



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη Αλκοολικής Ζύμωσης και Ποιοτικών Χαρακτηριστικών Οίνων
που παρήχθησαν με χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων



Αικατερίνη Ι. Σακκή

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη Αλκοολικής Ζύμωσης και Ποιοτικών Χαρακτηριστικών Οίνων που παρήχθησαν με χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων

«Study of the Alcoholic Fermentation Using Selected Yeast Strains and Quality Analysis of the Produced wine - samples»

SAK_2 P14 1L	SAK_6 P14 1,5L	SAK_5 U14 1L	SAK_4 U14 1,5L	SAK_3 G14 1L	SAK_7 G14 1,5L
ESTERS					
acetic methyl ester	acetic methyl ester	acetic methyl ester	acetic methyl ester	acetic methyl ester	acetic methyl ester
Ethyl Acetate	Ethyl Acetate	Ethyl Acetate	Ethyl Acetate	Ethyl Acetate	Ethyl Acetate
propanoic ethyl ester	propanoic ethyl ester	propanoic ethyl ester	propanoic ethyl ester	propanoic ethyl ester	propanoic ethyl ester
isobutyl acetate	isobutyl acetate	isobutyl acetate	isobutyl acetate	isobutyl acetate	isobutyl acetate
Butanoic ethyl ester	Butanoic ethyl ester	Butanoic ethyl ester	Butanoic ethyl ester	Butanoic ethyl ester	Butanoic ethyl ester
formic heptyl ester	isobutyl acetate	1-butanol, 3-methyl-acetate	formic heptyl ester	formic octyl ester	formic-1-methylethyl ester
ethyl hydrogen succinate	Butanoic ethyl ester	formic-1-methylethyl ester	1-butanol, 3-methyl-acetate	formic-1-methylethyl ester	1-butanol, 3-methyl-acetate
1-butanol, 3-methyl-acetate	1-butanol, 3-methyl-acetate	hexanoic ethyl ester	formic-1-methylethyl ester	1-butanol, 3-methyl-acetate	1-ethylpropyl acetate
hexanoic ethyl ester	hexanoic ethyl ester	butanoic-2-methylbutyl ester	hexanoic ethyl ester	hexanoic ethyl ester	hexanoic ethyl ester
butanoic-2-methylbutyl ester	butanoic-2-methylbutyl ester	propanoic-2-hydroxy-ethyl ester	butanoic-2-methylbutyl ester	propanoic-2-hydroxy-ethyl ester	butanoic-2-methylbutyl ester
propanoic-2-hydroxy-ethyl ester	propanoic-2-hydroxy-ethyl ester	octanoic ethyl ester	propanoic-2-hydroxy-ethyl ester	octanoic ethyl ester	propanoic-2-hydroxy-ethyl ester
octanoic ethyl ester	octanoic ethyl ester	8-nonenoic ethyl ester	octanoic ethyl ester	decanoic ethyl ester	octanoic ethyl ester
8-nonenoic ethyl ester	8-nonenoic ethyl ester	decanoic ethyl ester	decanoic ethyl ester	butanedioic acid diethyl ester	4-penten-1-ol propanoate
decanoic ethyl ester	decanoic ethyl ester	butanedioic acid diethyl ester	butanedioic acid diethyl ester	1,3-propanediol, diacetate	decanoic ethyl ester
butanedioic acid diethyl ester	butanedioic acid diethyl ester	butanoic-3-methyl-ethyl ester	butanoic-3-methyl-ethyl ester	butanoic-3-methyl-ethyl ester	formic heptyl ester
butanoic-3-methyl-ethyl ester	butanoic-3-methyl-ethyl ester	acetic-2-phenylethyl ester	acetic-2-phenylethyl ester	acetic-2-phenylethyl ester	butanedioic acid diethyl ester
acetic-2-phenylethyl ester	acetic-2-phenylethyl ester	formic octyl ester	8-nonenoic ethyl ester	succinic butyl-2-phenylethyl ester	1,3-propanediol, diacetate
succinic butyl-2-phenylethyl ester	butanedioic ethyl 3-methylbutyl ester	butanedioic ethyl 3-methylbutyl ester	butanedioic ethyl 3-methylbutyl ester	8-nonenoic ethyl ester	butanoic-3-methyl-ethyl ester
pentanoic-3-hydroxy-ethyl ester	formic octyl ester	succinic butyl-2-phenylethyl ester	succinic butyl-2-phenylethyl ester	5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid	acetic-2-phenylethyl ester
butanedioic ethyl 3-methylbutyl ester	diethyl phthalate	hexanoic ethyl ester	p-hydroxycinnamic acid ethyl ester	hexanoic ethyl ester	8-nonenoic ethyl ester
hexanoic ethyl ester	hexanoic ethyl ester	diethyl phthalate	hexanoic ethyl ester	diethyl phthalate	succinic butyl-2-phenylethyl ester
diethyl phthalate	diethyl phthalate	5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid	diethyl phthalate	phthalic acid, butyl 2-pentyl ester	diethyl phthalate
formic octyl ester	ethyl hydrogen succinate	phthalic acid, butyl 2-pentyl ester	formic octyl ester		formic octyl ester
5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid	5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid	ethyl ester	5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid	ethyl ester	phthalic acid, butyl 2-pentyl ester
phthalic acid, butyl 2-pentyl ester	succinic butyl-2-phenylethyl ester		phthalic acid, butyl 2-pentyl ester		
	phthalic acid, butyl 2-pentyl ester				

Αικατερίνη Ι. Σακκή

Εξεταστική επιτροπή:

Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)
 Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής καθηγητής ΓΠΑ
 Μαρία Μετάφα, Συνεργάτης - Ερευνήτρια Γ' - ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ»

Μελέτη Αλκοολικής Ζύμωσης και Ποιοτικών Χαρακτηριστικών Οίνων που παρήχθησαν με χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων

ΔΠΜΣ «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου»

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Οινολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Διεθνής και συνεχόμενος ανταγωνισμός στην αγορά οίνου, σε συνδυασμό με τις απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού για νέα, πολύπλοκα και ενδιαφέροντα προϊόντα μειωμένης αλκοόλης, έχουν δημιουργήσει στην επιστήμη της Οινολογίας, νέες προκλήσεις. Η ελεγχόμενη αλκοολική ζύμωση χωρίς την παρουσία του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* ή με το διαδοχικό εμβολιασμό του στο εν ζυμώσει γλεύκος, αποτελεί μία υποσχόμενη απάντηση σε αυτές. Επομένως, είναι σημαντική η διερεύνηση των ειδών των μικροοργανισμών, που μπορούν να συμμετάσχουν στη διαδικασία παραγωγής οίνου.

Εκκινώντας από την ικανότητα των μικροοργανισμών να καταβολίσουν συγκεκριμένους υδατάνθρακες, στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, επιλέγησαν τέσσερα στελέχη ζυμομυκήτων, τα οποία ερευνήθηκαν, αρχικά, ως προς την ανάπτυξή τους σε συνθετικό υπόστρωμα συγκεκριμένης ποσότητας σακχάρου (γλυκόζης) υπό αερόβιες συνθήκες (που μπορούν να χαρακτηρισθούν έως και ημιαερόβιες). Πρόκειται για τη μελέτη της βιοκινητικής συμπεριφοράς τους σε φαινόμενα ζύμωσης, με έμφαση στην επιθυμητή παραγωγή προϊόντων, όπως η αιθανόλη σε μειωμένα επίπεδα, ώστε να ευρεθούν και να μελετηθούν τα στελέχη που είναι κατάλληλα για χρήση, στην οινοποιητική διαδικασία με πιθανότητα χρήσης τους στη βιομηχανία οίνου. Ακολούθως, μελετήθηκε το φαινόμενο Crabtree, το οποίο σχετίζεται με την ικανότητα κάποιων μικροοργανισμών να εκτελούν αλκοολική ζύμωση, παρουσία οξυγόνου, όταν το σάκχαρο στο μέσο καλλιέργειας υπερβαίνει μία κρίσιμη συγκέντρωση. Έπειτα από τρεις σειρές πειραμάτων στις οποίες ακολουθήθηκαν ακριβώς οι ίδιες διεργασίες, προέκυψαν επαναλήψιμα αποτελέσματα και συμπεράσματα ως προς την ικανότητα των μικροοργανισμών να εκτελέσουν αλκοολική ζύμωση στις συνθήκες του πειράματος. Τέλος, έλαβε χώρα η μελέτη της παραγωγής των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών τους και μικροβιακού λίπους.

Η παρούσα διατριβή στο δεύτερο μέρος της, επικεντρώνεται στην ελεγχόμενη ζύμωση του γλεύκους με εμβόλια των ανωτέρω επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων, όπου πραγματοποιήθηκαν τέσσερις κύκλοι πειραμαματικών μικροοινοποιήσεων με εκκινητές της ζύμωσης τους τέσσερις μικροοργανισμούς, σε παστεριωμένο γλεύκος ασύρτικο και μη, μελετώντας εκ νέου τη βιοκινητική τους σε παστεριωμένο γλεύκος αυτή τη φορά. Στη συνέχεια, οι τρεις άγριες ζύμες χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο-εκκίνηση σε διαδοχικό εμβολιασμό με τον *Saccharomyces cerevisiae* rhone σε παστεριωμένο γλεύκος υπό ασηπτικές συνθήκες, αλλά σε δεύτερο πλάνο και μη παστεριωμένο γλεύκος με κανονικές συνθήκες οινοποίησης.

Τα επιλεγμένα στελέχη ζυμομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα: *Metschnikowia pulcherrima* MPLFMB1, *Hanseniaspora uvarum* OSTIBFW1, *Hanseniaspora guilliermondii* OSPIBFW12 και *Saccharomyces cerevisiae* rhone. Οι τρεις πρώτοι είναι non-*Saccharomyces* ζυμομυκήτες, ενώ ο τέταρτος είναι σακχαρομύκητας. Θετικοί ως προς το φαινόμενο Crabtree αποδείχθηκαν οι εξής: ο πρώτος (*M.pulcherrima*), ο τρίτος (*H.guilliermondii*) και ο σακχαρομύκητας (*S.cerevisiae*), επαληθεύοντας τις βιβλιογραφικές αναφορές. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων το υπόστρωμα αποτελούταν από γλυκόζη 70g/L και στο δεύτερο μέρος η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε γλεύκος ασύρτικο με ≈250g/L σακχάρων, το οποίο επιλέχθηκε κυρίως λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε σάκχαρο, ώστε να μπορούν να εξαχθούν ρεαλιστικά αποτελέσματα που να ανταποκρίνονται στην επίλυση των προκλήσεων που αντιμετωπίζει η βιομηχανία οινοποίησης παγκοσμίως. Η μελέτη κατανάλωσης των σακχάρων με ταυτόχρονη παραγωγή προϊόντων, όπως αιθανόλη, γλυκερόλη κ.ά. έλαβε χώρα μέσω HPLC. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του πτητικού προφίλ των παραγόμενων πειραματικών οίνων ποικιλίας ασύρτικο μέσω GC-MS και οσφρητικού οργανοληπτικού ελέγχου.

Η αξιολόγηση αφορά τα τρία τελικά προϊόντα, τα οποία προέκυψαν ως αποτέλεσμα του διαδοχικού εμβολιασμού του οίνου με διαφορετικές άγριες ζύμες και τον ίδιο σακχαρομύκητα και κατα πόσο ο κάθε ένας από αυτούς τους διαδοχικούς εμβολιασμούς μπορεί να επηρεάσει το χαρακτήρα του οίνου (συγκέντρωση αιθανόλης, γλυκερόλης και αρωματικών

ενώσεων). Η ανάλυση, συνεπώς του αρώματος των παραγόμενων πειραματικών οίνων της ποικιλίας ασύρτικο, διαφοροποιώντας την ανωτέρω παράμετρο, κρατώντας τις υπόλοιπες συνθήκες σταθερά ίδιες, αποτελεί απαραίτητη γνώση για τους οινολόγους, τόσο ως εργαλείο αξιολόγησης των ποικιλιακών οίνων, όσο και ως ένα σημαντικό βοήθημα για την επιλογή των ζυμών που θα εφαρμόσουν κατά την διαδικασία της οινοποίησης.

Γενικά, παρατηρήθηκε σχετικά μικρή μείωση και στους τρεις διαφορετικούς παραγόμενους πειραματικούς οίνους (6 συνολικά δείγματα – τα 3 είναι επαναληπτικά), όσον αφορά στη σύγκριση μεταξύ του οίνου αναφοράς παραγόμενου από παστεριωμένο γλέυκος και αύξηση κυρίως των παραπροϊόντων, όπως η γλυκερόλη. Επομένως, αυτό το οποίο, ήταν το κυρίως ζητούμενο επιτεύχθει. Μεγαλύτερη μείωση παρουσίασε το δείγμα οίνου με εμβόλιο εκκίνησης *M.pulcherrima*. Σε δεύτερη βάση, το αρωματικό προφίλ του ασύρτικου μελετήθηκε μέσω του προσδιορισμού των πτητικών ενώσεων των πειραματικών οίνων, οι οποίες και διαμορφώνουν το άρωμα, ενώ ως πιο διαδεδομένη τεχνική για την ταυτοποίηση και ημιποσοτικοποίηση των συστατικών αυτών χρησιμοποιήθηκε η αέρια χρωματογραφία σε συνδιασμό με την φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS). Η αξιολόγηση ολοκληρώθηκε με τον οσφρητικό οργανοληπτικό έλεγχο που έλαβε χώρα στο εργαστήριο Οινολογίας του ΓΠΑ. Η σύγκριση ανάλυσης των πτητικών ενώσεων των πειραματικών οίνων πραγματοποιήθηκε μεταξύ των δειγμάτων διαδοχικού εμβολιασμού, του αρχικού γλεύκους και βιβλιογραφικά, όχι με τον οίνο αναφοράς. Ως καλύτερο δείγμα, επιλέγεται αυτό που παράχθηκε με διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima* και *S.cerevisiae*, λόγω κυρίως της μεγαλύτερης συγκέντρωσης επιθυμητών εστέρων σε αυτό.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Οίνου

Λέξεις - Κλειδιά: Αλκοολική ζύμωση με διαδοχικό εμβολιασμό, non-Saccharomyces, άγριες ζύμες, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, σακχαρομύκητας, *Saccharomyces cerevisiae*, οινοποίηση, αερόβιες συνθήκες, μείωση αιθανόλης, πτητικές ενώσεις, ανάλυση αρωματικού προφίλ, HPLC, GC-MS, χημικό προφίλ, οσφρητική αξιολόγηση, οργανοληπτικός έλεγχος, ασύρτικο, λευκός οίνος, φαινόμενο Crabtree, ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, παραγωγή ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους.

Thesis title: Study of the Alcoholic Fermentation Using Selected Yeast Strains and Quality Analysis of the Produced wine – samples

MSc "Food Science and Technology and Human Nutrition"

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Microbiology and Biotechnology & Oenology Laboratory

ABSTRACT

The international and continuous competitiveness in the wine market, combined with the demands of the consumer public for new, complex and interesting products of low alcohol, have created new challenges in the science of Oenology. Controlled alcoholic fermentation without the presence of the microorganism *Saccharomyces cerevisiae* or with its sequential inoculation into the fermented must, is a promising response to them. Therefore, it is important to investigate the types of microorganisms that may be involved in the winemaking process.

Starting from the ability of microorganisms to catabolize specific carbohydrates, in this master's thesis, four yeast strains were selected, which were initially investigated for their growth on a synthetic substrate of a certain amount of sugar (glucose) under aerobic or semi-aerobic conditions. The study of their biokinetic behavior in fermentation phenomena, with emphasis on the desired wine products, such as ethanol at reduced levels, in order to find and study the strains that are suitable for use, in the winemaking process with the possibility of their use in the wine industry.

Next was studied, the Crabtree effect, which is related to the ability of some microorganisms to perform alcoholic fermentation in the presence of oxygen, when the sugar in the substrate exceeds a critical concentration. After three series of experiments in which exactly the same processes was followed, reproducible results and conclusions were obtained regarding the ability of microorganisms to perform alcoholic fermentation under the conditions of the experiment. Finally, the study of the production of their intracellular polysaccharides and microbial fat took place.

This report, in its second part, focuses on the controlled fermentation of grape must with vaccine-cultivations of the above selected yeast strains, where four cycles of experimental micro-vinifications were carried out /took place with starters of the fermentation the four microorganisms, in pasteurized and non must. The three wild yeasts/ non-*Saccharomyces* were then used as a starter-vaccine culture in a sequential inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* rhone in pasteurized must under aseptic conditions, but also unpasteurized must under normal vinification conditions.

The selected yeast strains used are the following: *Metschnikowia pulcherrima* MPLFMB1, *Hanseniaspora uvarum* OSTIBFW1, *Hanseniaspora guilliermondii* OSPIBFW12 and *Saccharomyces cerevisiae* rhone. The first three are non-*Saccharomyces* yeast, while the fourth is *Saccharomyces*. All, except *Hanseniaspora uvarum*, proved to be positive for the Crabtree phenomenon, verifying the bibliographical reports. In the first series of experiments the substrate consisted of glucose $\approx 70\text{g} / \text{L}$ and in the second part the alcoholic fermentation was carried out in assorted must with $\approx 250\text{g} / \text{L}$ sugars, which was chosen mainly due to its high sugar content, so that realistic results could be obtained to meet the challenges facing the wine industry worldwide. Furthermore, the study of the consumption of sugars with simultaneous production of main and byproducts, such as ethanol, glycerol, etc. took place via HPLC. Finally, the aromatic profile of the experimental produced wines "assyrtiko" was evaluated through GC-MS and olfactory organoleptic examination.

The evaluation concerns the three final products, which emerged as a result of the successive vaccination with different wild yeast and the same *Saccharomyces*, whether each of these successive vaccinations can affect the character of the wine (ethanol, glycerol and aromatic compounds-odor/final scent). Therefore, the analysis of the aroma of the produced experimental wines of the variety Assyrtiko, differentiating the above parameter, keeping the other conditions consistently the same, is a necessary knowledge for oenologists, both as a tool for evaluating varietal wines, and as an important aid for the selection of the doughs to be applied during the winemaking process.

In general, there was a relatively small decrease in all three different experimental wines produced (6 samples in total - 3 are repetitive), in terms of comparison between pasteurized reference wine and the increase mainly in by-products, such as glycerol. Therefore, this, which was the main goal to be achieved. The wine sample with *M.pulcherrima* starter vaccine showed the greatest reduction in ethanol. Specifically, the aromatic profile of assyrtiko was studied by determining the volatile compounds of the experimental wines, which form the aroma, while the most common technique for the identification and semi-quantification of these components carried out via gas chromatography in combination with mass

spectrometry (Gas Chromatography / Mass Spectrometry, GC / MS). The evaluation was completed with the organoleptic examination that took place in the laboratory of Oenology at AUA. The comparison of the analysis of the volatile compounds of the experimental wines was carried out between the samples of sequential inoculation, the initial must and bibliographically, not with the reference wine. As the best sample, characterized the wine which was produced by sequent inoculation of *M.pulcherrima* and *S.cerevisiae*, mainly due to the higher concentration of desired esters in it.

Scientific Area: Wine Microbiology

Key – Words: Alcoholic co-fermentation, sequential inoculation, non-Saccharomyces, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, winemaking, ethanol reduction, volatile compounds, aromatic profile analysis, HPLC, GC-MS, chemical profiling, sensory evaluation, assyrtiko, white wine, Crabtree, intracellular polysaccharides production, microbiological lipids production

ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της παρούσης ερευνητικής εργασίας είναι να εξετασθεί η πιθανότητα παραγωγής πειραματικών οίνων ποικιλίας ασύρτικο μειωμένης συγκέντρωσης αιθανόλης, με τη στρατηγική οινοποίησης του διαδοχικού εμβολιασμού non *Saccharomyces* με *Saccharomyces*, χρησιμοποιώντας διαφορετικά επιλεγμένα στελέχη, με εμφανή τη συνεισφορά τους στο αρωματικό προφίλ των παραγόμενων πειραματικών οίνων. Τα επιλεγμένα στελέχη ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν στο εμβολιασμό είναι τα εξής: *Saccharomyces cerevisiae* rhone, *Hanseniaspora uvarum* και *guilliermondii*, *Metschnikowia pulcherrima*. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα μια σειρά οινοποιήσεων που διεξάγονται τόσο από τη δραστηριότητα των επιλεγμένων στελεχών ως μονοκαλλιέργεια εκκίνησης, όσο και με τη μορφή μικτών καλλιιεργειών. Συγκεκριμένα, εξετάζεται η εφαρμογή ζυμομυκητών non-*Saccharomyces* ως εκκινητές μονοκαλλιέργειας σε συνθετικό γλεύκος, και σε δεύτερο πλάνο ως εκκινητές διαδοχικού εμβολιασμού γλεύκους. Τα αποτελέσματα της αλκοολικής ζύμωσης αξιολογήθηκαν προσδιορίζοντας κυρίως το ποσοστό της αιθανόλης, καθώς και τα παραπροϊόντα της ζύμωσης (γλυκερόλη κ.ά.) με ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τις αρωματικές πτητικές ενώσεις στα δείγματα των παραγόμενων πειραμαματικών οίνων.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑΣ

Το τρέχον ενδιαφέρον της αγοράς οίνου έχει επικεντρωθεί στην παραγωγή προϊόντων με μειωμένη περιεκτικότητα σε αλκοόλ. Ο κύριος λόγος της επιλογής του συγκεκριμένου θέματος μελέτης είναι η νέα τάση της βιομηχανίας οίνου να στραφεί προς ελεγχόμενες ζυμώσεις, με εμβόλιο εκκίνησης τους, τις αυτόχθονες ζύμες των σταφυλιών. Τέτοιου είδους ζυμώσεις, προσφέρουν στον οίνο, χαρακτηριστικότερα ποικιλιακά αρώματα και αυξάνουν την πολυπλοκότητα ενισχύοντας τα μοναδικά και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε οινικού προϊόντος (Ciani et al., 2009). Ως αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης ορίζεται η διερεύνηση της φυσιολογικής συμπεριφοράς επιλεγμένων στελεχών ζυμών, κατά την αύξησή τους σε συνθετικό υπόστρωμα και γλεύκος. Μελετάται το φαινόμενο Pasteur και το φαινόμενο Crabtree. Η μελέτη ολοκληρώνεται με πειραματικές μικρο-Οινοποιήσεις, ανάλυση πτητικών ενώσεων και οσφρητικό οργανοληπτικό έλεγχο των παραγόμενων πειραματικών οίνων.

Σε αυτήν τη μελέτη, έλαβε χώρα η διερεύνηση στρατηγικής διαδοχικού εμβολιασμού γλεύκους υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων, μέσω μικροβιολογικής προσέγγισης, με στόχο τη μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης του οίνου. Αυτή επιτεύχθη με τη βοήθεια τριών επιλεγμένων στελεχών άγριων ιθαγενών ζυμών **non-Saccharomyces** (*Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum* και *Hanseniaspora guilliermondii*, τα δύο τελευταία απομονωμένων από αμπελώνες της Σαντορίνης κατά το έτος 2018), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο εκκίνησης της ζύμωσης σε διαδοχικό εμβολιασμό με *S. cerevisiae*. Η χρήση ζυμομυκήτων non-*Saccharomyces* για μεταβολισμό και, ως εκ τούτου, απομάκρυνση μέσω αναπνοής μέρους της περιεχόμενης ποσότητας σακχάρων του γλεύκους, είναι η πλέον ανερχόμενη στρατηγική οινοποίησης που χρησιμοποιείται από τους βιοτεχνολόγους του οίνου. Τα ιθαγενή αυτά στελέχη λόγω της μικρής αντοχής τους σε αυξημένα επίπεδα αιθανόλης, δεν είναι σε θέση να καταναλώσουν όλη την ποσότητα σακχάρων του υποστρώματος-γλεύκους, επομένως είναι απαραίτητη η χρήση εμβολιασμού με κάποιον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*, προκειμένου να διασφαλισθεί η ολοκλήρωση της ζύμωσης. Στην ιδανική περίπτωση, ένα αποτελεσματικό στέλεχος, non-*Saccharomyces* θα πρέπει να εμφανίζει χαμηλή απόδοση αιθανόλης αλλά ταυτόχρονη ικανότητα να καταναλώνει αρκετή ποσότητα σακχάρων, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται εμφανής αντίκτυπος στη μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης των παραγόμενων οίνων και επιπλέον, να είναι συμβατός με το στέλεχος *S. cerevisiae*, ώστε να διασφαλιστεί η επιτυχής ολοκλήρωση της ζύμωσης.

Ένα επιπλέον στοιχείο πρωτοτυπίας της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η χρήση απομονωμένων ιθαγενών ζυμών από αμπελώνες της Σαντορίνης, σε συνδυασμό με γηγενή ποικιλία αμπέλου του νησιού της Θήρας, παγκοσμίως ανερχόμενη, το Ασύρτικο. Επιπρόσθετα, μελετάται το συγκεκριμένο γλεύκος, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε σάκχαρα, τα οποία αποδίδουν αντίστοιχα, υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης αιθανόλης στους οίνους, ώστε τα αποτελέσματα που εξάγονται είναι πιο ρεαλιστικά.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτέλεσε μια σύμπραξη ανάμεσα στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, καθώς και στο εργαστήριο Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ολοκληρώνοντας τη μεταπτυχιακή μου διατριβή, αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσά μου, κ. Καλλίθρακα Σταματίνα, αναπληρώτρια καθηγήτρια ΓΠΑ, για την εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου δίνοντάς μου την ευκαιρία να συμμετάσχω στο πρόγραμμα ΕΣΠΑ, με τίτλο «Αξιοποίηση νέας φυσικής Ελληνικής μικροβιακής χλωρίδας προς παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας». Η καλή της διάθεση και η επιστημονική καθοδήγησή της σε θέματα πειραματικού σχεδιασμού αναφορικά με το οινολογικό κομμάτι της ερευνητικής μου μελέτης, ήταν πολύτιμες.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον αναπληρωτή καθηγητή, κ. Παπανικολάου Σεραφείμ, για τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου. Με την επιστημονική του υποστήριξη κατάφερα να υπερκεράσω τις όποιες δυσκολίες, σε επίπεδο μικροβιολογίας, αντιμετώπισα, μη έχοντας εξαρχής το κατάλληλο θεωρητικό υπόβαθρό, φτάνοντας όμως στο επίπεδο να αγαπήσω πραγματικά το συγκεκριμένο αντικείμενο, φέρνοντας εις πέρας το απαιτητικό πρόγραμμα των πειραμάτων με ιδιαίτερο ενθουσιασμό.

Επίσης, οφείλω να δηλώσω τις ευχαριστίες μου στο τρίτο μέλος της εξεταστικής επιτροπής μου, την ερευνήτρια Δ' του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «Δήμητρα», κ. Μετάφα Μαρία.

Στη συνέχεια, επιθυμώ να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Κουτίνα Απόστολο, καθώς και όλη την υπέροχη εργαστηριακή του ομάδα, αποτελούμενη από υποψήφιους διδάκτορες και μεταδιδάκτορες για την πρόθυμη βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, την άποψη συνεργασία καθώς και την ηθική στήριξη που μου παρείχαν.

Ιδιαίτερη μνία μεταξύ όλων των διδασκόντων του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών, θα ήθελα να κάνω στον κ.Κοτσερίδη για τη μεταλαμπάδευση των γνώσεων του, καθώς και στις κ. Προξενιά Νίκη και κ. Καλαντζή Ουρανία, υπεύθυνες ΕΕΔΙΠ, των εργαστηρίων Οινολογίας και Μικροβιολογίας, αντίστοιχα, για την εξαιρετική συνεννόηση και συνεργασία των δύο εργαστηρίων, ιδιαίτερος όσον αφορά στο πρακτικό κομμάτι της εργασίας μου, βοηθώντας αμέριστα στη διεξαγωγή και την επιτυχή έκβαση των πειραματικών διαδικασιών, η κάθεμία στο δικό της τομέα.

Ακόμη, θα ήθελα να αναφέρω τον κύριο Μαλλούχο για την εμπιστοσύνη του και την άμεση ανταπόκριση σε συνεργασία με σκοπό τη διεξαγωγή αναλύσεων, οι οποίες έλαβαν χώρα στο εργαστήριο, το οποίο είναι επιστημονικός υπεύθυνος Ακολούθως θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου, για την άριστη συνεργασία τους, στις μεταδιδάκτορες Αντωνία Τέρπου και Μαρκέλα Τζιρίτα, για την εξαιρετική συνεργασία, την άποψη επαγγελματική συμπεριφορά που τις διακατείχε και την απεριόριστη βοήθειά τους. Η πολύτιμη καθοδήγηση της κ. Τέρπου συνέβαλε στην επιτυχή συνέχιση των πειραμάτων οινοποίησης, ώστε να δηλώνω ιδιαίτερος ευγνώμων για την ορθή διαχείριση τυχόν δυσκολιών στον πειραματικό προγραμματισμό.

Επιπλέον, νιώθω ευγνώμων απέναντι στις υποψήφιες διδάκτορες Στεφανία Χριστόφη και Ευαγγελία Νάνου, όσον αφορά στο οινολογικό μέρος της εργασίας μου. Την πρώτη για τη βοήθειά της με την επεξεργασία και ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων με την τεχνική GC-MS και τη δεύτερη για τις πολύτιμες συμβουλές της όσον αφορά στην οργάνωση της διαδικασίας του οργανοληπτικού ελέγχου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους μεταδιδάκτορες, υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές των δύο εργαστηρίων, τόσο για τις επιστημονικές τους συμβουλές, όσο και για το ευχάριστο, δημιουργικό κλίμα που επικρατούσε κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Συνακόλουθα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη κ. Δώρα Κομματά, υπεύθυνη της γραμματειακή υποστήριξη του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών, για τα στοιχεία υπευθυνότητας και επαγγελματισμού που τη διακρίνουν.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, που με έμαθε να μην τα παρατάω παρά τις αντίξοες συνθήκες, καθώς και για την ηθική συμπαράσταση που μου προσφέρουν σε κάθε μου βήμα.

Κατερίνα Σακκή,
Χημικός Μηχανικός

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το τρέχον ενδιαφέρον της αγοράς για τη μείωση των επιπέδων του αλκοόλ των οίνων, έγκεινται σε δύο βασικούς παράγοντες. Αρχικά, στην αντιστάθμιση της αύξησης της παγκόσμιας μέσης θερμοκρασίας (υπερθέρμανση του πλανήτη) και τον αντίκτυπο αυτής στην αμπελουργία, ο οποίος περιλαμβάνει χαμηλότερη οξύτητα, αλλοιωμένη φαινολική ωρίμανση και περιεκτικότητα σε τανίνη, καθώς και αισθητά υψηλότερα επίπεδα σακχάρων κατά τη στιγμή της συγκομιδής, ειδικά σε θερμά κλίματα (Jones et al., 2005). Έπειτα η αύξηση της περιεκτικότητας σε σάκχαρα στο γλεύκος σταφυλιών κατά τα τελευταία 20 έτη, έχει οδηγήσει σε συνακόλουθη αύξηση των επιπέδων αλκοόλης στον οίνο 2% (v / v), είναι μερικές από τις κύριες προκλήσεις που επηρεάζουν τη οινική βιομηχανία σήμερα (Goold et al., 2017). Η αυξανόμενη ζήτηση ποιοτικών οινικών προϊόντων χαμηλής αλκοόλης, αποτελεί τον άλλο σημαντικό παράγοντα, καθώς λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης διακυβεύεται η αρωματική πολυπλοκότητα του οίνου, με αρνητικές επιπτώσεις στα ποιοτικά οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (Pickering et al., 1998), όπως αύξηση της αντίληψης της πικρίας, της στυπτικότητας, καθώς και κάλυψη ορισμένων πτητικών ενώσεων (Fischer and Noble, 1994; Wilkinson and Jiraneek, 2013), καθιστώντας το προϊόν ως πιθανό απόρριψη από τους καταναλωτές. Συντρέχουν, φυσικά, και άλλοι σημαντικοί λόγοι για μια τέτοια απόφαση. Διάφορα σοβαρά θέματα εμπίπτουν στις νέες προτιμήσεις των καταναλωτών, όπως αυτά που αφορούν στην οδική ασφάλεια και τους νέους νόμους επί κατανάλωσης αλκοόλ, στις επιβλαβείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (υιοθέτηση ενός πιο υγιούς μοντέλου ζωής) (Gronbaek, 2009) ή ακόμα και οικονομικοί λόγοι, όπως το εμπόριο αλκοολούχων ποτών, που υπόκεινται φόρους ανάλογα με την περιεκτικότητα σε αλκοόλ (Gil et al., 2013) και το οποίο επηρεάζεται άμεσα, διότι αυξάνονται παράλληλα και οι φόροι των αντιστοίχων οινικών προϊόντων σε πολλές χώρες.

Η ποιότητα, η υγεία και οι οικονομικοί παράγοντες επομένως, οδήγησαν τους οινοποιούς στην απόφασή να αποκτήσουν πρόσβαση σε τεχνολογίες που να επιτρέπουν την επίτευξη της παραγωγής οίνων με χαμηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης, τάση, η οποία υπαγορεύεται από τη ζήτηση της διεθνούς αγοράς. Η έρευνα πάνω σε αυτό το αντικείμενο βρίσκεται ακόμη υπό εξέλιξη παρότι διεξάγεται τουλάχιστον εδώ και δυό δεκαετίες και μεταξύ των διαφόρων υπό εξέταση εναλλακτικών προτάσεων, έχει πλέον προσανατολιστεί στη **στρατηγική εύρεσης ζυμών με την δυνατότητα μείωσης της περιεκτικότητας σε αιθανόλη στους παραγόμενους οίνους** (Michnick et al., 1997).

Μέσα σε αυτό το χρονικό πλαίσιο, έχουν προταθεί διαφορετικές προσεγγίσεις και στρατηγικές, που στοχεύουν σε όλα τα στάδια της οινοποίησης, για τη μείωση των επιπέδων αλκοόλ στον οίνο. Αυτές περιλαμβάνουν **την επιλογή κλώνων αμπέλου, προσαρμοσμένων αγρονομικών μεθόδων** (Intrigliolo and Castel, 2009), διαχείρισης αμπελώνων, προζυμωτικές κατεργασίες του γλεύκους, **πρακτικές οινοποίησης προσαρμοσμένες σε άγουρα σταφύλια** (Kontoudakis et al., 2011b), **μικροβιολογικές προσεγγίσεις κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης με επιλογή και δημιουργία στελεχών ζύμης με χαμηλότερες αποδόσεις αιθανόλης** (Loira et al., 2012) ή **μερική αλκοόλη με φυσικά μέσα** (Aguera et al., 2010, Belisario-Sánchez et al., 2009, Catarino and Mendes, 2011, Chanukya and Rastogi, 2013, Gambuti et al., 2011) και τέλος τεχνολογίες που αφορούν το προϊόν μετά τη ζύμωση – μεταζυμωτικές πρακτικές (Ciani et al., 2016, Garcia-Martin et al., 2010, Gonzalez et al., 2013, Longo et al., 2017, Schmidtke et al., 2012, Varela et al., 2015). Η πρόωμη συγκομιδή δεν θεωρείται μια καλή εναλλακτική λύση για την αποφυγή της υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα του γλεύκους των σταφυλιών, δεδομένου ότι θα αποτρέψει τη βέλτιστη φαινολική ωριμότητα και την αρωματική πολυπλοκότητα που απαιτείται για την παραγωγή καλά δομημένων και πλήρων σε σώμα οίνων που απαιτούνται από τους καταναλωτές (Kontoudakis et al., 2011a).

Από τις πιο εφαρμόσιμες προτάσεις προς αυτή την κατεύθυνση, αποτελούν οι μικροβιολογικές προσεγγίσεις για τη μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης των οίνων. Ωστόσο, αρκετές από αυτές έχουν μικρό αντίκτυπο στην περιεκτικότητα σε αιθανόλη και θέτουν σε κίνδυνο την ποιότητα του οίνου, λόγω της διαφορετικής ποικιλίας των μεταβολιτών που παράγονται. (Quirós M. et al., 2014). Οι βιοτεχνολογικές στρατηγικές που διερευνήθηκαν, αρχικά βασίστηκαν στη γενετική μηχανική του *S. cerevisiae*, μια ορθολογική επιλογή, λαμβάνοντας υπόψη τον κυρίαρχο ρόλο αυτού του είδους *Saccharomyces*, τόσο στην αυθόρμητη όσο και στην ελεγχόμενη ζύμωση. Ωστόσο, η χρήση αυτών των ανασυνδυασμένων στρατηγικών αντιμετώπισε σύντομα εμπόδια, τα οποία προέρχονται τόσο από τον μεταβολισμό του σακχαρομύκητα, όσο και από το ρυθμιστικό πλαίσιο για τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (Kutyra et al., 2010, Varela et al., 2012, Rossouw et al., 2013). Το γεγονός ότι απαιτείται περαιτέρω γενετική τροποποίηση για να υπερκεραστούν τα αρχικά προβλήματα δεν βοήθησε ιδιαίτερα, καθώς η χρήση **γενετικά και εξελικτικά (μη ΓΤ) κατασκευασμένων στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*** δεν είναι ακόμα αρκετά κοντά στην εμπορική εφαρμογή και, ως εκ τούτου, δεν είναι διαθέσιμη για τους οινοπαραγωγούς (Abalos et al., 2011, Tilloy et al., 2014). Βέβαια, πρόσφατα, η ομάδα ερευνητών Tilloy et al. (2014) χρησιμοποίησαν στρατηγικές με βάση την εξέλιξη και την αναπαραγωγή για να δείξουν ότι τα εξελισσόμενα ή υβριδικά στελέχη μπορούν να οδηγήσουν σε μικρές μειώσεις αιθανόλης σε σύγκριση με τα προγονικά στελέχη. **Τέλος, έχει προταθεί και η χρήση μη συμβατικών ζυμών non-*Saccharomyces*** (Contreras et al., 2014, Gobbi et al., 2014, Quirós et al., 2014).

Αυτή η τελευταία πολλά υποσχόμενη στρατηγική της χρήσης μη συμβατικών ζυμών, περιλαμβάνει τη άφιξη στην αγορά, εκκινητών ζύμωσης non-Saccharomyces, (Kutyna et al., 2010, Longo et al., 2017), ανοίγοντας νέους δρόμους αξιοποίησης της αναπνευστικής μεταβολικής δραστηριότητας (οξειδωτική ή ασθενώς ζυμωτική) τους ως εργαλείο που στοχεύει στη μείωση της περιεκτικότητας των οίνων σε αιθανόλη, μέσω κατανάλωσης μικρότερης ποσότητας σακχάρων ή εκτροπής του μεταβολισμού του άνθρακα προς άλλες οδούς και συνάμα μεταβολίτες (Liguori et al. 2018, Gonzalez et al., 2013). Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί αναπνευστικής ζύμωσης (χρησιμοποιούν το οξυγόνο για ανάπτυξη ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση σακχάρου) που παρουσιάζουν ορισμένοι από αυτούς (αρνητικοί στο Crabtree, στην παρούσα εργασία μόνο ο *H.uvarum* χαρακτηρίστηκε ως τέτοιος) είναι διαφορετικοί από εκείνους που επιδεικνύει ο *S. cerevisiae* (θετικός στο Crabtree), ο οποίος ευνοεί τον ζυμωτικό μεταβολισμό (δυνητικά ζυμωτικός) έναντι της αερόβιας αναπνοής όταν η συγκέντρωση σακχάρου υπερβαίνει τα 10 g/L. Οι non-Saccharomyces, έτσι, έχουν την ικανότητα να εκτρέπουν τον άνθρακα (στην προκειμένη περίπτωση, των σακχάρων του γλεύκους) προς άλλες μεταβολικές οδούς επηρεάζοντας με μειωτική τάση τον σχηματισμό της τελικής απόδοσης αιθανόλης σε ένα αλκοολούχο προϊόν ζύμωσης, την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης, την παραγωγή βιομάζας και τα τελικά υπο και παρα-προϊόντα. Επιπρόσθετα, αυτή η μεταβολική συμπεριφορά μπορεί να αξιοποιηθεί ενισχύοντας τη μείωση των αποδόσεων αιθανόλης μέσω ελεγχόμενης οξυγόνωσης (υπό συνθήκες αερισμού) του εν ζυμώσει γλεύκους, συχνά από αρνητικά κατά Crabtree είδη non-Saccharomyces.

Σύμφωνα με την τρέχουσα γνώση, όπως και με άλλα μεταβολικά χαρακτηριστικά, **η απόδοση αιθανόλης δεν οφείλεται μόνο στο γένος, αλλά συχνά και στο είδος**. Υπάρχει μια ευρεία ποικιλομορφία των ειδών όσον αφορά στην απόδοση αιθανόλης, όπως φαίνεται για άλλα χαρακτηριστικά ζύμωσης. Ορισμένα από αυτά να έχουν τη δυνατότητα να αποδώσουν παρόμοια επίπεδα αιθανόλης (ένα από τα πιο αναλλοίωτα μεταβολικά χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae*) ή και υψηλότερα από το *S. cerevisiae*, αλλά πολλά από αυτά παρουσιάζουν μειωμένες αποδόσεις παραγωγής αιθανόλης, και μέσω επιθυμητών ενώσεων, μπορούν να επηρεάσουν θετικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων (Liguori et al. 2018, Tofalo et al. 2016). Οι άγριες ζύμες non-Saccharomyces, γενικά χαρακτηρίζονται ως μη αιθανολογικοί μικροοργανισμοί μέχρι λιγότερο αποτελεσματικοί από τα στελέχη Saccharomyces (μετατροπή του σακχάρου σε αιθανόλη) και είναι πλέον αποδεδειγμένο, πως πολλά είδη, σε συνδυασμό με *Saccharomyces cerevisiae* παράγουν οίνους μειωμένης συγκέντρωσης αιθανόλης (Canonico et al., 2016, Ciani et al., 2016, Contreras et al., 2014, Contreras et al., 2015, Gobbi et al., 2014, Loira et al., 2014, Quiros et al., 2014).

Αυτή η προσέγγιση για τη μείωση της παραγωγής αιθανόλης αποτελείται από τη χρήση ζύμης non-Saccharomyces σε συνδυασμό με *S. cerevisiae* (διαφορετικοί συνδυασμοί ζυμομυκήτων και ποικιλίας γλευκών), η οποία προτείνεται επιπλέον για τη βελτίωση της ποιότητας και την ενίσχυση της πολυπλοκότητας του οίνου (Jolly et al., 2014) και τη βελτίωση του αρώματος και του προφίλ της γεύσης (Cyan και Comitini, 2015, Jolly et al., 2014, Maturano et al., 2012, Maturano et al., 2015). Τα στελέχη non-Saccharomyces χαρακτηρίζονται και από αυξημένη παραγωγή παραπροϊόντων ζύμωσης (γλυκερόλη, 2,3 - βουτανодиόλη, κ.ά.) από τη διαθέσιμη πηγή υδατάνθρακα (σακχάρου). Πράγματι, το οινολογικό ενδιαφέρον αυτών των μικροοργανισμών προκλήθηκε αρχικά από τη δυνητική θετική συμβολή τους στην ποιοτική οργανοληπτική πολυπλοκότητα των οίνων, μέσω της παραγωγής πτητικών αρωματικών ενώσεων (ή και ενίσχυση τους) και άλλων δραστικών ουσιών, όπως η γλυκερόλη που συμβάλλουν θετικά στην επίδραση της ποιότητας ενός οίνου.

Σε αυτό το πλαίσιο, έντονο αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στη χρήση ελεγχόμενης πολυσύνθετης ζύμωσης χρησιμοποιώντας επιλεγμένες καλλιέργειες στελεχών ζύμης non-Saccharomyces και *S. cerevisiae* (Ciani and Comitini, 2011, Comitini et al., 2011, Domizio et al., 2011, Magyar and Tóth, 2011, Di Maio et al., 2012, Ehsani et al., 2012, Morata et al., 2012, Jolly et al., 2014). Πολλές μελέτες, έχουν ερευνήσει διαφορετικούς συνδυασμούς non-Saccharomyces / *S.cerevisiae* καθώς και με ζύμες *S. non-cerevisiae* για σύγχρονες πρακτικές οινοποίησης, συμπεριλαμβανομένης της επιρροής τους σε διαφορετικές παραμέτρους ποιότητας του οίνου με έμφαση σε χαρακτηριστικά, όπως συμβολή στα πρωτογενή (ποικιλιακά) και δευτερογενή (που παράγονται κατά τη ζύμωση) αρώματα, την οξύτητα, καθώς και στη διαμόρφωση συγκεκριμένων στυλ οίνων (όπως παραδοσιακά αφρώδη). Αν και οι ζυμομυκήτες non-Saccharomyces και *S. non-cerevisiae* μελετώνται (αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών εκκινητών) και επιλέγονται για τα συγκεκριμένα οινολογικά χαρακτηριστικά τους, αποτελεί πρόκληση για ορισμένους από αυτούς να πραγματοποιήσουν πλήρη ζύμωση σε ένα επιθυμητό επίπεδο ξηρότητας. Αυτό είναι πολύ σημαντικό για τους οινοποιούς, εν μέρει επειδή τα τελικά οινικά προϊόντα με υψηλότερα επίπεδα υπολειμματικών σακχάρων άνω των 0,5 g/L απαιτούν υψηλές δόσεις διοξειδίου του θείου (SO₂) για να διασφαλιστεί η μικροβιακή τους σταθερότητα για την πρόληψη της αλλοίωσης του οίνου. Επομένως, εμβολιασμοί non-Saccharomyces / *S. non-cerevisiae* σε μικτές καλλιέργειες με μεταγενέστερη προσθήκη στελέχους *S. cerevisiae*, καθίσταται απαραίτητη λόγω της μεγάλης ζυμωτικής

του ισχύς, διότι οι ζυμομύκητες non-Saccharomyces δεν είναι σε θέση να ολοκληρώσουν τη ζύμωση (μέχρι ξηρότητας) (Liguori et al.2018).

Η στροφή προς αυτού του νέου τύπου στρατηγική οινοποίησης με τη χρήση επιλεγμένων μικτών καλλιιεργειών πιστεύεται ότι είναι το **κλειδί για την παραγωγή οίνων με επιθυμητά χαρακτηριστικά** που ικανοποιούν τις μεταβαλλόμενες απαιτήσεις της αγοράς. **Η αλκοολική ζύμωση προτείνεται να πραγματοποιείται με τη χρήση non-Saccharomyces ως εκκινήτες ζύμωσης μέσω, είτε διαδοχικού, είτε ταυτόχρονου διπλού εμβολιασμού εκκίνησης (συνεμβολιασμός),** η οποία διεξάγεται με δύο διαφορετικές μεθόδους εμβολιασμού: (1) συν-εμβολιασμός, ο οποίος περιλαμβάνει ταυτόχρονα εμβολιασμούς non-Saccharomyces / S. non-cerevisiae σε υψηλή συγκέντρωση κυττάρων (π.χ. 10^7 κύτταρα/mL) με S. cerevisiae και / ή (2) διαδοχικός εμβολιασμός, ο οποίος περιλαμβάνει εμβολιασμό non-Saccharomyces (ή S. non-cerevisiae) για να ξεκινήσει η ζύμωση και να συνεχιστεί για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα, με ακόλουθο εμβολιασμό S. cerevisiae, ώστε να ολοκληρωθεί. Οι διαδοχικοί εμβολιασμοί, με αρχική απουσία S. cerevisiae, επιτρέπουν τη μεγιστοποίηση του πολλαπλασιασμού και της μεταβολικής συμβολής των non-Saccharomyces (Ciani et al. 2016, Maturano et al. 2019). Η χρονική περίοδος (ο ενδιάμεσος χρόνος καθυστέρησης κυμαίνεται γενικά μεταξύ 1 και 3 ημερών) πριν από τη διεξαγωγή του διαδοχικού εμβολιασμού S. cerevisiae και ο λόγος εμβολίου Saccharomyces / non-Saccharomyces (ή Saccharomyces non-cerevisiae) είναι και οι δύο σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν την κινητική της ζύμωσης και τα οινολογικά αποτελέσματα. Οι ζύμες non-Saccharomyces θεωρούνται υπεύθυνες για ατελείς ζυμώσεις (και κατά συνέπεια υψηλά επίπεδα υπολειμματικών σακχάρων στον οίνο) και παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων **οξικού οξέος και οξικού αιθυλεστέρα, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα διττά και αντίρροπα αποτελέσματα.** Ωστόσο, είναι σημαντικές για τους οινοποιούς, ιδιαίτερα όταν στοχεύουν σε παραγωγή οίνων με μοναδικούς ποιοτικούς οργανοληπτικά χαρακτήρες ευρέως αναγνωρισμένοι ως ποικιλιακοί, δηλαδή χαρακτηριστικοί της γεωγραφικής καταγωγής ή ποικιλίας, σε αντίθεση με την περιορισμένη πολυπλοκότητα που αποδίδεται σε οίνους που έχουν υποστεί ζύμωση με στελέχη εκκίνησης S. cerevisiae (Ciani et al., 2006, 2010, Jolly et al., 2006). Αυτές οι ζύμες είναι επίσης δημοφιλείς, όπως προαναφέρθηκε, στους οινοποιούς που επιλέγουν να παράγουν λιγότερο αλκοολούχους οίνους.

Τέλος, την προσοχή των βιοτεχνολόγων του οίνου έχει προσελκύσει μια πολύπλοκη, αλλά πολύ σημαντική πτυχή που περιλαμβάνει τις **φυσιολογικές και οικολογικές αλληλεπιδράσεις** μεταξύ των κυττάρων των καλλιιεργειών εκκίνησης, και αυτών των γηγενών μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων ανταγωνισμών, ανταλλαγών μεταβολιτών και παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών έως και ευρέως φάσματος. Όλα αυτά τα φαινόμενα έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν το επίπεδο αλκοόλ και τη συνολική ποιότητα των παραγόμενων οίνων. **Η ποικιλομορφία της ζύμης πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη, τόσο στο σχεδιασμό των πειραμάτων οινοποίησης, όσο και για την εξαγωγή γενικών συμπερασμάτων, για αυτό και προτιμώνται ζύμες, οι οποίες διαθέτουν παράγοντα «killer» και μπορούν να κυριαρχήσουν ως πληθυσμός έναντι των υπολοίπων, ώστε να υπάρχει έλεγχος, περιορισμός έως και θανάτωση της ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας του γλεύκους που μπορεί να υπεύθυνη για αλλοιώσεις** (Oro et al., 2014, 2016).

Κατά γενικό κανόνα, οι ερευνητικές μελέτες που αφορούν τις ζύμες οινοποίησης non-Saccharomyces, δίνουν έμφαση στην **αποφυγή παραγωγής ανεπιθύμητων μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένου του οξικού οξέος,** το οποίο έχει αναγνωριστεί ως σοβαρό μειονέκτημα, ειδικά όσον αφορά στις στρατηγικές που βασίζονται στον οξειδωτικό μεταβολισμό ή για ορισμένα στελέχη ζύμης. Για την αξιολόγηση του αντίκτυπου νέων στελεχών / ειδών ζύμης και νέων οινολογικών πρακτικών στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των οίνων, απαιτούνται πειράματα με χρήση φυσικού γλεύκους σταφυλιών είτε με τον διαδοχικό είτε ταυτόχρονο εμβολιασμό των S. cerevisiae και non-Saccharomyces αρχικών καλλιιεργειών. Η σκοπιμότητα, σε βιομηχανικό επίπεδο, της χρήσης ζυμών non-Saccharomyces για τη μείωση των επιπέδων αλκοόλης στον οίνο απαιτεί βελτιωμένη κατανόηση του μεταβολισμού αυτών των εναλλακτικών ειδών ζύμης κατά τη ζύμωση του γλεύκους, η οποία επιβάλλεται να ακολουθείται από χημική ανάλυση του αρωματικού προφίλ, με τη μελέτη να ολοκληρώνεται με οργανοληπτικό έλεγχο. Μια τέτοιου είδους προσπάθεια λαμβάνει χώρα στην παρούσα ερευνητική μελέτη. Μια λίγο διαφορετική προσέγγιση είναι η εισαγωγή μικτού εμβολιασμού εκκίνησης, όπου στις συνήθεις πρακτικές οινοποίησης απαιτεί καλύτερο έλεγχο των παραμέτρων ζύμωσης, προσαρμοσμένες σε κάθε συγκεκριμένο συνδυασμό εκκινήτων, οι οποίοι σίγουρα θα πρέπει να είναι συμβατοί μεταξύ τους και να μην ανταγωνίζονται στο περιβάλλον ανάπτυξης.

Σε κάθε περίπτωση διαδοχικού εμβολιασμού, ορισμένες σημαντικές παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι η **εκάστοτε ποικιλία σταφυλιών, η συγκέντρωση θειώδους οξέος, η θερμοκρασία, η ρύθμιση του pH, η ποσότητα του εμβολίου (και ο ενδιάμεσος χρόνος καθυστέρησης, για τον διαδοχικό εμβολιασμό), η διατροφή της ζύμης, και τέλος, τα επίπεδα οξυγόνωσης (αερισμός) και ο χρόνος, μεταξύ άλλων παραμέτρων. Προκειμένου να ληφθούν αποφάσεις με βάση τη γνώση σε αυτόν τον τομέα, απαιτείται περαιτέρω έρευνα.** Η ανάπτυξη βιομηχανικών διεργασιών ζύμωσης που βασίζονται σε μια τέτοια προσέγγιση απαιτεί, μεταξύ άλλων σταδίων, τον εντοπισμό ικανών και κατάλληλων στελεχών.

Στο Οινοποιείο της Αγάπης

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
ABSTRACT.....	v
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	viii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	ix
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	1

ΓΕΝΙΚΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....9

1.1 ΑΜΠΕΛΟΣ- ΓΛΕΥΚΟΣ – ΟΙΝΟΣ.....9

1.1.1 ΟΙΝΙΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ.....	10
1.1.2 ΑΜΠΕΛΟΣ.....	10
1.1.3 ΣΤΑΦΥΛΗ.....	10
1.1.4 ΣΥΣΤΑΣΗ ΓΛΕΥΚΟΥΣ.....	11
1.1.5 ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ.....	11
Τα Οργανικά Οξέα.....	13
Εξέλιξη των κυριότερων οργανικών οξέων του γλεύκους στη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.....	14
Τα Σάκχαρα.....	15
1.1.6 ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ.....	16

1.2 ΟΙΝΟΠΟΙΗΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΛΕΥΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ -ΓΛΕΥΚΟΠΟΙΗΣΗ.....18

1.2.1 ΚΛΑΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΛΕΥΚΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	19
1.2.2 ΠΡΟΖΥΜΩΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ.....	21
1.2.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΚΛΑΣΙΚΗΣ ΛΕΥΚΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΖΥΜΩΤΙΚΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	22
1.2.4 ΘΕΙΩΔΗΣ ΑΝΥΔΡΙΤΗΣ.....	23
Οι κύριες ιδιότητες του θειώδη ανυδρίτη.....	24
Δοσολογία του θειώδη ανυδρίτη.....	24
Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα του Θειώδη Ανυδρίτη.....	25
Παραγωγή θειώδους (SO ₂) από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.....	26
1.2.5 ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΚΤΥΠΟ ΣΤΙΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	27

1.3 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ.....28

1.3.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	29
1.3.2 ΑΤΡ.....	29
1.3.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ: ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ - ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΖΥΜΩΣΕΩΝ.....	30
1.3.3.1 ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ – ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	30

1.3.3.1.1 ΚΑΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (EMP).....	30
1.3.3.1.2 ΚΑΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ ENTNER-DOUDOROFF.....	32
1.3.3.2 ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΟΥ ΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	33
1.3.3.2.1 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	34
1.3.3.2.2 ΓΛΥΚΕΡΟΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	35
1.3.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ.....	37
1.3.4.1 Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (ΤΡΙΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ/ KRBS/TCA).....	37
Περιγραφή του κύκλου Krebs.....	39
1.3.4.2 ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΠΕΝΤΟΖΩΝ.....	40
1.3.5 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΥΛΙΩΣΗ.....	41
1.3.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΖΥΜΩΝ–ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ..	41
1.3.6.1 ΖΥΜΩΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ.....	41
1.3.6.1.1 ΑΙΘΑΝΟΛΗ.....	42
1.3.6.2 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ.....	44
1.3.6.2.1 ΥΠΟΠΡΟΙΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ.....	44
Α. ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ.....	44
Β. ΖΥΜΕΛΛΑΙΑ.....	46
C. ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ.....	46
D. ΑΛΛΑ ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΑ.....	46
1.3.7 ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	47
1.3.7.1 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ CRABTREE.....	47
1.3.7.2 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ PASTEUR.....	48
1.3.7.3 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ «ΣΥΝΘΕΣΗΣ – ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ – ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ» ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ (Make – Accumulate – Consume Life strategy).....	49
1.3.8 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΛΙΠΟΣ.....	49
1.4 ΖΥΜΕΣ.....	50
1.4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΖΥΜΩΝ.....	50
1.4.2 ΣΧΕΣΗ ΖΥΜΩΝ ΜΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΑΙ ΡΗ.....	50
1.4.3 ΤΡΟΠΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΖΥΜΩΝ.....	51
1.4.4 ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΥΚΛΟΥ ΖΩΗΣ ΖΥΜΩΝ (ΒΙΟΚΙΝΗΤΙΚΗ).....	51
1.4.4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΙΔΙΚΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ.....	54
1.4.4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΜΑΖΑΣ.....	55
1.4.5 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ - ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ.....	55
1.4.5.1 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΖΥΜΩΣΗΣ.....	56
1.4.5.2 ΡΗ.....	56
1.4.5.3 ΧΗΜΙΚΟΙ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΠΟΙΗΤΕΣ.....	57
1.4.5.4 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.....	57
1.4.5.5 ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	57

1.4.5.5.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	59
1.4.6 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΖΥΜΩΝ – ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....	60
1.4.6.1 ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ.....	60
1.4.6.2 ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ.....	61
1.4.6.3 ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΣΕ ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....	62
1.4.6.4 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	62
1.4.6.4.1 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	63
1.4.7 Η ΦΥΣΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΚΑΙ ΟΙΝΟΠΟΙΕΙΟΥ.....	63
1.4.7.1 Η ΚΥΡΙΑΡΧΙΑ ΤΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ.....	65
1.4.7.2 ΑΥΘΟΡΜΗΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΓΛΕΥΚΟΥΣ.....	65
1.4.7.3 ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΥΤΟΜΑΤΗ ΣΤΗΝ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΓΛΕΥΚΟΥΣ.....	66
1.4.8 ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	67
1.4.8.1 ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗ ΖΥΜΗ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	68
1.4.8.2 ΣΤΑΔΙΑ ΧΡΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗΣ ΖΥΜΗΣ ΣΕ ΟΙΝΟΠΟΙΕΙΟ.....	69
1.4.8.2.1 ΕΝΑΡΚΤΗΡΙΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΝ.....	70
Α. ΕΝΕΡΓΗ ΞΗΡΗ ΖΥΜΗ.....	70
Β. ΥΓΡΟΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	71
1.4.8.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗΣ ΖΥΜΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	71
1.4.8.3.1 ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΑΛΚΟΟΛΗ.....	73
1.4.8.3.2 ΖΥΜΩΤΙΚΗ ΙΣΧΥΣ.....	74
1.4.8.3.3 ΤΟΞΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ «KILLER».....	74
1.4.8.3.4 ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΟ ΘΕΙΩΔΕΣ ΟΞΥ (SO ₂).....	74
1.4.8.3.4.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ SO ₂ ΑΠΟ ΤΙΣ ΖΥΜΕΣ (ΖΥΜΩΣΗ ΜΗ ΘΕΙΩΜΕΝΟΥ ΟΙΝΟΓΛΕΥΚΟΥΣ).....	75
1.4.8.3.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ – ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΔΡΟΘΕΙΟΥ.....	76
1.4.8.3.6 ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ ΖΥΜΩΣΗΣ.....	76
1.4.9 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ	76
1.4.9.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ.....	77
1.4.9.2 ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	77
1.4.9.3 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΘΑΝΑΤΩΣΗΣ.....	78
1.4.9.4 ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ.....	78
1.4.10 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΕΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ.....	79
Α. «ΚΟΛΛΗΜΕΝΕΣ» Η ΥΠΟΤΟΝΙΚΕΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ.....	79
Β. ΠΑΡΑΓΩΓΗ OFF-ΧΑΡΑΚΤΗΡΩΝ.....	81
1.5 ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	82
1.5.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΡΩΜΑΤΩΝ.....	82
1.5.1.1 ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ ΟΙΝΟΥ.....	83
1.5.1.1.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	

ΠΟΥ ΔΙΑΜΟΡΦΩΝΟΥΝ ΤΟ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ	83
A. ΤΕΡΠΕΝΙΑ.....	84
B. ΠΑΡΑΓΩΓΑ C13-ΝΟΡΙΣΟΠΡΕΝΟΕΙΔΩΝ.....	86
C. ΚΕΤΟΝΕΣ.....	87
D. ΑΛΚΟΟΛΕΣ.....	88
E. ΓΛΥΚΟΖΙΤΕΣ ΟΣΜΗΡΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	88
F. ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΕΣ.....	89
G. ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	90
H. ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΘΕΙΟΛΕΣ.....	90
1.5.1.1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΣΤΟ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ.....	91
A. ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ.....	91
B. ΚΛΙΜΑ.....	92
C. ΕΔΑΦΟΣ.....	92
D. TERROIR.....	93
1.5.2 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ ΟΙΝΟΥ.....	93
A. ΑΙΘΑΝΟΛΗ.....	93
B. ΑΝΩΤΕΡΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ.....	93
C. ΠΤΗΤΙΚΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ.....	96
D. ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	96
E. ΕΣΤΕΡΕΣ.....	97
F. ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	100
G. ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	102
H. ΑΛΔΕΥΔΕΣ.....	103
I. ΑΚΕΤΑΛΕΣ.....	104
J. ΛΑΚΤΟΝΕΣ/ ΦΟΥΡΑΝΟΝΕΣ.....	104
K. ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	104
L. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ.....	104
1.5.3 ΤΡΙΤΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ ΟΙΝΟΥ.....	105
1.6. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	106
1.6.1 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ.....	107
1.6.1.1 ΤΟ ΠΟΤΗΡΙ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ.....	107
1.6.1.2 ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	108
1.6.1.3 ΟΙ ΔΟΚΙΜΑΣΤΕΣ.....	108
1.6.1.4 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΕ ΕΝΤΥΠΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ.....	109
1.6.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΎΨΗΣ.....	110
1.6.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ.....	111
1.6.3.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΡΩΜΑΤΩΝ ΟΙΝΩΝ.....	113
1.6.3.2 ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	114
1.6.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΓΕΥΣΗΣ.....	116
1.6.5 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ.....	119

1.6.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ: ΤΕΣΤ.....	119
1.6.6.1 Η ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ.....	122

2. ΕΙΔΙΚΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....123

2.1 ΠΟΙΚΙΛΙΑ «ΑΣΥΡΤΙΚΟ».....123

2.1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΜΠΕΛΩΝΑΣ Γ.Π.Α.....	123
2.1.2 ΑΜΠΕΛΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ, ΦΑΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ, ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	124
2.1.3 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ.....	125
2.1.4 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	126
2.1.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ – ΤΥΠΟΙ ΟΙΝΩΝ.....	127

2.2 ΕΠΙΛΕΚΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ.....128

2.2.1 <i>METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA</i>	129
2.2.2 ΤΑΞΗ <i>SACCHAROMYCETALES</i>	134
2.2.2.1 <i>HANSENIASPORA UVARUM</i>	136
2.2.2.2 <i>HANSENIASPORA GUILLIERMONDII</i>	137
2.2.2.3 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE RHONE</i>	138

2.3 ΓΕΝΙΚΗ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΥΠΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΣΥΡΤΙΚΟΥ.....139

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....142

3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	142
3.1.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	142
3.1.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	145
3.1.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	146
3.1.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	146
3.1.3.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΥΡΙΩΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	147
3.1.3.3 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΜΕ ΘΕΡΜΑΝΣΗ.....	148
3.1.4 ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΣΗΜΕΙΟΥ.....	149
3.1.4.1 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	149
3.1.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΡΗ ΣΤΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ.....	150
3.1.4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΑΣΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ.....	150
3.1.4.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ.....	151
3.1.5 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ.....	152
3.1.5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (IPS).....	152
3.1.5.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ.....	153
3.1.5.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΝΑΓΟΝΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ-D.N.S.....	153
3.1.5.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ, ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ HPLC.....	154
3.1.5.5 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΣΩ GC-MS	156
3.1.6 ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	157
3.1.6.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ.....	157
3.1.6.1.1 ΜΕ ΔΙΑΘΛΑΣΙΜΕΤΡΙΑ.....	157
3.1.6.1.2 ΜΕ ΑΡΑΙΟΜΕΤΡΙΑ.....	157
3.1.6.2 ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	158
3.1.6.2.1 ΡΗ - ΕΝΕΡΓΟΣ ΟΞΥΤΗΤΑ.....	158
3.1.6.2.2 ΟΛΙΚΗ / ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΟΞΥΤΗΤΑ.....	158
3.1.6.2.3 ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ.....	158
3.1.6.2.4 ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ.....	159
3.1.6.2.5 ΑΝΑΓΟΝΤΑ ΣΑΚΧΑΡΑ.....	160
3.1.6.2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΚΑΙ ΟΛΙΚΟΥ SO ₂	161
3.1.7 ΜΙΚΡΟΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	162
3.1.7.1 ΓΛΕΥΚΟΣ.....	162
3.1.7.1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ.....	162
3.1.7.1.2 ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ	162
3.1.7.2 ΕΜΒΟΛΙΟ.....	163
3.1.7.2.1 ΘΡΕΨΗ.....	163
3.1.7.2.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	163
3.1.7.3 Α' ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ	164
3.1.7.4 Β' ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ.....	165

3.1.7.5 Γ' ΚΑΙ Δ' ΚΥΚΛΟΙ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ - ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΚΑΙ ΜΗ.....	166
3.1.7.6 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΙΝΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ.....	169
3.1.8 ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΡΩΜΑΤΟΣ.....	170
3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	172
3.2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	172
3.2.1.1 <i>METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA LFMB 1</i>	172
3.2.1.2 <i>HANSENIASPORA UVARUM OSTIBFW1</i>	176
3.2.1.3 <i>HANSENIASPORA GUILLIERMONDII OSP1BFW12</i>	180
3.2.1.4 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE RHONE</i>	184
3.2.2 ΗPLC ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΙΝΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΓΛΕΥΚΟΥΣ.....	186
3.2.2.1 Α' ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: ΕΜΒΟΛΙΟ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΕ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ.....	186
3.2.2.2 Β' ΚΥΚΛΟΣ: ΕΜΒΟΛΙΟ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ NON-SACCHAROMYCES ΣΕ ΜΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ.....	194
3.2.2.3 Γ' ΚΑΙ Δ' ΚΥΚΛΟΙ: ΔΙΑΔΟΧΙΚΟΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ NON-SACCHAROMYCES/ <i>S. CEREVISIAE</i> - ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΚΑΙ ΜΗ.....	197
3.2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΟΙΝΩΝ ΜΕ GC-MS.....	207
3.2.3.1 ΑΛΚΟΟΛΕΣ.....	208
3.2.3.2 ΕΣΤΕΡΕΣ.....	215
3.2.3.3 ΤΕΡΠΕΝΙΑ.....	223
3.2.3.4 ΚΕΤΟΝΕΣ.....	226
3.2.3.5 ΑΛΔΕΥΔΕΣ.....	229
3.2.3.6 ΟΞΕΑ.....	231
3.2.3.7 ΑΛΛΕΣ ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	234
3.2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΟΙΝΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ.....	235
3.2.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ.....	237

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	241
4.1 ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ – ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	241
4.1.1 ΟΛΙΚΟ ΠΑΡΑΧΘΕΝ SO ₂ ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	242
4.2 ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΟΙΝΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ ΥΠΟ ΑΣΗΠΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΕ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ ΚΑΙ ΜΗ.....	242
4.2.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΖΥΜΩΝ, ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ.....	242
1. Α΄ ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: ΣΤΟ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ.....	243
2. Β΄ ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: ΣΤΟ ΜΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ.....	249
3. Γ΄ ΚΑΙ Δ΄ ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: ΔΙΑΔΟΧΙΚΟΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΣΕ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ ΚΑΙ ΜΗ - ΑΝΤΙΠΑΡΑΒΟΛΗ ΜΕ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	254
4. ΣΥΓΚΡΙΣΕΙΣ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ.....	260
Α. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ.....	260
Β. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ – ΣΑΚΧΑΡΩΝ.....	263
Γ. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ.....	265
Δ. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ.....	267
Ε. ΣΥΓΚΡΙΣΕΙΣ ΜΕΙΩΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΣΕ ΓΛΕΥΚΗ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ.....	271
ΣΤ. ΜΕΙΩΣΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΜΕ ΣΥΝΑΚΟΛΟΥΘΗ ΑΥΞΗΣΗ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ.....	276
4.2.2 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΟΙΝΟΥΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ.....	284
4.2.2.1 ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΣΥΓΚΡΙΣΕΩΝ ΤΩΝ ΔΥΟ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ.....	292
4.2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ.....	296
4.2.4 ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ.....	300
4.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	303
4.3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	303
4.3.2 ΕΙΔΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	304
4.3.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΡΙΟ ΣΤΟΧΟ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ.....	311
4.3.4 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	314
4.3.5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	315
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	316
5.1 ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	316
5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	318
5.3 ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΟΙ ΤΟΠΟΙ.....	341

1. ΓΕΝΙΚΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΑΜΠΕΛΟΣ- ΓΛΕΥΚΟΣ – ΟΙΝΟΣ

Ο οίνος θεωρείται ένα από τα πλέον αγαπημένα προϊόντα της γεωργικής παραγωγής. Η καλλιέργεια της αμπέλου, πιο συγκεκριμένα της αμπέλου Οινοφόρου (*Vitis vinifera*), έχει τις ρίζες της στα βάθη των αιώνων. Στην ελληνική ιστορία, η παρουσία του οίνου είναι συνεχής. Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, η αμπελοργία ξεκίνησε από την Ανατολή γύρω στο 5000 π.Χ., ενώ στη Ελλάδα εμφανίστηκε το 4000 π.Χ. Οι Έλληνες, οι οποίοι διέπρεψαν στην οινοποιία, μονοπωλώντας σχεδόν την αγορά για αιώνες, γνώρισαν τον οίνο πιθανότατα πριν το 1700 π.Χ., ενώ κάποιοι ερευνητές ισχυρίζονται πως το πρώτο ίχνος οίνου στην Ελλάδα χρονολογείται μεταξύ του 6^{ου} και του 5^{ου} π.Χ. αιώνα (Hames G., 2012). Η χρήση του οίνου στην καθημερινή διατροφή εξελίχθηκε σε επιστήμη στην αρχαία Ελλάδα και συνόδευε κάθε θρησκευτική, κοινωνική και πολιτιστική εκδήλωση (Παληγοιάννη, 2017). Οικονομικοί, πολιτικοί και κοινωνικοί παράγοντες έχουν επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην κουλτούρα και την κατανάλωση αλοόλ τα τελευταία 50 χρόνια. Επιπλέον, οι αλλαγές στη βιομηχανία οίνου είχαν σημαντικό αντίκτυπο στον τρόπο με τον οποίο εξελίχθηκαν οι απόψεις των καταναλωτών σχετικά με την ποιότητα του οίνου και τα βασικά χαρακτηριστικά του (Beccaria & Pretto, 2021), καθώς σημαντικός είναι ο ρόλος της περιβαλλοντικής αλλαγής στην παραγωγή (Tiefenbacher & Townsend, 2019). Η ιστορία της σύγχρονης ελληνικής οινοπαραγωγής και η ανάπτυξη του εμφιαλωμένου οίνου στην Ελλάδα ξεκινά τα πενήντα τελευταία χρόνια, τη δεκαετία του 1960. Τότε αρχίζουν να γίνονται και οι πρώτες σοβαρές επενδύσεις σε εγκαταστάσεις και μηχανολογικό εξοπλισμό με αποτέλεσμα τη θεαματική βελτίωση των ελληνικών οίνων σε ότι αφορούσε την τεχνολογία. Παράλληλα, γίνεται και μερική ανασύσταση αμπελώνων με φύτευση εκλεκτών ποικιλιών οινάμπελου βάσει αξιολογήσεων που πραγματοποιήθηκαν από το Ινστιτούτο Οίνου, ενώ ήδη από την πρώτη δεκαετία θεσμοθετούνται οι περιοχές για την παραγωγή οίνων Ονομασίας Προελεύσεως από το Υπουργείο Γεωργίας (Marnie Old, 2015). Σημαντικό ρόλο έπαιξε φυσικά και ο ανθρώπινος παράγοντας, οι Έλληνες οινολόγοι που μετέφεραν τις επιστημονικές τους γνώσεις στην παραγωγή, αλλά και οι ίδιοι οι οινοπαραγωγοί, οι οποίοι έδειξαν να ευαισθητοποιούνται απέναντι στις νέες πραγματικότητες που διαμορφώνονταν. Το γεγονός ότι η ανάκαμψη συντελέστηκε μέσα στις τελευταίες δεκαετίες δείχνει όλο το δυναμισμό του αμπελοοινικού τομέα ως κλάδου της γεωργικής οικονομίας (Αναγνωστάκης, 1995). Ο κόσμος του οίνου οφείλει στην αρχαία, αλλά και τη μεταγενέστερη Ελλάδα τη συμβολή της στην ιστορική ανάδειξη του σε «έργο τέχνης» και σε φορέα πολιτισμού. Της οφείλει, επίσης, τη συστηματοποίηση του τρόπου της αμπελοκαλλιέργειας, μοναδικές τεχνικές οινοποίησης, καθώς και τη δημιουργία οίνων από διαφορετικές ποικιλίες, τύπους, ονομασίες προέλευσης κ.ά. Όλα όσα έθεσαν τα θεμέλια της παγκόσμιας αμπελοοινικής κουλτούρας, την οποία απολαμβάνουν οι σύγχρονοι οινόφιλοι (Marnie Old, 2015).

Στις ημέρες μας, η εγχώρια παραγωγή είναι κατακερματισμένη μεταξύ πλήθους οινοποιητικών μονάδων, με διαφορά δυναμικότητας. Στην πλειοψηφία, πρόκειται για παραγωγικές μονάδες που ασχολούνται αποκλειστικά με την οινοποίηση. Οι μεγάλες οινοβιομηχανίες αν και ολιγάριθμες, καλύπτουν σημαντικό μέρος της παραγωγής, διαθέτοντας στην πλειοψηφία τους σύγχρονες εγκαταστάσεις και ποικιλία προϊόντων, την οποία ενίοτε συμπληρώνουν με ορισμένα εισαγόμενα. Σύμφωνα με τα τελευταία δημοσιευμένα στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης υπάρχει, δυστυχώς, μια μεγάλη πτωτική τάση στον κλάδο της νόμιμης οινοπαραγωγής τα τελευταία 30 έτη, καθώς η παραγωγή τότε υπολογιζόταν στα 5.025.000 hL Το 2013 η παραγωγή άγγιξε τα 3.343.330 hL, ενώ την περίοδο 2015-2016, με συνεχιζόμενη μείωση, διαφαίνεται από επίσημα στοιχεία ότι η συνολική παραγωγή οίνου στην Ελλάδα ανερχόταν στα 2.501.100 hL, δηλαδή στο μισό της παραγωγής προ τριαντακονταετίας.

Τα παράπάνω στοιχεία δεν είναι διόλου ενθαρρυντικά, μιας και η Ελλάδα έχει μακράιωνη ιστορία στην οινοποίηση και δυστυχώς φαίνεται πως χάνει διαρκώς έδαφος σε αυτόν τον τομέα, καθώς η παραγωγή της συρρικνώνεται χρόνο με το χρόνο. Προκειμένου να γίνουν τα οινικά προϊόντα πιο ανταγωνιστικά και θελκτικά σε σχέση με αυτά του εξωτερικού, ώστε να αυξηθεί ζήτηση, η οποία θα δώσει την απαραίτητη ώθηση στον τομέα, η εγχώρια, αλλά και η διεθνής με τη μοφή εξαγωγών, αποτελεί αδήριτη ανάγκη να ακολουθηθούν οι νέες τάσεις που διαμορφώνονται και υπαγορεύονται από τη παγκόσμια αγορά.

Η άνοδος αυτή θα επιτευχθεί κυρίως με την στροφή στις εγχώριες ποικιλίες και την παραγωγή οίνων με χαμηλό αλκοολικό τίτλο, αλλά πλούσιο άρωμα. Οι ελληνικοί οίνοι για να ανταπεξέλθουν στις προσδοκίες/ προδιαγραφές και να ανέλθουν στις προτιμήσεις των καταναλωτών στρέφονται προς την ανάδειξη των ελληνικών ποικιλιών σταφυλής και τη χρήση γηγενών άγριων ζυμών non-Saccharomyces, είτε κατ' αποκλειστικότητα, είτε σε συνδυασμό με εμπορικά σκευάσματα ζυμών. Αυτή η κίνηση, σε συνδυασμό με τα ελληνικά αμπελοτόπια (ορεινά ή παραθαλάσσια), το λεγόμενο terroir, αποτελεί μια άλλη σημαντική ποιοτική παράμετρο που ενισχύει τη μοναδικότητα του οίνου, ως μία σύνθετη έννοια που περιλαμβάνει τόσο το έδαφος, το μικρο- και μακροκλίμα, καθώς και την επιλογή του κατάλληλου ιθαγενούς στελέχους ζύμης με σκοπό την ανάδειξη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της εκάστοτε ποικιλίας.

1.1.1 ΟΙΝΙΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, οίνος καλείται το ποτό που προέρχεται αποκλειστικά από ολική ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλών ή γλεύκους εκ νωπών σταφυλών (Νόμος 396/76 ΦΕΚ 198/Α/31-7-1976). Ο ίδιος ορισμός με κάποιες διευκρινήσεις δίνεται στην νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης: Οίνος ή κρασί καλείται το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με αλκοολική ζύμωση, ολική ή μερική, νωπών σταφυλιών, σπασμένων ή όχι, ή γλεύκους σταφυλιών (Κανονισμός (Ε.Ο.Κ.) 822/87, Παράρτημα Ι. Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων L 84/27-3-1987)

Από αυτές τις νομοθεσίες, την εθνική και την ευρωπαϊκή, δίνονται επίσης οι ορισμοί των νωπών σταφυλιών και του γλεύκους σταφυλιών. Οι κοινοτικοί ορισμοί έχουν ως εξής:

Νωπά σταφύλια: ο καρπός της αμπέλου που χρησιμοποιείται στην οινοποίηση, ώριμος ή έστω ελαφρά ηλιασμένος, που μπορεί να σπαστεί με τα συνήθη μέσα του οινοποιείου και να υποστεί μόνος του αλκοολική ζύμωση.

Γλεύκος ή μούστος σταφυλιών: το υγρό προϊόν που λαμβάνεται φυσικώς ή με φυσικές επεξεργασίες από νωπά σταφύλια. Το γλεύκος μετά την παραλαβή του από τις σταφυλές αποτελεί ένα υγρό θόλο, η πυκνότητα του οποίου κυμαίνεται μεταξύ 1,050 έως 1,130 ή πολλές φορές και περισσότερο.

Αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο: Αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο ενός οινικού προϊόντος καλείται ο αριθμός των λίτρων άνυδρης αιθυλικής αλκοόλης που περιέχεται σε 100 λίτρα του προϊόντος αυτού, όταν οι δύο όγκοι ογκομετρούνται σε θερμοκρασία 20 °C. Πρόκειται για το μέγεθος εκείνο που παλαιότερα καλούνταν αλκοολικός βαθμός. Έτσι, ένας οίνος που είχε π.χ. 12 ο αλκοολικούς βαθμούς, σήμερα λέμε ότι έχει αλκοολικό τίτλο 12 % vol.

1.1.2 ΑΜΠΕΛΟΣ

Ο κόσμος του οίνου είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος, αλλά συγχρόνως και ιδιαίτερα απλός, σε όποιον προσπαθήσει να μνηθεί στα μυστικά του. Υπάρχουν πολλά είδη κληματαριάς που είναι γνωστά σε όλο τον κόσμο, αλλά το κρασί φτιάχνεται από ένα είδος που ονομάζεται *Vitis vinifera*, το οποίο προέρχεται από την Ευρασία (Marnie Old, 2015). Η άμπελος (*Vitis vinifera*) ανήκει στην οικογένεια των Αμπελίδων (*Ampelidae*, *Vitaceae* ή *Ampelidaceae*). Ο αριθμός των ειδών του γένους *Vitis* κυμαίνεται γύρω στα πενήντα. Από τα είδη αυτά, 35 ανήκουν στα «βορειοαμερικανικά» αμπέλια, 15 στα είδη της Ανατολικής Ασίας κι ένα είδος, αυτό με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, το *vinifera*, στην Ευρώπη. Το είδος *Vitis vinifera*, η άμπελος η οινοφόρος, είναι η ονομαζόμενη, Ευρωπαϊκή Άμπελος, περιλαμβάνει περίπου 6.000 ποικιλίες. Το σύνολο σχεδόν των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου ανήκουν στο είδος αυτό. Ανάλογα με τον προορισμό της κάθε ποικιλίας αυτές διακρίνονται σε ποικιλίες για οινοποίηση, για επιτραπέζια χρήση, για σταφιδοποιία και τέλος, ποικιλίες που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα της ευρωπαϊκής αμπέλου για την αντιμετώπιση της φυλλοξήρας.

1.1.3 ΣΤΑΦΥΛΗ

Η σταφυλή προέρχεται από την ταξιανθία της αμπέλου, η οποία είναι φόβη πυκνή, θυρσός και ανήκει στους βότρες. Η σταφυλή αποτελείται από το ξυλώδες μέρος, το βόστρυχο (τσαμπί ή κοτσάνι), το οποίο αποτελεί το σκελετό της με τη μορφή ενός κεντρικού άξονα που διακλαδίζεται σε επιμέρους δεύτερης και τρίτης τάξης στην άκρη των οποίων υπάρχουν ποδίσκοι, πάνω στους οποίους στηρίζονται οι ράγες, το εδάωμο και οινοποιήσιμο τμήμα της σταφυλής. Η ράγα αποτελείται από το φλοιό, το σαρκώδες μέρος ή σάρκα και τα γίγαρτα. Το μέγεθος και το σχήμα των σταφυλιών διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία. Ακολουθεί η περιγραφή της σταφυλής από μέσα προς τα έξω. Αρχικά, το γίγαρτο, κοινώς κουκούτσι είναι ο σπόρος της αμπέλου και βρίσκεται στο ενδοκάρπιο. Κατά την οινοποίηση θα πρέπει να αποφεύγεται η θραύση των γιγάρτων, γιατί αλλιώς συμβαίνει διάχυση των ελαιωδών ουσιών και τανινών που εμπεριέχονται στα γίγαρτα (κυρίως ουσίες με πικρή γεύση), στο γλεύκος με αποτέλεσμα την αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων του παραγόμενου οίνου.

Το γίγαρτο περιβάλλεται από τη σάρκα, η οποία καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό της ράγας και απαρτίζεται από το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο, τα οποία αποτελούνται από 20-25 στοιβάδες μεγάλων πενταγωνικών ή εξαγωνικών κυττάρων. Το ενδοκάρπιο είναι ο χώρος που περιβάλλει τα γίγαρτα. Η σάρκα αποτελεί το τμήμα εκείνο της ράγας που περιέχει το χυμό της σταφυλής, ο οποίος αφού παραληφθεί με κατάλληλες επεξεργασίες της σταφυλής θα αποτελέσει το προς οινοποίηση γλεύκος.

Τέλος, τη σάρκα περικλείει ο φλοιός, το μεγαλύτερο μέρος του οποίου αποτελείται από νερό 75-80 % κ.β, και στον οποίο απαντώνται οι οργανικές ουσίες που χαρακτηρίζουν τις διάφορες ποικιλίες αμπέλου και διαμορφώνουν τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες των παραγόμενων οίνων. Άξιες αναφοράς είναι οι κηρώδεις ουσίες, μεγάλης θρεπτικής αξίας για τους ζυμομύκητες, τα αρωματώδη έλαια, χαρακτηριστικά της ποικιλίας του σταφυλιού. Επιπρόσθετα, πολύ

σημαντικές είναι οι χρωστικές ουσίες, ανθοκυάνες ή φλαβόνες, στις οποίες οφείλεται το χρώμα των ερυθρών ή λευκών σταφυλιών και οι δευτικές ουσίες (τανίνες), στις οποίες οφείλεται η στυφή γεύση των ερυθρών κυρίως οίνων. Στο φλοιό, επίσης, απαντώνται ελάχιστες ποσότητες σακχάρων, αδιάλυτες πηκτίνες, κυτταρίνη, πρωτεΐνες και διάφορα οργανικά οξέα, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων είναι υπό μορφή αλάτων (μηλικό οξύ, μόνο στο φλοιό των πράσινων σταφυλιών, τρυγικό οξύ σε μικρές ποσότητες, κιτρικό οξύ, σε υπερχρή σε σχέση με τα άλλα) (Τσακίρης, 2017).

1.1.4 ΣΥΣΤΑΣΗ ΓΛΕΥΚΟΥΣ

Ο πρόδρομος είναι το γλεύκος που εκρέει από το πιεστήριο πριν αρχίσει η πίεση της σταφυλομάζας προέρχεται από τα κύτταρα της μεσαίας ζώνης του μεσοκαρπίου. Το γλεύκος αποτελεί ουσιαστικά η σάρκα της ράγας, κι επομένως έχουν την ίδια χημική σύσταση. Μέρος των συστατικών του γλεύκους ανευρίσκονται στον παραγόμενο οίνο, ενώ άλλα μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η γνώση της σύστασης του γλεύκους καθορίζει τις δυνατότητες για την παραγωγή, με τις ανάλογες επεμβάσεις κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, του εκάστοτε επιθυμητού οινικού προϊόντος. Η κ.β χημική σύσταση της σάρκα αποτελείται από: α) το Νερό 75-80 %, στο οποίο βρίσκονται εν διαλύσει τα διάφορα συστατικά και η περιεκτικότητα του εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως την ποικιλία της σταφυλής, τις κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής, το στάδιο ωρίμανσης, την εποχή κ.ά., β) τα ζυμώσιμα σάκχαρα 17-25 %. Η περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα κυμαίνεται από 120-300 γραμμάρια ανά λίτρο. Εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων όπως την ποικιλία της σταφυλής, τις κλιματολογικές συνθήκες πριν τον τρυγητό, την εποχή του τρυγητού, το βαθμό ωρίμανσης, την υγιεινή κατάσταση της σταφυλής, τον τρόπο έκθλιψης αυτών κ.ά., γ) τα οργανικά οξέα, τα ανόργανα άλατα, οι αζωτούχες ουσίες, οι πηκτινικές ουσίες και οι αρωματικές ουσίες. Τα οξέα που υπάρχουν στο γλεύκος υπάρχουν και στον οίνο. Όταν το γλεύκος προέρχεται από υγιή σταφύλια, τα οξέα είναι φυσικά συστατικά της σταφυλής, διαφορετικά, όταν τα σταφύλια έχουν προσβληθεί π.χ από σήψη, τότε στο γλεύκος ανευρίσκονται οξέα που προέρχονται από τη δράση των μυκήτων. Τα κυριότερα οξέα του γλεύκους είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό, βρίσκονται σε όλα τα όργανα της αμπέλου και προέρχονται από φαινόμενα μεταβολισμού στα πράσινα μέρη του φυτού. Τα κύρια συστατικά της σάρκας είναι τα ζυμώσιμα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα. Οι ουσίες αυτές, παρόλο που δεν προσδίδουν στον οίνο τις ιδιαιτερότητές του, όπως συμβαίνει με τις ουσίες του φλοιού, ωστόσο διαχωρίζουν τους οίνους σε ευγενείς και κοινές ποικιλίες αμπέλου, του εξασφαλίζουν την υδροαλκοολική δομή του και τον πρωταρχικό χαρακτήρα ποιότητας ή τη γευστική ισορροπία του. Τέλος, το γλεύκος από καλά ωριμασμένα σταφύλια είναι λιγότερο πλούσιο σε βιταμίνες και αφομοιώσιμα αζωτούχα συστατικά ενώ, αντίθετα, είναι πλούσιο σε σάκχαρα. (Τσακίρης, 2017)

1.1.5 ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ

Ο οίνος είναι ένα μίγμα οργανικών και ανόργανων ενώσεων και η σύνθεσή του επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, οι οποίοι αρχίζουν από το αμπέλι μέχρι και την αλκοολική ζύμωση και έχουν σχέση με το περιβάλλον δηλαδή το έδαφος, το κλίμα, την ποικιλία και την οινολογική πρακτική. Οι περιβαντολλογικοί παράγοντες (κλίμα-έδαφος-τοποθεσία) συνήθως περιγράφονται με τον γαλλικό όρο «terroir» και επηρεάζουν αρκετά την ποιότητα του σταφυλιού, καθώς και το αρωματικό προφίλ του, ενώ είναι πολύ σημαντικοί σε έναν οίνο μιάς και συμβάλλουν στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Αυτό σε σημαντικό βαθμό οφείλεται στην συγκέντρωση των διαφόρων πτητικών ενώσεων κυρίως στις αλκοόλες, εστέρες, τερπένια, οξέα, αλδεΐδες και άλλων συστατικών που υπάρχουν στα σταφύλια ή σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ή κατά την διάρκεια της ωρίμανσης. Όλες αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για την οσμή και το άρωμα του οίνου. Σημαντικό ρόλο όμως στην διαμόρφωση του οργανοληπτικού χαρακτήρα ενός οίνου παίζει και το είδος/ τεχνική της οινοποίησης στην οποία υπόκεινται. Ο οίνος, αποτελεί ένα δείγμα της πολυπλοκότητας της ζωής και είναι αποτέλεσμα ζώντων οργανισμών. Το γλεύκος, που προκύπτει από τη θραύση των ζώντων κυττάρων του σταφυλιού, μετατρέπεται με την παρέμβαση των ζώντων κυττάρων – των ζυμών και των βακτηρίων σε ένα αλκοολούχο προϊόν, τον οίνο. Πρόκειται για ένα υδροαλκοολικό διάλυμα οργανικών οξέων, ένα μέρος των οποίων βρίσκεται σε μορφή αλάτων.

Τα συστατικά του οίνου μπορούν να διακριθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες που περιέχουν:

1. **Το νερό**, το οποίο αποτελεί το πρώτο σε ποσότητα συστατικό και ανέρχεται στα 80-85% αυτού. Προέρχεται από το σταφύλι και είναι υπεύθυνο, κατά κύριο λόγο, για την πυκνότητα του οίνου, η οποία είναι παραπλήσια με εκείνη του νερού (η αλκοόλη έχει μικρότερη πυκνότητα, αλλά υπάρχουν και βαρύτερα συστατικά). Η ποσότητα που περιέχεται στους οίνους, υπολογίζεται μετά τον προσδιορισμό του στερεού υπολείμματος (εξάτμιση στους 100° C).

2. Τα **Οργανικά συστατικά**:

a. Οργανικά οξέα

b. Αλκοόλες

c. Αρωματικές ενώσεις. Το άρωμα ενός οίνου οφείλεται σε πτητικές ενώσεις, που υπάρχουν, είτε στο σταφύλι πριν την οινοποίηση (πρωτογενές άρωμα), είτε από τη δημιουργούνται από τη δράση των ζυμών (δευτερογενές άρωμα), είτε οφείλονται σε χημικές και ενζυμικές δράσεις, που πραγματοποιούνται κατά την ωρίμανση (τριτογενές άρωμα). Το άρωμα και το μπουκέτο των οίνων οφείλονται, κυρίως, στις ανώτερες αλκοόλες και στους εστέρες. Σημαντική θεωρείται, επίσης, και η συμμετοχή άλλων αρωματικών ενώσεων, όπως είναι οι αλδεύδες, οι κετόνες, τα τερπένια, και άλλες καρβονυλικές ενώσεις. Εκτενέστερη αναφορά στις πτητικές ενώσεις του οίνου θα πραγματοποιηθεί στο αντίστοιχο εδάφιο.

d. **Σάκχαρα**

e. **Πολυσακχαρίτες**. Πρόκειται για ένα σύνολο κολλοειδών ουσιών που αποτελείται από πηκτίνες και οζάνες, πολυμερισμένους ανυδρίτες των μονοσακχάρων στους οποίους ανήκουν τα κόμμεα (γόμενες) και οι ουσίες με βλεννώδη υφή (δεξτράνες).

f. **Φαινολικές ενώσεις**

Οι ενώσεις αυτές απαντώνται στους ερυθρούς και τους ροζέ οίνους και αποτελούν τις ουσίες που είναι υπεύθυνες για τη διαμόρφωση του χρώματος. Εκχυλίζονται από τους φλοιούς και τους βόστρυχες των σταφυλιών. Οι ουσίες αυτές είναι οι ανθοκυάνες, οι ταννίνες, οι φλαβόνες και τα φαινολικά οξέα (Καλλίθρακα, πανεπιστημιακές παραδόσεις, 2017). Φαινολικές καλούνται οι ενώσεις που περιέχουν στο μόριό τους τη χαρακτηριστική ομάδα φαινόλης. Οι ενώσεις αυτές ως συστατικά του σταφυλιού και του οίνου περιέχουν ένα σύνολο ενώσεων, σχετικά με τη δομή και τη χημική σύσταση των φαινολικών ενώσεων τις διακρίνουμε στις παρακάτω 4 κύριες οικογένειες: τα φαινολικά οξέα, τις φλαβόνες, τις ανθοκυάνες και τις ταννίνες. (Ribereau-Gayon et al., 1978).

g. **Αζωτούχες ενώσεις**

Το άζωτο περιέχεται στους οίνους με μορφή διαφόρων αζωτούχων ενώσεων, η περιεκτικότητα των οποίων κυμαίνεται συνολικά από 0,5-4 g/L, αποτελώντας το 20% περίπου του ξηρού υπολείμματος. Το καθαρό άζωτο που περιέχεται σ' αυτές ανέρχεται σε 16%, δηλαδή σε 80-640 mg/L οίνου περίπου. Ένα (1) gN, αντιστοιχεί σε 6,25 g αζωτούχου ουσίας. Οι αζωτούχες ενώσεις διακρίνονται στις ανόργανες και τις οργανικές.

Οι ανόργανες αζωτούχες ουσίες περιέχονται στον οίνο ως αμμωνιακά άλατα, όπως π.χ. το $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, και αποτελούν το 5% του συνολικού αζώτου. Το υπόλοιπο, δηλαδή το 95%, περιέχεται στις οργανικές αζωτούχες ενώσεις, οι σπουδαιότερες από τις οποίες διακρίνονται σε: αμινοξέα, πολυπεπίδια, πρωτεΐνες και αμίδια.

Αμινοξέα, ολιγοπεπίδια και πρωτεΐνες, απαραίτητες για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων. Η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 0,5 - 4 (g/L). Πολλές φορές προκαλούν θολώματα στους οίνους που για το λόγο αυτό υφίστανται πρωτεϊνική σταθεροποίηση (Σουφλερός, 2015).

h. **Ένζυμα**. Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες μοριακού βάρους 104-106 και χρησιμεύουν για να καταλύουν τις χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν μέσα στα κύτταρα. Στον οίνο περιέχονται πολυάριθμα ένζυμα, είτε αυτά προέρχονται από το σταφύλι, είτε παράγονται από τους διάφορους μικροοργανισμούς. Τα ένζυμα που συναντώνται συνήθως είναι οι καταλάσες, οι οξειδάσες, οι ιμπερτάσες, οι πρωτεάσες, οι πηκτινάσες, οι εστεράσες, οι ταννάσες και άλλα.

i. **Βιταμίνες**. Είναι οργανικές ουσίες που ο ζωικός οργανισμός γενικά είναι ανίκανος να τις παράγει μόνος του και οι οποίες, σε απειροελάχιστες δόσεις, είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη, η διατήρηση και τη λειτουργία των οργανισμών και των οποίων η αποδεδειγμένη απουσία προκαλεί χαρακτηριστικές διαταραχές και βλάβες (Randoin). Στα σταφύλια και στα γλεύκη υπάρχουν αρκετές βιταμίνες, οι οποίες σε γενικές γραμμές περνούν στον οίνο αφού αυξομειωθούν και συμπληρωθούν από τις ζύμες, στις διάφορες φάσεις του μεταβολισμού τους. Ο οίνος πλούσιος σ' όλες τις απαραίτητες βιταμίνες αποτελεί ένα ενδιαφέρον θρεπτικό προϊόν.

3. Τα **ανόργανα συστατικά**: Ο οίνος περιέχει 2-4 g/L ανόργανων συστατικών. Πρόκειται για τα άλατα των ανόργανων οξέων, αλλά και μερικών οργανικών. Τα ανόργανα συστατικά σχηματίζονται στους βλαστούς της αμπέλου και μετακινούνται στη συνέχεια στο σταφύλι, απ' όπου τελικά θα περάσουν στο γλεύκος και στον οίνο. Οι ανόργανες ουσίες διακρίνονται σε ανιόντα και κατιόντα

a. Ανιόντα (Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , F^- , Br^- , I^- , BO_3^{3-} ,.....)

b. Κατιόντα (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^+ , Cu^{3+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , As^{3+} , Pb^{2+} ,.....)

Ανόργανα ανιόντα και κατιόντα σε διάφορες συγκεντρώσεις, κάποια εκ των οποίων (Fe και Cu) δημιουργούν θολώματα και απομακρύνονται με τεχνικές σταθεροποίησης. (Σουφλερός 2015, Τσακίρης 2017).

Τα Οργανικά Οξέα

Τα οργανικά οξέα αποτελούν μια σπουδαία ομάδα συστατικών των οίνων και είναι υπεύθυνα όχι μόνο για την όξινη γεύση των οίνων, αλλά και για την προστασία αυτών από τις μικροβιολογικές ή χημικές προσβολές, καθώς επίσης και για τη διατήρηση του χρώματος και ορισμένα απ' αυτά προσβάλλονται, μερικές φορές, από τους μικροοργανισμούς. Το γλεύκος και ο οίνος περιέχουν ανόργανα και οργανικά οξέα, καθώς και ικανή ποσότητα βάσεων, οι οποίες εξουδετερώνουν το σύνολο των ανόργανων οξέων, ως πιο ισχυρά που είναι, και μέρος των οργανικών. Εφόσον μέρος από τα οργανικά οξέα μένει ελεύθερο, φυσικό είναι η όξινη αντίδραση του γλεύκους και του οίνου να οφείλεται σε αυτά. Τα οργανικά οξέα, επομένως, γίνονται ρυθμιστές τόσο της ολικής ή ογκομετρούμενης οξύτητας γλεύκους και οίνου, όσο και του pH ή ενεργού οξύτητας. **Η ολική οξύτητα είναι το σύνολο των ελεύθερων (όχι των εξουδετερωμένων) καρβοξυλομάδων των οξέων, είτε βρίσκονται σε διάσταση είτε όχι, ενώ το pH ορίζεται από το σύνολο των καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και οι οποίες ρυθμίζουν την όξινη γεύση του οίνου.** Οπωσδήποτε, όμως, η φαινομενική όξινη γεύση (γεύση που αντιλαμβάνεται ο δοκιμαστής) επηρεάζεται αισθητά και από άλλα συστατικά, όπως είναι η αλκοόλη, τα σάκχαρα, οι ταννίνες κλπ.

Η υψηλή οξύτητα ή το χαμηλό pH του οίνου, είναι περιοριστικός παράγοντας στην ανάπτυξη των διαφόρων μικροοργανισμών και μάλιστα των βακτηρίων που γίνονται πρόξενοι αλλοιώσεων και υποβάθμισης της ποιότητας των οίνων. Από την περιεκτικότητα, επομένως, των οίνων σε οργανικά οξέα θα εξαρτηθεί η προστασία τους από τις μικροβιολογικές προσβολές. Το χαμηλό pH, εξάλλου, ασκεί ευνοϊκή επίδραση στη ζωηρότητα του χρώματος των οίνων. Η σταθερότητα ή μη των οργανικών οξέων έναντι των μικροοργανισμών, καθώς και ο βαθμός διάστασής τους παρουσιάζουν σπουδαίο τεχνολογικό ενδιαφέρον στην επιλογή τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τη σωστή αύξηση της οξύτητας, χωρίς ωστόσο να δημιουργείται κίνδυνος για τυχόν προσβολή. Τα οργανικά οξέα, διακρίνονται σε σταθερά και πτητικά, που περιέχονται στον οίνο έχουν διπλή προέλευση, αρχικά από από το σταφύλι, ενώ τα υπόλοιπα σχηματίζονται κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων του γλεύκους και των τυχόν μικρο - βιολογικών προσβολών γλεύκους και οίνου. Στα πτητικά οξέα, τα οποία διαμορφώνουν την πτητική οξύτητα του γλεύκους/οίνου, ανήκουν το Οξικό, το Μυρμηκικό (από σταφύλι), το Προπιονικό, το Ισοβουτυρικό και το Βουτυρικό οξύ. Τα κυριότερα σταθερά οξέα του σταφυλιού: Τρυγικό, Μηλικό, Κιτρικό, Γλυκονικό, Οξαλικό, Ασκορβικό οξύ και Ουρονικά οξέα. Σταθερά Οξέα ζυμώσεων και προσβολών: Ηλεκτρικό, Γαλακτικό, Κιτρομηλικό, Διμεθυλογλυκερικό, Πυροσταφυλικό (πυρουβικό) και α-Κετογλουταρικό οξύ. Από τα παραπάνω οξέα το μηλικό, το τρυγικό, το κιτρικό και το γαλακτικό, τα οποία περιέχουν στο μόριό τους ομάδες υδροξυλίων, έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν το σίδηρο με αποτέλεσμα να αποφεύγονται τα θολώματα που θα μπορούσαν πιθανόν να προκληθούν από το κατιόν αυτό. Απ' αυτά τα υδροξυοξέα, το κιτρικό οξύ είναι εκείνο που σχηματίζει τα πιο ισχυρά σύμπλοκα με το σίδηρο και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται για την προληπτική αποφυγή των θολωμάτων που έχουν ως αιτία το μέταλλο αυτό. (Σουφλερός, 2015, Τσακίρης 2017)

Πίνακας 1. Τα κυριότερα οργανικά οξέα του σταφυλιού και οι συγκεντρώσεις τους στο γλεύκος και στον οίνο

Οργανικό οξύ Σταφυλιού	Ποσότητα στο γλεύκος	Ποσότητα στον οίνο
Τρυγικό οξύ	2 – 6 (g/L)	1,5 – 2,5 (g/L)
Μηλικό οξύ	2 – 4 (g/L)	1 – 2,5 (g/L)
Κιτρικό οξύ	0,3 – 2,25 (g/L)	0,0 – 1,0 (g/L)
Γλυκονικό οξύ	0,12 (g/L)	0,12 – 2,5 (g/L)
Ασκορβικό οξύ	0,05 – 0,1 (g/L)	Κατανάλωση από ζύμες

Πίνακας 2. Τα σημαντικότερα οξέα που παράγονται κατά την οινοποίηση και οι συγκεντρώσεις τους στο γλεύκος και στον οίνο

Οργανικό οξύ οίνου	Προέλευση στον οίνο	Ποσότητα στον οίνο
Ηλεκτρικό οξύ	Αλκοολική Ζύμωση	0,5 – 1 (g/L)
Κιτρομηλικό οξύ	Δευτερεύον προϊόν AZ	0,1 – 0,25 (g/L)
D (-) Γαλακτικό οξύ	Αλκοολική Ζύμωση	0,1 – 0,4 (g/L)
L (+) Γαλακτικό οξύ	Μηλογαλακτική Ζύμωση	3,0 (g/L)
Πυροσταφυλικό οξύ	Μεταβολισμός Γλυκόζης	0,0 – 0,5 (g/L)
Α-κετογλουταρικό οξύ	Μεταβολισμός Γλυκόζης	0,0 – 0,2 (g/L)
Οξικό οξύ	Διάφορα Μονοπάτια	0,5 – 0,6 (g/L)

Πίνακας 3. Τιμές διαφόρων τύπων οξύτητας, ανά τύπο οίνου.

Οξύτητα	Λευκοί Οίνοι	Ροζέ Οίνοι	Ερυθροί Οίνοι	Γλυκοί Οίνοι
Ολική	7,0 – 8,5 (g/L)	7,0 – 8,5 (g/L)	6,0 – 8,0 (g/L)	5,5 – 8,0 (g/L)
Ενεργός (pH)	3,1 – 3,5	3,1 – 3,5	3,3 – 3,8	3,5 – 3,8
Πτητική	18 meq/L	18 meq/L	20 meq/L	

Εξέλιξη των κυριότερων οργανικών οξέων του γλεύκους στη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης

Το γλεύκος και ο οίνος έχουν όξινο χαρακτήρα, επειδή περιέχουν οργανικά οξέα, με κυριότερα το τρυγικό οξύ (C₄H₆O₆), το μηλικό οξύ (C₄H₆O₅) και σε μικρότερες ποσότητες το κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇) κ.ά. Τα οξέα αυτά υπάρχουν στα σταφύλια όπου με τη σύνθλιψη τους περνούν στο γλεύκος και με τη ζύμωση του καταλήγουν στον οίνο. Κατά τη ζύμωση παρατηρούνται κάποιες αλλαγές στις ποσότητες των παραπάνω οξέων, επιπλέον εμφανίζονται και κάποια νέα οργανικά οξέα όπως το γαλακτικό (CH₃CH(OH)COOH) και το οξικό οξύ (CH₃COOH), ως δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης ή ως προϊόντα βακτηριακής ή ενζυμικής δράσης. Τα παραπάνω οξέα όταν βρίσκονται στις κατάλληλες ποσότητες συμβάλλουν στη διαμόρφωση των γευστικών χαρακτήρων του οίνου. Όμως σε μεγαλύτερες ή πολύ μικρότερες ποσότητες μπορεί να προσδώσουν στον οίνο ανεπιθύμητες ιδιότητες. Οξέα από το σταφύλι: τρυγικό, μηλικό, κιτρικό. Οξέα από ζυμώσεις: ηλεκτρικό, γαλακτικό, κιτρομηλικό, διμεθυλογλυκερικό. Πτητικά οξέα από ζυμώσεις: μυρμηγκικό, οξικό, προπιονικό, βουτυρικό και γλυκερικό.

Το τρυγικό οξύ είναι το κυριότερο οξύ του γλεύκους. Η δράση των ζυμων έχει έμμεσο αποτέλεσμα στην περιεκτικότητά του, λόγω μείωσης της διαλυτότητας των αλάτων του τρυγικού οξέος σε αλκοολικό διάλυμα.

Το μηλικό οξύ μπορεί να ζυμωθεί κατά το 1/3 από τον *Schizosaccharomyces pombe* ταυτόχρονα με τη ζύμωση των σακχάρων. Αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του Krebs. Σχηματίζεται σε μικρή ποσότητα από τα σάκχαρα κατά την αλκοολική ζύμωση.

Κιτρικό οξύ. Οι ζύμες σχηματίζουν πολύ μικρές ποσότητες κιτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Ηλεκτρικό οξύ. Παράγεται σε ποσότητες 0,5-1,5 g/l κατά την αλκοολική ζύμωση.

Γαλακτικό οξύ. Οι ζύμες παράγουν D(-) γαλακτικό οξύ μέχρι 200 mg/l και 10-20 mg/l L(+). Οξικό οξύ. Είναι ένα από τα παράγωγα της αλκοολικής ζύμωσης. Οι ζύμες παράγουν 0,2-0,4 g/l. Το γλεύκος που έχει υποστεί φαιά σήψη περιέχει ουσίες που ευνοούν το σχηματισμό οξικού οξέος.

Γλυκονικό οξύ. Είναι παράγωγο της δράσης της φαιάς σήψης και των οξικών βακτηρίων που βρίσκονται πάνω στο σταφύλι. Δεν μεταβολίζεται από τις ζύμες και βρίσκεται εξ'ολοκλήρου μέσα στο κρασί, δίνοντας τη δυνατότητα εκτίμησης του ποσοστού προβολής από τη φαιά σήψη.

Πυροσταφυλικό οξύ. Οι ζύμες παράγουν μέχρι 500 mg/l στη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Το μέγιστο φτάνει όταν έχουν ζυμωθεί τα 100 πρώτα γραμμάρια σακχάρου. Με την προσθήκη θειαμίνης μπορεί να αποφευχθεί η δημιουργία μέγιστου. Στην περίπτωση παραγωγής γλυκών οίνων με διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης, το πυροσταφυλικό οξύ, τη στιγμή εκείνη, βρίσκεται σε αυξημένη ποσότητα και δεσμεύει τον προστιθέμενο θειώδη ανυδρίτη. Η προσθήκη θειαμίνης στην περίπτωση αυτή κρίνεται απαραίτητη. (Τσακίρης, 2017)

Στην Ελλάδα, με το ζεστό κλίμα συχνά υπάρχει το πρόβλημα της μειωμένης οξύτητας, λόγω ταχείας ωρίμανσης των σταφυλιών. Αν ένας οίνος ή ένα γλεύκος έχει χαμηλή οξύτητα επιτρέπεται η διόρθωση με προσθήκη κιτρικού οξέος. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία επιτρέπεται η προσθήκη κιτρικού οξέος μέχρι 2,5 g/L στον οίνο και μέχρι 1,5 g/L στο γλεύκος. Γενικά, είναι προτιμότερο οι διορθώσεις οξύτητας να γίνονται στο γλεύκος, δηλαδή πριν τη ζύμωση.

Αν πρέπει να γίνει μείωση της οξύτητας προστίθεται στον οίνο ή στο γλεύκος κάποιο βασικό άλας, συνήθως CaCO₃ ή KHCO₃. Επισημαίνεται ότι, η χαρακτηριστική γεύση του οίνου είναι δεν είναι καλή όταν περιέχει λιγότερο από 1,5 g/L τρυγικό οξύ. Κάπως υψηλή οξύτητα προσδίδει σε έναν λευκό οίνο «δροσερότητα» και «φρεσκάδα». Κάπως χαμηλή οξύτητα, σε ερυθρούς οίνους, προσφέρει «απαλότητα» και «βελούδινη γεύση», αντίθετα, η υψηλή οξύτητα τους καθιστά «τραχύς». Αν μετά τη ζύμωση ο οίνος είναι εκτεθειμένος στον ατμοσφαιρικό αέρα (στο οξυγόνο) τότε πιθανότατα θα οξειδωθεί περαιτέρω με αύξηση της περιεκτικότητας του σε οξικό οξύ.

Η τιμή της ολικής οξύτητας του οίνου πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 4 - 8 g/L σε τρυγικό οξύ, ενώ του γλεύκους θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα σε 6 και 8 g/L σε τρυγικό οξύ, διότι η οξύτητα του παραγόμενου οίνου αποτελεί το 75% ή το 80% περίπου της οξύτητας του γλεύκους από το οποίο προέρχεται. Επομένως, από τα παραπάνω διαγράμματα εξάγεται το συμπέρασμα πως η οξύτητα των παραγόμενων πειραματικών οίνων δεν είναι αποδεκτή καθώς κυμαίνεται από 3-13 g/L.

Τα Σάκχαρα

Τα σάκχαρα είναι ενώσεις που αποτελούνται από μια ανθρακική αλυσίδα, η οποία περιέχει αλκοολικές ομάδες και επιπλέον μια αλδεϋδική ή μια κετονική ομάδα (αλδόζες ή κετόζες αντίστοιχα). Έχουν το γενικό τύπο $C_n(H_2O)_n$, και ονομάζονται επίσης γλυκίδια ή υδατάνθρακες. Περιέχονται σε άφθονες ποσότητες στο σταφυλοχυμό, αλλά τα περισσότερα απ' αυτά και κυρίως εκείνα που περιέχονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (γλυκόζη, φρουκτόζη) μετατρέπονται με την αλκοολική ζύμωση σε αλκοόλη. Τα σάκχαρα του γλεύκους και του οίνου χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα αναγωγικά ή ανάγοντα και τα μη αναγωγικά (δεν ανάγουν το φελίγγειο υγρό), ενώ υπάρχουν σε ίχνη κάποια άλλα σάκχαρα, τα οποία λόγω της ελάχιστης περιεκτικότητάς τους, δεν παρουσιάζουν κανένα τεχνολογικό ενδιαφέρον για τους οίνους, αλλά συχνά χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση ορισμένων ζυμών. Τα αναγωγικά διακρίνονται σε ζυμώσιμα σάκχαρα (C6 - εξόζες) και μη (C5 - πεντόζες), ενώ τα μη αναγωγικά είναι κυρίως οι πολυσακχαρίτες.

Τα αναγωγικά σάκχαρα, χαρακτηρίζονται από τις ακόλουθες βασικές ιδιότητες:

1. ανάγουν το φελίγγειο υγρό. Η αναγωγική αυτή ιδιότητα συνδέεται με την παρουσία της αλδεϋδικής ή κετονικής ομάδας και χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους.
2. Είναι βιολογικά ασταθή και προσβάλλονται από τα γαλακτικά βακτήρια με αποτέλεσμα το σχηματισμό του γαλακτικού οξέος και την αύξηση της πτητικής οξύτητας. Ο κίνδυνος αυτός υπαγορεύει την ταχεία ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης των σακχάρων με ισχυρό πληθυσμό ζυμών και την προσπάθεια ν' αποφευχθεί κάθε διακοπή της ζύμωσης που θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της πτητικής οξύτητας. Η παρέμβαση του οινολόγου, σε περίπτωση διακοπής της ζύμωσης, πρέπει να είναι αστραπιαία.
3. Δεσμεύουν το θειώδη ανυδρίτη: Η ιδιότητα των σακχαράων να σχηματίζουν ενώσεις με το θειώδη ανυδρίτη είναι της αλδεϋδικής ή κετονικής ομάδας αυτών. Ο θειώδης ανυδρίτης που συμμετέχει στις ενώσεις αυτές χάνει τις αντισηπτικές του ιδιότητες.
4. Αντιδρούν με τη φαινυλδραζίνη και δίνουν ουσίες με ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως το σημείο τήξης, που επιτρέπει την ταυτοποίηση των αντίστοιχων σακχάρων.
5. Συμμετέχουν σε αντιδράσεις μεθυλίωσης και ακετυλίωσης δίνοντας παράγωγα πτητικά που δύνανται να προσδιοριστούν με αέρια χρωματογραφία.

Στα ζυμώσιμα αναγωγικά σάκχαρα του γλεύκους ή του οίνου περιέχονται οι εξόζες: D(+) γλυκόζη, D (-) φρουκτόζη και D (-) γαλακτόζη (ζυμώνεται από περιορισμένο αριθμό στελεχών ζυμομυκήτων και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση αυτών). Το γλεύκος των ώριμων σταφυλιών περιέχει 15-25% κατά βάρος σάκχαρα αποτελούμενα κυρίως από γλυκόζη και φρουκτόζη, ενώ στις περιπτώσεις υπερωρίμανσης (π.χ. λιαστά σταφύλια) η συγκέντρωση αυτή ξεπερνάει το 25% κατά βάρος. **Η φρουκτόζη έχει υψηλή ικανότητα γλυκύτητας σε σχέση με τ'άλλα σάκχαρα. Αν η σακχαρόζη θεωρηθεί ότι έχει ικανότητα γλυκύτητας 1, η φρουκτόζη έχει 1,73, ενώ η γλυκόζη 0,74. Η αραβινόζη έχει ακόμη πιο μικρή γλυκύτητα, ίση με 0,40.**

Στα πράσινα σταφύλια, υπάρχει περισσότερη γλυκόζη (G) σε σχέση με τη φρουκτόζη (F), αλλά στη διάρκεια της ωρίμανσης η αναλογία της φρουκτόζης αυξάνει περισσότερο, έτσι ώστε τελικά το γλεύκος από καλά ωριμα σμένα σταφύλια να είναι ένα ισομοριακό μίγμα γλυκόζης και φρουκτόζης

$G/F = 0,95 \rightarrow 1$. Κατά την αλκοολική ζύμωση που ακολουθεί, η γλυκόζη - ως περισσότερο ζυμούμενη από τους ζυμομύκητες σε σχέση με τη φρουκτόζη - μειώνεται πιο γρήγορα απ' αυτή, με αποτέλεσμα η σχέση G/F να είναι πολύ μικρότερη από τη μονάδα. Η υπεραφθονία της φρουκτόζης συντελεί στο να στρέφει ο οίνος το επίπεδο του πεπολωμένου φωτός προς τα αριστερά, παρόλο που τα υπόλοιπα περιεχόμενα σάκχαρα (γλυκόζη, σακχαρόζη και αραβινόζη) είναι δεξιόστροφα. Αν ο οίνος, στρέφει το επίπεδο του πεπολωμένου φωτός προς τα δεξιά, αυτό σημαίνει ότι είναι πιθανή η προσθήκη σακχαρόζης ή γλυκόζης σε αυτόν και μάλιστα πολύ αργά σε σχέση με το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, ώστε να μην έχει καταναλωθεί από τις ζύμες. Έλεγχος της τεχνητής γλύκανσης των οίνων γίνεται επίσης με τον υπολογισμό της σχέσεως P/a, η οποία στους φυσικούς οίνους δεν ξεπερνάει το τέσσερα. Υπάρχουν, ωστόσο, μερικές φρουκτόφιλες ζύμες που προσβάλλουν γρηγορότερα τη φρουκτόζη, παρά τη γλυκόζη. Στην πράξη, όμως, διαπιστώθηκε ότι οι ζύμες αυτές ποτέ δεν ενεργούν μόνες τους, έτσι ώστε και στην περίπτωση αυτή η σχέση G/F να είναι πάλι μικρότερη από τη μονάδα. Η σχέση G/F παραμένει περισσότερο ακόμη πιο μικρή από τη μονάδα στους γλυκούς οίνους, που προκύπτουν από μερική ζύμωση όπου η διακοπή της ζύμωσης έγινε είτε αυθόρμητα είτε με την προσθήκη αλκοόλης ή SO₂. Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, η γαλακτόζη, η οποία χρησιμοποιείται πολύ λίγο από τις ζύμες, σε σχέση με τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, περιέχεται στους οίνους σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από εκείνες της γλυκόζης, παρόλο που στο γλεύκος η αναλογία ήταν 1:1000.

Τα μη ζυμώσιμα αναγωγικά σάκχαρα του γλεύκους ή των οίνων αποτελούνται από πεντόζες (C5) (με εξαίρεση την L-ραμινόζη με C6, η οποία είναι μια μεθυλ-πεντόζη) και ανέρχονται σε μικρές ποσότητες δυνάμενες να φτάσουν από 0,3 σε 2 g/L (σε εξαιρετικές περιπτώσεις). Οι ερυθροί οίνους είναι πλουσιότεροι σε πεντόζες από τους λευκούς και αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι τα σάκχαρα αυτά περιέχονται σε μεγαλύτερη αναλογία στους βόστρυχες των σταφυλιών και

τους φλοιούς των ραγών παρά στη σάρκα τους. Σε γενικές γραμμές οι περιεκτικότητες των πεντοζών αυτών είναι οι ακόλουθες: L-αραβινόζη 300-1000 mg/L, D-ξυλόζη 100 mg/L, D-ριβόζη 100-500 mg/L, L-ραμνόζη < 100 mg/L. Η συνολική συγκέντρωση των πεντοζών μεγαλύτερη από 2 g/L δίνει υποψίες για την ανάμιξη με οίνους από άλλα φρούτα (π.χ. μηλίτης οίνος). Οι πεντόζες δε ζυμώνονται από τις ζύμες, αλλά προσβάλλονται από τα γαλακτικά βακτήρια με αποτέλεσμα την αύξηση της πτητικής οξύτητας. (Σουφλερός, 2015, Τσακίρης 2017)

Πίνακας 4. Διάκριση των οίνων, ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε αναγωγικά (αζύμωτα) σάκχαρα

Χαρακτηρισμός οίνου	Συγκέντρωση Σακχάρων
Ξηρός	<2 (g/L)
Ημίξηρος	2 – 18 (g/L)
Ημίγλυκος	18 – 40 (g/L)
Γλυκός	>40 (g/L)

1.1.6 ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ

Ο ελληνικός αμπελώνας αποτελείται κυρίως από γηγενείς ποικιλίες, άλλοτε αυτόριζες και άλλοτε εμβολιασμένες με αντιφυλλοξηρικά υποκείμενα. Στην Ελλάδα καλλιεργούνται περίπου 300 ποικιλίες αμπέλου. Οι κυριότερες ελληνικές λευκές ποικιλίες οινοποιίας και τα χαρακτηριστικά τους είναι:

1. Αθήρι (παραλλαγές του είναι το Θρασαθήρι και το Μαυραθήρι)

Καλλιεργείται στην Κρήτη και στις Κυκλάδες. Λευκή ποικιλία πρώιμη. Εξ' αιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας του γλεύκους σε σάκχαρα παράγεται οίνος καλής ποιότητας Η Θηραϊκή άμπελος των αρχαίων. Ευαισθησία στο ωίδιο και τον βοτρυτή. Συμμετέχει στους οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Ρόδος έως το 2011 ήταν 100%, έκτοτε προστέθηκαν ασύρτικο και μαλαγουζιά. Συμμετοχή στους οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Σαντορίνη και στους λευκούς οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Πλαγιές Μελίτωνα. Τρύγος από μέσα Αυγούστου έως αρχές Σεπτεμβρίου, ανάλογα με την περιοχή. Δίνει λευκά ξηρά, γλυκά και αφρώδη κρασιά (Ρόδος). Μόνο του δίνει μεσόβαθμα έως υψηλόβαθμα ξηρά κρασιά με λεπτά και κάπως ελαφρά αρώματα που θυμίζουν εσπεριδοειδή (ανθός λεμονιού) και άλλα φρούτα (ανανάς, ξινόμηλο, πεπόνι). Έχουν μαλακιά, ισορροπημένη γεύση και χαμηλή έως μέτρια οξύτητα.

2. Ασύρτικο

Καλλιεργείται κατά κύριο λόγο στις Κυκλάδες. Λίκνο της η Σαντορίνη, όπου και παραμένει αυτοφυής, αφού δεν προσβλήθηκε ποτέ από φυλλοξήρα. Πολυδυναμική, λευκή ποικιλία από τις πιο αξιολογές της Μεσογείου, πολύ παραγωγική με μεγάλες αντοχές σε ξηρασία, περονόσπορο, ωίδιο και βοτρυτή. Διαθέτει μεγάλη προσαρμοστικότητα, εξ' ου και η μεγάλη του διασπορά ανά την Ελλάδα. Συμμετέχει στους οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Σαντορίνη έως και 100% αλλά τους οίνους Vinsanto με καλύτερη εκδοχή την συνοινοποίηση με λίγο αθήρι και κυρίως αηδάνι άσπρο (με λιάσιμο των σταφυλιών, επιτυγχάνεται ημίγλυκο, παχύ, πλούσιο στο στόμα, με άρωμα σοκολάτας, καφέ και λικέρ βύσσινο, έχει σκούρο μελί χρώμα). Συμμετέχει στους λευκούς οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Πλαγιές Μελίτωνα, από το 2010 συμμετέχει στους γλυκείς οίνους ΠΟΠ Μονεμβασία-Malvasia, από το 2011 στους γλυκείς οίνους ΠΟΠ Πάρος και από το 2011 στους λευκούς οίνους ΠΟΠ Ρόδος. Ο τρύγος λαμβάνει χώρα όλο τον Αύγουστο, ανάλογα με την περιοχή. Είναι ο βασιλιάς της ισορροπημένης οξύτητας. Υψηλό αλκοόλ (έως 15-16%Vol). Πλούσια φρουτώδης και εκρηκτική, λόγω οξύτητας γεύση, πολύ ελαφρύ άρωμα εσπεριδοειδών (λεμόνι) και φρούτων (πράσινο μήλο, ανανάς). Χαρακτηριστική στυφάδα στο τελείωμα και, συνήθως, μακρά επίγευση. Ως ευοξειδωτή ποικιλία απαιτεί πολύ προσεκτική οινοποίηση και επιδέχεται παλαιώση κάτω από ιδανικές συνθήκες. Οι Σαντορίνες έχουν terroir πολύ χαρακτηριστικό, ενώ εκτός νησιού διατηρούνται τα αρωματικά χαρακτηριστικά, αλλά όχι το στόμα.

3. Βηλόνα

Καλλιεργείται στους νομούς Ηρακλείου και Λασιθίου. Είναι ευγενική, λευκή ποικιλία της Κρήτης μεγάλης παραγωγικότητας. Συμμετέχει στους οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Πεζιά 100% και στους λευκούς οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Σητεία με τρύγος στα μέσα Σεπτεμβρίου. Ιδιαίτερα ανοιχτό χρώμα, Χαμηλός έως μέτριος αλκοολικός βαθμός, καλή έως υψηλή οξύτητα. Δίνει μετρίως αρωματικά κρασιά (πράσινο μήλο, κίτρο, λεμόνι). Πολύ ευοξειδωτή πρέπει να καταναλώνεται φρέσκια.

4. Γουστολίδι (Αυγουστολίδι, Βουστολίδι, Βοστυλίδι)

Καλλιεργείται κυρίως στα νησιά του Ιονίου πελάγους, όπως η Ζάκυνθος, Κεφαλονιά, αλλά συναντάται και στη Δυτική Πελοπόννησο. Λευκή, πρώιμη, παραγωγική ποικιλία που παρουσιάζει ευαισθησία στον περονόσπορο. Το γλεύκος της είναι πλούσιο σε σάκχαρα (άνω των 26%) και ο οίνος (αλκ.βαθμό 14-15°) καλής ποιότητας, με χαρακτηριστικό το λαμπερό ανοιχτό χρώμα του.

5. Μαλαγουζιά

Καταγωγή από την Αιτωλοακαρνανία. Εύρωστη και παραγωγική, ευαίσθητη στον βοτρυτή και το ωίδιο, ανθεκτική στην ξηρασία με τρύγο στα τέλη Αυγούστου. Από τις πλέον αρωματικές γηγενείς ποικιλίες. Δίνει ξηρά κρασιά με έντονα και σύνθετα αρώματα που θυμίζουν λουλούδια, κίτρο, βασιλικό, μήλο, ροδάκινο κ.ά. Έχουν πλούσια γεύση με σχετικά χαμηλή οξύτητα, υψηλή περιεκτικότητα αλκοόλ, καλή επίγευση και δυνατότητες ωρίμανσης σε βαρέλι. Από το 2011 συμμετέχει στη σύνθεση των λευκών οίνων ΠΟΠ Ρόδος.

6. Μαλβάζια

Πολύ ευοξειδωτή λευκή ποικιλία της Ιταλίας, αλλά θεωρείται ότι κατάγεται από τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου. Υπάρχει σε διάφορες εκδοχές, από τις οποίες η πλέον συνήθης στην Ελλάδα είναι η Aromatica. Παράγει και γλυκά και αφρώδη κρασιά με χυσαφένιο χρώμα και αρώματα αμύγδαλου, βερίκοκου.

7. Μοσχάτο Σάμου (Μοσχοστάφυλο, Μοσχάτο άσπρο, Μοσχούδι)

Μια από τις πιο διαδεδομένες ποικιλίες σε όλον τον κόσμο (Ευρώπη, Αμερική, Αυστραλία) με διάφορα ονόματα (Muscat de Frontignan, a petits grains, bianco, di Trani) και μεγάλη παραλλακτικότητα. Η ποικιλία αυτή συναντάται στις περιοχές της Σάμου, Αχαΐας και στα Δωδεκάνησα. Συμμετέχει στους οίνους ΠΟΠ (ΟΠΕ) Σάμος, Μοσχάτος Πατρών, Μοσχάτος Ρίου Πατρών, Μοσχάτος Κεφαλονιάς 100%. Τρύγος από μέσα Αυγούστου ως τέλη Σεπτεμβρίου, ανάλογα με την περιοχή. Τα ξηρά της κρασιά έχουν πολύ έντονα και ιδιαίτερα αρώματα που θυμίζουν τριαντάφυλλο, μέντα και άλλα λουλούδια, φρούτα (πράσινο μήλο, σταφύλι, βερίκοκο, ανανά κ.ά.) καθώς και μέλι ή μαρμελάδα (περγαμόντο). Έχουν ευχάριστη γεύση, μέτρια οξύτητα, αρκετά υψηλή περιεκτικότητα αλκοόλ και πρέπει να καταναλώνονται πολύ φρέσκα. Δίνει επίσης γλυκά κρασιά (ΠΟΠ - ΟΠΕ) που, ανάλογα με την οινοποίηση και την ωρίμανση, έχουν αρώματα που θυμίζουν λουλούδια, φρούτα, κυρίως αποξηραμένα, (όπως βερίκοκο, ανανά κ.ά.), κακάο, σοκολάτα, καφέ κ.ά. και αντίστοιχη γεύση, συχνά με ιδιαίτερα καλή επίγευση. Αυτά της Σάμου πληθωρικά με ρουστίκ χαρακτηριστικά, ενώ τα της Πάτρας, Ρίου πιο φινετσάτα και νεανικά. Από την ευοξειδωτή αυτή ποικιλία παράγονται κυρίως γλυκοί οίνοι, οίνοι σαν το ρητινίτη (κ. ρετσίνα), τα μιστέλια καθώς και ημίγλυκοι.

8. Μοσχάτο Αλεξανδρείας

Λευκή ποικιλία, πιθανώς αφρικανικής καταγωγής διαδεδομένη σε όλον τον κόσμο (στη νότια Ιταλία το λένε Zibbibo). Τριπλής χρήσης (οινοποίηση, επιτραπέζια, σταφίδα). Μεγάλη αντοχή στην ξηρασία, ευαισθησία σε ιώσεις, περονόσπορο, ωίδιο. Στους οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Λήμνος και ΠΟΠ (ΟΠΕ) Μοσχάτος Λήμνου 100%. Τρύγος τέλη Αυγούστου μέσα Σεπτεμβρίου. Δίνει ξηρά κρασιά με έντονα αρώματα που θυμίζουν λουλούδια και κίτρινα φρούτα. Έχουν γεύση με αρκετά υψηλή οξύτητα, μέτρια προς υψηλή περιεκτικότητα αλκοόλ. Έχει δυνατότητες ωρίμανσης σε βαρέλι αλλιώς είναι ευοξειδωτή. Δίνει επίσης γλυκά κρασιά με αρώματα που θυμίζουν λουλούδια, αποξηραμένα φρούτα, μέλι κ.ά. Έχουν γεύση που μοιάζει συχνά με αυτή του σταφυλιού και μακρά επίγευση.

9. Μοσχοφίλερο

Η γκρι και ευγενέστερη εκδοχή της ποικιλίας Φιλέρι, μια από τις καπνίας αμπέλους των αρχαίων. Παρότι ερυθρωπή δίνει κυρίως λευκά κρασιά. Στους οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Μαντίνεια 100% στην πράξη, παρότι ο νόμος επιτρέπει και ασπρούδες. Με μικρή προσαρμοστικότητα και τρύγο αρχές Οκτώβρη, δίνει ξηρούς οίνους με πολύ έντονα αρώματα που κυριαρχεί το τριαντάφυλλο στα χαμηλότερα υψόμετρα και το λεμόνι στα υψηλότερα και ακόμα πράσινο μήλο, εξωτικά φρούτα (λίτσι) κ.ά. Έχουν γεύση μέτριου όγκου με χαρακτηριστικά υψηλή οξύτητα που ξεχωρίζει, μέτρια έως χαμηλή περιεκτικότητα αλκοόλ και όχι ιδιαίτερα μακρά επίγευση. Επιπλέον δίνει ημιαφρώδη ή αφρώδη λευκά, αλλά και ροζέ. Αρκετά ευοξειδωτή ποικιλία, καθώς έχει πολύ πλούσια πρωτογενή αρώματα, στο βαρέλι τη βάζουν λίγοι παραγωγοί. Αν οινοποιηθεί μαζί με τα στέμφυλα δε δίνει ακριβώς ροζέ, αλλά έναν αρωματικό γκρι οίνο - vin gris

10. Μπατίκι (Τιμπί-Μπατίκι, Ντεμπατίκι, Ντεβέ Μπατίκι)

Λευκή ποικιλία μικρασιατικής προέλευσης που καλλιεργείται κυρίως στην Θεσσαλία (Τίρναβος), αλλά και στην Β. Εύβοια και Δ. Μακεδονία. Οι οίνοι της ποικιλίας αυτής έχουν χαρακτηριστικό άρωμα.

11. Ντεμπίνα

Συναντάται σε ψυχρά κυρίως κλίματα όπως αυτό των Ιωαννίνων και της γύρω περιοχής. Η ποικιλία αυτή είναι όψιμη (β' δεκαήμερο Οκτωβρίου) και αρκετά παραγωγική. Παρουσιάζει ευαισθησία στις προσβολές από περονόσπορο. Από την ποικιλία αυτή παρασκευάζεται και ο γνωστός οίνος ονομασίας Προελεύσεως Ζίτσα, καθώς και άλλοι τύποι οίνων όπως αφρώδεις, ξηροί κ.ά.

12. Ροδίτης (Ρογδίτης, Ροϊδίτης, Αλεπού, Ροδομούσι, Βιολεντό)

Ευδοκμεί στις περιοχές των Νομών Πάτρας, Μαγνησίας, Ηλείας, Μεσσηνίας, στην Εύβοια, στην Αγχιάλο Θεσσαλίας αλλά και σποραδικά σε όλη τη χώρα (Κυκλάδες, Β.Δ. Ελλάδα κ.λ.π.). Η ποικιλία αυτή είναι ερυθρή και παραγωγική. Από την ποικιλία αυτή παράγονται λευκοί οίνοι. Συμμετέχει στους οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Πάτρα 100%, στους οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Αγχιάλος τουλάχιστον 75%, συμμετοχή στους λευκούς οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Πλαγιές Μελίτωνα. Η 2η ευρύτερα καλλιεργούμενη ποικιλία, αλλά πρώτη σε οργανωμένες εκμεταλλεύσεις. Πολλές παραλλαγές σε χρώμα από λευκό (Αγχιάλου) μέχρι ρόδινο (Αλεπού) και διάφορες ονομασίες. Έχει ευαισθησία στον περονόσπορο, αντοχή στην ξηρασία. Τρύγος τέλος Σεπτεμβρίου. Στα κατάλληλα εδάφη, ορεινών περιοχών βορινού προσανατολισμού και με μέτριες αποδόσεις ανά πρέμνο, μπορεί να δώσει αξιολογικά ξηρά κρασιά, με καλή ισορροπία ανάμεσα στην αλκοόλη και την οξύτητα, με καλό άρωμα λουλουδιών, εσπεριδοειδών, μήλου, πεπονιού, μπανάνας. Δροσερή, χάρη στην οξύτητα, γεύση. Μπορεί να δώσει και παχύ, λιπαρό σώμα. Δυνατότητες παλαιώσης.

13. Ρομπόλα (Ρομπόλα κέρινη, Ασπρορομπόλα)

Η ποικιλία αυτή καλλιεργείται με επιτυχία στην περιοχή της Κεφαλληνίας και Ζίτσας Μετσόβου. Είναι λευκή ποικιλία μεγάλης παραγωγικότητας. Το φυτό της ποικιλίας αυτής αξιοποιεί εδάφη φτωχά και ξηρά δίνοντας οίνους ανωτέρας ποιότητας (στον πληθυσμό της ρομπόλας απαντά και παραλλαγή με ερυθρές ρόγες, η Κοκκινόρομπόλα).

14. Σαββατιανό (Κουντούρα άσπρη, Δουμπραίνα άσπρη, Σακέικο, Σαββαθιανό, Σταματιανό)

Η ευρύτερα καλλιεργούμενη ποικιλία. Συναντάται στις περιοχές της Αττικής, Εύβοιας, Βοιωτίας και Μαγνησίας. Είναι λευκή, πολύ παραγωγική και παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στην ξηρασία και στις προσβολές από ασθένειες. Χρησιμοποιείται για την παρασκευή της ρετσίνας. Τρύγος μέσα Σεπτεμβρίου ως μέσα Οκτώβρη. Χρώμα κιτρινοπράσινο προς κίτρινο έντονο όσο παλαιώνει. Φρουτώδη αρώματα μεγάλης ποικιλίας (λευκό ροδάκινο, λεμόνι, ακτινίδιο, μπανάνα, πεπόνι, ώριμο βερίκοκο, φράουλα, μοσχάτο, γαρμάς, κίτρινο ροδάκινο). Στόμα μαλακό στην αρχή και συχνά με χαμηλή οξύτητα, που σε πολλά κρασιά εκφράζει αδυναμία, αφού τα κάνει πλαδαρά, χωρίς νεύρο.

15. Φιλέρι

Η καλλιέργεια της παραγωγικής αυτής ποικιλίας συνίσταται στους νομούς Ηλείας και Μεσσηνίας. Ωριμάζει πλήρως στα τέλη του Σεπτεμβρίου. Οι παραγόμενοι οίνοι έχουν χαρακτηριστική γεύση και ιδιαίτερο άρωμα. (Κεχαγιά, διδακτορική διατριβή, 2019)

1. 2. ΟΙΝΟΠΟΙΗΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΛΕΥΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ -ΓΛΕΥΚΟΠΟΙΗΣΗ

Ο όρος «Οινοποίηση» αναφέρεται στο σύνολο των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα για την μετατροπή των σταφυλιών σε οίνο και με γενίκευση του όρου η ζύμωση αποτελεί τη διεργασία μετατροπής ορισμένων πρώτων υλών που καλούνται «υπόστρωμα», με την παρέμβαση πάντοτε μικροοργανισμών, προς προϊόντα περισσότερο χρήσιμα προς τον άνθρωπο σε σχέση με το υλικό εκκινήσεως. Οι διαδικασίες ξεκινούν από τη συλλογή των σταφυλιών μέχρι τη στιγμή που τελειώνει η μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και με την ευρεία έννοια, και ξεκινούν από την επιλογή του τόπου όπου θα φυτευθεί το αμπέλι μέχρι την κατανάλωση του οίνου. Η διαδικασία της παραγωγής οίνου, είναι μία διαδικασία που ξεκινά κάθε έτος σε λίγο διαφορετικό χρόνο, ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειας, τα καιρικά φαινόμενα, με την ποικιλία της σταφυλής, ενώ εξαρτάται και από άλλους παράγοντες. Η διαδικασία έχει κάποιες κοινές αρχές, ωστόσο η οινοποίηση έχει πολλές παραμέτρους, ενώ κάθε περιοχή, κάθε ποικιλία σταφυλιού και κάθε είδος παραγόμενου οίνου έχει τις δικές του απαιτήσεις. Ο οίνος προέρχεται από τα χυμοτόπια της σάρκας των ραγών. Στα χυμοτόπια είναι συγκεντρωμένα τα σάκχαρα όταν τα σταφύλια είναι ώριμα, και επίσης αφθονούν τα οξέα που δίνουν γεύση στο υδροαλκοολικό διάλυμα που γεννιέται από την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων. Οι ανθοκυάνες όμως, που διαμορφώνουν το χρώμα των ερυθρών οίνων, είναι συγκεντρωμένες στον φλοιό των ραγών. Στους φλοιούς επίσης βρίσκεται μεγάλο μέρος των φαινολικών παραγώγων, τα οποία αφθονούν στα γίγαρτα και στους βοστρύχους. Οι φλοιοί είναι εξάλλου πλούσιοι σε αρωματικά συστατικά και αρωματικούς προδρόμους, καθώς και πληθώρα ουσιών που συνιστούν το κηρώδες επικάλυμμα του φλοιού, την ανθρότητα. Ανάλογα με τον τρόπο που εργάζεται ο οινοποιός, το υδροαλκοολικό διάλυμα που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση εμπλουτίζεται λιγότερο ή περισσότερο με τα συστατικά του φλοιού και των γιγάρτων. (Τσακίρης, 2017)

Οι κατηγορίες της οινοποίησης είναι η λευκή (ποσοστό 70% της εγχώριας οινοποιίας), η ερυθρή οινοποίηση (30% στην Ελλάδα), η ροζέ οινοποίηση (10% επί της ερυθράς οινοποίησης) και οι ειδικές οινοποιήσεις που αναφέρονται σε αφρώδεις και γλυκούς οίνους, με τις επιμέρους κατηγορίες αυτών. **Οι κατεργασίες που πραγματοποιούνται στην οινοποίηση χωρίζονται σε μηχανικές και χημικές. Μια σημαντική παράμετρος που λαμβάνουν υπόψη οι παραγωγοί οίνου είναι η επιλογή του κατάλληλου στελέχους μικροοργανισμού για να πραγματοποιηθεί η επιθυμητή διαδικασία.** Υπάρχουν διαφορετικά στοιχεία που καθιστούν τον κάθε μικροοργανισμό κατάλληλο για την

εκάστοτε οινοποίηση, όπως είναι η δυνατότητά τους να ζυμώνουν αρκετές κατηγορίες σακχαρούχων υποστρωμάτων. Επιπλέον, κάποιοι μικροοργανισμοί εμφανίζουν μεγαλύτερη αντοχή σε δυσκολίες κατά την αλκοολική ζύμωση, και ανταπεξέρχονται καλύτερα σε παραμέτρους όπως υψηλή θερμοκρασία, μεγάλη συγκεντρώση σακχάρων ή αυξημένα επίπεδα αιθανόλης. Τέλος, κάποιοι έχουν την ικανότητα ζύμωσης και των πεντοζών που εμπεριέχονται στο υπόστρωμα της ζύμωσης (Mohd Azhar et al., 2017).

Η τεχνική της οινοποίησης παίζει καθοριστικό ρόλο στην αλκοολική ζύμωση. Η επιλογή της ποικιλίας των σταφυλιών από την οποία προέρχεται το γλεύκος και η ωριμότητα σταφυλιών είναι σημαντικές καθότι αποτελούν την πρώτη ύλη οινοποίησης (Ribereau-Gayon, 1985, Bisson, 2000 & 2001).

Τα σταφύλια που έχουν προσβληθεί από φαιά σήψη περιέχουν ενώσεις που είναι τοξικές για τη ζύμη. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται εντοπισμένες στα στερεά μέρη του σταφυλιού και εξάγονται κυρίως με τις τελευταίες πιέσεις, οι οποίες καθίσταται να ζυμώνονται χωριστά (Τσακίρης, 2017). Επιπλέον, οι τανίνες (πολυφαινόλες) ενεργούν ως αναστολείς ανάπτυξης των κυττάρων των ζυμών και των βακτηρίων (Rose & Harrison, 1970, Bisson, 2001). Ο *S. cerevisiae* μπορεί να αναπτυχθεί ακόμα και σε περιβάλλον που περιέχει 3% τανίνες (Τσακίρης, 2017). Η διαύγαση του γλεύκους μπορεί να αποτελέσει αιτία καθυστέρησης της ζύμωσης, λόγω ελάττωσης του μικροβιακού φορτίου του γλεύκους. Η ελαφρά διαύγαση με καθίζηση των μεγάλων σωματιδίων του γλεύκους επιτρέπει την καλύτερη θρέψη των κυττάρων (Ribereau-Gayon, 1984, Bisson, 2001).

1.2.1 ΚΛΑΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΛΕΥΚΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Κλασική μέθοδος οινοποίησης ονομάζεται η τεχνική, κατά την οποία διεξάγονται ταυτόχρονα δυο φαινόμενα, η αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους παρουσία των στερεών μερών της σταφυλής (φλοιοί, γίγαρτα και ενδεχομένως βόστρυχοι) και η εκχύλιση των συστατικών των στερεών μερών της σταφυλής από το υδραλκοολικό διάλυμα που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση.

Σε χώρες με το κλίμα της Ελλάδας, αμέσως μετά τον τρυγητό, τα σταφύλια παραλαμβάνονται στο οινοποιείο και τοποθετούνται αρχικά σε ανοξείδωτες σταφυλοδόχους και ψύχονται. Η εποχή της συγκομιδής είναι η καλοκαιρινή περίοδος, (Ιούλιος – Σεπτέμβριος), και λόγω των υψηλών εξωτερικών θερμοοίνων είναι απαραίτητο αυτό το στάδιο, πριν την έναρξη της διαδικασίας της λευκής οινοποίησης. Μετά την ψύξη, ακολουθεί η διαλογή, με σκοπό την βελτίωση της ποιότητας κατά 3 – 5%. Η ταινία διαλογής οδηγεί τα σταφύλια πάλι στη σταφυλοδόχο. Με τη βοήθεια του κοχλία οδηγούνται στο εκραγιστήριο, όπου διαχωρίζονται οι ράγες από τους βόστρυχες, τη λεγόμενη αποβοστρίχωση. Στη συνέχεια, κατά το στάδιο της έκθλιψης, οι ράγες περνούν ανάμεσα από τους κυλίνδρους του θλιπτηρίου όπου σπάζουν και απελευθερώνεται μέρος του χυμού τους. Η σταφυλομάζα που παραλαμβάνεται, οδηγείται στο πιεστήριο και γλευκοποιείται. Υπάρχουν διάφορα είδη πειστηρίων στα οινοποιεία. Ο χυμός που συλλέγεται από το πιεστήριο, χωρίς να ασκηθεί πίεση ή με την εφαρμογή χαμηλής πίεσης στη σταφυλομάζα καλείται πρόρογος χυμός και είναι πιο ποιοτικός από τους χυμούς που προκύπτουν έπειτα από πίεση. Οι διαφορές του εντοπίζονται στην τιμή της ενεργού οξύτητας (pH), της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες κ.α. Σε πολλές περιπτώσεις οινοποιείται ξεχωριστά, αφού δίνει ανώτερης ποιότητας προϊόντα. Έπειτα, το γλεύκος οδηγείται σε δεξαμενή, όπου ψύχεται για κάποιο χρονικό διάστημα (συνήθως μία νύχτα περίπου), ώστε να επιβραδυνθεί η έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, όπου και λαμβάνει χώρα η επεξεργασία του.

Εκτός από τις χημικές επεξεργασίες που πραγματοποιούνται, όπως θείωση, εμπλουτισμός σε σάκχαρα και διόρθωση της οξύτητας, στη λευκή οινοποίηση εφαρμόζονται και άλλες επεξεργασίες φυσικές, όπως η απολάσπωση (απομάκρυνση της υποστάθμης) και φυσικοχημικές, όπως η προσθήκη μετετονίτη.

Η θείωση στη λευκή οινοποίηση γίνεται πιο επιτακτική, διότι οι επιδράσεις της οξειδωσης στο χρώμα και στο πρωτογενές άρωμα είναι πιο έντονες και πιο εμφανείς. Επιπλέον, τα λευκά γλεύκη και οι λευκοί οίνοι δε διαθέτουν επαρκή ποσότητα φαινολικών ενώσεων για την άμυνά τους ενάντια στην οξείδωση.

Οι ποσότητες του θειώδη ανυδρίτη, που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στο στάδιο της γλευκοποίησης για την παραγωγή λευκών οίνων, κυμαίνονται από 6-8 g/hl στα υγιή σταφύλια και από 10-12 g/hl στα προσβεβλημένα από σήψη. Τα μέγιστα και τα ελάχιστα των δόσεων αυτών εξαρτώνται, επίσης, από την οξύτητα του γλεύκους (οι πιο μικρές δόσεις αντιστοιχούν στις πιο υψηλές οξύτητες) και τη θερμοκρασία αυτού. Υψηλές θερμοκρασίες του γλεύκους απαιτούν υψηλότερες δόσεις θειώδη ανυδρίτη.

Ο εμπλουτισμός της σταφυλομάζας ή του γλεύκους σε σάκχαρα επιτυγχάνεται με βιολογικές, φυσικές και χημικές μεθόδους. Ακολούθως, οι διορθώσεις που μπορούν να λάβουν χώρα στην οξύτητα της σταφυλομάζας είναι είτε η αύξηση, είτε η μείωση αυτής. Στην οινοποίηση λευκών ξηρών οίνων, η βελτίωση της οξύτητας γίνεται, όταν είναι μικρότερη από 4 g/l ή μεγαλύτερη από 7 g/l, εκφρασμένη σε H₂SO₄. Στην πρώτη περίπτωση, η ολική οξύτητα αυξάνει με προσθήκη 50-100 g τρυγικού οξέος ανά εκατόλιτρο οίνου, η οποία επιφέρει αύξηση περίπου ίση με

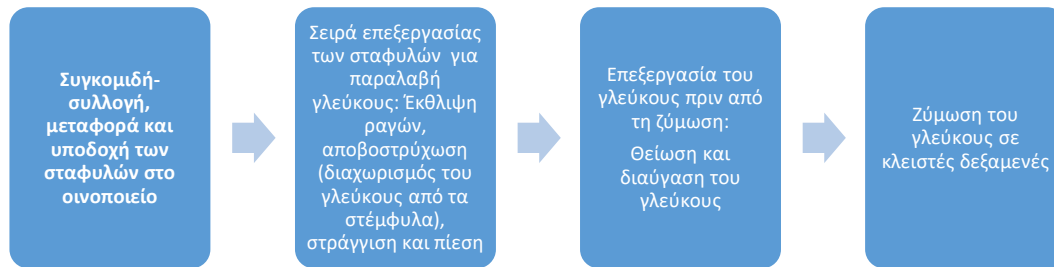
0,25-0,5 g/l, αντιστοιχώς. Υψηλότερη ποσότητα τρυγικού οξέος καθιστά τους οίνους τραχείς. Στη δεύτερη περίπτωση, η μείωση της οξύτητας γίνεται προσθέτοντας 50-100 g ανθρακικού ασβεστίου ανά εκατόλιτρο οίνου, η οποία αντιστοιχεί σε μείωση ίση περίπου με 0,5-1 g/L, εκφρασμένη σε H₂SO₄. Στις ελληνικές κλιματολογικές συνθήκες, επιβάλλεται συχνά μάλλον η αύξηση της οξύτητας, ενώ η ανάγκη ελάττωσης της είναι τουλάχιστον πολύ σπάνια. Για το ύψος πάντως των διορθώσεων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η προτίμηση των καταναλωτών. Οποιαδήποτε πάντως, διόρθωση του γλεύκους οφείλει να γίνεται μετά την απολάσπωση. Στους λευκούς οίνους, σε γενικές γραμμές, η διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης δεν επιδιώκεται.

Ακολούθως, λαμβάνει χώρα η απολάσπωση του γλεύκους ή απομάκρυνση της υποστάθμης είναι ένας άλλος τρόπος περιορισμού της εκχύλισης των συστατικών των στερεών μερών του σταφυλιού που έχει σημαντική σπουδαιότητα για τους λευκούς οίνους. Κανόνας στη λευκή οινοποίηση είναι η ζύμωση να γίνεται σε όσο το δυνατόν περισσότερο διαυγές γλεύκος. Διακρίνονται τρεις τρόποι απομάκρυνσης της υποστάθμης, **η στατική απολάσπωση** που είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος και συνίσταται στην καθίζηση των στερεών συστατικών, όπως πηκτινικές ουσίες, στερεά σωματίδια που προέρχονται από τη σταφυλή κ.α. σχηματίζοντας τις λεγόμενες οινολάσπες, οι οποίες είναι ανεπιθύμητες για την παραγωγή ποιοτικών οίνων και η απόμάκρυνση του διαχωρισμού του γλεύκους και της υποστάθμης με μετάγγιση του γλεύκους σε δεξαμενή όπου θα λάβει χώρα η αλκοολική ζύμωση, **η δυναμική απολάσπωση ή απολάσπωση με φυγοκέντρωση (υψηλό κόστος)**, η οποία λαμβάνει χώρα αμέσως μετά την παραλαβή του, είτε μετά από μερική απολάσπωση με τη στατική μέθοδο και είναι πολύ γρήγορη και πιο αποτελεσματική, δυνάμενη να απομακρύνει ακόμη και σωματίδια με διάμετρο 0,01mm και τέλος **η απολάσπωση με επίπλευση**, η οποία έχει πολλαπλά πλεονεκτήματα, όπως μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι της κλασικής, ελεγχόμενη ποιότητα διήθησης, συνεχή λειτουργία και ταχύτητα εργασίας και προστασία του γλεύκους από την οξειδωση λόγω του αδρανούς αερίου. **Η επίπλευση** στηρίζεται στη διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στο ειδικό βάρος των στερεών σωματιδίων ή των σφαιριδίων υγρού και του ειδικού βάρους του υγρού μέσα στο οποίο αιωρούνται. Ο διαχωρισμός αυτός «στερεού-υγρού» και «υγρού-υγρού» εφαρμόζεται μόνο σε σωματίδια, των οποίων το ειδικό βάρος είναι μικρότερο από εκείνο του υγρού που τα περικλείει (φυσική επίπλευση). Μερικές φορές, βασιζόμενοι στην ιδιότητα κάποιων στερεών ή υγρών σωματιδίων να ενώνονται με φυσαλίδες αδρανών σωματιδίων, δημιουργούνται «σύνολα» «σωματιδίων-αερίου» που έχουν μικρότερη πυκνότητα από το υγρό που τα περιέχει (προκαλούμενη επίπλευση). Η απολάσπωση με διήθηση δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Τέλος, πραγματοποιείται η προσθήκη του μπετονίτη, η οποία ενδείκνυται να γίνεται στο γλεύκος και όχι στον οίνο και μάλιστα πριν από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Η εφαρμογή του στην κατάλληλη αυτή στιγμή έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απαιτούμενης εργασίας, τη μικρότερη ταλαιπωρία του παραγόμενου οίνου και την καθίζηση του μπετονίτη μετά την αλκοολική ζύμωση, χωρίς επαύξηση του όγκου της οινολάσπης. Η χρήση του μπετονίτη έχει ως αποτέλεσμα τον ελαφρό αποαρωματισμό του γλεύκους και την απομάκρυνση μέρους των πρωτεϊνών που υπάρχουν στον οίνο, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο του πρωτεϊνικού θολώματος. Οι πρωτεΐνες έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν συσσωματώματα, τα οποία δημιουργούν θολώματα. Επίσης, γίνεται μερική δέσμευση των οξειδωτικών ενζύμων (πολυφαινολοξυδάσες), υποβοηθώντας έτσι τη δράση του θεώδη ανυδρίτη. Οι οίνοι βελτιώνονται οργανοληπτικά καθώς και ενισχύεται η φυσική τους διάγυση. Με μπετονίτη, οι οίνοι προστατεύονται από τα θολώματα χαλκού κ.ά. Ο μπετονίτης είναι άργιλος κολλοειδούς μορφής και έχει τύπο Al₂O₃, 4SiO₂, x H₂O). Είναι φορτισμένος με αρνητικό φορτίο και διακρίνεται για τη μεγάλη προσροφητική του ικανότητα. Με πρωτεΐνες, οι οποίες είναι θετικά φορτισμένες, σχηματίζει μεγάλα συσσωματώματα και καθιζάνει. Έχει την ιδιότητα, επίσης, να απορροφά νερό και να διογκώνεται, έτσι ώστε να αποκτά μεγάλη επιφάνεια προσρόφησης. Ο μπετονίτης μπορεί επιπλέον να σχηματίσει μεγαλομοριακά συσσωματώματα με μόνη την επίδραση της οξύτητας και των διαφόρων αλάτων. Καθιζάνοντας, ο μπετονίτης με τη μορφή των συσσωματωμάτων συμπαρασύρει και άλλα στερεά σωματίδια που αιωρούνται στο γλεύκος. Οι ιδιότητες αυτές, συντελούν, ώστε η άργιλος αυτή να χρησιμοποιείται ευρύτατα στην οινοποιία. Η προσθήκη μπετονίτη γίνεται μετά τη διάλυση της σκόνης ή των κόκκων μέσα σε περιέκτη που έχει μικρή ποσότητα γλεύκους. Στη συνέχεια, προστίθεται στο γλεύκος με ζωνρή ανάδευση. Οι δόσεις που χρησιμοποιούνται, εξαρτώνται από την περιεκτικότητα του γλεύκους σε πρωτεΐνες και από την ποιότητα του μπετονίτη και κυμαίνονται από 50 έως 100 g/hl γλεύκους. Η προσθήκη μπετονίτη συνίσταται να γίνεται μετά την απολάσπωση, διότι σε αντίθετη περίπτωση καθυστερεί την πτώση των στερεών σωματιδίων και αυξάνει τον όγκο της υποστάθμης. (Τσακίρης 2017, Σουφλερός 2015)

Το προκύπτον γλεύκος είναι πιο διαυγές και έτσι ενισχύεται το αρωματικό προφίλ του τελικού προϊόντος. Στο στάδιο αυτό, εκκινεί η αλκοολική ζύμωση, συνήθως, με επιθυμητά εμβόλια καλλιέργειας στελεχών σακχαρομύκητα. Οι αυθόρμητες ζυμώσεις με γηγενείς ζυμομύκητες του φλοιού των ραγών των σταφυλιών, οι οποίοι έχουν συνήθως ευαισθησία στο θεώδη ανυδρίτη και στα υψηλά ποσοστά αιθανόλης, σε βιομηχανικό επίπεδο αποφεύγονται, καθώς η ζύμωση για πολλούς λόγους διατήρησης ποιότητας και απόδοσης (συγκεντρώσεις μεταβολιτών κ.ά.) επιβάλλεται να είναι ελεγχόμενη. Η οινοποίηση, δεν αποτελεί απλώς την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους, αλλά κυρίως τη διαδικασία εξαγωγής του καλύτερου μέρους των ραγών, ώστε να περιοριστεί η διάχυση συστατικών, ικανών να προκαλέσουν

οσφρητικά και γευστικά ελαττώματα (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Η ευνοϊκότερη θερμοκρασία ζύμωσης για τα λευκά κρασιά είναι 16-20 °C, ενώ χαμηλότερες θερμοκρασίες, έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση των αρωματικών ενώσεων του παραγόμενου οίνου. Μόλις ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση, δηλαδή η μετατροπή σακχάρων σε αλκοόλη, ακολουθείται μια σειρά διεργασιών για την φροντίδα του οίνου. Η μηλογαλακτική ζύμωση, η μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό από τα βακτήρια, συνήθως δεν επιδιώκεται στους λευκούς οίνους, διότι η σχετική οξύτητα τους είναι επιθυμητή για οργανοληπτικούς λόγους (Τσακίρης, 2017). Η λευκή οινοποίηση οδηγεί σε παραγωγή οίνων λευκού χρώματος. Στους οίνους αυτούς δεν απουσιάζει το χρώμα, απλά αυτό οφείλεται σε κίτρινες χρωστικές. Η ποικιλία που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς επίσης και τα διάφορα στάδια οινοποίησης που ακολουθούνται καθορίζουν τον τύπο του οίνου που θα παραχθεί.



Εικόνα 1. Στάδια διαδικασίας που ακολουθείται κατά τη λευκή Οινοποίηση (σχήμα σύμφωνα με την περιγραφή, Τσακίρης, 2017)

Οι λευκοί οίνοι, κατά γενικό κανόνα, παράγονται από τη αλκοολική ζύμωση του γλεύκους που προκύπτει από λευκά σταφύλια, η οποία πραγματοποιείται αποκλειστικά στο χυμό (γλεύκος), χωρίς την παρουσία των στερεών συστατικών του σταφυλιού (στεμφύλων κ.ά.(Σουφλερός, 2015), αυτό επιτυγχάνεται χάρη στη γρήγορη εξαγωγή του γλεύκους από τα σταφύλια με τη χρήση πιεστηρίων. Επομένως, κύρια χαρακτηριστικά της λευκής οινοποίησης, είναι η απουσία εκχύλισης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και ο διαχωρισμός του γλεύκους σε κλάσματα. Για τους λόγους αυτούς, τόσο η εξαγωγή του γλεύκους, όσο και η οινοποίηση έχουν μεγάλη σημασία. Ο διαχωρισμός του γλεύκους από τα στέμφυλα γίνεται πριν από τη ζύμωση, ώστε η εκχύλιση να ελαχιστοποιείται. Η σπουδαιότερη διαφορά, ανάμεσα στη λευκή και στην ερυθρή οινοποίηση έγκεινται στο γεγονός ότι η πρώτη δε χαρακτηρίζεται από τη συμπαραμονή των στεμφύλων μέσα στο χυμό, γεγονός που περιορίζει στο ελάχιστο την εκχύλιση των διαφόρων συστατικών των στερεών μερών του σταφυλιού. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, υπάρχουν περιπτώσεις που ο λευκός οίνος παράγεται από ερυθρές ποικιλίες σταφυλιών, όπως συμβαίνει με τον καμπανίτη οίνο (Champagne) και περιπτώσεις, όπου η ζύμωση μπορεί να γίνει παρουσία στεμφύλων λευκών ποικιλιών. Αυτοί όμως σπανίζουν και αποτελούν εξαίρεση στην παραγωγή λευκών οίνων (Σουφλερός, 2015).

1.2.2 ΠΡΟΖΥΜΩΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η προζυμωτική (κρυο)εκχύλιση «coldmaceration» είναι μία τεχνική που περιλαμβάνει εκχύλιση στην υδατική φάση, εφόσον, οι χαμηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται (4-15°C) έχουν ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξης της αλκοολικής ζύμωσης. Συνήθως γίνεται σε ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα για την αναστολή των μεταβολικών δράσεων των ζυμών.

Μόνο στην περίπτωση της προζυμωτικής εκχύλισης, πραγματοποιείται μικρή εκχύλιση για την παραλαβή των αρωματικών συστατικών από τον φλοιό και τα κύτταρα κάτω από την επιδερμίδα των σταφυλιών. Εμφανίζονται αρκετά νωρίς, πριν την πλήρη ωρίμανση των σακχάρων, και για αυτό ένας πρώιμος τρύγος μπορεί να δώσει πιο αρωματικό κρασί. (Τσακίρης, 2017)

Έτσι κατά την προζυμωτική κρυοεκχύλιση ενοείται η εκχύλιση υδατοδιαλυτών συστατικών από τα στερεά μέρη του σταφυλιού όπως χρωστικές, πρόδρομες αρωματικές ουσίες, πολυσακχαρίτες και γλυκοζυλιομένα φαινολικά συστατικά (Casassa, 2015). Οι βασικοί παράγοντες που επιδρούν στο αποτέλεσμα της προζυμωτικής κρυοεκχύλισης είναι η ποικιλία, η σοδειά και ο βαθμός ωριμότητας του σταφυλιού(Mihne et al., 2015). Η τεχνική αυτή μπορεί να ενισχύσει τον αρωματικό χαρακτήρα των λευκών οίνων και παράλληλα, με την εκχύλιση ορισμένων φαινολικών συστατικών, να βελτιώσει τη δυνατότητα παλαιώσής τους. Από την άλλη πλευρά, εκχυλίζονται και συστατικά με μη επιθυμητά φυτικά αρωματικά συστατικά καθώς και συστατικά που ενισχύουν την στυπτικότητα του οίνου. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να

πραγματοποιείται μια ισορροπημένη εκχύλιση με βασικές παραμέτρους το χρόνο, τη θερμοκρασία, τη χρήση θειώδη ανυδρίτη και τη χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων (Sokolowsky et al., 2015).

Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες κρυσταλλοποίησης παρατηρήθηκε μικρότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, μικρότερη χρωματική ένταση αλλά και υψηλότερη συγκέντρωση εστέρων, οι οποίοι επιδρούν αρωματικά στον οίνο, σε σχέση με τις υψηλότερες θερμοκρασίες κρυσταλλοποίησης (Sacchi et al., 2005). Αναφορικά με την εκχύλιση των φαινολικών, η προζυμωτική κρυσταλλοποίηση αυξάνει τη συγκέντρωση των φλαβονοειδών στο γλεύκος, και πιο συγκεκριμένα της κατεχίνης και της επικατεχίνης ενώ δεν επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση των μη φλαβονοειδών όπως το καφταρικό οξύ. Παράλληλα με τα φαινολικά εκχυλίζεται και κάλιο στο γλεύκος. Το κάλιο αντιδρά με το τρυγικό οξύ προς παραγωγή οξίνου τρυγικού καλίου, το οποίο ιζηματοποιείται. Έτσι, η συγκέντρωση του τρυγικού οξέος και η οξύτητα του γλεύκους μειώνεται ενώ το pH αυξάνεται (Sokolowsky et al., 2015). Με την εφαρμογή της προζυμωτικής εκχύλισης συνεπώς έχει αποδειχθεί ότι προκαλείται μείωση της ολικής οξύτητας του γλεύκους η οποία συνοδεύεται με αύξηση του pH (Jackson, 2008).

Η τεχνολογία που εφαρμόζεται στην προζυμωτική φάση επηρεάζει σημαντικά τη μετέπειτα ποιότητα των λευκών ξηρών οίνων. Αυτή η τεχνική χαρακτηρίζεται από μια περίοδο επαφής μεταξύ του γλεύκους και της σταφυλομάζας, μετά την έκθλιψη των ραγών αλλά πριν από την πίεση. Με γνώμονα το αξίωμα αυτό, η εφαρμογή μιας νέας τεχνικής, της maceration pelliculaire (επαφή γλεύκους και φλοιών) πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, θα είχε ως αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του γλεύκους με περισσότερα συστατικά, χαρακτηριστικά της ποικιλίας των σταφυλιών (αρωματικές ουσίες, κολλοειδή, φαινολικές ενώσεις κλπ). Τα συστατικά αυτά βρίσκονται, κυρίως, στο φλοιό των ραγών και η παρουσία τους στους οίνους δύναται να βελτιώσει το άρωμα τους, τη γεύση τους, το σώμα τους κλπ, χωρίς βέβαια να αυξηθεί η στυφή και η πικρή γεύση. Η διαδικασία αυτή μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα του οίνου λόγω της εκχύλισης των πρόδρομων αρωματικών συστατικών από τους φλοιούς των ραγών. Το ποικιλιακό άρωμα είναι υπεύθυνο για τα «φρουτώδη» και τα «αρώματα λουλουδιών» των λευκών οίνων. Τα ποικιλιακά χαρακτηριστικά μπορεί να αυξηθούν με την επαφή των φλοιών με το γλεύκος. Απαραίτητη ωστόσο προϋπόθεση, για να εφαρμοστεί η παραπάνω τεχνολογία, είναι η καλή ωρίμανση και η καλή υγιεινή κατάσταση του σταφυλιού. Οι δύο αυτοί παράγοντες αποτελούν τους εσωτερικούς παράγοντες. Σημαντική είναι επίσης, η επίδραση στο αποτέλεσμα της εκχύλισης και δύο εξωτερικών παραγόντων, που είναι η διάρκεια και η θερμοκρασία της προζυμωτικής εκχύλισης. Η πίεση της σταφυλομάζας και η απολάσπωση του γλεύκους και του οίνου δεν μπορεί να θεωρηθούν χωρίς σπουδαιότητα (Σουφλερός, 2017).

Η εφαρμογή της προζυμωτικής κρυσταλλοποίησης κατά τη λευκή οινοποίηση απέδειξε σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε λευκούς οίνους στη Γαλλία ότι αυξάνει τα πτητικά συστατικά των οίνων (Baumes et al., 1989). Η διαδικασία αυτή παρέχει πιο ισορροπημένους και πιο ολοκληρωμένους οίνους με ισχυρό σώμα στο στόμα. Ωστόσο κατά την διάρκεια του χρόνου η τυπικότητα του οίνου αλλάζει και συνήθως εμφανίζονται βαριά αρώματα. Κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών αρκετοί οινοπαραγωγοί έχουν πειραματιστεί στην εφαρμογή αυτής της μεθόδου με την ποικιλία Ασύρτικο, ώστε να καταφέρουν να παράγουν πιο έντονα αρωματικά λευκά κρασιά (Symeou et al, 2007).

1.2.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΚΛΑΣΙΚΗΣ ΛΕΥΚΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΖΥΜΩΤΙΚΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Τα κυριότερα συμπεράσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της προζυμωτικής κρυσταλλοποίησης σε σύγκριση με την κλασική λευκή οινοποίηση είναι τα εξής :

1. Μείωση της ολικής οξύτητας του γλεύκους και αύξηση του pH, οι μεταβολές αυτές συμβαίνουν καθώς το κάλιο μετατρέπει το τρυγικό οξύ σε άλας
2. Αύξηση των αζωτούχων ενώσεων (αμινοξέα, πρωτεΐνες) και των ουδετέρων πολυσακχαριτών.
3. Οι φαινολικές ενώσεις έχουν μικρό βαθμό διάχυσης στο γλεύκος όταν η σταφυλομάζα δεν αναδεύεται μηχανικά (Σουφλερός, 2017).
4. Η ένδειξη των ολικών φαινολών δεν παρουσιάζει τιμές συνηθισμένες. Η περιεκτικότητα σε ταννίνες εξαρτάται, κυρίως από τη διαδικασία πίεσης της σταφυλομάζας και από την παρουσία οινολάσπης κατά την αλκοολική ζύμωση και τη διατήρηση του οίνου
5. Η διάχυση των αρωματικών ενώσεων φαίνεται βραδύτερη από εκείνη ορισμένων άλλων συστατικών των φλοιών (κάλιο, φαινολικές ενώσεις) γεγονός που εξηγεί ότι οι πιο μακροχρόνιες προζυμωτικές εκχυλίσεις δίνουν καλύτερα αποτελέσματα.
6. Η επαφή φλοιών – γλεύκους ευνοεί την εκχύλιση πρόδρομων αρωματικών ενώσεων, οι οποίες μετατρέπονται σε άρωμα κατά την αλκοολική ζύμωση και την διατήρηση του οίνου.
7. Οι οίνοι μετά από την προζυμωτική κρυσταλλοποίηση είναι πιο μεστοί και δίνουν μια δομή πιο πλούσια, σε σχέση με αυτούς που προκύπτουν μετά από άμεση πίεση της σταφυλομάζας
8. Η μηλογαλακτική ζύμωση ευνοείται αισθητά (Navarre and Langlade, 2002). Ένα άλλο σημαντικό κομμάτι κατά τη διαδικασία της κρυσταλλοποίησης, είναι η επίδραση των γαλακτικών, οξικών βακτηρίων και των άγριων ζυμών. Θεωρείται

ότι οι άγριες ζύμες και τα βακτήρια όπως είναι τα ετεροζυμώσιμα γαλακτικά και οξικά βακτήρια, *Acetobacter*, *Brettanomyces* και *Kloeckera/Hanseniaspora* μένουν ενεργά στα γλεύκη κατά τη διάρκεια της κρυσταλλοποίησης. Η δράση τους είναι μάλλον θετική, διότι εκκρίνουν ένζυμα τα οποία αλληλεπιδρούν με τα συστατικά των πρόδρομων αρωμάτων και έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή πτητικών συστατικών του αρώματος τα οποία τελικά, συνεισφέρουν στην πολυπλοκότητα του οίνου.

Συνοψίζοντας, οι επιδράσεις της προζυμωτικής κρυσταλλοποίησης έναντι της κλασικής οινοποίησης είναι η μεγάλη αύξηση του φρουτώδους αρώματος (πτητικές ενώσεις) και ειδικά της συγκέντρωσης των τερπενίων στα λευκά γλεύκη. Παρατηρείται, αύξηση της αρωματικής έντασης και πολυπλοκότητας. Επιπλέον, λαμβάνει χώρα αύξηση αρώματος του στόματος, πιθανόν εξ' αιτίας των αυξημένων συγκεντρώσεων φαινολών, στις οποίες οφείλεται η αίσθηση στυφάδας, αλλά και εξ' αιτίας των πολυσακχαριτών. Στο Ασύρτικο, επειδή οι φλοιοί του περιέχουν περισσότερες φαινολικές ενώσεις από ότι άλλες λευκές ποικιλίες, πρέπει να παραμένει υπ' αυτές τις συνθήκες μόνον 4-5 ώρες. Τέλος, σημειώνεται αύξηση χρωματικής έντασης και χροιάς, (αποχρώσεις). Οι παραγόμενοι οίνοι διαθέτουν μέτρια στυφότητα και πλουσιότερο «σώμα» (Κεχαγιά, διδακτορική διατριβή, 2019).

1.2.4 ΘΕΙΩΔΗΣ ΑΝΥΔΡΙΤΗΣ

Το οξυγόνο αποτελεί εχθρό του λευκού οίνου, με ελάχιστες εξαιρέσεις, διότι αλλοιώνει το άρωμα, καταστρέφει τη φρεσκάδα και σκουραίνει το χρώμα. Η οξειδωτική του δράση αρχίζει από την έκθλιψη των σταφυλιών και συνεχίζεται πολύ πιο έντονη κατά τη στράγγιση, λόγω της μεγάλης επιφάνειας επαφής του με τον αέρα. Η οξειδωτική συνεχίζεται ακόμα και κατά την πίεση των στεμφύλων, την απολάσπωση του γλεύκους, τη ζύμωσή του κυρίως όταν γίνεται σε βαρέλια, τις μεταγίσεις και γενικά σε όλες τις φάσεις της επεξεργασίας του. Η οξειδωτική του γλεύκους ή του οίνου είναι ακόμη μεγαλύτερη, όταν προέρχεται από σταφύλια που έχουν προσβληθεί από σήψη και τα οποία περιέχουν πολλά οξειδωτικά ένζυμα, τα οποία διευκολύνουν την οξειδωτική, κυρίως, των χρωστικών και των αρωματικών στοιχείων και σχηματίζουν ουσίες στυφές και πικρές (Σουφλερός, 2015).

Ο θειώδης ανυδρίτης ή διοξείδιο του θείου, είναι ένα προϊόν που χρησιμοποιείται κυρίως από τα τέλη του 18ου αιώνα (Santos et al., 2012) και εφαρμόζεται συστηματικά στην οινολογία από τον 19ο αιώνα. Σήμερα αποτελεί το πιο σημαντικό και ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρητικό στην οινοποίηση και λόγω των πολλών ιδιοτήτων του η πλήρης αντικατάσταση του καθιστάται σχεδόν αδύνατη. Επιπλέον η ολική απουσία του SO₂ από τον οίνο σπάνια υφίσταται καθώς κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι ζύμες παράγουν μικρές ποσότητες SO₂ (Ribereau-Gayon et al., 2006), μέχρι 80g/l (Werner et al. 2008). Ανάλογα με την ανθεκτικότητα των ζυμών στο θειώδη ανυδρίτη, διακρίνονται τρεις ομάδες, οι ζύμες που αντέχουν μέχρι 100 mg/l θειώδη ανυδρίτη, όπως οι *Saccharomyces rosei*, *Kloeckera* και *Hanseniaspora*, οι ζύμες που μπορούν να επιβιώσουν μέχρι 150 mg/l SO₂, όπως οι *Saccharomyces ellipsoideus* και *Torulopsis stellata* και οι ζύμες που είναι ικανές ν' αναπτυχθούν σε υψηλές δόσεις SC>2, όπως οι *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces baillii* και *Saccharomycodes ludwigii*. Οι άγριες γηγενείς ζύμες θεωρούνται ιδιαίτερα ευαίσθητες στη θείωση του οινογλεύκους. Ο θειώδης ανυδρίτης προστίθεται σε διάφορες φάσεις της παραγωγικής διαδικασίας του οίνου προκειμένου να προστατεύσει το γλεύκος και τον οίνο από την οξειδωτική και την δράση των μικροοργανισμών. Το διοξείδιο του θείου χρησιμοποιείται με διάφορες μορφές ως αέριο SO₂, ως υγροποιημένο αέριο SO₂, ως διάλυμα όξινου θειώδους καλίου KHSO₃ και ως στερεό μεταθειώδες κάλιο (K₂S₂O₅) που είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μορφή του. Η επίδραση της προσθήκης στον οίνο είναι η ίδια ανεξάρτητα από τη μορφή χρήσης του διοξειδίου του θείου. Η ισορροπία που αποκαθίσταται μεταξύ των διαφόρων μορφών είναι η ίδια. Εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το pH και από την παρουσία μορίων που δεσμεύονται με το διοξείδιο του θείου. **Όσο υψηλότερο είναι το pH τόσο λιγότερος ο μοριακός SO₂, ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας συντελεί σε θεαματική αύξηση.** Ο θειώδης ανυδρίτης εμφανίζεται ως ελεύθερος και ως δεσμευμένος. **Το άθροισμα των τριών μορφών (μοριακού και ιοντικών) δίνει τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη.** Το άθροισμα του ελεύθερου και του δεσμευμένου θειώδους ανυδρίτη είναι ίσο με τον ολικό θειώδη ανυδρίτη.

Στη σχέση μοριακού ως προς ελεύθερο SO₂ σημαντικό ρόλο παίζει και η συγκέντρωση της αλκοόλης. Για το ίδιο pH και την ίδια συγκέντρωση ελεύθερου SO₂, η συγκέντρωση του μοριακού SO₂ είναι ανάλογη του αλκοολικού τίτλου του διαλύματος.

Ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης στα υδατικά διαλύματα των οίνων (σε pH 3-4) βρίσκεται σε δύο μορφές: τη μοριακή (SO₂), η οποία είναι και περισσότερο δραστήρια και τις ιοντικές: όξινο θειώδες ανιόν (HSO₃⁻), θειώδες ανιόν (SO₃²⁻) (Fugelsang and Edwards, 2007). Η μοριακή μορφή (SO₂), είναι αυτή που έχει το κυριότερο ρόλο στην τροποποίηση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του οίνου. Το SO₂ είναι 100 φορές πιο δραστήριο από το HSO₃⁻ (Τσακίρης, 2014). Το ποσοστό του μοριακού SO₂ αυξάνει ανάλογα με τα επίπεδα της αλκοόλης και τη θερμοκρασία, καθόσον οι παράγοντες αυτοί

επηρεάζουν την ισορροπία της αντίδρασης. Επίσης, εξαρτάται και από το pH του οίνου, στο οποίο η δραστική μορφή του θειώδους, η μοριακή, αντιπροσωπεύει πολύ μικρό ποσοστό και όσο αυξάνει το pH τόσο μειώνεται ενώ επικρατεί η μορφή του όξινου θειώδους ανιόντος (HSO_3^-) (Fugelsang and Edwards, 2007, Ribereau-Gayon et al., 2006). Στον οίνο ο θειώδης ανυδρίτης έχει την ιδιότητα να ενώνεται με ουσίες που διαθέτουν καρβονυλικές ομάδες (αντιδρά με σάκχαρα, πτητικές ουσίες, πρωτεΐνες και ανθοκυάνες δίνοντας ασταθείς ενώσεις αλλά και με την ακεταλδεϋδη προς σχηματισμό σταθερών ενώσεων), παράγοντας ασταθείς ή σταθερές ενώσεις. Ο δεσμευμένος θειώδης ανυδρίτης ανεξαρτήτως αν σχηματίζει σταθερές ή ασταθείς ενώσεις είναι ανενεργός. Η μέτρηση του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη σε διαφορετικές θερμοκρασίες δείχνει αύξηση του με την αύξηση της θερμοκρασίας και αντίστοιχη μείωση του ενωμένου θειώδη ανυδρίτη. (Ribereau-Gayon et al., 2006, Τσακίρης, 2017).

Οι κύριες ιδιότητες του θειώδη ανυδρίτη

Οι περισσότερες ιδιότητες που αποδίδονται στο θειώδη ανυδρίτη οφείλονται αποκλειστικά στον ελεύθερο θειώδη. Όσον αφορά τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες, το πιο δραστικό τμήμα του ελεύθερου θειώδους είναι ο μοριακός SO_2 , ο οποίος επιδρά επί των ζυμών, έχοντας την ικανότητα να διέρχεται από την ημιπερατή μεμβράνη των κυττάρων τους (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Αντίθετα, ο ενωμένος SO_2 είναι ανενεργός και δεν έχει καμία από τις πολύτιμες ιδιότητες του ελεύθερου SO_2 και γι' αυτό το λόγο θεωρείται "παθητικός", ενώ παράλληλα αυξάνει τον ολικό θειώδη ανυδρίτη χωρίς να προσφέρει ουσιαστικές υπηρεσίες. Ωστόσο, οι ασταθείς ενώσεις που σχηματίζει ο θειώδης ανυδρίτης έχουν χρησιμότητα, γιατί αποθηκεύουν τον θειώδη και όταν επέρχεται μείωση του ελεύθερου SO_2 στους οίνους, υδρολύονται απελευθερώνοντας τον (Ribereau-Gayon et al., 2006).

