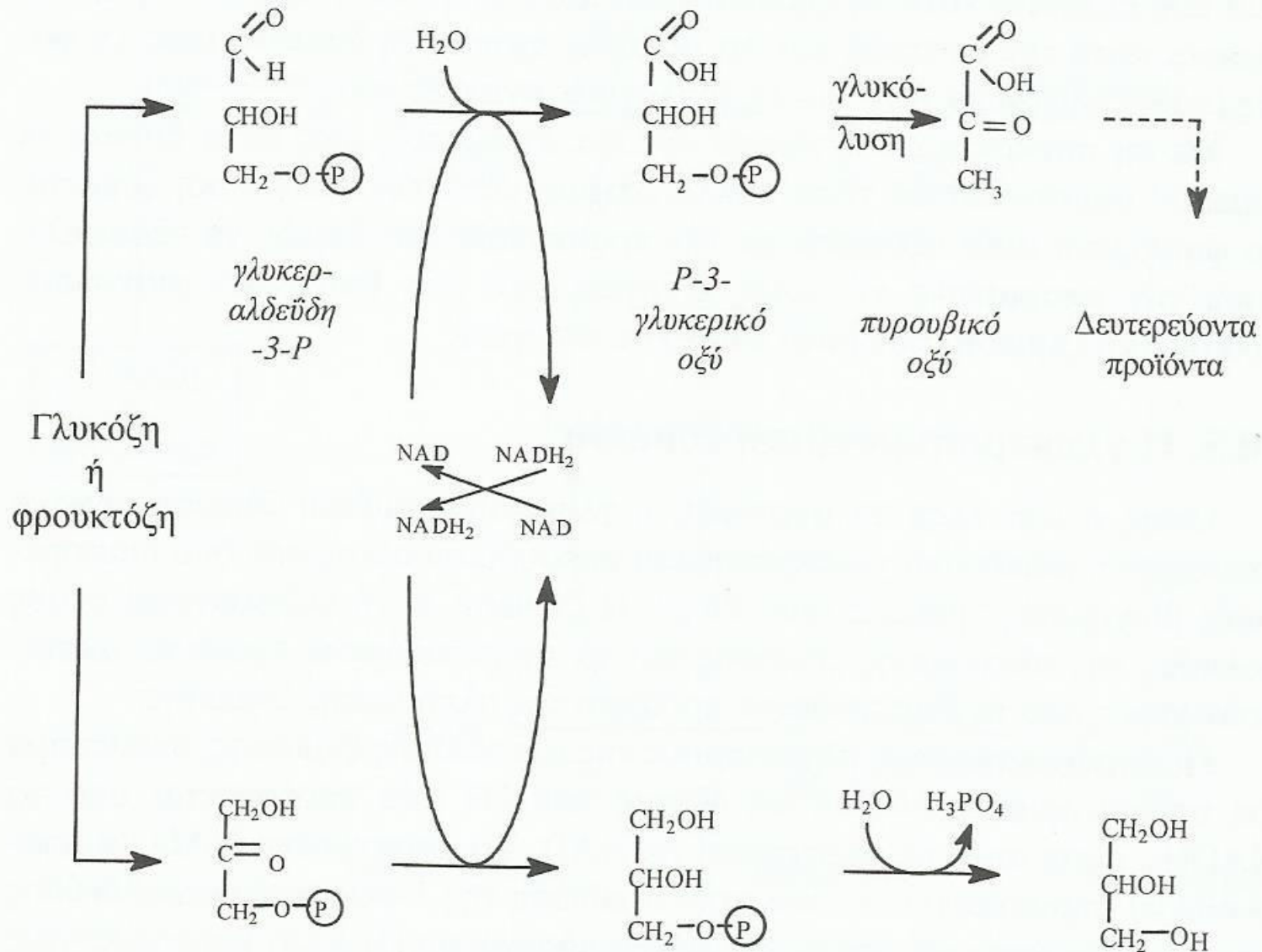
Γλυκεροπυροσταφυλλική ζύμωση

- Η γλυκεροπυροσταφυλλική ζύμωση **συμβαδίζει** με την αλκοολική ζύμωση.
- Η παραγωγή γλυκερόλης είναι μεγαλύτερη στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης είτε μετά από προοδευτική προσθήκη μικρών δόσεων θειώδη ανυδρίτη, που δεσμεύει ισχυρά την ακεταλδεΐδη.
- Απουσία ακεταλδεΐδης, η οξειδοαναγωγή του NADH_2 σχετίζεται με το μετασχηματισμό της φωσφογλυκεραλδεΐδης και φωσφοδιυδροξυακετόνης.
- Η πρώτη οξειδώνεται και στην πορεία προκύπτει πυροσταφυλλικό οξύ. Από αυτό παράγονται διάφοροι άλλοι μεταβολίτες (δευτερογενή προϊόντα).
- Η δεύτερη ανάγεται σε γλυκερόλη.
- Τα επίπεδα της γλυκερόλης στους οίνους είναι υψηλά, συνήθως 6-10 g/L.
- Η γλυκερόλη προσδίδει γλυκύτητα και παχύτητα.

Πορεία γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης



Αντιδράσεις γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης



Δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης

- ▶ **Ακεταλδεΐδη:** είναι ενδιάμεσο της αλκοολικής ζύμωσης, και ανάγεται σε αιθανόλη. Όμως, μικρές ποσότητες μπορεί να απελευθερώνονται στον οίνο. Ακεταλδεΐδη, επίσης, μπορεί να παραχθεί με χημική ή βιολογική οξείδωση της αιθανόλης. Η ακεταλδεΐδη προσδίδει χαρακτηριστικό άρωμα, της αίσθησης του οξειδωμένου.
- ▶ **Οξικό οξύ :** φυσιολογικά ο ζαχαρομύκητας παράγει μικρές ποσότητες οξικού οξέος, 0,1-0,3 g/L. Όμως, σε αργές ζυμώσεις ή με διακοπή της ζύμωσης παράγονται σημαντικές ποσότητες οξικού οξέος. Γαλακτικά βακτήρια και οξικά βακτήρια παράγουν επίσης οξικό οξύ.
- ▶ **Ανώτερες αλκοόλες :** παράγονται με μεταβολισμό αμινοξέων. Οι ανώτερες αλκοόλες συνεισφέρουν στο άρωμα του οίνου, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση. Είναι πρόδρομες ενώσεις εστέρων που έχουν σημαντική συνεισφορά στο flavour.



Δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης

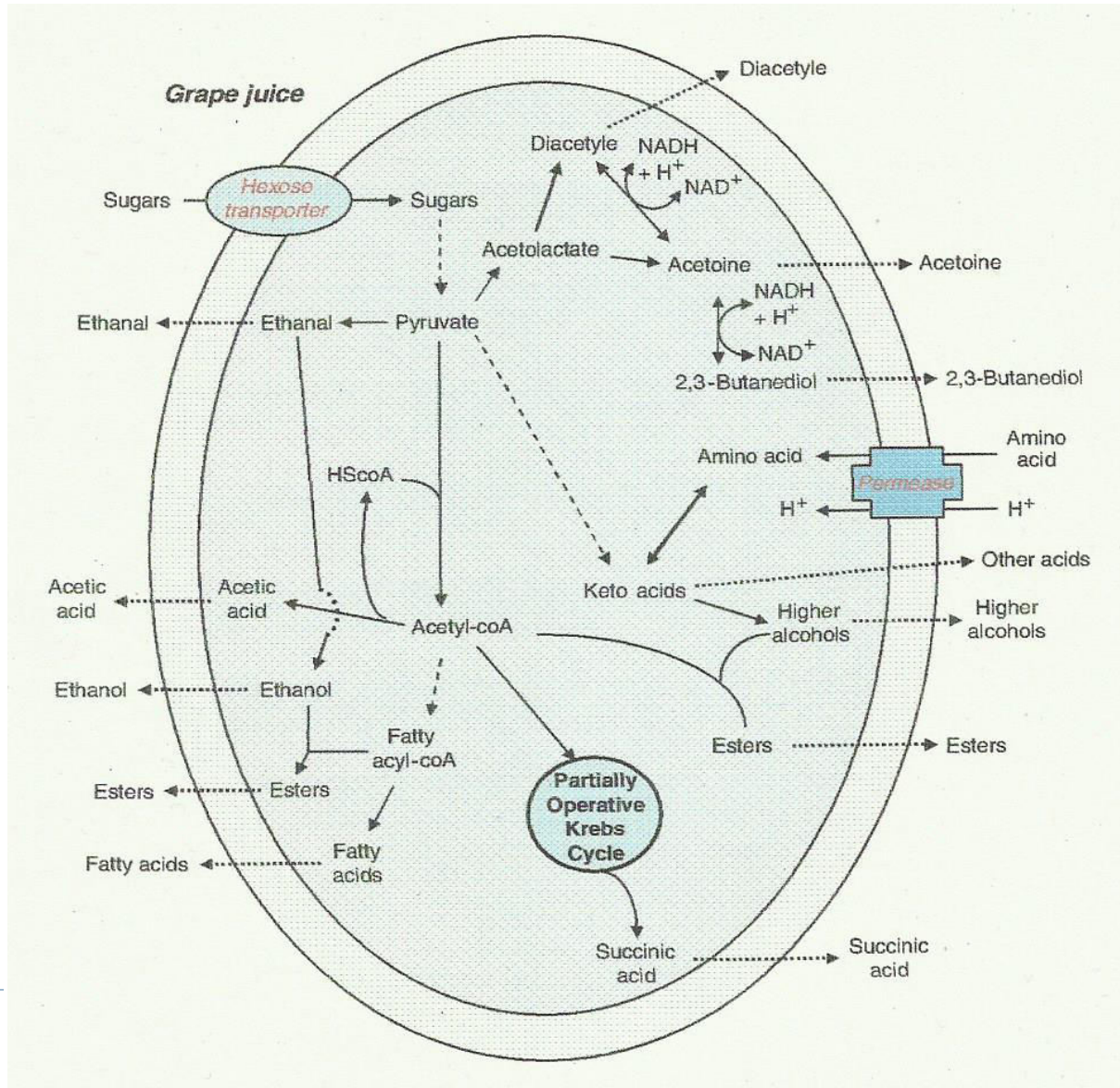
- ▶ **Ηλεκτρικό οξύ** : είναι ποσοτικά το τρίτο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης, και παράγεται σε επίπεδα 0,6-1,2 g/L. Συνεισφέρει σημαντικά στην οξύτητα του οίνου.
- ▶ **Άλλα οξέα** : οι ζυμομύκητες απελευθερώνουν στον οίνο διάφορα άλλα οξέα όπως γαλακτικό, ισοβαλερικό, ισοβουτυρικό και άλλα. Όμως, μόνο σε μικρές συγκεντρώσεις.
- ▶ **Εστέρες** : υπάρχουν δύο βασικές ομάδες εστέρων στους οίνους. Οι οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών και οι εστέρες των λιπαρών οξέων με αιθανόλη. Οι οξικοί εστέρες σχηματίζονται συντίθενται από ακετυλο-συνένζυμο Α και τις ανώτερες αλκοόλες. Οι εστέρες αυτοί προσδίδουν διάφορες οσμές, όπως κόλλας /ζωική (οξικός αιθυλεστέρας), μπανάνας (οξικός ισοαμυλεστέρας), τριαντάφυλλου (οξική φαινυλαιθανόλη). Οι εστέρες λιπαρών οξέων με αιθανόλη σχηματίζονται από διάφορα ακυλο-συνένζυμα και αιθανόλη. Προσδίδουν φρουτώδες άρωμα. Οι παραπάνω εστέρες, με εξαίρεση τον οξικό αιθυλεστέρα, συνεισφέρουν θετικά στο άρωμα του οίνου. Άλλοι εστέρες, όπως ο γαλακτικός αιθυλεστέρας και ο ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας, σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις δεν έχουν επίδραση στην οργανοληπτική ποιότητα του οίνου.

Δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης

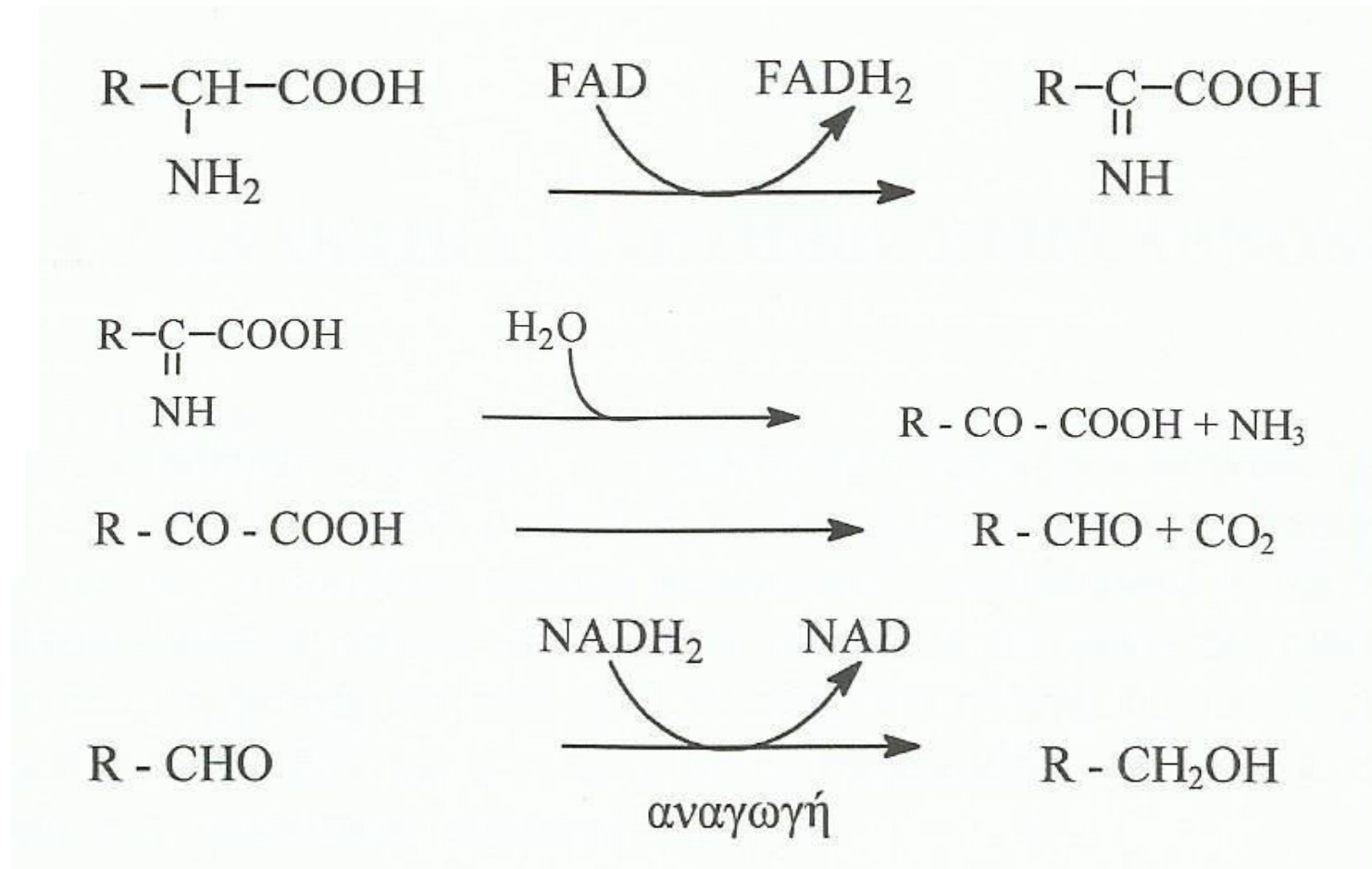
- ▶ **Διακετύλιο, ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη:** παράγονται από το πυροσταφυλλικό.
- ▶ Σχηματίζεται ακετογαλακτικό οξύ, που αποκαρβοξυλιώνεται προς διακετύλιο (οξειδωτικά) είτε ακετοΐνη (μη οξειδωτικά).
- ▶ Η ακετοΐνη σχηματίζεται και με αναγωγή του διακετυλίου.
- ▶ Επίσης, η ακετοΐνη μπορεί να αναχθεί προς 2,3-βουτανοδιόλη.
- ▶ Η ακετοΐνη και ιδιαίτερα το διακετύλιο προσδίδουν άρωμα βουτύρου. Όμως, με την αλκοολική ζύμωση δεν παράγονται ικανές ποσότητες.
- ▶ Με δράση γαλακτικών βακτηρίων παράγονται σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.