1. Αντιμικροβιακές: εμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Έχει μεγαλύτερη δράση σε βακτήρια παρά σε ζυμομύκητες. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει ανασταλτική δράση, ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις καταστρέφει ποσοστό του μικροβιακού πληθυσμού. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του οίνου, το SO_2 εμποδίζει την ανάπτυξη όλων των τύπων μικροοργανισμών (ζυμομύκητες, γαλακτικά βακτήρια και, σε μικρότερο βαθμό, οξικά βακτηρίδια) και την ανεπιθύμητη έναρξη μηλογαλακτικής ζύμωσης. Ακόμη, με την αντιμικροβιακή δράση, εμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών που μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου και να το προφυλάξει από την επίδραση του οξυγόνου
2. Αντιοξειδωτικές: Ο θειώδης ανυδρίτης αντιδρά αργά με το οξυγόνο με σχηματισμό SO_3
 $\text{SO}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_3$. Έτσι, προστατεύει τον οίνο από χημική οξείδωση. Το SO_2 προστατεύει το κρασί από υπερβολικά έντονη οξείδωση των φαινολικών του ενώσεων και κάποιων ενώσεων του αρώματος του. Ακόμη, συνεισφέρει στη δημιουργία χαμηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής, που ευνοεί την ανάπτυξη αρώματος και γεύσης κατά την παλαίωση και την αποθήκευση του οίνου
3. Αντιοξειδασικές: αναστέλλει άμεσα τη δράση των οξειδωτικών ενζύμων (τυροσινάση, λακκάση) και με την πάροδο του χρόνου τα καταστρέφει. Έτσι, προστατεύει το γλεύκος από την οξείδωση πριν τη ζύμωση. Επίσης, βοηθάει στην αποφυγή θολώματος οξείδωσης σε λευκούς και ερυθρούς οίνους που παρασκευάζονται από σάπια σταφύλια
4. Δέσμευση ακεταλδεϋδης και άλλων συναφών ενώσεων (Ποιοτική βελτίωση): επιτρέποντας στο κρασί να διατηρήσει τη φρεσκάδα και το άρωμα του
Μέχρι σήμερα κανένα προϊόν δεν μπορεί να αντικαταστήσει το θειώδη ανυδρίτη ως αντισηπτικό και ταυτόχρονα ως αντιοξειδωτικό. (Ribereau-Gayon et al., 2006, Τσακίρης, 2017).

Δοσολογία του θειώδη ανυδρίτη

Μεγάλες ποσότητες ολικού θειώδη ανυδρίτη έχει βλαβερά αποτελέσματα στην υγεία, καθώς είναι τοξικό για τον ανθρώπινο οργανισμό. Ακόμα, υποβαθμίζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (Τσακίρης, 2017). Υψηλές δόσεις θειώδη ανυδρίτη εξουδετερώνουν το άρωμα, ενώ ακόμα μεγαλύτερες ποσότητες παράγουν χαρακτηριστικά ελαττώματα αρώματος, όπως η αίσθηση καψίματος στην επίγευση. Από την άλλη, σε ανεπαρκείς συγκεντρώσεις του θειώδη ανυδρίτη μπορεί με οξείδωση ή με μικροβιακή ανάπτυξη να επηρεάσει τη σταθερότητα του οίνου και να θέσει σε κίνδυνο την ποιότητα του (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Δεν είναι εύκολο να υπολογιστούν οι ακριβείς ποσότητες που απαιτούνται, λόγω της πολύπλοκης χημικής ισορροπίας του θειώδη ανυδρίτη στον οίνο (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Λόγω των προβλημάτων υγείας που σχετίζονται με τη χρήση του SO_2 , η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization- WHO) συνέστησε να περιοριστεί όσο το δυνατόν περισσότερο ή και να καταργηθεί πλήρως η χρήση του SO_2 στην επεξεργασία τροφίμων (WHO, 2009) και ο Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου (OIV) μείωσε προοδευτικά τη μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση του στους οίνους (Garcia-Ruiz et al., 2009), η οποία είναι 150 mg / L για ερυθρούς οίνους και 200 mg / L για τους λευκούς και ροζέ οίνους (Regulation (EC) No 607/2009).

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα του Θειώδη Ανυδρίτη

Η χρησιμοποίηση του θειώδη ανυδρίτη στις κατάλληλες δόσεις και η ταχύτητα εκτέλεσης των διαφόρων ενεργειών μεταποίησης των σταφυλιών σε γλεύκος δίνουν καλά αποτελέσματα για την προστασία του γλεύκους από την οξείδωση. Ο θειώδης ανυδρίτης ενεργεί τόσο με τις αναγωγικές και αντιοξειδωτικές του χημικές ιδιότητες (πρωταρχική δέσμευση οξυγόνου), όσο και με τις αντιοξειδασικές, στις οποίες οφείλεται η αδρανοποίηση ή η καταστροφή των ενζύμων που διευκολύνουν την οξείδωση των διαφόρων συστατικών των οίνων.

Συγκεκριμένα, το SO₂ δρα έναντι ενός ευρέως φάσματος μικροοργανισμών, αναστέλλει την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, των γαλακτικών βακτηρίων και, σε μικρότερο βαθμό, των οξικών βακτηρίων κατά την αποθήκευση του οίνου (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Επίσης, η ένωση αυτή εμποδίζει την ανεπιθύμητη έναρξη μηλογαλακτικής ζύμωσης, αναστέλλοντας την ανάπτυξη *Brettanomyces* και μικροδερμικών ζυμών, και προφυλάσσει τους οίνους από διάφορα ελαττώματα βακτηριακής προέλευσης (Bakker *et al.*, 1998, MacHado *et al.*, 2009). Εκτός από τις αντισηπτικές του ιδιότητες, το SO₂ καταπολεμά την οξείδωση του οίνου (Karbowiak *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2008).

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να δράσει άμεσα ή έμμεσα με διάφορους τρόπους. Άμεσα, διότι αντιδρά με το οξυγόνο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οξειδώνεται ο ίδιος και έτσι προφυλάσσει άλλα ευοξειδωτα συστατικά του οίνου. Έμμεσα δρα απενεργοποιώντας τις οξειδάσες, ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης (Oliveira *et al.*, 2011). Εμποδίζει την αμαύρωση ('καφέτιασμα'), απενεργοποιώντας ένζυμα όπως η πολυφαινολοξειδάση (PPO), η υπεροξειδάση (POD) και οι πρωτεάσες, και επίσης αναστέλλοντας τις αντιδράσεις Maillard (Garde-Cerdan *et al.*, 2008).

Το SO₂ διευκολύνει την εκχύλιση πρωτογενών αρωματικών συστατικών, χρωστικών και φαινολικών ενώσεων από τον φλοιό των σταφυλιών και βοηθάει την σταθεροποίηση του χρώματος του οίνου κατά τη ωρίμανση του (Bakker *et al.*, 1998). Επιπλέον με την προσθήκη του θειώδους ανυδρίτη αναβαθμίζεται η οργανοληπτική ποιότητα του οίνου, καθώς δεσμεύεται με κάποια συστατικά τα οποία έχουν δυσάρεστη οσμή ή γεύση όπως το πυροσταφυλικό οξύ και η ακεταλδεΐδη (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Ταυτόχρονα, αυξάνει την οξύτητα σχηματίζοντας H₂SO₃ και δρα ως διαυγαστικός παράγοντας καθώς ευνοεί τη συσσωμάτωση κolloειδών συστατικών και εν τέλει την καταβύθιση τους (Giacosa *et al.*, 2019).

Παρά τα πλεονεκτήματα του SO₂, σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει οργανοληπτικές αλλοιώσεις στον οίνο, εξουδετερώνοντας το άρωμα ή δημιουργώντας χαρακτηριστικά ελαττωματικά αρώματα, μπορεί να αυξηθεί η αίσθηση σκληρότητας στο τελικό προϊόν αλλά και να αναστείλει την έναρξη της αλκοολικής και μηλογαλακτικής ζύμωσης (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Αντίθετα, μια ανεπαρκής συγκέντρωση δεν εξασφαλίζει την επαρκή σταθερότητα του οίνου, όσον αφορά τις οξειδώσεις και την μικροβιακή ανάπτυξη, γεγονός που μπορεί να υποβαθμίσει την ποιότητά του οίνου. Επιπλέον, τα θειώδη που προέρχονται από την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη στον οίνο σχετίζονται με διάφορα προβλήματα υγείας σε ορισμένους καταναλωτές. Η παρουσία του στον οίνο έχει συσχετιστεί με αλλεργικές αντιδράσεις ή με δυσανεξία σε ορισμένους καταναλωτές. Τα περισσότερα μη ασθματικά άτομα μπορούν να ανεχθούν έως και 5 ppm, ενώ τα ευαίσθητα άτομα αντιδρούν αρνητικά στην κατάποση των θειωδών και μπορεί να εμφανίσουν μια σειρά από συμπτώματα όπως δερματίτιδα, κνίδωση, αγγειοοίδημα, κοιλιακό άλγος, διάρροια, βρογχοσυστολή (Gastaminza *et al.*, 1995) και αναφυλαξία (Vally *et al.*, 2009, Guerrero *et al.*, 2015).

Συνεπώς, εξαιτίας όλων των παραπάνω, για την προστασία του γλεύκους από την οξείδωση πέραν του θειώδη ανυδρίτη, έχει γεννηθεί η ανάγκη για την ανεύρεση **εναλλακτικών συντηρητικών ή καινοτόμων τεχνικών** που να τον αντικαθιστούν, εν μέρει εάν όχι πλήρως. Ωστόσο, η προϋπόθεση για την αντικατάσταση του είναι να παρέχεται παρόμοιο αντισηπτικό αποτέλεσμα και αντιοξειδωτική δράση, εξασφαλίζοντας ένα ποιοτικό τελικό προϊόν, αλλά χωρίς να υπάρχουν αρνητικές συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία. Έχουν δοκιμασθεί άλλες ουσίες και άλλες τεχνικές, ως υποκατάστατα Θειώδους Ανυδρίτη. Εναλλακτικά Συντηρητικά αποτελούν οι αντιμικροβιακοί Παράγοντες: Λυσοζύμη, Σορβικό Οξύ, Δικαρβονικός διμεθυλεστερας (DMDC), Χιτοζάνη, Βακτηριοσίνες και το Κolloειδές σύμπλοκο αργύρου (CSC), ενώ στους Αντιοξειδωτικούς Παράγοντες ανήκουν η Γλουταθειόνη, το Ασκορβικό Οξύ, οι Φαινολικές Ενώσεις, τα Φυτικά Εκχυλίσματα. Οι Τεχνικές Υποκατάστασης SO₂ αποτελούν τα Παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF), η Υπεριώδης Ακτινοβολία, οι Υπέρηχοι και η Υψηλή Υδροστατική Πίεση (HHP). (Γεωργακάκη, μεταπτυχιακή εργασία, 2019)

Ενδεικτικά, αναφέρεται πιο αναλυτικά η χρησιμοποίηση του **ασκορβικού οξέος** για την αποφυγή οξείδωσης του γλεύκους (βιταμίνη C-αντιοξειδωτική προστασία με προσθήκη 10-20 g/hl, η **θερμική επεξεργασία της σταφυλόμαζας** (στους 70-75° C και γρήγορα στους 40-45° C και τέλος επαναφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος <20° C και αφήνεται να ζυμωθεί), Η **μέθοδος της θέρμανσης** του γλεύκους παρέχει πολύ καλή σταθερότητα στα γλεύκη σχετικά με την οξείδωση, αλλά καθιστά προβληματική τη φυσική διαύγαση του παραγόμενου οίνου, λόγω της καταστροφής των πηκτινολυτικών ενζύμων, για αυτό οφείλει να ακολουθείται από προσθήκη τέτοιων ενζύμων καθώς και προσθήκη καλλιέργειας ζυμομυκήτων. Συχνά διαπιστώνεται, επίσης, η αλλοίωση του αρώματος και ο οίνος αποκτά γεύση από αιθέρα. Τέλος, η **οινοποίηση σε ατμόσφαιρα από αδρανές αέριο** (επεξεργασία των σταφυλιών και του γλεύκους σε αναερόβιο περιβάλλον που δημιουργείται με τη διοχέτευση ενός αδρανούς αερίου, όπως αζώτου ή διοξειδίου του

άνθρακα) και άλλα. Η τεχνική αυτής της επεξεργασίας βελτιώνει την ένταση και τη λεπτότητα του αρώματος. Το γλεύκος, όμως, που προκύπτει συναντά πολλά προβλήματα στη ζύμωση και είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στο οξυγόνο ακόμα και με την πρώτη επαφή αποκτάει βαθύ κίτρινο χρώμα. Μπορεί να γίνει αναφορά και άλλες τεχνικές προστασίας του γλεύκους ή του οίνου από την οξείδωση, οι οποίες όμως δεν επιδρούν πλέον πάνω στο οξυγόνο ή στα οξειδωτικά ένζυμα, αλλά πάνω στο ίδιο το οξειδούμενο υπόστρωμα, δηλαδή τις πολυφαινόλες. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι η **δέσμευση των τανινών από σκόνη πολυαμιδίου (nylon)** έδινε μεγαλύτερη σταθερότητα στο χρώμα του οίνου και βελτίωνε τη φρεσκάδα του. Το **κολλάρισμα**, επίσης, του γλεύκους σε μεγάλες δόσεις (50-100 g/hl) καζείνης αποχρωματίζει και απομακρύνει τις οξειδωμένες πολυφαινόλες. Το **PVPP** (polyvinylpyrrolidone), τέλος, σε δόσεις 30 g/hl είναι εξίσου αποτελεσματικό. (Σουφλερός, 2015). Μια σχετικά νέα τεχνική για την προστασία του παραγόμενου λευκού οίνου από την οξείδωση αποτελεί η **υπεροξυγόνωση του γλεύκους**. Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους, βασίζεται στην πρ'οψη υπεροξείδωση με 50 mg O₂/l των ευοξειδωτων συστατικών του γλεύκους, έτσι ώστε η οξείδωση του προκύπτοντος οίνου να είναι περιορισμένη (Ribereau-Gayon, 2006). Κατά την τεχνική αυτή, οι φαινολικές ενώσεις δίνουν στο γλεύκος σκούρο χρώμα, το οποίο στη συνέχεια ακολουθείται από τον πολυμερισμό τους. Τα πολυμερή αυτά καθιζάνουν και απομακρύνονται αργότερα με τις απολασπώσεις ή/και με τη φυγοκέντρωση (Moreira et al. 2008). Με τη μείωση των φαινολικών ενώσεων, μειώνεται και η οξειδωτική εξέλιξη του προϊόντος και οδηγείται στην τελική σταθεροποίηση του χρώματος των λευκών οίνων. Αποτέλεσμα της περιορισμένης οξειδωτικής δραστηριότητας είναι η κατάργηση της προσθήκης θειώδους ανυδρίτη πριν τη ζύμωση και τη μείωση των απαραίτητων δόσεων τους οίνους (Cocolin et al. 2003). Τα υπεροξυγονωμένα γλεύκη παρουσιάζουν μεγαλύτερη χρωματική ένταση, η οποία μειώνεται σημαντικά κατά την αλκοολική ζύμωση. Στα γλεύκη αυτά, η οξύτητα είναι πιο μικρή, καθώς και οι συγκεντρώσεις των οξέων τρυγικού και μηλικού. Η απουσία θειώδους ανυδρίτη συνοδεύεται από κατώτερης ποιότητας απολάσπωση, γεγονός που επιβεβαιώνει την ικανότητα προς συσσωμάτωση του SO₂ (Guerrero et al. 2015). Όσον αφορά στους λευκούς οίνους, που προκύπτουν από υπεροξυγονωμένα γλεύκη, διαπιστώνεται ότι είναι φτωχότεροι σε φαινολικές ενώσεις, ενώ τα αρωματικά τους συστατικά κυμαίνονται, ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών. Τέλος, οι αλδεϋδικές ενώσεις περιέχονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με οίνους που δεν προέρχονται από υπεροξυγονωμένα γλεύκη. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης και ως διαδικασία επίπλευσης, με σκοπό την απομάκρυνση της λάσπης από την επιφάνεια του γλεύκους. (Yan-Kui Lin et al. 2012, Zoecklein et al. 1995)

Ο συνδυασμός του ασκορβικού οξέος με το θειώδη ανυδρίτη φαίνεται να παρέχει καλύτερη προστασία κατά των οξειδωτικών φαινομένων καθώς και καλύτερη διατήρηση του αρώματος. Παρά τις καινούργιες αυτές τεχνικές, η θείωση και η απολάσπωση παραμένουν για την ώρα ο πιο απλός τρόπος με τα πιο σίγουρα αποτελέσματα.

Παραγωγή θειώδους (SO₂) από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, οι ζύμες παράγουν φυσικά διοξείδιο του θείου (SO₂), ως μεταβολικό ενδιάμεσο της οδού αναγωγής θειικών (Romano and Suzzi 1993, Ribereau-Gayon et al., 2006). Τα στελέχη ζύμης μπορούν να ταξινομηθούν σε παραγωγούς χαμηλού SO₂, δηλαδή *Saccharomyces cerevisiae* var. Ελλειψοειδούς, Παραγωγοί υψηλών SO₂, δηλαδή *Saccharomyces bayanus* Sacardo. Ορισμένα στελέχη ζύμης μπορούν να παράγουν έως 300 mg/L θειώδους άλατος κατά τη ζύμωση. Οι Dott and Trüper (1976) περιέγραψαν ότι η αναγωγή του θειώδους άλατος των στελεχών ζυμομύκητα που παράγουν θειώδη μπορεί να μεταβληθεί. Κατά συνέπεια το θειώδες άλας (SO₂) θα συσσωρευτεί στο κύτταρο και τελικά θα απελευθερωθεί στο γλεύκος. Σήμερα, οι παραγωγοί εμπορικής ξηράς ζύμης θεωρούν πολύ σημαντική αυτή την ιδιότητα ζύμης κατά τη διαδικασία επιλογής. Η πλειοψηφία των σημερινών εμπορικών στελεχών ζύμης θεωρείται ότι είναι χαμηλοί παραγωγοί SO₂, παρουσιάζοντας παραγωγή έως 20 mg/L συνολικού SO₂. Μόνο λίγα στελέχη ζύμης φαίνεται να έχουν υψηλότερη παραγωγή (έως 80 mg/L SO₂) (Werner et al. 2008).

1.2.5 ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΚΤΥΠΟ ΣΤΙΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Στη λευκή οινοποίηση, η διαδικασία της απολάσπωσης, οδηγεί σε οίνους με πιο λίγες ανώτερες αλκοόλες και λιπαρά οξέα. Αυξημένες, όμως, είναι οι ποσότητες των λιπαρών οξέων, των αιθυλικών και οξικών εστέρων που έχουν ευχάριστο άρωμα. Στο σχηματισμό των αρωμάτων, σημαντικό ρόλο έχει η επιλογή των ζυμών, με σκοπό την αδρανοποίηση ιθαγενών ζυμών, τη γρήγορη εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης, την παραγωγή επιθυμητών οσφρητικών ενώσεων και την πλήρη αποζύμωση. Αυτές οι ζύμες, επιδρούν στην παραγωγή αρωμάτων από πρόδρομες ουσίες του σταφυλιού. Η χρήση ζυμών που μπορούν και παράγουν λιγότερες οσφρητικές ουσίες, είναι επιθυμητές, διότι αρκετοί καταναλωτές, δεν επιθυμούν οίνους με έντονα τεχνολογικά αρώματα, όπως ονομάζονται τα αρώματα που προκύπτουν από απολασπωμένα γλεύκη σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Κατά τη λευκή οινοποίηση με προζυμωτική εκχύλιση, πραγματοποιείται εκχύλιση των υδατοδιαλυτών συστατικών του φλοιού της ράγας των σταφυλιών, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Το γλεύκος, στο οποίο έχουν περάσει τα συστατικά, ζυμώνεται, και ως αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η καλύτερη αξιοποίηση του ποικιλιακού δυναμικού, άρα και των αρωματικών χαρακτήρων, με τελικό αποτέλεσμα να ευνοούνται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Στην ερυθρή οινοποίηση, όταν η ζύμωση πραγματοποιείται με παρουσία φλοιών και γιγάρτων (στεμφύλων) των σταφυλιών, πραγματοποιείται και το φαινόμενο της εκχύλισης των αρωματικών ουσιών, των τανινών, που βρίσκονται στο φλοιό και στα γιγάρτα. Ο χρόνος παραμονής στέμφυλων και γλεύκους κατά την αλκοολική ζύμωση, επηρεάζει αρκετά την περιεκτικότητα των αρωματικών ουσιών. Αν και στην αρχή η εκχύλιση είναι έντονη, στην πορεία μειώνεται. Κατά την παραγωγή ερυθρού οίνου με θερμοοινοποίηση, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης και μετά την έκθλιψη των σταφυλιών, γίνεται θέρμανση του σταφυλοπολτού με θερμαντήρες ταχείας θέρμανσης (70-80°C), με στόχο τη γρήγορη διάχυση των φαινολικών συστατικών πριν καν αρχίσει η ζύμωση.

Εάν η οινοποίηση, επιτευχθεί με εκχύλιση σε ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα, δεν πραγματοποιείται έκθλιψη και απορραγισμός, όπως στην κλασική οινοποίηση, αλλά ολόκληρα τα στέμφυλα, με άθικτες τις ράγες, μεταφέρονται στις δεξαμενές ζύμωσης, με αποτέλεσμα κάποιες ποσότητες ραγών να σπάνε, ενώ κάποιες να παραμένουν άθικτες. Μόλις αρχίσει η αλκοολική ζύμωση, το CO₂ απομακρύνει τον αέρα και οι ράγες που δεν έχουν σπάσει βρίσκονται σε αναερόβιες συνθήκες, άλλες στον πυθμένα και άλλες στο αναερόβιο περιβάλλον του διοξειδίου του άνθρακα. Στη συνέχεια, οι ράγες εμποτίζονται με διοξείδιο του άνθρακα και ταυτόχρονα επιδρούν τα ενζυμικά συστήματα που υπάρχουν μέσα τους και τέλος γίνεται διάχυση διαφόρων ουσιών από το φλοιό προς τη σάρκα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μια ενδοκυτταρική ζύμωση που πραγματοποιείται με τη δράση των ιθαγενών ενζύμων, ενώ η αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους, πραγματοποιείται μέσα στα κύτταρα της ζύμης με τη βοήθεια των δικών τους ενζύμων. Ως αποτέλεσμα, στην ατμόσφαιρα CO₂ υπάρχει διάχυση των πολλαπλών ουσιών μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες. Στόχος είναι να σχηματιστεί χαρακτηριστικό άρωμα που προκύπτει από την ενδοκυτταρική ζύμωση. Αρχικά, λιγοστεύουν τα αρώματα της ποικιλίας και στη συνέχεια εκφράζεται ο τυπικός αρωματικός χαρακτήρας του οίνου που προέρχεται από αυτό το περιβάλλον ζύμωσης. (Μπουκαρά, 2008)

Τέλος, η προσθήκη SO₂ στο γλεύκος πριν αρχίσει η αλκοολική ζύμωση, έχει ως επίπτωση τη μείωση του οξικού αιθυλεστέρα, όπως και άλλων ανώτερων εστέρων. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι ποσότητα 50-60mg ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη ανά λίτρο οίνου, βοηθάει στην ανάπτυξη αρώματος κατά την εμφιάλωση ορισμένων οίνων (Κοντοκόστας, 2010, Δήμου, 2012). Επιπλέον εκχύλιση αρωματικών επιτυγχάνεται με προσθήκη SO₂ στο γλεύκος. Κατά την αλκοολική ζύμωση, οι σημαντικότερες ενώσεις αρώματος και γεύσης του οίνου σχηματίζονται ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού των αμινοξέων. Τέτοιες ενώσεις είναι οι ανώτερες αλκοόλες και οι συγγενείς εστέρες τους, καθώς και πτητικά οξέα. Αυτά τα παράγωγα προϊόντα προέρχονται από το μεταβολισμό της βαλίνης, της λευκίνης και της ισολευκίνης. Έχει αποδειχθεί ότι ο χαρακτήρας του ποικιλιακού αρώματος ορισμένων ποικιλιών σταφυλιών θα μπορούσε να εξηγηθεί εν μέρει από τη σύνθεση του σταφυλιού σε αμινοξέα (Hernández- Orte, et al. 2002). Αν και τα στελέχη των ζυμομυκήτων διαφέρουν σημαντικά στην ικανότητά τους να χρησιμοποιούν το άζωτο και τα αμινοξέα, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη αζώτου με τη μορφή αφομοιώσιμου αζώτου και αμινοξέων επηρεάζει το πτητικό αρωματικό προφίλ του οίνου. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι μέσω των οποίων τα αμινοξέα μπορούν να μεταβολιστούν σε αρωματικές ενώσεις (Zhu et al. 2016):

- A. Η αντίδραση **Ehrlich**, μέσω της οποίας τα αμινοξέα καταβολίζονται σε ανώτερες αλκοόλες. Επιδρά επίσης άμεσα ή έμμεσα στη σύνθεση άλλων αρωματικών ενώσεων.
- B. Τα αμινοξέα που περιέχουν **θειό** μπορούν να έχουν θετικό αντίκτυπο στο άρωμα του οίνου. Για παράδειγμα, η 3-μερκαπτοεξανόλη μπορεί να προσδώσει φρουτώδη γεύση στον οίνο.
- C. Η αντίδραση **Maillard**, μια χημική αντίδραση μεταξύ αμινο-ομάδων και καρβονυλομάδων, που συντελεί στη δημιουργία νέων ενώσεων, μέσω της οποίας η κυστεΐνη μπορεί να σχηματίσει διάφορες ενώσεις που επιδρούν στο άρωμα του οίνου.

1.3 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

Οι οργανισμοί προκειμένου να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν και πάνω από όλα να παραμείνουν ζωντανοί πρέπει να παράγουν έργο. Η ικανότητά τους να προσλαμβάνουν ενέργεια από διάφορες πηγές του περιβάλλοντος και να την μετατρέπουν σε βιολογικό έργο, αποτελεί βασική ιδιότητα, που πιθανώς, απέκτησαν σε αρχικές φάσεις της εξελικτικής διαδικασίας. Όλες οι μεταβολές ενέργειας που γίνονται στο κύτταρο (βιολογική ενέργεια), υπακούουν στους ίδιους φυσικούς νόμους που διέπουν τα φυσικά και χημικά φαινόμενα κατά συνέπεια ακολουθούν τους νόμους της θερμοδυναμικής. Το σύνολο των διεργασιών μέσω των οποίων τα χημικά συστατικά του υποστρώματος μετατρέπονται σε κυτταρικά υλικά, καλείται κυτταρικός μεταβολισμός, ο οποίος περιλαμβάνει μια εξειδικευμένη σειρά χημικών αντιδράσεων που καλείται μεταβολική οδός, κατά την οποία η ενέργεια που περιέχεται στο υπόστρωμα μετατρέπεται σε αξιοποιήσιμη για το κύτταρο ενέργεια. Μεταξύ του υποστρώματος και των τελικών προϊόντων των μεταβολικών διεργασιών παρεμβάλλονται διακριτά βήματα, το καθένα από τα οποία καταλύεται από συγκεκριμένο ένζυμο ή ενζυμικό σύστημα. Οι **μεταβολικές διεργασίες** μπορούν να διαχωριστούν σε δύο διαφορετικές, αλλά αλληλοεξαρτώμενες δραστηριότητες, τον **αναβολισμό και τον καταβολισμό**. Οι βιοχημικές αναβολικές αντιδράσεις του μεταβολισμού οργανώνονται σε αλληλουχίες ενζυμικών αντιδράσεων, που πραγματοποιούνται στις καταβολικές και αναβολικές διαδικασίες και αναφέρονται ως **μεταβολικά μονοπάτια**.

Ο καταβολισμός αφορά στις διαδικασίες κατά τις οποίες, πολύπλοκες οργανικές ενώσεις αποδομούνται σε απλές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους. Η κυτταρική ενέργεια, στους περισσότερους μικροοργανισμούς προέρχεται από σειρά αντιδράσεων αποδόμησης πλούσιων σε ενέργεια οργανικών που προσλαμβάνονται από το περιβάλλον της αύξεσης. Μέσω των καταβολικών αντιδράσεων μετασχηματίζονται τα μόρια σε κυτταρική ενέργεια, όπως η πλέον κοινή, η διάσπαση των σακχάρων προς CO₂ και H₂O από την οποία παράγεται ελεύθερη ενέργεια, μέρος της οποίας γίνεται ATP. Αντίθετα, ο αναβολισμός αφορά στις διαδικασίες κατά τις οποίες, απλές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση βιολογικών μακρομορίων (νουκλεϊνικών οξέων, πρωτεϊνών, λιπιδίων κ.λπ.) και πρόδρομων ουσιών (αμινοξέων, πουρινών, πυριμιδινών, λιπαρών οξέων κ.λπ.). Ο αναβολισμός, είναι δε δραστηριότητα, η οποία δε συμβαίνει αυθόρμητα, αλλά ελέγχεται από τη διαθέσιμη ενέργεια στο μικροβιακό κύτταρο, επομένως απαιτείται ενέργεια προκειμένου να συντεθούν πολύπλοκα μόρια που χρειάζεται το κύτταρο.

Οι απλές ενώσεις με μικρό μοριακό βάρος που παράγονται ή τροποποιούνται στις αντιδράσεις αυτές καλούνται μεταβολίτες ή **ενδιάμεσοι μεταβολίτες**. Ως **ενδιάμεσος μεταβολισμός**, χαρακτηρίζονται οι μεταβολικές διαδικασίες αποθήκευσης και ενέργειας, καθώς και χρησιμοποίησή της στη βιοσύνθεση βιομορίων. Συγκεκριμένα, ο ενδιάμεσος μεταβολισμός εξυπηρετεί δύο βασικές βιολογικές λειτουργίες: παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για τη σύνθεση των μακρομορίων ή την πραγματοποίηση άλλων διεργασιών που απαιτούν ενέργεια και παράλληλα εφοδιάζει τις βιοσυνθετικές διαδικασίες με τις απαραίτητες πρώτες ύλες (αμινοξέα για τη σύνθεση πρωτεϊνών, λιπαρά οξέα για τη σύνθεση λιπιδίων και νουκλεοτίδια για τη σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων). Οι ρυθμοί με τους οποίους πραγματοποιούνται οι διάφορες βιολογικές διεργασίες παρουσιάζουν τεράστιες διακυμάνσεις και οι οργανισμοί προκειμένου να ανταποκριθούν σε αυτές, μεταβάλλουν το ρυθμό των αντιδράσεων του ενδιάμεσου μεταβολισμού με τέτοιο τρόπο, ώστε να εξυπηρετούνται οι συγκεκριμένες ανάγκες κάθε φορά και να μην παρουσιάζονται σημαντικές αυξομειώσεις. Η σταθερότητα της συγκέντρωσης (παροχής) ορισμένων ενδιάμεσων μεταβολιτών, επιτυγχάνεται με τη διατήρηση του σταθερού ρυθμού κατανάλωσης και παραγωγής τους (κατάσταση ισορροπίας). (Αγγελής 2017, Μπαλατσαούρας 2006, Κατινάκης, 2004)

Υπάρχει, μια επιπλέον κατηγορία μεταβολικών αντιδράσεων, όπου ανάλογα με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου μπορούν να είναι είτε αναβολικές είτε καταβολικές. Οι πορείες αυτές καλούνται **αμφιβολικές πορείες** (Berg et al, 2002). Οι οργανισμοί χρησιμοποιούν κυρίως τρεις μηχανισμούς ρύθμισης και ελέγχου των μεταβολικών διαδικασιών. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά τον έλεγχο της συγκέντρωσης των ενζύμων στα κύτταρα, η οποία σε μια δεδομένη χρονική στιγμή εξαρτάται από δύο παραμέτρους, το ρυθμό βιοσύνθεσης τους και το ρυθμό αποδόμησής τους. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά τον έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητας, η οποία ρυθμίζεται, είτε από τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος ή του προϊόντος, είτε αλλοστερικά, είτε μέσω αντιτρεπτών ομοιοπολικών τροποποιήσεων, όπως η φωσφορλίωση ή η αδενυλίωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδα, είτε μέσω μη-αντιτρεπτών ομοιοπολικών τροποποιήσεων. Ο τρίτος μηχανισμός αφορά τον έλεγχο των μεταβολικών διαδικασιών των ανώτερων οργανισμών μέσω ορμονών. Ο έλεγχος αυτός μπορεί να ασκείται είτε στο επίπεδο ρύθμισης της σύνθεσης του ενζύμου, είτε στο επίπεδο ρύθμισης της δραστηριότητάς του. Ως τέταρτος μηχανισμός ελέγχου των μεταβολικών διαδικασιών μπορεί να θεωρηθεί η διαμερισματοποίηση των ευκαρυωτικών κυττάρων, με τον έλεγχο να εφαρμόζεται στη ροή των μεταβολιτών μέσω των μεμβρανών. (Μοριακή Μικροβιολογία – Μικροβιακός Μεταβολισμός).

1.3.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Οι μικροοργανισμοί, ανάλογα με τις πηγές ενέργειας και άνθρακα που χρησιμοποιούν για τη διεκπεραίωση των αντιδράσεων του μεταβολισμού διακρίνονται σε **ετερότροφους**, που χρησιμοποιούν οργανικές ουσίες ως πηγές ενέργειας και άνθρακα και σε **αυτότροφους**, που χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα ως πηγή άνθρακα και ως πηγές ενέργειας, είτε απλές ανόργανες ουσίες (χημειοαυτότροφοι), είτε το φως (φωτοαυτότροφοι).

Οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν **δύο βασικούς τύπους μεταβολισμού, τον αναπνευστικό ή οξειδωτικό και το ζυμωτικό**, μέσω των οποίων παράγουν ενέργεια. Η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών τύπων εντοπίζεται στον **τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων των μεταβολικών οδών**. Κατά την **αναπνοή** χρησιμοποιούνται **εξωτερικοί** τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων (μόρια που δεν προέρχονται από το υπόστρωμα), ενώ κατά τη **ζύμωση** χρησιμοποιούνται ως τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων **παράγωγα προερχόμενα από το οργανικό υπόστρωμα**.

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που ακολουθούν **αναπνευστικό μεταβολισμό χρησιμοποιούν ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και χαρακτηρίζονται ως αερόβιοι**. Εναλλακτικά, μερικοί **μπορούν να χρησιμοποιούν ως αποδέκτες ηλεκτρονίων αμμωνία, νιτρώδη ιόντα ή ιόντα σιδήρου**, όταν το περιβάλλον στο οποίο αυξάνονται είναι πλούσιο στα συστατικά αυτά, και επομένως μπορούν να **αυξάνονται απουσία οξυγόνου**. Στις περιπτώσεις όμως που οι μικροοργανισμοί στερούνται της ικανότητας χρήσης των αποδεκτών αυτών, τότε, απουσία οξυγόνου, δεν υπάρχει δυνατότητα παραγωγής ενέργειας στο μικροβιακό κύτταρο μέσω αναπνευστικών (οξειδωτικών) διεργασιών. **Οι μικροοργανισμοί που ακολουθούν ζυμωτικό μεταβολισμό δε χρησιμοποιούν οξυγόνο στις αντιδράσεις μεταβολισμού και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως αναερόβιοι**. Αυτοί αξιοποιούν για την αύξηση τους την προερχόμενη από συγκεκριμένες χημικές αντιδράσεις ενέργεια στις οποίες συμμετέχουν ενδιάμεσα παράγωγα του μεταβολισμού.

Η αντίδραση των οργανικών ουσιών με το οξυγόνο είναι μια ισχυρώς εξώθερμη διεργασία. Για το λόγο αυτό οι **αερόβιοι** μικροοργανισμοί, εν γένει, καταβολίζουν σχετικά μικρές ποσότητες οργανικών ουσιών, για να στηρίξουν ένα δεδομένο επίπεδο αναβολισμού (**κυτταρικής αύξησης**). Οι αερόβιες διαδικασίες μέσω των οποίων οι υδατάνθρακες, αλλά και τα υπόλοιπα μεταβολικά «καύσιμα» (λιπίδια και πρωτεΐνες), οξειδώνονται προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό, στο σύνολό τους αποτελούν την κυτταρική αναπνοή. Στα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών, οι διαδικασίες που αποτελούν την αναπνοή αποσκοπούν στην ανάκτηση της ενέργειας που είναι αποθηκευμένη στα διάφορα οργανικά υποστρώματα και στην απόκτηση ανθρακικών σκελετών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη και συντήρηση των κυττάρων. Η κυτταρική αναπνοή μπορεί να διαχωρισθεί σε τρία διακριτά στάδια, την παραγωγή ακετυλο-CoA μέσω των διαδικασιών καταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπαρών οξέων και μερικών αμινοξέων, την οξείδωση του ακετυλο-CoA στον κύκλο του κιτρικού οξέος και τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο οξυγόνο μέσω μιας διαδικασίας που είναι συζευγμένη με την παραγωγή ATP από ADP και P_i.

Αντίθετα, η καταβολική δραστηριότητα των αναερόβιων μικροοργανισμών είναι δυσανάλογη της αναβολικής, διότι η στήριξη ενός συγκεκριμένου επιπέδου αναβολισμού πραγματοποιείται μέσω χαμηλής ενεργειακής απόδοσης αντιδράσεων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η **αύξηση της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, ενός μικροοργανισμού προαιρετικά αναερόβιου, ικανού δηλαδή να αναπτύσσεται τόσο παρουσία όσο και απουσία οξυγόνου**. Ο μικροοργανισμός αυτός, αυξανόμενος αερόβια, καταβολίζει το σάκχαρο προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό, και παράγει κυτταρική μάζα με υψηλό συντελεστή απόδοσης. Αυξανόμενος, αντίθετα, αναερόβια, εμφανίζει χαμηλούς ειδικούς ρυθμούς αύξησης και μικρή αναβολική δραστηριότητα για τη στήριξη της οποίας καταβολίζονται μεγάλες ποσότητες υποστρώματος προς αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. (Αγγελής 2017, Μπαλατσαούρας 2006, Κατινάκης, 2004)

1.3.2 ATP

Η σύνδεση μεταξύ καταβολισμού-αναβολισμού πραγματοποιείται μέσω μορίων που χρησιμοποιούνται ως αποθήκες της ενέργειας καταβολισμού και τροφοδότες ενέργειας των αναβολικών αντιδράσεων. Για την εύκολη μεταφορά της ενέργειας μέσα στο κύτταρο και τον ταχύτατο μετασχηματισμό της από τη μία μορφή στην άλλη, απαιτείται η ύπαρξη ενός κοινού «νομίσματος», το οποίο να είναι προσιτό και να έχει υψηλή ενέργεια. Το μόριο αυτό ονομάζεται Τριφωσφορική Αδενοσίνη (αδενοσινό-τρι φωσφορικό οξύ ή ATP) και αποτελεί το μόριο – κλειδί του μεταβολισμού των κυττάρων, καθώς ο ρόλος του στον κυτταρικό μεταβολισμό είναι πρωταρχικός και ουσιώδης, δεδομένου ότι συμμετέχει στη φωσφορυλίωση των ενδιάμεσων παραγώγων αυτού. Ας σημειωθεί ότι τα φωσφορυλιωμένα παράγωγα είναι περισσότερο ενεργά των προδρόμων ενώσεων και για το λόγο αυτό οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης συναντώνται πολύ συχνά στο μικροβιακό κύτταρο. (Berg et al, 2002). Περιέχει δύο πλούσιους σε ενέργεια δεσμούς φωσφορικού ανυδρίτη, οι οποίοι υδρολυόμενοι απελευθερώνουν την ενέργεια τους στο κύτταρο, προκειμένου να εκτελέσει τις βιολογικές του λειτουργίες μέσω ενεργοβόρων αντιδράσεων (κίνηση, βιοσύνθεση, ενεργός μεταφορά). Η ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση της ATP είναι ασυνήθιστα μεγάλη για το κύτταρο. Παράλληλα δίνουν γένεση σε

αδενοσινο-διφωσφορικό οξύ (ADP) ή περιστασιακά σε αδενοσινο-μονοφωσφορικό οξύ (AMP). Η απαραίτητη ενέργεια για τη σύνθεση του ATP εξασφαλίζεται από τη διάσπαση άλλων μορίων. Το ADP περιέχει έναν επιπλέον πλούσιο σε ενέργεια δεσμό και είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για αναγέννηση ATP, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, με τη βοήθεια ενός εξειδικευμένου ενζύμου, της αδενυλικής κινάσης. Επομένως, αυτός ο αένας κύκλος ATP – ADP είναι ο βασικός τρόπος ανταλλαγής ενέργειας στα βιολογικά συστήματα. Τέλος, δύο ακόμα πολύ σημαντικά μόρια για τα κύτταρα, το NAD⁺ και το FAD⁺ αποτελούν παράγωγα της ATP. Η ενεργειακή κατάσταση του μικροβιακού κυτάρου μπορεί να εκφραστεί ποσοτικά με τη βοήθεια του λόγου: $[(ATP + 0,5 ADP)/(ATP + ADP + AMP)]$, ο οποίος καλείται ενεργειακό φορτίο. Η μέγιστη τιμή που μπορεί να λάβει ο λόγος αυτός είναι 1, όταν το μοναδικό αδενοσινο-νουκλεοτίδιο είναι το ATP. Το ενεργειακό φορτίο δε δηλώνει την ποσότητα του ATP στο κύτταρο και συνεπώς δεν μπορεί να περιγράψει κατ' απόλυτο τρόπο που το ενεργειακή κατάσταση. Αποτελεί, όμως, ένα χρήσιμο δείκτη που περιγράφει με επιτυχία σχετικές αλλαγές της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου. (Μπάσα 2020, Αντωνάτου 2017)

1.3.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ: ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ - ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ

Ο μεταβολισμός ενός υποστρώματος, όπως προαναφέρθηκε, περιλαμβάνει μια εξειδικευμένη σειρά χημικών αντιδράσεων που καλείται μεταβολική οδός (metabolic pathway), κατά οποία η ενέργεια που περιέχεται στο υπόστρωμα μετατρέπεται σε αξιοποιήσιμη το κύτταρο ενέργεια. Μεταξύ του υποστρώματος και των τελικών προϊόντων των μεταβολικών διεργασιών παρεμβάλλονται διακριτά βήματα, το καθένα απ' τα απο καταλύεται από συγκεκριμένο ένζυμο ή ενζυμικό σύστημα

1.3.3.1 ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ – ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

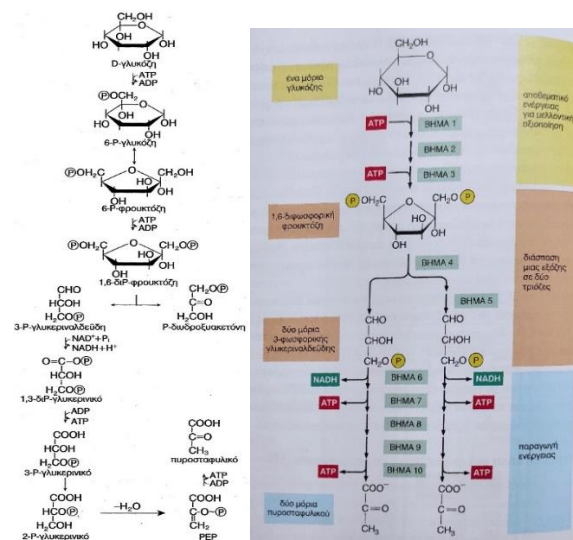
Η γλυκόλυση περιλαμβάνει το σύνολο των αντιδράσεων που επιτρέπουν στο ζωντανό κύτταρο να μετατρέψει τα σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα (γλυκόζη και φρουκτόζη) σε πυροσταφυλικό οξύ. Αυτές οι αντιδράσεις αφορούν τόσο την αναερόβωση (αλκοολική ζύμωση, γαλακτική ζύμωση) όσο και την αερόβωση (αναπνευστική οδός). Τα σάκχαρα του γλεύκους εισέρχονται στο κύτταρο μέσω της περατής μεμβράνης τους για να γίνουν υπόστρωμα δράσης των ενζύμων και να εξυπηρετήσουν τις λειτουργικές ανάγκες του κυττάρου. Αν και οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να μεταβολίζουν ένα μεγάλο αριθμό σακχάρων (λακτόζη και γαλακτόζη, μαλτόζη, μαννιτόλη, φουκόζη και ραμνόζη, πηκτίνη, κυτταρίνη, άμυλο και συναφείς πολυσακχαρίτες), η γλυκόζη συνιστά για την πλειονότητα αυτών την προτιμητέα πηγή άνθρακα και ενέργειας. Οι **σπουδαιότερες καταβολικές οδοί της γλυκόζης είναι η οδός Embden-Meyerhof-Parnas και η οξειδωτική οδός των φωσφοροπεντοζών**. Οι δύο αυτές οδοί **αλληλεξαρτώνται**, συχνά δε πραγματοποιούνται συγχρόνως. Η ένταση της καθεμιάς, καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις τους, ελέγχονται από μηχανισμούς, οι οποίοι αναφέρονται στη συνέχεια.

1.3.3.1.1 ΚΑΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (EMP)

Σύμφωνα με το μονοπάτι της γλυκόλυσης, το οποίο συχνά αναφέρεται ως το μονοπάτι της καταβολικής οδού Embden-Meyerhof-Parnas, η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ χωρίς απώλειες άνθρακα υπό αναερόβια διεργασία (οι σακχαρομύκητες παράγουν περισσότερες ανώτερες αλκοόλες-γλυκερόλη, εστέρες-αρωματικές ενώσεις κ.ά., αν κάνει ζύμωση από 100 g γλυκόζης παράγονται 40g βιομάζας). Συνήθως διαχωρίζεται σε δύο διακριτές φάσεις: α) Στη φάση επένδυσης, κατά την οποία η ενέργεια της ATP επενδύεται στη σύνθεση ενδιάμεσων μεταβολιτών (φωσφορικών πεντοζών) και η ανθρακική αλυσίδα όλων των εξοζών μετατρέπεται σε ένα κοινό πριον, την 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. β) Στη φάση παραγωγής ενέργειας, κατά την οποία η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη φωσφορυλιώνεται (από ανόργανο φώσφορο και όχι από την ATP) σε 1,3 διφωσφογλυκερικό οξύ. Στα επόμενα βήματα, το 1,3 διφωσφογλυκερικό οξύ μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό, ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται ενέργεια. Ένα μέρος της οποίας διατηρείται μέσω της φωσφορυλίωσης τεσσάρων μορίων ADP σε ATP. Η αλληλουχία των αντιδράσεων της γλυκόλυσης περιγράφεται στο σχήμα που ακολουθεί. (Κατινάκης, 2004, Παπανικολάου, πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2018)

Η οδός χρησιμοποιείται από τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, από ένα μεγάλο αριθμό βακτηρίων, αλλά όχι από τα αρχαία. Το γλυκολυτικό σχήμα EMP συνεισφέρει ενεργειακά στο μικροβιακό κύτταρο με την απόδοση δύο

ανηγμένων συνενζύμων NADH και την αναγέννηση δύο μορίων ATP. Εξάλλου, **το πυροσταφυλικό οξύ που παράγεται είναι μόριο μεγάλης βιολογικής σημασίας**, αφού αποτελεί τη βιοσυνθετική κεφαλή πολλών αναβολικών προδρόμων. Κατά τα πρώτα στάδια της καταβολικής οδού, απαιτείται ενέργεια για τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης προς 6-P-γλυκόζη, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο εξοκινάση (HK), και τη φωσφορυλίωση της 6-P-φρουκτόζης προς 1,6-δι-P-φρουκτόζη, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο φωσφοροφρουκτοκινάση (PFK). Στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς και στα βακτήρια που αυξάνονται **αερόβια**, η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται με **δαπάνη ATP**, ενώ **στα αναερόβια βακτήρια με δαπάνη P-ενόλο-πυροσταφυλικού (PEP)** κατά τη μεταφορά της γλυκόζης δια μέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μέσω του συστήματος μεταφοράς PEP:PTS. Το ένζυμο PFK αποτελεί ένα ένζυμο – κλειδί που ρυθμίζει το ρυθμό καταβολισμού της γλυκόζης μέσω του σχήματος EMP. Το προϊόν των πρώτων αυτών αντιδράσεων, η 1,6-δι-P-φρουκτόζη, διασπάται προς δύο τριόζες. Την 3-P-γλυκεριναλδεύδη και την P-διυδροξυακετόνη, διάσπαση που καταλύεται από το ένζυμο αλδολάση. Η P-διυδροξυακετόνη δε συμμετέχει στις αντιδράσεις που ακολουθούν, μπορεί όμως να μετατραπεί σε 3-P-γλυκεριναλδεύδη. Η συνεχής μάλιστα μετατροπή της 3-P-γλυκεριναλδεύδης προς 1,3-δι-P-γλυκεριναλδεύδη (εικόνα 2) μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δύο ισομερών προς την πλευρά της 3-P-γλυκεριναλδεύδης, έτσι ώστε τελικά η P-διυδροξυακετόνη μετατρέπεται ποσοτικά σε 3-P-γλυκεριναλδεύδη. Επομένως, από ένα μόριο γλυκόζης λαμβάνονται τελικά δύο μόρια 3-P-γλυκεριναλδεύδης. Στη συνέχεια της καταβολικής οδού, ακολουθεί οξειδωτική φωσφορυλίωση της 3-P-γλυκεριναλδεύδης προς 1,3-δι-P-γλυκερινικό οξύ, με ενσωμάτωση στη δομή της ανόργανου φώσφορου. Από την αντίδραση αυτή παράγεται αναγωγική δύναμη, υπό μορφή ενός μορίου ανηγμένου συνενζύμου NADH ανά μόριο γλυκόζης. Το 1,3-δι-P-γλυκερινικό οξύ μετατρέπεται στη συνέχεια προς 3-P-γλυκερινικό οξύ με σύγχρονη φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος ενός μορίου ADP προς ATP. Έτσι, παράγεται ένα μόριο ATP ανά μόριο 1,3-δι-P-γλυκερινικού ή δύο μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης. Το 3-P-γλυκερινικό οξύ μετατρέπεται προς PEP και αυτό με τη σειρά του προς πυροσταφυλικό. Η αποφωσφορυλίωση του PEP καταλύεται από την πυροσταφυλική κινάση και συνοδεύεται με φωσφορυλίωση ενός μορίου ADP προς ATP. Κατα τα παραπάνω, η συνολική αντίδραση του γλυκολυτικού σχήματος EMP έχει ως εξής: **Γλυκόζη + 2x NAD⁺ + 2x Pi → 2x πυροσταφυλικό οξύ + 2x NADH + 2x ATP**. Εκ των τεσσάρων μορίων ATP που παράγονται, τα δύο αναλώνονται για την φωσφορυλίωση του υποστρώματος στα πρώτα στάδια της γλυκολυτικής οδού. (Αγγελής 2017, Μπαλατσαούρης, 2006, Alberts et al. 2006, Κατινάκης 2004)

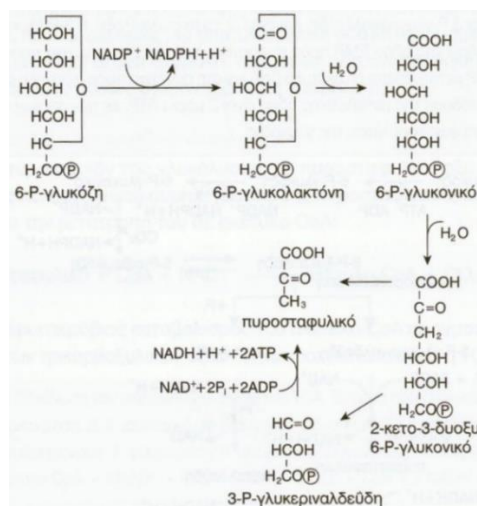


Εικόνα 2. α) β) Embden Meyerhof Parnas pathway. Οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί και πολλά βακτήρια χρησιμοποιούν την καταβολική οδό EMP, για να μετατρέψουν τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό οξύ και συγχρόνως να παράγουν ενέργεια (Αγγελής, 2017). Η παραγωγική φάση της γλυκόλυσης περιλαμβάνει τα βήματα φωσφορυλίωσης κατά τα οποία ένα μέρος της ελεύθερης ενέργειας του μορίου της γλυκόζης διατηρείται υπό μορφή ATP. Η μετατροπή των δύο μορίων της 3 – φωσφορικής γλυκεραλδεύδης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού, συνοδεύεται από το σχηματισμό τεσσάρων μορίων ATP, από το ADP. Ωστόσο η καθαρή απόδοση ATP ανά μόριο γλυκόζης είναι μόνο δύο μόρια, επειδή δύο μόρια ATP είχαν δαπανηθεί κατά την προπαρασκευαστική φάση της γλυκόλυσης για τη φωσφορυλίωση των δύο άκρων του μορίου της εξόζης (Nelson et al., 2008). Ξεκινώντας με δεδομένα πως λαμβάνονται δύο μόρια αιθανόλης ανά μόριο γλυκόζης, και υπολογίζοντας με βάση τα μοριακά βάρη των δύο ενώσεων (180 για τη γλυκόζη και 46 για την αιθανόλη) εξάγεται το συμπέρασμα πως η μέγιστη θεωρητική απόδοση της γλυκόλυσης είναι 0,51 g/g. (Sarris & Papanikolaou, 2016).

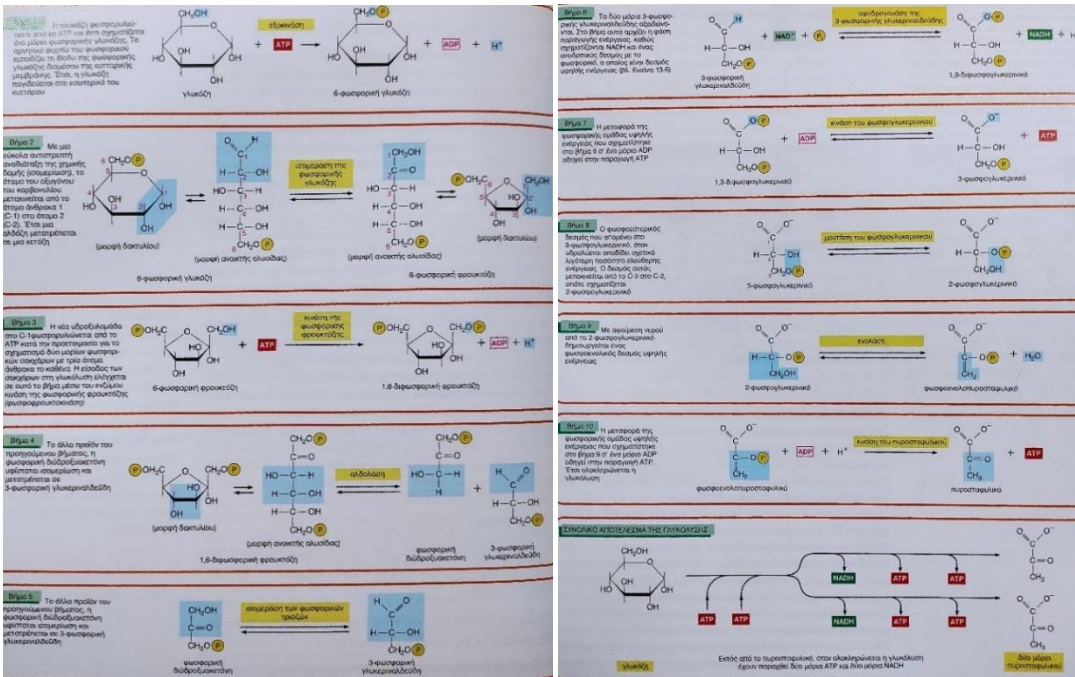
1.3.3.1.2 ΚΑΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ ENTNER-DOUDOROFF

Η κυριότερη εναλλακτική οδός του γλυκολυτικού σχήματος EMP, η οποία χρησιμοποιείται για τον καταβολισμό της γλυκόζης και άλλων υποστρωμάτων, είναι η οδός Entner-Doudoroff, η οποία χρησιμοποιείται από Gram- αερόβια βακτήρια, όπως είδη του γένους *Pseudomonas* και αρχαία που δε διαθέτουν δραστηριότητα PFK. Πολύ λίγα Gram+ βακτήρια μεταξύ των οποίων το *Enterococcus faecalis* χρησιμοποιούν αυτή την οδό. Για τη μετατροπή της 6-P-γλυκόζης σε 6-P-γλυκονικό οξύ χρησιμοποιούνται τα ίδια ένζυμα με αυτά της οδού των φωσφοροπεντοζών. Από την 3-P-γλυκεριναλδεύδη (μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό από τα ένζυμα της γλυκόλυσης) παράγονται σάκχαρα με 4 και 5 άτομα άνθρακα με τη μεσολάβηση των ενζύμων που συναντώνται στον κύκλο των φωσφοροπεντοζών, με τη διαφορά ότι οι αντιδράσεις έχουν αντίθετη φορά. Στο μονοπάτι παράγεται ένα μόριο ATP για κάθε δύο μόρια πυροσταφυλικού, σύμφωνα με το σχήμα της εικόνας 3.

Εκτός από της γλυκόλυση EMP, υπάρχουν και άλλες ατραποί αποικοδόμησης της γλυκόζης. Κάποια βακτηριακά στελέχη έχουν τη δυνατότητα να εκτελέσουν γλυκόλυση, όχι όμως με την ίδια διεργασία που χρησιμοποιούν οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Η αντίστοιχη διεργασία για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, διαφέρει στα αρχικά βήματα, ενώ στη συνέχεια είναι παρεμφερής με την EMP. Η γλυκόλυση των προκαρυωτικών οργανισμών ανακαλύφθηκε από τους Nathan Entner και Michael Doudoroff και δημοσιεύθηκε το 1951, στον μικροοργανισμό *Pseudomonas saccharophila* (Conway, 1992). Βιοχημικά, οι προαναφερθείσες διαφορές μεταξύ των δύο οδών είναι μέχρι το σημείο που παράγεται η 3 – φωσφορική γλυκεραλδεύδη. Από το σημείο αυτό και μετά η πορεία είναι η ίδια μέχρι την παραγωγή του πυροσταφυλικού. Ο τρόπος με τον οποίο καταλήγει όμως η ED οδός στο σημείο αυτό, είναι ο εξής: Το πρώτο βήμα είναι κοινό και έτσι η διαφορά ξεκινά από την 6 – φωσφορική γλυκόζη, η οποία μέσω της αφυδρογονάσης της 6 – φωσφορικής γλυκόζης, οξειδώνεται σε 6 – φωσφορική γλυκολακτόνη με ταυτόχρονη αναγωγή ενός NADP^+ σε NADPH . Εν συνεχεία το ένζυμο της λακτονάσης μετατρέπει την 6 – φωσφορική γλυκολακτόνη σε 6 φωσφογλυκονικό με ταυτόχρονη κατανάλωση ενός μορίου νερού, το οποίο ακολούθως απομακρύνεται δίνοντας 2 – κετοξυ – 3 – διοξυ – 6 – φωσφογλυκονικό. Το μόριο αυτό, ακολούθως διασπάται δίνοντας ένα πυροσταφυλικό και μία 3 – φωσφορική γλυκεραλδεύδη. Από το σημείο αυτό ακολουθείται η πορεία EMP που καταλήγει στην παραγωγή ενός ακόμα πυροσταφυλικού. Επομένως και από αυτήν την γλυκολυτική διεργασία λαμβάνονται 2 μόρια αιθανόλης. Ωστόσο, στην γλυκόλυση EMP παράγονται δύο ATP, ανά μόριο γλυκόζης έναντι ενός που παράγεται στην ED (Αγγελής 2017, Μπαλατσαούρας, 2006, Κατινάκης 2004)



Εικόνα 3. Καταβολισμός της γλυκόζης σύμφωνα με το σχήμα Entner-Doudoroff. Η οδός αυτή αντικαθιστά σε μερικές περιπτώσεις τη γλυκόλυση (Αγγελής, 2017).

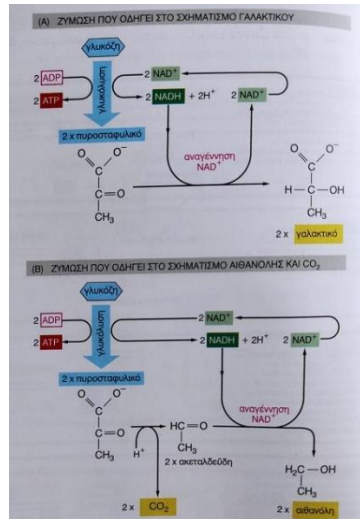


Εικόνα 4. α) β) Λεπτομερής παρουσίαση των 10 βημάτων της γλυκόλυσης (μπλε χρώμα: τμήμα μορίου που μεταβάλλεται και κίτρινο πλαίσιο: όνομα ενζύμου που καταλύει την αντίδραση). Καθένα από τα 10 βήματα της γλυκόλυσης καταλύεται από ένα διαφορετικό ένζυμο. Στο βήμα 4, μια εξόξη διασπάται σε δύο τριόζες. Έτσι, ο αριθμός των μορίων σε κάθε επακόλουθο βήμα είναι διπλάσιος. Η φάση παραγωγής ενέργειας, η οποία οδηγεί σε σύνθεση ATP και NADH, αρχίζει στο βήμα 6.

1.3.3.2 ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΟΥ ΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Στην αναερόβωση το πυροσταφυλικό οξύ δεν μπορεί να οξειδωθεί μέσω των αντιδράσεων του κύκλου του Krebs. Το πυροσταφυλικό οξύ αποτελεί κομβικό σημείο στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η τύχη του εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση του κυττάρου, η οποία με τη σειρά της προσδιορίζεται από την αντίδραση που καταλύεται από την αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεύσης. Το κυτταροπλασματικό NAD^+ μετατρέπεται σε NADH , το οποίο σε αερόβιες συνθήκες οξειδώνεται μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας σε NAD^+ και χρησιμοποιείται ξανά στο μονοπάτι της γλυκόλυσης. Αντίθετα, όταν επικρατούν αναερόβιες συνθήκες, η επανοξείδωση του NADH από την αναπνευστική αλυσίδα δεν πραγματοποιείται, λόγω απουσίας οξυγόνου. Για να αντιπαραέλθουν το πρόβλημα αυτό οι διάφοροι οργανισμοί έχουν αναπτύξει στρατηγικές αναγέννησης του NAD^+ μέσω άλλων διαδικασιών, όπως η γαλακτική και η αλκοολική ζύμωση. (Κατινάκης, 2004) Το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο παράγεται από τη γλυκόλυση, χρησιμεύει ως δέκτης για να προσλάβει το υδρογόνο που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης υπό μορφή $\text{NADH} + \text{H}^+$ και μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους: το ζυμωτικό και τον αναπνευστικό. οπότε ανάγεται απευθείας σε γαλακτικό οξύ (ομογαλακτική ζύμωση) ή με αποκαρβοξυλίωση σε αιθανόλη (αλκοολική ζύμωση). Συγκεκριμένα, στις αναερόβιες συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης μετά την μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ, επενεργούν δύο ένζυμα. Το πρώτο είναι η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση που μετατρέπει το πυροσταφυλικό οξύ σε αιθανάλη (ακεταλδεύδη), με την απομάκρυνση ενός μορίου CO_2 . Η παραχθείσα αιθανάλη, είναι ο τελικός αποδέκτης των e^- όταν δεν υπάρχει οξυγόνο. Το δεύτερο ένζυμο, η αλκοολική αφυδρογονάση, ανάγει την αιθανάλη δίνοντας το τελικό προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης, την αιθανόλη. Η αναγωγή αυτή πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την εκ νέου οξείδωση του NADH που παρήχθη κατά τη γλυκόλυση σε NAD^+ , ώστε το τελευταίο να συμμετάσχει στη γλυκόλυση επόμενου μορίου γλυκόζης. Τελικά, ανά μόριο γλυκόζης που ζυμώνεται σε δύο μόρια αιθανόλης παράγονται 2 μόρια ATP και 2 άτομα άνθρακα απομακρύνονται με τη μορφή του CO_2 . Η μέγιστη θεωρητική απόδοση της γλυκόλυσης είναι 0,51 g/g (Sarris & Papanikolaou, 2016). Έτσι η συνολική αντίδραση μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη είναι: **$\text{Γλυκόζη} + 2\text{P} + 2\text{ADP} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{αιθανόλη} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$**

Όταν όμως τα δύο υδρογόνα της γλυκόλυσης χρησιμοποιούνται αλλού (γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση), το πυροσταφυλικό οξύ δεν ανάγεται. Τότε δίνει πολύ μεγάλο αριθμό δευτερευόντων προϊόντων.



Εικόνα 5. Η αποδόμηση του πυροσταφυλικού υπό αναερόβιες συνθήκες. (Alberts et al.2006)

Το σχηματισθέν πυροσταφυλικό οξύ, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, μπορεί να μεταβολιστεί ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες. (Α) Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, το πυροσταφυλικό οξύ παράγει μικρότερη ποσότητα ενέργειας και ζυμώνεται σε γαλακτικό οξύ κατά την γαλακτική ζύμωση ή σε αιθανόλη κατά την αλκοολική ζύμωση. (Β) παρουσία οξυγόνου, το πυροσταφυλικό οξύ μεταβολίζεται σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Στην αναερόβιαση το πυροσταφυλικό οξύ δεν μπορεί να οξειδωθεί μέσω της αναπνευστικής οδού. (Τσακίρης, 2017, Alberts et al. 2006).

1.3.3.2.1 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

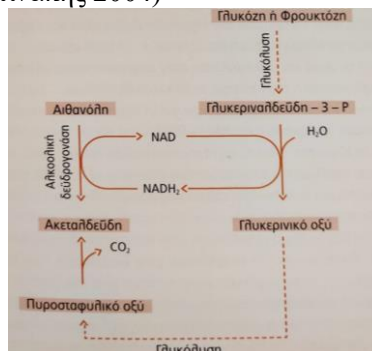
Η αλκοολική ζύμωση είναι η σπουδαιότερη για την οικονομία της φύσης και για τον άνθρωπο. Εφαρμόζεται στη βιομηχανία παραγωγής οίνου και άλλων αλκοολούχων ποτών, αλλά και στη βιομηχανία της αλκοόλης (για ενεργειακούς, φαρμακευτικούς και άλλους σκοπούς) από υποπροϊόντα της γεωργο-βιομηχανίας. Παρά το γεγονός ότι η ανθρωπότητα επαφελήθηκε από αυτούς τους μικροοργανισμούς για μεγάλο χρονικό διάστημα, αγνοούσε την ύπαρξή τους μέχρι που ο Van Leeuwenhoek (1632-1723), με το μικροσκόπιο του, παρατήρησε τις ζύμες για πρώτη φορά. Το 1815, ο Gay-Lussac καθόρισε την εξίσωση ζύμωσης με αιθανόλη: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$. Η αλκοολική ζύμωση έγινε η αιτία να δημιουργήσει ο Louis Pasteur τη βιοχημεία (1840) και να αποκλείσει τη θεωρία της αυτομάτου γεννήσεως. Το φαινόμενο αυτό αποτέλεσε το πρώτο βιοχημικό μοντέλο, που μελετήθηκε και διευρύνθηκε κατά στάδια (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Οι ζύμες και πολλοί μικροοργανισμοί μεταβολίζουν το πυροσταφυλικό οξύ σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, αντί του γαλακτικού. Κατά την αλκοολική ζύμωση, η γλυκόζη εισέρχεται στο κύτταρο της ζύμης μέσω της εκλεκτικά περατής κυτοπλασματικής μεμβράνης. Εκεί με τη μεσολάβηση της εξωκίνησης και του αδενοζινοτριφωσφορικού (ATP) φωσφορυλιούται στο έκτο και στη συνέχεια, αφού πρώτα μετατραπεί μέσω ισομερίωσης προς φρουκτόζη και στο πρώτο άτομο άνθρακα. Σε επόμενο στάδιο, η διφωσφορυλιωμένη φρουκτόζη με την παρέμβαση του ενζύμου της αλδολάσης σχίζεται προς δύο τριόζες, που καταλήγουν μέσω σειράς αντιδράσεων σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Επειδή η αλκοολική ζύμωση είναι οξειδοαναγωγική, ταυτόχρονα με το σχηματισμό των δύο μορίων πυροσταφυλικού οξέος ανάγονται με τέσσερα άτομα υδρογόνου και δύο μόρια του συνενζύμου νικοτινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD). Στο τελευταίο στάδιο, τα δύο μόρια του πυροσταφυλικού οξέος δίνουν με αποκαρβοξυλίωση δύο μόρια διοξειδίου του άνθρακα και δύο μόρια ακεταλδεύδης (Μπαλατσαούρας, 2006).

Σήμερα, είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, οι ζυμομύκητες καταναλώνουν τα σάκχαρα και άλλα συστατικά του γλεύκους σαν υποστρώματα για την ανάπτυξη τους, μετατρέποντας τα σε αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και άλλους μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες και τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού συνεισφέρουν στις οργανοληπτικές ιδιότητες του παραγόμενου οίνου. Οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων που αναλώνονται και τα προϊόντα που παράγονται εξαρτώνται από το είδος των μυκήτων που είναι παρόντα και το μέγεθος της ανάπτυξης τους. (Νεράντζης, κ.α, 2015). Ένα από τα βασικά τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των σακχάρων από τον *Saccharomyces cerevisiae* και τα στενά συγγενικά του είδη, είναι σαφώς η αιθανόλη, δίνοντας περίπου 92% - 95% μετατροπή των σακχάρων. Το διοξείδιο του άνθρακα σχηματίζεται επίσης, σε ίσες μοριακές ποσότητες προς αιθανόλη, αλλά το μεγαλύτερο μέρος του διαφεύγει στην ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αλλά και μετά το πέρας. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι το διοξείδιο του άνθρακα είναι ιδιαίτερα διαλυτό στον οίνο, ιδιαίτερα σε σύγκριση με τα άλλα ατμοσφαιρικά αέρια, το άζωτο και το οξυγόνο. Σε υψηλές πιέσεις, η ζύμωση επιβραδύνεται και τελικά σταματά, πιθανώς λόγω τοξικότητας από το διοξείδιο του άνθρακα. Άλλα κύρια τελικά προϊόντα είναι διάφορα πτητικά και μη πτητικά οξέα, συμπεριλαμβανομένης της γλυκερόλης. Ανώτερες αλκοόλες (ζυμέλαια), πτητικοί εστέρες, οι οποίοι παράγονται

σε μικρές ποσότητες, αλλά έχουν μεγάλη επίδραση στην ποιότητα του τελικού προϊόντος, ενώ παράγονται και δυσάρεστες οσμές που περιέχουν θείο. Το διακετύλιο, το οποίο έχει ένα άρωμα γλυκού βουτύρου, μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στο προφίλ γεύσης ενός οίνου. Ενώ αυτό και οι στενοί συγγενείς του, όπως η ακετοΐνη και η βουτάνιο-2,3-διόλη, σχηματίζονται από ζύμες, η παρουσία τους στον οίνο γενικά προέρχεται από βακτήρια γαλακτικού οξέος.

Στην προαιρετικά αναερόβια ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, ο μηχανισμός παραγωγής αιθανόλης έχει ως εξής. Το πυροσταφυλικό οξύ που παράγεται από τη γλυκόζη μέσω της οδού EMP, μετατρέπεται υπό αναερόβιες συνθήκες, σε αιθανόλη. 1 μόριο γλυκόζης αποδίδει 2 μόρια πυροσταφυλικού οξέος που παράγουν 2 μόρια αιθανόλης, με σύγχρονη οξειδωση 2 μορίων NADH (σύμφωνα με το σχήμα της εικόνας 6). **Η ενέργεια που παράγεται από 1 μόριο γλυκόζης κατά την αλκοολική ζύμωση (2 μόρια ATP), αντιστοιχεί στο 5% περίπου της ενέργειας που παράγεται από τον ίδιο μικροοργανισμό, υπό αερόβιες συνθήκες (38 μόρια ATP).** Η αντίδραση παραγωγής αιθανόλης είναι συνεπώς ικανή να επανοξειδώσει τα 2 μόρια NADH που παράγονται κατά τη μεταβολική οδό της γλυκόλυσης. Ένα ποσοστό της γλυκόζης εισέρχεται στην οδό των φωσφοροπεντοζών, μέσω της οποίας παράγονται C4 και C5 υδατάνθρακες, που αποτελούν απαραίτητους προδρόμους για τη βιοσύνθεση κυτταρικών υλικών, όπως επίσης και 2 μόρια NADPH και 1 μόριο NADH. Η επανοξείδωση των μορίων αυτών δεν είναι δυνατόν να γίνει μέσω της μετατροπής του πυροσταφυλικού σε αιθανόλη, αφού το παραγόμενο πυροσταφυλικό επαρκεί μόνο για την επανοξείδωση των 2 μορίων NADH που παράγονται από τη μεταβολική οδό EMP. Έτσι, τα ανηγμένα αυτά μόρια επανοξειδώνονται μέσω άλλων αντιδράσεων και κυρίως μέσω των αντιδράσεων βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, οι οποίες καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες ανηγμένων παραγόντων. Αιθανόλη παράγεται επίσης και από βακτήρια και μύκητες.

Στον ενεργειακό ισολογισμό, η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας που προκύπτει από το χημικό μετασχηματισμό ενός μορίου γλυκόζης σε CO₂ και αιθανόλη είναι 40 Kcal. Η ενέργεια του σχηματισμού ενός μορίου ATP είναι 7,3 Kcal. Κατά την αλκοολική ζύμωση σχηματίζονται δύο μόρια ATP και άρα συνολικά 25,4 Kcal ελευθερώνονται υπό μορφή ενέργειας προκαλώντας αύξηση θερμοκρασίας του γλεύκους σε ζύμωση. Η επανοξείδωση του NADH, με κατανάλωση οξυγόνου και η οξειδωση του πυροσταφυλικού οξέος μέσω του κύκλου του Krebs επιτρέπουν μεγαλύτερη συλλογή ενέργειας που αντιστοιχεί σε σχηματισμό 38 μορίων ATP για κάθε μόριο σακχάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η αναπνευστική οδός για το ίδιο βάρος σακχάρων να θέτει στη διάθεση της ζύμης 19 φορές περισσότερη ενέργεια: Η ζύμωση των σακχάρων από τη ζύμη παράγει πάντοτε λίγο γαλακτικό οξύ, περίπου 200 mg/l. Ο μηχανισμός αυτού του σχηματισμού μοιάζει με αυτόν της ομογαλακτικής ζύμωσης. Οι ζύμες σχηματίζουν σχεδόν αποκλειστικά D(-) γαλακτικό οξύ. (Τσακίρης 2017, Αγγελής 2017, Μπαλατσαούρας, 2006, Κατινάκης 2004)



Εικόνα 6. Μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης, που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. (Τσακίρης, 2017). Η μετατροπή επιτελείται σε δύο βήματα: Το πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται, σε μια αντίδραση που καταλύεται από την αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού και μετατρέπεται σε ακεταλδεύδη. Στη συνέχεια, η ακεταλδεύδη ανάγεται σε αιθανόλη, σε μια αντίδραση που καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογονάση (Μπαλατσαούρας, 2006).

1.3.3.2.2 ΓΛΥΚΕΡΟΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Μία ακόμα πορεία που λαμβάνει χώρα κατά το μεταβολισμό της γλυκόζης από τους ζυμομύκητες είναι η **παραγωγή γλυκερόλης**. Η ένωση αυτή περιέχεται στους οίνους σε ποσότητα 6–10% (Καλλίθρακα, Πανεπιστημιακές σημειώσεις 2018). Η γλυκερόλη είναι μία τριόλη, η οποία είναι πολύ σημαντική για τα κύτταρα, καθώς είναι η ουσία με την οποία ενώνονται με εστερικούς δεσμούς τα λιπαρά οξέα δημιουργώντας τα τριγλυκερίδια. Στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, το ενοφθάλμισμα συνίσταται από μικροοργανισμούς που έχουν αναπτυχθεί εν τη παρουσία οξυγόνου. Τα ένζυμα μετατροπής του πυροσταφυλικού σε αιθανόλη (πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση και αλκοολική αφυδρογονάση) είναι ανενεργά, καθιστώντας έτσι περιορισμένη τη συσσώρευση της αιθανόλης. Επομένως η αναγέννηση των NADH γίνεται μέσω της διυδροξυακετόνης. Με τον τρόπο αυτό, παράγονται γλυκερόλη και πυροσταφυλικό και μέσω αυτού και άλλα

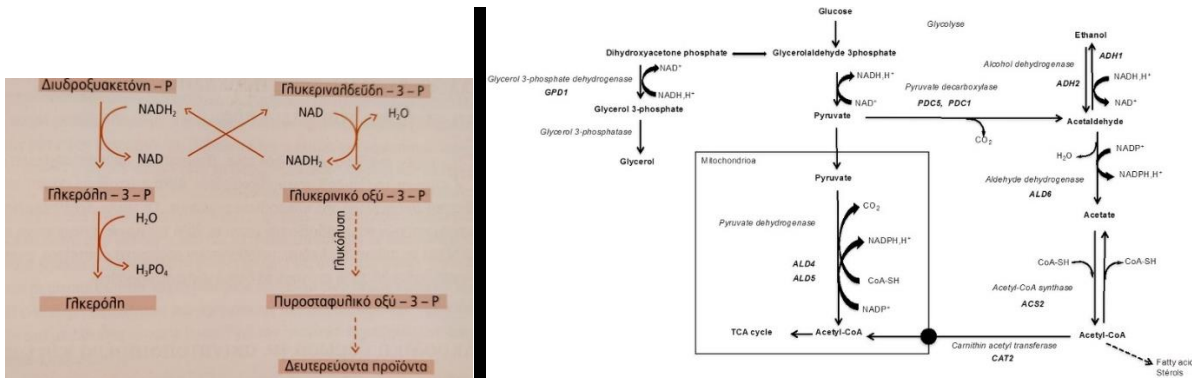
δευτερογενή προϊόντα (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Αναλυτικότερα, ο τελικός αποδέκτης του υδρογόνου που προέρχεται από τη γλυκόλυση είναι η ακεταλδεΐδη. Στην αρχή του φαινομένου η ακεταλδεΐδη απουσιάζει από το περιβάλλον. Η επανοξειδωση του NADH, γίνεται με κατανάλωση ενός μορίου διυδροξυακετόνης -P, της οποίας η αναγωγή οδηγεί στην παραγωγή γλυκερόλης. Μ' αυτό τον τρόπο εξηγείται και η ύπαρξη περιόδου αναμονής. Ταυτόχρονα η γλυκεριναλδεΐδη -3P οξειδώνεται σε γλυκερινικό οξύ -3P, που με τη σειρά του δίνει πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο αποκαρβοξυλιώνεται σε ακεταλδεΐδη. **Αυτή η ακεταλδεΐδη δεν μπορεί όμως να αναχθεί σε αιθανόλη και γι' αυτό τα δυο υδρογόνα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία γλυκερόλης με αφετηρία τη διυδροξυακετόνη. Κάθε φορά, λοιπόν, που σχηματίζεται ένα μόριο γλυκερόλης, παράλληλα σχηματίζεται ένα μόριο πυροσταφυλικού οξέος, χωρίς όμως να μετατρέπεται σε αιθανόλη.** Ανάμεσα στην ακεταλδεΐδη και τη διυδροξυακετόνη, που είναι και οι δυο δέκτες υδρογόνου, υπάρχει ανταγωνισμός. Όταν η ακεταλδεΐδη δεν υπάρχει, δηλαδή στην αρχή της αύξησης των ζυμών, η διυδροξυακετόνη χρησιμεύει σα δέκτης υδρογόνου και πραγματοποιείται συσσώρευση της ακεταλδεΐδης για το ξεκίνημα της αλκοολικής ζύμωσης. Όταν η συγκέντρωση των δυο αυτών ενώσεων γίνει ίδια, επειδή η αναγωγή της ακεταλδεΐδης είναι πιο εύκολη, επικρατεί η αλκοολική ζύμωση. Ακόμη όμως και όταν η αλκοολική ζύμωση βρίσκεται σε πλήρη εξέλιξη, ένα 8% των μορίων των σακχάρων μετέχει στη γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση. (Τσακίρης, 2017) Ωστόσο, η παραγωγή της γλυκερόλης, από τους μικροοργανισμούς της αλκοολικής ζύμωσης, επηρεάζεται και από την παρουσία του θειώδους ανυδρίτη. Ο θειώδης ανυδρίτης προστίθεται στο γλεύκος στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, προκαλεί την παραγωγή γλυκερόλης και CO₂, ενώ δεσμεύει μόνιμα την αιθανόλη. Η συνδεδεμένη με SO₂ αιθανόλη δεν μπορεί να αναχθεί σε αιθανόλη κι έτσι ο τελικός αποδέκτης των e⁻ είναι η φωσφορική διυδροξυ ακετόνη. Η παραγωγή της γλυκερόλης γίνεται μέσω της αναγωγής της τελευταίας, που πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την οξείδωση ενός NADH προς NAD⁺. Η γλυκερόλη, στη συνέχεια εξέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη. Η αντίδραση αυτή αποτελούσε τη μέθοδο για τη βιομηχανική παραγωγή της γλυκερόλης. Η αναλογία στον οίνο είναι 1 μόριο γλυκερόλης ανά 10 μόρια αιθανόλης. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια: Αρχικά η φωσφορική διυδροξυ ακετόνη ανάγεται σε 3 – φωσφορική γλυκερόλη, με τη βοήθεια του ενζύμου αφυδρογονάση της 3 – φωσφορικής γλυκερόλης και με ταυτόχρονη οξείδωση NADH προς NAD⁺. Εν συνεχεία, η φωσφορική ομάδα απομακρύνεται ως φωσφορικό οξύ από το μόριο μέσω του ενζύμου φωσφατάση της 3 – φωσφορικής γλυκερόλης.

Η αλλαγή από την **αλκοολική σε γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση** συμβαίνει κυρίως λόγω της ανάγκης αναγέννησης NAD⁺, όταν απουσιάζει η ακεταλδεΐδη από το περιβάλλον (εικόνα 11). Αυτό μπορεί να οφείλεται:

1. Στη μη διαθεσιμότητα της ακεταλδεΐδης, εάν δεσμεύεται από το θειώδη ανυδρίτη (Ciany et al.,2013). Ο θειώδης ανυδρίτης εισέρχεται στο κύτταρο και δεσμεύεται από διάφορες ουσίες. Μια από αυτές τις ενώσεις είναι η ακεταλδεΐδη που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση με την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Ο θειώδης ανυδρίτης δεσμεύεται σταθερά με αυτή την ένωση με αποτέλεσμα να μη μπορεί να αναχθεί προς αιθανόλη μέσω της δευτερης ενζυμικής αντίδρασης (Neuberg, 1946).
2. Στην απουσία ή στην χαμηλή δραστηριότητα της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης και
3. Στην υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου αφυδρογονάση της αλδεΐδης (υπό αλκαλικό pH) που καταλύει την αντίδραση από ακεταλδεΐδη προς οξικό (Ciany et al.,2013).

Η φωσφορική δι-υδροξυ-ακετόνη (DHAP), το κύριο προϊόν της αντίδρασης αλδολάσης, οξειδώνεται σε 3-φωσφορική γλυκερόλη (από το ένζυμο αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης), ενώ ένα μόριο NADH οξειδώνεται σε NAD⁺. Στη συνέχεια, το ένζυμο φωσφατάσης της 3-φωσφορικής γλυκερόλης καταλύει την παραγωγή γλυκερόλης από την αποαποφωσφυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης (Sarris & Papanikolaou, 2016). Οπότε, στην ουσία η επανοξειδωση του NADH₂, γίνεται με την κατανάλωση ενός μορίου φωσφορικής δι-υδροξυ-ακετόνης, της οποίας η αναγωγή οδηγεί στην παραγωγή γλυκερόλης. Με αυτόν τον τρόπο εξηγείται και η ύπραξη της περιόδου αναμονής. Ταυτόχρονα η 3-φωσφορική- γλυκεραλδεΐδη (G3P) οξειδώνεται σε το 3-φωσφογλυκερινικό οξύ που με τη σειρά του δίνει το πυροσταφυλικό οξύ το οποίο αποκαρβοξυλιώνεται σε ακεταλδεΐδη. Αυτή η ακεταλδεΐδη δεν μπορεί όμως να αναχθεί σε αιθανόλη και γι' αυτό τα δυο υδρογόνα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία γλυκερόλης με αφετηρία τη δι-υδροξυ-ακετόνη. Κάθε φορά, λοιπόν, που σχηματίζεται ένα μόριο γλυκερόλης, παράλληλα σχηματίζεται ένα μόριο πυροσταφυλικού οξέος, χωρίς όμως να μετατρέπεται σε αιθανόλη (Τσακίρης, 2017).

Ανάμεσα στην ακεταλδεΐδη και τη δι-υδροξυ-ακετόνη, που είναι και οι δυο δέκτες υδρογόνου, υπάρχει ανταγωνισμός. Όταν η ακεταλδεΐδη δεν υπάρχει, δηλαδή στην αρχή της αύξησης των ζυμών, η δι-υδροξυ-ακετόνη χρησιμεύει σαν δέκτης υδρογόνου και πραγματοποιείται συσσώρευση της ακεταλδεΐδης για το ξεκίνημα της αλκοολικής ζύμωσης. Όταν η συγκέντρωση των δυο αυτών ενώσεων γίνει ίδια, επειδή η αναγωγή της ακεταλδεΐδης είναι πιο εύκολη, επικρατεί η αλκοολική ζύμωση. Ακόμη όμως και όταν η αλκοολική ζύμωση βρίσκεται σε πλήρη εξέλιξη, ένα 8% των μορίων των σακχάρων μετέχει στη γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση (Τσακίρης, 2017).



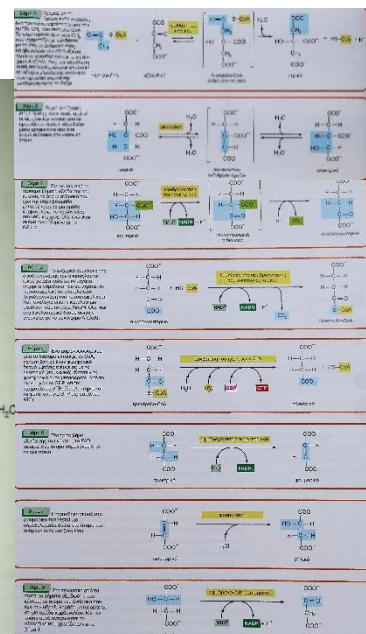
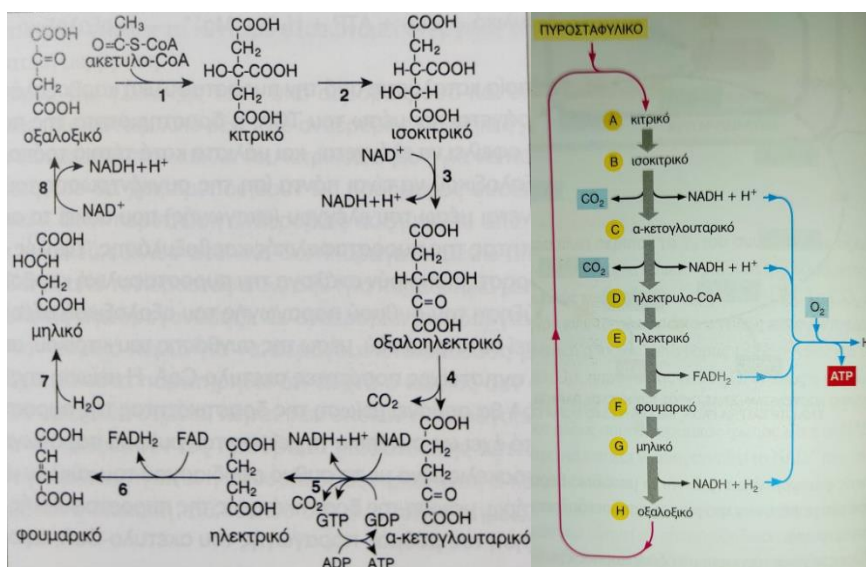
Εικόνα 7. α) Μεταβολικό μονοπάτι γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης – οδηγεί σε σχηματισμό γλυκερόλης (Τσακίρης, 2017). Κατά τη συγκεκριμένη μεταβολική οδό μόνο δύο μόρια ATP παράγονται για κάθε μόριο εξόζης, που αποικοδομείται. Το ATP χρειάζεται για την ενεργοποίηση της γλυκόζης (παραγωγή 6-φωσφορικής γλυκόζης) κατά το πρώτο βήμα της γλυκόλυσης. Εν τέλει κατά την γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση το ενεργειακό κέρδος για το κύτταρο είναι μηδέν, αφού όπως αναφέρθηκε δύο μόρια ATP που παράγονται καταναλώνονται εκ νέου στα πρώτα στάδια της γλυκόλυσης (Ribereau-Gayon, et al., 2006), β) Ύψυμα και κύρια γονίδια που εμπλέκονται στην παράκαμψη PDH και στην παραγωγή γλυκερόλης – *M.pulcherrima/S.cerevisiae* (γλυκεροπυροστική ζύμωση) (Sadoudi et al, 2017)

1.3.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

1.3.4.1 Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (ΤΡΙΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ / KREBS / TCA)

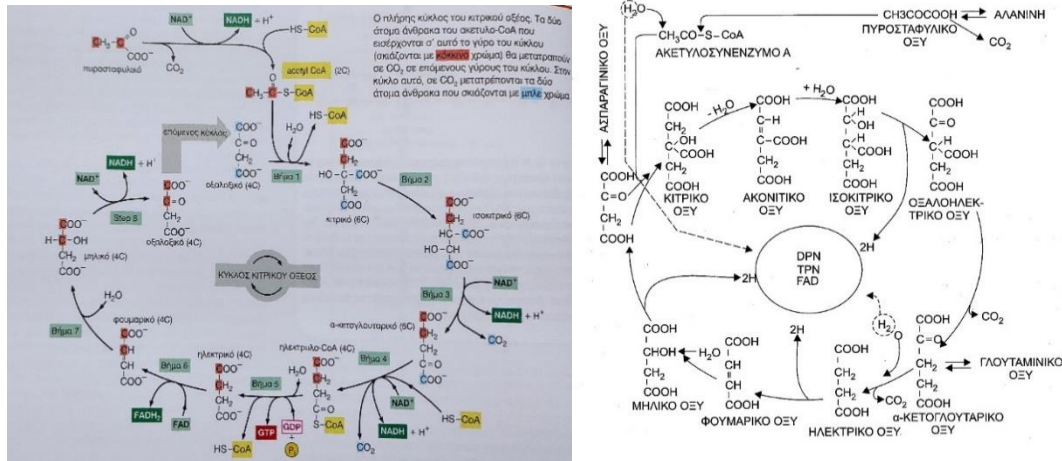
Ο κύκλος του κιτρικού οξέος αποτελεί το δεύτερο στάδιο της κυτταρικής αναπνοής, όπου οξειδώνονται όλα τα υποστρώματα. Το κυριότερο προϊόν της γλυκόλυσης, το πυροσταφυλικό οξύ, αποτελεί υπόστρωμα ενός πολυενζυμικού συμπλέγματος, της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, που καταλύει τη μετατροπή του σε ακετυλο-CoA.

Πυροσταφυλικό + CoA+NAD⁺ → ακετυλο-CoA +CO₂ + NADH. Ο αερόβιος καταβολισμός του πραγματοποιείται μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (Tricarboxylic acid cycle, εικόνα 8 και 9). Ο σημαντικός αριθμός των ενδιάμεσων μεταβολιτών του κύκλου υποδηλώνει ότι υπάρχουν πολλές εναλλακτικές εισοδοί για τα προϊόντα των διαφόρων καταβολικών μονοπατιών. Στους ετερότροφους οργανισμούς, ο κύκλος αποκτά τα υποστρώματα που χρειάζεται από τους υδατάνθρακες, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Οι υδατάνθρακες και τα λιπίδια εισέρχονται στον κύκλο ως ακετυλο-CoA, ενώ τα αμινοξέα με τη μορφή κάποιου ενδιάμεσου μεταβολίτη του κύκλου.



Εικόνα 8. α) Οξείδωση του ακετυλο-CoA μέσω του TCA. Ύψυμα που συμμετέχουν: 1: κιτρική συνθήση, 2:ακονιτάση, 3,4: ισοκιτριική αφυδρογονάση, 5: α-κετογλουταρική αφυδρογονάση, 6: ηλεκτρική αφυδρογονάση, 7: φουμαράση, 8: μηλική αφυδρογονάση. Η συνολική αντίδραση έχει ως εξής: ακετυλο-CoA + 3NAD⁺ + FAD⁺ + ADP → 2 CO₂ + CoA + 3 NADH + FADH₂ + ATP (Αγγελής 2017), β) Απλουστευμένη αναπαράσταση του κύκλου του κυκλικού οξέος: κατανάλωση O₂ και απελευθέρωση CO₂ από την οξείδωση των μοριακών ενδιάμεσων του κύκλου

(Alberts et al, 2006), γ) Ο πλήρης κύκλος του κιτρικού οξέος σε οκτώ λεπτομερή βήματα. Για κάθε βήμα, το τμήμα του μορίου που μεταβάλλεται σκιάζεται με μπλε χρώμα, ενώ το όνομα του ενζύμου που καταλύει την αντίδραση βρίσκεται σε κίτρινο πλαίσιο. (Alberts et al, 2006). Συννοώντας, η λειτουργία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων είναι: Η συγκομιδή ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας από τις πηγές οργανικών καύσιμων μορίων (Berg et al, 2002). Μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος παράγονται ενδιάμεσοι μεταβολίτες, όπως το α-κετογλουταρικό που η μετατροπή του σε γλουταμινικό είναι βασική στη βιοσύνθεση πλήθους αμινοξέων, καθώς και στην αφομοίωση της NH₃ (όπως και η μετατροπή του οξαλοξικού σε ασπαραγινικό). Οι αναερόβιοι οργανισμοί επίσης επιδίδονται σε κάποιες από τις αντιδράσεις του κύκλου για να συνθέσουν τους ενδιάμεσους μεταβολίτες που χρειάζονται για τη βιοσύνθεση κυτταρικών τους υλικών. Ο κύκλος όμως σταματά, σε ορισμένα σημεία πέραν των οποίων δεν υπάρχουν χρήσιμοι μεταβολίτες. (Alberts et al., 2006).



Εικόνα 9 . α) β) Σχηματα του κύκλου του Krebs (Alberts et al.2006, Μπαλατσαούρας, 2006). Ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων. Το ακετυλο - CoA, εν τη παρουσία οξυγόνου και μόνο ακολουθεί μία διεργασία καλούμενη «κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων» (άλλες ονομασίες είναι κύκλος του κιτρικού οξέος και κύκλος του Krebs). Η διεργασία αυτή αποτελεί τον περαιτέρω καταβολισμό του. Ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων είναι η τελική κοινή πορεία για την οξειδωση των καύσιμων οργανικών μορίων, αμινοξέων, λιπαρών οξέων και υδατανθράκων. Τα μόρια αυτά εισέρχονται στον κύκλο ως ακετυλο - CoA. Οι αντιδράσεις του κύκλου λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών οργανισμών.

TCA καλείται και κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs. Ο κύκλος αυτός καλύπτει δύο σημαντικές ανάγκες του κυττάρου. Μέσω αυτού:

α) Παράγονται ενδιάμεσοι μεταβολίτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ουσίες στη βιοσύνθεση κυτταρικών υλικών (π.χ. α-κετογλουταρικό → γλουταμικό).

β) Παράγεται ενέργεια, κυρίως υπό τη μορφή ανηγμένων συνενζύμων NADH, FADH₂, τα οποία επανοξειδούμενα παράγουν ATP (το μεν NADH₃ μόρια ATP ανά μόριο, το δε FADH₂ μόρια ATP ανά μόριο).

Φαινομενικά, ο TCA είναι αυτοδιαταρασσόμενος, αφού η απομάκρυνση κάποιου ενδιάμεσου μεταβολίτη, για χρήση του σε αντιδράσεις αναβολισμού, θα αναμενόταν να διαταράξει τη σύνθεση του οξαλοξικού και ως εκ τούτου την αναγέννηση του κιτρικού οξέος. Αυτό όμως δε συμβαίνει στην πράξη, αφού, χάρη της ομαλής λειτουργίας του κύκλου, υπάρχουν στο μικροβιακό κύτταρο επιπρόσθετες αντιδράσεις βιοσύνθεσης οξαλοξικού, που λειτουργούν ανεξάρτητα του TCA. Η κυριότερη είναι η καρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος προς οξαλοξικό: πυροσταφυλικό + CO₂ + ATP + H₂O + Mg²⁺ → οξαλοξικό + ADP + Pi, αντίδραση, η οποία καταλύεται από την πυροσταφυλική καρβοξυλάση. Επειδή οξαλοξικό οξύ παράγεται και μέσω του TCA, η δραστηριότητα της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης οφείλει να ελέγχεται, και μάλιστα κατά τέτοιο τρόπο, ώστε η συγκέντρωση του οξαλοξικού να είναι πάντα ίση της συγκέντρωσης του ακετυλο-CoA. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του ελέγχου (επαγωγής) που ασκεί το ακετυλο-CoA επι της δραστηριότητας της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης. Υψηλές συγκεντρώσεις ακετυλο-CoA δραστηριοποιούν ανάλογα την πυροσταφυλική καρβοξυλάση με αποτέλεσμα αύξηση του ρυθμού παραγωγής του οξαλοξικού οξέος. Το τελευταίο θα βιομετατραπεί σε κιτρικό οξύ, μέσω της συνθάσης του κιτρικού, απομακρύνοντας συγχρόνως και αντίστοιχες ποσότητες ακετυλο-CoA. Η μείωση της συγκέντρωσης του ακετυλο-CoA θα σημαίνει μείωση της δραστηριότητας της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης. Αυτό έχει ως συνέπεια τη μείωση του ρυθμού παραγωγής του οξαλοξικού οξέος σε ισοσκελισμένα με το ρυθμό εφοδιασμού του κύκλου με ακετυλο-CoA επίπεδα. Περαιτέρω, μείωση της δραστηριότητας της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης θα σημαίνει αύξηση του ρυθμού παραγωγής του ακετυλο CoA, αφού περισσότερο υπόστρωμα (πυροσταφυλικό οξύ) θα μείνει διαθέσιμο για την πυροσταφυλική αφυδρογονάση. **Η πυροσταφυλική καρβοξυλίωση ρυθμίζει εμμέσως και την παραγωγή του ακετυλο CoA, αφού ανταγωνίζεται ως προς το υπόστρωμα την πυροσταφυλική αφυδρογονάση.** Εκτός του προαναφερόμενου μηχανισμού αναγέννησης οξαλοξικού υπάρχουν και άλλοι που διαφέρουν από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό. Μερικοί τέτοιοι σημαντικοί μηχανισμοί είναι ο

μηχανισμός αναγέννησης μέσω της αντίδρασης της Ρ-ενολο-πυροσταφυλικής καρβοξυκινάσης: $PEP + CO_2 + H_2O \rightarrow$ οξαλοξικό + Pi, και αυτός μέσω της αντίδρασης που καταλύεται από το μηλικό ένζυμο, ο οποίος ενισχύει εμμέσως τη συγκέντρωση του οξαλοξικού: $πυροσταφυλικό + CO_2 + NADPH + H^+ \rightarrow$ L-μηλικό + $NADP^+$. Σε κάθε περίπτωση το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου συνιστά βασικό παρόγοντα ενζυμικής ρύθμισης του TCA.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι αντιδράσεις του κιτρικού κύκλου, καθώς επίσης και άλλες αντιδράσεις που συσχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας, πραγματοποιούνται στα μιτοχόνδρια. Στα βακτήρια, αντίθετα, τα κυριότερα ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις μέσω των οποίων το κύτταρο εξοικονομεί ενέργεια, εδράζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. **Ο μεταβολισμός της γλυκόζης τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες αποδίδει πυροσταφυλικό οξύ. Υπό αναερόβιες συνθήκες μικρή ποσότητα του τελευταίου εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος για να παράγει ενδιάμεσους μεταβολίτες που θα χρησιμοποιηθούν ως πρόδρομες ουσίες βιοσύνθεσης κυτταρικών υλικών.** Στην περίπτωση αναερόβιας αύξησης το απαιτούμενο για τη λειτουργία του κιτρικού κύκλου ακετυλο-CoA παράγεται μέσω αποδόμησης του οξικού ακετυλο-CoA ή από το πυροσταφυλικό οξύ (για παράδειγμα με τη μεσολάβηση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης). **Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν, επομένως, τον κιτρικό κύκλο για να παράγουν ενδιάμεσους μεταβολίτες και όχι ενέργεια.** Έχει μάλιστα παρατηρηθεί ότι συχνά ο κύκλος δεν ολοκληρώνεται, αλλά σταματά σε ορισμένα σημεία, πέραν των οποίων οι παραγόμενοι ενδιάμεσοι μεταβολίτες δεν ενδιαφέρουν ως πρόδρομα βιοσύνθεσης κυτταρικών υλικών. Μια συνηθισμένη περίπτωση είναι η απουσία δραστηριότητας α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης και η διακοπή του κύκλου στο αντίστοιχο σημείο. (Αγγελής 2017, Μπαλατσαούρας, 2006, Κατινάκης 2004)

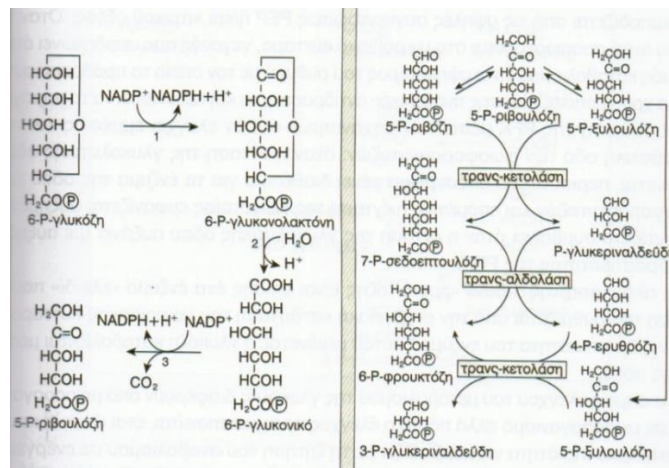
Περιγραφή του κύκλου Krebs

Η σπουδαιότητα του κύκλου του Krebs είναι ότι παράγει ανηγμένα μόρια (NADH, FADH₂), τα οποία εισέρχονται στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και μεταφέρουν ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα την παραγωγή νερού και ATP.

1. Ο κύκλος αρχίζει με το οξαλοξικό που συμπυκνώνεται με το ακέτυλο – CoA, δίνοντας κίτρουλο – CoA, το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται σε κιτρικό και CoA. Πρόκειται για μία αλδολική συμπύκνωση που ακολουθείται από υδρόλυση και καταλύεται από την κιτρική συνθάση.
2. Το κιτρικό για λόγους στερεοχημικής παρεμπόδισης ισομερειώνεται σε ισοκιτρικό. Η ισομερίωση πραγματοποιείται σε δύο βήματα, μία αφυδάτωση και στη συνέχεια μία ενυδάτωση, που όμως καταλύονται από το ίδιο ένζυμο, την ακονιτάση.
3. Το ισοκιτρικό οξειδώνεται και αποκαρβοξυλιώνεται σε α-κετογλουταρικό, μέσω της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται και η αναγωγή ενός NAD^+ σε $NADH$. Στο στάδιο αυτό υπάρχει η πρώτη απώλεια C με τη μορφή CO_2 . Επιπλέον, το στάδιο είναι σημαντικό για τη συνολική ταχύτητα του κύκλου, καθώς αποτελεί ένα από τα σημεία ελέγχου του.
4. Το επόμενο βήμα είναι η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του α-κετογλουταρικού σε ηλεκτρυλο – CoA. Το σύμπλεγμα της α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης που καταλύει αυτήν την αντίδραση, είναι ομόλογο με εκείνο της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, ενώ και οι αντιδράσεις (η παρούσα με την Swanson) είναι μεταξύ τους αντίστοιχες. Αυτό είναι το στάδιο με τη δεύτερη απώλεια C με τη μορφή CO_2 .
5. Ακολουθεί η διάσπαση του θειοεστερικού δεσμού του ηλεκτρυλο – CoA, που είναι συζευγμένη με τη φωσφορυλίωση ενός διφωσφορικού νουκλεοζίτη μίας πουρίνης, (συνήθως γουανίνης GDP). Το ένζυμο που καταλύει την συγκεκριμένη αντίδραση είναι η συνθετάση του ηλεκτρυλο – CoA, ενώ τα προϊόντα είναι το ηλεκτρικό και η GTP.
3. Τελικό βήμα της διεργασίας του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων είναι η αναπαραγωγή του οξαλοξικού από την οξείδωση του ηλεκτρικού. Αυτό πραγματοποιείται από μία σειρά αντιδράσεων που παραπέμπουν στην β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα, αρχικά το ηλεκτρικό οξειδώνεται σε φουμαρικό, από την ηλεκτρική αφυδρογονάση και με ταυτόχρονη αναγωγή ενός FAD σε $FADH_2$. Εν συνεχεία, το φουμαρικό ενυδατώνεται προς L – μηλικό, με τη βοήθεια της φουμαράσης. Τέλος, το L – μηλικό οξειδώνεται σε οξαλοξικό με ταυτόχρονη αναγωγή ενός NAD^+ σε $NADH$. Το ένζυμο που καταλύει αυτήν την αντίδραση είναι η μηλική αφυδρογονάση. (Rupasinghe et al., 2017)

1.3.4.2 ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΠΕΝΤΟΖΩΝ

Η καταβολική οδός των φωσφοροπεντοζών (εικόνα 7) είναι το πιο σημαντικό εναλλακτικό μονοπάτι οξειδωσης της γλυκόζης και συνίσταται από μία οξειδωτική φάση μέσω της οποίας, η γλυκόζη μετατρέπεται σε πεντόζη και διοξειδίο του άνθρακα και η οποία αποδίδει δύο ανηγμένα συνένζυμα NADPH, και από μια μη-οξειδωτική φάση, κατά την οποία μέσω σειράς αντιστρεπτών αντιδράσεων παράγονται μόρια με 3-7 άτομα άνθρακα, έως ότου επιτευχθεί ισορροπία. Οι φωσφοτριόζες (P-διυδροξυακετόνη και 3-P-γλυκεριναλδεύδη) είναι ίδιες που παράγονται και κατά τη γλυκόλυση. Η άμεση οξείδωση της γλυκόζης μέσω αυτής της οδού δεν αποδίδει ενέργεια υπό τη μορφή ATP, αλλά υπό τη μορφή ανηγμένων συνενζύμων NADPH (έχει παρόμοια δομή με το NADH). Και τα δύο αυτά συνένζυμα χρησιμεύουν για τη μεταφορά πρωτονίων (δρογόνων), έχουν όμως διακριτούς ρόλους: το NADH συμμετέχει κυρίως σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, μέσω των οποίων παράγεται ενέργεια, ενώ το NADPH χρησιμοποιείται κυρίως για την αναγωγή πρόδρομων μορίων σε αντιδράσεις αναβολισμού (π.χ. βιοσύνθεση λιπαρών οξέων). Στους περισσότερους μικροοργανισμούς 66-80% της γλυκόζης καταβολίζεται μέσω της γλυκολυτικής οδού EMP και το υπόλοιπο οξειδώνεται μέσω της οδού των φωσφοροπεντοζών. Ένα πολύ γνωστό σημείο ελέγχου του καταβολισμού της γλυκόζης με τη μία ή την άλλη οδό βρίσκεται στα πρώτα στάδια της οδού EMP και είναι η φωσφορυλίωση της 6-P-φρουκτόζης προς 1,6-διP-φρουκτόζη, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο PFK. Η μοριακή κατασκευή αυτού του ενζύμου του επιτρέπει τον έλεγχο της καταλυτικής δραστηριότητας του από την ένταση της αναβολικής δραστηριότητας του κυττάρου (Όταν υπάρχουν ενεργειακά αποθέματα, της PFK μειώνεται και αντίστροφα). Η δραστηριότητα αυτού του ενζύμου ελέγχεται, επίσης, από μερικά καταβολικά παράγωγα και συγκεκριμένα παρεμποδίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις PEP/ή και κιτρικού οξέος (όταν τα μόρια αυτά συσσωρεύονται, το μικροβιακό κύτταρο σταματάει να τα παράγει). Η ρύθμιση της PFK μέσω των μηχανισμών αυτών ελέγχει εμμέσως και την καταβολική οδό των φωσφοροπεντοζών: όταν η ένταση της γλυκολυτικής οδού μειώνεται, περισσότερο υπόστρωμα μένει διαθέσιμο για τα ένζυμα της οδού των φωσφοροπεντοζών και επομένως η ένταση της τελευταίας εμφανίζεται αυξημένη. Το αντίθετο συμβαίνει όταν η ένταση της γλυκολυτικής οδού αυξάνει (με αύξηση της δραστηριότητας της PFK). Η αλδολάση της 1,6-διP-φρουκτόζης είναι επίσης ένα ένζυμο-κλειδί που η δράση του ρυθμίζεται από την ενεργειακή κατάσταση του μικροβιακού κυττάρου. Όταν η δραστηριότητα του ενζύμου αυτού μειώνεται, η γλυκόζη καταβολίζεται μέσω άλλης οδού. Τα σημεία ελέγχου του μεταβολισμού της γλυκόζης διαφέρουν από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό, αλλά πάντα ο έλεγχος πραγματοποιείται, έτσι ώστε η καταβολική δραστηριότητα να συμβαδίζει με τη ζήτηση του αναβολισμού σε ενέργεια. Η πορεία αυτή αποτελεί την τρόπο αποκατάστασης της ενέργειας και των πρόδρομων μορίων, που σπαταλούνται κατά τη βιοσυνθετική διαδικασία (Αγγελής, 2017, Alberts, 2006, Κατινάς, 2004, Kruger & von Schaewen, 2003).



(α) (β)

Εικόνα 10. Καταβολισμός της γλυκόζης μέσω της οδού των φωσφοροπεντοζών. (α) Οξειδωτική φάση: Η 6-P-γλυκόζη μετατρέπεται σε 5-P-ριβουλόζη με τη μεσολάβηση των ενζύμων αφυδρογονάση της 6-P-γλυκόζης (1), λακτονάση (2) και αφυδρογονάση του 6-P-γλυκονικού οξέος (3). (β) Μη-οξειδωτική φάση: Από την 5-P-ριβουλόζη παράγονται τα μόρια με 3-7 άτομα C μέσω αντιστρεπτών αντιδράσεων. Οι πεντόζες που παράγονται χρησιμοποιούνται ως πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων, ενώ τα άλλα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέσω άλλων μεταβολικών οδών.

1.3.5 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

Εκτός από την αλκοολική ζύμωση, οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί διαθέτουν και άλλον έναν τρόπο καταβολισμού των οργανικών ουσιών, την κυτταρική αναπνοή. Μάλιστα, ο τρόπος αυτός είναι ιδιαίτερος προσδοφόρος ενεργειακά για το μικροβιακό κύτταρο. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η ζύμωση μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Ανάλογα με τις συνθήκες όμως, διαφορετικά φαινόμενα καθορίζουν την πορεία μιας ζύμωσης και διαφορετικά μονοπάτια ακολουθούνται από τους μικροοργανισμούς για τον καταβολισμό των υποστρωμάτων. Ένα από αυτά, είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία αποτελεί τη συνέχεια του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, ή ακριβέστερα, την εξαργύρωση των ενεργειακών «νομισμάτων» που αποκομίζει το κύτταρο από αυτόν. Συγκεκριμένα, πρόκειται για τη διεργασία παραγωγής ATP (και ADP και Pi) μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από NADH και FADH₂ με τελικό αποδέκτη το O₂ διαμέσου μίας σειράς φορέων ηλεκτρονίων. Για τους αερόβιους οργανισμούς αυτή είναι η σημαντικότερη πηγή ATP (26 – 30 ATP). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποδίδει 3 ATP για κάθε NADH και 2 ATP για κάθε FADH₂ και η αναπνοή ενός μορίου γλυκόζης παράγει 36 έως 38 μόρια ATP. Δύο προέρχονται από τη γλυκόλυση, 28 από την οξειδωτική φωσφορυλίωση της NADH και της FADH₂ που παράγεται από τον κύκλο του Krebs και δύο από τη φωσφορυλίωση των επιπέδων υποστρώματος κατά τη διάρκεια του σχηματισμού ηλεκτρικού οξέος. Τέσσερα έως έξι μόρια ATP προκύπτουν από την οξειδωτική φωσφορυλίωση δύο μορίων NADH που παράγονται στη γλυκόλυση. Ο ακριβής αριθμός εξαρτάται από το σύστημα μεταφοράς που χρησιμοποιείται για τη μετακίνηση των ηλεκτρονίων του κυτοσολικού NADH στην αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια. Επομένως, η αναπνευστική οδός για την ίδια ποσότητα σακχάρων παράγει 18 έως 19 φορές περισσότερη ενέργεια από τη ζύμωση (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Τα διάφορα γένη και είδη των ζυμών οξειδώνουν όλες τις ζυμώσιμες πηγές άνθρακα και επιπλέον τις πεντόζες, το οξικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, τη μεθανόλη, την αιθανόλη, τη διυδροξυακετόνη, το κετονογλουταρικό οξύ και το οξαλοξικό οξύ. Ειδικότερα οι ζύμες που ευθύνονται για την άνθηση του οίνου (*Candida vini*, *Pichia membranaefaciens*, *Hansenula anomala*) αναπτύσσονται σε βάρος της αιθανόλης. Την αιθανόλη αποικοδομούν κατά τρόπο όμως διαφορετικό οι ζύμες της δευτερογενούς παραγωγής οίνων Χερές (Sherry) (Μπαλατσαούρας, 2006).

1.3.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΖΥΜΩΝ – ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να καταβολίσουν μια μεγάλη ποικιλία σακχάρων, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, λακτόζη, γαλακτόζη, μαλτόζη, μαννιτολη, φουκόζη, ραμνόζη, πηκτίνη, κυτταρίνη, άμυλο και συναφείς πολυσακχαρίτες. Ανεξαρτήτου του είδους των σακχάρων, τα προϊόντα αποδόμησης συνιστούν ενδιάμεσα μόρια των κύριων καταβολικών οδών. Για την έναρξη του καταβολισμού απαιτείται συνήθως μια χρονική περίοδος επαγωγής που αντιστοιχεί στην περίοδο που απαιτείται για τη βιοσύνθεση των ενζύμων που συμμετέχουν τόσο στη μεταφορά των σακχάρων στο μικροβιακό κύτταρο, όσο και στην καταβολική διεργασία καθαυτή. Η παρουσία γλυκόζης στο περιβάλλον της μικροβιακής αύξησης, συνήθως καταστέλλει τη βιοσύνθεση των ενζύμων αυτών, φαινόμενο γνωστό ως συνέπεια γλυκόζης (glc effect). Έτσι, σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν ως πηγή άνθρακα, συγχρόνως γλυκόζη και ένα άλλο σάκχαρο, οι μικροοργανισμοί πρώτα καταναλώνουν τη γλυκόζη και μόνον όταν αυτή εξαντληθεί βιοσυνθέτουν τα ένζυμα που απαιτούνται για τον καταβολισμό άλλων σακχάρων. Επιδεικνύουν, συνεπώς, δύο διακριτούς αυξητικούς κύκλους που διαχωρίζονται από μια φάση υστέρησης, η οποία αντιστοιχεί στη χρονική περίοδο επαγωγής της βιοσύνθεσης των ενζύμων που απαιτούνται για τον καταβολισμό του σακχάρου. Η αύξηση αυτή χαρακτηρίζεται ως διφασική (diauxic).

1.3.6.1 ΖΥΜΩΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Οι ζύμες θεωρούνται γενικώς ως μικροοργανισμοί που ζυμώνουν τα σάκχαρα προς αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα κατά την ακόλουθη γενική αντίδραση: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + CO_2 + 64 M.Θ$ (αντίδραση Gay-Lussac). Η αντίδραση δεν είναι στοιχειομετρική, και αυτό, διότι εκτός από τα παραπροϊόντα που παράγονται πάντοτε, σε μεγαλύτερες ή μικρότερες ποσότητες, ανάλογα με την περίπτωση, ένα αυξημένο ποσοστό των εξοζών χρησιμοποιείται από τα κύτταρα της ζύμης, είτε για τη σύνθεση κυτοπλάσματος (πολλαπλασιασμός), είτε για την αποδέσμευση ενέργειας, όταν αυτή που αποδεσμεύεται με την ανωτέρω διάσπαση δεν είναι αρκετή. Η ζύμωση, όπως περιγράφεται στην ανωτέρω αντίδραση, είναι ζωή χωρίς αέρα (la fermentation est la vie sans air) πράγμα που διατυπώθηκε από τον Παστέρ και σημαίνει ότι **με τη ζύμωση αποδεσμεύεται ενέργεια και σχηματίζονται ενδιάμεσα προϊόντα**. Εντούτοις, ακόμη και τα πλέον ζυμωτικά είδη μπορούν να μεταπέσουν από το ζυμωτικό σε καθαρά οξειδωτικό μεταβολισμό. Έτσι, όλα τα είδη του γένους *Saccharomyces* που χρησιμοποιούνται σε ζυμώσεις βιομηχανικής κλίμακας, υπό συνθήκες έντονου αερισμού, αντί να ζυμώσουν τα σάκχαρα, τα οξειδώνουν προς νερό και διοξείδιο του άνθρακα. Με τη διαδικασία αυτή

αποδεδειγμένα πολύ μεγαλύτερα ποσά ενέργειας από ότι με τη ζύμωση, χρησιμοποιώντας την ενέργεια για κυτταροπλασσία. Ο έντονος οξειδωτικός μεταβολισμός του είδους *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία παραγωγής ζύμης αρτοποιίας, για την οποία η αλκοόλη είναι προϊόν ανεπιθύμητο. **Ο Παστέρ ήταν ο πρώτος που απέδειξε ότι μια ζυμωτική ζύμη, όταν αερισθεί έντονα παύει να ζυμώνει, αλλά οξειδώνει τα σάκχαρα προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό και ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα έντονη κυτταροπλασσία.** Το αντίθετο συμβαίνει αν ο αερισμός μηδενισθεί, οπότε η ζύμη παύει να πολλαπλασιάζεται και ζυμώνει τα σάκχαρα προς διοξείδιο του άνθρακα και οινόπνευμα. Την ιδιορρυθμία αυτή της ζύμης αξιοποιεί η οινοβιομηχανία και αερίζει το γλεύκος στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης για να επιτευχθεί αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Στη συνέχεια, εξασφαλίζει πλήρη κατά το δυνατόν αναερόβωση, οπότε επιτυγχάνει το μέγιστο της παραγωγής αλκοόλης από μία δεδομένη συγκέντρωση των σακχάρων.

1.3.6.1.1 ΑΙΘΑΝΟΛΗ

Η αιθανόλη έχει περιγραφεί ως μία από τις πιο εξωτικές συνθετικές οργανικές χημικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο. Αυτό συμβαίνει, λόγω του μοναδικού συνδυασμού ιδιοτήτων ως «διαλύτη, μικροβιοκτόνο, αντιψυκτικό, καύσιμο, καταστολέα και ιδιαίτερα ως χημικό ενδιάμεσο για άλλες οργανικές χημικές ουσίες» (Maziar, 2010). Η αιθανόλη χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων των χημικών ουσιών, των καυσίμων (βιοαιθανόλη), των ποτών, των φαρμακευτικών προϊόντων και των καλλυντικών (Sarris & Papanikolaou, 2016). Από την ενεργειακή κρίση του 1970, η επιστημονική έρευνα έχει επικεντρωθεί σε μεγάλο βαθμό, στην ανάπτυξη χαμηλού κόστους, βιώσιμων και ανανεώσιμων πηγών ενέργειας όπως είναι η αιθανόλη (Maziar, 2010).

Η πλειοψηφία (90-95%) του ποσοστού αιθανόλης που παράγεται παγκοσμίως προέρχεται από την τεχνολογία της ζύμωσης (βιοαιθανόλη), ενώ το υπόλοιπο παράγεται συνθετικά. Η βιοχημεία παραγωγής της αλκοολικής ζύμωσης περιλαμβάνει τις οδούς αποδόμησης του υποστρώματος (γλυκόλυση, αλκοολική ζύμωση, γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση και αναπνοή στην περίπτωση χρήσης εξόζης, τις καταβολικές οδούς της ξυλόζης για την περίπτωση χρησιμοποίησης πεντόζης και τη την αφομοίωση της γλυκόζης και τη γλυκόλυση για την περίπτωση μικροοργανισμών μετατροπής της γλυκερόλης) και ρύθμιση μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής (φαινόμενο Pasteur, φαινόμενο Crabtree, φαινόμενο Kluyver και φαινόμενο Custer). Η γλυκόλυση θα γίνει με την καταβολική οδό Embed-Meyerhof-Parnas (για τον *S. cerevisiae* και μικροοργανισμούς που καταναλώνουν γλυκερόλη), με την καταβολική οδό των φωσφορικών πεντοζών (PP) (για τους μικροοργανισμούς που καταναλώνουν ξυλόζη) και με την καταβολική οδό Entner- Dudoitoff (για τα βακτήρια *Z. mobilis*) (Sarris & Papanikolaou, 2016). Αρκετά άρθρα έχουν δημοσιευθεί, σχετικά με τη παραγωγή αιθανόλης μέσω ζύμωσης από μικροοργανισμούς, βακτήρια, ζύμες και μύκητες. Οι πιο γνωστοί μικροοργανισμοί για την παραγωγή της αιθανόλης είναι ζύμες. Η γλυκόζη μπορεί να μετατραπεί σε αιθανόλη με τη βοήθεια ενός από τους σημαντικότερους παραγωγούς αιθανόλης, κυρίως του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* και του βακτηρίου *Z. Mobilis* (Sarris & Papanikolaou, 2016).

Η αιθανόλη παράγεται από ζύμη κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και βρίσκεται γενικά στο εύρος των 11,5-15% (v/v) στους οίνους. Είναι ένα σημαντικό συστατικό τους που επηρεάζει άμεσα τις οργανοληπτικές ιδιότητες, τη γήρανση και τη σταθερότητα του οίνου (Jackson et al.2014). Η επίδραση της αιθανόλης στο αισθητηριακό προφίλ των οίνων και άλλων αλκοολούχων ποτών έχει διερευνηθεί σε σχετικές μελέτες (Ickes et al.2017). Η αιθανόλη επηρεάζει την αίσθηση γεύσης και αίσθησης στο στόμα, μεταβάλλει την αίσθηση της γλυκύτητας, αυξάνει την πικρία, μειώνει την οξύτητα και συμβάλλει στην αίσθηση ζεστασιάς και του σώματος του οίνου (King et al. 2013, Nurgel et al.2006, Fischer et al.1994, Gawel e al. 2007). Η αιθανόλη μπορεί επίσης να μειώσει την πτητικότητα των αρωματικών ενώσεων αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους στο κρασί (Saha et al.2018) καθιστώντας τις μικρές ενώσεις όπως οι φρουτώδεις αιθυλεστέρες και τα οξικά λιγότερο αναγνωρίσιμα/ανιχνεύσιμα από τις ανθρώπινες αισθήσεις.

Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Αμπέλου και Οίνου (OIV), η περιεκτικότητα σε οινόπνευμα των οίνων πρέπει να είναι τουλάχιστον 8,5% (v/v), αν και σε περιοχές με αμπελώνες με κρύο κλίμα, αυτή η τιμή μπορεί να μειωθεί στο 7% (v/v) (OIV, 2015) . Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η περιεκτικότητα σε αιθανόλη στους οίνους αυξάνεται αισθητά σε ορισμένες περιοχές κατά 0,1-1% ετησίως (Godden et al. 2015, Alston et al.2015). Εκτός από τα θερμότερα κλίματα που οδηγούν σε υψηλότερα επίπεδα σακχάρων κατά τη συγκομιδή και ως εκ τούτου, υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλ στον οίνο (Van Leeuwen et al. 2016)

Ένας από τους κύριους λόγους πίσω από αυτήν την προοδευτική αύξηση είναι η ζήτηση των καταναλωτών για συγκεκριμένα στυλ οίνων, τα οποία περιγράφονται ως πλούσια, καλά δομημένα, με αρωματικό προφίλ που κυριαρχείται από κόκκινα, ώριμα φρούτα (Williamson et al.2012). Αυτό το στυλ απαιτεί βέλτιστη ωριμότητα σταφυλιών και υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα 240 g / L ή περισσότερο (Bindon et al.2013). **Παρ'όλα αυτά, μια αυξανόμενη τάση για μειωμένο αλκοόλ στα ποτά** και γενικά ορίζεται να περιέχει 9% έως 13% (v/v) αιθανόλη, καθώς και οι οίνοι χαμηλής αλκοόλης 0,5-2% (v/v) (Jordão et al 2015, Bucher et al.,2018). Η αύξηση της ευαισθητοποίησης για την υγεία

και την ασφάλεια και οι παγκόσμιες πρωτοβουλίες για τον περιορισμό της κατανάλωσης οινοπνεύματος είναι λόγοι για την παραγωγή οίνων χαμηλότερου αλκοόλ που απευθύνονται σε καταναλωτές οίνου. Οι οίνοι ενδέχεται επίσης να υπόκεινται σε υψηλότερη φορολογία ανάλογα με την περιεκτικότητα τους σε αλκοόλ, γεγονός που αυξάνει το τελικό κόστος τους (Sharma et al, 2017). Δεδομένου ότι η αιθανόλη είναι η κύρια πηγή περιεκτικότητας σε θερμίδες στο κρασί, υπάρχει επίσης ο κίνδυνος αρνητικών επιπτώσεων στην εξαγωγή του σε χώρες όπου η επισήμανση της υγείας των τροφίμων και ποτών που σερβίρεται σε εστιατόρια είναι προαιρετική ή υποχρεωτική (Annunziata et al, 2016). Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και επομένως σε αιθανόλη μπορεί να προκαλέσει αργή και κολλημένη αλκοολική ζύμωση και επίσης μπορεί να είναι δύσκολη για επιτυχημένες μηλογαλακτικές ζυμώσεις (Ribéreau-Gayon et al. 2006, Zapparoli et al. 2009). **Ως μέσο για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων, έχουν μελετηθεί μέθοδοι που περιλαμβάνουν μείωση της τελικής περιεκτικότητας των οίνων σε αιθανόλη** χρησιμοποιώντας μια ευρεία επιλογή παρεμβάσεων. Αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν σε (1) προπαρέμβαση (π.χ. αμπελοργία, αραίωση γλεύκους και ζύμωση φρούτων πρώιμης συγκομιδής). (2) ταυτόχρονη παρέμβαση (π.χ., ζυμομύκητες non-Saccharomyces, τροποποιημένες ζύμες και ζύμωση που έχει σταματήσει) (Goold et al. 2017, Canonico et al. 2019) και (3) μετά τη ζύμωση παρεμβάσεις (Canonico et al. 2019, Longo et al. 2017, Longo et al. 2018). **Η χρήση μικροβιολογικών προσεγγίσεων, όπως ο εμβολιασμός με ζυμομύκητες non-Saccharomyces για την παραγωγή οίνων με λιγότερη αιθανόλη είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για την απομάκρυνση της αιθανόλης με προσεγγίσεις με βάση τη μεμβράνη** (Maturano et al. 2019, Varela et al. 2015, Röcker et al. 2016). Τα πλεονεκτήματα που σχετίζονται με τη χρήση ζυμών χαμηλής αιθανόλης / υψηλής γλυκερόλης περιλαμβάνουν τη σχετικά εύκολη εφαρμογή τους και το χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με ακριβότερες και λιγότερο φιλικές προς το περιβάλλον προσεγγίσεις, όπως επαφές μεμβράνης, νανοδιήθηση ή στήλη κώνου κλώσης (Contreras et al. 2014, Varela et al. 2017). Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναγνωρίσουμε ότι οι ζυμομύκητες με χαμηλή αιθανόλη / υψηλή γλυκερόλη είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματικοί από τις διεργασίες που βασίζονται στη μεμβράνη όσον αφορά τις μειώσεις αιθανόλης (Longo et al. 2017) και είναι ίσως κατάλληλες μόνο όταν οι οινοποιοί θέλουν να επιτύχουν μείωση της περιεχόμενης αιθανόλης έως και 3,0% (v/v) (Contreras et al. 2014). Οι εμβολιασμοί με ζυμομύκητες non-Saccharomyces μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μια αποτελεσματική στρατηγική για την παραγωγή οίνων μειωμένου αλκοόλ λόγω των διαφορετικών οδών αποδόμησης σακχάρου από τις άγριες ζύμες, συμπεριλαμβανομένων αναπνοής, αλκοολικής ζύμωσης και γλυκερόλης - πυροσταφυλιτικών μεταβολισμών και διαφορετικών ρυθμιστικών μηχανισμών, σε σύγκριση με το *S. cerevisiae* (Ciani et al. 2006 & 2019). Ενώ η θεωρητική απόδοση σακχάρων προς αιθανόλη για πλήρη ζύμωση από *S. cerevisiae* κυμαίνεται γενικά από 90% έως 95%, και το υπόλοιπο σάκχαρο καταναλώνεται μέσω εναλλακτικών μεταβολικών οδών και βιοσύνθεσης βιομάζας (Ciani et al. 2006). Από την άλλη πλευρά, η απόδοση αιθανόλης και τα παραπροϊόντα που σχηματίζονται ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ζυμομυκήτων non-Saccharomyces (Ickes et al. 2017). Για παράδειγμα, λόγω του φαινομένου Crabtree, το *S. cerevisiae* προτιμά τον μεταβολισμό της ζύμωσης παρά την αναπνοή όταν η ποσότητα σακχάρου υπερβαίνει τα 10 g/L (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Αντίθετα, μεταξύ των ζυμών, υπάρχουν στελέχη και είδη που μπορούν να καταναλώνουν σάκχαρο με αερόβια αναπνοή ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του (Alexander et al. 1990, De Deken et al. 1966) χωρίς να συμβάλλει σημαντικά στο τελικό επίπεδο αιθανόλης του οίνου. Ως εκ τούτου, οι ζύμες non-Saccharomyces έχουν μελετηθεί υπό μερική και ελεγχόμενη στρατηγική αερισμού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για την επίτευξη χαμηλότερης αιθανόλης επιτρέποντας στην κατανάλωση μέρους του σακχάρου μέσω αναπνοής και όχι αλκοολικής ζύμωσης (Röcker et al. 2016, Canonico et al. 2019). Ωστόσο, η αύξηση των ανεπιθύμητων πτητικών ενώσεων, όπως το οξικό οξύ και ο οξικός αιθυλεστέρας, είναι οι κύριοι περιοριστικοί παράγοντες των στρατηγικών αερισμού που απαιτούν την εφαρμογή ενός κατάλληλου συστήματος αερισμού (Canonico et al. 2019, Contreras et al. 2015, Morales et al. 2015). Ως απάντηση στο ενδιαφέρον για μειωμένα επίπεδα αλκοόλ στους οίνους, οι ερευνητές μελέτησαν non-Saccharomyces είδη *cerevisiae* και *Saccharomyces non-cerevisiae* (Contreras et al. 2014 & 2015, Gonzalez et al. 2013, Quirós et al. 2014, Mestre et al. 2017). Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά στελέχη ζύμης non-Saccharomyces, συμπεριλαμβανομένων των *Metschnikowia pulcherrima* και δύο ειδών *Kluyveromyces*, τα οποία έχουν την ικανότητα να μειώνουν τις αποδόσεις αιθανόλης με αναπνοή (Quirós et al. 2014). Το *M. pulcherrima* AWRI 1149 αναγνωρίστηκε ως δυνητική ζύμη για την παραγωγή οίνου με μειωμένη συγκέντρωση αιθανόλης, αφού ταυτοποιήθηκε μετά την αξιολόγηση 50 απομονωμένων non-Saccharomyces υπό περιορισμένες συνθήκες αερισμού και σε διαδοχικούς εμβολιασμούς με *S. cerevisiae* (Contreras et al. 2014). Μια παρόμοια μελέτη με 48 προϊόντα απομόνωσης ζύμης non-Saccharomyces ταυτοποίησε τις ζύμες *Torulasporea delbrueckii* AWRI 1152 και *Zygosaccharomyces bailii* AWRI 1578 ως κατάλληλες για τη μείωση της αιθανόλης (Contreras et al. 2015). Πιο πρόσφατα, έχουν αξιολογηθεί τα αναπνευστικά, ζυμοτικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά 114 ζυμομυκητικών ζυμομυκήτων (Mestre et al. 2017).

1.3.6.2 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Υπάρχουν ζύμες αυστηρώς οξειδωτικές και επομένως ανίκανες να ζυμώσουν τα σάκχαρα και να παράγουν αλκόλη. Οι ζύμες αυτές υπάγονται στα γένη *Rhodotorula* και *Cryptococcus* και πολλές άλλες υπάγονται στα γένη *Candida*, *Torulopsis* κ.ά. Η οξειδωτική διάσπαση των σακχάρων συμβαίνει κατά την ακόλουθη αντίδραση: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 686 \text{ M.}\Theta$.

Η πλήρης ακολουθία των αντιδράσεων της αλκοολικής ζύμωσης των εξόζων από τις ζύμες και της οξείδωσής τους μέσω του κύκλου του Krebs φαίνονται στις εικόνες του σχετικού εδάφιου. Υπάρχουν, επιπλέον ζύμες κατά κύριο λόγο οξειδωτικές και ελάχιστα ζυμωτικές και αντίθετα ζύμες κατά κυριότητα ζυμωτικές και κατ' εξαίρεση οξειδωτικές. Στην πρώτη κατηγορία τάσσονται π.χ. ζύμες των γενών *Debaryomyces* και *Pichia* και στη δεύτερη το είδος *Saccharomyces carlsbergensis* (*S. uvarum*), το οποίο χρησιμοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή ζύθου τύπου "Lager". Από πλευράς ενεργειακού ισοζυγίου θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη ζύμωση ενός γραμμομρίου (180g) γλυκόζης, γεννώνται τέσσερις φωσφορικοί δεσμοί υψηλής ενέργειας. Αφαιρουμένων, όμως, των δύο που δαπανήθηκαν για τη φωσφορυλίωση της εξόζης στο πρώτο και έκτο άτομο άνθρακα, μένουν ως καθαρό ενεργειακό κέρδος οι δύο φωσφορικοί δεσμοί υψηλής ενέργειας. Κατά συνέπεια, η γενική εξίσωση της αλκοολικής ζύμωσης δύναται να διατυπωθεί ως εξής: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2ph^-$ (Δύο μόρια ADP μετατρέπονται σε δύο μόρια ATP). **Η ενέργεια αυτή χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πρωτοπλάσματος, για αύξηση του μεγέθους του κυττάρου ή του αριθμού τους (πληθυσμός), καθώς και για την επιτέλεση των διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών του κυττάρου.**

Αν συμβεί να υπάρχει στο ζυμούμενο υπόστρωμα έλλειψη αζώτου, τότε μέρος του σακχάρου ζυμώνεται και το υπόλοιπο αφομοιώνεται προς αποθέτους υδατάνθρακες του κυττάρου (κατά κύριο λόγο γλυκογόνο). Με την πρόοδο όμως της ανάπτυξης της ζύμης μέρος του αποθέτου γλυκογόνου υπόκειται σε ενδογενή ζύμωση. Γενικά, υπό οποιεσδήποτε συνθήκες, ένα ποσοστό του σακχάρου αφομοιώνεται από τα κύτταρα της ζύμης για κυτταροπλασία. Αυτός είναι ένας λόγος για τον οποίο η εξίσωση μετατροπής της εξόζης σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα δεν είναι στοιχειομετρική. Ένας άλλος λόγος είναι τα σχηματιζόμενα κατά την αλκοολική ζύμωση **παραπροϊόντα και υποπροϊόντα.**

1.3.6.2.1 ΥΠΟΠΡΟΙΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΑ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

A. ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ

Οι ζύμες, ακόμα και υπό ιδεώδεις συνθήκες ζύμωσης μετατρέπουν προς διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη μόνο το 95% των σακχάρων. Το υπόλοιπο 5% εμφανίζεται υπό μορφή παραπροϊόντων, όπως η γλυκερόλη, το ηλεκτρικό οξύ, ανώτερες αλκοόλες (ζυμέλαια), η 2,3 βουτανολόλη, ίχνη ακεταλδεύδης, οξικό οξύ και γαλακτικό οξύ. Η γλυκερόλη είναι το πιο άφθονο προϊόν μεταβολισμού ζύμης μετά από την αιθανόλη το και CO_2 . Παράγεται από φωσφορική διϋδροξυακετόνη, η οποία αρχικά ανάγεται σε 3-φωσφορική γλυκερόλη μέσω αφυδρογονάσης 3-φωσφορικής γλυκερόλης (GPDH), και στη συνέχεια μετατρέπεται σε γλυκερόλη με συγκεκριμένη φωσφατάση. Αυτή είναι μια μη πτητική 3-υδροξυ αλκοόλη, η οποία είναι μια πολυόλη επίσης γνωστή ως αλκοόλη σακχάρου. Η γλυκερόλη είναι ένα παχύρρευστο υγρό σε θερμοκρασία δωματίου και φαίνεται να συμβάλλει στην αίσθηση στο στόμα και στο ιξώδες, ή πάνω από 28 g/l και γλυκύτητα στην κλίμακα 5-12 g/l (Goold et al. 2017 Ballester-Tomás et al. 2017, M. buyane et al. 2018). Ωστόσο, οι Nieuwoudt, et al. δεν βρήκαν καμία σχέση μεταξύ της ποιότητας του οίνου και συγκέντρωσης γλυκερόλης σε αυτό, και οι ερευνητές Goold et al.(20017) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η γλυκερόλη είχε ελάχιστη επίδραση στο ιξώδες του οίνου.

Η **σύνθεση της γλυκερόλης** και του οξικού οξέος, εκτός από την αιθανόλη, και οι δύο συνδέονται με την οξειδοαναγωγική ισορροπία (Jackson et al. 2014, Goold et al 2017). Η σημασία της σύνθεσης γλυκερόλης στην εξισορρόπηση της οξειδοαναγωγικής υποδηλώνεται ότι οφείλεται στην αδυναμία των μεταλλαγμάτων (ανίκανα να συνθέσουν γλυκερόλη) να αναπτυχθούν σε αναερόβιες συνθήκες (Jackson et al. 2014, Nissen 2000). Κατά τη στάσιμη φάση της ζύμης στη ζύμωση, η σύνθεση γλυκερόλης βρέθηκε να σχετίζεται με την οξειδοαναγωγική ισορροπία με την αφαίρεση της περίσσειας αναγωγικής ισχύος (Jackson et al. 2014, Roustan et al.2002).

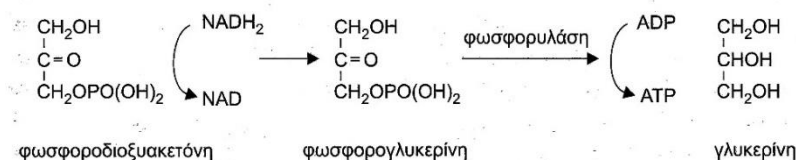
Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή γλυκερίνης, η οποία είναι γενικά πιο άφθονη σε οίνους που έχουν υποστεί ζύμωση με non-*Saccharomyces* από εκείνους που έχουν υποστεί ζύμωση με *S. cerevisiae* (Rantsiou et al.2012, Domizio et al. 2017, Di Gianvito et al. 2018), και σε ερυθρό οίνο (περίπου 10,5 g /L) σε σύγκριση με τους λευκούς (περίπου 7 g / L). Η γλυκερόλη είναι γενικά πιο άφθονη στα ερυθρούς εν μέρει, επειδή το ερυθρό γλεύκος συνήθως ζυμώνει σε υψηλότερες θερμοκρασίες (20–25 °C) από ότι το λευκό (<20 °C). Ωστόσο, οι θερμοκρασίες ζύμωσης επηρεάζουν θετικά την παραγωγή γλυκερόλης από ζυμομύκητες και οι non-*Saccharomyces* και *Saccharomyces non-cerevisiae* δεν αποτελούν εξαίρεση. Για παράδειγμα, η αύξηση της θερμοκρασίας ζύμωσης από 16 σε 20 °C αύξησε την περιεκτικότητα σε γλυκερόλη από 1,69 σε 3,04 g/L σε ζυμώσεις *Candida stellata* και *S. cerevisiae* (Ciani et al.2006).

Σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας σε γλυκερόλη ενός γλεύκους παρατηρήθηκε επίσης μετά την αύξηση της θερμοκρασίας από 12 σε 25 °C, με ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν από καθαρό *Saccharomyces paradoxus* να αναφέρουν αύξηση περίπου 2,5 g / L, για παράδειγμα. Το επίπεδο σακχάρων των σταφυλιών κατά τη συγκομιδή (και επομένως και του γλεύκους) επηρεάζει επίσης την παραγωγή γλυκερόλης, επειδή αυτή η ένωση συσσωρεύεται από ζύμη για την καταπολέμηση της αφυδάτωσης εξισορροπώντας την ενδοκυτταρική οσμωτικότητα με εκείνη του μέσου (Scanes et al.1998). Αυτό το φαινόμενο έχει γίνει ακόμη πιο εμφανές τον τελευταίο καιρό λόγω των θερμότερων εποχιακών θερμοορίων σε ζεστά κλίματα. Αυτό σημαίνει ότι οι οινοπαραγωγοί καθυστερούν την ημερομηνία συγκομιδής λόγω των οινοποιείων που λειτουργούν σε πλήρη χωρητικότητα (Longo, 2018). Hranilovic, et al.2018 ανέφεραν ότι η περιεκτικότητα σε γλυκερόλη ενός οίνου Shiraz από σταφύλια πρώιμης συγκομιδής (περίπου 265 g / L TSS) ήταν πολύ υψηλότερη από εκείνη των σταφυλιών όψιμης συγκομιδής (περίπου 325 g / L TSS), με στέλεχος *M. pulcherrima* (ακολουθήθηκε με εμβόλιο *S. cerevisiae*), που παράγει οίνους πρώιμης και καθυστερημένης συγκομιδής με 10,51 και 12,59 g / L γλυκερόλη, αντίστοιχα. Το γλεύκος με υψηλή συγκέντρωση σακχάρου οδηγεί επίσης σε περίσσεια οξεικού οξέος, η οποία μπορεί να εξηγηθεί από ζυμομύκητες που προσπαθούν να διατηρήσουν την ισορροπία του redox χρησιμοποιώντας πλεόνασμα NAD (P) + που συσσωρεύεται κατά τη σύνθεση των μεταβολιτών ζύμωσης (*M. buyane* et al.2018., Soden et al. 2000, Eglinton et al. 2002, Li et al.2010). Η ανάπτυξη ειδών ζύμης *non-Saccharomyces*, όπως *Lachancea thermotolerans*, *T. delbrueckii* και *M. pulcherrima* εξαρτάται αυστηρά από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου (Morales et al.2015, Pérez-Nevedo et al.. 2006, Shekhawat et al.. 2017). Όταν αξιολογήθηκε η επίδραση της διαθεσιμότητας οξυγόνου στην παραγωγή γλυκερόλης από *non-Saccharomyces*, η οξυγόνωση σε τρία επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου 0,08, 0,41 και 1,71 mg / L είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της γλυκερόλης (Shekhawat 2017). Αυτό ήταν εμφανές για ένα στέλεχος *T. delbrueckii* σε ζύμωση με *S. cerevisiae*, με την περιεκτικότητα σε γλυκερίνη να μειώνεται από 6,79 g / L στην αναερόβια θεραπεία *T. delbrueckii* έως 1,09 g / L στη θεραπεία συν-εμβολιασμού με 1,71 mg / L διαλυμένου οξυγόνου. Διαφορετικά αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους Morales et al.(2015), ο οποίος παρατήρησε αυξημένες αποδόσεις γλυκερόλης για *M. pulcherrima* / *S.* οι μικτές καλλιέργειες *cerevisiae* υπό ελεγχόμενες συνθήκες οξυγόνωσης (διοχετεύονται με καθαρό αέρα, άζωτο ή μίγματα και των δύο) κατά τη διάρκεια των πρώτων 48 ωρών ζύμωσης και αναερόβιες συνθήκες στη συνέχεια.

Οι άγριες ζύμες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να ανακατευθύνουν την κατανάλωση σακχάρου για την παραγωγή εναλλακτικών ενώσεων, αντί της αιθανόλης, έχουν μελετηθεί σε οίνους με μειωμένη περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Αυτές οι εναλλακτικές ενώσεις θα μπορούσαν να είναι η γλυκερόλη και το πυρουβικό οξύ που παράγονται μέσω μεταβολισμού γλυκερόλης - πυρουβικού οξέος. Εναλλακτικά, προτού χρησιμοποιηθούν σάκχαρα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, μπορούν να καταναλωθούν μέσω αναπνευστικού μεταβολισμού (Ribéreau-Gayon et al, 2006), πράγμα που συμβαίνει με διάφορες ζύμες *non-Saccharomyces* με χαμηλότερο αποτέλεσμα Crabtree.

Άλλοι παράγοντες μπορεί να έχουν αντίκτυπο στο σχηματισμό γλυκερόλης από τους *non-Saccharomyces*. Αυτές περιλαμβάνουν τη συγκέντρωση αζώτου και θειώδους άλατος (García et al.2020). **Περιορισμένες συγκεντρώσεις αζώτου στο γλεύκος (με τη μορφή αμινοξέων και αμμωνίου) μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντική αύξηση της παραγωγής γλυκερόλης.** Αντίθετα, υψηλότερα επίπεδα διοξειδίου του θείου οδηγούν σε υψηλότερα επίπεδα γλυκερόλης (Godden et al.. 2015). **Η αυξημένη παραγωγή γλυκερίνης έχει βρεθεί ότι συνδέεται με αυξημένο οξικό οξύ, το οποίο ανιχνεύεται εύκολα λόγω της οσμής ξυδιού** (Jolly et al.2014, García et al. 2020, Vilela et al.2019, Prior et al.2000).

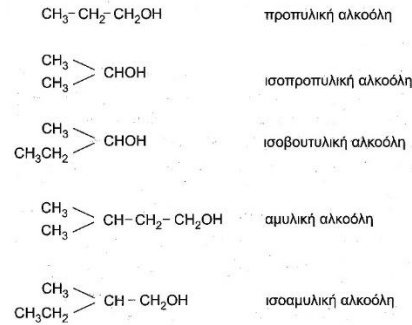
Μετά από μια εμπεριστατωμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση, έγινε εντοπισμός των ζυμομυκήτων *non-Saccharomyces* που έχουν μελετηθεί ευρέως λόγω των διαφορετικών οινολογικών χαρακτηριστικών τους. *Schizosaccharomyces pombe*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, *Candida stellata* και *Torulasporea delbrueckii*. Αυτοί οι πέντε χρησιμοποιούν διαφορετικές οδούς που έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της αιθανόλης και την παραγωγή γλυκερόλης, ενώ επηρεάζουν διαφορετικές παραμέτρους της χημικής σύνθεσης των οίνων.



Εικόνα 11. Σύνθεση Γλυκερόλης (σηματίζεται σε αυξημένα σχετικά επίπεδα και έχει την αρχή της στην αναγωγή της σχηματιζόμενης κατά την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης φωσφοροδιοξυακετόνης κατά το ανωτέρω πρότυπο).

B. ΖΥΜΕΛΑΙΑ

Η σχηματιζόμενη ανώτερη αλκοόλη έχει ένα άτομο άνθρακα λιγότερο από ότι το αντίστοιχο αμινοξύ. Σύμφωνα όμως με σχετικά πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα αποδείχθηκε ότι οι ανώτερες αλκοόλες μπορούν να παραχθούν και από γλυκόζη με **εκτροπή** της πορείας μέσω της οποίας συντίθενται από τα κύτταρα της ζύμης τα αμινοξέα λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη. Στο ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να οδηγήσει και η **υπερχείλιση** κατά τη σύνθεση των ιδίων ως άνω αμινοξέων. Σημασίας είναι οι ανώτερες της αιθανόλης αλκοόλες, όπως η προπυλική, η ισοπροπυλική, η ισοβουτυλική, η ισοαμυλική και η αμυλική με τους ακόλουθους συντακτικούς τύπους:



Εικόνα 12. Οι αλκοόλες αυτές, σύμφωνα με έρευνες διεξαχθείσες από τον Erlich, σχηματίζονται (σύνθεση ζυμελαίων) από αντίστοιχα αμινοξέα δια της **αποδέσμευσης** ανά ενός μορίου αμμωνίας και διοξειδίου του άνθρακα κατά το πρότυπο τη σύνθεσης των ζυμελαίων

C. ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ

Είδη του γένους *Brettanomyces* σχηματίζουν οξικό οξύ εις βάρος της γλυκόζης και της αιθανόλης και έτσι επηρεάζουν δυσμενώς την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων, όπως του οίνου. Αυξημένα ποσοστά οξικού οξέος σχηματίζει και το είδος *Hansenula anomala* με μόνη διαφορά ότι αυτό ενώνται με την αιθανόλη και σχηματίζει οξικό αιθυλεστέρα.

D. ΑΛΛΑ ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΑ

Το **ηλεκτρικό οξύ**: σχηματίζεται υπό αερόβιες συνθήκες (έντονος αερισμός) μέσω του κύκλου του γλυκοξυλικού οξέος κατά την ακόλουθη αντίδραση: $2\text{CH}_3-\text{COOH} \rightarrow \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} + [2\text{H}]$

Το **ζυμονικό οξύ**: σχηματίζεται από ορισμένα μόνο είδη ζύμης, όπως τα *Kloeckera brevis*, *Hansenula subpelliculosa*, *Trichosporon capitatum* και είναι πτητικό.

Πολυυδροξυαλκοόλες: συντίθενται κυρίως από απλοειδείς ζύμες υπό συνθήκες έντονου αερισμού. Μερικές εκ των οποίων είναι η **γλυκερίνη**, ο ερυθρίτης, ο αραβίτης, ο μαννίτης κ.ά.

Χρωστικές: Διάφορες χρωστικές παράγονται μόνο από ορισμένα είδη και γένη ζυμών. Τέτοιες χρωστικές είναι οι λιποδιαλυτές, κίτρινες ή ρόδινες, οι οποίες σχηματίζονται από ζύμες των γενών *Rhodotorula*, *Cryptococcus* και *Sporobolomyces*. Άλλη **χρωστική είναι η πουλχεριμίνη που σχηματίζεται από το είδος *M. pulcherrima* και είναι αδιάλυτη στους οργανικούς διαλύτες και ελαφρά διαλυτή στο νερό. Η ίδια χρωστική μπορεί να εκχυλιστεί με διάλυμα αλκαλίου και να κατακρημνισθεί από το εκχύλισμα με οξύ**. Εκκρίνεται και από ορισμένα είδη των γενών *Fabospora*, *Hansenula*, *Pichia* και από στελέχη του *Saccharomyces*. Μια άλλη χρωστική είναι η μαύρη χρωστική που εκκρίνεται από ζυμοειδή του γένους *Pullularia*.

Συστατικά κάψας: Η κάψα που περιβάλλει τα κύτταρα ορισμένων γενών και ειδών ζύμης. Τα συστατικά αυτά είναι πολυμερείς ουσίες, όπως φωσφορομαννάνες, αμυλοειδείς ενώσεις, ετεροπολυσακχαρίτες κ.ά. Πολλές από τις οποίες παράγονται υπό βιομηχανική κλίμακα και χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία τροφίμων, όπου χρησιμοποιούνται ως γαλακτοματοποιητές.

Γλυκολιπίδια: παράγονται από ορισμένα γένη και είδη ζυμών. Τέτοια γλυκολιπίδια είναι το γλυκοζίδιο υδροξυλιπαρών οξέων με το σάκχαρο σοφορόζη (εκκρίνεται από το είδος *Torulopsis magnolia*), η τετρα-ακετυλοφυτοσφινγκοσίνη και άλλα. (Μπαλατσαούρας, 2006).

1.3.7 ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταβολική ρύθμισή μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής

Οι ζυμομύκητες είναι μικροοργανισμοί που μπορούν να εκτελέσουν, τόσο κυτταρική αναπνοή, όσο και αλκοολική ζύμωση. Καταβολική καταστολή είναι το φαινόμενο σύμφωνα με το οποίο, ο καταβολισμός άλλης πηγής άνθρακα, θα ξεκινήσει μόλις η συγκέντρωση της γλυκόζης (φρουκτόζης ή μαννόζης) βρεθεί κάτω από ένα όριο. Τα εξαρτόμενα από το οξυγόνο φαινόμενα φυσιολογίας, κατηγοριοποιούνται σε τέσσερα διαφορετικά φαινόμενα, η εμφάνιση καθενός εκ των οποίων εξαρτάται τόσο από το είδος του μικροοργανισμού, όσο και από το σακχαρούχο υπόστρωμα. Τα φαινόμενα αυτά επιγραμματικά περιγράφονται ως εξής:

1. Φαινόμενο Crabtree. Αναστολή της κυτταρικής αναπνοής, σε συνθήκες περίσσειας σακχάρου, εν τη παρουσία οξυγόνου.
2. Φαινόμενο Pasteur. Αναστολή της αλκοολικής ζύμωσης από την παρουσία οξυγόνου.
3. Φαινόμενο Custers. Αναστολή της αλκοολικής ζύμωσης από την απουσία οξυγόνου
4. Φαινόμενο Kluyver. Ικανότητα ζυμών να χρησιμοποιούν συγκεκριμένους δισακχαρίτες αερόβια, αλλά όχι αναερόβια, ενώ μπορούν μόνο αναερόβια να χρησιμοποιήσουν τα κατάλοιπά τους (Weusthuis, et al., 1994).

1.3.7.1 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ CRABTREE (Επίδραση συγκέντρωσης γλυκόζης στον καταβολισμό αυτής)

Ο Pasteur ήταν ο πρώτος που συνέκρινε την ανάπτυξη ζύμης σε αερόβιο και αναερόβιο περιβάλλον. Για χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης σε μέσα καλλιέργειας, οι ζύμες χρησιμοποιούν σάκχαρα μέσω είτε αναπνοής είτε ζύμωσης. Ο αερισμός προκαλεί αύξηση της σχηματισμένης βιομάζας και μείωση της παραγωγής αλκοόλης και της κατανάλωσης σακχάρου. Ο Pasteur συνεπώς συνήγαγε ότι η αναπνοή εμποδίζει τη ζύμωση (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Στην πραγματικότητα, οι συνθήκες αυτές χρησιμοποιούνται για τη βιομηχανική παραγωγή επιλεγμένων ξηρών ζυμών (Sarris & Papanikolaou, 2016). Όταν η συγκέντρωση σακχάρου στο περιβάλλον αύξησης της ζύμης υπερβαίνει μια κριτική τιμή συγκέντρωσης, τα πρώτα ένζυμα του TCA, καθώς και ένζυμα κυτοχρωμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας, υφίστανται καταβολική καταστολή. **Για υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, όπως για παράδειγμα σε γλεύκος σταφυλιών ο *S. cerevisiae* μεταβολίζει τα σάκχαρα μόνο μέσω της ζυμωτικής οδού. Ακόμα και με την παρουσία οξυγόνου, η αναπνοή είναι αδύνατη**, δηλαδή ο κυτταρικός μεταβολισμός χωρεί μέσω της ζυμωτικής και όχι της αναπνευστικής οδού. Ανακαλύφθηκε από τον Crabtree (1929) σε καρκινικά κύτταρα, το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό με διάφορα ονόματα: **καταβολική καταστολή από τη γλυκόζη, αντίθετο φαινόμενο Pasteur και το φαινόμενο Crabtree.**

Σε καλλιέργειες μικροοργανισμών όπου η πηγή άνθρακα (γλυκόζη) είναι περιορισμένη, η παραγωγή του CO₂ ισούται με την κατανάλωση του O₂. Το επίπεδο της βιομάζας είναι υψηλό στις συνθήκες αυτές (περίπου 0,5 g/g) και η συγκέντρωση εναπομεινάντων σακχάρων είναι χαμηλή. Όσο η συγκέντρωση της γλυκόζης ανεβαίνει, ο μικροοργανισμός αναγκάζεται να αναπαραχθεί ταχύτερα, ώστε να διατηρήσει ένα σταθερό πληθυσμό στο θρεπτικό μέσο. Αυτό συνεπάγεται αύξηση στη συγκέντρωση των εναπομεινάντων σακχάρων. Τόσο η παραγωγή του CO₂ όσο και η κατανάλωση του O₂ αυξάνονται αναλογικά με την αύξηση των εναπομεινάντων σακχάρων, αλλά παραμένουν αλληλένδετες έως ενός ορισμένου κρίσιμου σημείου (≈ 9 g/L). Από τη στιγμή που η συγκέντρωση της γλυκόζης θα ξεπεράσει το κρίσιμο σημείο ξεκινά η ζύμωση (παρουσία οξυγόνου και υψηλής ποσότητας σακχάρου εκτελείται ζύμωση (>10g/L) και όχι αναπνοή (<10g/L)). Η παραγωγή του CO₂ εξακολουθεί να αυξάνεται ταχέως αλλά δεν είναι πλέον συνυφασμένη με την κατανάλωση του O₂. Η έναρξη της ζύμωσης ακολουθείται από κατακόρυφη πτώση της βιομάζας σε επίπεδα κάτω από 0,2 g/g (Pfeiffer & Morley, 2014). Εν ολίγοις, τα κύτταρα αισθάνονται την παρουσία της γλυκόζης και μεταδίδουν το σήμα για την παύση της αναπνευστικής δραστηριότητας (Postma et al, 1989).

Όταν η συγκέντρωση του σακχάρου στο περιβάλλον αύξησης της ζύμης υπερβεί μια κρίσιμη τιμή τα πρώτα ένζυμα του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων καθώς και τα ένζυμα των κυτοχρωμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας υφίστανται καταβολική καταστολή με αποτέλεσμα να καταστέλλεται το αερόβιο μεταβολικό μονοπάτι και ο κυτταρικός μεταβολισμός να στρέφεται προς ζύμωση (Παπανικολάου Σ., Πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2018).

Η ικανότητα της σύνθεσης αιθανόλης από σάκχαρα αποτελεί την κύρια μεταβολική οδό των ζυμών. Υπό αερόβιες συνθήκες, η κυτταρική αναπνοή είναι δυνατή, καθώς το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων, όμως ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* και κάποιοι άλλοι (μόλις 3 γενεές μικροοργανισμών) εξακολουθούν να εκτελούν αλκοολική ζύμωση έως ότου η γλυκόζη (σάκχαρο) εξαλειφθεί από το μέσο. Η ικανότητα αυτή καλείται φαινόμενο Crabtree (Hagman & Piškur, 2015). Η δυνατότητα των μικροοργανισμών αυτών να επιδίδονται σε αλκοολική ζύμωση τόσο σε αναερόβιες όσο και σε αερόβιες συνθήκες αποτελεί μια από τις πιο υποσχόμενες ιδιότητές τους (Hagman et al., 2013). Παρά ταύτα, είναι δυνατή η διατήρηση του μεταβολισμού μέσω της κυτταρικής αναπνοής ως μόνης μεταβολικής οδού, σε απολύτως αερόβιες συνθήκες, εάν το σάκχαρο στο θρεπτικό μέσο, δεν υπερβαίνει μία συγκεκριμένη, αρκετά χαμηλή, συγκέντρωση που καλείται κρίσιμη συγκέντρωση, ή

χρησιμοποιώντας ημισυνεχείς καλλιέργειες (fed-batch). Συγκεκριμένα, όταν ο ρυθμός ανάπτυξης στο μέσο καλλιέργειας για μικροοργανισμούς όπως ο *S. cerevisiae* **υπερβαίνει τον αποκαλούμενο κρίσιμο ρυθμό ανάπτυξης, η αιθανόλη ξεκινά να συσσωρεύεται** (Compagno et al., 2014).

Στην περίπτωση της αλκοολικής ζύμωσης ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι η αιθανάλη (ακεταλδεΐδη) που στη συνέχεια ανάγεται σε αιθανόλη. Οι **θετικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες**, επιδίδονται σε ζύμωση ακόμα και εν τη παρουσία O_2 , ενώ θα μπορούσαν αρχικά να βασίζονται στην αναπνοή. Το γεγονός αυτό προκαλεί έκπληξη, καθότι η ζύμωση, έχει σαφώς χαμηλότερο επίπεδο παραγωγής ATP από την κυτταρική αναπνοή. **Όμως, η αλκοολική ζύμωση δεν απαιτεί την παρουσία οξυγόνου κι έτσι επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να συνθέτουν ATP και σε σχεδόν αναερόβιες συνθήκες** (Pfeiffer & Morley, 2014). Σε συνθήκες πλήρους αναεροβίωσης καθίσταται αδύνατη η επιβίωση των ζυμών καθώς χρειάζονται κάποιο πολύ μικρό ποσοστό οξυγόνου ώστε να συμβάλλουν στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης και άλλων συστατικών των κυτταρικών τους μεμβράνων.

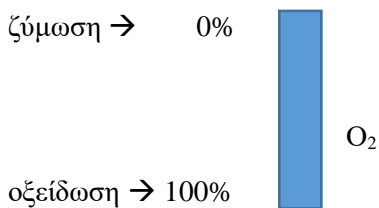
Από τις γενεές των θετικών κατά Crabtree μικροοργανισμών, περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την γενεά Saccharomycetaceae, καθώς ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος στην Βιομηχανία Τροφίμων και κυρίως στην Οινολογία. Ωστόσο, οι θετικοί στο φαινόμενο Crabtree μικροοργανισμοί, έχουν ένα **μειονέκτημα** έναντι των αρνητικών. Λόγω της χρήσης μέρους του σακχάρου προς την παραγωγή αιθανόλης, δεν προκαλείται μεγάλη αύξηση του πληθυσμού τους, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τον ανταγωνισμό τους με άλλους μικροοργανισμούς στη φύση (Hagman et al., 2013).

Crabtree-positive	Crabtree-negative
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Brettanomyces intermedius</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Torulopsis glabrata</i>	<i>Hansenula neofermentans</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Candida stellata</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>

Εικόνα 13. Φυσιολογικές κατηγορίες ζυμών οίνου ανάλογα με τον τρόπο ζύμωσης, θετικές και αρνητικές κατά Crabtree (Παραμυθιώτης, πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2018). **Το Φαινόμενο Crabtree συσχετίζει τη συγκέντρωση της πηγής άνθρακα με την καταβολική οδό που θα χρησιμοποιηθεί, ανάλογα με την συγκέντρωση του οξυγόνου. Οι ζύμες ανάλογα με τον κορεσμό σε οξυγόνο και τη συγκέντρωση του σακχάρου, μπορούν να εμφανίσουν συμπεριφορές που συνοψίζονται ακολούθως: Οι αρνητικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες: παρουσία O_2 , δίνουν βιομάζα και παράγουν αιθανόλη και απουσία O_2 , δεν δίνουν βιομάζα, ούτε αιθανόλη. Αντιθέτως, στις θετικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες, η υψηλή συγκέντρωση σακχάρου οδηγεί σε παραγωγή αιθανόλης, ενώ η χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου οδηγεί σε παραγωγή βιομάζας.**

1.3.7.2 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ PASTEUR (Επίδραση οξυγόνου στον καταβολισμό γλυκόζης)

Πέραν της συγκέντρωσης των σακχάρων, σημαντικός παράγοντας στην κατεύθυνση του κυτταρικού μεταβολισμού των ζυμών είναι ο κορεσμός του μέσου καλλιέργειας σε οξυγόνο. Η επίδραση του οξυγόνου στην επιλογή ατραπού αποικοδόμησης της γλυκόζης εξαρτάται από ένα φαινόμενο, που καλείται φαινόμενο Pasteur. Αρχικά, το φαινόμενο Pasteur θεωρούνταν η καταστολή της αλκοολικής ζύμωσης, από την κυτταρική αναπνοή (De Deken, 1965). Ακολούθως, ανακαλύφθηκε πως το κυτταρικό οξύ λειτουργεί ως αναστολέας της φωσφοφρουκτοκινάσης. Υπό τη παρουσία οξυγόνου, κάτω από ένα συγκεκριμένο ποσοστό οξυγόνου, καταστέλλονται τα ένζυμα του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (π.χ. α-κετογλουταρική αφυδρογονάση), ενώ ενεργοποιούνται τα ένζυμα του γλυκολυτικού σχήματος (π.χ. φωσφοφρουκτοκινάση). Υποδηλώνεται πως με την παρουσία O_2 ενεργοποιείται η αναπνευστική αλυσίδα, και η παραγωγή βιομάζας, ενώ ταυτόχρονα, μειώνεται η κινητική της αλκοολικής ζύμωσης, άρα και η παραγωγή της αιθανόλης. Συγκεκριμένα, οι συνθήκες αυτές χρησιμοποιούνται στην βιομηχανική παραγωγή επιλεγμένων ζυμών (Sarris & Papanikolaou 2016). Με τον τρόπο αυτό αποδεικνύεται πως η ζύμωση είναι η διαδικασία που λαμβάνει χώρα υπό αναερόβιες συνθήκες. **Μεταξύ των 2 φαινομένων (Pasteur και Crabtree), φαίνεται πως εκείνο που υπερτερεί είναι το φαινόμενο Crabtree, καθώς άνωθεν της κρίσιμης συγκέντρωσης σακχάρου, οι θετικοί κατά Crabtree μικροοργανισμοί, πραγματοποιούν αλκοολική ζύμωση ακόμη και σε πλήρως αερόβιες συνθήκες** (Παπανικολάου Σ., Πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2018).



Εικόνα 14. Το Φαινόμενο Pasteur συσχετίζει την συγκέντρωση του οξυγόνου, ανάλογα με την καταβολική οδό που θα χρησιμοποιηθεί.

1.3.7.3 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ «ΣΥΝΘΕΣΗΣ – ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ – ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ» ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ (Make – Accumulate – Consume Life strategy)

Ενώ οι γενεές των ζυμών μετά το WGD έχουν εξεφρασμένο το φαινόμενο Crabtree, η αλκοολική ζύμωση δεν περιορίζεται μόνο σε αυτές. Ένα άλλο γεγονός που έχει λάβει μεγάλη προσοχή είναι ο διπλασιασμός της αλκοολικής αφυδρογονάσης και ο διαχωρισμός της σε δύο διακριτά ένζυμα την Adh 1 και την Adh 2 (Pfeiffer & Morley, 2014). Το γεγονός αυτό παρέχει την έναρξη μίας προσπάθειας εξήγησης της επιλογής της επιζήμιας (ενεργειακά) αλκοολικής ζύμωσης, έναντι της συμφέρουσας κυτταρικής αναπνοής από τις θετικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες (Piškur, et al., 2006). Η θεωρία αυτή, καλούμενη «Σύνθεση – Συσσώρευση – Κατανάλωση» αιθανόλης (Make – Accumulate – Consume Life strategy), βασίζεται στην ιδέα πως οι θετικοί στο φαινόμενο Crabtree μικροοργανισμοί, ζυμώνουν τη γλυκόζη προκειμένου να αμυνθούν έναντι των άλλων μικροοργανισμών που συνυπάρχουν σε πλούσια σε σάκχαρα υποστρώματα και λαμβάνει χώρα σε διεργασίες όπου υπάρχει οξυγόνωση στο περιβάλλον της αύξησης (Sarris, et al., 2014). Μέσω της αλκοολικής ζύμωσης στο υπόστρωμα προκαλείται έκρηξη τοξικότητας από την παραγόμενη αιθανόλη στην οποία όμως οι ζυμομύκητες είναι ανθεκτικότεροι, των λοιπών μικροοργανισμών. Το σημαντικότερο όμως είναι το γεγονός, πως οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν στη συνέχεια να καταβολίσουν την παραγόμενη αιθανόλη, όταν οι προτιμώμενοι υδατάνθρακες στο υπόστρωμα έχουν καταναλωθεί. Σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα, έχει παρατηρηθεί η έναρξη της κατανάλωσης της αιθανόλης (ανακατανάλωση αιθανόλης), ενώ υπάρχει ακόμα σάκχαρο στο μέσο καλλιέργειας, γεγονός που υποδεικνύει πως ο μεταβολισμός πραγματοποιείται και με τους δύο τρόπους, δηλαδή ζύμωση και κυτταρική αναπνοή (Hagman et al., 2013). Σε αερόβιες συνθήκες, η αιθανόλη, οξειδώνεται σε αιθανάλη μέσω το ενζύμου της αλκοολικής αφυδρογονάσης (Adh 2). Η αιθανάλη οξειδώνεται σε οξικό οξύ, το οποίο μετατρέπεται σε ακέτυλο συνένζυμο Α και εισέρχεται στο μιτοχόνδριο και τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA). Τα εξελικτικά γεγονότα που οδήγησαν στην εμφάνιση του φαινομένου αυτού είναι πιθανώς τα ίδια με εκείνα που συνετέλεσαν στην εμφάνιση του φαινομένου Crabtree. Χρονικά το φαινόμενο κατανάλωσης της συσσωρευμένης αιθανόλης αποδίδεται στο διάστημα που συνδέει την απαρχή της ικανότητας ανάπτυξης σε αναερόβιες συνθήκες, την οριζόντια μεταφορά του γονιδίου URA 1 και την απώλεια του συμπλέγματος I από την αναπνευστική αλυσίδα. Ωστόσο, ταυτόχρονα με αυτά τα φαινόμενα, εμφανίστηκε και μία μετάλλαξη, η οποία ορίζεται ως η αδυναμία κάποιων ζυμών να αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μόνο μη ζυμώσιμα σάκχαρα όπως γλυκερόλη ή αιθανόλη.

1.3.8 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΛΙΠΟΣ

Βάσει της ιδιότητας τους να συνθέτουν μεγάλες ποσότητες λιπαρών οξέων, οι μικροοργανισμοί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τους ελαιογόνους και τους μη.

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι εκείνοι που σε συνθήκες έλλειψης εξωκυτταρικού αζώτου, διασπούν τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), με αποτέλεσμα στο μικροβιακό κύτταρο να αυξάνεται η ATP και να παρεμποδίζεται αλλοστερικά η δράση της ισοκυτρικής αφυδρογονάσης. Με τον τρόπο αυτό, συσσωρεύονται ισοκυτρικό και κιτρικό οξύ, τα οποία μετά από μία σειρά διεργασιών οδηγούν σε παραγωγή λιπιδίων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, σε συνθήκες έλλειψης N, δίνουν ποσοστό λίπους επί ξηράς βιομάζας > 20%. Μη ελαιογόνοι, ονομάζονται εκείνοι οι οποίοι σε συνθήκες έλλειψης N υφίστανται αλλοστερική παρεμπόδιση της φωσφοφρουκτοκινάσης από την συσσώρευσή της ATP. Επομένως, καθίσταται αδύνατη η σύνθεση της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης και επέρχεται συσσώρευση της 6 φωσφορικής φρουκτόζης που αυξάνει την ωσμωτική πίεση κι έτσι προκαλεί διάρρηξη των κυττάρων. Αντ' αυτού, πραγματοποιείται πολυμερισμός της 6 φωσφορικής γλυκόζης προς πολυσακχαρίτες (γλυκογόνο).

1.4 ΖΥΜΕΣ

1.4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Η ζύμωση, κατά κύριο λόγο αλκοολική, είναι δραστηριότητα και έργο των ζυμών που βασίζεται στο σχηματισμό αλκοόλης με το μεταβολισμό των σακχάρων. Ζύμες ή ζυμομύκητες είναι μικρομύκητες που ο θαλλός τους σε κάποιο στάδιο του βιολογικού τους κύκλου, περιορίζεται σε απλά κύτταρα. Οι ζύμες ανήκουν στα ευκαρυωτικά κύτταρα και οι διαστάσεις τους κυμαίνονται από 5 μέχρι 8 μm (Τσακίρης, 2017). Στερούνται χλωροφύλλης και είναι στην πλειοψηφία τους σαπρόφυτοι οργανισμοί και σπανίως παράσιτοι ή παθογόνοι, και επομένως στο σύνολό τους είναι μικροοργανισμοί ετερότροφοι. Άξιο ιδιαίτερης προσοχής είναι το γεγονός οι παθογόνες ζύμες καταπολεμούνται δύσκολα, γιατί είναι πολύ ανθεκτικές στα συνήθη αντιβιοτικά. Το κύτταρο τους αποτελείται σε γενικές γραμμές από το κυτταρικό τοίχωμα, την κυτταρική μεμβράνη, τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και άλλα οργανίδια (Walker et al., 2016). Έχουν καθορισμένο κυτταρικό τοίχωμα, μάλλον δύσκαμπτο, διακριτό και καλώς οργανωμένο πυρήνα και στερούνται μέσω μετακινήσεως (βλεφαρίδων). Από πλευράς μεταβολισμού είναι οξειδωτικοί οργανισμοί κατά πλειονότητα, με εξαίρεση τις ευγενείς ζύμες, οι οποίες μπορούν να αποδεσμεύσουν ενέργεια και ενδιάμεσα προϊόντα και διαμέσου της αλκοολικής ζύμωσης. Ανώτεροι μύκητες, δεν είναι ικανοί, κατά κανόνα, να φέρουν εις πέρας ζυμώσεις. Οι ζύμες είναι **μεσόφιλοι (μέγιστη ανάπτυξη 25-28° C) και οξέφιλοι μικροοργανισμοί** και δεν είναι ευρείας διαδόσεως στη φύση, όπως είναι τα βακτήρια. Προτιμούν ελαφρώς ή μετρίως όξινο περιβάλλον (pH 4,5-6,5) και προϋποτίθεται βαθμιαία εξοικείωση για την ανάπτυξή τους (εθισμό), ιδιαίτερα στην όξινη περιοχή κάτω του 3,7 και στην ουδέτερη αλκαλική 7-8, τα είδη των οποίων μπορούν να αναπτυχθούν σε τέτοιες τιμές pH είναι περιορισμένα. Οι ζύμες έχουν εκπροσώπους που αντέχουν σε μεγάλη οσμωτική πίεση του υποστρώματος (**ωσμόφιλες, ωσμοάντοχες, αλόφιλες, αλοάντοχες**). Έτσι αναπτύσσονται και αλλοιώνουν τρόφιμα πλούσια σε σάκχαρα ή αλάτι, στα οποία η ενεργότητα του νερού είναι χαμηλής τιμής. **Ως προς την απαίτησή τους σε οξυγόνο, οι ζύμες κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:** αυστηρώς αερόβιες (οξειδωτικές), κατά βάση ζυμοτικές (ευγενείς ζύμες βιομηχανικής εφαρμογής) και κατά βάση οξειδωτικές. **Άξιοσημείωτο είναι ότι καμία ζύμη δεν είναι αυστηρώς αναερόβια** και δεν είναι αναγκαστικά συνδεδεμένες με την αλκοολική ζύμωση και την παραγωγή αλκοόλης και διοξειδίου του άνθρακα, όπως πιστευεται ευρέως, αλλά **κατά πλειοψηφία είναι οξειδωτικές** και πραγματοποιούν πλήρη ανοργανοποίηση των υποστρωμάτων προς σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα, νερό κλπ. Η μερική οξείδωση προς ενδιάμεσα προϊόντα. Γενικά οι ζύμες δεν σχηματίζουν δύσσομα προϊόντα, όπως H₂S, NH₃, ινδόλιο, σκατόλιο κ.ά., όπως συμβαίνει με τα πρωτεολυτικά βακτήρια. **Κυρίως σχηματίζουν αιθέρες, εστέρες, αλδεύδες, κετόνες κ.ά. Αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα σχηματίζουν κυρίως τα είδη του γένους Saccharomyces (ευγενείς ζύμες) που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανικές ζυμώσεις.** (Μπαλατσαούρας, 2006)

1.4.2 ΣΧΕΣΗ ΖΥΜΩΝ ΜΕ ΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ – ΘΕΡΜΟΕΞΟΝΤΩΣΗ) ΚΑΙ ΤΟ ΡΗ

Οι ζύμες είναι μικροοργανισμοί μεσόφιλοι με optimum θερμοκρασίας για την ανάπτυξή τους το εύρος μεταξύ 20 και 40° C (με την πλειονότητα 25-28° C), ανάλογα με τα γένη και τα είδη. Καμία ζύμη δεν είναι θεμόφιλη με μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης ανώτερη των 40° -42° C. Ελάχιστες μάλιστα μπορούν να ζήσουν και να δράσουν σε θερμοκρασία ανώτερη των 30° C, μονο μια κατηγορία ζυμών παράσιτοι των θερμόαιμων οργανισμών έχει optimum θερμοκρασίας ανάπτυξης 28-35° C ή και υψηλότερη όπως το είδος *Saccharomycopsis guttulata* (35-40° C). Η θερμοεξόντωση των ζυμών αρχίζει στη θερμοκρασία των 50° C και εντείνεται με την ανύψωση της θερμοκρασίας σε υψηλότερα επίπεδα. **Η συγκέντρωση των σακχάρων στο υπόστρωμα αυξάνει την αντοχή της ζύμης στη θερμοεξόντωση συγκριτικά με το μάρτυρα.** Κατά κανόνα, θέρμανση των βλαστικών κυττάρων των ζυμών στους 60° C για 30' ή στους 70° C για 15' είναι αρκετή για την αδρανοποίησή τους. Τα ασκοσπόρια υπό τις ίδιες συνθήκες αδρανοποιούνται σε θερμοκρασίες κατά 10° C ανώτερες, αντίστοιχα. Η αντοχή των ζυμών στις χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω του μηδενός) είναι υψηλή. Ψυχρόφιλες ζύμες έχουν απομονωθεί από τις πολικές περιοχές που όμως δε συγκεντρώνουν βιομηχανικό ενδιαφέρον. Κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae* επιβίωσαν με έκθεση θερμοκρασίας -24° C, αλλά και σε εκείνη των -193° C. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ζύμες, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές ζυμώσεις **δεν σχηματίζουν τα καλύτερα προϊόντα υπό optimum θερμοκρασία ανάπτυξης, αλλά υπό θερμοκρασία που αγγίζει την ελάχιστη.** Παράδειγμα αποτελεί το χρησιμοποιούμενο στην οινοποίηση είδος *Saccharomyces cerevisiae*, το οποίο υπό θερμοκρασιακό εύρος 25-30° C εμφανίζει τη μέγιστη ανάπτυξή του (πολλαπλασιασμός με κυτταρική διαίρεση) παράγει, όμως, **οίνο της χειρότερης ποιότητας ακόμα και στους 25° C** (στην πορεία της ζύμωσης η θερμοκρασία του οινογλεύκου φθάνει στους 40° C, χωρίς όμως σοβαρή επίπτωση επί της ζυμοτικής ικανότητας του σακχαρομύκητα). Αντιθέτως, **υπό θερμοκρασία 15° C (ελάχιστη για την ανάπτυξή του) δίνει εκλεκτό οίνο. Σε πολύ**

χαμηλές όμως θερμοκρασίες, η ζύμωση προχωρεί με βραδύτατο ρυθμό και για το λόγο αυτό επιλέγεται η θερμοκρασία των 18-20° C για τη ζύμωση του οινογλεύκου. (Μπαλατσαούρας, 2006)

Περιοριστικός παράγοντας με εκλεκτική ενεργότητα είναι το pH που κυμαίνεται μεταξύ 3 και 3,5 κατά περίπτωση. Τα μικρόβια που αναπτύσσονται είναι: Ζύμες με optimum pH μεταξύ 4 και 4,5. Αναπτύσσονται όμως και σε pH ίσο με 3, έτσι ώστε να είναι το οινογλεύκος ιδεώδες υπόστρωμα για την ομάδα αυτή των μικροβίων. Οξοβακτήρια με optimum pH για την ανάπτυξη τους λίγο μεγαλύτερο από 4 έως 4,5, ενώ μπορούν να ανεχθούν και ίσο με 3. Γαλακτοβακτήρια, κατά κύριο λόγο το *Leuconostoc oenos* και σε δεύτερη μοίρα τα είδη του γένους *Lactobacillus*. Μύκητες που επηρεάζονται ελάχιστα από την τιμή του pH. Με τη ζύμωση δημιουργούνται συνθήκες αναερόβιες, λόγω του εκλυόμενου διοξειδίου του άνθρακα, που παρεμποδίζουν τα αυστηρώς αερόβια μικρόβια, δηλαδή τα οξοβακτήρια και τους μύκητες.