Σχηματισμός δευτερογενών προϊόντων από το πυροσταφυλικό οξύ



Αντιδράσεις σχηματισμού ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα, με ενδιάμεσες ενώσεις κετονοξέα.



Κετονοξέα σχηματίζονται και από ζάχαρα μέσω πυροσταφυλικού οξέος.

Παράγοντες που επιδρούν στο σχηματισμό δευτερευόντων προϊόντων

Η παραγωγή των δευτερευόντων προϊόντων εξαρτάται από το ζυμομύκητα και τις συνθήκες ζύμωσης. Σε διάφορες μελέτες έχουν αναφερθεί ότι:

- ▶ **Υψηλό pH** ευνοεί την γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση και την παραγωγή δευτερευόντων προϊόντων.
- ▶ Επίσης, **σε pH μικρότερο του 3** ευνοείται η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση, και η παραγωγή οξικού οξέος.
- ▶ Σε **θερμοκρασία μεγαλύτερη από 30° C** ευνοείται η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση, και η παραγωγή οξικού οξέος.
- ▶ **Έλλειψη σε βιταμίνες** ευνοεί το σχηματισμό οξικού οξέος.
- ▶ **Έλλειψη σε θειαμίνη** ευνοεί το σχηματισμό πυροσταφυλικού οξέος.
- ▶ **Υψηλές συγκεντρώσεις ζαχάρων** ευνοούν το σχηματισμό γλυκερόλης και οξικού οξέος.

Η αυτόλυση των ζυμών στην οινοποίηση

- ▶ Η παλαίωση στις οινολάσπες χρησιμοποιείται στην οινοποίηση ήσυχων και αφρωδών οίνων.
- ▶ Η διάρκειά της είναι λίγοι μήνες, ένα ή και περισσότερα χρόνια. Κατά αυτή συμβαίνει αυτόλυση των κυττάρων με δράση υδρολυτικών ενζύμων τους, όπως πρωτεϊνάσες, νουκλεάσες, λιπάσες, γλυκανάσες.
- ▶ Η αυτόλυση είναι μία αργή διαδικασία, στην οποία η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο.
- ▶ Με τη δράση των ενζύμων συστατικά του κυτταροπλάσματος (αμινοξέα, πεπτίδια, λιπαρά οξέα, νουκλεοτίδια) και του κυτταρικού τοιχώματος (μαννοπρωτεΐνες) απελευθερώνονται στον οίνο.
- ▶ Η ποσότητα και ποιότητα των συστατικών που απελευθερώνονται εξαρτώνται από τον ζυμομόκητα, τη συγκέντρωση της αιθανόλης, τη θερμοκρασία, το pH του οίνου και το χρόνο.

Η αυτόλυση των ζυμών στην οينوποίηση

- ▶ Τα κύρια συστατικά που σχηματίζονται κατά την αυτόλυση είναι **αζωτούχες ενώσεις, πολυζαχαρίτες, νουκλειικά οξέα, λιπαρά οξέα, διάφορες βιταμίνες, ενώσεις αρώματος.**
- ▶ Οι ενώσεις που προέρχονται από την αυτόλυση συνεισφέρουν σημαντικά στο **άρωμα και ποιότητα του οίνου.**
- ▶ Θεωρείται ότι αυξάνονται τα επίπεδα πρόδρομων ενώσεων αρώματος.
- ▶ Επίσης, πεπτίδια και αμινοξέα με αντιοξειδωτική δράση προστατεύουν το άρωμα.
- ▶ Ακόμη, θεωρείται ότι ευνοείται η μηλογαλακτική ζύμωση.
- ▶ Με παλαίωση στις οινολάσπες ο οίνος αποκτά μία κρεμώδη αίσθηση στο στόμα, πιο γεμάτο σώμα και πιο σύνθετο άρωμα. Στη σαμπάνια προκύπτουν υψηλότερα επίπεδα αμινοξέων που θεωρείται ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη καλύτερου flavour.