1.4.3 ΤΡΟΠΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Ο όρος ζύμη υποδηλώνει μια ομάδα κυρίως μονοκύτταρων μυκήτων που δεν είναι ούτε απόλυτα καθορισμένη, ούτε απόλυτα ομοιογενής. Εντούτοις έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά, με κυριότερο να προκαλούν ζυμώσεις. (Τσακίρης, 2017) Οι ζυμομύκητες μπορούν να χωριστούν σε τρεις επί μέρους κατηγορίες: τους Ασκομύκητες, τους Ατελείς Μύκητες και τους Βασιδιομύκητες. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται βάσει της αναπαραγωγικής μεθόδου που ακολουθούν οι τρεις αυτές κατηγορίες (με μονογονία, είτε μέσω διχοτόμησης είτε μέσω εκβλάστησης). Οι ζύμες που απαντώνται στους φλοιούς των σταφυλών, ανήκουν στις δύο πρώτες από τις προαναφερθείσες ομάδες (Ribéreau- Gayon, et al., 2006). Πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλαστήσεις (budding) και μόνο ορισμένα γένη με κυτταρική διαίρεση (fission), ή με συνδιασμό των δύο τρόπων. Εγγενώς πολλαπλασιάζονται (οι εγγενείς ή σποριογόνες) με ασκοσπόρια ή βαλλιστοσπόρια και όσοι ανήκουν στους Βασιδιομύκητες με τελειοσπόρια (Μπαλατσαούρας, 2006). Οι σπορογόνες ζύμες, όταν το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται γίνεται δυσμενές, διακόπτουν τον πολλαπλασιασμό με εκβλαστήσεις και μετατρέπονται σε ασκούς που περιέχουν ασκοσπόρια. Η μετατροπή των κυττάρων σε ασκούς προσφέρει μεγάλη ανθεκτικότητα. Οι ζύμες που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σπόρια ανήκουν στους ασκομύκητες, ενώ αυτές που δεν έχουν αυτή την ικανότητα ανήκουν στις ατελείς ζύμες. (Μπαλατσαούρας 2006, Τσακίρης, 2017). Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των ζυμών κατέχει ενδιάμεση θέση μεταξύ εκείνων των βακτηρίων και των μυκήτων. Συνέπεια του ανωτέρου είναι ότι σε ένα μικρό πληθυσμό, οι ζύμες έχουν πιθανότητα να επικρατήσουν έναντι των άλλων κατηγοριών μικροβίων (ικανοποιητικά ποσοστά ανάπτυξης), μόνον αν οι συνθήκες είναι πολύ ευνοϊκές για την ανάπτυξή τους. (Μπαλατσαούρας, 2006). Οι ζύμες, όπως τα βακτήρια και άλλοι μικροοργανισμοί, βρίσκονται στον αμπελώνα, στο έδαφος, στα κλήματα. Στο σταφύλι ειδικότερα μεταφέρονται από τα έντομα πάνω στους βόστριγες και κυρίως στους ποδίσκους και στη ράγα (Τσακίρης, 2017). Ο αριθμός των ζυμών (πληθυσμός) στο σταφύλι, λίγο πριν τη συγκομιδή, είναι μεταξύ 103 και 105 ανάλογα τη γεωγραφική θέση του αμπελώνα, τις κλιματολογικές συνθήκες κατά την ωρίμανση, την υγειονομική κατάσταση της συγκομιδής και τις επεξεργασίες με φυτοφάρμακα που εφαρμόζονται στην αμπέλια (Ribereau-Gayon, et al., 2006).

1.4.4 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ (ΒΙΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ)

Μικροβιακή αύξηση είναι το αποτέλεσμα των βιοσυνθετικών διεργασιών στο μικροβιακό κύτταρο, που πραγματοποιούνται με τη βοήθεια ενός μεγάλου αριθμού ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων, που συνοδεύεται από αύξηση της κυτταρικής μάζας (βιομάζας), είναι το μακροσκοπικό αποτέλεσμα της ολικής ενζυμικής δραστηριότητας των μικροβιακών κυττάρων. Οι κινητικές παράμετροι της μικροβιακής αύξησης υπολογίζονται με τη βοήθεια μαθηματικών προτύπων, τα οποία έχουν ευρεία χρήση στη Βιομηχανική Μικροβιολογία (στο σχεδιασμό και στην αριστοποίηση μικροβιακών συστημάτων και βιοαντιδραστήρων και στην ανάπτυξη συστημάτων ελέγχου τους) και στη Μικροβιακή Οικολογία (στην πρόβλεψη μικροβιακών διεργασιών στο φυσικό περιβάλλον, στη μελέτη των σχέσεων μικροβιακών πληθυσμών και των σχέσεων μικροοργανισμών με ανώτερους οργανισμούς). (Αγγελής, 2017)

Το γλεύκος είναι πλούσιο υπόστρωμα για τη μικροβιακή ανάπτυξη και περιέχει σάκχαρα, αζωτούχες ουσίες (αμμωνιακά άλατα, αμινοξέα και πολυπεπτίδια), ανόργανα άλατα και παράγοντες ανάπτυξης (μικροσυστατικά, όπως υδατοδιαλυτές βιταμίνες – βιοτίνη, παντοθενικό οξύ, πυριδοξίνη, θειαμίνη κ.ά.) Έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση σακχάρων μεταξύ πολλών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αιθανόλης μέσω ζύμωσης. Ως αποτέλεσμα, το επίπεδο αιθανόλης είναι από τα υψηλότερα και η σημασία της αναστολής της ανάπτυξης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συντηρητικής δράσης του υποστρώματος και της αιθανόλης είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνες στη ζυθοποιία ή άλλων ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση. Κατά την οινοποίηση, το είδος των

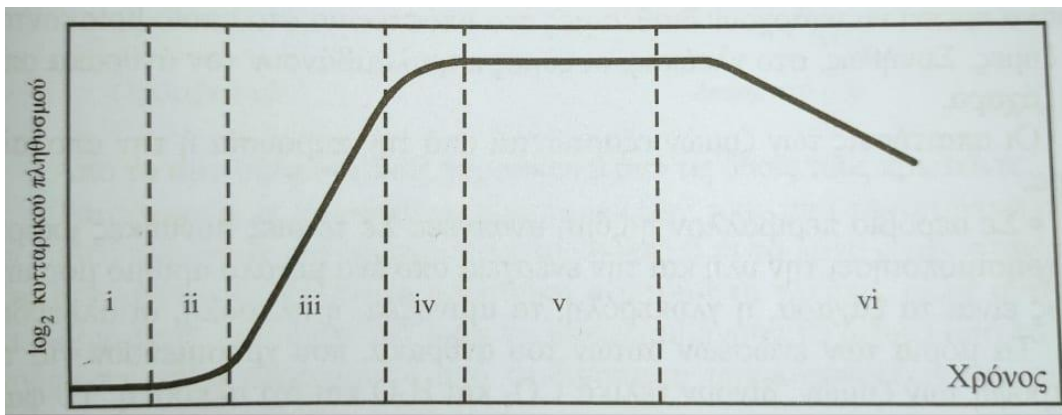
μικροοργανισμών εξαρτάται από τις φυσικές συνθήκες και τις τεχνολογικές πρακτικές. Η αυθόρμητη ζύμωση προκαλείται από τις ιθαγενείς ζύμες, οι οποίες αντλούν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από το οινογλεύκος. Τις πρώτες μέρες του τρύγου, οι ζύμες αυτές πραγματοποιούν μεταβολισμό στο μεγαλύτερο μέρος αερόβιο και λιγότερο με την οδό της ζύμωσης (αναερόβιο). Η έναρξη της ζύμωσης επιφέρει στο γλεύκος συνθήκες αναεροβίωσης, όλο και πιο αυστηρές. Η αποικοδόμηση (ζύμωση) των σακχάρων είναι γρήγορη και πλήρης όταν αυτά βρίσκονται σε τέτοια συγκέντρωση ώστε να μπορούν να ζυμωθούν κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού και στασιμότητας. Πρόκειται για γλεύκη που περιέχουν λιγότερα από 200 g/l σάκχαρα. Όταν το γλεύκος περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα σακχάρων, η ζύμωση παρατείνεται (καθυστέρηση) από το γεγονός ότι πραγματοποιείται από ζύμες που δεν βρίσκονται πια σε αύξηση, των οποίων το ποσοστό βιωσιμότητας μεινεται διαρκώς. Αυτή η μείωση οφείλεται σε αλλοίωση του μεταβολισμού και στην επίδραση της αιθανόλης στις ζύμες. Σε περιβάλλον πλούσιο σε αζωτούχα συστατικά και σε συνθήκες αναεροβίωσης τα σάκχαρα δεν είναι αφομοιώσιμα, δηλαδή δεν χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία κυτταρικών συστατικών, αλλά η αποικοδόμησή τους χρησιμεύει ως πηγή ενεργείας για την αύξησή τους.

Ποσοστό ανάπτυξης ονομάζεται ο αριθμός των διαιρέσεων στη μονάδα του χρόνου και χρόνος πολλαπλασιασμού, τον απαραίτητο χρόνο για τη διαίρεση του κυττάρου σε δυο κύτταρα. Είναι ανάλογος της περιεκτικότητας του περιβάλλοντος σε θρεπτικά, ενεργειακά και άλλα απαραίτητα συστατικά. Ένας μικροβιακός πληθυσμός προσδιορίζεται από το βάρος των ζυμών ανά μονάδα όγκου ή τον αριθμό των κυττάρων των ζυμών ανά μονάδα όγκου. Αύξηση των δυο αυτών παραμέτρων αποτελεί το φαινόμενο αύξησης. Η αύξηση του βάρους (μικροβιακή πυκνότητα) είναι συνεχές φαινόμενο, η αύξηση του αριθμού (πολλαπλασιασμός) είναι ασυνεχές φαινόμενο. Για να υπάρξει αύξηση των κυττάρων, πρέπει να υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία, αερισμός, pH κ.ά.) και ικανή συγκέντρωση σε απαραίτητα συστατικά. **Παρεμποδιστικοί παράγοντες** είναι ορισμένες συνθήκες περιβάλλοντος και η ύπαρξη (ή απουσία) συστατικών σε συγκεντρώσεις που να προκαλούν σταμάτημα της αύξησης. Σε περιβάλλον κατάλληλο για καλλιέργεια (αύξηση) μικροοργανισμών, εάν γίνει εμβολιασμός με μικροοργανισμούς αυτοί θα αναπτυχθούν μέχρι του σημείου που η παρουσία των παρεμποδιστικών παραγόντων φτάσει σε κάποιο κρίσιμο σημείο. Προς το τέλος της ζύμωσης, όταν εξαντλούνται ορισμένα από χρήσιμα στοιχεία για τη συνέχιση του έργου τους, επιβάλλεται η προσθήκη τους (πηγές άνθρακα, αζώτου και ανόργανα συστατικά). Η επιβράδυνση και διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης μπορεί να οφείλεται σε τροφοπενία ADP (διφωσφορική αδενοσίνη), σε συσσώρευση της σχηματιζόμενης αιθανόλης στο εσωτερικό του κυττάρου λόγω της δύσκολης απέκκρισης ή, τέλος, σε τροφοπενία του κυττάρου σε στερόλες. Αυτή οδηγεί σε αλλοίωση της κυτταρικής μεμβράνης. Η μέτρηση του ολικού αριθμού ζυμών γίνεται σε καθορισμένο όγκο υγρού με τη βοήθεια μικροσκοπίου. Η οπτική παρατήρηση με μικροσκόπιο, η οποία όμως δεν επιτρέπει τη διαφοροποίηση νεκρών και ζωντανών κυττάρων. (Boulton 2018, Τσακίρης 2017, Σουφλερός 2015)

Σε μια **κλειστή (ασυνεχή) καλλιέργεια**, τα αντιδρώντα (θρεπτικά υλικά, κύτταρα αέρια κ.ά.) επωάζονται για να παραγάγουν μια αυθόρμητη αντίδραση σε ένα σύστημα όπου δεν υπάρχει είσοδος ή έξοδος. Ο κύκλος ανάπτυξης των ζυμών στο γλεύκος (εικόνα 15), εφόσον πληρούνται όλες οι απαραίτητες συνθήκες, ολοκληρώνεται στις παρακάτω φάσεις που απεικονίζονται και στα γλεύκη που είναι πλούσια σε σάκχαρα χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη διάρκεια που φτάνει το 75% του συνολικού χρόνου ζύμωσης. Σε περίπτωση προσθήκης ζυμών, η ολική αύξηση μένει μικρή.

- i. **Λανθάνουσα φάση /Φάση Υστέρησης (επώαση):** Κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης πραγματοποιείται αρκετά μικρή αύξηση της πυκνότητας της καλλιέργειας. Στο μέσο καλλιέργειας δεν υπάρχει αύξηση της βιομάζας $dx/dt=0$, όμως σημαντική βιοσύνθεση RNA και πρωτεϊνών. **Η διάρκεια της φάσης αυτής ποικίλλει ανάλογα με τις νέες συνθήκες, καθώς και από τον όγκο του εμβολίου.** Όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος αυτός, τόσο πιο σύντομη είναι η πρώτη φάση (μακροχρόνια παραμονή – παρουσία τοξικών υλικών στο υπόστρωμα) Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης δε συμβαίνει κυτταροδιαίρεση με σκοπό τον πολλαπλασιασμό τους, αλλά ο κυτταρικός μεταβολισμός προσπαθεί να προσαρμοστεί στην διαδικασία της ανάπτυξης και προτίμησης υποστρώματος. Μακροχρόνια φάση υστέρησης υποδηλώνει ατυχή εμβολιασμό,, πρωτό υπόστρωμα, έκκριση τοξινών κ.ά. (Σουφλερός 2015, Παπανικολάου, Παραμυθιώτης, πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2018). Στα πλούσια σε σάκχαρα γλεύκη στη φάση αυτή, υπάρχει πληθυσμός 2×10^6 κύτταρα/ml.
- ii. **Φάση επιτάχυνσης αύξησης** (μεταξύ υστέρησης και εκθετικής): Στη φάση επιτάχυνσης, παρατηρείται, η εκκίνηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η κυτταρική μάζα αυξάνει, στην αρχή αργά και έπειτα με γρήγορο ρυθμό. Η καμπύλη του παρακάτω σχήματος, που παριστάνει τον πολλαπλασιασμό των ζυμών, μέχρι το σημείο αυτό είναι παράλληλη προς τον οριζόντιο άξονα και μόλις στο τέλος της φάσης αυτής αρχίζει να έχει ανοδική πορεία. Η διάρκεια των δύο αυτών πρώτων φάσεων είναι τόσο μικρότερη, όσο πιο ευνοϊκές είναι οι συνθήκες ανάπτυξης των ζυμών. Ο ρυθμός (ταχύτητα) κατανάλωσης κάθε σακχάρου και η προτίμηση υποστρώματος λόγω της δραστηριότητας ανάπτυξης μπορεί να εκφραστεί με όρους ρυθμού ανάπτυξης και απόδοσης κυττάρων για το σάκχαρο μαζί με την κατανάλωσή του από τη δραστηριότητα συντήρησης. (Σουφλερός 2015, Boulton 2018) Στη φάση πολλαπλασιασμού, που διαρκεί 2-5 ημέρες, οι ζύμες κάνουν αναερόβιο μεταβολισμό για να φτάσουν στους 3×10^7 /ml. (Τσακίρης, 2017)

- iii. **Λογαριθμική ή εκθετική φάση του αυξητικού κύκλου:** Αντιπροσωπεύει τον κατεξοχήν πολλαπλασιασμό των κυττάρων και η θνησιμότητά τους, σε αυτή τη φάση είναι σχεδόν μηδενική. Παρουσιάζεται εκθετική αύξηση σε σχέση με το χρόνο της πυκνότητας των κυττάρων. **Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού** (μ_{max}) λαμβάνει την μέγιστη τιμή. Ο ρυθμός της κυτταρικής ανάπτυξης μπορεί να εκφραστεί με όρους του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και της βιώσιμης κυτταρικής μάζας. Αρκετές μελέτες με ζυμομύκητες έχουν δείξει ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης προσδιορίζεται από τον ρυθμό μεταφοράς στα κύτταρα του υποστρώματος που περιορίζει την ανάπτυξη (van Uden, 1971). Σε κατάλληλα μέσα αυτό είναι απλώς ο ρυθμός πρόσληψης των σακχάρων, της γλυκόζης και της φρουκτόζης, αλλά σε ανεπαρκή μέσα θα καθοριστεί από το ρυθμό μεταφοράς άλλων θρεπτικών ουσιών, όπως τα αμινοξέα, η αμμωνία ή οποιουδήποτε θρεπτικού συστατικού που περιορίζει την ανάπτυξη, όπως οι βιταμίνες. Σύμφωνα με $\mu = \mu_{max} = \text{σταθερό}$ και $\mu \cdot x = dx/dt$ προκύπτει $dx/dt = \mu_{max} \cdot x$ και με ολοκλήρωση $\rightarrow t_d = \ln 2 / \mu_{max} = 0,693 / \mu_{max}$. Όσο αυξάνει το μ_{max} , τόσο πιο γρήγορα αυξάνεται η μικροβιακή καλλιέργεια (Παπανικολάου, Παραμυθιώτης, πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2018).
- iv. **Φάση επιβράδυνσης – φθίνοντος ρυθμού ανάπτυξης ($dx/dt > 0$):** Η ταχύτητα του πολλαπλασιασμού των ζυμών μικραίνει και η καμπύλη ανάπτυξης αρχίζει να οριζοντιώνεται όσο μειώνεται ο ρυθμός της κυτταρικής ανάπτυξης. **Η ειδική ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνεται.** Ουσιαστικά η παραγωγή βιομάζας επιβραδύνεται μέχρι να γίνει στάσιμη (Ρυθμός αύξησης = ρυθμός θανάτου). Οι παράγοντες οι οποίοι οφείλονται για τη συγκεκριμένη μείωση είναι τα θρεπτικά συστατικά, το φως, το pH, το διοξείδιο του άνθρακα καθώς και άλλοι φυσικοχημικοί παράγοντες. Ο ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων (και η παραγωγή αιθανόλης) λόγω της συντηρητικής δραστηριότητας, εκφράζεται γενικά με βάση τη βιώσιμη κυτταρική μάζα επί τον ειδικό ρυθμό συντήρησης. Η συντηρητική δραστηριότητα γενικά θεωρείται ότι είναι η ενέργεια ανακύκλωσης του κυττάρου, καθώς υποβαθμίζει και ανοικοδομεί τα ένζυμα και διατηρεί τις βαθμίδες συγκέντρωσης διαμέσου της μεμβράνης του. (Σουφλερός 2015, Boulton et al, 2018) Με το σταμάτημα του πολλαπλασιασμού, το πιο μεγάλο μέρος της ενέργειας διατίθεται υπό μορφή θερμότητας και ένα άλλο μέρος, υπό μορφή ATP, και μεταφέρεται για το σχηματισμό αποθεμάτων του κυττάρου.
- v. **Φάση στασιμότητας ($dx/dt = 0$):** Καμία αύξηση πληθυσμού δεν παρατηρείται στο στατικό αυτό στάδιο. Η καμπύλη γίνεται ολότελα οριζόντια και ο πληθυσμός παραμένει σταθερός για αρκετό χρονικό διάστημα. Επικρατεί ισορροπία της δράσης των περιοριστικών παραγόντων και του ρυθμού ανάπτυξης με άμεσο αποτέλεσμα τα κύτταρα να έχουν σταθερή πυκνότητα. Επομένως, στη διάρκεια αυτής της στατικής φάσης, ο αριθμός των κυττάρων παραμένει σταθερός. Οι φάσεις επιβράδυνσης και στασιμότητας οφείλονται στην έλλειψη ή μείωση της συγκέντρωσης ορισμένων παραγόντων ανάπτυξης. Η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται κατά τρόπο που σχετίζεται τόσο με το χρόνο της ζύμωσης, όσο και με την περιεκτικότητα σε αιθανόλη ή/και τη συσσώρευση άλλων προϊόντων που είναι ανασταλτικά για την αύξηση, καθώς επίσης με το στέλεχος και τις συνθήκες του μέσου, όπως η αρχική περιεκτικότητα σε οξυγόνο (που αποτελεί περιοριστικό παράγοντα), η διατροφή (απαραίτητα θρεπτικά συστατικά) και η θερμοκρασία. Ωστόσο, ο μεταβολισμός των κυττάρων και ιδιαίτερα οι βιοσυνθέσεις μπορούν ακόμα να διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα. Οι δραστηριότητες της ζύμωσης εκφράζονται σκόπιμα με όρους βιώσιμης κυτταρικής μάζας, δεδομένου ότι στις ζυμώσεις του οίνου η βιωσιμότητα δεν είναι πάντα 100% και υπάρχει σημαντική μείωση της τελευταίας στα μεταγενέστερα στάδια της ζύμωσης, που καταλήγει σε ποσοστά κυτταρικού θανάτου. (Σουφλερός 2015, Boulton et al, 2018) Στη φάση στασιμότητας παρατηρείται μικρή μείωση του πληθυσμού, $2 \times 10^7 / \text{ml}$.
- vi. **Φάση μείωσης (θανάτου-αυτόλυσης $dx/dt < 0$):** Ο πληθυσμός των ζυμών μικραίνει και τα κύτταρα αυτολύονται, ελευθερώνοντας τα συστατικά τους, διότι η ποιότητα του νερού υποβαθμίζεται και τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται (Ρυθμός θανάτου > Ρυθμός αύξησης – έκκριση αντιμεταβολιτών, τοξινών κ.ά). Η πυκνότητα των κυττάρων μειώνεται όλο και περισσότερο και τελικά η καλλιέργεια καταρρέει. Η καμπύλη αποκτά καθοδική πορεία και ο χρόνος διάρκειας του σταδίου αυτού εξαρτάται από το μέγιστο του αριθμού κυττάρων, ο οποίος υπήρχε στη φάση της στασιμότητας, και από τη διάρκεια της φάσης αυτής. (Σουφλερός, 2015, Νεράντζης κ.α, 2015). Στη φάση θανάτου, που διαρκεί μέχρι 15 μέρες, ο ολικός πληθυσμός μένει σταθερός, ενώ εκείνος των ζωντανών κυττάρων μειώνεται κατά πολύ. Η φάση αυτή προσδιορίζεται μόνο με μέτρηση των ζωντανών κυττάρων, αφού ο θάνατος και η λύση των κυττάρων, επηρεάζουν την οπτική πυκνότητα ελάχιστα ή καθόλου. Το τέλος της ζύμωσης προκαλείται από άλλους παράγοντες και όχι από τη μείωση των συστατικών από τα οποία οι ζύμες αντλούν ενέργεια. (Τσακίρης, 2017).



Εικόνα 15. Φάσεις ανάπτυξης των ζυμών, σύμφωνα με τους Senez, 1968 και Monod 1942
 1. Φάση Προσαρμογής- Λανθάνουσα 2. Φάση επιτάχυνσης 3. Εκθετική φάση 4. Φάση επιβράδυνσης 5. Φάση στασιμότητας 6. Φάση θανάτου, (Σουφλερός 2015).

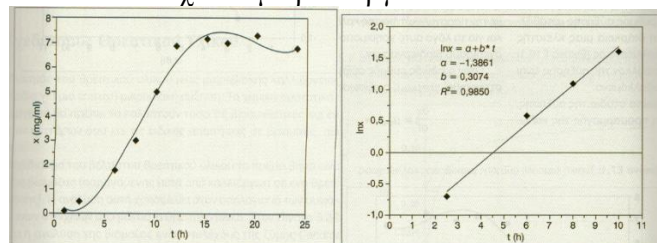
1.4.4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΙΚΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ

Η βιοσυνθετική δυναμική των μικροβιακών πληθυσμών είναι τεράστια. **Ειδικός ρυθμός αύξησης** (μ , h^{-1}) μιας καλλιέργειας είναι ο ρυθμός αύξησης της κυτταρικής μάζας (x , $mg mL^{-1}$) ανά μονάδα κυτταρικής μάζας και μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια μιας **κλειστής μικροβιακής καλλιέργειας**, επειδή το περιβάλλον της αύξησης είναι διαρκώς μεταβαλλόμενο, σύμφωνα με τη σχέση: $\mu = dx/dt \cdot 1/x$ (h^{-1}), όπου μ (h^{-1}) παράμετρος, η οποία καλείται **ειδικός ρυθμός αύξησης** και ισούται με την παραγόμενη βιομάζα ανά μονάδα βιομάζας στη μονάδα του χρόνου. **Υπό συνθήκες αύξησης χωρίς περιορισμούς, η παράμετρος μ λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της μ_{max}** και ονομάζεται **μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης** (η εξίσωση δύναται τότε να ολοκληρωθεί και προκύπτει $x = x_0 \cdot e^{\mu_{max} \cdot t}$, όπου x_0 η συγκέντρωση της βιομάζας (ή κυττάρων) στις αρχικές συνθήκες την $t = 0$). Η σχέση αυτή περιγράφει την **εκθετική αύξηση** ενός μικροβιακού πληθυσμού σε ένα ιδανικό περιβάλλον και καλείται **εκθετικός νόμος**. Χρόνος γενεάς (t_g) και χρόνος διπλασιασμού ($t_d = \ln 2 / \mu_{max} = 0,693 / \mu_{max}$), είναι οι παράμετροι, οι οποίες εκφράζουν αντίστοιχα τη χρονική περίοδο για διπλασιασμό του αριθμού ή της μάζας των κυττάρων αντίστοιχα. (Αγγελής, 2017)

Πίνακας 5. Ενδεικτικές τιμές των παραμέτρων μ_{max} (h^{-1}), t_g (h) για τις διάφορες κατηγορίες μικροοργανισμών.

Μικροοργανισμός	μ_{max} (h^{-1})	t_g (h)
Μύκητες	0,1 – 0,34	6,9 – 2,00
Ζύμες	0,34 0,6	2,0 – 1,15
Βακτήρια	0,69 3,0	1,0 – 0,15

Κατά τα πρώτα στάδια της αύξησης, μετά τη φάση προσαρμογής της καλλιέργειας, και όταν η πυκνότητά της είναι ακόμη μικρή, ο ειδικός ρυθμός αύξησης μεγιστοποιείται και διατηρείται μέγιστος για ένα χρονικό διάστημα. **Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης είναι σημαντική παράμετρος μιας καλλιέργειας**, διότι συνδέεται με την **παραγωγικότητα** της και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται στο σχεδιασμό βιοδιεργασιών.



Εικόνα 16. α) Τυπική καμπύλη αύξησης και **β)** Προσδιορισμός του μ_{max} μικροβιακής καλλιέργειας (Αγγελής, 2017)

Το μ_{max} μονοκύτταρων μικροοργανισμών υπολογίζεται ως ακολούθως: Κατά τη διάρκεια της αύξησης λαμβάνονται δείγματα και σε αυτά προσδιορίζεται η βιομάζα. Ακολούθως χαράσσεται η καμπύλη $\ln x = f(t)$ και αναζητείται η περιοχή της καμπύλης που ικανοποιεί το γραμμικό πρότυπο. Η εκκίνηση της ευθείας ($a = -1,3861$) ισούται με το λογαριθμο της

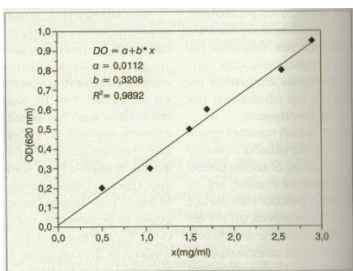
βιομάζας υποθετικού εμβολίου που δεν έχει φάση προσαρμογής και η κλίση της ($b=0,3074$) με μ_{\max} . Όσο πιο μεγάλο το μ τόσο πιο γρήγορα αναπτύσσεται ένας μικροοργανισμός σε ένα υπόστρωμα.

Στην πράξη, ο εκθετικός νόμος αύξησης έχει ισχύ για ένα μικρό μόνο χρονικό διάστημα, κατά το οποίο όλα τα θρεπτικά συστατικά βρίσκονται στο περιβάλλον της αύξησης σε συγκεντρώσεις κορεσμού των μεταβολικών δραστηριοτήτων όλων των κυττάρων του πληθυσμού. Στην κατάσταση κορεσμού, ο πληθυσμός αυξάνεται με το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης, για δεδομένες τις λοιπές συνθήκες αύξησης (θερμοκρασίας, pH κ.λπ.). Είναι ευνόητο ότι ένα περιβάλλον, στο οποίο δεν υπάρχει εξωτερική προσθήκη θρεπτικών συστατικών (κλειστή καλλιέργεια), σύντομα καθίσταται περιοριστικό για την αύξηση, καθώς τα θρεπτικά του συστατικά γρήγορα μειώνονται σε συγκεντρώσεις κατώτερες των ορίων στήριξης του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης, ο δε μικροβιακός πληθυσμός παύει να βρίσκεται σε κατάσταση κορεσμού. Έτσι, όσο τα θρεπτικά συστατικά λιγοστεύουν, τόσο ο ειδικός ρυθμός αύξησης θα απομακρύνεται του μέγιστου. Τις περισσότερες φορές ένα θρεπτικό συστατικό, ο περιοριστικός για την αύξηση παράγοντας (limiting growth factor), καθίσταται περιοριστικό για την αύξηση. Συμπερασματικά, ο ειδικός ρυθμός αύξησης βρίσκεται διαρκώς υπό τον αυστηρό έλεγχο της διαθεσιμότητας του περιοριστικού για την αύξηση παράγοντα. (Αγγελής, 2017)

1.4.4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΜΑΖΑΣ

Κατά τη διάρκεια μιας μικροβιακής καλλιέργειας, τα χημικά συστατικά του υποστρώματος μετατρέπονται σε κυτταρική μάζα (βιομάζα) και μεταβολίτες (προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των οποίων, είναι ουσιώδεις αναλύσεις, με άμεσες και έμμεσες μεθόδους, που επιτρέπουν τον υπολογισμό και την αξιολογήση της καλλιέργειας. Άμεσες μέθοδοι είναι εκείνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον απ'ευθείας προσδιορισμό της μικροβιακής μάζας που περιέχεται στο συγκεκριμένο όγκο καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως υγρό ή ξηρό βάρος κυττάρων στην μονάδα του όγκου της καλλιέργειας. Έμμεσες μέθοδοι είναι εκείνες που προσδιορίζουν συγκεκριμένες φυσικοχημικές παραμέτρους του θρεπτικού υλικού που σχετίζονται με τη μικροβιακή αύξηση (π.χ. pH του μέσου καλλιέργειας, οπτική πυκνότητα, εξάντληση κάποιου θρεπτικού συστατικού κ.λπ.)

Ο Προσδιορισμός της Ξηρής Βιομάζας πραγματοποιείται βάσει της Συσχέτισης με την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας. Η οπτική πυκνότητα (Optical Density 620nm) μιας καλλιέργειας είναι εντός ορίων ανάλογη της συγκέντρωσης της κυτταρικής μάζας σε αυτή. Αν επομένως είναι γνωστή η σχέση $x \text{ (mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = f \text{ (OD}_{620\text{nm}})$ είναι δυνατόν να εκτιμηθεί η συγκέντρωση των κυττάρων, μετρώντας απλά την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας. Στην εργαστηριακή πράξη χρησιμοποιούνται δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης βιομάζας $x \text{ (mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ και σε αυτά προσδιορίζεται η $\text{OD}_{620\text{nm}}$. Ακολουθώντας, χαράσσεται η πρότυπη καμπύλη $x = f \text{ (OD)}$ και προσδιορίζεται στατιστικά η εξίσωση ευθείας, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό βιομάζας. (Αγγελής, 2017)



Εικόνα 17. Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της βιομάζας με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Αγγελής, 2017).

1.4.5 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ - ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

Αλκοολική ζύμωση είναι η διάσπαση των σακχάρων η οποία είναι συνάρτηση της δυνατότητας των ζυμών να παραγάγουν αιθανόλη και να επιζήσουν σε περιβάλλον αυτής. Παράγοντες που επιδρούν στην επιτάχυνση της ανάπτυξης των ζυμών (μικροβιακή αύξηση) και την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης ελέγχεται από πολλούς παράγοντες, εκ των οποίων οι σπουδαιότεροι και πλέον μελετημένοι είναι η δράση του οξυγόνου, η θερμοκρασία, η ενεργός οξύτητα (pH), το υπόστρωμα, οι χημικοί δραστηριοποιητές και τα προϊόντα του μικροβιακού μεταβολισμού.

1.4.5.1 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΖΥΜΩΣΗΣ

Η **θερμοκρασία** περιβάλλοντος και ζύμωσης έχει μεγάλη σημασία, τόσο για την αύξηση των ζυμών, όσο και στην παραγωγή δευτερογενών προϊόντων. Οι ζύμες οινοποίησης μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες μέχρι 45 °C με βέλτιστο το εύρος 22-27 °C, το οποίο εξαρτάται από το είδος της ζύμης και τις συνθήκες περιβάλλοντος. Αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση του αριθμού των ζυμών, αλλά και μείωση της μάζας τους. Όσο πιο υψηλή είναι η θερμοκρασία τόσο πιο ατελής είναι, δηλαδή τόσο μεγαλύτερο το ποσοστό των σακχάρων που μένουν αζύμωτα. Αυτό μάλλον οφείλεται σε συσσώρευση αιθανόλης στο εσωτερικό του κυττάρου (Τσακίρης, 2017). **Όσο πιο χαμηλή είναι η θερμοκρασία ζύμωσης, τόσο τα δευτερεύοντα προϊόντα είναι αυξημένα και το άρωμα των οίνων πιο πλούσιο. Η παραγωγή των αρωματικών εστέρων του οίνου συνδέεται με την ολικά παραγόμενη βιομάζα.** Στην περίπτωση της ζύμωσης σε υψηλές θερμοκρασίες είναι μειωμένη. Μεγάλο ρόλο παίζει για την πορεία της ζύμωσης και η θερμοκρασία με την οποία αρχίζουν οι ζύμες τη ζύμωση. Στην αεροβίωση η ζύμωση είναι πιο γρήγορη και τέλεια, όσο το ξεκίνημα της ζύμωσης γίνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Το αντίθετο ισχύει για την αναεροβίωση. Η ανθεκτικότητα των κυττάρων σε αιθανόλη μειώνεται σε υψηλές θερμοκρασίες εξαιτίας της ελαττωμένης διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης που προκαλείται από την αύξηση της ενσωμάτωσης κορεσμένων λιπαρών οξέων σε αυτήν (Ribereau-Gayon, 1985). Όσο πιο χαμηλή είναι η θερμοκρασία ζύμωσης, τόσο τα δευτερεύοντα προϊόντα είναι αυξημένα και το άρωμα των οίνων πιο πλούσιο. Η παραγωγή των αρωματικών εστέρων του οίνου συνδέεται με την ολικά παραγόμενη βιομάζα. Στην περίπτωση της ζύμωσης σε υψηλές θερμοκρασίες είναι μειωμένη. Όσο πιο σταθερή είναι η θερμοκρασία ζύμωσης, τόσο περισσότερο ευνοείται η αύξηση των ζυμών και η ζύμωση διευκολύνεται (Τσακίρης, 2017). Η **θερμοκρασία**, στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί ένας μικροοργανισμός κυμαίνεται μεταξύ ενός ελαχίστου, που εξαρτάται από την ενέργεια ενεργοποίησης για σύνθεση κυτταρικού υλικού, και ενός μέγιστου, που καθορίζεται από την αντοχή των βιολογικών δομών (μεμβρανών, ενζύμων κ.λπ.) στη θερμοκρασία. Η εξάρτηση του ειδικού ρυθμού αύξησης από τη θερμοκρασία, περιγράφεται ικανοποιητικά από το πρότυπο των Toriwala & Sinclair (1971), το οποίο είναι παρόμοιο με αυτό του Arrhenius που χρησιμοποιείται στη χημική μηχανική: $\mu = k_1 \cdot e^{-E_1/R \cdot T} - k_2 \cdot e^{-E_2/R \cdot T}$, όπου R = παγκόσμια σταθερά αερίων, T = θερμοκρασία, k1 = σταθερά σύνθεσης του κυτταρικού υλικού, k2 = σταθερά αδρανοποίησης των βιολογικών δομών, E1 = ενέργεια ενεργοποίησης για αύξηση και E2 = ενέργεια ενεργοποίησης για καταστροφή των κυττάρων. Οι μικροοργανισμοί, ανάλογα με τη θερμοκρασία στην οποία εμφανίζουν το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (άριστη αύξηση – optimum growth), ταξινομούνται συμβατικά **σε ψυχρόφιλους (Topt = 10-15°C), μεσόφιλους (Topt = 28-40°C), θερμόφιλους (Topt = 55-65°C) και υπερθερμόφιλους (συνήθως Topt = 80-90°C).**

Κατά την αλκοολική ζύμωση το κυριότερο δευτερεύον προϊόν που παράγεται και αποτελεί βασικό ποιοτικό χαρακτηριστικό, κυρίως των παραγόμενων λευκών οίνων, είναι το άρωμα τους. Αυτό απαρτίζεται από το άρωμα της πρώτης ύλης και το δευτερεύον-δευτερογενές άρωμα που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση. Είναι φανερό, επομένως, ότι η παραγωγή καλής ποιότητας λευκών οίνων, επιβάλλει τη διεξαγωγή της ζύμωσης του γλεύκους σε τέτοιες συνθήκες, ώστε να δημιουργείται το περισσότερο δυνατόν άρωμα. Πολλές μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι **η θερμοκρασία της ζύμωσης είναι ο πιο βασικός παράγοντας, που ρυθμίζει το ποιοτικό αυτό χαρακτηριστικό του οίνου και ότι οι θερμοκρασίες που επιτρέπουν τη διατήρηση του ικανοποιητικού αρώματος είναι εκείνες που δεν ξεπερνούν τους 20° C.** Οι θερμοκρασίες πάνω από το όριο αυτό και μάλιστα υψηλότερες από 25° C, εκτός από τις επιπλοκές που δημιουργούν στην εξέλιξη της ζύμωσης, συνοδεύονται και με απώλεια των αρωματικών συστατικών. Τα συστατικά αυτά παρασύρονται από το διοξείδιο του άνθρακα και τους ατμούς αλκοόλης και νερού, δεδομένου ότι η ζύμωση σε υψηλές θερμοκρασίες είναι έντονη και η παραγωγή των αερίων σημαντική. Για να κρατηθεί, επομένως, η **θερμοκρασία ζύμωσης χαμηλή**, υπάρχουν δύο λύσεις, η ζύμωση του γλεύκους να πραγματοποιηθεί σε δοχεία μικρού όγκου και να εφαρμοσθεί αποτελεσματικά ψύξη στη δεξαμενή του εν ζυμώσει γλεύκους. **Η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης στη λευκή οινοποίηση ελέγχεται, όπως και στην περίπτωση της ερυθρής, μετρώντας τη θερμοκρασία και την πυκνότητα του γλεύκους.**

1.4.5.2 PH

Η δράση των ενζύμων, καθώς και οι λειτουργίες των βιολογικών δομών εξαρτώνται επίσης από την **Ενεργό οξύτητα (pH)**. Για κάθε μικροοργανισμό υπάρχει κάποια άριστη τιμή pH για την οποία, δεδομένων των άλλων παραμέτρων, η καλλιέργεια αναπτύσσεται με το μέγιστο ρυθμό αύξησης. Έχει σημαντική επίδραση στον έλεγχο της βακτηριακής μόλυνσης, καθώς και στην ανάπτυξη ζύμης, τα ποσοστά ζύμωσης και τον σχηματισμό παραπροϊόντων. Οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν σε pH που κυμαίνεται από 2 έως 7. **Το βέλτιστο pH είναι μεταξύ 4-5 (5 είναι το pH στο εσωτερικό του κυττάρου). Σε υψηλό pH, όπως και σε μικρότερο του 3, ευνοείται η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση. (Τσακίρης, 2014).** Ένα εύχρηστο εμπειρικό πρότυπο που περιγράφει την εξάρτηση του ειδικού ρυθμού αύξησης από το pH είναι αυτό των Andreyeva & Birykon (1973): $\mu = \alpha \cdot pH^2 + \beta \cdot pH + \gamma$, όπου α,β,γ σταθερές. Μερικοί μικροοργανισμοί (συνήθως ζύμες και μύκητες) εμφανίζουν υψηλότερους ειδικούς ρυθμούς αύξησης σε χαμηλότερες

τιμές του pH (π.χ. <6) και χαρακτηρίζονται ως **οξεόφιλοι**. Άλλοι (συνήθως βακτήρια) αυξάνονται καλύτερα στην αλκαλική περιοχή (pH >7) και χαρακτηρίζονται ως **αλκαλίφιλοι**.

Όσον αφορά στην αλκοολική ζύμωση οινογλεύκους, ο κατάλληλος **συνδυασμός της θερμοκρασίας ζύμωσης και του pH** του γλεύκους ασκεί σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των ζυμομύκητων, αλλά και στην ποιότητα του παραγόμενου οίνου. Σύμφωνα με τον Σουφλερό, **ο συνδυασμός θερμοκρασίας 20 και pH 3,4 αυξάνει τις ανώτερες αλκοόλες κατά 35% και τους ανώτερους εστέρες κατά 100%, σε σχέση με το συνδυασμό θερμοκρασίας 30 και pH 2.9** (Ribereau-Gayon et al, 2006).

1.4.5.3 ΧΗΜΙΚΟΙ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΠΟΙΗΤΕΣ

Ως **χημικοί δραστηριοποιητές** μπορούν να δράσουν αζωτούχες ενώσεις (μονόξινο φωσφορικό αμμώνιο, θειικό αμμώνιο, θειώδες ή διθειώδες αμμώνιο). Οι ενώσεις αυτές σύμφωνα με τη νομοθεσία και σε δόσεις που προβλέπονται, προστίθενται στο γλεύκος με σκοπό την ανάπτυξη των ζυμών. **Η αποτελεσματικότητά τους είναι συνάρτηση της σχέσης ολικό άζωτο/ανόργανο άζωτο και της χρονικής στιγμής της προσθήκης τους μέσα στο γλεύκος. Η ευνοϊκότερη στιγμή προσθήκης τους είναι η αρχή της ζύμωσης οπότε και ευνοούν το σχηματισμό ενζυμικού δυναμικού.** Η προσθήκη τους μπορεί να ευνοήσει την αύξηση προκαλώντας διπλασιασμό του πληθυσμού, επιταχύνοντας με αυτό τον τρόπο τη ζύμωση. Η προσθήκη τους όμως δεν έχει καμία επίδραση στην επιβίωση των ζυμών, γι' αυτό δεν επεμβαίνουν στο τελείωμα της αλκοολικής ζύμωσης. Τα αμινοξέα είναι πολύ ακριβά για να χρησιμοποιηθούν στην οινολογία. (Αγγελής, 2017). Οι ζύμες έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν τις βιταμίνες που χρειάζονται. Το πυροσταφυλικό οξύ και η αιθανόλη ενεργοποιούν την αύξηση των ζυμών και ευνοούν τη σύνθεση πρωτεϊνών. Τα εκχυλίσματα ζυμών είναι εξαιρετικά πλούσια σε άζωτο, αμινοξέα, παράγοντες αύξησης. Η χρήση τους επιτρέπεται σε ποσότητα μέχρι 40 g/l. Ως δραστηριοποιητής μπορεί επίσης να δράσει και η σκόνη ξηρών ζυμών.

1.4.5.4 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Η επίδραση της **Συγκέντρωσης του υποστρώματος** στον ειδικό ρυθμό αύξησης περιγράφεται από το πρότυπο Monod. Σε μερικές όμως περιπτώσεις, παρατηρούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, αποκλίσεις από το πρότυπο αυτό, που οφείλονται στην παρεμπόδιση που ασκεί το υπόστρωμα στην αύξηση των κυττάρων. Για κοινά υποστρώματα, όπως η γλυκόζη, η παρεμπόδιση εμφανίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (>100 g·l⁻¹), σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (της τάξης των 350-500 g·l⁻¹), η αύξηση για τους περισσότερους μικροοργανισμούς είναι αδύνατη, και μόνο οι ωσφόφιλοι ή ωσμοάντοχοι είναι ικανοί να αναπτύσσονται. Το φαινόμενο αυτό της **Παρεμπόδισης υποστρώματος** (substrate inhibition) έχει βιομηχανικό ενδιαφέρον και έχει μελετηθεί εκτενώς. Ένα πρότυπο που περιγράφει τη μικροβιακή αύξηση σε συνθήκες παρεμπόδισης υποστρώματος είναι το πρότυπο του Andrews (1968): $\mu = \mu_{\max} \cdot S / (K_s + S + (S^2/K_i))$, όπου K_i (g·L⁻¹), η σταθερά παρεμπόδισης υποστρώματος. Πολλοί μικροοργανισμοί, παρεμποδίζονται από υποστρώματα, όπως οι πολυφαινόλες, η μυρμηκική αλδεύδη, το τολουένιο, η μεθανόλη κ.ά., ακόμη και όταν αυτά βρίσκονται στο περιβάλλον της αύξησης σε μικρές συγκεντρώσεις.

Ένα άλλο φαινόμενο που απαντάται συχνά στις μικροβιακές καλλιέργειες είναι το **φαινόμενο επίσχεσης που ασκείται από τα προϊόντα του μικροβιακού μεταβολισμού στην αύξηση**. Το φαινόμενο αυτό, το οποίο καλείται **παρεμπόδιση προϊόντος**, έχει μελετηθεί σε περιπτώσεις ζυμώσεων βιομηχανικού ενδιαφέροντος, όπως της αλκοολικής ζύμωσης. Έχουν προταθεί αρκετές εξισώσεις που περιγράφουν την εξάρτηση του ειδικού ρυθμού αύξησης από τη συγκέντρωση των μεταβολικών προϊόντων με παρεμποδιστική δράση, όπως η εξίσωση των Aiba et al. (1968): $\mu = \mu_{\max} \cdot (S / (K_s + S)) \cdot \exp [-K_p \cdot p]$, όπου K_p η σταθερά παρεμπόδισης προϊόντος. (Αγγελής, 2017)

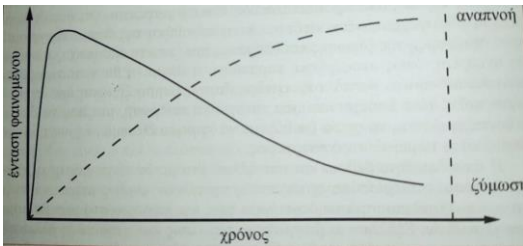
1.4.5.5 ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Οι ζυμομύκητες, ανάλογα με τις ποσότητες οξυγόνου που έχουν στη διάθεσή τους, αναπτύσσουν δύο διαφορετικές δραστηριότητες: τη ζύμωση, σε αναερόβιο περιβάλλον και την αναπνοή, σε αερόβιο περιβάλλον. Όσο λιγότερο είναι το οξυγόνο (αποφυγή συνθηκών αερισμού), τόσο δυσκολότερα πολλαπλασιάζονται, αλλά αυξάνεται η ζυμωτική δράση τους και συνεπώς αυξάνεται η παραγωγή αλκοόλης (Τσιβεριώτου, 2003). Κατά τη ζύμωση τα σάκχαρα μεταβολίζονται σε αλκοόλη, διοξείδιο του άνθρακα και άλλα δευτερεύοντα προϊόντα με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας 40kcal, ενώ κατά την αναπνοή, τα σάκχαρα αποσυντίθενται σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό και εκλύεται ποσότητα θερμότητας 686 kcal, η οποία χρησιμοποιείται για τις ανάγκες των ζυμών.

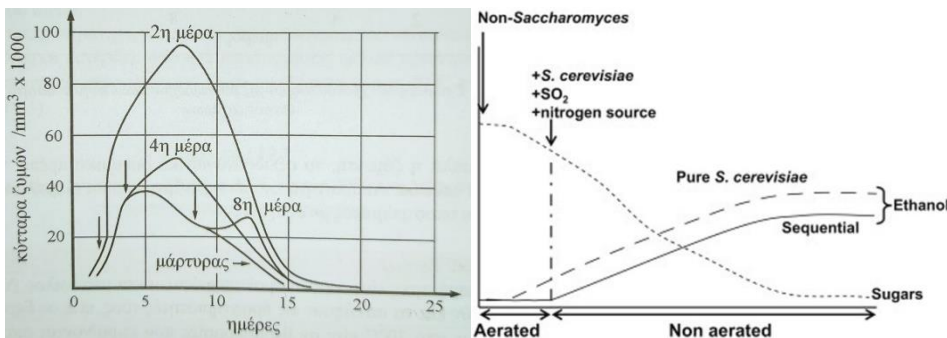
Λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες που επικρατούν στην πράξη πριν και μετά την αλκοολική ζύμωση, **δεν υπάρχει απόλυτος διαχωρισμός ανάμεσα στην αναπνοή και τη ζύμωση ή στο αερόβιο και αναερόβιο περιβάλλον** (διαδοχικό πέρασμα). Τα δύο αυτά φαινόμενα μπορούν να ερμηνευτούν με την κατωτέρω καμπύλη της εικόνας (Ribereau-Gayon et

al., 1975). Διαπιστώνεται ότι, κατά το μέγιστο της μίας καμπύλης, συμβαίνει το ελάχιστο της άλλης, όταν η ένταση της αναπνοής είναι χαμηλή, η ένταση της ζύμωσης είναι υψηλή και το αντίθετο.

Η **αποτελεσματικότητα του αερισμού** εξαρτάται, ωστόσο, από τη **χρονική στιγμή εφαρμογής** του. Στην πράξη ο αερισμός πριν από την έναρξη της ζύμωσης δεν ασκεί καμία επίδραση. Αντίθετα, ο αερισμός τη 2^η ημέρα δίνει το μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων, ίσο με εκείνο του συνεχούς αερισμού, αποτέλεσμα του οποίου είναι η ταχεία ζύμωση των σακχάρων (όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα). Αερισμός την 4^η ημέρα επιδρά πολύ λιγότερο, ενώ την 8^η ημέρα τα αποτελέσματα είναι ανεπαίσθητα και το φαινόμενο της ζύμωσης εξελίσσεται όπως και στην περίπτωση έλλειψης αερισμού. Η αποτελεσματικότητα του αερισμού κατά την 2^η ημέρα οφείλεται στο γεγονός ότι ο πολλαπλασιασμός των ζυμών την ημέρα αυτή βρίσκεται στην πιο σημαντική φάση, όπου ακόμα και ίχνη οξυγόνου επιταχύνουν την εξέλιξη της ζύμωσης. (Σουφλερός, 2015).



Εικόνα 18. Συνδυασμός αναπνοής και ζύμωσης (Σουφλερός, 2015)



Εικόνα 19. **α)** Επίδραση του αερισμού στον πληθυσμό ζυμομυκήτων, όταν λαμβάνει χώρα σε διαφορετικές στιγμές της αλκοολικής ζύμωσης (Σουφλερός, 2015), **β)** επίδραση αερισμού κατά τις πρώτες ημέρες ζύμωσης σακχαρομύκητα σε εντιπαραβολή με αυτή του διαδοχικού εμβολιασμού (Gonzalez et al. 2013).

Πειράματα σε γλεύκος έδειξαν ότι, παρουσία αέρα, ο πληθυσμός των ζυμών μπορεί να διπλασιαστεί και η ζύμωση να γίνει πιο πλήρης. Ζύμωση με απουσία αέρα, με αερισμό τη 2^η ή 3^η ημέρα της ζύμωσης, καταλήγει στο ίδιο αποτέλεσμα δηλαδή στο διπλασιασμό του πληθυσμού των ζυμών και την ενεργοποίηση της ζύμωσης, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Αυτή η δράση του αερισμού, εξηγείται με το ότι το οξυγόνο ενεργοποιεί τη βιοσύνθεση των στερολών και την αύξηση της περιεκτικότητάς τους μέσα στο κύτταρο. Σ' αυτή οφείλεται η μεγάλη αξία της ανακύκλωσης του γλεύκους, δηλαδή η διαβροχή των στέμφυλων που βρίσκονται στο επάνω μέρος της δεξαμενής με γλεύκος από το κάτω μέρος της δεξαμενής. Αυτή η ανακύκλωση έχει αποτέλεσμα τον αερισμό του γλεύκους και τον εμπλουτισμό σε ζύμες καθώς αυτές αποσπώνται από τα στέμφυλα όπου βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση. Εξάλλου, το γλεύκος σε ζύμωση παρασύρει το ολεανολικό οξύ που βρίσκεται πάνω στη φλούδα του σταφυλιού. Η ανακύκλωση του γλεύκους είναι μία τεχνική που σπάνια εφαρμόζεται στην οινοποίηση του λευκού γλεύκους, διότι ο αερισμός προκαλεί την οξείδωσή του.

Η προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας οξυγόνου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης είναι μια κοινή πρακτική στα περισσότερα οινοποιεία, καθώς προάγει τη σύνθεση βιομάζας της εκαστοτε ζύμης και συμβάλλει σε μια υγιή ζύμωση (Fornairon-Bonnefond et al. 2003, Rosenfeld et al. 2003). **Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος «κολλημένης» και αργής ζύμωσης μειώνεται δραστικά έπειτα από προσθήκες οξυγόνου 10 έως 20 mg/L** (Rosenfeld et al. 2004, Sablayrolles and Barre 1986), **ιδιαίτερα όταν εκτελείται στο τέλος της φάσης ανάπτυξης της ζύμης** (Sablayrolles et al. 1996). Παρ' όλα αυτά, το οξυγόνο μπορεί επίσης να αποβεί **επιζήμιο όταν προστίθεται σε περίσσεια**, ενισχύοντας την οξείδωση του οίνου, την υποβάθμιση του χρώματος και τη σύνθεση των αρωματικών ουσιών (Salmon 2006). Παρά τη σπουδαιότητά του, οι προσθήκες οξυγόνου κατά τη ζύμωση του οινογλεύκους πραγματοποιούνται συνήθως ευρετικά μέσω εργασιών άντλησης, οι οποίες συμβάλλουν στη διάλυση οξυγόνου. Παραδόξως, υπάρχουν μόνο μεμονωμένες αναφορές σχετικά με την ποσότητα οξυγόνου που ενσωματώθηκε κατά τη διάρκεια αυτών των κοινών επιχειρήσεων οινοποιείας (Bisson και Butzke 2000, Bosso et al. 2009, Vidal and Aagaard 2008), ειδικά λαμβάνοντας υπόψη ότι το

τελευταίο επηρεάζει την προκύπτουσα ποιότητα οίνου, καθώς εμποδίζει διαχείριση προσθήκης οξυγόνου κατά τη διαδικασία οινοποίησης. **Ο ρυθμός διάλυσης εντός της υγρής φάσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση ισορροπίας της, η οποία σχετίζεται με τη θερμοκρασία και τη σύνθεση του υγρού, την ποσότητα των στερεών και την ανάμιξη που παρέχεται από τις φυσαλίδες του CO₂ που παράγονται από τα κύτταρα ζύμης** (Saa et al. 2012, Singleton 1987). Το CO₂ έχει αποδειχθεί ότι παίζει αντίθετους ρόλους στη διαλυτοποίηση του οξυγόνου στις καλλιέργειες οίνου. Από τη μία πλευρά, μειώνει το ρυθμό διάλυσης οξυγόνου, λόγω της επίδρασης αραιώσης (Devatine et al. 2007, Saa et al. 2012, 2013), αλλά από την άλλη πλευρά, η διοχέτευση CO₂ αυξάνει αυτόν τον ρυθμό, λόγω της βελτιωμένης ανάμιξης κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (García et al. 1994, Vlassides and Block 2000). **Σε μικρές δεξαμενές ζύμωσης, το CO₂ μειώνει το ρυθμό διάλυσης οξυγόνου.** Μέχρι σήμερα, αρκετές μελέτες έχουν χαρακτηρίσει τη συγκέντρωση και την κατανομή του οξυγόνου σε πιλοτική και βιομηχανική οινοποίηση κατά τη μικρο-οξυγόνωση και τη γήρανση (Adoua et al. 2010, Laurie et al. 2008, Nevares et al. 2008, 2010), Ωστόσο, δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες όσον αφορά στο οξυγόνο που προστίθεται μέσω αντλιών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης οινογλεύκους σε βιομηχανικές δεξαμενές, παρόλο που είναι απόλυτα αναγκαίες, ώστε να αποφασιστεί χρονικά και ποσοτικά το οξυγόνο που είναι απαραίτητο να προστεθεί.

1.4.5.5.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Τα επίπεδα διαλυτού οξυγόνου στις βιολογικές διεργασίες εξαρτώνται από τις βιολογικές, χημικές και φυσικές ιδιότητες της υπό παρακολούθηση διαδικασίας. Η μέτρηση του διαλυμένου οξυγόνου (DO) είναι απαραίτητη στις διαδικασίες βιοχημικής μηχανικής και η αλλαγή του, από σταθερή κατάσταση σε μη, μπορεί να επηρεάσει το χρόνο κατακράτησης και άλλες μεταβλητές της διαδικασίας, όπως συγκεντρώσεις υποστρώματος και προϊόντος, χρόνο συγκράτησης, ρυθμό αραιώσης και ρυθμό αερισμού. Οι μικροβιακές δραστηριότητες παρακολουθούνται από τον ρυθμό πρόσληψης οξυγόνου από τον παρεχόμενο αέρα ή το οξυγόνο.

Η μέτρηση του διαλυτού οξυγόνου αποτελεί βασικό test για τον έλεγχο και τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας, καθώς το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη ζύμωση και την κυτταρική καλλιέργεια και τα σωστά επίπεδα του διασφαλίζουν ότι οι συνθήκες παραμένουν βέλτιστες για τα κύτταρα. Τα χαμηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου στους ζυμωτήρες / βιοαντιδραστήρες μπορούν να επηρεάσουν το ρυθμό ανάπτυξης, την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών, την κυτταρική μορφολογία και τη σύνθεση μεταβολιτών, οδηγώντας σε μειωμένη απόδοση και χαμηλότερη ποιότητα τελικού προϊόντος. Τα υψηλά επίπεδα προκαλούν το σχηματισμό ειδών που αντενεργούν με το οξυγόνο και μπορούν να οξειδώσουν συστατικά του μέσου και να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις κυττάρων.

Η διαχείριση του οξυγόνου είναι επομένως ζωτικής σημασίας για να εξασφαλιστεί η κατάλληλη ανάπτυξη της ζύμης και να αποφευχθούν οι επιβλαβείς επιδράσεις της στην ποιότητα του οίνου. Οι προσθήκες οξυγόνου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης πραγματοποιούνται συνήθως μέσω εργασιών άντλησης και καλούνται αερισμός. Ο ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου από την αέρια φάση στην υγρή φάση είναι σημαντικός. Σε υψηλές πυκνότητες κυττάρων, η ανάπτυξη των κυττάρων περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου στο μέσο. Η ανάπτυξη αερόβιων ζυμών στον ζυμωτήρα ελέγχεται κατόπιν από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου, υποστρώματος, πηγών ενέργειας και ενζύμων. Πρέπει να παρέχεται συγκεκριμένη ποσότητα αέρα (αερόβια διαδικασία) για την ενίσχυση της ανάπτυξης των κυττάρων. Ο περιορισμός οξυγόνου μπορεί να προκαλέσει μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Η διατήρηση διαλυμένου οξυγόνου στο απαιτούμενο εύρος είναι κρίσιμη για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας.

Σε πειράματα βελτίωσης της διαχείρισης του οξυγόνου κατά τη ζύμωση έχει δείχθει ότι το 80% του συνόλου συγκεντρώνεται στην κορυφή των δεξαμενών. Κατά την ανάλυση της διάλυσης οξυγόνου στη διάρκεια της διαβροχής, παρουσιάζονται αρχικά χαμηλά επίπεδα οξυγόνου παρά τις υψηλές συγκεντρώσεις ελεύθερου SO₂ (αναστολέας της ενζυματικής οξείδωσης) που ενδεχομένως να οφείλεται στην υψηλή αρχική περιεκτικότητα σε CO₂, η οποία αποτρέπει τη διάλυση οξυγόνου κατά την αρχική περίοδο. Στην περίπτωση του σταδίου ζύμωσης, οι παρατηρούμενες χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου οφείλονται κυρίως σε αυξημένη δραστηριότητα ζύμης. Η αρνητική επίδραση του CO₂ στη διάλυση οξυγόνου και η αυξημένη βιολογική δραστηριότητα της ζύμης που εκδηλώνεται με έντονη ζύμωση, επισημαίνονται ως οι κύριες αιτίες για τα παρατηρούμενα χαμηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου.

Ο ακριβής έλεγχος οξυγόνου είναι δυνατός μόνο εάν οι μετρήσεις από αισθητήρες διαλυμένου οξυγόνου που είναι εγκατεστημένοι σε ζυμωτήρες / βιοαντιδραστήρες είναι αξιόπιστες (αμπερομετρικοί, οπτικοί αισθητήρες. Mettler Toledo στοιχείο αντίχνευσης κ.ά.) Επιπλέον, σε μεγάλους ζυμωτήρες που απαιτούν ισχυρούς συμπίεστες για την έγχυση αέρα, η υπερβολική διάχυση είναι μια δαπανηρή σπατάλη ενέργειας. Εκτός από το οξυγόνο, ο έλεγχος της θερμοκρασίας είναι επίσης κρίσιμος καθ' όλη τη διαδικασία της ζύμωσης. Ασκει έντονη επίδραση στη γέυση του προϊόντος προκαλώντας αλλοίωση στους εστέρες, παραγωγή υψηλότερου επιπέδου αλκοόλης και ακεταλδεϋδης, καθώς και αύξηση της πρόσληψης αμινοξέων. (Moenne et al.2014, Portno et al. 1967, Jones et al.1992 & 2007, Kazemi et al. 2013, Zheng et al. 2019, Rosenfeld et al. 2003, Najafpour et al. 2007, Cheynier et al.1991)

1.4.6 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΖΥΜΩΝ – ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Ο αριθμός των ζυμών στα σταφύλια είναι μικρός και ακανόνιστος. Ο σπαστήρας για την ερυθρή οινοποίηση και το πιεστήριο για τη λευκή παίζουν το ρόλο του τροφοδότη ζυμών για το γλεύκος. Οι ζύμες που δίνουν δύσκολα σπόρια είναι αυτές που εξασφαλίζουν την έναρξη της πρώτης φάσης της ζύμωσης. Σε αυτές οφείλονται οι πρώτοι αλκοολικοί βαθμοί και πρόκειται κυρίως για το στέλεχος *Hanseniaspora uvarum*. Ταυτόχρονα όμως αναπτύσσονται σακχαρομύκητες, με αποτέλεσμα, προς το τέλος της ζύμωσης, η ζύμη non-Saccharomyces να εξαφανίζεται. Από τους σακχαρομύκητες, οι οποίοι έχουν διαφορετική, αλλά μεγαλύτερη ικανότητα ζύμωσης, επικρατούν τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces bayanus*, τα οποία και ολοκληρώνουν την αλκοολική ζύμωση (Τσακίρης, 2017).

Όπως και άλλοι μικροοργανισμοί, έτσι και οι ζύμες απαιτούν ένα πλήθος θρεπτικών ουσιών συμπεριλαμβανομένου του άνθρακα (σάκχαρα), του αζώτου (αμμωνίας ή / και των αμινοξέων) και διαφόρων παραγόντων ανάπτυξης και επιβίωσης, όπως οι βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία (Ribéreau-Gayon, 2006). Η ζύμη προκειμένου να τραφεί, να αυξηθεί και να συντηρηθεί έχει ανάγκη από διάφορα απαραίτητα συστατικά, τα οποία μπορεί να είναι σε ελεύθερη κατάσταση ή ενωμένα. Οι περισσότερες ζύμες χρειάζονται 90-95% σχετική υγρασία με τη μορφή νερού. Οι οσμόφιλες ζύμες, όμως, μπορούν να αναπτυχθούν σε επίπεδο υγρασίας 85-90% και ακόμη μικρότερη. Τα θρεπτικά συστατικά μπαίνουν στο εσωτερικό της ζύμης με παθητικό τρόπο χάρη στην υψηλή συγκέντρωση του περιβάλλοντος και με ενεργητικό μηχανισμό, κατά τη βαθμιαία μείωση της συγκέντρωσης. Η επιλογή της αποβολής των άχρηστων ουσιών για τη ζύμη (όπως η αιθανόλη) γίνεται με τον ίδιο μηχανισμό. Σε **αναερόβιο περιβάλλον**, από τις ενώσεις του άνθρακα, οι ζύμες παράγουν αλκοόλη, διοξείδιο του άνθρακα και άλλα δευτερεύοντα προϊόντα, ενώ το φαινόμενο καλείται αλκοολική ζύμωση και σε αυτήν την περίπτωση, οι ζύμες αποκτούν μεγάλη εξειδίκευση, ανάλογα με τις ενώσεις άνθρακα που έχουν στη διάθεσή τους. Στη περίπτωση του **αερόβιου περιβάλλοντος** ζύμωσης (φαινόμενο αναπνοής ζυμών), η αφομοιωτική ικανότητα των ζυμών είναι πολύ μεγαλύτερη. Μπορούν να αφομοιώσουν υδατάνθρακες ακόμη και μεγάλου πολυμερισμού, πεντόζες, οξέα του κύκλου του Krebs, ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης, αμινοξέα και CO₂, που βρίσκεται προσκολλημένο στο πυροσταφυλικό οξύ του κύκλου του Krebs. Τα μόρια των ενώσεων του άνθρακα, εδώ χρησιμεύουν για τη διατροφή των ζυμών, δίνοντας διοξείδιο του άνθρακα και νερό. (Τσακίρης, 2017).

Σε γενικές γραμμές, το γλεύκος των σταφυλιών περιέχει όλα τα απαραίτητα ανόργανα στοιχεία και μάλιστα σε επαρκείς ποσότητες, ώστε να εξασφαλίζει στις ζύμες κανονική ανάπτυξη και ικανοποιητική ζυμωτική δράση. Ωστόσο, ένας επιπλέον εξωτερικός εμπλουτισμός του γλεύκους με ανόργανα συστατικά έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη δραστηριοποίηση των ζυμών.

1.4.6.1 ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

Όλες οι ζύμες (εκτός από τις παθογόνες) αναπτύσσονται άνετα πάνω σε θρεπτικά υλικά ή υποστρώματα γενικώς, τα οποία περιέχουν μια πηγή άνθρακα του γενικού τύπου CH₂O_n, οργανικό και για ορισμένα είδη ζυμών ανόργανο άζωτο, ανόργανα συστατικά και έναν αριθμό βιταμινών, ορισμένες για τα καθέκαστα είδη ζυμών, κυρίως από την ομάδα των υδατοδιαλυτών. Ακόμη θα πρέπει να σημειωθεί, ότι τα θρεπτικά υλικά, τα οποία είναι ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των ζυμών, δυνατόν να είναι διαφορετάτης σύστασης, υπό τον όρο ότι περιέχουν τα ανωτέρω απαραίτητα βασικά συστατικά.

Οι ζύμες είναι ετερότροφοι οργανισμοί και προσλαμβάνουν τον άνθρακα από τα σάκχαρα. Όλες οι ζύμες έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν τις πηγές άνθρακα με εξαίρεση ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 1%, των αποικιών ορισμένων ειδών που αντλούν ενέργεια μόνο δια της ζύμωσης. Οι αποικίες αυτές είναι μικρού μεγέθους και ανήκουν σε μεταλλακτικό στέλεχος. Αντίθετα, οι οξειδωτικές ζύμες δεν ζυμώνουν καμιά πηγή άνθρακα, ενώ οι υπόλοιπες ζυμώνουν επιλεκτικά μια ή περισσότερες πηγές άνθρακα, ανάλογα με το είδος ή και το στέλεχος.

Οι πηγές του άνθρακα διακρίνονται (οργανικά συστατικά – παράγοντες ανάπτυξης) σε αφομοιώσιμες, οι οποίες αξιοποιούνται, είτε διαμέσου της ζύμωσης (αναερόβια), είτε διαμέσου της οξείδωσης (αερόβια), είτε και με τους δύο τρόπους, ανάλογα με τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες. Όσον αφορά στην πρώτη περίπτωση (αναερόβιο περιβάλλον, αλκοολική ζύμωση), καμιά ζύμη δεν μπορεί να ζυμώσει τις πεντόζες, αλλά όλες μπορούν να ζυμώσουν ορισμένες εξόζες και ειδικότερα τις D-ισομερείς. Αναλυτικότερα, τα σάκχαρα κατατάσσονται σε αναγωγικά και μη αναγωγικά, ενώ τα αναγωγικά διακρίνονται σε ζυμώσιμα (εξόζες) και μη ζυμώσιμα (πεντόζες). Στα αναγωγικά σάκχαρα του γλεύκους περιέχονται οι ακόλουθες εξόζες: D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη, D-μανόζη και D-φρουκτόζη. Από την άλλη τα σάκχαρα με τα 5 άτομα άνθρακα είναι τα εξής: D-αραβινόζη, D-ξυλόζη, D-ριβόζη, και L-ραμνόζη. Στα μη ανάγοντα σάκχαρα ανήκει η σακχαρόζη σε περιεκτικότητα 1-2%, η οποία υδρολύεται σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα σημαντικότερα σάκχαρα είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, σε συγκέντρωση 150 έως 250 g/l. Τα άλλα σάκχαρα υπάρχουν σε μικρότερες αναλογίες. Στο γλεύκος, η σχέση γλυκόζης προς φρουκτόζη είναι κοντά στη μονάδα (0,95). Η γλυκόζη είναι λιγότερο σταθερή από τη φρουκτόζη, γι' αυτό μεταβολίζεται κατά προτίμηση από τις ζύμες. Μερικές ζύμες,

ανάλογα με τις ιδιότητες της μεμβράνης τους, αφομοιώνουν κατά προτίμηση τις D-γλυκόζη, D φρουκτόζη, D-μανόζη. Μερικές ζύμες μπορούν να αφομοιώσουν τη γαλακτόζη. Η σακχαρόζη αφομοιώνεται, αφού πρώτα υδρολυθεί σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Η ραφινόζη (γλυκόζη - φρουκτόζη - γαλακτόζη) είναι αφομοιώσιμη από ορισμένες ζύμες καθώς και ορισμένα παράγωγα της γλυκόλυσης, η διυδροξυακετόνη και η γλυκεριναλδεύδη (Τσακίρης, 2017). Γενικά, καμία ζύμη δε ζυμώνει τις πεντόζες που απαντώνται σε ορισμένα σακχαρούχα υποστρώματα και ιδίως στο οινογλεύκος (ξυλόζη και αραβινόζη), που όμως όμως ζυμώνονται από τα γαλακτικά βακτήρια. Οι πολύ υψηλές και οι πολύ χαμηλές ποσότητες σακχάρων δεν ευνοούν την ανάπτυξη των ζυμών. Ο μεταβολισμός των ζυμών διαταράσσεται σε ολόκληρη τη διάρκεια της ζύμωσης. Πραγματοποιείται επιμήκυνση της φάσης επώασης, μείωση της ταχύτητας ζύμωσης, μείωση της ποσότητας των σακχάρων που ζυμώνονται και αύξηση της πηκτικής οξύτητας. Συχνά παρατηρείται και διακοπή της ζύμωσης (Ribereau-Gayon et al, 2006, Σουφλερός 2015, Τσακίρης, 2017).

Οι κανόνες που ακολουθούν, ισχύουν για τη ζύμωση των διαφόρων πηγών άνθρακα από τις ζύμες και είναι τα επονομαζόμενα **δόγματα του Kluver**:

1. Πολλές ζύμες ζυμώνουν μόνο εξόζες (μία ή περισσότερες).
2. Όσες ζύμες δε ζυμώνουν τη γλυκόζη, δε ζυμώνουν καμία άλλη πηγή άνθρακα (είναι καθαρά οξειδωτικές).
3. Όσες ζύμες ζυμώνουν τη γλυκόζη, ζυμώνουν και τη φρουκτόζη και μαννόζη, όχι όμως αναγκαστικά και τη γαλακτόζη.
4. Η γαλακτόζη ζυμώνεται από ορισμένα είδη ζυμών ή και από ορισμένα στελέχη ειδών (φυσιολογικές φυλές) και για τη ζύμωσή της είναι απαραίτητο το ένζυμο γαλακτοζοβαλντινάση.
5. Μια ζύμη που ζυμώνει τη λακτόζη δεν ζυμώνει τη μαλτόζη και αντίστροφα. Και τους δύο δισακχαρίτες ζυμώνει το είδος *Brettanomyces clausenii*.
6. Οι ζύμες που ζυμώνουν τους δισακχαρίτες (σακχαρόζη, μαλτόζη, λακτόζη, μελιβίοζη) πρέπει να συνθέτουν τα αντίστοιχα ένζυμα για τον καθένα (ιμπερτάση, μαλτάση, λακτάση, μελιβιάση).
7. Ο τρισακχαρίτης ραφινόζη ζυμώνεται κατά το 1/3 αν η ζύμη συνθέτει το ένζυμο ραφινάση και κατά τα 2/3 αν συνθέτει και τα δύο ένζυμα ραφινάση και μελιβιάση.
8. Οι πολυσακχαρίτες (άμυλο, δεξτρίνες κ.ά.) δεν ζυμώνονται από τις ζύμες. Κατ' εξαίρεση, το είδος *Saccharomyces diastaticus* ζυμώνει τις δεξτρίνες του ζύθου, το είδος *Schwanniomyces occidentalis* ζυμώνει το άμυλο και τα είδη του γένους *Kluveromyces* ζυμώναν την ινσουλίνη. (Κατινάκης 2004, Μπαλατσαούρας 2006).

1.4.6.2 ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

Οι ζυμομύκητες χρειάζονται πηγές αζώτου για την ανάπτυξή τους. Η αύξηση τους είναι κυρίως φαινόμενο σύνθεσης πρωτεϊνών, δεδομένου ότι το 25-60% του ξηρού βάρους της ζύμης αποτελείται από **αζωτούχα συστατικά**. Οι αζωτούχες ενώσεις αντιπροσωπεύουν το 20% περίπου του στερεού υπολείμματος του οίνου και διακρίνονται στις οργανικές και τις ανόργανες. Οι ανόργανες αζωτούχες ενώσεις, βρίσκονται στον οίνο σαν αμμωνιακά άλατα και αποτελούν το 5% του συνολικού αζώτου. Το ανόργανο άζωτο (NH⁺) προέρχεται από άλατα οργανικών οξέων, τα οποία είναι εύκολα αφομοιώσιμα, γιατί το ανιόν που μένει στο διάλυμα δεν προκαλεί ελάττωση του pH (με εξαίρεση το οξικό και οξαλικό αμμώνιο με τοξική επίδραση στις ζύμες). Επίσης, προέρχεται από άλατα ανόργανων οξέων, όπως το φωσφορικό καιθειώδες αμμώνιο. Τα νιτρικά άλατα είναι αφομοιώσιμα από μικρό αριθμό ζυμών. Το υπόλοιπο 95% περιέχεται στον οίνο σαν οργανικές αζωτούχες ενώσεις, οι οποίες προέρχονται από αμινοξέα, τα οποία είναι αφομοιώσιμα ανάλογα με το είδος της ζύμης, από ορισμένα αμιδιά (ασπαραγίνη, γλουταμίνη), από ολιγοπεπτίνες, οι οποίες είναι αφομοιώσιμες αναλόγως του pH, και τέλος, από πυριδίνες, πυριμιδίνες, από τις οποίες μόνο το άζωτο των ανοιχτών αλυσίδων είναι αφομοιώσιμο (Τσακίρης, 2017). Για την αφομοίωση του αζώτου από τις ζύμες ισχύουν τα ακόλουθα. Καμία από τις ζύμες δε μπορεί να χρησιμοποιήσει ως μόνη πηγή αζώτου το μοριακό άζωτο (N₂) και τις πρωτεΐνες, επειδή δεν εκκρίνουν πρωτεϊνολυτικά εξωένζυμα για να διασπάσουν τις πρωτεΐνες προς αμινοξέα και ολιγοπεπτίδια. Όλες οι ζύμες χρησιμοποιούν ως μόνη πηγή αζώτου τα αμμωνιακά άλατα με την ακόλουθη σειρά προτίμησης: μονο-, δι-, και τριφωσφορική αμμωνία,θειική αμμωνία, ανθρακικό αμμώνιο, διανθρακικό αμμώνιο, το οξικό, το γαλακτικό και το τρυγικό αμμώνιο. Όλες οι ζύμες διαθέτουν το κύτταρό τους τα κατάλληλα ένζυμα για τη σύνθεση όλων των αμινοξέων, των πουρινών και πυριμιδινών για την σύνθεση των απαραίτητων για το κύτταρό τους πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων και μόνο οι ζύμες του γένους *Hansenula* της παλιάς κλείδας ταξινόμησης των ζυμών μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως μοναδική πηγή αζώτου τα νιτρικά άλατα (νιτρικό άζωτο). Τέλος, μείγματα αμινοξέων, διάφορα κατά περίπτωση, μπορούν να αποτελέσουν μοναδική πηγή αζώτου για την ανάπτυξη των διαφόρων γενών, ειδών ή και στελεχών ζυμών. Η έλλειψη αζώτου στο γλεύκος έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων. Όσο περισσότερο άζωτο έχουν στη διάθεσή τους, τόσο πιο έντονη είναι η ζυμωτική τους ικανότητα (Rose & Harrison, 1970, Bisson, 2001).

Πίνακας 6. Κύρια συστατικά μέσων ζύμωσης για την αλκοολική ζύμωση, τα οποία ενυπάρχουν στο οινογλεύκος (Walker et al., 2016).

Απαραίτητα Συστατικά	Θρεπτικά	Γλεύκος Σταφυλιού
Πηγή άνθρακα		Εξόζες (Γλυκόζη, φρουκτόζη)
Πηγή αζώτου		Αμμωνιακό άζωτο Αμινοξέα
Μέταλλα		Υπάρχει Επάρκεια
Βιταμίνες		Υπάρχει εύρος βιταμινών
Ανάγκες σε βιταμίνες		Ελάχιστα απαιτητικές
Δευτερεύων συστατικά		Πεντόζες, οργανικά και λιπαρά οξέα

1.4.6.3 ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΣΕ ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι ενώσεις, τις οποίες η ζύμη δε μπορεί να συνθέσει και η απουσία των οποίων κάνει αδύνατη την αύξησή της, κυρίως οι βιταμίνες της ομάδας Β (νικοτινικό οξύ (NAD) 10-20 mg/L, πυριδοξίνη (B6) 100-500 µg/L, παντοθενικό οξύ (συνένζυμο Α-Βιταμίνη Β5) 0,2-1 mg/, μεσοϊνσοιτόλη (Βιταμίνη Ι) 10-50 mg/L, θειαμίνη (Βιταμίνη Β1) 100-500 µg/L, Βιοτίνη (Βιταμίνη Η) 10-50 µg/L), τα στεροειδή (όπως οι στερόλες, που σε συνθήκες αυστηρής αναερόβιας, συμπεριφέρονται σαν παράγοντες αύξησης ζύμης και επιβίωσης) και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το ολεανολικό οξύ που στη φάση μείωσης των ζυμών, λειτουργεί σαν παράγοντας επιβίωσης και όχι αύξησης. Αυτή η δράση τους είναι πολύ σημαντική, διότι το 1/3 - 2/3 της αλκοολικής ζύμωσης γίνεται με ζύμες, των οποίων η αύξηση έχει σταματήσει. Οι βιομηχανικά παροσκευαζόμενες ζύμες, οι οποίες παράγονται σε περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο έχουν μεγάλη περιεκτικότητα στερόλες, όπως οι ιθαγενείς, ενώ οι ζύμες που αναπτύσσονται με ζύμωση είναι πιο φτωχές σε στερόλες. Επομένως, οι βιταμίνες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των κυττάρων. Μερικά δε στελέχη ζυμών έχουν ανάγκη συγκεκριμένων βιταμινών, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και πιθανή έλλειψη προκαλεί αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων τους (Ough et al., 1989, Bisson 2001, Σουφλερός 2015, Τσακίρης 2017). Επιπλέον, μικρή ποσότητα μετάλλων, όπως, Fe, Cu, Co, Al, Mg, Zn, καθίσταται αναγκαία για τη λειτουργία των κυττάρων. Αυξημένες ποσότητες όμως αυτών προκαλούν επιβράδυνση ή και αναστολή της ζύμωσης λόγω του ότι είναι τοξικά για τα κύτταρα (Rose & Harrison, 1970, Bisson, 2001). Τέλος, το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την αύξηση των ζυμών. Τελείως απαραίτητα ανόργανα συστατικά είναι ο φωσφορος, το θείο, το κάλιο και το μαγνήσιο. Τα μονοβασικά φωσφορικά άλατα (KH₂PO₄) αφομοιώνονται καλύτερα από ό,τι τα διβασικά (K₂HPO₄). Οι ζύμες αντλούν το θείο από τα θειικά άλατα, ενώ το κάλιο είναι τελείως απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό και τη ζύμωση και μπορεί μερικώς να αντικατασταθεί από το νατριο και το αμμώνιο. Σε μικρότερες ποσότητες απαιτείται σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο, βόριο και ιώδιο. Τα άλλα ανόργανα συστατικά παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των ζυμών σε μικρές ή αυξημένες συγκεντρώσεις.

1.4.6.4 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Ο σχεδιασμός του θρεπτικού υλικού μιας μικροβιακής καλλιέργειας είναι ένα κρίσιμο στάδιο για μια επιτυχή μικροβιακή αύξηση. Τα χημικά συστατικά του μέσου καλλιέργειας θα πρέπει να καλύπτουν τόσο τις βιοσυνθετικές και ενεργειακές ανάγκες των κυττάρων, όσο και τις ειδικές απαιτήσεις σε βιταμίνες, αμινοξέα και ιχνοστοιχεία. Για το σχεδιασμό του βέλτιστου θρεπτικού υλικού (υπόστρωμα), το πρώτο βήμα είναι η χημική ανάλυση της βιομάζας (παραγόμενης μετά από καλλιέργεια σε ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης). Η ανάλυση αυτή χρησιμεύει στον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των ανόργανων στοιχείων στο βέλτιστο θρεπτικό υλικό (πρέπει να εξασφαλίζει την καλύτερη δυνατή αύξηση). Η ποσότητα πηγής άνθρακα υπολογίζεται με βάση την αναμενόμενη απόδοση του μικροοργανισμού και τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον της αύξησης. Πρακτικά χρησιμοποιούνται διάφορα πρότυπα βελτιστοποίησης θρεπτικών υλικών και γενικά συνθηκών καλλιέργειας (pH, θερμοκρασίας, αερισμού κ.λπ.).

1.4.6.4.1 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Γενικά οι ζύμες έχουν μειωμένες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά. Κατάλληλα υποστρώματα για την ανάπτυξη τους είναι τα ακόλουθα:

- A. Υπόστρωμα του Wickerham:** Κατά τον Αμερικανό Ζυμολόγο ιδεώδες θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη και τη διατήρηση των ζυμών είναι το εκχύλισμα βύνης με άγαρ, το οποίο περιέχει κατά λίτρο: εκχύλισμα βύνης 3g, πεπτόνη 5g και άγαρ 12-15g. Πέρα από τα θρεπτικά συστατικά ενδιαφέρει και το pH των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υλικών για την ανάπτυξη των ζυμών, που θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών **3 και 8**. **Καλύτερα όμως αποτελέσματα επιτυγχάνονται όταν το εύρος του περιορίζεται μεταξύ 4,5 και 6,5.**
- B.** Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και ειδικά υποστρώματα για την ανάπτυξη των ζυμών που χρησιμοποιούνται σε ειδικές μόνο περιπτώσεις και για την επίτευξη ορισμένων εκάστοτε σκοπών. Τέτοια υποστρώματα είναι:
- Το προϊόν αυτολύσεως των κυττάρων ζύμης:** Είναι πλήρες ως προς όλα τα συστατικά, δεν περιέχει σάκχαρα σε ζυμώσιμες ποσότητες. Το υλικό αυτό αποτελεί τη βάση για θρεπτικά υλικά με τα οποία ελέγχεται η ζυμωτική για ορισμένα σάκχαρα ικανότητα των ζυμών.
- Βάση αζώτου για τις ζύμες:** Είναι θρεπτικό υλικό πλήρες ως προς όλα τα θρεπτικά συστατικά, στερείται όμως πηγής άνθρακα. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αφομοιωτικής ικανότητας για τα διάφορα σάκχαρα ικανότητας των διαφόρων ειδών ζύμης.
- Βάση άνθρακα για τις ζύμες:** Είναι θρεπτικό υλικό πλήρες ως προς όλα τα θρεπτικά συστατικά, στερείται όμως πηγής αζώτου. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αφομοιωτικής ικανότητας για το ανόργανο άζωτο (κυρίως νιτρικών αλάτων) των διαφόρων ειδών ζύμης.
- Θρεπτικό υλικό απαλλαγμένο βιταμινών:** Είναι θρεπτικό υλικό πλήρες ως προς όλα τα θρεπτικά συστατικά, εξαιρείται των βιταμινών, από τις οποίες είναι τελείως απαλλαγμένο. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των αναγκών σε βιταμίνες των καθεκαστα ειδών ζυμών. Με βάση δε τις μέχρι τώρα έρευνες αποδείχθηκαν απαραίτητες για την ανάπτυξη των ζυμών εννιά συνολικά βιταμίνες, από τις οποίες μόνο ορισμένες αναγκαιούν για κάθε είδος ζύμης. Οι βιταμίνες αυτές είναι οι ακόλουθες: βιοτίνη, πανθοθενικό ασβέστιο, φυλλικό οξύ, ινοσίτης, νιασίνη, παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ, πυριδοξίνη, ριβοφλαβίνη και θειαμίνη (Phaff et al., 1966).
- GPY:** Σύσταση – Απιονισμένο νερό 500ml, Γλυκόζη 40g, Πεπτόνη 5g, Προϊόν αυτόλυσης ζυμών 500ml, Άγαρ 10-15g.
- YPD Συστατικά ανά λίτρο - Γλυκόζη 20g, Πεπτόνη 20g, Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) 10ml, Άγαρ 10-15g.**
- Gorodkowa-agar** (συστατικά ανά λίτρο)- Γλυκόζη 1g, Πεπτόνη 10g, NaCl 5g, Άγαρ 10-15g.
- Θρεπτικό υλικό με οινογλεύκος:** Απιονισμένο νερό 500ml, Οινογλεύκος 500ml, Άγαρ 10-15g.
- Το οινογλεύκος αποτελεί άριστο θρεπτικό υλικό για ζύμες.** Λόγω όμως του χαμηλού pH υδρολύει το άγαρ στη διάρκεια της αποστείρωσης. Για το λόγο αυτό θα πρέπει το γλεύκος να αποστειρώνεται ως έχει και το άγαρ εναιωρημένο χωριστά σε νερό. Τα δύο θα πρέπει να αναμιγνύονται υπό ασηπτικές συνθήκες μετά την αποστείρωση. (Μπαλατσαούρας, 2006)

1.4.7 Η ΦΥΣΙΚΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΟΙΝΟΠΟΙΕΙΟΥ

Είναι σημαντικό να αναγνωρίζεται το γένος και τα είδη των ζυμών που σχετίζονται με τον οίνο, προκειμένου να πραγματοποιείται σύγκριση και συμβολή των ζυμών-εμβολίων ή των γηγενών σε ένα συγκεκριμένο οίνο ή οινοποιείο και να αξιολογούνται τα προβλήματα που προκύπτουν κατά τη ζύμωση και τη μικροβιακή αλλοίωση. Η ταξινόμηση των ζυμών αποτελεί ένα διαρκώς εξελισσόμενο θέμα, καθώς οι μέθοδοι ταυτοποίησης, και άρα ταξινόμησης, μεταβάλλονται ραγδαία. Ανεξάρτητα από τη ταξινόμηση, η επιλογή και χρήση κατάλληλης ζύμης του συγκεκριμένου στελέχους θα πρέπει να γίνεται με βάση τα **επιθυμητά χαρακτηριστικά που προσδίδει στον παραγόμενο οίνο, τα οποία έχουν σχέση με την ικανότητά του να ζυμώνει και να παράγει ενώσεις, οι οποίες επιδρούν άμεσα στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.** Η ζυμωτική συμπεριφορά δεν πρέπει να θεωρείται δεδομένη αφού, με την πάροδο του χρόνου αυτή μπορεί να μεταβάλλεται. Σύμφωνα με την τρέχουσα οινολογική πρακτική, οι ζύμες υπάρχουν σε διαφορετικές ποσότητες στο σταφύλι και διαθέτουν ζυμωτική ικανότητα διαφορετικών ταχυτήτων, ανοχή σε αιθανόλη και προτίμηση στη ζύμωση σακχάρων. (Μπαλατσαούρας 2006, Αγγελής 2017).

Η μικροβιακή χλωρίδα των σταφυλιών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η βροχόπτωση, η υγρασία, τα καθεστώτα ψεκασμού του αμπελώνα, οι φορείς εντόμων, τα καθεστώτα αζωτούχων λιπασμάτων και οι πρακτικές διάθεσης αποριμμάτων στα οινοποιεία. Η παρουσία πολλών γενών ζυμών στα σταφύλια, στον αμπελώνα και το οινοποιείο έχει καθιερωθεί από το 1968 (Amerine & Kunkee 1968, 1980).

Οι άγριες non-Saccharomyces ζύμες κυρίως από τα γένη *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Hansenula*, *Candida* και *Hanseniaspora*, είναι εκείνες που απαντώνται σε μεγάλο βαθμό στα σταφύλια, και μπορούν να λάβουν μέρος, στις

ζυμώσεις οίνου, τουλάχιστον κατά την έναρξη. Η *Kloeckera apiculata* φαίνεται να είναι το κυρίαρχο είδος της ζύμης στα σταφύλια σε περιοχές ψυχρότερης ανάπτυξης, ενώ το είδος ***Hanseniaspora uvarum*** είναι το πιο διαδεδομένο στις θερμότερες περιοχές ανάμεσα στις ζύμες που προέρχονται από τα σταφύλια (Castelli 1954, Adams 2008, Pretorius, 2000). Άλλα γένη που υπάρχουν και σχετίζονται με το περιβάλλον της οινοποίησης, αλλά σε μικρότερες αναλογίες είναι τα ακόλουθα: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* και *Brettanomyces* (Pretorius, 2000). Ο *S. cerevisiae* μπορεί να μην εμφανίζεται σε μεγάλο ποσοστό στην επιφάνεια των σταφυλιών, αλλά είναι αυτός που έχει την καλύτερη προσαρμογή στις αντίξοες συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης (Σουφλερός, 2015). Οι περισσότερες μελέτες που ασχολούνται με τη Μικροβιολογία οίνου, εστιάζουν στον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* και άλλα είδη του γένους *Saccharomyces*, καθώς είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο στην Οινική Βιομηχανία. Η μετατροπή του γλεύκους των σταφυλιών σε οίνο είναι ουσιαστικά μια μικροβιακή διαδικασία. Η αλκοολική ζύμωση, η μετατροπή των κυριότερων σακχάρων των σταφυλιών, της γλυκόζης και της φρουκτόζης σε αιθανόλη και διοξειδίο του άνθρακα διεξάγεται, κυρίως, από τις ζυμομύκητες αυτού του γένους. Ωστόσο, στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, συμμετέχει και πλήθος μικροοργανισμών non-*Saccharomyces*, όπως προαναφέρθηκε, οι οποίοι συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στα χαρακτηριστικά του οίνου. (Fernandez et al., 2000). Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται μία αυξανόμενη ζήτηση για νέα και βελτιωμένα στελέχη μικροοργανισμών τα οποία να μπορούν να προσαρμοστούν στους διάφορους τύπους οίνου. (Pretorius, 2000)

Saccharomyces cerevisiae. Αποτελεί το 80% του πληθυσμού του γλεύκους σε ζύμωση. Αυξάνεται γρήγορα και έχει δυνατότητα να ζυμώσει μέχρι 12-14% vol (μέση ζυμωτική ικανότητα). Έχει μεγάλη ευαισθησία στην ακτιδιόνη. Μπορεί να μετατρέψει το θειώδη ανυδρίτη σε θειικά ιόντα, γεγονός που μπορεί να κάνει τη ζύμη επικίνδυνη. Δεν μπορεί να ζυμώσει τη γαλακτόζη και αυξάνει λίγο την πτητική οξύτητα .

***Hanseniaspora uvarum* και η ατελής της μορφή *Kloeckera apiculata*.**

Αποτελεί το 99% του αρχικού πληθυσμού των αυτόχθονων ζυμών σταφυλιού, αλλά έχει μικρή ικανότητα ζύμωσης 2-6%vol. και δημιουργεί αυξημένη πτητική οξύτητα και οξικό αιθυλεστέρα (Pretorius, 2000), και είναι ο λόγος που θεωρείται ιδιαίτερα ανεπιθύμητη. Είναι πολύ ευαίσθητη στο θειώδη ανυδρίτη και γι' αυτό παύει να δρα πολύ γρήγορα, ιδιαίτερα στους λευκούς οίνους, λόγω αυξημένης θείωσης, (Τσακίρης, 2017).

Metschnikowia pulcherrima. Υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό ως γηγενούς ζύμης επάνω στο σταφύλι. αλλά γρήγορα εξαφανίζεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Επιπλέον, κάποιες εκ των ζυμών που ανιχνεύονται στο γλεύκος, ίσως και στον οίνο με διαφορετικές ικανότητες ζύμωσης από καθόλου μέχρι μεγαλύτερη από τον *S.cerevisiae* που φέρνει εις πέρας τις περισσότερες αλκοολικές ζυμώσεις:

Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces bailli*, *Pichia etchellsii*, *Hansmula anomala*, *Debaryomyces phaffi*, *Saccharomyces ludwigii, ατελείς φρουκτόφιλοι μύκητες (fungi imperfect), όπως: ***Toryopsis stellata* ή *bacillaris*** ***Candida*, *Rhodotorula***, η οποία δεν έχει δυνατότητα παραγωγής αιθανόλης και το στέλεχος ***Saccharomyces bayanus (oviformis)*** με δυνατότητα ζύμωσης μέχρι 18%vol. Αυτή η ζύμη συνεχίζει τη ζύμωση μετά το στέλεχος *cerevisiae*. Το 50% των αναζυμώσεων οφείλεται σε αυτήν και επιπλέον είναι ανθεκτική στο θειώδη ανυδρίτη.

Οι άγριες ζύμες είναι ικανές για αερόβια και αναερόβια ανάπτυξη και μπορεί να επιμείνουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αυτές οι ζύμες ανταγωνίζονται με τον *Saccharomyces* για θρεπτικά συστατικά και μπορεί να **παράγουν εστέρες λιπαρών οξέων και άλλες ενώσεις που επηρεάζουν το αρωματικό μπουκέτο της ζύμωσης του οίνου**. Πολύ λίγες από αυτές είναι ανθεκτικές σε υψηλά επίπεδα αιθανόλης, όπως ο *Saccharomyces*, και συνεπώς είναι γενικά μη ανιχνεύσιμες μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Η ανθεκτικότητα αυτών των non-*Saccharomyces* άγριων ζυμών κατά τη διάρκεια μιας ζύμωσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία ζύμωσης, η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, η αντοχή εμβολιασμού του *Saccharomyces*, η χρήση και τα επίπεδα διοξειδίου του θείου και ο αριθμός και τα είδη των οργανισμών που υπάρχουν στα σταφύλια εξαρχής.

Αν και τα είδη *Saccharomyces* δεν απαντώνται σε μεγάλο βαθμό στα σταφύλια, ωστόσο, ο σακχαρομύκητας αυτός είναι τόσο καλά προσαρμοσμένος στο γλεύκος ως μέσο ανάπτυξης, ώστε να κυριαρχεί άμεσα στις ζυμώσεις του γλεύκους, συνιστώντας ουσιαστικά μια καθαρή καλλιέργεια μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Εκτός της ικανότητας να διεξάγουν πλήρη ζύμωση του γλεύκους ή άλλου μέσου υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα, παρέχουν, επιπλέον, στο **ζυμωμένο προϊόν ευχάριστες, ποιοτικές γεύσεις και οσμές αποδεκτές**. Ο *Saccharomyces* μπορεί επίσης να βρεθεί περιστασιακά σε αμπελώνες, όπου είναι κοινή πρακτική η απόρριψη αποβλήτων ως λίπασμα, όπως στέμφυλα και οινολάσπες από οινοποιεία, διαφορετικά είναι πολύ δύσκολο να βρεθεί και να απομονωθεί από τις επιφάνειες των σταφυλιών. (Τσακίρης 2017, Boulton, 2018)

Στη μικροχλωρίδα των σταφυλιών μπορούν να συμπεριληφθούν και άλλα είδη που δημιουργούν και αλλοιώσεις: *Brettanomyces*, *Dekkera* και *Zygosaccharomyces*. Οι ζύμες επιμόλυνσης, όπως ο *Brettanomyces*, συχνά βρίσκουν το δρόμο τους στο οινοποιείο με την παραλαβή των σταφυλιών και, αν και είναι αρχικά σε μικρό αριθμό, καταφέρνουν να εγκαθίστανται σε αυτό. Τέλος, σε γενικές γραμμές, ο πληθυσμός της μούχλας είναι αρκετά υψηλός. Τα κύρια γένη που

βρέθηκαν είναι: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* και *Mucor* (Amerine et al., 1980). Ο πληθυσμός αερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων μπορεί επίσης να είναι υψηλός στα κατεστραμμένα σταφύλια κατά τη συγκομιδή. **Τα κυριότερα προκαρυωτικά γένη που υπάρχουν είναι οι βάκιλλοι, τα γαλακτικά και τα βακτήρια του οξικού οξέος, και βρίσκονται σε πολύ μικρότερους αριθμούς σε υγρή φρούτα από ότι οι ευκαρυωτικές άγριες ζύμες.** Η μούχλα και τα αερόβια βακτήρια αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν κάτω από τις αναερόβιες συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης και δεν παραμένουν στις ζυμώσεις γλεύκους. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι μια ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία μικροοργανισμών που απαντώνται στους οίνους. Είναι υπεύθυνοι για τη «μηλογαλακτική ζύμωση», η οποία αφορά τη μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό. (Τσακίρης 2017)

Είναι επίσης σημαντικό, να επισημανθεί, ότι σε πολλές περιοχές της Ευρώπης, τα απορρίματα των οινοποιείων, χρησιμοποιούνται για τη γονιμοποίηση του αμπελώνα. Μετά από αρκετά χρόνια μιας τέτοιας πρακτικής, αυτή η επεξεργασία μπορεί να αποτελέσει εμβολιασμό του αμπελώνα με ζύμη του οινοποιείου, η οποία θα επηρεάσει σαφώς τη χλωρίδα στους καρπούς κατά την επερχόμενη συγκομιδή σταφυλιών (Κοτσερίδης, Πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2018).

1.4.7.1 Η ΚΥΡΙΑΡΧΙΑ ΤΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ

Οι ζύμες *Saccharomyces* είναι μονοκύτταροι οργανισμοί με σφαιρικό έως και ελλειψοειδές σχήμα. Το γένος *Saccharomyces* αντιπροσωπεύει έναν αριθμό 16 ειδών. Πολλές παράμετροι φυσιολογίας επιτρέπουν στον ζυμομύκητα *Saccharomyces* να κυριαρχεί στις ζυμώσεις του γλεύκους. Η ταχεία παραγωγή υψηλού επιπέδου ενός τελικού τοξικού προϊόντος είναι μια στρατηγική που εξασφαλίζει την κυριαρχία στο μέσο ζύμωσης. **Η αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης είναι το κύριο χαρακτηριστικό αυτής της ζύμης που επιτρέπει την επιβίωσή της.** Ο *Saccharomyces* παράγει αιθανόλη ως κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης των σακχάρων των σταφυλιών. Οι άγριες non-*Saccharomyces* ζύμες και άλλη χλωρίδα των σταφυλιών δεν είναι το ίδιο ανθεκτικές στην αιθανόλη, αν και μερικές είναι ικανές να την παράγουν οι ίδιες σε μεγάλες ποσότητες. Οι κοινές ζύμες αλλοίωσης του οίνου, *Brettanomyces* και *Zygosaccharomyces*, είναι τόσο ανθεκτικές στην αιθανόλη όσο και το είδος *Saccharomyces*.

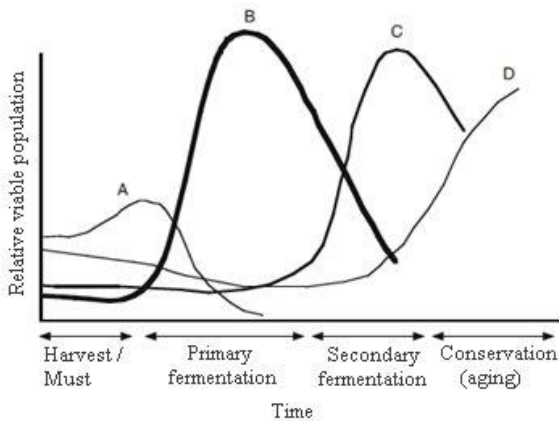
Μια δεύτερη παράμετρος που επίσης δίνει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στο είδος *Saccharomyces*, είναι η **ανοχή σε υψηλότερες θερμοκρασίες από πολλές άλλες ζύμες.** Η αναερόβια ζύμωση είναι κάπως αναποτελεσματική, δημιουργώντας ενέργεια αποβλήτων με τη μορφή θερμότητας. Κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων, τα στελέχη του *Saccharomyces* του οίνου μπορούν να διατηρήσουν τη βιωσιμότητά τους και να συνεχίσουν να ζυμώνουν σε θερμοκρασίες που προσεγγίζουν τους 38° C, ενώ το μεγαλύτερο μέρος της άγριας χλωρίδας αναστελλεται σε θερμοκρασίες άνω των 25° C. Η παραγωγή θερμότητας ως τελικό προϊόν και η ικανότητα επιβίωσης σε υψηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να δίνουν επιλεγμένα χαρακτηριστικά στον *Saccharomyces* που συμβάλλουν στην κυριαρχία των ζυμώσεων. (Boulton, 2018)

Ο επιτυχημένος ανταγωνισμός για τον περιορισμό των θρεπτικών ουσιών είναι επίσης ένας παράγοντας που συμβάλλει στην κυριαρχία ενός είδους ή γένους έναντι άλλου σε μικτή μικροβιακή ζύμωση (Kunkee & Bisson, 1993). Πολλές μελέτες έχουν γίνει σχετικά με τη χρήση και πρόσληψη θρεπτικών ουσιών στα είδη *Saccharomyces*, αλλά έχει πραγματοποιηθεί πολύ μικρή συγκριτική ανάλυση με άλλες χλωρίδες. Η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά του γλεύκους μπορεί να ποικίλλει ευρέως ως συνάρτηση πολλών μεταβλητών, όπως η ποικιλία των σταφυλιών, η καλλιεργούμενη περιοχή και οι κλιματικές επιπτώσεις, ο θρεπτικός πλούτος του εδάφους και οι πρακτικές γονιμοποίησης του αμπελώνα. Το θρεπτικό περιεχόμενο ενός χυμού σταφυλιών επηρεάζει τον αριθμό και τα είδη των οργανισμών που μπορούν να πολλαπλασιαστούν. Ο διακριτός χαρακτήρας λόγω περιοχής πιθανότατα συνδέεται με αμπελουργικές και κλιματολογικές εκτιμήσεις, παρά με το κυρίαρχο στέλεχος ζυμομυκήτων, το οποίο κατά πάσα πιθανότητα θα εμβολιασθεί στο οινοποιείο αντί να συνδέεται με τον αμπελώνα (Boulton et al, 2018). Οι σχετικές θρεπτικές αδυναμίες του γλεύκους μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της συμβολής ή της επίπτωσης της άγριας χλωρίδας στη γέυση και στο άρωμα του οίνου.

1.4.7.2 ΑΥΘΟΡΜΗΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΓΛΕΥΚΟΥΣ

Η ζύμωση αρχίζει αυτόματα μετά από μια ημέρα περίπου από την ώρα εκπύεσως των σταφυλιών με την παρέμβαση της μικροχλωρίδας των σταφυλιών. Αν δεν έχει πραγματοποιηθεί θείωση, τότε κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης εμφανίζονται οι άγριες ζύμες που εντοπίζονται στο φλοιό των σταφυλιών (Renouf et al., 2005, 2007) και επικρατούν, κυριαρχώντας έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών. Δεδομένου ότι οι περισσότερες άγριες γηγενείς ζύμες, είναι ευαίσθητες στα υψηλά ποσοστά αιθανόλης, σε συγκεντρώσεις αιθανόλης μεγαλύτερες από 6-8%, (Fleet et al. 1984), αρχίζουν να εξαφανίζονται και τη σκυτάλη της ζύμωσης παίρνουν υπερισχύοντας οι γηγενείς σακχαρομυκήτες του γλεύκους. Στα μετέπειτα στάδια μέχρι και την αποζύμωση υπάρχουν στο γλεύκος διάφορα είδη του γένους *Saccharomyces* (κυρίως *S. Cerevisiae*).

Σε νότιες περιοχές εμφανίζονται ως οι επικρατούσες άγριες ζύμες, το είδος *Kloeckera apiculata* και το είδος *Hanseniaspora guilliermondii*, οι οποίες είναι ζύμες λεμονοειδείς σποριογόνες (Castelli, 1954). Οι λεμονοειδείς ζύμες αντέχουν σε περιβάλλον με αλκοόλη συνήθως 4-8. Μετά τον παραγκωνισμό τους από τη συσσώρευση της αιθανόλης επικρατεί το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, όπως προαναφέρθηκε, το οποίο σπανίως παρεμποδίζεται στη δράση του με αλκοόλη 10°, ενώ αντέχει και μέχρι τους 20° (ορισμένα στελέχη). Άλλα είδη του γένους *Saccharomyces* που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (*S. bayanus*, *S. chevalieri*, *S. oviformis* κ.ά.) έχουν ενσωματωθεί στο είδος *Saccharomyces cerevisiae* στις τελευταίες κλειδές ταξινόμησης των ζυμών. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, το είδος *S. cerevisiae* (με την ευρύτερη έννοια) μπορεί να αντικατασταθεί στην αποζύμωση των οίνων με τα είδη *Torulaspora rosei*, *Zygosaccharomyces pombe*, *Schizosaccharomyces japonicas* κ.ά. (Μπαλατσαούρας, 2006)



Εικόνα 20. Διάγραμμα συσχέτισης πληθυσμού μικροοργανισμών και ζυμώσεων στον οίνο, απ'τη στιγμή του τρύγου μέχρι την παλαίωση (Μικροβιακή οικολογία γλεύκους και οίνου). Η κινητική της ζύμωσης εξαρτάται από την καμπύλη ανάπτυξης και είναι βέλτιστη για περίπου 10 ημέρες, ενώ η ζύμωση διαρκεί αρκετές εβδομάδες. Η ανάπτυξη της ζύμης δε σταματά λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών.

A: non-Saccharomyces (αν η θερμοκρασία αυξηθεί, ο πληθυσμός δε μειώνεται)

B: *Saccharomyces* (ζύμες που διεξάγουν την ΑΖ)

C: *Oenococcus oeni* (βακτήρια ΜΓΖ)

D: αλλοιογόνα βακτήρια και ζύμες που υπάρχει το ενδεχόμενο να αναπτυχθούν, ανάλογα με τις συνθήκες

1.4.7.3 ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΥΤΟΜΑΤΗ ΣΤΗΝ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΓΛΕΥΚΟΥΣ

Η αυτόματη ζύμωση του οινογλεύκου ήταν γνωστή από αρχαιότατων χρόνων, γνωρίζοντας τη διαδικασία της συμπίεσης και του αποτελέσματος, αλλά αγνοώντας παντελώς το αίτιο της ζύμωσης, τις ζύμες.

Η οινοποιία οδηγήθηκε σταδιακά στην ελεγχόμενη ζύμωση του οινογλεύκου, λόγω του ότι η **αυτόματη δεν ήταν πάντα επιτυχής και το χειρότερο δεν έδινε πάντοτε οίνο καλής ποιότητας**. Σε μια ελεγχόμενη ζύμωση, προκειμένου να διατηρηθεί ο μικροβιολογικός έλεγχος (επαρκής πληθυσμός) και να αποφευχθεί μια κολλημένη ή αργή ζύμωση, με ταυτόχρονη αλλοίωση των χαρακτηριστικών των οίνων, στην ευρεία οινοποίηση χρησιμοποιούνται **εμβόλια-εκκινητών, ώστε να επιτευχθούν επαναλήψιμα αποτελέσματα**. Αρχικά, με τη χρήση του **θειώδους ανυδρίτη και στη συνέχεια με τη χρήση επιλεγμένων ζυμών**, κατά κύριο λόγο του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. **Επίλεκτη είναι μια ζύμη, η οποία διαθέτει τα γνωστά και προγραμματισμένα χαρακτηριστικά για την επίτευξη ενός κατ' αρχήν προσδιορισμένου αποτελέσματος**. Ειδικά στην οινοποιία, ζύμες, οι οποίες ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* ή και το είδος *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιούνται στην κύρια ζύμωση, αλλά και δευτερεύουσα παραγωγή τσουχτερών στη γεύση, αλλά και αφρώδων οίνων. Όμως, μπορούν να θεωρηθούν μειονεκτικές, επειδή ζυμώνουν με πολύ βραδύ ρυθμό το γλεύκος που περιέχει αυξημένα κατάλοιπα φυτοφαρμάκων, αυξημένη ποσότητα θειώδους οξέος, παράγουν αυξημένες ποσότητες οξικού οξέος, σχηματίζουν αυξημένο και επίμονο αφρό κλπ, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν κατευθείαν και δυσμενώς την ποιότητα του παραγόμενου οίνου. Οι **επίλεκτες ζύμες που χρησιμοποιούνται στην κατευθυνόμενη ζύμωση του οινογλεύκου, αναζητούνται κυρίως στο χώρο του είδους *Saccharomyces cerevisiae* και στις φυσιολογικές του φυλές με κύρια χαρακτηριστικά την υψηλή ζυμωτική ενεργότητα, την αυξημένη αντοχή στο θειώδες οξύ, την ανύπαρκτη παραγωγή αφρού, τη μειωμένη παραγωγή δευτερευόντων προϊόντων κατά τη ζύμωση κλπ.** (Μπαλατσαούρας, 2016)

Η συνεισφορά πλήθους ζυμομυκήτων που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* στην αλκοολική ζύμωση είναι ένα θέμα που εξετάζεται από τη σύγχρονη οινολογία και προκαλεί εκτενείς διενέξεις. Οι ζυμομύκητες αυτοί υπάρχουν αρχικά σε όλες τις ζυμώσεις των οίνων, είναι μεταβολικά ενεργοί και τα προϊόντα τους επηρεάζουν την ποιότητα του οίνου. Παρότι κάποιες φορές θεωρούνται μικροβιακή προσβολή, υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις για το αντίθετο και έτσι θεωρείται πως έχουν θετικό αντίκτυπο στους οίνους. (Jolly et al., 2006). Επίσης, οι μικροοργανισμοί των άλλων γενών **θεωρούνταν πως παράγουν μικρές ποσότητες αιθανόλης και έχουν μικρή ανθεκτικότητα στα υψηλά ποσοστά αυτής**. Πλέον οι θεωρίες αυτές έχουν διαψευστεί καθώς υπάρχουν αρκετά στελέχη μικροοργανισμών, που επιβιώνουν σε προχωρημένα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Είναι λοιπόν προφανές, πως η μελέτη των γενών αυτών όσον αφορά τη συμμετοχή τους στην αλκοολική ζύμωση καθίσταται απαραίτητη, καθώς ενδέχεται να δώσει αποτελέσματα που θα οδηγήσουν σε **χρήση τους από την οινική βιομηχανία**. (Ciani & Maccarelli, 1997).

Ένας ακόμα λόγος για τον οποίο καθίσταται σημαντική η μελέτη των **άγριων ζυμών, είναι η ενζυμική τους δραστηριότητα**. Στις ζύμες αυτές έχουν βρεθεί **ένζυμα, όπως είναι οι πηκτινάσες, οι πρωτεάσες και οι πολυγαλακτουρονάσες, που επηρεάζουν τον οίνο καθώς συμμετέχουν σε διεργασίες που αφορούν κυρίως την παραγωγή αρωματικών ουσιών**. Ακόμα τα ένζυμα αυτά διασπούν τις πρωτεΐνες που προκαλούν θολερότητα κι έτσι **συμμετέχουν τόσο τη διαύγηση όσο και στην πρωτεϊνική σταθεροποίηση του οίνου**. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να διαπιστωθεί η δυνατότητα της εξωκυτταρικής παραγωγής των ενζύμων αυτών από τις άγριες ζύμες. (Fernandez M. et al., 2000).

Μία ακόμα τάση που έχει δημιουργηθεί και μελετάται τα τελευταία χρόνια, είναι η ζύμωση από ελεγχόμενη κοινή καλλιέργεια άγριας ζύμης και σακχαρομύκητα. Με τον τρόπο αυτό είναι εκμεταλλεύσιμη η διαδικασία της αυθόρμητης έναρξης της ζύμωσης, ενώ παράλληλα αποφεύγεται ο κίνδυνος παρακώλυσης της ζύμωσης. (Ciani et al., 2009). **Άλλωστε, επειδή το φυσικό υπόστρωμα της αλκοολικής ζύμωσης δεν είναι αποστειρωμένο, η διεργασία χωρίς την ανθρώπινη παρέμβαση ξεκινά από ζύμες του φυτού και μετά από τρεις με τέσσερις μέρες αντικαθίστανται από τον *Saccharomyces cerevisiae***.

1.4.8 ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΖΥΜΩΣΗ

Ζύμωση με τη στενή έννοια της λέξης (*sensu stricto*) είναι η διεργασία μετατροπής ορισμένων πρώτων υλών, με την παρέμβαση πάντοτε μικροοργανισμών, υπό συνθήκες πρακτικώς αναερόβιες, προς προϊόντα περισσότερο χρήσιμα για τον άνθρωπο σε σχέση με το υλικό εκκίνησης. Σύμφωνα με το βιοχημικό ορισμό, η ζύμωση είναι η ζωή εν απουσία αέρα (*fermentation c'est la vie sans air*), ορισμός δοθείς από το Pasteur, 1860, αν και πλέον στη βιβλιογραφία, ο όρος δε χρησιμοποιείται μόνο με τη στενή αρχική έννοια. Στη σύγχρονη πρακτική, οι διεργασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα είναι κατά κύριο λόγο αναερόβιες. «Βιομηχανική Ζύμωση» αναφέρεται στη διεργασία κατά την οποία προϊόντα παράγονται από γεωργικές ή βιομηχανικές πρώτες ύλες και υπό-ή παρά- προϊόντα, με την ανάπτυξη σε αυτά ζώντων μικροοργανισμών (Αγγελής, 2007).

Αρχικά, όλες οι οινοποιήσεις λάμβαναν χώρα με την αξιοποίηση της φυσικής μικροχλωρίδας των σταφυλιών (αυθόρμητη ζύμωση) και δεν γινόταν κανένας σκόπιμος εμβολιασμός για να ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης (ελεγχόμενη ζύμωση) (Pretorius, 2000). **Μια φυσική ζύμωση είναι εκείνη στην οποία δεν προστίθεται σκόπιμα ζύμες εκκίνησης (εισαγωγή εσκεμμένη κατά τη διάρκεια των οινοποιητικών διαδικασιών)**. Οι φυσικές ζυμώσεις απουσία διοξειδίου του θείου μπορούν να επιτρέψουν να διατηρηθεί η χλωρίδα της άγριας ζύμης και ενδεχομένως να συμβάλλουν στον συνολικό αρωματικό και γευστικό χαρακτήρα του οίνου, αν και δεν είναι προβλέψιμος ο αντίκτυπος. Είτε συμβάλλοντας στην πολυπλοκότητα του οίνου, είτε μειώνοντας την ποιότητά του (ενδεχόμενη παραγωγή δυσάρεστων γεύσεων και αρωμάτων από άγριες ζύμες ή βακτήρια και απρόβλεπτη έναρξη και διάρκεια ζύμωσης), ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών, τον τύπο του οίνου και την πραγματική χλωρίδα που υπάρχει κατά τη ζύμωση. Η αυθόρμητη ζύμωση πραγματοποιείται από τους μικροοργανισμούς που απαντώνται στα σταφύλια, όπως ζύμες, μύκητες, οξικά και οξυγαλακτικά βακτήρια όπως επίσης, και στις επιφάνειες των δεξαμενών οινοποίησης. Καθώς η ζύμωση εξελίσσεται παρατηρείται η κατανάλωση των θρεπτικών στοιχείων και η αύξηση της συγκέντρωσης της αλκοόλης, εμποδίζοντας την ανάπτυξη των μη ανθεκτικών σε αλκοόλη μικροοργανισμών. **Οι αυθόρμητες οινοποιήσεις παρουσιάζουν μειονεκτήματα, τα οποία συνίστανται κυρίως στα παρακάτω: α) στην έλλειψη ποιοτικής σταθερότητας των αποτελεσμάτων από χρονιά σε χρονιά, β) στην παρατεταμένη διάρκεια της οινοποίησης ή στην πρόωρη παύση της ζύμωσης και γ) στη συχνή εκτροπή της οινοποίησης προς παραγωγή οίνων με δυσάρεστες γεύσεις και οσμές λόγω της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών** (Fleet, 2008, Boulton et al, 2018).

Μια σημαντική ανακάλυψη έγινε το 1880 όταν ο Hansen, εργαζόμενος στη Ζυθοποιία Carlsberg στη Δανία, εισήγαγε την τεχνική της απομόνωσης καθαρών καλλιέργειών και το 1890, ο Muller-Thurgau εισήγαγε την έννοια του εμβολιασμού των ζυμώσεων του οίνου με καθαρές καλλιέργειες ζυμομύκητα (Pretorius, 2000). Το 1965 παρήχθησαν τα

δύο πρώτα εμπορικά στελέχη ζύμης από ένα μεγάλο οινοποιείο στην Καλιφόρνια (Fleet and Heard, 1993). Αυτά τα δύο στελέχη, «Montrachet» και «Pasteur Champagne», προσφέρθηκαν παγκοσμίως ως ζύμες γενικής χρήσης. Ο εμβολιασμός επιλεγμένων καθαρών καλλιιεργειών ζύμης στο γλεύκος είναι σήμερα μια κοινή οινολογική πρακτική που καθιερώθηκε από τη δεκαετία του '70 με σκοπό την **παραγωγή οίνου με επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την εγγύηση της ομοιογένειας των διαδοχικών ετών** (Perez-Coello et al., 1999). Η χρήση μιας εναρκτήριας καλλιέργειας εξασφαλίζει ταχύτερη ανάληψη της ζύμωσης από την επιλεγμένη ζύμη (συνήθως *Saccharomyces*). Υπάρχει γενικά μια περίοδος καθυστέρησης ή χρόνος προσαρμογής που απαιτείται πριν από την ανάπτυξη των κυττάρων και τη ζύμωση, ακόμα και αν χρησιμοποιείται εμπορικό παρασκεύασμα, αφού οι εμπορικοί ζυμομύκητες αναπτύσσονται υπό αυστηρά αερόβιες και χαμηλές συνθήκες υποστρώματος. Αυτές οι συνθήκες ανάπτυξης υψηλής έκθεσης οξυγόνου εξασφαλίζουν επίσης ότι η εναρκτήρια ζύμη περιέχει άφθονη ποσότητα παραγόντων επιβίωσης, στερόλες και ακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι απαραίτητα για ανοχή στην αιθανόλη. Οι λεγόμενες φυσικές ζυμώσεις ή ζυμώσεις άγριων ζυμών διεξάγονται πάντα από στελέχη του *Saccharomyces*, ο οποίος επικρατεί. **Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι ο εμβολιασμός με επιλεγμένα στελέχη αναπτύσσεται ως πρακτική παγκοσμίως.** Η πρακτική της χρήσης χυμού από μια εν ζυμώσει δεξαμενή για τον εμβολιασμό της επόμενης οδηγεί σε ταχεία έναρξη της ζύμωσης, καθώς οι ζύμες προστίθενται στο γλεύκος σε μεγάλους πληθυσμούς. Ωστόσο, έχει το μειονέκτημα ότι εισάγεται ένα εμβόλιο με μειωμένα θρεπτικά συστατικά εάν το πρώτο γλεύκος είναι ανεπαρκές σε θρεπτικά. Εξαλείφει επίσης τα κύτταρα των παραγόντων επιβίωσης και μπορεί να προωθήσει την εξάπλωση των οργανισμών αλλοίωσης, αν καθιερωθούν στο γλεύκος που χρησιμοποιείται για εμβολιασμό. **Γενικά, ένα εμβόλιο 2-5% (v/v) χρησιμοποιείται από εν ζυμώσει γλεύκος σε 12-15 Brix.** Τα είδη *Saccharomyces* κυριαρχούν εύκολα στις ζυμώσεις των γλευκών, ακόμη και όταν έχουν ξεπεράσει σημαντικά τα πρώτα στάδια ζύμωσης. Τα τελευταία 30 έτη, τα στελέχη του *S. cerevisiae* έχουν επιλεγεί για τις οινολογικές τους ιδιότητες και χρησιμοποιούνται ως εκκινητές στις διαδικασίες οινοποίησης (Perez-Coello et al., 1999). Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούνται από τις οινοποιητικές μονάδες σε μια συγκέντρωση της τάξης του 10^7 κύτταρα/ml, με αποτέλεσμα να υπερσχύουν της τοπικής χλωρίδας. **Επομένως, οι οίνοι χάνουν τον παραδοσιακό τους χαρακτήρα και μετατρέπονται σε κρασιά ευρείας κατανάλωσης, με παρόμοια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.** Για τους λόγους αυτούς, οι οινοποιοί που αναζητούν αυθεντικές γεύσεις προτιμούν αυθόρμητη ζύμωση με ιθαγενείς ζύμες. Για τους ίδιους λόγους πολλοί ερευνητές έχουν προτείνει τη διαδοχική χρήση γηγενών στελεχών ως καλλιιεργειών εκκίνησης με σκοπό την παραγωγή οίνων που θα έχουν διακριτούς τοπικούς χαρακτήρες, οι οποίοι θα αντανάκλουν τη βιοποικιλότητα της περιοχής από την οποία προέρχονται (Zironi et al., 1993, 2008, Clemente-Jimenez et al., 2005). Οι συνθήκες ζύμωσης είναι αντίξοες και για το λόγο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζύμες επιλεγμένες που να συγκεντρώνουν τα σπουδαιότερα κατά προτεραιότητα τεχνολογικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, η μεγάλη αλκοολογόνο ικανότητα (αν και τα τελευταία χρόνια, έχει αλλάξει η τάση για οίνους υψηλών αλκοολικών βαθμών), χάρις στην οποία μπορεί να συντομευθεί η ζύμωση στους 15-18° C. Τα ίδια ζυμώνουν έντονα και στους 25-28° C. Η ζυμωτική δύναμη πρέπει να είναι υψηλής στάθμης. Μόνο τότε μπορούν να αποζυμωθούν τα σάκχαρα σε χαμηλή θερμοκρασία. Το χαρακτηριστικό αυτό συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Επιπλέον, η αντοχή στο θειώδη ανυδρίτη, διότι η ζύμωση ολοκληρώνεται παρουσία αυτού του συντηρητικού. Επιπροσθέτως, η ανάπτυξη υπό μορφή μεμονομένων κυττάρων, γιατί τα στελέχη μορφής συσσωματωμάτων δε δίνουν ζωηρή ζύμωση. Σημαντικό, επίσης, χαρακτηριστικό είναι η μη σύνθεση υδροθείου, παρά το ότι τα στελέχη αυτά παράγουν θειώδες οξύ σε βάρος θειικών αλάτων. Τέλος, η μη αυτόλυση των κυττάρων της ζύμης (δύσκολη σε χαμηλή θερμοκρασία). Η ταυτοποίηση ενός καλού στελέχους του οίνου έχει τα παραπάνω χαρακτηριστικά.

1.4.8.1 ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗ ΖΥΜΗ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Το οινογλεύκος ως υπόστρωμα ανάπτυξης μικροβίων παρουσιάζει ανισορροπία, επειδή είναι πλούσιο σε σάκχαρα (υδατάνθρακες) και σχετικά πτωχό σε άλλα συστατικά και κυρίως σε αζωτούχες ουσίες. Περιέχει ακόμα ξένες ουσίες που προστίθενται εσκεμμένα ή όχι, πολλές εκ των οποίων παρεμποδίζουν την ομαλή πορεία της ζύμωσης, την οποία **ιδιαίτερα επηρεάζουν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες.** Γι' αυτό η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης συχνά προχωρεί με βραδύτητα ή διακόπτεται πλήρως. Το οινογλεύκος πριν εμβολιασθεί με την επιλεγμένη ζύμη δε μπορεί να παστεριωθεί. Έτσι είναι φορέας της εγγενούς μικροχλωρίδας, τις λεγόμενες άγριες ζύμες. Για την παρεμπόδιση αυτών των ζυμών (μπλοκάρισμα) χρησιμοποιείται το θειώδες οξύ (SO₂) στο οποίο τα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* (και τέτοια είναι όσα απαρτίζουν τις επιλεγμένες ζύμες της οινοποιίας) εμφανίζουν μικρότερη ευαισθησία. Τα είδη του *Schizosaccharomyces* μπορούν επίσης να ζυμώσουν επιτυχώς το γλεύκος και σε ειδικές περιπτώσεις έχουν προταθεί ως υποκατάστατη ζύμη οίνου για τον *Saccharomyces*, αν και δεν δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα οργανοληπτικά. Γενικά όμως, για να είναι επιτυχής η ελεγχόμενη ζύμωση του οινογλεύκου με επιλεγμένη ζύμη, θα πρέπει το στέλεχος της ζύμης να επικρατήσει σε πληθυσμό έναντι των άγριων από τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Για να γίνει

η προσέγγιση του επιθυμητού στόχου με τη χρήση επιλεγμένης ζύμης θα πρέπει να **εμβολιασθεί το οινογλεύκος με άφθονα, ζωντανά και μεγάλης ενεργότητας κύτταρα (στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους)**. (Μπαλατσαούρας, 2006).

Η συνεισφορά πλήθους ζυμομυκήτων που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* στην αλκοολική ζύμωση είναι ένα θέμα που εξετάζεται από τη σύγχρονη οινολογία και προκαλεί εκτενείς διενέξεις. Οι ζυμομυκήτες αυτοί υπάρχουν αρχικά σε όλες τις ζυμώσεις των οίνων, είναι μεταβολικά ενεργοί και τα προϊόντα τους επηρεάζουν την ποιότητα του οίνου. Παρότι κάποιες φορές θεωρούνται μικροβιακή προσβολή, υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις για το αντίθετο και έτσι θεωρείται πως έχουν θετικό αντίκτυπο στους οίνους. (Jolly et al., 2006, 2014). Επίσης, οι μικροοργανισμοί των άλλων γενών θεωρούνταν πως παράγουν μικρές ποσότητες αιθανόλης και έχουν μικρή ανθεκτικότητα στα υψηλά ποσοστά αυτής. Πλέον οι θεωρίες αυτές έχουν διαψευστεί καθώς υπάρχουν αρκετά στελέχη μικροοργανισμών, που επιβιώνουν σε προχωρημένα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Είναι λοιπόν προφανές, πως η μελέτη των γενών αυτών όσον αφορά τη συμμετοχή τους στην αλκοολική ζύμωση καθίσταται απαραίτητη, καθώς ενδέχεται να δώσει αποτελέσματα που θα οδηγήσουν σε χρήση τους από την οινική βιομηχανία. (Ciani & Maccarelli, 1997). Ένας ακόμα σημαντικός λόγος για τον οποίο καθίσταται σημαντική η μελέτη των άγριων ζυμών, είναι η ενζυμική τους δραστηριότητα. Στις ζύμες αυτές έχουν βρεθεί ένζυμα όπως είναι οι πηκτινάσες, οι πρωτεάσες και οι πολυγαλακτουρονάσες, που επηρεάζουν την ποιότητα του οίνου αρωματικά, καθώς συμμετέχουν σε διεργασίες που αφορούν κυρίως την παραγωγή αρωματικών ουσιών. Ακόμα τα ένζυμα αυτά διασπούν τις πρωτεΐνες που προκαλούν θολερότητα κι έτσι συμμετέχουν τόσο τη διαύγαση όσο και στην πρωτεϊνική σταθεροποίηση του οίνου. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να διαπιστωθεί η δυνατότητα της εξοκτυταρικής παραγωγής των ενζύμων αυτών από τις άγριες ζύμες. (Fernandez M. et al., 2000, 2003).

Μία ακόμα τάση που έχει δημιουργηθεί και μελετάται την τελευταία δεκαετία, είναι η ζύμωση από ελεγχόμενη κοινή καλλιέργεια άγριας ζύμης και σακχαρομύκητα. Με τον τρόπο αυτό είναι εκμεταλλεύσιμη η διαδικασία της αυθόρμητης έναρξης της ζύμωσης ενώ παράλληλα αποφεύγεται ο κίνδυνος παρακώλυσης της ζύμωσης. (Ciani et al., 2009, 2011, 2016, 2019, 2020). Άλλωστε, επειδή το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο λαμβάνει χώρα η αλκοολική ζύμωση δεν είναι αποστειρωμένο, η διεργασία χωρίς την ανθρώπινη παρέμβαση ξεκινά από γηγενείς ζύμες και μετά από 3 – 4 μέρες αντικαθίστανται από τον *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος είναι ικανός να ολοκληρώσει τη ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους, καθότι δεν παρουσιάζει ευαισθησία σε υψηλά επίπεδα αιθανόλης.

Τέλος, έξω από τον κύριο και βασικό ρόλο τους, την αλκοολική ζύμωση δηλαδή, μερικές ζύμες, παρουσιάζουν ένα άλλο ιδιαίτερο τεχνολογικό χαρακτηριστικό, καθώς γίνονται πρόξενοι φαινομένων που έχουν άμεση σχέση με τη μεταβολιστική τους δραστηριότητα (Κουράκου-Δραγώνα, 1976- 77) Τέτοια φαινόμενα είναι κυρίως η ζύμωση των θειωμένων γλευκών και η βιολογική μείωση της οξύτητας

Η μοριακή βιολογία σε συνδυασμό με την επιστήμη της οινολογίας πέτυχαν την παρασκευή επιλεγμένων καλλιεργείων για ένα μεγάλο αριθμό εφαρμογών, όπως είναι η αποικοδόμηση του μηλικού οξέος σε αιθυλική αλκοόλη (μηλοαλκοολική ζύμωση) (*Schizosaccharomyces pombe*), η παραγωγή αφρού και η παραγωγή συμπαγούς ιζήματος για τους οίνους Champagne και για τους αφρώδεις οίνους που παρασκευάζονται με τη μέθοδο της Καμπανίας και η ανάπτυξη κάποιων πρόδρομων ουσιών για την ενίσχυση ποικιλιακού αρώματος κ.ά. (Σουφλερός, 2015).

1.4.8.2 ΣΤΑΔΙΑ ΧΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗΣ ΖΥΜΗΣ ΣΕ ΟΙΝΟΠΟΙΕΙΟ

Η επιλεγμένη χρονοβόρα (20 ημέρες περίπου – προ της ενάρξεως του τρύγου) διαδικασία μπορεί να επιφέρει τροποποιήσεις και παρεκκλίσεις κατά περίπτωση. Πάντοτε όμως θα πρέπει το γλεύκος πριν τον εμβολιασμό να είναι παστεριωμένο ή επαρκώς θειωμένο, έτσι ώστε να μην αρχίσει η αυτόματη ζύμωση. Τα στάδια είναι τα ακόλουθα:

1. Εκκίνηση από καθαρή καλλιέργεια επιλεγμένου στελέχους που έχει αναπτυχθεί σε κεκλιμένη επιφάνεια και σε θρεπτικό υλικό PDA, malt extract agar, peptone-yeast extract-dextrose agar κλπ.
2. Εμβολιασμός ενός λίτρου παστεριωμένου οινογλεύκους με κύτταρα από το δοκιμαστικό σωλήνα. Επώαση στους 30° C για 2-3 ημέρες.
3. Μεταφορά του ενός λίτρου εναιωρήματος κυττάρων ζύμης σε 10-20 λίτρα παστεριωμένου οινογλεύκους, το οποίο θα είναι εμπλουτισμένο και με 100-150 ppm SO₂ (10-15g/hL). Ακολουθεί επώαση για 6 ημέρες και τότε θα έχουν εξασφαλισθεί 10-20 L εναιωρήματος κυττάρων από καθαρή καλλιέργεια ενός επιθυμητού στελέχους.
4. Μεταφορά των 10-20 L σε ένα ή δύο εκατόλιτρα παστεριωμένου και θειωμένου οινογλεύκους σε δεξαμενή που αφιείται για 2-3 ημέρες σε επώαση.
5. Μεταφορά σε οινογλεύκος 10 εκατόλιτρων ενδεχομένως παστεριωμένου, πάντοτε όμως θειωμένου με 100mg θειώδους ανά λίτρο (10g/hL). Η μεγάλη αυτή ποσότητα του εμβολιασμένου οινογλεύκους μετά από 2 έως 3 ημέρες είναι έτοιμη προς εμβολιασμό όλων των δεξαμενών σε ποσοστό όγκου 10%. Έχει υπολογισθεί ότι το γλεύκος σε πλήρη ζύμωση

περιέχει 100 εκατομμύρια κύτταρα/cm². Συνήθως οι δεξαμενές γεμίζονται μέχρι τη μέση και εμβολιάζονται με ενοφθάλμισμα 10% του τελικού όγκου, με φορτίο κυττάρων που μεταφέρονται με τον εμβολιασμό 10 εκατομμύρια/κυβικό εκατοστό και την επόμενη μέρα απογεμίζονται. Γενικά, αν η ημερήσια απόδοση του οινογλεύκου είναι 5000 εκατόλιτρα θα πρέπει η οινοβιομηχανία να έχει στη διάθεσή της 1000 εκατόλιτρα γλεύκου που έχει εμβολιασθεί πριν από 2-3 ημέρες (κύτταρα ηλικίας το πολύ 72 ωρών), διότι έτσι **τα κύτταρα της επιλεγμένης ζύμης βρίσκονται στη φάση της λογαριθμικής αύξησης και μπορούν στη νέα παρτίδα να παραγκωνίσουν την ανάπτυξη της εγγενούς ζυμογλωρίδας** (η οποία λόγω της θείωσης δεν έχει αναπτυχθεί επαρκώς, ώστε να έχει εισέλθει στην εκθετική της φάση) **και να μηδενίσουν πρακτικά την παρέμβαση της στη διαδικασία της ζύμωσης.**

1.4.8.2.1 ΕΝΑΡΚΤΗΡΙΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΝ

Μέχρι σήμερα, καμία οινολογική ζύμη για εμπορική χρήση δεν έχει όλα τα χαρακτηριστικά που παρατίθενται. Οι ζύμες ποικίλλουν ανάλογα με τις δυνατότητες οινοπαραγωγής τους. Αν και αυτό το φαινόμενο μπορεί να εξαρτάται από τις συνθήκες ζύμωσης που είναι ελάχιστα αναπαραγώγιμες. Η κύρια πηγή της ποικιλομορφίας μπορεί να αποδοθεί στη γενετική σύσταση των ζυμών οίνου (Pretorius, 2000). **Ο ρόλος του γένους ή του είδους των ζυμών, αλλά και του στελέχους στην παραγωγή του οίνου είναι γνωστός εδώ και αρκετά χρόνια. Ωστόσο, απασχολεί ιδιαίτερα τους οινολόγους από τότε που άρχισε να προβάλλεται επιτακτικά η τυποποίηση της ποιότητας του οίνου,** διότι διαφορές έγκεινται στη διαφορετική σύνθεση της φυσικής ζυμογλωρίδας. Είναι γνωστό ότι κατά την αλκοολική ζύμωση, εκτός από την αλκοόλη και το CO₂, παράγονται και αρκετά δευτερογενή πτητικά προϊόντα (ανώτερες αλκοόλες, ανώτεροι εστέρες, αλδεΐδες κλπ.), υπεύθυνα για το δευτερεύον άρωμα του οίνου. **Οι ποσότητες των αρωματικών αυτών συστατικών κυμαίνονται ανάλογα: με την πρώτη ύλη, το στέλεχος ή τα στελέχη ζυμών που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση, με τις συνθήκες (pH, Θ) πραγματοποίησης αυτής, με τις τεχνικές οινοποίησης κλπ.** Η δυνατότητα ασφαλούς διαφοροποίησης ή ταύτισης των στελεχών μεταξύ τους - με τη μελέτη του DNA των μιτοχονδρίων ή των χρωμοσώμων του κυττάρου - δημιούργησε τις προϋποθέσεις για την πλήρη αξιοποίηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών κάθε στελέχους και τη θεαματική εφαρμογή στο χώρο της οινολογίας της τεχνικής των επιλεγμένων καλλιιεργειών των μικροοργανισμών (ζύμες, βακτήρια). Επομένως, κρίνεται ως απαραίτητη προϋπόθεση, η συνειδητή επιλογή ενός συγκεκριμένου στελέχους ζύμης που θα αποτελέσει την αρχική καλλιέργεια εκκίνησης. Διακρίνονται δύο είδη επιλεγμένων καλλιιεργειών: **το στέλεχος μπορεί να διατίθεται στο εμπόριο σε ξηρή μορφή ή μπορεί να προέρχεται από μια συλλογή καλλιιεργειών και πρέπει να παρασκευασθεί ένα υγρό εμβόλιο και θα αναλυθούν παρακάτω** (Σουφλερός, 2015). Σε μεγάλη κλίμακα, η επιλεγμένη καλλιέργεια μπορεί να προστεθεί απευθείας στο γλεύκος. **Ωστόσο, ο τρόπος αυτός θεωρείται πολυδάπανος, διότι απαιτούνται μεγάλες ποσότητες.** Στην περίπτωση αυτή, η ενυδάτωση της καλλιέργειας -λίγο πριν τη χρησιμοποίηση της- με **σακχαρούχο διάλυμα θερμοκρασίας 37-43° C, για 10-15 min, θεωρείται καλύτερη επιλογή.** Ο εμβολιασμός με επιλεγμένες καλλιέργειες πρέπει να γίνεται μετά από αποδυνάμωση του «αυτόχθονα» πληθυσμού με: φυγοκέντρηση, διήθηση, μετάγγιση, προσθήκη SO₂, παστερίωση κτλ. Ο εμβολιασμός του οινογλεύκου με επιλεγμένη ζύμη γίνεται παρουσία στο ίδιο 50 έως 150mg SO₂/L (5-15g/hL) και λαμβάνει χώρα, είτε μέσω μιας αρχικής καλλιέργειας που αποτελεί μέρος μιας ενεργής ζύμωσης και με αυτόν τον τρόπο ο αριθμός κυττάρων που προστίθεται στο γλεύκος είναι υψηλός, είτε μέσω εμβολιασμού με επιλεγμένη (ενεργή) ξηρή ζύμη, έπειτα από ενυδάτωση. Μπορεί να πραγματοποιηθεί συνδυασμός επιλεγμένων άγριων ζυμών και σακχαρομύκητα σε διαδοχικό εμβολιασμό γλεύκου ή απλά ως εκκινητή ζύμωσης, ή με συνεμβολιασμό εκκίνησης (Παραμυθιώτης, πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2018). Επιλεγμένες καλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, επίσης, και για την επαναδραστηριοποίηση ζυμώσεων που έχουν διακοπεί. Σε τέτοιες περιπτώσεις, ο εμβολιασμός πρέπει να είναι ισχυρός και απαιτούνται 50 g ξηρής καλλιέργειας για 100 λίτρα γλεύκου «εν ζυμώσει».

A. ΕΝΕΡΓΗ ΞΗΡΗ ΖΥΜΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Οι ζύμες ονομάζονται ενεργές ξηρές, αν και περιέχουν έως και 9% υγρασία. Διατίθενται συνήθως στο εμπόριο ερμητικά σφραγισμένες υπό άζωτο. Όταν αποθηκεύονται σε ψύξη διατηρούν τη βιωσιμότητά τους για τουλάχιστον ένα έτος. Οικονομικότερος τρόπος χρησιμοποίησης επιλεγμένων ζυμών είναι προετοιμασία μιας καλλιέργειας εκκίνησης. Για το σκοπό αυτό 25-50 g ξηρής καλλιέργειας προστίθενται ανά 100 λίτρα γλεύκου. Όταν ζυμωθούν τα μισά περίπου σάκχαρα, η καλλιέργεια εκκίνησης χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό άλλων δεξαμενών σε αναλογία 5-10%. Οι τετοιου είδους καλλιέργειες πρέπει να ανανεώνονται κάθε εβδομάδα, για να αποφεύγονται επιμολύνσεις από ανεπιθύμητα στελέχη, και απαιτούν μεγαλύτερη επαγρύπνηση. Η συνιστώμενη δΟΣΟΛΟΓΙΑ, περίπου 0,1 – 0,2 g ξηρής ζύμης ανά λίτρο γλεύκου, θα δώσει μια αρχική συγκέντρωση περίπου 10⁶ κύτταρα/ml. Ο εμβολιασμός στο τελικό επίπεδο του πληθυσμού (10⁸ κύτταρα/ml) ελαχιστοποιεί τον πολλαπλασιασμό των ζυμομυκήτων, αυξάνει ελαφρώς την

απόδοση της αιθανόλης και μπορεί να δώσει μια αρωματική νότα ζύμης στον τελικό οίνο. (Σουφλερός 2015, Boulton et al, 2018)

B. ΥΓΡΟΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

Οι υγρές καλλιέργειες προέρχονται από επιλεγμένες αποικίες, που φυλάσσονται στο εργαστήριο σε στερεό υπόστρωμα (άγαρ) και σε θερμοκρασία 0°C ή -80°C ή -180°C (υγρό N₂). Πολλαπλασιάζονται σε θρεπτικά υποστρώματα, λίγο πριν τη χρήση τους. Από την άλλη πλευρά, η παραγωγή των ξηρών ενεργών καλλιιεργειών περιλαμβάνει τα εξής στάδια: Πολλαπλασιασμός, φυγοκέντρωση, διήθηση, μορφοποίηση, αποξήρανση και αποθήκευση. Οποιοσδήποτε τύπος αρχικής καλλιέργειας χρησιμοποιείται, η ποσότητα θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη, ώστε να εξασφαλίζει ότι η ζύμωση γίνεται και ολοκληρώνεται από το εμβολιασμένο στέλεχος, το οποίο αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του συνολικού πληθυσμού ζυμομυκήτων στο τέλος της ζύμωσης (Petering et al. 1991). Οι καλλιέργειες εκκίνησης μπορούν να παρασκευασθούν στο εργαστήριο του οινοποιείου από αποθηκευμένες καλλιέργειες. Αυτό έχει το αμφίβολο πλεονέκτημα ότι παρέχει μια καλλιέργεια εκκίνησης κάποιου ειδικού στελέχους που δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο, αλλά είναι εντατικής εργασίας και πρέπει να γίνει προσεκτικά από μικροβιολογικά εκπαιδευμένο προσωπικό. Τα πρώτα στάδια της επέκτασης της καλλιέργειας πρέπει να γίνονται ασηπτικά. Δεδομένου ότι οι ζύμες του οίνου αναπτύσσονται πολύ γρήγορα και επειδή το γλεύκος είναι ένα ιδανικό μέσο για αυτούς τους οργανισμούς, διότι τα θρεπτικά συστατικά του και το pH επιτρέπουν την επέκταση της καλλιέργειας, αλλά αποθαρρύνουν την ανάπτυξη περισσότερων ξένων οργανισμών. Μεγάλα εμβόλια (2%) και λογικές ποσότητες προστιθέμενου διοξειδίου του θείου διατηρούν ασηπτικές συνθήκες. Οι συνθήκες εμβολιασμού εξαρτώνται σε κάποιο βαθμό από τις περιφερειακές πρακτικές και εμπειρίες. Το μόνο σίγουρο είναι ότι για να υπερκεραστούν αυτά τα προβλήματα κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν μελέτες για τη βελτίωση και την επιλογή οινολογικών στελεχών (Fleet, 2008, Σουφλερός 2015, Boulton et al, 2018).

1.4.8.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗΣ ΖΥΜΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Οι επίλεκτες ζύμες παράγονται με υβριδισμό, κλωνικές επιλογές, γενετικές βελτιώσεις με χρήση ομοθαλικών και ετεροθαλικών στελεχών, με τη μίξη σφαιροπλαστών, με μεταλλακτικές διαδικασίες κλπ. Τα χαρακτηριστικά επίλεκτης ζύμης για οινοποίηση χωρίζονται σε δύο ομάδες, α) σε αυτά με το **τεχνολογικό ενδιαφέρον** που επηρεάζουν τη ζυμωτική ικανότητα, όπως η ζυμωτική ενεργότητα (αντοχή στην αλκοόλη), η ενέργεια της ζύμωσης, η αντοχή στο θειώδες οξύ, ο τρόπος ανάπτυξης της ζύμης σε ρευστά υποστρώματα (μορφής κόνεως, συσσωμάτων), η δυνατότητα για αφρογένεση και φιλογένεση, η ταχύτητα καθίζησης στα στελέχη μορφής κόνεως, η προικοδότηση ή όχι με φονική τοξίνη (killer) και β) τα χαρακτηριστικά των στελεχών που **επηρεάζουν τη χημική σύσταση και την ποιότητα του παραγόμενου οίνου**, όπως η παραγωγή θειούχων ενώσεων, όπως το H₂S και το θειώδες οξύ (SO₂), η δράση επί της οξύτητας του οίνου, η δράση επί του μηλικού οξέος και η ζυμωτική καθαρότητα. Οι οίνοι που παρήχθησαν από την ίδια πρώτη ύλη και ζυμώθηκαν υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες, αλλά από δύο διαφορετικά στελέχη π.χ. του *Saccharomyces cerevisiae*, είναι πολύ διαφορετικά από πλευράς ποιοτικών χαρακτηριστικών (γευστικο-οσφραντικών). Η διαφορά οφείλεται στη διακύμανση της πτητικής οξύτητας, αλλά και της μονίμου, στη ζύμωση ή μη του μηλικού οξέος, στην παραγωγή ή όχι συστατικών από το μεταβολισμό του θείου, καθώς και στην παραγωγή περισσότερων ή ολιγοτέρων κατά περίπτωση αρωματικών συστατικών. (Μπαλατσαούρας, 2006)

Το οινογλεύκος πριν εμβολιασθεί με την επιλεγμένη ζύμη δε μπορεί να παστεριωθεί. Έτσι είναι φορέας εγγενούς μικροχλωρίδας. Η ζύμωση του γλεύκους μπορεί να γίνει είτε φυσικά και να διεξαχθεί αυθόρμητα από τις άγριες ζύμες που υπάρχουν στην επιφάνεια του φλοιού των σταφυλιών και στο οινοποιείο, είτε να εμβολιασθεί με την προσθήκη γνωστού στελέχους *Saccharomyces*, όπου με αυτή την πρακτική ελαχιστοποιείται η επιρροή των γηγενών ζυμών στην ποιότητα του οίνου. Για την παρεμπόδιση αυτών των non-*Saccharomyces* ζυμών - «μπλοκάρισμα», χρησιμοποιείται επιπλέον και το θειώδες οξύ (SO₂), στο οποίο τα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*, τα οποία απαρτίζουν τις συνήθεις επιλεγμένες ζύμες της οινοποιίας, εμφανίζουν μικρότερη ευαισθησία. Γενικά όμως για να είναι επιτυχής η ελεγχόμενη ζύμωση του οινογλεύκους με επιλεγμένο ζυμομύκητα θα πρέπει το στέλεχος της ζύμης να επικρατήσει σε πληθυσμό έναντι των γηγενών από τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Για να γίνει η προσέγγιση του επιθυμητού στόχου με τη χρήση επιλεγμένης ζύμης θα πρέπει να **εμβολιασθεί το οινογλεύκος με άφθονα, ζωντανά και μεγάλης ενεργότητας κύτταρα (στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους) σε μορφή ενός επανυδατωμένου εμπορικού παρασκευάσματος κατάλληλου στελέχους ζυμομυκήτων ή με ένα μέρος ζυμώσιμου γλεύκους**. Υπάρχουν σημαντικά επιχειρήματα ως προς την καλύτερη επιλογή ζύμης, πολλά από τα οποία σχετίζονται με την παράδοση, το στυλ οίνου και την αγορά. Η χρήση επιλεγμένων καλλιιεργειών ζύμης επιτρέπει μια πιο προβλέψιμη ζύμωση (Scollary, 2016). Ένα στέλεχος ζύμης για την παραγωγή επιτραπέζιου οίνου θα πρέπει να πληρεί τις παρακάτω προδιαγραφές. Ειδικότερα για καθένα από τα ανωτέρω χαρακτηριστικά της επιλεγμένης ζύμης ισχύουν τα ακόλουθα:

- Κατάλληλο Είδος:** Όλα τα επιλεγμένα στελέχη οινοποιίας ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae* με την ευρεία έννοια.
- Ζυμωτική Ενεργότητα:** Πρέπει να βρίσκεται στο μέγιστο, ώστε να διεξάγει έντονη ζύμωση.
- Αντοχή στο Θειώδες Οξύ:** Είναι χαρακτηριστικό ιδιαίτερης σπουδαιότητας, επειδή πρέπει η αντοχή στο θειώδη ανυδρίτη να είναι υψηλή και σταθερή ώστε να παραγκωνίσει με την έγκαιρη ανάπτυξή του στελέχους, τις άγριες, εγγενείς ζύμες του οινογλεύκου, σε όποιο στάδιο της ζύμωσης είναι επιθυμητό.
- Ζυμωτική Δύναμη (Δύναμη Αλκοολογόνος):** Συνήθως τα οινογλεύκη περιέχουν 20-22% σάκχαρα και επομένως ζυμωτική ικανότητα μέχρι 14° βαθμούς αλκοόλης είναι αρκετή για την αποζύμωση των σακχάρων, εκτός ορισμένων περιπτώσεων. Να μπορεί να διεξάγει τη ζύμωση μέχρι ξηρού (χαμηλά ή μη υπολειμματικά ζυμώσιμα σάκχαρα)
- Αφρογόνος ικανότητα:** Είναι χαρακτήρας άκρως αρνητικός και θα πρέπει να μην υπάρχει,
- Φιλμογόνος ικανότητα:** Ο σχηματισμός πέπλου στην επιφάνεια, δεν εξυπηρετεί την ύπαρξή του, εκτός αν πρόκειται να παραχθούν κρασιά Sherry.
- Μορφή ανάπτυξης:** Προτιμώνται τα στελέχη που αναπτύσσονται υπό μορφή μεμονομένων κυττάρων (μορφής κόνεως).
- Ταχύτητα καθίζησης:** Τα καλά στελέχη καθιζάνουν αμέσως μετά την αποζύμωση και δίνουν συμπαγές ίζημα, το οποίο δεν εναιωρείται εύκολα για να θολώσει ο οίνος. Να δημιουργεί κροκιδώματα, έτσι ώστε να είναι εύκολο να αφαιρεθεί (ιδιαίτερα για τη δευτερογενή ζύμωση στην παραγωγή αφρώδους οίνου).
- Έκκριση τοξίνης φονικής (killer):** Λόγω του χαμηλού pH του οίνου, ο χαρακτήρας αυτός δεν έχει σημασία, διότι δε μπορεί να δράσει επιλεκτικά.
- Ικανότητα για παραγωγή Υδρόθειου:** Στελέχη που δεν παράγουν υδρόθειο από θειικά άλατα, δεν είναι ανθεκτικά και δεν αναπτύσσονται σε θειωμένα γλεύκη. Προτιμώνται στελέχη που είναι ικανά να παράξουν μικροποσότητες.
- Προσβολή του Μηλικού Οξέος:** Προτιμώνται όσα στελέχη προσβάλλουν ελαφρώς το μηλικό οξύ και όχι όσα το ζυμώνουν στο σύνολό του, διότι διαταράσσουν το ισοζύγιο της μόνιμης οξύτητας στο γλεύκος.
- Ικανότητα παραγωγής Ακεταλδεύδης στο κρασί:** Γενικά προτιμώνται στελέχη, τα οποία παράγουν κατά κανόνα 70-80mg/L ακεταλδεύδης παρουσία 100ppm SO₂ (10g/ hL).
- Παραγωγή Ανώτερων Αλκοολών:** Προτιμώνται τα στελέχη που δεν παράγουν περισσότερο **από 200mg /L ανώτερων** αλκοολών.
- Ανοχή στην αιθανόλη και τη θερμοκρασία.**
- Να μην παράγει αρνητικά αρώματα μη αποδεκτά (off-flavors).
- Να διαθέτει αναπαραγωγίμα χαρακτηριστικά ζύμωσης.

(Μπαλατσαούρας, 2006)

Η επιλογή των στελεχών ζύμης είναι τα πιο σημαντικά κριτήρια για τη βελτίωση της ποιότητας του οίνου και τη διατήρηση της συνοχής του προϊόντος. Το κάθε στέλεχος επιλέγεται ανάλογα με το τι θέλει να επιτευχθεί. Για παράδειγμα μπορεί κάποιος να επιλέξει ένα στέλεχος λόγω της ταχύτητας της ζύμωσης (Jackson, 2008). Οι βασικές επιθυμητές ιδιότητες που απαιτούνται για την επιλογή ενός στελέχους *S. cerevisiae* για την παραγωγή οίνου διακρίνονται σε δύο κατηγορίες στα «Πρωτεύοντα», κύρια ή φυσικής κατάστασης χαρακτηριστικά, αυτά συνδέονται αυστηρά με το σχηματισμό αιθυλικής αλκοόλης με ζύμωση και τα «Δευτερεύοντα» ή ποιοτικά χαρακτηριστικά, αυτά σχετίζονται με την παραγωγή ενώσεων που επηρεάζουν άλλες παραμέτρους, όπως το «σώμα» του οίνου, το σύμπλοκο ανώτερων αλκοολών και την εμφάνιση ανεπιθύμητων. (Μπαλατσαούρας, 2006).

Τα κύρια και δευτερεύοντα χαρακτηριστικά, ώστε να επιλεγεί μια ζύμη, και να κριθεί κατάλληλη κατά περίπτωση, προς οινοποίηση γλεύκου, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα 7. και στη συνέχεια, αναλύονται τα πιο σημαντικά/βασικά εξ'αυτών .

Πίνακας 7. Βασικά και εξειδικευμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά επιλεγμένων στελεχών για την αλκοολική ζύμωση οινογλεύκου (Μπαλατσαούρας 2006, Σουφλερος 2015, Τσακίρης 2017).

Φυσικά χαρακτηριστικά	
Ιδιότητες Ζύμωσης	Τεχνολογικές ιδιότητες/ εξειδίκευση στις συνθήκες οινοποίησης
Ταχεία έναρξη ζύμωσης	Υψηλή γενετική σταθερότητα
Υψηλή απόδοση ζύμωσης (ταχύτητα ζύμωσης και αποζύμωσης)	Υψηλή αντοχή σε θειώδη άλατα
Υψηλό ποσοστό ζύμωσης (δυνατότητα ζύμωσης 170-240 g/L σακχάρων)	Χαμηλός σχηματισμός αφρού

Υψηλή αντοχή αιθανόλης (δυνατότητα συνέχισης της αλκοολικής ζύμωσης σε περιβάλλον 10-14 % vol αλκοόλης)	Ιδιότητες κροκίδωσης
Υψηλή ωσμωτική αντίσταση	Αντοχή στην αποξήρανση
Χαμηλή βέλτιστη θερμοκρασία	Ιδιότητες τοξίνης «killer»
Μέτρια παραγωγή βιομάζας	Πρωτεολυτική δράση
	Χαμηλή ζήτηση αζώτου
Ποιοτικά χαρακτηριστικά	
Χαρακτηριστικά αρώματος	Μεταβολικές ιδιότητες με τις επιπτώσεις στην υγεία
Παραγωγή χαμηλής πτητικής οξύτητας	Χαμηλός σχηματισμός θειωδών
Ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	
Παραγωγή αλκοόλης είναι μέτρια υψηλότερη	Χαμηλή πιθανότητα καρβαμικού αιθυλεστέρα (ουρεθάνη)
Ικανότητα απελευθέρωσης γλυκοσιδικών δεσμών	
Μη παραγωγή φαινολικών αρωμάτων	
Υψηλή παραγωγή γλυκερόλης	
Υδρολυτική δραστηριότητα	

1.4.8.3.1 ANTOXH ΣΤΗΝ ΑΛΚΟΟΛΗ

Λέγεται και αλκοολογόνος ικανότητα ή και ζυμωτική δύναμη και κυμαίνεται ευρύτατα ανάλογα με το γένος, το είδος, αλλά και το στέλεχος της ζύμης (μαγιάς) (Castelli, 1954). Η αλκοόλη (αιθανόλη) παράγεται από τις ζύμες υπό συνθήκες ασφυξίας. Εντούτοις, λιγότερο αλκοολογόνες ζύμες, όπως το *Torulaspora rosei* (*Saccharomyces rosei* ή *Saccharomyces delbrueckii*) παράγουν αρωματικά συστατικά και αναλογικά τη λιγότερη πτητική οξύτητα. **Οι λεμονοειδείς ζύμες παράγουν γενικά γύρω στους 3,5° και τα διάφορα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* 8-16°**. Γενικά στελέχη από γλεύκη νοτίων περιοχών, που είναι περισσότερο συμπυκνωμένα, είναι μεγαλύτερης αλκοολογόνου ικανότητας από ό,τι τα στελέχη από βόρειες περιοχές. Παρεμπόδιτική δράση εξασκεί η συγκέντρωση αλκοόλης μέσα στο κύτταρο της ζύμης και όχι στο υπόστρωμα, γιατί η αιθανόλη μέσα στο κύτταρο μπλοκάρει ορισμένα ένζυμα γλυκολύσεως όταν φθάνει σε μία ορισμένη στάθμη. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η αυξημένη αντοχή στην εξωτερική αιθανόλη συμπορεύεται με μειωμένη περιεκτικότητα εντός του κυττάρου σε λιπίδια και υδατάνθρακες. Η κυτοπλασματική μεμβράνη του *Saccharomyces cerevisiae* περιέχει σε μη σταθερά ποσοστά διάφορα λιπίδια, ελεύθερες στερόλες, καθώς και λιγότερο σημαντικές ποσότητες τριγλυκεριδίων. Έτσι εξηγείται η διάφορη αντοχή στελεχών του στις συγκεντρώσεις αιθανόλης στο υπόστρωμα ανάπτυξης. Για την αυξημένη ζυμωτική ικανότητα οι ζύμες με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την οινοποίηση είναι τα γένη του *Saccharomyces cerevisiae* (με όλες τις φυσιολογικές του φυλές), το *Torulaspora delbrueckii*, το *Zygosaccharomyces bailii* καθώς και είδη του γένους *Schizosaccharomyces*. Αξιοσημείωτο είναι ότι αν ένα στέλεχος του *Saccharomyces cerevisiae* έχει ζυμωτική ικανότητα που να φθάνει στους 12 αλκοολικούς βαθμούς, μπορεί να συνεχίσει διακοπείσα ζύμωση οίνου μέχρι να φθάσει στην ίδια στάθμη αλκοόλης. (Μπαλατσαούρας 2006, Τσακίρης 2017, Boulton et al.2018)

1.4.8.3.2 ΖΥΜΩΤΙΚΗ ΙΣΧΥΣ

Με τον όρο ενέργεια της ζύμωσης νοείται η ταχύτητα με την οποία ολοκληρώνεται η ζύμωση από ένα στέλεχος. **Για την εκτίμηση αυτού του χαρακτηριστικού χρησιμοποιείται το ίδιο γλεύκος καθώς και οι ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες, ώστε να είναι διαφορετικά μόνο τα στελέχη.** Σημειώθηκαν μεγάλες διαφορές ως προς την ζυμωτική ισχύ από το ένα στέλεχος στο άλλο, ειδικά του γένους *Saccharomyces cerevisiae*. **Στελέχη με μεγάλη ενέργεια ζυμώσεως, θεωρούνται πλεονεκτικά,** όταν ζυμώνουν υπό αντίξοες συνθήκες, όπως παρουσία αυξημένων ποσοστών θειώδους οξέος (π.χ. οίνοι «φριζάντε» με τσουχτερή γεύση και οίνοι «μπανιζέ» αεριούχοι). Όμως για την παραγωγή οίνων υπό ομαλές συνθήκες ζύμωσης είναι πλεονεκτικότερα τα στελέχη μέτριας ή χαμηλής ζυμωτικής ισχύς (ολοκληρώνουν τη ζύμωση μέσα σε μακρότερο σχετικά χρονικό διάστημα), γιατί εξασφαλίζουν καλύτερη ποιότητα. (Μπαλατσασούρας 2006, Τσακίρης 2017, Boulton et al.2018).

1.4.8.3.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΤΟΥ ΤΟΞΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ «KILLER»

Ορισμένες ζύμες εκκρίνουν πρωτεϊνούχες τοξίνες, οι οποίες μπορούν να θανατώσουν άλλες ζύμες. Υπάρχουν 11 τουλάχιστον ομάδες killer (K1-K11) από τις οποίες μόνο οι K2 και K3 είναι επικίνδυνα θανατηφόρες. Ο παράγοντας killer βρέθηκε σε διάφορα γένη και είδη και κυρίως στον *Saccharomyces*, εκκρίνουν την ουσία killer-τοξίνη, στην οποία τα ίδια είναι ανθεκτικά, ενώ άλλα στελέχη του ίδιου είδους είναι ευαίσθητα. Η τοξίνη αυτή έχει διαπιστωθεί σε άλλα είδη των γενών, όπως τα *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Kluyveromyces* και *Debaryomyces*. Ο παράγοντας αυτός σύμφωνα με τη γαλλική βιβλιογραφία κυμάνθηκε μεταξύ 0-90% στα οινογλεύκη. Η σημασία της φαίνεται να είναι μικρή στην οινοποίηση λόγω της χαμηλής τιμής του pH του οινογλεύκου και του οίνου. (Μπαλατσασούρας, 2006) Για την επιλογή ζυμών προτιμάται ο χαρακτήρας killer (K), γιατί κατά τον εμβολιασμό οι ζύμες αυτές μπορούν να υπερισχύσουν των άλλων και να φτάσουν μέχρι το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης λειτουργώντας ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου που παράγει θανατηφόρες τοξίνες. (Bevan & Makower, 1963) Οι τοξίνες αυτές είναι πρωτεΐνες σχετικά μικρού μοριακού βάρους, υπεύθυνες για την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης ή την αναστολή παραγωγής νουκλεϊνικών οξέων. Η δράση τους εξαρτάται από τις συνθήκες περιβάλλοντος. Είναι δυνατό με μεθόδους της βιοτεχνολογίας οι ζύμες να αποκτήσουν τη δυνατότητα να παράγουν τέτοιου είδους πρωτεΐνες ή οι ζύμες Neutral (N) να χρησιμοποιηθούν για επιλεγμένες καλλιέργειες, ως ανθεκτικές στον παράγοντα killer. (Τσακίρης, 2017, Σουφλερός, 2015).

Τα στελέχη-δολοφόνοι είναι σε θέση να εμποδίσουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών αλλοίωσης που επηρεάζουν την ποιότητα του οίνου. Η προσθήκη διοξειδίου του θείου ως αντιοξειδωτικό και αντιμικροβιακό πρόσθετο αποτελεί κοινή πρακτική κατά την παραγωγή οίνου. Ωστόσο, λόγω των σημερινών τάσεων για τη μείωση της χρήσης χημικών προσθέτων, η χρήση των καλλιέργειών εκκίνησης που παράγουν θανατηφόρες-τοξίνες είναι μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση για να αποφευχθεί η μόλυνση από ζύμες αλλοίωσης. Συνεπώς, το να συμπεριληφθεί ο ζυμομυκήτας δολοφόνος *S. cerevisiae* με κατάλληλες ιδιότητες ζύμωσης, είναι απαραίτητο για την επίτευξη ελεγχόμενης ζυμώσεως, επισημαίνοντας τη σημασία μιας έξυπνης επιλογής στελεχών (Perez, 2018).

1.4.8.3.4 ANTOXH ΣΤΟ ΘΕΙΩΔΕΣ ΟΞΥ (SO₂)

Η αντοχή στο θειώδες οξύ κυμαίνεται ανάλογα με το γένος, το είδος, αλλά και το στέλεχος της ζύμης. Περισσότερο ευαίσθητες είναι οι λεμονοειδείς ζύμες και περισσότερο ανθεκτικές οι ζύμες του γένους *Schizosaccharomyces*, καθώς και του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Όμως περισσότερο ανθεκτικό στο θειώδες οξύ είναι το είδος *Saccharomyces ludwigii* που μπορεί να ζυμώσει τα «βουβά» γλεύκη που περιέχουν 800ppm (80g/hL). Η φυσική αντοχή στο θειώδες είναι σταθερή και κληρονομήσιμη και μεταφέρεται στους απογόνους σύμφωνα με τους κανόνες της κλασικής κληρονομικότητας των ποσοτικών χαρακτηριστικών. Τα πιο ανθεκτικά στελέχη του *S.cerevisiae* αναπτύσσονται χωρίς καμιά δυσκολία σε συγκέντρωση SO₂ 100ppm (10g/hL), ελαφρώς σε 150ppm και με μια μικρή καθυστέρηση στα 200ppm (Zambonelli et al, 1971). Με 15g SO₂ ανά εκατόλιτρο κανένα στέλεχος του *S.cerevisiae* δεν παρεμποδίζεται. Υπάρχει μια μικρή καθυστέρηση στην έναρξη της ζύμωσης, αν το στέλεχος είναι ευαίσθητο, το τελικό αποτέλεσμα όμως θα είναι το ίδιο, όπως και για στελέχη με αυξημένη εγγενή αντοχή στο ίδιο αντισηπτικό. Φαίνεται το SO₂ στη διάρκεια της προσαρμογής προάγει την εξέλιξη κυττάρων μεταλλακτικών, που παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ότι η αποκτηθείσα διαμέσου προσαρμογής αντοχή στο θειώδες παραμένει σταθερή για μερικές γενεές, ύστερα εξασθενεί και τελικώς εξαφανίζεται. Έχει ακόμα αποδειχθεί ότι η αντοχή στο SO₂ δεν ελέγχεται από το γονίδιο της κληρονομικής ουσίας του πυρήνα, αλλά από πλασμίδια του κυτοπλάσματος, γ'αυτό το λόγο και δεν είναι σταθερή η αντοχή που επιτυγχάνεται με βάση τον εθισμό του στελέχους σε συνεχώς αυξανόμενες συγκεντρώσεις SO₂. Το SO₂ μέσα στο κύτταρο ενώνεται με πολλά συστατικά και η ένωση άλλοτε είναι αντιστρεπτή και άλλοτε όχι. Θεωρείται πιθανότερο για το θειώδες να παρεμποδίζει την ανάπτυξη της ζύμης διαμέσου

ενώσεως του με την οξειδωμένη γλουταθειόνη. Με αυτή τη μορφή, R-S-SO₃, μπορεί το SO₂ να συσσωρεύεται μέσα στο κύτταρο. Το SO₂ αντιδρά με τα νουκλεϊνικά οξέα (DNA και RNA) και για το λόγο αυτό θεωρείται μεταλλαξιογόνο (οι μεταλλαγές δεν είναι χρωμοσωμικές, γι' αυτό η αντοχή στους απογόνους εξασθενεί στην ακολουθία των γενεών) (Μπαλατσούρας, 1960).

Στο οиноγλεύκος το SO₂ προστίθεται σε συγκέντρωση 80-120ppm (8-12 g/hL). Το περισσότερο ενώνεται με συστατικά του γλεύκους (δεσμευμένο) και παύει να είναι ενεργό. Απομένει, όμως, και ελεύθερο αρκετό για την επίτευξη των στόχων της θείωσης. Το ελεύθερο θειώδες είναι τόσο περισσότερο αναλογικά όσο χαμηλότερη είναι η τιμή του pH του οиноγλεύκους. Η οينوποίηση πρακτικά λαμβάνει χώρα πάντοτε παρουσία θειώδους οξέος, επομένως οι ζύμες θα πρέπει να είναι ανθεκτικές σε αυτό. Μάλιστα, η αντοχή είναι πλεονεκτικότερη αν είναι εγγενής (φυσική) και όχι από μετάλλαξη. Γιατί στην πρώτη περίπτωση η ιδιότητα αυτή είναι σταθερή και δεν υπόκειται σε μετάλλαξη στην πορεία της ζύμωσης. (Μπαλατσούρας 2006, Τσακίρης 2017, Boulton et al.2018).

1.4.8.3.4.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ SO₂ ΑΠΟ ΤΙΣ ΖΥΜΕΣ (ΖΥΜΩΣΗ ΜΗ ΘΕΙΩΜΕΝΟΥ ΟΙΝΟΓΛΕΥΚΟΥΣ)

Η παραγωγή SO₂ με αναγωγή των θεικών αλάτων από τις ζύμες του είδους *S. cerevisiae* κατά τη ζύμωση ήταν γνωστή από το έτος 1894. Σχεδόν 70% των στελεχών παράγουν SO₂ λιγότερο των 10mg/L (1g/hL), 50% παράγουν SO₂ μεταξύ 10-20 mg/L mg/L και ελάχιστα στελέχη παράγουν περισσότερα από 20 mg/L. Έχουν αναφερθεί στελέχη που παράγουν με αναγωγή 100 mg SO₂/L (10g/hL). Ο θειώδης ανυδρίτης που προστίθεται στο οиноγλεύκος δεν είναι διαφορετικός από το θειώδες που παράγεται με αναγωγή των θεικών αλάτων από τη ζύμη **και χρήση του παραγόμενου υδρόθειου στη σύνθεση των θειούχων αμινοξέων** (γίνεται σχετική αναφορά στο υποεπείκλιο 1.2.4 «θειώδης ανυδρίτης»/σελ.21). Μέρος του θειώδους οξέος εκκρίνεται από το κύτταρο και μεταφέρεται στον οίνο, όχι όμως αναγκαστικά και υδρόθειο. Συνεπώς, το θειώδες οξύ είναι **κανονικό συστατικό του οίνου** ανεξαρτήτως ή όχι της προσθήκης του στο οиноγλεύκος πριν από την έναρξη της ζύμωσης και περιέχεται σε ποσοστό λίγων mg μέχρι και 100mg/l. Το θειώδες οξύ, από την άλλη πλευρά, σε μεγάλες ποσότητες είναι πολύ επικίνδυνο για τον ανθρώπινο οργανισμό (70g εφραπαξ ή ημερήσια δόση 0,7mg/kg), την χλωρίδα, τη πανίδα, τα μάρμαρα κλπ. Ιδιαίτερα βλαπτικό είναι το SO₂ του ατμοσφαιρικού αέρα. Ο οίνος είναι μια σοβαρή πηγή θειώδους οξέος, ιδιαίτερα αν αυτό καταναλώνεται καθημερινά. Ο διεθνής οργανισμός υγείας συνιστά τον περιορισμό του στο ελάχιστο, έως και την πλήρη κατάργηση του και αντικατάστασή του (ανάυση στο σχετικό εδάφιο του θειώδη ανυδρίτη). (Μπαλατσούρας, 2016) Παρόλες τις συστάσεις και τις προειδοποιήσεις για τις δυσμενείς επιπτώσεις τις πρόληψης θειώδους οξέος, η οينوποιία έχει μείνει πρακτικά ασυγκίνητη σε ό,τι αφορά τη χρήση του. Και αυτό συμβαίνει διότι είναι πρακτικά αναντικατάστατο σε μια ορθολογική οينوποίηση, επειδή εκτός των άλλων σταθεροποιεί το οиноγλεύκος και τον παραγόμενο οίνο έναντι της οξειδωσης, παρεμποδίζει την ανάπτυξη των οξικών και γαλακτικών βακτηρίων, καθώς και την ανάπτυξη εγγενών (άγριων) ζυμών εις όφελος των επιθυμητών κατά κανόνα στελεχών του *Saccharomyces cerevisiae*. Αντικατάσταση του θειώδους στην οينوποίηση με **παστερίωση που αδρανοποιεί τα ένζυμα (οξειδωτικά) και εξοντώνει τα οξοβακτήρια, γαλακτοβακτήρια και εγγενείς ζύμες, συνεπάγεται υψηλό κόστος για τη βιομηχανία και υποβάθμιση του οиноγλεύκους σε ό,τι αφορά ορισμένα γευστικο-οσφραντικά χαρακτηριστικά. Παστερίωση** έλαβε χώρα στα μισά δείγματα οίνων του παρόντος πειράματος οينوποίησης χωρίς θειώδη ανυδρίτη, αλλά κυρίως ενδείκνυται στη μικροβιολογία σε εργαστηριακής κλίμακας πειράματα για τη μελέτη της κινητικής των μικροοργανισμών. Μια άλλη λύση του προβλήματος θα μπορούσε να αποτελέσει η ζύμωση του οиноγλεύκους από επιλεγμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*, ορισμένα από τα οποία σταθεροποιούν το χρώμα στα λευκά κρασιά, ενώ άλλα δρουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη αξικών και γαλακτικών βακτηρίων. (Μπαλατσούρας, 2016). Πάντως το στέλεχος που χρησιμοποιείται για κατευθυνόμενη ζύμωση, θα πρέπει να μπορεί να παράγει 25-30mg SO₂ ανά λίτρο από αναγωγή θεικών αλάτων. Θειώδες οξύ (SO₂) και υδρόθειο (H₂S) παράγονται με την ίδια ακολουθία αντιδράσεων. Όμως, δε φαίνεται να υπάρχει συσχετισμός στην παραγωγή των δύο ενώσεων. Γενικά, όμως, τα στελέχη που δεν παράγουν υδρόθειο είναι δυναμικές πηγές θειώδους οξέος.

Στο παρόν πείραμα οينوποίησης που έλαβε χώρα σε γλεύκος παστεριωμένο και μη, δεν πραγματοποιήθηκε επιπλέον θείωση του γλεύκους πέραν από αυτή που είχε πραγματοποιηθεί κατά την οينوποίηση, έπειτα από την απόψυξη του και πριν τον εμβολιασμό, διότι οι άγριες γηγενείς ζύμες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στο θειώδη ανυδρίτη. Μετά την αποζύμωση, τα παστεριωμένα δείγματα των οίνων τοποθετήθηκαν σε ψυγείοθάλαμο και δε θειώθηκαν, ενώ θείωση 10mg/L MBS πραγματοποιήθηκε στα υπόλοιπα.

1.4.8.3.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ – ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΔΡΟΘΕΙΟΥ

Οι ζύμες συνθέτουνθειούχα αμινοξέα με υλικό εκκίνησης ταθειικά άλατα, όπου με την παρέμβαση ειδικών ενζύμων μέσα στο κύτταρο, αυτά (άλατα) ανάγονται προς υδρόθειο, το οποίο με τη σειρά του αντιδρά με την ακετυλο-σερίνη και την ακετυλο-ομοσερίνη. Με βάση δε τις περαιτέρω συνθετικές διαδικασίες σχηματίζονται η κυστεΐνη, η ομοκυστεΐνη και η μεθειονίνη. Αξιοσημείωτο είναι ότι ταθειώδη άλατα και το υδρόθειο που μετέχουν στην πορεία της σύνθεσης τωνθειούχων αμινοξέων, μπορούν μερικώς να εκκρίνονται από το κύτταρο και να καταλήγουν στο κρασί με δυσμενείς επιπτώσεις επί της ποιότητας του.

Η παραγωγή Υδρόθειου από ταθειώδη άλατα και το θείο, που χρησιμοποιείται στην καταπολέμηση του ωιδίου στα σταφύλια ήταν γνωστή από το 1890. Η ποσότητά του εξαρτάται από την πρώτη ύλη, το είδος των ενώσεων του θείου και κυρίως από το είδος και το στέλεχος της ζύμης που έφερε σε πέρας τη ζύμωση του οινογλεύκου. Τα στελέχη *S. cerevisiae* είναι ικανά να παράγουν υδρόθειο σε ποσοστό 99%. Η δυνατότητα παραγωγής υδρόθειου είναι σταθερός χαρακτήρας και κληρονομείται στους απογόνους σύμφωνα με τις μεντελικές αρχές της γενετικής. Η διακύμανση της παραγωγής του κυμαίνεται από λίγα μικρογραμμάρια έως 4-5 mg ανά λίτρο. Στα πλούσια υποστρώματα, όπως είναι το οινογλεύκος, η παραγωγή υδρόθειου από τις ζύμες είναι περιορισμένη. Αυξημένες ποσότητες παράγονται κατά τη ζύμωση αν τα σταφύλια περιέχουνθειάφι από καταπολεμήσεις του ωιδίου. Στη ζύμωση του οινογλεύκου προτιμούνται τα στελέχη που παράγουν τις χαμηλότερες ποσότητες υδρόθειου, διότι τα στελέχη που δεν το παράγουν καθόλου, το συσσωρεύουν στο κύτταρό τους, ενώ εκείνα που παράγουν αυξημένες ποσότητες μπορούν να συνθέσουνθειώδη παράγωγα ανεπιθύμητα. Σε οίνους επαναζυμώσεως, αντίθετα (για αφρώδεις οίνους) μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι δύο τύποι σε ό,τι αφορά το πολύ ή λίγο υδρόθειο ανάλογα με τομ οίνο της βάσης. (Μπαλατσαούρας 2006, Τσακίρης 2017, Boulton et al.2018)

1.4.8.3.6 ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ ΖΥΜΩΣΗΣ

Η καθαρότητα της ζύμωσης αφορά στα παραπροϊόντα, τα οποία παράγονται κατά την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης και επηρεάζουν την ποιότητα του τελικού προιοντος, θετικά ή αρνητικά, κατά περίπτωση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει το **οξικό οξύ**, που παράγεται κατευθείαν από τα σάκχαρα, επηρεάζει δραματικά την ποιότητα και η **συγκέντρωση στην οποία παράγεται εξαρτάται όχι από το είδος του σακχαρομύκητα, αλλά από το στέλεχος**. Σε 10 βαθμούς αλκοόλης, πτητική οξύτητα 0,3 g/L θεωρείται τιμή optimum. Οξικό οξύ παράγεται από τα οξικά βακτήρια (οξοβακτήρια), τα οποία συναναπτύσσονται με τις ζύμες. Για το λόγο αυτό **τα στελέχη ζυμών που παράγουνθειώδες οξύ προσφέρονται για μειωμένη σύνθεση οξικού οξέος**. Ορισμένα στελέχη του *S. cerevisiae* ευνοούν την ανάπτυξη των οξοβακτηρίων με έκκριση τριπεπτιδίων. Έτσι, στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, ο οίνος είναι επιρρεπής στην οξική ζύμωση. Στην εκλογή των κατάλληλων στελεχών θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ικανότητά τους να παράγουν τα ίδια οξικό οξύ ή να διευκολύνουντην ανάπτυξη οξικών βακτηρίων (Μπαλατσαούρας 2006, Τσακίρης 2017, Boulton et al.2018)

1.4.9 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τους μικροοργανισμούς, έχοντας την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη τους επιδρώντας στην πορεία της αλκοολικής ζύμωσης, διακρίνονται σε **Ενδογενείς και Εξωγενείς**.

Οι παράμετροι που επηρεάζουν τη ζύμωση του οίνου μπορούν στην ουσία να διακριθούν σε έξι κατηγορίες:

Παράγοντες που βρίσκονται στο σταφύλι-Τεχνικές οινοποίησης

Παράγοντες θρέψης και αύξησης των ζυμών

Το περιβάλλον ζύμωσης

Παράγοντες αναστολής ανάπτυξης ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού των κυττάρων

Φαινόμενο θανάτωσης

Εξωγενείς παράγοντες

1.4.9.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ

Σάκχαρα. Όταν η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ξεπεράσει τα 300g/l, ο μεταβολισμός των ζυμών διαταράσσεται σε ολόκληρη τη διάρκεια της ζύμωσης. Υπάρχει επιμήκυνση της περιόδου αναμονής, μειωμένη ταχύτητα ζύμωσης και μείωση της ποσότητας των σακχάρων που ζυμώνονται. Τέλος, αύξηση της πτητικής οξύτητας.

Φαιά σήψη. Τα σταφύλια που έχουν προσβληθεί από φαιά σήψη περιέχουν ενώσεις που είναι τοξικές για τη ζύμη. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται εντοπισμένες στα στερεά μέρη του σταφυλιού και εξάγονται κυρίως με τις τελευταίες πιέσεις, οι οποίες πρέπει να ζυμώνονται χωριστά.

Τανίνες. Παρεμποδίζουν την αύξηση. Ο *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να αναπτυχθεί ακόμη και σε περιβάλλον που περιέχει 3% τανίνες.

1.4.9.2 ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι ενδογενείς παράγοντες αποτελούνται επιγραμματικά από το υπόστρωμα ανάπτυξης, τα θρεπτικά συστατικά, το pH, το οξειδωαναγωγικό δυναμικό, την ενεργότητα του νερού, την ύπαρξη αντιμικροβιακών ουσιών και τις βιολογικές δομές. Σημαντικοί παράγοντες που αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά την αλκοολική ζύμωση είναι η αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα και το οξικό οξύ.