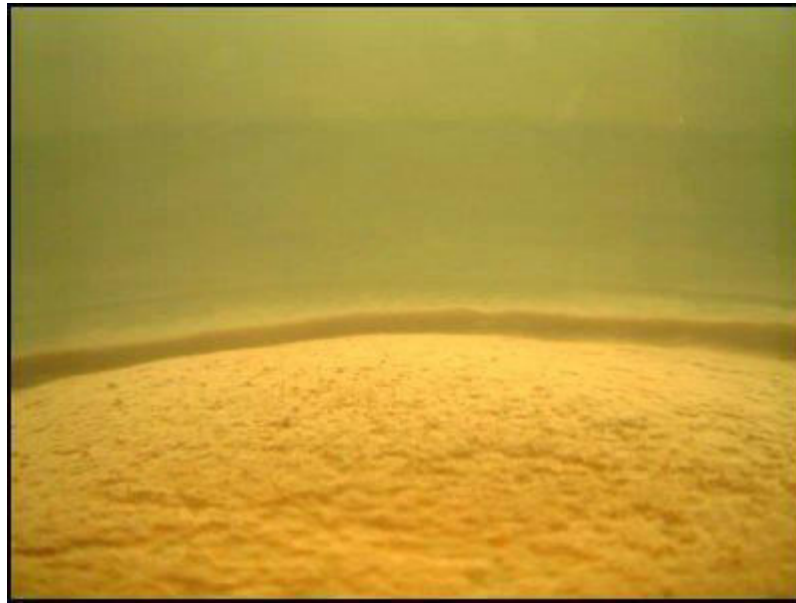
Η αυτόλυση των ζυμών στην οينوποίηση

- ▶ Επίσης, οι **μαννοπρωτεΐνες** από την αυτόλυση **προστατεύουν από το θόλωμα** πρωτεϊνών και τρυγικών.
- ▶ Οι μαννοπρωτεΐνες είναι **γλυκοπρωτεΐνες** μεγάλου MB (όπως 800 kDa) που περιέχουν πολλές πλευρικές αλυσίδες μαννόζης (παρόμοια της γλυκόζης). Με την αυτόλυση απελευθερώνονται στον οίνο σημαντική ποσότητα (<50) mg/L μαννοπρωτεϊνών.
- ▶ Αυτές θεωρείται ότι συμβάλλουν στην κρεμμώδη υφή του οίνου , και ότι με σύνδεση με ταννίνες μειώνουν τη στυφότητα. Ακόμη, πεπτίδια συμβάλλουν στη **καλύτερη γεύση** του οίνου.
- ▶ Πάντως, η παραμονή του οίνου στις οινολάσπες, χωρίς έλεγχο σε μεγάλες ποσότητες, με αναγωγικές συνθήκες οδηγεί στη παραγωγή υδροθείου και μερκαπτανών με πολύ αρνητική επίδραση στο flavour του οίνου.



Παραμονή του οίνου στις οινολάσπες

- Εκτός από την παλαίωση στις οινολάσπες, στην οινοποίηση χρησιμοποιούνται παρασκευάσματα ξηρών αδρανοποιημένων ζυμομυκήτων (inactive dry yeasts). Κάποια τέτοια παρασκευάσματα είναι πλούσια σε μαννοπρωτεΐνες και έχουν τις παραπάνω θετικές επιδράσεις σε οίνους. Επίσης, τέτοια παρασκευάσματα πλούσια στο αντιοξειδωτικό πεπτίδιο γλουταθειόνη (γλυκίνη-κυστεΐνη-γλουταμινικό οξύ) προστατεύουν το άρωμα οίνων.



Παραμονή οίνου στις οινολάσπες.



Starters

- ▶ Οι **ζυμομύκητες οινοποίησης** έχουν σημαντική επίδραση στην **ποιότητα** του οίνου, όπως στην **παραγωγή δευτερογενών πτητικών ενώσεων** (ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, αλδεύδες, και άλλες) που διαμορφώνουν το **δευτερογενές άρωμα** του οίνου.
- ▶ Για την τυποποίηση της ποιότητας του οίνου πρέπει να είναι σταθερές οι διάφορες παράμετροι (όπως πρώτη ύλη, μικροχλωρίδα οινοποίησης, συνθήκες οινοποίησης όπως θερμοκρασία και pH, τεχνικές οινοποίησης).
- ▶ Με χρήση **επιλεγμένων καλλιεργειών** η χλωρίδα ζύμωσης είναι σε σημαντικό βαθμό σταθερή.