Η τοξικότητα υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης των ευαίσθητων γηγενών ζυμών αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα. Επιπλέον, η προσθήκη αιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση της φάσης αναμονής και την επιβράδυνση της αύξησης. Ο μέγιστος πληθυσμός είναι τόσο πιο μικρός όσο πιο υψηλός είναι ο αλκοολικός τίτλος. Η παρεμπόδιση που ασκεί η αιθανόλη είναι τόσο μεγαλύτερη όσο πιο αυξημένη είναι η θερμοκρασία. Μεγάλη ποσότητα αιθανόλης μπορεί να προκαλέσει σταμάτημα της αλκοολικής ζύμωσης. Εμπειρικά καθορίζεται ότι η αλκοολική ζύμωση σταματά όταν το άθροισμα συγκέντρωσης σε σάκχαρα με τη συγκέντρωση της αιθανόλης πολλαπλασιασμένη επί 4,5 είναι μεγαλύτερο του 80. Για παράδειγμα, ένα ζυμωμένο γλεύκος που περιέχει 20 g/l σάκχαρα και είναι 13,3%vol. **Η παρεμπόδιση που προκαλεί η αιθανόλη εξαρτάται από το είδος της ζύμης και της φάσης ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται.** Σε αυτή την ιδιότητα στηρίζεται η παραγωγή των μιστελιών. Δηλαδή στην παρεμπόδιση έναρξης της αλκοολικής ζύμωσης με την προσθήκη αιθανόλης (αλκοόλ 96% vol). Ο ανώτερες αλκοόλες είναι επίσης τοξικές. Η παρεμπόδιση που προκαλούν είναι συνάρτηση του αριθμού των ατόμων άνθρακα που περιέχουν και αυξάνει με αύξηση της περιεκτικότητάς τους. Η αιθανόλη επηρεάζει τον μεταβολισμό των κυττάρων και τη μακρομοριακή βιοσύνθεση, επάγοντας την παραγωγή πρωτεϊνών θερμικού σοκ, μειώνοντας το ποσοστό του RNA και της συσσώρευσης πρωτεϊνών, ενισχύοντας τις σημειακές μεταλλάξεις, μεταβάλλοντας τον μεταβολισμό και μετουσιώνοντας τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και τα γλυκολυτικά ένζυμα και μειώνοντας τη δραστηριότητα του (Walker, 1998). Οι κύριες θέσεις που επιδρά η αιθανόλη στους ζυμομύκητες είναι οι **κυτταρικές μεμβράνες**, υδρόφοβες και υδρόφιλες πρωτεΐνες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Συγκεκριμένα, η αιθανόλη δρα ως διαλύτης λιπιδίων των μεμβρανών, μετουσιώνει και τις ενζυμικές πρωτεΐνες τους αναστέλλοντας έτσι τη δράση τους, με αποτέλεσμα να μεταφέρονται συστατικά δια μέσου της μεμβράνης προκαλώντας τη διάλυση των λιπιδίων και αλλοιώνοντας τα ενζυμικά συστήματα. Επομένως, η παρουσία της ελαττώνει και κατόπιν παρεμποδίζει την αφομοίωση αζωτούχων συστατικών (Ribereau-Gayon, 1985, Bisson, 2001, Σουφλερός, 2009, Τσακίρης 2017).

Όσον αφορά στο θρεπτικό υπόστρωμα, η ζύμωση είναι πολύ αργή όταν οι **υδατάνθρακες** είναι σε μικρή συγκέντρωση, γίνεται ταχύτερη σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (15-20g/l), σταθερή μέχρι τα 200 g/l και μειώνεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, όπου σταματάει εντελώς να υφίσταται σε συγκεντρώσεις 600-650 g/l. Προσθήκη υδατανθράκων (σακχάρων), πραγματοποιείται όπου κρίνεται απαραίτητη και καλό είναι να γίνεται μετά τη δεύτερη ημέρα ζύμωσης, δηλαδή σε μέσο με ενεργά αναπτυσσόμενα κύτταρα. Θα πρέπει να παρακολουθείται η θερμοκρασία και να μην υπάρχει αύξηση. Το άζωτο, του οποίου η προσθήκη γίνεται πριν ξεκινήσει η ζύμωση και στο μέσο της ζύμωσης με αερισμό, με έλλειψη οξυγόνου: 200 mg/l, παρουσία οξυγόνου 300 mg/l και σε αερόβιες συνθήκες 735 mg/l. Ο *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να συνθέσει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και μπορεί να χρησιμοποιήσει αυτά του γλεύκους με απευθείας ενσωμάτωση σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, κάνοντας αποικοδόμηση της αμινομάδας και απόρριψη του υπόλοιπου μορίου και τέλος σαν πηγή άνθρακα. Όταν απαιτείται προσθήκη αζώτου, τότε μίγμα αμμωνιακού αζώτου και αμινοξέων βελτιώνει την ανάπτυξη. Η προσθήκη κρίνεται απαραίτητη όταν η συγκέντρωση των αμμωνιακών κατιόντων είναι < 25mg/l και απλώς χρήσιμη 25-50mg/l. Γενικά το γλεύκος καλύπτει τις ανάγκες της ζύμης σε μεταλλικά άλατα. Συγκέντρωση Υδατανθράκων-σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη), αιθανόλης, οργανικών οξέων (τρυγικό, μηλικό), μεταλλικών αλάτων (φώσφορος, χλώριο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο). Πηγές αζώτου (αμμωνία, αμινοξέα, πολυπεπτίδια, πρωτεΐνες), Παράγοντες ανάπτυξης (βιταμίνες) και επιβίωσης.

Παράγοντες ανάπτυξης σε μικρές συγκεντρώσεις επηρεάζουν το μεταβολισμό και την ανάπτυξη των ζυμών. Εμπλουτισμός του γλεύκους με βιοτίνη και θιαμίνη συνίσταται καθότι βελτιώνει την κινητική της ζύμωσης (0,5 mg/ l θιαμίνης αυξάνει τον πληθυσμό της ζύμης κατά 30%, αν και δεν είναι πάντα αποτελεσματική η προσθήκη).

Παράγοντες επιβίωσης. Η παρουσία τους δε συνδέεται με τη βελτίωση της ανάπτυξης π.χ. η εργοστερόλη, όπου σε συνθήκες αναερόβιωσης π.χ. γλεύκος με 260g/l υδατάνθρακες, το οποίο χωρίς εργοστερόλη σε 10 ημέρες θα είχε 175 g/l, με την προσθήκη της θα ήταν 258g/l. Σε αερόβιες συνθήκες παρατηρείται μικρή παρεμπόδιση της ζύμωσης με την προσθήκη εργοστερόλης.

Το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), ασκεί μικρή παρεμποδιστική δράση. Παρεμποδίζει τη ζύμωση όταν η πίεση που οφείλεται στο CO₂, φτάσει στις 7,3 Atm. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη συντήρηση του γλεύκους. Ακόμη, μεταβάλλοντας την εξωτερική ατμοσφαιρική πίεση επιτυγχάνεται ομαλοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης (Τσακίρης, 2017).

Η Παρεμποδιστική δράση του οξικού οξέος αρχίζει από τη συγκέντρωση 0,1 g/l και γίνεται σημαντική για 0,5 g/l. **Οξικό οξύ μπορεί να περιέχει το γλεύκος πριν από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Η περιεκτικότητα σε οξικό οξύ είναι αυξημένη προς το τέλος της ζύμωσης. Στη συνέχεια μεταβολίζεται σε άλλα προϊόντα.** Σε αυτό στηρίζεται η τεχνική μείωσης της υψηλής πτητικής οξύτητας ενός οίνου. Ο οίνος αυτό οδηγείται σε πολύ γρήγορη ζύμωση αφού πρώτα αναμειχθεί με αζύμωτο γλεύκος.

Τέλος, όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία ζύμωσης, τόσο ενισχύεται η παρεμπόδιση. (Τσακίρης, 2017)

Πίνακας 8. Χημική ανάλυση οίνων με κριτήριο την επίδραση της θερμοκρασίας ζύμωσης (Torija et al., 2003)

Chemical analyses of wines (end products)					
Concentration (g l ⁻¹)	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
Ethanol	93.60 ± 0.56 ^a	93.04 ± 0.88	90.00 ± 0.56	89.60 ± 0.00	79.52 ± 1.84
Glycerol	6.05 ± 0.11	6.59 ± 0.07	6.91 ± 0.11	7.18 ± 0.02	7.38 ± 0.08
Acetaldehyde	0.05 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Succinic acid	0.74 ± 0.06	0.89 ± 0.04	0.77 ± 0.06	0.92 ± 0.08	0.70 ± 0.03
Acetic acid	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.22 ± 0.04
Sum of products	100.52	100.74	97.86	97.87	87.84
CO ₂	89.53	88.99	86.08	85.70	76.06
Products+ CO ₂	190.05	189.73	183.94	183.57	163.90
Ethanol yield ^b	47.51	47.23	45.68	45.48	40.36

^a Mean ± SD.

^b Ethanol produced (g l⁻¹) × 100/initial sugars (g l⁻¹).

Απενεργοποιημένα κύτταρα ζύμης. Κατά τη ζύμωση παράγεται πλήθος μεταβολιτών που παρεμποδίζουν τον μεταβολισμό και την ανάπτυξη της ζύμης. **Η παρεμπόδιση** αυτή, οφείλεται σε ενώσεις με C6, C8, C10 λιπαρά οξέα, τις τανίνες, το διοξείδιο του άνθρακα που αυξάνει την πίεση και την πρόωξη ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων/botrytis cinerea. Η προσθήκη απενεργοποιημένων κυττάρων ζύμης **απομακρύνει τους παρεμποδιστές** και επιδρά θετικά στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου (Παραμυθιώτης, πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2018).

1.4.9.3 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΘΑΝΑΤΩΣΗΣ

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης μπορεί να εμφανιστεί το φαινόμενο θανάτωσης. Πρόκειται για την έκκριση τοξινών, οι οποίες θανατώνουν τα **ευαίσθητα στελέχη των ζυμών. Οι τοξίνες αυτές είναι πρωτεΐνες σχετικά μικρού μοριακού βάρους, υπεύθυνες για την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης ή την αναστολή παραγωγής νουκλεϊνικών οξέων.** Η δράση τους εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Είναι δυνατό με μεθόδους της βιοτεχνολογίας οι ζυμες να αποκτήσουν τη δυνατότητα να παράγουν τέτοιου είδους πρωτεΐνες. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται ώστε να αποφεύγονται τέτοιου είδους ζύμες να προστίθενται σε οίνο που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί ως οίνος βάσης για την παραγωγή αφρωδών οίνων, γιατί η παρουσία τους θα παρεμποδίσει τη δεύτερη αλκοολική ζύμωση (βλέπε 1.4.8.3.3 τοξικός παράγοντας «killer»).

1.4.9.4 ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ

Διαφορετικές περιβαλλοντικές, βιολογικές και χημικές συνθήκες είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την αλκοολική ζύμωση. Οι εξωγενείς παράγοντες παρεμπόδισης της αλκοολικής ζύμωσης είναι το περιβάλλον ανάπτυξης, η σχετική υγρασία, θερμοκρασία, η σύσταση της ατμόσφαιρας, η σύσταση μικρο-οικοσυστήματος. Επιπλέον, ο θειώδης ανυδρίτης, τα αντιβιοτικά, τα αντισηπτικά και άλλα χημικά προϊόντα, όπως τα φυτοφάρμακα και NVC (Chemical compound with antimicrobial properties, effectively kill microbial strains, including antibiotic-resistant). (Lu Wang et al., 2011)

Ο τρόπος δράσης του **θειώδη ανυδρίτη** δεν είναι επακριβώς γνωστός. Δρα δεσμεύοντας την ακεταλδεύδη. Η ένωση ακεταλδεύδης-θειώδη ανυδρίτη δρα παρεμποδιστικά. Είναι πιθανόν να καταστρέφει τις διθειούχες γέφυρες της κυτταρικής μεμβράνης. Η δράση του δεν είναι ακαριαία. Προσθήκη 25g/hl μετά από 5 ώρες αφήνει σε ζωή το 90% των

ζυμών. Η ζύμωση αρχικά μοιάζει να έχει παρεμποδιστεί αυτομάτως. Όμως μία βραδεία γλυκόλυση εξακολουθεί να πραγματοποιείται. Γι' αυτό το λόγο, μετά τη θείωση, για να επιτευχθεί οριστικό σταματημα της ζύμωσης πρέπει να απομακρυνθούν οι ζύμες το συντομότερο δυνατό.

Τα **αντιβιοτικά** αποτελούν ένα βιολογικό παράγοντα αναστολής ή παρεμπόδισης των ζυμών. Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες που παράγονται από ορισμένους μικροοργανισμούς και είναι ικανοί να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, όπως των βακτηρίων. Τα κοινά αντιβιοτικά (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη) δεν έχουν καμία δράση εναντίον των ζυμών, αλλά υπάρχουν αντιβιοτικά που είναι πολύ αποτελεσματικά, όπως η **ακτιδιόνη, πιμαρισίνη, η μυκοστατίνη, η μυκοσουμπιλίνη** (Ρούμπος, 1996). Η χρήση τους είναι απαγορευμένη.

Ακτιδιόνη: Είναι υποπροϊόν στρεπτομυκίνης και είναι πολύ δραστική επί των ζυμών. Δόση 0,5 mg/l είναι αρκετή για να σταθεροποιήσει ένα κρασί. Είναι τοξική και η χρήση του απαγορεύεται.

Πιμαρισίνη: Είναι πολύ δραστική επί των ζυμών που μπορούν να προκαλέσουν αναζυμώσεις. Στο γλεύκος οι δραστικές δόσεις είναι: 20 mg/l για τους *Saccharomyces bayanus cerevisiae* 10 mg/l για τον *Saccharomyces bailii*, 10 mg/l για τον *Saccharomyces ludwigii*. Για το κρασί, οι δραστικές δόσεις είναι: 2 mg/l για τον *Saccharomyces cerevisiae*, 5 mg/l για τον *Saccharomyces bayanus*, 1mg/l για τον *Saccharomyces ludwigi*. Χρησιμοποιείται στην αλλαντοποιία και τυροκομία και η χρησιμοποίησή του στην οινοποιία είναι πολύ ενδιαφέρουσα. Υπάρχουν και άλλα αντιβιοτικά με δράση στις ζύμες. Τα **χημικά αντισηπτικά** που εμποδίζουν την ανάπτυξη των ζυμών διακρίνονται σε μυκητοστατικά και μυκητοκτόνα. Τα μυκητοκτόνα αναστέλλουν ή παραλύουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ζυμών, ενώ τα μυκητοκτόνα σκοτώνουν τα κύτταρα τους. Τα κυριότερα αντισηπτικά που χρησιμοποιούνται στην οινοποιία είναι ο θειώδης ανυδρίτης, το σορβικό οξύ και το βενζοϊκό οξύ (Ρούμπος, 1996). Η δράση τους γενικά είναι λιγότερο επιλεκτική. Ο θειώδης ανυδρίτης δρα δεσμεύοντας την ακεταλδεΐδη. Η ένωση ακεταλδεΐδης-θειώδη ανυδρίτη δρα παρεμποδιστικά. Είναι πιθανόν να καταστρέψει τις διθειούχες γέφυρες της κυτταρικής μεμβράνης. Η δράση τους δεν είναι ακαριαία. Για το σορβικό οξύ δραστική δόση είναι 100-200 mg/l στο κρασί, 500-2.000 mg/l στο γλεύκος. Για το σαλικυλικό οξύ και τα άλατα του 200-500 mg/l στο κρασί και 500-1.000 mg/l στο γλεύκος. Για το βενζοϊκό οξύ 200-500 mg/l στο κρασί και 1.000 mg/l στο γλεύκος. Από τα φυτοφάρμακα (εντομοκτόνα, παρασιτοκτόνα, μυκητοκτόνα), τα παράγωγα του θείου και του φωσφόρου είναι τα πιο παρεμποδιστικά. Θανατώνουν τις ζύμες που βρίσκονται πάνω στο σταφύλι. Παρεμποδίζουν τη ζύμωση. Προσθήκη ζυμών μπορεί να ξεπεράσει αυτό το εμπόδιο, αν και στο τέλος της ζύμωσης παρατηρούνται δυσκολίες. Ένας μεγάλος τομέας της οινολογίας μελετά την επίδραση των διαφόρων φυτοφαρμάκων στις ζύμες του σταφυλιού, την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης και την ανίχνευση των μικροποσοτήτων οι οποίες μπορούν να ανιχνευτούν στον οίνο. (Τσακίρης, 2017)

1.4.10 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΕΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ

Υπάρχουν δύο γενικές κατηγορίες προβλημάτων για τον οινοποιό που μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης: α) υποτονικές ή «κολλημένες» ζυμώσεις, όπου ο ρυθμός ζύμωσης των σακχάρων επιβραδύνεται δραματικά ή ακόμα και αν φτάσει στη ξηρότητα, το τέλος της ζύμωσης είναι ιδιαίτερα παρατεταμένο και β) η παραγωγή ελαττωματικών οσμών, μη αποδεκτών οργανοληπτικά.

A. «ΚΟΛΛΗΜΕΝΕΣ» Η ΥΠΟΤΟΝΙΚΕΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ

Στην πορεία της αλκοολικής ζύμωσης σχηματίζονται από τις ζύμες προϊόντα που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και τη δράση τους. Οι Υπεύθυνοι παράγοντες για τη διακοπή της ζύμωσης και επανάκαμψη της, παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα και επιγραμματικά είναι οι εξής: ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, τοξικότητα αιθανόλης, αναστολή υποστρώματος, τοξίνη killer, επιπτώσεις της θερμοκρασίας. Η πιο συνήθης είναι η τοξικότητα της αιθανόλης. Η αιθανόλη προκύπτει από την αλκοολική ζύμωση των ζυμώσιμων σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και επομένως η περιεκτικότητα ενός οίνου σε αιθανόλη είναι άμεσα εξαρτώμενη από τον βαθμό ωρίμανσης των σταφυλιών, δηλαδή από την συγκέντρωσή τους σε σάκχαρα τη στιγμή του τρυγητού. Τα ποσοστά της αιθανόλης κυμαίνονται μεταξύ 10% και 16% vol στους ξηρούς οίνους (Ribéreau-Gayon, et al., 2006), με τους γλυκείς οίνους να έχουν τις υψηλότερες περιεκτικότητες και τους ερυθρούς ξηρούς που προέρχονται από βόρειες χώρες να εμφανίζουν τις χαμηλότερες. Η υπερβολική περιεκτικότητα σακχάρων έχει επίδραση στην ανάπτυξη της ζύμης και την ζύμωση, επίσης η παραγωγή υπερβολικών ποσοτήτων αιθανόλης, που προέρχεται από τη συγκομιδή υπερώριμων σταφυλιών, μπορεί επίσης να διαδραματίσει κάποιο ρόλο. Η ανασταλτική επίδραση της αιθανόλης θα πρέπει να παρατηρηθεί νωρίς στη ζύμωση, δεδομένου ότι οι ρυθμοί ανάπτυξης της ζύμης είναι πιο ευαίσθητοι στην αναστολή της αιθανόλης από ότι οι ρυθμοί ζύμωσης (Leao & Van Uden, 1985, Navarro & Durand 1978). Η ανασταλτική επίδραση της αιθανόλης στους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης των ζυμών έχει μετρηθεί (Aiba et al., 1968, Thomas & Rose, 1979, Beavan et al., 1982) και έχουν

προκύψει μαθηματικά μοντέλα για να δείξουν τη σχέση μεταξύ της ανάπτυξης της ζύμης και της συγκέντρωσης της αιθανόλης (Boulton et al.2018, Pamment 1989). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η αιθανόλη αναστέλλει την πρόσληψη σακχάρων και αμινοξέων (Kunkee & Bisson, 1993), τα οποία πρέπει επίσης να συμβάλλουν στην ανασταλτική επίδραση κατά τη φάση ανάπτυξης. Ωστόσο, στη ζύμωση του χυμού των σταφυλιών, η συγκέντρωση της αιθανόλης που απαιτείται για να δείξει μια επίδραση στο ρυθμό ανάπτυξης, δεν επέρχεται, στην πραγματικότητα, μέχρις ότου οι ζύμες πλησιάσουν τη στατική φάση ανάπτυξης (Pamment 1989). Ο αξιοσημείωτα βραδύτερος ρυθμός ανάπτυξης των ζυμών σε χυμό σταφυλιών, σε σύγκριση με εκείνον σε εργαστηριακό μέσο, είναι αποτέλεσμα της καταστολής των σακχάρων – καταστολή της γλυκόζης – και όχι τοξικότητας στην αιθανόλη. Η ανασταλτική επίδραση στη δραστηριότητα της ζύμης, προφανώς στο τέλος των ζυμώσεων των χυμών των σταφυλιών, προέρχεται από την τοξικότητα της αιθανόλης. Οι τοξικές επιδράσεις της φαίνεται να είναι αρκετές και οι αποκρίσεις των ζυμών στην πρόκληση της αιθανόλης επίσης πολλές, αλλά η κύρια επίδραση της είναι στην πλασματική μεμβράνη της ζύμης και στην διαπερατότητά της (αλλαγές ρευστότητας). Η τοξικότητα της αιθανόλης για τη ζύμη είναι πολύπλοκη και προφανώς πολύπλευρη, (συσσώρευση στην εσωτερική συγκέντρωση αιθανόλης με αποτέλεσμα τη μετουσίωση των βασικών ενζύμων (Kunkee & Bisson, 1993). Ένας απλός μηχανισμός τοξικότητας φαίνεται να προκαλεί μια γενετυπική απάντηση. Ωστόσο, όλοι οι τρόποι έκθεσης των ζυμομυκήτων στην αιθανόλη, ακόμη και απλοειδή ετεροθαλικά στελέχη, δεν οδήγησαν ποτέ στην επιλογή ενός μεταλλαγμένου στελέχους με προφανώς αυξημένη ανοχή στην αιθανόλη. Η ανασταλτική επίδραση της αιθανόλης που παρατηρείται στο τέλος της ζύμωσης του οίνου, ειδικά σε αργές ζυμώσεις, μπορεί να οφείλεται στην επίδραση της ικανότητας της ζύμης του κυττάρου ή στην επίδραση της βιωσιμότητας. (Boulton et al, 2018)

Τέλος, αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι **τα θραύσματα του κυτταρικού τοιχώματος που προέρχονται από την αυτόλυση**, όταν προστίθενται υπό αναλογία 0,2-1 g/L μπορούν να προλάβουν τη διακοπή της ζύμωσης που οφείλεται σε Αυξημένη αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (250g/L), Παρουσία υπολειμμάτων των σακχάρων, Υπερβολική απολάσπωση, Ανάπτυξη της γκρίζας μούχλας στα σταφύλια(Botrytis cinerea), Υψηλή θερμοκρασία στην πορεία της ζύμωσης. Η διακοπή της ζύμωσης αποκαθίσταται με προσθήκη 0,5g θραυσμάτων του κυτταρικού τοιχώματος/ L οινολεύκου και αρχίζει 24 ώρες μετά την ενσωμάτωση μιας καλλιέργειας ζύμης (1 εκατομμύριο κυττάρων ζύμης/ ml). Τα θραύσματα του κυτταρικού τοιχώματος επηρεάζουν δυσμενώς την ποιότητα του οίνου. Υποκατάστατα, όπως η σκόνη της κυτταρίνης, η καζείνη, οι αλγινικές ενώσεις, η σκόνη υάλου, ο ενεργός άνθρακας κ.ά. δρουν προς την ίδια κατεύθυνση. Όλες οι ανωτέρω ουσίες προσροφούν τα λιπαρά οξέα και τους εστέρες τους και έτσι δίνουν την ευκαιρία για ανάκαμψη της ζύμωσης.

Πίνακας 9. Αιτίες «κολλημένων» ή υποτονικών ζυμώσεων

Περιορισμός θρεπτικών ουσιών (ανεπάρκεια)	Μακροθρεπτικά	Άζωτο
		Φωσφορικό
	Μικροθρεπτικά	Βιταμίνες
		Μεταλλικά στοιχεία
Αναστολή υπόστρωματος	Ακατάλληλα ανεπτυγμένο εμβόλιο	
	Η περίσσεια σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη), Υψηλό Brix	

<p>Τοξικότητα αιθανόλης Η Αιθανόλη που δρα παρεμποδιστικά, όταν η συγκέντρωσή της φθάνει σε ορισμένο επίπεδο, διαφορετική για κάθε στέλεχος του ίδιου είδους.</p>	<p>Ανεπάρκεια παραγόντων επιβίωσης</p>	<p>Στερόλες, ακόρεστα λιπαρά οξέα</p> <p>Τα Λιπαρά Οξέα που εκκρίνονται από το κύτταρο και μεταφέρονται στο γλεύκος, ιδιαίτερα το οκτανοϊκό, δεκανοϊκό και δωδεκανοϊκό και οι εστέρες τους. Ο παρεμποδιστικός ρόλος των λιπαρών οξέων στη δράση των ζυμών έχει διαπιστωθεί και στην περίπτωση της οινοποίησης και της ζυθοποίησης. Σε μεγάλη συγκέντρωση 3mg/L μπορούν να διακόψουν την Αλκοολική ζύμωση. Οι Στερόλες του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτοπλασματικής μεμβράνης μπλοκάρουν την αλκοολική ζύμωση (επηρεάζουν την ανταλλαγή συστατικών μεταξύ του περιεχομένου του κυττάρου και του περιβάλλοντος).</p>
	<p>Ανεπάρκεια Οξυγόνου</p>	
	<p>Ακατάλληλα ανεπτυγμένο εμβόλιο</p>	
<p>Τοξικές ουσίες π.χ. ως συνέπεια μικροβιακής δραστηριότητας, μυκοτοξίνη trichothecene, T2, που παράγεται από είδη Fusarium, Mycothecium, Trichothecium, Cephalosporium και Stachybotrys, αναστέλλει τον Saccharomyces (Koshinsky et al., 1992).</p>	<p>Οργανικά οξέα</p>	<p>Οξικό</p> <p>Προπιονικό οξύ</p> <p>Βουτυρικό οξύ</p> <p>Πεντανοϊκό οξύ</p>
	<p>Λιπαρά οξέα</p>	<p>Cis αντί για trans</p> <p>Μέση αλυσίδα C₆-C₁₀</p>
	<p>Υπολείμματα ζιζανιοκτόνων</p>	
	<p>Υπολείμματα φυτοφαρμάκων</p>	
	<p>Μικροβιακές τοξίνες</p>	<p>Παράγοντας killer</p> <p>Μυκοτοξίνες</p>
	<p>Υπέρβαση θειώδη ανυδρίτη</p>	
	<p>Υπερψύχωση της ζύμωσης</p> <p>Υπερθέρμανση εξαιτίας απελευθέρωσης της θερμότητας μεταβολισμού της ζύμης</p>	
<p>Θερμοκρασιακό σοκ Αν κολλήσουν οι ζυμώσεις δε ξεκινούν επιμέρους με απλή ρύθμιση της θερμοκρασίας, ακόμη και αν αυτό ήταν το αρχικό πρόβλημα θερμοκρασία επίσης επηρεάζει τη ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης. Ο συνδυασμός της αιθανόλης και των ακραίων θερμοοίνων είναι ιδιαίτερα προκλητικός για ένα μικροβιακό κύτταρο από την άποψη της διατήρησης της λειτουργίας και της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης.</p>		

B. ΠΑΡΑΓΩΓΗ OFF-ΧΑΡΑΚΤΗΡΩΝ

Η δεύτερη κατηγορία προβλημάτων της ζύμωσης, αφορά την παραγωγή off- χαρακτήρων, αρωματικών ουσιών ή off-flavors που μειώνουν την συνολική ποιότητα του οίνου, όπως το οξικό οξύ και οι ανώτερες αλκοόλες (fusel). Επιπλέον, όταν λάβει χώρα υπερβολική προσθήκη αζώτου, τότε υπάρχει κίνδυνος για τη μικροβιολογική σταθερότητα του τελικού προϊόντος, την αλλοίωση του αρωματικού χαρακτήρα και την παραγωγή καρβαμικού αιθυλεστέρα. Τα στελέχη Saccharomyces έχουν, επίσης, εμπλακεί στην παραγωγή ορισμένων πτητικών φαινολών στον οίνο (Chatonnet et al., 1993). Η ζύμη ενζυμικά παράγει βινυλ-φαινόλες από φυτικούς φαινολικούς προδρόμους. Αυτές οι ενώσεις μπορεί να έχουν χαρακτηριστικό φαρμακευτικό ή φαινολικό άρωμα. Off-Χαρακτήρες παράγουν οι πτητικές ενώσεις που περιέχουν θείο, στοιχειακό θείο, αμινο-άζωτο, παρουσία θειώδους - επιδράσεις στελέχους, ανεπάρκεια βιταμινών, καθώς και άλλοι δευτερεύοντες παράγοντες.

1.5 ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Το άρωμα είναι ένα από τα πλέον ξεχωριστά χαρακτηριστικά του οίνου (Lambrechts & Pretorius, 2000). Συχνά χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία όροι, όπως *flavor*, *aroma* ή *bouquet* που μεταφράζονται με σχετική ακρίβεια ως «άρωμα στόματος» και αναφέρονται στον συνδυασμό μεταξύ οσμής και γεύσης. Η χημική σύσταση του οίνου είναι το θεμέλιο της αρωματικής του ποιότητας. Μαζί με τα συστατικά της ποικιλίας της σταφυλής, πολλές από τις αρωματικές ενώσεις που υπάρχουν στον οίνο, παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους από τις ζύμες (Rodríguez, et al., 2016). Απαραίτητη ιδιότητα ενός συστατικού ώστε να είναι αρωματικό αποτελεί η πτητικότητα του, η οποία επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες του οίνου. Μερικοί από αυτούς είναι η περιεκτικότητα του μέσου σε σάκχαρα, ο αλκοολικός τίτλος και η θερμοκρασία. Βέβαια σημαντικό ρόλο παίζουν και τα μη πτητικά συστατικά (Jackson, 2002). Πάνω από 400 πτητικά συστατικά έχουν εντοπιστεί σε οίνους, μέσω της ενόργανης ανάλυσης και με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας. Μάλιστα αρκετά από αυτά έχουν προσδιοριστεί ποσοτικά σε μεγάλο αριθμό οίνων. Διακρίνονται σε μικρές έως πολύ μικρές συγκεντρώσεις και εκφράζονται σε ppm (mg/L), ppb (μg/L) και ppt (nm/L). Καθοριστικό ρόλο στο αρωματικό δυναμικό δύναται να έχουν συστατικά που βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, αντίθετα με άλλα που μπορεί να είναι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και να εξασφαλίζουν μικρή συμβολή σε αυτό (Jackson 2002, Ribereau-Gayon et al., 2006).

Η πολυπλοκότητα τόσο της γεύσης όσο και του αρώματος των οίνων οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στη δράση των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τους. Την πλειονότητα των πτητικών ουσιών που προέρχονται από το μεταβολισμό του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* αποτελούν η αιθανόλη, η γλυκερόλη και το διοξείδιο του άνθρακα (Fleet, 2003). Η συνεισφορά των άγριων ζυμών στα πτητικά χαρακτηριστικά και συνεπώς στο αρωματικό προφίλ ενός οίνου, φαίνεται να είναι καθοριστική στην σύνθεση των συστατικών αυτών. Σε αρκετές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί φαίνεται πως η ζύμωση από καλλιέργειες άγριων ζυμών, είτε ταυτόχρονα, είτε πριν τη ζύμωση από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* επιφέρει καλύτερο οργανοληπτικό αποτέλεσμα (Lambrechts & Pretorius, 2000). Μάλιστα, αιτία για την παραγωγή των πτητικών αρωματικών ενώσεων, από τις άγριες ζύμες, στις περιπτώσεις αυτές θεωρείται πως είναι ο ανταγωνισμός μεταξύ των στελεχών αυτών με το μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* (Garde – Cerdan & Ancin – Azpilicueta, 2005).

1.5.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΡΩΜΑΤΩΝ

Το άρωμα των οίνων οφείλεται στις πτητικές ενώσεις που περιέχονται σε αυτούς και διακρίνεται σε δύο μεγάλες δύο κατηγορίες ανάλογα με την προέλευσή τους. Εκείνες που συνιστούν **το άρωμα στους νέους οίνους (πρωτογενές και δευτερογενές)** και εκείνες που συνιστούν **το «μπουκέτο» στους παλαιωμένους (τριτογενές)**. Αναλυτικότερα, το άρωμα ενός νέου οίνου συντίθεται από το πρωτογενές και το δευτερογενές άρωμα. Ως Πρωτογενές άρωμα (ποικιλίας), χαρακτηρίζεται αυτό, το οποίο προέρχεται από αρωματικές ουσίες που περιέχει το σταφύλι και αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό για κάθε ποικιλία. Σε αυτό ανήκουν διάφορες τάξεις χημικών ενώσεων, με σημαντικότερα τα τερπένια, τις τερπενόλες (χαρακτηριστικά των μοσχάτων ποικιλιών), τις πυραζίνες, τις φαινολικές ενώσεις αλλά και αλκοόλες όπως μεθανόλη, εξανόλη και θειόλες. Το Δευτερογενές άρωμα είναι ουσιαστικά το άρωμα που προκύπτει από τη ζύμωση και είναι χαρακτηριστικό των ζυμών και των συνθηκών που επικρατούν. Όσον αφορά στις αρωματικές αυτές ενώσεις, οι οποίες σχηματίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση πρόκειται κυρίως για ανώτερες αλκοόλες και εστέρες, καθώς επίσης, τα πτητικά λιπαρά οξέα, οι αλδεΐδες και οι θειούχες ενώσεις

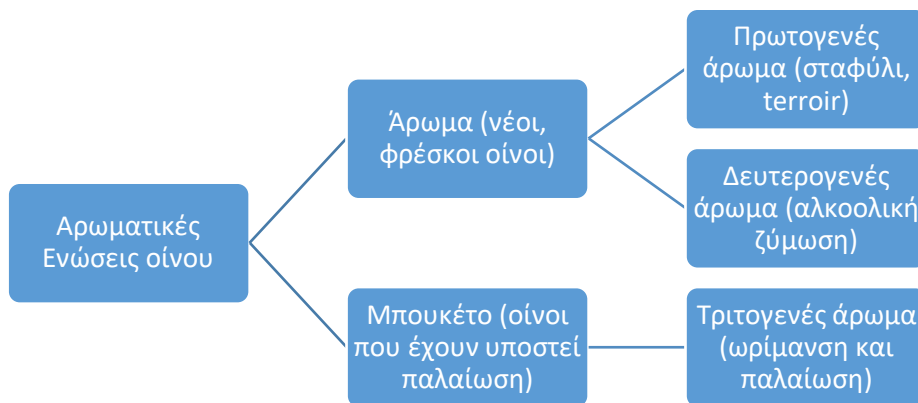
Η ανάπτυξη του αρωματικού «μπουκέτου» (ανθοσμίας) κατά την παλαίωση του οίνου προκύπτει από το μετασχηματισμό των συστατικών του αρώματος των νέων οίνων. Το τριτογενές άρωμα, όπως καλείται, αποτελεί το άρωμα που αποκτά ο οίνος από τις διεργασίες ωρίμανσης και παλαίωσης που ακολουθεί, δίνοντας ενώσεις με ευχάριστο άρωμα, όπως οι Εστέρες (σχηματισμός εστέρων μέσω χημικών αντιδράσεων εστεροποίησης της αιθανόλης με οξέα του οίνου όπως το ηλεκτρικό, το τρυγικό, το μηλικό, το κιτρικό), οι λακτονες, οι φουμαρικές ενώσεις, οι αλδεΐδες κ.ά. **Είναι γνωστό σήμερα, ότι το άρωμα και το μπουκέτο των οίνων οφείλονται, κυρίως, στις ανώτερες αλκοόλες και τους εστέρες. Σημαντική θεωρείται, ωστόσο, η συμμετοχή και άλλων οσμηρών ενώσεων, όπως είναι οι αλδεΐδες, οι κετόνες, τα τερπένια, οι πυραζίνες, οι λακτόνες και φουρανόνες, τα πτητικά οξέα, οι αμίνες, οι φαινόλες και οι θειούχες ενώσεις** (Clarke and Bakker, 2004).

(Σουφλερός, 2015) Αυτό που διαφοροποιεί τον οίνο σε τόσο μεγάλο βαθμό, σε σχέση με την πρώτη ύλη παραγωγής του, το γλεύκος, δεν είναι τίποτε άλλο από τον συνδυασμό του δευτερογενούς και του τριτογενούς αρώματος. Παρόλα αυτά, την ταυτότητα σε έναν οίνο τη δίνει το πρωτογενές άρωμα, καθώς τα αρωματικά συστατικά του σταφυλιού είναι αυτά που παίζουν τον κύριο ρόλο στην ποιότητα και στον τύπο του οίνου. (Τσακίρης, 2017).

Ο μετασχηματισμός αυτός για ορισμένους τύπους οίνων (Madera, Xeres) είναι οξειδωτικός, ενώ για τους περισσότερους τύπους λεπτών οίνων είναι αναγωγικός. Οι ενώσεις αυτές, επειδή περιέχονται στους οίνους σε πολύ μικρές ποσότητες, παρουσιάζουν αρκετές δυσκολίες στη μελέτη τους, με τις αναλυτικές μεθόδους. Ο προσδιορισμός τους είναι δυνατός

μετά την εκχύλιση με κάποιο διαλύτη (αιθέρας, εξάνιο, πεντάνιο κ.ά.) και τη χρήση της αερίου χρωματογραφίας (τριχοειδής στήλης), η οποία δίνει τη δυνατότητα για άμεσο και αποτελεσματικό προσδιορισμό των αρωματικών ουσιών του οίνου.

Ακολουθεί περιγραφή των κυριότερων αρωματικών ενώσεων και κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με τη χημική τους ταυτότητα, αλλά και τη συνεισφορά τους στο άρωμα του τελικού προϊόντος. Οι ενώσεις που απαντώνται συχνότερα στον οίνο ανήκουν στις ακόλουθες κατηγορίες.



Εικόνα 21. Κατηγοριοποίηση αρώματος οίνου

Πίνακας 10. Κατηγοριοποίηση των αρωματικών ουσιών σύμφωνα με την προέλευσή τους (Τσακίρης, 2017)

Πρωτογενές άρωμα	Δευτερογενές άρωμα	Τριτογενές άρωμα
Τερπένια	Ανώτερες αλκοόλες	Εστέρες
Τερπενόλες	Εστέρες	Λακτόνες
Πυραζίνες	Πτητικά λιπαρά οξέα	Φουμαρικές ενώσεις
θειόλες	Αλεϋδες	Αλδεϋδες

1.5.1.1 ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ ΟΙΝΟΥ

1.5.1.1.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΔΙΑΜΟΡΦΩΝΟΥΝ ΤΟ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ

Ανάμεσα στα συστατικά του αρώματος του οίνου, οι οσμηρές πτητικές ενώσεις που προέρχονται από το σταφύλι, χαρακτηριστικές στη διαμόρφωση της ποικιλίας και της έκφρασης της ανάλογα με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην **ποιότητα και τυπικότητα των οίνων**. Αυτές αποτελούν το «ποικιλιακό» άρωμα των οίνων, το οποίο μπορεί να είναι διαφορετικό από το άρωμα που προσδίδουν οι ενώσεις που βρίσκονται σε ελεύθερη κατάσταση στο σταφύλι. Οι πρόδρομες ενώσεις, οι άοσμες μορφές, οσμηρών πτητικών ενώσεων που υπάρχουν στο σταφύλι παίζουν στην περίπτωση αυτή σημαντικότερο ρόλο στη διαμόρφωση του ποικιλιακού αρώματος του οίνου. Τα πτητικά συστατικά του αρώματος που προέρχονται από το σταφύλι, ανήκουν σε διάφορες τάξεις χημικών ενώσεων τεσσάρων βασικών οικογενειών: τερπένια (χαρακτηριστικά των μοσχάτων ποικιλιών), νορισοπρενοειδή με 13 άτομα άνθρακα, (μεθοξυ)πυραζίνες καθώς και ορισμένες θειόλες και θειούχες ενώσεις (Ribereau-Gayon et al., 2000). (Ribereau-Gayon et al., 2000). Επιπλέον, αναφέρονται οι φαινολικές ενώσεις, αλλά και αλκοόλες όπως η μεθανόλη και η εξανόλη.

A. ΤΕΡΠΕΝΙΑ

Στον φυσικό κόσμο, υπάρχουν τουλάχιστον 4.000 τερπενικές ενώσεις, στις οποίες οφείλεται και το άρωμα των λουλουδιών, των φύλλων, του ξύλου, των φρούτων και των σπόρων. Στους οίνους έχουν εντοπισθεί περισσότερες από 70 τερπενοειδείς ενώσεις. Αποτελούν την πιο πολυάριθμη ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών, με κοινή βιοσυνθετική προέλευση και είναι αδιάλυτες στο νερό. Οι ενώσεις που έχουν ανιχνευτεί και παρουσιάζουν ενδιαφέρον στο κρασί, είναι τα σεσκιτερπένια και τα μονοτερπένια. Γενικά πρόκειται για ενώσεις με έντονο και ευχάριστο χαρακτήρα αρώματος και έχουν σημαντική οργανοληπτική επίδραση. Συμβάλλουν στο πρωτογενές ποικιλιακό άρωμα. Οι οσφρητικές ουσίες που εκλύονται παραπέμπουν σε εσπεριδοειδή, λουλούδια, με αρώματα βιολέτας και τριαντάφυλλου (Lambropoulos and Roussis, 2007, Σουφλερός, 2015).

Οι τερπενικές ενώσεις ή τερπένια, αποτελούν χαρακτηριστικά του πρωτεύοντος αρώματος (arome primaire) ορισμένων ποικιλιών με έντονο άρωμα (π.χ. Μοσχάτο, Riesling). Είναι ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα και βρίσκονται στη φύση, κυρίως ως συστατικά των αιθερίων ελαίων. Πολλά τερπένια, όπως: ορτιενόλη, κιτρονελλόλη, τερπινενόλη-4, σολανόνη, σαφρόλη, φαρνεσόλη, λιμονένιο κλπ, απαντώνται, επίσης, στην ποικιλία του Μοσχάτου, σύμφωνα με ερευνητικές εργασίες. Η γερανιόλη και η νερόλη μετατρέπονται εύκολα σε α-τερπινεόλη, η οποία είναι ένωση λιγότερο αρωματική, με οσμή καμφοράς. Η λιναλόλη μετατρέπεται στα οξειδιά της (A, B, C, D), των οποίων επίσης το άρωμα είναι πιο αδύναμο. Από άποψη οργανοληπτική, οι πιο ενδιαφέρουσες είναι η λιναλόλη με άρωμα λεμονιού και η γερανιόλη με βαριά μυρωδιά λουλουδιών. Τα μονοτερπένια εμφανίζονται με διάφορες μορφές, δηλαδή ως υδρογονάνθρακες, αλδεΐδες, κετόνες εστέρες και αλκοόλες. Τα κυριότερα από τα τερπένια που βρίσκονται στα σταφύλια (κυρίως στο φλοιό των ραγών και λίγο στη σάρκα) και επομένως και στους οίνους, είναι οι τερπενικές αλκοόλες: λιναλόλη, νερόλη, γερανιόλη, α-τερπινεόλη και τέσσερα (4) οξειδιά (A, B, C, D) της λιναλόλης, ενώ μπορεί να είναι ελεύθερα ή με τη μορφή γλυκοζιτών. (González-Barreiro, et al., 2015).

Στην ομάδα των τερπενικών ενώσεων οφείλεται η χαρακτηριστική αρωματική νότα των εσπεριδοειδών (λεμόνι, πορτοκάλι, κίτρο, γκρέιπφρουτ), επιπλέον οι οσφρητικές ουσίες που εκλύονται παραπέμπουν σε λουλούδια, κυρίως τριαντάφυλλο (Lambropoulos and Roussis, 2007). Χαρακτηριστική ένωση αυτής της ομάδας είναι η κιτράλη (μίγμα δύο στερεοϊσομερών της γερανιάλης και της νεράλης) η οποία δίνει τον χαρακτήρα του ελαίου του λεμονιού και η νουκκατόνη με έντονο πικρό χαρακτήρα ως χαρακτηριστική ένωση του γκρέιπφρουτ (Ντουρτόγλου Θ.). Τα τερπένια στο αρωματικό χαρακτήρα του οίνου αναδεικνύουν χαρακτηριστικά αρώματα από λουλούδια, φρούτα, σπόρους, φύλλα, ξύλα και τις ρίζες του φυτού, όπως η α-ιονόλη έχει το άρωμα της βιολέτας, ενώ αντιθέτως η οκτενόλη έχει τη δυσάρεστη μυρωδιά της μούχλας. Σε αντίθεση με άλλα συστατικά στον οίνο, τα τερπένια κυρίως προέρχονται από τα σταφύλια. Στην πραγματικότητα μόνο τα τερπένια που βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή συμβάλουν στον αρωματικό χαρακτήρα του οίνου. Αξιοσημείωτο είναι ακόμα το γεγονός ότι μεταξύ των τερπενίων υπάρχουν αλληλεπιδράσεις, όπως η συνέργεια, όπου μια ένωση μπορεί να αυξήσει το άρωμα μιας άλλης και το σύνολο των ενώσεων να είναι πιο αρωματικό από το άθροισμα του αρώματος από τις οποίες αποτελείται.

Αν και οι περισσότερες ενώσεις βρίσκονται στον οίνο, οι τερπενικές ουσίες προέρχονται από τα σταφύλια και ανιχνεύονται κυρίως στους λευκούς οίνους που προέρχονται από μοσχάτες ποικιλίες, όπως το Muscat de Frontignan, το Μοσχάτο Αλεξανδρείας, καθώς και στις ποικιλίες που αποτελούν διασταύρωση, δίνοντας ιδιαίτερο οργανοληπτικό χαρακτήρα και προσδίδοντας αρωματικό πλούτο στους παραγόμενους οίνους, καθώς οι συγκεντρώσεις των μονοτερπενίων στους παραγόμενους οίνους ξεπερνούν το αντίστοιχο κατώφλι αίχνευσης των ουσιών (δηλαδή την συγκέντρωση της ουσίας όπου είναι δυνατή η ανίχνευση διαφοράς ανάμεσα σε δύο δείγματα) (Darriet et al. 2012). Τα μονοτερπένια έχουν περισσότερο ή λιγότερο έντονη επίδραση και στο άρωμα των σταφυλιών και οίνων που προκύπτουν από τις ποικιλίες Gewürztraminer, Albariño, Scheurebe και Auxerrois, και σε κάποιο βαθμό και στο άρωμα των ποικιλιών Riesling, Muscadelle και ορισμένων κλώνων Chardonnay. Αυτές οι μονοτερπενικές αλκοόλες συχνά απαντώνται σε πολλές ποικιλίες (π.χ. Sauvignon, Syrah, Cabernet Sauvignon, κλπ.) σε επίπεδα γενικότερα πιο χαμηλά από το κατώφλι αναγνώρισης των οσμών (Darriet et al. 2012).

Στις μοσχάτες ποικιλίες, εντοπίζονται στη ράγα, κατά κύριο λόγο στη φλούδα. Αυτό όμως δεν ισχύει για όλες τις ποικιλίες, όπως για παράδειγμα για το Μοσχάτο Αλεξανδρείας όπου τα περισσότερα τερπένια βρίσκονται στη σάρκα των σταφυλιών, κάτι που έχει μεγάλη τεχνολογική σημασία, αφού υποδεικνύει ότι δεν είναι απαραίτητη η παραμονή του χυμού σε επαφή με τα στέμφυλα. Το περιεχόμενο σε τερπένια εξαρτάται από την ποικιλία της αμπέλου και δεν επηρεάζεται από την τεχνική οινοποίησης. Γι' αυτό αποδείχθηκε ότι η διαφοροποίηση των ποικιλιών αμπέλου, μπορεί να πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τα τερπένια, μέσω στατιστικής επεξεργασίας, αντί των αρωμάτων που προκύπτουν από τη ζύμωση. (Τσακίρης, 2017) Οι ερυθρές ποικιλίες χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα τερπενίων. (Βουκίδης, 2014). Ακόμη, πολλά γονίδια που παίρνουν μέρος στο μεταβολισμό των ισοπρενίων και τερπενίων έχουν ταυτοποιηθεί σε σταφύλια, κάτι που φανερώνει σπουδαίο ρόλο των τερπενοειδών στην εξέλιξη των σταφυλιών ή/και σε αντοχή από ασθένειες και εχθρούς (Βουκίδης, 2014). Το άρωμα των λεγόμενων αρωματικών ποικιλιών, οφείλεται σε τερπενικές ενώσεις όπως τερπινεόλη, λιναλόλη, γερανιόλη νερόλη και σε παράγωγα αυτών. Η συνολική συγκέντρωση

αυτών των ενώσεων είναι 1-3 mg/l. Οι ενώσεις αυτές κατά την παλαίωση του οίνου, οξειδώνονται σε ενώσεις λιγότερο αρωματικές. Από τις πιο σημαντικές τερπενικές μονοαλκοόλες, που διαμορφώνουν το χαρακτηριστικό άρωμα της ποικιλίας **Μοσχάτο** είναι: Λιναλοόλη (οσμή τριαντάφυλλου ή κοριανδρου ή περγαμόντου), Κιτρονελλόλη (οσμή βοτάνων-σιτρονέλλας), α-τερπινεόλης (οσμή lily of the valley), οτριενόλης (οσμή φλαμουριάς). Νερόλη (χορτώδη οσμή ή οσμή τριαντάφυλλου) είναι ισομερές της Γερανιόλης, Γερανιόλη (οσμή τριαντάφυλλου), **τερπινενόλη-4, σολανόνη, σαφρόλη, φαρνεσόλη, λιμονένιο** κλπ. (Σουφλερός, 2015).

Πίνακας 11. Τερπένια (Σύμπουρα, 2009)

Αριθμός ατόμων άνθρακα	Χημικός Τύπος	Κατηγορία ενώσεων	Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι
5	C ₅ H ₈	Ισοπρένιο	Ισοπεντενυλοφωσφοτικό
10	C ₁₀ H ₁₆	Μονοτερπένια	Αιθέρια έλαια
15	C ₁₅ H ₂₄	Σεσκιτερπένια	Αιθέρια έλαια, ρητίνες, αμπισικό οξύ
20	C ₂₀ H ₃₂	Διτερπένια	Αιθέρια έλαια, ρητίνες, γιββερίλλινικό οξύ
30	C ₃₀ H ₄₈	Τριτερπένια	Ρητίνες, ελαστικό κόμμι
40	C ₄₀ H ₆₄	Τετρατερπένια	Καροτενοειδή, φυτοένιο
n	(C ₅ H ₈) _n	Πολυτερπένια	Ελαστικό κόμμι, γουτατέρκα

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των τερπενίων στο σταφύλι και τους οίνους ποκίλλουν

Η βιοσύνθεση των μονοτερπενίων εμφανίζεται κατά την ωρίμανση των σταφυλιών, καθώς οι ενώσεις αυτές εντοπίζονται κυρίως στο φλοιό της ράγας. Η συγκέντρωση (αναλογία και μορφή) τους αυξάνεται κατά τα πρώτα στάδια της ωρίμανσης, ενώ μειώνεται προς το τέλος της και η μείωση αυτή συνεχίζεται στη φάση της υπερωρίμανσης. **Η υπερβολική έκθεση δεν είναι ευνοϊκή για αυξημένα επίπεδα πτητικών μονοτερπενίων κατά την ωρίμανση των σταφυλιών. Το μέγιστο άρωμα** τερπενικής προέλευσης αποδίδεται από σταφύλια που συγκομίζονται όταν έχουν συγκέντρωση σακχάρων ελαφρώς μικρότερη από την μέγιστη δυνατή (Marais, 1986). Το **μέγεθος του καρπού** επιδρά επίσης στην ποσότητα των περιεχόμενων τερπενίων. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι μεγαλύτερες ποσότητες μονοτερπενίων ελεύθερων ή όχι βρίσκονται στους φλοιούς των σταφυλιών που προέρχονται από την ποικιλία Muscat. Συνεπώς η επαφή του γλεύκους με τους φλοιούς μπορεί να επηρεάσει την ένταση και την ποιότητα του αρώματος των παραγόμενων οίνων, και παρά το ότι δεν περιλαμβάνεται στην κλαστική λευκή οινοποίηση, η πραγματοποίηση της για μικρό χρονικό διάστημα, σαν προζυμωτική διεργασία, θα πρόσφερε βελτίωση της ποιότητας των οίνων (Riberau-Gayon, 2000, Marais, 1986, Gunata, Bayonove et al., 1985).

Η ζύμωση μεταβάλλει σημαντικά τη μονοτερπενική σύνθεση των σταφυλιών μέσω των χημικών και των μικροβιολογικών διεργασιών (Darrriet et al. 2012). Επίσης, κατά την παλαίωση των οίνων, η σύσταση και το περιεχόμενο σε τερπένια μεταβάλλεται και όσο περνάει ο χρόνος η ποσότητα των τερπενίων ελαχιστοποιείται (Βουκίδης, 2014). Επιπρόσθετα, η μόλυνση των σταφυλιών από *B. cinerea* μειώνει και τροποποιεί το τερπενικό περιεχόμενο. Αυτό αδιαμφισβήτητα παίζει ένα βασικό ρόλο στην απώλεια του ποικιλιακού χαρακτήρα στους περισσότερους οίνους με βοτρυτή (Bock et al., 1988). Η **προσβολή των σταφυλιών από φαιά σήψη**, καταφέρει και μετασχηματίζει αρκετές από τις τερπενικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιεί την περιεκτικότητά τους στη ράγα, επηρεάζοντας έτσι το ποικιλιακό άρωμα. Η ανάπτυξη του *Botrytis cinerea* στα σταφύλια μπορεί επίσης να μεταβάλει τη σύνθεση των μονοτερπενίων σταφυλιών με αποικοδόμηση των κύριων μονοτερπενικών αλκοολών και των οξειδίων τους σε γενικά λιγότερο οσμηρά συστατικά. Εργαστηριακά πειράματα κατέδειξαν ότι η λιναλοόλη μετατρέπεται σε λιλική (lilac) αλκοόλη και αλδεΐδη, ενώ η 8-υδροξυ λιναλοόλη μπορεί επίσης να σχηματιστεί με τη δράση των ενζύμων που εκκρίνονται από τον *B. cinerea* (Darrriet et al. 2012). Μερικές αλκοόλες, όπως η κιτρονελλόλη, λιναλόλη και γερανιόλη ελαττώνονται όσο αυξάνεται ο χρόνος παλαίωσης, καθότι μετασχηματίζονται σε οξείδια με μεγαλύτερο κατώφλι αντίληψης και προσδίδουν διαφορετικό αρωματικό χαρακτήρα στον οίνο (δε συμβάλουν ποιοτικά), ενώ άλλα τερπένια μετατρέπονται σε κετόνες, όπως οι α- και β- ιονόνη, τα οποία προσδίδουν το άρωμα της βιολέτας (Δήμου, 2012). Για παράδειγμα, η γερανιόλη και η νερόλη μετατρέπονται εύκολα σε α-τερπινεόλη, η οποία είναι ένωση λιγότερο αρωματικής έντασης, ενώ η λιναλόλη μετατρέπεται στα οξειδιά της, τα οποία έχουν κατώφλι αντίληψης περίπου δέκα φορές υψηλότερο από αυτήν (Σουφλερός, 2015).

Τα τερπενικά συστατικά του οίνου και των σταφυλιών είναι **ευαίσθητα σε όξινες συνθήκες, σε αύξηση της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης**. Μετατρέπονται σε ενώσεις διαφορετικής αρωματικής έντασης. Κάποια τερπένια γίνονται κυκλικά και σχηματίζουν λακτόνες, για παράδειγμα η 2-βινυλ-2-μέθυλο τέτρα υδρο φουράν-5-όνη από τα οξειδία της λιναλοόλης. Άλλα τερπένια μπορεί να μετατραπούν σε κετόνες, όπως η α και β -ιονόνες, ή το βιτισπιρένιο. Παρότι τα περισσότερα τερπένια έχουν ευχάριστο άρωμα, μερικά δίνουν ελλατωματικές οσμές. Ένα παράδειγμα είναι σεσκιτερπένια με οσμή ψαριού που παράγονται από το *Penicillium roquefortii* στο φελλό (Heimann et al., 1983). Τα είδη του *Streptomyces* επίσης, μπορούν να συνθέσουν σεσκιτερπένια με δυσάρεστες γαιώδεις οσμές στον φελλό ή το ξύλο των βαρελιών (Jackson, 2008, Δήμου, 2012). Επειδή η β-D-γλυκοζιδάση των σταφυλιών και αυτή του *Saccharomyces cerevisiae* έχουν περιορισμένη δράση, πολλοί γλυκοζίτες παραμένουν στους νεαρούς οίνους.

Πολλοί ερευνητές έχουν θεμελιώσει την έννοια των πρόδρομων οσφρητικών ενώσεων που μπορεί να είναι μονοτερπενόλες, τερπενικές διόλες και πολυόλες, λιπαρά οξέα και καροτενοειδή. Πρόκειται για ενώσεις με κοινή προέλευση τα τερπένια αλλά με μεγαλύτερο μοριακό βάρος, τα οποία μπορούν να αποικοδομηθούν και να δώσουν ενδιαφέρουσες οσμηρές ενώσεις. Πολλές πρόδρομες ενώσεις είναι σε μορφή γλυκοζιτών και μπορούν να ελευθερωθούν δίνοντας οσμηρές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές με την πάροδο του χρόνου μειώνονται και, αν κάποιος θέλει να απελευθερώσει τα πτητικά συστατικά, πρέπει να επέμβει με την χρήση ενζύμων στο στάδιο της οινοποίησης. Η πρακτική αυτή έχει βρει βιομηχανική εφαρμογή αφού στο εμπόριο κυκλοφορούν τέτοιου είδους ένζυμα, η δε χρήση τους επιτρέπεται από τη νομοθεσία. (Τσακίρης, 2017).

B. ΠΑΡΑΓΩΓΑ C13-ΝΟΡΙΣΟΠΡΕΝΟΕΙΔΩΝ

Η οξειδωτική αποικοδόμηση των καροτενοειδών, που ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων με 40 άτομα άνθρακα (τετρατερπένια) οδηγεί σε πολλά παράγωγα, συμπεριλαμβανομένων των νορισοπρενοειδών με 13 άτομα άνθρακα (C13-norisoprenoids) που μπορούν να συμβάλουν στο άρωμα των οίνων. Κάποια χαρακτηριστικά C13 νορισοπρενοειδή που έχουν αναγνωριστεί σε σταφύλια και οίνους είναι η β-δαμασκηνόνη (άρωμα σάλτσας μήλου, τριαντάφυλλου), η β-ιονόνη (άρωμα βιολέτας), η TPB (άρωμα φύλλου γερανίου), η TDN (άρωμα κηροζίνης) (Darriet et al. 2012). Η β-δαμασκηνόνη ανιχνεύτηκε αρχικά σε γλεύκος προερχόμενο από τις ποικιλίες Riesling και Scheurebe και στη συνέχεια σε πολλές άλλες ποικιλίες και εξαιτίας του χαμηλού κατωφλίου αναγνώρισης σε νερό υπάρχει η άποψη ότι συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στο άρωμα των οίνων (Darriet et al. 2012).

Το κατώφλι αντίληψης της β-δαμασκηνόνης στον οίνο είναι μεταξύ 2 και 7 μg / L, αν και αυτή η ένωση, που συνήθως βρίσκεται σε συγκεντρώσεις μεταξύ 700 ng / L και 2,5 μg / L. Η β-δαμασκηνόνη μπορεί να συμβάλει, μέσω συνεργιστικών φαινομένων, στο άρωμα του οίνου, πχ. για τη μείωση του επιπέδου του εξανοϊκού αιθυλεστέρα και της λιναλοόλης. Η β-ιονόνη, έχει ένα όριο αντίληψης 120 ng / L σε νερό, 800 ng / L σε μοντέλο διάλυμα και 4 μg / L σε λευκό κρασί και η επιρροή της έχει αποδειχθεί σε διάφορες ποικιλίες σταφυλιών και οίνων. Οι υπόλοιπες C13-νορισοπρενοειδείς ενώσεις έχουν μικρή συμβολή στο άρωμα των οίνων (Darriet et al. 2012).

Η 1-(2,3,6-τριμεθυλφαινυλ) βουτα-1,3-διένιο (TPB) με κατώφλι αντίληψης 40 ng/L σε οίνο και 20 ng/L σε νερό, βρίσκεται σε συγκεντρώσεις μέχρι και 200 ng/L σε μερικούς παλαιούς οίνους Semillon. Μία άλλη ομάδα οσμηρών ενώσεων αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνει το TDN (1,1,6-τριμεθυλ-1,2-διυδροναφθαλίνιο), που μυρίζει σαν κηροζίνη και έχει κατώφλι αντίληψης 20 μg/L, το (E) και (Z) -βιτισπιράνιο, τα οποία έχουν αποχρώσεις καμφοράς/ξύλου, την ακετάλη Riesling (φρουτώδες άρωμα) και την ακτινιδόλη (ξύλωδες άρωμα). Το TDN θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει σε μεγάλο βαθμό τα αρώματα «πετρελαίου» των ηλικιωμένων οίνων Riesling, ενώ το (E) και (Z) -βιτισπιράνιο, η ακετάλη και η ακτινιδόλη θεωρούνται ότι έχουν περιορισμένη συμβολή στο άρωμα του οίνου, ιδιαίτερα στο Riesling, καθώς οι συγκεντρώσεις τους είναι συνήθως πολύ χαμηλότερες από αυτές του ορίου αντίληψης (Darriet et al. 2012).

Τα C13-νορισοπρενοειδή, κυρίως εντοπίζονται στους φλοιούς των ραγών και προέρχονται από την αποικοδόμηση των καροτενοειδών του σταφυλιού σε καροτένιο, λουτεΐνη, νεοξανθίνη και βιολαξανθίνη κατά την ωρίμανση των σταφυλιών. Αυτή η αποικοδόμηση ευνοείται από την έκθεση των σταφυλιών στο ηλιακό φως. Αυτές οι ενώσεις υφίστανται αρχικά διάσπαση από την διοξυγενάση της ράγας, ακολουθούμενη από αναγωγή και γλυκοσυλίωση, για να αποτελέσουν πρόδρομες μορφές. Στο τέλος της ωρίμανσης, και στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της οινοποίησης και της παλαίωσης του οίνου, σχηματίζονται C13-νορισοπρενοειδείς ενώσεις σε όξινα μέσα, μέσω μερικές φορές περίπλοκων χημικών μηχανισμών από αρκετές πτητικές και μη πτητικές πρόδρομες ενώσεις (Winterhalter et al. 2006., Darriet et al. 2012).

C. KETONES

Από την κατηγορία αυτή, λίγες ενώσεις επηρεάζουν το άρωμα), όπως το διακετύλιο (2,3-βουτενδιόνη) σε μικρές συγκεντρώσεις μυρίζει βούτυρο, φουντούκι, ενώ σε μεγάλες (0,2-0,4 mg/L) με έχει αρνητική βουτυρώδη-γαλακτώδη οσμή. Ενώσεις, όπως τα νορσοπρενοειδή με παρεμφερή αρώματα με αυτά των τερπενίων. Κάποιες από αυτές προϋπάρχουν στο σταφύλι, όπως η β-ιονόνη (οσμή βιολέτας) και η β-δαμασκινόνη (τριαντάφυλλο). Λίγες κετόνες υπάρχουν στα σταφύλια και συνήθως εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, αν αυτή πραγματοποιηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία.

Οι ισοπρενοϊδείς κετόνες σχηματίζονται από την ενζυματική οξείδωση των καροτενίων, που είναι τερπένια με 40 άτομα άνθρακα και αποθηκεύονται ως γλυκοζίτες. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει κατά την διάρκεια του περκασμού μέχρι και την ωρίμανση των σταφυλιών. Αυτοί οι γλυκοζίτες, όταν βρεθούν σε ελαφρά όξινο περιβάλλον, υδρολύονται και σχηματίζουν πολλές πτητικές ενώσεις, ανάμεσα στις οποίες είναι και οι αρωματικές ενώσεις δαμασκηνόνη, α- και β-ιονόνη, βιτισπιρένιο, Reasling ακετάλη και 1,1,6-τριμέθυλ-1,2-διϋδروναφθαλενιο(TDN). Το διακετύλιο (το οποίο μαζί με την 2,3 πεντανοδιόνη αποτελούν τις συζυγείς δικετόνες) και σε μικρότερο βαθμό η 2,3 βουτανοδιόλη, μπορεί σε κάποια συγκέντρωση, να έχουν «βουτυρώδες» άρωμα, αλλά σε «χαλασμένους» οίνους μπορεί να θεωρηθεί ότι δεν συμβάλουν στον αρωματικό τους χαρακτήρα. Η ακετοϊνη παρουσιάζει μία ελαφρά μυρωδιά γάλακτος και μπορεί να γίνει αισθητή η παρουσία της στον οίνο. Οι άλλες απλές αλειφατικές κετόνες παρόλο που υπάρχουν ή σχηματίζονται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δεν θεωρείται ότι συμμετέχουν πολύ στον αρωματικό χαρακτήρα των οίνων. Η σημαντικότερη κετόνη που μπορεί να εμφανιστεί στον οίνο, είναι το διακετύλιο, που δίνει άρωμα βουτύρου και καραμέλας ανάλογα με τη συγκέντρωσή του. Ανήκει στα δευτερογενή αρώματα. Το διακετύλιο μπορεί βέβαια να παραχθεί κατά την μήλο-γαλακτική βιομετατροπή. Η παραγωγή του διακετυλίου όμως μέσω της αποικοδόμησης του κιτρικού οξέος κατά την μηλογαλακτική ζύμωση στην οποία υποβάλλονται εσκεμμένα ή μή κάποιοι οίνοι μπορεί να έχει μεγάλο οινολογικό ενδιαφέρον μιας και επηρεάζει το άρωμα του οίνου. Σε χαμηλά επίπεδα (5 mg/l) το διακετύλιο θεωρείται ότι συμβάλλει στην πολυπλοκότητα του αρώματος μιας και μπορεί να επιδράσει θετικά με τα καραμελώδη και ξηρού καρπού(καρυδιού) χαρακτηριστικά του, παρότι σε υψηλότερα από 5 mg/l επίπεδα μπορεί να αποτελέσει αλλοίωση δημιουργώντας μία έντονη βουτυρώδη / καραμέλας βουτύρου γεύση, η οποία ανιχνύεται ως ελλάτωμα. Ο μικροβιακός συνεπώς σχηματισμός του διακετυλίου είναι μία δυναμική διαδικασία και συνεπώς η συγκεντρωσή του στον οίνο εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το στέλεχος του βακτηρίου, το pH, η επαφή του οίνου με τις λάσπες και η περικτικότητα του σε SO₂ (Martineau and Herick-King 1995, Nielsen and Richelieu 1999). Το όριο αντίληψης του συστατικού ποικίλει ανάλογα με τα επίπεδα διαφόρων συστατικών του οίνου όπως αυτό του θειώδη ανυδρίτη. Μπορεί να παραχθεί ως ένας μεταβολίτης του κιτρικού οξέος όταν όλο το μηλικό οξύ έχει καταναλωθεί. Παρά ταύτα, το διακετύλιο σπάνια μετατρέπει τον οίνο σε μη πόσιμο (Moreno and Carmen 2009).

Αρκετές κετόνες έχουν ταυτοποιηθεί για την παρουσία τους στους οίνους, συμπεριλαμβανομένων και των προπανόνη, βουτανόνη και πεντανόνη. Οι πιο σημαντικές όμως είναι η ακετυμέθυλ -καρβινόλη και διακετύλιο. Οι άλλες απλές αλειφατικές κετόνες παρόλο που υπάρχουν ή σχηματίζονται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δεν θεωρούνται ότι συμμετέχουν πολύ στον αρωματικό χαρακτήρα των οίνων.

Οι σύνθετες κετόνες, β-δαμασκηνόνη και α,β-ιονόνες, βιτισπιρένιο, Riesling ακετάλη και 1,1,6-τριμέθυλ-1,2-διϋδροναφθαλένιο (TDN) που ονομάζονται και ισοπρενοϊδή βρίσκονται στον τελικό οίνο, μερικώς ως αποτέλεσμα της έκθλιψης των σταφυλιών. Το TDN που έχει μια χαρακτηριστική οσμή «κηροζίνης», παίζει πολύ χαρακτηριστικό ρόλο στο άρωμα των οίνων από την ποικιλία Riesling (Simpson, 1978). Γενικά δεν το βρίσκουμε στα σταφύλια ή στους νέους οίνους, αλλά μπορεί να εμφανιστεί κατά την παλαίωση σε μπουκάλι, φτάνοντας σε συγκεντρώσεις των 200μg/l, ενώ το κατώφλι αντίληψης της είναι στα 20μg/l. Μετά από αρκετά χρόνια παλαίωσης σε μπουκάλι, η συγκέντρωση του μπορεί να φτάσει τα 40 parts per billion (ppb) (Rapp and Guntert, 1986). Πάνω από τα 20 ppb δίνει μία οσμή καπνιστού, κηροζίνης, παλαίωσης σε μπουκάλι (Jackson, 2008).

Η β-δαμασκηνόνη βρίσκεται στους περισσότερους οίνους, και έχει μια μεθυστική μυρωδιά που θυμίζει εξωτικά λουλούδια με μία «φρουτώδη» νότα σαν «μήλο», «τριαντάφυλλο» και «μέλι» ενώ πιστεύεται ότι συμβάλλει στο άρωμα των οίνων από σταφύλια όπως το Chardonnay. Η σημαντική αυτή ένωση (β-δαμασκηνόνη) απομονώθηκε πρώτη φορά από έλαιο τριαντάφυλλου από την Βουλγαρία από τους Demole et al., το 1973 και ταυτοποιήθηκε σε σταφύλια και οίνο από τους Schreier and Drawert. Ανήκει στην οικογένεια των συστατικών με τεράστια χρήση στην βιομηχανία αρωμάτων ως κετόνες τριαντάφυλλου (Ohloff and Demole, 1986). Από τότε έχει ανιχνευτεί σε πολλά φρούτα και φυτά. Πιστεύεται ότι προέρχεται από την αποικοδόμηση της καροτενοϊδούς νεοξανθίνης από ένα πολύπλοκο μονοπάτι (Sefton et al., 1989, Winterhalter and Skouroumounis, 1996). Έχει ένα όριο ανίχνευσης στα 0,002ppb στο νερό (Buttery a Teranishi., 1988) και έχει περιγραφεί ως ανθική και ιώδης παρότι η συγκεντρωσή της παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον αντιληπτό χαρακτήρα της (Ohloff, 1978, Kotseridis et al., 1998). Οι Winterhalter et al.(1990) , έδειξαν ότι η β-δαμασκηνόνη προήλθε από την όξινη υδρόλυση πολλαπλών πρόδρομων ουσιών, σε οίνους ποικιλίας Riesling, μετά από διαχωρισμό των πρόδρομων με DCCC (droplet counter-current chromatography). Αυτό έχουν υποστηρίξει ευρήματα σε φλοιούς

σταφυλιών ποικιλίας Concord (Braell et al., 1986). Οι πρόδρομες ενώσεις φαίνεται να περιλαμβάνουν γλυκοζίτες με διαφορετικά τμήματα σύζευξης καθώς και μη γλυκοζιτικά συστατικά (πολυούλες). Σύμφωνα με τους Kotseridis et al., 1999, οι οποίοι μελέτησαν τα επίπεδα της β-δαμασκηνόνης μεταξύ οίνων διαφορετικών ποικιλιών αλλά και μεταξύ οίνων της ίδιας ποικιλίας βρέθηκαν σημαντικές διαφορές. Πιθανόν οι διαφορές μεταξύ των αμπελοτοπίων και του κλίματος να είχαν επίδραση στα επίπεδα των προδρόμων της β-δαμασκηνόνης στα σταφύλια και κατ'επέκταση στα επίπεδα της ελεύθερης β-δαμασκηνόνης στους οίνους. Τα επίπεδα που βρέθηκαν ήταν υψηλότερα από τα αναφερόμενα επίπεδα των λευκών οίνων (Guth., 1997), γεγονός το οποίο θα μπορούσε να εξηγηθεί από τις διαφορετικές οινοποιητικές τεχνικές και συγκεκριμένα από την προζυμωτική εκχύλιση με τους φλοιούς για 15-20 ημέρες στην περίπτωση των ερυθρών οίνων που μετείχαν στην μελέτη. Αποδείχθηκε ότι υψηλά επίπεδα των προδρόμων της β-δαμασκηνόνης βρέθηκαν σε φλοιούς σταφυλιών της ποικιλίας Cabernet Sauvignon (Naiker and Allen, 1997). Η συγκεκριμένη έρευνα των Kotseridis et al., 1999 έδειξε ότι οι μισές ποσότητες οι οποίες μετρήθηκαν στο γλεύκος αντιπροσώπευσαν τις ποσότητες της β-δαμασκηνόνης η οποία μετρήθηκε στον οίνο.

Οι α,β-ιονόνες έχουν οσμή «βιολέτας» και έχουν βρεθεί σε πολλές λευκές ποικιλίες σταφυλιών (Schreier et al, 1976) , όπως και στα σταφύλια της ποικιλίας Μοσχάτο (Etivant et al, 1983). Βρίσκονται επίσης συνήθως ως δευτερογενείς μεταβολίτες από την ενζυματική οξειδωση των αντίστοιχων καρτοτενοειδών (Wahlberg and Enzell, 1987) και έχουν επίσης σημαντικές εφαρμογές στον τομέα του αρώματος (Naves, 1947). Η α-ιονόνη έχει πολλές περιγραφές ως βιολέτα, ανθική, ξυλώδη και φρουτώδη ενώ η β-ιονόνη έχει περιγραφεί ως ξυλώδη, ξηρών φρούτων και με άρωμα βατόμουρου (Perfumers Compedium). Οι α και β ιονόνες έχουν όριο αντίληψης στο νερό τα 0,4 (Keith and Powers, 1968) και 0,007 ppm αντίστοιχα . Οι α και β ιονόνες όπως και η β-δαμασκηνόνη υπάρχουν στο γλεύκος των σταφυλιών και στους οίνους σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με άλλα πτητικά συστατικά (Kotseridis et al., 1998). Το βιτισπινένιο (VTS) σχηματίζεται κατά την παλαίωση των οίνων και φτάνει σε συγκεντρώσεις μεταξύ 20 και 100 ppm . Συνίσταται από δύο ισομερή που το κάθε ένα έχει διαφορετική οσμή. Το cis- ισομερές έχει οσμή «χρυσάνθεμου» ενώ το trans έχει μια πιο βαριά οσμή εξωτικών φρούτων. Η Riesling ακετάλη έχει βρεθεί στα γλεύκη και στους οίνους της ποικιλίας Riesling και έχει μια ελαφρά φρουτένια οσμή.

D. ΑΛΚΟΟΛΕΣ

Η εξανόλη, γνωστή και ως "leaf" αλκοόλη, έχει μία χορτώδη μυρωδιά φρεσκοκομμένης χλόης, η οποία γίνεται αισθητή όταν περιέχεται σε αρκετή ποσότητα στους οίνους, μαζί με τις cis και trans εξανόλη-1. Συνήθως, βρίσκεται και στο γλεύκος, λόγω της ενζυματικής δράσης στο λινολεϊκό οξύ που είναι αποτέλεσμα της έκθλιψης των σταφυλιών. Η μεθανόλη έχει το άρωμα ορισμένων μήλων.

E. ΓΛΥΚΟΖΙΤΕΣ ΟΣΜΗΡΩΝ ΠΗΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η έρευνα των τελευταίων δεκαετιών έχει αποκαλύψει ότι ένας μεγάλος αριθμός οσμηρών πτητικών ενώσεων των οίνων απαντά στο σταφύλι με τη μορφή μη πτητικών γλυκοζιτών (Williams et al., 1982b, Zoecklein et al., 2000, Whiton and Zoecklein, 2000, Cabrita et al., 2007, 2020). Ο όρος «γλυκοζίτες» περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα ενώσεων που έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα: αποτελούνται από ένα τουλάχιστον μόριο σακχάρου ενωμένο με ένα άλλο συστατικό το οποίο αναφέρεται ως αγλυκόνη. Οι γλυκοζίτες αποτελούν προϊόντα συμπύκνωσης και σχηματίζονται από το υδρογόνο του ημιακεταλικού υδροξυλίου και την υδροξυλομάδα από μια άλλη ένωση (Μπόσκος, 1997). Άοσμες είναι και οι συζευγμένες με σάκχαρα μορφές των μονοτερπενίων. Οι μονοτερπενικοί γλυκοζίτες απαντούν στα σταφύλια σε συγκέντρωση από 2 έως και 8 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα ελεύθερα πτητικά οσμηρά τερπένια αποτελώντας μία εξαιρετικά σημαντική δεξαμενή ποικιλιακού αρώματος. Η κατηγορία αυτή των πτητικών ενώσεων έχει τραβήξει από πολύ νωρίς το ενδιαφέρον των ερευνητών και αποτελεί ένα διαρκές αντικείμενο μελέτης. Στα σταφύλια οι κύριες μονοτερπενόλες και οι τερπενικές πολυόλες απαντούν και με τη μορφή γλυκοζιτών (Williams et al., 1982, Voirin et al., 1990, Allen et al. 1989, Schwab et al., 1991, Sarry and Gunata 2004) στους οποίους συμμετέχουν 4 βασικά σάκχαρα: γλυκόζη, αραβινόζη, ραμνόζη και απιόζη. Τέσσερις τύποι γλυκοζιτών έχουν ταυτοποιηθεί (Εικόνα 6): τρεις διγλυκοζίτες (6-O-α-L-αραβινοφουρανοζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτης, 6-O-α-L-ραμνοπυρανοζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτης, 6-O-β-D-απιοφουρανοζυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτης) και ένας μονογλυκοζίτης (β-D-γλυκοπυρανοζίτης) (Maicas and Mateo, 2005). Οι γλυκοζίτες βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα κύτταρα του φλοιού της ράγας (στη στοιβάδα της επιδερμίδας) σε σχέση με τη σάρκα (Ribereau-Gayon et al., 2000). Καθώς πολλές οσμηρές πτητικές ενώσεις απαντούν στα σταφύλια σε μεγαλύτερη συγκέντρωση με τη μορφή των γλυκοζιτών παρά ως ελεύθερες ενώσεις, οι τελευταίοι αποτελούν μια πολύ σημαντική πρόσθετη πηγή αρώματος το οποίο απελευθερώνεται μέσω της ήπιας όξινης υδρόλυσης που πραγματοποιείται φυσικά κατά τη διάρκεια της οινοποίησης και της παλαίωσης των οίνων (Sefton, 1990, 1994, Zoecklein et al., 2000, Naiker, 2001, Cabrita et al., 2006, Arevalo Villena et al., 2006).

F. ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΕΣ

Πυραζίνες, ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο στο μόριο τους και παράγονται από το μεταβολισμό των αμινοξέων. Ανήκουν στα πρωτογενή αρώματα, είναι πολύ έντονες και η οσμή τους είναι ανιχνεύσιμη σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις όπως μέρη στο τρισεκατομμύριο (parts per trillion ή ng /l), δηλαδή έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης και προσδίδουν στους οίνους χορτώδη χαρακτήρα, όπως πράσινη πιπεριά, σπαράγγι, βρασμένα λαχανικά, φασολιού κλπ. Η περιεκτικότητά τους εξαρτάται σημαντικά από τις κλιματικές συνθήκες. (González-Barreiro, et al., 2015). **Οι μεθοξυπυραζίνες ή πυραζίνες προσδιορίστηκαν σχετικά πρόσφατα στους οίνους, το 1975 (Τσακίρης, 2017), αλλά η εκτίμηση της σημασίας των μεθοξυπυραζινών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων είναι σχετικά πρόσφατη.** Αυτές οι ενώσεις είναι σημαντικές για το άρωμα του οίνου, λόγω των εξαιρετικά χαμηλών ορίων αντίληψής τους. Βρίσκονται κυρίως στο φλοιό των ραγών των κόκκινων σταφυλιών και εκχυλίζονται κατά την οινοποίησή τους.

Στην αρχή, οι πυραζίνες, είχαν ανιχνευθεί στην πράσινη πιπεριά και στις καυτερές πιπεριές, στο τυρί, την πατάτα, το μπιζέλι και το σπαράγγι. Πλέον όμως, είναι γνωστό ότι αυτές οι ουσίες αν και σε μικρή περιεκτικότητα, **δίνουν ένα ξεχωριστό άρωμα στο κρασί και είναι χαρακτηριστικό κάποιων ποικιλιών αμπέλου.** Για παράδειγμα, στους οίνους της ποικιλίας Sauvignon Blanc που παράγονται στην περιοχή Marlborough οι μεθοξυπυραζίνες είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό έντονο άρωμα τους (Jouanneau et al. 2012). Η βιοσύνθεση των μεθοξυπυραζινών στα σταφύλια, ιδιαίτερα της IBMP, δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί και η προτεινόμενη βιοσυνθετική οδός αναφέρεται στη μικροβιακή σύνθεση (Darriet et al. 2012). **Η περιεκτικότητα σε πυραζίνες στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης είναι σχετικά υψηλή και μειώνεται κατά τη διάρκειά της.** Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού οι πυραζίνες είναι αρχικά εντοπισμένες στους βλαστούς, όσο δε προχωρά η ωρίμανση η συγκέντρωσή τους μειώνεται και εντοπίζονται κυρίως στους φλοιούς και τα γίγαρτα. Με την οινοποίηση μεταφέρονται στον οίνο. Επιπλέον έχει μελετηθεί η επίδραση των κλιματικών συνθηκών στην περιεκτικότητα των πυραζινών. Σε μία μελέτη της μεταβολής της συγκέντρωσης αυτών των ενώσεων, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης σταφυλιών Sauvignon blanc σε δύο περιοχές της Νέας Ζηλανδίας, (Allen et al., 1991) βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα σε πυραζίνες στο στάδιο της ωρίμανσης ήταν κάτω από το όριο αντίληψής τους στη θερμότερη περιοχή (1,3 ppt), ενώ στο ψυχρό κλίμα ήταν περίπου πέντε φορές μεγαλύτερη από το κατώφλι αντίληψης (9,5 ppt) (Ντουρτόγλου Θ.).

Οι πυραζίνες (3-ισοβουτύλο-2-μεθοξυπυραζίνη, η 3-sec-βούτυλο -2- μεθοξυπυραζίνη και η 3-ισοπρόπυλο- 2- μεθόξυ πυραζίνη συνδέονται **με το πράσινο, φυτικό άρωμα.** Ουσίες υπεύθυνες για τα αρώματα της **πράσινης πιπεριάς, του σπαραγγιού ή μπιζελιού, και γενικά του χορτώδη αρωματικού χαρακτήρα** που προσδίδουν οι πυραζίνες στον οίνο, οι οποίες είναι χαρακτηριστικό των οίνων Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc και Merlot, όπως επίσης και των Sauvignon blanc και Semillon, είναι οι 3-αλκυλο-2-μεθοξυπυραζίνες, που περιλαμβάνουν την 3-ισοπρόπυλο- 2-μεθοξυπυραζίνη, τη δευτερο-βουτύλο-2-μεθοξυπυραζίνη, και τη 3-ισοβουτύλο-2-μεθοξυπυραζίνη (IBMP). Οι ενώσεις αυτές ανιχνεύονται σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις (ng/L) στους οίνους (Δρόσου, 2017). Μεταξύ αυτών των μεθοξυπυραζινών, η 3-ισοβουτύλο-2-μεθοξυπυραζίνη είναι αυτή που απαντάται συχνότερα και η πλέον πιθανή να συνεισφέρει στο χορτώδες άρωμα των σταφυλιών της ποικιλίας Sauvignon Blanc, όπου έχει προσδιοριστεί σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,5 έως 40 ng/L (Darriet et al. 2012). Η 3-ισοβουτύλο-2-μεθοξυπυραζίνη εμφανίζεται στις ταξιανθίες λίγες ημέρες μετά την άνθηση και οι συγκεντρώσεις αυξάνονται μέχρι τον περκασμό, ενώ μειώνονται κατά την περίοδο ωρίμανσης. Παρόλα αυτά η βιοσύνθεση της ουσίας συνεχίζεται στα φύλλα της βάσης. Η 3-ισοβουτύλο-2- μεθοξυπυραζίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην οσμή **πράσινης πιπεριάς** συχνά εμφανή στο Sauvignon blanc (Allen et al., 1991). Οι 3-αλκύλο -2- μεθόξυπυραζίνες τείνουν να έχουν πράσινα και λαχανώδη αρώματα και βρίσκονται σε μία πληθώρα προϊόντων όπως οι πράσινες πιπεριές (Buttery et al., 1969, Buttery et al., 1969) τα σπαράγγια, ο αρακάς και οι πατάτες (Murray and Whitfiel, 1975). Αυτές οι ίδιες μεθόξυ πυραζίνες μπορούν να συνεισφέρουν στον πράσινο και άγουρο χαρακτήρα του οίνου (Kotseridis et al., 2008).

Οι μεθόξυπυραζίνες που αναφέρονται ανωτέρω, θεωρούνται ότι αποτελούν κάποια από τα βασικά ποικιλιακά πτητικά, τα οποία αναφέρθηκαν σε σταφύλια και οίνους, αρχικά ταυτοποιήθηκαν σε οίνους από Cabernet Sauvignon (Bayonove et al., 1975), αργότερα σε Sauvignon blanc (Augustyn et al., 1982) και άλλες ποικιλίες σταφυλιού της *Vitis vinifera* (Sala et al., 2007). Η ωριμότητα των σταφυλιών στον τρύγο και η έκθεση στον ήλιο είναι οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα των μεθόξυ πυραζινών στους οίνους (Sala et al., 2007). Σύμφωνα με τους Kotseridis et al., 2008, **η απολάσπωση πριν την αλκοολική ζύμωση μειώνει την συγκέντρωση της 3-ισοπρόπυλο-2- μεθόξυπυραζίνης στον παραγόμενο οίνο συγκριτικά με το μη απολασπωμένο γλεύκος.** Η μείωσή της είναι τόσο μεγαλύτερη όσο περισσότερο χρόνο αφήνεται να διαυγάσει το γλεύκος. **Μετά την αλκοολική ζύμωση παρατηρείται μία αύξηση στη συγκέντρωση της πιθανόν λόγω της αποικοδόμησης των στερεών των σταφυλιών, τα οποία παραμένουν στο γλεύκος μετά την απολάσπωση,** όπως αναφέρθηκε και στην μικροοινοποίηση του Cabernet Sauvignon (Roujou et al., 2002). Η υψηλή θολερότητα του αρχικού μή διαυγασμένου γλεύκου (1280 NTU) δείχνει ότι περιέχει σημαντικά επίπεδα στερεών και επιβεβαιώνει την προηγούμενη υπόθεση. Μία ενδιαφέρουσα και λιγότερο πιθανή εξήγηση είναι η

παραγωγή της 3-ισοπρόπυλο-2-μεθοξυπυραζίνης από τους ζυμομύκητες όπως έχει αρχικά αναφερθεί από τους Pickering et al., 2010. Συνεπώς η απολάσπωση θα ήταν μία απλή πρακτική που θα μπορούσε να ακολουθήσει ο οινοποιός για να μειώσει την δυναμική συγκέντρωση της 3-ισοπρόπυλο-2-μεθοξυπυραζίνης στον οίνο όταν διαχειρίζεται σταφύλια πρώιμης ωριμότητας. **Η αποχρωση της φιάλης και οι συνθήκες φωτός και θερμοκρασίας στις οποίες εκτίθεται ένας οίνος κατά την αποθήκευση και την εμπορική του διανομή είναι πιθανόν να αποτελούν επιπρόσθετες ευκαιρίες για μείωση των συγκεντρώσεων των μεθοξυπυραζινών** (Blake et al., 2010). Τέλος, οι συγκεντρώσεις των πυραζινών εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από τις κλιματικές συνθήκες (Κοντοκόστας, 2010). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση της ουσίας επηρεάζεται από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, καθώς και τις εφαρμοζόμενες αμπελοκομικές τεχνικές (Darriet et al. 2012). Πιο συγκεκριμένα, χαμηλότερες συγκεντρώσεις έχουν εντοπιστεί σε σταφύλια που ωρίμασαν σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Allen et al. 1989), ενώ οι Falcão et al. (2007) διαπίστωσαν ότι την παρουσία μεγαλύτερων συγκεντρώσεων IBMP σε σταφύλια που προήλθαν από μεγαλύτερο υψόμετρο. Η συγκεκριμένη ένωση παρουσιάζει εναισθησία στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία, η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση της και το σχηματισμό 2-μέθοξυ-3-μεθυλοπυραζίνης, μία ένωση που είναι λιγότερο **οσμική**. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα **επίπεδα των μεθοξυπυραζινών** στα σταφύλια, είναι σημαντικά **χαμηλότερα** σε ώριμα φρούτα ή σε φρούτα καλιεργούμενα σε θερμότερα κλίματα ως αποτέλεσμα της **αυξημένης έκθεσης στο φως** (Hashizume and Samuta, 1999, Ryona et al., 2008) και στην θερμοκρασία (Falcao et al., 2007). Λαμβάνοντας υπόψη την δυναμικότητά τους, καθώς και το γεγονός ότι υψηλά επίπεδα των μεθοξυπυραζινών σχετίζονται με τα άγουρα σταφύλια και/ή το οργανοληπτικό σφάλμα που προκύπτει από την προσβολή σταφυλιών από πασχαλίτσες (Pickering et al. 2005, Ross and Weller 2007). Άλλοι αμπελοκομικοί παράγοντες, όπως η πρώιμη απομάκρυνση των φύλλων της βάσεως, οι αποδόσεις και η διαθεσιμότητα νερού και αζώτου φαίνεται ότι έχουν αντίκτυπο στην δημιουργία του IBMP. Το περιεχόμενο IBMP σε ώριμα σταφύλια μπορεί επίσης να ποικίλει σημαντικά ανάλογα με την κλωνική προέλευση των αμπέλων. Επιπλέον, η ανίχνευση του IPMP στους οίνους μπορεί να σχετίζεται με τη μόλυνση των σταφυλιών κατά τη συγκομιδή από το έντομο *H. axyridis*, ένα έντομο εισήχθη για τον βιολογικό έλεγχο των αφιδών (Darriet et al. 2012). Η μέτρηση των μεθοξυπυραζινών στον οίνο είναι πολύπλοκη λόγω των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεών τους και της πολυπλοκότητας του οίνου, γεγονός που το κάνει ιδιαίτερα δύσκολο να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν. Οι ερευνητές Botezatu et al., 2014 ανέπτυξαν μια MD-GC-MS μέθοδο χάρη στην οποία κατάφεραν να ποσοτικοποιήσουν ταυτόχρονα και τις 4 αρωματικά ενεργές αλκυλο- μεθοξυπυραζίνες, οι οποίες σχετίζονται με την ποιότητα του οίνου.

G. ΠΗΗΤΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι φαινολικές ουσίες που περιλαμβάνονται στον οίνο, κατά κύριο λόγο, προέρχονται από τα σταφύλια, τα οποία επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η ποικιλία, η ωρίμανση του σταφυλιού, το φως, η διαθεσιμότητα σε νερό, τα θρεπτικά στοιχεία του εδάφους, οι μεταβολές στους εχθρούς και τις ασθένειες. Ακόμη, το φαινολικό περιεχόμενο των οίνων, επηρεάζεται και από διάφορες οινολογικές πρακτικές, καθώς και από τη διάρκεια των ζυμώσεων, αλλά και της παλαίωσης (Δήμου, 2012).

Βέβαια, τα φαινολικά οξέα, όπως είναι το καφεϊκό οξύ, δεν είναι ουσίες όσφρησης, όμως μέσα από κάποιες χημικές αντιδράσεις, μπορούν να μετατραπούν σε ενώσεις που δίνουν αρώματα καπνού, δέρματος ή ξύλου. Συνήθως, αυτά τα αρώματα δε διακρίνονται εύκολα, διότι καλύπτονται από άλλες ουσίες. Διαφοροποιούνται ανάλογα με την ποικιλία της αμπέλου, ενώ ένα μέρος τους χάνεται λόγω οξειδώσεων. Κάποιες φαινόλες, είναι εστεροποιημένες με τρυγικό οξύ και άλλες είναι ενωμένες με γλυκόζη. Επίσης, οι ζύμες μπορούν να τις αποκαρβοξυλιώσουν δίνοντας πτητικά παραπροϊόντα. Πτητικές φαινόλες μπορούν να παραχθούν και με ενζυμική υδρόλυση.

Τέλος, ο κινναμωνικός αιθυλεστέρας, ο οποίος έχει πολύ χαμηλό κατάφλι όσφρησης, παράγεται όπως και άλλες ενώσεις από την εστεροποίηση των φαινολικών οξέων. Αυτές οι ενώσεις, συμβάλλουν στο χαρακτηρισμό των ποικιλιών (Τσακίρης, 2017).

H. ΠΗΗΤΙΚΕΣ ΘΕΙΟΛΕΣ

Οι θειόλες είναι ενώσεις που περιέχουν θείο, με μια ομάδα σουλφυδρυλίου (-SH) προσαρτημένη σε ένα άτομο άνθρακα στη χημική δομή τους. Η προσθήκη μιας ομάδας θειόλης σε ένα μόριο με μέσες οργανοληπτικές ιδιότητες μπορεί να το μετασχηματίσει σε μια εξαιρετικά ισχυρή ένωση γεύσης, μειώνοντας το όριο αντίληψης σε αρκετές τάξεις μεγέθους. Πολλές ενώσεις θείου στην οικογένεια των θειολών θεωρούνται υπεύθυνες για όσφρητικά ελαττώματα. Ωστόσο, έχει σαφώς έχουν αποδειχθεί ότι συμβάλλουν σημαντικά στα αρώματα πολλών φρούτων (φραγκοστάφυλο, γκρέιπφρουτ). Πολλά από αυτά τα συστατικά έχουν ανιχνευθεί στον οίνο και η θετική συμβολή τους στη γεύση του οίνου, ιδιαίτερα στο ποικιλιακό άρωμα των οίνων Sauvignon Blanc και άλλων λευκών και ερυθρών ποικιλιών, είναι πλέον καλά τεκμηριωμένη. Οι τρεις πιο σημαντικές θειόλες στο άρωμα Sauvignon Blanc θεωρούνται ότι είναι 3-σουλφανυλεξανόλη (3SH) με γεύση γκρέιπφρουτ, ο οξικό 3-σουλφανυλοεξυλεστέρας (3SHA) και η 4-μεθυλο-4-σουλφανυλοπενταν- 2-όνη

(4M5P). Αν και οι θειόλες εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στο κρασί Sauvignon Blanc, διαπιστώθηκε επίσης ότι συμβάλλουν στο ποικιλιακό άρωμα των οίνων που παράγονται από άλλες ποικιλίες *Vitis vinifera*, έγχρωμες και λευκές, όπως Gewürztraminer, Riesling, Semillon, Muscat, Manseng, καθώς και στις έγχρωμες Merlot και Cabernet Sauvignon (Darriet et al. 2012).

1.5.1.1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΣΤΟ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ

Οι κλιματολογικές συνθήκες και διάφορες αμπελοκομικές πρακτικές έχουν μεγαλύτερη επίδραση στη συγκέντρωση παρά στον τύπο των οσμικών πτητικών ενώσεων που υπάρχουν σε μια ποικιλία σταφυλιού. Η έκθεση των σταφυλιών στον ήλιο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης επιταχύνει την αποικοδόμηση των καροτενοειδών και συνοδεύεται από αύξηση στο περιεχόμενο των γλυκοζυλιωμένων παραγώγων των C13- νορισοπρενοειδών (Ribereau-Gayon et al., 2000). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι, αν και τα ζεστά κλίματα είναι ευνοϊκά για την συσσώρευση των σακχάρων, δεν αποτελούν απαραίτητα τις καλύτερες προϋποθέσεις για την παραγωγή οίνων ποιότητας (Ribereau-Gayon et al., 2000). Επιζήμια, για την ποιότητα των σταφυλιών θεωρείται και η υψηλή εδαφική ή ατμοσφαιρική υγρασία κατά την περίοδο της ωρίμανσης (Σουφλερός, 2015). Η άμπελος (*Vitis vinifera* L.) γενικά, είναι παραδοσιακά μια ανθεκτική στην ξηρασία μη αρδευόμενη καλλιέργεια (συνθήκες που αναφέρονται στο νησί της Σαντορίνης). Κάτω από τις συνθήκες του μεσογειακού κλίματος ωστόσο, η διαχείριση του νερού στον αμπελώνα είναι μεγάλης σπουδαιότητας για τον έλεγχο των επιπτώσεων της ξηρασίας στην ποιότητα σταφυλιών και οίνου. Η αναπλήρωση π.χ. μέσω της άρδευσης, του νερού που χρειάζεται το αμπέλι για την ομαλή ανάπτυξη του και μέρος του οποίου χάνεται λόγω εξάτμισης και διαπνοής, αποτελεί μια πρακτική η οποία μπορεί να επηρεάσει το μεταβολισμό της αμπέλου επηρεάζοντας και τον οίνο που τελικά παράγεται. Η έκθεση των σταφυλιών στο ηλιακό φως επιδρά σημαντικά στα επίπεδα των νορισοπρενοειδών και τερπενολών στα σταφύλια και τους οίνους, γεγονός που σαφώς επηρεάζει τους υπό μελέτη οίνους μιας και οι συνθήκες ωρίμανσης των σταφυλιών στο νησί της Σαντορίνης περιλαμβάνουν μεγάλη διάρκεια έκθεσης στο ηλιακό φως και έλλειψη νερού.

Η σύσταση του σταφυλιού, η οποία θα καθορίσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, εξαρτάται από εσωτερικούς παράγοντες όπως η ποικιλία όπως και από εξωτερικούς όπως οι κλιματικές συνθήκες, το έδαφος, η περιοχή και οι καλλιεργητικές τεχνικές (Jackson and Lombard, 1993, Jones and Davis 2000. Σε αυτό το πνεύμα κάποιες έρευνες προσπάθησαν να καθιερώσουν κάποιες σχέσεις ανάμεσα στις οινοποιητικές παραμέτρους και την σύσταση του οίνου. Για παράδειγμα, προηγούμενες έρευνες έδειξαν την επίδραση της ημερομηνίας τρυγητού στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των οίνων. Οι Perez- Magarino and Gonzalez-San Jose (2006) βρήκαν ότι η ημερομηνία τρύγου η οποία είναι απευθείας συνδεδεμένη με τους βαθμούς ωριμότητας των σταφυλιών επηρεάζει τα χρωματικά χαρακτηριστικά των οίνων. Οι Du - Plessis (1984) και Hamilton and Coombe (1992) έδειξαν επίσης ότι η στιγμή για την συλλογή των σταφυλιών είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας στην παρασκευή ποιοτικών οίνων. Με βάση τα χαρακτηριστικά των αμπελώνων κάποιιοι ερευνητές βρήκαν ότι το έδαφος επηρεάζει την συνολική ποιότητα του σταφυλιού και συνεπώς την ποιότητα του αρώματος του παραγόμενου οίνου. **Οι για παράδειγμα βρήκαν** διαφορετικές συστάσεις στον οίνο σύμφωνα με τον τύπο του εδάφους. Οι Sabon, de Revel, Kotseridis and Bertrand (2002) ανέφεραν επίσης την επίδραση των εδαφών της Rhone Valley (Γαλλία) στην αρωματική σύσταση των οίνων Grenache. Και ο Mahl (1998) έδειξε ότι οι οίνοι Muller-Thurgau και Riesling, που παρήχθησαν από κλήματα καλλιεργούμενα σε διαφορετικούς τύπους εδάφους μπορούσαν να διακριθούν μεταξύ τους. Αυτό δείχνει ότι παρότι το μακροκλίμα και το μικροκλίμα έχουν μεγάλη επίδραση στην ποιότητα του οίνου και την ποικιλιακή τυπικότητα, το έδαφος μπορεί να έχει μια ανεξάρτητη επίδραση. Η έρευνα των Jose Gomez-Miguez et al., 2007, έδειξε ότι σχετικά με τα αρωματικά χαρακτηριστικά των οίνων στην περίπτωση των αργιλωδών εδαφών η ημερομηνία του τρύγου δεν θα πρέπει να καθυστερεί λόγω της αρνητικής επίδρασης της στο άρωμα των παραγόμενων οίνων.

Στη συνέχεια, αναλύονται οι παράγοντες που επιδρούν στον καθορισμό του πρωτογενούς αρώματος του οίνου, όπως η ποικιλία των σταφυλιών και οι εδαφοκλιματικοί παράγοντες που επικρατούν στον αμπελώνα (κλίμα, έδαφος, terroir).

A. ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ

Ο φλοιός της ράγας του σταφυλιού αποτελείται από τρία στρώματα, την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα, καθένα από τα οποία αποτελείται από μία ή περισσότερες στοιβάδες κυττάρων. Η επιδερμίδα, ειδικότερα, αποτελείται από μία στοιβάδα κυττάρων και είναι το στρώμα του φλοιού, στο οποίο περιέχονται αρωματώδη έλαια, χαρακτηριστικά της ποικιλίας του σταφυλιού. Πέρα από τον φλοιό, και στο χυμό περιλαμβάνονται σε μικρό ποσοστό αρωματικές ουσίες, μαζί με άλλες ομάδες ουσιών, όπως είναι οι αζωτούχες ενώσεις, οι πηκτινικές ύλες, τα οργανικά οξέα, τα ανόργανα συστατικά, κ.α. Ωστόσο, το γλεύκος που προκύπτει από τις περισσότερες ποικιλίες σταφυλιών έχει πολύ λίγο άρωμα, γεγονός που δείχνει ότι τα περισσότερα αρωματικά συστατικά βρίσκονται στο φλοιό και όχι στη σάρκα (Σουφλερός, 2015).

Οι ποικιλίες σταφυλιών διαφέρουν ως προς το άρωμα τους, για παράδειγμα, οι κύριες ενώσεις που ευθύνονται για τα πιο έντονα αρώματα στους ποικιλιακούς οίνους από Sauvignon Blanc που παράγονται στην περιοχή Marlborough θεωρείται ότι είναι οι μεθοξυπυραζίνες και ποικιλιακές θειόλες (Jouanneau *et al.* 2012). Οι οίνοι από Ξινόμαυρο έχουν χαρακτηριστικό άρωμα ντομάτας και ελιάς (Βέκιος και συν. 2001), οι οίνοι από Ντεμπίνα που καλλιεργήθηκε σε ψυχρά κλίματα διακρίνονται από αρώματα που θυμίζουν μήλο, αχλάδι ακόμη και κανέλα, οι οίνοι από Αθήρι χαρακτηρίζονται από αρώματα εσπεριδοειδών και εξωτικών φρούτων (πεπόνι) (Αθηνόραμα, 2017). Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε ποικιλίας συνοδεύουν το φυτό, όπου και αν καλλιεργείται αυτό, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό (Σουφλερός, 2015). Ωστόσο, παράγοντες όπως οι καλλιεργητικές τεχνικές, οι κλιματολογικές συνθήκες, η τεχνική οινοποίησης και η παλαίωση επιδρούν και τροποποιούν το ποικιλιακό άρωμα ενός οίνου. Έτσι, όσον αφορά στη γηγενή ποικιλία Ξινόμαυρο, το άρωμα των ροζέ οίνων διατηρεί τα χαρακτηριστικά της ποικιλίας δηλαδή τα αρώματα της ντομάτας και της ελιάς, αλλά με πιο έντονα τα αρώματα φραγκοστάφυλου, κυδωνιού, φράουλας, μήλου, κερασιού και βιολέτας (Βέκιος και συν. 2001). Στους νεαρούς ερυθρούς οίνους κυριαρχούν αρώματα από μπαχαρικά, πιπεριά, ντομάτα, κόκκινα φρούτα, με την επίδραση της παλαίωσης τα αρώματα εξελίσσονται σε αρώματα πάστας ελιάς, λιαστής ντομάτας, πιπεριού και δέρματος (Δήμου, 2012).

B. ΚΛΙΜΑ

Οι εδαφοκλιματικοί παράγοντες επιδρούν και καθορίζουν την πορεία ωρίμανσης, επηρεάζοντας έτσι και τον σχηματισμό των αρωματικών συστατικών της ράγας. Έρευνες έχουν δείξει ότι το άρωμα σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και ότι η ποσότητα και η ποιότητα αυτού αυξάνουν με την πρόοδο της ωρίμανσης (Σουφλερός, 2015). Η επιλογή ποικιλίας με μεγάλο βλαστικό κύκλο και υψηλές θερμικές απαιτήσεις, για μια περιοχή με ψυχρό κλίμα θα οδηγήσει πιθανότατα σε ανεπαρκή ωρίμανση και παραγωγή οίνου με περιορισμένα αρωματικά συστατικά (Πετροπούλου – Καραγιαννοπούλου, 2016). Ωστόσο, είναι δυνατό η υπερωρίμανση ή η γρήγορη ωρίμανση σε ένα πολύ θερμό κλίμα να μειώσουν την ένταση και τη λεπτότητα μερικών αρωμάτων. Για το λόγο αυτό, η παραγωγή λευκών οίνων θεωρείται περισσότερο επιτυχημένη, όταν τα σταφύλια από τα οποία προέρχονται συγκομίζονται μερικές μέρες πριν από την πλήρη ωρίμανσή τους, όταν η ένταση, η φρεσκάδα και η λεπτότητα του αρώματος βρίσκονται στο άριστο σημείο (Σουφλερός, 2015). Η καλλιέργεια της ίδιας ποικιλίας σε δύο περιοχές με διαφορετικό κλίμα και διαφορετικό ηλιοθερμικό δείκτη επηρεάζει πέρα από την ωρίμανση και τα σάκχαρα των σταφυλιών και τη γενικότερη σύσταση τους. Για παράδειγμα, η καλλιέργεια της ποικιλίας Ξινόμαυρο στη Νάουσα και στο Αμύνταιο οδηγεί σε διαφοροποίηση και ως προς την ποσότητα και κατανομή των μεμονωμένων αμινοξέων που περιέχονται στα σταφύλια, με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση του αρωματικού δυναμικού των παραγόμενων οίνων, καθώς τα αμινοξέα συνδέονται με την παραγωγή αρωματικών ουσιών (Bouloumpasi, *et al.* 2002). Οι Mendez-Costabel *et al.* (2014) αξιολόγησαν τις επιπτώσεις των χειμερινών βροχοπτώσεων στις κύριες ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τα πράσινα αρώματα στα σταφύλια και τους οίνους κατά τη διάρκεια των ετών 2009 και 2010 στην Καλιφόρνια και διαπίστωσαν ότι τα συστατικά των σταφυλιών και των οίνων επηρεάστηκαν δραματικά από την απουσία βροχοπτώσεων και τα δύο έτη. Η περιγραφική οργανοληπτική ανάλυση έδειξε ότι η έλλειψη βροχοπτώσεων είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή οίνων με λιγότερα πράσινα αρώματα και πιο έντονα χαρακτηριστικά φρούτων κατά την πρώτη χρονιά, ενώ την επόμενη χρονιά επειδή επηρεάστηκε η ανάπτυξη των πρέμων παράχθηκαν κρασιά λιγότερο έντονα φρουτώδη αρώματα και κακής ποιότητας τανίνες. Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε ότι εάν τα επίπεδα βροχόπτωσης είναι χαμηλότερα από τα φυσιολογικά, επιτυγχάνεται θετική επίδραση στη σύνθεση σταφυλιών και οίνων (Mendez-Costabel *et al.* 2014).

C. ΈΔΑΦΟΣ

Όσον αφορά στα εδάφη, θεωρούνται ιδανικά για την παραγωγή υψηλής ποιότητας οινοποιήσιμων σταφυλιών εδάφη αμμοχαλικώδη, τα οποία χαρακτηρίζονται από μέτρια γονιμότητα. Οι ιδιότητες αυτές εξασφαλίζουν ικανοποιητική στράγγιση, καλύτερη θέρμανση και εφόσον τα εδάφη εφοδιάζονται με τις απαραίτητες ποσότητες νερού επιτρέπουν στο ριζικό σύστημα να αναπτυχθεί ταχύτερα και προωμίζουν την ωρίμανση των σταφυλιών. Τα χουμώδη εδάφη δίνουν μεγάλες αποδόσεις, ωστόσο τα παραγόμενα σταφύλια και οι οίνοι που προκύπτουν από αυτά στερούνται αρώματος και γεύσης. Τα ηφαιστειογενή εδάφη ευνοούν την παραγωγή ποιοτικών οινοποιήσιμων σταφυλιών. Εδάφη που προέρχονται από δολομιτικά πετρώματα (ιζηματογενή ανθρακικά ορυκτά του ασβεστίου και του μαγνησίου) ευνοούν την παραγωγή λευκών οίνων εξαιρετικής ποιότητας, ενώ εκείνα που έχουν γρανιτική προέλευση (σκληρό, πυριγενές, πλουτώνιο πέτρωμα που διαθέτει όξινη σύσταση και έχει προέλθει από στερεοποιημένο και κρυσταλλοποιημένο μάγμα) ή βασαλτική προέλευση (πέτρωμα με λεπτόκοκκη υφή που προήλθε από έκρηξη και ταχεία ψύξη λάβας) δίνουν οίνους με υψηλό αλκοολικό τίτλο και ευχάριστη γεύση, που ωστόσο υστερούν χρωματικά (Τσέτουρας, 2014). Ο τύπος του εδάφους, αν και σχετίζεται στενά με την κατάσταση του νερού του εδάφους, έχει ανεξάρτητη επίδραση στο άρωμα των σταφυλιών ποιότητας. Οι ερευνητές Falcao *et al.* (2008) υποστηρίζουν ότι ένα εδαφικό προφίλ πλουσιότερο σε ορυκτά θα μπορούσε να παράγει κρασιά πλουσιότερα σε ορισμένες αρωματικές ενώσεις αρώματος, καθώς οι Oliveira *et al.*

(2003) έδειξαν μια σχέση μεταξύ των χαρακτηριστικών του εδάφους και ορισμένων προδρόμων C13-νορισοπρενοειδών. Στην έρευνά τους, οι αμπελώνες που δεν αρδεύονταν παρήγαγαν υψηλότερα επίπεδα καροτενοειδών που προέρχονται από τη ράγα (β-καροτένιο, νεοξανθίνη, βιολοξανθίνη και λουτεξανθίνη), αλλά μόνο όταν το έδαφος είχε χαμηλή ικανότητα συγκράτησης ύδατος. Αυτό το φαινόμενο δείχνει το δυναμικό για μια φυσιολογική απόκριση που προκαλείται μέσα στο ριζικό σύστημα και απαιτεί επαρκή ξήρανση του εδάφους. Τα C13-νορισοπρενοειδή συσχετίζονται στενά και με τις φυτικές ορμόνες που συνδέονται με το στρες, όπως το αμψισικό οξύ.

D. TERROIR

Το terroir πρόκειται για έννοια που περιγράφει τη συνεργασία που δημιουργείται ανάμεσα στο φυσικό περιβάλλον, δηλαδή το κλίμα, το έδαφος και το υπέδαφος, και τα φυτά, δηλαδή ποικιλία και υποκείμενο αμπέλου, σε συγκεκριμένο γεωγραφικό τόπο και υπό συγκεκριμένες ανθρώπινες επεμβάσεις. Όπως φαίνεται λοιπόν και από τον ορισμό, η έννοια του terroir αφορά ήδη εγκαταστημένους αμπελώνες και κάθε αμπελώνας αντιπροσωπεύεται από ένα terroir που μπορεί να εμφανίζει ομοιότητες ή διαφοροποιήσεις από ένα άλλο. Ο προσδιορισμός των ενοτήτων των terroirs βασίζεται κυρίως στις διαφορές τους ως προς το αμπελοοινικό δυναμικό τους (Ταβερναράκη, 2000). Οι ερευνητές Foroni et al. (2017) αξιολόγησαν συνολικά για πρώτη φορά την επιρροή του terroir σε μονομερή αισθητήρια χαρακτηριστικά των οίνων και απέδειξαν την ανθρώπινη ικανότητα να διακρίνει λεπτές οσφρητικές διαφορές σε οίνους ίδιας ποικιλίας που παράχθηκαν σε διαφορετικά terroirs. Οι Falcao et al. (2008) αξιολόγησαν τα χαρακτηριστικά του εδάφους τεσσάρων διαφορετικών τοποθεσιών στην περιοχή Σάντα Καταρίνα της Βραζιλίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θέση του αμπελώνα είχε ισχυρή επιρροή στο κλάσμα των πτητικών ενώσεων των παραγόμενων οίνων. Οι ποικιλιακές πτητικές ενώσεις ήταν βασικός παράγοντας στη διαφοροποίηση των παραγόμενων οίνων, σύμφωνα με τις τοποθεσίες. Επιπλέον, οι Ribereau-Gayon et al. (2006) έδειξαν ότι το έδαφος έχει αποφασιστική επίδραση στις συγκεντρώσεις μεθοξυπυραζίνης των οίνων Merlot, Cabernet Franc και Cabernet Sauvignon της περιφέρειας του Μπορντό, λόγω της επίδρασής του στη βλαστική ανάπτυξη. Τα αποτελέσματα συγκεκριμένα έδειξαν ότι τα σταφύλια που προήλθαν από πρέμνα καλλιεργούμενα σε καλά στραγγιζόμενα χαλικώδη εδάφη είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σταφυλιών που προήλθαν από αμπελώνες με ασβεστολιθικά ή αργιλώδη εδάφη (Ribereau-Gayon et al. 2006).

1.5.2 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ ΟΙΝΟΥ

Τα δευτερογενή αρώματα ή αρώματα ζύμωσης, είναι οι οσμηρές πτητικές ενώσεις του οίνου, οι οποίες δημιουργούνται, κυρίως, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και παράγονται από τις ζύμες, αλλά μπορούν να αναπτυχθούν και κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αξίζει να σημειωθεί πως τα αρώματα αυτής της κατηγορίας, καταλαμβάνουν, τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά, το μεγαλύτερο αριθμό πτητικών ενώσεων του οίνου. Οι τάξεις χημικών ενώσεων που απαντώνται κατά τις ζυμώσεις, είναι αλκοόλες, εστέρες, πτητικά οξέα, θειούχες ενώσεις, πτητικές φαινόλες και πτητικές αζωτούχες ενώσεις (Γκουλιώτη, 1996). Ακολουθεί παράθεση των κατηγοριών των αρωματικών ενώσεων που διαμορφώνουν το δευτερογενές άρωμα.

A. ΑΙΘΑΝΟΛΗ

Παράγονται από τη δράση των ζυμομυκήτων είτε απευθείας στα σάκχαρα, είτε στα αμινοξέα των σταφυλιών (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Η αιθανόλη είναι αδιαμφισβήτητα η πιο σημαντική αλκοόλη μέσα στο κρασί, καθώς αποτελεί οργανικό υποπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Συμβάλλει στο άρωμα, αλλά και στη γεύση των οίνων. Πολλές φορές, αναφέρεται ως αλκοόλη ή αλκοόλ. Η οσμή της είναι αρκετά έντονη, δριμεία και χαρακτηριστική, με άρωμα που θυμίζει ορισμένες ποικιλίες μήλου (γλυκερή μεσαίας έντασης οσμή). Στην πραγματικότητα, όσο πιο μικρό μόριο έχει μια ένωση τέτοιου τύπου, τόσο πιο χαρακτηριστική οσφρητικά είναι, καθώς επίσης όσο πιο πτητική είναι τόσο πιο έντονα μυρίζει. Κάτω από κανονικές συνθήκες ζύμωσης, η αιθανόλη μπορεί να συσσωρευτεί μέχρι περίπου 14-15 %. Η αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη) (σ.ζ. 78.3⁰C) έχει χαρακτηριστική και αρκετά δριμεία οσμή.

B. ΑΝΩΤΕΡΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ

Η παρουσία των αλκοολών στον οίνο είναι απαραίτητη για την παραγωγή των σύνθετων αρωμάτων, διότι σ' αυτές οφείλεται η ισορροπία των ευχάριστων αρωμάτων και των υπόλοιπων συστατικών που περιέχονται στο κρασί, όπως και η πολυπλοκότητα της οσμής. Οι ανώτερες αλκοόλες με ευθεία άλυσσο ή αλλιώς fusel oils (ζυμέλαια) είναι προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης και παράγονται μαζί με την αιθυλική αλκοόλη. Οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται από τις ζύμες είτε κατευθείαν από τα σάκχαρα ή από τα αμινοξέα των σταφυλιών μέσω της αντίδρασης Ehrlich (Berry, 1995). Μπορούν να προδώσουν ελαττωματικές οσμές, αλλά και να συνεισφέρουν και στη πολυπλοκότητα του μπουκέτου του παραγόμενου οίνου. Οι ανώτερες αλκοόλες (3-6 άτομα C), επηρεάζουν το άρωμα του οίνου και οι περισσότερες

αποτελούν υποπροϊόντα των ζυμών και των βακτηρίων, ενώ αναδύουν βαριά οσμή διαλυτικού. Η 1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-προπανόλη (ισοβουτυλική αλκοόλη), η 3-μεθυλ-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη), η μεθυλ-βουτανόλη έχει οσμή βερνικιού νυχιών. Σε ποσότητες < 400 mg/L συμμετέχουν θετικά, ενώ σε συγκεντρώσεις > 400 mg/L δίνουν ανεπιθύμητες βαριές οσμές, ειδικά αυτές με 6 άτομα C (εξανόλες) έχουν χορτώδη οσμή. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν θετικά αρώματα και προσθέτουν στα επιθυμητά αρωματικά χαρακτηριστικά του οίνου, ενώ σε υψηλές έχουν άσχημη επίδραση ως αρνητικοί ποιοτικοί παράγοντες, καθώς έχουν ένα δριμύ, καυστικό χαρακτήρα. Η περιεκτικότητά τους φτάνει στα 400-500mg/L, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, είναι πιθανόν να δώσουν ανεπιθύμητες οσμές, γι' αυτό θεωρείται ότι οι περισσότερες αλκοόλες δίνουν δυσάρεστες οσμές (Maarse, 1991). Στις αλκοόλες και συγκεκριμένα στις πολυόλες ανήκει και η γλυκερόλη, η οποία όμως, αν καταναλωθεί από βακτήρια δίνει ακρολεΐνη που αντιδρώντας με φαινόλες και ανθοκυάνες, δίνει πικρή γεύση στον οίνο. Γλεύκη με περίσσεια ανόργανου αζώτου, παράγουν λιγότερες αλκοόλες, εκτός της προπανόλης, η οποία σχηματίζεται από σάκχαρα. Επίσης, η παραγωγή ανώτερων αλκοολών αυξάνεται αν βελτιωθούν οι συνθήκες που συμβάλουν στη βιομάζα των κυττάρων, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας. Όπως προκύπτει από διάφορες έρευνες, η φαινυλο-2-αιθανόλη (με μοριακό βάρος 122) που δίνει αρώματα τριαντάφυλλου και η σύνθεσή της, ευνοείται από την παρουσία οξυγόνου κατά τη ζύμωση, τις χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης και από κάποιες ειδικές τεχνικές ερυθρής οινοποίησης, όπως είναι η θερμοοινοποίηση. Παράγεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, από πολύ μεγάλο αριθμό ζυμών και είναι παράγωγο του αντίστοιχου αμινοξέος φαινυλαλανίνη. Στους οίνους περιέχεται σε ποσότητες που κυμαίνονται από 20-180 mg/L. (Μ.Ο. 50 mg/L). Αποτελεί για το άρωμα του οίνου σημαντικό συστατικό, δίνοντάς του την ευχάριστη οσμή τριαντάφυλλου από την οποία χαρακτηρίζεται. Η φαινυλο-2 αιθανόλη αν και περιέχεται σε μικρές ποσότητες στους οίνους, εντούτοις η παρουσία της γίνεται αισθητή, γιατί είναι η μόνη ανάμεσα στις άλλες ανώτερες αλκοόλες που γίνεται αντιληπτή σε χαμηλές περιεκτικότητες (50 mg/L περίπου).

Με αυτόν τον τρόπο, η λευκίνη μετατρέπεται σε ισοαμυλική αλκοόλη (3-αίθυλ-βουτανόλη -1), η 1-ισολευκίνη σε αμυλαλκοόλη (2-μέθυλ-βουτανόλη-1) και η βαλίνη σε ισοβουτανόλη (2-μέθυλο-1-προπανόλη). Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο σχηματισμός των ανώτερων αλκοολών επηρεάζεται από τις οινοποιητικές πρακτικές, έτσι ώστε η σύνθεση τους να ευνοείται από την παρουσία οξυγόνου, τις υψηλές θερμοκρασίες ζύμωσης και την παρουσία αιρούμενων σωματιδίων στο γλεύκος. Ωστόσο οι Rireau-Gayon et al., (2000) θεωρούν ότι ισχύει το αντίθετο. Επιπλέον, η προσθήκη ζάχαρης και οι κλειστές δεξαμενές ζύμωσης δείχνουν να συμβάλλουν στην σύνθεση ανώτερων αλκοολών. Ακόμα οι Chen (1978) και Jackson (1994), υποστηρίζουν ότι κάποιες ανώτερες αλκοόλες μπορεί να προέρχονται από τις αλδεΐδες που βρίσκονται στο σταφύλι και από αναγωγική αφαίρεση της αζωτούχου ομάδας (reductive denitrification) του αμινοξέος ή διαμέσου σύνθεσης από τα σάκχαρα. Επιπροσθέτως οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται από τον μεταβολισμό των ζυμομυκήτων αλλοίωσης και βακτηριδίων.

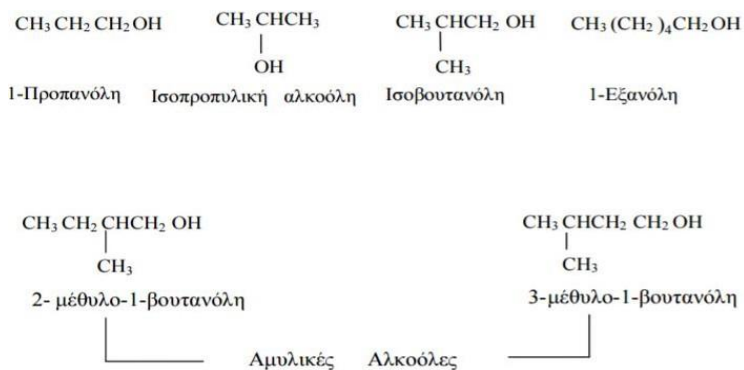
Στον οίνο ανιχνεύεται η προπανόλη-1 σε συγκεντρώσεις 10-70 mg/l που έχει οσμή παρόμοια με αυτή της αιθανόλης. Εντοπίζεται, επίσης, η προπανόλη-2. Η βουτανόλη-1 υπάρχει σε συγκεντρώσεις 0,5-8 mg/l και έχει οσμή παρόμοια με την αιθανόλη και η βουτανόλη-2 και την ισοβουτανόλη (2-μέθυλο-1-προπανόλη). Η μέθυλο-2-βουτανόλη-1 υπάρχει σε συγκεντρώσεις 15-150 mg/l και η μέθυλο-3-βουτανόλη-1 σε συγκεντρώσεις 30-500 mg/l. Και οι δύο αυτές αλκοόλες έχουν χαρακτηριστική, αρκετά δριμυία, οσμή διαλυτικού και ονομάζονται αμυλικές αλκοόλες. Βρίσκονται, επίσης, εξανόλη, επτανόλη, οκτανόλη και δεκανόλη. Ωστόσο, υπάρχουν δύο αλκοόλες, οι οποίες έχουν ένα κοινό στοιχείο, περιέχουν στο μόριό τους βενζολικό δακτύλιο. Αυτές οι ουσίες είναι η φαινυλο-2-αιθανόλη, με οσμή τριαντάφυλλου (σε υδατικά διαλύματα και συγκεντρώσεις 10-80 mg/l) και η τυροσόλη με οσμή μελιού. Και οι δύο χαρίζουν στο κρασί ευχάριστο άρωμα. Η πρώτη, προέρχεται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη και συντίθεται κατά την αλκοολική ζύμωση. Αν και περιέχεται σε μικρές ποσότητες συγκριτικά με τις άλλες ανώτερες αλκοόλες γίνεται εύκολα αντιληπτή. Ακόμη, παράγεται από αρκετά μεγάλο αριθμό ζυμών, και μέσα από έρευνες έχει προκύψει πως η σύνθεσή της ευνοείται από τις χαμηλές θερμοκρασίες της ζύμωσης, από την παρουσία οξυγόνου και από ειδικές τεχνικές ερυθρής οινοποίησης, όπως η θερμοοινοποίηση. Η δεύτερη, προέρχεται από το αντίστοιχο αμινοξύ τυροσίνη και είναι δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Συμμετέχει και αυτή στο άρωμα του οίνου (Σουφλερός, 2015).

Σημαντικότερες ουσίες αυτής της κατηγορίας, θεωρούνται οι ανώτερες αλκοόλες, οι οποίες επηρεάζουν πολύ το άρωμα των οίνων. Το άρωμα τους είναι αρκετά δριμύ και εμπεριέχουν τρία έως έξι άτομα άνθρακα. Μερικές από αυτές είναι η 3-μεθυλ-1-βουτανόλη και 2-μεθυλ-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη), 2-μεθυλ-1-προπανόλη (ισοβουτυρική αλκοόλη), εξανόλες και 2-φαινυλαιθανόλη. Οι περισσότερες παράγονται από τους ζυμομυκήτες κατά τον καταβολισμό των αμινοξέων, δηλαδή τα αμινοξέα καταναλώνονται πλήρως στα πρώτα στάδια που αυξάνονται οι ζυμομυκήτες, με αποτέλεσμα να παράγονται ανώτερες αλκοόλες κατά τη στάσιμη φάση των ζυμών (Μαλλούχος, 2003). Οι ανώτερες αλκοόλες βρίσκονται πάντα σε αυξημένη συγκέντρωση στους οίνους που κρίνονται καλά στη δοκιμασία. Όταν η ολική τους περιεκτικότητα ξεπεράσει τα 450 mg/l οι οίνοι εμφανίζουν βαριά οσμή. Η βουτανοδιόλη- 2,3 σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ως δευτερεύον προϊόν, όπως και η ακετόλη νη. Η γλυκερόλη υπάρχει στον οίνο σε συγκεντρώσεις 5-20 g/l. Σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και ειδικότερα στην

αρχή της όπου το NAD καταναλώνεται για την παραγωγή των δευτερευόντων προϊόντων. (Τσακίρης, 2008). Έρευνες έδειξαν ότι η ποσότητα των ανώτερων αλκοολών εξαρτάται από τις συνθήκες οινοποίησης (Ribéreau-Gayon, 1978, Σουφλερός 2015).

Πίνακας 12. Αρώματα μερικών εκ των αλκοολών που περιέχονται στον οίνο (Τσακίρης, 2017).

Χημική Ονομασία	Συγκέντρωση στον οίνο (σε mg/L)	Οσμή
Διακετύλιο / Βουτανεδιόνη-2,3	0,1-2	Φρέσκο Βούτυρο
Τυροσόλη	50-100	Μέλι προέρχεται από το αντίστοιχο αμινοξύ τυροσίνη και συμμετέχει στη διαμόρφωση του αρώματος του οίνου
Φαινυλο-2-αιθανόλη	20-180	Τριαντάφυλλο, γιασεμί
Εξανόλη		Φρεσκοκομμένη χλόη
2-μεθυλ-1-βουτανόλη	15-150	Άρωμα καμμένου
3-μεθυλ-1-βουτανόλη	30-500	Ζυμέλαιο
Προπανόλη-1	10-70	-



Εικόνα 22. Οι σημαντικότερες αλκοόλες των οίνων (Ρούσσοι, 2016)

C. ΠΗΤΗΤΙΚΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Τα λιπαρά οξέα συνεισφέρουν στο άρωμα των οίνων εξαιτίας του χαμηλού κατωφλίου αντίληψης που έχουν, των σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων που βρίσκονται στους οίνους, συγκριτικά με τα υπόλοιπα οξέα, και στην επαρκή ποσότητα τους σε φυσιολογικές θερμοκρασίες (Μαλλούχος, 2003).

Γενικά, τα οξέα θεωρούνται πως δίνουν ανεπιθύμητες οσμές στους οίνους, όμως συμβάλλουν στην αρωματική πολυπλοκότητα αυτών και παίζουν σημαντικό ρόλο και στην ποιότητά τους. Συνήθως, τα αρώματα αυτών των ουσιών, περιγράφονται από οσμές ξυδιού, τυριού, βουτύρου, λαχανικών και σαπουνιού, όταν αυξάνει το μοριακό βάρος, όπως το ισοβουτυρικό οξύ που έχει τη μυρωδιά του παλιού τυριού. Πιο συγκεκριμένα, τα κορεσμένα μονοκαρβονικά οξέα (λιπαρά οξέα), με 2 έως 12 άτομα άνθρακα έχουν οσμές που θυμίζουν τυρί, ενώ αυτά με 5 έως 12 είναι ουδέτερα οσφρητικά και εξαιρετικά ενδιαφέροντες και ευχάριστους αρωματικά εστέρες (Παληγογιάννη 2007). Τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας (6-12 άτομα άνθρακα), όπως είναι το εξανοϊκό, το οκτανοϊκό και το δεκανοϊκό οξύ, συνεισφέρουν και αυτά στο άρωμα των οίνων και οι συγκεντρώσεις τους, εξαρτώνται από τη σύνθεση του γλεύκους, τις αναερόβιες συνθήκες αύξησης, το στέλεχος του ζυμομύκητα, την καλλιέργεια του αμπελιού, τις οινολογικές πρακτικές και τη θερμοκρασία ζύμωσης (Βασιλείου, 2016). Ακόμη, τα λιπαρά πτητικά οξέα, βρίσκονται μόνο σε ίχνη στο γλεύκος και οφείλονται στο σχηματισμό τους από τα βακτήρια και τους ζυμομύκητες (Παληγογιάννη, 2007). Τα οξέα με ακόμα μεγαλύτερο μοριακό βάρος δεν έχουν οργανοληπτική σημασία.

Λινελαϊκό και λινολενικό είναι τα οξέα από τα οποία προέρχεται η εξανόλη και η εξανάλη, που είναι υπεύθυνες για τις φυτικές οσμές των οίνων που προέρχονται από άγουρα σταφύλια. Τα οξέα θεωρούνται γενικά ότι έχουν δυσάρεστο άρωμα, όμως συμβάλλουν στη γενική οσφρητική ισορροπία, συμμετέχοντας στην οσφρητική πολυπλοκότητα που αποτελεί τη βάση της ποιότητας του οίνου. **Το οξικό οξύ**, παρά την κακή του φήμη, είναι απαραίτητο για την πολυπλοκότητα του αρώματος του οίνου (Dubois, 1994). Το οξικό οξύ, αποτελεί το σημαντικότερο πτητικό οξύ που βρίσκεται στους οίνους. Ωστόσο, έχει την οσμή ξυδιού και συνδέεται κυρίως με ελατώματα, προσβολή του οίνου από οξικά ή/και γαλακτικά βακτήρια και άσχημες οσμές. Αν και είναι σημαντικό για την παραγωγή των οξικών εστέρων, οι οποίοι προσδίδουν φρουτώδη χαρακτήρα. Επίσης, πρόκειται για ένα υποπροϊόν της δράσης των βακτηρίων και των ζυμών που η συγκέντρωσή του μπορεί να αυξηθεί ακόμη και κατά το στάδιο της παλαίωσης σε βαρέλι από την υδρόλυση των ημικυτταρινών. Στα συνήθη επίπεδα που βρίσκεται αυτό το οξύ είναι επιθυμητό, γιατί συνεισφέρει στην πολυπλοκότητα τόσο του αρώματος όσο και της γεύσης των οίνων. Όμως, αν ξεπεράσει τα 300 mg/L, τότε έχει δυσμενείς επιδράσεις στα αρώματα των οίνων (Σουφλερός, 2015).

D. ΠΗΤΗΤΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΔΗΜΙΟΥΡΓΟΥΝΤΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η οικογένεια των φαινολικών παραγώγων είναι μια από τις σημαντικότερες οικογένειες φυτοχημικών ουσιών και απασχολούν ιδιαίτερα τη βιομηχανία των τροφίμων και όχι μόνο. Τα φαινολικά οξέα, όπως το καφεϊκό οξύ, δεν είναι οσμηρές ενώσεις, αλλά μέσα από διάφορες χημικές αντιδράσεις μπορούν να μετατραπούν σε άλλες που εμφανίζουν άρωμα καπνού, ξύλου ή δέρματος. Αυτό έχει αποδειχθεί με προσθήκη τέτοιων ουσιών στο κρασί. Τις περισσότερες φορές τα αρώματα αυτά δεν γίνονται εμφανή, γιατί καλύπτονται από άλλες ενώσεις.

Τα φαινολικά παράγωγα θα μπορούσαν να καταταχθούν σε δύο κύριες κατηγορίες, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές κατά την εφαρμογή της οινολογικής πρακτικής, είτε γίνεται αναφορά σε ερυθρούς, είτε σε λευκούς οίνους. Σχηματίζονται μάλιστα σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στους λευκούς οίνους σε σχέση με τους ερυθρούς. **Οι πολυμοριακές φαινόλες:** έχουν βασικό τύπο C6-C3-C6, ο οποίος αντιστοιχεί στη φλαβόνη. Για το λόγο αυτό το όνομά τους είναι φλαβανοειδείς φαινόλες. Κύριοι εκπρόσωποι των φλαβανοειδών φαινολών είναι οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες. **Οι μονομοριακές φαινόλες:** όπως είναι το γαλλικό οξύ και το καφεϊκό οξύ, που σε αντιδιαστολή προς τις πολυφαινόλες της προηγούμενης ομάδας, ονομάζονται μη φλαβανοειδείς φαινόλες (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). **Είναι εστεροποιημένα με τρυγικό οξύ, ενώ πολλά είναι ενωμένα με γλυκόζη. Έχουν μεγάλη διαφοροποίηση ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού. Ένα μέρος τους χάνεται από οξειδώσεις, ενώ οι ζύμες μπορούν να τα αποκαρβοξυλιώσουν και να δώσουν πτητικά παραπροϊόντα.** Πτητικές φαινόλες μπορούν, εκτός της ζυμωτικής οδού, να παραχθούν με ενζυμική υδρόλυση. Επίσης, με εστεροποίηση των φαινολικών οξέων παράγονται ενώσεις, όπως κατά κύριο λόγο η 4-βινυλφαινόλη και η 4-βινυλγουαϊακόλη με χαρακτηριστικό άρωμα γαρύφαλλου και ο κινναμωμικός αιθυλεστέρας που έχει εξαιρετικά χαμηλό κατώφλι οσφρητικής αντίληψης. Ενισχύουν το άρωμα των οίνων, αν και δεν φτάνουν στο κατώφλι αντίληψης. Στον οίνο ανιχνεύονται επίσης και τα αίθυλο-παράγωγά τους, 4-αιθυλ-φαινόλη και 4-αιθυλ-γουαϊακόλη και η παρουσία τους αποδίδεται στην δράση του βρετανομύκητα, *B.Bruxellensis* (Chatonnet et al., 1995). Πρόκειται για ουσίες που συμβάλλουν στο χαρακτηρισμό των ποικιλιών (Τσακίρης, 2008). Οι ενώσεις αυτές θεωρείται ότι δεν ανήκουν στα πρωτογενή αρωματικά συστατικά αλλά σχηματίζονται μάλλον κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή της θερμικής κατεργασίας των τροφίμων. Τα φαινολικά οξέα και η λιγνίνη διασπώνται θερμικά (π.χ κατά την κατεργασία του καπνισμού) ή αποικοδομούνται από μικροοργανισμούς σε φαινόλες. Ο καπνός που παράγεται από την καύση του ξύλου

(πυρόλυση της λιγνίνης) εμπλουτίζει τα προϊόντα με τα οποία έρχεται σε επαφή με φαινόλες και αποκτούν χαρακτηριστικό άρωμα (Ντουρτόγλου Θ.).

E. ΕΣΤΕΡΕΣ

Από το 1862, (Berthelot) είναι γνωστό ότι τα ελεύθερα οργανικά οξέα του οίνου, ενεργοποιημένα από το συνένζυμο A αντιδρούν με την αιθυλική αλκοόλη αυτού και σχηματίζουν τους εστέρες με την απώλεια μορίου νερού. Η αντίδραση εστεροποίησης στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος εξελίσσεται πολύ αργά και είναι αντιστρεπτή. $R-COOH + CH_3-CH_2OH \leftrightarrow R-COO-CH_2-CH_3 + H_2O$. Στην αντίδραση αυτή, άξια προσοχής είναι η ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα στα αντιδρώντα συστατικά και τα προϊόντα της αντίδρασης, η οποία εξηγεί το λόγο για τον οποίο στο ξύδι δεν υπάρχει μόνο οξικός αιθυλεστέρας, αλλά κυρίως οξικό οξύ. Η αλκοόλη οξειδώνεται σε οξικό οξύ, ενώ παράλληλα και όταν η αλκοόλη πέσει στο μηδέν ο σχηματιζόμενος εστέρας αποσυντίθενται στα στοιχεία του.

Οι ουδέτεροι εστέρες ονομάζονται και πτητικοί εστέρες, ενώ οι όξικοί εστέρες, κυρίως του τρυγικού και του μηλικού οξέως, ονομάζονται μη πτητικοί εστέρες. Από όλες τις ομάδες ενώσεων στον οίνο, οι εστέρες είναι αυτοί που αναγνωρίζονται πιο συχνά. Περίπου 160 διαφορετικοί εστέρες έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί, στον οίνο, μέχρι σήμερα. Οι περισσότεροι από αυτούς έχουν βρεθεί σε ίχνη και είτε έχουν μικρή πτητικότητα, είτε έχουν ήπια οσμή, επομένως η συμβολή τους στο άρωμα είναι μικρή. Παρόλα αυτά, οι πιο κοινοί βρίσκονται πάνω από το κατώφλι αντίληψης και έχουν φρουτώδες άρωμα και συμβάλλουν στη δημιουργία αρώματος των φρέσκων λευκών οίνων.

Οι εστέρες προέρχονται από τα σταφύλια σε πολύ μικρό ποσοστό, σχηματίζονται κυρίως από τους μικροοργανισμούς, κατά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης (ουδέτεροι εστέρες) και τέλος, κατά την ωρίμανση των οίνων, από μία πολύ αργή χημική αντίδραση εστεροποίησης (οξ. Εστέρες). **Οι εστέρες, κατά κύριο λόγο, παράγονται από τις ζύμες του γλεύκους και αριθμητικά αποτελούν τις περισσότερες αρωματικές ενώσεις. Οι εστέρες των οίνων συμβάλλουν στο άρωμα και σχηματίζονται είτε δια της χημικής οδού, κατά τη διάρκεια της παλαίωσης αυτών (υδρόλυση με το χρόνο), είτε δια της ενζυματικής οδού, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.** Και με τις δύο οδούς, οι εστέρες που σχηματίζονται από τα οξέα μ' ένα καρβοξύλιο είναι ουδέτεροι, ενώ εκείνοι που προκύπτουν από οξέα με περισσότερα καρβοξύλια μπορούν να είναι όξινοι και ουδέτεροι. Θεωρούνται από τις πιο σημαντικές ενώσεις του οίνου μετά το νερό, την αιθανόλη και τις αλκοόλες της ζύμωσης για τον αρωματικό χαρακτήρα του οίνου. Είναι, κυρίως, δευτερογενή αρώματα, τα οποία προέρχονται βιολογικά από τις ζύμες ή τα βακτήρια κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, υπάρχουν όμως και τριτογενή αρώματα εστέρων, που σχηματίζονται χημικά κατά την παλαίωση του οίνου, ελάχιστες ποσότητες περιέχονται και στα σταφύλια (Ronald, 2002). **Η περιεκτικότητα των οίνων σε εστέρες αυξάνει σημαντικά με το πέρασμα του χρόνου**, έτσι ώστε οι παλαιωμένοι οίνοι να περιέχουν 2-3 φορές περισσότερους εστέρες σε σχέση με τους νέους. Βιβλιογραφικά στοιχεία αναφέρουν ότι οι νέοι οίνοι περιέχουν 2-3 meq/l, ενώ οι παλαιωμένοι 9-10 meq/l. Το τεχνολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι εστέρες οφείλεται στους οργανοληπτικούς χαρακτήρες αυτών. **Εκτός από τον οξικό αιθυλεστέρα, που χαρακτηρίζεται για τη δυσάρεστη οσμή του, οι εστέρες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχουν άρωμα λουλουδιών ή φρούτων και συμμετέχουν αποφασιστικά στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων.**

Ανάμεσα στους πολυάριθμους εστέρες του οίνου, συχνά ο οξικός αιθυλεστέρας αντιπροσωπεύει από μόνος του το 80% του συνόλου των πτητικών εστέρων. Αν και το όριο, πέρα από το οποίο ο εστέρας αυτός γίνεται αντιληπτός οργανοληπτικά, είναι σχετικά υψηλό (160 mg/L), ωστόσο η παρουσία του ασκεί αναμφισβήτητα δυσμενή επίδραση στο άρωμα των οίνων (χαρακτηριστική ξινίλα) και τους καθιστά επίσης γευστικά τραχείς και στυφούς. Ο γαλακτικός και ο προπιονικός αιθυλεστέρας δε φαίνεται να παίζουν κανένα ρόλο στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων. Οι εστέρες αυτοί έχουν ουδέτερη οσμή και για να γίνουν αντιληπτοί απαιτούνται μεγάλες ποσότητες

Αντίθετα, οι οξικοί εστέρες του 2-μεθυλοπροπυλίου, του 3-μεθυλοβουτυλίου (χαρακτηρίζεται από άρωμα μπιρνανίας), του 2-φαινυλο αιθυλίου και οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα και ειδικότερα με C6, C8, C10 και C12 αποτελούν σπουδαία συστατικά του αρώματος και του μπουκέτου των οίνων. Στατιστικά στοιχεία έχουν αποδείξει ότι τα δείγματα οίνων, που επιλέχθηκαν ως "τα καλύτερα" μετά από μία οργανοληπτική εξέταση, είχαν πάντοτε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε οκτανοϊκό και δεκανοϊκό αιθυλεστέρα. Ο σχηματισμός των εστέρων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ποικίλλει χρονικά ανάλογα με τη φύση αυτών. Ο οξικός αιθυλεστέρας παράγεται κατά το 90% της περιεκτικότητας του προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ ο οξικός 3-μεθυλο βουτυλεστέρας αρχίζει να σχηματίζεται από την αρχή της ζύμωσης, περνάει από ένα μέγιστο και προς το τέλος αυτής μειώνεται πάλι. Ανάλογος προς τον οξικό 3-μεθυλο βουτυλεστέρα είναι και ο σχηματισμός του εξανοϊκού αιθυλεστέρα. Διάφοροι παράγοντες, όπως το γένος και το είδος των ζυμών, η θερμοκρασία της ζύμωσης, το pH και ο αερισμός του υποστρώματος (γλεύκος), η τεχνική της οινοποίησης κλπ, επιδρούν στο σχηματισμό των ανώτερων εστέρων.

Οι μόνοκαρβοξυλικοί είναι αυτοί που το οξύ από το οποίο προέρχονται έχει μια μόνο καρβοξυλομάδα και είναι αυτοί που παίζουν σημαντικό ρόλο στο αρωματικό προφίλ των οίνων. Από αυτή την ομάδα οι πιο σημαντικοί είναι αυτοί που

σχηματίζονται από την αιθανόλη και κορεσμένα οξέα όπως το εξανοϊκό, το οκτανοϊκό και το δεκανοϊκό οξύ και αυτοί από οξικό οξύ και ανώτερες αλκοόλες, όπως ισοβουτυλική και ισοαμυλική αλκοόλη. Οι εστέρες μικρού μοριακού βάρους αποκαλούνται και 'φρουτώδεις' εστέρες και δίνουν φρουτώδη αρώματα, όπως μπανάνα, μήλο και ανανά, ενώ όσο μεγαλώνει η ανθρακική αλυσίδα, ο αρωματικός χαρακτήρας μετατρέπεται προς σαπυνοειδείς οσμές που θυμίζουν κερι, κολώνια, σαπούνι και λάδι, για να καταλήξει σε λιπαρή νότα, όπως συμβαίνει με τους εστέρες των λιπαρών οξέων με C16-C18 (Killiam and Ough 1979, Ronald, 2002).). Εάν υπάρχουν τέτοιοι εστέρες στον οίνο, όπως είναι και ο οκτανοϊκός και ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας, τις περισσότερες φορές αποτελούν δείκτη ποιότητας στους ερυθρούς οίνους (Ronald, 2002). Ωστόσο, ο οξικός αιθυλεστέρας, που συχνά υπάρχει στον οίνο, δίνει την οσμή της κόλλας και θεωρείται ελάττωμα (González-Barreiro, et al., 2015). Κυρίως πρόκειται για οξικούς εστέρες ανώτερων αλκοολών ή αιθυλεστέρες (προερχόμενους από αντιδράσεις της αιθανόλης με πτητικά οξέα).

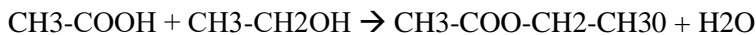
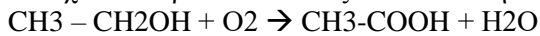
Οι υψηλές θερμοκρασίες, επίσης, δρουν ως παρεμποδιστές στην συσσώρευση εστέρων, ενώ ευνοούν την υδρόλυση αυτών. Η χαμηλή συγκέντρωση σε SO₂ και η διαύγαση του γλεύκους ευνοούν την σύνθεση και την διατήρηση των εστέρων. Η ενδοκυτταρική ζύμωση (car onic maceration) και η απουσία οξυγόνου κατά την ζύμωση ενισχύουν επιπλέον τον σχηματισμό εστέρων. (Killiam and Ough 1979)

Η παρουσία του οξικού αιθυλεστέρα στους οίνους οφείλεται τόσο στην εστεροποίηση του οξικού οξέος και της αιθυλικής αλκοόλης, που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης αυτών δια της χημικής οδού, όσο και τη σύνθεση αυτού από τους μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η εστεροποίηση όμως δια της χημικής οδού εξελίσσεται τόσο σιγά μέσα στους οίνους, ώστε να θεωρείται ότι η χημική αυτή αντίδραση δεν παρεμβαίνει σχεδόν καθόλου στη σύνθεση του οξικού αιθυλεστέρα και ότι το προϊόν αυτό είναι αποτέλεσμα καθαρά βιολογικών φαινομένων. Συνοδεύεται πάντα από οξικό οξύ και συμβάλλει σε μια διακριτή, υπόξινη γεύση στον οίνο σε μία τυπική συγκέντρωση των 120-160 mg/L, σε αντίθεση με το οξικό οξύ το οποίο είναι αισθητό στον οίνο, μόνο σε συγκέντρωση περίπου 700 mg/L. Η συνήθης συγκέντρωση του οξικού αιθυλεστέρα στον οίνο είναι 50-150 mg/L, το όριο αναγνώρισης βέβαια είναι στο 12-14 mg/L. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να είναι ευχάριστος και η συμβολή του θετική στο γενικό άρωμα, ενώ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση δίνει μία ξινή και ελαττωματική οσμή. Η ανάπτυξη ανεπιθύμητου ποσοστού οξικού αιθυλεστέρα συνήθως συνδέεται με το σταφύλι, το γλεύκος ή την επιμόλυνση του οίνου από οξικά βακτήρια. Ο οξικός αιθυλεστέρας μπορεί να καταστρέψει το άρωμα ενός οίνου, πολύ πριν τα επίπεδα του οξικού οξέος φθάσουν σε συγκέντρωση τέτοια ώστε να καταστρέψουν τον οίνο. Το τεχνολογικό του ενδιαφέρον βρίσκεται στο γεγονός ότι το συστατικό αυτό είναι υπεύθυνο για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων των προσβεβλημένων από τα οξικά βακτήρια και όχι το οξικό οξύ, όπως πιστευόταν παλιότερα.

Βιολογικά, ο οξικός αιθυλεστέρας παράγεται:

α) Από τις ζύμες. Κάθε κανονική αλκοολική ζύμωση συνοδεύεται από παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα, του οποίου η ποσότητα κυμαίνεται γύρω στα 50 mg/L. Υπάρχουν όμως ζύμες, όπως είναι κυρίως τα γένη *Kloeckera*, *Hanseniaspora* και *Saccharomyces*, που παράγουν υψηλότερες ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα με αποτέλεσμα την εμφάνιση δυσάρεστης οσμής και την υποβάθμιση της ποιότητας του οίνου. Επειδή όμως οι περισσότερες από τις ζύμες αυτές (με εξαίρεση το είδος *S'codes ludwigii*) είναι ευαίσθητες στο θειώδη ανυδρίτη, έγκυρη προσθήκη του SO₂, τις αδρανοποιεί και περιορίζεται έτσι η παραγωγή του εστέρα αυτού σε υψηλές ποσότητες, οι οποίες κάνουν την παρουσία του ανεπιθύμητη.

β) Από τα οξικά βακτήρια (*Acetobacter*). Οι μικροοργανισμοί αυτοί οξειδώνουν την αλκοόλη σε οξικό οξύ και στη συνέχεια εστεροποιούν το οξύ αυτό και την αιθανόλη, σχηματίζοντας οξικό αιθυλεστέρα :



Με τον τρόπο αυτό, ο σχηματισμός μιας ελάχιστης ποσότητας οξικού αιθυλεστέρα, ίσης με 50 mg- είναι αναπόφευκτη για τους ερυθρούς οίνους που φυλάσσονται για παλαίωση μέσα σε βαρέλια.

Η βιολογική εστεροποίηση του οξικού οξέος οδηγεί στον ίδιο εστέρα με την αντίδραση της χημικής οδού, αλλά η ταχύτητα είναι διαφορετική. Έχει διαπιστωθεί ότι, για να εστεροποιηθεί – δια της χημικής οδού - ένα ποσοστό οξικού οξέος ίσο με 7%, απαιτούνται 10 ημέρες, με την προϋπόθεση ότι η αντίδραση αυτή θα εξελίσσεται στους 100°C. Για να εστεροποιηθεί η ίδια σχεδόν ποσότητα (8%) οξικού οξέος, δια της βιολογικής οδού, βρέθηκε ότι σε θερμοκρασία ίση με 21°C απαιτούνται 2 μόνο ημέρες.

Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι ένα προϊόν ανεπιθύμητο και η περιεκτικότητά του δηλώνει το μέγεθος της αλλοίωσης των οίνων, έτσι διακρίνονται τρεις κατηγορίες ζυμών:

α) Τις οξυκόρυφες ζύμες *Hanseniaspora* και *Saccharomyces*, που παράγουν τις μεγαλύτερες ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα (περίπου 500 mg/L),

β) Τις ζύμες που ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* και που μπορούν να συνθέσουν μέχρι 100 mg/L περίπου από τον εστέρα αυτόν, και

γ) Τις ζύμες που ανήκουν στα γένη *Pichia* και *Candida*, που παράγουν μικρές ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα δυνάμενες να φθάσουν μέχρι 25 mg/L.

Αν και ο σχηματισμός του οξικού αιθυλεστέρα ευνοείται φανερά από τις χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης, το pH φαίνεται να μην ασκεί καμιά επ δρασση. Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις από τις οποίες προκύπτει ότι pH ίσο με 4,5 ευνοεί σημαντικά το σχηματισμό του οξικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τα χαμηλότερα pH.

Η προσθήκη, τέλος, του SO₂, στο γλεύκος πριν από το ξεκίνημα της ζύμωσης μειώνει, επίσης, το σχηματισμό του οξικού αιθυλεστέρα.

Οι Pineau et al. (2009), έδειξαν πρώτοι ότι μικρές διακυμάνσεις ανάμεσα σε 15 εστέρες του οίνου μπορούν να προκαλέσουν μεγάλες διαφοροποιήσεις στο συνολικό αρωματικό προφίλ του. Ιδιαίτερα σημαντικοί, όμως, για το άρωμα του οίνου αναφέρονται και κάποιοι υδροξυλιωμένοι εστέρες, όπως ο 2-ύδροξυ-4-μεθυλοπεντανοϊκός αιθυλεστέρας, ο οποίος αποτελεί μία ένωση που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των αρωμάτων. Οι Luccarelli et al., περιέγραψαν το αρώμα του από βατόμουρο και λάδι βαλεριάνας και έδειξαν ότι η συγκεκριμένη ένωση είναι από μόνη της χρήσιμη σε επίπεδα από 1-100 ppm για να αναδείξει αρώματα βατόμουρου, τροπικών φρούτων, μήλου ποικιλίας cashew (*Anacardium occidentale L*), λάιμ και λαδιού βαλεριάνας. Επιπλέον έδειξαν ότι η συγκεκριμένη ένωση αναμεμιγμένη με C4-C10 αλκανοϊκά οξέα, ενίσχυσε την φυσική, ώριμη τροπική φρουτώδη γεύση στα φρούτα (Lytra et al., 2012).

Στην παρακάτω λίστα αποτυπώνεται το άρωμα ορισμένων αρωματικών εστέρων (αιθυλεστέρες πτητικών οξέων - αιθανόλη και πτητικό οξύ) που έχουν εντοπισθεί στον οίνο (Κεχαγιά 2019, Παληογιάννη, 2007, Δήμου, 2012):

- Βουτανοϊκός Αιθυλεστέρας: Άρωμα Φρούτων, Άρωμα Βουτύρου
- Βουτυρικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα Φρούτων, κεράσι, μήλο, μπανάνα, τσιγλόφουσκα, φράουλα
- Βουτυρικός Μεθυλεστέρας: Άρωμα Κόκκινων Φρούτων, φράουλα
- Ισοαμυλικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα μπανάνας
- Ισοβουτυρικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα Κόκκινων Φρούτων, φράουλα
- Ισοβαλερικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα φρούτων, μήλο, κεράσι
- Εξανοϊκός Αιθυλεστέρας (C8-C12): Άρωμα λουλουδιών, Άρωμα φρούτων, μήλο, ανανάς, ροδάκινο, μπανάνα
- Εστέρας της μεθυλοσαβινόνης: άρωμα του τσίπουρου
- Βουτυρικός 2-αιθυλμεθυλεστέρας: Άρωμα φρούτων, φράουλα, μήλο
- Καπροϊκός αιθυλεστέρας: Άρωμα φρούτων, ανανάς, μήλο
- Κινναμωμικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα μελιού
- Καπρυλικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα φρούτων, αχλάδι, μήλο, ανανάς
- Δωδεκανικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα Κόκκινων Φρούτων, δαμάσκηνο
- Δεκανικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα Κόκκινων Φρούτων
- Οξικό Βενζόλιο: Άρωμα μήλου
- Οξικός βουτυλεστέρας: Άρωμα κόκκινων φρούτων
- Οξικός Εξυλεστέρας: Άρωμα Φρούτων, αχλάδι
- Οξικός Ισοαμυλεστέρας: Άρωμα μπανάνας
- Οκτανοϊκός Αιθυλεστέρας: Άρωμα φρούτων, Άρωμα λουλουδιών
- Οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας: Άρωμα Ξηρών Φρούτων, ξηρό δαμάσκηνο, Άρωμα Καπνού, Άρωμα λουλουδιών, τριαντάφυλλο, ροδόνερο
- Οξικός 3-μεθυλο-βουτυλεστέρας: Άρωμα Φρούτων, μπανάνα
- Οξικός εξυλικοεστέρας: Άρωμα Φρούτων, μήλο, κεράσι
- Οξικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα από κρασί-μπράντυ
- Πεντανοϊκός Αιθυλεστέρας: Άρωμα μήλου, >150 mg/L, οσμή κόλλας
- Προπανοϊκός Αιθυλεστέρας: Άρωμα από ρούμι
- Σιναμονικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα κόκκινων φρούτων, Άρωμα λουλουδιών
- Φορμικός Αιθυλεστέρας: Άρωμα φρούτων, άρωμα από ρούμι
- 3-μέθυλο-βουτανοϊκός Αιθυλεστέρας: Άρωμα φρούτων
- 2-υδροξυπροπανοϊκός Αιθυλεστέρας: Άρωμα φρούτων, Άρωμα λουλουδιών

Οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών (οξικό οξύ και ανώτερη αλκοόλη)

- Μικρής αλύσου: φρούτα, λουλούδια

- Μακριάς αλύσου: κολώνια, σαπούνι
- C16-C18: λαρδί
- Χαμηλές συγκεντρώσεις : φρούτα, λουλούδια
- Υψηλές συγκεντρώσεις: κολώνια

Οι εστέρες εξανοϊκός αιθυλεστέρας (καπρονικός αιθυλεστέρας), οκτανοϊκός αιθυλεστέρας (καπρυλικός αιθυλεστέρας), δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (καπρινικός αιθυλεστέρας), δωδεκανοϊκός θυλεστέρας (λαυρικός αιθυλεστέρας) έχουν φρουτώδη αρώματα μπανάνας και λουλουδιών σε βαθμό μειούμενης έντασης. Παράγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες με ζυμώσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες. Δεν είναι πάντοτε τόσο επιθυμητοί, διότι «σκεπάζουν» τα ποικιλιακά αρώματα.

Απο ερευνητικές εργασίες, προκύπτει ότι οι ζύμες που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ζυμωτική ικανότητα (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. chevalieri*, *S. prostoserdonii*, *S. italicus* και *S. heterogenicus*) παράγουν και τις μεγαλύτερες ποσότητες ανώτερων εστέρων, που κυμαίνονται από 4-13 mg/L. Ζύμες με ενδιάμεση ζυμωτική ικανότητα, όπως οι *Zygosaccharomyces bailii*, *S. capensis*, *Torulaspora delbrueckii*, *S. pretoriensis*, *S. insconspicuous* και *Saccharomycodes ludwigii* παράγουν ποσότητες που κυμαίνονται από 0,5-2,7 mg/L, με εξαίρεση τον *S. codes ludwigii* που παράγει υψηλότερες ποσότητες (περίπου 4,7 mg/L). Τέλος, οι ζύμες με τη μικρότερη ζυμωτική ικανότητα (όπως τα γένη *Pichia*, *Candida* (πρώην *Tortulopsis*), *Hanseniaspora* κ.ά) σχηματίζουν ποσότητες που ποικίλουν 0,3-2 mg/L.

Διαφορές παρατηρούνται, επίσης, και στις ποσότητες των παραγόμενων ανώτερων εστέρων ανάλογα με τη φύση αυτών. Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στο διαφορετικό βαθμό ελευθέρωσής τους από τα κύτταρα των ζυμών. Έτσι, έχει υπολογιστεί ότι οι οξικοί εστέρες του 3-μεθυλο βουτυλίου και του 2-φαινυλο αιθυλίου, καθώς εξανοϊκός αιθυλεστέρας ελευθερώνονται σχεδόν στο σύνολό τους. Αντίθετα οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων C8-12 κατακρατούνται κατά 40%, 90% και 100% αντίστοιχα από τα κύτταρα των ζυμών, γεγονός που δικαιολογεί και τις μικρότερες περιεκτικότητες των υστέρων αυτών στον οίνο.

Οι εστέρες, δίνουν ευχάριστα αρώματα στους οίνους, και διάφοροι παράγοντες επιδρούν στο σχηματισμό τους, όπως το pH, η θερμοκρασία ζύμωσης, το είδος των ζυμών, ο αερισμός του γλεύκους και η τεχνική οινοποίησης. Κατά την αλκοολική ζύμωση, η υψηλή οξύτητα, φαίνεται να ευνοεί την παραγωγή εστέρων. Η επίδραση της θερμοκρασίας ζύμωσης στη σύνθεση των εστέρων, σε γενικές γραμμές, ερμηνεύεται με το σχηματισμό μεγαλύτερων ποσοτήτων σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Έρευνες έδειξαν ότι στους 20°C παράγονται κατά 25% περίπου μεγαλύτερες ποσότητες εστέρων από ότι στους 30°C. Μερικές αποκλίσεις, από το γενικό κανόνα είναι δυνατόν να συμβαίνουν για ορισμένους από τους εστέρες αυτούς και για ορισμένα είδη ζυμών.

Ανάλογη με τη θερμοκρασία είναι και η επίδραση της οξύτητας στη σύνθεση των εστέρων. Διάφορα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η **σύνθεση των παραγόμενων εστέρων ευνοείται από υψηλότερα pH. Η ευνοϊκή μάλιστα επίδραση των υψηλότερων pH είναι πιο αισθητή στις υψηλότερες θερμοκρασίες ζύμωσης.**

Ο εμπλουτισμός του γλεύκους με οξυγόνο έχει δυσμενή επίδραση στο σχηματισμό των εστέρων. Εξαίρεση αποτελούν ορισμένες ζύμες οξειδωτικού τύπου, για τις οποίες η έλλειψη οξυγόνου αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξή τους και τη σύνθεση του ακετυλο-CoA που είναι απαραίτητο στην παραγωγή των εστέρων. Τέλος, η τεχνική της οινοποίησης ασκεί μια σχετική επίδραση στη σύνθεση των εστέρων των οίνων. Ειδικότερα στη λευκή οινοποίηση ο οίνος εκροής, σε σχέση με τον οίνο πίεσης, περιέχει μεγαλύτερες ποσότητες εστέρων. Μεγαλύτερες ποσότητες περιέχουν επίσης και οι οίνοι που προκύπτουν από γλεύκη που έχουν υποστεί απολάσπωση.

Η θερμοοινοποίηση φαίνεται να επηρεάζει μόνο τη σύνθεση του οξικού αιθυλεστέρα, αποκτώντας τελικά μικρότερες ποσότητες από το συστατικό αυτό. Η οινοποίηση σε ατμόσφαιρα CO₂, σε αντίθεση με τη θερμοοινοποίηση, προκαλεί αύξηση της ποσότητας του οξικού αιθυλεστέρα, ενώ δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στους άλλους εστέρες.

Η «συνεχής οινοποίηση», πρακτικά, δεν επιφέρει καμία μεταβολή στην περιεκτικότητα των εστέρων, σε σχέση με την κλασική οινοποίηση. Η προσθήκη, τέλος, του SO₂, στο γλεύκος, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, συνοδεύεται με **κάποια μείωση της περιεκτικότητας του οξικού αιθυλεστέρα, καθώς και των άλλων ανώτερων εστέρων.**

F. ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι πτητικές θειούχες ενώσεις, είναι μία ομάδα ενώσεων με ποικιλόμορφη αρωματική ενέργεια και με διάφορες επιδράσεις στο χαρακτήρα του οίνου. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να προκύψουν είτε από την αποικοδόμηση των αμινοξέων που περιέχουν θείο (κυστεΐνη, μεθειονίνη) από τους μικροοργανισμούς, την autólυση των ζυμών και άλλων αντιδράσεων (δευτερογενές άρωμα) είτε από την αναγωγική παλαιώση των οίνων (τριτογενές άρωμα). Εκτός από το υδρόθειο, αυτές οι ενώσεις, ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη χημική δομή τους, όπως οι θειοεστέρες, σουλφίδια, οι ετεροκυκλικές ενώσεις και οι θειόλες ή μερκαπτάνες. (Δήμου, 2012). Οι τελευταίες, καθώς επίσης και το υδρόθειο (H₂S), ενώσεις με μικρό μοριακό βάρος, συνδέονται έντονα με την οσμή του κλούβιου αυγού, σε αντίθεση με τα δύο πρώτα που δίνουν μια πιο σύνθετη οσφρητική αντίληψη (Ronald, 2002). Το H₂S, είναι από παλιά

η πιο γνωστή πτητική θειούχος ένωση και συχνά αυτή που υποβαθμίζει περισσότερο το άρωμα του οίνου. Εμφανίζεται κατά την ωρίμανση, τη ζύμωση ή την παλαίωση σε φιάλη. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να αποτελέσει μέρος του δευτερογενούς αρώματος και χαρακτηρίζει τα κρασιά που μόλις έχουν ζυμώσει. Ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις δίνει οσμή κλούβιου αυγού και η περιεκτικότητά του, μπορεί να μειωθεί με αερισμό. Οι πιο πολλές οργανικές ενώσεις που περιέχουν θείο, όπως και το υδρόθειο, συνήθως βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους οίνους, κάτω από το κατώφλι οσφρητικής αντίληψης. Διάφοροι παράγοντες δημιουργούν μεγαλύτερες ποσότητες, οδηγώντας σε κρασί με σαφή οργανοληπτικά ελαττώματα. Οι θειοεστέρες και τα σουλφίδια δίνουν πιο σύνθετη οσφρητική αντίληψη. Οι δυσοσμίες λόγω θειούχων ενώσεων έχουν συνδεθεί με την αυτόλυση των νεκρών κυττάρων των ζυμών (Jackson, 2002-2008, Τσακίρης, 2014). Γενικά, οι ενώσεις αυτές έχουν πολύ άσχημα αρώματα, όπως οσμές από σκόρδο και λάστιχο. Επομένως είναι ιδιαίτερος ανεπιθύμητες για τον οίνο (González-Barreiro, et al., 2015) Ορισμένες, όμως, από αυτές, συμβάλουν ιδιαίτερα στο μπουκέτο του οίνου, δίνοντας μάλιστα και φρουτώδη αρωματικό χαρακτήρα και τις ονομάζουν πολυλειτουργικές θειόλες. Αυτές οι ουσίες, ανευρίσκονται με χαμηλό μοριακό βάρος και κάτω από το κατώφλι οσφρητικής αντίληψης. Όμως, ακόμη και αν το ξεπεράσει πάλι δε θα υπάρξουν δυσμενείς οσμές (Βουκίδης, 2014). Οι θειούχες ενώσεις που βρίσκονται στον οίνο μπορεί να προέρχονται είτε από ενζυμικές είτε από μη ενζυμικές αντιδράσεις. Οι ενζυμικές, αφορούν το μεταβολισμό των αμινοξέων, πεπτιδίων ή πρωτεϊνών, που στο μόριο τους περιέχουν θείο, το μεταβολισμό των θειούχων μικροβιοκτόνων και το σχηματισμό παραπροϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης. Ενώ οι μη ενζυμικές, περιλαμβάνουν θερμικές, φωτοχημικές και χημικές αντιδράσεις θειούχων ενώσεων που πραγματοποιούνται κατά την οινοποίηση και την παλαίωση. Ακόμη, η έκθεση στο φως, μπορεί να ενεργοποιήσει τη παραγωγή αυτών των ενώσεων (Τσακίρης, 2017). Οι Peyrot des Gachons et al. (2005) ανέφεραν ότι το ήπιο έλλειμμα νερού αυξάνει τη συγκέντρωση προδρόμων ενώσεων των πτητικών θειολών στους οίνους από Sauvignon blanc, ενώ το σοβαρό έλλειμμα νερού έχει αρνητική επίδραση. Οι θειούχες ενώσεις των οίνων κατατάσσονται στις εξής ομάδες:

ΘΕΙΟΛΕΣ (ΜΕΡΚΑΠΤΑΝΕΣ). Είναι οργανικές ενώσεις που στο μόριο τους έχουν και μια ομάδα (-SH). Η πιο αντιπροσωπευτική ένωση αυτής της ομάδας είναι η αιθανθειόλη. Έχει μια οσμή «κρεμμυδιού», «λάστιχου» όταν βρίσκεται σε συγκεντρώσεις κοντά στο κατώφλι αντίληψης ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, έχει μια οσμή «βόθρου». Μια συναφής θειόλη, η 2-μερκαπτοαιθανόλη, συνδέεται με την παραγωγή μιας οσμής «στάβλου» (Rapp et al., 1985). Υπάρχουν όμως και θειούχες ενώσεις που περιέχουν πτητικά συστατικά, είναι συχνά πολύ οσμηρά ενώ η ομάδα που συγκροτούν συνεισφέρει σημαντικά στον φρουτώδη χαρακτήρα των οίνων με αρώματα όπως του φραγκοστάφυλλου, του γκρέιπφρουτ και του passionfruit τα οποία βρίσκονται σε πολύ υψηλές ποσότητες σε οίνους της ποικιλίας Sauvignon blanc σύμφωνα με έρευνες σε ποικιλιακούς οίνους της Ν.Ζηλανδίας. Οι συγκεντρώσεις της 3-μερκαπτο-εξαν-1-όλη, 3MH (με αρώματα γκρέιπφρουτ και passionfruit) κυμάνθηκαν στα 100-20000 ng/l, με όριο αντίληψης τα 60 ng/l ενώ του οξικού-3-μερκαπτοεξυλεστέρα, 3MHA (με γλυκά αρώματα passionfruit) κυμάνθηκαν στα 5-2500 ng/l με όριο αντίληψης τα 4 ng/l (Benkwitz and Nicolau, 2016), ενώ της μερκαπτο-4-μεθυλοπεντάν-2-όνη, 4MMP (με αρώματα βατόμουρου και passionfruit), με όριο αντίληψης τα 3 ng/l έφτασαν τα 30 ng/l. Η απελευθέρωση των ελεύθερων θειολών μέσα στον οίνο επηρεάζεται άμεσα από τη δράση των ζυμομυκήτων καθώς και από την ύπαρξη των πρόδρομων ουσιών αυτών. Στο σταφύλι απαντούν με τη μορφή πρόδρομων άοσμων ενώσεων συζευμένων με το αμινοξύ κυστεΐνη (Tominaga et al., 1998a). Μετά από έρευνες γνωρίζουμε ότι αυτές οι θειόλες συμβάλουν μοναδικά στο χαρακτηριστικό άρωμα του Sauvignon blanc (Darriet, 1993, Tominaga et al., 1998a). Σύμφωνα με την Natoiya, 2013 οι πρόδρομες ουσίες της 3MH βρίσκονται στον φλοιό των σταφυλιών ενώ της 4MMP στη σάρκα τους με αποτέλεσμα η προζυμωτική κρυσταλλοποίηση και μάλιστα για μεγαλύτερο χρόνο και σε υψηλότερη θερμοκρασία (18-20 °C) να οδηγεί σε αυξημένες ποσότητες 3MH στον οίνο. Παρότι για παράδειγμα η συγκέντρωση της 3MH στον τρύγο κυμαίνεται σύμφωνα με έρευνες στα 100 ng/l, μετά την αλκοολική ζύμωση η συγκέντρωσή της στο τελικό προϊόν μπορεί μέχρι και να τετραπλασιαστεί. Η πιο υδατικό στρές και μέτρια παροχή αζώτου αυξάνουν την συγκέντρωση των πτητικών θειολών στον οίνο.

ΘΕΙΟΑΙΘΕΡΕΣ. Είναι οργανικές ενώσεις με θείο και χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός μορίου θείου ενωμένο ανάμεσα σε δύο άτομα άνθρακα. Για παράδειγμα, το διμεθυλ-σουλφίδιο (DMS) έχει δομή $\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_3$. Πάνω από το κατώφλι αντίληψης έχει μια οσμή «γαρίδας» ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις η οσμή του θυμίζει «σπαράγγια», «καλαμπόκι», «μελάσα» (Lewis and Young, 1998).

ΣΟΥΛΦΙΔΙΑ ΚΑΙ ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ. Είναι κυκλικές ενώσεις που περιέχουν θείο, όπως η 2-μέθυλοθειοάνη -3-όλη που έχει μια αμυδρή οσμή «κρεμμυδιού» ή θείο και άζωτο, όπως η 5-(2-ύδροξυαιθύλιο)-4-μέθυλοθειοαζόλη που έχει οσμή «φυστικού». **ΘΕΙΟΕΣΤΕΡΕΣ** σχηματίζονται μεταξύ μιας καρβονυλικής ένωσης που περιέχει θείο και μιας αλκοόλης, με πιο σημαντικό τον 3-μερκαπτοπροπιονικό αιθυλεστέρα που έχει οσμή που θυμίζει «αλεπού». Οι ενώσεις με μικρό μοριακό βάρος, όπως το υδρόθειο και οι μερκαπτάνες, στους οίνους που δεν παρουσιάζουν οργανοληπτικό ελάττωμα, βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες, κάτω από το κατώφλι οσφρητικής αντίληψης. Ακόμη και όταν φτάσουν το κατώφλι αυτό, ο οίνος δεν αποκτά δυσάρεστο οσφρητικό χαρακτήρα. Διάφοροι παράγοντες δημιουργούν μεγαλύτερες ποσότητες, οδηγώντας σε οίνο με σαφή οργανοληπτικά ελαττώματα. Η δημιουργία του υδρόθειου σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητη για τις ζύμες, γιατί επιτρέπει την παραγωγή

θειούχων ενώσεων, όπως η θειαμίνη, η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, απαραίτητων στην ανάπτυξη των ζυμών και άρα είναι συνδεδεμένη και με τον τρόπο μεταβολισμού του αζώτου. Παράγεται με την αναγωγή ανόργανων ενώσεων του θείου που υπάρχουν στο γλεύκος, ως αποτέλεσμα της θείωσης των σταφυλιών ή του γλεύκους. Το υδρόθειο μπορεί να προέρχεται επίσης από την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών από τις ζύμες σε περιβάλλον που υπάρχει έλλειψη αφομοιώσιμου αζώτου. Παρόμοιο προϊόν είναι το διμεθυλοσουλφίδιο (DMS), προϊόν δευτερευόντος μεταβολισμού του θείου (με οσμή βρασμένου καλαμποκιού) που λαμβάνεται από την κυστεΐνη, που επίσης μπορεί να παραχθεί κατά την ωρίμανση του οίνου, συμμετέχοντας στην οσφρητική πολυπλοκότητα. Μία άλλη κατηγορία ενώσεων είναι τα προϊόντα μεταβολισμού της κυστεΐνης, της μεθειονίνης και της ομομεθειονίνης όπως η 2-μερκαπτοαιθανόλη, από μεταβολική οδό που εικάζεται ότι είναι παρόμοια αυτής των ανώτερων αλκοολών. Συνήθως η περιεκτικότητά τους δεν ξεπερνά το κατώφλι αντίληψης και γι' αυτό συμμετέχουν στη γενική οσφρητική αντίληψη και πολυπλοκότητα του οίνου δίχως να δημιουργούν οργανοληπτικά ελλωτάματα. Τέλος, οι θειούχες ενώσεις έχουν σημαντικό ρόλο στους οίνους και υπάρχει περιθώριο εξερεύνησης κι άλλων τέτοιων ουσιών, αν και οι περισσότερες από αυτές, δίνουν οσμές όπως σκόρδο, κρεμμύδι, λάχανο, και λάστιχο (Πίνακας) και γενικά θεωρείται ότι υποβαθμίζουν την ποιότητα του οίνου. (Καραγιάννης, διδακτορική διατριβή, 1999).

Πίνακας 13. Θειούχες ουσίες και οι δυσμενείς οσμές τους (Καραγιάννης, 1999)

Θειούχος Ένωση	Οσμή
Αιθανοθειόλη	Κρεμμύδι ή λάστιχο
Βενζοθειαζόλιο	Καουτσούκ
Διαιθυλοσουλφίδιο	Σκόρδο
Διθειάνθρακας	Καουτσούκ
Διμέθυλο-δισουλφίδιο	Λάχανο ή κουνουπίδι
Διμέθυλο-σουλφίδιο	Μούχλα ή σπαράγγι
	Μούχλα ή κουνουπίδι
Μεθανοθειόλη	Λάχανο ή πατάτα
Μεθειονόλη	Σάπιο αυγό
Υδρόθειο	Κουνουπίδι ή κρεμμύδι
2-μεθύλθειο-αιθανόλη	Γκάζι ή καουτσούκ
2-μέθυλο-τετραυδροθειοφαινόνη	Καουτσούκ ή μούχλα
2-μέρκαπτο-αιθανόλη	Ψητό κρέας
3-μεθύλθειο-προπιονικό οξύ	Λάχανο ή σκόρδο ή
4-μεθύλθειο-βουτανόλη	Χώμα

G. ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Αν και έχει βρεθεί μεγάλος αριθμός καρβονυλικών ενώσεων στο κρασί, λόγω των συνθηκών που επικρατούν στη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, μετασχηματίζονται σε άλλα προϊόντα, με αποτέλεσμα να προσδιορίζονται μόνο σε ίχνη, με εξαίρεση την ακεταλδεΐδη, η οποία μπορεί να βρεθεί σε προσδιοριζόμενες ποσότητες και μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 200 mg/L. Γενικά, οι αλειφατικές καρβονυλικές ενώσεις, αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα στο σχηματισμό ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα και σάκχαρα (Κοντοκώστας, 2010).

Η ακεταλδεΐδη ή οξική αλδεΐδη είναι ένα κανονικό δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και παράγεται μετά την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού (πυρουβικό) οξέος. Μικρές ποσότητες ακεταλδεΐδης σχηματίζονται επίσης από την οξείδωση της αλκοόλης των οίνων παρουσία αέρα. Είναι η πιο σημαντική καρβονυλική πτητική ένωση και αποτελεί το 90% του συνόλου των αλδευδών στους οίνους. Σε υψηλές συγκεντρώσεις δίνει ανεπιθύμητες και δριμείς οσμές ενώ σε χαμηλές ευχάριστες και φρουτώδεις νότες. Οι οργανοληπτικές της ιδιότητες, οσμή μήλου, καθώς και εκείνες των παραγώγων παρουσιάζουν μεγάλο τεχνολογικό ενδιαφέρον στην οινοποιία. Παράγεται μετά την αποκαρβοξυλίωση του πυροβικού οξέος, και μικρές ποσότητές της σχηματίζονται και από την οξείδωση της αλκοόλης των οίνων παρουσία αέρα (Σουφλερός, 2015).

Η παραγωγή της ακεταλδεΐδης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και η ιδιότητα της χαρακτηριστικής ομάδας της αλδεΐδης (-CHO) να δεσμεύει το SO₂, παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του χρόνου προσθήκης του θειώδη ανυδρίτη. Αν η προσθήκη του SO₂, πραγματοποιηθεί μετά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, η παραγόμενη ακεταλδεΐδη θα το δεσμεύσει ολότελα με αποτέλεσμα το συντηρητικό αυτό να χάσει τις ιδιότητες που το χαρακτηρίζουν.

Αντίθετα, αν ο θειώδης ανυδρίτης προστεθεί στο γλεύκος πριν αρχίσει η αλκοολική ζύμωση, τότε θα δεσμευτεί από τα σάκχαρα, τα οποία ζυμούμενα θα τον απελευθερώνουν προοδευτικά, με αποτέλεσμα να προσφέρει τις προστατευτικές του ιδιότητες σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Σημαντική επίδραση ασκεί, επίσης, η ακεταλδεΐδη στα γευστικά χαρακτηριστικά των οίνων, που δεν περιέχουν επαρκείς ποσότητες ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη. Συμβαίνει πολλές φορές κατά τη διατήρηση, τη μεταγύγιση ή την εμφιάλωση των παραπάνω οίνων να οξειδώνεται η αιθυλική αλκοόλη και να σχηματίζεται περίσσεια ακετ αλδεΐδης. Η ακεταλδεΐδη αυτή καθιστά τους οίνους γευστικά ανούσιους και επίπεδους (eventes). Όταν η οξείδωση της αλκοόλης γίνει κατά την εμφιάλωση των οίνων, η παραγόμενη ακετ αλδεΐδη θεωρείται υπεύθυνη για τη λεγόμενη «ασθένεια της φιάλης».

Η περιεκτικότητα της ακεταλδεΐδης στους ξηρούς οίνους μπορεί να φτάσει τα 50-100 mg/L, στους γλυκούς να ξεπεράσει τα 200 mg/L, ενώ στους ισπανικούς οίνους «sherry» και άλλους παρόμοιους συχνά ξεπερνάει τα 500-1000 mg/L. **Η περιεκτικότητά της κυμαίνεται ανάλογα με την εφαρμοζόμενη θείωση των οίνων, τον αερισμό αυτών στη διάρκεια των διαφόρων διαδικασιών οινοποίησης και παλαίωσης, την τεχνική της οινοποίησης, την περιεκτικότητα των οίνων σε σίδηρο, τις συνθήκες φωτισμού των χώρων αποθήκευσης του οίνου κ.ά.** Έχει διαπιστωθεί ότι στους λευκούς οίνους η σύνθεση της ακεταλδεΐδης δια της χημικής οδού ευνοείται σημαντικά από την παρουσία του σιδήρου και ότι είναι μεγαλύτερη στο φως παρά στο σκοτάδι.