Starters

- Ο *Saccharomyces cerevisiae* έχει μελετηθεί και χρησιμοποιείται κατά κόρο.
- Επίσης, γίνονται προσπάθειες για χρήση **non- *Saccharomyces* μαζί με *Saccharomyces cerevisiae*** για καλύτερα αποτελέσματα.
- Η επιλεγμένη καλλιέργεια μπορεί να προστεθεί **απευθείας στο γλεύκος**, αλλά απαιτούνται μεγάλες ποσότητες.
- Πριν την χρησιμοποίηση της επιλεγμένης καλλιέργειας γίνεται ενυδάτωση του ζυμομύκητα με **γλεύκος αραιωμένο 1:1** στους περίπου 35 °C για 15-20 min. Τις πρώτες 24-72 ώρες μετά την προσθήκη ο πληθυσμός του ζυμομύκητα είναι 1×10^6 έως 3×10^6 cfu/mL. Στη συνέχεια ο πληθυσμός συνήθως είναι πάνω από 10^7 cfu/mL.
- Ο εμβολιασμός με επιλεγμένη καλλιέργεια πρέπει να γίνεται μετά από **αποδυνάμωση της φυσικής χλωρίδας με χρήση θειώδη ανυδρίτη, μετάγγιση, φυγοκέντρηση και άλλες μεθόδους**. Επιλεγμένες καλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για επαναδραστηριοποίηση ζυμών που έχουν διακοπεί.



Χαρακτηριστικά για επιλογή ζαχαρομυκήτων

- ▶ Α. Χαρακτηριστικά που αφορούν την **οινοποίηση**
- ▶ Β. Χαρακτηριστικά που αφορούν την **οργανοληπτική ποιότητα**
- ▶ Γ. Χαρακτηριστικά που αφορούν την **υγεία**



Χαρακτηριστικά που αφορούν την οينوποίηση

- **Ικανότητα ζύμωσης** : αφορά την μέγιστη ποσότητα ζαχάρων που μπορεί να ζυμώσει το στέλεχος σε πλούσιο μέσο. Επίσης, την ταχύτητα έναρξης της ζύμωσης (πρώτες 2-3 ημέρες) και την κινητική της ζύμωσης. Επιθυμητά είναι η άμεση έναρξη της ζύμωσης, η μη διαφοροποίηση με μεταβολές της θερμοκρασίας και η ολοκλήρωση της ζύμωσης.
- **Ανθεκτικότητα στο θειώδη ανυδρίτη** : τα κατάλληλα στελέχη που επιτελούν πλήρη ζύμωση με συγκεντρώσεις ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη πάνω από 30 mg/L και 50 mg/L, αντίστοιχα, και μεγαλύτερες για ειδικούς οίνους.
- **Ανθεκτικότητα στο χαλκό** : χαλκός βρίσκεται στο γλεύκος και οίνο από τη χρήση ενώσεων χαλκού στα αμπέλια για έλεγχο εντόμων (ζιζανίων). Υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού έχουν τοξικές επιδράσεις στην ανάπτυξη και ζυμωτική ικανότητα των ζυμών.
- **Χαρακτήρας killer** : Τα κατάλληλα στελέχη παράγουν τοξίνες σε συνθήκες οينوποίησης. Επιθυμητά είναι στελέχη killer (παράγουν τοξίνες για άλλες ζύμες) και στελέχη neutral (δεν παράγουν και δεν είναι ευαίσθητοι σε τοξίνες).
- **Ανάπτυξη σε υγρό μέσο** : τα κατάλληλα στελέχη έχουν καλή διασπορά και κατακάθιση.
- **Δημιουργία αφρού** : Τα κατάλληλα στελέχη δεν σχηματίζουν ή σχηματίζουν ελάχιστο αφρό.

Χαρακτηριστικά που αφορούν την οργανοληπτική ποιότητα

- ▶ **Παραγωγή πτητικής οξύτητας** : Το οξικό οξύ είναι παραπροϊόν της ζύμωσης και σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει αρνητικές επιδράσεις. Η παραγωγή οξικού οξέος είναι ανάλογη της θερμοκρασίας ζύμωσης. Στην ερυθρή οινοποίηση η θερμοκρασία ζύμωσης είναι υψηλότερη (25-32 °C) για αύξηση της εκχύλισης. Τα κατάλληλα στελέχη παράγουν χαμηλά επίπεδα πτητικής οξύτητας, και ειδικά για την ερυθρή οινοποίηση και σε υψηλές θερμοκρασίες.
- ▶ **Παραγωγή γλυκερόλης** : Η γλυκερόλη είναι πολυαλκοόλη. Στον οίνο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, το τρίτο μετά το νερό και την αιθανόλη. Παίζει σημαντικό ρόλο στη δομή του οίνου καθόσον αυξάνει την πυκνότητα και μαλακότητα. Η παραγωγή της εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση ζαχάρων, τις συνθήκες ζύμωσης και το στέλεχος του ζαχαρομύκητα. Τα κατάλληλα στελέχη παράγουν υψηλά επίπεδα γλυκερόλης. Έτσι, βελτιώνεται η δομή του ερυθρού οίνου. Επίσης, αυξάνει τον πολυμερισμό των ταννινών και έτσι μειώνει τη στυφότητα.