Εκτός βέβαια από την ακεταλδεΐδη και άλλες ανώτερες αλδεΐδες περιέχονται στους οίνους. Αν και τα συστατικά αυτά βρίσκονται σε ίχνη, εντούτοις συμμετέχουν στη διαμόρφωση του αρώματος μερικών οίνων και δίνουν το χαρακτηριστικό τους τόνο. Η εξουδετέρωση της φρεσκάδας και της γεύσης του σταφυλιού, που επέρχεται σε ορισμένα λευκά σταφύλια με την προσθήκη του θειώδη ανυδρίτη, εξηγείται με τη δέσμευση των αλδεϋδών από το SO₂.

Εκτός από την ακεταλδεΐδη, παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης, το οποίο προέρχεται από τη συμπύκνωση δύο μορίων ακεταλδεΐδης, είναι και η ακετοΐνη ή ακετυλο-μεθυλο-καρβινόλη, της οποίας το περιεχόμενο, προέρχεται από διάφορες πηγές, όπως ζύμες ή βακτήρια μόλυνσης, ζυμομύκητες κατά την αλκοολική ζύμωση και βακτήρια κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Τέλος, το κατώφλι αντίληψης της ακετοΐνης στους οίνους, είναι υψηλό, με αποτέλεσμα, να θεωρείται αμελητέα η συνεισφορά της στο άρωμά τους (Μαλλούχος, 2003). Περιέχεται στους οίνους σε ποσότητες που κυμαίνονται από 2 μέχρι 84 mg/L με μέσο όρο γύρω στα 10 mg/L. Η σύνθεση της ακετοΐνης παρουσιάζει ένα μέγιστο (25-100 mg/L) στο μέσον περίπου της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ στη συνέχεια παρατηρείται μείωση της περιεκτικότητάς της. Το γεγονός αυτό κάνει φανερό το λόγο για τον οποίο οι επιδόρπιοι οίνοι είναι πλουσιότεροι σε ακετοΐνη. Πολλοί από τους οίνους αυτούς παράγονται με διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης, προσθέτοντας αλκοόλη, όταν έχει ζυμωθεί η μισή σχεδόν ποσότητα των περιεχόμενων σακχάρων. Υψηλές ποσότητες ακετοΐνης συναντάμε επίσης και στους οίνους «sherry». Το συστατικό αυτό, ως πτητικό που είναι, περιέχεται και στα αποστάγματα, στα οποία φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον. Η παρουσία της βοηθάει στο χαρακτηρισμό αυτών και επιτρέπει τη διάκριση ανάμεσα στο Cognac (Κονιάκ), προϊόν διπλής απόσταξης, (Αρμανιάκ) που προέρχεται από απλή απόσταξη.

Το διακετύλιο (ή βουτανεδιόνη-2,3) είναι επίσης δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και περιέχεται στους οίνους σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,1-2 mg/l. Η συνηθισμένη όμως ποσότητα είναι της τάξης των 0,2-0,3 mg/l. Η ουσία αυτή προκύπτει από την οξείδωση της ακετοΐνης και διακρίνεται για τη χαρακτηριστική και ευχάριστη οσμή φρέσκου βουτύρου. Λόγω, όμως, της μικρής περιεκτικότητας των οίνων σε διακετύλιο, η οσμή αυτή γίνεται αισθητή σε πολύ λίγες περιπτώσεις. Στα αποστάγματα των οίνων το διακετύλιο παρουσιάζει μεγαλύτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον και χρησιμεύει, όπως και η ακετοΐνη για τη διάκριση αυτών μεταξύ τους.

H. ΑΛΔΕΥΔΕΣ

Οι αλδεΐδες, εκτός από την ακεταλδεΐδη, η οποία αποτελεί προϊόν οξείδωσης της αιθανόλης και δίνει δυσάρεστη οσμή οξείδωσης, βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στον οίνο. Κάποιες αλδεΐδες υπάρχουν στο φρούτο και δίνουν χορτώδεις οσμές, πολλές προέρχονται από δράση ενζύμων σε λιπαρά οξέα και άλλες από επίδραση υψηλών θερμοοίνων σε σάκχαρα ενώ υπάρχουν και οι αλδεΐδες της βελανιδιάς που εκχυλίζονται στον οίνο κατά την ωρίμανση. Ενώ οι αλδεΐδες μπορεί να υπάρχουν στο σταφύλι κατά την διάρκεια της οινοποίησης, οι περισσότερες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες αλκοόλες. Η ακεταλδεΐδη είναι προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά η περιεκτικότητά της εξαρτάται από την ποσότητα του διοξειδίου του θείου που υπάρχει και με το οποίο ενώνεται. Η ακεταλδεΐδη ενώνεται επίσης με την αλκοόλη προς σχηματισμό ακετάλης. Μόνο η ελεύθερη ακεταλδεΐδη συμβάλει στον αρωματικό χαρακτήρα του οίνου, η οποία αν υπερβεί το κατώφλι αντίληψης, έχει αρνητική οσμή, διότι μεγάλες ποσότητες ακεταλδεΐδης καθιστούν τον οίνο ανούσιο και επίπεδο. Η εξανάλη και οι δύο εξανάλεις trans και cis έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές, ότι βρίσκονται στο σταφύλι και στο μούστο, μαζί με την 3-εξανόλη και trans-εξ-2-ενόλη. Η παρουσία τους οφείλεται στην έκθλιψη των σταφυλιών. Κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης αυτές οι αλδεΐδες μετατρέπονται στις αντίστοιχες αλκοόλες, που έχουν παρόμοια «χορτώδη» αρώματα σε μικρές συγκεντρώσεις.

Η Φουρφουράλη έχει οσμή καραμέλας και μαρτυρά θερμική επεξεργασία. Οι Φαινολικές Αλδεϋδες από το ξύλο των βαρελιών, κινναμωμική αλδεϋδη κανέλλα διαθέτουν άρωμα βανιλίνης-βανίλιας. Τέλος, η βενζαλδεϋδη έχει οσμή πικραμύγδαλου (Gamay).

I. ΑΚΕΤΑΛΕΣ

Η ακετάλη σχηματίζεται από την αντίδραση της ακεταλδεϋδης με την αιθυλική αλκοόλη και θεωρείται ότι έχει αρωματικό χαρακτήρα. Γενικά οι ακετάλες, που σχηματίζονται από άλλες αλκοόλες και αλδεϋδες παρουσιάζουν ένα πιο «φυτικό» αρωματικό χαρακτήρα αλλά θεωρείται ότι έχουν μικρό ρόλο στο άρωμα του οίνου. Επειδή θεωρείται ότι σχηματίζονται κατά την οξειδωτική παλαίωση και απόσταξη, προκρίπτονται σε οίνους τύπου sherry είτε σε brandy (Jackson, 2008). Ο σχηματισμός της ακετάλης καταλύεται (ευνοείται) από χαμηλό pH. Η τεχνολογική της σημασία οφείλεται στο ότι χαρακτηρίζεται από πολύ ισχυρή οσμή αλδεϋδης. Η περιεκτικότητά της στους οίνους είναι πολύ μικρή (< 5 mg/L), ενώ στα αποστάγματα και στα sherry φτάνει μέχρι 118 mg/L, με αποτέλεσμα να θεωρείται ποιοτικό κριτήριο (Σουφλερός 2015, Τσακίρης 2017).

J. ΛΑΚΤΟΝΕΣ/ ΦΟΥΡΑΝΟΝΕΣ

Οι Λακτόνες είναι κυκλικοί εστέρες που προέρχονται από αντιδράσεις εστεροποίησης μεταξύ μίας καρβοξυλομάδας και ενός υδροξυλίου του ίδιου μορίου (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Οι ενώσεις αυτές αποδίδονται στην ποικιλία, στη δράση των μικροοργανισμών αλλά και στην ωρίμανση σε δρύινα βαρέλια. Δίνουν αρώματα καραμέλας, βουτύρου, καρύδας κ.α. Περίπου 20 λακτόνες έχει ταυτοποιηθεί ότι υπάρχουν στους οίνους και αρκετές άλλες έχουν πρόσφατα ταυτοποιηθεί ότι βρίσκονται στα σταφύλια, είτε ότι εκχυλίζονται από τα δρύινα βαρέλια κατά την διάρκεια της παλαίωσης. Από το βαρέλι, προέρχεται η β-μεθυλ-οκταλακτόνη, με - tans άρωμα καρύδας και cis οσμή ξύλου. Οι περισσότερες λακτόνες/φουρανόνες(φουράνια) φαίνεται ότι σχηματίζονται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η πιο γνωστή είναι η **γ-βουτυρολακτόνη** με συγκέντρωση περίπου 1mg /l (Ribereau-Gayon et al., 2000), αλλά δεν θεωρείται ως σημαντικό αρωματικό συστατικό των οίνων. Οι λακτόνες/φουρανόνες δείχνουν μια ποικιλία αρωματικών χαρακτηριστικών. Οι Sotolon και η HDMF ή φουρανεόλη παρόλο που έχουν παρόμοια χημική δομή, παρουσιάζουν διαφορετικά αρωματικά χαρακτηριστικά (Wang et al., 2017). Η Sotolon (4,5-διμεθυλο-τετρα-ύδρο-2,3-φουρανοδιόνη) είναι χαρακτηριστική των οίνων μολυσμένων από *Botrytis* (Masuda et al., 1984), όπως επίσης και των οίνων τύπου Sherry (Martin et al., 1992). Έχει μία οσμή γλυκιά, καμμένη, καρυδιού. Έτσι, ενώ τα δεύτερα ισομερή έχουν μια φρουτώδη/γλυκιά οσμή, τα πρώτα έχουν μια πικάντικη νότα. Οι 2-όνες τείνουν να παρουσιάζουν λιπαρό και χορτώδη χαρακτήρα, ειδικά αυτές με μικρό μοριακό βάρος, ενώ αυτές με μεγάλο μοριακό βάρος έχουν και μια νότα καρύδας.

K. ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι πτητικές αζωτούχες ενώσεις που βρίσκονται στον οίνο χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, στα **ακεταμίδια, τις ετεροκυκλικές ενώσεις και τις αμίνες**. Οι ζύμες, παράγουν ελάχιστες αμίνες και οι περισσότερες προέρχονται από το γλεύκος ή τη μηλογαλακτική ζύμωση. Στο σύνθετες pH του οίνου, οι αμίνες, βρίσκονται υπό τη μορφή άλατος, με αποτέλεσμα να είναι σχεδόν απίθανη η συνεισφορά τους στον αρωματικό χαρακτήρα των οίνων. Για τα ακεταμίδια, προκύπτουν τα ίδια σχεδόν συμπεράσματα με τις αμίνες, αφού το κατώφλι αντίληψής τους, είναι δέκα χιλιάδες φορές υψηλότερο από αυτό των αμιμών (Μαλλούχος, 2003).

L. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Συγκεντρωτικά, τα δευτερογενή αρώματα, επηρεάζονται από την διαδικασία και τη θερμοκρασία της οινοποίησης. Οι ζύμες, μεταβολίζουν τα σάκχαρα του σταφυλιού με τη δράση των ενζύμων που περιέχουν, με την αιθυλική αλκοόλη παίζει σημαντικό ρόλο στον αρωματικό χαρακτήρα του οίνου. Οι Jones et al. (2008) διερεύνησαν την επίδραση επιλεγμένων συστατικών του οίνου στο άρωμα που αντιλαμβάνεται ο καταναλωτής του οίνου, χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο διάλυμα που προσομοίαζε με έναν λευκό οίνο. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη ήταν τα ακόλουθα: Η βαθμολογία για το «συνολικό άρωμα» και άλλα χαρακτηριστικά του αρώματος όπως «άρωμα εστέρων» και «άρωμα ανθέων» επηρεάστηκαν θετικά από τη συγκέντρωση των πτητικών συστατικών. Ωστόσο, για καθένα από αυτά τα χαρακτηριστικά, η ένταση της επίδρασης των πτητικών ουσιών επηρεάστηκε εν μέρει και από τα επίπεδα της γλυκερίνης και της αιθανόλης στον πρότυπο οίνο. Όταν η ένταση των πτητικών συστατικών ήταν υψηλότερη, τότε η ένταση του «συνολικού αρώματος» δεν επηρεάστηκε από την παρουσία γλυκερόλης ή την αυξημένη ποσότητα αιθανόλης. Ωστόσο, στο χαμηλότερο επίπεδο των πτητικών συστατικών, η αιθανόλη φαινόταν να καταστέλλει το γενικό

άρωμα απουσία γλυκερόλης, αλλά αντίθετα το ενίσχυε παρουσία γλυκερόλης. Η παρουσία πρωτεΐνης οδήγησε σε αυξημένη ένταση των χαρακτηριστικών αρώματος «άρωμα ανθέων», «άρωμα εστέρων», «άρωμα τυριού» και «συνολικό άρωμα», αλλά μόνο όταν η συγκέντρωση των πτητικών συστατικών ήταν σε χαμηλό επίπεδο. Στο υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης πτητικών συστατικών, η προσθήκη πρωτεΐνης δεν επέφερε καμία αλλαγή ή μείωση στην αντιληπτή ένταση αυτών των χαρακτηριστικών. Η παρουσία πολυσακχαριτών είχε ελάχιστη επίδραση στις εντάσεις των επιμέρους χαρακτηριστικών του αρώματος. Η μόνη εξαίρεση ήταν μία μικρή επίδραση των πολυσακχαριτών στο «άρωμα ανθέων» και «άρωμα εστέρων», το μέγεθος της οποίας εξαρτάται από το επίπεδο της αιθανόλης. Ειδικότερα, η ένταση του «αρώματος εστέρων» μειώθηκε λόγω της παρουσίας πολυσακχαριτών στο υψηλότερο επίπεδο αιθανόλης. Η αιθανόλη και η γλυκερόλη σε συνδυασμό πιθανώς να επηρεάζουν την έκταση στην οποία άλλοι παράγοντες επηρεάζουν τη συνολική ένταση του αρώματος. Τέλος, το χαμηλότερο συνολικό άρωμα παρατηρήθηκε στην συνδυασμένη παρουσία πολυσακχαριτών και γλυκερόλης στο χαμηλότερο επίπεδο αλκοόλης. Αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να εξηγηθεί από την αύξηση του ιξώδους του πρότυπου οίνου που μείωσε την πτητικότητα του αρωματικού μίγματος (Jones et al. 2007).

1.5.3 ΤΡΙΤΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ ΟΙΝΟΥ

Τα τριτογενή αρώματα ή μπουκέτο ή ευωδιά ή ανθοσμιά, χαρακτηρίζουν τον παλαιωμένο οίνο και οφείλονται σε αρωματικά συστατικά που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης με οξειδώσεις, αναγωγές, εστεροποιήσεις και άλλους μηχανισμούς. Ανεξάρτητα από τον περιέκτη όπου διατηρείται ο οίνος (δεξαμενή, βαρέλι και / ή φιάλη), κατά τη διαδικασία της παλαίωσης διεξάγονται πολλές χημικές αντιδράσεις (Grainger, 2009). Δεδομένου ότι διακρίνονται δύο τύποι παλαίωσης, αντίστοιχα υπάρχουν και δύο τύποι μπουκέτου: το οξειδωτικό μπουκέτο των οίνων που παλαιώνουν παρουσία οξυγόνου (π.χ. jerez κλπ.) και οφείλεται κατά βάση στην ακεταλδεύδη και τα παράγωγά της, και το αναγωγικό μπουκέτο των οίνων, που παλαιώνουν σε απόλυτη απουσία οξυγόνου και έχει την προέλευσή του στις αρωματικές ενώσεις του φλοιού των σταφυλιών, καθώς και στις πολυφαινόλες. Το μπουκέτο αποδίδεται στις ανώτερες αλκοόλες, που είναι σημαντικές ως πρόδρομες ενώσεις για το σχηματισμό εστέρων κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, στα πτητικά (λιπαρά) οξέα, στους εστέρες που σχηματίζονται από τις ανώτερες αλκοόλες και τα λιπαρά οξέα, στους αιθυλικούς εστέρες των λιπαρών οξέων, **στους εστέρες των μη πτητικών οξέων, στα οξέα διυδροξυμυλεϊκό, δικετοηλεκτρικό και διοξυτρυγικό**, στις ενώσεις βαλίνη, λευκίνη, αιθανολαμίνη και σε πολλές άλλες (Σουφλερός, 2012, Zhu et al. 2016). Τα τριτογενή αρώματα, που αναπτύσσονται κατά την παλαίωση των εκλεκτών οίνων και μπορούν να παρουσιάσουν μία πολύπλοκη σειρά από απρόσκοπτα, συνυφασμένα αρωματικά χαρακτηριστικά οσμής, που ιδανικά βρίσκονται σε απόλυτη αρμονία. Τα τριτογενή αρώματα είναι εκείνα που συχνά προκαλούν τα πιο περιγραφικά σχόλια, όπως π.χ. σέλα αλόγου, πούρο Αβάνας, δέρμα και φθινοπωρινός κήπος, ενώ πολλά φυτικά χαρακτηριστικά, όπως οι μυρωδιές που μοιάζουν με λάχανο ανήκουν επίσης στην τριτογενή ομάδα (Grainger, 2009). Κατά την παραμονή του οίνου στο βαρέλι λαμβάνει χώρα εκχύλιση αρωματικών ενώσεων και πολυφαινολών από το ξύλο του βαρελιού. Το επεξεργασμένο ξύλο από βελανιδιά περιέχει αρκετές πτητικές ουσίες με συγκεκριμένα αρώματα. Οι ενώσεις αυτές παράγονται από τη διάσπαση των σύνθετων πολυμερών ενώσεων του ξύλου (λιγνίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη κ.ά.) (Λιολιούσης, 2007). Οι αρωματικές ουσίες που εκχylίζονται ανήκουν στις ακόλουθες κατηγορίες αρωματικών ενώσεων: λακτόνες (π.χ. ούισκι λακτόνη), πτητικές φαινόλες (π.χ. ευγενόλη), αλδεύδες, φαινολικές αλδεύδες (π.χ. βανιλίνη), νορισοπρενοειδείς ενώσεις και τα φουρανικά παράγωγα (π.χ. 5-υδροξυμεθύλ-φουρφουράλη). Παρότι η βελανιδιά δίνει πολλές πτητικές ενώσεις, οι οποίες όλες συμβάλουν στο να αναδειχθεί το πολύπλοκο μπουκέτο, ωστόσο μόνο κάποιες απ' αυτές έχουν αρκετά σημαντικότερο ρόλο (Μπουκαρά, 2018).

1.6. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Με τις χημικές αναλύσεις στα δείγματα οίνων, προκύπτει ποσοτική και μερικώς ποιοτική εικόνα, ενώ με η οργανοληπτική εξέταση αποδίδει πλήρως της ποιοτική αξιολόγηση ενός οίνου. Για παράδειγμα με την αέρια χρωματογραφία και την εφαρμογή επιστημονικών μεθόδων επιτυγχάνεται ποσοτική ανάλυση των αρωματικών ενώσεων, αλλά από την ανάλυση είναι δύσκολο να προκύψει αν βρίσκονται σε ισορροπία. Η οργανοληπτική αξιολόγηση είναι μια **επιστημονική μέθοδος που εφαρμόζει αρχές πειραματικού σχεδιασμού και στατιστικής ανάλυσης στη χρήση ανθρώπινων αισθήσεων** στον προσδιορισμό των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών **για την αξιολόγηση ποιότητας καταναλωτικών προϊόντων**. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη δημιουργία συγκεκριμένων ερωτήσεων και την καταγραφή των αντίστοιχων απαντήσεων στα έντυπα αξιολόγησης, από μία ομάδα ανθρώπων, που καλούνται αξιολογητές. Με την εφαρμογή στατιστικών τεχνικών στα αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν κάποια αντιπροσωπευτικά συμπεράσματα για τα υπό αξιολόγηση προϊόντα.

Η αξιολόγηση των διαφόρων χαρακτηριστικών ενός καταναλωτικού προϊόντος που θα το κάνουν αποδεκτό ή όχι από τους καταναλωτές **συνδυάζει τόσο την αξιολόγησή του με τις αντικειμενικές μεθόδους και τις τεχνικές ανάλυσης όσο και την οργανοληπτική τους αξιολόγηση**. Η επιλογή ενός συγκεκριμένου προϊόντος έναντι κάποιων άλλων παρόμοιων στηρίζεται κατά πολύ στην **προσωπική εκτίμηση του καταναλωτή**, η οποία προκύπτει από τις γευστικές και άλλες προτιμήσεις του. Αυτές με τη σειρά τους πηγάζουν από τις εμπειρίες του (γευστικό υπόβαθρο), την εκπαίδευσή του στα θέματα της γεύσης, στη δεκτικότητα του και στη γνώση του.

Οι **δοκιμαστές** σε ένα οργανοληπτικό τεστ αποτελούν πρακτικά το «**όργανο μέτρησης**» και αυτός είναι ο λόγος που η επιλογή και η εκπαίδευσή τους είναι ιδιαίτερα σημαντική για την έκβαση της έρευνας. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες εκτιμητών ανάλογα με το στόχο της δοκιμής. Κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο χρησιμοποιούνται **ως εργαλεία αξιολόγησης διάφορα τεστ**. Η επιλογή του κατάλληλου τεστ **εξαρτάται κατά πολύ από τη φύση του στόχου του, αλλά και από το υπό εξέταση προϊόν, τους δοκιμαστές, το περιβάλλον και το επιθυμητό επίπεδο της απαιτούμενης ακρίβειας**.

Ο οργανοληπτικός έλεγχος ενός οίνου σχετίζεται με την ικανότητα, τις γνώσεις και την εμπειρία του δοκιμαστή αναγνωρίσει και να εξακριβώσει, μέσω των αισθητηρίων οργάνων του, το «**χαρακτήρα**» του οίνου. Είναι μια δοκιμασία δια μέσου των αισθήσεων που οδηγεί στην «**ανάλυση**» ποιότητας του οίνου και πέρα από την ανίχνευση και επισήμανση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του, μπορεί να οδηγήσει και στον εντοπισμό ανεπιθύμητων οπτικών χαρακτηριστικών (θολώματα), δυσάρεστων οσμών και γεύσεων, τις περισσότερες φορές οφείλονται σε διάφορα προβλήματα (ελαττώματα ή ασθένειες) του οίνου, που μπορεί να προέρχονται από το σταφύλι, από τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, από τις συνθήκες ωρίμανσης ή από τις συνθήκες παλαίωσης. Παρακάτω αναφέρονται κάποιες ουσίες, οι οποίες ανιχνεύονται με την όσφρηση (δεν αναφέρονται οι ελαττωματικές οσμές που οφείλονται στο σταφύλι ή δημιουργούνται κατά την ωρίμανση-παλαίωση). Όταν η συγκέντρωση τους βρίσκεται πάνω από μια συγκεκριμένη τιμή (κατώφλι αντίληψης) μπορεί να προσδώσουν δυσάρεστη οσμή στον υπό εξέταση οίνο και να αποτελέσουν σημαντικά ελαττώματα. Με τον εντοπισμό της ελαττωματικής οσμής ο δοκιμαστής μπορεί να προσδιορίσει την αιτία της.

Αξιολόγηση ενός οίνου πραγματοποιείται με τη χρήση και των τεσσάρων αισθήσεων

Την όραση για την όψη (χρώμα, απόχρωση, διαύγεια, διαφάνεια, ιξώδες, ύπαρξη CO₂)

Την όσφρηση για την οσμή και το άρωμα

Την γεύση για την γλυκύτητα, την οξύτητα, την πικρία, την ισορροπία

Την αφή για την αίσθηση της στυφάδας, του ιξώδους, το σώμα, λιπαρότητα



Εικόνα 23. Οργανοληπτικός έλεγχος οίνου (όψη, όσφρηση, γεύση). Οι αισθήσεις που εμπλέκονται στην οργανοληπτική δοκιμασία.

1.6.1 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

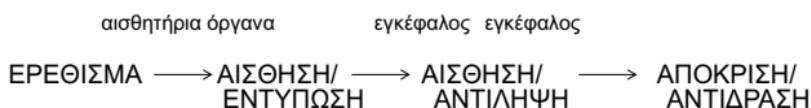
Ο σκοπός μιας οργανοληπτικής αξιολόγησης, επαφίεται στο γεγονός της προτίμησης, της ποσοτικής διαφοράς μεταξύ των δειγμάτων, την επιλογή του καλύτερου ποιοτικά δείγματος, καθώς και την ποιοτική διαβάθμιση των υπόλοιπων. Τέλος, σημαντική είναι η αναγνώριση της ομοιομορφίας για να επιτευχθεί η πολυπόθητη τυποποίηση των παραγόμενων προϊόντων.

Η οργανοληπτική εξέταση προσεγγίζει την εξήγηση της γεύσης και του αρώματος και είναι απαραίτητη για την πραγματική εκτίμηση της ποιότητας ενός δείγματος οίνου. Από τις χημικές αναλύσεις μέσω αέριας χρωματογραφίας και την εφαρμογή επιστημονικών μεθόδων προκύπτει ποσοτική και μερικώς ποιοτική εικόνα για τη χημική του σύνθεση των αρωματικών ενώσεων του, διότι είναι πολύ δύσκολο να εκτιμηθεί η ισορροπία μεταξύ τους. Οι αναλύσεις, ώστε να αποδώσουν την ανατομία, πρέπει να προσδιορίζουν > 300 συστατικά, δε μπορούν όμως να δώσουν τον "χαρακτήρα" του οίνου. Η οργανοληπτική εξέταση αποδίδει πλήρως την ποιοτική αξιολόγηση του.

Για μια επιτυχημένη δοκιμή δειγμάτων οίνων είναι απαραίτητο να ακολουθηθούν ορισμένα βήματα συγκεκριμένης και ειδικής τεχνικής για την εξέταση της όψης, των αρωμάτων και των γευστικών χαρακτηριστικών του οίνου, με αποτέλεσμα όλη η διαδικασία να βασίζεται σε τρία κυρίως σημεία: την οπτική, την οσφρητική και τη γευστική εξέταση. Ο οργανοληπτικός έλεγχος ενός δείγματος οίνου και η συνολική εκτίμηση/αξιολόγηση της ποιότητας αυτού γίνεται με τη βοήθεια κυρίως των τεσσάρων αισθήσεων.

Οι οργανοληπτικές δοκιμές πραγματοποιούνται σε ειδικά δωμάτια οργανοληπτικής δοκιμής με βάση πρωτόκολλο, όπως ορίζεται από τον International Organization for Standardisation ISO 3591. Τα κελιά των δοκιμαστών επιβάλλεται να είναι ομοιόμορφα μεταξύ τους, διαστάσεων 0,85 x 0,50 m, ανεξάρτητα και να έχουν ατομικά πτυελοδοχεία. Ο χώρος της οργανοληπτικής εξέτασης, πρέπει να είναι ευχάριστος κατάλληλα φωτισμένος (λευκός φωτισμός), αν όχι φυσικά φωτισμένος, απαλλαγμένος από κάθε οσμή και να έχει σταθερή θερμοκρασία 20-22°C, σχετική υγρασία 60-70%, καθώς και καλή ηχομόνωση. Γίνεται χρήση των standard ποτηριών σχήματος τουλίπας, κατάλληλων για οργανοληπτικής δοκιμή, τα οποία ορίζονται ως Wine Tasting Glass ο International Standard Organization (ISO) και ποσότητα δείγματος 30ml, σε θερμοκρασία σερβιρίσματος για τους προς εξέταση λευκούς οίνους (εδώ ασύρτικο) στους 8-12°C. Κατά την οργανοληπτική εξέταση δίνονται στους δοκιμαστές τα ανάλογα δελτία οργανοληπτικής αξιολόγησης. Το δελτίο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα οργανοληπτική εξέταση, παρατίθεται στο πειραματικό μέρος της εργασίας. Η οργανοληπτική εξέταση των οίνων είναι απαιτητική καθώς το κάθε δείγμα έχει τα δικά του χαρακτηριστικά (χρώμα, γεύση, άρωμα) και ο εκάστοτε δοκιμαστής καλείται να τα αναγνωρίσει και να τα αποδώσει σωστά και με σαφήνεια.

Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο είναι απαραίτητο να ακολουθούν την τήρηση των προτύπων σύμφωνα με τα κάτωθι ISO. Υπεύθυνος: καθήκοντα - γνώσεις/εμπειρία (iso 13300-1:2006, iso 13300-2:2006), Λεξικό (iso 5492:2008), Επιλογή δοκιμαστών - εξειδικευμένων δοκιμαστών (iso 8586-2:2008), Λειτουργία ομάδας δοκιμαστών (iso 8586-1:1993), Εργαστήριο (iso 8589:2007).

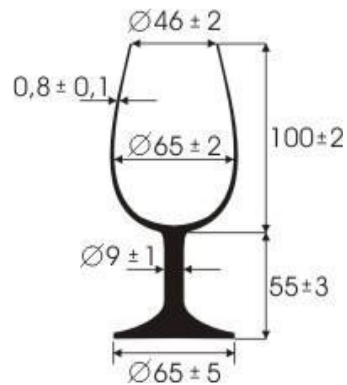


Εικόνα 24. Συσχέτιση απόκρισης με ερέθισμα και εκπαίδευση - ίδια απόκριση σε δεδομένο ερέθισμα

1.6.1.1 ΤΟ ΠΟΤΗΡΙ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Το υποδειγματικό ποτήρι δοκιμασίας πρέπει να αποτελείται από γυαλί κρυστάλλινου τύπου και να έχει συγκεκριμένη μορφή τουλίπας (κυπελλοειδές σχήμα, χωρίς σκαλίσματα) και διαστάσεις, όπως φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα. Υπάρχει τυποποιημένο ποτήρι οργανοληπτικής δοκιμασίας, το οποίο και χρησιμοποιείται κατά τους οργανοληπτικούς ελέγχους, το οποίο διαθέτει δύο μεγάλα προτερήματα. Κατ' αρχάς, το μεγάλο πόδι του επιτρέπει το εύκολο πιάσιμο χωρίς να κρύβει τη θέα προς το περιεχόμενο. Επιτρέπει συγχρόνως την άνετη περιστροφή του σε κυκλική ανάδευση, όπως χρειάζεται να γίνει στο στάδιο της καταγραφής του αρώματος μετά από ανακίνηση. Κατά δεύτερο και κυριότερο λόγο, το σχήμα του επιτρέπει τον εμπλουτισμό με οσμηρά συστατικά του χώρου του ποτηριού που μένει κενός, γεγονός που διευκολύνει την έμμεση αρωματική του ανίχνευση με τον εγκλωβισμό τους εφόσον αυξάνεται η συγκέντρωσή τους και γίνονται καλύτερα αντιληπτές. Το ποτήρι οφείλει να γεμίζει μέχρι το 1/3 του ύψους αυτού (30-50 ml κάθε φορά), να καθαρίζεται με προϊόντα όχι αρωματικά και να ξεπλένεται με απιονισμένο νερό. Όσον αφορά τον αρωματικό

χαρακτήρα ενός οίνου είναι φανερό ότι χρησιμοποιώντας για το ίδιο κρασί διαφορετικά ποτήρια δοκιμασίας η αρωματική αντίληψη θα διαφέρει ποσοτικά και ίσως ποιοτικά. Πρέπει λοιπόν να τονιστεί η μεγάλη σημασία που έχει για την τεχνική της δοκιμασίας η ύπαρξη ίδιων μέσων (ποτήρι, λεξιλόγιο) που οδηγούν σε αντικειμενικά και καθολικά παραδεκτά αποτελέσματα όσο κι αν, μερικές φορές, μπορεί να απομακρύνουν από τις πραγματικές συνθήκες, κάτω από τις οποίες καταναλώνεται το κρασί (Τσακίρης, 2017).



Εικόνα 25. Υποδειγματικό ποτήρι δοκιμής του οίνου με τις κατάλληλες διαστάσεις και την κατάλληλη μορφή τουλίπας.

1.6.1.2 ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Στην οργανοληπτική εξέταση προηγούνται οι ξηροί και οι λευκοί οίνοι και ακολουθούν οι ροζέ, οι ερυθροί και οι γλυκοί. Ο αριθμός δειγμάτων εξαρτάται από τον σκοπό της ανάλυσης. Για απλές αξιολογήσεις χρειάζονται 20 δείγματα (π.χ. αν υπάρχουν ελαττωματικές οσμές). Για την ανάλυση μίας (ή περισσότερων) ιδιοτήτων τους 5-6 δείγματα είναι αρκετά. Υπάρχει σε κάθε δείγμα ένας τριψήφιος αριθμός για την κωδικοποίηση του και η σειρά παρουσίασης τους πρέπει να είναι τυχαία/ διαφορετική. Ο χρόνος εξέτασης κάθε δείγματος κυμαίνεται στα 15-20 min/ δείγμα και μεταξύ των δειγμάτων επιβάλλεται διάλειμμα (2-3 min). Η διάρκεια της οργανοληπτικής εξέτασης δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 45-60 min και ο αριθμός των δειγμάτων δεν πρέπει να ξεπερνά τα 10-15. Όσο περισσότερα χαρακτηριστικά αναλύονται τόσο περισσότερος χρόνος χρειάζεται για την αξιολόγηση, η οποία καταγράφεται στα αντίστοιχα έντυπα.

1.6.1.3 ΟΙ ΔΟΚΙΜΑΣΤΕΣ

Οι δοκιμαστές πρέπει να εργάζονται ανεξάρτητα και ήσυχα, να είναι σε κανονική φυσιολογική κατάσταση, να μην καπνίζουν τουλάχιστον κατά την οργανοληπτική εξέταση και λίγο πριν απ' αυτήν, ν' αποφεύγουν να καταναλώνουν διάφορα τρόφιμα (π.χ. καφέ) τουλάχιστον 1-2 ώρες πριν και να μη χρησιμοποιούν οδοντόκρεμες με ισχυρό άρωμα, after shave έντονα, μαστίχες κλπ.

Για οργανοληπτική ανάλυση απαιτούνται ορισμένα στοιχεία, τα οποία μπορούν να επιτευχθούν χρησιμοποιώντας μεγάλο αριθμό εμπειρών δοκιμαστών ή/και κάνοντας αρκετές επαναλήψεις και εκπαιδώντας το πάνελ, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή επαναληψιμότητα, η μικρή απόκλιση από τον μέσο όρο της μέτρησης και η απαραίτητη ευαισθησία (αποφυγή λανθασμένων αποτελεσμάτων).

1.6.1.4 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΕ ΕΝΤΥΠΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Μια ελεύθερη Προσέγγιση γευστιγνωσίας περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των κάτωθι χαρακτηριστικών.

1. **Αξιολόγηση με την όραση:** Εμφάνιση / Όψη
 - Χρώμα, απόχρωση
 - Λαμπερότητα
 - Διαύγεια, διαφάνεια
 - Δάκρυα, ιξώδες/ ρευστότητα
 - Ύπαρξη CO₂ / αφρισμός
2. **την όσφρηση:** Οσμή / Άρωμα
 - Διαύγεια / καθαρότητα
 - Ένταση
 - Διάρκεια / Εξέλιξη
 - Ποιότητα
 - Αρωματική παλέτα
3. **τη γεύση:** Γευστική δοκιμασία οίνου
 - Καθαρότητα
 - Σάκχαρα
 - Οξύτητα
 - Τανίνες
 - Αλμύρα (ορυκτότητα/μεταλλικότητα)
 - Σώμα / Δομή / Υφή
 - Ένταση / Διάρκεια
 - Γεύση/ αρώματα στόματος (την γλυκύτητα, την οξύτητα, την πικράδα, την ισορροπία)
4. Επιγευση και αίσθηση
5. **την αφή (για την αίσθηση της στυφάδας, του ιξώδους, το σώμα, τη λιπαρότητα)**
6. **Γενικά Συμπεράσματα όπως Ποιότητα/ Δυνατότητα παλαιώσεως / Ποικιλία/ Στυλ / Μέθοδος Παραγωγής κ.ά.**

The image shows a detailed wine organoleptic analysis form. It is divided into several main sections:

- ΕΚΔΗΛΩΣΗ (Appearance):** Includes fields for color, clarity, and sediment.
- ΟΣΜΗ (Smell):** Divided into 'απόχρωση' (aroma) and 'αφή' (mouthfeel). It includes a grid for 'αρώματα' (aromas) with categories like 'φρούτα', 'λουλούδια', 'πικράδα', etc., and a 'σημειώσεις' (notes) section.
- ΓΕΥΣΗ (Taste):** Includes a grid for 'γεύση' (taste) with categories like 'γλυκύτητα', 'οξύτητα', 'πικράδα', etc., and a 'σημειώσεις' section.
- ΑΙΣΘΗΣΗ (Mouthfeel):** Includes a grid for 'αφή' (mouthfeel) with categories like 'σώμα', 'δομή', 'υφή', etc., and a 'σημειώσεις' section.
- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ (Conclusions):** A section for overall assessment, including 'ποικιλία', 'στυλ', and 'μέθοδος παραγωγής'.

Εικόνα 26. Συστηματική προσέγγιση οργανοληπτικής αξιολόγησης. Έντυπο οργανοληπτικής ανάλυσης οίνων σε διαγωνισμούς (Τσακίρης, 2017).

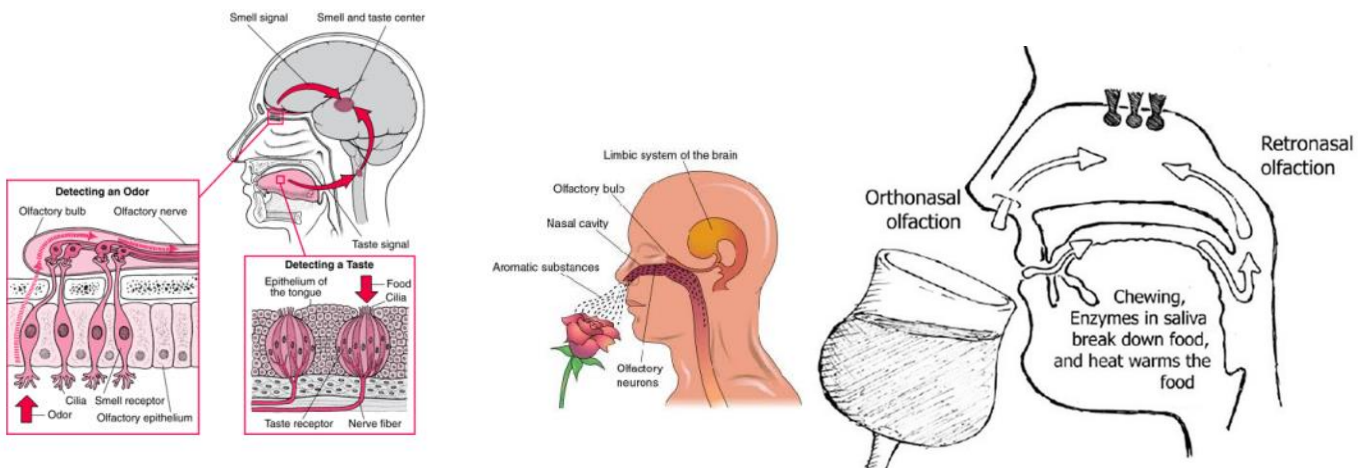
Για κάθε είδος δοκιμασίας, παρίσταται ανάγκη από αντικειμενικά και απο πριν καθορισμένα κριτήρια καταγραφής και βαθμολόγησης. Αυτό αποτελεί ένα λεπτό σημείο της τεχνικής δοκιμασίας. Για την διευκόλυνση των αξιολογητών, γίνεται προσπάθεια αποδόμησης της διαδικασίας, ώστε να εκφράζονται με ακρίβεια οι απαιτήσεις μιας τέτοιας καταγραφής. Είναι, επίσης, φανερό, ότι δεν είναι απαραίτητο σε όλα τα είδη δοκιμασίας να εφαρμοστεί πλήρης διαδικασία, όπως λ.χ. στο παρόν πείραμα οινοποίησης έλαβε χώρα μόνο οσφρητικός οργανοληπτικός έλεγχος. Το έντυπο αξιολόγησης δημιουργείται ώστε να εξασφαλίζει μια αρκετά τμηματική εξέταση που να προσεγγίζει την αντικειμενικότητα μιας εκτίμησης, την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων με προσφυγή σε αρυθμητικό σύστημα. Τέλος, εκτός από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά αρώματος και γεύσης, αξιολογούνται και τα ελαττώματα. Η προσφυγή σε έναν αρνητικό βαθμό ως συνέπεια αποδοκιμασίας, πρέπει να συμπληρωθεί με μια τεχνική κρίση για τη φύση του ελαττώματος ή προβλήματος τους δείγματα.

1.6.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΟΨΗΣ

Για τη διαδικασία της οπτικής εκτίμησης, καθαρός και δυνατός φωτισμός είναι απαραίτητος. Αρχικά, ο οίνος τοποθετείται σε ποτήρι με σχήμα τουλίπας, **μέχρι το ενδεδειγμένο σημείο (1/3 περίπου) και με ελαφριά περιστροφή του ποτηριού για την ανακίνηση του οίνου εκτιμάται οσφρητικά.**

Λαμβάνει χώρα ο προσδιορισμός του με βάση το είδος του: σε **λευκό, ερυθρό, ροζέ**. Με την οπτική παρατήρηση, εξάγονται πληροφορίες **για την ακριβή χροιά του χρώματος σε αποχρώσεις και ανταύγειες** (χρυσασφί, πρασινωπό, κίτρινο, κιτρινοπράσινο, κεχριμπαρένιο, καστανό, κρεμμυδόφλουδα, κοκκινέλι, ροζέ, πορφυρό, βιολετί, ρουμπινί, κεραμιδί, σοκολατί, με ανταύγειες χρυσές κ.α.) και ακολούθως η λαμπρότητα, κρατώντας το ποτήρι με γυρτή φορά, υπό γωνία (45° περίπου) σε λευκό φόντο. Η οπτική αξιολόγηση συνεχίζεται με την εκτίμηση της **έντασής του**. Κατόπιν εκτιμάται η **καθαρότητα (διαύγεια ή θολερότητα)** και η **διαφάνειά του**. Ύπαρξη ελαττώματος εμφανίζεται με τη μορφή πρωτεϊνικού θολώματος, τρυγικών αλάτων κ.α. Ένα κρασί δύναται να μην είναι διαυγές και ταυτόχρονα να είναι εντελώς διάφανο μπροστά σε μια λευκή επιφάνεια. Η αξιολόγηση της όψης συνεχίζεται με την παρατήρηση του **βαθμού οξείδωσης και την ηλικία**. Επιπλέον, εξετάζεται ο αφρισμός, η περιεκτικότητα του σε CO₂ (ήσυχος, ημαφρώδης ή αφρώδη οίνος-μεγάλη έκλυση διοξειδίου του άνθρακα), καθώς επίσης και η ύπαρξη "**δακρύων**" που σχετίζεται με τη **ρευστότητα/ ιξώδες**. Η ποσότητα και το μέγεθός τους είναι συνάρτηση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη (πιο πτητική από το νερό όπου αυξάνει την επιφανειακή τάση) και της θερμοκρασίας. Τα δάκρυα δεν αποτελούν ένδειξη ποιότητας. Υποδειγματικό **χρώμα** δεν υπάρχει. Στους οίνους εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες: την **πολυφαινολική** του σύσταση, την **ποικιλία**, την **ωρίμανση**, τον **τρόπο οινοποίησης** και **συντήρησης**. Για να γίνει η **αξιολόγηση του χρώματος σε έναν οίνο** θα πρέπει να είναι γνωστά τα εξής στοιχεία: ο **τύπος**, το **είδος** καθώς και η **ηλικία** του. Υπάρχει σχέση μεταξύ έντασης χρώματος και αρώματος του οίνου (δοκιμές σε σκουρόχρωμα ποτήρια). Στα κόκκινα κρασιά, η ένταση του χρώματος σχετίζεται με την αρωματική και γευστική ένταση. Ανοιχτό χρώμα οίνου, σημαίνει ότι η αρωματική παλέτα αποτελείται από φρέσκα φρούτα και λουλούδια, Έντονο χρώμα οδηγεί σε ώριμα αρώματα, τέλος το βαθύ χρώμα συνδέεται με ξηρά φρούτα, καβούρδισμα και μπαχαρικά.

Η οπτική εκτίμηση ενός οίνου είναι υποκειμενική, σε σύγκριση με αυτές της όσφρησης και της γεύσης. Εκτιμάται ως εμπειρική και επιδρά πάνω στα επόμενα στάδια της δοκιμασίας. Στα μάτια ενός έμπειρου δοκιμαστή ή όψη του οίνου και τα επιμέρους στοιχεία της δίνουν συχνά ένα δυσανάλογα μεγάλο και ενδιαφέρον πλήθος πληροφοριών. Η ένταση του χρώματος ενός ερυθρού οίνου επιτρέπει το να προδικαστεί το σώμα, ο όγκος, η απόχρωσή, η ηλικία του και σε έναν λευκό η κατάσταση οξείδωσής του. Τέλος, είναι βέβαιο ότι ο δοκιμαστής θα είναι αυστηρός με ένα δείγμα θολού οίνου., το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί οπτικά ως μη αποδεκτό (Τσακίρης, 2017)



Εικόνες 27. α) β) όσφρηση - οσφρητικό επιθήλιο, αισθητήρια νεύρα και συνδέσεις με τον εγκέφαλο. Η αίσθηση της οσμής είναι συνυφασμένη και η έννοια του «αρώματος». Μια ουσία για να χαρακτηριστεί ως αρωματική, πρέπει να είναι πτητική (M.B. < 300), υδρόφιλη (λιποδιαλυτή) και ασθενώς πολική (υδατοδιαλυτή). Η Συγκέντρωση των σακχάρων, πολυφαινολών, μακρομορίων (π.χ. μαννοπρωτεΐνες), και ποσοστό αλκοόλης να επηρεάζουν την πτητικότητα. Ακολουθεί σύντομη περιγραφή των αρωμάτων βάσει τις χημικές ενώσεις. **γ)** Απεικόνιση διαδικασίας οσφρητικού οργανοληπτικού έλεγχου.

1.6.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ

Η Αναγνώριση του αρώματος, λαμβάνει χώρα στον ανθρώπινο οργανισμό με την αλληλουχία ενεργοποίησης και τον συνδυασμό διαφορετικών υποδοχέων. Παρότι, μόνο ένα κλάσμα των αρωματικών μορίων, τα οποία φθάνουν στις οσφρητικές περιοχές απορροφούνται από τη βλέννα που καλύπτει το επιθήλιο. Με την όσφρηση γίνεται αντιληπτό το άρωμα της πρώτης ύλης ή ποικιλιακό (πρωτογενές), και το μπουκέτο, το οποίο οφείλεται στη ζύμωση (δευτερογενές άρωμα) και στην παλαίωση (τριτογενές άρωμα/ οξειδωση/ αναγωγή). Μέσω της όσφρησης παρέχονται πληροφορίες για την ποιότητα και τον τρόπο οινοποίησης, καθώς και για τις μεταζυμωτικές επεξεργασίες και διατήρηση του οίνου. Για την όσφρηση χρησιμοποιείται, κυρίως, τη γραμμή της ρινικής κοιλότητας. Ωστόσο, όταν ο οίνος βρίσκεται στο στόμα δίνει, εντυπώσεις που οφείλονται στην όσφρηση, που φθάνει στο οσφρητικό επιθήλιο δια μέσου της στοματο-ρινικής κοιλότητας. Πρόκειται για το «γευστικό άρωμα» ή το «άρωμα γεύσης ή του στόματος». Η συνύπαρξη των εντυπώσεων όσφρησης και γεύσης αποδίδεται με τον όρο «flaveur» ή «flavor». **Ο οσφρητικός έλεγχος αφορά τη διαύγεια-καθαρότητα (ή ελάττωμα) ενός οίνου στη μύτη, την ένταση της, τη διάρκεια, την ποιότητα, καθώς και την αρωματική παλέτα που το διακρίνει.** Μια ουσία για να έχει οσμή πρέπει να είναι διαλυτή στο μείγμα νερού-αιθανόλης σε ικανή συγκέντρωση, και πτητική ώστε τα μόρια αυτής της ουσίας να περνούν στον αέρα και από εκεί στο αισθητήριο της όσφρησης. Η ελάχιστη, λοιπόν, συγκέντρωση μιας πτητικής ουσίας σ' ένα διαλυτή αποτελεί το κατώφλι αντίληψης, που είναι η ελάχιστη ποσότητα που γίνεται αισθητή χωρίς να γίνεται αντιληπτή η φύση της (κατώφλι προσδιορισμού). Ευδιάκριτο λέγεται ένα άρωμα όταν βρίσκεται σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από το κατώφλι προσδιορισμού, με αποτέλεσμα να γίνεται εύκολα αντιληπτό. Και τα δύο αυτά κατώφλια μεταβάλλονται από άνθρωπο σε άνθρωπο και εξαρτώνται για την ίδια ουσία από το διαλυτικό μέσο. Τέλος, με την αύξηση της θερμοκρασίας, πραγματοποιείται ελάττωση στο κατώφλι προσδιορισμού. Ανάμεσα στους 20-35°C τα αρώματα διακρίνονται καλύτερα. Στους οίνους με μικρότερη θερμοκρασία, η δυνατότητα όσφρησης εξασθενίζει. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο, για τον προσδιορισμό των ελατωματικών οσμών, η καταλληλότερη θερμοκρασία του είναι 20-25°C. Προσδιορίζονται η ένταση του αρώματος, η ύπαρξη ποικιλιακών αρωμάτων, η πολυπλοκότητα του, η ισορροπία των αρωμάτων, ο τύπος του αρώματος (αρώματα φρούτων, λουλουδιών, ζωικά, ξηρών φρούτων & καρπών, μπαχαρικών, καπνιστά, βαλσάμικα, χορτώδη, διάφορων τροφών κ.α.), οι ελατωματικές οσμές (αναγωγικά, οξειδώσεις, μούχλας κ.α.).

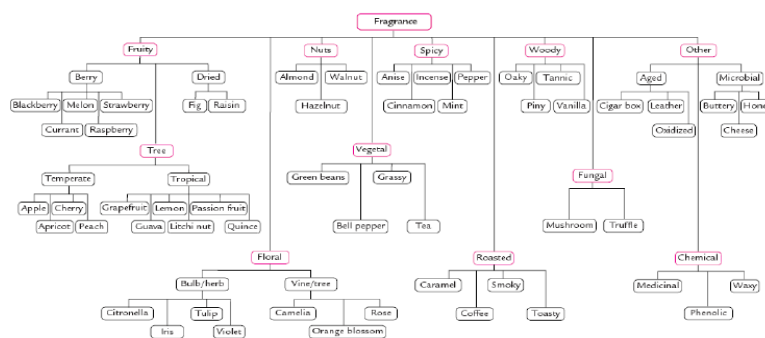
Με την όσφρηση του οίνου αξιολογείται το ποικιλιακό άρωμα (άρωμα του σταφυλιού), το δευτερεύον άρωμα (άρωμα της ζύμωσης) και το τριτεύον άρωμα ή μπουκέτο (bouquet), που είναι προϊόν της παλαίωσης του οίνου. Οι πληροφορίες που παίρνει ο δοκιμαστής από τις οσμές που αντιλαμβάνεται σχετίζονται τόσο με την οινοποίηση και τον τρόπο διατήρησης και μεταχείρισης του οίνου, όσο και τυχόν ανεπιθύμητες ζυμώσεις που μπορεί να πραγματοποιήθηκαν. Ορισμένοι τύποι οίνων, μάλιστα, μπορούν να διακριθούν αποκλειστικά και μόνο από το άρωμά τους. Αρχικά, ο οίνος οσφραίνεται παρατεταμένα ακίνητος. Στη συνέχεια, για την αποτελεσματική όσφρηση του οίνου συνιστάται η περιστροφική ανακίνηση του ποτηριού, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μεγέθυνση της επιφάνειας εξάτμισης και συνεπώς τη μεγαλύτερη απελευθέρωση αρώματος. (Σουφλερός, 2015)

Η οσμή του οίνου και η χρήση της όσφρησης κατά τη δοκιμή του είναι δυστυχώς για τους περισσότερους καταναλωτές ασήμαντες έως ελάχιστα σημαντικές. Διότι η μύτη είναι από τα πιο ουσιαστικά εργαλεία του δοκιμαστή οίνου, αλλά ακόμα και για τους μη ειδικούς η οσφρητική εξέταση ενός οίνου είναι μάλλον το πλέον ευχάριστο κομμάτι της δοκιμής, αφού είναι το πιο ενδιαφέρον. Τα ερεθίσματα που μπορεί να συλλέξει η μύτη από το κρασί είναι πάρα πολλά. Για αυτά ευθύνονται τα αρώματα που βρίσκονται μέσα σε αυτό (δεν προστίθενται, αλλά προέρχονται από το σταφύλι, τις φυσικές διαδικασίες της πορείας του μέχρι να γίνει κρασί και την κατοπινή ζωή του μέσα στο βαρέλι και στη φιάλη). Δεν είναι τίποτα άλλο από πτητικές χημικές ενώσεις, που για να γίνουν αντιληπτές από την όσφρηση, πρέπει να βρίσκονται σε επαρκή ποσότητα. Οι αρωματικές ουσίες που υπάρχουν μέσα στο κρασί και διαμορφώνουν το χαρακτήρα του ξεπερνούν τις 1500 (Τσακίρης, 2017) Στην ορολογία της οργανοληπτικής δοκιμής των οίνων χρησιμοποιείται συνήθως η λέξη «μύτη» για να περιγράψει η οσμή του οίνου. Σε περίπτωση που αυτή είναι σχετικά απλή ονομάζεται «άρωμα». Όταν είναι πολύπλοκη και αφορά σε ένα κρασί με σύνθετο αρωματικό χαρακτήρα, ονομάζεται «bouquet» («μπουκέτο» όρος που χρησιμοποιείται κυρίως για κόκκινα κρασιά, χωρίς να αποκλείεται η χρήση του και για λευκά με πολύπλοκη μύτη). Η μύτη του οίνου και ιδιαίτερα ο χαρακτήρας της προέρχεται ή και διαμορφώνεται κατά κύριο λόγο από την ποικιλία αμπέλου (πρωτογενή αρώματα, τις περισσότερες φορές ανθώδη, φρουτώδη, φυτικά κ.α.) από τις πολύπλοκες χημικές αντιδράσεις της ζύμωσης (δευτερογενή αρώματα, διάφορα), και από την ωρίμαση μέσα στο βαρέλι (αν υπάρχει) και την παλαίωση, ή απλή διατήρηση στη φιάλη (τριτογενή αρώματα, συνήθως μπαχαρικών, καβουρδισμένα, ξύλου κ.α.) (Τσακίρης, 2017). Η τεχνική της οσφρητικής εκτίμησης του οίνου αρχίζει με το σερβίρισμα του στο ένα τρίτο περίπου της χωρητικότητας του ποτηριού, ένα αέριο στρώμα σχηματίζεται επάνω από το υγρό και καταλαμβάνει τον ελεύθερο χώρο του. Τα οσφρητικά χαρακτηριστικά του οίνου, που «βγαίνουν» από αυτό ως πτητικές αρωματικές ενώσεις, εξετάζονται δια της όσφρησης, το άτομο θα πρέπει να ακολουθήσει τα παρακάτω βήματα: μυρίζει το κρασί φέρνοντας τη μύτη του ιδιαίτερα κοντά στο ποτήρι, αρχικά χωρίς αυτό να ανακινηθεί. Ακολουθεί μικρή και κατόπιν μια πιο αποφασιστική περιστροφή του ποτηριού, ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικής δύναμης και διάρκειας ανακίνηση του οίνου

και ξαναμυρίζει. Σε αυτές τις κινήσεις καταγράφει τις εντυπώσεις για την κατάσταση της μύτης του οίνου, που πρέπει να είναι ευχάριστη και κυρίως υγιής, την ένταση, την ποιότητα και τον χαρακτήρα της. Όσο πιο δυναμικά, σύνθετα, πολύπλοκα και πυκνά εμφανίζονται τα αρωματικά χαρακτηριστικά τόσο το καλύτερο, αρκεί να βρίσκονται σε αρμονική συνύπαρξη μεταξύ τους και να μην είναι μονοδιάστατα, άκομψα και χονδροκομμένα

Η ευαισθησία στην αντίληψη του αρώματος μέσω της ανίχνευσης οσμηρών ουσιών παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάμεσα στους δοκιμαστές. Εξαρτάται από τη φύση των οσμηρών ουσιών και κυρίως από το σχήμα τους και διαφέρει από άτομο σε άτομο. Η μέγιστη οσφρητική ικανότητα εμφανίζεται μετά την εφηβεία και γενικά εξαρτάται από την ηλικία (κατώφλι αντίληψης ↓, μνήμη ↓, ικανότητα μάθησης ↓ ≠ εμπειρία ↑, ικανότητα συγκέντρωσης ↑), όπου και ελαττώνεται μετά τα 70 «πρεσβυ-οσμία». Επιπλέον, εξαρτάται από το φύλο. Η ευαισθησία είναι μεγαλύτερη στις γυναίκες. Όπως είναι λογικό, έχει άμεση εξάρτηση από την υγεία του ατόμου (λήψη φαρμάκων, κάπνισμα) και την ενδοκρινολογική κατάσταση του, καθώς και από γενετικούς παράγοντες (μέγεθος μύτης, ασθένειες π.χ. ιγμορίτιδα, κρύωμα). Το αίσθημα πείνας, αυξάνει την ένταση αρώματος, καθώς και η εκπαίδευση σε προηγούμενη έκθεση. Το ανθρώπινο κατώφλι της όσφρησης για τα διάφορα μόρια ποικίλει ανάλογα με τη φύση της ουσίας καθώς και ανάλογα με την ηλικία των ατόμων, το γένος, και την κατάσταση της υγείας τους.

Άμεση και έμμεση γραμμή όσφρησης. Ο δοκιμαστής οφείλει να μυρίσει το δείγμα πριν το δοκιμάσει χρησιμοποιώντας την απευθείας γραμμή όσφρησης που συνδέει το εξωτερικό περιβάλλον με το κέντρο της όσφρησης μέσω της μύτης. Πρόκειται για τη ρινική όσφρηση, ή άμεση γραμμή όσφρησης, που δίνει το αίσθημα του αρώματος της μύτης. Η ανακίνηση του οίνου μέσα στο ποτήρι της δοκιμασίας ελευθερώνει περισσότερες οσμές και αυξάνει την αρωματική αίσθηση, επιτρέποντας συγχρόνως να εμφανίζονται και νέες μυρωδιές που αφορούν «βαρύτερα» αρωματικά συστατικά.



Wine fragrance chart (Jackson, 2002)

Εικόνα 28. Πίνακας αρωμάτων οίνου (Jackson, 2002)

Ο οσφρητικός χαρακτηρισμός ενός οίνου πρέπει να περιλαμβάνει τους κάτωθι σημαντικούς παράγοντες – αναδυόμενα χαρακτηριστικά της μύτης του οίνου.

- **Η κατάσταση του αρώματος**, αφορά στο αν και κατά πόσο η μύτη του οίνου είναι ευχάριστη και υγιής/ καθαρή, ή δυσάρεστη και προβληματική/ελαττωματική (στη δεύτερη περίπτωση μπορεί το δείγμα μπορεί να έχει κάποιο ελάττωμα)
- **Η ένταση του αρώματος**, αφορά στο κατά πόσο η μύτη του οίνου είναι αδύναμη, μέτριας έντασης(±), ή δυνατή/ έντονη. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των αρωμάτων είναι η αρωματική τους ένταση. Ένας οίνος χαρακτηρίζεται ως αρωματικός, όταν έχει έντονα και ταυτόχρονα χαρακτηριστικά αρώματα.
- **Η ποιότητα του αρώματος**, αφορά στο κατά πόσο η μύτη του οίνου είναι απλή ή πολύπλοκη, καθαρή ή μπερδεμένη, πυκνή ή αραιή, διακριτική ή υπερβολική, κομψή ή χοντροκομμένη κλπ.
- **Η εξέλιξη** του στο χρόνο με χαρακτηρισμούς όπως «νέο», «ωριμάζει», «έχει ωριμάσει», «κουρασμένο», «οξειδωμένο» κ.ά. και η διάρκεια της μύτης του οίνου. Τόσο η διάρκεια όσο και η καλή, μακρά και σύνθετη εξέλιξη της μύτης είναι ένδειξη υψηλής ποιότητας. **Διάρκεια – εξέλιξη:** αφορούν στο χρονικό διάστημα που η μύτη του οίνου διατηρεί την ένταση, την ποιότητα και το χαρακτήρα της και στο πώς ο τελευταίος μεταμορφώνεται κατά τη διάρκειά αυτού.
- **Ο αρωματικός χαρακτήρας**, αφορά στις αρωματικές οικογένειες (ομάδες αρωμάτων) και πιο αναλυτικά στα συγκεκριμένα αρώματα (αρωματικούς τύπους), που θυμίζει και παραπέμπει ή μύτη του οίνου και την ακριβή περιγραφή τους (όσο πιο πολύπλοκος είναι ο χαρακτήρας της μύτης του οίνου, τόσο πιο δύσκολα αναγνωρίζεται και περιγράφεται) Οι ομάδες των αρωμάτων των οίνων και κάποιοι τύποι αρωμάτων είναι πάρα πολλοί και ορισμένοι

πολύ ιδιαίτεροι. Παρακάτω αναφέρονται οι τύποι αρωμάτων που μπορεί να έχει ένας υπό εξέταση οίνος. Αρώματα λουλουδιών (λευκών, ροζέ, κόκκινων κ.α.), φρούτων (δένδρων, θάμνων, τροπικών, λιωμένων, ξερών κ.α.), χόρτων, φυτών (χλωρών και ξερών) και καρπών (αρωματικών, λιωμένων, κονσέρβας, κομπόστας, μαρμελάδας, ξερών, σε αλκοόλ, λικέρ, ζαρζαβατικών κ.α.), ξηρών καρπών (όλων των ειδών), τροφών (τυριού, βουτύρου, ψωμιού, ζαμπόν, μαγειρεμένου κρέατος κ.α.), γης (φρεσκοκομμένου χόρτου, χώματος, μανιταριού κ.α.), ζωικά (δέρματος κ.α.), μπαχαρικών (όλων των ειδών), βαλσαμικά (με κυριότερο αυτό της ρητίνης), γλυκά ή και καβουρδισμένα (μελιού, καραμέλας, σοκολάτας κ.α.), ξύλου (βανίλιας, κέδρου, καπνού, καφέ κ.α.), χημικά ή μικροβιακά (όπως διαφόρων ζυμών, αλλά τις περισσότερες φορές αφορούν σε δυσάρεστα αρώματα που φανερώνουν κάποιο ελάττωμα του οίνου και μπορεί να καταστρέψουν ακόμα και όλο τον αρωματικό του χαρακτήρα). Η μύτη του οίνου δίνει πολλές φορές όξινη, γλυκιά, δροσερή, θερμή, μεταλλική, ή και ορυκτή αίσθηση, που επηρεάζει ουσιαστικά το χαρακτήρα της (Τσακίρης, 2017).

1.6.3.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΡΩΜΑΤΩΝ ΟΙΝΩΝ

Αναλυτική παρουσίαση των χαρακτηριστικών αρωμάτων που διακρίνουν έναν οίνο και ταξινομούνται σε εννέα κατηγορίες:

Αρώματα λουλουδιών

Χαρακτηρίζουν τα νεαρά κρασιά. Σημαντικός είναι ο ρόλος της θερμοκρασίας ζύμωσης, είναι αποδεδειγμένο ότι θερμοκρασίες οινοποίησης κάτω από τους 20 °C οδηγούν σε παραγωγή πιο αρωματικών λευκών οίνων. Αρώματα των άσπρων και κίτρινων λουλουδιών επικρατούν στα λευκά κρασιά και των κόκκινων στους κόκκινους οίνους. Το είδος της μυρωδιάς λουλουδιών εξαρτάται από το είδος του κλήματος, το έδαφος, και τις συνθήκες οινοποίησης. Σημαντικός είναι ο ρόλος της θερμοκρασίας ζύμωσης. Δεν είναι σπάνιο να απαντώνται στο κρασί αρώματα λουλουδιών που φυτρώνουν στην ίδια περιοχή από την οποία προέρχονται τα σταφύλια. Τα αρώματα αυτά αποκαλούνται ανθώδη. Το τριαντάφυλλο και οι πολυάριθμες αρωματικές του αποχρώσεις είναι το άρωμα πολλών κόκκινων οίνων. Ανθικά: Ακακία, χαμομήλι, αγιόκλημα, κουφοξυλιά, γεράνι, τριαντάφυλλο, βιολέτα.

2. Αρώματα φρέσκων φρούτων

Χαρακτηρίζουν καινούργια και νέα κρασιά καλά διατηρημένα. Ισχύει η ίδια αντιστοιχία χρώματος φρούτων και αρώματος του οίνου. Το άρωμα του μήλου αποτελεί το αρωματικό υπόβαθρο των περισσότερων άσπρων οίνων. Το σταφύλι και το μήλο περιέχουν ένα κοινό οργανικό οξύ, το μηλικό. Αυτό το οξύ δίνει εστέρες και αρωματικά παράγωγα που αποτελούν την αρωματική βάση του 'μήλου. Εστέρες όπως ο βουτυρικός και ο εξανοικός αιθυλεστέρας είναι βασικά συστατικά του μήλου αλλά και των οίνων. Χαρακτηρίζουν καινούργια και νέα κρασιά καλά διατηρημένα. Το άρωμα του μήλου αποτελεί το αρωματικό υπόβαθρο πολλών άσπρων οίνων. Αυτό δεν είναι καθόλου εκπληκτικό, γιατί το σταφύλι και το μήλο περιέχουν ένα κοινό οργανικό οξύ, το μηλικό. Αυτό το οξύ δίνει εστέρες και αρωματικά παράγωγα που αποτελούν την αρωματική βάση του μήλου. Οίνοι με αυξημένη οξύτητα μερικές φορές θυμίζουν το άρωμα του λεμονιού. Αναφέρονται επιγραμματικά, κάποιες γενικές κατηγορίες φρούτων που μπορούν να ανιχνευτούν στο άρωμα των οίνων. Πράσινα Φρούτα: μήλο, φραγκοστάφυλο, αχλάδι, κυδώνι, σταφύλι, Εσπεριδοειδή Φρούτα: γκρέιπφρουτ, λεμόνι, λάιμ, πορτοκάλι, φλούδα πορτοκαλιού κ.λπ., Πυρηνόκαρπα Φρούτα: ροδάκινο, βερίκοκο, νεκταρίνι, Τροπικά Φρούτα: μπανάνα, λίτσι μάνγκο, πεπόνι, φρούτο του πάθους, ανανάς, Κόκκινα Φρούτα: μούρο, κράνμπερι, σμέουρο, φράουλα, κεράσι, δαμάσκηνο και τέλος, Μαύρα Φρούτα: μούρο, βατόμουρο, μύρτιλο, κεράσι, δαμάσκηνο.

3. Τα αρώματα ξηρών φρούτων

Τα αρώματα των φρέσκων φρούτων απευθύνονται κυρίως σε αρώματα των νέων οίνων και αυτά των ξηρών φρούτων, όπως αποξηραμένο δαμάσκηνο, εντοπίζονται σε οίνους που έχουν υποστεί παλαιώση. Πολλά κρασιά ωριμάζοντας αποκτούν αρώματα κομπόστας ή μαρμελάδας φρούτων. Το άρωμα του ξηρού σύκου συναντιέται σε οίνους που προέρχονται από πολύ ώριμα σταφύλια και θεωρείται εξαιρετικής ποιότητας άρωμα. Επιπλέον, το σακχαροποιημένο κεράσι αναγνωρίζεται σε οίνους με παλαιώση. (Τσακίρης, 2017). Αρώματα αποξηραμένων Φρούτων: σύκο, δαμάσκηνο, σταφίδα, μαγειρεμένα φρούτα.

4. Αρώματα ξηρών χόρτων και φυλλωμάτων (και καπνού)

Δυσάρεστος χαρακτήρας (ελάττωμα του οίνου) θεωρείται η χορτώδη οσμή της πράσινης χλόης που μόλις κόπηκε. Έχει χημικό υπόβαθρο την εξανόλη, εξανάλη και τα παράγωγά τους και θεωρείται απόρροια κακής οινοποίησης. Υπάρχουν, όμως, και αρώματα χόρτων και φυλλωμάτων που το άρωμά τους απαντάται σε κρασιά, στα οποία και δίνουν μια νότα πρωτοτυπίας όπως η φτέρη, η μυρωδιά του φρεσκοκομμένου σανού, το άρωμα της μέντας, το άρωμα του πεύκου. Το άρωμα του καπνού αποτελεί ένα δείγμα της μεγάλης ποικιλίας αρωμάτων που μπορεί να ανιχνευθεί στο κρασί. Ποώδη Αρώματα: πράσινη πιπεριά, γρασιδί, φύλλα τομάτας, σπαράγγια, φύλλα φραγκοστάφυλο

5. Αρώματα καβουρδισμένου και ξηρών καρπών

Είναι τα αρώματα που δίνουν ορισμένα προϊόντα όταν θερμανθούν ελαφρά. Τέτοια είναι τα αρώματα της καραμέλας, που οφείλονται στο σχηματισμό της φουρφουράλης κατά την θέρμανση της ζάχαρης. Είναι μέτρια ποιοτικό άρωμα, συνέπεια μιας πρόωμης γήρανσης. Συνοδεύεται με καστανές αποχρώσεις και είναι ένα από τα ελάχιστα αρώματα που απομένουν στο κρασί όταν έχει χάσει όλο του το αρωματικό δυναμικό. Άλλα αρώματα: τσαγιού, κακάο, καφέ. Δεν αποτελεί έκπληξη η ανίχνευση αρωμάτων ξηρών καρπών, όπως του φουντουκιού και του καβουρδισμένου σε βούτυρο αμυγδάλου, κυρίως σε ώριμα λευκά κρασιά (Τσακίρης 2017, Οινολογία I&II).

6. Αρώματα μπαχαρικών και βοτάνων

Το άρωμα της βανίλιας ανιχνεύεται σε όλα τα κόκκινα και άσπρα κρασιά που έχουν μείνει σε δρύινα βαρέλια. Είναι αποτέλεσμα διαφορετικών παραγώγων της βανιλίνης, που είναι ένα από τα κυριότερα αρωματικά συστατικά, του ξύλου της δρυός. Η ευγενόλη δίνει χαρακτηριστικό άρωμα γαρύφαλλου. Η ανηθόλη, το κύριο αρωματικό συστατικό του ούζου, αποτελεί πολλές φορές αρωματικό συστατικό πολλών οίνων και κυρίως λευκών. Βοτανικά Αρώματα: ευκάλυπτος, μέντα, φαρμακευτικά, λεβάντα, μάραθος, άνηθος Μπαχάρια: λευκό/μαύρο πιπέρι, γλυκόριζα, άρκευθος, τζίντζερ.

7. Βαλσαμικά αρώματα

Το κυριότερο είναι το άρωμα της ρετσίνας. Είναι ευχάριστο όταν είναι ελαφρύ και όχι έντονο. Η ρετσίνα, που παρασκευάζεται αποκλειστικά στην Ελλάδα, γίνεται με την προσθήκη ρετσινιού πεύκου στο γλεύκος (από λευκά σταφύλια). Είναι ένα πρωτότυπο άρωμα, δύσκολο στη (μη συνηθισμένη) όσφρηση, που για να γίνει αποδεκτό απαιτεί συνήθεια. Όταν δεν είναι πολύ έντονο επιτρέπει την έξοδο και των άλλων αρωμάτων του οίνου, ώστε να αποτελεί ένα αρμονικό σύνολο. Συνοδεύεται από πικρίλα που αυξάνεται με την ηλικία.

8. Ζωικά αρώματα

Η παρουσία τους δεν είναι αναγκαστικά αρνητική. Η πιο συνηθισμένη που μπορούμε να βρούμε σε ένα κρασί είναι η μυρωδιά του δέρματος, κυρίως στα κόκκινα, πλούσια σε τανίνες. Είναι γνωστό ότι παρόμοιο άρωμα δημιουργείται στο φρέσκο δέρμα του ζώου όταν αυτό έρθει σε επαφή με τανίνες.

9. Αρώματα διαφόρων τροφών

Σε ένα πλήθος οίνων και κυρίως λευκών απαντάται το άρωμα του μελιού, του υδρομελιού, βουτύρου (διακετύλιο). Το άρωμα της μύρας βρίσκεται σε οίνους που ζυμώθηκαν σε χαμηλές οξύτητες και είναι ελάττωμα πολλών οίνων. Αρώματα οίνων μπορεί να θυμίζουν τυρί ή το γιαούρτι. Συνήθως πρόκειται για αποτέλεσμα αλλοίωσης από την επέμβαση μικροβίων γαλακτικής ζύμωσης.

Αρώματα ζύμωσης

Ζύμης: μπισκότο, ψωμί, τوست, brioche, τυρί, γιαούρτι

MLF: βούτυρο, τυρί, κρέμα γάλακτος, γιαούρτι

Αρώματα Παλαίωσης

Βαρέλι: βανίλια, γαρίφαλο, μοσχοκάρυδο, καρύδα, καραμέλα, κέδρο, ξύλο, καπνός, σοκολάτα, καφές

οξειδωτικά Αρώματα: αμύγδαλο, καρύδα, φουντούκι, σοκολάτα, καφές, καραμέλα

Εξελιγμένα Λευκά Φρούτα: αποξηραμένο ροδάκινο/μήλο/μπανάνα, μαρμελάδα

Εξελιγμένα Κόκκινα Φρούτα: σύκο, δαμάσκηνο πίσσα, βατόμουρο, μαγειρεμένα φρούτα

Παλαίωση Λευκά: βενζίνη, κηροζίνη, κανέλα, τζίντζερ, μοσχοκάρυδο, τوست, δημητριακά, μανιτάρια, σανό, μέλι

Παλαίωση ερυθρά: δέρμα, βρεγμένο χώμα, γήινα, μανιτάρια, κυνήγι, κέδρο, καπνός, φυτικά, βρεγμένα φύλλα, αλμύρα, κρέας, φάρμα. (ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ II, εργαστηριακός οδηγός, 2017)

1.6.3.2 ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η γευστική δοκιμή ενός οίνου δεν είναι απαραίτητο πως θα οδηγήσει μόνο σε θετικούς σχολιασμούς αλλά μπορεί να αναδείξει περίεργα οπτικά χαρακτηριστικά, δυσάρεστες οσμές και γεύσεις. Τις περισσότερες φορές οφείλονται σε διάφορα προβλήματα (ελαττώματα ή ασθένειες) του οίνου, που μπορεί να προέρχονται από κακής ποιότητας πρώτη ύλη, λάθος τρόπο μεταφοράς της, έλλειψη καθαριότητας, αμελή ή άτεχνη οινοποίηση, ωρίμαση, εμφιάλωση, παλαίωση, διατήρηση, ή ακόμα και κακή τύχη. Σημειώνεται πως η παρουσία ιζήματος (κατακάθι) σε παλαιωμένα κρασιά είναι αναμενόμενη, δεν αποτελεί ελάττωμα και απαιτεί κατάλληλο σερβίρισμα μετάγγιση σε καράφα (Τσακίρης 2017).

Ένας οίνος χαρακτηρίζεται ελαττωματικός, όταν παρουσιάζει συγκεκριμένες οσμές αλλοιώσεων, όπως οξείδωση, υδρόθειο, ξίνισμα, μούγλα, σαπιο φυτικό. Οι ελαττωματικές οσμές σε έναν οίνο είναι αυτές που μπορούν να του στερήσουν την καθαρότητα, η οποία είναι απαραίτητη προϋπόθεση της ποιότητας. Εντούτοις, το άρωμα των οίνων είναι ένα μείγμα αρωμάτων που από μόνο τους μπορεί να είναι ευχάριστο ή δυσάρεστο. **Ο συνδυασμός δίνει την πολυπλοκότητα χαρίζοντας στο κρασί την υψηλότερη ποιότητα και ανάλογη τιμή**, σε σύγκριση με τα άλλα ποτά αλκοολούχα ποτά ή όχι.

Οσμές που περιγράφονται ως ελαττωματικές γίνονται αντιληπτές μόνο με την προϋπόθεση ύπαρξης τους σε αυξημένη περιεκτικότητα, αν έχουν ξεπεράσει το κατώφλι αντίληψής τους. Η βλάβη που προκαλούν είναι ότι δύνανται να καλύψουν ή να επηρεάσουν τα υπόλοιπα αρώματα. Οι κυριότερες πηγές τέτοιων ελαττωμάτων για έναν οίνο είναι η οξείδωση, και το αντίθετο της η αναγωγή, το ζίνισμα, η ύπαρξη αρωμάτων ξένων προς το κρασί.

Η οξείδωση είναι μια ελαττωματική οσμή, η οποία προκαλεί απώλεια του φρούτου στο άρωμα του οίνου και προκαλείται όταν ο οίνος βρίσκεται σε επαφή με οξυγόνο ή με βακτήρια που αγαπούν το οξυγόνο. Τα προϊόντα αυτής της χημικής αντίδρασης συνεπάγονται μία αλλαγή στο χρώμα (αύξηση της μπλέ χροιάς) και παραγωγή ακεταλδεύδης που μυρίζει σαν sherry ή καφετιασμένο μήλο. Για αυτό και πρέπει να περιορίζεται η επαφή του οίνου με τον αέρα (Jackson, 2002). **Η μυρωδιά του ξινισμένου οίνου οφείλεται στο συνδυασμό της οσμής του οξικού οξέος με τον οξικό αιθυλεστέρα σε αυξημένη δόση.**

Το οξικό οξύ (παραγωγή κατά την αλκοολική ζύμωση) αποτελεί το κύριο πτητικό οξύ των οίνων. Εμφανίζεται κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης και μικρές συγκεντρώσεις είναι φυσιολογικές. Στη συνέχεια παρουσιάζεται επιπλέον αύξηση κατά τη μηλογαλακτική ώμωση ή από προσβολή οξικών βακτηρίων. Έχει οσμή ξυδιού και την κύρια αιτία παρουσίας του αποτελούν οι μικροβιακές ή χημικές μετατροπές, διάφορα στελέχη ζυμών, τα οξικά και γαλακτικά βακτήρια (παραπροϊόν ζύμωσης-οξείδωση αλκοολών, αιθανόλη σε οξικό οξύ), οι αργές ζυμώσεις, τα υπερβολικά καθαρά γλεύκη, οι πολύ χαμηλές τιμές pH [$<3,1$] ή πολύ υψηλές τιμές pH (4), υψηλές θερμοκρασίες κατά τον πολλαπλασιασμό των ζυμών (25-30°C) κατά την επανεκκίνηση ζύμωσης που έχει κολλήσει. Το κατώφλι αντίληψής του είναι 400 mg/l και η συνήθης συγκέντρωση σε οίνους με πρόβλημα: 750 mg/l. Προλαμβάνεται και αντιμετωπίζεται κυρίως επεμβάσεις για περιορισμό της ανάπτυξης οξικών βακτηρίων, επαρκείς θειώσεις, ελεγχόμενες θερμοκρασίες ζύμωσης και συντήρησης (<15 °C, με ελεύθερο SO₂, 215 mg/L), προσοχή στις συνθήκες αλκοολικής και μηλογαλακτικής ζύμωσης, προσοχή κατά τη διατήρηση και παλαίωση σε δεξαμενές & βαρέλια, προσεκτικός καθαρισμός μηχανημάτων και βαρελιών, καλή συντήρηση των βαρελιών (πλύσιμο με ζεστό νερό 80 °C, πλήρωση με νερό 24 ώρες πριν τη χρήση τους), επαρκείς συγκεντρώσεις αζωτούχων ενώσεων στην αρχή της ζύμωσης (190mg/L), προσοχή στην ποιότητα του φελλού στην εμφιάλωση.

Ο οξικός αιθυλεστέρας (αλκοολική ζύμωση) παράγεται από ζύμες μέχρι μια συγκέντρωση 50mg/L, αν η συγκέντρωση είναι 160 mg/L τότε οφείλεται σε οξικά βακτήρια. Δεν συντίθεται από τα γαλακτικά βακτήρια. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις 50-80 mg/L συμμετέχει στην πολυπλοκότητα του αρώματος των οίνων (ρούμι, ροδάκινο, βερίκοκο, ανανάς). Σε μεγάλες συγκεντρώσεις έχει οσμή κόλλας. Η αιτία παραγωγής του είναι οι μικροβιακές και χημικές μετατροπές, το στέλεχος *S.cerevisiae*, τα οξικά και γαλακτικά βακτήρια (παραπροϊόν ζύμωσης - οξείδωση αλκοολών), οι ανεπαρκείς θειώσεις, οι αυξημένες θερμοκρασίες κατά την παλαίωση και η εστεροποίηση του οξικού οξέος από τα οξικά βακτήρια, με κατώφλι αντίληψής: 80-150 mg/L. Συνήθης συγκέντρωση σε οίνους με πρόβλημα 250 mg/L. Στην πρόσληψη ανήκουν κυρίως επεμβάσεις για περιορισμό της ανάπτυξης οξικών βακτηρίων, επαρκείς θειώσεις, προστασία από το οξυγόνο, γρήγορη έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης κατά την πλήρωση των δεξαμενών για την αποφυγή ανάπτυξης των αξικών βακτηρίων στην επιφάνεια, προσοχή στην πρώτη ύλη- διαλογή σταφυλιών, πλήρωση δεξαμενών και βαρελιών κατά την παλαίωση, χαμηλές θερμοκρασίες τήρησης (15 °C), προσεκτικός καθαρισμός μηχανημάτων και βαρελιών, καλή συντήρηση των βαρελιών (πλύσιμο με ζεστό νερό 80 °C, πλήρωση με νερό 24 ώρες πριν τη χρήση τους). Η αναγωγική οσμή του υδρόθειου (αλκοολική ζύμωση) συναντάται κυρίως σε νέους οίνους που έχουν βγει νωρίτερα στην αγορά και έχει οσμή κλούβιου αυγού, γκάτσι. Αναγωγικό καλείται το άρωμα που δημιουργείται σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Αυτή η ενοχλητική οσμή οφείλεται στην εμφάνιση του υδρόθειου και σε πιο προχωρημένη μορφή των μερκαπτανών, (ενώσεις στοιχείων του οίνου με υδρογόνο σε απουσία οξυγόνου). (Τσακίρης, 2017). Οι ενώσεις θείου στους οίνους προέρχονται κυρίως από το μεταβολισμό της ζύμης, που σχετίζεται με την αναγωγή θειικού άλατος και, κατά συνέπεια, την παραγωγή αμινοξέων θείου (μεθειονίνη και κυστεΐνη). Οι βαριές ενώσεις θείου είναι πτητικές ενώσεις σε κρασιά σε χαμηλές ποσότητες και χαρακτηρίζονται από τα χαμηλά όρια οσμής (Anocibar Beloqui & Bertrand, 1995, Mestres, Busto, & Guasch, 2000). Μπορούν να παίξουν ένα ελκυστικό ή αποκρουστικό ρόλο, ανάλογα με τη φύση και την ποσότητα που υπάρχει στον οίνο (Landaud, Helinck, & Bonnarme, 2008). Η κύρια ένωση βαρύ θείου που αναφέρεται στο κρασί είναι 3- (μεθυλθειο) -1-προπανόλη (μεθειονόλη), που συνήθως βρίσκεται σε συγκεντρώσεις πάνω από την τιμή κατωφλίου, που αποδίδει ένα κουνουπίδι, άρωμα λάχανου και μαγειρεμένων πατατών (Anocibar Beloqui & Bertrand, 1995, Landaud et al., 2008). Προλαμβάνεται με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων θειώδους, θρεπτικών συστατικών κατά τη ζύμωση καθώς και τις κατάλληλες ζύμες με την ποικιλία γλεύκους. Όπου εντοπίζεται το πρόβλημα γίνονται μεταγίσεις με αερισμό ή προσθήκη θειικού χαλκού ($< 0,5$ g/tn). Στις αιτίες ανήκουν οι υπερβολικές θειώσεις στο αμπέλι, η βακτηριακή μόλυνση λόγω πλημμελούς υγιεινής, οι συνθήκες ζύμωσης, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών κατά τη ζύμωση (άζωτο), ακατάλληλα παρασκευάσματα ζύμης, παραμονή του οίνου με τις οινολάσπες. Το κατώφλι αντίληψής του είναι 40 μg/L και η συνήθης συγκέντρωση σε οίνους με πρόβλημα: 70 μg/L

Αναφέρεται αναλυτικά και η ακεταλδεύδη (αλκοολική ζύμωση), διότι ορισμένοι δοκιμαστές την ανέφεραν ως επιπλέον ελάττωμα ορισμένων οίνων. Προέρχεται από οξείδωση της αιθανόλης παρουσία καταλύτη ή από ανάπτυξη *Candida*

mycoderm (ανθιση) και απελευθερώνεται στον οίνο όταν γίνονται υπερβολικές θειώσεις. Συμμετέχει σημαντικά στο άρωμα και τη γεύση του sherry και των brandies. Έχει οσμή υπερώριμου μήλου, χυμό πορτοκαλιού-εσπεριδοειδών και οίνος χωρίς φρεσκάδα. Η κύρια αιτία είναι ο μικροβιακός μεταβολισμός ή οξειδωτικές αντιδράσεις, κατά την ζυμωση ή κατά την ωρίμανση σε οξειδωτικές συνθήκες. Το κατώφλι αντίληψης ανέρχεται στα 5-20 mg/L και η συνήθης συγκέντρωση σε οίνους με πρόβλημα. 50 mg/L. Η πρόληψη επιτυγχάνεται με ελεγχόμενες θειώσεις, προσοχή στους αερισμούς και προσοχή στα ιχνοστοιχεία.

Ένας οίνος αποκαλείται **φαρμακευτικός** όταν τα αρώματά του θυμίζουν το περιεχόμενο ντουλαπιού φαρμακείου. Συνήθως οφείλεται στην πλημμελή καθαριότητα των δεξαμενών φύλαξης με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται οσμές ξένες προς το κρασί. **Χοντροκομμένο** καλείται, όταν παρουσιάζει αρώματα φυτικά και χορτώδη που στερούνται λεπτότητας, αν και μπορεί να χαρακτηρίζεται από τέτοιου είδους αρώματα χωρίς όμως να φτάνει σε βαθμό φανερού ελαττώματος. Όταν το κρασί προέρχεται από σταφύλι που έχει **τρυγηθεί σαπισμένο**, παράγονται ελαττωματικές μυρωδιές, όπως ιωδίου, φαινολών και μούχλας. Από τη δράση βακτηρίων προέρχεται το ακεταμίδιο, του οποίου η μυρωδιά θυμίζει γεράνι. Είναι αποτέλεσμα βακτηριακής προσβολής του **σορβικού οξέος** που προστίθεται στον οίνο με σκοπό την αποφυγή επαναζυμώσεων. Επίσης, από δράση βακτηρίων προέρχεται και η **βουτυρική οσμή** ορισμένων οίνων που θυμίζουν έντονα τη μυρωδιά ταγγισμένου βούτυρου. Ένα ξύλινο βαρέλι κακώς διατηρημένο και όχι καθαρό, πέραν των κινδύνων που περικλείει για πιθανή αλλοίωση, δίνει στο κρασί μια γεύση βαρελίσιας και ξύλου. Τέλος, τα πιο κοινά ελαττώματα που συναντά κανείς σε χώρους οργανοληπτικής δοκιμής είναι η **οσμή φελλού και η οξείδωση**. Η οσμή φελλού οφείλεται στην 2,4,6-trichloroanisole ή TC, μια χημική ένωση η οποία προκαλεί μια οσμή μούχλας, βρεγμένου σκύλου, η οποία μπορεί να είναι λίγο διαφορετική ανάμεσα σε διαφορετικούς οίνους αλλά μπορεί να ανιχνευθεί από τις ανθρώπινες αισθήσεις και σε μικρές ακόμη συγκεντρώσεις ppt. Τα ελαττώματα ενός οίνου μπορούν να επηρεάσουν την αποδοχή του από τον καταναλωτή.

1.6.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΓΕΥΣΗΣ

Η γευστική εντύπωση (και απόλαυση) που προκαλείται από την κατανάλωσή του οίνου δε χρειάζεται ιδιαίτερη μνεία. Πρόκειται για την πιο οικεία από τις άλλες δύο, την οπτική και την οσφρητική. Ίσως διαδραματίζει και το σημαντικότερο ρόλο στη δοκιμή του οίνου, οδηγώντας στα κυριότερα συμπεράσματα για την τελική αξιολόγηση του και διαμορφώνει όσο τίποτα άλλο την απόφαση σχετικά με το συνδυασμό του με το κατάλληλο φαγητό (Τσακίρης 2017)

Κατά το γευστικό έλεγχο, ο δοκιμαστής αξιολογεί την αίσθηση του στόματος με τις εξής παραμέτρους: καθαρότητα, ένταση, στυπτικότητα, λιπαρότητα, στρογγυλότητα, καυστικότητα (αλκοόλ), επιθετικότητα ταννινών, Σάκχαρα, Οξύτητα, ορυκτότητα/μεταλλικότητα, Σώμα/Δομή/Υφή, Ένταση/Διάρκεια, καθώς και το άρωμα στόματος μέσω της έντασης και του τύπου. Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της Επίγευσης (σύντομη, μακρά κ.ά.). Εξάγονται γενικά συμπεράσματα που αφορούν την Ποιότητα, καθώς και τη Δυνατότητα παλαίωσης. Τέλος, κρίνεται η συνολική αίσθηση με την ισορροπία μεταξύ των γεύσεων και την πολυπλοκότητα του δείγματος. Στη γευστιγνωσία οίνου, η αίσθηση του στόματος που αναφέρεται στις τέσσερις στοιχειώδεις γεύσεις: γλυκιά, αλμυρή, ξινή, πικρή και ουμάμι. Το γλουταμινικό άλας (glutamate) προκαλεί την πέμπτη γευστική αίσθηση (Ντουρτόγλου Θ.). Η κάθε γεύση εντοπίζεται σε διαφορετικές ζώνες της γλώσσας, ανάλογα με τους γευστικούς κάλυκες που εδράζουν εκεί. Το ξινό συνδέεται με την παρουσία πρωτονίων, το αλμυρό συνδέεται με τα ανιόντα ανόργανων αλάτων, το γλυκό και το πικρό σχετίζεται με ειδική στερεοδομή των μορίων του σήματος του ερεθίσματος, σε αλληλεπίδραση με το σύστημα του υποδοχέα. Μόρια τροφίμων διασκορπίζονται στη στοματική κοιλότητα και έρχονται σε επαφή με τα αισθητήρια όργανα της γεύσης. Έτσι στο μπροστινό τμήμα της γλώσσας εδράζουν μυκητοειδείς αυξήσεις (fungiform), σχηματισμοί στο επιθήλιο, όπου υπάρχουν κάλυκες από τους οποίους αναγνωρίζεται η γλυκιά γεύση. Πλευρικά του κυρίου σώματος της γλώσσας βρίσκονται οι πλευρικές πτυχώσεις (foliate) στις οποίες αναγνωρίζονται η αλμυρή και η ξινή γεύση. Τέλος, κοντά στη βάση της γλώσσας, εδράζουν 8-12 θηλές (circumvallate), οι κάλυκες των οποίων ανταποκρίνονται στην πικρή και σε μικρό βαθμό στη ξινή γεύση (Meilgaard, 2006).

Κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση χρησιμοποιούνται ακόμη δύο γεύσεις, η umami και η μεταλλική. Η πρώτη παράγεται από αραιά υδατικά διαλύματα, από ένα ορισμένο είδος αμινοξέος ή νουκλεοτιδίου, όπως το όξινο γλουταμινικό νάτριο και συνδέεται με το πικάντικο, ενώ η δεύτερη παράγεται από διαλύματα βάσεων (π.χ. υδροξείδια νατρίου) και συχνά αναφέρεται ως η γεύση που έχει το αίμα. Οι γεύσεις αυτές δεν αναγνωρίζονται από όλους, ωστόσο χρησιμοποιούνται ευρέως, ειδικά κατά την εκπαίδευση των δοκιμαστών, και αυτό γιατί είναι εύκολα αναγνωρίσιμες. Τον τελευταίο καιρό, γίνεται λόγος για μία ακόμη γεύση που σχετίζεται με την αναγνώριση του λίπους. Αμερικανοί επιστήμονες φαίνεται να ανακάλυψαν ένα γονίδιο που ρυθμίζει την ικανότητα αναγνώρισης αυτής της νέας γεύσης. Το υπόλοιπο της στοματικής αίσθησης είναι κυρίως αισθήσεις αφής, όπως η θερμοκρασία. Στις άλλες αισθήσεις, πρέπει επίσης να προστεθεί και η χημική, στην οποία περιλαμβάνεται η στυφή αίσθηση. Η αίσθηση της γεύσης επιτελείται με

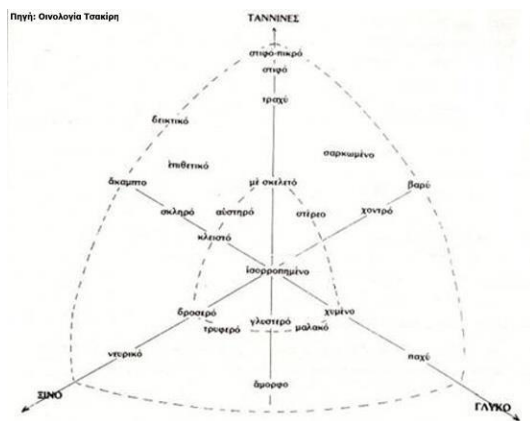
τη βοήθεια των θηλών (καλύκων) που βρίσκονται στην επιφάνεια της γλώσσας. Κάθε θηλή της γλώσσας περιέχει γευστικά κύτταρα. Δεν υπάρχουν περιοχές στη γλώσσα όπου να γίνεται αποκλειστικά αντιληπτή κάθε συγκεκριμένη γεύση. Όμως, υπάρχουν πολύ μικρές διαφορές, με αποτέλεσμα το μπροστινό μέρος της γλώσσας να είναι πιο ευαίσθητο στη γλυκιά γεύση, τα πλάγια στην αλμυρή και ξινή και το βάθος της γλώσσας στην πικρή. Το πικρό γίνεται πιο αντιληπτό στο πίσω μέρος της γλώσσας. Η ξινή γεύση γίνεται αντιληπτή και στο εσωτερικό από τα μάγουλα. Ο δοκιμαστής θα πρέπει να γνωρίζει το χρόνο εμφάνισης και το μέγιστο κάθε γεύσης στο χρόνο, διότι κατά τη δοκιμασία αυτές οι τέσσερις γεύσεις δεν αναγνωρίζονται ταυτόχρονα, αλλά διαδοχικά. (Τσακίρης, 2017).

Ακολουθούν την ίδια σειρά, δηλαδή διαδοχικά εμφανίζονται η γλυκιά, η ξινή και η πικρή γεύση, με αποτέλεσμα να υπάρχει η αίσθηση της διαδοχής των γεύσεων. Η γλυκιά εμφανίζεται σε 2-3 δευτερόλεπτα και έχει σχετικά μικρή διάρκεια. Στη συνέχεια εμφανίζεται η ξινή που έχει μεγαλύτερη διάρκεια και γι' αυτό συνήθως επικρατεί της γλυκιάς στην επίγευση. Τέλος, η πικρή εμφανίζει μέγιστο σε 10-15 δευτερόλεπτα, με αποτέλεσμα πολλές φορές να γίνεται πιο αισθητή στην επίγευση. Η καμπύλη χρόνου-έντασης μπορεί να καταγραφεί επιστημονικά και αξιόπιστα. Η χρονική απόκλιση οφείλεται συνολικά τόσο στη μικρή διαφορά ευαισθησίας των θηλών των διαφόρων περιοχών, όσο κυρίως σε μια χρονική διαφοροποίηση της εμφάνισης του μέγιστου για κάθε γεύση. Η αλκοόλη (κυρίως αιθανόλη και γλυκερόλη) ευθύνεται σε σημαντικό βαθμό για την υφή του οίνου και συνεισφέρει στη γλυκύτητά του. Τα σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη) αποτελούν το κύριο παράγοντα για τη διαμόρφωση της γλυκύτητας του οίνου. Τα οργανικά οξέα (τρυγικό, μηλικό, γαλακτικό) εντοπίζονται στον οίνο σε ποσότητα 5 - 7 gr/l περίπου και διαμορφώνουν την οξύτητα του οίνου, κοινώς τη ξινή γεύση. Η πικρή γεύση οφείλεται στις πολυφαινόλες, φλαβονοειδή (κατεχίνες), υδροξυκιναμωμικά οξέα και αιθυλεστέρες τους αμίνες, τριτερπένια, αλκαλοειδή, τυροσόλη, ρητίνες (π.χ ρετσίνι), ακρολείνη (βακτηριακή προσβολή). Οι κυριότερες (για τη γεύση) είναι οι τανίνες, συμβάλλουν δραστικά στην πικρή και στυφή γεύση του οίνου. Η **ξινή και αλμυρή** γεύση οφείλεται σε διαλυτά ανόργανα κατιόντα (H⁺, Na⁺). Τέλος, τα άλατα, όπου τα κυριότερα στον οίνο είναι τα τρυγικά, διαμορφώνουν την αλμύρα του οίνου που βρίσκεται συνήθως σε αμελητέα επίπεδα, δε χρήζει ξεχωριστής ανάλυσης, εντείνει όμως την οξύτητα και τη φρεσκάδα του και ενώ η παρουσία της δε γίνεται εύκολα αντιληπτή, ενοχλεί η απουσία της, συμβάλλοντας σε πλαδαρά και απογοητευτικά γευστικά αποτελέσματα. Σπάνια ανιχνεύεται στον οίνο με εξαίρεση τον νησιωτικό αμπελώνα. Παράγοντες που επηρεάζουν τη γεύση είναι: η **Θερμοκρασία**: βέλτιστη η θ στόματος (π.χ. χαμηλή θ ελαττώνει την γλυκιά γεύση αλλά αυξάνει την πικρή και την στυφάδα), το **pH** (ιονισμός αλάτων, οξέων, δομή πρωτεϊνών), η **Ηλικία** του δοκιμαστή (αριθμός γευστικών θηλών) καθώς και το φύλο, η **Προσαρμογή** των γεύσεων (το νερό φαίνεται γλυκό μετά την δοκιμή πικρών ουσιών) και τέλος η **χημική σύσταση του σάλιου** (διαφέρει ανάμεσα στους δοκιμαστές, αλλά και με την ώρα της ημέρας). Γενικά, η γεύση του οίνου αποτελεί αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ των επιμέρους συστατικών του. Τη βάση της γευστικής αρμονίας στον οίνο αποτελεί η ισορροπία δύο ομάδων, στις οποίες η μεν πρώτη αποτελείται από συστατικά με γλυκιά γεύση και η δεύτερη ομάδα αποτελείται από συστατικά με πικρή γεύση. Αντίστοιχα η ξινή γεύση οφείλεται στα οξέα, η αλμυρή στα άλατα των οξέων και η πικρή στις ταννίνες. Η ισορροπία μεταξύ των γεύσεων δίνει οίνους ισορροπημένους. Στους οίνους, στους οποίους δεν υπάρχει γευστική ισορροπία, αυτό οφείλεται στο λανθασμένο προσδιορισμό της ωρίμανσης των σταφυλιών (Henderson and Rex, 2011).

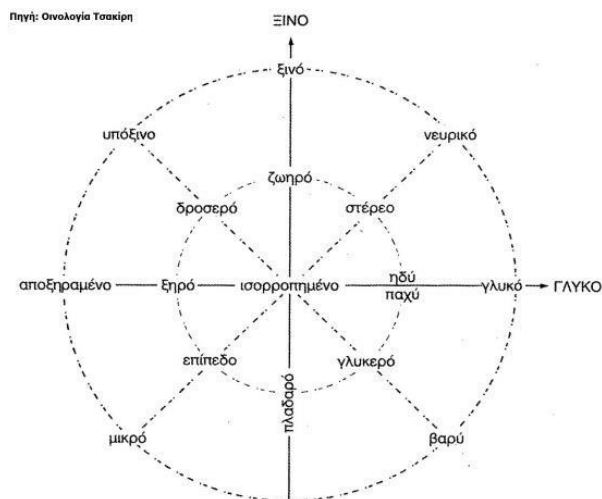
Η διαδικασία της γευστικής εξέτασης έχει ως εξής, αφού εισαχθεί ο οίνος στο στόμα, στροβιλίζεται (διασπείρεται το υγρό σε όλη τη στοματική κοιλότητα καθώς έρχεται σε επαφή τόσο με όλη την επιφάνεια της γλώσσας και τους ευαίσθητους γευστικούς της κάλυκες, όσο και με τον ουρανίσκο, τα ούλα και το εσωτερικό των μάγουλων, με αποτέλεσμα την καλύτερη δυνατή λήψη ερεθισμάτων γεύσης και αφής) και εκτιμάται, έπειτα ή θα αποβληθεί από αυτό με φτύσιμο, ή θα καταποθεί. Προσδιορίζεται η γεύση (γλυκό, ξινό, πικρό, αλμυρό, umami), αξιολογείται η ισορροπία μεταξύ των γεύσεων, η αίσθηση στόματος (ένταση, στυπτικότητα, λιπαρότητα, στρογγυλότητα, καυστικότητα, επιθετικότητα ταννινών), εκτιμάται το άρωμα στόματος (ένταση, τύπος, ισορροπία), η δομή του οίνου, το σώμα, η πολυπλοκότητα, η διάρκεια και επίγευση.

Άλλες αισθήσεις. Το κάψιμο και τον πόνο που προκαλεί η αιθανόλη στο στόμα. Αυτή η θερμή αίσθηση που γίνεται κάψιμο στα ισχυρά αλκοολούχα ποτά οφείλεται στην ικανότητά της να απορροφά το νερό των κυττάρων. Η δράση των ταννινών είναι χημική. Πρόκειται για ενώσεις που περιέχονται κατα κύριο λόγο στα ερυθρά κρασιά και προκαλούν τη συγκόλληση του σάλιου χάρη στην ένωσή τους με τις πρωτεΐνες που περιέχει το σάλιο και το τελικό φράξιμο των σιελογόνων αδένων. Έτσι δημιουργούν τη στυφάδα που περιγράφεται ως σύσφιγξη, συστολή, σκλήρυνση. Η αφή, τέλος, δίνει πληροφορίες για το ιξώδες, το ελαιώδες, τον όγκο και τη θερμοκρασία. Η θερμική ευαισθησία γίνεται αντιληπτή από ορισμένα φαινόμενα, όπως το πάγωμα των δοντιών και των ούλων όταν το δείγμα είναι πάρα πολύ κρύο. Η θερμοκρασία τροποποιεί την αντίληψη των διαφόρων γεύσεων, καθώς και την αρωματική ένταση των ενώσεων. Γι' αυτό το λόγο, η διεξαγωγή του οργανοληπτικού ελέγχου γίνεται σε κατάλληλο χώρο (επαρκής φωτισμός, απαλλαγμένος από οσμές και θερμοκρασία 20-22° C) από άτομα που έχουν ανεπτυγμένη αισθητική μνήμη κι έχουν εκπαιδευτεί συστηματικά.

Η επίγευση είναι η γευστική εντύπωση που μένει μετά την κατάποση ή την αποβολή του οίνου. Η γεύση που αφήνει στο στόμα είναι ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά του οίνου. Σχετίζεται έντονα με την ύπαρξη πικρών συστατικών. Ανυπαρξία γεύσης φανερώνει ένα μικρό και φτωχό σε συστατικά κρασί. Ύπαρξη έντονης γεύσης πικρών ή ξινών συστατικών φανερώνει κρασί με ελαττωματική δομή. Αντίθετα, όταν η γευστικότητα του στόματος παραμένει έντονη χωρίς εμφάνιση ξινών ή πικρών συστατικών, είναι δείγμα ποιοτικής ανωτερότητας του οίνου. Μερικές φορές, αν και δεν είναι σωστό χρησιμοποιείται για να δηλώσει την αρωματική διάρκεια. Με τον όρο «τελείωμα» γίνεται αναφορά στις αισθήσεις που γίνονται αντιληπτές μετά την κατάποση. Επίσης, γρήγορο ή σύντομο λέγεται το κρασί με μικρή αρωματική διάρκεια και σύντομη επίγευση στις γευστικές εντυπώσεις που αφήνει στο στόμα, σε αντίθεση με ένα μακρύ κρασί που αφήνει μια μακριά και παρατεταμένη γευστική εντύπωση (Τσακίρης 2017).



Εικόνα 29. Γευστική Ισορροπία. Η γραφική παράσταση της γευστικής ισορροπίας παρουσιάζει έναν άξονα για κάθε ξεχωριστή γεύση, όπου εξάγεται ο γευστικός χαρακτηρισμός του εκάστοτε οίνου. Ο σκοπός της δημιουργίας της είναι η διευκόλυνση χρησιμοποίησης του γευστικού λεξιλογίου καθώς και ο σχηματισμός της λεκτικής έκφρασης της γευστικής ισορροπίας. Έτσι, ένα κρασί με κανονική γλύκα και ανεπαρκή οξύτητα είναι πλαδαρό. Για τα κόκκινα κρασιά προστίθεται ένας ακόμη άξονας που αντιστοιχεί στη στυφή αίσθηση των ταινιών (Τσακίρης 2017).



Εικόνα 30. Γευστικός χαρακτηρισμός οίνου (Τσακίρης, 2017)

1.6.5 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Η ποιότητα ενός οίνου προσδιορίζεται από συγκεκριμένους παράγοντες, όπως η πολυπλοκότητα και η εξέλιξη των αρωμάτων, η διάρκεια του αρώματος, ο χαρακτήρας του τελειώματος, καθώς και η ισορροπία (δεν υπερισχύει καμία γεύση ή άρωμα). Χαρακτηρίζεται ως Δυναμική, από Κομψότητα, από Νευρικότητα (έντονα χαρακτηριστικά, ισορροπία ακροβατεί). Το οργανοληπτικό προφίλ αποτελεί μέρος της προδιαγραφής ενός προϊόντος. Βασικές παράμετροι Ποιότητας προϊόντος: Μικροβιολογικά και Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, Διαθρεπτική αξία. Η Εκτίμηση της ποιότητας του οίνου ολοκληρώνεται με τον οργανοληπτικό έλεγχο, διότι οι αναλυτικές μέθοδοι σήμερα είναι ικανές να δώσουν πληροφορίες για πάνω από 300 ουσίες που υπάρχουν στον οίνο, εν τούτοις υπάρχουν πολλές ακόμα, σε πολύ μικρή συγκέντρωση, που είναι υπεύθυνες για το διαφορετικό χαρακτήρα των οίνων και γίνονται αντιληπτές μόνο μέσω των αισθήσεων, καθώς και η μεταξύ τους αρωματική ισορροπία.

Περιλαμβάνει την ανάλυση των γευστικών και αρωματικών χαρακτηριστικών του οίνου (προτερημάτων ή των ελαττωμάτων του), την ταξινόμηση και σύγκριση οίνων ίδιου τύπου, αλλά και στον προσδιορισμό της ποιότητας διαφορετικών τύπων με αντικειμενικά κριτήρια, την εκτίμηση της εμπορικής αξίας συγκριτικά με άλλους οίνους κοινής προέλευσης και τύπου. Επικρατεί η αντίληψη ότι ένας οίνος έχει τόσο υψηλότερη βαθμολογία σε ποιοτικά χαρακτηριστικά, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωσή του σε εστέρες (με τον οξικού αιθυλεστέρα κάτω από ένα όριο) και σε ανώτερες αλκοόλες μέχρι ένα όριο συγκέντρωσης. Επικεφαλής των αποθητικών οσμών του οίνου μπαίνει η μυρωδιά του θειώδη ανυδρίτη που υποβαθμίζει πολλά κρασιά, κυρίως λευκά, μερικές φορές και ερυθρά. Ο θειώδης ανυδρίτης (διοξειδίο του θείου), όπως έχει προαναφερθεί αναλυτικά στο ομώνυμο εδάφιο, είναι ένα αντισηπτικό που προστίθεται με διάφορες μορφές απαραίτητως πριν και μετά από τη ζύμωση προ κειμένου να αποφεύγονται οι ενζυμικές δράσεις της οξειδώσεως του οίνου και η απενεργοποίηση μικροοργανισμών που δρουν μέσα στο κρασί. Η μυρωδιά του θειώδη ανυδρίτη είναι πνιγηρή και προκαλεί ζάλη (ερεθισμός του οσφραντικού κέντρου). (Τσακίρης, 2017)

Τέλος η εκτίμηση από τους εξειδικευμένους επαγγελματίες οινολόγους, οινολογικών τεχνικών και κατεργασιών είναι απαραίτητη, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα χρήσιμα για την οινοποίηση, αλλά και την εξέλιξη του προϊόντος. (Τζιτζή και Κυπαρισσίου, 2010).

1.6.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ: ΤΕΣΤ

Με σκοπό την αξιολόγηση τροφίμων και ποτών κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο, χρησιμοποιούνται ως εργαλεία διάφορες μέθοδοι αξιολόγησης (τεστ). **Οι μέθοδοι αυτές διαχωρίζονται βάση τη φύση του στόχου, το υπό εξέταση προϊόν, τους δοκιμαστές, το περιβάλλον και το επιθυμητό επίπεδο της απαιτούμενης ακρίβειας.**

Οι βασικές κατηγορίες και υποκατηγορίες όπως ορίζονται από τον ISO (International Organization for Standardization) αναφέρονται παρακάτω. **Διακρίνονται 3 κατηγορίες μεθόδων (τεστ):**

- i. **Τεστ διαφοροποίησης (Discrimination tests).** Απαιτείται στατιστική ανάλυση (Σύγκριση κατά ζεύγη, Τριγωνική δοκιμή, duo-trio δοκιμή, δοκιμή δύο από τα πέντε, A – όχι A)
- ii. **Τεστ με χρήση διαβαθμίσεων και κατηγοριών (Scale and categories tests)**
- iii. **Περιγραφικά τεστ (Descriptive tests)** (απλό περιγραφικό, ποσοτική περιγραφή, ελεύθερη επιλογή από προφίλ)
- iv. **Τεστ με χρήση διαβαθμίσεων και κατηγοριών**

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων στηρίζεται στην στατιστική ανάλυση. Χρησιμοποιούνται ευρέως μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις. Συχνά χρησιμοποιείται ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για εκτίμηση αλληλεπιδράσεων. Στην απλή του μορφή προσφέρει στατιστικά τεστ για σύγκριση μέσων όρων. Όσον αφορά τα αποτελέσματα, υπάρχει μεγάλη ποικιλία στον τρόπο παρουσίασής τους. Συνήθως προτιμώνται διαγράμματα που είναι απλά και εύκολα κατανοητά.

Περιγραφικά τεστ (Descriptive tests)

Οι συγκεκριμένες δοκιμές μπορούν να εφαρμοστούν σε 1 ή περισσότερα δείγματα με στόχο να χαρακτηρίσουν, ποιοτικά και ποσοτικά, ένα ή περισσότερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η κατηγοριοποίηση τους είναι η εξής:

- a. **Απλό περιγραφικό (simple descriptive test): Το τεστ αυτό δίνει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά ενός προϊόντος. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ταυτοποίηση και την περιγραφή των χαρακτηριστικών ενός δείγματος ή δειγμάτων καθώς και την σειρά με την οποία γίνονται αντιληπτά. (ISO 6658, 2005)**
- b. **Ποσοτική περιγραφή (quantitative descriptive test):** Γίνεται καθορισμός οργανοληπτικού προφίλ με χρήση λεξιλογίου που έχει οριστεί με χρήση απλού περιγραφικού τεστ. Τα επιμέρους χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στη δημιουργία της συνολικής αισθητηριακής εντύπωσης βαθμολογούνται σε κλίμακα και τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του οργανοληπτικού προφίλ. Η χρήση των τεστ με ποσοτική περιγραφή εφαρμόζεται κυρίως

στην διαδικασία ανάπτυξης νέων προϊόντων, στην εξακρίβωση της φύσης των διαφορών μεταξύ προϊόντων καθώς και στον ποιοτικό έλεγχο. Επιπλέον, παρέχουν πληροφορίες οργανοληπτικού περιεχομένου οι οποίες μπορούν να διασταυρωθούν με τα αποτελέσματα μετρήσεων οργάνων και πληροφορίες από καταναλωτές. (ISO 6658, 2005)

c. **Ελεύθερη επιλογή προφίλ (free choice profiling test):** Χρησιμοποιείται από άπειρους δοκιμαστές για να αξιολογήσουν και να περιγράψουν προϊόντα με δική τους ορολογία. Η δοκιμή αυτή προτιμάται στην διαδικασία ανάπτυξης νέων προϊόντων με κύριο πλεονέκτημα την αποφυγή εκπαίδευσης ενός οργανοληπτικού πάνελ. (ISO 6658, 2005)

Στη συνέχεια, στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται οι διάφορες μέθοδοι δοκιμής που εφαρμόζονται κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο.

Όπου Α: ανειδίκευτοι δοκιμαστές και Ε: εκπαιδευμένοι δοκιμαστές

		Κύριες κατηγορίες δοκιμών	Τύποι κατάλληλων δοκιμών
ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ	ΔΟΚΙΜΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΗΣ	α. δοκιμές διαφοράς	1. δοκιμή σύγκρισης ζεύγους 2. δοκιμή duo/trio 3. Τριγωνική δοκιμή 4. Δοκιμή κατάταξης 5. Δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων
		β. δοκιμές ευαισθησίας	1. Δοκιμή αραίωσης 2. Δοκιμή στο κατώφλι της διαφοράς

	Κύριες κατηγορίες δοκιμών	Τύποι κατάλληλων δοκιμών
ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ	α) Δοκιμές διαβάθμισης χαρακτηριστικών <ul style="list-style-type: none"> • Δοκιμή βαθμολόγησης • Δοκιμή αναλογικών μεγεθών β) Δοκιμές περιγραφικής ανάλυσης <ul style="list-style-type: none"> • Ανάλυση κατατομής γεύσης • Ανάλυση κατατομής υφής • Ποσοτική περιγραφική ανάλυση
ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΡΟΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΧΗΣ		α) Δοκιμές σύγκρισης ζεύγους b) Δοκιμές κατάταξης c) Δοκιμές βαθμολόγησης d) Δοκιμές αρέσκειας

Εικονες 31. Τα βασικά τεστ επιλογής: Διάκριση χαρακτηριστικών (μάθηση), Συγκράτηση αισθήσεων (μνήμη), Έκφραση με ξεκάθαρους και ακριβείς όρους (εμπειρία) και ο Σχηματισμός γνώμης.

Μέθοδος	Τύπος και αριθμός δοκιμαστών	Εφαρμογή
<u>Απλή δοκιμή δείγματος</u>	A:80 E: 3-10	<ul style="list-style-type: none"> • Πληροφορίες για ποιότητα • Προτίμηση • Βαθμός αρέσκειας
Σύγκριση κατά ζεύγη	A:80 E: 8-12	<ul style="list-style-type: none"> • Δοκιμή διαφοροποίησης • Δοκιμή ευαισθησίας • Επιλογή πάνελ • Δοκιμή για όριο ανίχνευσης
DUO-TRIO	E: 8-10	<ul style="list-style-type: none"> • Δοκιμή διαφοροποίησης • Δοκιμή ευαισθησίας • Επιλογή πάνελ
Τριγωνική δοκιμή	E: 8-10	<ul style="list-style-type: none"> • Δοκιμή διαφοροποίησης • Δοκιμή ευαισθησίας • Επιλογή πάνελ • Δοκιμή για όριο ανίχνευσης
Δοκιμή για ταξινόμηση	A:80 E: 3-10	<ul style="list-style-type: none"> • Επιλογή δείγματος • Σύγκριση ποιότητας • Δοκιμή αποδοχής • Προτίμηση
Δοκιμή πολλαπλής σύγκρισης	E: 5-10	<ul style="list-style-type: none"> • Δοκιμή διαφοροποίησης • Ανάπτυξη προϊόντος • Έλεγχος ποιότητας
Εξακρίβωση προφίλ γεύσης	E: 6-12	<ul style="list-style-type: none"> • Λεπτομερής έλεγχος ποιότητας • Ανάπτυξη προϊόντος • Δείκτες αρώματος
Δοκιμή ευαισθησίας	A: 5-15	<ul style="list-style-type: none"> • Επιλογή πάνελ • Ανίχνευση δεικτών αρώματος
Τεστ αποδοχής καταναλωτών	A: 25-100	<ul style="list-style-type: none"> • Επιλογή προϊόντος • Προτίμηση • Βαθμός αρέσκειας • Ήδονική απόκριση

Πίνακας 14. Μέθοδοι αξιολόγησης οργανοληπτικού ελέγχου - τεστ.

1.6.6.1 ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ

Μείζον θέμα συζήτησης γίνεται τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα για τη βαθμολόγηση των οίνων από ειδικούς γευσιγνώστες - δοκιμαστές, περισσότερο ή λιγότερο αποδεκτούς. Η νέα, για τη χώρα, αλλά όλο και επεκτεινόμενη αυτή κατάσταση φαίνεται τελικά πως λειτουργεί και εδώ, όπως περίπου και σε χώρες του εξωτερικού, επηρεάζοντας την αγορά και διαμορφώνοντας σινικές τάσεις και μόδες. Η ευσυνείδητη και επαγγελματική αξιολόγηση - βαθμολόγηση οίνων είναι μια αρκετά πολύπλοκη και κυρίως υπεύθυνη διαδικασία συγκεκριμένων κανόνων, που έχει σκοπό τη μεγιστοποίηση της αντικειμενικότητας και τη διαμόρφωση μιας ξεκάθαρης εικόνας της ποιότητάς τους. Πρέπει να γίνεται από αμερόληπτους έμπειρους και ικανούς δοκιμαστές και έχει συνήθως εμπορικούς, διαγωνιστικούς και δημοσιογραφικούς λόγους. Αφορά στην επιμέρους βαθμολόγηση κάθε κομματιού της οργανοληπτικής εξέτασης του οίνου.

(13)

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΟΙΝΟΥ	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ	ΕΝΤΑΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ	ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΕΣ ΟΣΜΕΣ
732	1 Μη Αποδεκτό - Ελαττωματικό 2 Αποδεκτό 3 Ευχάριστο 4 Πολύ καλό	1 Χαμηλή 2 Μέτρια 3 Ικανοποιητική 4 Υψηλή	→ αχλάδι Φρέσκα φρούτα 1 2 3 4 Ξηρά Φρούτα 1 2 3 4 Ζύμες 1 2 3 4	Οξικό οξύ 1 2 3 4 Οξ. Λιθ/στέρας 1 2 3 4 Υδρόθειο 1 2 3 4
712	1 Μη Αποδεκτό - Ελαττωματικό 2 Αποδεκτό 3 Ευχάριστο 4 Πολύ καλό	1 Χαμηλή 2 Μέτρια 3 Ικανοποιητική 4 Υψηλή	→ πράσινο μήλο Φρέσκα φρούτα 1 2 3 4 Ξηρά Φρούτα 1 2 3 4 Ζύμες 1 2 3 4	Οξικό οξύ 1 2 3 4 Οξ. Λιθ/στέρας 1 2 3 4 Υδρόθειο 1 2 3 4
456	1 Μη Αποδεκτό - Ελαττωματικό 2 Αποδεκτό 3 Ευχάριστο 4 Πολύ καλό	1 Χαμηλή 2 Μέτρια 3 Ικανοποιητική 4 Υψηλή	Φρέσκα φρούτα 1 2 3 4 Ξηρά Φρούτα 1 2 3 4 Ζύμες 1 2 3 4	Οξικό οξύ 1 2 3 4 Οξ. Λιθ/στέρας 1 2 3 4 Υδρόθειο 1 2 3 4
987	1 Μη Αποδεκτό - Ελαττωματικό 2 Αποδεκτό 3 Ευχάριστο 4 Πολύ καλό	1 Χαμηλή 2 Μέτρια 3 Ικανοποιητική 4 Υψηλή	Φρέσκα φρούτα 1 2 3 4 Ξηρά Φρούτα 1 2 3 4 Ζύμες 1 2 3 4	Οξικό οξύ 1 2 3 4 Οξ. Λιθ/στέρας 1 2 3 4 Υδρόθειο 1 2 3 4

→ κόλλα

Εικόνα 32. Απαντημένο ερωτηματολόγιο οργανοληπτικού ελέγχου παρούσης ερευνητικής εργασίας με αριθμητική κλίμακα 0-4, το οποίο πολλές φορές συνοδεύτηκε από σχόλια των πιο έμπειρων δοκιμαστών, όσον αφορά χαρακτηρισμό των επιμέρους ποιοτικών χαρακτηριστικά, αλλά και των ελαττωματικών.

Σε ένα ερωτηματολόγιο οργανοληπτικού ελέγχου, όπως το εικονιζόμενο (αξιολογείται μόνο η παράμετρος «άρωμα»), μετά το πέρας της αξιολόγησης πραγματοποιείται άθροισμα των επιμέρους βαθμολογιών κάθε δείγματος. Το άθροισμα αυτών των βαθμών δίνει το σύνολο, τον τελικό δηλαδή βαθμό, που πολλές φορές συνοδεύεται και από κάποιον χαρακτηρισμό και σχόλια. Με αυτόν τον τρόπο επιλέγεται το καλύτερο οινικό προϊόν σύμφωνα με τη γνώμη των έμπειρων αξιολογητών. Η Βαθμολόγηση οργανοληπτικών χαρακτήρων γίνεται με τη χρήση Κλίμακας Αριθμητικής ή Περιγραφικής. Η Περιγραφική ανάλυση αφορά το αρωματικό ή/και γευστικό προφίλ. Υπάρχουν διάφορα συστήματα βαθμολόγησης με αρκετές διαφορές μεταξύ τους. Δύο όμως από αυτά έχουν επικρατήσει: αυτό με άριστα το 20 και αυτό με άριστα το 100. Το δεύτερο είναι αυτό που χρησιμοποιεί και ο γνωστότερος ίσως ανά τον κόσμο κριτικός οίνων, ο διάσημος Robert Parker. Συχνά συναντάται και το σύστημα με τα αστέρια (0-5).

2. ΕΙΔΙΚΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΠΟΙΚΙΛΙΑ «ΑΣΥΡΤΙΚΟ»

2.1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΜΠΕΛΩΝΑΣ Γ.Π.Α.

Το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών κατέχει και διαχειρίζεται τρία αγροκτήματα, τα οποία βρίσκονται στην Αλίαρτο Βοιωτίας (1.100 στρέμματα), στον Ωρωπό (27 στρέμματα) και στην περιοχή Γιαλού του Δήμου Σπάτων - Αρτέμιδος (430 στρέμματα). Στα αγροκτήματα, τα μέλη της ακαδημαϊκής κοινότητας ασκούν εκπαιδευτικές και ερευνητικές δραστηριότητες, σημαντικές για την ανάπτυξη των γεωπονικών επιστημών και του πρωτογενούς τομέα. Παράλληλα, τμήματα των παραπάνω εκτάσεων καλλιεργούνται στο πλαίσιο παραγωγικών δραστηριοτήτων με τη μεταφορά της πανεπιστημιακής γνώσης στην αγορά μέσω της επιστημονικής παραγωγής. Έτσι το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών έχει πετύχει να συνδεθεί με την αγορά, αξιοποιώντας τη γνώση που κατέχει και παράγει, αλλά και την περιουσία του, με μια υγιή οικονομική πολιτική, που βοηθάει στην επίτευξη της ανάπτυξής του.

Το αγρόκτημα Γιαλού Σπάτων βρίσκεται 35 χιλιόμετρα δυτικά της Αθήνας και σε μικρή απόσταση από τον δήμο των Σπάτων. Έχει συνολική έκταση 430 στρεμμάτων και καλλιεργείται κυρίως με αμπέλια οινοποιήσιμα και ελαιώνα (ο αμπελώνας και ο ελαιώνας έχουν ενταχθεί από το 2005 σε επιδοτούμενο πρόγραμμα βιολογικής καλλιέργειας).

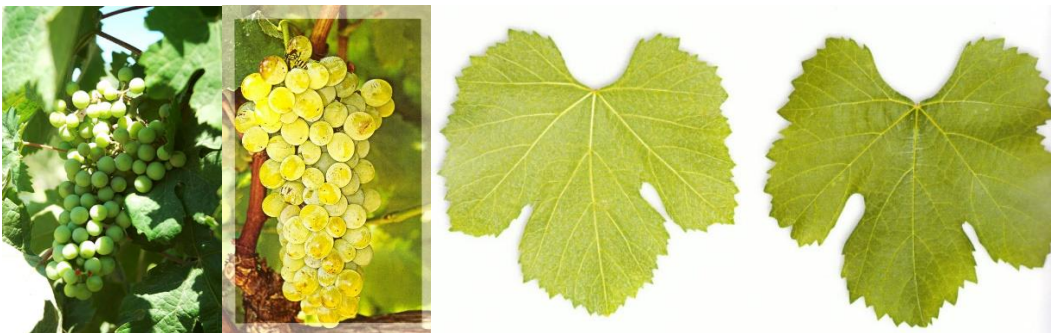
Ο βιολογικός αμπελώνας του Γ.Π.Α. των Σπάτων, βρίσκεται σε μια περιοχή όπου η αμπελουργική παράδοση αρχίζει από τα αρχαία χρόνια. Εκτείνεται σε 245 στρέμματα και περιλαμβάνει πέντε ελληνικές γηγενείς λευκές ποικιλίες αμπέλου προς οινοποίηση, Σαββατιανό και Ροδίτη, παραδοσιακές της Αττικής, **Αιγιοπελαγίτικες**, **Ασύρτικο** και Αθήρι, καθώς και την Στερεοελλαδίτικη Μαλαγουζιά. Το ξηροθερμικό κλίμα της περιοχής, οι ήπιοι άνεμοι και η σύσταση του εδάφους συντελούν στην παραγωγή ποιοτικών οίνων. Τα πρέμνα έχουν γραμμοειδή διαμόρφωση και αρδεύονται με σταγόνες. Η βιολογική διαχείριση του αμπελώνα γίνεται από τους γεωπόνους του Τμήματος Γεωργικών Εκμεταλλεύσεων του Γ.Π.Α. με την επιστημονική συνεργασία των αρμοδίων εργαστηρίων. (Site aua)



Εικόνα 33. α) β) γ). Οι εκτάσεις στο Αγρόκτημα των Σπάτων με την ποικιλιακή σύνθεση του αμπελώνα: Σαββατιανό, Ροδίτης, Ασύρτικο, Αθήρι και Μαλαγουζιά

2.1.2 ΑΜΠΕΛΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ, ΦΑΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ, ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η σταφυλή του είναι μέτριου μεγέθους, περίπου 350g και μήκους περίπου 20cm, ενίοτε μεγάλη, κυλινδρική ή κωνική, απλή, πυκνή, με ισομεγέθεις ράγες. Ποδίσκος βραχύς, ισχυρός, μετρίως ξυλοποιούμενος κατά την πλήρη ωρίμανση. Η ράγα αυτής της ποικιλίας είναι μέσου μεγέθους έως μεγάλες, σφαιρικές έως ελλειψοειδείς, με παχιά φλούδα, χυμώδη σάρκα και υπόξινη γεύση. Φλοιός κίτρινος με χρυσές αποχρώσεις, μέτριου πάχους, πλούσιος (για λευκή ποικιλία) σε τανίνες, διαφανής, καλυπτόμενος από λεπτό στρώμα κέρινης ανθερότητας. Η σάρκα περικλείει 2-3 γίγαρτα κυρτά, απιοειδή. Η ίδια είναι μαλακή, μετρίως χυμώδης, με χαρακτηριστική υπόξινη γεύση και ποδίσκος μέτριο, χαλαρής πρόσφυσης. Η βλάστηση ξεκινά στα τέλη Μαρτίου με αρχές Απριλίου, με την ωρίμανση ξεκινάει τέλος Ιουλίου με την πλήρη ωρίμανση τέλη Αυγούστου με το πρώτο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου. Συμβιώνει αρμονικά με τα υποκείμενα 110 R, 1103 P, 140 Ru, η δε συμπεριφορά της ποικιλίας στους εμβολιασμούς είναι πολύ καλή. Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δοθεί στην ατόρριξη μορφή των αμπελώνων σε συνδυασμό με την ιδιότητα του ριζικού συστήματος των ποικιλιών της ευρωπαϊκής αμπέλου να διεισδύει σε πολύ μεγαλύτερο βάθος από τα ανθεκτικά στη ριζόβια μορφή της φυλλοξήρας υποκείμενα και έτσι να παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στην ξηρασία.



Εικόνες 34. α) Σταφυλή ασύρτικου (αριστερά) και β) σχήμα φύλλων (δεξιά).

Η ποικιλία Ασύρτικο είναι φυτό ζωνρό, εύρωστο και παραγωγικό, με δυνατότητα προσαρμογής σε διαφορετικούς τύπους εδαφοκλιματολογικών συνθηκών διατηρώντας τα αμπελογραφικά χαρακτηριστικά και τις οινολογικές του ιδιότητες (Τσακίρης, 2017).

Επιδεικνύει αξιοσημείωτη αντοχή στη ξηρασία, και τις ασθένειες, όπως τον περονόσπορο και το οίδιο. Λίκνο της είναι το νησί της Θήρας, όπου και παραμένει αυτοφυής, αφού δεν προσβλήθηκε ποτέ από φυλλοξήρα. Το μικροκλίμα της Σαντορίνης είναι μοναδικά ιδανικό και έχει ταυτιστεί με την εξέλιξη της ποικιλίας, η οποία είναι απόλυτα προσαρμοσμένη στα ξηροθερμικά περιβάλλοντα και είναι σπάνια η ικανότητα της να καλλιεργείται και να ωριμάζει σε συνθήκες ζεστού έως καυτού και ξηρού κλίματος, σε άνυδρα εδάφη, διατηρώντας υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα σε πλήρη ισορροπία με την έντονη οξύτητα του. **Πρόκειται για πολυδυναμική λευκή ποικιλία, πολλά υποσχόμενη, με άριστα γλευκογραφικά χαρακτηριστικά και μεγάλη δυνατότητα για εφαρμογή ποικίλων μεθόδων καλλιέργειας και οينوποίησης σε διάφορους βαθμούς τεχνολογικής ωριμότητας.** Κατά την πλήρη ωρίμανση, η περιεκτικότητα του γλεύκους της ποικιλίας Ασύρτικο σε σάκχαρα είναι 250-260 g/L, η ολική οξύτητα 7-9,5 g/L σε τρυγικό οξύ, το pH 3,10-3,30. Υπάρχει δε υψηλή περιεκτικότητα (για λευκή ποικιλία) σε τανίνες, αλλά και σημαντική ποσότητα ευοξειδωτων ουσιών. Από την ποικιλία αυτή παράγονται οίνοι υψηλής ποιότητας, λευκοί ξηροί, με υψηλό αλκοολικό τίτλο (12,8 – 14% vol), υψηλή οξύτητα (6,4 g/L σε τρυγικό οξύ και pH 2,9-3,1), με ευχάριστο άρωμα, αλλά και τάση για οξειδωση (Σταυρακάκης 2010, Σταύρακας 2011).

2.1.3 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

Πρόκειται για μια σπάνια, λευκή, εγχώρια ποικιλία, παγκόσμιας κλάσης και μια από τις σπουδαιότερες ποικιλίες που απαντώνται στη λεκάνη της Μεσογείου. Η ποικιλία προέρχεται από το σύμπλεγμα νησιών, τις Κυκλάδες με το νησί της Θήρας να είναι ο τόπος καταγωγής του, τον ιστορικότερο ελληνικό αμπελώνα και τον αρχαιότερο στην Ευρώπη. Καλλιεργείται σε άγονες και θερμές συνθήκες με δυνατούς ανέμους και ανήκει στις ποικιλίες που μπορούν να αναπτυχθούν με ελάχιστη άρδευση από την αρχαιότητα διατηρώντας μέχρι σήμερα αμετάβλητη την ποιότητά του και τα χαρακτηριστικά του. Με την παράδοση στην αμπελουργία, να υφίσταται στο νησί και τουλάχιστον 3.500 χρόνια. Πιθανολογείται ότι καλλιεργούνταν στο όρος του Προφήτη Ηλία μέχρι τη μεγάλη ηφαιστειακή έκρηξη, όπου η τέφρα σκέπασε την Καλλίστη, εξαφανίζοντας κάθε είδους βλάστηση πάνω στο νησί, με εξαίρεση τα φυτά που υπήρχαν στην οροσειρά του Προφήτη Ηλία. (Κουράκου-Δραγώνα, 1975, 2015).

Η σημερινή έκταση του αμπελώνα είναι περίπου 13.000 στρέμματα. Ξεκινά ομαλά από τη θάλασσα και καταλήγει με αναβαθμίδες μέχρι ύψος 300 μέτρα. Η πληθώρα χαρακτηριστικών της αμπελοκαλλιέργειας και οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, καθιστούν ξεχωριστό και ιδιαίτερο τον Σαντορινιό αμπελώνα (Κουράκου, 2015, Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007). Με τα εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα καλίου στο έδαφος να συντελούν στην υψηλή οξύτητα των σταφυλιών του Ασύρτικου κατά την πλήρη ωρίμανσή τους. Το κλίμα είναι ξηρό, αλλά η γειτνίαση με τη θάλασσα και οι μόνιμα πνέοντες υγροί άνεμοι μειώνουν τις αυξημένες θερμοκρασίες του καλοκαιριού, με συνέπεια τα σταφύλια που παράγονται έχουν πλούσια αρωματικά χαρακτηριστικά (Σπινθηροπούλου, 2009).

Η έλλειψη νερού μπορεί να επηρεάσει τη σύσταση των σταφυλιών και τα χαρακτηριστικά του οίνου με περισσότερους από έναν τρόπους. Τα σταφύλια που εκτίθενται σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες και ανθοκυάνες (Matthews et al., 1988, Esteban et al., 2001). Η υδατική καταπόνηση ως αποτέλεσμα της μειωμένης παροχής νερού, επιδρά στη φυσιολογία της αμπέλου (π.χ. κλείσιμο των στοματίων των φύλλων, μειωμένη φωτοσύνθεση) (Goodwin, 2002). Επίσης, μπορεί να έχει άμεσα και έμμεσα αποτελέσματα στο άρωμα του οίνου. Ως άμεσα αποτελέσματα αναφέρονται η μείωση της ανάπτυξης, η οποία συνεπάγεται την αύξηση της έκθεσης των σταφυλιών στο φως και οδηγεί σε μια μεταβολή στην αρωματική ισορροπία αρωμάτων φρούτων / φυτικών αρωμάτων και η περιορισμένη παραγωγή και μεταφορά σακχάρων στα σταφύλια, γεγονός που μειώνει τη διαθεσιμότητα των μεταβολιτών και μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή οίνων και γλευκών με υψηλότερο pH (Goodwin, 2002, Bruwer et al., 2007).

Η ελληνική αυτή ποικιλία με τις απεριόριστες δυνατότητες ανοίγει διάπλατα τις πόρτες του παγκόσμιου οινικού κόσμου, της οποίας αναγνωρίσιμο ελληνικό brand name, αποτελεί η Σαντορίνη με τα μοναδικά τοπία και κρασιά της, που την ανακυρήσσουν ναυαρχίδα του ελληνικού αμπελώνα, τόσο εμπορικά όσο και ποιοτικά, εντός και εκτός συνόρων. Το Ασύρτικο κατάφερε να κατακτήσει την παγκόσμια οινική σκηνή και μαζί με το Ξινόμαυρο μεταμόρφωσαν τελείως την αγορά του ελληνικού οίνου, ταυτίζοντάς την με γηγενείς ποικιλίες και σύγχρονες ετικέτες που μπορούν να εκφράσουν το οικοσύστημα που τις φιλοξενεί με τον πιο γοητευτικό τρόπο και ταυτόχρονα, να αξιώνουν τη θέση τους στις σημαντικότερες λίστες οίνων του κόσμου.



Εικόνα 35. Μόρφωση πρέμων (αμπελιές) στη Σαντορίνη στο παραδοσιακό καλάθι.

2.1.4 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η καλλιέργεια της γηγενούς αυτής ποικιλίας θεωρείται μοναδική, παραδοσιακή και αυθεντική. Κέντρο καλλιέργειας αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, η θηραϊκή γη, στην οποία σήμερα συγκεντρώνεται το 80 % των καλλιεργούμενων εκτάσεων στην Ελλάδα (καλλιεργείται σε έκταση περίπου 25.000 στρεμμάτων σχεδόν σε όλη την επικράτεια) (Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007). Σήμερα, οι αμπελώνες του Ασύρτικου στους οποίους απαντώνται διάφοροι βιότυποι (Ασύρτικα αρσενικά κ.ά) (Σταυρακάκης 2015, Stavrakakis et al.1997), συγκεντρώνονται κυρίως στο νότιο και νοτιοδυτικό τμήμα του νησιού σε εδάφη ηφαιστειακής προέλευσης, αμμώδους σύστασης με μηδενική σχεδόν υδατοχωρητικότητα και οργανική ύλη (Σπινθηροπούλου, 2009). Το ηφαίστειο, το οποίο αν και ανενεργό έχει επηρεάσει καταλυτικά το έδαφος και το κλίμα του νησιού. Η σύνθεση του εδάφους και η τοπολογία βοηθούν το κλήμα να αναπνέει καθ' όλη τη διάρκεια της μέρας. Το πρωί απορροφά την ζέστη με αποτέλεσμα την φυσιολογική ανάπτυξη της ράγας και το βράδυ την απωθεί διατηρώντας το μέγεθος και την υγρασία που χρειάζεται για να αναπτυχθεί. Παρόλο που το φυτό αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες, η οξύτητα του είναι το πιο έντονο χαρακτηριστικό του, γεγονός που κατατάσσει το Ασύρτικο στις σπουδαιότερες ελληνικές ποικιλίες ακόμη και για παλαιώση. Τα ηφαιστιογενή, χαλκώδη, ξηροθερμικά εδάφη με τους διάσπαρτους τόφους, τις υψηλές θερμοκρασίες, τους ισχυρούς ανέμους, τις ελάχιστες βροχοπτώσεις, αλλά και την αυξημένη ατμοσφαιρική υγρασία που μεταφέρουν τα καλοκαιρινά μελέμια, αφενός μεν επέβαλλαν την ανάπτυξη μιας ιδιαίτερης χαρακτηριστικής αμπελοκομικής τεχνικής όσον αφορά τη μόρφωση και το κλάδεμα καρποφορίας των αυτόρριζων, κατά κανόνα, πρέμων με πολύ χαμηλό κορμό διαμορφώνοντας το ιδιότυπο κυπελοειδές σχήμα κουλούρας, το παραδοσιακό καλάθι, για την προστασία των αμπελιών από τους ανέμους, αλλά και από την ισχυρή ηλιακή ακτινοβολία, αφετέρου δε αποτέλεσαν το ιδανικό περιβάλλον για την ανάδειξη των εξαιρετικών χαρακτήρων ποιότητας της ποικιλίας. Το τύλιγμα των πρέμων σε συνδυασμό με την υγρασία εξασφαλίζουν την απαραίτητη ποσότητα νερού, χωρίς να υπάρχει ιδιαίτερη ανάγκη ποτίσματος κατά τους θερινούς μήνες

Η πολυδύναμη αυτή ποικιλία του ελληνικού αμπελώνα (ανερχόμενη παγκοσμίως) καλλιεργείται κυρίως στις Κυκλάδες, αλλά εξαπλώθηκε σε όλη την υπόλοιπη Ελλάδα, όπου το κλήμα μορφώνεται σε αμφίπλευρο γραμμοειδές Royat, και έγινε, από άποψη ποιότητας, μία από τις πιο σημαντικές ελληνικές ποικιλίες, λόγω της ανθεκτικότητας, της δυνατότητας προσαρμογής της σε διάφορα οικολογικά περιβάλλοντα, της φήμης και της δυναμικής της.

Ανήκει στην ομάδα εκείνη των εκλεκτών ποικιλιών που εκφράζει και εκφράζεται με μοναδικό τρόπο στις συγκεκριμένες εδαφοκλιματικές συνθήκες της Σαντορίνης, έναν από τους πιο ενδιαφέροντες αμπελότοπους (terroir) του παγκόσμιου αμπελώνα. Βέβαια, δίνει εξαιρετικά αποτελέσματα τόσο στη νησιωτική, όσο και στην ηπειρωτική Ελλάδα. Η ποικιλία είναι άριστα προσαρμοσμένη, από την αρχαιότητα, στο ηφαιστειογενές έδαφος του νησιού και ιδιαίτερα ξηροθερμικό περιβάλλον του (Κουράκου-Δραγώνα, 2015), ενώ λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος που προκαλεί, πολλοί αμπελοουργοί προσπάθησαν να το καλλιεργήσουν και σε άλλα είδη εδαφών με διαφορετικά χαρακτηριστικά και κλιματολογικές συνθήκες σε όλη την Ελλάδα, αλλά και στο εξωτερικό. Παρουσιάζει μεγάλη προσαρμοστικότητα στα διάφορα εδαφοκλιματικά περιβάλλοντα της Ελλάδας. Συγκεκριμένα, πολύ αξιόλογα εγχώρια δείγματα ασύρτικου συναντώνται από την Βόρεια Ελλάδα και την Μακεδονία, αλλά και σε πολλά κυκλαδίτικα νησιά. Φαίνεται, όμως, ότι το βέλτιστο της ποιότητας των οίνων επιτυγχάνεται στο συγκεκριμένο, ιδιόμορφο εδαφοκλιματικό περιβάλλον του νησιού της Θήρας.

Η καλλιέργεια συνίσταται για τα αμπελοουργικά διαμερίσματα της Δωδεκανήσου, των Κυκλάδων, της Θεσσαλίας (Τύρναβος), της Θράκης, της Μακεδονίας (Θεσσαλονίκη και Χαλκιδική), της Δράμας (στις πλαγιές του Μελιτώνα, στην Επανομή), της Πελοποννήσου (ξεχωρίζει η περιοχή της Νεμέας), της Στερεάς Ελλάδας (Αττική, Βοιωτία), και επιτρέπεται για τους νομούς Λασιθίου (Κρήτη), Χίου, Λέσβου, Ικαρίας (νησιά Βορείου Αιγαίου), καθώς και σποραδικά σε μικρές εκτάσεις σε άλλες περιοχές της Ελλάδας, σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία.

Στο εξωτερικό, εκτός από κάποιες πειραματικές προσεγγίσεις σε διάφορες χώρες, το μεγαλύτερο επίτευγμα έχει αναφερθεί στην Αυστραλία, όπου ήδη έχει φυτευτεί ο πρώτος αμπελώνας (Jim Barry Wines) με την ποικιλία Ασύρτικο (Λέλεκας, Οινόχοος 10/2010). Είναι πρώτη φορά στην ιστορία του ελληνικού οίνου που μια ελληνική ποικιλία φυτεύθηκε, καλλιεργήθηκε, οινοποιήθηκε, εμφιαλώθηκε και διατέθηκε εμπορικά εκτός συνόρων. Η επιλογή για καλλιέργεια στην Αυστραλία, πραγματοποιήθηκε λόγω της αντοχής του στα θερμά κλίματα και για τη «φρέσκια», «καθαρή», με οξύτητα γεύση του, καθώς και το χαμηλό pH και την υφή του.

Ένα από τα μοναδικά χαρακτηριστικά του Ασύρτικου είναι ότι δεν μειώνεται η οξύτητα του ακόμα και αν τα σταφύλια του φτάσουν σε υψηλή ωρίμανση με κατά συνέπεια την υψηλή συγκέντρωση σακχάρων. Στην Ηπειρωτική Ελλάδα, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη κατά τη διάρκεια του χειμώνα, η βροχόπτωση είναι υψηλότερη, ενώ το καλοκαίρι έχει ηπιότερους ανέμους, η παραγωγή είναι μεγαλύτερη και ενώ μπορεί να δίνει οίνους με λιγότερο σώμα έχει παράλληλα πιο φρουτώδη αρώματα. Η δυναμική και ο ιδιαίτερος χαρακτήρας της ποικιλίας αυτής ενθουσιάζει τους γευστιγνώστες σε ολόκληρο τον κόσμο. Οι Έλληνες οινοπαραγωγοί πρέπει να είναι υπερήφανοι καθώς οινολόγοι ερευνητές από όλο τον κόσμο έχουν ενδιαφερθεί και ξεχωρίσει το νησί της Σαντορίνης με την μοναδική αυτή ποικιλία σε επίπεδο να συζητείται η συγκαταλόγη της στον κατάλογο των ιστορικών μνημείων της Unesco.

2.1.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ – ΤΥΠΟΙ ΟΙΝΩΝ

Οι οίνοι, οι οποίοι προέρχονται από τη συγκεκριμένη ποικιλία χαρακτηρίζονται ως οίνοι Ονομασίας Προελεύσεως Ανωτέρας Ποιότητας (Ο.Π.Α.Π) (Σταυρακάκης, 2010).

Το Ασύρτικο κυριαρχεί στον οίνο ΠΟΠ Σαντορίνη και οδηγεί σε πολύ πυκνά λευκά κρασιά, με λεπτότητα και ορυκτώδη χαρακτήρα. Ωστόσο, έχει φυτευθεί στις περισσότερες ελληνικές αμπελουργικές περιοχές, από άλλα νησιά του Αιγαίου πελάγους, έως τη Μακεδονία (ΠΟΠ Πλαγιές Μελίτωνα), την κεντρική Ελλάδα και την Πελοπόννησο. Σε αυτές τις περιοχές, το Ασύρτικο διατηρεί το φρέσκο και ορυκτώδη χαρακτήρα του, αλλά παρουσιάζει εντονότερα πρωτογενή αρώματα φρούτων και λιγότερο πυκνή δομή.

Η ποικιλία μόνη της ή σε συνδιασμό με μικρές ποσότητες των ποικιλιών Αθήρι και Αηδάνι δίνει τους ξηρούς και γλυκούς οίνους ΟΠΑΠ "Σαντορίνη". Από την ίδια ποικιλιακή σύνθεση, με βασική ποικιλία το Ασύρτικο, παράγεται και ο φημισμένος, γλυκός οίνος από υπερώριμα, λιαστά σταφύλια (λιαστός και Vin de liqueur) με την επωνυμία Vinsanto (ΦΕΚ 179/B/19-02-2002) αναγνωρισμένη με κανονισμό της Ε.Ε ως Ονομασία Προελεύσεως συνώνυμη της ΟΠΑΠ "Σαντορίνη".

Σε συνδιασμό με τις ποικιλίες Μονεμβασιά (τουλάχιστον στο 51%) και Κυδωνίτσα υπεισέρχεται στην ποικιλιακή σύνθεση του οίνου Προστατευόμενης Ονομασίας Προελεύσεως "Μονεμβασιά - Malvasia". Το Vinsanto και ο οίνος ΠΟΠ Μονεμβασιά-Malvasia είναι πλούσια, πολύπλοκα και έντονα κρασιά.

Το Ασύρτικο συναντάται σε χαρμάνια με άλλες ποικιλίες, όπου ο ρόλος του είναι να προσθέσει δομή, να συνεισφέρει στην αρωματική σύνθεση και να ενισχύσει τα επίπεδα οξύτητας του χαρμανιού. Στα πιο διαδεδομένα και εμπορικότερα χαρμάνια είναι η συνύπαρξη του με το Sauvignon Blanc και τη Μαλαγουζιά. Η ποικιλία συμμετέχει σε μεγάλο αριθμό τοπικών οίνων της Θήρας, αναλυτικότερα: ΠΟΠ Σαντορίνη (Ασύρτικο), ΠΟΠ Σαντορίνη «Νυχτέρι» (συναινοποίηση Ασύρτικο, Αθήρι, Αηδάνι), ο «πάσσο» της αρχαιότητας προέρχεται από την συναινοποίηση γλεύκους ποικιλιών (συνδυασμός Ασύρτικο 75% και Αηδάνι 25% και έκθεση στον ήλιο 10 ημέρες περίπου). Επιπλέον, δίνει το λευκό ξηρό οίνο Ονομασίας Προέλευσης Ανωτέρας Ποιότητας "Πλαγιές Μελίτωνα", όπου συμμετέχει σε συναινοποίηση με τις ποικιλίες Ροδίτη και Αθήρι.

Συμμετέχει στην παραγωγή πλέον των 20 λευκών ξηρών Τοπικών οίνων όπως "Αγιορείτικος", "Αναβύσσου", "Αττικός", "Δράμας", "Δωδεκανησιακός", "Επανομής", "Παγγαίου", "Παιανίτικος", "Θηβαϊκός", "Πλαγιές Βερτίσκου", "Κορινθιακός", "Χαλκιδικής", Συριανός", "Κυκλάδων", "Κώς", ΠΟΠ Πάρος, ΠΟΠ Ρόδος κ.ά.

Από το Ασύρτικο παράγονται ακόμη ημίγλυκοι οίνοι. Επομένως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώριμο ή και υπερώριμο, για λιαστό γλυκό, ημίγλυκο αλλά και ξηρό οίνο. Είναι ιδιαίτερα αρωματικό και εν γένει εμφανώς προσοντούχο.

Άξιο αναφοράς είναι πως όλο και περισσότεροι παραγωγοί πειραματίζονται με την ποικιλία και παράγουν ακόμη και ρετσίνα υψηλής ποιότητας από την ποικιλία του ασύρτικου. Σημαντικοί Έλληνες παραγωγοί: Σαντορίνη: Χατζηδάκης, Σιγάλας, Καραμολέγκος, Αργυρός, Κτήμα Γαία, Βενετσάνος, Μπουτάρης, Γαβαλάς, Συνεταιρισμός Σαντορίνης.

2.2 ΕΠΙΛΕΚΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ

Ο όρος ζύμη είναι όρος της βιοτεχνολογίας και χαρακτηρίζει μια ανοιμοιογενή ομάδα μικροοργανισμών. Από πλευράς βοτανικής, όλες οι ζυμομύκητες είναι μικρομύκητες, δηλαδή παρουσιάζουν μυκήλιο περιορισμένο ή ανύπαρκτο και ο θαλλός είναι ανύπαρκτος ή όλων των διαβαθμίσεων, επιπλέον, πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλαστήσεις και μόνο ορισμένα γένη με κυτταρική διαίρεση. Τις πρώτες παρατηρήσεις επί των ζυμών, τις οποίες ονόμασε ζώρια (animalcules), ανακοίνωσε ο ερασιτέχνης μικροβιολόγος Antony Leeuwenhoek, στη Βασιλική Εταιρεία του Λονδίνου, το 1680. Λόγω της ειδικής σημασίας που έχουν οι ζύμες για τον άνθρωπο, τα τελευταία χρόνια έχει διαμορφωθεί ειδικός κλάδος επιστήμης με αντικείμενο τη μελέτη τους, η Ζυμολογία. Αναλυτικότερα, οι τυπικές ζύμες συγκεντρώνουν τις κύριες ιδιότητες των ανωτέρων μυκήτων, αλλά και των βακτηρίων και ως τέτοιοι μικροοργανισμοί: πολλαπλασιάζονται γρήγορα, αναπτύσσονται εύκολα σε κοινά θρεπτικά υποστρώματα, έχουν διακριτό πυρήνα, είναι δεκαπλασίων διαστάσεων από τα τυπικά βακτήρια και εμφανίζουν έντονη μεταβολιστική δραστηριότητα. Οι τυπικές ή ευγενείς ζύμες έχουν την ικανότητα να διασπούν τα απλά σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη κ.ά.) προς διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη με έκλυση μικρών ποσοτήτων θερμότητας. Για όλους τους ανωτέρω λόγους, έχουν βρει ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές.

Σύμφωνα με τη μονοφυλετική προέλευσή των ζυμών από τους Φυκομύκητες, οι ζύμες συμπεριλαμβάνουν τις ακόλουθες πέντε τάξεις των μυκήτων: Dipodascales, Taphrinales, Saccharomycetales, Cryptococcales, Sporobolomycetales. Οι τρεις πρώτες τάξεις είναι όλοι Ημιασκομύκητες, η τέταρτη τάξη ανήκει στους Δευτερομύκητες και έχει συμπεριλάβει όλες τις ασποριογόνες (πολλαπλασιάζονται μόνο αγενώς) και η Πέμπτη ανήκει στους Βασιδιομύκητες. Οι επίλεκτες ζύμες παράγονται με υβριδισμό, κλωνικές επιλογές, γενετικές βελτιώσεις με χρήση ομοθαλικών και ετεροθαλικών στελεχών, με τη μίξη σφαιροπλαστών, με εμταλλακτικές διαδικασίες κ.ά.. Αυτές οι ζύμες χρησιμοποιούνται στην κατευθυνόμενη ζύμωση του οινογλεύκου και προέρχονται από το χώρο του είδους *Saccharomyces cerevisiae* και τις φυσιολογικές του φυλές με κύρια χαρακτηριστικά την υψηλή ζυμωτική ενεργότητα (αντοχή στην αλκοόλη), την αυξημένη αντοχή στο θειώδες οξύ, την ανύπαρκτη παραγωγή αφρού ή τη δυνατότητα αφρογένεσης, τη μειωμένη παραγωγή δευτερευόντων προϊόντων κατά τη ζύμωση κ.ά. (Μπαλατσαούρας, 2006)

Παραδοσιακά η ζύμωση του οίνου πραγματοποιείται με αυθόρμητο τρόπο, από γηγενείς ζύμες που υπάρχουν στα σταφύλια όταν συγκομίζονται ή εισάγονται παθητικά από επιφάνειες επαφής κατά τη διάρκεια του διαδικασίας οινοποίησης. Πολλές ποιοτικές μελέτες έχουν δείξει τη διαδοχική εξέλιξη ειδών ζύμης κατά τη διάρκεια αυθόρμητων ζυμώσεων οίνου. **Είναι γνωστό ότι τα πρώτα στάδια χαρακτηρίζονται από ανάπτυξη non-Saccharomyces, κυρίως ζυμομύκητες** (Beltran et al., 2002, 2016, Fleet, 2003, Fleet & Heard, 1993, Fugelsang & Edwards, 2007) γι' αυτό και στα οινοποιεία το γλεύκος εμβολιάζεται αρχικά με τον σακχαρομύκητα που θα δώσει τα επιθυμητά και επαναλήψιμα αποτελέσματα στον εκάστοτε οίνο.

Η ποικιλομορφία του πληθυσμού ζύμης στα γλεύκη σταφυλιών, η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών ζυμών (είδη και στελέχη), οι συγκεντρώσεις εμβολίου *S. cerevisiae*, η θρεπτική σύνθεση του γλεύκου καθώς και οι συνθήκες επεξεργασίας (προσθήκη διοξειδίου του θείου, περιεκτικότητα σε οξυγόνο και θερμοκρασία ζύμωσης) επηρεάζει επίσης την ανάπτυξη non-Saccharomyces κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (Fleet, 2003, Hansen, Nissen, Sommer, Nielsen, & Arneborg, 2001, Jolly et al., 2006, Nissen & Arneborg, 2003, Nissen, Nielsen, & Arneborg, 2003, Pérez-Nevado, Albergaria, Hogg, & Gírio, 2006, Zott et al., 2008).

Η συμβολή των non-Saccharomyces σε λιπαρά οξέα και ενώσεις βαρέων θειών σύνθεσης οίνων, που σχηματίζονται κυρίως κατά την αλκοολική ζύμωση, μπορεί να συμβάλει αρνητικά στο άρωμα του οίνου. Λόγω των επιπτώσεών τους στο οργανοληπτικό προφίλ οίνων, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί πώς η ανάπτυξη των ζυμομυκητικών επηρεάζει τη σύνθεση του οίνου. Τα λιπαρά οξέα παράγονται από ζύμες ως ενδιάμεσα στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, σημαντικά συστατικά της μεμβράνης της ζύμης (Lambrechts & Pretorius, 2000). Όταν ανιχνεύονται παραπάνω από ορισμένες συγκεντρώσεις, λιπαρά οξέα έως μεσαίας αλυσίδας μπορούν να δρουν ως αναστολές της ανάπτυξης και επιβίωσης του *S. cerevisiae*, προκαλώντας κολλήσεις στις ζυμώσεις (Fleet & Heard, 1993). Η παραγωγή αυτών των οξέων ποικίλλει σημαντικά με τα είδη και τα στελέχη ζύμης και μπορεί να επηρεάσει τη διαδοχική ανάπτυξη των ζυμομυκήτων κατά τη ζύμωση (Fleet, 2003).

Για αρκετό καιρό ο τομέας του οίνου αναζητά τρόπους παραγωγής οίνου με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ. Μια προφανής προσέγγιση είναι η χρήση στελεχών ζύμης που δεν είναι αποτελεσματικά στη μετατροπή των σακχάρων του γλεύκους σε αιθανόλη. Μετά όμως από μελέτες, διαπιστώθηκε ότι οι ζυμομύκητες του εμπορίου, εμφανίζουν τις ίδιες αποδόσεις σε αιθανόλη. Για το λόγο αυτό η έρευνα στάθηκε στον εμβολιασμό γλεύκους με δύο ζύμες, μία άγρια και ένα σακχαρομύκητα. Έγινε διερεύνηση της δυναμικής του πληθυσμού άγριων ζυμών με ενθαρρυντικά αποτελέσματα που έδειξαν ότι με τη χρήση διαδοχικού εμβολιασμού γλεύκους και με *Saccharomyces* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μπορούν να παραχθούν οίνοι μειωμένης περιεκτικότητας σε αλκοόλ με νέο, ενισχυμένο άρωμα και γεύση. Προς αυτή την κατεύθυνση στάθηκε και η παρούσα ερευνητική εργασία. Για την κάλυψη της ανερχόμενης τάσης στον τομέα της παραγωγής οίνου, των νέων οινικών προϊόντων με τις επιθυμητές ιδιότητες ως προς τη ζήτηση αγοράς, επιλέχθηκαν προς μελέτη, οι τρεις κάτωθι άγριες ζύμες. Άγριες καλούνται οι ζύμες που μπορούν να προκαλέσουν την έναρξη της ζύμωσης του γλεύκους, αλλά δεν είναι επαρκώς ανθεκτικές στην αιθανόλη για να ολοκληρώσουν τη ζύμωση, όπως έχει προαναφερθεί, και συνήθως βρίσκονται στη ράγα των σταφυλιών.

2.2.1 METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA

Φυλή: Cryptococcoideae, υποφυλή: Candida

Σύμφωνα με το πρόγραμμα ταξινόμησης NCBI, η οικογένεια Metschnikowiaceae περιλαμβάνει επί του παρόντος πέντε διαφορετικά γένη, *Aciculoconidium*, *Clavispora*, *Kodamaea*, *Metschnikowia* και *Nectaromyces*. Το γένος *Metschnikowia* περιέχει 81 διαφορετικά είδη, τα οποία σχηματίζουν μια μονοφυτική ομάδα στο *Metschnikowiaceae*, το οποίο περιλαμβάνει επίσης το μικρότερο γένος *Clavispora* και μερικές ομάδες ειδών *Candida*. (Brysch-Herzberg et al. 2015, Belda et al. 2016, Gutierrez et al. 2017). Με τα χρόνια, ο ζυμομύκητας *M. pulcherrima* έγινε γνωστός με πολλά διαφορετικά ονόματα λόγω αλλαγών στην ταξινόμησή του με βάση τις κλασικές μεθόδους ταξινόμησης ζύμης (*Asporomyces uvae*, *Candida pulcherrima*, *Castellania castellanii*, *Cryptococcus castellanii*, *Eutorula pulcherrima*, *Monilia castellanii*, *Rhodotorula pulcherrima*, *Saccharomyces pulcherrimus*, *Torula pulcherrima*, *Torulopsis pulcherrima*, *Torulopsis burgeffiana*, *Torulopsis dattila* κ.λπ.) (Kurtzman et al. 2011). Τα περισσότερα είδη *Metschnikowia* δεν είναι οικολογικά διαδεδομένα, αλλά παρουσιάζουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης.

Οικολογικά χαρακτηριστικά και ρόλος στον οίνο. Πρόκειται για ένα είδος ζύμης **non-Saccharomyces**, με πολλά στελέχη, που ανήκουν στην οικογένεια *Metschnikowiaceae*. Τα στελέχη του *M. pulcherrima* φαίνεται να σχετίζονται κυρίως με έντομα των φρούτων. Απαντάται πολύ συχνά στη φύση, καθώς εμφανίζεται σε βιότοπους, ειδικά σε φρούτα, όπως σταφύλια, κεράσια, λουλούδια, νέκταρ, φρούτα σε σήψη και συνεπώς μεταφέρεται από έντομα, επίσης, μπορεί να παραμείνει στον εξοπλισμό των οινοποιείων και να οδηγήσει σε επακόλουθους εμβολιασμούς, εάν ο εξοπλισμός δεν έχει απολυμανθεί σωστά. Σε περιβάλλον που σχετίζεται με τον οίνο (οινοποιεία, αμπελώνες) έχουν αναφερθεί τα είδη *M. pulcherrima*, *M. fructicola* και *M. viticola* (Vicente et al. 2020)

Ο μικροοργανισμός *Metschnikowia pulcherrima* ανήκει στις λεγόμενες «άγριες ζύμες», τις ζύμες που απομονώνονται από τους φλοιούς των σταφυλιών και ευθύνονται για περιπτώσεις αυθόρμητων ζυμώσεων. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός αυτός, έχει χαρακτηριστεί από την ικανότητά του να σκοτώνει κάποιους άλλους μικροοργανισμούς ανεπιθύμητους στη διαδικασία παραγωγής οίνου, όπως είναι οι μικροοργανισμοί *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* και *Alternaria alternata* (Saravanakumar et al., 2008). Η χρωστική *pulcherrimin* παρέχει στον ζυμομύκητα αυτό κάποια ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων *non-Saccharomyces* καθώς και ορισμένες αντιμυκητιακές ιδιότητες, που λειτουργεί ως παράγοντας βιοελέγχου, περιορίζοντας τον ανταγωνισμό της με άλλες ζύμες στο μέσο ζύμωσης. Διαθέτει αναπνευστικό μεταβολισμό που μπορεί να βοηθήσει στη μείωση των επιπέδων της αιθανόλης σε αερόβιες συνθήκες ζύμωσης. Το στέλεχος *Metschnikowia pulcherrima* παρουσίασε, ανάμεσα σε άλλους *non-Saccharomyces*, τη **χαμηλότερη απόδοση στην παραγωγή αιθανόλης και στην κατανάλωση των σακχάρων του γλεύκους**, γεγονός που παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς ο μικροοργανισμός αυτός ανήκει στις αποκαλούμενες «άγριες ζύμες», δηλαδή εκείνες που ευθύνονται για την αυθόρμητη έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης στα γλεύκη (Fernández, et al., 2000). Έχει αποδειχθεί πως είναι από τις πιο σημαντικές άγριες ζύμες με ενδιαφέρον στην παραγωγή οίνου, καθώς συμμετέχει σε αρκετές περιπτώσεις στις **αυθόρμητες ζυμώσεις** (Goold et al. 2017) Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί ιστορικά στη βιομηχανία οίνου της **Νότιας Αφρικής**. (Augustyn et al. 1982, Du Plessis et al. 2019, Lambrechts et al. 2008, Laurie et al. 1985, Marais et al. 1983, Nieuwoudt et al. 2002)

Μορφολογία. Το κύτταρο αναπαράγεται με εκβλάστηση, έχοντας σχήμα ωοειδές έως ελλειψοειδές. Οι ψευδοϋφές μπορούν να σχηματιστούν υπό αναερόβιες συνθήκες. Ο διπλός ρόλος των κυττάρων της άγριας αυτής ζύμης, που λειτουργούν και ως μητρικοί ασκοί, είναι μοναδικός μεταξύ των ζυμών. Το κύριο χαρακτηριστικό, βάσει της οπτικής μικροσκοπίας, αυτού του ζυμομύκητα αποτελούν τα μεγάλα μεγέθους σφαιρικά κύτταρα με παχιά τοιχώματα και σταγόνα ελαίου υψηλού δείκτη διάθλασης στο κέντρο. Μελετάται στο Πανεπιστήμιο του Bath ως πιθανή εναλλακτική λύση για τη χρήση φοινικέλαιου και τα πρώιμα αποτελέσματα είναι πολλά υποσχόμενα.

Φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Το υπόστρωμα ανάπτυξης είναι κυρίως γλυκόζη και αλλά και φρουκτόζη και μεταβλητά η Γαλακτόζη. Αφομοιώνει Γαλακτόζη, Σουκρόζη, Μαλτόζη, Μελεξιτόζη, Κυτταροβιόζη, Τρεχαλόζη, D-Ξυλόζη, Ριβιτόλη, Μανιτόλη, Σουκινικό, Γλυκοτόλη, Μαννιτόλη, ενίοτε Σορβόζη, Σαλικίνη, Αρμπουτίνη, Κιτρικό, Σουκινικό, Αιθανόλη, δεν πραγματοποιείται αφομοίωση νιτρικών ή νιτρωδών. Το Cadaverine χρησιμοποιείται ως μοναδική πηγή N. μεταβλητή χρήση αιθυλαμίνης, λυσίνης, τρυπτοφάνης ως μοναδικής πηγής

Ευαισθησίες στελέχους

Καμία ανάπτυξη σε μέσο χωρίς βιταμίνες, **απαιτεί βιοτίνη.**

Ευαισθησίες ανάπτυξης σε **10% NaCl, αυξάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, δεν είναι ανθεκτικό στο κυκλοξιμίδιο.**

SO₂ (διοξείδιο του θείου-θειώδης ανυδρίτης): Αναστέλλει την ανάπτυξη ζύμης, αλλά οι μοριακές υπογραφές των ζυμομυκήτων που δεν είναι *Saccharomyces* μπορούν να παραμείνουν σε ζυμώσεις οίνου που υποβάλλονται σε επεξεργασία με SO₂ πολύ καιρό, αφού αυτοί οι πληθυσμοί γίνουν μη καλλιεργήσιμοι (Cocolin, 2003) Η ευαισθησία που παρουσιάζει είναι χαμηλότερη από εκείνη που παρατηρείται στα στελέχη *S.cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii* ή *S. pombe*, αλλά εμφανίζει μέση αντίσταση σε σύγκριση με άλλα είδη μη *Saccharomyces*. (Ruizl et al.2018)

DMDC (διττανθρακικό διμεθύλιο). Καθυστερεί την ανάπτυξη στελεχών *M. pulcherrima* για 12 ώρες κατά τη ζύμωση του γλεύκους, αλλά δεν αναστέλλεται, παρά μόνο με την προσθήκη 400 mg/L DMDC. Η ολική αναστολή του μικροβιακού πληθυσμού μπορεί να επιτευχθεί με 500 mg/L DMDC (μεγαλύτερη αντοχή από το σακχαρομύκητα *cerevisiae*). Είναι πιο αποτελεσματικό σε θερμοκρασίες κάτω από 30 °C.

Έχει παρατηρηθεί επίσης κάποια ευαισθησία σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες, όπως η **καρβακρόλη και η θυμόλη.**

pH: Η ζύμη μπορεί να ανεχθεί χαμηλά pH, αλλά το pH άνω του 7 είναι ανασταλτικό και το pH άνω του 3,6 επιτρέπει ανταγωνισμό από βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς.

Οξέα: Δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στα οργανικά οξέα.

Αιθανόλη: Η ζύμη παρουσιάζει αντοχή στην αιθανόλη έως ότου το μέσο φτάσει σε συγκέντρωση 5%, τότε αρχίζει να πεθαίνει ο πληθυσμός και ο *Saccharomyces* αναλαμβάνει τη ζύμωση.

Αναερόβια ζύμωση: Το οξυγόνο απαιτείται για το μεταβολισμό της ζύμης, επομένως **η έλλειψη οξυγόνου (αναερόβια ζύμωση) είναι ανασταλτική.**

Θερμοκρασία: Η μέγιστη θερμοκρασία για ανάπτυξη είναι περίπου 39 °C. Το ανώτατο όριο θερμοκρασίας για σπορίωση του *Metschnikowia pulcherrima* βρίσκεται κάτω από 25 °C σε όλα, εκτός από τα πιο ευνοϊκά μέσα.

Τεχνολογικά χαρακτηριστικά

Ζυμωτική ισχύς

Η **ζυμωτική ισχύς** του μικροοργανισμού αυτού είναι χαμηλή, χαμηλότερη από εκείνη που παρατηρείται για άλλα είδη *non-Saccharomyces*, με πολλά στελέχη να φτάνουν στο 4% (v/v) σε αιθανόλη, αν και σε προγενέστερες μελέτες έχει παρατηρηθεί παραγωγή αιθανόλης έως 6-7% (v/v). Αυτό το χαρακτηριστικό, μαζί με το γεγονός ότι η παρουσία της άγριας αυτής ζύμης σε φρέσκο αζύμωτο γλεύκος υπολογίζεται περίπου στο 19-39% των συνολικών γηγενών ζυμών του, καθιστά απαραίτητη τη διαδοχική ή μικτή χρήση της ως εμβόλιο (κατάλληλο συνδυασμό ζυμών, αναλογία εμβολίου και χρόνος διεκπαιρέωσης) με άλλες ζύμες μεγαλύτερης ζυμωτικής ισχύς όπως, ο σακχαρομύκητας, *Saccharomyces cerevisiae* με τον οποίο έχει καλή συμβατότητα (ή εναλλακτικά τον *Schizosaccharomyces pombe*), ώστε να καταφέρει να ολοκληρωθεί η ζύμωση των σακχάρων μέχρι ξηρότητας, παράγοντας χαμηλή έως μέτρια παγκόσμια πτητική οξύτητα. Η πτητική οξύτητα της ζύμης σε μονοκαλλιέργεια είναι επίσης μέτρια, κυμαινόμενη από 0,3 έως 0,4 g / L εκφραζόμενη σε οξικό οξύ. Επιπλέον, ορισμένα στελέχη είναι σε θέση να μειώσουν το σχηματισμό H₂S κατά τη ζύμωση. Υπό συνθήκες στρες, όπως έλλειψη αζώτου, η αναγνώρισή της ζύμης με τη βοήθεια της οπτικής μικροσκοπίας καθίσταται εύκολη χάρη στην εμφάνιση ενός σφαιριδίου λίπους μέσα στο κύτταρο της στην αρχή της σπορίωσης. Στην σποριώδη μορφή του, ο ασκός του *Metschnikowia* είναι μακρύς και κλειστός και περιέχει ένα έως δύο σπόρια.

Η παραγωγή CO₂ κατά τη ζύμωση του απέδωσε χαμηλότερες ποσότητες από ότι ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* (4,5 g/100 mL έναντι 12,9 g/100 ml). Η *Μρ* έχει ενδιάμεση παραγωγή ακετοΐνης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης σε σχέση με άλλα είδη, όπως ο *S. cerevisiae* και *B. bruxellensis* με χαμηλή παραγωγή ακετοΐνης και *C. stellata* και *K. apiculata* με την υψηλότερη παραγωγή ακετοΐνης. (Morata et al.2019).

Ενζυματικές δραστηριότητες.

Το στέλεχος *Metschnikowia pulcherrima* έχει μελετηθεί αρκετά ως προς τη δραστικότητα των ενζύμων που διαθέτει και ευνοούν την ποιότητα του οίνου (Fernandez et al., 2000). Οι πρωτεάσες οξέων που εκκρίνονται από *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima* και *Torulasporea magnolia* βρέθηκαν να είναι αποτελεσματικές στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών οίνου τόσο σε διαλύματα οίνου όσο και σε μοντέλα διαλύματος (Lagace, 1990). Εμφανίζει υψηλή εξωκυτταρική ενζυματική ικανότητα απελευθερώνοντας αρωματικές πρόδρομες ενώσεις από το σταφύλι να ρυθμίζοντας έτσι τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών της ζύμωσης προκειμένου να βελτιώσει την οργανοληπτική εικόνα του οίνου. Ευνοεί τις ενζυματικές δραστηριότητες των πηκτινάση, πρωτεάση, γλυκανάση, λειχανάση, β-γλυκοσιδάση, κυτταρινάση, ξυλανάση, αμυλάση, θειική αναγωγάση, λιπάση και β-λυάση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η *Metschnikowia pulcherrima* ένα από τα είδη ζυμομυκήτων non-Saccharomyces που μπορεί να εκφράσει περισσότερα εξωκυτταρικά υδρολυτικά ένζυμα. Η υψηλή πρωτεολυτική του δράση καθιστά τον μικροοργανισμό ως έναν πολύ ενδιαφέροντα συνεργάτη ζύμωσης για το *S.cerevisiae*, καθώς τα αμινοξέα που απελευθερώνονται (συμπεριλαμβανομένων εκείνων από την αυτόλυση) μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγή θρεπτικών ουσιών για τον *S.cerevisiae*. Επιπλέον, η έντονη δραστικότητα της γλυκοσιδάσης, υψηλότερη υπό αερόβιες συνθήκες, προάγει την απελευθέρωση αρωματικών ποικιλιών από το σταφύλι με υδρόλυση δεσμευμένων μονοτερπενίων. Η ένταση της ενζυματικής δραστηριότητας εξαρτάται όχι μόνο από το είδος, αλλά και από το στέλεχος (Morata et al.2019).

Πολυσακχαρίτες και μαννοπρωτεΐνες

Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι τα περισσότερα στέλεχη *M. pulcherrima* απελευθερώνουν περισσότερους πολυσακχαρίτες από τους οίνους-μάρτυρες με *S. cerevisiae* κατά τη διάρκεια μονοκαλλιέργειών και με τα δύο είδη (Comitini et al.2011). Το στέλεχος *M. pulcherrima* που έδωσε την καλύτερη απελευθέρωση 17% περισσότερους πολυσακχαρίτες από τον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*. Παρατηρήθηκε παρόμοιο αποτέλεσμα για μικτές ζυμώσεις μεταξύ *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae*. Η τελική συγκέντρωση πολυσακχαρίτη αυξήθηκε όταν το εμβόλιο *M. pulcherrima* ήταν υψηλότερο. Οι αυξήσεις κυμαίνονταν από 20 έως 50% ανάλογα με την αναλογία αρχικού εμβολίου *M. pulcherrima*. Άλλες μελέτες αναφέρουν *M. pulcherrima* για την απελευθέρωση υψηλότερων ποσοτήτων μαννοπρωτεϊνών από δύο οίνους μάρτυρες με διαφορετικούς σακχαρομύκητες *S. cerevisiae* στο 50 και 90%. Ωστόσο, ένα άλλο στέλεχος *S. cerevisiae* απελευθέρωσε 37% περισσότερες μαννοπρωτεΐνες από το επιλεγμένο στέλεχος *M. pulcherrima* (Belda et al.2016b). 90% των στελεχών του είδους *Metschnikowia* παράγουν πρωτεάση και πηκτινάση (Belda et al.2016a). Ωστόσο, στην περίπτωση του *M. pulcherrima* ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι δεν είναι πρωτεολυτικές (Comitini et al.2011), ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν ότι όλα τα στέλεχη *M. pulcherrima* έχουν αυτήν την ενζυματική δραστηριότητα (Du Plessis et al.2017). Η δραστικότητα πρωτεάσης μπορεί να επιλύσει το σχηματισμό θολών πρωτεϊνών στα κρασιά, ως εναλλακτική λύση ή συμπλήρωμα στη χρήση μπεντονίτη (Marangon et al.2012). Ο ρόλος και η έκφραση της πρωτεάσης που παράγεται από ένα στέλεχος *M. Pulcherrima* έχουν μελετηθεί (Marangon et al.2012, Snyman et al. 2019). Η δραστικότητα πηκτινάσης εξαρτάται από το στέλεχος *M. pulcherrima* (Hong et al.2019).

Αντιμικροβιακό βιολογικό εργαλείο – Δραστηριότητα βιοελέγχου

Το στέλεχος αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου χάρη στην ικανότητά του να παράγει φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες. Ο μηχανισμός της αυτός βασίζεται κυρίως στον ανταγωνισμό της για τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, η ζύμη *M.pulcherrima* παράγει την πουλχεριμίνη, μια υδατοδιαλυτή ρόδινη χρωστική με αντιμυκητιακή δράση, η οποία παράγεται από την εξάντληση του σιδήρου. Η εξάντληση αυτή προκαλείται από την αλληλεπίδραση του σιδήρου με το πουλχεριμινικό οξύ, πρόδρομο της πουλχεριμίνης που εκκρίνεται από την ζύμη (το χρώμα κατα μία εκδοχή είναι ένωση που συμπλοκοποιεί το σίδηρο). Με αυτόν τον τρόπο, το περιβάλλον γίνεται αφιλόξενο σε άλλους μικροοργανισμούς που χρειάζονται σίδηρο για την ανάπτυξή τους. Η χρωστική πουλχεριμίνη (pulcherrimin) έχει αποτελεσματική ανασταλτική δράση έναντι πολλών ζυμών, όπως *Candida tropicalis* και *Candida albicans*, καθώς και των γενών *Brettanomyces* / *Dekkera*, *Hanseniaspora* και *Pichia*. και μυκητών, όπως ο *Botrytis cinerea*, και άλλων νηματοειδών μυκήτων, ζυμών και βακτηρίων που είναι ανεπιθύμητα για τη βιομηχανία οίνου (Sipiczki et al.2006), όπως *Penicillium*, *Alternaria* και *Monilia* spp. Ωστόσο, ο σακχαρομύκητας *S. cerevisiae* δεν φαίνεται να επηρεάζεται από αυτήν την αντιμικροβιακή της δραστηριότητα. Τα τελικά προϊόντα είναι αλκοόλη, λιπάση και η πουλχεριμίνη, η οποία σχηματίζεται μόνο παρουσία σιδήρου. Αυτή η αναστολή επιβίωσης άλλων ειδών λαμβάνει χώρα λόγω της εξάντλησης του σιδήρου (Benito et al. 2018). Ο ζυμομύκητας *M. pulcherrima* χρησιμοποιεί αυτήν τη στρατηγική ως βασικό εργαλείο για τον ανταγωνισμό, λόγω του γεγονότος ότι ο σίδηρος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των μυκήτων και την παθογένεση (Hershkovitz et al. 2013, Harle et al. 2019). Αυτή η ικανότητα χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε οπωροφόρα δέντρα μήλου για τον βιολογικό έλεγχο του *B. cinerea* (Saravanakumar et al.2008). Λόγω της απαγόρευσης ορισμένων αποτελεσματικών μυκητοκτόνων κατά του *B. cinerea* και άλλων

ανεπιθύμητων μυκήτων κατά τις περιόδους πριν από τη συγκομιδή, η χρήση παραγόντων βιοελέγχου, όπως το *M. pulcherrima*, θα μπορούσε να είναι χρήσιμος υποψήφιος για εφαρμογή στη βιομηχανία οινοποίησης. Το στελέχος *M. pulcherrima* δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για την αναστολή των μυκήτων, αλλά και για τον έλεγχο και τη μείωση των τοξικών προϊόντων τους, όπως η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ). Αυτή η ζύμη έχει τη δυνατότητα να μειώσει την ΟΤΑ έως και 80% στους 30 °C μετά από 15 ημέρες, χωρίς πρακτικά καμία προσρόφηση στο κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης (Spadano et al.2017, Benito et al.2019) Υπάρχουν στελέχη, τα οποία δεν σχηματίζουν χρωστική.

Διαδοχικοί εμβολιασμοί γλεύκους (μείωση αιθανόλης, αερόβιος μεταβολισμός)

Εμφανίζεται συχνά σε αυθόρμητες ζυμώσεις και η ευελιξία του έγκειται στην ικανότητά του να ζυμώνει σε συνδυασμό με άλλα είδη ζύμης. Οι γηγενείς ζυμομύκητες αυτοί ξεκινούν τη ζύμωση προτού οι πληθυσμοί των σακχαρομυκήτων αποκτήσουν επαρκή κυτταρική πυκνότητα. **Οι άγριες ζύμες τείνουν να θεωρούνται ευνοϊκές για τις αλκοολικές ζυμώσεις, διότι επιτρέπουν πρόσθετη γέυση στον οίνο και ξεκινούν τη ζύμωση γρηγορότερα για να αποτρέψουν την καθιέρωση άλλων δυσμενών οργανισμών πριν από το τέλος της περιόδου υστέρησης του *Saccharomyces*. Ζυμώνουν το γλεύκος έως ότου η περιεκτικότητα σε αλκοόλ φτάσει περίπου το 5%, όπου η ευαισθησία τους στην αιθανόλη εμποδίζει τον περαιτέρω μεταβολισμό και προκαλεί θάνατο όλων των ειδών ζύμης εκτός από το *Saccharomyces* (ανθεκτικός στα υψηλά επίπεδα αιθανόλης).** Βάση της έκκρισης πουλχεριμίνης, η χρήση της ζύμης *Metschnikowia pulcherrima* ως επιλεγμένου εκκινητή σε διαδοχικές ή μικτές βιοτεχνολογίες με τον σακχαρομύκητα *S.cerevisiae*, ο οποίος δεν επηρεάζεται, έχει μεγάλο ενδιαφέρον για τη σύγχρονη οικολογία (Morata et al.2019). Η χρήση του **σε διαδοχικό εμβολιασμό με *Saccharomyces uvarum* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μπορεί να παράγει οίνο Shirazi και Chardonnays με χαμηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη.**

Η διαδοχική χρήση των *M.pulcherrima* και *S.cerevisiae* ως εμβόλια γλεύκους, αποδείχθηκε **κάπως αποτελεσματική στη μείωση της περιεκτικότητας του οίνου σε αιθανόλη.** Αυτό συνδέεται με τους αερόβιους αναπνευστικούς μεταβολισμούς της Μρ που, υπό κατάλληλες συνθήκες αερισμού, μπορεί να **μεταβολίσει αερόβια περισσότερο από το 40% των σακχάρων, μειώνοντας έτσι σημαντικά την απόδοση της αιθανόλης.** Ένα παράδειγμα αυτής της εφαρμογής μπορεί να φανεί στη μελέτη που ανέπτυξαν οι Contreras et al. (2014), όπου επιτεύχθηκε μια μέση μείωση του αλκοολικού τίτλου 1,6% v / v όταν το Μρ χρησιμοποιήθηκε σε διαδοχική ζύμωση με Sc (εμβολιάστηκε την τέταρτη ημέρα) στην παραγωγή ερυθρού οίνου της ποικιλίας Syrah από γλεύκος με 240 g / L σακχάρων (πιθανός αλκοολικός τίτλος 14% v / v). Ως εκ τούτου, η χρήση ορισμένων ειδών ζύμης non-*Saccharomyces*, **όπως η *M. pulcherrima*, έχει προταθεί ως βιοτεχνολογική στρατηγική με στόχο την παραγωγή οίνων με χαμηλότερα επίπεδα αιθανόλης.** Σε αυτήν την τελευταία μελέτη, ένα είδος «συνεργασίας» παρατηρήθηκε μεταξύ των πληθυσμών του Μρ και του *S. uvarum*, δηλαδή ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα, επιτυγχάνοντας χαμηλότερη παραγωγή αιθανόλης από ό, τι σε καθαρές ζυμώσεις με κάθε ζύμη. Πρόσφατα, οι Mestre Furlani et al. (2017) αξιολόγησαν τη μεταβολική συμπεριφορά διαφορετικών non-*Saccharomyces* εγγενών ζυμών για τη μείωση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη κατά την οινοποίηση, με δύο στελέχη *M.pulcherrima* (απομονωμένα από σταφύλια) να παρουσιάζουν αναλογία μετατροπής σακχάρου προς αιθανόλη μεγαλύτερη από > 19 g/L /% (v/v). Αυτό επιβεβαιώνει τη χρησιμότητα της στην απόκτηση οίνων με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη. (Morata et al.2019).

Οι διαδοχικές ζυμώσεις *M. pulcherrima* φαίνεται να **αυξάνουν την τελική συγκέντρωση αμινοξέων στον οίνο.** Οι μεγαλύτερες αυξήσεις των αμινοξέων οφείλονται σε αυξήσεις της ισολευκίνης, της σερίνης και της φαινυλαλανίνης. Αυτά τα αμινοξέα διπλασίασαν τη συγκέντρωσή του σε σύγκριση με οίνο ελέγχου με *S. cerevisiae*. Η θρεονίνη ήταν το μόνο αμινοξύ που μειώθηκε (Benito et al.2015). Η χρήση του *M. pulcherrima* στη γήρανση των λευκών οίνων προκαλεί επίσης αύξηση της τελικής συγκέντρωσης αμινοξέων των οίνων. Κατά τη γήρανση, η χρήση του *M. pulcherrima* σε συνδυασμό με το *S. cerevisiae* **αυξάνει την τελική συγκέντρωση των αμινοξέων** σε σύγκριση με την εφάπαξ χρήση του *S. cerevisiae*, ειδικά στην ποσότητα ιστιδίνης και τρυπτοφάνης (63%). Αντίθετα, η θρεονίνη επισημαίνεται επειδή είναι το μόνο αμινοξύ που έχει παρατηρηθεί ότι μειώνεται (Belda et al. 2016).

Αρωματικές ενώσεις

Η **μεμονωμένη** χρήση του *Metschnikowia pulcherrima* οδήγησε σε υπερβολική **παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα** με αρνητικές ποιοτικά οργανοληπτικές επιπτώσεις. Ωστόσο, η μικτή χρήση του ως εμβόλιο με *Saccharomyces uvarum* μειώνει την παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα, ευνοώντας ταυτόχρονα το σχηματισμό 2-φαινυλαιθανόλης και οξικού 2-φαινυλαιθυλίου. Η χρήση συν-εμβολιασμών αυτού του τύπου (μικτές ζυμώσεις με Μρ / Sc) παρήγαγε υψηλή περιεκτικότητα σε οξικούς εστέρες και β-δαμασκενόνη με χαμηλότερα επίπεδα αλκοολών C6 (Vidal blanc). Η ενίσχυση της αρωματικής πολυπλοκότητας των οίνων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση του ως συν-εκκινητή με *Saccharomyces cerevisiae*, κυρίως λόγω της υψηλής παραγωγής εστέρων που προέρχεται από την έντονη εξωκυτταρική ενζυματική του δράση. Ομοίως, οι διαδοχικές ζυμώσεις με τον ίδιο σακχαρομύκητα εμφάνισαν μεγαλύτερη παραγωγή ανώτερων

αλκοολών, με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις ισοβουτανόλης και φαινυλαιθανόλης. Όσον αφορά την ενίσχυση του αρώματος, η έκφραση της β-ϋ-γλυκοσιδάσης ευνοεί την απελευθέρωση ελεύθερων τερπενίων. (Morata et al.2019). Οι ιδιότητες των τελικών προϊόντων, των παραγόμενων οίνων μπορούν να επηρεαστούν από ζύμες non Saccharomyces, καθότι οι περισσότερες αρωματικές ενώσεις προέρχονται από μικροβιακή δραστηριότητα. **Ποικιλιακά αρώματα**, τυπικά οριζόμενα ως τερπένια και θειόλες, προέρχονται από τις μη πτητικές πρόδρομες ενώσεις τους, που απελευθερώνονται κατά τη ζύμωση του οίνου από διαφορετικά υδρολυτικά ένζυμα ζύμης και οι οποίες βοηθούν στον καλύτερο καθορισμό και τυποποίηση των ποικιλιακών προφίλ των οίνων που απευθύνονται στην παγκόσμια αγορά. Ανάλογη μελέτη διεξήχθη σε γλεύκος Verdejo (ορίζεται ως μια λευκή ποικιλία σταφυλιού θειόλης), με διαδοχικό εμβολιασμό επιλεγμένου στελέχους άγριας ζύμης Metschnikowia pulcherrima, σε συνδυασμό με δύο διαφορετικά στελέχη Saccharomyces cerevisiae. Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων θειόλης 4-MSP (4-μεθυλ-4-σουλφανυλοπενταν-2-όνη) πάνω από το αισθητήριο όριο της, μαζί με μείωση παραγωγής ανώτερων αλκοολών. Αυτό έχει σημαντικό αντίκτυπο σε αυτούς τους οίνους καθιστώντας τα πιο φρουτώδη και πιο φρέσκα, πάντα προς την προτίμηση του πάνελ δοκιμαστών. Επομένως, η χρήση επιλεγμένων στελεχών M. pulcherrima είναι μια χρήσιμη βιολογική στρατηγική για την αύξηση της αρωματικής ποικιλιακής ποιότητας λευκών οίνων Verdejo ή σχετικά παρόμοιων ποικιλιών, όπως το Sauvignon blanc ή το Chardonnay. Αυτή η αύξηση της ποιότητας των αρωμάτων των οίνων σε διαδοχικές ζυμώσεις M. pulcherrima έχει αποδοθεί στον σχηματισμό **θειόλης** σε επίπεδα 6,4 φορές υψηλότερα από αυτά που παράγονται από τις μονές καλλιέργειες- ζυμώσεις S. cerevisiae, μαζί με μια γενικευμένη μείωση της συγκέντρωσης ανώτερων αλκοολών. Άλλα δευτερεύοντα πλεονεκτήματα που παρατηρήθηκαν με τη χρήση M. pulcherrima είναι η αύξηση της παραγωγής γλυκερόλης και χαμηλότερων τελικών συγκεντρώσεων αιθανόλης και ακεταλδεΐδης. (Ruiz1 et al. 2018)

Βελτίωση της σταθερότητας του χρώματος του οίνου (ανθοκυάνες και πολυφαινόλες)

Ορισμένοι non-Saccharomyces απορροφούν χαμηλότερο περιεχόμενο ανθοκυανινών κατά τη ζύμωση από ότι ο S.cerevisiae. Στον σακχαρομούκητα, η προσρόφηση μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 1 και 6% στο συνολικό περιεχόμενο των ανθοκυανινών, αλλά μπορεί να φτάσει έως και 30% για ορισμένες συγκεκριμένες ανθοκυανίνες. Η προσρόφηση επηρεάζεται από τη σύνθεση και τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος ζύμης. Η άγρια ζύμη παρουσιάζει χαμηλή προσρόφηση ανθοκυανινών στα κυτταρικά τοιχώματα σε σύγκριση με άλλες ζύμες, διότι έχει δραστηριότητα πολυγαλακτουρονάσης. Αυτή η δραστηριότητα αυξάνει τη συγκέντρωση των ενώσεων ανθοκυανίνης και πολυφαινόλης, ενώ μειώνει τη θολρότητα του οίνου (Belda et al.2016c). Η επίδραση της στο σχηματισμό σταθερών χρωστικών (πυρανοανθοκυανίνες και πολυμερή) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης έχει μελετηθεί σε διαδοχικές ζυμώσεις με S.cerevisiae και S. pombe (Morata et al.2019). Οι διαδοχικές αυτές ζυμώσεις οδηγούν σε οίνους με σημαντική μείωση των τελικών συγκεντρώσεων ανθοκυανινών. Εκτενέστερη αναφορά στο συγκεκριμένο εδάφιο, δεν πραγματοποιείται, διότι το παρόν πείραμα οινοποίησης έλαβε χώρα με λευκό γλεύκος ποικιλίας ασύρτικο.

Κύρια κριτήρια επιλογής M. pulcherrima

Οι μελέτες που συγκρίνουν τις ζυμώσεις που περιλαμβάνουν διαφορετικά στελέχη του είδους M. pulcherrima, αναφέρουν υψηλή μεταβλητότητα στελεχών για αρκετές παραμέτρους ποιότητας του οίνου. Εξαιτίας αυτού, ορισμένα κριτήρια επιλογής πρέπει να καθοριστούν για τη βελτίωση των παραμέτρων ποιότητας του οίνου, όπως η πρώτη παράμετρος που λαμβάνεται υπόψη σε μια διαδικασία επιλογής M. pulcherrima πρέπει να είναι η **απουσία ανταγωνισμού έναντι του S. cerevisiae**, καθώς οποιαδήποτε θετική επίδραση στον οίνο δεν θα είχε νόημα εάν δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σωστή αλκοολική ζύμωση. Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης του M. pulcherrima οφείλεται στη θετική του επίδραση στο άρωμα του οίνου. Σχετικά με αυτό το γεγονός, τα στελέχη M. Pulcherrima θα πρέπει να επιλέγονται βάσει των ενώσεων που μπορούν να απελευθερώσουν, όπως ποικιλιακών που απαρτίζονται από θειόλες και τερπένια, ενώ είναι ικανά να παράγουν φρουτώδεις εστέρες, όπως οκτανοϊκό αιθυλεστέρα. Η ζυμωτική ισχύς μαζί με την ανοχή στην αιθανόλη και το διοξείδιο του θείου πρέπει να ληφθεί υπόψη προκειμένου να επιτραπεί στα επιλεγμένα στελέχη να αποδίδουν περισσότερο κατά τη διάρκεια βιομηχανικών αλκοολικών ζυμώσεων, ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη των επιθυμητών ποιοτικών στόχων. Αυτές οι παράμετροι παραμένουν ως ο κύριος περιορισμός των διαθέσιμων εμπορικών στελεχών. Άλλα δευτερεύοντα θετικά αποτελέσματα που θα μπορούσαν να επιλεγούν είναι η ικανότητα μείωσης της τελικής περιεκτικότητας σε αιθανόλη και αύξησης της συγκέντρωσης γλυκερόλης στα τελικά προϊόντα. Ορισμένες παράμετροι επιπρόσθετου ενδιαφέροντος είναι η απορρόφηση ανθοκυανίνης και η απελευθέρωση πολυσακχαριτών. Τέλος, ορισμένες αρνητικές παράμετροι που αναφέρθηκαν για ορισμένα στελέχη M. pulcherrima όπως διακετύλιο, ακετόνη, ανώτερες αλκοόλες ή ακεταλδεΐδη πρέπει να αποφεύγονται στα επιλεγμένα στελέχη. Ο πίνακας που ακολουθεί συνοψίζει τις προτεινόμενες παραμέτρους επιλογής M. pulcherrima. (Vicente et al.2020) (Arroyo-López et al.2010, Arslan et al. 2018, Azzolini et al. 2012, Bafncová et al. 1999, Beavan et al. 1982, Benito et al. 2013, 2017,

2019, 2016, 2015 (co-fermentation non-S / S.c), Binati et al.2020(co-fermentation non-S / S.c)). Συμπερασματικά, η αξία της ζύμης *M. pulcherrima* για τη βιομηχανία οίνου έγκειται **στην ανταγωνιστική συμπεριφορά της με άλλα, ανεπιθύμητα είδη, την γρήγορη εκκίνηση ζύμωσης, χαμηλό αλκοολικό τίτλο οίνων, αύξηση παραγόμενης γλυκερόλης και στην απελευθέρωση των αρωματικών προδρόμων που βελτιώνουν την οργανοληπτική αίσθηση του οίνου**. Αναφέρονται δύο εμπορικά προϊόντα διαφορετικών ειδών *Metschnikowia pulcherrima*, με προτεινόμενη χρήση Flavia™ MP346 της Lallemand, στο λευκό γλεύκος, αυξάνει τις ποικιλιακές θειόλες και βελτιώνει την οξύτητα. Του οίνου και Excellence™ της Bio-Nature που βοηθάει στον έλεγχο της γηγενούς χλωρίδας του γλεύκους που επιτρέπει μια ελεγχόμενη ζύμωση.

(Kurtzman et al. 2018 (new species), Turkel et al. 2014 (biocontrol), Barbosa et al. 2018 (phenotype), Binati et al. 2020 (volatile sensory), Caronico et al. 2019 (ethanol reduction), Contreras et al. 2015, Rauhut et al. 2014 (ethanol reduction & S.uvarum), Duarte et al. 2019 (mixed fermentation), Gonzales-Royo et al.2014 (co-fermentation with S.c.), Hranilovic et al. 2020 (ethanol reduction, co-fermentation S.c), Ruiz et al.2018 (volatile-white wines), Lachance et al. 2016 (review), Morata et al.2019 (review), Oro et al. 2014 (antimicrobial activity), Vicente et al. 2020 (review), Varela et al.2016, 2017 (ethanol reduction, volatile), Varakumar et al. 2011 (co-fermentation with S.c), Saravanakumar et al.2008).

Product name	Manufacturer	Contribution to wine production	Website
Level 2 Flavia™/ Flavia® MP346	Lallemand	Increases varietal aromas, such as terpenes and volatile thiols. Improves mouthfeel due to polysaccharide release and early autolysis.	https://www.lallemandwine.com/
Levulia® Pulcherrima	AEB	Increases ethyl esters, phenyl-acetate, isoamyl acetate and terpenes.	https://www.aeb-group.com/
Excellence® B-Nature	Lamothe-Abiet	Controls indigenous microbiota on grape and in must. Reduces pre-fermentation sulphating.	https://www.lamothe-abiet.com/
Zymaflore Égide	Laffort	Blend of <i>Torulaspora delbrueckii</i> and <i>Metschnikowia pulcherrima</i> . Bio-protection – inhibits growth of indigenous microbiota.	https://www.laffort.com
AWRI Obsession	Maurivin	Increases dark fruit aromas and palate complexity of red wines.	https://www.abbiotek.com

Εικόνα 36. Εμπορικά είδη *M.pulcherrima* και ο ρόλος τους στην παραγωγή.

2.2.2 ΤΑΞΗ SACCHAROMYCETALES

Στην τάξη Saccharomycetales (Ascomycota) περιλαμβάνονται οι ζύμες, μικροοργανισμοί μεγάλης σπουδαιότητας για τη βασική βιολογική έρευνα και τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, την ιατρική και τη βιοτεχνολογία.

Οι ζύμες δεν παράγουν ασκογόνες υφές και ασκοκάρπια και έτσι διαφοροποιούνται από τους νηματοειδείς μύκητες. Πολλοί νηματοειδείς μύκητες (οι περισσότεροι Mucorales της κλάσης Zygomycetes, αρκετοί των φύλων Ascomycota και Basidiomycota), μεταπίπτουν σε κάποια φάση του βιολογικού τους κύκλου από μύκητες σε ζύμες ή ζυμοειδή (yeast-like). Οι μύκητες αυτοί που ονομάζονται διμορφικοί, δεν κατατάσσονται στην τάξη Saccharomycetales (αληθείς ζύμες), επειδή η νηματοειδής (μυκηλιακή) μορφή είναι εκείνη που δεσπόζει στη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου. Αντίθετα, μερικά μέλη της τάξης Saccharomycetales, μολονότι διμορφικά, κατατάσσονται στην ομάδα των αληθών ζυμών, επειδή η δεσπόζουσα μορφή του θαλλού τους είναι η μονοκύτταρη μορφή ζύμης. Γενικά πάντως η μορφή του θαλλού δεν αποτελεί ισχυρό κριτήριο για την κατάταξη ή όχι ενός μύκητα στην τάξη Saccharomycetales.

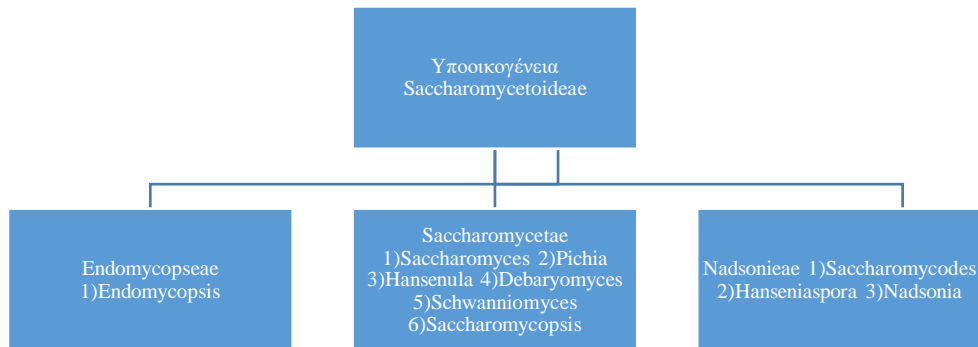
Σημαντικοί φαινοτυπικοί χαρακτήρες που φαίνεται να διαφοροποιούν τους νηματοειδείς μύκητες είναι η παρουσία ασκογόνων υφών και ασκοκαρπίων, χαρακτήρες που απουσιάζουν από τα μέλη της τάξης Saccharomycetales. Στα τελευταία, το ρόλο των γαμεταγγείων διαδραματίζουν τα βλαστικά κύτταρα, ενώ σε μερικά είδη το ζυγωτό παράγεται παρθενογενετικά. Η καρυογαμία πραγματοποιείται αμέσως μετά την πλασμογαμία, και επομένως η δικαρυωτική φάση είναι πολύ σύντομη διάρκειας ή ανύπαρκτη. Η διπλοειδής φάση, αντίθετα, σε ορισμένα είδη (αυτά που πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλάστηση), είναι μεγάλης διάρκειας. Τα μέλη της ομάδας Saccharomycetales πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλάστηση των κυττάρων, με κονίδια ή αρθροσπόρια.

Οι ζύμες είναι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα υψηλής οσμωτικής πίεσης. Με ελάχιστες εξαιρέσεις είναι σαπρόφυτα, **προαιρετικά αναερόβια** και δεν παράγουν τοξικούς μεταβολίτες. Η τάξη Saccharomycetales, όπως έχει διαμορφωθεί μετά από πρόσφατες φυλογενετικές μελέτες, είναι μια μονοφυλογενετική ομάδα, διαιρεμένη σε οκτώ οικογένειες, Saccharomycetaceae, Nadsoniaceae, Sccharomycodaceae, Eremotheciaceae, Metschnikowiaceae, Cephaloascaceae, Dipodascaceae και Lipomycetaceae (τα είδη αυτής της οικογένειας μολονότι εμφανίζουν πολλές φυλογενετικές ομοιότητες με τα είδη των άλλων οικογενειών, φαίνεται να απομακρύνθηκαν κάπως από την υπόλοιπη ομάδα). (Αγγελής, 2017)

Γένος *Saccharomyces* και Συγγενή Γένη

Σήμερα αναγνωρίζονται 7 γένη, τα *S. cerevisiae*, *S. dairensis*, *S. exigus*, *S. kluyveri*, *S. servazzii*, *S. telluris* και *S. unisporus*. Απομονώνονται από εδαφικά δείγματα, άνθη φυτών, φρούτα, τρόφιμα κ.ά. Το πληρέστερα μελετημένο είδος του γένους και ολόκληρης της οικογένειας Saccharomycetaceae, είναι το *Saccharomyces cerevisiae*. Είναι η γνωστή ζύμη που χρησιμοποιείται στην αρτοποιία και στη ζαχαροπλαστική, στην παραγωγή οίνου, αλκοολούχων ποτών και άλλων προϊόντων καθημερινής χρήσης, όπως επίσης και στη βιοτεχνολογική παραγωγή πολλών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Το είδος αυτό έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο από κάθε άλλο ευκαρυωτικό μικροοργανισμό ως πρότυπο βιοχημικών και μοριακών μελετών στη βασική βιολογική έρευνα, από την εποχή του Παστέρ.

Το είδος *Saccharomyces cerevisiae* παράγει σε κάθε ασκό 1-4 ασκοσπόρια, τα οποία όταν απελευθερωθούν, βλαστάνουν και δίνουν γένεση σε βλαστικά (σωματικά) απλοειδή κύτταρα, ικανά να αναπαράγονται αγενώς με εκβλαστήσεις. Το είδος είναι ετεροθαλικό και επομένως πλασμογαμία πραγματοποιείται μόνο μεταξύ βλαστικών κυττάρων αντίθετου συζευκτικού τύπου. Δικαρυωτική φάση δεν υπάρχει, αφού αμέσως μετά την πλασμογαμία ακολουθεί καρυογαμία. Το διπλοειδές κύτταρο που παράγεται είναι ικανό προς βλάστηση και έτσι παράγονται πολλές γενεές διπλοειδών κυττάρων πριν την παραγωγή ασκοσπορίων. Σε αντίξοες συνθήκες, τα διπλοειδή κύτταρα μεταμορφώνονται σε ασκούς και ο διπλοειδής πυρήνας υφίσταται μείωση, η οποία όμως δε συνοδεύεται από μιτωτική διαίρεση και επομένως σε κάθε ασκό παράγονται τέσσερα ασκοσπόρια (κατά το μέγιστο), ανά δύο αντίθετου συζευκτικού τύπου. Ασκοσπόρια δύναται να παραχθούν και παρθενογενετικά από ένα και μοναδικό βλαστικό κύτταρο. Σε ευνοϊκές συνθήκες αύξησης λαμβάνει χώρα σύζευξη των ασκοσπορίων και παραγωγή δύο διπλοειδών κυττάρων, ενώ σε δυσμενείς συνθήκες, ο ασκός θραύεται και ελευθερώνει ασκοσπόρια που είναι ικανά προς βλάστηση.



Εικόνα 37. Σχήμα με τις 3 φυλές υποοικογένειας Saccharomycetoideae, με τις υποφυλές/γένη τους.

Στη συγκεκριμένη υποοικογένεια, πάντοτε ο αγενής πολλαπλασιασμός γίνεται με εκβλάστηση και ο εγγενής με ασκοσπόρια. Ο αριθμός σπορίων ανά ασκό κυμαίνεται από 1-4. Ο μεταβολισμός τους είναι κατά κύριο λόγο ζυμωτικός, αλλά και οξειδωτικός ταυτόχρονα, και σε ορισμένα γένη κύρια οξειδωτικός.

Η τάξη ζυμών των Saccharomycetales περιλαμβάνει μόνο μια οικογένεια, αυτή των Saccharomycetaceae, στην οποία υπάγονται οι ακόλουθες πέντε υποοικογένειες: Eremascoideae, Endomycetoideae, Saccharomycetoideae, Nematosporoideae και Lipomycetoideae. Η υποοικογένεια Saccharomycetoideae (φυλές), συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη ζυμολογία και για τη βιομηχανία τροφίμων, γιατί έχει συμπεριλάβει τις τυπικές ζύμες (sensu-stricto) με βιομηχανική εφαρμογή. Η υποοικογένεια αυτή, υποδιαιρείται σε τρεις φυλές, η καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει ορισμένα γένη (Μπαλατσαούρας, 2006).

Φυλή *Nadsonieae* (λεμονοειδείς ζύμες), υποφυλή/γένος *Hanseniaspora*

Η υποφυλή *Hanseniaspora* ανήκει στη φυλή των λεμονοειδών ζυμών, *Nadsonieae*, οι οποίες εμφανίζουν έντονο το φαινόμενο της οντογένεσης (αρχικά σφαιρικό το κύτταρο αποχωρισμού από το μητρικό και έπειτα αποειδούς σχήματος – ίδια εξέλιξη παρουσιάζουν και τα ασκοσπόρια, δε σχηματίζουν ψευδομυκήλιο και δε συγκεντρώνουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις βιομηχανικές ζυμώσεις, ιδιαίτερα για τη ζύμωση οινογλεύκου. Οι ζύμες *Hanseniaspora* εμφανίζονται στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, στα επόμενα, όμως, υποχωρούν λόγω της αυξημένης ευαισθησίας τους στο θειώδες και στις μεγάλες συγκεντρώσεις αλκοόλης (Castelli, 1954).

2.2.2.1 HANSENIASPORA UVARUM

Γενικά οικολογικά χαρακτηριστικά και ρόλος στον οίνο. Το στέλεχος *H. uvarum* είναι από τα πιο άφθονα είδη για **non-Saccharomyces** ζύμης που απαντάται συχνά σε ώριμα φρούτα (Spencer et al., 1992, Morais et al., 1995) και ιδιαίτερα στα σταφύλια, όπου αποτελεί τμήμα της φυσιολογικής ιθαγενούς μικροχλωρίδας τους σε μεγάλες συγκεντρώσεις και βρίσκεται ακόμα και στο χόμα. Ανιχνεύεται στις περισσότερες - εάν όχι όλες - αμπελουργικές περιοχές παγκοσμίως σύμφωνα με τους Fleet, 1985, Mateo et al., 1991, Comi et al., 2001, Beltran et al., 2002, Jolly et al., 2003, Combina et al., 2005, Li et al., 2010, Zott et al., 2010, Kachalkin et al., 2015). Επιπλέον μαζί με τον *Hanseniaspora guilliermondii* αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό γηγενών άγριων ζυμών στους αμπελώνες της Σαντορίνης. Πρόκειται για έναν από τους **κυρίαρχους ζυμομύκητες σε διάφορα στάδια πρώιμης φυσικής ζύμωσης γλεύκους**. (Castelli, 1955, Schütz και Gafner, 1993, Hierro et al., 2006) **και παράγει οξικό αιθυλεστέρα.**

Μορφολογία. Το κύτταρο αναπαράγεται με εκβλάστηση. σχήματος σφαιροειδές έως ωοειδές, επιμήκης, (1,5-5,0) x (2,5-11,5) μm, μονό ή σε ζεύγη. Τα στελέχη. Συγκεντρώνονται κυρίως με βάση τη γεωγραφική τους θέση, ενώ έχει καταγραφεί έντονη συσσωμάτωση με βάση το έτος απομόνωσης (γενετική ποικιλομορφία των στελεχών).

Φυσιολογικά χαρακτηριστικά

Ζυμώνει κυρίως τα σάκχαρα γλυκόζη και φρουκτόζη και αφομοιώνει Κυτταροβιόζη, μεταβλητή χρήση: Σαλικίνη, Αρνουτίνη, D-γλυκονο-1,5-λακτόνη, 2-κετο-D-γλουκονάτη, Αιθανόλη. Δεν αφομοιώνει νιτρικά. Χρησιμοποιεί αιθυλαμίνη, L-Λυσίνη, καδαβερίνη ως μοναδική πηγή N, ορισμένα στελέχη ασθενώς. Αναπτύσσεται φυσιολογικά στις θερμοκρασίες 35 και 37 °C. **Ευαισθήσιες στελέχους**

Ευαισθησίες ανάπτυξης: κυκλοεξιμίδιο, επιπλέον δεν υπάρχει ανάπτυξη σε μέσο χωρίς βιταμίνες, απαιτεί ιμισιτόλη, πανθοθενικό οξύ, πυροξιδίνη και νιασίνη. Μερικά στελέχη απαιτούν, επίσης, βιοτίνη και θειαμίνη.

SO₂: 100 mg / L

Σορβικό: 250 mg / L σε pH 5,0, χωρίς αύξηση σε pH 3,0

DMDC: 400 mg / L (υψηλή αντοχή)

pH: 1,5-7,5

Αιθανόλη: *H. Uvarum*: 3,4-6,7%, *K. Appiculata* (η ατελής μορφή του): 9-12,5%, εξαρτάται από τη θερμοκρασία

Αναεροβίωση: Ζυμώνει τη γλυκόζη προς παραγωγή γλυκερόλης και αιθανόλης

Θερμότητα: Ανάπτυξη: 8 ° C-36 ° C. Επιβιώνει 20min στους 55 °C, και λιγότερο από 10min στους 60 °C.

Τεχνολογικά χαρακτηριστικά: Η ζύμη φαίνεται να έχει κάποια ενδιαφέροντα ένζυμα, όπως η β- \ddot{u} -γλυκοσιδάση και η β- \ddot{u} -ξυλοσιδάση, τα οποία είναι βασικά ένζυμα για την απελευθέρωση των αρωματικών ενώσεων στην οινοποίηση (Kurtzman et al., 2011). Το στέλεχος είναι **αρνητικό στο φαινόμενο Crabtree**. Επιπλέον, ως μειονέκτημα αναφέρεται ότι ορισμένα στελέχη των ειδών *H. uvarum* αποδείχθηκαν χαμηλοί παραγωγοί ωχρατοξίνης A (**OTA**), της κύριας μυκοτοξίνης που έχει ανιχνευθεί στον οίνο (Angioni et al., 2007). Στα θετικά του στελέχους ανήκει η ικανότητα του να μπορεί να διατηρηθεί με λυοφιλοποίηση και κρυσυντήρηση, η οποία είναι αρκετά ικανοποιητική, ώστε να διατηρήσει την ικανότητα ζύμωσης. (de Arruda Moura Pietrowski et al., 2015). Μια πιθανή εφαρμογή θα μπορούσε να είναι η αφαίρεση οποιωνδήποτε φυσικών γηγενών ζυμομυκήτων *S. cerevisiae* ενός γλεύκους με συν-κροκίδωση από το γλεύκος σταφυλιών με *H. uvarum* (πριν από τη ζύμωση) και στη συνέχεια προσθήκη εμβολίου μιας επιλεγμένης καλλιέργειας *S. cerevisiae* για την κύρια ζύμωση). Η πρόωρη κροκίδωση μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρο τέλος μιας ζύμωσης.

Μικτός ή διαδοχικός εμβολιασμός με σακχαρομύκητα

Αρκετές μελέτες αναφέρουν τον χαρακτηρισμό του αποτελέσματος της αλκοολικής ζύμωσης από *H. uvarum* ως εμβόλιο εκκίνησης σε μικτό ή διαδοχικό εμβολιασμό με *Saccharomyces cerevisiae* σε γλεύκος σταφυλιών, καθώς μόνο το *H. uvarum* δεν είναι σε θέση να ολοκληρώσει την ζύμωση των σακχάρων. Οι οίνοι που προκύπτουν φαίνεται να διαφέρουν από τις καθαρές καλλιέργειες (*S. cerevisiae*) στη **χημική τους σύνθεση (συγκεντρώσεις ορισμένων οργανικών οξέων, αλδεϋδών, δευτερευουσών αλκοολών, ανώτερων αλκοολών, πτητικών μεταβολιτών, βουτανοδιόλης, ακετοΐνης και μερικές άλλες ενώσεις αναφέρθηκαν ως σημαντικά διαφορετικές)**. Πράγματι, οι συγκεντρώσεις ορισμένων οργανικών οξέων, αλδεϋδών και δευτερευουσών αλκοολών (Hong and Park, 2013), ανώτερες αλκοόλες και πτητικοί μεταβολίτες (Zironi et al., 1993, Zohre and Erten, 2002, Moreira κ.ά., 2011) (Moreira et al., 2008), βουτανοδιόλη και ακετοΐνη (Romano et al., 1993, 2000) και μερικές άλλες ενώσεις αναφέρθηκαν ως σημαντικά διαφορετικές. Ορισμένες από αυτές τις αλλοιώσεις θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την έκκριση εξοκυτταρικών ενζύμων. Έχουν χαρακτηριστεί αρκετές ενζυματικές δραστηριότητες τεχνολογικού ενδιαφέροντος, όπως δραστηριότητες β-γλυκοσιδάσης, ξυλοσιδάσης, πρωτεάσης και λιπάσης (Charoenchai κ.ά., 1997, Manzanares et al., 1999, Capece κ.ά., 2005). Οι ζύμες *Hanseniaspora*

uvanum, οι αποίες αποτελούν γηγενείς και των βερίκοκων, έχουν γίνει αντικείμενο αυξανόμενου ενδιαφέροντος, καθώς ο πολλαπλασιασμός τους σε ανταγωνισμό με το *S. cerevisiae* μπορεί να επηρεάσει την οργανοληπτική ποιότητα του οίνου, λόγω της υψηλότερης παραγωγής εστέρων (Moreira et al. 2008 (sulphites, higher alcohols, esters, mixed cultures), 2011 (red wine volatiles), Tristezzan et al. 2016 (co-fermentation with *S.c.*), Warren et al. 2016, Wang et al. (winemaking)).

2.2.2.2 HANSENIASPORA GUILLIERMONDII

Γενικά οικολογικά χαρακτηριστικά και ρόλος στον οίνο. Το στέλεχος *Hanseniaspora guilliermondii* είναι ένα είδος ζύμης της οικογένειας *Saccharomycetaceae*. Τα στελέχη αυτού του είδους παράγουν **ακετοΐνη**, μια χημική ουσία που βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα και αρώματα. Το *Hanseniaspora guilliermondii* είναι μια γηγενής ζύμη του βερίκοκου που υπάρχει συνήθως στην αρχική μικροχλωρίδα των γλευκών σταφυλιών και ειδικά αυτών που έχουν υποστεί σήψη. Έχει ανιχνευθεί και σε άλλα φρούτα όπως χουρμάδες, τομάτες, σύκα, ακόμα και στο χόμα. Αποτελεί την κυρίαρχη μορφή ζύμης non-Saccharomyces στα σταφύλια και κυριαρχεί κατά την αρχική φάση της ζύμωσης μαζί με τον μικροοργανισμό *H. uvanum*. Οι αυθόρμητες ζυμώσεις οινογλεύκους πραγματοποιούνται διαδοχικά από διαφορετικούς πληθυσμούς non-Saccharomyces, κατά τα πρώτα στάδια ζύμωσης του οινογλεύκους. Η ανάπτυξη μειώνεται όταν η αιθανόλη ή το διοξείδιο του θείου φθάνει σε μια ανασταλτική συγκέντρωση. Οι ζύμες αυτών των γενών έχουν αναφερθεί ως ικανές να ζυμώσουν γλεύκος σταφυλιών έως και μέγιστη περιεκτικότητα σε αλκοόλη 5% κατ'όγκο (τιμή που διαφέρει σε ερευνητικές μελέτες), μετά από αυτό το σημείο, τα πιο έντονα ζυμωτικά και πιο ανθεκτικά στην αιθυλική αλκοόλη είδη *Saccharomyces* αναλαμβάνουν και ολοκληρώνουν τη ζύμωση (Albergaria et al. 2003).

Μορφολογία. Το κύτταρο αναπαράγεται με εκβλάστηση και έχει σχήμα λεμονοειδές, έως 4 ασκοσπόρια σε κάθε ασκό.
Φυσιολογικά Χαρακτηριστικά. Αφομοιώνει 2 κετο-ϋ-γλυκονικό, μπορεί να αναπτυχθεί στους 37 °C και να χρησιμοποιήσει λυσίνη ως πηγή αζώτου.

Ευαισθησίες στελέχους

Ανθεκτικό σε κυκλοεξιμίδιο

SO₂: Μεταβλητό, αλλά πιο ευαίσθητο από το *Saccharomyces*

Σορβικό: 100-200 ppm

DMDC: 100mg / L

pH: 2,0-8,0

Οξέα: βενζοϊκό οξύ

Ευαίσθητη στην αιθανόλη: > 5%

Αναερόβια: ζύμωση <150 g/L γλυκόζη

Θερμότητα: ευαίσθητο > 37°C

Τεχνολογικά χαρακτηριστικά. Το στέλεχος είναι **θετικό στο φαινόμενο Crabtree**. Μέχρι ρυθμό αραίωσης 0,25 h⁻¹, η γλυκόζη μεταβολίζεται πλήρως σε βιομάζα, γλυκερόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Στην παραπάνω τιμή, μια αύξηση του ρυθμού αραίωσης συνοδεύεται από την παραγωγή άλλων μεταβολιτών όπως αιθανόλη, οξικό και μηλικό οξύ.

Αυθόρμητη ζύμωση/ ελεγχόμενη ζύμωση ως εμβόλιο εκκίνησης. Οι μικροοργανισμοί *Hanseniaspora guilliermondii* και *Hanseniaspora uvanum* μπορούν να αναπτυχθούν έως 10⁶-10⁸ κύτταρα / ml κατά τη διάρκεια των πρώτων 4-6 ημερών ζύμωσης, μετά την οποία επέρχεται κυτταρικός θάνατος σε μεγάλο βαθμό ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης συγκέντρωσης της αιθανόλης που παράγεται από τον *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος διαθέτει καλύτερη δυνατότητα ζύμωσης και ανοχή στην αιθανόλη (Fleet, 2003, Fugelsang & Edwards, 2007, Granchi et al., 1998, Jolly & Pretorius, 2006, Zott et al. 2008). Γενικά, τα είδη *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* που βρίσκονται στο γλεύκος είναι ευαίσθητα σε συγκεντρώσεις αιθανόλης άνω του 4-7%, και αυτό εξηγεί τον πρόωρο θάνατό τους καθώς προχωρά η ζύμωση πέρα από τα αρχικά και μεσαία στάδια (Fleet, 2003, Fleet & Heard, 1993, Fugelsang & Edwards, 2007, Moreir et al, 2008).

Η φυσιολογία του ζυμομύκητα non-Saccharomyces, ***Hanseniaspora guilliermondii*** μελετήθηκε από τους Albergaria και επιστημονικούς συνεργάτες (2003), απομονωμένη από γλυκιά σταφυλιών, σε καλλιέργειες γλυκόζης υπό αερόβιες

συνθήκες, τόσο σε συνθήκες σταθερής κατάστασης (κλασική καλλιέργεια) όσο και στη διαδικασία επιτάχυνσης και με τις δύο τεχνικές καλλιέργειας βρέθηκε ότι είναι ζύμη **θετική στο φαινόμενο Crabtree**. Υπό πραγματικές συνθήκες σταθερής κατάστασης παρατηρήθηκε μετατόπιση από καθαρά οξειδωτικό σε αναπνευστικό-ζυμωτικό μεταβολισμό για ρυθμούς αραίωσης υψηλότερους από $0,25 \text{ h}^{-1}$ όταν η αιθανόλη, το οξικό οξύ και το μηλικό οξύ άρχισαν να συσσωρεύονται στο μέσο ανάπτυξης. **Αυτή η συμπεριφορά είναι χαρακτηριστική των ζυμομυκήτων θετικών στο Crabtree και ο κρίσιμος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης που παρουσιάζεται ($0,25 \text{ h}^{-1}$) συμφωνεί με τις τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία** για άλλους ζυμομύκητες θετικούς στο Crabtree. Αυτή η τιμή είναι χαμηλότερη από τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, $0,39 \text{ h}^{-1}$, για αυτή τη ζύμη σε αερόβια batch κλειστή καλλιέργεια. (Albergaria et al. 2003 (συμπεριφορά σε κλειστές καλλιέργειες)). (Meyer et al. 1977 (species status), Moreira et al. 2011 (red wine volatiles), Moreira et al. 2008 (mixed cultures, volatiles), Romano et al. 1993 (Acetoin), Zironi et al. 2008 (glycerol, co-fermentation with S.c.).

2.2.2.3 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Φυλή Saccharomyceteae, υποφυλή/γένος Saccharomyces

Γενικά χαρακτηριστικά και ρόλος στον οίνο. Η υποφυλή Saccharomyces, ανήκει στην φυλή Saccharomyceteae της υποοικογένειας Saccharomycetoideae, η οποία περιλαμβάνει τις αληθινές ζύμες, που δεν σχηματίζουν πραγματικό μυκήλιο, αλλά μόνο ψευδομυκήλιο και σε ορισμένα μόνο γένη και είδη. Στην κλείδα ταξινόμησης του Kreger-van Rij, το 1984, μόλις 7 είδη αναγνωρίζονται, το σπουδαιότερο εκ των οποίων, είναι το Saccharomyces cerevisiae, το οποίο είναι υπεύθυνο κατά κύριο λόγο για την αλκοολική ζύμωση υπό βιομηχανικές συνθήκες. (Μπαλατσαούρας, 2006). Ο Saccharomyces cerevisiae είναι ένας από τους πιο εντατικά μελετημένους μικροοργανισμούς στη μοριακή και κυτταρική βιολογία. Ο σακχαρομύκητας αυτός αποτελεί το 80% του πληθυσμού ενός εν ζυμώσει γλεύκους με ποσοστό αιθανόλης μεγαλύτερο από το 5%, επομένως είναι ο πιο κοινός ζυμομύκητας που εμπλέκεται στην αλκοολική ζύμωση του γλεύκους των σταφυλιών, γνωστός και ως «η ζύμη του οίνου» (Fleet and Heard 1993). Συνδέθηκε για πρώτη φορά με την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους και του βυνογλεύκους από τον Cagniard-Latour, το 1837 και αποτελεί τον πλέον χρησιμοποιούμενο στην οινική βιομηχανία, καθώς είναι εκείνος που αποδίδει τα μεγαλύτερα ποσοστά αιθανόλης, ενώ εμφανίζει και τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε αυτά (Sarris & Papanikolaou 2016). Ο S. cerevisiae είναι μια από τις κύριες πηγές εμπορικής παραγωγής οίνου, μύρας, ψωμιού, ενζύμων, βιοκαυσίμων, φαρμακευτικών προϊόντων και πολλών άλλων προϊόντων βιοτεχνολογικού οίνου (Barnett et al, 2000). Αυξάνεται γρήγορα και έχει δυνατότητα να ζυμώσει (ζυμωτική ικανότητα) μέχρι 12-14% vol. Έχει μεγάλη ευαισθησία στην ακτιδιόνη. Μπορεί να μετατρέψει το θειώδη ανυδρίτη σε θειικά ιόντα, γεγονός που μπορεί να κάνει τη ζύμη επικίνδυνη. Δεν μπορεί να ζυμώσει τη γαλακτόζη και αυξάνει λίγο την πτητική οξύτητα (Τσακίρης, 2017). Όσον αφορά στις απαιτήσεις θερμοκρασίας και pH, οι ζυμομύκητες ευδοκούν σε θερμό και όξινο περιβάλλον, με τα περισσότερα στελέχη του S. cerevisiae να αναπτύσσονται σε θερμοκρασία μεταξύ 20 και 30 °C και pH 4,55 – 6,5 (Walker et al., 2016).

Μορφολογία. Ο Saccharomyces είναι ένας ευκαρυωτικός μικροοργανισμός που αναπαράγεται με εκβλάστηση και ανήκει στους Ασκομύκητες. Τα κύτταρα είναι σφαιρικά, ωοειδή, αλλά και επιμήκη στα πρώτα στάδια της εξέλιξής τους, διαμέτρου 5-10 μm και περιβάλλονται από ένα άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από γλυκάνη, μαννάνη και πρωτεΐνη, επιτρέποντας τους να αντέχουν σε δραματικές αλλαγές στην οσμωτική πίεση. Κάτω από το κυτταρικό τοίχωμα υπάρχει ένας περιπλασματικός χώρος, ο τόπος εντοπισμού των εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Τα ακέραια κύτταρά του δεν εκκρίνουν πρωτεΐνες στο περιβάλλον. Αντί αυτού, τα εξωκυτταρικά ένζυμα περιορίζονται στο εξωτερικό του κυττάρου από το κυτταρικό τοίχωμα. Άλλες ζύμες εκκρίνουν ένζυμα στο περιβάλλοντα μέσο. Το κυτταρόπλασμα των κυττάρων των ζυμομυκήτων περιβάλλεται από μεμβράνη πλάσματος, η οποία χρησιμεύει ως κύριος φραγμός διαπερατότητας. (Αγγελής, 2017)

Τεχνολογικά χαρακτηριστικά. Είναι ο μικροοργανισμός για τον οποίο έχουν πραγματοποιηθεί οι περισσότερες έρευνες όσον αφορά στα φαινόμενα που πραγματεύεται η παρούσα μελέτη και για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε ως μικροοργανισμός αναφοράς, ως **χαρακτηριστική θετική κατά Crabtree ζύμη**. (Hagman et al., 2013, 2015). Το στέλεχος *S. cerevisiae*, επίσης, έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στη μυρωδιά του ψωμιού. Η προλίνη και η ορνιθίνη που υπάρχουν στη ζύμη είναι πρόδρομοι της 2-ακετυλο-1-πυρρολίνης, μια μυρωδιά που μυρίζει ψητό, στην κρούστα του ψωμιού.

Το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να επιβιώσει με την προσθήκη 200 mg/L DMDC, ενώ η ανάπτυξη άλλων ειδών του γένους *Saccharomyces* αναστέλλεται με 150 mg/L DMDC.

Αυθόρμητη ή ελεγχόμενη ζύμωση. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο κύριος μικροοργανισμός που είναι υπεύθυνος για την οινοποίηση, καθώς ολοκληρώνει τη ζύμωση των διαθέσιμων σακχάρων μετά τη παραγκώνιση άλλων ειδών ζύμης που υπάρχουν στο γλεύκος σταφυλιών. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω βασικών προσαρμογών στο εν ζυμώσει γλεύκος, ιδίως μέσω της ικανότητάς του να παράγει και να παρουσιάζει αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αλκοόλ. Σε ερευνητικές εργασίες, η μέγιστη απόδοση αιθανόλης ανάμεσα σε άγριες ζύμες και σακχαρομύκητες επετεύχθη από το μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* (Fernández, et al., 2000). Το στέλεχος *S. cerevisiae*, όχι μόνο ολοκληρώνει τη ζύμωση, μετατρέποντας τα σάκχαρα του γλεύκους μέχρι ξηρότητας (γλυκόζη και φρουκτόζη) σε αιθανόλη και CO₂, αλλά παράγει επίσης μεταβολίτες που έχουν θετική επίδραση στις αισθητηριακές ιδιότητες του οίνου. Όλες οι διαθέσιμες ζύμες *S. cerevisiae* του οίνου παράγουν παρόμοιες αποδόσεις αιθανόλης, με αποτέλεσμα συγκρίσιμες συγκεντρώσεις αλκοόλης κατά τη ζύμωση του ίδιου γλεύκους (Ruiz1 et al. 2018).

2.3 ΓΕΝΙΚΗ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΥΠΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΣΥΡΤΙΚΟΥ

ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Από οινοποιητική άποψη, αποτελεί μία από τις ευγενείς λευκές ποικιλίες του ελληνικού αμπελώνα και έχει αξιολογηθεί από πολλούς ξένους ειδικούς ως η σημαντικότερη λευκή μη μοσχάτη ελληνική ποικιλία, η οποία μπορεί να δώσει πολλούς τύπους οίνων, με ιδιαίτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειάς της. Ακολουθεί, το Μοσχοφίλερο, στις προτιμήσεις των Ελλήνων για λευκές ποικιλίες -οι τάσεις όμως είναι ανοδικές, όπως δείχνουν πρόσφατες έρευνες. (Ασύρτικο, Οινοχόος τεύχος 59 Δεκέμβριος 2020). Η υψηλή οξύτητα που παρουσιάζει το σαντορινιό ασύρτικο, οφείλεται στο έδαφος, λόγω της μειωμένης απορρόφησης καλίου και στο κλίμα με τις λίγες βροχές. Οι ισχυροί άνεμοι μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της φωτοσύνθεσης, με αποτέλεσμα η διαδικασία της ωρίμανσης να επιβραδύνεται και τα επίπεδα της οξύτητας να παραμένουν υψηλά. (Σταυρακάκης, 2010). Το Ασύρτικο δίνει οίνους υψηλόβαθμους δωρικούς, ευγενείς, με υψηλή την οξύτητα να το ισορροπεί και να του δίνει σκελετό, εξασφαλίζοντάς του δροσερή επίγευση. Αυτός ο συνδυασμός είναι σπάνιος για λευκή μεσογειακή ποικιλία. Οι οίνοι από Ασύρτικο χαρακτηρίζονται από τη ζωηρή, πλούσια και γεμάτη γεύση και την ιδιαίτερη μύτη ήπια αρωματικά, πιο μεταλλική και γήινη στη Σαντορίνη, έντονα φρουτώδη και ανθώδη στην ηπειρωτική και ιδιαίτερα στη Βόρεια Ελλάδα. Ειδικότερα, η ποικιλία Ασύρτικο προσδίδει στους οίνους απαλό πρασινοκίτρινο χρώμα με πλούσια φρουτώδη γεύση, ευχάριστη οξύτητα, λιπαρότητα και εξαιρετική αρμονία και μακρά επίγευση (Κουράκου – Δραγώνα, 2003, 2015).

Το γλεύκος που λαμβάνεται από τα σταφύλια της ποικιλίας Ασύρτικο είναι πλούσιο σε σάκχαρα και περιέχει αρκετά οξέα και άφθονες, για λευκή ποικιλία ταννοειδείς ουσίες, γι' αυτό χρειάζεται προσοχή στην οινοποίηση προς αποφυγή οξειδώσεων, διότι έχει αυτή την τάση.

Ο πολυδυναμικός αυτός χαρακτήρας της ποικιλίας έδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα σε ολόκληρο τον Ελλαδικό χώρο, εκτός της Σαντορίνης, με αρχικό προορισμό την Χαλκιδική και έπειτα την Μακεδονία και την Πελοπόννησο. Σε αυτές τις περιοχές, χαρίζει οίνους με εντονότερα πρωτογενή αρώματα φρούτων και λιγότερο πυκνή δομή, που μπορεί να μην έχουν το *terroir* Σαντορίνης, αλλά δεν υστερούν καθόλου σε ποιότητα και ενδιαφέρον. Το Ασύρτικο, επομένως, με τη σαντορινιά καταγωγή βρίσκει εξαιρετικά *terroir* και στην ηπειρωτική Ελλάδα, για να ευδοκιμήσει και να εκφράσει τον νέο του ορεινό αντισυμβατικό χαρακτήρα. Στη Σαντορίνη, όπου το ηφαιστειογενές έδαφος φτωχό σε οργανική ουσία και μέταλλα (κάλιο), πλούσιο όμως σε «ορυκτά» και το ιδιαίτερο μικροκλίμα, το Ασύρτικο προκύπτει μετρημένο και ευγενικό ταυτόχρονα, ενώ οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες συμβάλλουν στην απόκτηση έντονη ορυκτότητας. Και στον πρώιμο ή τον οψιμότερο τρύγο, ο χαρακτήρας του αναδεικνύεται μοναδικός. Αντιθέτως, στις ορεινές περιοχές, όπως το Αμύνταιο, το ηπειρωτικό κλίμα με τις ζεστές μέρες και τις δροσερές νύχτες κατά τη διάρκεια του περκασμού επιτρέπει στην ποικιλία να εξελιχθεί αργά. Η παρατεταμένη ωρίμανση βοηθάει στη διατήρηση των αρωμάτων λουλουδιών και

φρούτων, που δίνουν ένα μοναδικό ασύρτικο βουνού με περισσότερες νότες φρούτου και πιο έντονη την ανθική του πλευρά, με μια ιδιαίτερη για την περιοχή «αλμυρότητα».

Οι λάτρεις των σύνθετων και έντονων οίνων σίγουρα γοητεύονται από τη συγκεκριμένη ποικιλία που εστιάζει στη δομή, στο εκχύλισμα και στο γευστικό όγκο και λιγότερο στον αρωματικό χαρακτήρα.

Σύμφωνα με έρευνες που είχαν πραγματοποιηθεί στα πλαίσια του προγράμματος «Οίνος Και Υγεία» από το Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών (Εργαστήριο Χημείας), σε συνεργασία με το τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και το τμήμα Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η ποικιλία Ασύρτικο, αν και είναι λευκή, έχει υψηλό πολυφαινόλικο περιεχόμενο, άρα ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα, ανάλογη με το κόκκινο κρασί. Η συγκεκριμένη ποικιλία έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει σε σημαντικό ποσοστό την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στο ήπαρ, ενώ σταματά πλήρως τη διαδικασία της αγγειογένεσης που έχει συνδεθεί με τη δημιουργία ποικίλων παθολογικών καταστάσεων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και οι καρκινικές μεταστάσεις. Μάλιστα ο καθηγητής της έρευνας, πρότεινε να αξιοποιηθούν οι ιδιότητες αυτές του Ασύρτικου με τη δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής και καλλυντικών από σταφύλια της ποικιλίας (Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007).

ΌΨΗ

Έντονο, πολύ ανοιχτόχρωμο λευκό κρασί με ασυμβίβαστο χαρακτήρα σε κάθε έκφρασή του μέσα στον χρόνο. Το Ασύρτικο χαρακτηρίζεται από ανοιχτές χρυσές έως πρασινοκίτρινες ανταύγειες. Λευκό κρασί με έντονο λεμονιό χρώμα στη νιότη του, όταν πρόκειται για ασύρτικο δεξαμενής. Τα βαρελάτα κρασιά, αλλά και αυτά που έχουν παλαιώσει χαρακτηρίζονται από πιο βαθύ κίτρινο και κεχρμιπαρένιο χρώμα. Ένα γύρισμα του οίνου στο ποτήρι, θα δώσει δάκρυα μέτριας πυκνότητας, αλλά με αργή ροή, μαρτυρώντας τον υψηλό αλκοολικό βαθμό.

ΑΡΩΜΑ

Το Ασύρτικο δίνει οίνους αυστηρούς και σικάτους, με υψηλό αλκοολικό βαθμό, υψηλές οξύτητες, με ιδιαίτερο χαρακτήρα και αρωματικό δυναμικό, όπου κυριαρχούν άνθη εσπεριδοειδών μαζί με φρούτα με κρυστάλλινη καθαρότητα, «νέυρο» και φρεσκάδα. Οι οίνοι χαρακτηρίζονται, σε αντίθεση με την αίσθηση που χαρίζει στο στόμα, από τον ήπιων τόνων διακριτικό αρωματικό χαρακτήρα τους, όπου, αναλόγως με τα εδάφη και την περιοχή που καλλιεργείται, **το φρούτο αναδύει νότες εσπεριδοειδών (μπορούν να διακριθούν σε λεμόνι, grape fruit, ξύσμα πορτοκαλιού), πράσινου μήλου ή άγουρου ροδάκινου, ενώ ο μεταλλικός (mineral) χαρακτήρας στο φόντο θα ολοκληρώσει την μεθυστική διαδρομή από την μύτη στον ουρανίσκο. Όσο είναι φρέσκο, κυριαρχούν αρώματα κίτρινων φρούτων, όπως λεμονιού, κίτρου, άλλων εσπεριδοειδών, φλούδες πορτοκαλιού και των ανθών τους** (Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007) (Οινοχόος τεύχος 59), είναι εμφανή με ένα στροβίλισμα στο ποτήρι φυσικά ορυκτά ιδιαίτερα στα δείγματα της Σαντορίνης. Το Ασύρτικο ερμηνεύει με τρόπο μοναδικό το ιδιαίτερο terroir του ηφαιστιογενούς νησιού της Σαντορίνης, όπου παράγονται εξαιρετικά δείγματα της ποικιλίας με έντονα πετρώδη αρώματα, χαρακτηριστική είναι η μεταλλικότητα και η ορυκτότητα, που διακρίνεται κυρίως σε αυτά της Σαντορίνης, λόγω του ηφαιστιογενούς εδάφους και των υπόλοιπων κλιματολογικών συνθηκών. Προσφέρει εντυπώσεις που ξεφεύγουν πολύ από το μέσο, «εμπορικά θελκτικό» ξηρό λευκό κρασί, ενώ είναι πολύ φιλικό με το φαγητό, ιδίως με το ψητό ψάρι, οστρακοειδή και τα θαλασσινά.

ΓΕΥΣΗ - ΕΠΙΓΕΥΣΗ

Στο στόμα παραμένει έντονο και εξίσου πολύπλοκο και απολαυστικό. Το Ασύρτικο απευθύνεται σε άτομα που αναζητούν λευκά κρασιά με αντισυμβατικό, έντονο στιβαρό στυλ και εστιάζουν στη δομή και την πυκνότητα στόμα, η οποία συνδυάζεται υπέροχα με τη λεπιδωτή υψηλή οξύτητα, τη γενναιόδωρη αλκοόλη (συνήθως έχει υψηλό αλκοολικό τίτλο), η οποία προσφέρει όγκο στο στόμα και τη μεταλλικότητα, σε ένα σπάνιο σύνολο. Χαρακτηρίζεται από στυφάδα στο τελείωμα και, συνήθως, μακρά επίγευση. Κυριαρχεί πλούσια φρουτώδης και εκρηκτική, λόγω οξύτητας γεύση, με άρωμα εσπεριδοειδών (λεμόνι) και φρούτων (πράσινο μήλο, ανανάς).

Έντονη αίσθηση ορυκτότητας χαρακτηρίζει, κυρίως, τα Ασύρτικα της Σαντορίνης, καθώς η ποικιλία έχει την ικανότητα να εκφράζει με ένταση το terroir, αποδίδοντας τα χαρακτηριστικά του μέσα από γεύσεις και αρώματα (φρέσκων κίτρινων φρούτων και εσπεριδοειδών, νύξεις από φύλλα τσαγιού, ορυκτώδεις και μεταλλικές χροιές). Το Ασύρτικο είναι η κύρια ποικιλία που χρησιμοποιείται στην παραγωγή των σαντορινιών γλυκών οίνων Vinsanto, που θεωρούνται παγκοσμίως,

από τα εκλεκτότερα επιδόρπια κρασιά. Με λιάσιμο των σταφυλιών, επιτυγχάνεται ημίγλυκο, παχύ, πλούσιο στο στόμα, με άρωμα σοκολάτας, καφέ και λικέρ βύσσινο, έχει σκούρο μελί χρώμα.

ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΠΑΛΑΙΩΣΗΣ

Πλούσιο και γεμάτο είναι στο στόμα, με μεταλλικότητα και έντονα λαμπερή φρεσκάδα του οφείλεται στη λεπιδωτή τυπική οξύτητα που χαρακτηρίζει όλα τα καλά ασύρτικα κρασιά, ένα στοιχείο κλειδί για την εξέλιξή τους μέσα στον χρόνο. Με τη δυναμική της παλαίωσης να έχει ως οδηγό αυτά τα χαρακτηριστικά που του χαρίζουν ανθεκτικότητα και το καθιστούν, μια από τις λίγες ελληνικές λευκές ποικιλίες που έχουν την δυνατότητα να εξελίσσονται μέσα στο χρόνο γευστικά και να αναδεικνύονται και μέσω της παλαίωσης στις κατάλληλες συνθήκες κάνοντάς το ακόμη πιο ιδιαίτερο και έντονο και η αρωματικότητά του γίνεται όλο και πιο πολύπλοκη. Όλα τα ξηρά ασύρτικα, τόσο τα δεξαμενής, όσο και αυτά που ωριμάζουν σε βαρέλι, κυρίως δρύινο, παλαιώνουν με ασφάλεια για πέντε ή ακόμα και δέκα χρόνια, μερικές φορές πολύ περισσότερο. Η δρυς ταιριάζει πολύ σε αυτήν την ποικιλία. Η ζύμωση του οίνου μέσα σε βαρέλι, η ωρίμανσή του μαζί με τις οινολάσπες (sur lie), ακόμη και η πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, συμβάλλουν στο κτίσιμο της προσωπικότητάς του. Έτσι, τα «βαρελάτα» ασύρτικα είναι περισσότερο πληθωρικά, αποπνέουν νότες μελιού, κηρύθρας και μαρμελάδας φρούτων, όπως ώριμο βερίκοκο, ανανάς, γκρέιπφρουτ, ροδάκινο, μάνγκο, ενώ και νύξεις από νυχτολούλουδο, γιασεμί και διάφορα βότανα, συνδυάζονται επιπλέον με αρώματα παλαίωσης, όπως ο βουτυράτος γευστικός πλούτος που αποκτά αποτελεί ακόμη ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του. Τέλος, τα γλυκά ασύρτικα θεωρούνται «αιώνια», αφού, ο χρόνος όχι μόνο δεν τα κουράζει, αλλά θεωρείται πως τα βελτιώνει.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

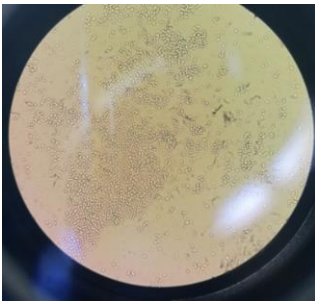
3.1.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τέσσερα στελέχη ζυμομυκήτων. Δύο εκ των τριών στελεχών non-Saccharomyces που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία, προέρχονται από τράπεζα του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «Δήμητρα» και αποτελούν γηγενείς ζύμες που απομονώθηκαν από αμπελώνες της Σαντορίνης το έτος 2018. Τα υπόλοιπα δύο στελέχη άγριων ζυμών ανήκουν στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (FMCC - AUA).

A. *Metschnikowia pulcherrima*

Ο μικροοργανισμός αυτός ανήκει στην τράπεζα στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων - ΓΠΑ.

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε είναι το *Metschnikowia pulcherrima* LFMB 1.

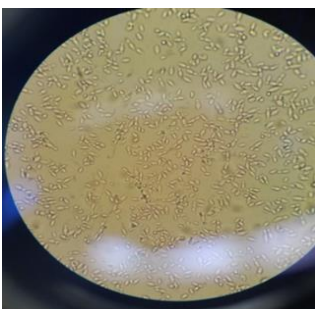


Εικόνα 38. *M. pulcherrima* Strain LFMB1. Φωτογραφία μικροσκοπίου από ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα

B. *Hanseniaspora uvarum*

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός απομονώθηκε από τη Σαντορίνη το έτος 2018 - ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ».

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε είναι το *Hanseniaspora uvarum* OST1BFW1.

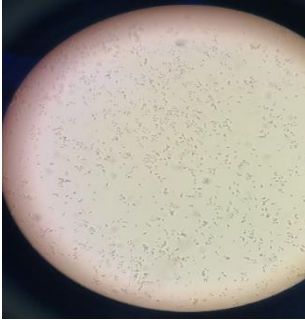


Εικόνα 39. *H. Uvarum* Strain OST1BFW1. Φωτογραφία μικροσκοπίου από ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα

C. *Hanseniaspora guilliermondii*

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός απομονώθηκε από τη Σαντορίνη το έτος 2018 - ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ».

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε είναι το *Hanseniaspora guilliermondii* OSP1BFW12.



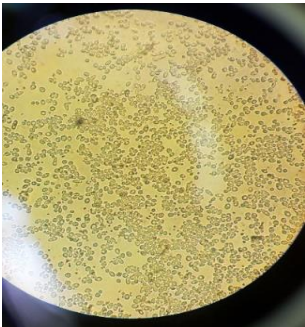
Εικόνα 40. *H. guilliermondii* Strain OSP1BFW12. Φωτογραφία μικροσκοπίου από ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα

Τα συγκεκριμένα στελέχη του γένους *Hanseniaspora* επιλέχθηκαν προς μελέτη, διότι σύμφωνα με έρευνες είναι οι επικρατούσες άγριες γηγενείς ζύμες που απαντώνται στους φλοιούς των σταφυλιών της Σαντορίνης. Το γλεύκος που χρησιμοποιήθηκε για τις πειραματικές μικροοινοποιήσεις είναι ποικιλίας Ασύρτικο. Ο οίνος αυτός αποτελεί μια κλασική αποτύπωση της ποικιλίας και της προέλευσής του, καθώς το Ασύρτικο κυριαρχεί στον οίνο ΠΟΠ Σαντορίνη.

D. *Saccharomyces cerevisiae*

Ο μικροοργανισμός αυτός ανήκει στην τράπεζα στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων - ΓΠΑ.

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε είναι το *Saccharomyces cerevisiae rhone* (**στέλεχος αναφοράς**).



Εικόνα 41. *S. cerevisiae* Strain rhone. Φωτογραφία μικροσκοπίου από ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα

Συγκεκριμένα, το στέλεχος *Metschnikowia pulcherrima* διατηρείτο σε ψυγειοθάλαμο του εργαστηρίου Μικροβιολογίας, στους 4 °C σε Slants (Incubator, Sanyo). Πριν τη χρήση του σε υγρή προκαλλιέργεια για να διασφαλισθεί η ζωτικότητα του έγινε αναγέννηση του μικροοργανισμού με εμβολιασμό του υπό ασηπτικές συνθήκες σε καινούρια Slants (slant, δοκιμαστικός σωλήνας με αποστειρωμένο YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar) θρεπτικό υλικό υπό κλίση: Γλυκόζη 10g/L, Πεπτόνη 10 g/L, Εκχύλισμα ζύμης 10 g/L, Άγαρ 20 g/L.).

Οι μικροοργανισμοί *Hanseniaspora uvarum* και *Hanseniaspora guilliermondii* στάλθηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας από το ΕΛΓΟ «Δήμητρα» ανεπτυγμένοι σε τρυβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα YPDA και προκειμένου να μελετηθούν, εμβολιάστηκαν σε Slants.

Στα προς μελέτη στελέχη, έλαβε χώρα εμβολιασμός/αναγέννηση σε Slants υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια κρίκου από τρυβλίο ή το παλιότερο slant και αφέθηκαν προς επώαση σε θερμοστατούμενο κλίβανο (Memmert) στους 30±1°C για 24 - 48h (αναλόγως το μικροοργανισμό).

Ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae rhone*, ο οποίος βρισκόταν σε αδρανή κατάσταση υπό συνθήκες κατάψυξης στους -80 °C σε cryovial με κρυοπροστατευτικό διάλυμα γλυκερόλης 30% (v/v), απομακρύνθηκε από την βαθιά κατάψυξη και όταν ήλθε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ασηπτικές συνθήκες εμβολιάστηκε σε υγρή προκαλλιέργεια. Για να ενεργοποιηθεί πλήρως, ο σακχαρομύκητας χρειάστηκε ανάπτυξη σε δύο διαδοχικές υγρές προκαλλιέργειες με τη διαδικασία αναγέννησης. Συνοπτικά, η διαδικασία έχει ως εξής: το περιεχόμενο του cryovial αδειάζεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε μια κωνική φιάλη που περιέχει αποστειρωμένη υγρή προκαλλιέργεια, τοποθετείται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (shaker) στους 30±1°C, με ρυθμό 180±5 rpm και έπειτα από 48h περίπου, εμβολιάζεται, με 1ml αυτής, η νέα υγρή προκαλλιέργεια των 50ml (1ml εμβόλιο / 50ml υγρής καλλιέργειας).



Εικόνες 42. α) (Αριστερά) Δημιουργία Slants, β) (Δεξιά) Τοποθέτηση εμβολιασμένων Slants σε επωαστή (θ ≈ 30°C) προς ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Τέλος, όλα τα στελέχη, ώστε να διατηρηθούν, τοποθετούνται υπό ψύξη στους 4 °C (προσωρινή αποθήκευση). Η ανανέωση των μικροοργανισμών πραγματοποιούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα κάποιων μηνών, προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για να χρησιμοποιηθούν σε υγρή προκαλλιέργεια, τα εμβολιασμένα slants, που βρίσκονται ήδη στη συντήρηση, αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή ιδανικά για λίγη ώρα στον θερμοστατούμενο κλίβανο.

3.1.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά, έγινε επιλογή συγκεκριμένων στελεχών ζυμών *Saccharomyces* και *non*, καθώς και τα απαραίτητα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης και η σύνθεσή τους, όπως συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης και γλεύκος ποικιλίας ασύρτικο υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων. Διερευνήθηκε η αλκοολική ζύμωση σε κλειστές καλλιέργειες υπό αερόβιες, έως ημιαερόβιες συνθήκες. Η διεργασία αυτή της μετατροπής (κατανάλωση) των σακχάρων του υποστρώματος προς παραγωγή προϊόντων, όπως η αιθανόλη, η γλυκερόλη, τα αρωματικά συστατικά, όπως εστέρες και ανώτερες αλκοόλες, καθώς και το παραγόμενο SO₂ από τις ζύμες κ.α., μελετήθηκαν για τέσσερα είδη ζυμομυκήτων. Επομένως, η πειραματική διαδικασία αποτελείται από δύο κυρίως μέρη, την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε συνθετικό μέσο γλυκόζης και αυτήν σε γλεύκος ασύρτικο παστεριωμένο και μη. Με το δεύτερο μέρος να απαρτίζεται από τέσσερις επιμέρους κύκλους πειραματικής μικροοινοποίησης (υπό ίδιες σταθερές συνθήκες). Ακολουθεί σύντομη περιγραφή των πέντε πειραματικών κύκλων.

- A. Στο πρώτο μέρος, έλαβαν χώρα αλκοολικές ζυμώσεις με τα τρία στελέχη άγριων ζυμών, που αναφέρονται αναλυτικά στην υποενότητα του ειδικού θεωρητικού 2.2, *M.pulcherrima*, *H.uvaruma* και *H.guilliermondii*, σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης (70g/l με μικρές διαφοροποιήσεις), υπό αερόβιες συνθήκες (χωρίς αερισμό, επομένως θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ημιαερόβιο το περιβάλλον της ζύμωσης του γλεύκους, σε κωνικές φιάλες με πόμα βαμβακιού – όχι ανοιχτές στο περιβάλλον) προς μελέτη των βιοχημικών χαρακτηριστικών τους. Αφορά τη διερεύνηση της κινητικής του κάθε μικροοργανισμού σε συνθετικό μέσο, καθώς συνιστά την πρώτη προσπάθεια «σκιαγράφησης» των στελεχών και των ρυθμών ανάπτυξης τους (κατανάλωση σακχάρου – παραγωγή αιθανόλης) σε συνθήκες οινοποίησης. Συγκεκριμένα, διεξήχθησαν οι εξής αναλύσεις: προσδιορισμός παραγόμενης ξηρής βιομάζας, παραγόμενων ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους συγκέντρωση οξυγόνου, κατανάλωση σακχάρων, παραγωγή αιθανόλης και δευτερογενών μεταβολιτών κυρίως μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Έλαβαν χώρα τρεις επαναλήψεις πειραμάτων ζύμωσης για κάθε μικροοργανισμό, όπου ακολουθήθηκαν πανομοιότυπες διεργασίες και συνθήκες ζύμωσης (t εμβολιασμού, θρεπτικό υπόστρωμα, κ.ά.).
- B. Έπειτα, ακολούθησε το δεύτερο μέρος των πειραμάτων, που αποτελεί τον πρώτο κύκλο πειραματικής μικροοινοποίησης παστεριωμένου γλεύκους και τη μετάβαση από το συνθετικό μέσο σε πραγματικό γλεύκος, που αφορά το πεδίο ενδιαφέροντος. Πραγματοποιήθηκε παστερίωση και παραλαβή σημείου υπό ασηπτικές συνθήκες, για να καταστεί δυνατή η μικροβιακή μελέτη ανάπτυξης του κάθε στελέχους (κινητική) σε γλεύκος απαλλαγμένο από οποιονδήποτε ξένο μικροοργανισμό πέραν του εμβολίου εκκίνησης, Έλαβε χώρα, υπό αερόβιες συνθήκες (έως και ημιαερόβιες λόγω του ότι οι φιάλες καθ' όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ήταν κλειστές με βαμβάκι) με τα ίδια στελέχη όπως στον πρώτο κύκλο, και επιπλέον του στελέχους *S.c.thone*, ως εμβόλιο εκκίνησης μονοκαλλιέργειας.
- C. Κατά τον δεύτερο κύκλο, πραγματοποιήθηκε μικροοινοποίηση γλεύκους (μη παστεριωμένο) ποικιλίας ασύρτικο, υπό αερόβιες συνθήκες (ανοιχτές φιάλες στο περιβάλλον) με τα ίδια στελέχη ως εμβόλιο. Με αυτόν τον τρόπο είναι πιο άμεσος ο αντικατοπτρισμός της βιομηχανίας οίνου (κανένα οινοποιείο δεν παστεριώνει το γλεύκος). Σε αυτή τη πειραματική φάση, επιλέγεται το στέλεχος (άγρια ζύμη) με την καλύτερη πορεία, ώστε να ακολουθήσει πείραμα διαδοχικού εμβολιασμού με σακχαρομύκητα.
- D. Στον τρίτο κύκλο, έλαβε χώρα μικροοινοποίηση παστεριωμένου γλεύκους ποικιλίας ασύρτικο, υπό αερόβιες συνθήκες (έως και ημιαερόβιες) με τη στρατηγική του διαδοχικού εμβολιασμού. Αρχικά, ο εμβολιασμός του παστεριωμένου γλεύκους πραγματοποιήθηκε με μία εκ των τριών άγριων ζυμών (*non-Saccharomyces*) ως εκκίνητη της ελεγχόμενης αλκοολικής ζύμωσης και έπειτα από κάποιες ημέρες ο ίδιος σακχαρομύκητα εμβολιάστηκε σε όλα τα εν ζυμώσει γλεύκη. Η λήψη του δείγματος για την καθημερινή παρακολούθηση της αλκοολικής ζύμωσης γινόταν ασηπτικά. Η οινοποίηση αυτή αποτέλεσε προσπάθεια δημιουργίας πρωτοκόλλου ζύμωσης (άγρια ζύμη και σακχαρομύκητας, χρόνου εμβολιασμών κ.ά.) και επιλογής βέλτιστων συνθηκών και μικροοργανισμών με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.
- E. Στον τέταρτο κύκλο, πραγματοποιήθηκε μικροοινοποίηση υπό αερόβιες συνθήκες (όχι αερισμός), πάλι με τον ίδιο διαδοχικό εμβολιασμό (με διαφορά λίγων ημερών ως ενδιάμεσου χρόνου καθυστέρησης), αλλά σε μη παστεριωμένο γλεύκος αυτή τη φορά. Αρχικά, ο εμβολιασμός του γλεύκους πραγματοποιήθηκε με μία εκ των τριών άγριων ζυμών (*non-Saccharomyces*) και έπειτα από κάποιες ημέρες ο ίδιος σακχαρομύκητα χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο εμβόλιο (όπως ακριβώς στο τέταρτο μέρος). Ακολούθησαν οι απαραίτητες οινολογικές αναλύσεις και προσδιορισμός των αρωματικών ενώσεων των παραγόμενων πειραματικών οίνων με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία μάζας (GC-MS). Τέλος, διεξήχθη οσφρητικός οργανοληπτικός έλεγχος των τελικών προϊόντων (επιλογή Γ' και Δ' κύκλου και ως οίνος αναφοράς – ασύρτικο'19), σύγκριση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

3.1.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

3.1.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Τα στελέχη παραλαμβάνονται από την στερεή καλλιέργεια, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 2.1, και αναπτύσσονται αρχικά σε προκαλλιέργεια για 24 - 48h, όπου και παρατηρείται έντονο θόλωμα.

Η προκαλλιέργεια αποτελείται από αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPD (Yeast Peptone D-glucose), το οποίο εμβολιάζεται υπό ασηπτικές συνθήκες με την εκάστοτε προς μελέτη ζύμη. Για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου προκαλλιέργειας προστίθενται σε απιονισμένο νερό τα παρακάτω αντιδραστήρια : 20 g/L γλυκόζη (glucose, Carlo Erba, Chaussée du Vexin, France), 10 g/L πεπτόνης (bacteriological peptone, Conda, Madrid, Spain) και 10 g/L εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, Conda, Madrid, Spain). Έπειτα, πραγματοποιείται η πλήρωση κωνικών φιαλών Erlenmeyer χωρητικότητας 250 mL κατά το 1/5 (50 mL) του όγκου τους.

Ακολουθεί αποστείρωση της υγρής προκαλλιέργειας, με τις κωνικές φιάλες να πωματίζονται με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινοχαρτο και να εισάγονται σε αυτόκαυστο (συνθήκες αποστείρωσης 1,5 atm, 121°C, 20 min). Στη συνέχεια, όταν οι κωνικές φιάλες έλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γίνεται εμβολιασμός της υγρής αποστειρωμένης προκαλλιέργειας με κύτταρα του εκάστοτε στελέχους, από slant με βρόγχο ενοφθαλισμού - κρίκο (μια κρικιά) υπό ασηπτικές συνθήκες, με χρήση φλόγας εντός θαλάμου νηματικής ροής – UV/Laminar flow cabinet (Telstar Biological safety cabinet Bio II Advance).

Το τελευταίο βήμα είναι η τοποθέτηση των κωνικών φιαλών προς επώαση, υπό ανάδευση σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Shaker, Zhwy-211B Rocking Incubator) υπό σταθερές συνθήκες ανάδευσης σε θερμοκρασία 30±1°C, με ρυθμό 180±5 rpm για 24 – 48 h, μέχρι την εκθετική φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού (οι ώρες προέκυψαν από πειραματικά δεδομένα και βιβλιογραφικά).

Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα στελέχη με στόχο την αναγέννηση των μικροοργανισμών πριν τον εμβολιασμό τους στην εκάστοτε κυρίως καλλιέργεια. *M. pulcherrima*: 48 h προκαλλιέργεια, *H. uvarum* :30 h προκαλλιέργεια, *H. guilliermondii*: 30 h προκαλλιέργεια και *S.c. rhone*: 24 h προκαλλιέργεια.

Πριν τον εμβολιασμό των προκαλλιεργειών σε κυρίως καλλιέργειες με ποσότητα εμβολίου πάντα 1 ml ανα 50 ml υγρής προκαλλιέργειας, κάθε φορά πραγματοποιείται στο παρασκεύασμα μικροσκοπικός έλεγχος για την καθαρότητα της καλλιέργειας, την αποφυγή επιμολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς και την υγιή ανάπτυξη του επιλεγμένου στελέχους.



Εικόνα 43. α) Παρασκευή των προκαλλιεργειών σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml, με περιεχόμενο υγρό θρεπτικό μέσο 50 ml και προετοιμασία για αποστείρωση τους. Θα ακολουθήσει εμβολιασμός του αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου με τη βοήθεια συρμάτινου κρίκου από slant υπό ασηπτικές συνθήκες.



Εικόνες 44. α) Εμβολιασμός, υπό ασηπτικές συνθήκες, των κωνικών φιαλών που περιέχουν την αποστειρωμένη κυρίως καλλιέργεια με β) προκαλλιέργεια του κάθε στελέχους στην εκθετική του φάση, γ) με εμβόλιο: 1ml προκαλλιέργειας ανά 50ml καλλιέργειας

3.1.3.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΥΡΙΩΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Μετά το πέρας των ωρών που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί για να αναπτυχθούν στις προκαλλιέργειες και συγκεκριμένα να φτάσουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης, ακολουθεί η παρασκευή των κυρίως καλλιιεργειών σε κωνικές φιάλες των 250 ml. Η Σύσταση του Συνθετικού Θρεπτικού **υποστρώματος εμπορικών σακχάρων της Υγρής Κυρίως Καλλιιεργειας** ανά λίτρο απιονισμένου νερού (d H₂O) αποτελείται από γλυκόζη, ως μοναδική πηγή άνθρακα, σε συγκέντρωση 70 g L⁻¹ (glucose, Carlo Erba, Chaussée du Vexin, France). Επιπλέον, περιείχε ως πηγή αζώτου 5 g · L⁻¹ πεπτόνη (bacteriological peptone, Conda, Madrid, Spain) και 5 g · L⁻¹ εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, Conda, Madrid, Spain). Τέλος, στα αντιδραστήρια περιλαμβάνονται τα κάτωθι μεταλλικά άλατα, τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 15.

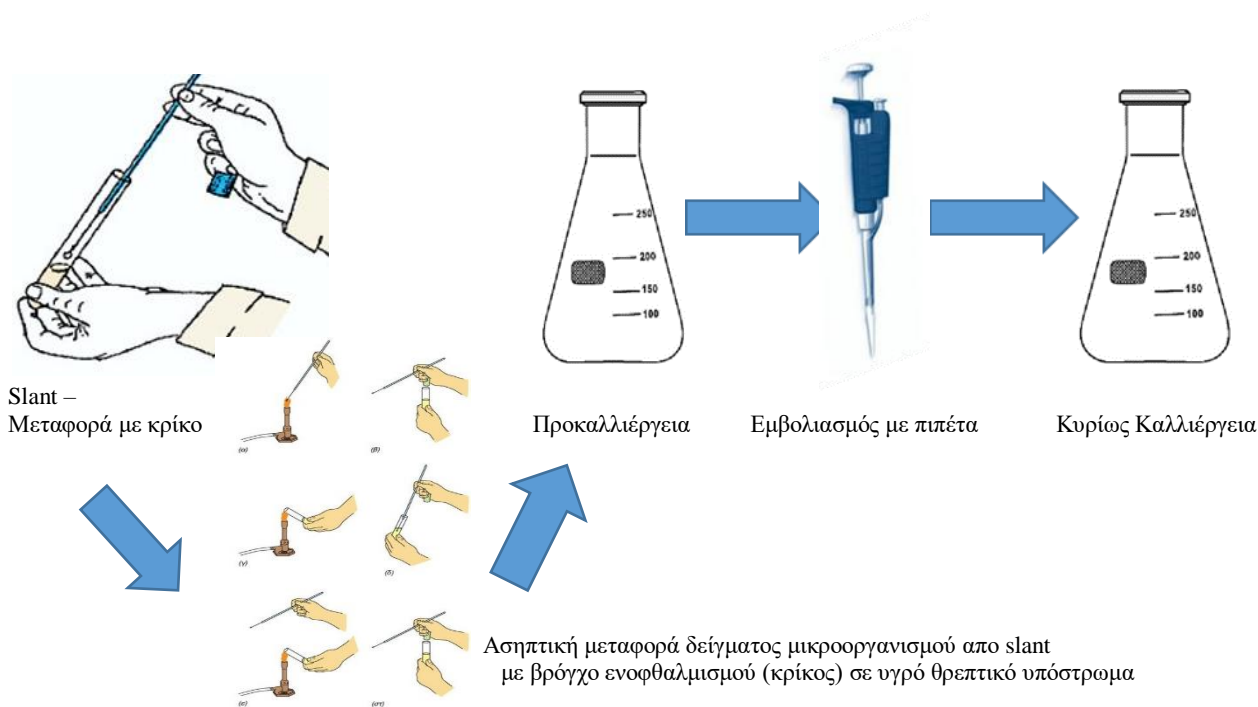
Πίνακας 15. Συγκεντρώσεις μεταλλικών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των κύριων καλλιιεργειών των προς μελέτη ζυμών (Papanikolaou et al., 2001).

Όνομασία	Συστικά	Συγκέντρωση (g · L ⁻¹)	Προέλευση
Άνυδρο φωσφορικό κάλιο	KH ₂ PO ₄	7,0	Penta, Radiová, Prague
Άνυδρο φωσφορικό δι-νάτριο	Na ₂ HPO ₄	2,5	Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France
Ένυδρο θειικό Μαγνήσιο	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	Honeywell Fluka, Seelze, Germany
Ένυδρος 3-χλωριούχος σίδηρος ή μολυσίτης	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,15	Honeywell Fluka, Seelze, Germany
Ένυδρο 2-χλωριούχο ασβέστιο	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15	Honeywell Fluka, Seelze, Germany
Ένυδρο θειικό μαγγάνιο	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,06	MERCK, Darmstadt Germany
Ένυδρος θειικός ψευδάργυρος	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	Mallinckrodt, Staines- upon-Thames United Kingdom

Η τιμή του **pH** του συνθετικού υποστρώματος κατά την διάρκεια των ζυμώσεων, σύμφωνα με τις οδηγίες που δόθηκαν, έπρεπε να παραμένει σταθερό, με τιμή ίση με **5±0,2**. Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα με πεχάμετρο τύπου HI-2211 (Hanna Instruments) και η διόρθωση με προσθήκη NaOH ή HCl, αναλόγως αν χρειαζόταν αύξηση ή μείωση.

Οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν με **ασυνεχή ζύμωση** σε κωνικές φιάλες των 250 ml που η καθεμία περιείχε 50ml κυρίως καλλιιεργειας αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση (η αποστείρωση έλαβε χώρα στο αυτόκλειστο ή χύτρα, όπως έχει προαναφερθεί) των κυρίως καλλιιεργειών και όταν ήλθαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ακολούθησε ο εμβολιασμός τους, **ασηπτικά**, με 1ml προκαλλιιεργειας (με τη χρήση πιπέτας) ανά κωνική φιάλη που περιείχε 50ml κυρίως καλλιιεργειας.

Η επώαση (ανάπτυξη) έλαβε χώρα, σε συνθήκες παρόμοιες με αυτή της προκαλλιιεργειας, σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο υπό σταθερές συνθήκες ανάδευσης σε θερμοκρασία 30±1°C, με ρυθμό 180±5 rpm. Η **παραλαβή σημείου** γινόταν ανά συγκεκριμένες ώρες που ορίστηκαν για κάθε μικροοργανισμό, ανάλογα με τις ώρες στις οποίες ολοκληρώνεται η ζύμωσή του υποστρώματος. Ανάλογα με το χρόνο επώασης, καθεμία από αυτές τις κωνικές φιάλες, αποτέλεσε σημείο της ανάπτυξης της μεταβολικής δραστηριότητας του κάθε μικροοργανισμού.



Εικόνα 45. Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας εμβολιασμού προκαλλιέργειας και κυρίως καλλιέργειας, υπό ασηπτικές συνθήκες

3.1.3.3 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΜΕ ΘΕΡΜΑΝΣΗ

Η μελέτη των μικροοργανισμών προϋποθέτει την απομόνωσή τους από το φυσικό περιβάλλον, όπου διαβιούν εντός μικτών πληθυσμών, και την καλλιέργειά τους στο εργαστήριο υπό ασηπτικές συνθήκες, δηλαδή απουσία κάθε άλλου μικροοργανισμού από το περιβάλλον της αύξησης. Αυτό είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί μόνο εφόσον τα χρησιμοποιούμενα για την απομόνωση και καλλιέργεια θρεπτικά υλικά και σκεύη είναι αποστειρωμένα. Αποστείρωση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί, είτε με την καταστροφή των κυττάρων με θέρμανση, ακτινοβολήση ή χημικά μέσα, είτε με απομάκρυνση των μικροοργανισμών με διήθηση (διήθηση της τάξης των μικρο- είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα διαδικασία, ειδικά για μεγάλες ποσότητες) και **πρόκειται για τη διαδικασία που απαλλάσσει θρεπτικά υλικά, αντικείμενα και χώρους από κάθε ζωντανό κύτταρο, σπόριο ή ιό.** Με τη χρήση εξάλλου αποστειρωμένων υλικών είναι δυνατή η πραγματοποίηση βιοδιεργασιών, με το επιθυμητό μικροβιακό στέλεχος. Η πλέον ανθεκτικές μορφές μικροοργανισμών είναι τα σπόρια (κυρίως λόγω διπικολιλικού ασβεστίου-συστατικό τοιχώματός τους) των θερμοφίλων βακτηρίων, τα οποία επιβιώνουν σε υπέρθερμο ατμό (134° C υπό πίεσι 30 psi). Κατά την έκθεση ενός μικτού μικροβιακού πληθυσμού (N) σε κάποιο μικροβιοκτόνο παράγοντα, ο ρυθμός καταστροφής των κυττάρων ακολουθεί κινητική αντιδράσεων πρώτης τάξης: $-dN/dt = k \cdot N$, όπου k σταθερά, η οποία καλείται ειδικός ρυθμός καταστροφής και είναι χαρακτηριστική του είδους και της φυσιολογικής κατάστασης του μικροβιακού πληθυσμού, καθώς επίσης και της φύσης του μικροβιοκτόνου παράγοντα. Η τιμή του ειδικού ρυθμού καταστροφής χρησιμοποιείται ως κριτήριο αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας των διαφόρων μικροβιακών παραγόντων ή ως κριτήριο ανθεκτικότητας ενός μικροβιακού πληθυσμού σε διάφορους παράγοντες.

Η θέρμανση αποτελεί τον πλέον αποτελεσματικό τρόπο αποστείρωσης, δηλαδή μέθοδο καταστολής της μικροβιακής αύξησης. Η θερμότητα έχει μεγάλη διεισδυτικότητα και δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα. Η δράση της οφείλεται στη μετουσίωση των βιολογικών μορίων και στην καταστροφή της δομής του κυττάρου. Η αποστείρωση με υπέρθερμο ατμό είναι ταχύτερη σε σύγκριση με την αποστείρωση με ξηρή θερμότητα, επειδή ο ατμός είναι καλός αγωγός της θερμότητας. Το αποτέλεσμα της θερμικής επεξεργασίας προσδιορίζεται από το συνδυασμό θερμοκρασίας και χρόνου έκθεσης. Όσο υψηλότερες θερμοκρασίες χρησιμοποιούνται, τόσο ταχύτερα καταστρέφονται τα μικροβιακά κύτταρα. Στην πράξη τα διάφορα μικροβιολογικά υλικά και εργαστηριακοί βιοαντιδραστήρες μικρού όγκου αποστειρώνονται σε αυτόκαυστα (autoclave) με τη χρήση υπέρθερμου ατμού υπό πίεση. Για μια επιτυχή αποστείρωση είναι απαραίτητη η εκδίωξη του αέρα από το θάλαμο αποστείρωσης. Δεδομένου ότι υπάρχει πάντα μια υστέρηση στη μετάδοση της θερμότητας από τον ατμό στα προς αποστείρωση υλικά, η περίοδος αποστείρωσης αρχίζει περίπου 10min μετά την επίτευξη της θερμοκρασίας αποστείρωσης στο θάλαμο και παρατείνεται 5min περίπου μετά τη διακοπή του ατμού. Μετά τη διακοπή

της παροχής ατμού, το αυτόκαυστο αφήνεται να ψυχθεί έως ότου η εσωτερική πίεση γίνει ίση με την ατμοσφαιρική. Οι μεγάλοι εργαστηριακοί βιοαντιδραστήρες και αυτοί της βιομηχανικής κλίμακας αποστειρώνονται επί τόπου (in situ) με θέρμανση του δοχείου ζύμωσης ή με διοχέτευση ατμού μέσα στο δοχείο και στις σωληνώσεις του βιοαντιδραστήρα (Αγγελής, 2017).



Εικόνα 46. Αυτόκαυστο εργαστηριακής κλίμακας (Αγγελής, 2017)

3.1.4 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΣΗΜΕΙΟΥ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, πραγματοποιήθηκε μία σειρά αναλύσεων για κάθε μικροοργανισμό. Οι αναλύσεις αυτές στοχεύουν στη διερεύνηση τόσο της ανάπτυξης, όσο και της μεταβολικής τους δραστηριότητας. Ακολουθεί σύντομη περιγραφή κάθε βήματος.



Εικόνα 47. α) Διαδικασία παραλαβής Σημείου με την πρώτη φυγοκέντρηση, όπου πραγματοποιείται διαχωρισμός ιζήματος β) (φαίνεται μέσα στα falcons) και υπερκείμενου υγρού που μεταφέρεται σε erpendorfs των 2ml προς ανάλυση HPLC.

3.1.4.1 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Αρχικά πραγματοποιείται έλεγχος καθαρότητας καλλιέργειας στο μικροσκόπιο (σε κάθε σημείο-φιάλη). Μεταφέρεται πολύ μικρή ποσότητα (1-2 σταγόνες ως νωπό παρασκεύασμα μικροσκόπησης) με μικροπιπέτα σε πολύ καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα, η οποία καλύπτεται με καλυπτρίδα στο σημείο με το υγρό προσέχοντας να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα και τοποθετείται στο μικροσκόπιο προς παρακολούθηση των κυττάρων. Ελέγχεται αν η καλλιέργεια είναι καθαρή και δεν έχει επιμολυνθεί με άλλους μικροοργανισμούς, όπως μύκητες και βακτήρια.



Εικόνα 48. α) β) Έλεγχος καθαρότητας καλλιέργειας στο μικροσκόπιο, γ) μεταφορά σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

3.1.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΡΗ ΣΤΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ, ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΗ ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ

Στις ζυμώσεις που θα παρουσιαστούν, το pH προσδιορίστηκε σε κάθε φιάλη-σημείο και έτσι προσδιορίστηκε σε όλη την κινητική του μικροοργανισμού. Το pH συνεχώς μειώνεται, αλλά μόλις σταθεροποιηθεί είναι ένδειξη ότι η ζύμωση έχει ολοκληρωθεί.

Αρχικά, το ηλεκτρόδιο ξεπλένεται με νερό βρύσης, η φιάλη αναδεύεται και τοποθετείται εντός του περιεχόμενου υγρού (με προσοχή να μην ακουμπήσει τον πάτο της φιάλης). Η τιμή του καταγράφεται για κάθε σημείο της κινητικής. Στα αρχικά πειράματα που έλαβαν χώρα σε συνθετικό υπόστρωμα, η τιμή του pH ρυθμίστηκε στην τιμή 5. Η διόρθωσή του έγινε, είτε με προσθήκη NaOH (αύξηση), είτε με προσθήκη HCl (μείωση). Το pH του θρεπτικού μέσου χρειάστηκε ελάχιστες φορές ρύθμιση με προσθήκη διαλύματος NaOH 5M.

Στα πειράματα μικροοινοποιήσεων δεν ήταν ελεγχόμενο το pH, αλλά ωστόσο παίρνονταν μετρήσεις για παρακολούθηση της πορείας της ζύμωσης.



Εικόνα 49. α) Προσδιορισμός pH β) pH-μετρο τύπου HI-2211 by Hanna Instruments.

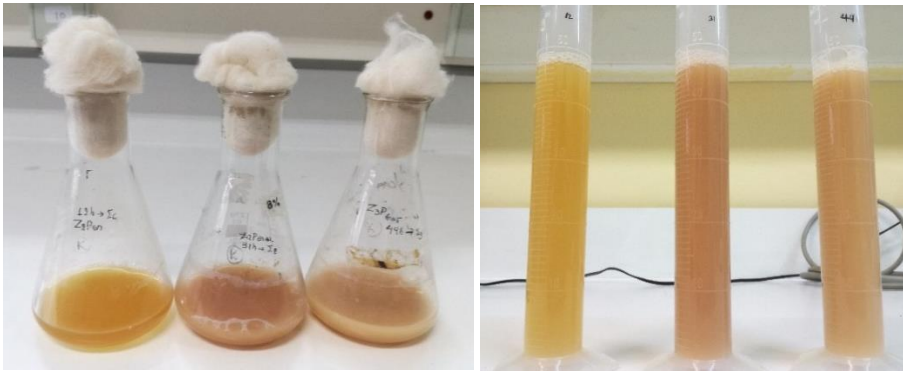
3.1.4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΑΣΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (DOT, % V/V, MG/L)

Η μέτρηση του διαλυμένου οξυγόνου για κυτταρική καλλιέργεια και ζύμωση προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας φορητό οξυγονόμετρο, το οποίο έφερε ένα επιλεκτικό ηλεκτρόδιο. Αρχικά, γινόταν εκπλύση του ηλεκτροδίου της οξυγονομέτρησης, με απιονισμένο νερό. Έπειτα, ενώ η φιάλη βρισκόταν μέσα στο shaker (ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο), η ανάδευση σταματούσε και το ηλεκτρόδιο τοποθετούταν μέσα στην κωνική φιάλη και το περιεχόμενό της, προσέχοντας να μην ακουμπήσει στον πάτο της, τυλίγοντάς το με το βαμβάκι που έχει ως πόμα μέχρι να σταθεροποιηθεί. Ακολούθως, γινόταν ενεργοποίηση της ανάδευσης, άνοιγμα του οξυγονόμετρου, ώστε να βγει η ένδειξη 100%, η οποία αν δεν εμφανισθεί μάλλον σημαίνει πως το ηλεκτρόδιο ακουμπάει στον πάτο της κωνικής φιάλης. Σταματάται πάλι η ανάδευση και ανά 5 sec παίρνεται μέτρηση (καταγραφή αντιστοιχίας μέτρησης - sec) μέχρι 30-35 sec περίπου. Οι τιμές λαμβάνονται επί % και σε ppm. Στη συνέχεια, πρέπει να γίνει η μετατροπή των ppm κάθε σημείου σε g/L (1 ppm= 1,001 g/L). Ξεπλένεται πάλι το ηλεκτρόδιο με απιονισμένο νερό και το περιεχόμενο της φιάλης χρησιμοποιείται για τις υπόλοιπες αναλύσεις (μέτρηση όγκου, pH, φυγοκέντρηση, κ.ά.). Οι τιμές των μετρήσεων του οξυγόνου που πάρθηκαν χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία DOT διαγράμματος (dissolved oxygen) x (sec), y (ppm) και **μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέτρηση κατανάλωσης οξυγόνου - ένδειξη παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα και ζωτικότητας του μικροοργανισμού, διότι αν έχει καταναλωθεί το οξυγόνο σημαίνει πως ο μικροοργανισμός έχει πεθάνει.**



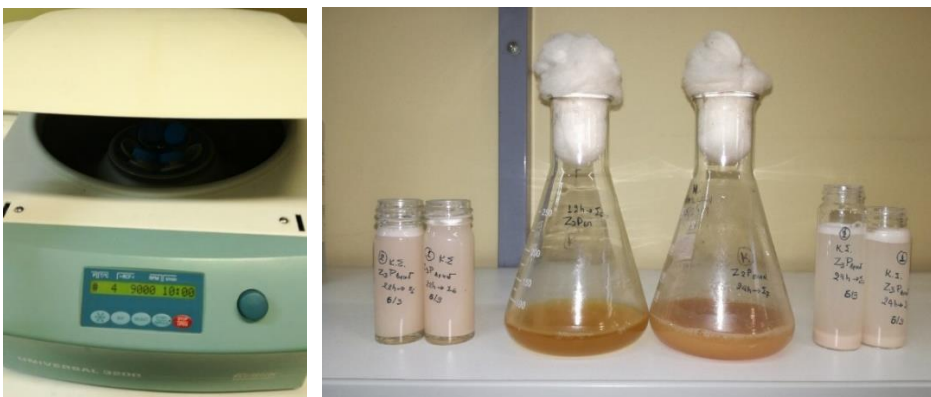
Εικόνα 50. α) β) Μέτρηση διαλυτού οξυγόνου με ηλεκτρόδιο Hanna Instruments.

3.1.4.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

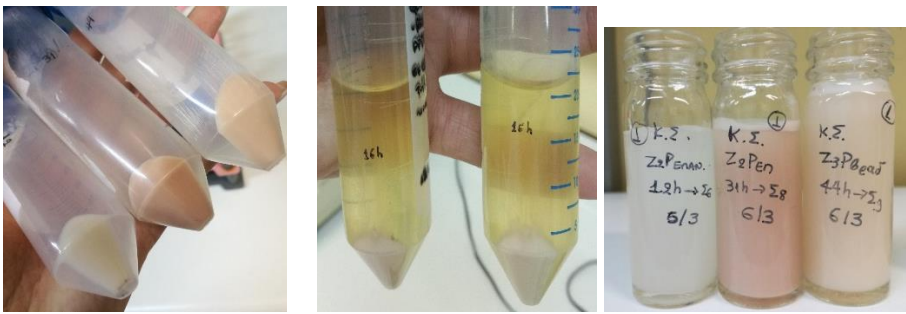


Εικόνα 51. α) γ) Ογκομέτρηση των κυρίως καλλιιεργειών, δηλ. του περιεχομένου των κωνικών φιαλών με έγχυση σε ογκομετρικό σωλήνα και καταγραφή των ml.

Ο προσδιορισμός της βιομάζας γίνεται με τη μέτρηση του ξηρού βάρους. Αρχικά, λαμβάνει χώρα η **μέτρηση** και καταγραφή του **όγκου** (ml) της υγρής καλλιέργειας της κάθε κωνικής φιάλης με ογκομετρικό κύλινδρο (δείγμα συγκεκριμένου όγκου). Επειτα, λαμβάνουν χώρα τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με τις ίδιες συνθήκες (πρόγραμμα ψυχόμενης φυγοκεντρώσης), που ως σκοπό έχουν το διαχωρισμό του θρεπτικού εν ζυμώσει υποστρώματος σε υπερκείμενο υγρό και ίζημα-βιομάζα (κατακρήμνιση κυττάρων). Στις οινοποιήσεις που δε λαμβάνεται όλο το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης, πριν τη λήψη του δείγματος (σημείο) γίνεται ανάδευση ή ανακίνησή της. Στην πρώτη φυγοκέντρωση πραγματοποιείται ισοσκελισμός του περιεχομένου της κωνικής φιάλης σε δύο falcons (πλαστικούς περιέκτες με καπάκι) με εξαιρετική ακρίβεια, στη συνέχεια τοποθετούνται εντός της φυγοκέντρου (Universal 320/320 R της εταιρείας Hettich Zentrifugen), αντιδιαμετρικά και γίνεται ρύθμιση του ανάλογου προγράμματος - 9000 rpm, 10 min, 4°C. Μετά το πέρας των 10 min, επιτυγχάνεται διαχωρισμός ιζήματος (βιομάζα κυττάρων στελέχους) και υπερκείμενου υγρού (υγρού καλλιέργειας). Το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται σε erpendorfs των 2ml και φυλάσσεται στην κατάψυξη για περαιτέρω αναλύσεις. Η ίδια διαδικασία με ισοστάθμιση του όγκου στα δύο falcons με απιονισμένο νερό πραγματοποιείται για άλλες δύο φορές, όπου το νερό μετά το πέρας των φυγοκεντρώσεων απορρίπτεται με σκοπό την διατήρηση μόνο των κυττάρων και όχι των εξωκυτταρικών μεταβολιτών που δύναται να είναι προσκολλημένοι σε αυτά. Μετά την τρίτη φυγοκέντρωση γίνεται έκπλυση με απιονισμένο νερό του ιζήματος, που αποτελεί την καθαρή βιομάζα του μικροοργανισμού, μέχρι να αποκολληθεί από τα τοιχώματα των falcon tubes και πραγματοποιείται συλλογή καθαρής βιομάζας σε δύο προζυγισμένα φιαλίδια Mc Cartney (ζυγός ακριβείας Ker new 420 – 3NM με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων). Τέλος, τοποθετούνται προς ξήρανση της εμπιερχόμενης βιομάζας σε φούρνο (τύπου Heraeus TA1) σε θερμοκρασία 80 °C (μέχρι σταθεροποίηση του βάρους του). Μετά τη ξήρανση, αφήνονται τα φιαλίδια εντός ξηραντηρίου (desiccator) να ψυχθεί (συνήθως μία ημέρα) και έπειτα πραγματοποιείται ζύγιση του φιαλιδίου που πλέον περιέχει την ξηρά βιομάζα. Από τη διαφορά των δύο μετρήσεων του βάρους που προκύπτει, η παραγόμενη βιομάζα (DW) εκφραζόμενη σε g/L.



Εικόνα 52. α) Φυγοκέντρος (φυγοκέντρος Universal 329 R) όπου έλαβαν χώρα οι φυγοκεντρήσεις του πειράματος και **β)** Κωνικές φιάλες με εμβολιασμένη υγρή καλλιέργεια. Το περιεχόμενό τους φυγοκεντρείται, η συλλογή της βιομάζας γίνεται με τη βοήθεια απιονισμένου νερού, τοποθετείται σε Mc Cartneys (τα φιαλίδια δεξιά και αριστερά των κωνικών) και έπειτα σε φούρνο προς ξήρανση.



Εικόνα 53.α) Ίζημα με βιομάζα των στελεχών μετά την τρίτη φυγοκέντρηση, **β)** υπερκείμενο υγρό και ίζημα μετά την πρώτη φυγοκέντρηση. **γ)** Συλλογή βιομάζας σε προζυγισμένα φιαλίδια Mc Cartney προς ζήρανση σε φούρνο α) των σημείων: 12h, 31h, 44h της επαναληπτική ζύμωσης του στελέχους *M.pulcherrima*.

Οι αναλύσεις του δείγματος (σημείο) που λαμβάνουν χώρα περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

3.1.5 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

Βιομάζας

Προσδιορισμός Ενδοκυτταρικών Πολυσακχαριτών (IPS)

Προσδιορισμός Ενδοκυτταρικού Λίπους (L)

Αναλύσεις Υπερκείμενου υγρού

Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων - μέθοδος DNS (κατά τα πειράματα σε συνθετικό υπόστρωμα)

Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Σακχάρων – Αιθανόλης και γλυκερόλης (και οξέων) με τη μέθοδο HPLC (κατά τα πειράματα σε γλεύκος)

Προσδιορισμός πτητικών ενώσεων με τη μέθοδο GC-MS (στην οινοποίηση με διαδοχικό εμβολιασμό)

Οινολογικές αναλύσεις (περιλαμβάνουν και τον προσδιορισμό ολικού SO₂ ο οποίος πραγματοποιήθηκε και στα πειράματα σε συνθετικό υπόστρωμα και στο τέλος των αλκοολικών ζυμώσεων γλεύκους).

3.1.5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (IPS)

Η ολική συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (Intra-cellular polysaccharides, IPs) υπολογιζόταν ποσοτικά στην εκάστοτε ζύμωση με βάση το τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου Liang et al. (2009). Στον προσδιορισμό των παραγομένων από τους μικροοργανισμούς, ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, ως δείγμα χρησιμοποιείται ποσότητα 0,05 g από την ξηρά βιομάζα του μικροοργανισμού, η οποία τοποθετείται σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες. Προστίθεται σε αυτό, διάλυμα 10ml HCl 2M για όξινη υδρόλυση σακχάρων και το στατό εμβαπτίζεται σε υδατόλουτρο μέχρι την κάλυψη του περιεχομένου των δοκιμαστικών σωληνίων (Water bath, Grant) στους 80°C. Η εμβάπτιση διαρκεί 30 λεπτά. Όταν έλθουν στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, εξουδετερώνεται το διάλυμα με προσθήκη 10ml NaOH 2M για εξουδετέρωση και ανάδευση σε αναδευτήρα Vortex. Κατόπιν πραγματοποιείται διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί. Η βιομάζα απορρίπτεται και συλλέγεται το διήθημα. Τέλος, προσδιορίζονται ποσοτικά τα ανάγοντα σάκχαρα σε ισοδυναμία γλυκόζης μέσω μια φωτομετρικής μεθόδου με τη χρήση του αντιδραστήριου 3.5- δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Η αλδεϋδική ομάδα της γλυκόζης ανάγει το 3.5 δι- νιτροσαλικυλικό οξύ προς 3-αμινο-5-νιτρο-σαλικυλικό οξύ, παρουσία καυστικού νατρίου. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται οξειδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ (Miller, 1959). Η διαδικασία του προσδιορισμού των αναγόντων σακχάρων με τη μέθοδο DNS που περιγράφεται (μεθοδολογία) στην υποενότητα 2.1.1.6.



Εικόνα 54. (α-δ) Προσδιορισμός Ενδοπολυσακχαριτών – DNS.

3.1.5.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του παραγομένου λίπους, χρησιμοποιείται η ξηρά βιομάζα του μικροοργανισμού, η οποία ομογενοποιείται με τη βοήθεια προσθήκης μίγματος διαλυτών «Folch» χλωροφορμίου CH_2Cl_2 / μεθανόλης CH_3OH 2:1 μέχρι το ύψος των $\frac{3}{4}$ Mc Cartney φιαλιδίων με ποσότητα 0,5g ξηράς βιομάζας και κλείνεται ερμητικά με καπάκι. Αφήνεται προς εκχύλιση για τουλάχιστον τρεις ημέρες (72h περίπου) σε απολύτα σκοτεινό μέρος. Ακολουθεί διήθηση των δειγμάτων (με μονό διηθητικό χαρτί) σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες εξάτμισης στην απαγωγό εστία και εξάτμιση των διαλυτών με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα. Η εξάτμιση πραγματοποιείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα Buchi Rotavapor R – 114, υπό κενό, στους $60\text{ }^\circ\text{C}$ (όχι μεγαλύτερη θερμοκρασία για να μην «καεί» το λίπος). Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών, οι σφαιρικές φιάλες τοποθετούνται σε desiccator για μια ημέρα μέχρι σταθεροποίησης του βάρους και πραγματοποιείται εκ νέου ζύγιση τους. Το μικροβιακό λίπος υπολογίζεται από τη διαφορά των δύο μετρήσεων.



Εικόνες 55. (α-δ) Προσδιορισμός μικροβιακού λίπους, με περιστροφικό εξατμιστήρα.

3.1.5.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΝΑΓΟΝΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ-D.N.S

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων (γλυκόζη, κ.ά.) πραγματοποιείται με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος, στην οποία χρησιμοποιείται το ομώνυμο αντιδραστήριο DNS (μέθοδος 3,5 dinitrosalicylic acid, DNS, Miller, 1959). Ως αναγωγικό σάκχαρο ορίζεται το σάκχαρο εκείνο που έχει ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο. Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο προαναφερθέν υδροξύλιο και το δινιτροσαλικυλικό οξύ κατά τη θέρμανση σε θερμοκρασία πάνω από τους $70\text{ }^\circ\text{C}$. Το σύμπλοκο αυτό, εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm , όπου κάθε απορρόφηση αναλογεί σε κάποια συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων που περιέχονται στην αντίστοιχη κάθε φορά αραιώση του δείγματος. Με τον τρόπο αυτό κατασκευάζεται και η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης. Το δείγμα θα πρέπει να είναι κατάλληλα προετοιμασμένο για να μετρηθεί με την προκειμένη μέθοδο.

Παρασκευή αντιδραστηρίου 3.5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS): Σε 500 ml απιονισμένου νερού υπό ήπια θέρμανση, προστέθηκαν 8 g καυστικού νατρίου (NaOH). Έπειτα, διαλύθηκαν αργά και με έντονη ανάδευση 5,0 g 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Στο τέλος προστέθηκαν με αργό ρυθμό 150, g τρυγικό κάλιο-νάτριο (KNaC₄H₄O₆· 4 H₂O). Το αντιδραστήριο αποθηκεύτηκε σε σκούρο γυάλινο μπουκάλι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Κατά την πειραματική διαδικασία DNS, πραγματοποιούνται στα δείγματα οι κατάλληλες αραιώσεις ώστε να ανταποκρίνονται στην πρότυπη καμπύλη αναφοράς της μεθόδου DNS → $y * \text{αραιώση δείγματος} = \alpha \cdot X \pm \beta$, όπου $y =$ **απορρόφηση στα 540nm**, $x =$ **συγκέντρωση γλυκόζης** (εξίσωση έως 2 g/L Glucose). Στη συνέχεια, σε δοκιμαστικούς σωλήνες, λαμβάνει χώρα η παρασκευή των δειγμάτων (δύο για κάθε συγκέντρωση γλυκόζης) προστίθενται 0,5 ml διαλύματος δινιτροσαλικυλικού οξέος και 0,5 ml από το κάθε δείγμα (διάλυμα γλυκόζης). Ακολούθως, σε δύο ακόμα δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0,5 ml διαλύματος δινιτροσαλικυλικού οξέος και 0,5 ml απιονισμένου νερού ως τυφλό δείγμα -μάρτυρας. Όλα τα προκύπτοντα διαλύματα αναμιγνύονται καλά στο Vortex, καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και έπειτα οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε νερό που βράζει, έτσι ώστε σχηματιστεί το σύμπλοκο μεταξύ της γλυκόζης και του δινιτροσαλικυλικού οξέος. Μετά από ακριβώς 5 min απομακρύνονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες από το νερό και έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται με το στατό μέσα σε δοχείο με κρύο νερό βρρύσης για 2 min προκειμένου να ψυχθούν και έλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα,, προστίθεται σε κάθε ένα από αυτούς τους δοκιμαστικούς σωλήνες 5 ml απιονισμένο νερό και επαναλαμβάνεται ανάδευση στο Vortex. Μετά την προσθήκη αντιδραστηρίων στο δείγμα, ώστε να είναι εφικτή η μέτρηση, το δείγμα τοποθετείται σε κυβέτες (κυψελίδες των 2ml) και ακολουθεί μέτρησή του σε φασματοφωτόμετρο (τύπου Hitachi U- 2000 Spectrophotometer). Το φασματοφωτόμετρο ρυθμίζεται σε απορρόφηση με μήκος κύματος Abs: 540nm. Αρχικά, μηδενίζεται το όργανο με το διάλυμα που περιέχει τους μάρτυρες, μετρώνται και καταγράφονται οι απορροφήσεις όλων των δειγμάτων και λαμβάνεται ο μέσος όρος των δύο (κανονικό και επανάληψη) για κάθε σημείο. Κάθε απορρόφηση αναλογεί σε κάποια συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων που περιέχονται στο εκάστοτε αντίστοιχο αραιωμένο δείγμα. Αραίωση πρέπει να πραγματοποιείται, εάν η λαμβανόμενη απορρόφηση του αγνώστου διαλύματος είναι μεγαλύτερη από την απορρόφηση του προτύπου διαλύματος γλυκόζης, ώστε να η απορρόφηση του συγκεκριμένου δείγματος να βρίσκεται μέσα στα όρια των απορροφήσεων των προτύπων διαλυμάτων. Η μετρούμενη απορρόφηση από το φωτόμετρο είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου ανάγοντος σακχάρου, γι'αυτό και γίνεται αντικατάσταση των μέσων όρων των τιμών για κάθε σημείο στην παραπάνω χαρακτηριστική εξίσωση που εκφράζεται σε ισοδύναμη συγκέντρωση γλυκόζης (g/L). (εργαστηριακές ασκήσεις βιοτεχνολογίας 8^ο εξ, ΕΜΠ 2008, Παπαδοπούλου 2012).

3.1.5.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ, ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC, HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των σακχάρων του υποστρώματος και άλλων μεταβολιτών (παραγόμενων αλκοολών ζύμωσης, διαφόρων άλλων δευτερευόντων προϊόντων) χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), η οποία αποτελείται από μια κινητή φάση (στήλη), μια στατική φάση και το μίγμα συστατικών προς διαχωρισμό και προσδιορισμό (ποιοτικό και ποσοτικό) με τη βοήθεια ανιχνευτή. Η χρωματογραφική αυτή μέθοδος βασίζεται στη διαφορετική μετατόπιση των συστατικών ενός μίγματος κατά μήκος μιας στήλης που περιέχει εξαιρετικά λεπτόκοκκο υλικό με τη βοήθεια ενός διαλύτη που ρέει συνεχώς μέσω της στήλης. Ωφείλεται στη διαφορετική έλξη κάθε συστατικού για τις δύο φάσεις.

Ο ποιοτικός προσδιορισμός βασίζεται στην ταυτοποίηση των ενώσεων, η οποία στηρίζεται στο χρόνο κατακράτησής τους στη στήλη (χρόνος ανάλυσης – ταυτοποίηση κορυφών), διότι κάθε χημική ένωση εμφανίζεται σε συγκεκριμένο χρόνο, ανάλογα με τις ιδιότητες (όγκος στήλης). Ο χρόνος αυτός συγκρίνεται με τον αντίστοιχο γνωστών πρότυπων ουσιών και ταυτοποιούνται οι εμπειριεχόμενες ενώσεις του δείγματος. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων καθορίζεται από το μέγιστο της απορρόφησης κάθε συστατικού. Από τη δεκαετία του '70 που ανακαλύφθηκε, η HPLC έχει εφαρμοσθεί για τον διαχωρισμό, τον χαρακτηρισμό και τον προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ενώσεων του οίνου ή ομάδες ενώσεων αυτού (J. Guasch and O. Busto). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε HPLC, συστήματος 600E της εταιρίας Waters για τον προσδιορισμό των κυριότερων σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης), της γλυκερόλης και αιθανόλης, καθώς και με συγκεκριμένη στήλη για την ανίχνευση των οξέων. Τα κυριότερα μέρη ενός χρωματογραφικού συστήματος είναι το δοχείο διαλυτών έκλυσης, η αντλία, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, η στήλη διαχωρισμού, ο ανιχνευτής (απορρόφησης) και το σύστημα καταγραφής δεδομένων. Αυτή η μέθοδος έχει πολύ καλή επαναληψιμότητα (Samanidou et al. 2001), όπως επίσης πλεονεκτεί έναντι των άλλων μεθόδων (χρόνος, όγκος διαλύματος, όρια ευαισθησίας, αναπαραγωγικότητα).

Ως δείγμα χρησιμοποιείται το υπερκείμενο υγρό των φυγοκεντρήσεων (μετά το πέρας της 1^{ης} φυγοκέντρωσης). Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, αρχικά πραγματοποιείται η φυγοκέντρωση αυτών, στη συνέχεια γίνονται οι απαραίτητες αραιώσεις του υπερκείμενου (ανάλογα με τη δυνατότητα της εκάστοτε στήλης και των πρότυπων καμπυλών) με διάλυμα 10 mM H₂SO₄ και ακολουθεί το φιλτράρισμά των δειγμάτων με τη χρήση φίλτρων whatmann με διάμετρο σπών 0,2 μm (Whatman Polycap TC). (Φυσικές μέθοδοι Ανάλυσης εργαστηριακές ασκήσεις, Χημικών μηχανικών ΕΜΠ, 2004). Για τις αναλύσεις του παρόντος πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά συστήματα HPLC, τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω.

HPLC

Το πρώτο σύστημα της HPLC στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: Ανιχνευτής RI 410 για ανίχνευση αλκοολών και σακχάρων.

Ανιχνευτής UV 486 για οργανικά οξέα.

Η στήλη είναι PHENOMENEX ROA REZEX (300 mm×7,8mm) χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση .

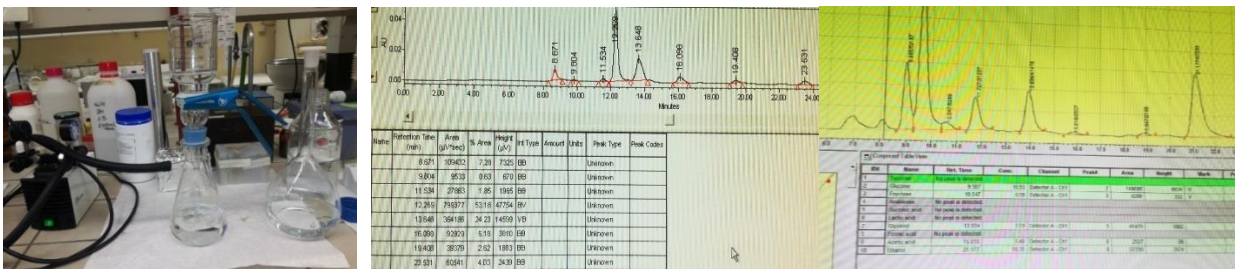
Την κινητή φάση αποτέλεσε ο διαλύτης, υδατικό διάλυμα θειϊκού οξέος, 10mM H₂SO₄ (από υπερκάθαρο νερό - απιονισμένο και φιλτραρισμένο - ddH₂O) και η ροή της κινητής φάσης καθορίστηκε στα 0,6 ml/min με θερμοκρασία της στήλης στους 60°C. Ο απαιτούμενος όγκος έκχυσης του δείγματος (ένεση) ήταν 20μL, η διάρκεια ανάλυσης 30 λεπτά και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε g/L καλλιέργειας.

Στα γραφήματα που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε ολοκλήρωση των κορυφών με τη βοήθεια του λογισμικού Empower. Η ταυτοποίηση των διάφορων δειγμάτων βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης ή ανασχεσης (Rf), ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά πρότυπα αυτών. Τέλος, με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς (**χαρακτηριστικών εξισώσεων για κάθε ουσία**) η συγκέντρωση της κάθε ουσίας του δείγματος πραγματοποιείται μέσω της ολοκλήρωσης των εμβαδών που προκύπτουν από το χρωματογράφημα.

Το δεύτερο σύστημα της HPLC διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των μιγμάτων ήταν τύπου Phenomenex Rezex ROA-Organic acid H+ (300 mm×7,8mm) με το σύστημα HPLC SHIMADZU UFLC XR συζευγμένο με ανιχνευτή RI (RID-10A, Shimadzu, Ιαπωνία).

Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα θειϊκού οξέος (H₂SO₄, 10 mM) με ροή 0,6 mL/min στους 65 °C. Το συγκεκριμένο σύστημα είναι αυτοματοποιημένο και το κάθε δείγμα τοποθετείται σε vial και έπειτα σε συγκεκριμένη αριθμημένη θέση στην ειδική θήκη υποδοχής δειγμάτων του μηχανήματος. Ο όγκος κάθε ένεσης είναι 10 μL και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε g/L καλλιέργειας. Με τα χρωματογραφήματα να εμφανίζονται έτοιμα καθώς και οι τιμές τους, σε αντίθεση με την παραπάνω HPLC.



Εικόνα 56. α) Φιλτράρισμα διαλύτη προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στην HPLC και στην αραιώση των δειγμάτων, **β)** πρώτο σύστημα HPLC **γ)** δεύτερο σύστημα HPLC (αποτελέσματα – κορυφές ενώσεων και από κάτω τα εμβαδά τους αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (g/L)).

Πρότυπες Καμπύλες Οξέων

Πραγματοποιήθηκε παρασκευή διαλυμάτων των κυριότερων οξέων του οίνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0,5, 1, 4 g/L) και τα δείγματα εισήχθησαν προς ανάλυση στην HPLC. Σύμφωνα με τους χρόνους (retention time – σε min) απόκρισης και τα εμβαδά τους (Area [μV*sec]), κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες, από τις οποίες προκύπτουν οι χαρακτηριστικές εξισώσεις του κάθε οξέος, **πρότυπο (g/L) = (Area-b) /a. Βάσει αυτών των εξισώσεων των οξέων (κιτρικό, μηλικό, τρυγικό, ηλεκτρικό, οξικό, γαλακτικό οξύ)** και την καταχώρηση των τιμών, καταγράφηκε η συγκέντρωσή τους στα δείγματα των παραγόμενων πειραματικών οίνων.



Εικόνα 57. Τα κυριότερα οξέα του οίνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κιτρικό (RT=11), τρυγικό (11,8), μηλικό (13), ηλεκτρικό (15), L-Γαλακτικό οξύ (16,8) και οξικό οξύ (18,7-19).

3.1.5.5 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ GC-MS (GAS CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY)

Η χρωματογραφία πληροφορεί ποιοτικά για το χρόνο ανάλυσης κάθε ουσίας σε σύγκριση με τις πρότυπες. Η ταυτοποίηση των συστατικών ενός μίγματος γίνεται με βάση: τον χρόνο ανάλυσης (είτε διορθωμένο), τη μέθοδο εμβολιασμού και το δείκτη Kovats. Η αέρια χρωματογραφία βασίζεται στη διαφορετική ταχύτητα μετατόπισης των επιμέρους συστατικών των δειγμάτων μέσω μιας κινητής φάσης και μιας στατικής. Ο χρόνος ανάλυσης καθορίζεται από την ταχύτητα μετακίνησης της ουσίας μέσα στη στήλη και η ταυτοποίηση με τη σύγκριση των χρόνων ανάλυσης των πρότυπων ουσιών. Ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται με τη σύγκριση ύψους είτε εμβαδού κορυφής των συστατικών του δείγματος με το ύψος ή το εμβαδόν των κορυφών των πρότυπων ουσιών (Μεθοδολογία του επί % λόγου των εμβαδών και των σχετικών συντελεστών απόκρισης). Γενικά προκύπτει δύσκολο γράφημα με όχι τόσο ξεκάθαρα αποτελέσματα. Χαρακτηριστικά: θόρυβος (διακυμάνσεις στο σήμα του ανιχνευτή), μετατόπιση από την αρχική θέση, όρια ανίχνευσης (πρέπει τριπλάσιο ύψος από το θόρυβο). Το Φασματομέτρο μάζας χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με τον αέριο χρωματογράφο για την ταυτοποίηση ουσιών σε βιολογικά δείγματα (συνδυασμένες αναλυτικές τεχνικές). Αποτελείται από ένα σύστημα έγχυσης του δείγματος, τον εγχυτήρα. Επίσης είναι εφοδιασμένο με μια φιάλη φέροντος αερίου (He ή H₂), βαλβίδες ελέγχου για τον έλεγχο της θερμοκρασίας του φούρνου, έναν μικροεπεξεργαστή και σωληνώσεις για τη σύνδεση του εγχυτήρα στην στήλη και στην έξοδο για τη διασύνδεση με το φασματομέτρο μάζας. Η στήλη θα πρέπει να είναι επικαλυμμένη με μια στατική φάση, στην οποία λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός. Στη μονάδα διασύνδεση, οι ενώσεις που διαχωρίζονται μεταφέρονται στην πηγή ιονισμού του φασματογράφου, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος να γίνει ξανά ανάμιξη των διαχωρισθέντων συστατικών. Το φασματομέτρο μάζας αποτελείται από την πηγή ιονισμού, το φακό εστίασης, τον αναλυτή μάζας, τον ανιχνευτή ιόντων και πολλαπλές βαλβίδες άντλησης. Τέλος, περιλαμβάνει ένα σύστημα ελέγχου που γίνεται η επιλογή της μάζας, έλεγχος του ανιχνευτή, επεξεργασία των δεδομένων και διασύνδεση του GC με τον σύστημα εισαγωγής του δείγματος (McMaster, 2008, Samanidou et al. 2011, Φυσικές μέθοδοι Ανάλυσης εργαστηριακές ασκήσεις, σχολή χημικών μηχανικών ΕΜΠ, 2004)

Η εισαγωγή του δείγματος και ο διαχωρισμός των συστατικών βάση της διαφορετικής συγκράτησής τους στη στατική φάση γίνεται στον αέριο χρωματογράφο, ενώ ο φασματογράφος μάζας λειτουργεί σαν ανιχνευτής. Ο φασματογράφος μάζας παρέχει πληροφορίες για τον χρόνο ανίχνευσης, το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) και την ένταση του λαμβανόμενου σήματος. Έτσι λόγω της χρωματογραφικής διάταξης πραγματοποιείται **καλός διαχωρισμός και υψηλή ταχύτητα ανάλυσης**, ενώ με το φασματομέτρο μάζας πραγματοποιείται ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων. **Η ταυτοποίηση της κάθε ένωσης του αναλυόμενου δείγματος επιτυγχάνεται με τον έλεγχο του χρόνου συγκράτησης της με τον χρόνο του γνωστού προτύπου, καθώς και με σύγκριση του φάσματος μάζας με τα φάσματα μάζας από τη βιβλιοθήκη φασμάτων MS που υπάρχει στο λογισμικό του οργάνου** (Samanidou et al., 2011) Συγκεκριμένα στα δείγματα των παραγόμενων πειραματικών οίνων, για τον διαχωρισμό των πτητικών συστατικών εφαρμόστηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας, ενώ για την ταυτοποίησή τους χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία μαζών. Το φιαλίδιο σφραγίστηκε αεροστεγώς με ειδικό πώμα (Teflon-lined septum) διαμέσου του οποίου εισήχθη η SPME σύριγγα. Το δείγμα θερμοστατήθηκε σε υδατόλουτρο στους 80 °C για 5 min και έπειτα για 30 min στους 40 °C. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν τριχοειδή τύπου MEGA-5 HT. Η στήλη είχε μήκος 30 m, εσωτερική διάμετρο 0,25 mm και πάχος υμενίου 0,25mm. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο (He) με σταθερή ταχύτητα 35 cm/s. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ο φούρνος διατηρήθηκε στους 40 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια με ρυθμό αύξησης 4 °C/min, έφτασε τους 150 °C. Τέλος, έλαβε την τιμή των 260 °C ύστερα από σταδιακή αύξηση και παρέμεινε σταθερή για 5 min. Το φασματομέτρο μάζας λειτουργούσε στη λειτουργία ιονισμού ηλεκτρονίων με την ενέργεια ηλεκτρονίων ρυθμισμένη στα

70 eV και εύρος μάζας σάρωσης 40-400 m/z. Οι θερμοκρασίες πηγής και διεπαφής ρυθμίστηκαν στους 200 °C και 270 °C, αντίστοιχα (Mantzourani et al., 2020).

Ο δείκτης κατακράτησης (Konvats Index) της κάθε ένωσης υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση: $KI=100*[n+(N-n)*(t_{\text{αγνωστού}}-t_n)/(t_N-t_n)]$, όπου KI: ο δείκτης κατακράτησης (Konvats Index), n: Ο αριθμός των ανθράκων του μικρότερου αλκανίου (αλκάνιο πριν από το άγνωστο), N: Ο αριθμός των ανθράκων του μεγαλύτερου αλκανίου (αλκάνιο μετά το άγνωστο) και t_r : Ο χρόνος έκλυσης.

3.1.6 ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Ακολουθεί παρουσίαση των απαραίτητων οινολογικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στο γλεύκος πριν την έναρξη της ζύμωσης, κατά τη διάρκεια στο εν ζυμώνει και τέλος στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους, όπως οξύτητα, pH, σάκχαρα, αλκοολικός βαθμός, ολικό και ελεύθερο θειώδες και άλλες ανά περίπτωση για να εκτιμηθεί η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης και η τυχόν αναγκαία διόρθωση.

3.1.6.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

3.1.6.1.1 ΜΕ ΔΙΑΘΛΑΣΙΜΕΤΡΙΑ

Η αλλαγή κατεύθυνσης μια ακτίνας όταν διέρχεται από ένα μέσο σε ένα άλλο ονομάζεται διάθλαση και το μέγεθος που περιγράφει πόσο έντονα διαθλάται η ακτίνα ορίζεται ως δείκτης διάθλασης. Είναι χαρακτηριστική σταθερά της διαλυμένης ουσίας και εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η μέτρηση του δείκτη διάθλασης γίνεται με τα διαθλασίμετρα και είναι σημαντικό εργαλείο για τον καθορισμό της συγκέντρωσης των ουσιών που είναι διαλυμένες σε ένα υγρό, δηλαδή τα ολικά διαλυτά στερεά. Στο γλεύκος η πλειοψηφία των διαλυτών στερεών είναι σάκχαρα, συνεπώς η μέτρηση με διαθλασίμετρο αντιστοιχίζεται κατευθείαν σε συγκέντρωση σακχάρων, το οποίο στην οινολογία αντιστοιχεί σε βαθμούς Brix ($\text{g}_{\text{σακχάρων}}/100\text{g}_{\text{διαλύματος}}$), τιμή η οποία βοηθάει και στον προσδιορισμό του δυναμικού αλκοολικού τίτλου (ΔΑΤ).

Για τον προσδιορισμό των βαθμών Brix το ηλεκτρονικό διαθλασίμετρο ρυθμίζεται με μερικές σταγόνες απεσταγμένου νερού, το οποίο έχει θερμοκρασία 20 °C, η οποία αποτελεί θερμοκρασία βαθμονόμησης του οργάνου. Οι σταγόνες τοποθετούνται στο στεγνό πρίσμα, το οποίο στη συνέχεια σκεπάζεται με το κάλυμμα και το όργανο είναι έτοιμο για παρατήρηση με τον αντικειμενικό φακό απέναντι από μια φωτεινή πηγή, η οποία φέρεται στο ίδιο επίπεδο με το πρίσμα. Έπειτα, στο οπτικό πεδίο του οργάνου εμφανίζονται δύο τμήματα, ένα σκοτεινό και ένα φωτεινό τα οποία χωρίζονται με μία σκούρα γραμμή. Με τον κοχλία η γραμμή ρυθμίζεται να συμπίπτει ακριβώς με το μέσον της οπτικής επιφάνειας του οργάνου. Πατιέται το κουμπί Tg και το όργανο έχει ρυθμιστεί καθώς εμφανίζεται το σύμβολο c στην οθόνη. Για τη μέτρηση των βαθμών Brix του γλεύκους το πρίσμα στεγνώνεται προσεκτικά με χαρτί και τοποθετούνται λίγες σταγόνες του δείγματος, του οποίου η θερμοκρασία έχει μετρηθεί με θερμόμετρο υδραργύρου. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως με το απεσταγμένο νερό και η τιμή λαμβάνεται αμέσως από την οθόνη του οργάνου.

3.1.6.1.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΑΡΑΙΟΜΕΤΡΙΑ

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων στο γλεύκος χρησιμοποιείται αραιόμετρο, το οποίο μετράει το ειδικό βάρος, δίνοντας ένδειξη της πυκνότητας του γλεύκους, ενώ είναι βαθμονομημένο στους 20 °C και εξαρτάται από τη θερμοκρασία, θερμόμετρο υδραργύρου σε °C και ογκομετρικός κύλινδρος των 250 mL

Αρχικά, 200 mL δείγματος τοποθετούνται στον ογκομετρικό κύλινδρο υπό γωνία προς αποφυγήν σχηματισμού φυσαλίδων και έπειτα ο κύλινδρος τοποθετείται κατακόρυφα. Βυθίζεται μέσα το αραιόμετρο και αφήνεται να ισορροπήσει, ενώ μετριέται η θερμοκρασία του γλεύκους. Λαμβάνεται η τιμή του αραιομέτρου και διορθώνεται σύμφωνα με τους κατάλληλους πίνακες.

Στις πρώτες μέρες της ζύμωσης χρησιμοποιείται το ηλεκτρονικό διαθλασίμετρο, το οποίο είναι πιο ακριβές. Όμως, σε τιμές κάτω από 8 °Brix δεν δίνει αποτελέσματα, συνεπώς επιλέγεται η μέθοδος της αραιομετρίας για τις επόμενες μέρες της ζύμωσης.

Οι διορθώσεις των μετρήσεων της πυκνότητας γίνονται με βάση τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 16: Διορθώσεις μετρήσεων πυκνότητας

Θερμοκρασία (°C)	Μέτρηση αρα	Διορθωμένη (20 °C)
15	X	X-0,0010
16	X	X-0,0008
17	X	X-0,0006
18	X	X-0,0004
19	X	X-0,0002
20	X	X
21	X	X+0,0002
22	X	X+0,0004
23	X	X+0,0006
24	X	X+0,0008
25	X	X+0,0010

3.1.6.2 ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

3.1.6.2.1 ΡΗ - ΕΝΕΡΓΟΣ ΟΞΥΤΗΤΑ

Ως pH (ενεργός οξύτητα) ορίζεται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση στον οίνο και δίνουν κατιόντα υδρογόνου (H⁺). Πιο συγκεκριμένα είναι ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης κατιόντων υδροξωνίου στο διάλυμα. Δηλαδή : $pH = -\log[H^+]$.

Για τη μέτρηση του pH απαιτείται η ύπαρξη ειδικού οργάνου το οποίο ονομάζεται pH-μετρο. Διαθέτει ένα γυάλινο ηλεκτρόδιο, το οποίο διατηρείται σε απιονισμένο νερό.

Σε ένα ποτήρι ζέσεως τοποθετείται αρκετή ποσότητα οίνου, έτσι ώστε το ηλεκτρόδιο του pH-μετρου να εμβαπτίζεται και να μην ακουμπάει στα τοιχώματα ή στον πυθμένα. Το pH-μετρο βαθμονομείται με τη χρήση των κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων, ένα με τιμή pH 4, ένα με τιμή 7 και ένα με τιμή 10. Το ηλεκτρόδιο εισέρχεται στο ποτήρι ζέσεως και αφήνεται να σταθεροποιηθεί η τιμή του pH-μέτρου, η οποία αποτελεί και την ένδειξη του pH. Η θερμοκρασία του δείγματος πρέπει να είναι μεταξύ 20-25°C και να λαμβάνονται δύο μετρήσεις από το ίδιο δείγμα και να καταγράφεται ο μέσος όρος με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων. Οι μετρήσεις έγιναν με βάση τη συνήθη μέθοδο *OIV-MA-AS313-15*.

3.1.6.2.2 ΟΛΙΚΗ / ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

Ως ολική οξύτητα ορίζεται το σύνολο των όξινων ομάδων που τιτλοδοτούνται όταν το pH του οίνου φέρεται στην τιμή 7 με προσθήκη πρότυπου διαλύματος αλκάλειου. Ο προσδιορισμός της βασίζεται στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων.

Μεταφέρονται 10mL δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL και απομακρύνεται το CO₂ με θέρμανση μέχρι αφρισμού. Στη συνέχεια προστίθενται μερικές σταγόνες (2-3) του δείκτη “κυανό της βρωμοθυμόλης” ο οποίος έχει περιοχή αλλαγής χρώματος στην τιμή pH=7, καθώς και 30mL απεσταγμένου νερού. Το δείγμα τιτλοδοτείται με πρότυπο αλκαλικό διάλυμα NaOH (0,1M). Λαμβάνεται η αρχική και η τελική ένδειξη της προχοΐδας που περιέχει το NaOH και από την κατανάλωση (αφαίρεση της τελικής από την αρχική ένδειξη) προκύπτει η ολική οξύτητα, η οποία εκφράζεται σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο οίνου(g/L). Στους λευκούς οίνους οι ενδεικτικές τιμές είναι 5-8 g/L. Οι μετρήσεις έγιναν με βάση τη συνήθη μέθοδο *OIV-MA-AS313-01*.

3.1.6.2.3 ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ

Ως αλκοολικός τίτλος κατ'όγκο ορίζεται ο αριθμός των λίτρων άνυδρης αιθανόλης που περιέχονται σε 100 λίτρα κρασί όταν βρίσκεται σε θερμοκρασία 20°C. Για τον προσδιορισμό του αλκοολικού τίτλου χρησιμοποιείται συσκευή απόσταξης η οποία αποτελείται από σφαιρική φιάλη με εσφυρισμένο στόμιο, επανορθωτική αποστακτική στήλη ύψους 20 cm, καμινέτο και ψυκτήρα, στον οποίου το άκρο τοποθετείται λεπτός σωλήνας που μεταφέρει το απόσταγμα στον πυθμένα ογκομετρικής φιάλης

Αρχικά, σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL τοποθετείται οίνος μέχρι τη χαραγή και μετριέται η θερμοκρασία με θερμομότρο υδραργύρου σε °C. Το δείγμα μεταγγίζεται στη σφαιρική φιάλη με εσφυρισμένο στόμιο και η ογκομετρική φιάλη ξεπλένεται 4 φορές με τα ξεπλύματα να προστίθενται στη σφαιρική φιάλη. Προστίθενται 10 mL CaOH (οδηγεί στη μετατροπή του δείγματος σε αλκαλικό) και 2 ελαφρόπετρες ώστε να μην είναι έντονος ο βρασμός. Η φλόγα του καμινέτου πρέπει να είναι χαμηλότερα από τον πυθμένα της ογκομετρικής φιάλης, καθώς υπάρχει ο κίνδυνος καραμελοποίησης του δείγματος. Όταν σε νέα ογκομετρική φιάλη συγκεντρωθούν περίπου τα 3/4 του αρχικού όγκου σε μορφή αποστάγματος, συμπληρώνεται ο όγκος με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Μετριέται η θερμοκρασία με το ίδιο θερμομότρο, η οποία δεν πρέπει να έχει απόκλιση από την πρώτη κατά $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Το απόσταγμα αναδεύεται χειροκίνητα και μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο, στον οποίο εμβαπτίζεται το κατάλληλο αλκοολόμετρο. Μετριέται εκ νέου η θερμοκρασία, η οποία δεν πρέπει να διαφέρει από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος κατά $\pm 5^{\circ}\text{C}$ και όταν σταθεροποιηθεί το αλκοολόμετρο λαμβάνεται η ένδειξη η οποία αποτελεί τον φαινομενικό αλκοολικό τίτλο. Ο πραγματικός αλκοολικός τίτλος προκύπτει από τη διόρθωση του φαινομενικού με τη χρήση των κατάλληλων πινάκων. Η μονάδα μέτρησης είναι %vol με τις τιμές να κυμαίνονται στα 11-12 %vol στα λευκά κρασιά. Οι μετρήσεις έγιναν με βάση τη συνήθη μέθοδο *OIV-MA-AS312-01A*.



Εικόνα 58. Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου.

3.2.6.2.4 ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

Ως πτητική οξύτητα ορίζεται το σύνολο των οξέων της σειράς του οξικού οξέος που υπάρχουν στους οίνους ελεύθερα ή με μορφή αλάτων. Οι τιμές της πτητικής οξύτητας αποτελούν ποιοτικό κριτήριο των οίνων καθώς εξαρτάται από την εκδήλωση ή μη βακτηριακών προσβολών. Εξαρτάται από το είδος του γλεύκους, από το στέλεχος της ζύμης και από την περιεκτικότητα του οίνου σε αλκοόλη. Με βάση τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης ανώτατο όριο στους λευκούς οίνους είναι τα 1,08 g οξικού οξέος/L. Ο προσδιορισμός της πτητικής οξύτητας γίνεται με τη συσκευή απόσταξης, η οποία αποτελείται από μια γεννήτρια ατμού, μια φιάλη με σωλήνα ατμού, μια στήλη απόσταξης και ένα συμπυκνωτή.

Αρχικά, λαμβάνονται 20 mL δείγματος από τα οποία απομακρύνεται το CO₂. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στη φιάλη τα 20 mL δείγματος και προστίθενται 0,5 g τρυγικού οξέος. Το δείγμα με το τρυγικό οξύ αποστάζεται και παραλαμβάνονται 250 mL αποστάγματος, στο οποίο προστίθενται 2-3 σταγόνες φαινολοφθαλεινης ως δείκτη. Στη συνέχεια, ακολουθεί τιτλοδότηση με NaOH 0,1 M και υπολογίζεται η κατανάλωση. Το τελικό σημείο είναι το ροζ χρώμα το οποίο πρέπει να διατηρηθεί για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα. Στο δείγμα που έχει τιτλοδοτηθεί προστίθενται 4 σταγόνες αραιού υδροχλωρικού οξέος το οποίο το αποχρωματίζει, καθώς και 2 mL δείκτη αμύλου, και τιτλοδοτείται εκ νέου με διάλυμα ιωδίου (I₂ 0,005 M), όπου υπολογίζεται η νέα κατανάλωση. Με βάση τις δύο καταναλώσεις (NaOH και I₂) υπολογίζεται η πτητική οξύτητα σε γραμμάρια οξικού οξέος ανά λίτρο (g οξικού οξέος/L). Οι μετρήσεις έγιναν με βάση τη συνήθη μέθοδο *OIV-MA-AS313-02*.



Εικόνα 59. Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας οίνων.

3.1.6.2.5 ΑΝΑΓΟΝΤΑ ΣΑΚΧΑΡΑ

Ως ανάγοντα σάκχαρα ορίζονται τα σάκχαρα τα οποία διαθέτουν ελεύθερη αλδεϋδική ή κετονική ομάδα και έχουν την ιδιότητα να ανάγουν το δισθενή χαλκό σε μονοσθενή, όταν βρίσκονται σε αλκαλικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα στον οίνο, έχει βρεθεί η ύπαρξη γλυκόζης και φρουκτόζης σε αναλογία Γλυκόζη/ Φρουκτόζη = 0,95, η ύπαρξη D-γαλακτόζης σε μικρές ποσότητες (100mg/L) και ζαχαρόζης σε ποσότητες 2-5 g/L. Οι ζυμομύκητες, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, χρησιμοποιούν τα σάκχαρα σαν υπόστρωμα για την παραγωγή βιομάζας ή για την παραγωγή αλκοόλης και δευτερευόντων προϊόντων. Δηλαδή, η αρχική συγκέντρωση σακχάρων μειώνεται με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της αλκοόλης (συνήθως πρώτα καταναλώνεται η γλυκόζη και ύστερα η φρουκτόζη). Εάν δεν ζυμωθούν τα ανάγοντα σάκχαρα, υπάρχει κίνδυνος να πραγματοποιηθεί δευτερεύουσα ζύμωση μετά την εμφιάλωση, γεγονός που οδηγεί τις φιάλες αυτές ακατάλληλες προς πώληση.

Για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων χρησιμοποιούνται: Διάλυμα οξικού μολύβδου, Διάλυμα NaOH 0,1 M, Ανθρακικό ασβέστιο, Αλκαλικό διάλυμα χαλκού, Διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 25% v/v, Διάλυμα ιωδιούχου καλίου 30%, Δείκτης αμύλου 5 g/L, Πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου (Na₂S₂O₃) 0,1 N, Ογκομετρική φιάλη 100 mL, Χωνί, Ηθμός από διηθητικό χαρτί, Προχοΐδα, Εσφυρισμένη κωνική φιάλη 250 mL, Ογκομετρικός κύλινδρος 100 mL, Πιπέτες, Κάθετος ψυκτήρας και Θερμαντικός μανδύας.

Πριν από την έναρξη προσδιορισμού των αναγόντων σακχάρων γίνεται μέτρηση της ολικής οξύτητας σε ποσότητα 10 mL (με την διαδικασία που έχει αναφερθεί) και σημειώνεται ως n ο όγκος διαλύματος NaOH 0,1 M που χρησιμοποιήθηκε. Για τη μέτρηση των αναγόντων σακχάρων μεταφέρονται 50 mL του οίνου σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστίθενται με σειρά 1/2 (n - 0,5) mL διαλύματος NaOH 0,1 M, 2,5 mL κορεσμένου διαλύματος οξικού μολύβδου υπό ανάδευση και 0,5 g ανθρακικού ασβεστίου. Το διάλυμα αναδεύεται επαρκώς και αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 15 λεπτά. Ο όγκος συμπληρώνεται έως τη χαραγή και ακολουθεί διήθηση με τον ηθμό από διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια, σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη των 300 mL μεταφέρονται 25 mL αλκαλικού διαλύματος χαλκού και 25 mL διαυγασμένου διαλύματος οίνου. Η φιάλη προσαρμόζεται σε κάθετο ψυκτήρα, φέρεται σε βρασμό (με τη χρήση ελαφρόπετρων για να είναι ηπιότερος ο βρασμός) που πρέπει να πραγματοποιηθεί σε 2 λεπτά και διατηρείται για 10 λεπτά. Ακολουθεί άμεσα ψύξη με κρύο και τρεχούμενο νερό και προστίθενται 10 mL ιωδιούχου καλίου 30% και 25 mL θειικού οξέος 25% (αργά διότι προκαλείται αφρισμός). Ακολούθως, προστίθενται 2 mL δείκτη αμύλου και το δείγμα τιτλοδοτείται με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1 M. Εμφανίζεται αλλαγή του χρώματος του I₂ από καφέ σε κίτρινο, σημείο που αποτελεί το τελικό της ογκομέτρησης. Τέλος, η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για να βρεθεί η οξειδωτική ικανότητα των 25 mL του διαλύματος CuSO₄, με τη διαφορά ότι αντί για 25 mL διαυγασμένου διαλύματος οίνου χρησιμοποιούνται 25 mL ύδατος. Με βάση την κατανάλωση του θειοθειικού νατρίου και στις δύο περιπτώσεις, καθώς και με τη χρήση των κατάλληλων πινάκων βρίσκεται η ποσότητα των αναγόντων σακχάρων, η οποία μετριέται σε $\frac{\text{Γανάγοντα σάκχαρα}}{\text{L-διηθήματος}}$. Οι μετρήσεις έγιναν με βάση τη συνήθη μέθοδο OIV-MA-AS311-02.



Εικόνα 60. α) β) Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων οίνου (παραγόμενου από μη παστεριωμένο γλεύκος).

3.1.6.2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΚΑΙ ΟΛΙΚΟΥ SO_2

Ο θειώδης ανυδρίτης (SO_2) προστίθεται στον οίνο και με τη μορφή άλατος του μεταδιθειώδους καλίου $K_2S_2IO_5$, ενώ δεσμεύεται μέσα σε λίγες ώρες από ουσίες που διαθέτουν ελεύθερη καρβονυλική ομάδα. Για ένα συγκεκριμένο οίνο υπάρχει ισορροπία μεταξύ δεσμευμένου και ελεύθερου SO_2 , η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία. Στον οίνο εμφανίζεται σε 3 μορφές, τον ελεύθερο, το δεσμευμένο και τον ολικό. Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης ορίζεται ως ο θειώδης ανυδρίτης που βρίσκεται υπό μορφή διοξειδίου του θείου (SO_2), καθώς και υπό μορφή των ανόργανων θειωδών ενώσεων H_2SO_3 , $H_2SO_3^-$ και SO_3^{2-} . Δεσμευμένος θειώδης ανυδρίτης καλείται εκείνος που είναι δεσμευμένος με ακεταλδευδή, ζάχαρα, πολυφαινόλες και άλλα συστατικά του οίνου που διαθέτουν ελεύθερες ομάδες αλδευδής και κετόνης, καθώς επίσης και η διαφορά ανάμεσα στον ολικό και τον ελεύθερο. Τέλος, ολικός θειώδης ανυδρίτης καλείται το σύνολο του ανυδρίτη του θειώδους οξέος που βρίσκεται μέσα στον οίνο και ως ελεύθερος και ως δεσμευμένος με οποιαδήποτε μορφή ένωσης. (Σουφλερός, 2009). Όσον αφορά τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη, η αντίδραση που λαμβάνει χώρα όταν βρεθεί σε διάλυμα τιμών pH 3,0-4,0 είναι η :

$SO_2 + H_2O \rightarrow HSO_3^- + H^+$ όπου,

SO_2 : ο θειώδης ανυδρίτης διαλυμένος ως μοριακός

HSO_3^- : τα ανιόντα του εξουδετερωμένου θειώδους οξέος

Το άθροισμα των δύο μορφών (μοριακού και εξουδετερωμένου) δίνει τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη.

Για τη μέτρηση τόσο του ελεύθερου όσο και του ολικού θειώδη ανυδρίτη χρησιμοποιήθηκε το όργανο ENO 20, μέθοδος η οποία είναι ποτενσιομετρική. Διαθέτει δύο πολωμένα ηλεκτρόδια, τα οποία ανιχνεύουν ηλεκτρικό ρεύμα, όταν η οξειδωτική φτάσει σε ένα καθορισμένο τελικό σημείο. Τα ηλεκτρόδια πρέπει να ξεπλένονται επαρκώς με απιονισμένο νερό πριν από κάθε μέτρηση, ενώ το όργανο δέχεται ποτήρι ζέσεως συγκεκριμένου μεγέθους.

Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης: 20 mL δείγματος μεταφέρονται στο κατάλληλο ποτήρι ζέσεως και προστίθενται 2 mL H_2SO_4 1/3. Το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται πάνω στον κινητό δίσκο της βάσης τιτλοδότησης και πατιέται το κουμπί *START/STOP*. Με το πέρας 5 δευτερολέπτων πατιέται το κουμπί της τιτλοδότησης, μέχρις ότου ακουστεί ο χαρακτηριστικός ήχος της ολοκλήρωσης της τιτλοδότησης. Πατάται το κουμπί *START/STOP* και διαβάζεται η ένδειξη από την προχοίδα, η οποία εκφράζεται σε mg SO_2/L .

Ολικός θειώδη ανυδρίτης: 20 mL δείγματος μεταφέρονται στο κατάλληλο ποτήρι ζέσεως, προστίθενται 2 mL NaOH 0,5 M και 4 mL H_2SO_4 1/3. Το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται πάνω στον κινητό δίσκο της βάσης τιτλοδότησης και πατιέται το κουμπί *START/STOP*. Με το πέρας 5 δευτερολέπτων πατιέται το κουμπί της τιτλοδότησης, μέχρις ότου ακουστεί ο χαρακτηριστικός ήχος της ολοκλήρωσης της τιτλοδότησης. Πατάται το κουμπί *START/STOP* εκ νέου και διαβάζεται η ένδειξη από την προχοίδα, η οποία εκφράζεται σε mg SO_2/L . (ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ Ι – Εργαστηριακές Ασκήσεις, ΓΠΑ, 2015)

3.1.7 ΜΙΚΡΟΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Τα τέσσερα πειράματα μικροοινοποιήσεων υπό αερόβιες συνθήκες (ύπαρξη ατμόσφαιρας οξυγόνου, όχι αερισμός), μαζί με τις επαναλήψεις τους, έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και στο Εργαστήριο Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

3.1.7.1 ΓΛΕΥΚΟΣ

Για την διεξαγωγή του δεύτερου μέρους των πειραμάτων που απαρτίζεται από τέσσερις κύκλους μικροοινοποιήσεων, χρησιμοποιήθηκε αζύμωτο κατεψυγμένο γλεύκος ποικιλίας Ασύρτικο.

Στοιχεία Γλεύκους: Ποικιλία Ασύρτικο Σπάτων ΓΠΑ 2018 (οξειδωμένο – ιδιαίτερα στο χρώμα/όψη), Brix: 23,2, Ο.Ο.: 4,35, ΡΗ: 3,45. Οι Μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν στις 13/9/18. Αρχικές αναλύσεις γλεύκους πραγματοποιήθηκαν σε κάθε κύκλο πειραμάτων.

3.1.7.1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ

Α' κύκλος: Αρχικά, η απόψυξη του γλεύκους, το οποίο ήταν αποθηκευμένο μέσα σε ασκούς, πραγματοποιήθηκε στους 4°C εντός ψυγιοθαλάμου για μια ημέρα, ώστε να μην ξεκινήσει αυθόρμητα η ζύμωση των σακχάρων.

Με το πέρας της απόψυξης, έλαβε χώρα η μεταγύγιση και απολάσπωση (συγκράτηση του ιζήματος) σε δοχείο 20 L, στο οποίο προστέθηκε μπετονίτης 10g/hL και PVPP 5g/hL διαλυμένα σε δεκαπλάσιο όγκο απιονισμένου νερού ή polygel (το polygel είναι μίγμα μπετονίτη, PVPP και κυτταρίνης) 20g/hL με σκοπό τη διαύγαση και την αποφυγή της περαιτέρω οξείδωσης του γλεύκους. Στη συνέχεια, ακολούθησε καλή ανάμιξη και μεταφορά του δοχείου στον ψυγιοθάλαμο (≈ 4°C) για δύο ακόμα ημέρες.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες οινολογικές αναλύσεις στο γλεύκος: μέτρηση όγκου, μέτρηση pH, μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (Brix), μέτρηση ολικής οξύτητας με τιτλοδότηση με NaOH 0,1N και δείκτη μπλέ της βρωμοθυμόλης, μέτρηση ολικού και ελεύθερου SO₂, μέτρηση πτητικής οξύτητας και αλκοόλης. Οι μετρήσεις της σακχαροπεριεκτικότητας και της αλκοόλης, επαληθεύτηκαν από τα αποτελέσματα της HPLC.

Το γλεύκος, είχε χαμηλή οξύτητα λόγω της κατακρήμνισης τρυγικών αλάτων κατά την κατάψυξή του. Γι' αυτό το λόγο για να ενισχυθεί η οξύτητά του (απαραίτητη η διόρθωση της οξύτητας) σχεδόν μισού βαθμού, προστέθηκαν 7,5 g τρυγικού οξέος σε 10 l γλεύκους, διαλυμένα σε πολύ λίγη ποσότητα H₂O (1 βαθμός οξύτητας = 1 g/L τρυγικού οξέος – οινολογικό προϊόν, το οποίο επιτρέπεται από τους κανονισμούς της Ε.Ε Χρειάζεται 2kg/τόνο τρυγικού οξέος για αύξηση 1,5 g/l της ογκομετρούμενης οξύτητας, ώστε να συνυπολογισθεί η καθίζηση του όξινου τρυγικού καλίου, συνήθως γίνεται προσθήκη 1 : 1). Τέλος, πραγματοποιήθηκε νέα μέτρηση της οξύτητας και βρέθηκε περίπου ίση με την τιμή 5.

Δεν πραγματοποιήθηκε επιπλέον θείωση του γλεύκους, πέραν από αυτή κατά τη γλευκοποίηση (σε όλους τους κύκλους οινοποίησης), διότι οι άγριες ζύμες δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στο θειώδη ανυδρίτη.

Β' κύκλος: Συνολικός όγκος γλεύκους έπειτα από στατική απολάσπωση 9 L (6 φιάλες με περιεχόμενο 1,5 L). Παρόμοια διαδικασία μεταχείρισης γλεύκους με τον Α' κύκλο Οινοποίησης. Μέτρηση οξύτητας και αρχικών σακχάρων πριν από τον εμβολιασμό. Το γλεύκος, είχε χαμηλή ολική οξύτητα (4,425) λόγω της κατακρήμνισης τρυγικών αλάτων κατά την κατάψυξή του. Γι' αυτό το λόγο για να ενισχυθεί η οξύτητά του (απαραίτητη η διόρθωση της οξύτητας) μισού βαθμού προστέθηκαν 5g τρυγικού οξέος σε πολύ λίγη ποσότητα H₂O (1 βαθμός οξύτητας = 1 g/L τρυγικού οξέος). Τέλος, πραγματοποιήθηκε νέα μέτρηση της οξύτητας και βρέθηκε ίση με 4,95.

Προσδιορισμός ολικού και ελεύθερου SO₂. Ελεύθερος SO₂ = 15 mg/L και ολικός SO₂ = 16 mg/L.

Γ' και Δ' κύκλος: Ο τρίτος και τέταρτος κύκλος πειραμάτων ξεκίνησαν στις 30/9/19 με την απόψυξη των ασκών που περιείχαν το προς οινοποίηση γλεύκος, έπειτα από απόψυξη εντός του ψυγείου για να μην ξεκινήσει αυθόρμητα η ζύμωση. Η διαδικασία και οι μετρήσεις που έλαβαν χώρα ήταν πανομοιότυπες με τους δύο πρώτους κύκλους οινοποίησης. Brix: 21,3 ΡΗ: 3,54, Ο.Ο.:4,54. Θ=20±1°C.

3.1.7.1.2 ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ (στα πειράματα οινοποίησης που πραγματοποιήθηκαν με παστεριωμένο γλεύκος)

Α' κύκλος: Έλαβε παστερίωση στους 100°C για 10 λεπτά, συνολικά 8 κωνικών φιαλών όγκου 2L με περιεχόμενο γλεύκος 1,5L/φιάλη, σε σύστημα αυτόκλειστου. Κρίθηκε καταλληλότερη αυτή η μέθοδος, παρότι που θα μπορούσε να είχε πραγματοποιηθεί παστερίωση με εμβάπτιση σε υδατόλουτρο ή με φιλτράρισμα (ιδιαίτερα χρονοβόρα διαδικασία για τον όγκο γλεύκους που χρησιμοποιήθηκε).

Γ' κύκλος: Στις 2/10/19 πραγματοποιήθηκε παστερίωση στους 100°C για 10 λεπτά συνολικά 6 κωνικών φιαλών όγκου 2L με περιεχόμενη ποσότητα γλεύκους 1,5L/φιάλη, σε σύστημα αυτόκλειστου.

3.1.7.2 ΕΜΒΟΛΙΟ

Τα στελέχη που επιλέχθηκαν προς ζύμωση εμβολιάστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε κωνικές φιάλες με υγρό αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα YPD. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Shaker, Zhwy-211B Rocking Incubator) με ρυθμό 180.0±5 rpm και θερμοκρασία 30.0±1°C για 48 ώρες.

Α' κύκλος: Οι μικροοργανισμοί με τους οποίους πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του γλεύκους ως εκκινητή της ζύμωσης, είναι ο *Metschnikowia pulcherrima*, ο *Hanseniaspora uvarum*, ο *Hanseniaspora guilliermondii* και ο *Saccharomyces cerevisiae* rhone.

Β' κύκλος: Ο εμβολιασμός του μη παστεριωμένου γλεύκους πραγματοποιήθηκε με τις υγρές προκαλλιέργειες των εξής τριών στελεχών: *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum* και *Hanseniaspora guilliermondii*.

Γ' και Δ' κύκλος (Διαδοχικός εμβολιασμός): Στις κωνικές των 2L, πραγματοποιήθηκε ο πρώτος εμβολιασμός με υγρή προκαλλιέργεια του εκάστοτε εκ των τριών άγριων ζυμών (εις διπλούν για επαναληπτική ζύμωση). Οι μικροοργανισμοί με τους οποίους πραγματοποιήθηκε ο αρχικός εμβολιασμός του γλεύκους την ημέρα 0 (day 0) είναι ο *Metschnikowia pulcherrima*, ο *Hanseniaspora uvarum* και ο *Hanseniaspora guilliermondii*.

Στη συνέχεια, στο γλεύκος έλαβε χώρα δεύτερος εμβολιασμός με σακχαρομύκητα, έπειτα από μερικές ημέρες ανάλογα με την κατανάλωση των σακχάρων από την εκάστοτε άγρια ζύμη που είχε αρχικά εμβολιασθεί. Για το λόγο αυτό δεν πραγματοποιήθηκε ο δεύτερος εμβολιασμός την ίδια ημέρα σε όλες τις φιάλες. Ο διαδοχικός (δεύτερος) εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε σε όλες τις φιάλες με τον *Saccharomyces cerevisiae* rhone, με τον οποίο ολοκληρώθηκε η αλκοολική ζύμωση του γλεύκους.

3.1.7.2.1 ΘΡΕΨΗ

Κατά τον τέταρτο κύκλο μόνο, έπειτα από 9 ημέρες ζύμωσης του μη παστεριωμένου γλεύκους, έλαβε χώρα ανόργανη θρέψη αζώτου 200g/tn DAP (διαμμωνικό φωσφορικό άλας). Πραγματοποιήθηκε ουσιαστικά δύο ημέρες μετά τον δεύτερο εμβολιασμό του γλεύκους με σακχαρομύκητα, ο οποίος θεωρείται πιο απαιτητικός όσον αφορά τη διατροφή των ζυμών σε θρεπτικά συστατικά.



Εικόνα 61. Προσθήκη θρέψης DAP σε εν ζυμώσει οينوγλεύκος.

3.1.7.2.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η διαδικασία της προκαλλιέργειας, ουσιαστικά αποτελεί τη προετοιμασία του εκάστοτε εμβολίου-στελέχους.

Α' κύκλος: Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός προκαλλιέργειας ασηπτικά, ανάλογα με τους χρόνους επώασης που αναγράφονται βιβλιογραφικά, αλλά σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της ζύμωσης σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο γλυκόζης. Η διαδικασία είναι πανομοιότυπη με αυτή που ακολουθήθηκε για το συνθετικό υπόστρωμα και αναφέρεται αναλυτικά ανωτέρω. **Το ζητούμενο είναι ο μικροοργανισμός με τον οποίον θα εμβολιασθεί το γλεύκος να βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης του.**

Επιπλέον, από τις φιάλες με την υγρή προκαλλιέργεια που περίσσεψε κρατήθηκε το περιεχόμενο, μετρήθηκε ο όγκος, έγινε ξήρανση και ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας, ώστε να βρεθεί η ξηρή μάζα του κάθε μικροοργανισμού που αποτέλεσε το εμβόλιο της οινοποίησης.

Β' κύκλος: Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός προκαλλιέργειας, ανάλογα με τους χρόνους επώασης –εκθετική φάση ανάπτυξης– που αναγράφονται βιβλιογραφικά (ίδιοι χρόνοι με τον Α' κύκλο οινοποίησης). Η διαδικασία είναι πανομοιότυπη με αυτή που ακολουθήθηκε για το συνθετικό υπόστρωμα και στο παστεριωμένο γλεύκος (αναφέρεται αναλυτικά ανωτέρω).

Γ' και Δ' κύκλος: Δημιουργία και αποστείρωση 9 προκαλλιιεργειών γλυκόζης, που στη συνέχεια εμβολιάστηκαν από slant με κρίκο και τοποθετήθηκαν για κάποιες ώρες/ή και ημέρες σε θάλαμο επώασης (shaker) στους 30 °C υπό ανάδευση

180 grm (σε συνθήκες ταχείας ανάπτυξης) ανάλογα με το χρόνο τον οποίο χρειάζεται κάθε μικροοργανισμός για να φτάσει στην εκθετική του φάση. Πανομοιότυπη διαδικασία με τους άλλους δύο κύκλους οινοποίησης.

3.1.7.3 Α' ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ – ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ

Ο πρώτος κύκλος πειραματικής μικροοινοποίησης έλαβε χώρα σε παστεριωμένο γλεύκος.

Στοιχεία Γλεύκους: Brix μετά την παστερίωση: 20, O.O.: 4,16, PH: 3,40, ελεύθερος SO₂: 11 mg/L, ολικός SO₂: 11 mg/L
Ο πρώτος κύκλος πειραμάτων οινοποίησης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικου Σπάτων χρονιάς 2018, έλαβε χώρα στις 11/6/19 για 13-14 ημέρες, σε φιάλες 2L, οι οποίες ανά δύο εμβολιάστηκαν με τον ίδιο μικροοργανισμό, ούτως ώστε να αποτελούν την επανάληψη του πειράματος.

Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία ≈ 20°C) με εμβολιασμό ίδιας ποσότητας μικροοργανισμού (1ml εμβολίου/50ml γλεύκους), ο οποίος όμως προερχόταν από διαφορετική κωνική φιάλη προκαλλιέργειας πριν εισαχθεί στο γλεύκος, αλλά από ίδιο αναγεννημένο slant ανάπτυξης (επομένως ίσως εντοπισθούν κάποιες μικροδιαφορές).

Το δείγμα που λαμβανόταν, έπειτα από ελαφρά ανάδευση, για τις καθημερινές αναλύσεις ήταν περίπου 50ml, εκτός από το πρώτο σημείο που λαμβανόταν 70 ml για περισσότερες αναλύσεις.



Εικόνα 62. Μετάγγιση και απολάσπωση του γλεύκους μετά την απόψυξη (α-γ).

Οινοποίηση

Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε 8 αποστειρωμένες κωνικές φιάλες 2L, οι οποίες περιείχαν παστεριωμένο γλεύκος και ήταν κλειστές στο στόμιο με βαμβάκι για να διατηρηθεί καθαρή η καλλιέργεια και η ζύμωση από μολύνσεις οποιουδήποτε άλλου μικροοργανισμού πέραν αυτών με τους οποίους εμβολιάστηκε το γλεύκος.

Οι φιάλες με το παστεριωμένο γλεύκος καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης βρίσκονταν στο εργαστήριο μικροβιολογίας, ώστε να είναι εύκολη η μετακίνησή τους στο UV-lamīnar για να μπορέσει να παρθεί καθημερινά δείγμα (Σημείο) υπό ασηπτικές συνθήκες, ώστε να ελέγχεται σε ποια φάση βρίσκεται η ζύμωση.

Σε όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης καθημερινά, γίνονταν οι απαραίτητες μετρήσεις/ αναλύσεις.

Τέλος, το πείραμα διήρκησε 14 ημέρες σε θερμοκρασία ≈ 22 °C.

3.1.7.4 Β' ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ – ΜΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ

Ανάπτυξη σε τρυβλίο δείγματος γλεύκους (21/6/19) χρησιμοποιώντας ένα συρμάτινο κρίκο εμβολιασμού και διαγράφοντας κατά μήκος της επιφάνειας του άγαρ ένα ραβδωτό μοτίβο (λωρίδες) και στη συνέχεια τοποθετείται προς επώαση στους 30°C για δύο ημέρες. Στην εικόνα που ακολουθεί είναι εμφανείς οι αποικίες ζυμομυκητών, άλλων μυκητών (όπως μούχλα) και βακτηρίων.

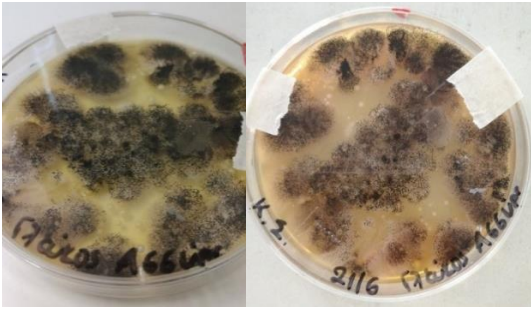
Στοιχεία γλεύκους: Brix: 23.2, O.O.: 4,425, PH: 3.45

Δημιουργία και αποστείρωση προκαλλιέργειας στελεχών. Εμβολιασμός προκαλλιεργιών από slants και εισαγωγή στο shaker (επώαση υπό ανάδευση) για συγκεκριμένες ώρες, όπως και στον Α' και Β' κύκλο πειραμάτων.

Ο πρώτος κύκλος πειραμάτων οινοποίησης έλαβε χώρα για 14ημέρες, έπειτα από απόψυξη των ασκών (ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία μεταχείρισης του γλεύκους όπως και στον πρώτο κύκλο οινοποίησης), σε συνθήκες λευκής οινοποίησης (θερμοκρασία ≈ 20 °C).

Το δείγμα που λαμβανόταν, μετά από ανακίνηση, για τις καθημερινές αναλύσεις ήταν περίπου 50ml, εκτός από το πρώτο σημείο που λαμβανόταν 70 ml για περισσότερες αναλύσεις.

Οι αναλύσεις που πραγματοποιούνταν καθημερινά ήταν δείγμα από το υπερκείμενο υγρό (1^η φυγοκέντρηση) για HPLC (κατανάλωση σακχάρων, παραγωγή αιθανόλης, γλυκερόλης) και η ζύμωση παρακολουθούταν από τα Brix.



Εικόνα 63. Ανάπτυξη σε τρυβλίο δείγματος μη παστεριωμένου γλεύκους ασύρτικο.

Οινοποίηση

Η ζύμωση έλαβε χώρα σε 6 διαφορετικές, ίδιας χωρητικότητας και σχήματος, πλαστικές φιάλες 2L με 1,5L περιεχόμενο γλεύκος ανά φιάλη, ανοιχτές στο περιβάλλον.

Οι φιάλες εμβολιάστηκαν ανά δυο με τον ίδιο μικροοργανισμό, ώστε η δεύτερη να αποτελεί την επανάληψη του πειράματος στις ίδιες συνθήκες.

Την πρώτη ημέρα (day 0) που ξεκίνησε η ζύμωση, οι φιάλες ανά δύο εμβολιάστηκαν με τον ίδιο μικροοργανισμό, ούτως ώστε οι δεύτερες να αποτελούν την επανάληψη του πειράματος στις ίδιες συνθήκες.

Η ζύμωση του γλεύκους, παρά τους διάφορους μικροοργανισμούς που περιείχε, ξεκίνησε με το μικροοργανισμό-εμβόλιο και το πείραμα οινοποίησης διήρκησε συνολικά 14 ημέρες, όπου και διεκόπη.

Όλες οι ζυμώσεις ελέγχθηκαν στο μικροσκόπιο μέχρι και την τελευταία ημέρα της οινοποίησης και βρέθηκαν καθαρές προς ξένους μικροοργανισμούς.

Στο τέλος της ζύμωσης, πραγματοποιήθηκαν οι κλασικές αναλύσεις (και πτητική οξύτητα).



Εικόνα 64. α) Εμβολιασμός γλεύκους με υγρή προκαλλιέργεια. Ποσότητας 1ml εμβολίου/50ml γλεύκους. β) Μετά τον εμβολιασμό, οι φιάλες ανοιχτές στο περιβάλλον με το εν ζυμώσει γλεύκος (κανονική οινοποίηση).



Εικόνα 65. Διαφορετικές ημέρες ζύμωσης του γλεύκους.

3.1.7.5 Γ' ΚΑΙ Δ' ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ – ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ ΚΑΙ ΜΗ

Οινοποίηση

Σε όλες συνολικά τις φιάλες, η οινοποίηση του γλεύκους πραγματοποιήθηκε σε παρόμοιες συνθήκες (θερμοκρασία, σκίαση, όπως προβλέπεται).

ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ

Η αλκοολική ζύμωση έλαβε χώρα σε 6 πλαστικές φιάλες 2L, όπου οι μισές περιείχαν γλεύκος όγκου 1,5L και 1L οι υπόλοιπες τρεις και διήρκτησε 14 ημέρες.

Οι ανοιχτές φιάλες στο περιβάλλον στις οποίες το γλεύκος ήταν μη παστεριωμένο βρίσκονταν στο εργαστήριο Οινολογίας, όπου και ήταν ευκολότερο καθημερινά να ελέγχονται τα Brix, το pH και η θερμοκρασία τους.

Στις ανοιχτές φιάλες που περιείχαν γλεύκος 1L πραγματοποιήθηκε θρέψη (θρεπτικό υλικό) των ζυμομυκήτων με DAP φωσφορικό διαμμώνιο (0,75 γραμμάρια περίπου ανά 4 lt γλεύκους) για να βοηθηθεί η ανάπτυξη της ζύμης και να μειωθούν αργότερα τα προβλήματα με το υδρόθειο. Έλαβε χώρα την 9^η ημέρα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου Οινολογίας για τη συγκεκριμένη ποικιλία. Βέβαια πραγματοποιήθηκε λίγο αργά χρονικά σύμφωνα με το πρωτόκολλο της λευκής οινοποίησης.

Εμβολιασμός στις 2/10 όλων των φιαλών με τις τρεις άγριες ζύμες ανά δύο ίδιες (κανονική ζύμωση και επαναληπτική).

Δεύτερος Εμβολιασμός του μη παστεριωμένου γλεύκους (όλες τις φιάλες - 6) στις 9/10 με **S.c. rhone**.

Αποζύμωση γλεύκους στις 16/10 (τελευταίο Σημείο 14) – τοποθέτησή των φιαλών στο ψυγείο.

ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ

Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε 6 αποστειρωμένες κωνικές φιάλες 2, οι οποίες περιείχαν παστεριωμένο γλεύκος και ήταν κλειστές στο στόμιο με βαμβάκι για να διατηρηθεί καθαρή η καλλιέργεια και η ζύμωση από μολύνσεις οποιουδήποτε άλλου μικροοργανισμού πέραν αυτών με τους οποίους εμβολιάστηκε το γλεύκος. **Η οινοποίηση** διήρκτησε 21-26 ημέρες.

Οι κλειστές φιάλες, στις οποίες το γλεύκος ήταν παστεριωμένο, βρίσκονταν επίσης στο εργαστήριο Οινολογίας, προκειμένου να επιτευχθούν ίδιες συνθήκες οινοποίησης του γλεύκους.

Εμβολιασμός με *M.pulcherrima* στις 2/10 και **διαδοχικό εμβολιασμό με *S.rhone*** 15/10. Πρώτη στατική απολάσπωση (μετάγγιση) 28/10 και δεύτερη 29/10 και μπήκε ψυγείο από τις 28/10 σε πλαστική φιάλη πιεσμένη, όσο το δυνατόν χωρίς οξυγόνο.

Επανάληψη: Εμβολιασμός με *M.pulcherrima* στις 2/10 και **διαδοχικό εμβολιασμό με *S.rhone*** 15/10. Πρώτη απολάσπωση 28/10 και δεύτερη 29/10 και μπήκε ψυγείο από τις 28/10 σε πλαστικό μπουκάλι, όσο το δυνατόν χωρίς οξυγόνο.

Εμβολιασμός με *H.uvarum* στις 2/10 και **διαδοχικό εμβολιασμός με *S.rhone*** 9/10. Πρώτη απολάσπωση 24/10 και δεύτερη 25/10 και μπήκε ψυγείο από τις 23/10 σε πλαστικό μπουκάλι χωρίς οξυγόνο.

Επανάληψη: Εμβολιασμός με *H.uvarum* στις 2/10 και **διαδοχικό εμβολιασμός με *S.rhone*** 10/10. Πρώτη απολάσπωση 24/10 και δεύτερη 25/10 και μπήκε ψυγείο από τις 23/10 σε πλαστική φιάλη, όσο το δυνατόν χωρίς οξυγόνο..

Εμβολιασμός με *H.guilliermondii* στις 2/10 και **διαδοχικό εμβολιασμό με *S.rhone*** 10/10. Πρώτη απολάσπωση 24/10 και δεύτερη 25/10 και μπήκε ψυγείο από τις 23/10 σε πλαστικό μπουκάλι, όσο το δυνατόν χωρίς οξυγόνο..

Επανάληψη: Εμβολιασμός με *H.guil* στις 2/10 και **διαδοχικό εμβολιασμό με *S.rhone*** 9/10. Πρώτη απολάσπωση 24/10 και δεύτερη 25/10 και μπήκε ψυγείο από τις 23/10 σε πλαστική φιάλη, όσο το δυνατόν χωρίς οξυγόνο.

Όλες οι ζυμώσεις επαναληπτικές και μη ελέγχθηκαν στο μικροσκόπιο και βρέθηκαν καθαρές από μολύνσεις ξένων μικροοργανισμών πέραν των ζυμών-εμβολίων μέχρι και την τελευταία ημέρα της οινοποίησης.

Περιγραφή Παραλαβής Σημείου (ανά 24h) – Μετάγγιση - Θείωση

Στις 2/10/19 έλαβε χώρα η παραλαβή του σημείου 0 (πριν και μετά την παστερίωση του γλεύκους) - εμβολιασμός με τα τρία στελέχη εις διπλούν (2 φιάλες ανά στέλεχος – κανονική και επαναληπτική). Το σημείο 1 λήφθηκε μετά τις πρώτες 24h κ.ό.κ. Στις 9/10 (7^η ημέρα), στο σημείο 7 πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός μη παστεριωμένου γλεύκους (και τις 6 φιάλες) καθώς και στις φιάλες με το παστεριωμένο γλεύκος U7 και G'7(επαναληπτική ζύμωση) με τον σακχαρομύκητα *S.c.rhone*. Την επόμενη ημέρα (Σημείο 8) εμβολιάστηκαν οι φιάλες με το παστεριωμένο γλεύκος U'8(επαναληπτική ζύμωση) και G8 με τον ίδιο σακχαρομύκητα (1ml εμβολίου – υγρής προκαλλιέργειας / 50ml γλεύκους). Στο σημείο 9 έλαβε χώρα θρέψη στα μη παστεριωμένα γλεύκη 200g/tn DAP – στις τρεις εκ των έξι φιαλών. Πραγματοποιήθηκε σε αυτές με 1L περιεχόμενο γλεύκος. Κατά το σημείο 13 πραγματοποιήθηκε ο τελευταίος διαδοχικό εμβολιασμός με το

σακχαρομύκητα των φιαλών με το παστεριωμένο γλεύκος P13 και P'13 (επαναληπτική ζύμωση). Στις 16/10 (σημείο 14) έγιναν οι τελευταίες μετρήσεις των φιαλών που ήταν ανοιχτές στο περιβάλλον και ακολούθησε η τοποθέτησή τους στο ψυγείο (η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε μετά από 14 ημέρες). Στις 17/10 (σημείο 15) πραγματοποιήθηκε απολάσπωση των παστεριωμένων φιαλών με μετάγγιση του γλεύκους ασηπτικά σε καινούριες αποστειρωμένες φιάλες, καθώς και θείωση κάθε δείγματος παραγόμενου οίνου των ανοιχτών στο περιβάλλον φιαλών με προσθήκη 10g MBS/hL (potassium metabisulfite, Fluka) διαλυμένο σε μικρή ποσότητα νερού και επανατοποθέτησή τους στον ψυγιοθάλαμο για ένα μήνα, αφού αφαιρέθηκε όσο το δυνατόν με πίεση το οξυγόνο από τις πλαστικές φιάλες (ώστε να είναι πληρωμένα και να μην υπάρχει κενό). Στις 18/10 (σημείο 16) έλαβε χώρα μέτρηση αναγόντων σακχάρων στα μη παστεριωμένα γλεύκη (τα οποία ήταν σε ψυγιοθάλαμο για δύο ημέρες) και ακολούθως επανατοποθέτηση των πλαστικών δοχείων στο ψυγείο μέχρι τον οργανοληπτικό τους έλεγχο (οσφρητικό).