Χαρακτηριστικά που αφορούν την οργανοληπτική ποιότητα

- ▶ **Παραγωγή ανώτερων αλκοολών** : Κύριες ανώτερες αλκοόλες που βρίσκονται στον οίνο είναι οι n-προπανόλη, ισοβουτανόλη, αμυλική αλκοόλη, ισοαμυλική αλκοόλη, 2-φαινυλοαιθανόλη. Οι αλκοόλες αυτές παράγονται με καταβολισμό ζαχάρων είτε αμινοξέων. Είναι σημαντικές ενώσεις του αρώματος ζύμωσης. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν θετική επίδραση στο άρωμα του οίνου, ενώ σε υψηλές (> 350 mg/L) έχουν αρνητική επίδραση, ιδιαίτερα η ισοαμυλική αλκοόλη.
- ▶ Στις περιπτώσεις **φρέσκων λευκών οίνων** από **αρωματικές ποικιλίες**, κατάλληλα είναι στελέχη που παράγουν χαμηλά επίπεδα ανώτερων αλκοολών.
- ▶ Στις περιπτώσεις **φρέσκων λευκών οίνων** από **ουδέτερες ποικιλίες**, είναι απαραίτητη η μικρή παραγωγή ανώτερων αλκοολών (< 400 mg/L).
- ▶ Στις περιπτώσεις **ερυθρών οίνων υψηλής ποιότητας**, τα επίπεδα των ανώτερων αλκοολών πρέπει να είναι κάτω από 300 mg/L, για να μην καλύπτουν το ποικιλιακό άρωμα και το άρωμα παλαίωσης σε βαρέλια.



Χαρακτηριστικά που αφορούν την οργανοληπτική ποιότητα

- ▶ **Παραγωγή ανώτερων αλκοολών** : Κύριες ανώτερες αλκοόλες που βρίσκονται στον οίνο είναι οι n-προπανόλη, ισοβουτανόλη, αμυλική αλκοόλη, ισοαμυλική αλκοόλη, 2-φαινυλοαιθανόλη. Οι αλκοόλες αυτές παράγονται με καταβολισμό ζαχάρων είτε αμινοξέων. Είναι σημαντικές ενώσεις του αρώματος ζύμωσης. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν θετική επίδραση στο άρωμα του οίνου, ενώ σε υψηλές (> 350 mg/L) έχουν αρνητική επίδραση, ιδιαίτερα η ισοαμυλική αλκοόλη.
- ▶ Στις περιπτώσεις **φρέσκων λευκών οίνων** από **αρωματικές ποικιλίες**, κατάλληλα είναι στελέχη που παράγουν χαμηλά επίπεδα ανώτερων αλκοολών.
- ▶ Στις περιπτώσεις **φρέσκων λευκών οίνων** από **ουδέτερες ποικιλίες**, είναι απαραίτητη η μικρή παραγωγή ανώτερων αλκοολών (< 400 mg/L).
- ▶ Στις περιπτώσεις **ερυθρών οίνων υψηλής ποιότητας**, τα επίπεδα των ανώτερων αλκοολών πρέπει να είναι κάτω από 300 mg/L, για να μην καλύπτουν το ποικιλιακό άρωμα και το άρωμα παλαίωσης σε βαρέλια.



Χαρακτηριστικά που αφορούν την οργανοληπτική ποιότητα

- ▶ **Παραγωγή ακεταλδεύδης** : Η ακεταλδεύδη είναι προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Είναι η κύρια αλδεύδη του οίνου, περίπου το 90 % των αλδευδών. Γενικά, υψηλά επίπεδα ακεταλδεύδης είναι ανεπιθύμητα. Σε συγκεντρώσεις 100-125 mg/L έχει οξεία οσμή και γεύση οξειδωμένη και βοτάνου. Τα κατάλληλα στελέχη παράγουν χαμηλά επίπεδα ακεταλδεύδης.
- ▶ **Παραγωγή εστέρων** : Οι εστέρες παράγονται από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση. Το οξικό οξύ και λιπαρά οξέα εστεροποιούνται με την αιθανόλη ή άλλες αλκοόλες. Ο κύριος εστέρας του οίνου είναι ο οξικός αιθυλεστέρας που συνεισφέρει στο άρωμα με οσμή ξυδιού. Σε συγκεντρώσεις 50-80 mg/L έχει επιθυμητή επίδραση, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προσδίδει ανεπιθύμητο flavour. Για βελτίωση της οσμής του οίνου από ποικιλίες με ουδέτερο άρωμα, επιλέγονται στελέχη που παράγουν σημαντικά επίπεδα εστέρων που προσδίδουν φρουτώδη χαρακτήρα, όπως οξικό ισοαμυλεστέρα, οξικό ισοβουτυλεστέρα. Για βελτίωση της οσμής οίνου από αρωματικές ποικιλίες πλούσιες σε τερπένια, επιλέγονται στελέχη που παράγουν χαμηλά επίπεδα πτητικών ενώσεων. Αυτό καθόσον πτητικές ενώσεις ζύμωσης μπορεί να καλύψουν το ποικιλιακό άρωμα που είναι σημαντικό για αυτούς τους οίνους