Πίνακας 17. Ανάγοντα σάκχαρα, στο τέλος της οινοποίησης, των 6 φιαλών του μη παστεριωμένου γλεύκους

Στελέχη εμβολιασμού μη παστεριωμένου γλεύκους	διαδοχικού	Ανάγοντα σάκχαρα (g/L)
M.p. + S.c.r. 1L		0,876
M.p. + S.c.r. 1,5L		1,056
H.u. + S.c.r. 1L		0,956
H.u. + S.c.r. 1,5L		1,056
H.g + S.c.r 1L		0,936
H.g + S.c.r. 1,5L		1,036

Στις 23/10 (σημείο 21) ολοκληρώθηκε η αλκοολική ζύμωση του παστεριωμένου γλεύκους για τις φιάλες με εμβόλιο U21, U21' (επαναληπτική ζύμωση) και G21, G21' (επαναληπτική ζύμωση). Τέλος, στις 28/10 (σημείο 26) ολοκληρώθηκε η αλκοολική ζύμωση του παστεριωμένου γλεύκους για τις φιάλες με εμβόλιο P26 και P26' (επαναληπτική ζύμωση).

Μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης των πειραματικών οίνων, προέκυψαν με διαδοχικό εμβολιασμό τα παρακάτω τρία είδη οίνων:

1. Ασύρτικο γλεύκος από εμβόλιο *M.pulcherrima* και *S.c.rhone* (δύο φιάλες, η πρώτη και η επαναληπτική ζύμωση).
2. Ασύρτικο γλεύκος από εμβόλιο *H. uvarum* και *S.c.rhone* (δύο φιάλες, η πρώτη και η επαναληπτική ζύμωση).
3. Ασύρτικο γλεύκος από εμβόλιο *H. guilliermondii* και *S.c.rhone* (δύο φιάλες, η πρώτη και η επαναληπτική ζύμωση).

Μετρήσεις

Καθημερινά, έπειτα από ανακίνηση (μη παστεριωμένο γλεύκος) και ελαφριά ανάδευση (παστεριωμένο γλεύκος) λαμβάνονταν δείγμα περίπου 50ml, γινόταν καταμέτρηση του όγκου (σε ml), τα Brix του γλεύκους και η βιομάζα του, έπειτα από ξήρανση σε φούρνο στους 80°C για 1 ημέρα περίπου και σε desiccator επίσης σχεδόν 24h μέχρι σταθεροποίησης του βάρους του. Σε συγκεκριμένα σημεία που θεωρήθηκαν κομβικά για την ζύμωση, πραγματοποιήθηκε και HPLC ανάλυση και ταυτοποίηση αρωματικών με GC-MS μόνο για τα μη παστεριωμένα γλεύκη στο τέλος της ζύμωσής τους.



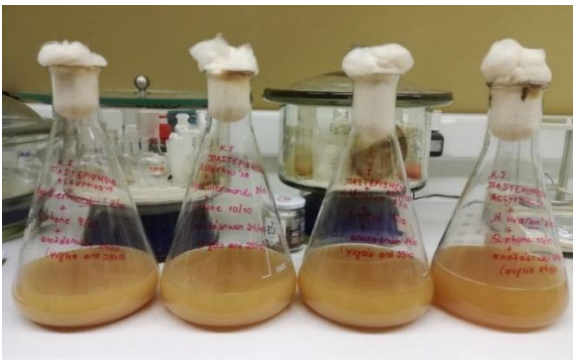
Εικόνα 66. 3^η ημέρα αλκοολικής ζύμωσης (Fermentation - Day 3) α) Παστεριωμένο γλεύκος, β) γ) Μη παστεριωμένο γλεύκος.



Εικόνα 67. 5^η ημέρα αλκοολικής ζύμωσης (Fermentation - Day 5) **α)** Παστεριωμένο γλεύκος, **β) γ)** Μη παστεριωμένο γλεύκος



Εικόνα 68. Διαδοχικός (δεύτερος) εμβολιασμός με υγρή προκαλλιέργεια *S.c. rhone* του εν ζυμώσει παστεριωμένου γλεύκους υπό ασηπτικές συνθήκες.



Εικόνα 69. Αποζύμωση Διαδοχικού εμβολιασμού *Hanseniaspora* και *Saccharomyces*.

Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, σε όλα τα δείγματα οίνων (κυρίως αυτών που προέρχονταν από μη παστεριωμένο γλεύκος) πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αναλύσεις:

1. Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων στο τέλος της ζύμωσης.
2. Προσδιορισμός αλκοόλης με απόσταξη και αραιομετρία με αλκοολόμετρο.
3. Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας με τη μέθοδο της απόσταξης μεθ' υδρατμών και τιτλοδότησης του αποστάγματος με 0,1 N NaOH και δείκτη φαινολοφθαλείνης και έπειτα με τιτλοδότηση με ιώδιο 0,005M και δείκτη αμύλου.
4. Μέτρηση ολικής οξύτητας με τιτλοδότηση με NaOH 0,1 N και δείκτη μπλε της βρωμοθυμόλης.
5. Μέτρηση του pH με χρήση πεχαμέτρου.

3.1.7.6 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΙΝΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ (ΑΣΥΡΤΙΚΟ ΣΠΑΤΩΝ – 2019)

Χρησιμοποιήθηκε ως οίνος αναφοράς κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο και την συμπλήρωση των ερωτηματολογίων. Επομένως είναι δυνατόν να επιτευχθεί μια κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων βάσει αυτού. Η οινοποίηση του Ασύρτικου '19 πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οινολογίας σύμφωνα με το παρακάτω (πίνακας 18) πρωτόκολλο οινοποίησης που χρησιμοποιείται ως οδηγός για το γλεύκος των λευκών ποικιλιών..

Πίνακας 18. Πρωτόκολλο οινοποίησης λευκών ποικιλιών, εργαστηρίου Οινολογίας ΓΠΑ.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΛΕΥΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ: ΑΣΥΡΤΙΚΟ ΣΠΑΤΩΝ	
ΣΤΑΔΙΑ	ΠΡΟΖΥΜΩΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΘΗΚΕΣ - ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ
1. Παραλαβή Σταφυλιών	Συνολική ποσότητα σταφυλιού σε Kg (περίπου 20 kg/τελάρο)
	Άνοιγμα καρτέλας ζύμωσης και καθημερινή ενημέρωση Ενημέρωση βιβλίου τρύγου
	Δείγμα 200 ραγών σε κατάψυξη
	Δείγμα 100 ραγών για μέτρηση βάρους και στο ίδιο δείγμα μέτρηση όγκου
2. Εκραγισμός - Σπάσιμο	Προσθήκη 4 g/hL metabisulfit σταδιακά στη σταφυλομάζα
	Προσθήκη 10 g/hL ασκορβικού οξέος σταδιακά στη σταφυλομάζα
	Πίεση στα 0,4 bar για 15 min. Δεύτερη πίεση (σπάσιμο πίεσης και ανακάτεμα σταφυλομάζας) στα 0,4 bar για 5 min αν υπάρχει ανάγκη για πρόσθετο γλεύκος.
	Μετρήσεις γλεύκους (Brix, OO, pH, YAN, Ένταση, Απόχρωση, ΔΦΟ)
3. Γλεύκος	Εκτίμηση συνολικού όγκου γλεύκους σε σε λίτρα
	Προσθήκη 3 g/hL metabisulfite
	Προσθήκη 5 g/hL γαλλοτανίνης
	Μετά από 1 h προσθήκη πτηκτινολυτικών ενζύμων (Rohavin clear) 3 mL/hL
	Παραμονή 2h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
4. Στατική απολάσπωση	Παραμονή για 14-18 h σε χαμηλή θερμοκρασία 4 °C (δεξαμενή με εναλλάκτη ή μεταφορά στον ψυγειοθάλαμο)
5. Απολάσπωση	Παραλαβή καθαρού υπερκείμενου γλεύκους και μέτρηση όγκου
	Μετρήσεις γλεύκους (Brix, OO, pH, NTU, YAN)
	Διόρθωση περιεκτικότητας σακχάρων ή οξέων όπου χρειάζεται
6. Εμβολιασμός	Παραμονή γλεύκους για άνοδο θερμοκρασίας στους 16-17 C
	Εμβολιασμός με προετοιμασμένο εμβόλιο ζύμης 20 g/hL (GV S107)
	Προσθήκη 20 g/hL σκευάσματος γλουταθειόνης (Spring Arom)
	Προσθήκη 10g/hL Spring cell
	Οργανική θρέψη αζώτου 20 g/hL (Springferm)
7. Αλκοολική Ζύμωση	Ελεγχόμενη θερμοκρασία ζύμωσης 18-20 °C
	Παρακολούθηση ζύμωσης με μέτρηση Brix και θερμοκρασίας καθημερινά
	Στο 1/3 υπόλοιπων σακχάρων προσθήκη ανόργανης θρέψης αζώτου 20 g/hL DAP

8. Αποζύμωση	Προσδιορισμός υπολοιπούμενων σακχάρων Τέλος αλκοολικής ζύμωσης
	Απολάσπωση και θείωση με 8 g/hL metabisulfite
9. Αποθήκευση	Μεταφορά νέων οίνων σε ψυκτικό θάλαμο 4 °C

3.1.8 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟΥ ΟΙΝΟΥ – ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΡΩΜΑΤΟΣ

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος (μόνο οσμή). Σκοπός ήταν η αξιολόγηση και η σύγκριση των αρωμάτων των παραγόμενων οίνων όπως τα αντιλαμβάνεται το άτομο.

Ως τόπος διεξαγωγής της ποσοτικής έρευνας ορίστηκε ο ειδικά διαμορφωμένος χώρος του Εργαστηρίου Οινολογίας. Ο χώρος είναι εξοπλισμένος με ξεχωριστούς λευκούς πάγκους και διαθέτει γυάλινα ποτήρια γευσιγνωσίας οίνου ISO. Τα ποτήρια έχουν σχήμα τουλίπας. Το κάθε ποτήρι πληρώθηκε με 30 ml οίνου και έφερε καπάκι για την μείωση της απώλειας αρωμάτων. Στο σύνολο τα δείγματα προς οργανοληπτικό έλεγχο ήταν εννιά.

Συμπληρώθηκαν ερωτηματολόγια από 14 αξιολογητές (άντρες και γυναίκες). Τα κριτήρια, τα οποία κλήθηκαν να αξιολογήσουν αφορούσαν στα εξής χαρακτηριστικά: ένταση αρώματος, φρουτώδης χαρακτήρας, ελαττωματικές οσμές και συνολική εκτίμηση. Παρακάτω εμφανίζεται η φόρμα όπως χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτέλεση του.

Συγκεκριμένα, ο οργανοληπτικός έλεγχος αρώματος των παραγόμενων πειραματικών οίνων πραγματοποιήθηκε από 14 εκπαιδευμένους και έμπειρους δοκιμαστές (μεταπτυχιακούς φοιτητές οινολογίας, διδάκτορες οινολογίας και μεταδιδάκτορες) της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με ηλικίες μεταξύ 25-45 και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα στο παρακάτω ερωτηματολόγιο, το οποίο διαμορφώθηκε για να εκτιμήσει το συνολικό άρωμα, την έντασή του, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων πειραματικών οίνων, καθώς και τις ελαττωματικές οσμές τους, οι οποίες προέκυψαν κυρίως λόγω του οι ποσότητες του γλεύκους προς οινοποίηση ήταν πολύ μικρές 1-1,5L και ήταν πολύ εύκολο να εκτραπούν. Το θετικό αρωματικό προφίλ απαρτίζεται από τις εξής κατηγορίες: φρέσκα φρούτα, ξηρά φρούτα και ζύμες και στο αρνητικό αρωματικό προφίλ ανήκουν το οξικό οξύ που υποδηλώνει οξείδωση με οσμή ξιδιού, ο οξικός αιθυλεστέρας (με μυρωδιά κόλλας, ασετόν σε μεγάλες συγκεντρώσεις) και το υδρόθειο με τις χαρακτηριστικές αναγωγικές οσμές κλούβιου αυγού. Αναφέρεται σε εξειδικευμένα ελαττώματα και όχι σε περιγραφές οσμών, διότι απευθύνεται σε έμπειρους δοκιμαστές/αξιολογητές.

Πίνακας 19. Ερωτηματολόγιο επεξήγησης βαθμολόγησης κριτηρίων αρώματος - οργανοληπτικού οσφρητικού ελέγχου 27/11/19

ΑΡΩΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ								
ΔΕΙΚΤΗΣ ΕΝΤΑΣΗΣ	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ	ΕΝΤΑΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ	ΦΡΕΣΚΑ ΦΡΟΥΤΑ	ΞΗΡΑ ΦΡΟΥΤΑ	ΖΥΜΕΣ	ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	ΟΞΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΥΔΡΟΘΕΙΟ
1	Μη αποδεκτό - ελαττωματικό	Χαμηλή	Καθόλου - Ελάχιστα	Καθόλου - Ελάχιστα	Καθόλου - Ελάχιστα	Καθόλου - Ελάχιστα	Καθόλου - Ελάχιστα	Καθόλου -
2	Οριακά Αποδεκτό	Μέτρια	Λίγο	Λίγο	Λίγο	Λίγο	Λίγο	Λίγο
3	Μέτρια ευχάριστο	Ικανοποιητική	Μέτρια - Αρκετα	Μέτρια - Αρκετα	Μέτρια - Αρκετα	Μέτρια - Αρκετα	Μέτρια - Αρκετα	Μέτρια - Αρκετα
4	Πολύ καλό - εξαιρετικό	Υψηλή	Πολύ - Πάρα πολύ	Πολύ - Πάρα πολύ	Πολύ - Πάρα πολύ	Πολύ - Πάρα πολύ	Πολύ - Πάρα πολύ	Πολύ - Πάρα πολύ

ΚΩΔΙ ΚΟΣ ΑΕΙΓ ΜΑΤ ΟΣ	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟ Σ	ΕΝΤΑΣΗ ΑΡΩΜΑΤ ΟΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ - ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ - ΕΝΑΤΩΜΑΤΙΚΕ Σ ΟΣΜΕΣ
	1 Μη Αποδεκτό - Ελαττωματικό 2 Αποδεκτό 3 Ευχάριστο 4 Πολύ καλό	1 Χαμηλή 2 Μέτρια 3 Ικανοποιητική 4 Υψηλή	Φρέσκα φρούτα 1 2 3 4 Ξηρά Φρούτα 1 2 3 4 Ζύμες 1 2 3 4	Οξικό οξύ 1 2 3 4 Οξ.Διθ/στέρας 1 2 3 4 Υδρόθειο 1 2 3 4
	1 Μη Αποδεκτό - Ελαττωματικό 2 Αποδεκτό 3 Ευχάριστο 4 Πολύ καλό	1 Χαμηλή 2 Μέτρια 3 Ικανοποιητική 4 Υψηλή	Φρέσκα φρούτα 1 2 3 4 Ξηρά Φρούτα 1 2 3 4 Ζύμες 1 2 3 4	Οξικό οξύ 1 2 3 4 Οξ.Διθ/στέρας 1 2 3 4 Υδρόθειο 1 2 3 4
	1 Μη Αποδεκτό - Ελαττωματικό 2 Αποδεκτό 3 Ευχάριστο 4 Πολύ καλό	1 Χαμηλή 2 Μέτρια 3 Ικανοποιητική 4 Υψηλή	Φρέσκα φρούτα 1 2 3 4 Ξηρά Φρούτα 1 2 3 4 Ζύμες 1 2 3 4	Οξικό οξύ 1 2 3 4 Οξ.Διθ/στέρας 1 2 3 4 Υδρόθειο 1 2 3 4

Πίνακας 20. Ερωτηματολόγιο οργανοληπτικού ελέγχου, οσφρητικής αξιολόγησης των παραγόμενων οίνων.

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

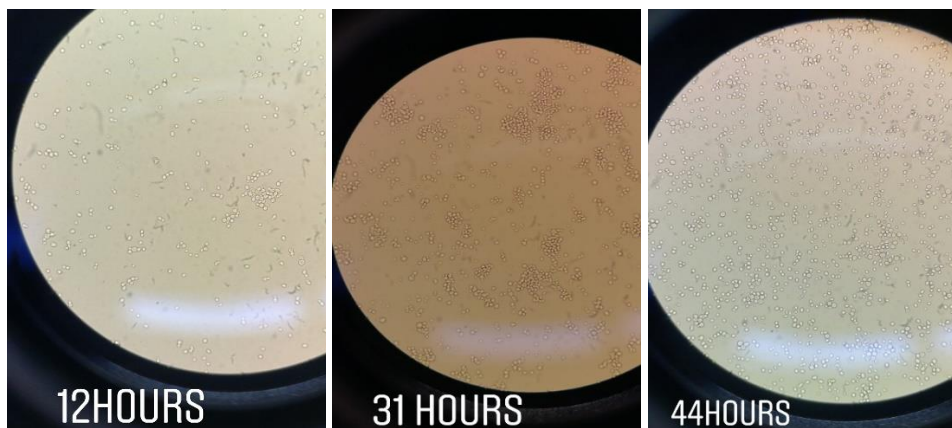
3.2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα μεταβολικά προϊόντα που παράγαγε ο κάθε μικροοργανισμός μέσω της αλκοολικής ζύμωσης του συνθετικού υποστρώματος γλυκόζης, καθώς και οι πληροφορίες που προκύπτουν από την ανάλυση αυτών.

Σε καθарές καλλιέργειες, οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης βιβλιογραφικά βρέθηκαν ως εξής: $\mu_{max} = 0,29 \text{ h}^{-1}$ για *H. uvarum*, $0,23 \text{ h}^{-1}$ για *H. guilliermondii* και $0,18 \text{ h}^{-1}$ για *S. cerevisiae* και επαληθεύτηκαν με την απόδοση της πρώτης ζύμωσης του κάθε στελέχους ζύμης. Όσον αφορά στη *M.pulcherrima* επιλέχθηκε ως ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: $0,29 \text{ h}^{-1}$. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ αυτών των τιμών και εκείνων που ελήφθησαν σε μικτές καλλιέργειες (Moreira et al.2008). Όσον αφορά στους χρόνους επώασης μέχρι την εκθετική φάση (της υγρής προκαλλιέργειας) επιλέχθηκαν κυρίως πειραματικά, με $t = 48\text{h}$ για τη ζύμη *M.pulcherrima*, $t = 30\text{h}$ για *H.uvarum* και *H.guilliermondii*, και τέλος 24h *S.cerevisiae*

3.2.1.1 METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA LFMB 1

Κατά την ανάπτυξη σε υπόστρωμα γλυκόζης ως μοναδική πηγή άνθρακα, ο μικροοργανισμός *M. pulcherrima*, εμφάνισε ταχεία πρόσληψη αυτής που οδηγεί σε ταυτόχρονη παραγωγή, μεσαίας ποσότητας αιθανόλης (μέγιστη τιμή $24,24\text{g/l}$ στις 24 h), τη μεγαλύτερη ανάμεσα στους εξεταζόμενους άγριους ζυμομύκητες. Μετά την κατανάλωση της γλυκόζης στις 35h , ο μικροοργανισμός προκειμένου να διατηρήσει τη βιομάζα του, αρχίζει να διασπά την παραχθείσα αιθανόλη (ανακατανάλωση). Στο σημείο αυτό ο μικροβιακός πληθυσμός βρέθηκε στη στάσιμη φάση της ανάπτυξης κι επομένως ο ρυθμός αύξησης ισούται με το ρυθμό θανάτου. Οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες και η σύνθεση λιπιδίων έχουν αντίστροφη μεταξύ τους πορεία. Ο μικροοργανισμός εκκινεί να συνθέτει ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες στην έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, οι οποίοι παρουσιάζουν μέγιστο, στο σημείο που έχει καταναλωθεί το διαθέσιμο σάκχαρο, ενώ στη συνέχεια η συγκέντρωσή τους μειώνεται. Αντίθετα, η σύνθεση λιπιδίων εκκινεί ταυτόχρονα με την αρχή της σύνθεσης των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών και εξακολουθεί παράλληλα με την πτώση των πολυσακχαριτών και την ανάλωση της εξωκυτταρικής αιθανόλης. Ωστόσο, η ποσότητα του ενδοκυτταρικού λίπους ανά ξηρά βιομάζα μικροοργανισμού είναι σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας περιορισμένη.



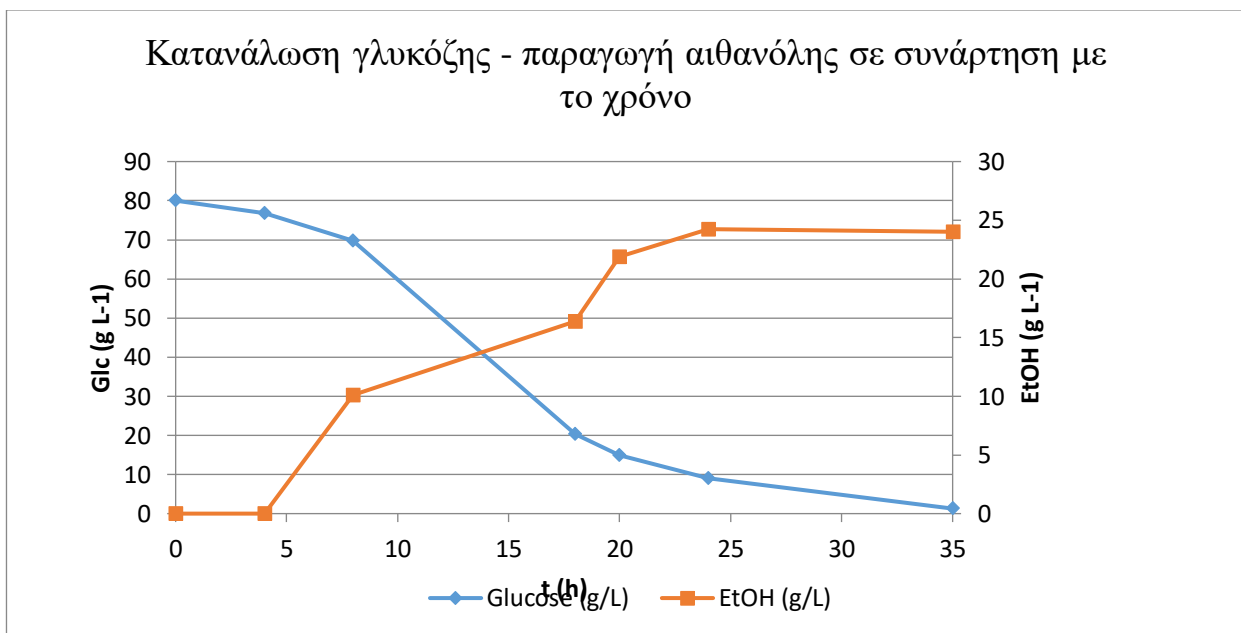
Εικόνα 70. Ζύμωση *M. pulcherrima* (αριστερά) 12h, 31h (μέση) και 44h (δεξιά). Μικροσκοπική παρατήρηση της καλλιέργειας.

Πίνακας 21. Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Metschnikowia pulcherrima* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη 80g/L. Συνθήκες αύξησης: time (h), DW: ξηρά βιομάζα (g L⁻¹), Glc: συγκέντρωση υποστρώματος γλυκόζης (g L⁻¹), EtOH: ποσότητα αιθανόλης (g L⁻¹), Y_{EtOH/Scon} (w/w) %: ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα, Y_{L/DW} (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς το ενδοκυτταρικό λίπος, Y_{IPS/DW} (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, Y_{DW/GLC} (w/w) %: ποσότητα ξηράς βιομάζας ανά υπόστρωμα γλυκόζης, Y_{EtOH/Glc} (w/w) %: ποσότητα αιθανόλης ανά υπόστρωμα γλυκόζης, Scon (g L⁻¹): καταναλωθείσα γλυκόζη.

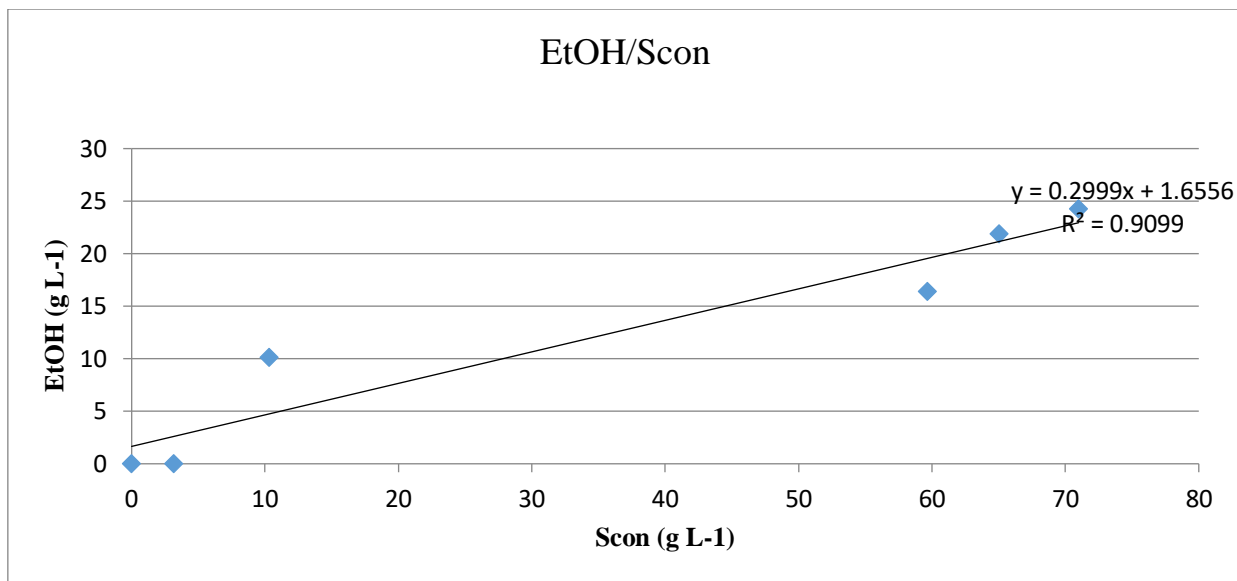
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>									
t(h)	DW (g L ⁻¹)	Glc(g L ⁻¹)	EtOH (g L ⁻¹)	Gly (g L ⁻¹)	Y _{L/DW} (% w/w)	Y _{IPS/DW} (% w/w)	Y _{X/S} (DW/Glc)	Y _{EtOH/Scon} (% w/w)	Scon (g L ⁻¹)
0	0	80,01	0	0	0	0	0	0	0
4	0,21	76,87	0	0	0	0	0,003	0	3,14
8	0,58	69,71	10,10	0	4,7	0	0,008	0,981	10,30
18	8,13	20,37	16,39	0,35	1,8	15,7	0,399	0,274	59,64
20	9,17	14,98	21,91	0,36	1	17,7	0,613	0,337	65,03
24	12,98	9,02	24,24	0,37	1,5	19,1	1,440	0,341	70,99
35	12,52	1,28	24,04	0	1,8	18,4	9,781	0,305	78,73

Όσον αφορά στο οξικό οξύ, παρουσιάζεται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, επομένως δεν ανιχνεύεται από τη στήλη της HPLC.

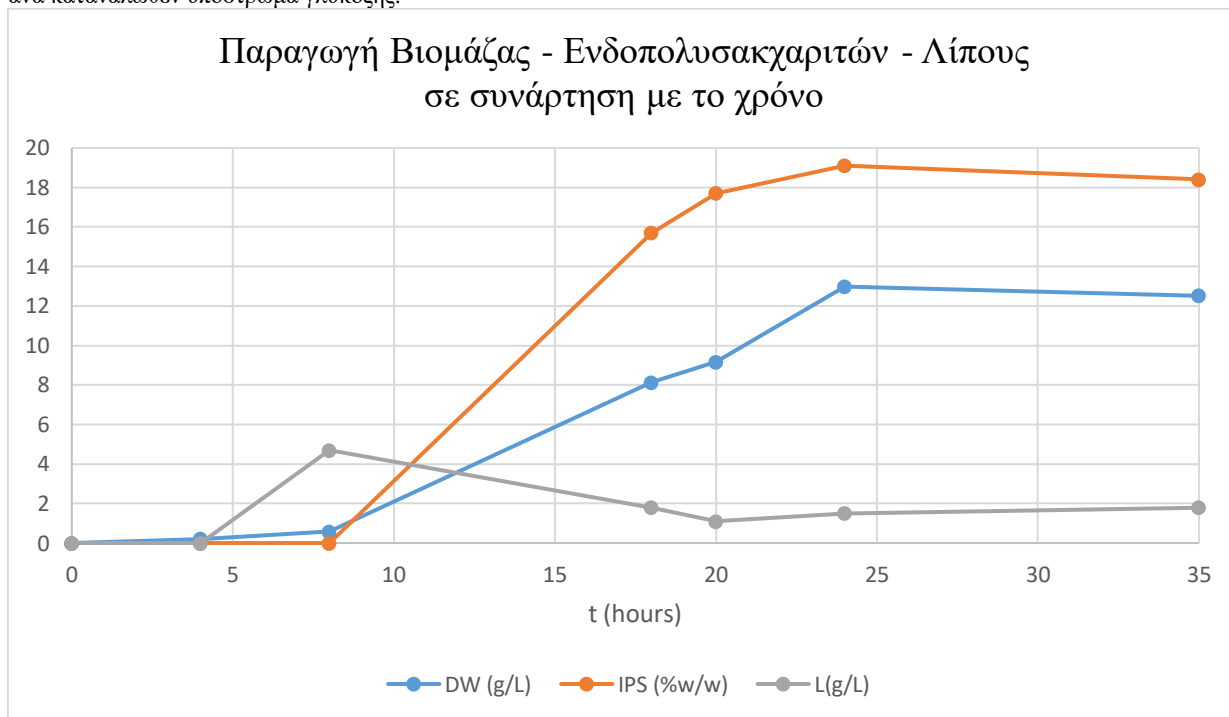
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ *M. PULCHERRIMA*



Διάγραμμα 1. Η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. Glc (g/L): καταναλωθείσα γλυκόζη, EtOH (g/L): παραχθείσα αιθανόλη.

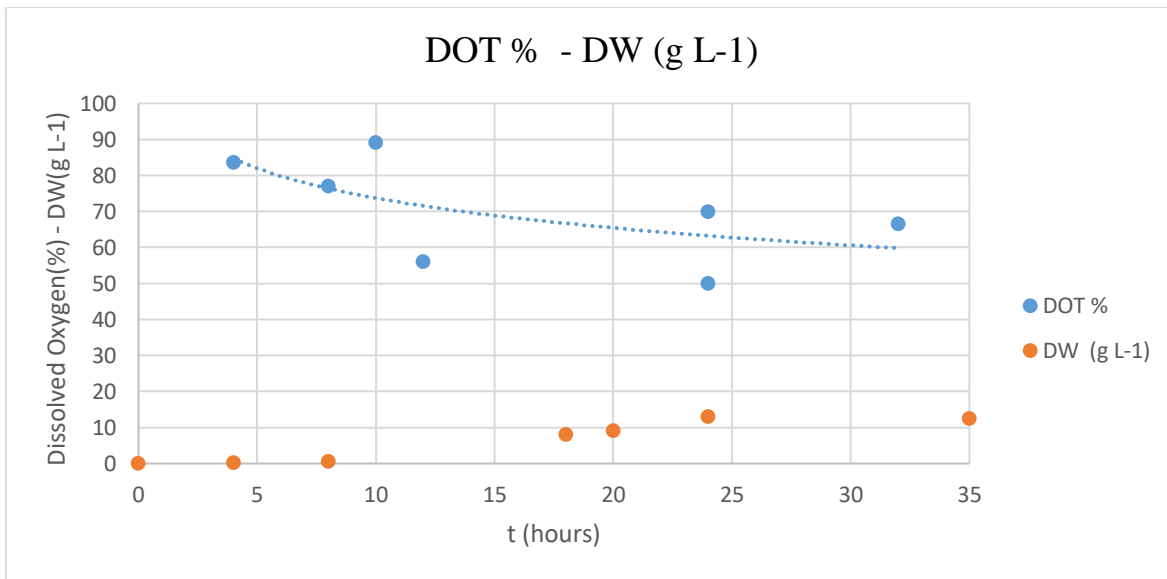


Διάγραμμα 2. Η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. EtOH/Scon (w/w) %: ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκόζης.

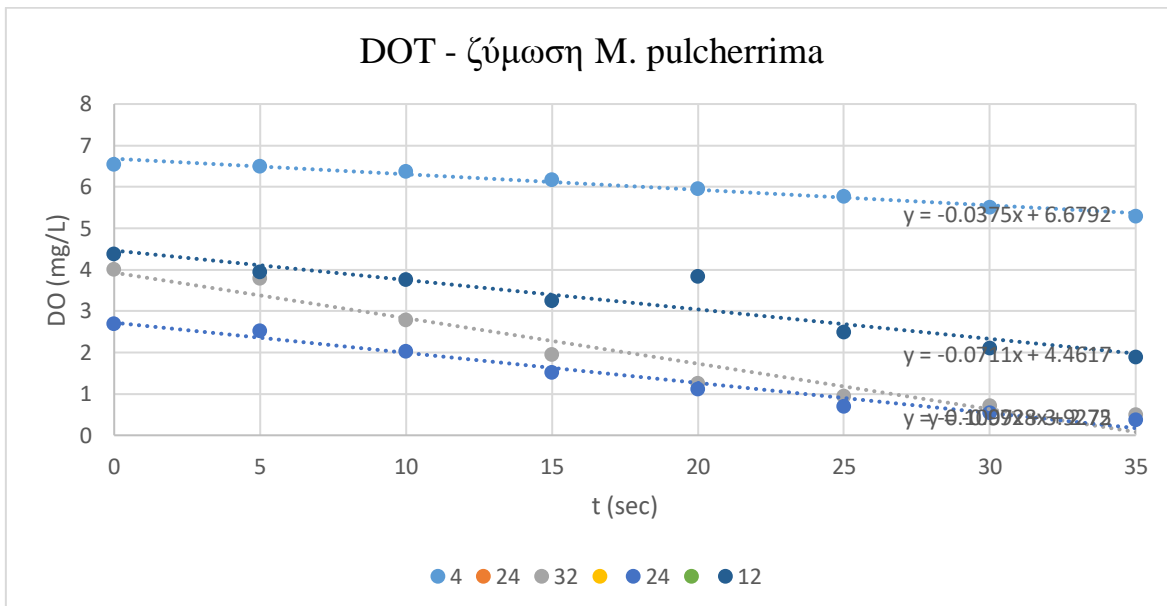


Διάγραμμα 3. Η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. DW (g/L): παραγόμενη βιομάζα, L/DW (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς το ενδοκυτταρικό λίπος, IPS/DW (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες.

Στο παρακάτω διάγραμμα κατανάλωσης οξυγόνου, παρουσιάζεται η τάση του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας ανά συγκεκριμένες ώρες καλλιέργειας. Απεικονίζεται η πορεία του διαλυτού οξυγόνου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η παραγόμενη αιθανόλη αυξάνεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ παράλληλα το διαλυτό οξυγόνο μειώνεται. Συγκεκριμένα, στις 24 ώρες με μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης 24,24 g/L, το διαλυτό οξυγόνο ισούται με 32 % v/v.



Διάγραμμα 4. Κατανάλωση οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας. DOT% (v/v): τάση του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας ανά συγκεκριμένες ώρες καλλιέργειας. Πορεία οξυγόνου κατά την αλκοολική ζύμωση με ταυτόχρονη αύξηση της βιομάζας (g L-1).



Διάγραμμα 5. Κατανάλωση οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας. Dissolved Oxygen (mg/L): τάση πτώσης διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας ανά sec μέτρησης για συγκεκριμένες ώρες καλλιέργειας.

3.2.1.2 HANSENIASPORA UVARUM OSTIBFWI

Κατά την ανάπτυξη σε υπόστρωμα γλυκόζης, ο μικροοργανισμός *H. uvarum* παρουσίασε παραγωγή αιθανόλης με μέγιστη τιμή 17,78 g/l (στις 48h). Μετά την κατανάλωση της γλυκόζης στις 66h, ο μικροοργανισμός προκειμένου να διατηρήσει τη βιομάζα του, διασπά όπως φαίνεται και από το σχετικό διάγραμμα, την παραχθείσα αιθανόλη. Στο σημείο αυτό ο μικροβιακός πληθυσμός βρέθηκε στη στάσιμη φάση της ανάπτυξής. Ο μικροοργανισμός παρουσιάζει μέγιστο, στο σημείο που έχει καταναλωθεί σχεδόν όλο το διαθέσιμο σάκχαρο και η ποσότητα της παραγόμενης αιθανόλης είναι μέγιστη, έπειτα ακολούθησε ανακατανάλωσή της.

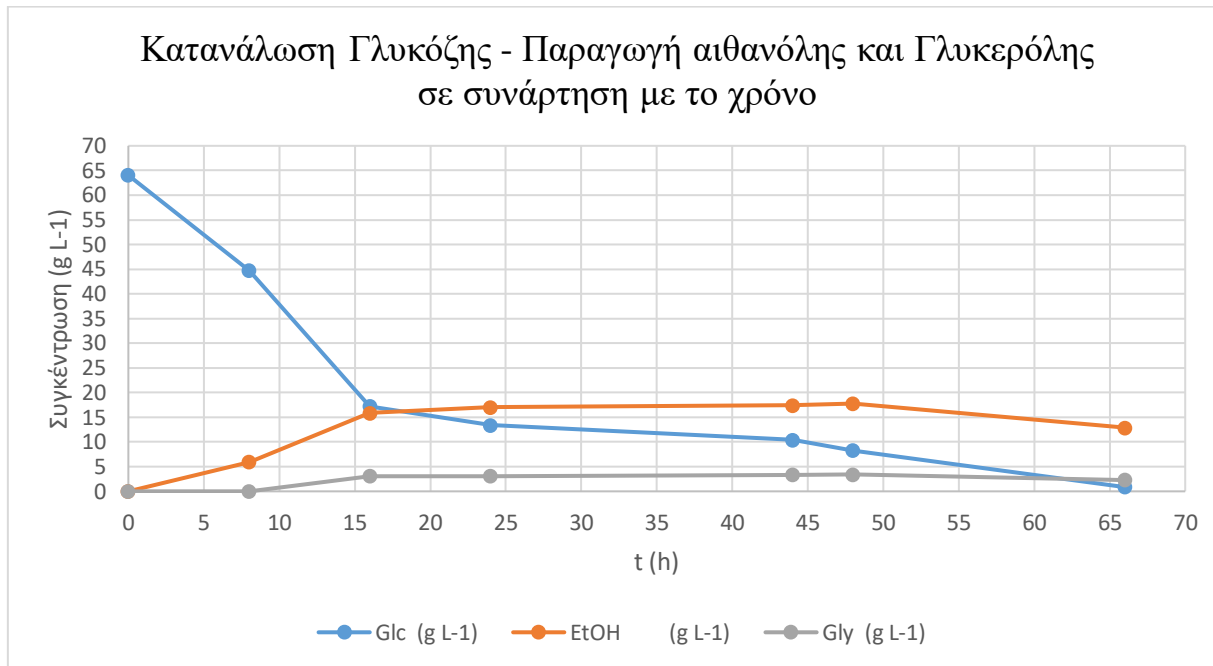
Μελετήθηκε, επίσης, η ικανότητα του ζυμομύκητα να παράγει γλυκερόλη κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η παραγωγή γλυκερόλης ξεκίνησε στις 16h περίπου, τη στιγμή που άρχισε να καταναλώνεται τάχιστα το σάκχαρο (από τις 8 μέχρι τις 16h). Το μέγιστο σημείο της σημειώθηκε στις 48 της ζύμωσης, με συγκέντρωση 3,43 g/l. Η παραγωγή γλυκερόλης συνδέεται στενά με τη διαθεσιμότητα των ζυμώσιμων σακχάρων που βρίσκονται στα γλεύκη. Επομένως, μπορεί να γίνει κατανοητό, γιατί σημειώθηκε σε μικρό ποσό συγκέντρωσης. Τέλος, όσον αφορά στο οξικό οξύ, εμφανίζεται σε μικρές συγκεντρώσεις που αυξάνουν μέχρι τις 48 h και έπειτα υποδιπλασιάζεται.

Πίνακας 22. Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Hanseniaspora uvarum* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη 70g/l. Συνθήκες αύξησης: time (h), DW: ξηρά βιομάζα (g L⁻¹), Glc: συγκέντρωση υποστρώματος γλυκόζης (g L⁻¹), EtOH: ποσότητα αιθανόλη (g L⁻¹), Gly: ποσότητα γλυκερόλης (g L⁻¹), Y_{EtOH/Scon} (w/w) %: ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα, Y_{L/DW} (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς το ενδοκυτταρικό λίπος, Y_{IPS/DW} (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, Y_{DW/GLC} (w/w) %: ποσότητα ξηράς βιομάζας ανά υπόστρωμα γλυκόζης, Y_{EtOH/Glc} (w/w) %: ποσότητα αιθανόλης ανά υπόστρωμα γλυκόζης, Scon (g L⁻¹): καταναλωθείσα γλυκόζη.

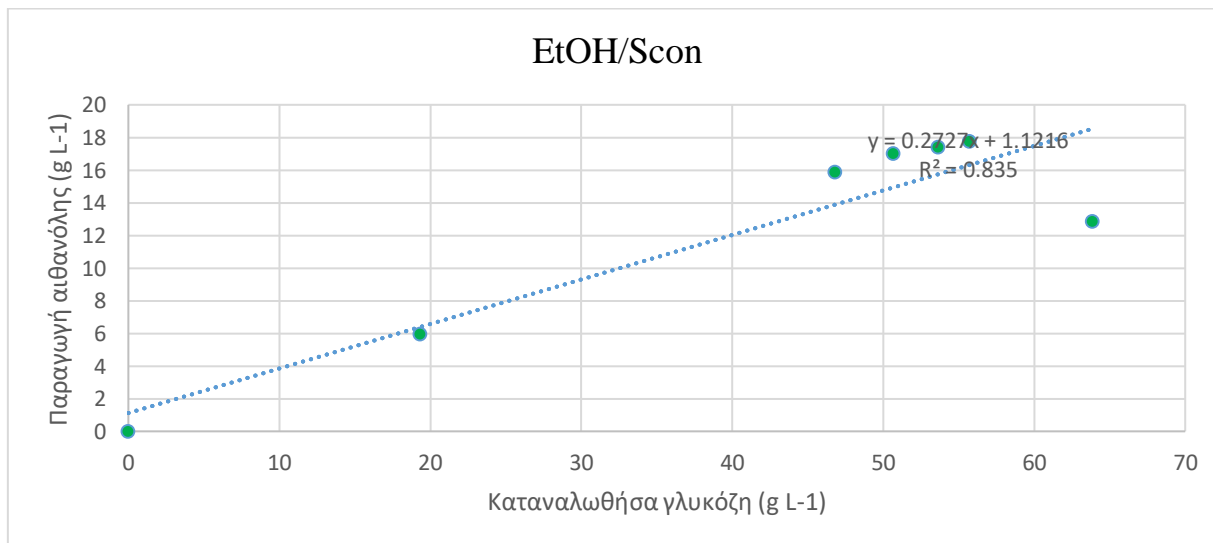
Hanseniaspora uvarum

t(h)	DW (g L ⁻¹)	Glc (g L ⁻¹)	EtOH (g L ⁻¹)	Gly (g L ⁻¹)	Y _{X/S} (DW/Glc) (% w/w)	Y _{L/DW} (% w/w)	Y _{IPS/DW} (% w/w)	Y _{EtOH/Glc} (% w/w)	Y _{EtOH/Scon} (% w/w)	Scon (g L ⁻¹)	Acetic acid (g L ⁻¹)
0	0	64,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	3,023	44,7	5,97	0	0,068	4,12	0	0,134	0,309	19,33	0
16	2,84	17,22	15,87	3,12	0,165	5,443	0	0,922	0,339	46,81	0,28
24	2,73	13,38	17,03	3,1	0,204	2,754	0	1,273	0,336	50,65	0,34
44	2,4	10,39	17,4	3,37	0,231	2,396	0,1	1,675	0,324	53,64	0,36
48	2,34	8,31	17,78	3,43	0,281	1,984	3	2,17	0,324	55,72	0,37
66	2,29	0,86	12,88	2,32	0,023	1,773	6	11,103	0,205	63,87	0,15

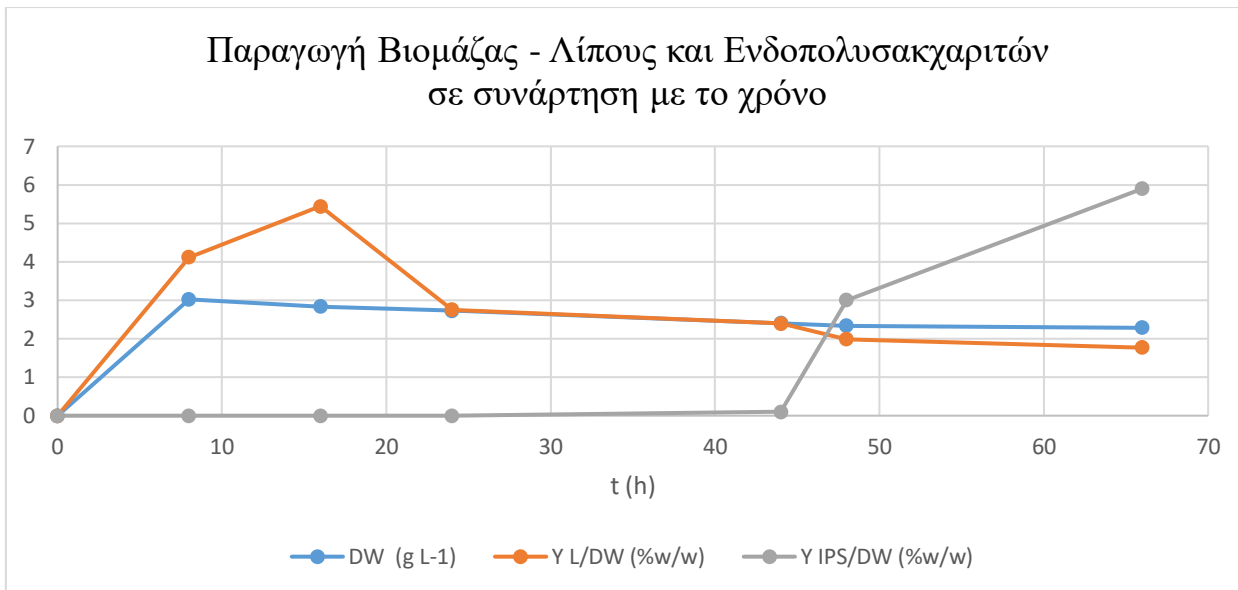
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ *H. UVARUM*



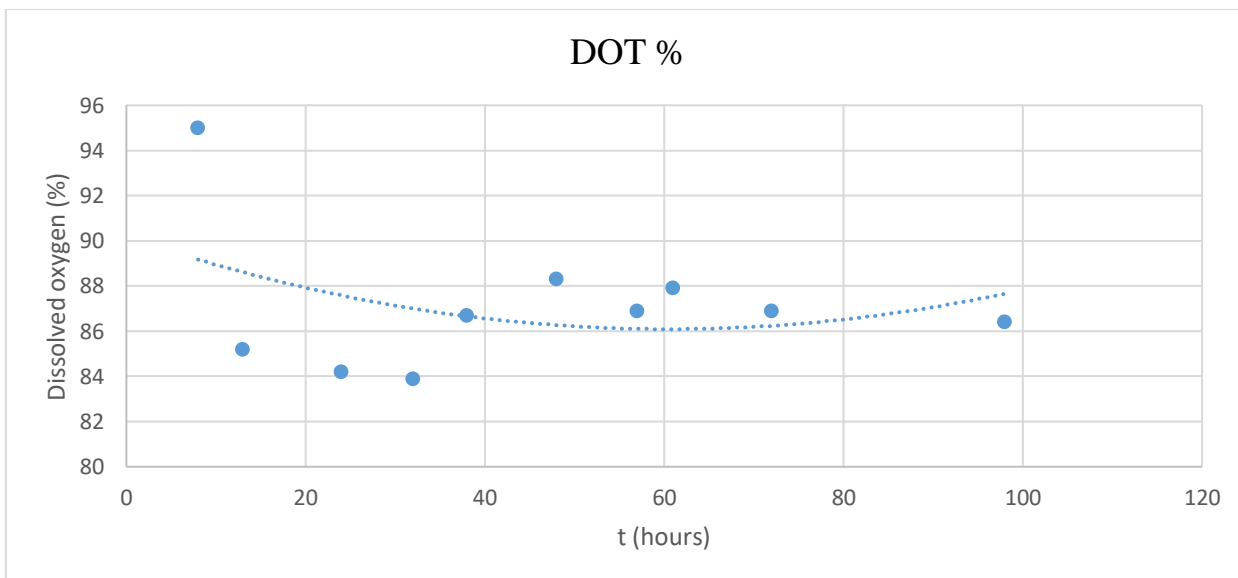
Διάγραμμα 6. Η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. Glc (g/L): καταναλωθείσα γλυκόζη, EtOH (g/L): παραχθείσα αιθανόλη, Gly (g/L): παραχθείσα γλυκερόλη.



Διάγραμμα 7. Η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. EtOH/Scon (w/w) %: ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα.

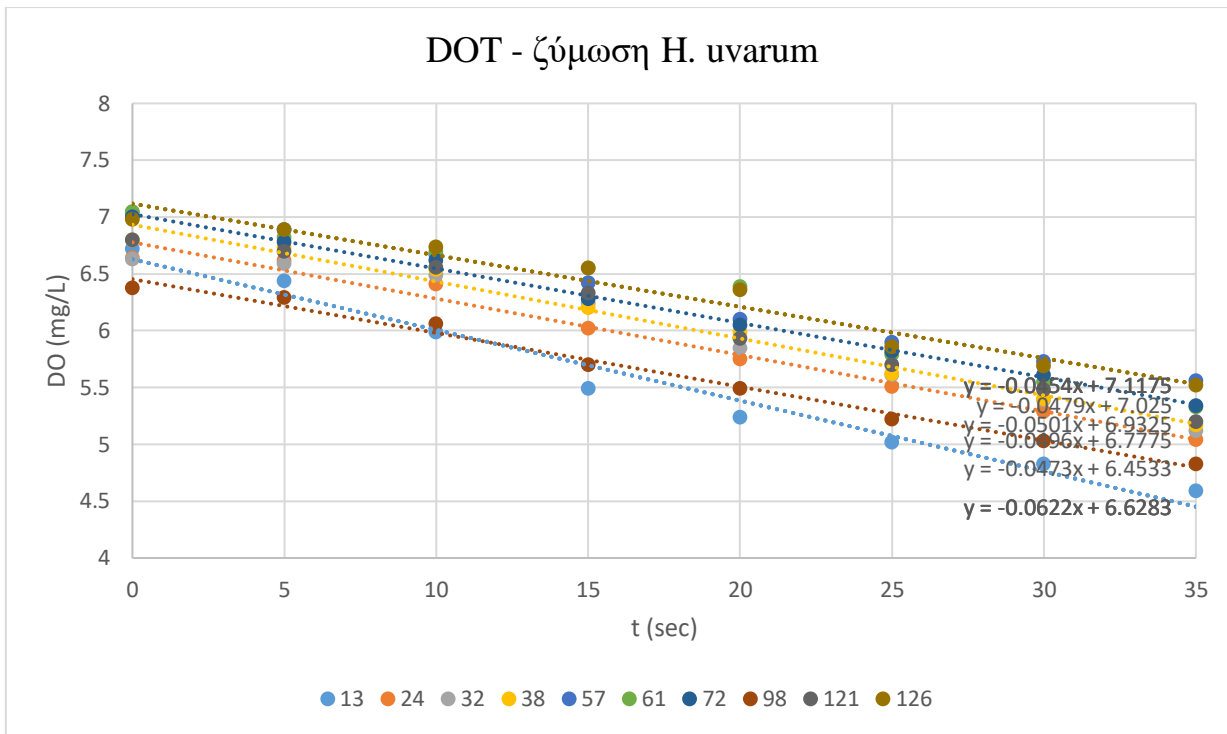


Διάγραμμα 8. Η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. DW (g/L): παραγόμενη βιομάζα, L/DW (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς το ενδοκυτταρικό λίπος, IPS/DW (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες



Διάγραμμα 9. Κατανάλωση οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας. DOT% (v/v): τάση του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας ανά συγκεκριμένες ώρες καλλιέργειας. ως συνάρτηση του χρόνου.

Στο παρακάτω διάγραμμα κατανάλωσης οξυγόνου, παρουσιάζεται η τάση του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας ανά συγκεκριμένες ώρες καλλιέργειας και μπορεί να παρατηρηθεί η πορεία του κατά την αλκοολική ζύμωση του *H. uvarum* αρνητική κατά Crabtree ζύμη. Το διαλυτό οξυγόνο τις πρώτες ώρες κατά την παραγωγή της αιθανόλης μειώνεται ελάχιστα και στην συνέχεια (με τη μείωση της αιθανόλης) αυξάνεται ελάχιστα. Αυτό μπορεί να συμβαίνει εξαιτίας της έντονης μεταβολικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού και στην παραγωγή αερίου CO₂ κατά την αλκοολική ζύμωση. Για παράδειγμα, στις 48 ώρες που καταγράφηκε το μέγιστο σημείο της αιθανόλης (από ότι φαίνεται στο διάγραμμα της παραγωγής της αιθανόλης 17,8 g/L), το διαλυτό οξυγόνο ισούται με 88,3% v/v, ενώ στις 121 ώρες με την ανακατανάλωσης της αιθανόλης ισούται με 91,4 % v/v. Επομένως, εμφανίζουν μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση.



Διάγραμμα 10. Κατανάλωση οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας. Dissolved Oxygen (mg/L): τάση πτώσης διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας ανά sec μέτρησης για συγκεκριμένες ώρες καλλιέργειας.



Εικόνα 71. Ζύμωση *Hanseniaspora uvarum* (αριστερά) 48h, 66h και 70h (μέση) και 80h (δεξιά). Μικροσκοπική παρατήρηση.

3.2.1.3 HANSENIASPORA GUILLIERMONDII OSP1BFW12

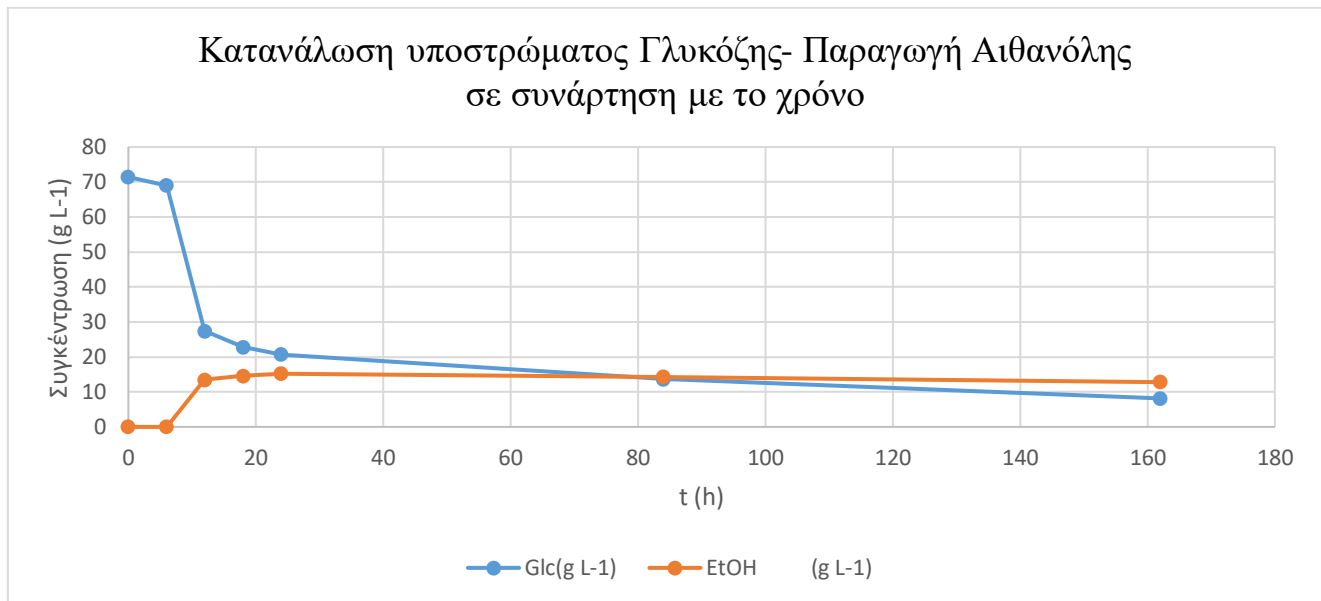
Κατά την ανάπτυξη σε υπόστρωμα γλυκόζης, ο μικροοργανισμός *H. guilliermondii*, εμφάνισε **ταχεία πρόσληψη αυτής που οδηγεί σε ταυτόχρονη παραγωγή αιθανόλης με μέγιστο στις 24 h**. Μικρότερη από αυτή του στελέχους *M. pulcherrima* ακόμα και του στελέχους *H. uvarum*. Η κινητική του στελέχους με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 71,42 g/L απεικονίζεται στο διάγραμμα κατανάλωσης γλυκόζης – παραγωγή αιθανόλης. Σύμφωνα με αυτό, η κατανάλωση των σακχάρων δεν είχε ολοκληρωθεί μέχρι το τελικό σημείο του πειράματος (162 h), αφήνοντας αζύμωτα σάκχαρα 8,14223g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης σημειώθηκε στις 24 ώρες και ισούται με 15,19 g/L. Στον ακόλουθο πίνακα, παρατίθενται τα στοιχεία της μεταβολικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, η βιομάζα μετά τις 18 ώρες (μέγιστο 2,77 g/L) άρχισε να μειώνεται. **Μετά την κατανάλωση της γλυκόζης, ο μικροοργανισμός προκειμένου να διατηρήσει τη βιομάζα του, διασπά την παραχθείσα αιθανόλη. Στο σημείο αυτό ο μικροβιακός πληθυσμός βρέθηκε στη στάσιμη φάση της ανάπτυξης.** Ο μικροοργανισμός εκκινεί να συνθέτει ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες στην έναρξη σχετικά της αλκοολικής ζύμωσης (μετά τις 10 πρώτες ώρες), οι οποίοι παρουσιάζουν μέγιστο, μετά τις 80h, ενώ στη συνέχεια η συγκέντρωσή τους μειώνεται (δε φαίνεται στο διάγραμμα).

Πίνακας 23. Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Hanseniaspora guilliermondii* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη 70 g/l. Συνθήκες αύξησης: time (h), DW: ξηρά βιομάζα (g L⁻¹), Glc: συγκέντρωση υποστρώματος γλυκόζης (g L⁻¹), EtOH: ποσότητα αιθανόλη (g L⁻¹), Gly: ποσότητα γλυκερόλης (g L⁻¹), Y_{EtOH/Scon} (w/w) %: ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα, Y_{L/DW} (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς το ενδοκυτταρικό λίπος, Y_{IPS/DW} (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, Y_{DW/GLC} (w/w) %: ποσότητα ξηράς βιομάζας ανά υπόστρωμα γλυκόζης, Y_{EtOH/Glc} (w/w) %: ποσότητα αιθανόλης ανά υπόστρωμα γλυκόζης, Scon (g L⁻¹): καταναλωθείσα γλυκόζη.

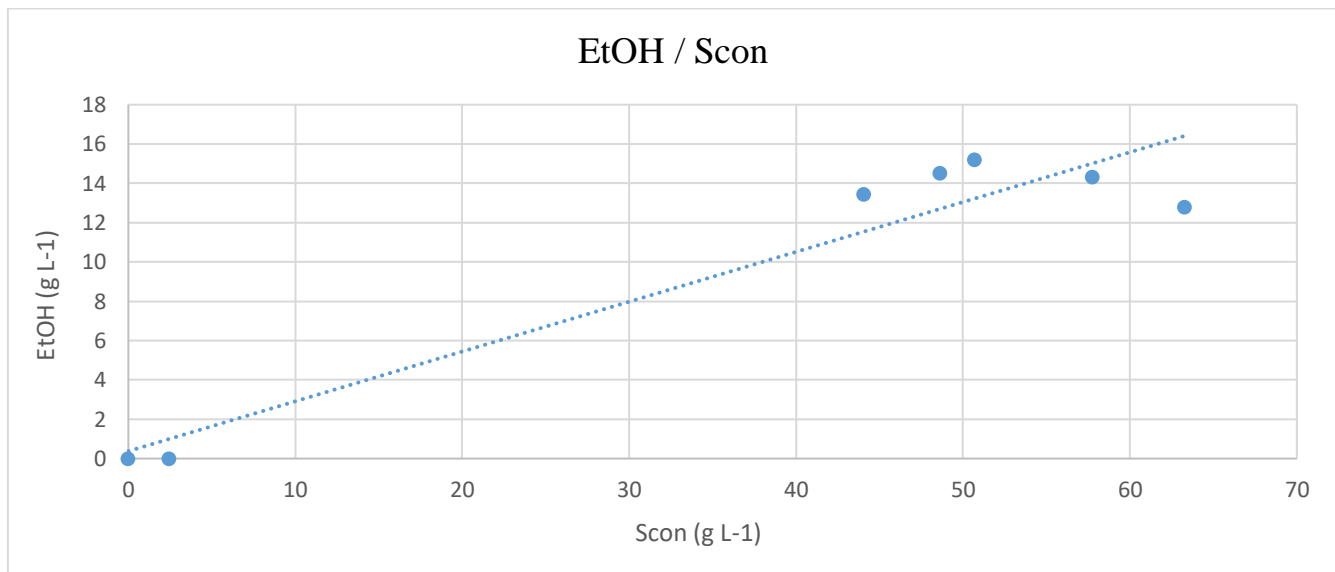
Hanseniaspora guilliermondii

t (h)	DW (g L ⁻¹)	Glc(g L ⁻¹)	EtOH (g L ⁻¹)	Gly (g L ⁻¹)	Y _{EtOH/Glc} (% w/w)	Y _{EtOH/Scon} (%w/w)	Y _{IPS/DW} (%w/w)	Y _{L/DW} (%w/w)	Y _{X/S} (DW/Glc) (% w/w)	Scon (g L ⁻¹)
0	0	71,42	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0,909	69,01	0	0	0	0	0	0	0,013	2,42
12	2,596	27,37	13,43	0	0,491	0,305	2,735	0,712	0,095	44,05
18	2,771	22,79	14,53	0	0,638	0,299	2,671	0,643	0,122	48,63
24	2,558	20,73	15,19	0	0,733	0,300	2,893	0,693	0,123	50,69
84	1,767	13,66	14,32	1	1,048	0,248	4,289	1,489	0,129	57,76
162	1,616	8,142	12,79	1,62	1,571	0,202	5,157		0,198	63,28

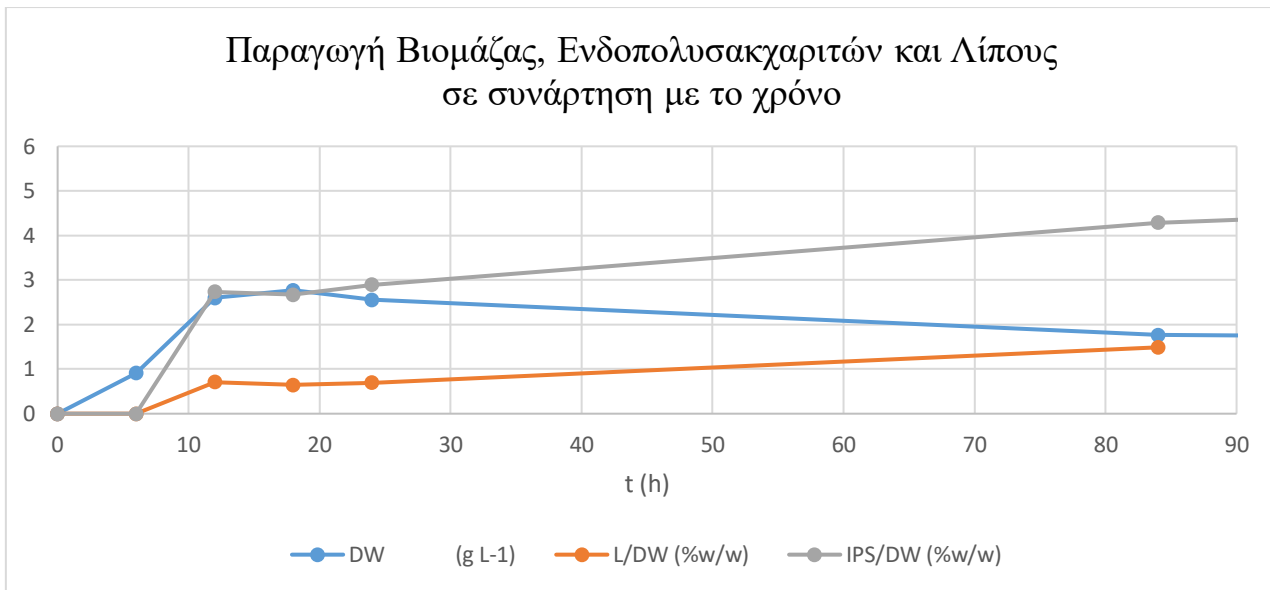
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ *H. GUILLIERMONDII*



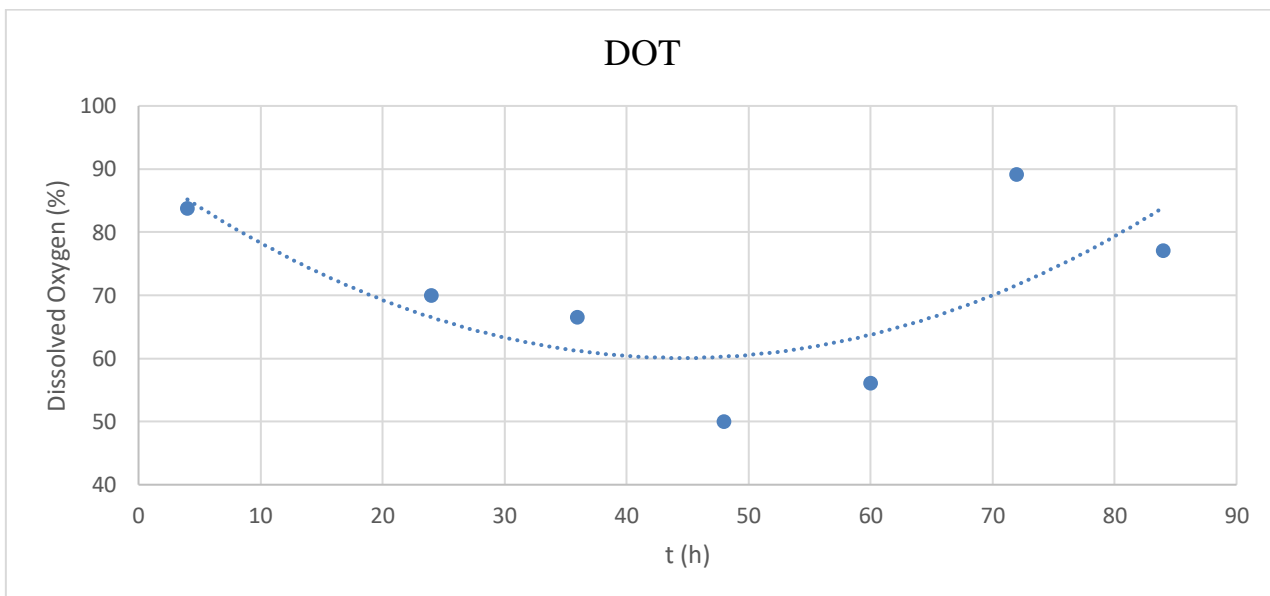
Διάγραμμα 11. Η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. Glc (g/L): καταναλωθήσα γλυκόζη, EtOH (g/L): παραχθήσα αιθανόλη.



Διάγραμμα 12. Η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. EtOH/Scon (w/w) %: ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα.

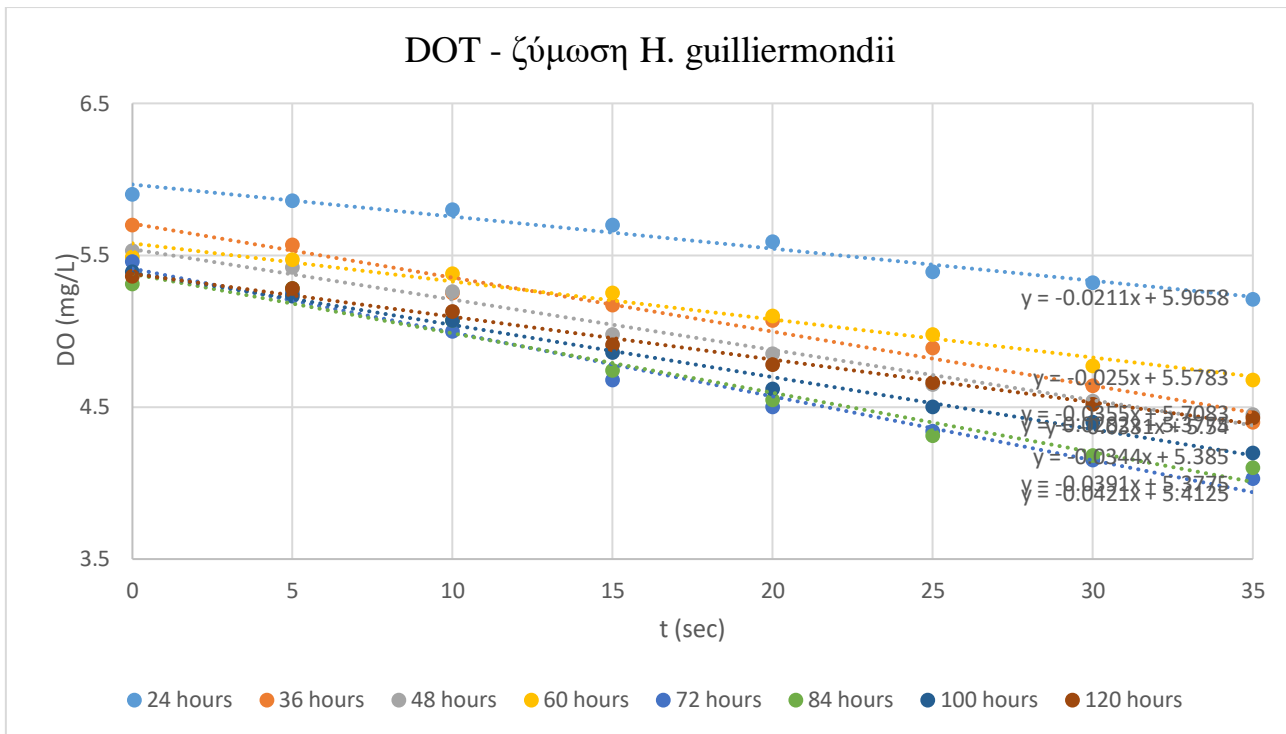


Διάγραμμα 13. Η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. DW (g/L): παραγόμενη βιομάζα, L/DW (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς το ενδοκυτταρικό λίπος, IPS/DW (w/w) %: περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας προς τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες



Διάγραμμα 14. Κατανάλωση οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας. DOT% (v/v): τάση του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας ανά συγκεκριμένες ώρες καλλιέργειας.

Στο παραπάνω διάγραμμα κατανάλωσης οξυγόνου, παρουσιάζεται η τάση του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας ανά συγκεκριμένες ώρες καλλιέργειας και μπορεί να παρατηρηθεί η πορεία του κατά την αλκοολική ζύμωση. Το διαλυτό οξυγόνο τις πρώτες ώρες κατά την παραγωγή της αιθανόλης μειώνεται αρκετά και στην συνέχεια (με τη μείωση της αιθανόλης) αυξάνεται πάλι στα αρχικά επίπεδα. Αυτό μπορεί να συμβαίνει εξαιτίας της έντονης μεταβολικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού και στην παραγωγή αερίου CO₂ κατά την αλκοολική ζύμωση. Συγκεκριμένα, στις 24 ώρες που καταγράφηκε το μέγιστο σημείο της αιθανόλης (από ότι φαίνεται στο διάγραμμα της παραγωγής της αιθανόλης ισούται με 15,19 g/L), το διαλυτό οξυγόνο ισούται με 70 % v/v, αυξάνεται λίγο τις επόμενες ώρες και πάλι στις 121 ώρες με την ανακατανάλωση της αιθανόλης ισούται με 77,1 % v/v.



Διάγραμμα 15. Κατανάλωση οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας. Dissolved Oxygen (mg/L): τάση πτώσης διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας ανά sec μέτρησης για συγκεκριμένες ώρες καλλιέργειας.



Εικόνα 72. Ζύμωση *Hanseniaspora guilliermondii* 120 h. Μικροσκοπική παρατήρηση.

3.2.1.4 SACCHAROMYCES CEREVISIAE RHONE

Ο μικροοργανισμός *S. cerevisiae* είναι ο κατ' εξοχήν μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται στην παραγωγή οίνου και χρησιμοποιήθηκε ως **ζυμομύκητας αναφοράς**, ο οποίος είναι θετικός στο φαινόμενο Crabtree. Οι θετικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες, επιδίδονται σε ζύμωση ακόμα και εν τη παρουσία O_2 , ενώ θα μπορούσαν αρχικά να βασίζονται στην αναπνοή.

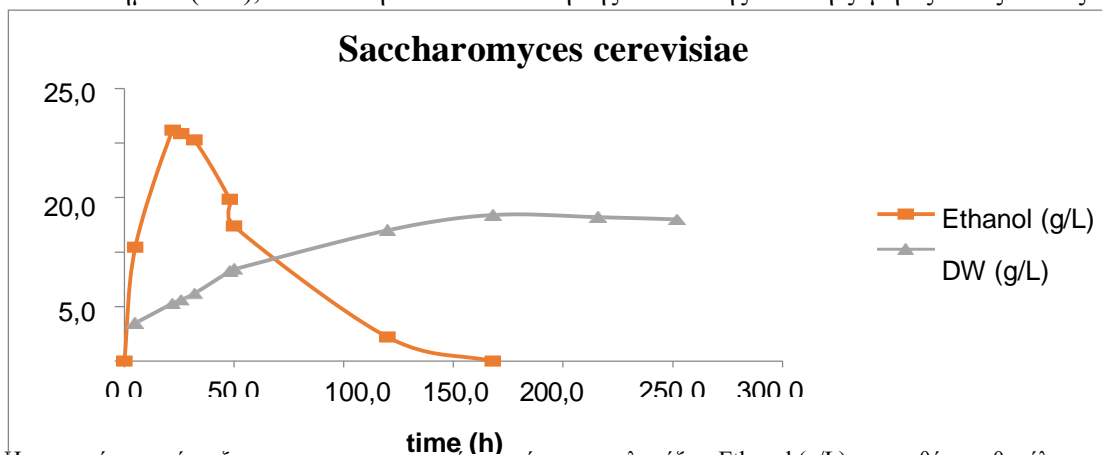
Τα αποτελέσματα κινητικής του σακχαρομύκητα rhone στο συνθετικό θρεπτικό μέσο που ακολουθούν προέρχονται από αντίστοιχη μεταπτυχιακή εργασία (Αντωνάτου, 2017) που διερευνούσε την κατανάλωση των σακχάρων και παραγωγής αιθανόλης διαφόρων στελεχών Saccharomyces και μη.

Στον ακόλουθο πίνακα, φαίνεται η κινητική του *Saccharomyces cerevisiae*, καθώς αναπτύσσεται σε υπόστρωμα γλυκόζης (κινητική της αύξησης και της εξέλιξης της βιομάζας και της αιθανόλης). Η κατανάλωση της γλυκόζης και η παραγωγή αιθανόλης (μέγιστη 21,2 g/l) πραγματοποιήθηκε με αρκετά γρήγορο ρυθμό (22 h). Ο μικροοργανισμός έχει καταναλώσει σχεδόν όλο το διαθέσιμο σάκχαρο, παράγοντας τη μέγιστη για το συγκεκριμένο πείραμα αιθανόλη. Από το σημείο αυτό και έπειτα, εκκινεί η κατανάλωση της συσσωρευμένης αιθανόλης, ελλείψει άλλης πηγής άνθρακα. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός φαίνεται να συνθέτει ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες από την αρχή της ανάπτυξης του στο συγκεκριμένο μέσο καλλιέργειας, τους οποίους όμως καταναλώνει όταν βρίσκεται σε συνθήκες πενίας πηγής άνθρακα, όμως η κατανάλωση φαίνεται να είναι αρκετά αργή. Ταυτόχρονα με την πτώση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών παρατηρείται σύνθεση μικρής ποσότητας λιπιδίων, όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 24. Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae rhone* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη 60 g/L. Συνθήκες αύξησης: time (h), Glc: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g L⁻¹), $Y_{L/DW}$: (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος, $Y_{IPS/DW}$: (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες. $Y_{EtOH/Glc}$ (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. (Αντωνάτου, 2017)

time	Glc	DW	EtOH	$Y_{L/DW}$	$Y_{IPS/DW}$	$Y_{EtOH/Glc}$
168,0	0,6	13,4	0,0	15,7	15,9	0,0
22,0	4,9	5,3	21,2	1,0	35,8	0,38
216,0	0,5	13,2	0,0	16,4	17,1	0,0
5,0	34,4	3,5	10,4	0,2	57,2	0,39

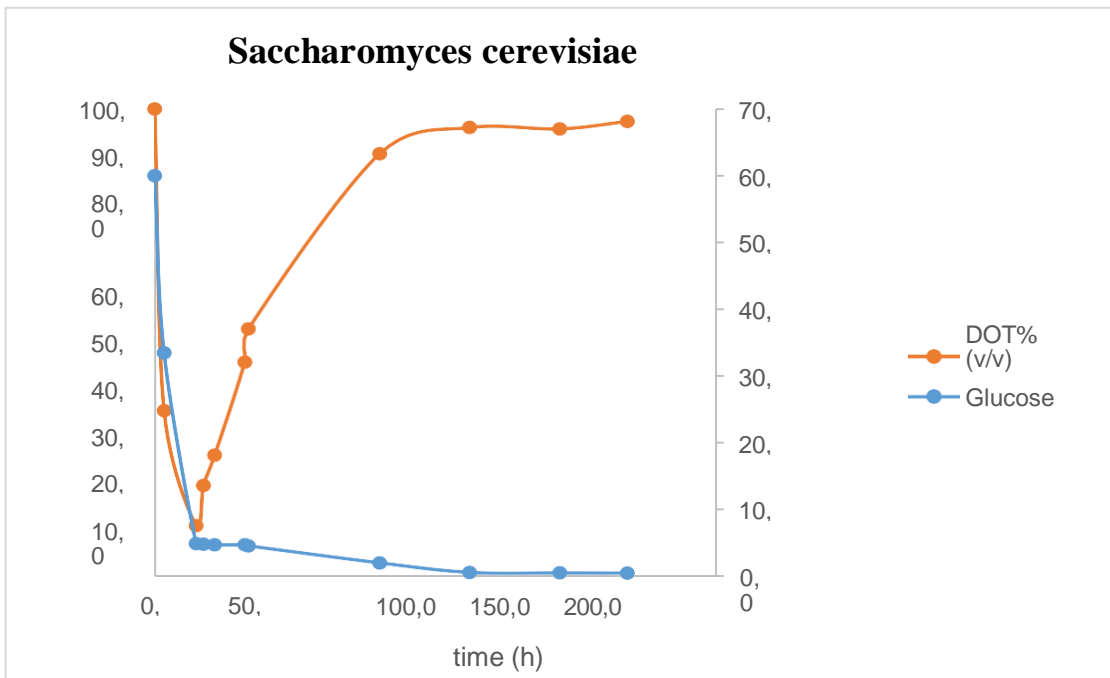
Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, τα οποία είναι αρκετά ενθαρρυντικά για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό (αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 60 g/L), καθώς το στέλεχος κατάφερε να καταναλώσει **το σάκχαρο τάχιστα και η αποζύμωση συνέπεσε με τη μέγιστη συγκέντρωση παραχθείσας αιθανόλης ($Y_{EtOH/Glc} \approx 0,38$)**. Ύστερα από αυτό το σημείο (22h), ακολούθησε κατανάλωση της αιθανόλης από τη ζύμη εξαιτίας πενίας της πηγής του άνθρακα.



Διάγραμμα 16. Η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκόζης. Ethanol (g/L): παραχθείσα αιθανόλη και DW (g/L): ξηρά βιομάζα (g/L).

Στο διάγραμμα φαίνεται επίσης, πως η αύξηση της βιομάζας είναι έντονη στην περίπτωση της κατανάλωσης του σακχάρου και συνεχίζεται και στην ανακατανάλωση της αιθανόλης. Ωστόσο, από την κατανάλωση της αιθανόλης και μετά, ο μικροοργανισμός απλώς διατηρεί τον πληθυσμό του. Στο παρακάτω διάγραμμα, εμφανίζεται η τάση του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας, ως συνάρτηση του χρόνου και αντιπαραβάλλεται με την κατανάλωση του σακχάρου. **Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, παρατηρείται κατακόρυφη πτώση του οξυγόνου στο μέσο**

καθώς και υπερβολική κατανάλωση γλυκόζης, ενώ εμφανίζεται σταδιακή άνοδος κατά την κατανάλωση της παραχθείσας αιθανόλης (το διαλυτό οξυγόνο τις πρώτες ώρες κατά την παραγωγή της αιθανόλης μειώνεται - κοιτάζοντας σε αντιπαράβολή το διάγραμμα της παραγωγής της αιθανόλης- και στην συνέχεια με τη μείωση της αιθανόλης αυξάνεται). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδίδεται στην έντονη μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού και στην παραγωγή αερίου CO₂ κατά την αλκοολική ζύμωση.

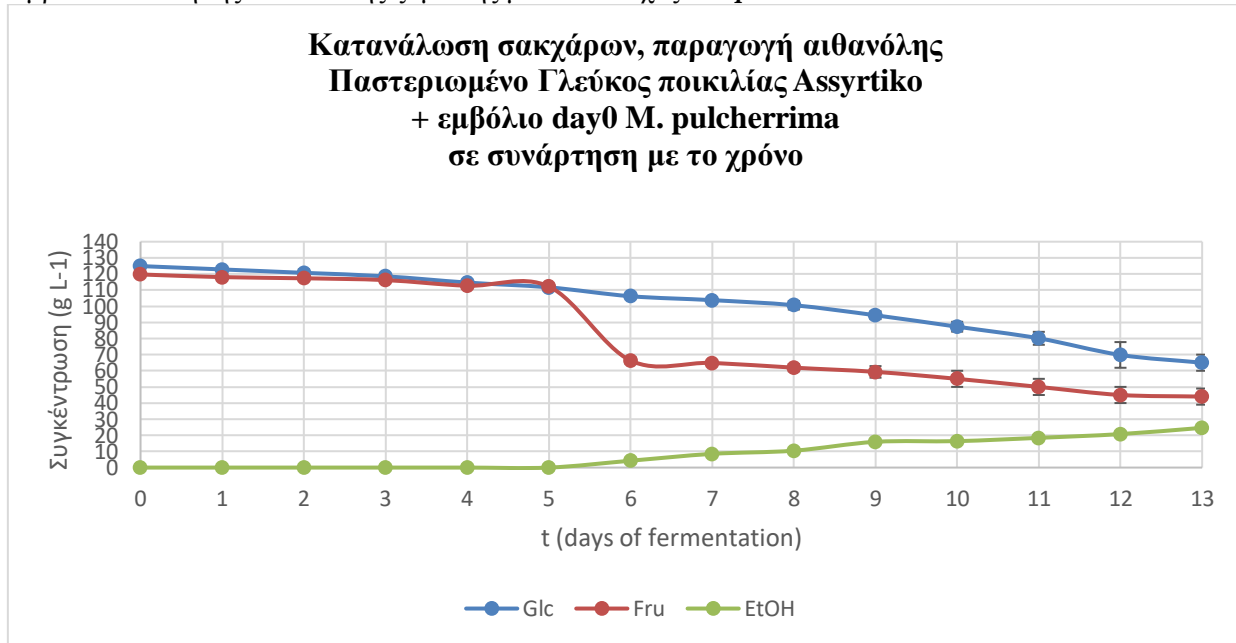


Διάγραμμα 17. Συσχέτιση κατανάλωσης σακχάρου με παρουσία οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας. DOT% (v/v): τάση του διαλυτού οξυγόνου.

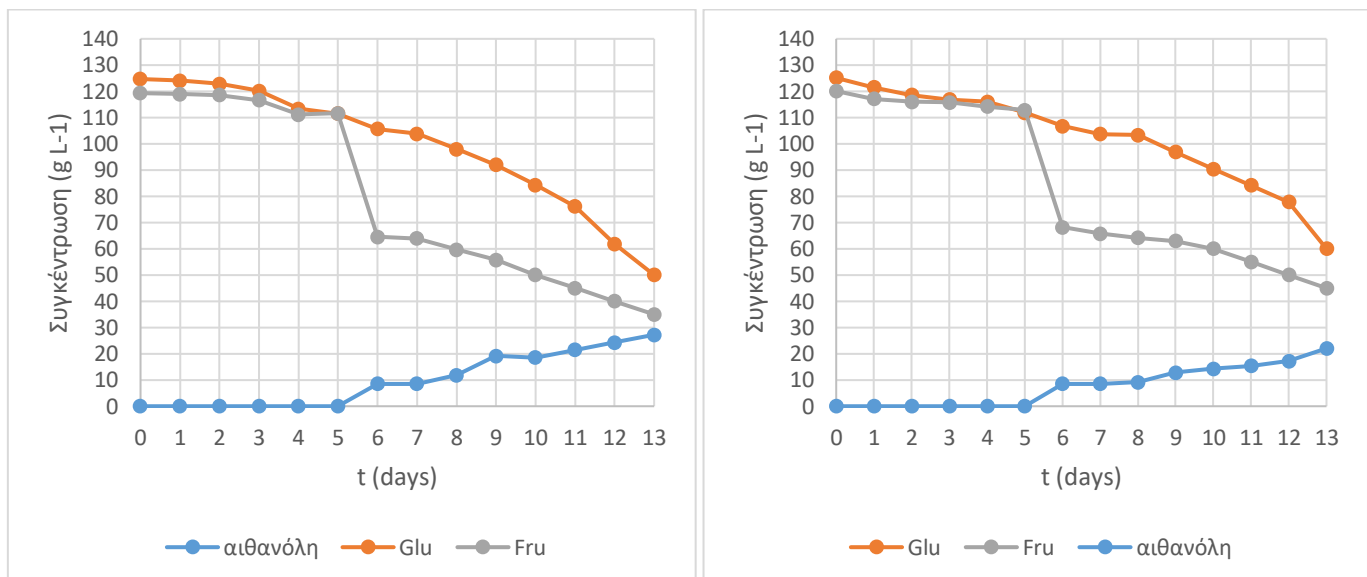
3.2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΙΝΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΓΛΕΥΚΟΥΣ (HPLC)

3.2.2.1 Α' ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: ΕΜΒΟΛΙΟ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΕ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ

Κατανάλωση σακχάρων και παραγωγή αιθανόλης σε συνάρτηση με το χρόνο (ημέρες οινοποίησης)
Εμβόλιο Εκκίνησης αλκοολικής ζύμωσης με το στέλεχος: *M.pulcherrima*



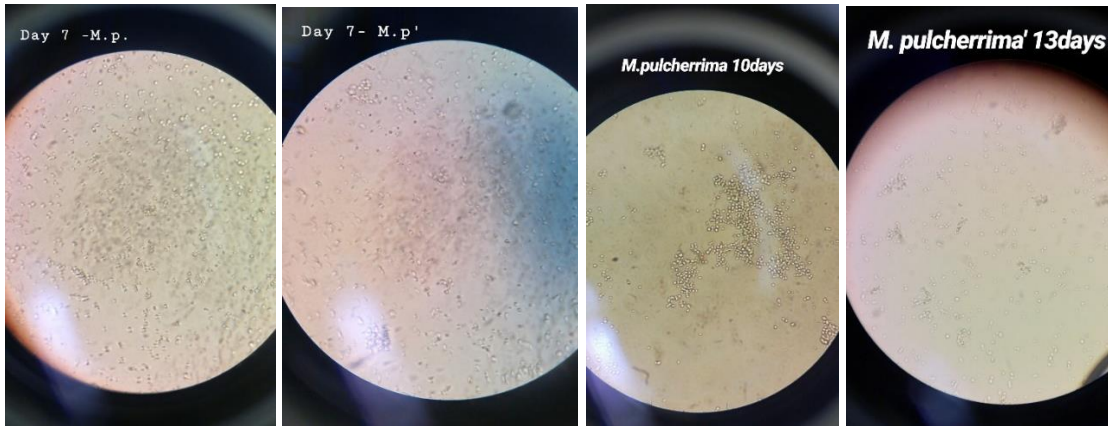
Διάγραμμα 18. Κινητική στελέχους με εμβολιασμό, κατά την ημέρα 0, του παστεριωμένου γλεύκους με *M. pulcherrima* (στατιστική ανάλυση – Πρώτη και επαναληπτική ζύμωση). Κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης.



Διαγράμματα 19. α) Πρώτη και β) επαναληπτική ζύμωση *M.pulcherrima*.

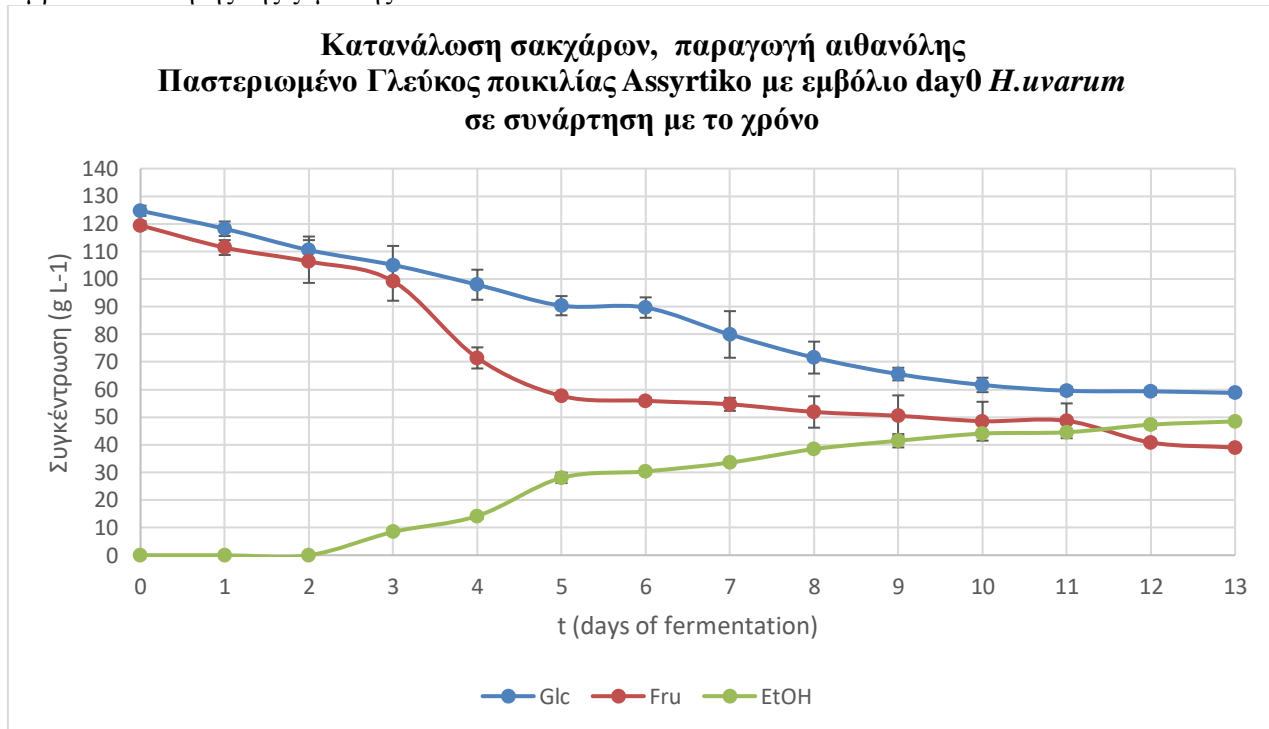
Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *M. pulcherrima* σε **παστεριωμένο γλεύκος** (συνυπόστρωμα γλυκόζης και φρουκτόζης), παρουσίασε ομοιότητα σε σχέση με την ανάπτυξή του σε θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από γλυκόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε περισσότερες ημέρες λόγω του ότι τα σάκχαρα ήταν 3,6 φορές περισσότερα σε σύγκριση με το πείραμα στο συνθετικό μέσο γλυκόζης, επιπλέον συνυπάρχουν δύο κύρια σάκχαρα, γλυκόζη και φρουκτόζη. Ο μικροοργανισμός παρουσιάζει ίδια εκλεκτικότητα ως προς τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη έπειτα από κάποιες ημέρες ζύμωσης (5) ως προς τη φρουκτόζη. Η παραγωγή του κύριου

προϊόντος ενδιαφέροντος, της αιθανόλης, παρουσίασε αντίστοιχη πορεία με την προηγούμενη πειραματική διαδικασία του συνθετικού υποστρώματος, τόσο ως προς το ρυθμό όσο και ως προς το επίπεδο της μέγιστης τιμής EtOH \approx 25 g/l. Οι τιμές του pH σε συνάρτηση με τις ημέρες αλκοολικής ζύμωσης, κατά τη διάρκεια κυμάνθηκαν από 2,98 - 3,4 και κατέληξαν στην τιμή 3 που είναι αποδεκτή για ξηρούς οίνους ποικιλίας ασύρτικο.

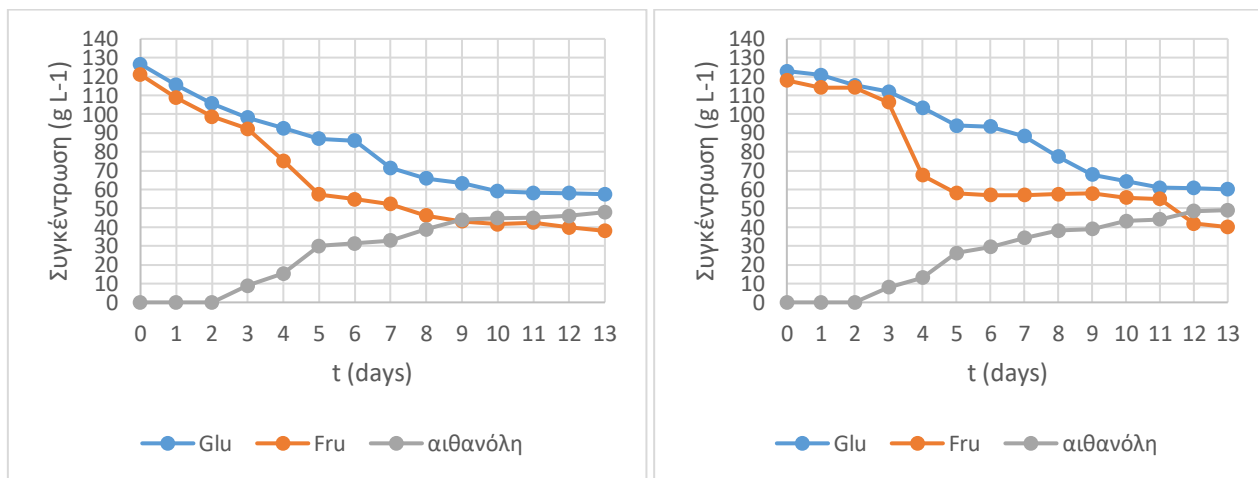


Εικόνα 73. αβ). Εικόνες μικροσκοπίου με το υπό εξέταση προς καθαρότητα παστεριωμένο εν ζυμώσει γλεύκος με εμβόλιο *M.pulcherrima* (δεύτερη φωτογραφία η επαναληπτική ζύμωση) της 7^η ημέρας, γ) δ) 10^η και 13^η ημέρα ζύμωσης.

Εμβόλιο-εκκινητής της ζύμωσης: *H. uvarum*



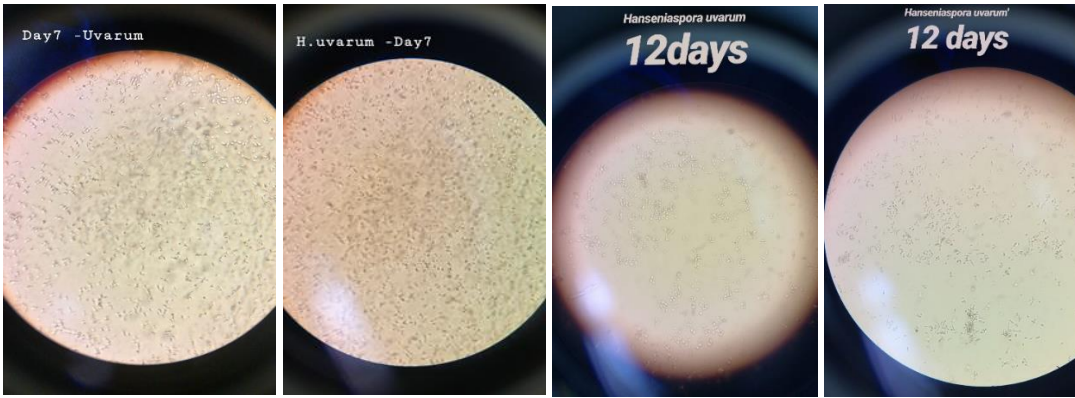
Διάγραμμα 20. Κινητική στελέχους με εμβολιασμό, κατά την ημέρα 0, του παστεριωμένου γλεύκους με *H. uvarum* (στατιστική ανάλυση – Κανονική-πρώτη και επαναληπτική ζύμωση). Κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης.



Διαγράμματα 21. α) Πρώτη και β) επαναληπτική ζύμωση *H.uvarum*.

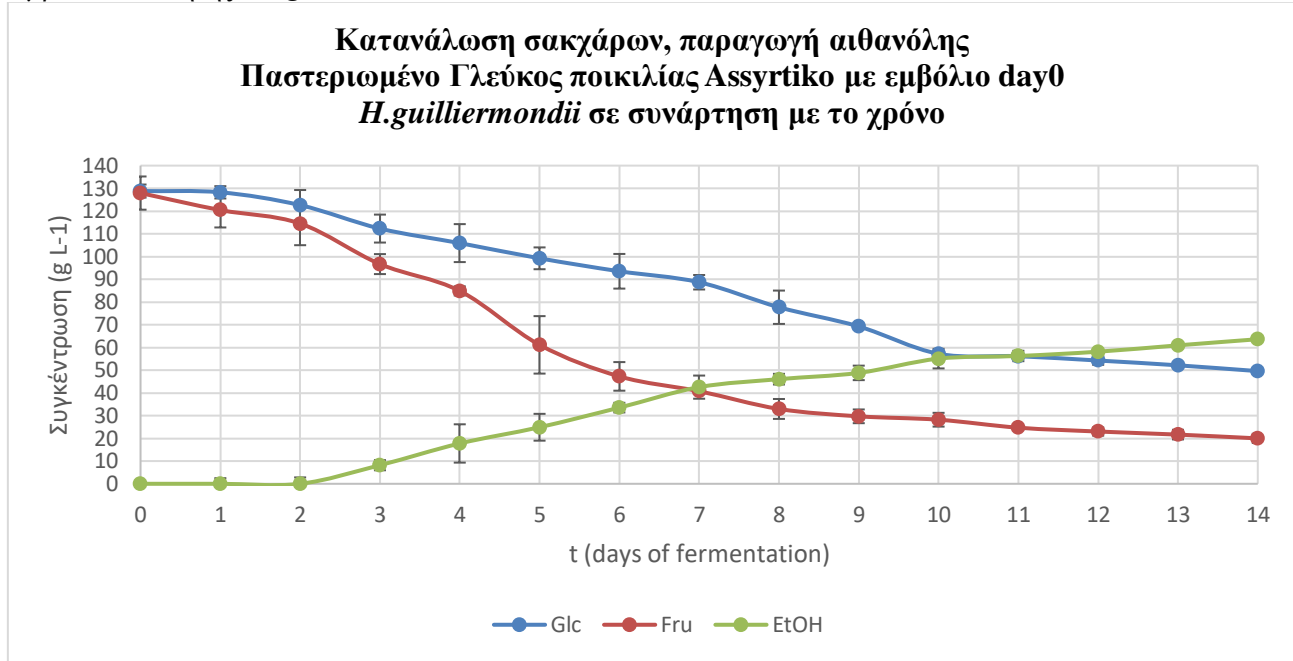
Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *H. uvarum* σε **παστεριωμένο γλεύκος**, παρουσίασε ομοιότητα σε σχέση με την ανάπτυξή του σε θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από γλυκόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε περισσότερες ημέρες λόγω του ότι τα σάκχαρα ήταν 3,6 φορές περισσότερα σε σύγκριση με το πείραμα στο συνθετικό μέσω γλυκόζης, επιπλέον εδώ συνυπάρχουν δύο κύρια σάκχαρα γλυκόζη και φρουκτόζη. Ο μικροοργανισμός παρουσιάζει, μια μικρή εκλεκτικότητα ως προς τη φρουκτόζη και μπορεί να χαρακτηριστεί ως φρουκτόφιλο στέλεχος. Η κατανάλωση σακχάρων επιτυγχάνεται γρηγορότερα από αυτό το στέλεχος σε σχέση με το *M. pulcherrima*. Παρουσίασε παραγωγή αιθανόλης ≈ 49 g/l, επομένως αποδεικνύεται ότι τουλάχιστον μέχρι αυτή την τιμή έχει αντοχή σε αυτήν.

Οι τιμές του pH σε συνάρτηση με τις ημέρες αλκοολικής ζύμωσης, κατά τη διάρκεια κυμάνθηκαν από 3,05 - 3,4 και κατέληξαν στην τιμή 3,18 που είναι οριακά αποδεκτή για ξηρούς οίνους ποικιλίας ασύρτικο.

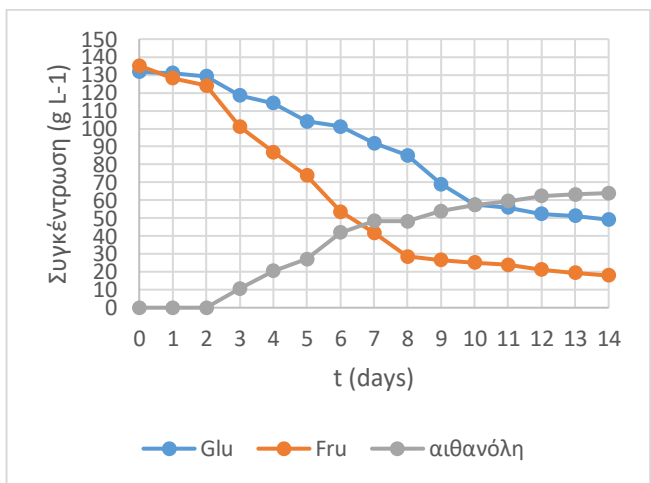
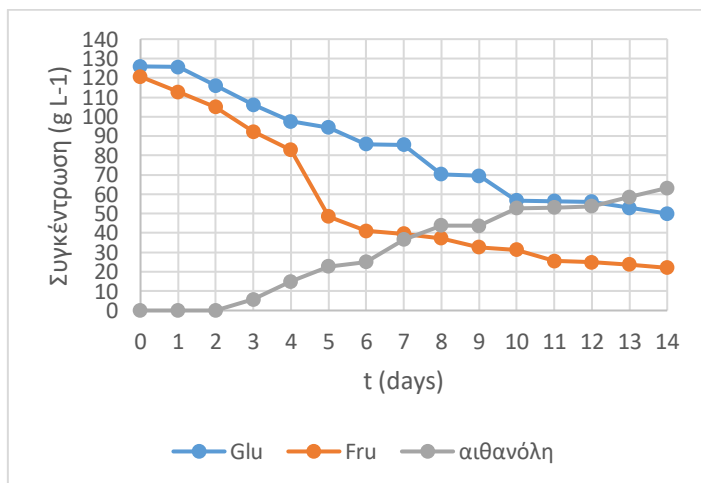


Εικόνα 74. α) β). Εικόνες μικροσκοπίου με το υπό εξέταση προς καθαρότητα παστεριωμένο εν ζυμώσει γλεύκος με εμβόλιο *H.uvarum* (δεύτερη φωτογραφία η επαναληπτική ζύμωση) της 7^η ημέρας, **γ) δ)** 12^η ημέρα ζύμωσης (τέταρτη φωτογραφία η επαναληπτική ζύμωση).

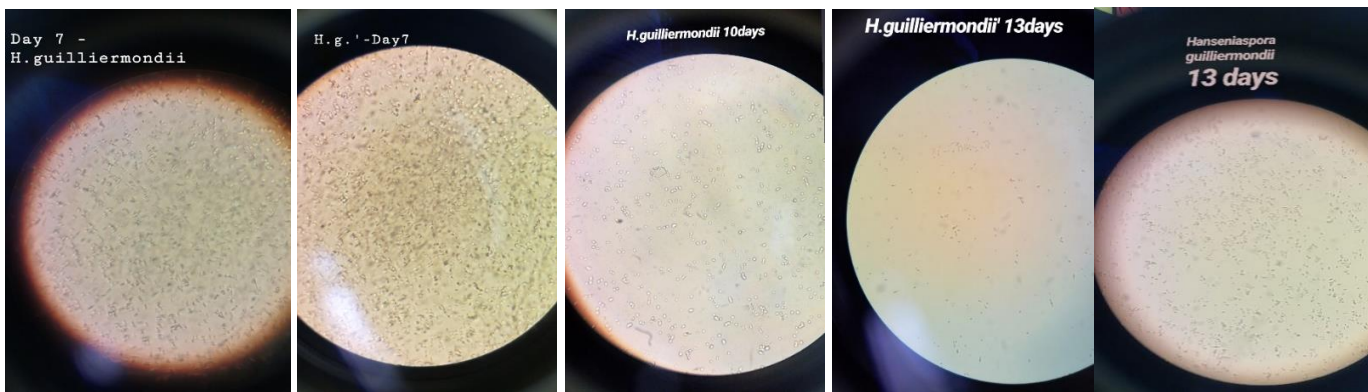
Εμβόλιο-εκκινητής: *H. guilliermondii*



Διάγραμμα 22. Κινητική στελέχους με εμβολιασμό, κατά την ημέρα 0, του παστεριωμένου γλεύκους με *H. guilliermondii* (στατιστική ανάλυση – Κανονική και επαναληπτική ζύμωση). Κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης.



Διαγράμματα 23. α) Πρώτη και β) επαναληπτική ζύμωση *H.guilliermondii*.

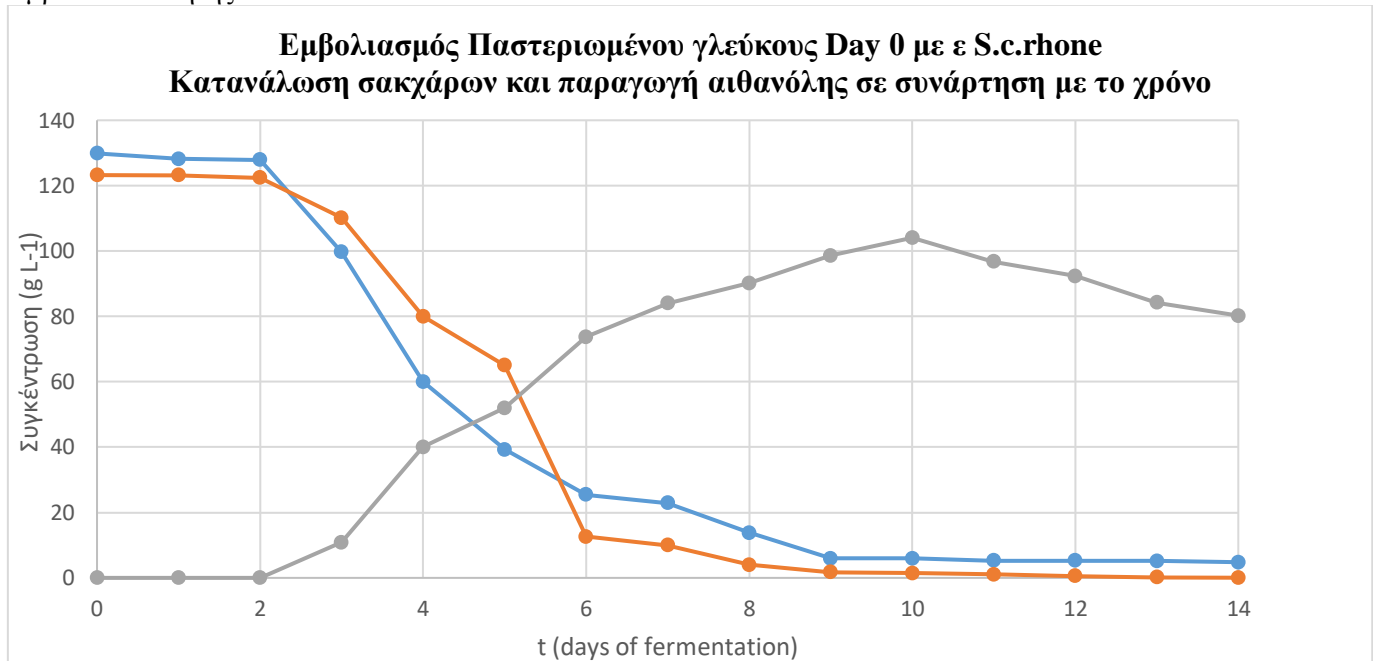


Εικόνα 75. α) β) γ). Εικόνες μικροσκοπίου με το υπό εξέταση προς καθαρότητα παστεριωμένο εν ζυμώσει γλεύκος με εμβόλιο *H. guilliermondii* (δεύτερη φωτογραφία η επαναληπτική ζύμωση) της 7^η ημέρας, **δ) ε)** 10 και 12^η ημέρα ζύμωσης (πέμπτη φωτογραφία η επαναληπτική ζύμωση).

Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *H. guilliermondii* σε **παστεριωμένο γλεύκος**, παρουσίασε ομοιότητα σε σχέση με την ανάπτυξή του σε θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από γλυκόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε περισσότερες ημέρες λόγω του ότι τα σάκχαρα ήταν 3,6 φορές περισσότερα σε σύγκριση με το πείραμα στο συνθετικό μέσω γλυκόζης, επιπλέον εδώ συνυπάρχουν δύο κύρια σάκαρα γλυκόζη και φρουκτόζη. Ο μικροοργανισμός παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς τη φρουκτόζη. Η αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε περίπου ίδιο χρονικό διάστημα σε σχέση με τον *H. guilliermondii*. Παρουσίασε παραγωγή αιθανόλης ≈ 64 g/l, επομένως αποδεικνύεται ότι τουλάχιστον μέχρι αυτή τη συγκέντρωση έχει αντοχή σε αυτήν.

Οι τιμές του pH σε συνάρτηση με τις ημέρες αλκοολικής ζύμωσης, κατά τη διάρκεια κυμάνθηκαν από 3,0 - 3,4 και κατέληξαν στην τιμή 3,16 που είναι οριακά αποδεκτή για ξηρούς οίνους ποικιλίας ασύρτικο.

Εμβόλιο-εκκινητής: *S. c. rhone*

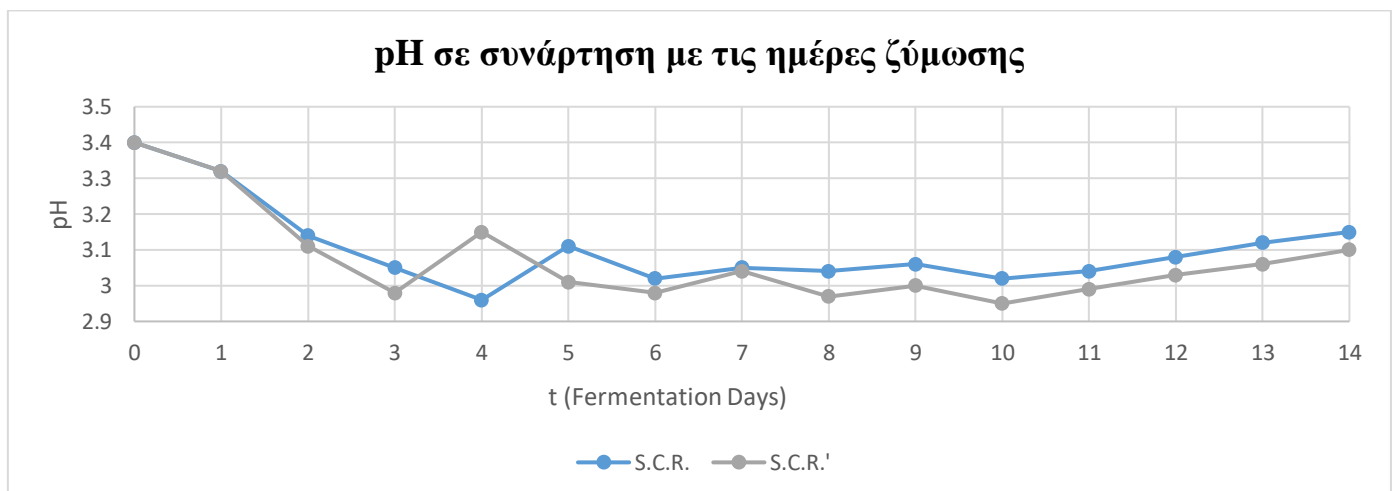


Διάγραμμα 24. Κινητική στελέχους με εμβολιασμό, κατά την ημέρα 0, του παστεριωμένου γλεύκους με *S.c. rhone*. Κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης.

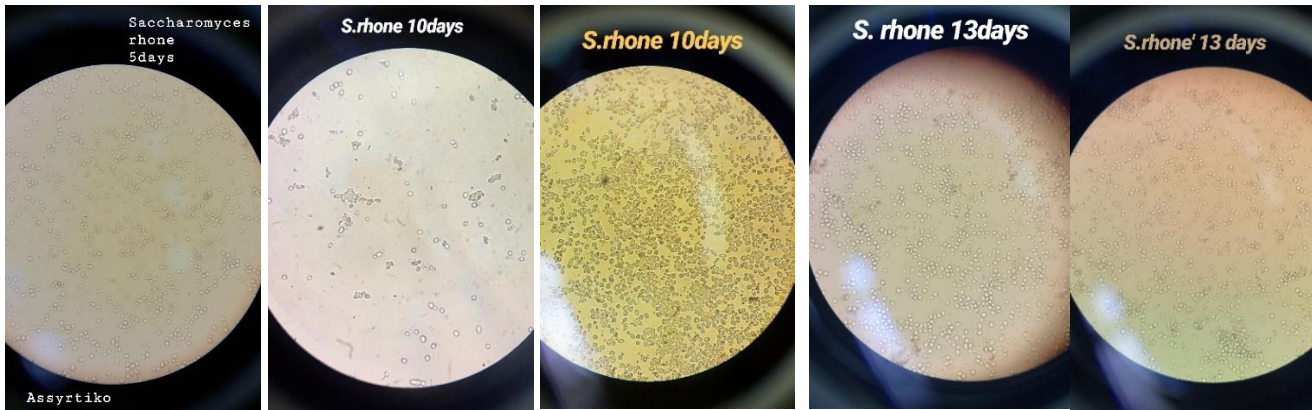
Όπως παρατηρείται, η κατανάλωση των σακχάρων ήταν τάχιστα, ειδικά μετά την τρίτη ημέρα μέχρι την 6^η, με αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την ταχύτερη παραγωγή αιθανόλης μέχρι 104g/l. Η ποσότητα της αιθανόλης ανακαταναλώθηκε από τη ζύμη (απομένοντας μόλις 80g/l την 14^η ημέρα ολοκλήρωσης του πειράματος), μετά την εξάλειψη των σακχάρων από το μέσο, χρησιμοποιώντας την ως εναλλακτική πηγή άνθρακα και λόγω των αερόβιων /ημιαερόβιων συνθηκών που επικρατούσαν.

Σε σχέση με τις άγριες ζύμες, ο σακχαρομύκητας εμφανίζει καλύτερη απόδοση στην κατανάλωση σακχάρων του γλεύκους με ταυτόχρονη παραγωγή αιθανόλης.

Οι τιμές του pH σε συνάρτηση με τις ημέρες αλκοολικής ζύμωσης, κατά τη διάρκεια κυμάνθηκαν από 2,95 - 3,4 και κατέληξαν στην τιμή 3,1-3,15 που είναι αποδεκτή για ξηρούς οίνους ποικιλίας ασύρτικο.



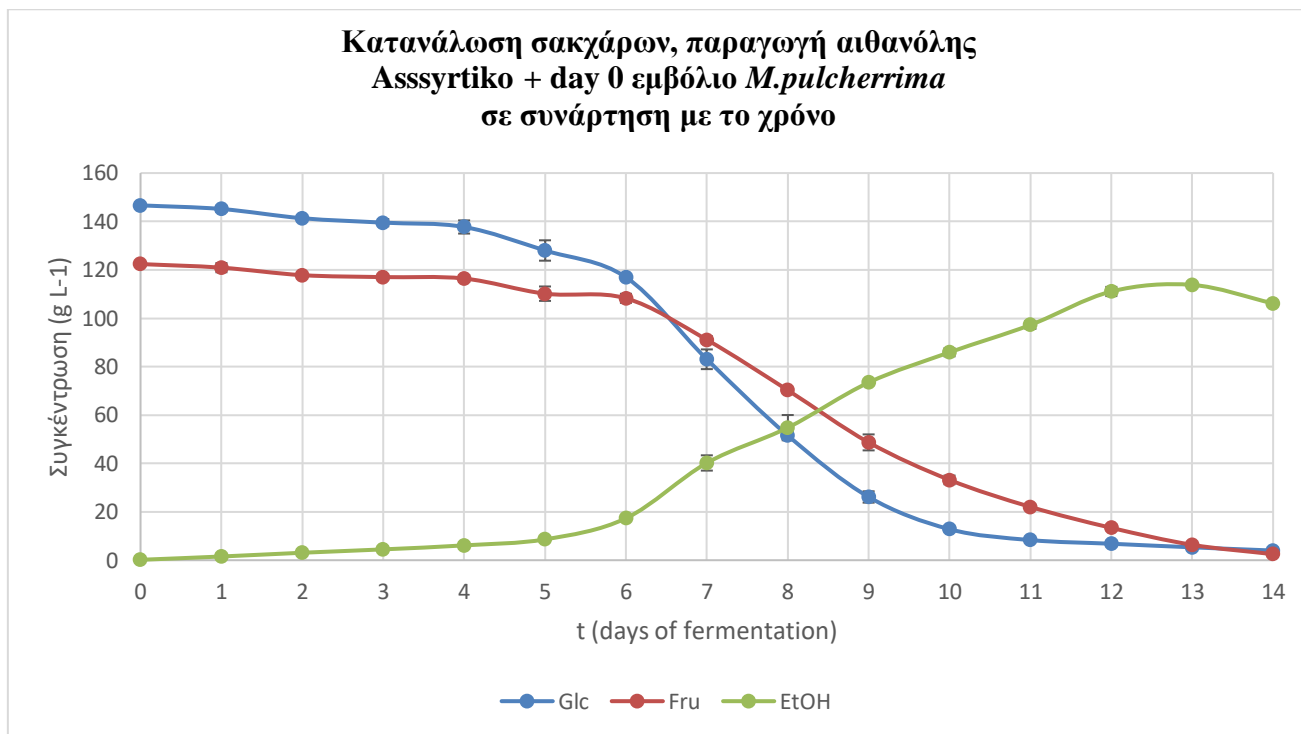
Διάγραμμα 25. Τιμές pH σε συνάρτηση με τις ημέρες αλκοολικής ζύμωσης *S.cerevisiae*.



Εικόνα 76 α) β) γ) Εικόνες μικροσκοπίου με το υπό εξέταση προς καθαρότητα παστεριωμένο εν ζύμωσει γλεύκος με εμβόλιο *S.c.rhone* (εικόνα πρώτη) 5^η ημέρα ζύμωσης, 10^η ημέρα (2^η και 3^η φωτογραφία η επαναληπτική ζύμωση), **δ) ε)** 13^η ημέρα ζύμωσης (πέμπτη φωτογραφία η επαναληπτική ζύμωση).

3.2.2.2 Β' ΚΥΚΛΟΣ: ΕΜΒΟΛΙΟ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ NON-SACCHAROMYCES ΣΕ ΜΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ

Κατανάλωση σακχάρων και παραγωγή αιθανόλης ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) σε συνάρτηση με το χρόνο (ημέρες ζύμωσης - οينوποίηση)

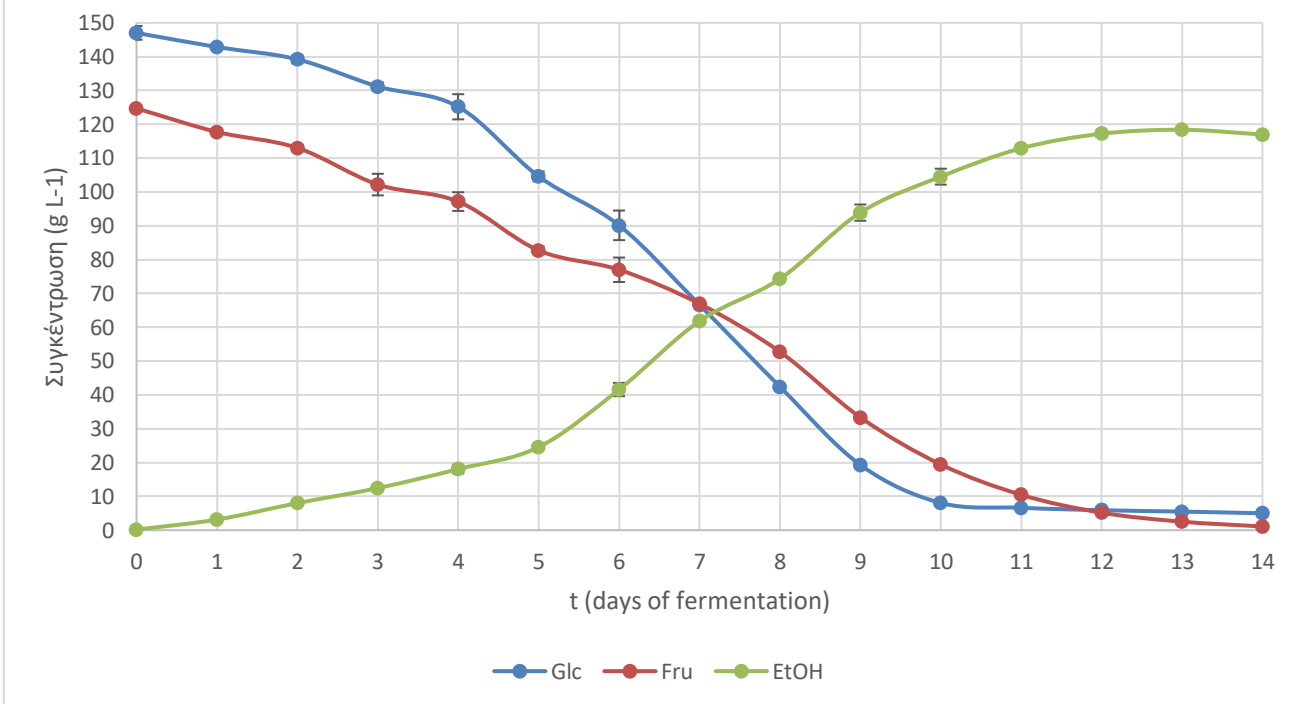


Διάγραμμα 26. Κινητική στελέχους (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης) με εμβολιασμό κατά την ημέρα 0 του γλεύκους με *M. pulcherrima* σε συνάρτηση με το χρόνο (στατιστική ανάλυση κανονικής και επαναληπτικής ζύμωσης).

Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *M. pulcherrima* σε μη παστεριωμένο γλεύκος με την αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε 14 ημέρες και παρουσίασε μια μικρή εκλεκτικότητα στη γλυκόζη. Μετά την 5^η ημέρα, υπήρξε μια έντονη πτώση των καμπυλών των σακχάρων, επομένως η απότομη μεγάλη κατανάλωση υποδηλώνει ότι σίγουρα η ζύμωση από εκείνο το στάδιο και έπειτα συνεχίστηκε από γηγενή σακχαρομύκητα που προυπήρχε στο γλεύκος πριν τον εμβολιασμό του με την άγρια ζύμη. Ο σακχαρομύκητας που σχεδόν πάντα συνεχίζει και καταφέρνει να ολοκληρώσει την εκάστοτε αλκοολική ζύμωση του γλεύκους, στην αρχή της ζύμωσης λόγω μειωμένου πληθυσμού σε σχέση με το εμβόλιο βρισκόταν σε μειονεκτική θέση ανάπτυξης. Βέβαια έπειτα από την αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης από 8 % v/v περίπου και πάνω και επειδή ο non-Saccharomyces δεν είναι ανθεκτικός σε υψηλά ποσοστά αιθανόλης, κατάφερε να αναπτυχθεί επαρκώς και σε αξιόλογο πληθυσμό κυττάρων (πάνω από 10^6) ώστε να παρουσιάσει αυτή την αξιοσημείωτη μεταβολή.

Κατά την 13^η ημέρα παρουσίασε τη μέγιστη τιμή αιθανόλης (σχεδόν 114 g/L) και την 14^η λόγω έλλειψης σακχάρων έγινε ανακατανάλωσή της (106-107 g/L), όπως είναι εμφανές από το διάγραμμα.

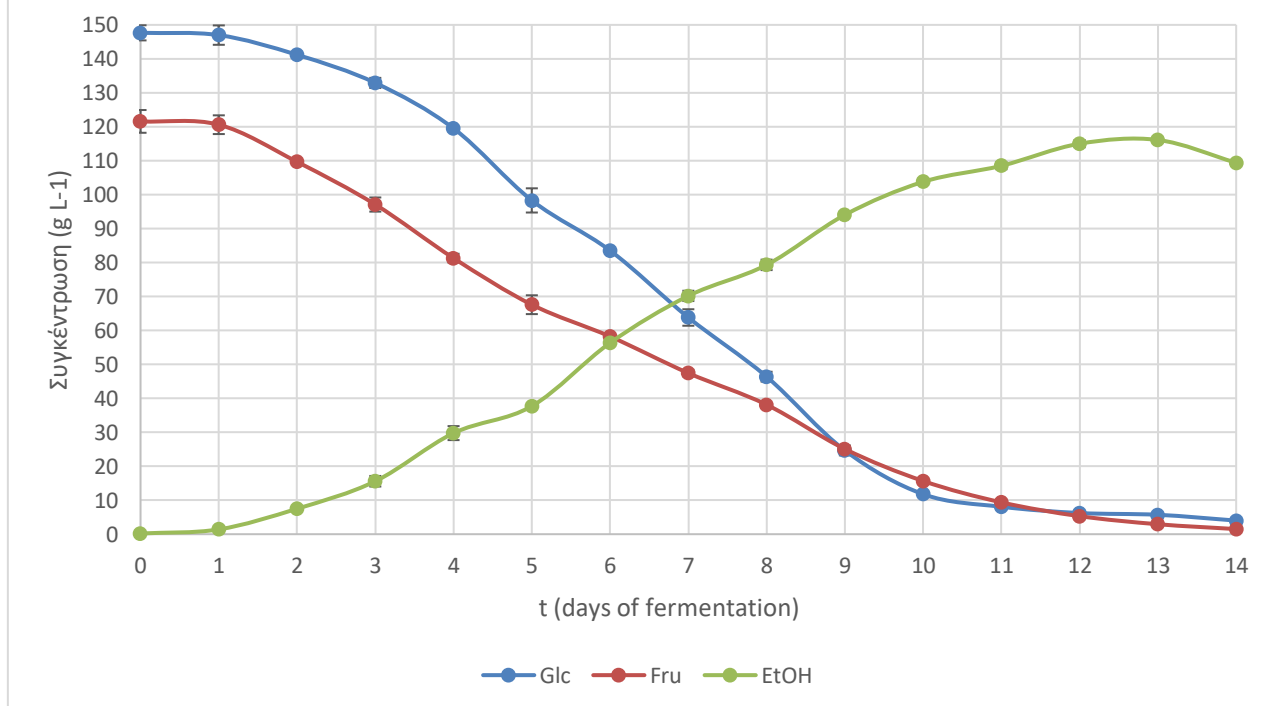
**Κατανάλωση σακχάρων, παραγωγή αιθανόλης
Γλεύκος ποικιλίας Assyrtiko + εμβόλιο day0 *H.uvarum*
σε συνάρτηση με το χρόνο**



Διάγραμμα 27. Κινητική στελέχους (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης) με εμβολιασμό κατά την ημέρα 0 του γλεύκους με *H. uvarum* σε συνάρτηση με το χρόνο (στατιστική ανάλυση κανονικής και επαναληπτικής ζύμωσης).

Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *H. Uvarum* σε **μη παστεριωμένο γλεύκος** με την αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε 14 ημέρες. Μετά την 4^η ημέρα, άρχισε μια έντονη πτώση των καμπυλών των σακχάρων, ιδιαίτερως της γλυκόζης. Η μεγάλη αυτή κατανάλωση υποδηλώνει ότι η ζύμωση από εκείνο το στάδιο και έπειτα σίγουρα συνεχίστηκε με ταχύ ρυθμό από το σακχαρομύκητα που προυπήρχε στο γλεύκος πριν τον εμβολιασμό του με την άγρια ζύμη μέχρι και την 11^η ημέρα όπου τα δύο σάκχαρα εμφάνισαν παρόμοια τιμή, ενώ την 14^η ημέρα η φρουκτόζη ήταν σε χαμηλότερο ποσοστό. Έπειτα από την αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης και επειδή ο non-Saccharomyces δεν είναι ανθεκτικός σε υψηλά ποσοστά αιθανόλης (η μεγαλύτερη αντοχή που έχει παρατηρηθεί για non-Saccharomyces 10 % v/v), κατάφερε να αναπτυχθεί αρκετά, ώστε να καταφέρει να παρουσιάσει αυτή την αξιοσημείωτη μεταβολή. Κατά την 13^η ημέρα παρουσίασε τη μέγιστη τιμή αιθανόλης (118 g/L) και την 14^η λόγω έλλειψης σακχάρων έγινε ανακατανάλωσή της (117 g/L), όπως είναι εμφανές από το διάγραμμα.

**Κατανάλωση σακχάρων, παραγωγή αιθανόλης
Γλεύκος ποικιλίας Assyrtiko + εμβόλιο day0 *H.guilliermondii* σε
συνάρτηση με το χρόνο**



Διάγραμμα 28. Κινητική στελέχους (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης) με εμβολιασμό κατά την ημέρα 0 του γλεύκους με *H. guilliermondii* σε συνάρτηση με το χρόνο (στατιστική ανάλυση κανονικής και επαναληπτικής ζύμωσης).

Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *H. guilliermondii* σε μη παστεριωμένο γλεύκος με την αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε 14 ημέρες και παρουσίασε μικρή εκλεκτικότητα στη φρουκτόζη. Μετά την 2^η- 3^η ημέρα, άρχισε μια έντονη πτώση των καμπυλών των σακχάρων. Η μεγάλη αυτή κατανάλωση υποδηλώνει ότι η ζύμωση από εκείνο το στάδιο και έπειτα λογικά συνεχίστηκε με ταχύ ρυθμό από το σακχαρομύκητα που προυπήρχε στο γλεύκος πριν τον εμβολιασμό του με την άγρια ζύμη μέχρι και την 11^η ημέρα όπου τα δύο σάκχαρα εμφάνισαν ίδια τιμή, ενώ την από την 12^η ημέρα η φρουκτόζη ήταν σε χαμηλότερο ποσοστό. Έπειτα από την αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης και επειδή ο non-Saccharomyces δεν είναι ανθεκτικός σε υψηλά ποσοστά αυτής, κατάφερε να αναπτυχθεί αρκετά, ώστε να καταφέρει να παρουσιάσει αυτή την αξιοσημείωτη μεταβολή.

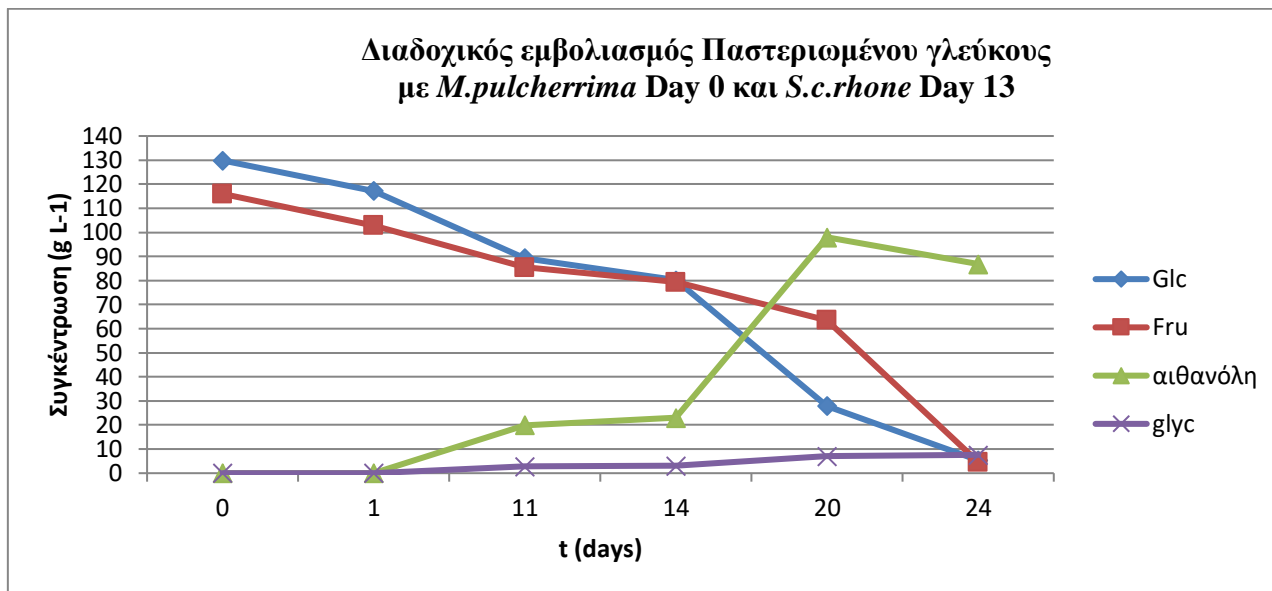
Κατά την 13^η ημέρα παρουσίασε τη μέγιστη τιμή αιθανόλης (116 g/L) και την 14^η λόγω έλλειψης σακχάρων έγινε ανακατανάλωσή της (109 g/L περίπου κατά μέσο όρο), όπως είναι εμφανές από το διάγραμμα.

3.2.2.3 Γ' ΚΑΙ Δ' ΚΥΚΛΟΙ: ΔΙΑΔΟΧΙΚΟΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ NON-SACCHAROMYCES / S.CEREVISIAE ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΚΑΙ ΜΗ

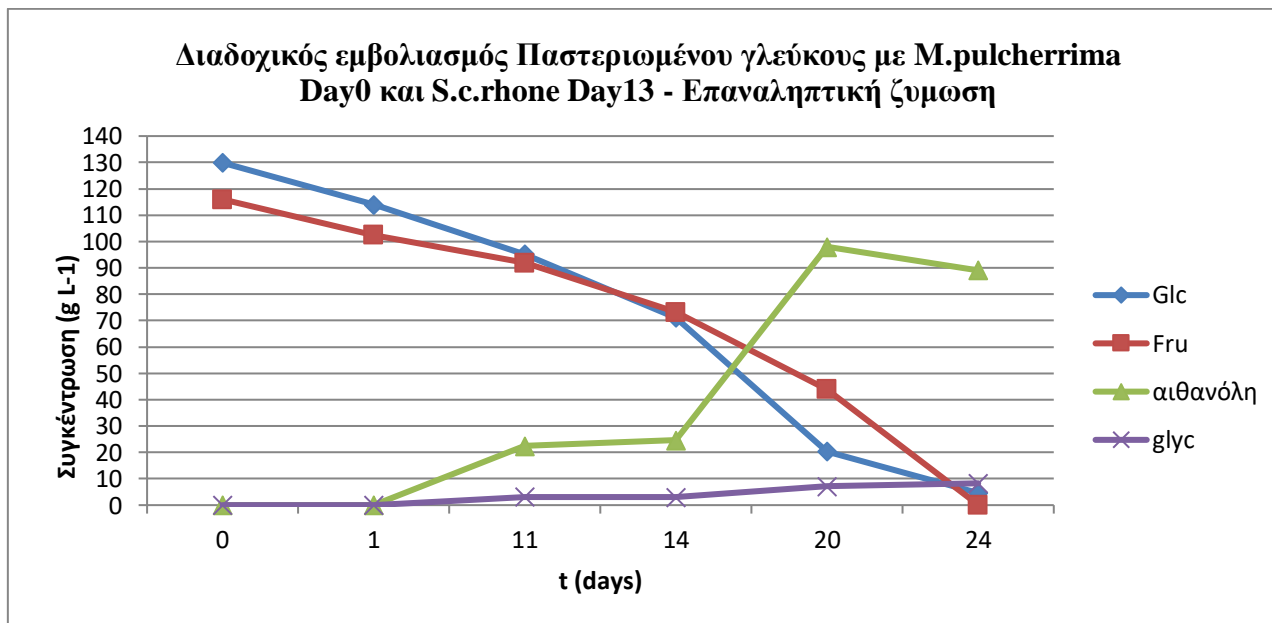
Κατανάλωση σακχάρων και παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) σε συνάρτηση με το χρόνο (ημέρες οينوποίησης)

Εμβόλιο-εκκίνησης: *M. pulcherrima* την $t=0$

Παστεριωμένο Γλεύκος



Διάγραμμα 29. Κινητική εμβολίων - στελεχών *M. pulcherrima* Day 0 και *S. cerevisiae* Day 13 σε παστεριωμένο γλεύκος (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης).



Διάγραμμα 30. Κινητική εμβολίων - στελεχών *M. pulcherrima* Day 0 και *S. cerevisiae* Day 13 σε παστεριωμένο γλεύκος – Επανάληψη ζύμωσης (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης).

Στατιστική Ανάλυση Κινητικής διαδοχικού εμβολιασμού

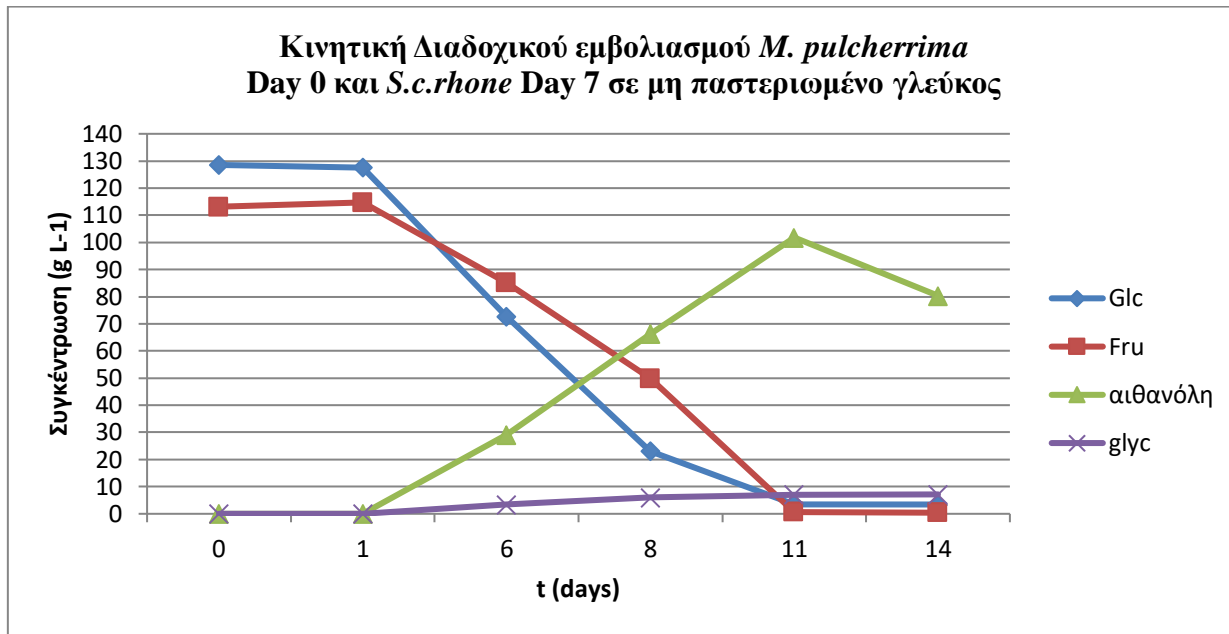


Διάγραμμα 31. Κινητική (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης) εμβολίων - στελεχών *M.pulcherrima* Day 0 και *S.c.rhone* Day 13 σε παστεριωμένο γλεύκος

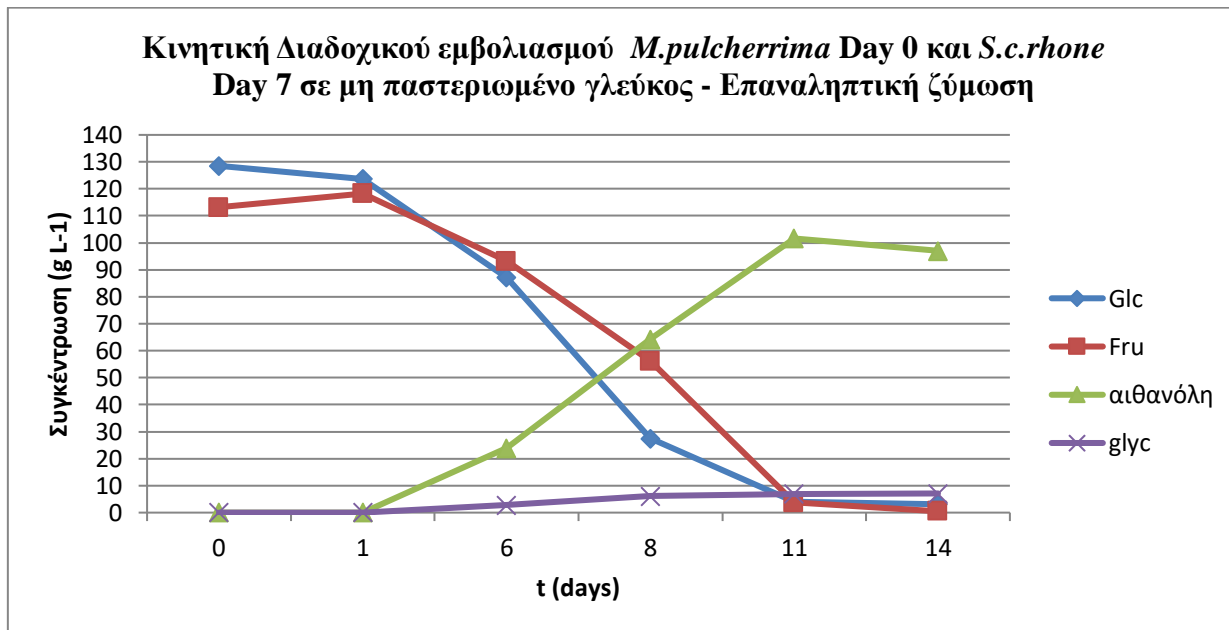
Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *M. pulcherrima* σε **παστεριωμένο γλεύκος** με την αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε 24-26 ημέρες και παρουσίασε μια μικρή εκλεκτικότητα στη γλυκόζη. Μετά την 13η ημέρα όπου έλαβε χώρα ο δεύτερος εμβολιασμός του γλεύκους με τον σακχαρομύκητα (δεύτερο βελάκι στο διάγραμμα 31), υπήρξε μια έντονη πτώση της καμπύλης των υπολειπόμενων σακχάρων, επομένως η απότομη μεγάλη κατανάλωση υποδηλώνει ότι σίγουρα η ζύμωση από εκείνο το στάδιο και έπειτα συνεχίστηκε από το σακχαρομύκητα *rhone*. Ο σακχαρομύκητας αναπτύχθηκε πολύ γρήγορα λόγω του ότι δεν υπήρξε ανταγωνισμός από την άγρια ζύμη (η συγκεκριμένη παρόλο που έχει δραστηριότητα βιοελέγχου έναντι άλλων μικροοργανισμών, στην περίπτωση του *S.cerevisiae* δεν τον ανταγωνίζεται), η οποία δεν είναι ανθεκτική σε μεγάλα επίπεδα αλκοόλης και συνέχισε με ταχύ ρυθμό και κατάφερε να ολοκληρώσει την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους.

Κατά την 20^η ημέρα παρουσίασε τη μέγιστη τιμή αιθανόλης (σχεδόν 98 g/L). Έπειτα λόγω έλλειψης σακχάρων ξεκίνησε η διάσπαση άλλων ενώσεων ως εναλλακτικών πηγών άνθρακα, οπότε και έγινε ανακατανάλωσή της αιθανόλης (περίπου 88 g/L), όπως είναι εμφανές από το διάγραμμα, με αζύμωτη γλυκόζη και στις δύο περιπτώσεις περίπου 7-8 g/L (πλήρης κατανάλωση της φρουκτόζης), οπότε το γλεύκος δεν έχει καταφέρει να αποζυμώσει, εφόσον πρόκειται για ποικιλία ξηρού οίνου.

Μη Παστεριωμένο Γλεύκος

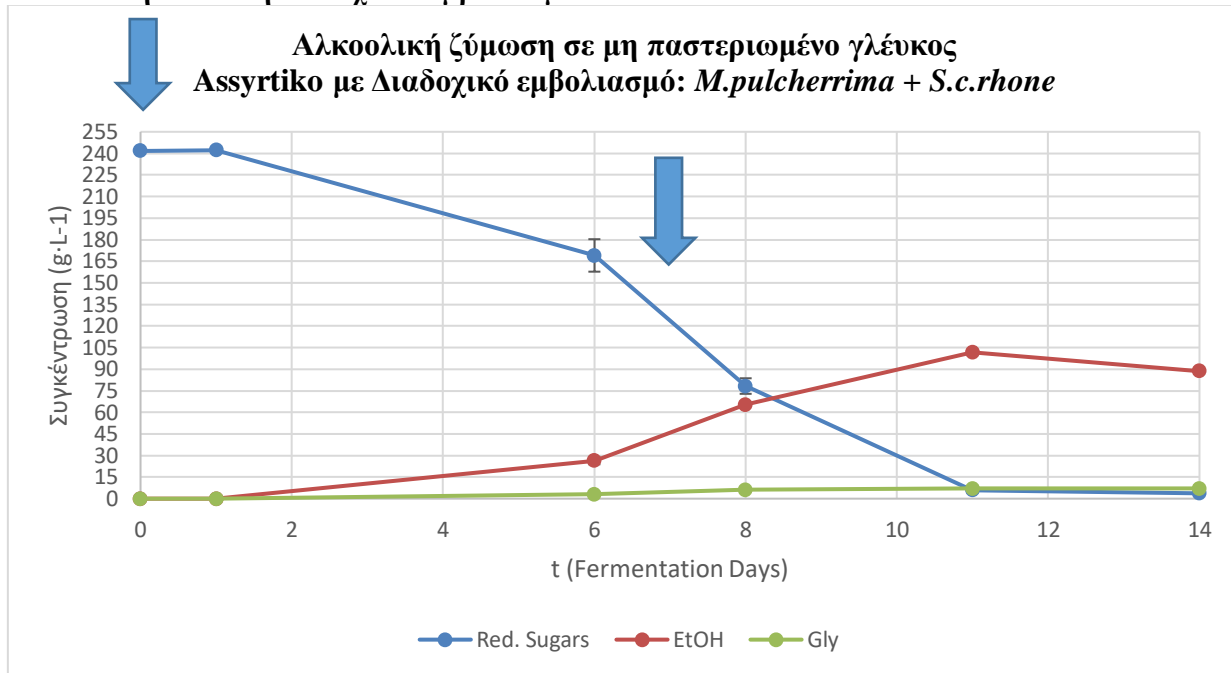


Διάγραμμα 32. Κινητική εμβολίων - στελεχών *M.pulcherrima* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε μη παστεριωμένο γλεύκος (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης).



Διάγραμμα 33. Κινητική εμβολίων - στελεχών *M.pulcherrima* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε μη παστεριωμένο γλεύκος – Επαναληπτική ζύμωση (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης).

Στατιστική Ανάλυση Διαδοχικού εμβολιασμού

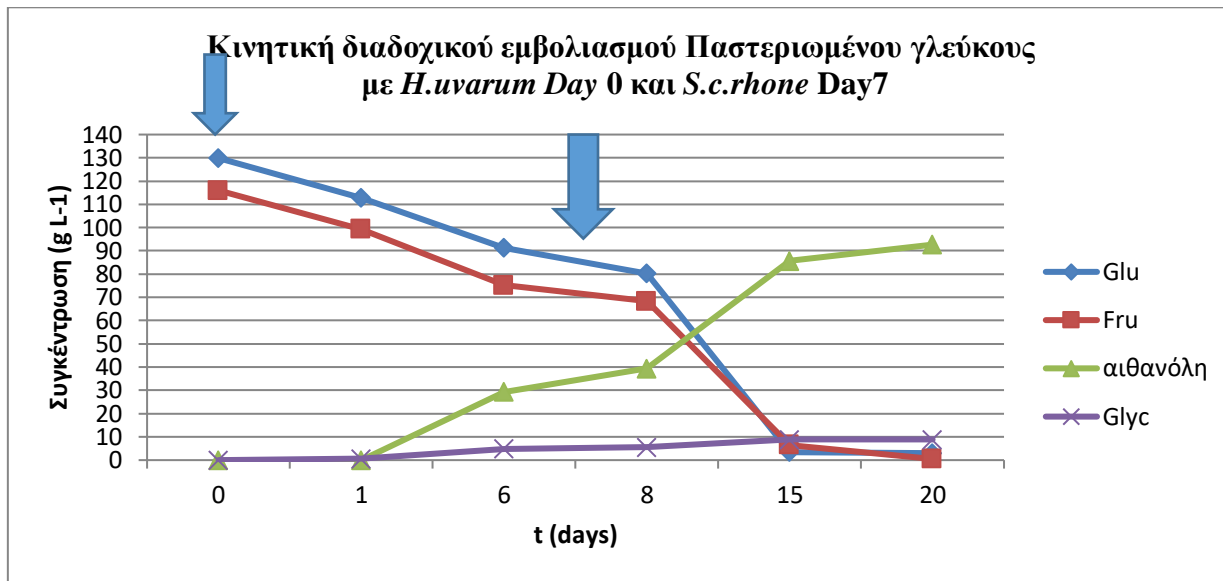


Διάγραμμα 34. Κινητική (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης) εμβολίων – στελεχών *M.pulcherrima* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε μη παστεριωμένο γλεύκος.

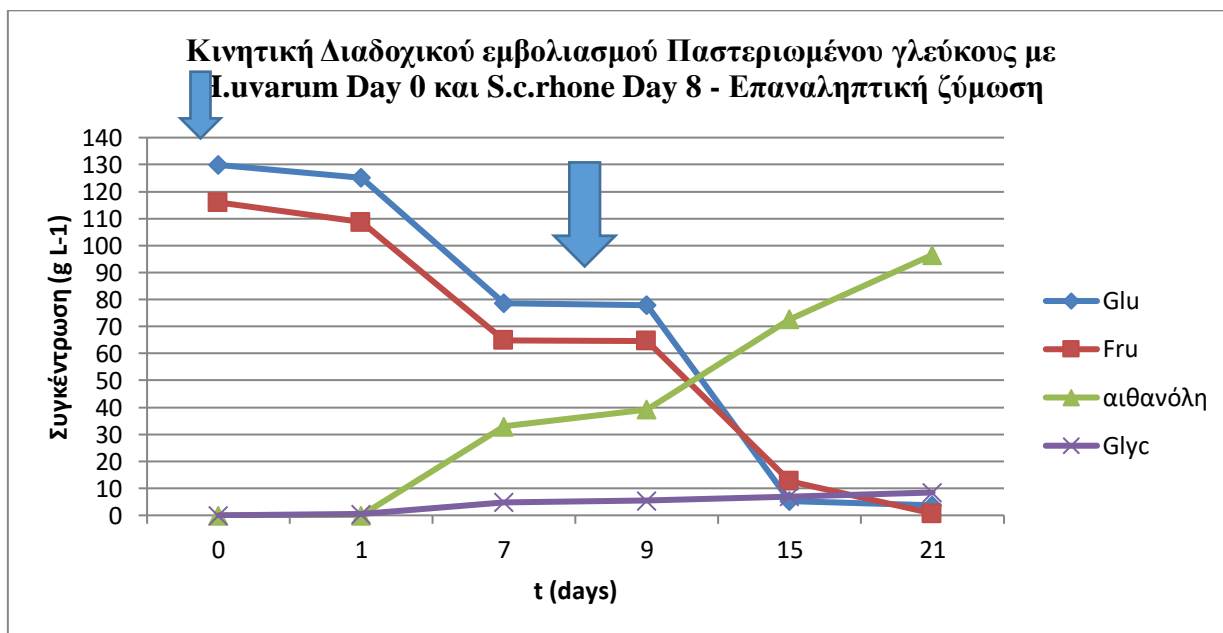
Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *M. pulcherrima* σε **μη παστεριωμένο γλεύκος** με την αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε 14 ημέρες, όπως και στο Β' κύκλο οινοποίησης. Μετά την 7^η ημέρα, όπου και έλαβε χώρα ο δεύτερος εμβολιασμός με τον σακχαρομύκητα υπήρξε μια έντονη πτώση της καμπύλης των σακχάρων, επομένως η απότομα μεγάλη κατανάλωση υποδηλώνει ότι σίγουρα η ζύμωση από εκείνο το στάδιο και έπειτα συνεχίστηκε από το σακχαρομύκητα *rhone*. Ο σακχαρομύκητας αναπτύχθηκε πολύ γρήγορα λόγω του ότι δεν υπήρξε ανταγωνισμός από την άγρια ζύμη, η οποία δεν είναι ανθεκτική σε μεγάλα επίπεδα αλκοόλης και ολοκλήρωσε τάχιστα την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους.

Κατά την 11^η ημέρα παρουσίασε τη μέγιστη τιμή αιθανόλης (σχεδόν 102 g/L) και την 14^η λόγω έλλειψης σακχάρων έγινε ανακατανάλωσή της (με μέσο όρο των δύο επαναληπτικών ζυμώσεων \approx 88 g/L), όπως είναι εμφανές από το διάγραμμα, με αζύμωτη γλυκόζη και στις δύο περιπτώσεις περίπου 7 g/L (πλήρης κατανάλωση της φρουκτόζης), οπότε το γλεύκος δεν έχει καταφέρει να αποζυμώσει, εφόσον πρόκειται για ποικιλία ξηρού οίνου.

Εμβόλιο εκκίνησης: *H. uvarum*
Παστεριωμένο Γλεύκος



Διάγραμμα 35. Κινητική εμβολίων - στελεχών *H.uvarum* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε παστεριωμένο γλεύκος (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης).



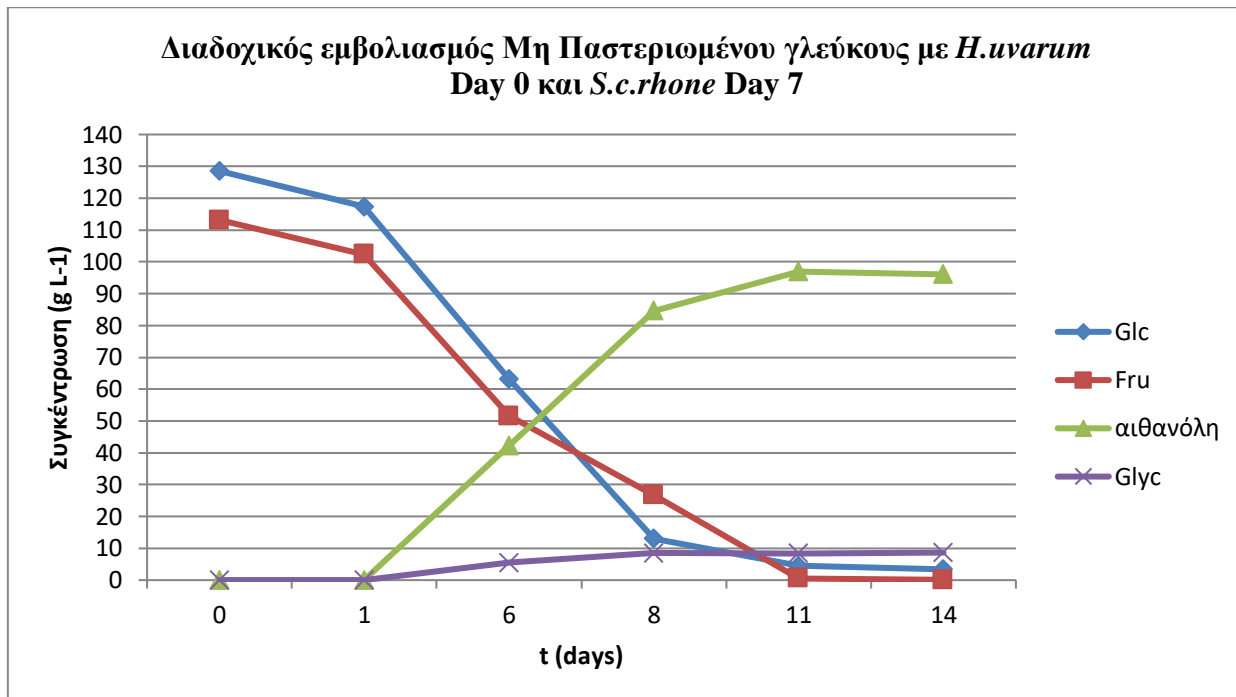
Διάγραμμα 36. Κινητική εμβολίων – στελεχών *H.uvarum* Day 0 και *S.c.rhone* Day 8 σε παστεριωμένο γλεύκος - Επαναληπτική ζύμωση (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης)

Στατιστική Ανάλυση → Δε μπορεί να πραγματοποιηθεί, διότι εμβολιάστηκε διαφορετική ημέρα η επαναληπτική ζύμωση.

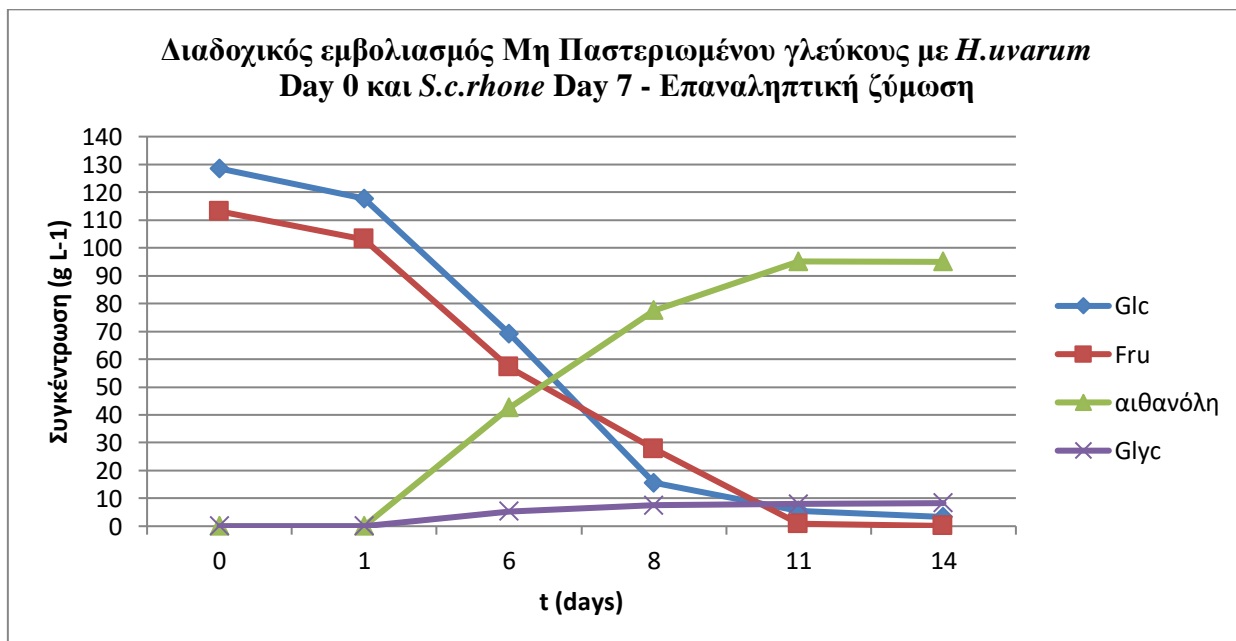
Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *H. uvarum* σε **παστεριωμένο γλεύκος** με την αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε 21 ημέρες. Μετά την 7^η ημέρα στην πρώτη φιάλη και την 8^η ημέρα στην επαναληπτική ζύμωση, όπου και έλαβε χώρα ο δεύτερος εμβολιασμός με τον σακχαρομύκητα (τα βελάκια στα σχετικά διαγράμματα 35, 36 δείχνουν τον πρώτο και το δεύτερο χρονικά εμβολιασμό, αντίστοιχα) υπήρξε μια έντονη πτώση της καμπύλης των σακχάρων μέχρι και την 15^η ημέρα. Η απότομη μεγάλη κατανάλωση υποδηλώνει ότι σίγουρα η ζύμωση από την 9^η ημέρα και έπειτα συνεχίστηκε από το σακχαρομύκητα *rhone*. Ο σακχαρομύκητας αναπτύχθηκε πολύ γρήγορα λόγω του ότι δεν υπήρξε ανταγωνισμός από την άγρια ζύμη, η οποία δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτική σε μεγάλα επίπεδα αλκοόλης και ολοκλήρωσε τάχιστα την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους.

Κατά την 15^η ημέρα παρουσίασε τη μέγιστη τιμή αιθανόλης (92,67 g/L) στην 1^η φιάλη και στην επαναληπτική της κατά την 21 ημέρα (96,58 g/L) με αζύμωτα σάκχαρα και στις δύο περιπτώσεις περίπου 8,5-9 g/L (πλήρης κατανάλωση της φρουκτόζης), οπότε το γλεύκος δεν έχει αποζυμώσει, εφόσον πρόκειται για ποικιλία ξηρού οίνου.

Μη Παστεριωμένο Γλεύκος

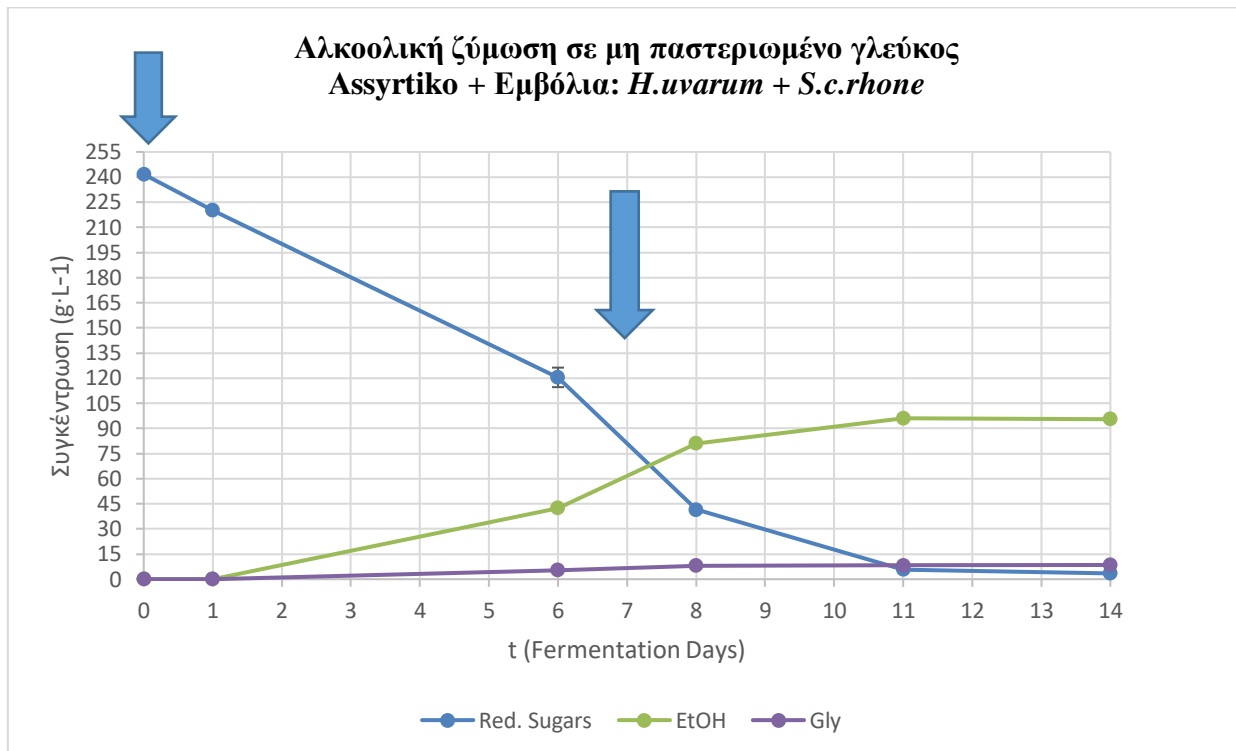


Διάγραμμα 37. Κινητική εμβολίων - στελεχών *H.uvarum* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε μη παστεριωμένο γλεύκος (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης)



Διάγραμμα 38. Κινητική εμβολίων - στελεχών *H.uvarum* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε μη παστεριωμένο γλεύκος – Επαναληπτική ζύμωση (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης)

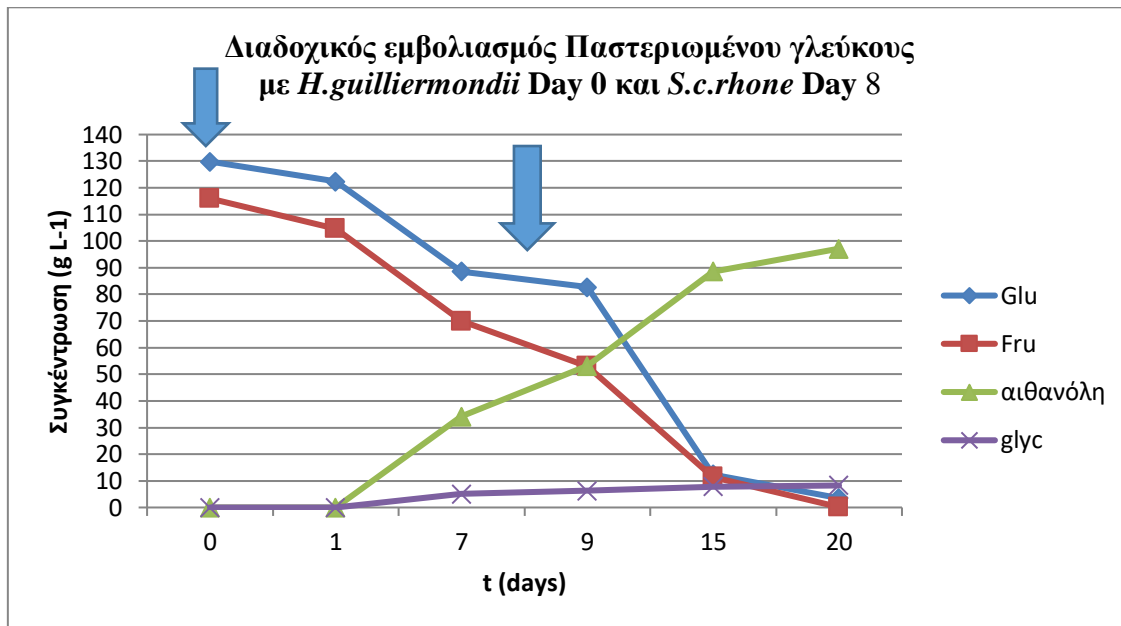
Στατιστική Ανάλυση Κινητικής διαδοχικού εμβολιασμού



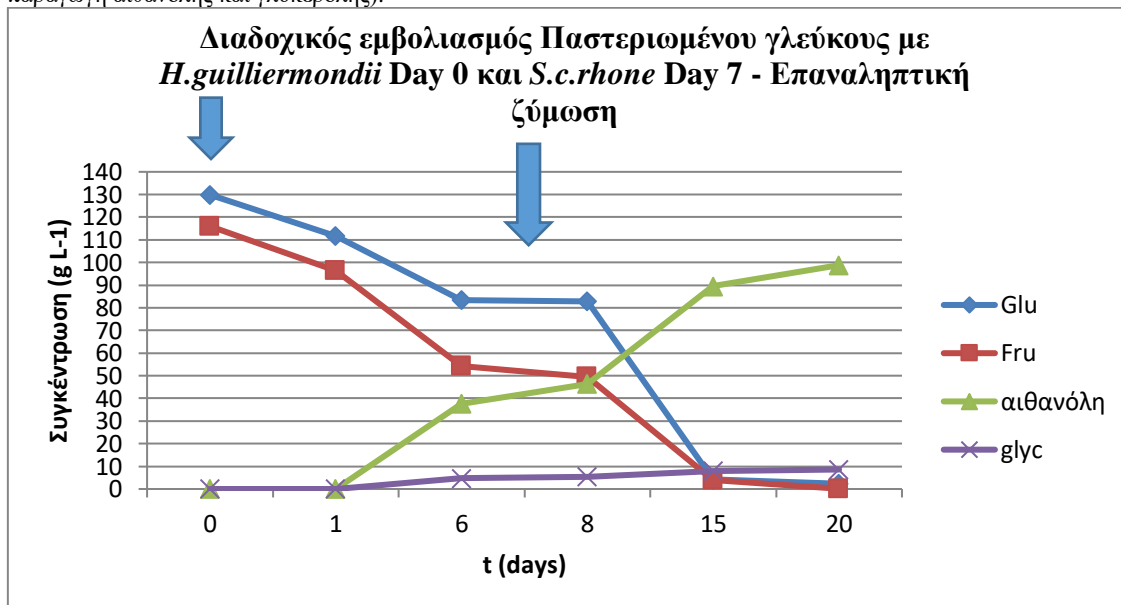
Διάγραμμα 39. Κινητική εμβολίων - στελεχών *H.uvarum* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε μη παστεριωμένο γλεύκος (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης)

Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *H. uvarum* σε **μη παστεριωμένο γλεύκος** με την αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε 14 ημέρες. Μετά την 7^η ημέρα, όπου και έλαβε χώρα ο δεύτερος εμβολιασμός με τον σακχαρομύκητα υπήρξε μια έντονη πτώση της καμπύλης των σακχάρων, επομένως η απότομα μεγάλη κατανάλωση υποδηλώνει ότι σίγουρα η ζύμωση από εκείνο το στάδιο και έπειτα συνεχίστηκε από το σακχαρομύκητα *rhone*. Ο σακχαρομύκητας αναπτύχθηκε πολύ γρήγορα λόγω του ότι δεν υπήρξε ανταγωνισμός από την άγρια ζύμη, η οποία δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτική σε μεγάλα επίπεδα αλκοόλης και ολοκλήρωσε τάχιστα την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους. Κατά την 11^η ημέρα παρουσίασε τη μέγιστη τιμή αιθανόλης (96 g/L) και τη μικρότερη τιμή σακχάρων, με αζύμωτα σάκχαρα και στις δύο περιπτώσεις περίπου 8,2-8,6 g/L (με πλήρη κατανάλωση της φρουκτόζης), οπότε το γλεύκος φαίνεται να μην έχει αποζυμώσει, εντελώς εφόσον πρόκειται για ποικιλία ξηρού οίνου.

Εμβόλιο εκκίνησης: *H. guilliermondii*
Παστεριωμένο Γλεύκος



Διάγραμμα 40. Κινητική εμβολίων - στελεχών *H.guilliermondii* Day 0 και *S.c.rhone* Day 8 σε παστεριωμένο γλεύκος (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης).



Διάγραμμα 41. Κινητική εμβολίων - στελεχών *H.guilliermondii* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε παστεριωμένο γλεύκος – Επαναληπτική ζύμωση (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης).

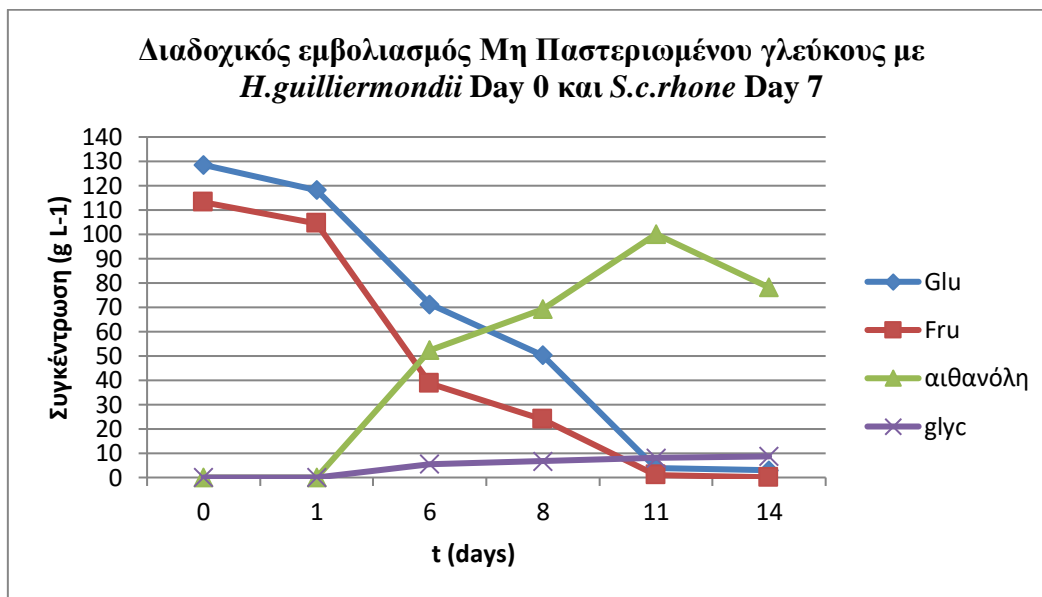
Στατιστική Ανάλυση → Δε μπορεί να πραγματοποιηθεί, διότι εμβολιάσθηκε διαφορετική μέρα η επαναληπτική ζύμωση.

Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *H. guilliermondii* σε παστεριωμένο γλεύκος με την αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε 20 ημέρες. Μετά την 7^η ημέρα στην δεύτερη φιάλη, την επαναληπτική και την 8^η ημέρα στην πρώτη, όπου και έλαβε χώρα ο δεύτερος εμβολιασμός με τον σακχαρομύκητα υπήρξε μια έντονη πτώση της καμπύλης των σακχάρων μέχρι και την 15^η ημέρα. Η απότομα μεγάλη κατανάλωση υποδηλώνει ότι σίγουρα η ζύμωση

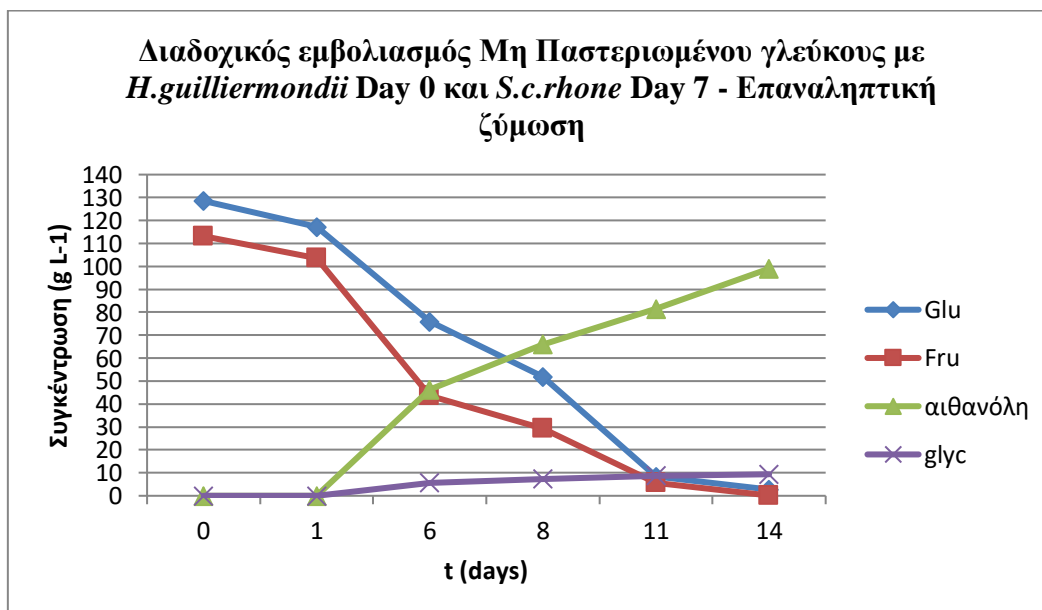
από την 8^η-9^η ημέρα και έπειτα συνεχίστηκε από το σακχαρομύκητα *rhone*. Ο σακχαρομύκητας αναπτύχθηκε πολύ γρήγορα λόγω του ότι δεν υπήρξε ανταγωνισμός από την άγρια ζύμη, η οποία δεν είναι ανθεκτική σε μεγάλα επίπεδα αλκοόλης και ολοκλήρωσε τάχιστα την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους.

Κατά την 15^η ημέρα παρουσίασε τιμή η αιθανόλη και στις δύο φιάλες (περίπου 88-90 g/L) και κατά την 21 ημέρα (περίπου 98-99 g/L) με αζύμωτα σάκχαρα και στις δύο περιπτώσεις περίπου 8 g/L (πλήρης κατανάλωση της φρουκτόζης), οπότε το γλεύκος δεν έχει αποζυμώσει, εφόσον πρόκειται για ποικιλία ξηρού οίνου.

Μη Παστεριωμένο Γλεύκος

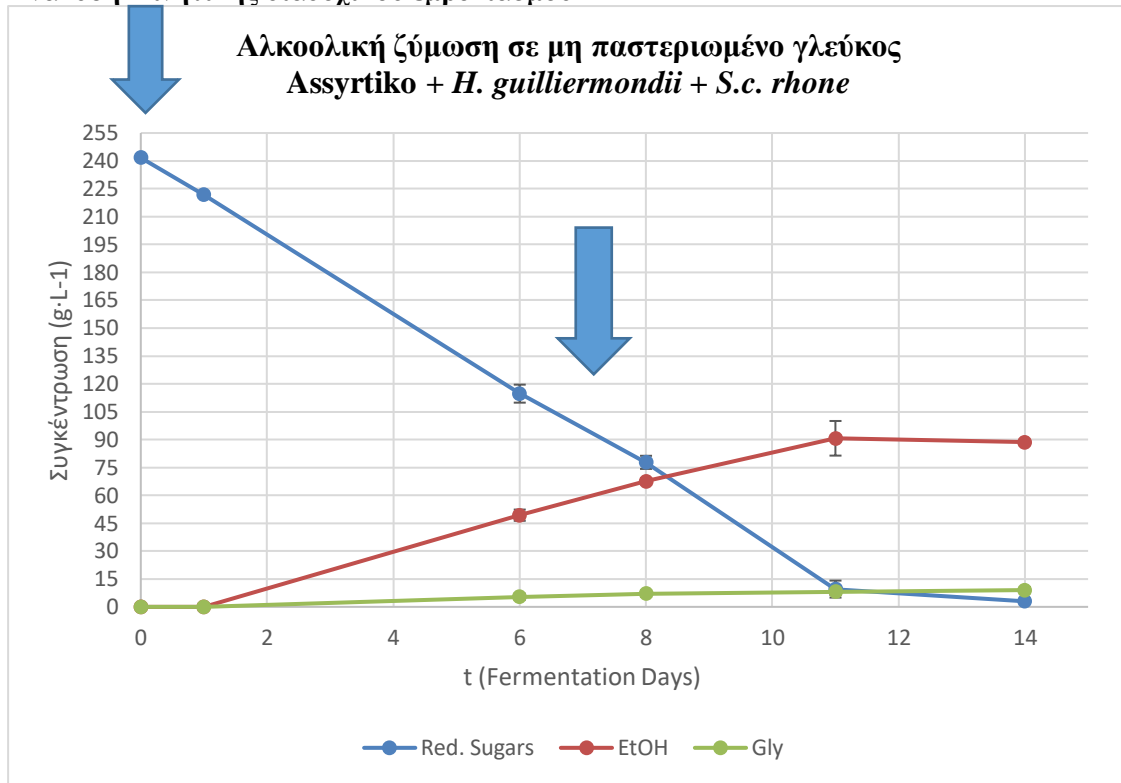


Διάγραμμα 42. Κινητική εμβολίων - στελεχών *H.guilliermondii* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε μη παστεριωμένο γλεύκος (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης)



Διάγραμμα 43. Κινητική εμβολίων - στελεχών *H.guilliermondii* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε μη παστεριωμένο γλεύκος – Επαναληπτική ζύμωση (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης).

Στατιστική Ανάλυση Κινητικής διαδοχικού εμβολιασμού



Διάγραμμα 44. Κινητική εμβολίων - στελεχών *H.guilliermondii* Day 0 και *S.c.rhone* Day 7 σε μη παστεριωμένο γλεύκος (κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης).