Χαρακτηριστικά που αφορούν την οργανοληπτική ποιότητα

- ▶ **Παραγωγή πτητικών θειούχων ενώσεων** (υδροθείου και μερκαπτανών) : Οι ζυμομύκητες κατά τη ζύμωση παράγουν υδρόθειο και μερκαπτάνες, ανεπιθύμητες πτητικές ενώσεις. Τα κατάλληλα στελέχη παράγουν ελάχιστες συγκεντρώσεις. Αυτό έχει σημασία ιδιαίτερα για τους ερυθρούς οίνους.
- ▶ **Δράσεις σχετικές με το μηλικό οξύ** : Οι ζύμες έχουν δραστηριότητες για αποικοδόμηση και για παραγωγή μηλικού οξέος. Σε ψυχρά ή ενδιάμεσα κλίματα με γλεύκη με υψηλή οξύτητα/χαμηλό pH, επιθυμητά είναι στελέχη που αποικοδομούν το μηλικό οξύ. Στις περιπτώσεις γλευκών με χαμηλή οξύτητα/υψηλό pH, επιθυμητά είναι στελέχη που παράγουν μηλικό οξύ.
- ▶ **Ενζυμικές δραστηριότητες** : Στις περισσότερες αρωματικές ποικιλίες, τα τερπένια (στα οποία οφείλεται το άρωμα) συνήθως υπάρχουν ως γλυκοζίτες. Ορισμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* έχουν δραστηριότητες γλυκοσιδάσης, και αυξάνουν τα επίπεδα των τερπενίων και το άρωμα του οίνου. Αυτό είναι σημαντικό στην παραγωγή λευκών οίνων.



Χαρακτηριστικά που αφορούν την υγεία

- **Παραγωγή καρβαμιδικού αιθυλεστέρα** : Ο καρβαμιδικός αιθυλεστέρας (ουρεθάνη) είναι τοξική ένωση, καρκινογόνος. Η παρουσία του στους οίνους σχετίζεται με μικροβιακές δράσεις (ζυμών και βακτηρίων), και εξαρτάται από το pH και τις συγκεντρώσεις των πρόδρομων αζωτούχων ενώσεων. Η χρήση επιλεγμένων στελεχών (αργινάσης αρνητικά) που δεν παράγουν καρβαμιδικό αιθυλεστέρα είναι ένας καλός τρόπος για έλεγχό του στους οίνους. Σημειώνεται ότι κάποιες χώρες έχουν θέσει όρια συγκέντρωσης καρβαμιδικού αιθυλεστέρα για εισαγωγή οίνων.
- **Παραγωγή βιογενών αμινών** : Βιογενείς αμίνες, όπως οι ισταμίνη, πουτρεσκίνη, τυραμίνη και άλλες, είναι μικρού MW οργανικές βάσεις. Στους οίνους παράγονται με μικροβιακή αποκαρβοξυλίωση αμινοξέων. Οι ενώσεις αυτές επιδρούν αρνητικά στην ωφελιμότητα του οίνου. Μπορεί να έχουν τοξικότητα ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και την ευαισθησία των ατόμων. Είναι πρόβλημα για άτομα ευαίσθητα στην ισταμίνη, και προκαλούν κεφαλόπονους. Ζύμες εμπλέκονται στην παραγωγή βιογενών αμινών αλλά όχι ισταμίνης που έχει τη μεγαλύτερη τοξικότητα. Η παραγωγή βιογενών αμινών
- ▶ καλό είναι να είναι μεταξύ των κριτηρίων επιλογής τους.

Χαρακτηριστικά που αφορούν την υγεία

- ▶ **Μείωση ωχρατοξίνης A** : Η ωχρατοξίνη A είναι μυκοτοξίνη που βρίσκεται σε οίνους από μεταβολισμό μυκήτων των σταφυλιών. Έχει διάφορες αρνητικές επιδράσεις και είναι πιθανόν καρκινογόνο. Στην Ευρώπη έχει θεσπιστεί μέγιστο όριό της στους οίνους, 2 $\mu\text{g/L}$. Ορισμένοι ζυμομύκητες μπορούν να μειώνουν τα επίπεδα ωχρατοξίνης A στους οίνους, και τέτοια στελέχη πρέπει να επιλέγονται.
- ▶ **Παραγωγή μεθανόλης** : Η μεθανόλη, η απλούστερη αλκοόλη, έχει τοξικές επιδράσεις. Παράγεται από τις πηκτίνες με δράση πηκτινολυτικών ενζύμων. Ζυμομύκητες μπορεί παράγουν μεθανόλη. Τα κατάλληλα στελέχη παράγουν χαμηλά επίπεδα μεθανόλης.



Βιβλιογραφία

- Οινολογία: Επιστήμη και τεχνογνωσία. Σουφλερός Ευάγγελος. Εκδόσεις ΣΟΥΦΛΕΡΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ. 2015
- Παραδόσεις Οινολογίας. Ιωάννης Ρούσσης. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2017 (Σημειώσεις).
- Οινολογία: Από το σταφύλι στο κρασί. Τσακίρης Αργύρης. Εκδόσεις ΨΥΧΑΛΟΥ, Αθήνα, 4^η Έκδοση-2017.