Η μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *H. guilliermondii* σε μη παστεριωμένο γλεύκος με την αποδόμηση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε 14 ημέρες. Μετά την 7^η ημέρα, όπου και έλαβε χώρα ο δεύτερος εμβολιασμός με τον σακχαρομύκητα, υπήρξε μια έντονη πτώση της καμπύλης των υπολοιπούμενων σακχάρων, επομένως η απότομα μεγάλη κατανάλωση υποδηλώνει ότι σίγουρα η ζύμωση από εκείνο το στάδιο και έπειτα συνεχίστηκε από το σακχαρομύκητα *rhone*. Ο σακχαρομύκητας αναπτύχθηκε πολύ γρήγορα λόγω του ότι δεν υπήρξε ανταγωνισμός από την άγρια ζύμη, η οποία δεν είναι ανθεκτική σε μεγάλα επίπεδα αλκοόλης και ολοκλήρωσε τάχιστα την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους.

Κατά την 11^η ημέρα παρουσίασε τη μέγιστη τιμή αιθανόλης (με μέσο όρο των δύο ζυμώσεων περίπου 90 g/L) και τη μικρότερη τιμή σακχάρων κατά την 14^η ημέρα, με συγκέντρωση αιθανόλης κατά μέσο όρο 85 g/L και με αζύμωτα σάκχαρα και στις δύο περιπτώσεις περίπου 9 g/L (με πλήρη κατανάλωση της φρουκτόζης), οπότε το γλεύκος φαίνεται να μην έχει αποζυμώσει μέχρι ξηρότητας.

3.2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΣΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΟΙΝΩΝ GC-MS

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζεται αναλυτικά το αρωματικό προφίλ των πειραματικών οίνων που παρήχθησαν με τη στρατηγική οινοποίησης του διαδοχικού εμβολιασμού διαφορετικού non-Saccharomyces με *Saccharomyces cerevisiae*, σε μη παστεριωμένο γλεύκος, ενώ αναλύεται και το αρχικό αζύμωτο γλεύκος, ούτως ώστε να είναι δυνατή κάποια είδους αντιπαραβολή. Οίνος αναφοράς παραγόμενος με εμβόλιο-εκκίνησης *S.cerevisiae* rhone, δεν αναλύθηκε με GC-MS. Οι αρωματικές ενώσεις των εξεταζόμενων οίνων μελετήθηκαν ποιοτικά, αλλά και ημιποσοτικά. Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων έλαβε χώρα με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS) και ακολούθως πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των πτητικών ενώσεων, ταυτοποίηση και ταξινόμηση τους στις εξής κύριες κατηγορίες: Αλκοόλες, Εστέρες, Κετόνες, Τερπένια, Αλδεύδες, Οξέα κ.ά. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλο ενδιαφέρον για τις non-Saccharomyces ζύμες και τη συμβολή τους ως εκκινητές ζύμωσης σε διαδοχικό εμβολιασμό με σακχαρομύκητα.

Οι επιλεγμένες ζύμες παρήγαγαν αρκετές πτητικές ενώσεις κοινές, αλλά και κάποιες ξεχωριστές.

Οι κάτωθι πτητικές ενώσεις είναι κοινές σε όλους τους παραγόμενους οίνους:

Αλκοόλες: 1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-pentanol, 1-heptanol, 1-octen-4-ol, 1-octanol, 3-(methylthio)-1-propanol, phenylethyl alcohol

Εστέρες: Ethyl Acetate, acetic methyl ester, propanoic ethyl ester, Butanoic ethyl ester, isobutyl acetate, 1-butanol, 3-methyl-acetate, hexanoic ethyl ester, octanoic ethyl ester, decanoic ethyl ester, acetic 2-phenylethyl ester, 8-nonenoic ethyl ester, butanedioic acid diethyl ester, formic octyl ester, butanoic 3-methyl-ethyl ester, propanoic 2-hydroxy-ethyl ester, diethyl phthalate, phthalic acid, butyl 2-pentyl ester, succinic butyl-2-phenylethyl ester

Κετόνες: Acetone, 1-(4-methylphenyl)-ethanone, butyrolactone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-ethanone

Τερπένια: (S)-(+)-1,2-propanediol, 2,3-butanediol [S-(R,R)], meso-3,4-hexanediol, citronellol

Οξέα: acetic acid, 2-methyl propanoic acid, 2-methyl-butanoic acid, 3-methyl-butanoic acid, octanoic acid, n-decanoic acid

Και **φουράνιο**, το 2,3-dihydro-benzofuran

Τέλος, καμία Αλδεύδη δεν ανιχνεύθηκε κοινή σε όλους τους οίνους.

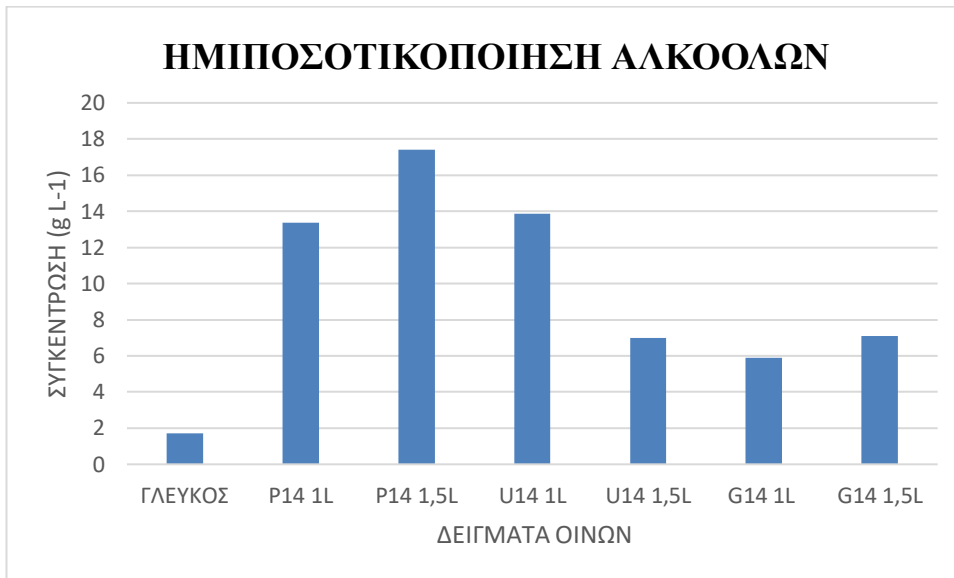
Στους πίνακες και τα γραφήματα που ακολουθούν, όπου P14 1L: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *M. pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone και θρέψη, P14 1,5L: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *M. pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone χωρίς θρέψη, U14 1L: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *H. uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone και θρέψη, U14 1,5L: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *H. uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone χωρίς θρέψη, G14 1L: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *H. guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone και θρέψη, G14 1,5L: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *H. guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone χωρίς θρέψη.

OTHER NAMES: άλλες συνήθειες ονομασίες, πιο κοινές

RT: χρόνος απόκρισης της ένωσης στη στήλη

ODOR: οσμή, μυρωδιά άρωμα πτητικής ένωσης

3.2.3.1 ΑΛΚΟΟΛΕΣ



Γράφημα 1. Συγκέντρωση αλκοολών στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους και το γλεύκος.

Πίνακας 25. Ταυτοποίηση των Αλοολών των επτά οινικών δειγμάτων (GC-MS)

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ							OTHER NAMES	RT	ODOR
	ΓΛΕΥΚΟΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ	P14 1L	P14 1,5L	U14 1L	U14 1,5L	G14 1L	G14 1,5L			
ALCOHOLS	ΓΛΕΥΚΟΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ	P14 1L	P14 1,5L	U14 1L	U14 1,5L	G14 1L	G14 1,5L			
cyclopropyl carbinol	•							Cyclopropylmethanol, Cyclopropylmethyl alcohol, Cyclopropylcarbinyl alcohol	1,7635	alcohol-like
3-methyl-4-penten-2-ol	•							3-methylpent-4-en-2-ol, 4-Penten-2-ol, 3-methyl-	6,0265	pungent vegetable honey peppermint
1-propanol		•	•	•	•	•	•	propyl alcohol, propan-1-ol	6,422	alcoholic fermented fusel tequila musty yeasty sweet fruity apple pear

2-methyl-1-propanol	•	•	•	•	•	•	•	isobutyl alcohol, isobutanol, 2-methylpropan-1-ol	8,156	Slightly suffocating, non residual alcoholic, ethereal winey
1-butanol		•	•	•	•	•	•	butan-1-ol	9,858	Fusel flavor oily sweet balsamic whiskey
3-methyl-1-butanol	•	•	•	•	•	•	•	3-methylbutan-1-ol	11,911	fusel flavor alcoholic whiskey fruity banana
1-pentanol	•		•				•	amyl alcohol, pentan-1-ol	13,213	pungent fermented bready yeasty fusel flavor winey solvent oily sweet balsamic
3-pentanol				•	•	•	•	diethyl carbinol, pentan-3-ol	16,828	sweet herbal oily nutty
3-methyl-1-pentanol	•	•	•	•	•	•	•	3-methylpentan-1-ol	15,477 5	pungent fusel cognac winey cocoa green fruity
3-methyl-4-penten-2-ol		•		•				3-penten-2-ol, methylpropenyl carbinol, 3-Methyl-4-penten-2-ol	16,51	
3-ethyl-4-methylpentan-1-ol				•				1-pentanol, 3-ethyl-4-methyl-	14,155 5	fruity

1-heptanol	•	•	•	•	•	•	•	heptan-1-ol, heptyl alcohol	19,028 5	musty pungent leafy green vegetable fruity apple banana
3-hexen-1-ol	•		•				•	hex-3-en-1-ol	26,63	green leafy
1-octen-4-ol		•	•	•	•	•	•		21,209	-
1-octanol	•	•	•	•	•	•	•	octan-1-ol, caprylic alcohol	21,636 5	waxy green citrus aldehydic floral sweet fatty coconut
3-octanol	•				•			octan-3-ol	17,376	earthy mushroom dairy musty creamy waxy fermented green minty herbal melon citrus woody spicy
3-(methylthio)-1-propanol		•	•	•	•	•	•	methionol, 3-(methylthio)propanol, 3-methylsulfanylpropan-1-ol	25,325	sulfurous onion sweet savory soup cooked vegetable
2,3-dimethyl-1-butanol		•						2-methylbutan-1-ol	26,086 5	roasted winey onion fruity fusel alcoholic whiskey
2-methoxyphenol	•							4-ethylguaiacol, 4-ethylguaiacol, 4-ethyl-2-	22,348	smoky bacon phenolic spicy clove medicinal

								methoxyphenol		woody sweet vanilla
benzyl alcohol	•		•	•	•		•	phenylmethanol	28,772	sweet floral rose phenolic balsamic fruity chemical
phenylethyl alcohol	•	•	•	•	•	•	•	2-phenylethanol	29,5115	sweet floral fresh breadly rose honey

Οι κάτωθι αλκοόλες είναι κοινές σε όλους τους παραγόμενους οίνους:

1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-pentanol, 1-heptanol, 1-octen-4-ol, 1-octanol, 3-(methylthio)-1-propanol, phenylethyl alcohol.

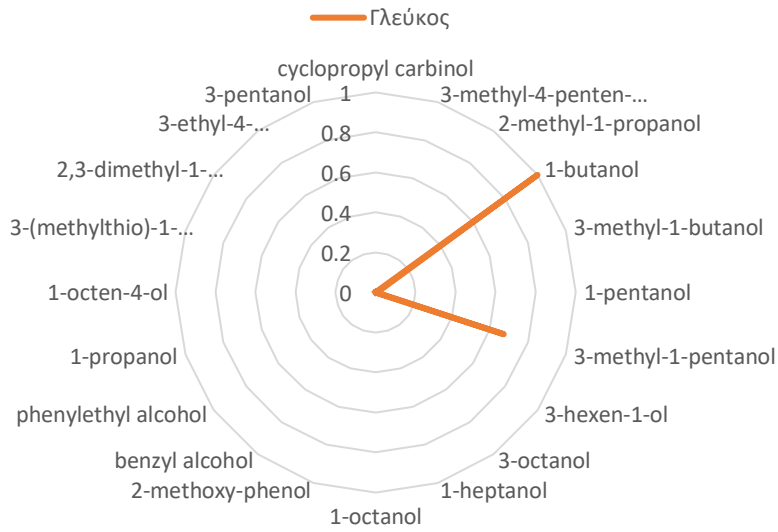
1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, 3-μεθυλ-1-πεντανόλη, 1-επτανόλη, 1-οκτεν-4-όλη, 1-οκτανόλη, 3- (μεθυλθειο) -1-προπανόλη, φαινυλαιθυλική αλκοόλη.

Σύμφωνα με τον πίνακα των αλκοολών ανιχνεύθηκαν στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους σε μικρότερο αριθμό, σε σύγκριση με την ομάδα των εστέρων. Σημαντικότερες ουσίες αυτής της κατηγορίας, θεωρούνται οι ανώτερες αλκοόλες, οι οποίες επηρεάζουν πολύ το άρωμα των οίνων. Γενικά, οι αλκοόλες που ανιχνεύονται είναι κυρίως αλειφατικές, αμυλικές ή αρωματικές (Terrou, et al., 2020). Οι αλειφατικές αλκοόλες αποτελούνται κυρίως από την προπανόλη-1, 2-μέθυλο-προπανόλη-1, 2-μέθυλο-βουτανόλη-1 και 3-μέθυλο-βουτανόλη-1. Όταν, βέβαια, οι αλκοόλες βρίσκονται σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να γίνουν τοξικές και να υποβαθμίσουν τρομερά το άρωμα ενός οίνου. Η χαμηλή συγκέντρωση αλκοολών εντείνει το άρωμα των λουλουδιών, προσφέρει πολυπλοκότητα στο μπουκέτο και αποτελεί ένδειξη υψηλής ποιότητας οίνων (Kallis et al., 2019). Η ουσία της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης προσφέρει γλυκιά γεύση που θυμίζει τριαντάφυλλο. Ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις συμβάλλει θετικά στο άρωμα του γλυκού οίνου (Terrou et al., 2020). Επίσης, η προπανόλη-1 διακρίνεται για τη γλυκιά οσμή της (Zoecklein et al., 1995, Silva et al., 2000). Η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων της βουτανόλης-1 όπως αναφέρουν οι Silva και Malcata (1998), αποτελεί ένδειξη βακτηριακής προσβολής των στέμφυλων. Η εξανόλη-1 προέρχεται αποκλειστικά από την πρώτη ύλη, δεν σχηματίζεται δηλαδή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Soufleros et Bertrand, 1987). Θεωρείται ότι έχει θετική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, προσδίδει ένα «φρουτώδες» αρωματικό προφίλ. Έχει αναφερθεί ότι αυξημένες συγκεντρώσεις της εξανόλης-1 παρατηρούνται συνήθως όταν τα σταφύλια δεν είναι ώριμα αρκετά (Cantagrel et al., 1997). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα των συγκεντρώσεων των αλκοολών είναι η ποικιλία των στέμφυλων που χρησιμοποιούνται, οι συνθήκες ζύμωσης τους και οι τεχνικές οινοποίησης (Silva and Malcata, 1998).

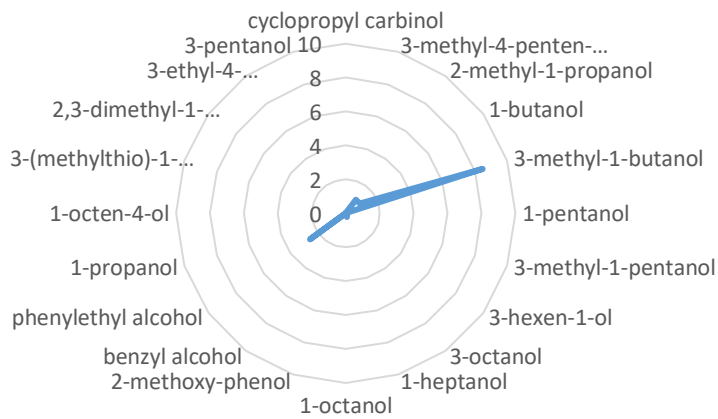
ΗΜΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΩΝ ΚΑΙ ΓΛΕΥΚΟΥΣ

Δεδομένου ότι δεν υπήρχαν πρότυπες καμπύλες των πτητικών ενώσεων του οίνου, μπορούσε να λάβει χώρα μόνο ημιοσοτικοποίηση, με βάση το εσωτερικό πρότυπο, την 1-βουτανόλη. Επιλέχθηκε ως εσωτερικό πρότυπο, διότι είναι μια ένωση, η οποία ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα. Ο ημιοσοτικός προσδιορισμός της σύστασης των αρωματικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στον οίνο, βασίστηκε στον τύπο (Area κάθε ένωσης / Area 1-butanol).

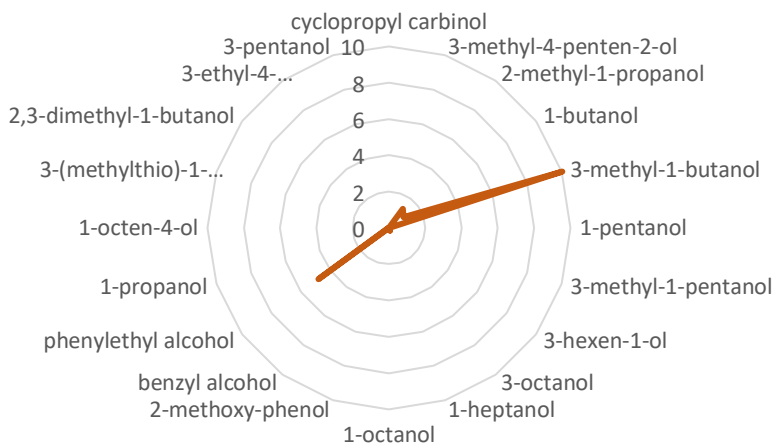
ALCOHOLS ΓΛΕΥΚΟΣ



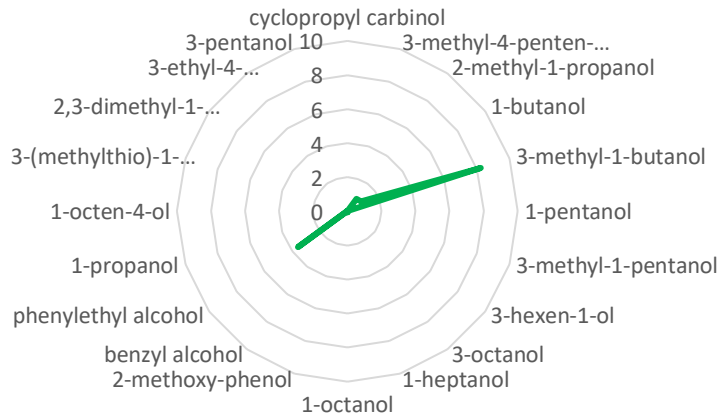
ALCOHOLS P14 1L



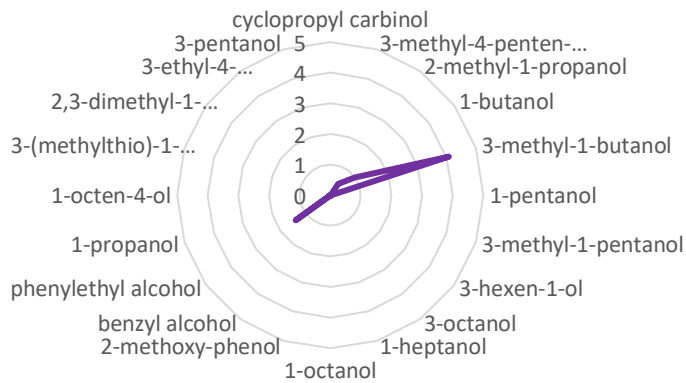
ALCOHOLS P14 1,5L



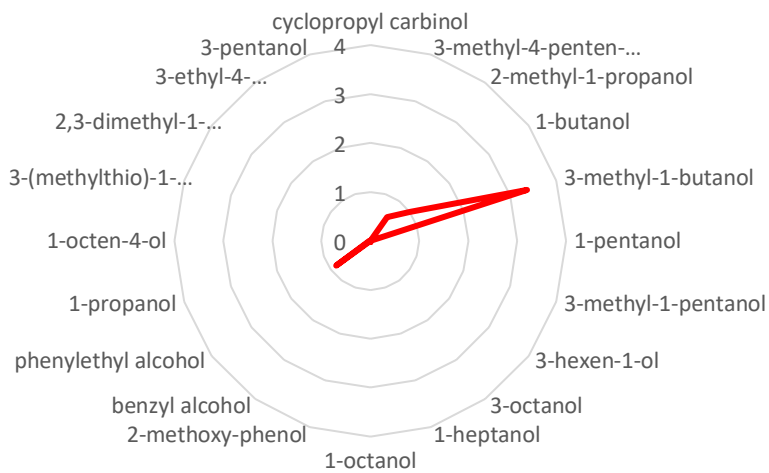
ALCOHOLS U14 1L

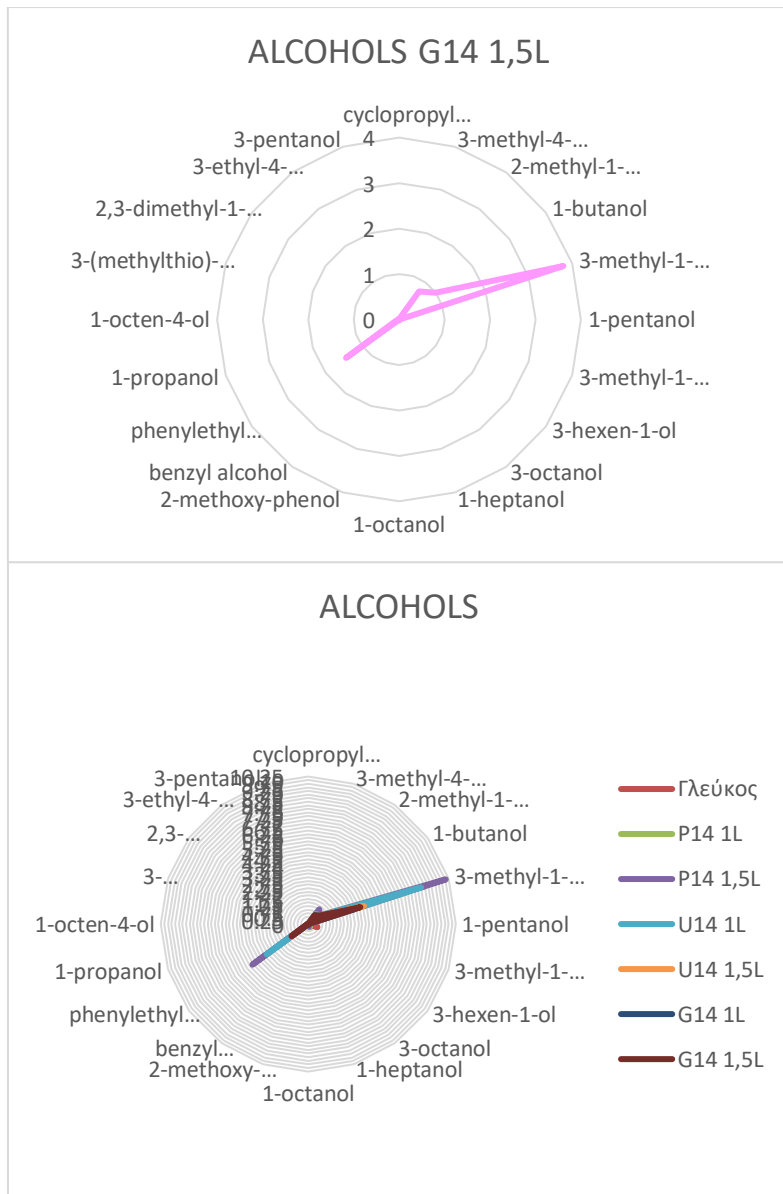


ALCOHOLS U14 1,5L



ALCOHOLS G14 1L

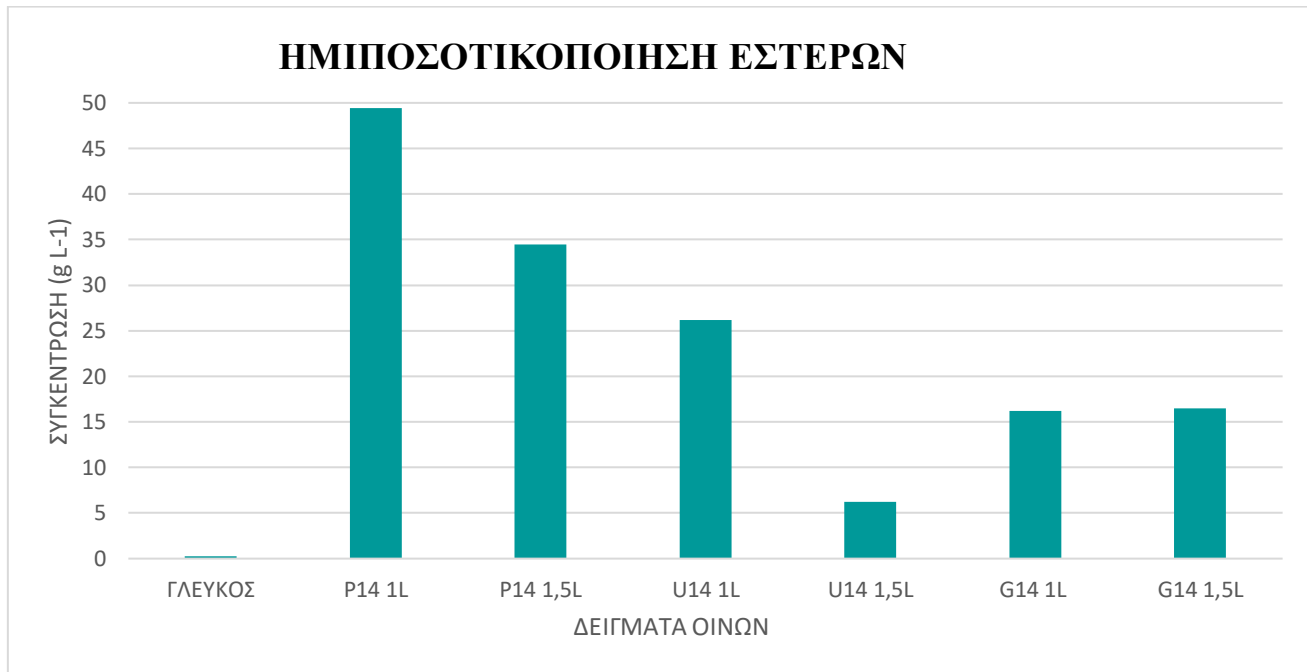




Γράφημα 2. Ομάδα γραφημάτων ημιποσοτικοποίησης αλκοολών, τα οποία ανιχνεύθηκαν στα έξι δείγματα παραγόμενων οίνων και το γλεύκος.

Σύμφωνα με την **ημιποσοτικοποίηση των αλκοολών** που έλαβε χώρα στα δείγματα, αρχικά στο γλεύκος υπερисχύουν σε συγκέντρωση η 1-βουτανόλη και η 3-μέθυλο-1-πεντανόλη, ενώ σε όλα τα δείγματα οίνων ανεξαιρέτως εμβολίου, ανιχνεύονται σε διαφορετικές όμως συγκεντρώσεις, σε μεγαλύτερο ποσοστό με διαφορά η 3-μέθυλο-1-βουτανόλη και σε μικρότερο η φαινυλαιθυλική αλκοόλη. Τέλος, σε εμφανώς μικρότερο η κυκλοπροπυλική καρμπινόλη. Οι υπόλοιπες αλκοόλες ακολουθούν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, χωρίς να αποκλείεται η συμβολή τους στο άρωμα, λόγω του μικρού ορίου ανίχνευσής που έχουν μερικές ενώσεις (κατλωφλι αντίληψης).

3.2.3.2 ΕΣΤΕΡΕΣ



Γράφημα 3. Συγκέντρωση εστέρων στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους και το αζύμωτο γλεύκος.

Πίνακας 26. Ταυτοποίηση των εστέρων στα επτά δείγματα.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ							OTHER NAMES	RT	ODOR
	ΓΛΕΥΚΟΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ	P14 1L	P14 1,5L	U14 1L	U14 1,5L	G1 4 1L	G1 4 1,5 L			
Ethyl Acetate	•	•	•	•	•	•	•		2,90 35	ethereal fruity sweet grape rummy
acetic methyl ester		•	•	•	•	•	•	methyl acetate, acetic acid, methyl ester	2,35 4	ethereal solvent estery fruity winey cognac rummy
propanoic ethyl ester		•	•	•	•	•	•	ethyl propionate, propionic acid, ethyl ester, ethyl propanoate	4,05 85	sweet fruity rummy juicy fruity grape pineapple ethereal winey fermented egg nog
propanoic 2-methyl- ethyl ester			•					ethyl 2-methylpropanoate, isobutyric	4,24 4	sweet ethereal fruity pungent alcoholic fusel rummy

								acid, ethyl ester		
Butanoic ethyl ester	•	•	•	•	•	•	•	Ethyl butyrate	6,138	sweet fruity tutti frutti
isobutyl acetate	•	•	•	•	•	•	•	acetic acid, isobutyl ester, 2-methylpropyl acetate 2-methylpropyl acetate	5,4565	sweet fruity ethereal apple banana tropical
formic-1-methylethyl ester			•	•	•	•	•	isopropyl formate, formic acid, isopropyl ester, propan-2-yl formate, Formic acid, 1-methylethyl ester Formic Acid Isopropyl Ester 1-Methylethyl formate	7,8075	sweet ethereal solvent fruity cocoa tropical
1-butanol, 3-methyl-acetate	•	•	•	•	•	•	•	methyl acetate	8,8575	sweet banana and pear-like fruity green ripe estery
hexanoic ethyl ester	•	•	•	•	•	•	•	Ethyl hexanoate	12,567	sweet fruity pineapple waxy fatty estery green banana
4-penten-1-ol propanoate	•							4-Penten-1-yl Acetate	15,244	green plastic weedy acrylate vegetable metallic cooked meaty sulfurous
octanoic ethyl ester	•	•	•	•	•	•	•	ethyl octanoate	18,3685	fruity winey waxy sweet apricot banana brandy pear

decanoic ethyl ester	•	•	•	•	•	•	•	ethyl decanoate	23,5 255	sweet fruity grape brandy	waxy apple oily
acetic 2-phenylethyl ester	•	•	•	•	•	•	•	phenethyl acetate, 2-phenylethyl acetate, acetic acid, 2-phenylethyl ester	27,4 5 27,4 745	sweet floral yeasty cocoa fruity floral sweet fruity nectar yeasty balsamic	honey rose honey balsamic tropical rose honey green tropical cocoa balsamic
butanoic-2-methylbutyl ester		•	•	•	•		•	2-methyl butyl butyrate, butanoic acid, 2-methylbutyl ester	13,5 24	fruity apricot tropical gooseberry spicy tutti frutti	pear apple
8-nonenoic ethyl ester	•	•	•	•	•	•	•	ethyl nonanoate	29,2 445	waxy cognac fruity banana winey	rose estery apple tropical
butanedioic acid diethyl ester		•	•	•	•	•	•	diethyl succinate, butanedioic acid, diethyl ester	24,3 92	fruity cooked ylang	apple apple
1,3-propanediol, diacetate							•	1,3-propane diol, 1,3-propanediol	25,8 245	characteristic, solvent	
formic octyl ester	•	•	•	•	•	•	•	octyl formate	35,7 545	fruity orange cucumber	rose waxy
butanoic 3-methyl-ethyl ester		•	•	•	•	•	•	ethyl isovalerate, isovaleric acid, ethyl ester, ethyl 3-methylbutanoate	27,3 185	fruity apple pineapple frutti sharp orange	sweet tutti estery green
formic heptyl ester		•			•		•	heptyl acetate, acetic acid, heptyl ester	24,1 005	fresh rummy ripe apricot waxy citrus	green fruit pear woody fatty

										aldehydic winey woody
ethyl hydrogen succinate		•	•					Ethylene glycol diacetate, monoethyl succinate, 4-Ethoxy- 4- oxobutanoic acid	35,7 64	
1- ethylpropyl acetate							•	3-Pentyl acetate, 1- Ethylpropyl ethanoate, 3-Pentanol, acetate	10,1 235	Banana essence
propanoic 2-hydroxy- ethyl ester		•	•	•	•	•	•	ethyl lactate, propanoic acid, 2- hydroxy-, ethyl ester, ethyl 2- hydroxypro panoate	15,8 26	sweet fruity acidic ethereal brown sharp tart buttery butterscotch
5- oxotetrahydr ofuran-2- carboxylic ethyl ester		•	•	•	•	•		Ethyl 5- oxooxolane -2- carboxylate , ethyl 2- furoate, ethyl furan- 2- carboxylate , 2- furancarbo xylic acid, ethyl ester	35,8 05	balsamic fruity floral orchid, Floral aroma with earthy fermented undertones
diethyl phthalate	•	•	•	•	•	•	•	diethyl benzene- 1,2- dicarboxyla te	35,6 755	practically odourless
dibutyl phthalate			•					phthalic acid, dibutyl ester, dibutyl benzene- 1,2- dicarboxyla te	34,1 585	characteristic, faint odor, a slight, aromatic odor

phthalic acid, butyl 2-pentyl ester	•	•	•	•	•	•	•	1-O-butyl 2-O-octyl benzene-1,2-dicarboxylate, butyl octyl phthalate, Benzyl butyl phthalate, phthalic acid, butyl octyl ester	38,5 035	Slight odor, a light, fruity aroma character
succinic butyl-2-phenylethyl ester		•	•	•	•	•	•	Succinic acid, butyl 2-phenylethyl ester	30,5 83	
pentanoic-3-hydroxy-ethyl ester		•						ethyl 3-hydroxyhexanoate, hexanoic acid, 3-hydroxy-, ethyl ester	29,1 31	sweet fruity tropical grape grassy hay cranberry citrus
butanedioic ethyl 3-methylbutyl ester		•	•	•	•				29,3 69	
p-hydroxycinnamic acid ethyl ester					•			Hydroxycinnamic Acid Ethyl Esters as Precursors to Ethylphenols in Wine, ethyl cinnamate, ethyl 3-phenyl-2-propenoate, ethyl 3-phenylprop-2-enoate	32,6 1	sweet balsamic fruity spicy powdery berry plum cinnamyl

Οι κάτωθι εστέρες είναι κοινοί σε όλους τους παραγόμενους οίνους:

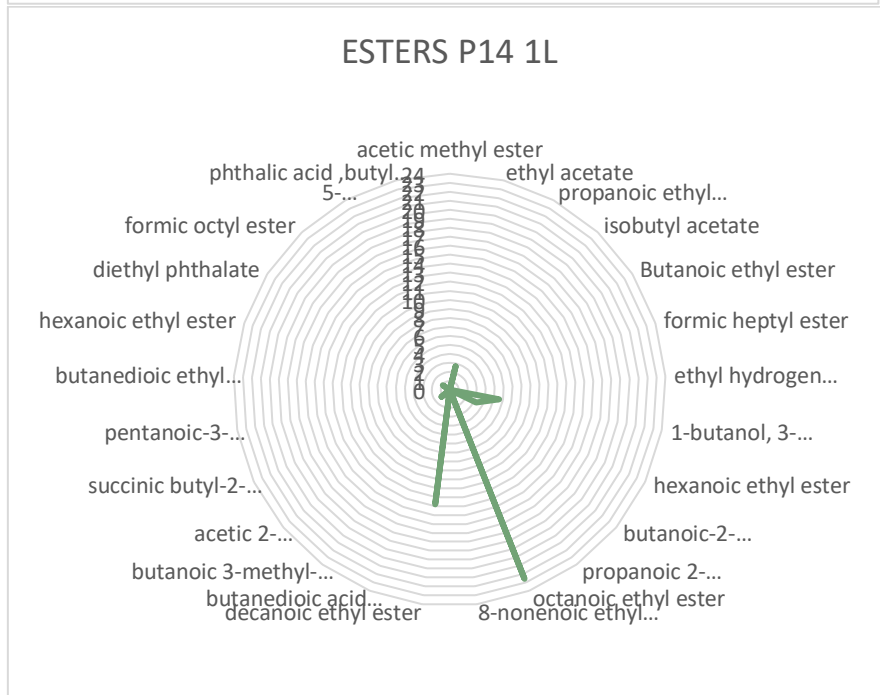
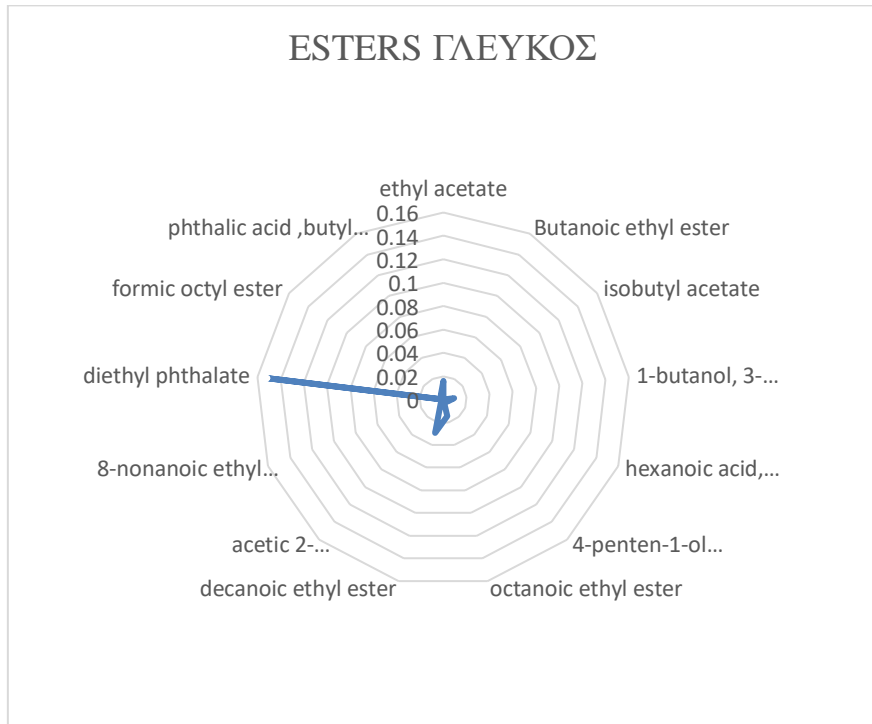
Ethyl Acetate, acetic methyl ester, propanoic ethyl ester, Butanoic ethyl ester, isobutyl acetate, 1-butanol, 3-methyl-acetate, hexanoic ethyl ester, octanoic ethyl ester, decanoic ethyl ester, acetic 2-phenylethyl ester, 8-nonenoic ethyl ester, butanedioic acid diethyl ester, formic octyl ester, butanoic 3-methyl-ethyl ester, propanoic 2-hydroxy-ethyl ester, diethyl phthalate phthalic acid, butyl 2-pentyl ester, succinic butyl-2-phenylethyl ester.

Οξικός αιθυλεστέρας, οξικός μεθυλεστέρας, προπανοϊκός αιθυλεστέρας, βουτανοϊκός αιθυλεστέρας, οξικός ισοβουτυλεστέρας, 1-βουτανόλη, 3-μεθυλ-οξικός εστέρας, εξανοϊκός αιθυλεστέρας, οκτανοϊκός αιθυλεστέρας, δεκανοϊκός αιθυλεστέρας, οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας, 8-νονενοϊκός αιθυλεστέρας, διαιθυλεστέρας βουτανοδιοϊκού οξέος, μυρμηκικός οκτυλεστέρας, βουτανοϊκός

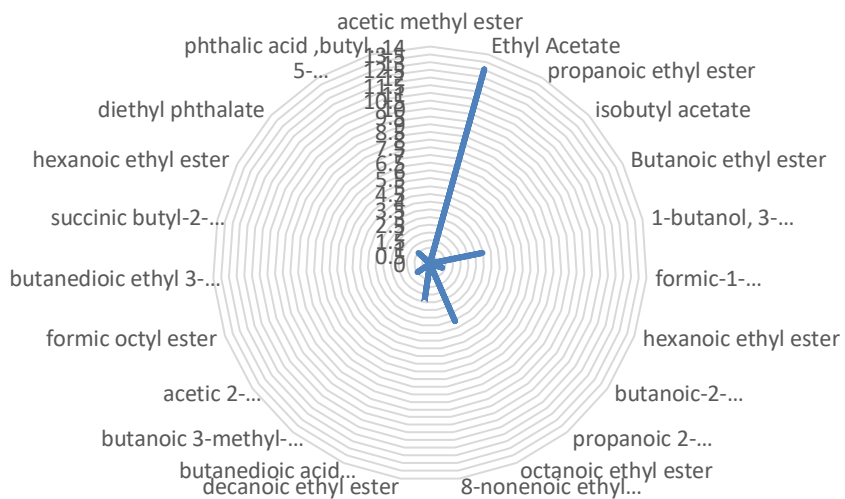
3-μεθυλ-αιθυλεστέρας, προπανοϊκός 2-υδροξυ-αιθυλεστέρας, φθαλικός διαιθυλεστέρας, βουτυλ 2-πεντυλεστέρας φθαλικού οξέος, ηλεκτρικός βουτυλο-2-φαινυλαιθυλεστέρας.

Οι περισσότεροι εστέρες παράγονται κατά το μεταβολισμό της αλκοολικής ζύμωσης. Έχει βρεθεί ότι η ποιότητα του οίνου έχει θετική συσχέτιση με τους εστέρες (εντός ορισμένων ορίων). Οι αιθυλεστέρες είναι επιθυμητοί στους οίνους, διότι προσδίδουν φρουτώδες άρωμα (Terrou et al., 2020). Οι μικρές συγκεντρώσεις του οξικού αιθυλεστέρα, παρέχουν φρουτώδες άρωμα, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδίδουν ένα δυσάρεστο και πικάντικο άρωμα.

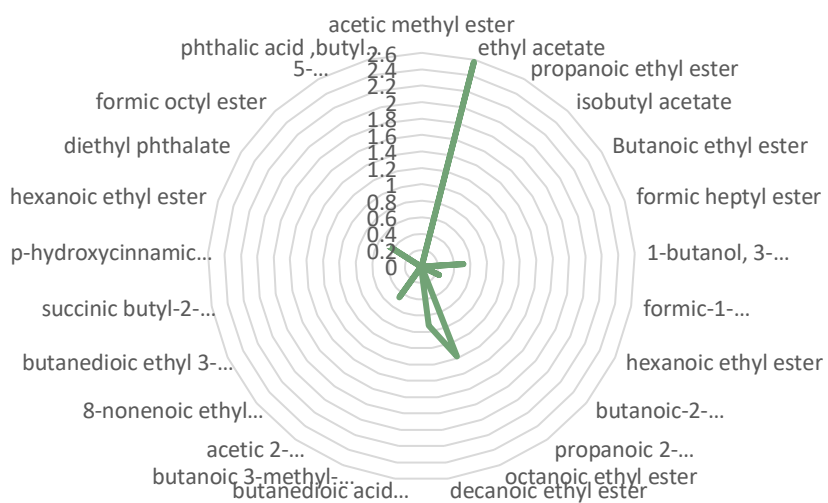
ΗΜΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ ΚΑΙ ΓΛΕΥΚΟΥΣ

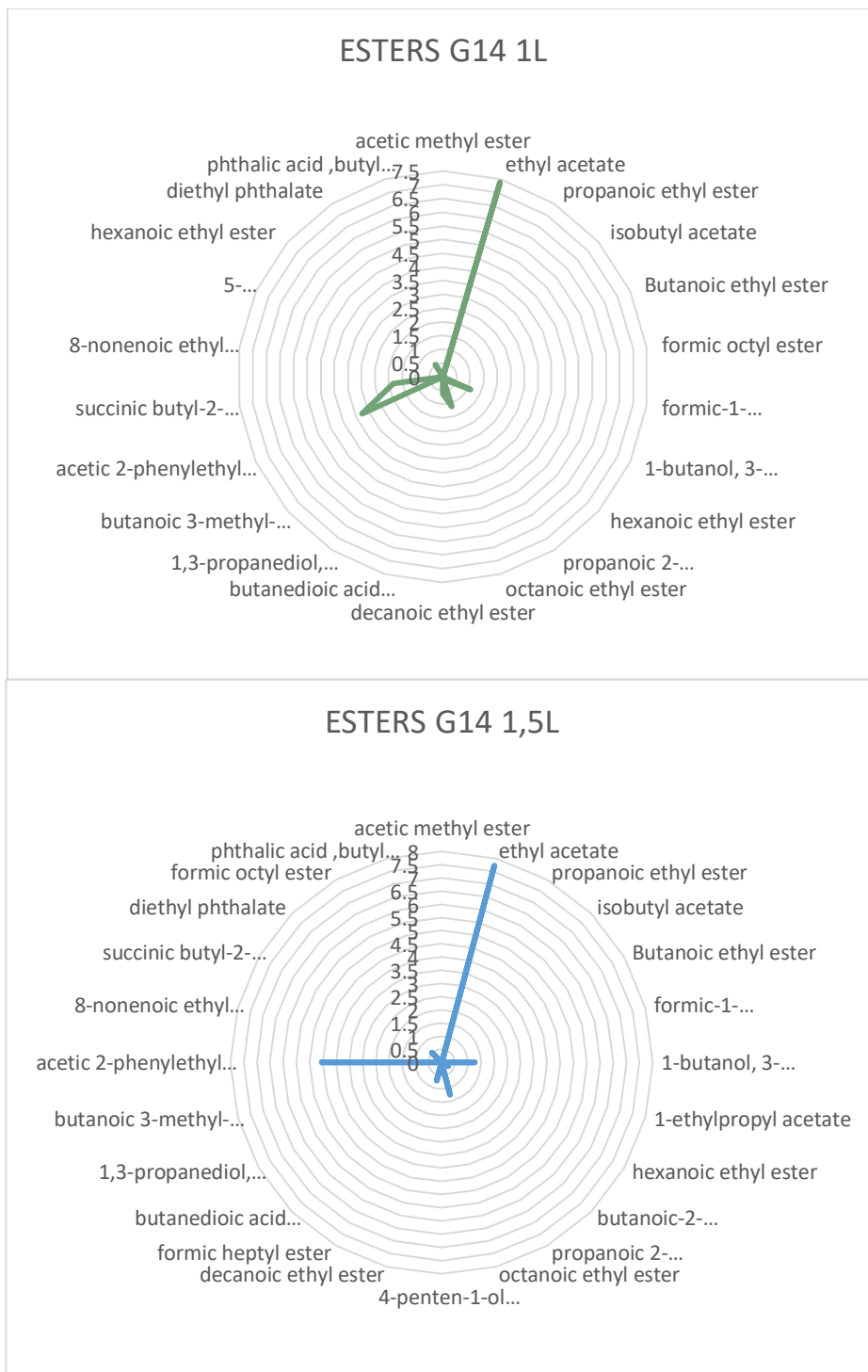


ESTERS U14 1L



ESTERS U14 1,5L





Γραφίμα 4. Ομάδα γραφημάτων ημιποσοτικοποίησης εστέρων που ανιχνεύθηκαν στα έξι δείγματα παραγόμενων οίνων και το αντίστοιχο γλεύκος τους.

Οι εστέρες μαζί με τις ανώτερες αλκοόλες αποτελούν τις βασικές αρωματικές ενώσεις σε έναν φρέσκο οίνο, γι' αυτό το λόγο είναι και αυτές που παρουσιάζονται διεξοδικότερα. Σύμφωνα με την **ημιποσοτικοποίηση των εστέρων**, που έλαβε χώρα στα δείγματα, παρατηρείται ότι στο γλεύκος υπερισχύει σε συγκέντρωση ο φθαλικός διαιθυλεστέρας (προέρχεται από τη στήλη) και σε πολύ μικρότερη ταυτοποιήθηκε ο οξικός αιθυλεστέρας και εν συνέχεια ο δεκανοϊκός. Τα δείγματα οίνων, όπως φαίνεται στα γραφήματα ημιποσοτικοποίησης, ταξινομούνται ανά δύο με ίδιους εστέρες σύμφωνα με το εμβόλιο εκκίνησης της αλκοολικής ζύμωσής τους. Βέβαια, στις φιάλες που έλαβε χώρα θρέψη με DAP, η συγκέντρωση ανιχνεύεται ως διπλάσια, κάτι το οποίο είναι ιδιαίτερος επιθυμητό για μερικούς εστέρες.

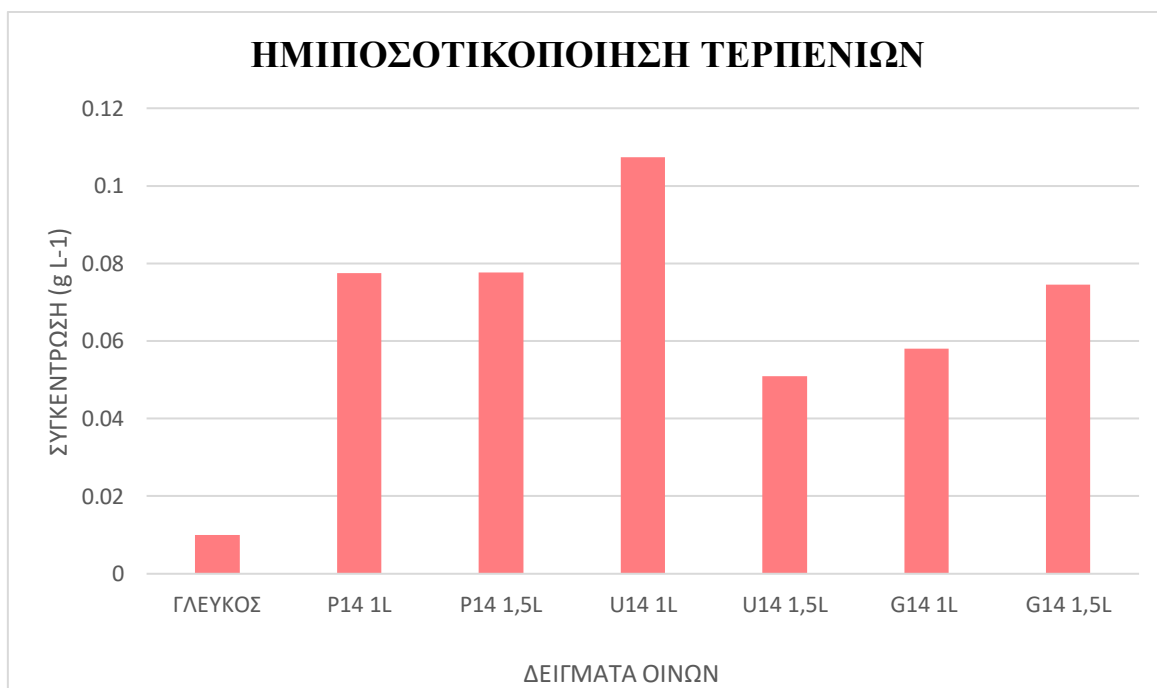
Αρχικά για το στέλεχος *M.pulcherrima* ανιχνεύονται οι ίδιοι εστέρες και στα δύο δείγματα με παρόμοια αναλογία, αλλά σε διπλάσιες συγκεντρώσεις για τον οίνο με τη θρέψη. Συγκεκριμένα, υπερισχύει ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας και έπειτα ακολουθούν ο δεκανοϊκός και ο 1-βουταν-3-μεθυλεστέρας για τον οίνο με τη θρέψη και οξικός αιθυλεστέρας για τον οίνο χωρίς.

Για το στέλεχος, *H.unarum*, ταυτοποιήθηκαν οι ίδιοι κύριοι εστέρες, οξικός σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση και ακολούθως ο οκτανοϊκός και 1-βουταν-3-οξικός μεθυλεστέρας.

Για τον οίνο με εκκινητή *H. guilliermondii*, ανιχνεύθηκαν οι δύο κύριοι εστέρες, στο ίδιο ποσοστό, αρχικά ο οξικός αιθυλεστέρας και έπειτα ο οξικός-2-φαιθυλεστέρας.

Οι υπόλοιποι εστέρες σε όλα τα δείγματα ακολουθούν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, χωρίς όμως να αποκλείεται η θετική συμβολή τους στο άρωμα, απλά υπερισχύουν οι προαναφερθέντες, οι οποίοι δυστυχώς σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να καλύπτουν ορισμένα επιθυμητά αρώματα.

3.2.3.3 ΤΕΡΠΕΝΙΑ



Γράφημα 5. Συγκέντρωση τερπενίων στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους και το γλεύκος.

Πίνακας 27. Ταυτοποίηση των τερπενίων στα επτά δείγματα.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ							OTHER NAMES	RT	ODOR
	ΓΛΕΥΚΟΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ	P14 1L	P14 1,5L	U14 1L	U14 1,5L	G1 4 1L	G1 4 1,5 L			
TERPENES										
(S)-(+)-1,2-propanediol	•	•	•	•	•	•	•	L-1,2-Propanediol, S-1,2-	22, 442 5	nearly odorless, but possesses a

								Propanediol,(S)-(+)-PROPANEDIOL,(S)-1,2-PROPANEDIOL,(2S)-1,2-Propanediol,(S)-Propane-1,2-diol,(2S)-propane-1,2-diol,1,2-Propanediol,Propane-1,2-diol,Propylene glycol α -Propylene glycol 1,2-Propanediol 1,2-Dihydroxypropane Methyl ethyl glycol Methylethylene glycol		faintly sweet taste
2,3-butanediol [S-(R,R)]	•	•	•	•	•	•	•	2,3-butane diol, butane-2,3-diol	22, 1	fruity creamy buttery
2,3-butanediol [R-(R,R)]		•		•	•	•	•	2,3-butane diol, butane-2,3-diol	21, 182 5	fruity creamy buttery
1,2-butanediol						•	•	1,2-butane diol, butane-1,2-diol, 1,2-Butanediol 1,2-Butylene Glycol 1,2-Dihydroxybutane	13, 98 15. 67	Acetic acid smell
meso-3,4-hexanediol	•	•	•	•	•	•	•	3,4-Hexanediol, Hexane-3,4-diol, meso-3,4-Hexanediol, 3,4-dihydroxyhexane	16, 828 5	

RS-2,3-hexanediol							•	hexane-2,3-diol, 2,3-Hexanediol, RS-2,3-hexanediol	18,7505	
Citronellol		•	•	•	•	•	•	3,7-dimethyl-6-octenol, 3,7-dimethyloct-6-en-1-ol	26,4815	floral rose sweet citrus green fatty terpenic leathery waxy
Geraniol							•	trans-3,7-dimethyl-2,7-octadien-1-ol, (2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-ol	28,2405	sweet floral rose-like, citrus with fruity, citronella, waxy nuances

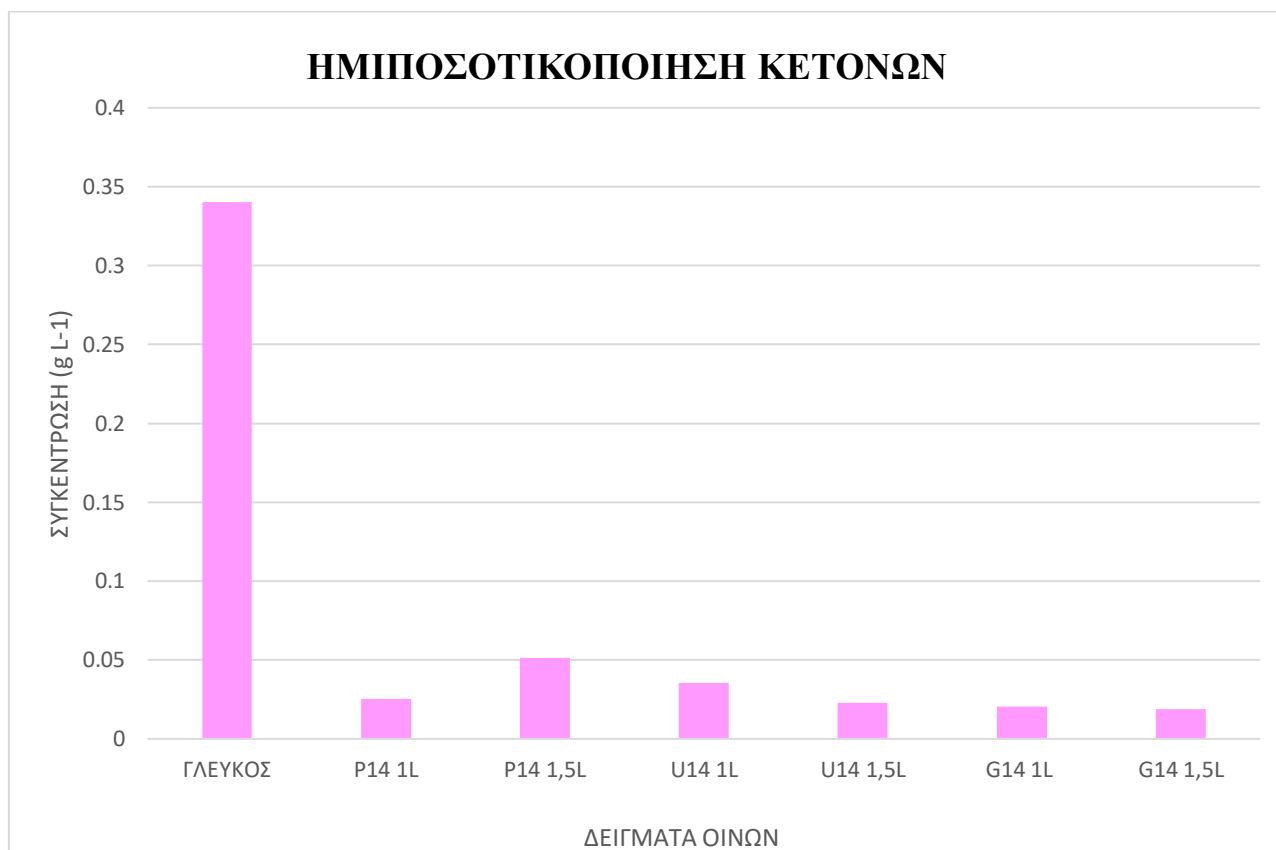
Τα κάτωθι τερπένια βρέθηκαν κοινά σε όλους τους παραγόμενους οίνους:

(S)-(+)-1,2-propanediol, 2,3-butanediol [S-(R,R)], meso-3,4-hexanediol, citronellol

1,2-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη, μεσο-3,4-εξανοδιόλη, κιτρονελόλη (ή σιτρονελόλη)

Τα τερπένια είναι τυπικές ενώσεις αρωματικών ποικιλιών που υπάρχουν στα σταφύλια σε ελεύθερες πτητικές μορφές. Τα ελεύθερα τερπένια παρόλο που μπορεί να βρεθούν σε μικρό ποσοστό, έχουν μεγάλη επίδραση στο άρωμα των οίνων προσδίδοντας τους ένα «λουλουδάτο» χαρακτήρα. Οι συγκεντρώσεις των τερπενίων στα σταφύλια επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως ο βαθμός ωρίμανσης, οι συνθήκες εδάφους, οι αμπελουργικές πρακτικές (Terrou et al., 2020). Για παράδειγμα, αυξάνονται ποσοτικά κατά το στάδιο της ωρίμανσης των σταφυλιών για να μειωθούν κατά τη διάρκεια της υπερωρίμανσης. Οι χαρακτηριστικές ουσίες λιναλόλη, γερανιόλη και η κιτρονελόλη ελαττώνονται όσο αυξάνεται ο χρόνος παλαίωσης (Jackson, 2008).

3.2.3.4 ΚΕΤΟΝΕΣ



Γράφημα 6. Συγκέντρωση κετονών στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους και το γλεύκος.

Πίνακας 28. Ταυτοποίηση των κετονών στα επτά δείγματα.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ							OTHER NAMES	RT	ODOR
KETONES	ΓΛΕΥΚΟΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ	P14 1L	P14 1,5 L	U14 1L	U1 4 1,5 L	G1 4 1L	G1 4 1,5 L			
acetone	•	•	•	•	•	•	•		2,263	solvent ethereal apple pear
acetoin	•		•	•	•	•	•	3-hydroxy-2-butanone, 3-hydroxybutan-2-one	13,981	sweet buttery creamy dairy milky fatty
1-(4-methylphenyl)-ethanone	•	•	•	•	•	•	•	para-methylacetophenone, 4'-methylacetophenone, 1-(4-methylphenyl)ethanone	17,497 5, 15,936 5	floral hawthorn sweet mimosa coumarinic cherry acacia powdery naphthyl vanilla
butyrolactone		•	•	•	•	•	•	gamma-butyrolactone, 4-hydroxybutyric acid lactone, oxolan-2-one	23,077 5 23,08	creamy oily fatty caramellic
3-methyl-3-buten-2-one				•		•		3-butene-2-one, 3-methyl, Isopropenyl methyl ketone	1,839	Very pungent, pleasant, sweet
1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-ethanone	•	•	•	•	•	•	•	ortho-acetyl-para-cresol, 2-hydroxy-5-methylacetophenone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)ethanone	28,217 5 34,37 34.35	sweet floral herbal
pantolactone			•					(R)-(-)-pantolactone, 2(3H)-furanone, dihydro-3-hydroxy-4,4-	29,818 5	cotton candy

								dimethyl-, (3R)-		
2H-pyran- 2,6-(3H)- dione			•	•	•	•	•	glutaric anhydride, 2H-pyran- 2,6(3H)- dione, dihydro-, oxane-2,6- dione, pyroglutari c acid, pentanedioi c acid anhydride, 3,6- dihydro- 2H-pyran- 2,6-dione, Glutaconsa eureanhydri d	31,116 5	

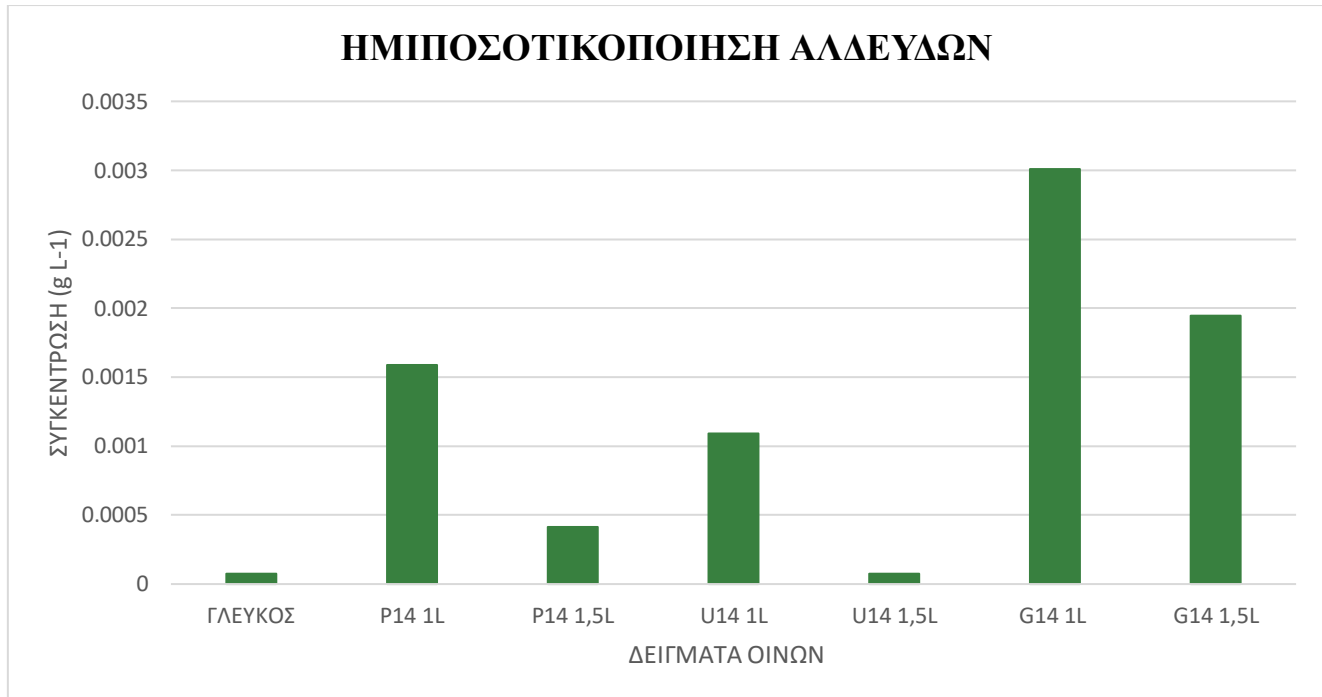
Οι κάτωθι κετόνες είναι κοινές σε όλους τους παραγόμενους οίνους:

Acetone, 1-(4-methylphenyl)-ethanone, butyrolactone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-ethanone

Ακετόνη, 1- (4-μεθυλοφαινυλο) -αιθανόνη, βουτυρολακτόνη, 1- (2-υδροξυ-5-μεθυλοφαινυλο) –αιθανόνη

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παράγονται και κάποιες κετόνες ελάχιστες όμως επηρεάζουν το αρωματικό χαρακτήρα. Η κετόνη β-δαμασκηνόνη με άρωμα τριαντάφυλλου προέρχεται από το σπάσιμο των σταφυλιών και απαντάται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στους ερυθρούς από ότι στους λευκούς οίνους (Clarke Ron. J & Bakker J., 2004).

3.2.3.5 ΑΛΔΕΥΔΕΣ



Γράφημα 7. Συγκέντρωση αλδευδών στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους και το γλεύκος.

Πίνακας 29. Ταυτοποίηση των αλδευδών στα επτά δείγματα.

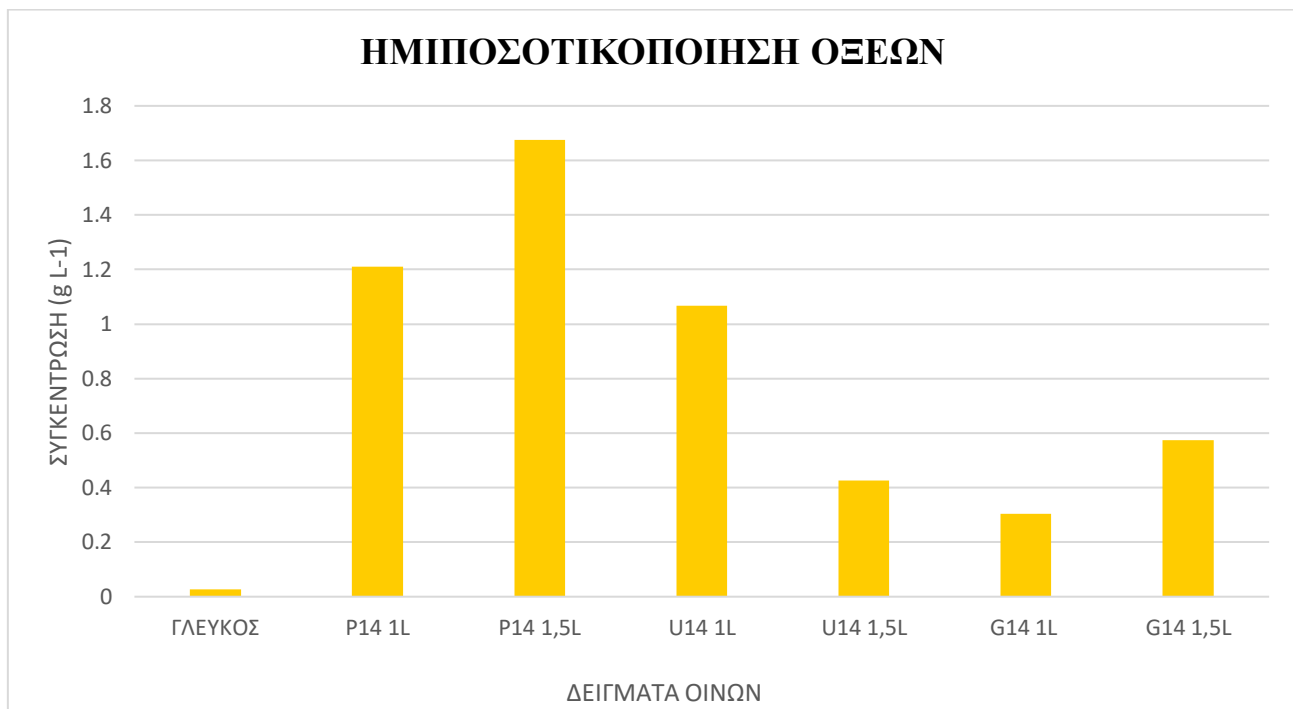
ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ							OTHER NAMES	RT	ODOR
	ΓΛΕΥΚΟΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ	P14 1L	P14 1,5L	U14 1L	U14 1,5L	G1 4 1L	G1 4 1,5 L			
ALDEHYDES										
methyl-benzeneacetaldehyde	•	•	•	•			•	homocum inic aldehyde, benzenea cetaldehy de, ar-(1- methyleth yl)-, 2-(3- propan-2- ylphenyl) acetaldehy de	14,50	green cortex foliage woody privet
(Z)-2-butenal				•	•			Crotonic aldehyde β- Methacrol ein β-Methyl acrolein	28,964 5 23,322	pungent, suffocating odor

								2-butenal Propylene aldehyde, 2- butenalde hyde, but- 2-enal, Crotonald ehyde		
5- hydroxymet hylfurfural						•	•	5- hydroxym ethyl furfural, hydroxym ethylfurfu ralaldehy de, 5- (hydroxy methyl)fu ran-2- carbaldeh yde	27,58	fatty buttery musty waxy caramellic

Καμία αλδεύδη δεν βρέθηκε κοινή σε όλους τους παραγόμενους οίνους.

Οι αλδεύδες είναι προϊόντα οξείδωσης των αλκοολών και συνήθως ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στους οίνους. Συγκεκριμένα, η ακεταλδεΐδη όταν ανιχνεύεται σε χαμηλή συγκέντρωση, μπορεί να προσφέρει ένα ευχάριστο φρουτώδες άρωμα. Από την άλλη πλευρά, όταν η ακεταλδεΐδη βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, μπορεί να δώσει μια έντονη και ανεπιθύμητη οσμή στο προϊόν. Ως εκ τούτου είναι σημαντικό κατά την οινοποίηση να επιλέγονται στελέχη, τα οποία παράγουν χαμηλές ποσότητες ακεταλδεΐδης (Kallis et al., 2019).

3.2.3.6 ΟΞΕΑ



Γράφημα 8. Συγκέντρωση οξέων στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους

Πίνακας 30. Ταυτοποίηση των οξέων στα επτά δείγματα.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ							OTHER NAMES	RT	ODOR
	ΓΛΕΥΚΟΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ	P14 1L	P14 1,5L	U14 1L	U14 1,5L	G14 1L	G14 1,5L			
methoxy-acetic acid							•	2-Methoxyacetic acid, Acetic acid, methoxy-, Methoxyethanoic acid	13,566	Odorless
acetic acid	•	•	•	•	•	•	•	ethanoic acid	18,732	sharp pungent sour vinegar
2-methyl propanoic acid	•	•	•	•	•	•	•	propionic anhydride, propionyl	21,77	like acetaldehyde

								propanoate		
2-methylbutanoic acid		•	•	•	•	•	•	2-methylbutyric acid, 2-methylbutyric acid	24,2465	pungent acidic fruity dirty roquefort cheesy fermented
3-methylbutanoic acid	•	•	•	•	•	•	•	isovaleric acid, 3-methylbutyric acid	24,2155	sour sweaty cheesy dairy acidic sour pungent fruity ripe fatty fruity
hexanoic acid				•			•	caproic acid	28,1325	sour fatty sweaty cheesy
octanoic acid	•	•	•	•	•	•	•	caprylic acid	32,4975	fatty waxy rancid oily vegetable cheesy
n-decanoic acid	•	•	•	•	•	•	•	capric acid	34,9875	rancid sour fatty citrus
Benzoic Acid		•	•	•		•	•	Phenylacetic acid, Benzoic acid, Carboxybenzene, Dracrylic acid, Phenylmethanoic acid	36,193	balsamic urine, faint, pleasant odor
butanoic acid	•	•	•	•	•			butyric acid	23,226	sharp acetic dairy cheesy buttery fruity
propanoic acid							•	propionic acid, pseudoacetic acid	24,242	pungent acidic cheesy dairy vinegar rancid unpleasant
4-methyl-2-oxovaleric acid					•			4-methyl-2-oxopentanoic acid	15,7055	Fruity

								acid, alpha- Ketoiso caproic acid, Keto-leu cine		
2-methyl- propanoic acid anhydride					•				20,574 5	like acetaldehyde

Τα κάτωθι οξέα είναι κοινά σε όλους τους παραγόμενους οίνους:

acetic acid, 2-methyl propanoic acid, 2-methyl-butanoic acid, 3-methyl-butanoic acid, octanoic acid, n-decanoic acid

Οξικό οξύ, 2-μεθυλ προπανοϊκό οξύ, 2-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ, 3-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ, οκτανοϊκό οξύ, η-δεκανοϊκό οξύ

Τα πτητικά οργανικά οξέα συμμετέχουν σε μεγάλο βαθμό στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων διαμορφώνοντας το άρωμα τους. Το οξικό οξύ, αποτελεί το σημαντικότερο πτητικό οξύ που βρίσκεται στους οίνους. Ωστόσο, έχει την οσμή ξυδιού και συνδέεται κυρίως με ελαττώματα, προσβολή του οίνου από οξικά ή/και γαλακτικά βακτήρια και άσχημες οσμές. Επίσης, πρόκειται για ένα υποπροϊόν της δράσης των βακτηρίων και των ζυμών που η συγκέντρωσή του μπορεί να αυξηθεί ακόμη και κατά το στάδιο της παλαίωσης σε βαρέλι από την υδρόλυση των ημικυτταρινών. Στα συνήθη επίπεδα που βρίσκεται αυτό το οξύ είναι επιθυμητό, γιατί συνεισφέρει στην πολυπλοκότητα τόσο του αρώματος όσο και της γεύσης των οίνων. Το βουτυρικό οξύ και προπανικό οξύ με οσμές βουτύρου και σόγιας αντίστοιχα, συμπληρώνουν τον αριθμό των διάφορων οξέων που μπορεί να υπάρχουν στο κρασί, τα οποία όμως σπάνια βρίσκονται πάνω από το κατώφλι αντίληψης (Jackson Ron S., 2002).

3.2.3.7 ΑΛΛΕΣ ΠΗΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Πίνακα 31. Ταυτοποίηση άλλων μεμονομένων ενώσεων στα επτά δείγματα.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ							OTHER NAMES	RT	ODOR
	ΓΛΕΥΚΟΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ	P14 1L	P14 1,5L	U14 1L	U14 1,5L	G1 4 1L	G14 1,5L			
2,3-dihydro-benzofuran	•	•	•	•	•	•	•	coumaran, 2,3-dihydro-1-benzofuran, 2,3-dihydrobenzo(b)fur an	35,8 315	musky odor
methylal	•	•		•	•		•	dimethoxymethane	8,16 65	chloroform-like odor and a pungent taste
3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-1H-pyrazole					•		•	1H-Pyrazole, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-, 1-phenyl-3(5)-propyl pyrazole, 1-phenyl-3 or 5-propyldiazole, 1H-Pyrazole, 1-phenyl-3(or 5)-propyl-	33,2 845	roasted cooked

Το κάτωθι φουράνιο είναι κοινό σε όλους τους παραγόμενους οίνους: **2,3-dihydro-benzofuran (2,3-δωδρο-βενζοφουράνιο)**.

3.2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΟΙΝΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Παραλαβή Γλεύκους Ποικιλίας Ασύρτικο Σπάτων (τρύγος 2019) και παρακολούθηση της αλκοολικής του ζύμωσης. Το γλεύκος εμβολιάστηκε με εμπορική ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και η ζύμωση διήρκησε 18 ημέρες. Οι παραγόμενοι οίνοι παρουσίασαν συγκέντρωση αιθανόλης 12,1-12,2 % vol (πίνακας 36).

Πίνακας 32. Ασύρτικο Σπάτων – Κωδικός ASYR – SPAT1 A & B – Στοιχεία Παραλαβής

Οινοποιείο	Γ.Π.Α. Σπάτων
Ποικιλία	Ασύρτικο
Ημερομηνία Εισαγωγής	28/8/19
Ημερομηνία Κατεργασίας	29/8/19
Βάρος Σταφυλιού	75 kg
Όγκος γλεύκους – απολασπόμενου γλεύκους	40 lt – 34 lt (προς ζύμωση 13lt A & 13lt B)
Βάρος 100 ραγών	222,4 g
Όγκος 100 ραγών	210 ml

Πίνακας 33. Προζυμωτικές μετρήσεις γλεύκους

Be	12,0
Brix	20,4
O.O.	6,45
PH	2,95
NTU	2,60

Πίνακας 34. Πρωτόκολλο Οινοποίησης - Θρέψη

Ζύμη	Safoeno GV S107
Θρέψη	200 g/tn Spring Arom (γλουταθειόνη) 100 g/tn Spring Cell (πολυσακχαρίτης) 200 g/tn SpringFerm (πηγή οργανικού αζώτου - μετά από 20h) 200 g/tn DAP (φωσφορικό διαμμώνιο – προσθήκη 4/9/19)

Πίνακας 35. Πορεία Αλκοολικής Ζύμωσης γλεύκους (Δ' κύκλος)

Ημερομηνία	Brix A	T (°C) A	Brix B	T (°C) B
31/8/19	20,4	20,0	20,8	20,0

1/9/19	20,3	20,5	20,6	24,5
2/9/19	20,1	20,1	19,4	21,9
3/9/19	18,7	21,6	18,3	19,4
4/9/19	16,5	22,5	16,1	25,5
5/9/19	14,9	18,5	14,5	18,4
6/9/19	13,1	18,5	13,0	18,4
7/9/19	11,9	18,0	11,5	18,0
8/9/19	10,8	19,5	10,5	20,0
9/9/19	10,2	19,8	9,9	19,4
10/9/19	9,5	19,9	9,1	19,5
11/9/19	8,8	20,5	8,8	19,5
12/9/19	7,7	21,0	7,9	20,0
13/9/19	1,0000	19,7	1,0000	19,8
16/9/19	0,9950	19,1	0,9950	19,1
17/9/19	0,9925	24,0	0,9925	23,5
18/9/19	0,9910	22,0	0,9915	21,5
19/9/19	Ανάγοντα 2,47g/l	Ο.Ο. 4,6125	Ανάγοντα 2 g/l	Ο.Ο. 4,6875
23/09/19	Θείωση 100 g/tn	4	Θείωση 100 g/tn	4

Πίνακας 36.. Τα αποτελέσματα των οινολογικών μετρήσεων του παραγόμενου οίνου μετά την αποζύμωση του γλεύκους

ΚΩΔΙΚΟΣ	pH	TA (g/L)	RS (g/L)	EtOH (vol %)	VA (g/L)	Free SO₂ (mg/L)	Total SO₂ (mg/L)
ASY_SPAT A	2,82	8,0	2,47	12,1	0,39	52	125
ASY_SPAT B	2,80	8,0	2,00	12,2	0,39	51	127

3.2.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟΥ ΈΛΕΓΧΟΥ

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών του οίνου, όσο και να δίνει αντικειμενικά δεδομένα των παραμέτρων που τον χαρακτηρίζουν, δεν επαρκούν για την εκτίμηση της γευστικής του ισορροπίας. Ο οργανοληπτικός έλεγχος θεωρείται απαραίτητο συμπλήρωμα για την αξιολόγηση ενός οίνου και αποτελεί βασικό εργαλείο για τον οινοποιό. Τα βασικά στοιχεία εκτίμησης και αξιολόγησης ενός ποιοτικού οίνου είναι το χρώμα, το άρωμα και η γεύση. Αρχικά, το χρώμα εξαρτάται από την ποικιλία, τη σύσταση του σταφυλιού σε φαινολικές ενώσεις (ανθοκυάνες, τανίνες), το στάδιο ωρίμανσης, το κλίμα, την τοποθεσία του αμπελιού, τη χρονιά παραγωγής, την ηλικία του οίνου και τη διαδικασία οινοποίησης. Στο συγκεκριμένο πείραμα οινοποίησης, παρόλο που το αρχικό γλεύκος ήταν αρκετά οξειδωμένο, το τελικό προϊόν προέκυψε με αποδεκτό χρώμα. Το άρωμα οφείλεται στον συνδυασμό των πτητικών χημικών ενώσεων που υπάρχουν στους οίνους με το όρο «άρωμα» να αντιπροσωπεύει την απλή, ευχάριστη οσμή νέου οίνου και το «μπουκέτο» τα σύνθετα αρώματα παλαιώσης. Το Πρωτογενές άρωμα προέρχεται από το σταφύλι και επηρεάζεται από την ποικιλία, τις κλιματικές συνθήκες το βαθμό ωρίμανσης κ.α. **Το Δευτερογενές άρωμα αναπτύσσεται κατά την αλκοολική ζύμωση. Επηρεάζεται από το είδος των ζυμομυκήτων, τις συνθήκες διεξαγωγής της αλκοολικής ζύμωσης και χαρακτηρίζει συνήθως τους νέους οίνους και το Τριτογενές.** Άρωμα αναπτύσσεται κατά την ωρίμανση του οίνου σε δρύινα βαρέλια ή κατά την παλαιώση σε φιάλη.

Τα κύρια συστατικά που είναι υπεύθυνα για τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων είναι η Αλκοόλη (η οποία προσδίδει λιπαρότητα, στρογγυλάδα, γλυκύτητα), τα Σάκχαρα (γλυκύτητα -αναλογα με τη συγκέντρωσή τους), οι Φαινολικές ενώσεις (χρώμα, στυπτικότητα και πικράδα στα νέα κρασιά, χαρακτήρα στα παλαιωμένα), τα Οργανικά οξέα (νευρικότητα, όξινη γεύση), οι Αρωματικές ενώσεις (διαμόρφωση θετικού αρωματικού προφίλ, μπουκέτο (φρούτα, λουλουδία, μπαχαρικά, ξηροί καρποί, ξύλο κλπ), άρωμα στόματος, ελαττώματα) και το Διοξειδίο του άνθρακα (που χαρίζει φρεσκάδα και χαρακτήρα στους νέους οίνους (λευκών και ροζέ)).

Η διεξαγωγή του παρόντος οργανοληπτικού ελέγχου έλαβε χώρα σε κατάλληλο χώρο, όπως προβλέπεται (επαρκής φωτισμός απαλλαγμένος από οσμές και θερμοκρασία 20-22° C) από άτομα που έχουν ανεπτυγμένη αισθητική μνήμη κι έχουν εκπαιδευτεί συστηματικά σε διάφορους οργανοληπτικούς ελέγχους του εργαστηρίου Οινολογίας ΓΠΑ. Η διαδικασία εξέτασης ακολούθησε τα πρωτόκολλα γευσιγνωσίας.

Οι οίνοι, οι οποίοι αξιολογήθηκαν, ήταν αυτοί που προέρχονταν από ζύμωση με διαδοχικό εμβολιασμό διαφορετικής άγριας ζύμης και σακχαρομύκητα, μη παστεριωμένου γλεύκους και κανονικών συνθηκών οινοποίησης, με φιάλες ανοιχτές στο περιβάλλον. Μόνο ο οίνος που παράχθηκε με εμβόλιο εκκίνησης non-Saccharomyces *M.pulcherrima* και διαδοχικό εμβόλιο σακχαρομύκητα σε παστεριωμένο γλεύκος, αποτέλεσε εξαίρεση, διότι σε σχέση με τις άλλες δύο άγριες ζύμες *Hanseniaspora* φαίνεται να πληρεί τις απαιτήσεις της παρούσης ερευνητικής εργασίας. Επιπλέον, ως οίνος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το ασύρτικο '19 του εργαστηρίου οινολογίας. Τα δείγματα των οίνων τοποθετήθηκαν σε ποτήρι με σχήμα τουλίπας, περίπου μέχρι το 1/3.

Αρχικά, γέροντας το ποτήρι γπραγματοποιείται η οπτική εκτίμηση του οίνου, καθώς προσδιορίζονται το είδος του οίνου (λευκό, ερυθρό, ροζέ, αφρώδες), η ένταση και το χρώμα του η ύπαρξη CO₂ η περιεκτικότητα σε αλκοόλη (δάκρυα), η διαύγεια (πρωτεϊνικό θλώμα, τρυγικά άλατα κ.α.). Στο συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο ήταν γνωστή η ποικιλία και το χρώμα των οίνων και δεν υπήρχε αξιολόγηση όσον αφορά την όψη του. Μετά από περιστροφή του ποτηριού για την ανακίνηση του οίνου, προσδιορίζονται η ένταση του αρώματος, η ύπαρξη ποικιλιακών αρωμάτων, η πολυπλοκότητα του, η ισορροπία των αρωμάτων, ο τύπος του αρώματος (αρώματα φρούτων, λουλουδιών, ζωικά, ξηρών φρούτων & καρπών, μπαχαρικών, καπνιστά, βαλσάμικα, χορτώδη, διάφορων τροφών κ.α.), οι ελαττωματικές οσμές (αναγωγικά, οξειδώσεις, μούχλας κ.α.). Το παρόν ερωτηματολόγιο ήταν σχετικά απλό στη δομή του και όχι τόσο εξειδικευμένο σε πολύπλοκες παρατηρήσεις. Τέλος, λαμβάνει χώρα η γευστική εκτίμηση (γεύση, αίσθηση, ένταση δομή, σώμα, πολυπλοκότητα, διάρκεια, επίγευση). Κάτι το οποίο δεν πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο οργανοληπτικό έλεγχο, ο οποίος ήταν οσφρητικός αποκλειστικά.



Εικόνα 77. Θέση (ανεξάρτητο κελί) δοκιμαστών οργανοληπτικού ελέγχου με τα υπό εξέταση δείγματα οίνων και το αντίστοιχο ερωτηματολόγιο.

Σύμφωνα με τους μέσους όρους των απαντήσεων προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα έπειτα από συμπλήρωση 14 ερωτηματολογίων στα πλαίσια του οργανοληπτικού ελέγχου «αρώματος».

Πίνακας 37. Μέσοι όροι απαντήσεων οσφρητικής αξιολόγησης των πειραματικών οίνων.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ	ΕΝΤΑΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ	ΦΡΕΣΚΑ ΦΡΟΥΤΑ	ΞΗΡΑ ΦΡΟΥΤΑ	ΖΥΜΕΣ	ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	ΟΞΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΥΔΡΟΘΕΙΟ
P. Θρέψη	2,48	3,36	3,29	2,14	2,00	1,57	1,79	1,07
P.	2,07	2,93	3,14	1,93	1,57	1,21	1,50	1,07
UV. Θρέψη	1,29	2,86	1,93	2,00	2,21	1,71	3,14	1,21
UV.	1,29	2,71	1,86	1,86	1,79	1,71	2,64	1,43
pulch. Παστερ.	2,07	3,50	2,64	2,36	1,64	1,36	1,64	1,14
pulch. Παστερ. Επανάληψη	2,29	3,26	2,86	2,36	1,79	1,29	1,50	1,07
G. Θρέψη	1,07	3,00	1,64	1,64	1,86	1,43	3,43	1,14
G.	1,14	2,64	1,79	1,93	1,79	1,64	2,93	1,07
Assyrtiko '19	1,43	2,64	1,86	2,00	2,00	1,43	1,64	1,71

Οι οίνοι, έπειτα από την οσφρητική αξιολόγηση που έλαβε χώρα, θεωρούνται ως μέτρια ευχάριστοι με τους περισσότερους να είναι οριακά αποδεκτοί (μερικοί κρίθηκαν μη αποδεκτοί) ως προς την εκτίμηση «συνολικού αρώματος». Ικανοποιητική παρουσιάζεται, κυρίως, η «ένταση αρώματος». Όσον αφορά τη μυρωδιά των «φρέσκων φρούτων» θεωρείται παρούσα από λίγο έως πολύ. Η οσμή «ξηρών φρούτων» ανιχνεύεται από λίγο έως αρκετά στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους. Η οσφρητική παρουσία των «ζυμών» (δικαιολογείται λόγω του ότι οι οίνοι είναι νέοι – φρέσκοι) είναι μικρή. Από τις ελαττωματικές οσμές μικρότερη ένταση παρουσιάζει το κριτήριο «υδρόθειο» (καθόλου-ελάχιστα), έπειτα το «οξικό οξύ» και τέλος ο «οξικός αιθυλεστέρας» με οσμή κόλλας, ασετόν-ακετόνης (λίγο έως πολύ). Πρώτος σε βαθμολογία στο κριτήριο «οξικό οξύ» από τις ελαττωματικές οσμές βρέθηκε ο οίνος με εμβόλιο *H. uvarum* και *S. cerevisiae* (με θρέψη και χωρίς) και δεύτερος ο παραγόμενος οίνος με *H. guilliermondii*, έπειτα σε «οξικό αιθυλεστέρα» το εμβόλιο-εκκίνησης της άγριας ζύμης *H. guilliermondii* με θρέψη και δεύτερο *H. uvarum* με θρέψη και τέλος στο κριτήριο «υδρόθειο» πάλι πρώτος σε βαθμολογία βρέθηκε ο οίνος με εμβόλιο *H. uvarum* και δεύτερος αυτός με *H. uvarum* και θρέψη. **Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι ελαττωματικές οσμές των οίνων στους οποίους πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος, (off –odors) οφείλονται κατά κύριο λόγο στις ανεπαρκείς θειώσεις, την έλλειψη αζωτούχων συστατικών κατά τη ζύμωση(άζωτο) ίσως και οι αρκετά χαμηλές χαμηλές τιμές pH<3,1.**

Ethyl Acetate, acetic methyl ester, propanoic ethyl ester, Butanoic ethyl ester, isobutyl acetate, 1-butanol, 3-methyl-acetate, hexanoic ethyl ester, octanoic ethyl ester, decanoic ethyl ester, acetic 2-phenylethyl ester, 8-nonenoic ethyl ester, butanedioic acid diethyl ester, formic octyl ester, butanoic 3-methyl-ethyl ester, propanoic 2-hydroxy-ethyl ester, diethyl phthalate, phthalic acid, butyl 2-pentyl ester, succinic butyl-2-phenylethyl ester.

Τα στελέχη ζυμομυκήτων που ανήκουν στο είδος, *Hanseniaspora uvarum* και *Metschnikowia pulcherrima* μπορεί να είναι υπεύθυνα για την εστερική χρώση των οίνων, ειδικά εάν η ανάπτυξή τους δεν ελέγχεται κατά τα αρχικά στάδια αλκοολικής ζύμωσης (Loureiro και Malfeito-Ferreira, 2003) και ενώσεις όπως ο **οξικός αιθυλεστέρας**, με άρωμα

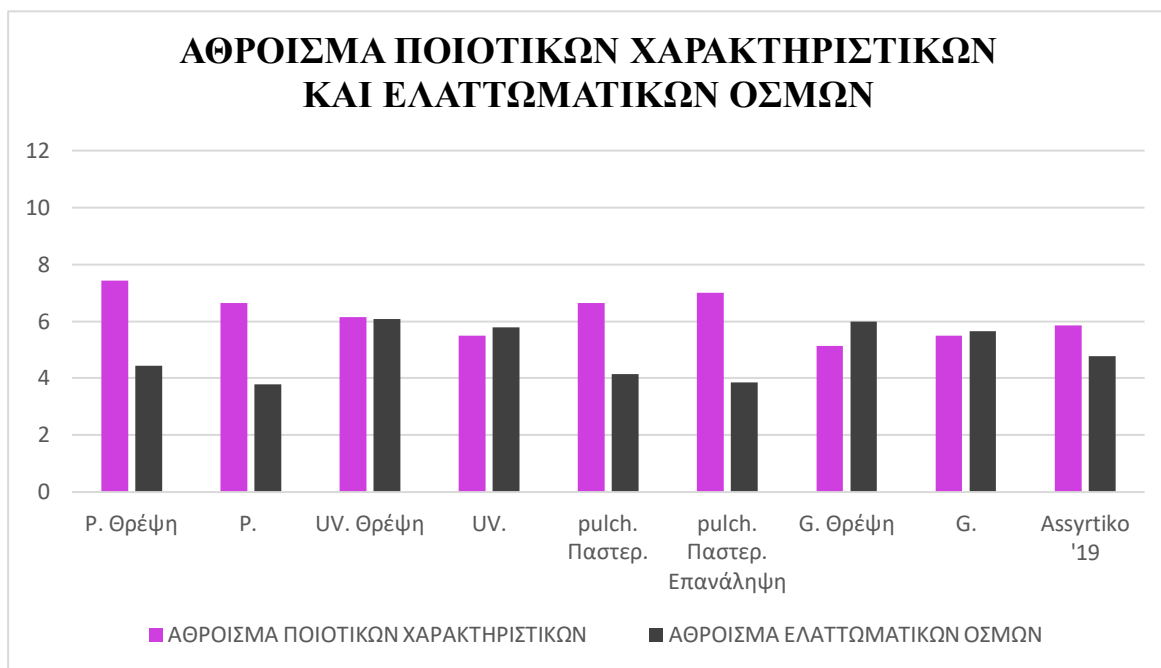
ακετόνης / κόλλας, ο οποίος σχηματίζεται στον οίνο μέσω της δράσης της ζύμης, την εστεροποίηση. Η τελική συγκέντρωση εξαρτάται από το είδος της ζύμης και τη σύνθεση του οίνου (Plata et al., 2003). **Η διαβροχή με άνθρακα, ο αερισμός και η διαύγαση του γλεύκους** και τα είδη ζύμης παίζουν σημαντικό ρόλο στις ποσότητες των παραγόμενων πτητικών ενώσεων. Μερικές ενώσεις, όταν ανιχνεύονται σε υπερβολική συγκέντρωση, έχουν αρνητική επίδραση και δύνανται να καλύψουν τον ποικιλιακό χαρακτήρα των οίνων (Ribéreau-Gayon et al., 2006, Fernanda et al., 2018).

Πίνακας 38. Αθροισμα χαρακτηριστικών οσφρητικής αξιολόγησης.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ	ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΩΝ (wines total score)			
	ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΕΝΤΑΣΗΣ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ (ΣΤΑ 8)	ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ (ΣΤΑ 12)	ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΩΝ ΟΣΜΩΝ (ΣΤΑ 12)	ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ (ΣΤΑ 20)
P. Θρέψη	5,83	7,43	4,43	13,21
P.	5,00	6,64	3,79	11,64
UV. Θρέψη	4,14	6,14	6,07	10,29
UV.	4,00	5,50	5,79	9,50
pulch. Παστ.	5,57	6,64	4,14	12,21
pulch.Π. επαν	5,57	7,00	3,86	12,57
G. Θρέψη	4,07	5,14	6,00	9,21
G.	3,79	5,50	5,64	9,29
Assyrtiko'19	4,07	5,86	4,79	9,93

Όπου P. Θρέψη: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *M. pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone και θρέψη, P: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *M. pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone χωρίς θρέψη, UV. Θρέψη: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *H. uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone και θρέψη, UV.: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *H. uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone χωρίς θρέψη, G. Θρέψη: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *H. guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone και θρέψη, G.: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *H. guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone χωρίς θρέψη, pulch. Παστερ.: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *M. pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone χωρίς θρέψη – οινοποίηση παστεριωμένου γλεύκους, pulch. Παστερ. Επανάληψη: Ασύρτικο γλεύκος συνεμβολιασμένο με *M. pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* rhone χωρίς θρέψη επαναληπτική ζύμωση – οινοποίηση παστεριωμένου γλεύκους, Assyrtiko '19: Ασύρτικο γλεύκος με εμβόλιο εμπορικού στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* με κανονική θρέψη (όπως περιγράφεται αναλυτικά στο πρωτόκολλο και στην καρτέλα οινοποίησης του).

Σύμφωνα με τα την αθροιστική βαθμολόγηση των οίνων που προέκυψαν από τις απαντήσεις των ερωτηματολογίων, τη **καλύτερη βαθμολογία (άθροισμα θετικών χαρακτηριστικών)** παρουσίασε ο παραγόμενος οίνος με εμβόλιο *M.pulcherrima* και *S.c. rhone* και **θρέψη** (=13,21/20) και ο οίνος με τις λιγότερες ελαττωματικές οσμές αθροιστικά, είναι αυτός που παράχθηκε με τα ίδια εμβόλια, αλλά χωρίς θρέψη (=3,79/12). Το ότι δεν παρουσίασε την καλύτερη συμπεριφορά και εδώ ο οίνος με τη μεγαλύτερη θετική βαθμολογία, λογικά οφείλεται στο γεγονός ότι η θρέψη έλαβε χώρα την 9^η ημέρα (δεύτερη ημέρα του δεύτερου εμβολιασμού), ενώ σε αντίστοιχες περιπτώσεις συνήθως γίνεται την 4^η ημέρα. Ακολουθεί το σχετικό γράφημα.



Γράφημα 9. Αθροισμα Ποιοτικών Χαρακτηριστικών και ελαττωματικών οσμών των οινικών δειγμάτων. Η ανώτερη βαθμολογία (άξονας y) ανέρχεται στους 12 βαθμούς.

Στην παρακάτω παρουσίαση βαθμολογίας οίνων με διαφορά θετικών και αρνητικών χαρακτηριστικών οίνων, πρώτος με πολύ μικρή διαφορά από το δεύτερο, όπως φαίνεται από τον πίνακα 39, είναι ο παραγόμενος οίνος με εμβόλιο *M.pulcherrima* και *S.c. rhone* και θρέψη και έπειτα ακολουθεί ο οίνος με τα ίδια εμβόλια, χωρίς θρέψη που παράχθηκε από παστεριωμένο γλεύκος (επαναληπτική ζύμωση). Αυτός ο ο οίνος παρουσιάζει αρκετά παρόμοια αποτελέσματα όπως είναι λογικό με την επανάληψή του, δείγμα το οποίο έρχεται τρίτο σε συνολική αθροιστική βαθμολογία. θετική-αρνητική).

Πίνακας 39. Διαφορά θετικών και αρνητικών χαρακτηριστικών οίνων

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΟΙΝΩΝ
P. Θρέψη	8,83
P.	7,86
UV. Θρέψη	4,21
UV.	3,71
pulch. Παστερ.	8,07
pulch. Παστερ. Επανάληψη	8,71
G. Θρέψη	3,21
G.	3,64
Assyrtiko '19	5,14

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ – ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Από τους τέσσερις μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν κατά την παρούσα διπλωματική διατριβή, όλοι έχουν απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα ως προς τη δυνατότητα χρήσης τους στην οινολογία, πέραν του σακχαρομύκητα, ο οποίος θεωρείται η κατ'εξοχήν ζύμη του οίνου. Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί εντατικά και η άγρια ζύμη *M.pulcherrima*, η οποία σε αυτό το πεδίο μελέτης θεωρείται ιδιαίτερα δημοφιλής. Στο συγκεκριμένο πείραμα, οι non-*Saccharomyces* ανήκουν όλοι στις «άγριες ζύμες», που απομονώνονται από τους φλοιούς των σταφυλιών (στο μεγαλύτερο ποσοστό αυτών) και ευθύνονται για περιπτώσεις αυθόρμητων ζυμώσεων. Επιπλέον, όλοι αποδείχθηκαν (και βιβλιογραφικά) θετικοί στο φαινόμενο Crabtree, εκτός από τον ζυμομύκητα *H.uvarum*. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν σε κωνικές φιάλες υπό τις ίδιες σταθερές συνθήκες ανάδευσης με ρυθμό 180±5 rpm, σε θερμοκρασία 30±1°C. Όσον αφορά στην κατανάλωση των σακχάρων, το κάθε στέλεχος είχε την δική του συμπεριφορά και κατανάλωναν με διαφορετική ταχύτητα μέρος των διαθέσιμων σακχάρων του εκάστοτε θρεπτικού υποστρώματος προς παραγωγή αιθανόλης, καθώς οι ποσότητες αυτές υπερέβαιναν την κρίσιμη συγκέντρωση σακχάρου, πάνω από την οποία εμφανίζεται το φαινόμενο Crabtree.

Πίνακας 40. Συγκριτικά αποτελέσματα κατανάλωσης σακχάρου – παραγωγής αιθανόλης και γλυκερόλης σε συνθετικό μέσο.

Θρεπτικό μέσο	Εμβολιασμός Εκκίνησης άγριων ζυμών	Max EtOH (g L-1)	Τελική αιθανόλη (g L-1)	Υπολ. sugars (g L-1)	Αλκοολικός βαθμός (% vol)	Max Gly (g L-1)	Τελική Gly (g L-1)
Συνθετικό υπόστρωμα Γλυκόζης 70 g L ⁻¹	<i>M. pulcherrima</i> (80 g L-1)	24,24	24,04	9,01	2,42	0,37	0
	<i>H. uvarum</i>	17,78	12,88	8,31	1,29	3,43	2,32
	<i>H. guilliermondii</i>	15,19	12,79	8,14	1,28	1,62	0

Σε μειούμενη σειρά, μεγαλύτερη ποσότητα σακχάρου, κατανάλωσε ζύμη *M.pulcherrima* (80 g γλυκόζη/l), *H.uvarum* και *H.guilliermondii*. Είναι φανερό πως ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* rhone με παραγωγή αιθανόλης 21,2 g/l (60 g γλυκόζη/l) αποδείχθηκε άξια επιλογή σακχαρομύκητα για την παραγωγή οίνου για ποικίλους λόγους. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρεται και από τους συγγραφείς Comragno et al, 2014, είναι άξιος για την ταχύτητα με την οποία καταναλώνει τα σάκχαρα (υπολείπ. 0,5 g/l), την υψηλή του απόδοση, αλλά και τη αντοχή του σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις αυτών. Ο αλκοολικός βαθμός των τελικών προϊόντων είναι: 2,42 g/l για *M.pulcherrima*, *H.guilliermondii* *H.uvarum* εμφάνισαν παρόμοια τιμή 1,28-1,29 g/l. Οι non-*Saccharomyces* δεν ζυμώνουν με την ίδια ταχύτητα και ούτε έχουν την ίδια ζυμωτική ισχύ, παρόλο που δεν είναι απόλυτα συγκρίσιμα τα αποτελέσματα διότι το υπόστρωμα των *Hanseniaspora* ήταν 70g γλυκόζη/l.

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αφομοίωση/ανακατανάλωση της αιθανόλης και της γλυκερόλης, προκειμένου να διατηρήσουν ή και να αυξήσουν τον πληθυσμό τους χρησιμοποιώντας τες ως εναλλακτική πηγή άνθρακα. Σε ορισμένους από τους μικροοργανισμούς (π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*) η ανάλωση της αιθανόλης οδήγησε σε αξιοσημείωτη διφασική αύξηση της βιομάζας (Sarris et al., 2013, Hagman et al., 2013). Σε άλλες περιπτώσεις (π.χ. *Metschnikowia pulcherrima*) η αφομοίωση της αιθανόλης οδήγησε σε μικρή ή ελάχιστη αύξηση της βιομάζας (Hagman et al., 2013). Μεγαλύτερη τιμή γλυκερόλης από τις άγριες ζύμες παρουσίασε η *H.uvarum*, 3,43 g/l, έπειτα η *H.guilliermondii* και τέλος η ζύμη *M.pulcherrima*.

Κατά τη διάρκεια όλων των των αλκοολικών ζυμώσεων, παρατηρήθηκε ότι στις πειραματικές αερόβιες (έως ημιαερόβιες) συνθήκες το διαλυτό οξυγόνο εμφάνιζε σταδιακή πτώση, καθώς ο μικροοργανισμός παρήγαγε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα και στην συνέχεια εμφανιζόταν σταδιακή άνοδος κατά την κατανάλωση της παραχθείσας αιθανόλης. Το διαλυτό οξυγόνο (DOT) που μελετήθηκε στο πρώτο μέρος των πειραμάτων κατά τις αλκοολικές ζυμώσεις σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης και ήταν πάντα ≥ 30% v/v έως πολύ υψηλό 90%. Επομένως, αποδείχθηκε ικανοποιητικό για ζυμώσεις υπό αερόβιες συνθήκες (Metsoviti et al. 2011, Hagman et al. 2013).

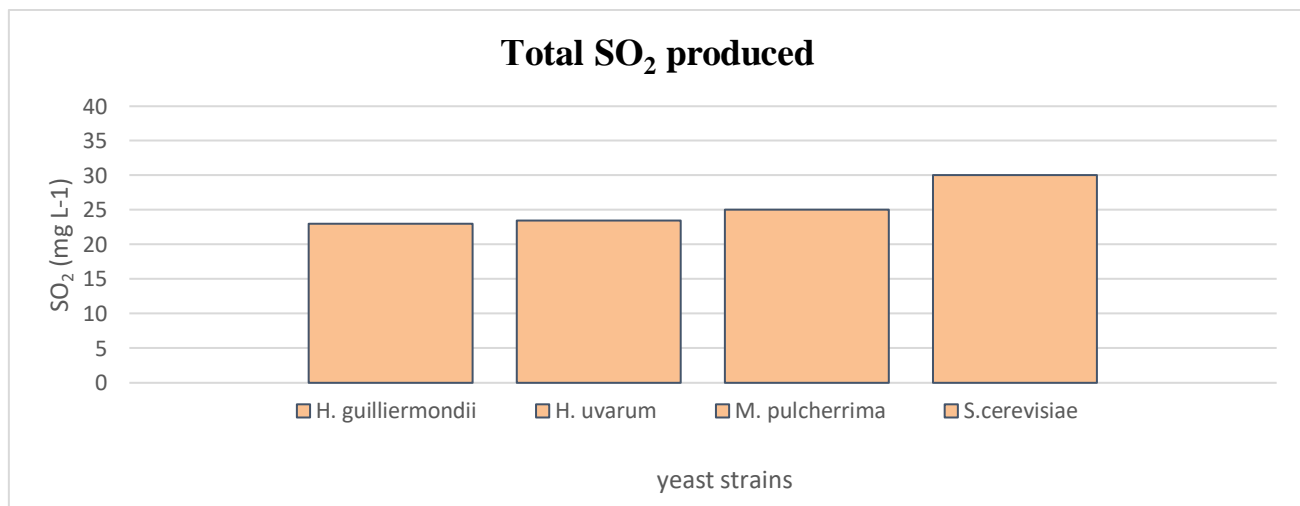
Επιπρόσθετα, βάσει της ιδιότητας τους να συνθέτουν μεγάλες ποσότητες λιπαρών οξέων, οι μικροοργανισμοί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τους ελαιογόνους και τους μη. Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι εκείνοι που σε συνθήκες έλλειψης εξωκυτταρικού αζώτου, δίνουν ποσοστό λίπους επί ξηράς βιομάζας > 20%. Επομένως και οι τέσσερις ζύμες χαρακτηρίζονται ως μη ελαιογόνες με φθίνουσα σειρά συντελεστή Y_{LDW} : *H.uvarum* (max 5,4), *M.pulcherrima* (max 4,7), *S.cerevisiae* (3,5) και *H.guilliermondii* (max 1,5).

Όσον αφορά τους ενδοπολυσακχαρίτες, ο συντελεστής $Y_{IPS/DW}$ διαμρφώνεται ως εξής με πρώτο το σακχαρομύκητα (56,1), έπειτα τη ζύμη *M.pulcherrima* με μέγιστο 19,1, ενώ τα στελέχη του γένους *Hanseniaspora* παρουσίασαν παρόμοιες τιμές με μέγιστο περίπου 6.

Τέλος, οξικό οξύ εμφανίστηκε μόνο στη ζύμωση του *H.uvarum*.

4.1.1 ΟΛΙΚΟ ΠΑΡΑΧΘΕΝ SO_2 ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι ζύμες παράγουν μικρές ποσότητες SO_2 (Ribereau-Gayon et al., 2006). Ανάλογα με την ανθεκτικότητα των ζυμών στο θειώδη ανυδρίτη, διακρίνονται τρεις ομάδες, χαμηλής, μεσαίας και υψηλής ανθεκτικότητας. Χαμηλής θεωρούνται οι ζύμες που αντέχουν μέχρι 100 mg/l, όπως οι *Hanseniaspora* και *Saccharomyces*, αλλά γενικά όλες οι non-*Saccharomyces* θεωρούνται ευαίσθητες, γι αυτό και αποφεύχθηκε η θείωση του γλεύκους. Όλες οι άγριες ζύμες του πειράματος χαρακτηρίζονται από σχετικά μικρή ικανότητα παραγωγής διοξειδίου του θείου, μέχρι σχεδόν 25mg/l, με μέγιστη την απόδοση του σακχαρομύκητα \approx 30 mg/l, συμβάλλοντας σε πολύ μικρό βαθμό στην προστασία του γλεύκους ενάντια στην οξειδωση. Η πλειοψηφία των σημερινών εμπορικών στελεχών ζύμης θεωρείται ότι είναι χαμηλοί παραγωγοί SO_2 , παρουσιάζοντας παραγωγή έως 20 mg/l. Μόνο λίγα στελέχη ζύμης φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη παραγωγή (έως 80 mg/l SO_2) (Werner et al.2008). Σε δημοσιευμένο άρθρο, των Varakumar et al. (2011), ο ολικός θειώδης ανυδρίτης για στέλεχος *S.cerevisiae* παρουσίασε τιμή ίση με 33 g/l, που συμφωνεί με του παρόντος πειράματος.



Γράφημα 10. Η μέγιστη ποσότητα παραγόμενου ολικού SO_2 (mg L⁻¹) κατά τη ζύμωση σε θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης από τα στελέχη του πειράματος.

Κατά αύξουσα σειρά παραγωγής θειώδους ανυδρίτη, οι ζύμες κατατάσσονται ως εξής: *H.guilliermondii*, *H.uvarum*, *M.pulcherrima* και *S.cerevisiae*.

4.2 ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΟΙΝΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ ΥΠΟ ΑΣΗΠΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΕ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ ΚΑΙ ΜΗ

a) Non-*Saccharomyces* ως εμβόλιο εκκίνησης ζύμωσης

b) ΜΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΟ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ non-*Saccharomyces* / *S.cerevisiae*

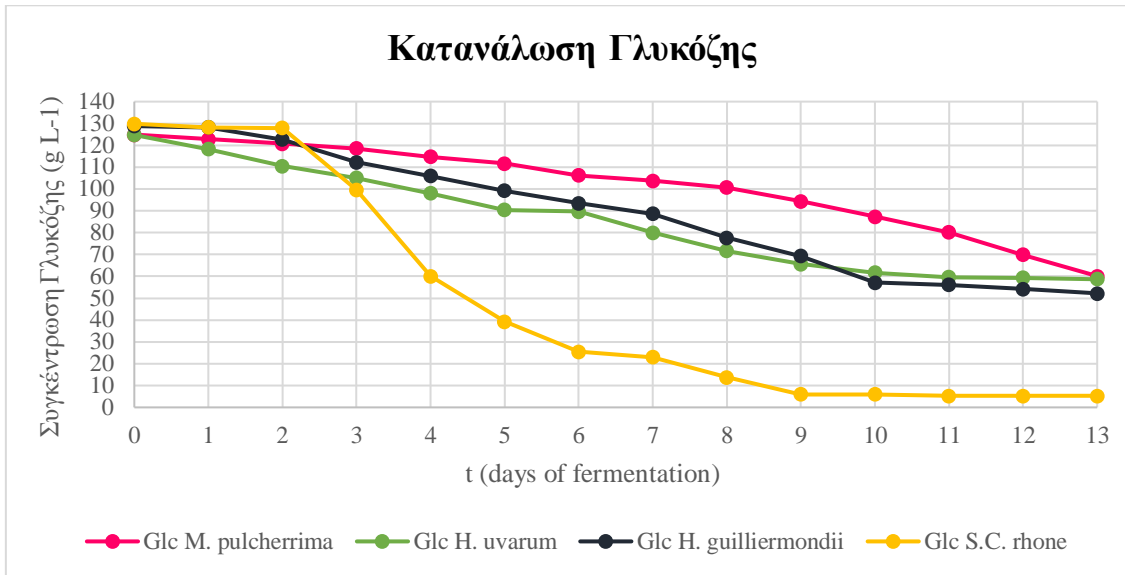
4.2.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΖΥΜΩΝ, ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Οι συγκρίσεις μεταξύ των μικροοργανισμών έγκεινται στις διαφορές που ανιχνεύονται στην κατανάλωση σακχάρων και την παραγωγή αιθανόλης.

1. Στο παστεριωμένο γλεύκος με εμβόλιο εκκίνησης
2. Στο μη παστεριωμένο γλεύκος με εμβόλιο εκκίνησης
3. Στο διαδοχικό εμβολιασμό (εμβόλιο εκκίνησης άγριων ζυμών με σακχαρομύκητα)

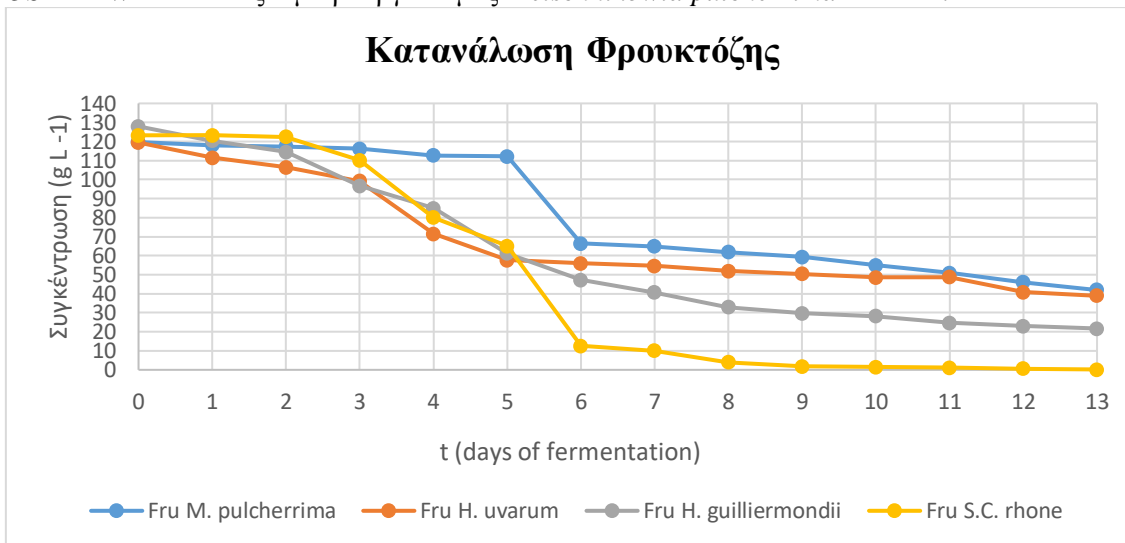
1. Α' ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: Παστεριωμένου γλεύκους

Α. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ



Διάγραμμα 45. Κατανάλωση Γλυκόζης (αλκοολική ζύμωση σε παστεριωμένο γλεύκος) από τα τέσσερα στελέχη. του πειράματος

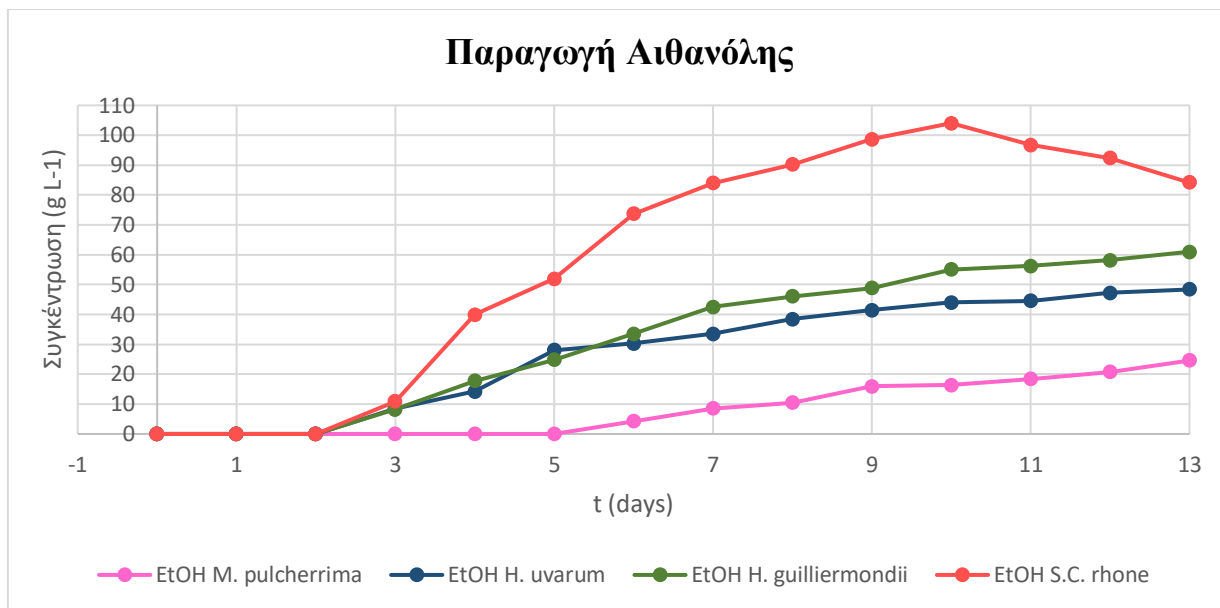
Τη μεγαλύτερη και ταχύτερη κατανάλωση γλυκόζης παρουσίασε, όπως ήταν αναμενόμενο, ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae rhone*, έπειτα τα στελέχη του γένους *Hanseniaspora guilliermondii* *OSP1BFW12* & *uvarum* *OST1BFW1* και τέλος ο μικροοργανισμός *Metschnikowia pulcherrima* *LFMB 1*.



Διάγραμμα 46. Κατανάλωση Φρουκτόζης (αλκοολική ζύμωση σε παστεριωμένο γλεύκος) από τα τέσσερα στελέχη.

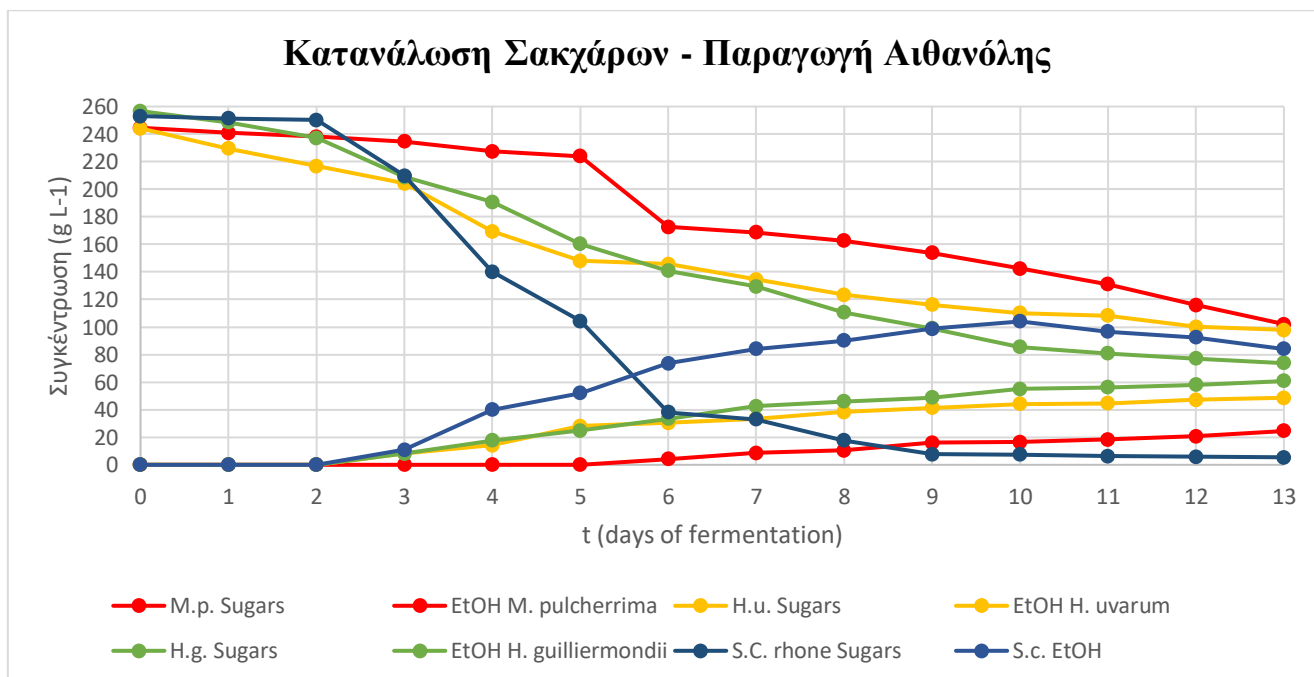
Συνακολούθως, τη μεγαλύτερη κατανάλωση φρουκτόζης παρουσίασε ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae rhone*, έπειτα τα στελέχη του γένους *Hanseniaspora* (περισσότερο φρουκτόφιλα), με μεγαλύτερη εκ των δύο ο μικροοργανισμός *guilliermondii* και τέλος το στέλεχος *Metschnikowia pulcherrima*.

Φαίνεται ότι οι άγριες ζύμες στο χρονικό διάστημα των 14 ημερών είτε εξαφανίστηκαν λόγω της μη αντοχής τους σε υψηλά επίπεδα αιθανόλης, είτε απλά δεν πρόλαβαν να καταναλώσουν όλη την ποσότητα των σακχάρων. Συνδυασμός των δύο με συνακόλουθη εξασθένιση της ζυμωτικής τους δράσης είναι το πιο πιθανό σενάριο.



Διάγραμμα 47. Παραγωγή Αιθανόλης (αλκοολική ζύμωση σε παστεριωμένο γλεύκος) από τα τέσσερα στελέχη.

Όπως ήταν αναμενόμενο, κατά την αλοολική ζύμωση, τη μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης παρουσίασε ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae rhone*, έπειτα τα στελέχη του γένους *Hanseniaspora*, με μεγαλύτερη εκ των δύο ο μικροοργανισμός *guilliermondii* και τέλος το στέλεχος *Metschnikowia pulcherrima*.



Διάγραμμα 48. Συγκεντρωτικά Συγκριτικά αποτελέσματα Κατανάλωσης Σακχάρων και Παραγωγής Αιθανόλης (αλκοολική ζύμωση σε παστεριωμένο γλεύκος) από τα τέσσερα διαφορετικά στελέχη.

Ο μικροοργανισμός *H. guilliermondii*, από ότι διαφαίνεται από τα διαγράμματα κατανάλωσης σακχάρων, είναι περισσότερο φρουκτόφιλος από όλους, έπειτα ακολουθεί ο *M. pulcherrima*, ο *H. uvarum* και τέλος ο *S.c. rhone*. Παρά τις αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές που θέλουν τις ζύμες να είναι επιλεκτικές ως προς τη γλυκόζη, παρατηρήθηκε ταυτόχρονη αφομοίωση των δύο σακχάρων από το στέλεχος *S.c. rhone*. Εντούτοις, σημειώθηκε πλήρης εξάλειψη της φρουκτόζης, ενώ ο μικροοργανισμός κατανάλωσε τη γλυκόζη μέχρις ενός σημείου, πέραν του οποίου ξεκίνησε έντονη ανακατανάλωση της αιθανόλης (λογικά λόγω πείνας θρεπτικών στο υπόστρωμα – και προς εύρεση πηγών άνθρακα την διέσπασε), γεγονός που συμπίπτει με παρατηρήσεις των ερευνητών Hagman et al. (2013).

B. ΠΙΝΑΚΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ – ΣΑΚΧΑΡΩΝ

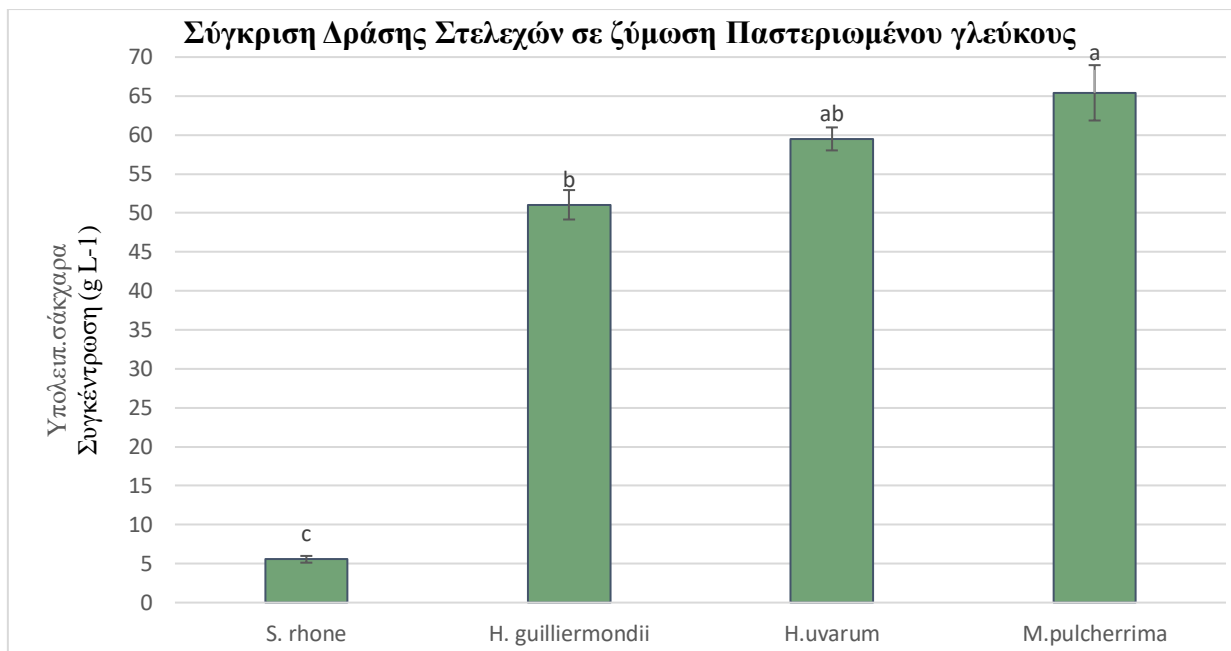
Σε αντιπαραβολή όλες οι ζυμώσεις μονοκαλλιέργειας σε παστεριωμένο γλεύκος, μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης με ταυτόχρονη κατανάλωση σακχάρων, παρουσιάζει πρώτος κατά σειρά ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae rhone*, όπως ήταν αναμενόμενο από τη βιβλιογραφία, έπειτα ακολουθούν οι non-Saccharomyces με τα στελέχη του γένους *Hanseniaspora*, με μεγαλύτερη εκ των δύο ο *guilliermondii* και τέλος το στέλεχος *Metschnikowia pulcherrima* (όπως φαίνεται και από τον ακόλουθο πίνακα 41).

Πίνακας 41. Μέγιστες τιμές παραγόμενης αιθανόλης και ελάχιστες τιμές υπολλειπόμενων σακχάρων, ολική κατανάλωση σακχάρων για τους παραγόμενους οίνους με διαφορετικό εμβόλιο non-Saccharomyces ως εκκινήτη σε παστεριωμένο γλεύκος ασύρτικο.

Θρεπτικό μέσο	Εμβόλιο	Max EtOH (g L ⁻¹)	Τελική παραγόμενη αιθανόλη (g L ⁻¹)	Κατανάλωση σακχάρων (g L ⁻¹)	Αλκοολικός βαθμός (οίνου) (% vol)
Παστεριωμένο γλεύκος ασύρτικο ≈ 245 - 250 g L ⁻¹	<i>M. pulcherrima</i>	22,03 27,24	24,64	150,1 158,98	2,46
	<i>H. uvarum</i>	47,91 48,58	48,46	152,01 138,32	4,85
	<i>H. guilliermondii</i>	63,21 64,00	63,61	174,53 199,77	6,36
	<i>S. cerevisiae</i>	104,04	80,20	248,24	8,02 -10,4*

*Θα γίνει αποδεκτή η υπόθεση, ότι κατά την 10^η ημέρα όπου εμφάνισε μέγιστη τιμή αιθανόλης ο οίνος με τη μονοκαλλιέργεια σακχαρομύκητα, έχει αποζυμώσει, διότι μετά άρχισε έντονη ανακατανάλωση αιθανόλης κυρίως και γλυκερόλης λόγω πενίας άνθρακα στο γλεύκος και θα χρησιμοποιηθεί με παραδοχή αυτή η τιμή προς σύγκριση με τις μικτές καλλιέργειες του Γ' και Δ' κύκλου.

Τα στοιχεία του ανωτέρω πίνακα αποδεικνύουν, πως οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν τη δυνατότητα να εκτελέσουν αλκοολική ζύμωση με σχετικά καλές αποδόσεις για την πλειονότητα αυτών, διαθέτοντας διαφορετική ζυμωτική ισχύ και ταχύτητα. Πέραν του σακχαρομύκητα δεν αποζύμωσε κανένα γλεύκος. Η μέγιστη απόδοση επετεύχθη από το μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*, όπως ήταν αναμενόμενο. Με τον τον *H. guilliermondii* με 6,36 % vol να ακολουθεί, και τον *H. uvarum* με 4,85 % vol. Ο μικροοργανισμός *Metschnikowia pulcherrima* είναι εκείνος, ο οποίος παρουσίασε τη χαμηλότερη απόδοση, παρόλο που στην αλκοολική ζύμωση σε συνθετικό μέσο είχε την υψηλότερη συγκριτικά με τα άλλα δύο στελέχη non-Saccharomyces. Λογικά, αυτό το γεγονός έγκειται στη μικρή αντοχή του σε περιβάλλον αιθανόλης. Η μεγαλύτερη τιμή αιθανόλης που αναφέρθηκε ότι παρήγαγε είναι 2,7 % vol, μεγαλύτερη συγκέντρωση θεωρείται τοξική για αυτή τη ζύμη στο παρόν πείραμα. Το ίδιο μπορεί να ισχύει και για τον *H. uvarum* όμως, διότι στο συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης έδειξε μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης από τον *H. guilliermondii*. Ο μικροοργανισμός αυτός, όπως και οι *Hanseniaspora* ανήκουν στις ιθαγενείς «άγριες ζύμες», δηλαδή εκείνες που ευθύνονται για την αυθόρμητη έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης στα γλεύκη με χαμηλή αντοχή στην αιθανόλη (Fernández et al., 2000).



Γράφημα 11. Σύγκρισης δράσης των στελεχών σε ζύμωση παστεριωμένου γλεύκους – Στατιστική Ανάλυση.

Γ. ΟΞΕΑ – ΟΞΥΤΗΤΑ

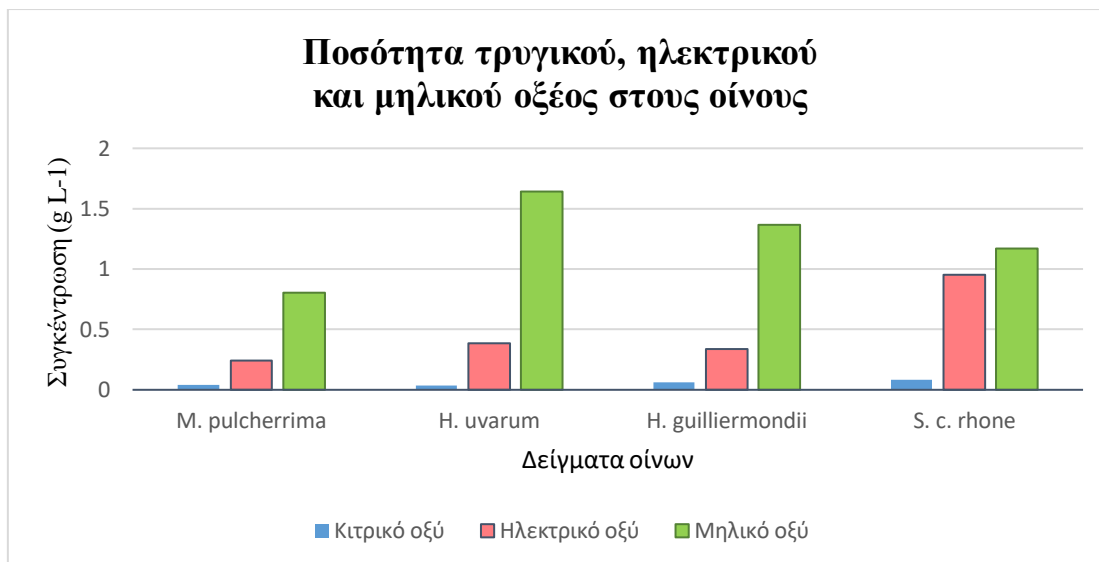
Τιμή ολικής οξύτητας γλεύκους: 4,35, με τιμή μετά τη διόρθωση ≈ 5 , PH: 3,45.

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα δείγματα οίνου με των non-Saccharomyces, μετά από 14 ημέρες ζύμωσης παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης και φρουκτόζης (υπολειπόμενων σακχάρων), με στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα (*S.c.rhone*). Αυτό πιθανότατα να οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στην μεγαλύτερη ευαισθησία των non-Saccharomyces στην αιθανόλη.

Κατά τις πρώτες μέρες ζύμωσης (μέχρι 6η ημέρα), όπου η κατανάλωση σακχάρων ήταν παρόμοια για όλα τα στελέχη, η παραγωγή γλυκερόλης δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Ωστόσο η αδυναμία ολοκλήρωσης των ζυμώσεων από τους non-Saccharomyces οδήγησε τελικά σε στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις γλυκερόλης στο τελικό προϊόν. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσίασε το στέλεχος *H.uvarum* με 3,43 g/l στις 48h, τιμή που ήταν παρόμοια ήδη από τις 16 πρώτες ώρες της ζύμωσης. Η ζύμη *M.pulcherrima* δεν εμφάνισε τιμή ανιχνεύσιμη, ενώ ο ζυμομύκητας *H.guilliermondii* μετά από σχεδόν 5 ημέρες ζύμωσης έδωσε τιμή ίση με 1,62 g/l.

Μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης παρουσίασε το στέλεχος *Saccharomyces*, όπως ήταν αναμενόμενο. Επιπλέον, μεγάλη αντοχή στη αιθανόλη παρουσίασε και το στέλεχος *H. guilliermondii*, ακολουθούμενο από το *H. Uvarum*, με μικρότερη αντοχή να έχει το στέλεχος *M. pulcherrima*.

Το ηλεκτρικό οξύ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδίδει μια αλμυρή και πικρή γεύση, επιπλέον παράλληλα εντείνει την αίσθηση ξηρότητας. Στην προκειμένη περίπτωση, οι non-Saccharomyces που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται να πλεονεκτούν έναντι του στελέχους που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, *S.c. rhone*.

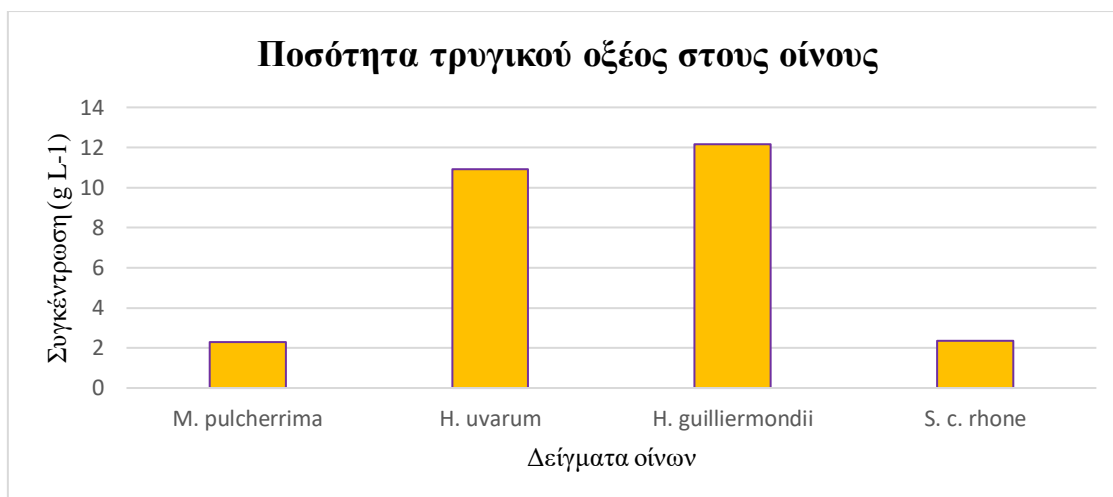


Γράφημα 12. Συγκέντρωση των κυριότερων οξέων των παραγόμενων πειραματικών οίνων που πρέκυψαν από την αλκοολική ζύμωση του παστεριωμένου γλεύκους με διαφορετικά εμβόλια-εκκινήτων.

Τα κυριότερα οξέα του σταφυλιού είναι: τρυγικό, μηλικό, κιτρικό οξύ, καθώς και το οξαλικό, ασκορβικό, γαλακτουρονικό και το γλυκουρονικό οξύ. Τα κυριότερα οξέα που παράγονται κατά τη ζύμωση είναι: ηλεκτρικό, γαλακτικό, κιτρομηλικό, διμεθυλο-2,3-γλυκερινικό οξύ, καθώς και μυρμηκικό, οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ, στα οποία οφείλεται η πτητική οξύτητα. Το τρυγικό οξύ υπάρχει στους οίνους σε συγκεντρώσεις 1,5-4,5 g/l, το πιο ισχυρό οξύ του οίνου και κυρίως υπεύθυνο για τη διαμόρφωση του PH του οίνου. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μειώνεται εξαιτίας της μερικής αδιαλυτοποίησης των τρυγικών αλάτων, λόγω σχηματισμού αιθανόλης. Το μηλικό οξύ, υπάρχει σε συγκεντρώσεις 0-4 g/l και αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του Krebs. Κατά τη ζύμωση σχηματίζεται μικρή ποσότητα από το σάκχαρο. Το κιτρικό οξύ υπάρχει σε συγκεντρώσεις 0-0,5 g/l και η περιεκτικότητά του κατά τη ζύμωση είναι σταθερή. Τέλος, το ηλεκτρικό οξύ υπάρχει σε συγκεντρώσεις 500-1500 mg/l και σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση με την αναγωγή του μηλικού οξέος. Είναι βιολογικά σταθερό και δίνει εστέρες με την αιθανόλη που έχουν άρωμα λουλουδιών (Τσακίρης 2017). Στον παρόν πείραμα οινοποίησης, μελετήθηκαν αναλυτικά τα οργανικά οξέα που εντοπίστηκαν στους οίνους μόνο με εμβόλιο εκκίνησης (μονοκαλλιέργεια), όπου παρατηρείται διαφορά του οίνου με ζύμη *M.pulcherrima* σε σχέση με τους οίνους με εμβόλιο εκκίνησης *Hanseniaspora* και ακόμη περισσότερο με τον σακχαρομύκητα (7/8 μείωση). Το γαλακτικό και το κιτρικό οξύ δεν φαίνεται να επηρεάζονται από το *M. pulcherrima* (Benito et al.2015, Chen et al.2018, Ruiz et al.2018, Dutraire et al. 2019), κάτι το οποίο φαίνεται να επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα, καθώς παρουσιάζει μια ανεπαίσθητη μείωση σε σχέση με τον οίνο αναφοράς. Το ηλεκτρικό οξύ σε σχέση με τον οίνο αναφοράς φαίνεται να μειώνεται στο 1/3. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει αυξήσεις στο φουμαρικό οξύ για διαδοχικές ζυμώσεις μεταξύ *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae*, από 30% σε 69% (έως 2,9 g/l) ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο στέλεχος *M. pulcherrima* (Hranilovic et al. 2020). Όσον αφορά στο τρυγικό οξύ, ο οίνος που παράχθηκε με εμβόλιο *M.pulcherrima*, εμφάνισε παρόμοια συγκέντρωση με τον οίνο αναφοράς (αποδεκτές τιμές), ενώ οι οίνοι με εμβόλιο *H.uvarum* και *H.guilliermondii* παρουσίασαν δεκαπλάσια ποσότητα, μη αποδεκτή σύμφωνα και με τους πίνακες 1-3.

Πίνακας 42. Οξέα των παραγόμενων οίνων.

Οξέα / Στέλεχος	<i>M. pulcherrima</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>H. guilliermondii</i>	<i>S. c. rhone</i>
Κιτρικό οξύ (g/l)	0,042	0,038	0,064	0,081
Ηλεκτρικό οξύ (g/l)	0,24	0,385	0,34	0,955
Μηλικό οξύ (g/l)	0,805	1,642	1,365	1,171
Τρυγικό οξύ (g/l)	2,304	10,900	12,166	2,340



Γράφημα 13. Ποσότητα τρυγικού οξέος στους παραγόμενους οίνους από διαφορετικά εμβόλια-εκκίνησης ζύμωσης παστεριωμένου γλεύκους υπό ασηπτικές συνθήκες.

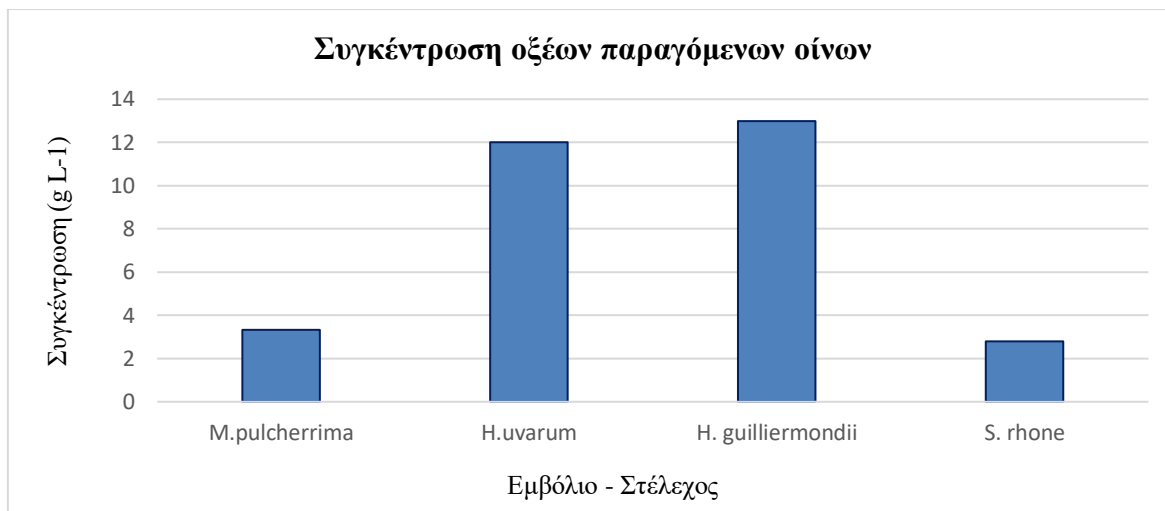
Μεγαλύτερη συγκέντρωση οξέων (≈ 12), όπως ήταν αναμενόμενο από τη βιβλιογραφία, παρουσιάζουν τα στελέχη *Hanseniaspora*, με το τρυγικό οξύ να βρίσκεται σε υπερβολικά υψηλή συγκέντρωση, αυξάνοντας πάνω από το αποδεκτό όριο τη συγκέντρωση σε οξέα. Αντιθέτως, ο σακχαρομύκητας και η άγρια ζύμη *M.pulcherrima* παρουσιάζουν χαμηλή συγκέντρωση σε οξέα (≈ 3), χαμηλότερη από την κανονική των οίνων.

Η πτητική οξύτητα εκφράζει τα πτητικά οξέα του οίνου με κυρίαρχο το οξικό οξύ και παράγεται και από τις ζύμες σε συγκεντρώσεις, συνήθως $<0,3$ g/l εκφρασμένη σε οξικό οξύ. Η ποσότητα της πτητικής είναι **εξαρτώμενη από παράγοντες όπως το στέλεχος της ζύμης, περιεκτικότητα σε αλκοόλη κλπ.** Κατα τις οινολογικές αναλύσεις, καθώς και με HPLC μετρήθηκε η πτητική οξύτητα των οίνων παραγόμενων από παστεριωμένο γλεύκος (οι τιμές επαληθεύονται με τις δύο μεθόδους), η οποία βρέθηκε αυξημένη, ιδιαίτερα για τις οξύκορφες ζύμες *Hanseniaspora*, όπως ήταν αναμενόμενο. Οι οξύκορφες ζύμες παράγουν αυξημένη ποσότητα οξικού οξέος, σε μικρότερη ποσότητα παράγει η *M.pulcherrima* που ανά περίπτωση δύναται να παράγει αρκετό και ακολούθως ο σακχαρομύκητας.

Πίνακας 43. Πτητική οξύτητα και pH των οίνων, κατά τον Α΄ κύκλο πειραμάτων οινοποίησης.

Οξύτητα / Στέλεχος - εμβόλιο	<i>M. pulcherrima</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>H. guilliermondii</i>	<i>S. c. rhone</i>
Οξικό οξύ (g L-1) – Πτητική οξύτητα 5 ^η & 9 ^η ημέρα ζύμωσης και των τελικών οίνων	0,135-0,21	0,468-0,588	0,39-0,51	0,216-0,231
	0,12	0,597-0,717	0,612-0,654	0,234
	0,28-0,3	0,55	0,44-0,46	0,35-0,37
pH 1 ^η ημέρα ζύμωσης & 14 ^η τελικών οίνων	3,21-3,27	3,34-3,38	3,29-3,32	3,32
	3,11-3,13	3,32-3,34	3,29	3,16-3,23

Η ζύμη *H.uvarum* βρέθηκε να έχει αυξημένη πτητική οξύτητα με συνεχώς ανοδική πορεία μέχρι το τέλος της ζύμωσης, το ίδιο ισχύει και για την *H.guilliermondii* που κυμαίνεται σε παρόμοιες υψηλές συγκεντρώσεις. Το οξικό οξύ είναι επιζήμιο για τον οίνο όταν υπάρχει σε συγκεντρώσεις υψηλότερο από 0,7 g /L, τιμές οριακά αποδεκτές για *H.uvarum* και *H.guilliermondii* από τις μετρήσεις της πτητικής οξύτητας που αναφέρονται στον ανωτέρω πίνακα 43. Η πτητική οξύτητα που παράγεται από τη ζύμη *Metschnikowia* κατά τη ζύμωση γλεύκους, εμφανίζει ακόμη μικρότερες τιμές από τον σακχαρομύκητα (φυσιολογικές). **Στις συγκεκριμένες μικροοινοποιήσεις που έλαβαν χώρα στην παρούσα ερευνητική εργασία, το pH είχε τιμές ≈ 3 με μικρές αποκλίσεις. Η χρήση της ζύμης *Metschnikowia* στη ζύμωση γλεύκους φαίνεται να σχετίζεται με μικρές απώλειες στη ολική οξύτητα του τελικού οινικού προϊόντος που επηρεάζει το pH, μπορεί να περιλαμβάνει μικροβιακή, πρωτεΐνη ή αστάθεια χρώματος.**



Γράφημα 14. Συγκέντρωση κυριότερων οξέων στους παραγόμενους οίνους από διαφορετικά εμβόλια με ζύμωση παστεριωμένου γλεύκους υπό ασηπτικές συνθήκες.

Δ. ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ

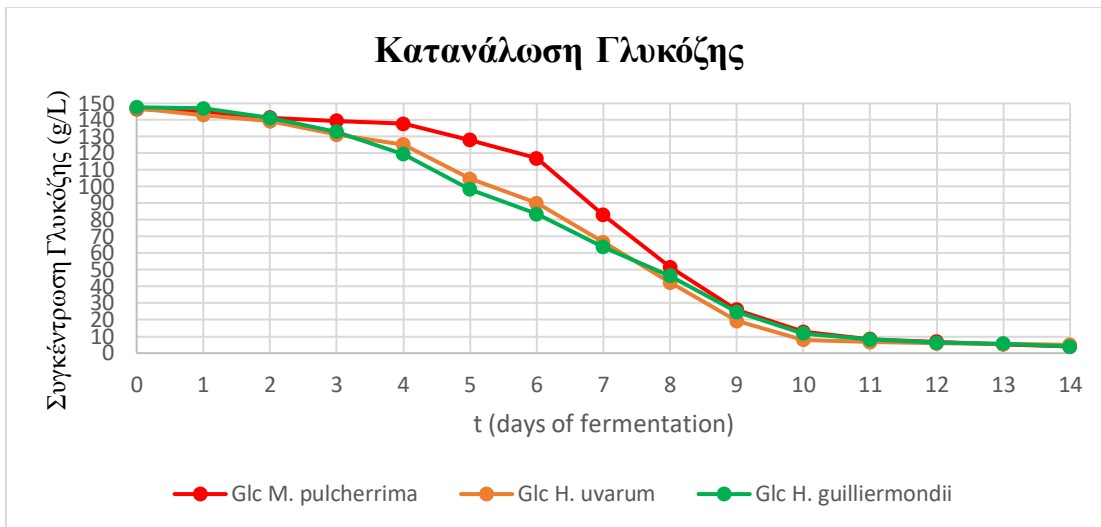
Πίνακας 44. Γλυκερόλη τελικών οίνων από παστεριωμένο γλεύκος.

Στέλεχος- Εμβόλιο εκκίνησης	Γλυκερόλη (g l-1)
M.p1	1,98
M.p2	2,01
H.uv1	3,26
H.uv2	2,92
H.g1	2,95
H.g2	3,04
S.c.1	5,83
S.c.2 ΟΙΝΟΣ-ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	5,66

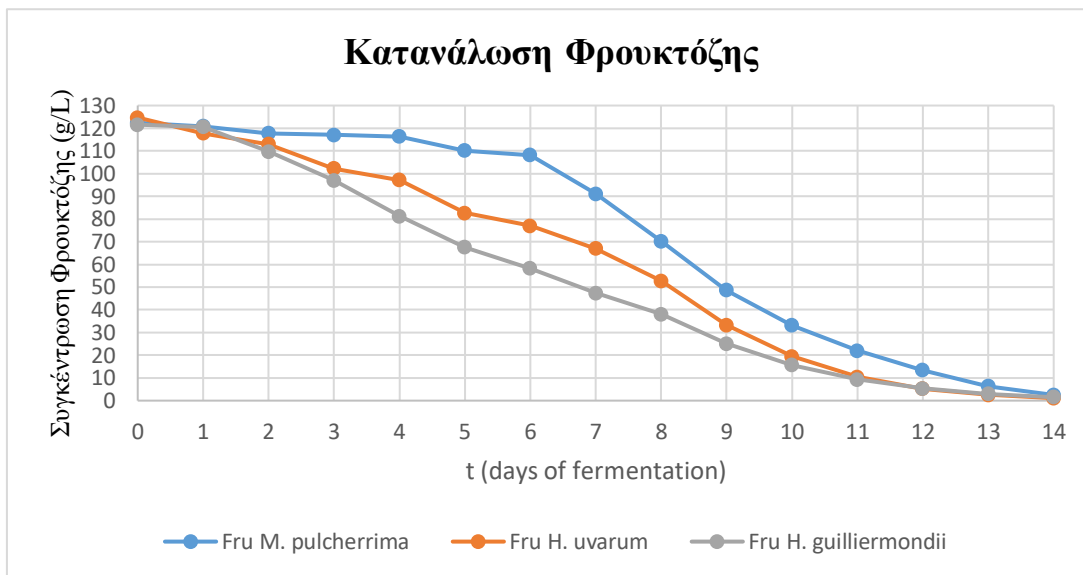
2. Β' ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: μη παστεριωμένου γλεύκους

Α. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ: Κινητική των τριών άγριων ζυμών ως εμβολίων εκκίνησης της ζύμωσης

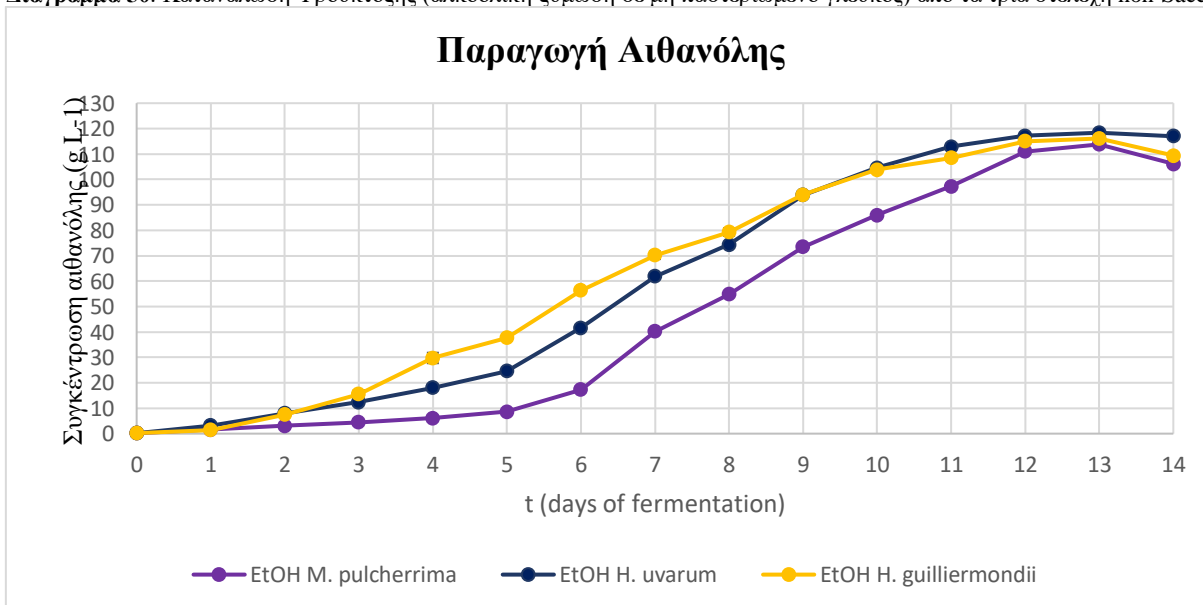
Στην προκειμένη περίπτωση οινοποίησης μη παστεριωμένου γλεύκους, με εμβόλιο εκκίνησης άγριας ζύμης, η ζύμωση δεν ξεκινάει αυθόρμητα με τις γηγενείς του ζύμες, αλλά ελεγχόμενα, λόγω του μεγάλου αριθμού πληθυσμού κυττάρων non-Saccharomyces του εμβολίου. Υπερισχύει σε κάθε φιάλη το στέλεχος με το οποίο εμβολιάστηκε το γλεύκος, επομένως είναι ελεγχόμενη μέχρι κάποιο ποσοστό αιθανόλης μικρότερο του 10%, όπου και συνεχίζουν να φέρουν εις πέρας τη ζύμωση οι γηγενείς σακχαρομύκητες που προϋπήρχαν στο σταφύλι και το γλεύκος. Μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης και ταυτόχρονη κατανάλωση σακχάρων ανάμεσα στα στελέχη *Hanseniaspora*, παρουσιάζει πάλι το στέλεχος *guilliermondii* και τέλος η *M.pulcherrima*, με την πιο αργή κατανάλωση γλυκόζης και φρουκτόζης. Ως πιο φρουκτόφιλα χαρακτηρίζονται τα στελέχη του γένους *Hanseniaspora* με βάση τη βιβλιογραφία και τα αποτελέσματα. Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώνεται και σε αυτό το πείραμα σε 14 ημέρες και η κατανάλωση γλυκόζης, φρουκτόζης, συνολικών σακχάρων, παραγωγή αιθανόλης και η αντιπαραβολή των δύο τελευταίων παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα 49-52, αντίστοιχα .



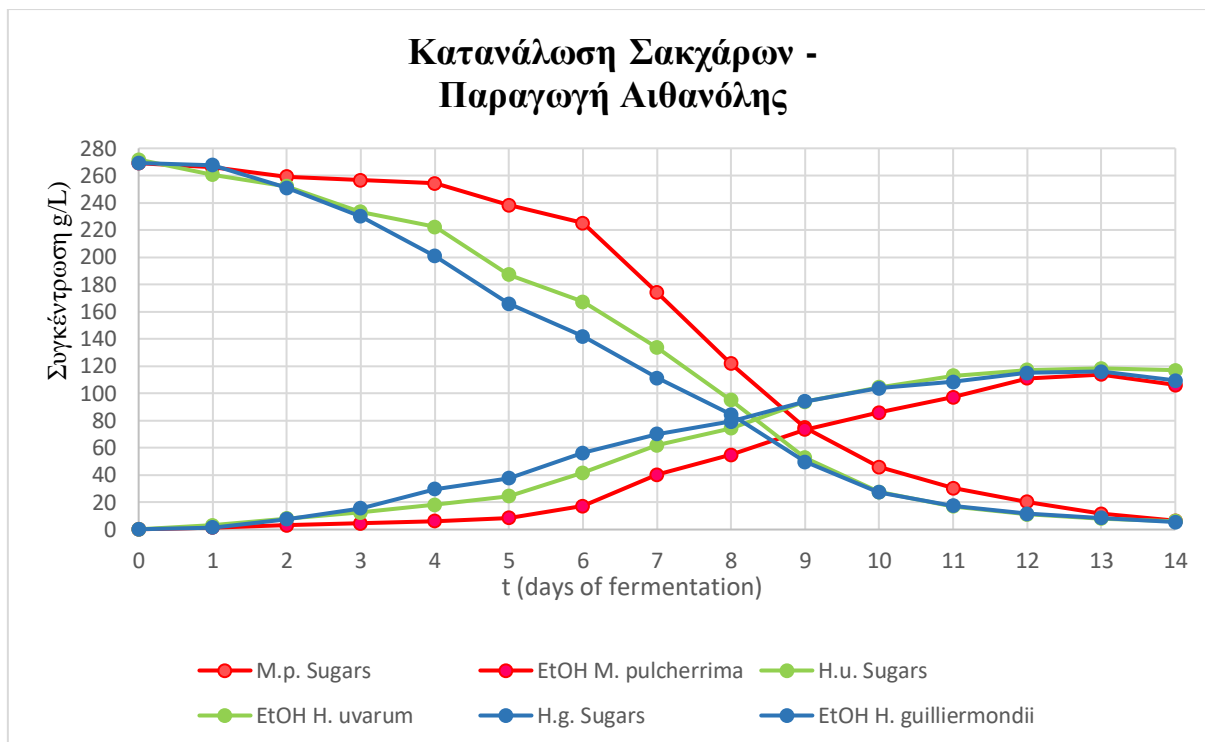
Διάγραμμα 49. Κατανάλωση Γλυκόζης (αλκοολική ζύμωση σε μη παστεριωμένο γλεύκος) από τα τρία στελέχη non-Saccharomyces.



Διάγραμμα 50. Κατανάλωση Φρουκτόζης (αλκοολική ζύμωση σε μη παστεριωμένο γλεύκος) από τα τρία στελέχη non-Saccharomyces.



Διάγραμμα 51. Παραγωγή αιθανόλης (αλκοολική ζύμωση σε μη παστεριωμένο γλεύκος) από τα τρία στελέχη non-Saccharomyces.

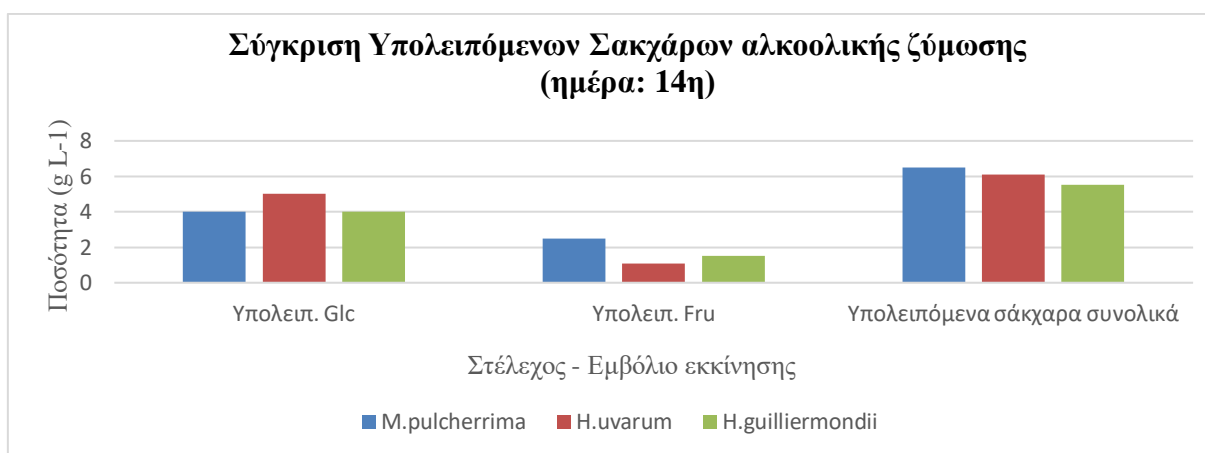


Διάγραμμα 52. Συγκεντρωτικά συγκριτικά αποτελέσματα Κατανάλωσης Σακχάρων και Παραγωγής Αιθανόλης (αλκοολική ζύμωση σε μη παστεριωμένο γλεύκος) με εκκινητές τα τρία στελέχη non-Saccharomyces.

B. ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ - ΣΑΚΧΑΡΩΝ

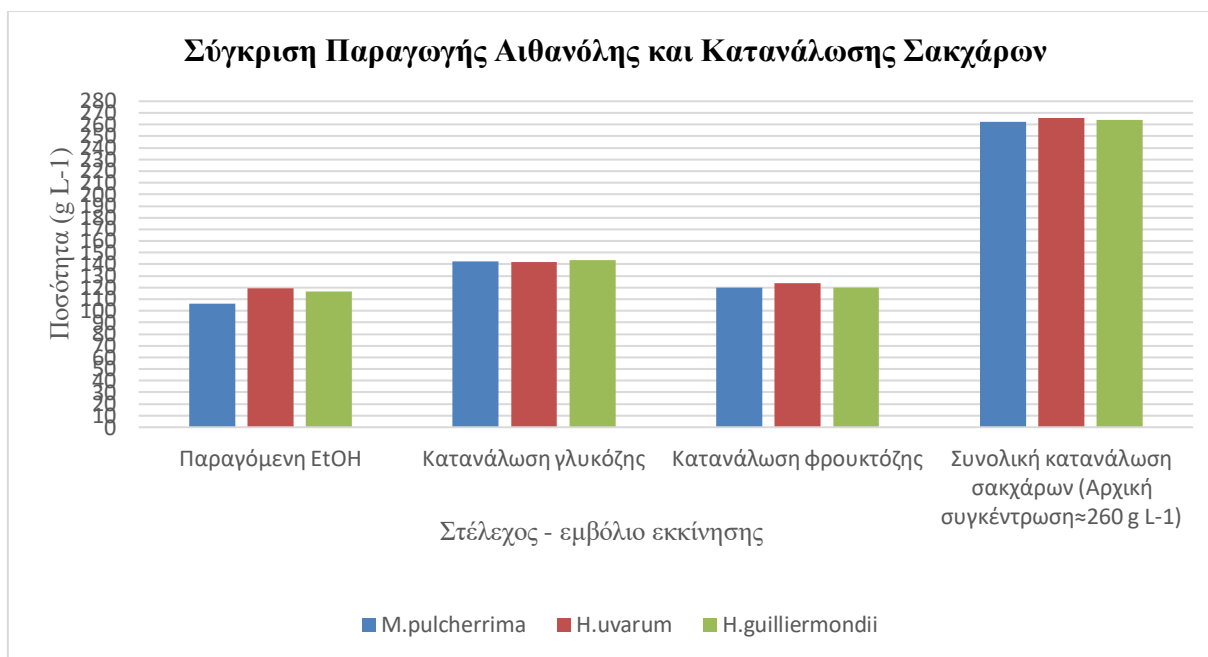
Σύγκριση Δράσης Στελεχών-εκκινητών σε αλκοολική ζύμωση μη παστεριωμένου γλεύκους

Έπειτα από λίγες ημέρες ζύμωσης (3-6) και ανάλογα με την ποσότητα της παραγόμενης αιθανόλης, οι γηγενείς σακχαρομύκητες του γλεύκους, κατάφεραν να υπερिशύσουν, συνεχίζοντας και ολοκληρώνοντας την αλκοολική ζύμωση, διότι οι πληθυσμοί των άγριων ζυμών των αρχικών εμβολίων δεν έχουν αντοχή σε μεγάλα επίπεδα αλκοόλης.



Γράφημα 15. Σύγκριση υπολειπόμενων σακχάρων στους παραγόμενους οίνους από διαφορετικά στελέχη.

Από τους τρεις non-Saccharomyces, φαίνεται ότι η γλυκόζη καταναλώθηκε σε ίση ποσότητα 142,7-143,6 g/l και ως πιο φρουκτόφιλος σε συνεργεία με τους ιθαγενείς σακχαρομύκητες, βάσει των δύο γραφημάτων (15-16), χαρακτηρίζεται ο H.uvarum (123,6 g/l), έπειτα ακολουθεί ο H.guilliermondii (120 g/l) και τέλος η ζύμη M.pulcherrima με σχεδόν 119 g/l, διότι στο γλεύκος υπήρχαν αρχικά σχεδόν ίσες ποσότητες των δύο σακχάρων, γλυκόζης και φρουκτόζης.



Γράφημα 16. Σύγκριση κατανάλωσης σακχάρων και παραγωγής αιθανόλης στους παραγόμενους οίνους από διαφορετικά στελέχη.

Πίνακας 45. Κατανάλωση σακχάρων – παραγωγή αιθανόλης στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους (υπό κανονικές συνθήκες οινοποίησης AZ σε μη παστεριωμένο γλεύκος)

Θρεπτικό μέσο	Εμβόλιο	max EtOH (g L ⁻¹) (13 d)	Τελική αιθανόλη Οίνων (14 d) (g L ⁻¹)	Υπολ. sugars (g L ⁻¹)	M.O. Αλκοολικού βαθμού οίνου (% vol) 2επαναλήψεων
Μη παστεριωμένο γλεύκος Ασύρτικο ≈260 g L ⁻¹	<i>M. pulcherrima</i>	113,14 114,42	107,18 106,14	7,6 6,7	10,67
	<i>H. uvarum</i>	118,19 118,39	117,01 117,10	6,2 6,0	11,71
	<i>H. guilliermondii</i>	115,66 116,56	107,57 111,22	5,8 5,0	10,94

Η κατανάλωση των συνολικών σακχάρων σε όλα τα δείγματα είναι παρόμοια ($\approx 262,5$ - $265,5$ g/l), σύμφωνα με τα στοιχεία του πίνακα 45. Η μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στο προηγούμενο πείραμα οινοποίησης που διεξήχθη σε παστεριωμένο γλεύκος, είναι πως ο non-Saccharomyces *H. uvarum* (118 g/l) εμφανίζει λίγο μεγαλύτερη κατανάλωση σακχάρων και παραγωγή αιθανόλης από ότι ο *H. guilliermondii* (116 g/l), καθώς και ο,τι η συγκέντρωση αιθανόλης στους παραγόμενους οίνους γενικά είναι μεγαλύτερη, διότι δεν υπάρχουν γηγενείς σακχαρομύκητες για να ολοκληρώσουν τη ζύμωση, όπως στην παρούσα οινοποίηση. Η ζύμη *M. pulcherrima* εμφανίζει μέγιστη αιθανόλη σχεδόν 114 g/l προς τις τελευταίες ημέρες τις ζύμωσης, αλλά στον τελικό οίνο το ποσοστό συγκέντρωσης μειώνεται στο 106 g/l, όπου αρχίζει και παρατηρείται ανακατανάλωση της.

Οι μέσοι όροι του αλκοολικού βαθμού των τελικών οίνων διαμορφώνεται ως εξής: *M. pulcherrima* 10,67, *H. guilliermondii* 10,94 και *H. uvarum* 11,71 (% vol). Εντοπίζεται διαφορά στο αποτέλεσμα της οινοποίησης με το παστεριωμένο γλεύκος, όπου μεγαλύτερη και πιο γρήγορη κατανάλωση σακχάρων (ειδικά φρουκτόζης) και παραγωγή αιθανόλης είχε εμφανίσει από τις άγριες ζύμες, ο *H. guilliermondii* (διαγράμματα 45-48).

Γ. ΟΞΥΤΗΤΑ

Στις συγκεκριμένες μικροοινοποιήσεις που έλαβαν χώρα στην παρούσα ερευνητική εργασία, το pH γλεύκους ήταν 3,58 και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και η ολική οξύτητα 4,95 μετά τη διόρθωση. Το PH τιμές ≈ 3 με μικρές αποκλίσεις (της τάξης του 0,2). Όσον αφορά στην πτητική οξύτητα των οίνων, κατά τον **Β΄ κύκλο πειραμάτων οινοποίησης, την 5^η και 9^η ημέρα ζύμωσης** πραγματοποιήθηκε μέτρηση του εν ζυμώσει γλεύκους, επιπλέον και της ολικής οξύτητας κατά την 4^η, 8^η και 9^η ημέρα. Αναφέρονται οι συγκεκριμένες ημέρες-τιμές ενδεικτικά, διότι παρουσιάζουν διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ τους (διακύμανση κατά τη ζύμωση). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα 46.

Πίνακας 46. Πτητική οξύτητα και PH των οίνων, κατά τον Β΄ κύκλο πειραμάτων οινοποίησης.

Οξύτητα / Στέλεχος - εμβόλιο	<i>M. pulcherrima</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>H. guilliermondii</i>
Οξικό οξύ (g L-1) – Πτητική οξύτητα 5 ^η & 9 ^η ημέρα ζύμωσης.	0,171-0,439	0,485-0,650	0,474-0,684
Ολική οξύτητα 4 ^η & 8 ^η ημέρα ζύμωσης	5,625-5,775 6,45-6,75	5,775-5,85 6,975-7,125	6,225 7,125-7,2
9 ^η ημέρα ζύμωσης	6,075-6,15	6-6,075	6,075-6,225

Γενικά, οι τιμές της πτητικής κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, σε σύγκριση με το πείραμα οινοποίησης σε παστεριωμένο γλεύκος είναι παρόμοιες. Με τα στελέχη *Hanseniaspora* να εμφανίζουν μεγαλύτερη πτητική οξύτητα από τους οίνους με εμβόλιο *M.pulcherrima*. Οι τιμές του ηλεκτρικού, του οξικού οξέος και το PH των τελικών οίνων παρουσιάζεται στον κάτωθι πίνακα 47 με μεγαλύτερες τιμές για το πρώτο να διαμορφώνονται όσον αφορά το εμβόλιο εκκίνησης *H.uvarum*, έπειτα *M.pulcherrima* και τέλος *H.guilliermondii*, ενώ το PH έχει παρόμοιες τιμές με απόκλιση 0,1.

Πίνακας 47. Ηλεκτρικό οξύ, οξικό οξύ και PH τελικών οίνων.

Στέλεχος / Εμβόλιο εκκίνησης	Ηλεκτρικό οξύ (g L-1)	PH
M.p	0,79	3,27
M.p επαναληπτική	0,79	3,24
H.u.	0,79	3,25
H.u. επαναληπτική	0,82	3,25
H.g.	0,76	3,25
H.g. επαναληπτική	0,74	3,24

Οι τιμές του ηλεκτρικού οξέος έχουν αυξηθεί σε σχέση με το πείραμα οινοποίησης παστεριωμένου γλεύκους και αυτό είναι λογικό, διότι η ζύμωση συνεχίζεται από γηγενή σακχαρομύκητα.

Δ. ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ

Πίνακας 48. Η γλυκερόλη των παραγόμενων οίνων από μη παστεριωμένο γλεύκος.

Στέλεχος / Εμβόλιο εκκίνησης	Γλυκερόλη (g L-1) Κατά την 7η ημέρα	Γλυκερόλη (g L-1) Κατά την 10η ημέρα	Γλυκερόλη (g L-1) Κατά την 12η ημέρα	τελική Γλυκερόλη των οίνων (g L-1)
M.p	4,23	6,94	7,76	7,82
M.p επαναληπτική	4,78	6,86	7,91	7,82
H.u.	6,9	8,48	8,99	9
H.u. επαναληπτική	6,83	8,48	8,96	8,96
H.g.	7,86	9,25	9,94	9,8
H.g. επαναληπτική	7,67	9,02	9,78	9,58

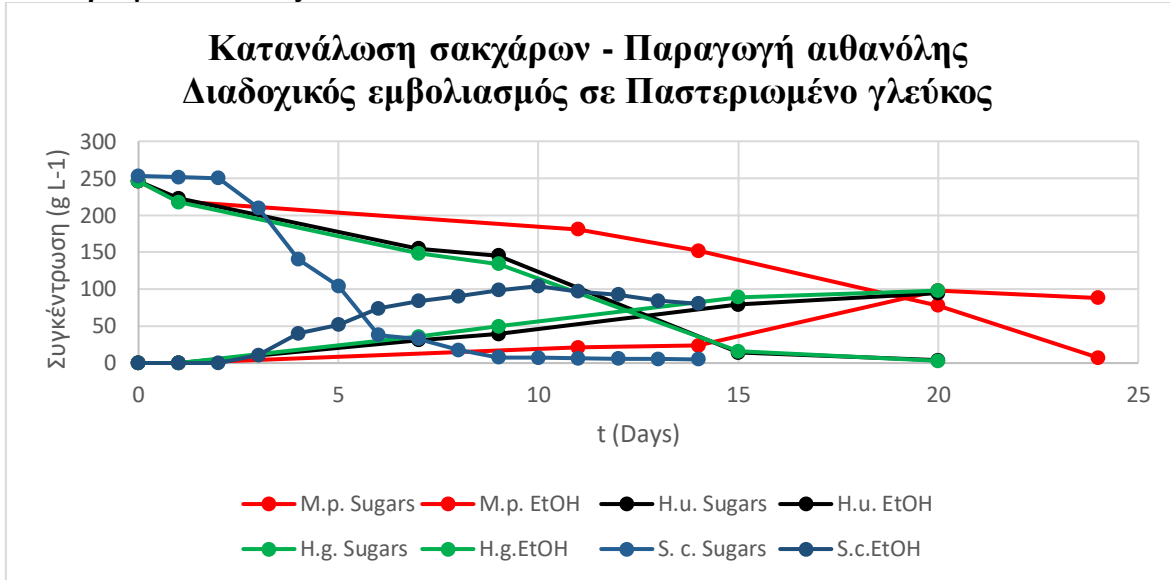
Η παραγόμενη γλυκερόλη (πίνακας 48) των τελικών οίνων κυμαίνεται από 7,82 -9,58 g/l με μεγαλύτερη συγκέντρωση να παρουσιάζει το στέλεχος *H.guilliermondii*, έπειτα το *H.uvarum* και τέλος *M.pulcherrima*. Μετά την 12^η ημέρα ζύμωσης μερικές τιμές είναι μέγιστες και αρχίζει να παρατηρείται ανακατανάλωσή της στους τελικούς οίνους των ζυμών *M.pulcherrima* και *H.guilliermondii*.

3. Γ' ΚΑΙ Δ' ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: Διαδοχικός εμβολιασμός σε παστεριωμένο γλεύκος και μη - αντιπαραβολή με τη ζύμωση αναφοράς

Α. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ

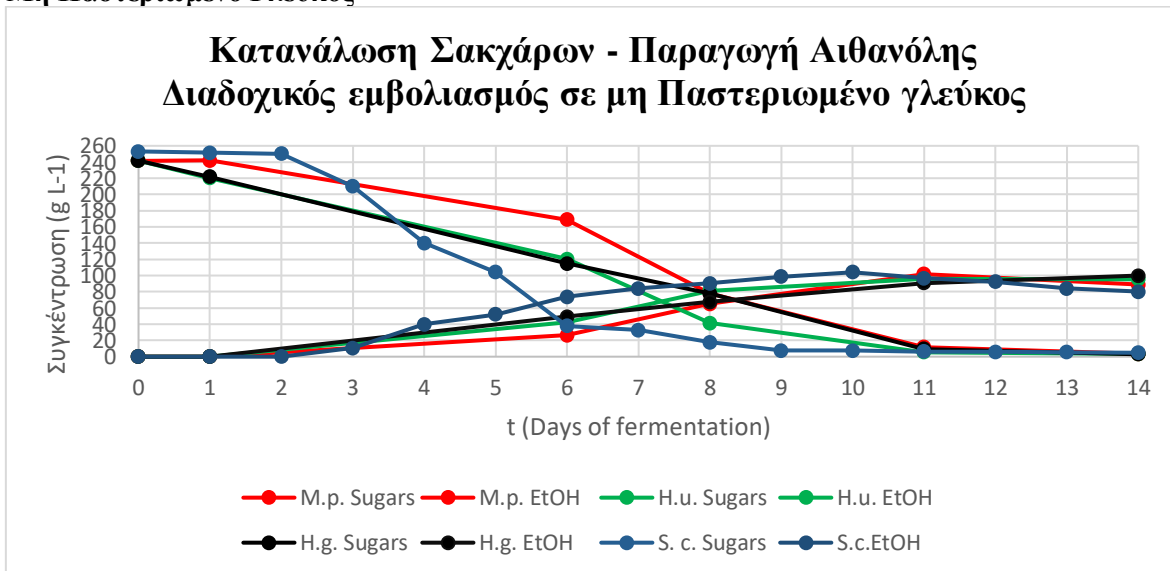
Παρουσιάζονται τα διαγράμματα κατανάλωσης σακχάρων με ταυτόχρονη παραγωγή αιθανόλης, σε σχέση με τον οίνο αναφοράς *S.cerevisiae* (δεδομένα της κινητικής του υπάρχουν μόνο σε παστεριωμένο γλεύκος).

Παστεριωμένο Γλεύκος



Διάγραμμα 53. Συγκριτικά αποτελέσματα Κατανάλωσης Σακχάρων και Παραγωγής Αιθανόλης (αλκοολική ζύμωση σε παστεριωμένο γλεύκος) με αρχικό εμβόλιο ενός εκ των τριών στελεχών non-Saccharomyces και έπειτα από κάποιες ημέρες έλαβε χώρα διαδοχικός εμβολιασμός με τον μικροοργανισμό *S.c.rhone*. Σε αντιπαραβολή παρουσιάζεται η κινητική του σακχαρομύκητα (κινητική οίνου αναφοράς).

Μη Παστεριωμένο Γλεύκος



Διάγραμμα 54. Συγκριτικά αποτελέσματα Κατανάλωσης Σακχάρων και Παραγωγής Αιθανόλης (αλκοολική ζύμωση σε μη παστεριωμένο γλεύκος) με αρχικό εμβόλιο ενός εκ των τριών στελεχών non-Saccharomyces και έπειτα από κάποιες ημέρες έλαβε χώρα διαδοχικός εμβολιασμός με τον μικροοργανισμό *S.c.rhone*. Σε αντιπαραβολή παρουσιάζεται η κινητική του σακχαρομύκητα (κινητική οίνου αναφοράς).

Ο εμβολιασμός εκκίνησης έλαβε χώρα την $t=0$ (day 0) και ο διαδοχικός εμβολιασμός όταν η συγκέντρωση των σακχάρων βρισκόταν κάτω από μια συγκεκριμένη τιμή $Brix \approx 15$. Συνήθως γίνονται για πιο άμεσα παρατηρήσιμα αποτελέσματα η παρακολούθηση των $Brix$, ως μέρος των καθημερινών αναλύσεων και παρακολούθησης της ζύμωσης. Στο παστεριωμένο γλεύκος, φαίνεται η αλκοολική ζύμωση να καθυστερεί γενικά όσον αφορά τη δράση των non-Saccharomyces, με αποτέλεσμα ο διαδοχικός εμβολιασμός του εν ζυμώνει γλεύκους με σακχαρομύκητα να αργεί και

τελικά να πραγματοποιείται σε διαφορετικούς χρόνους. Ειδικά στον οίνο με εμβόλιο εκκίνησης *M.pulcherrima* εμφανίζει μεγάλη καθυστέρηση (μικρότερη ταχύτητα ζύμωσης – κατανάλωση σακχάρων) με το διαδοχικό εμβολιασμό να λαμβάνει χώρα κατά την 13 η ημέρα, ώστε η ζύμωση να μπορεί να χαρακτηριστεί και «κολλημένη». *M.pulcherrima* (διάγραμμα 31), *H.uvarum* (ο δεύτερος εμβολιασμός λαμβάνει χώρα κατά την 7^η και 8^η ημέρα, διαγράμματα με αντίστοιχα βελάκια κατά τις ημέρες των εμβολιασμών 35-36), *H.guilliermondii* (7^η και 8^η ημέρα, διαγράμματα 40-41). Η αλκοολική ζύμωση διήρκησε από 20-26 ημέρες.

Στο μη παστεριωμένο γλεύκος, όλοι οι διαδοχικοί εμβολιασμοί με σακχαρομύκητα πραγματοποιήθηκαν την ίδια ημέρα 7^η και η ζύμωση όλων των οίνων ολοκληρώθηκε κατά την 14^η ημέρα. *M.pulcherrima* (διάγραμμα με αντίστοιχα βελάκια κατά τις ημέρες των εμβολιασμών 34), *H.uvarum* (διάγραμμα 39), *H.guilliermondii* (διάγραμμα 44).

Δ' κύκλος: Κατά την 7^η ημέρα λαμβάνει χώρα ο διαδοχικός εμβολιασμός με σακχαρομύκητα *rhone*, την 9^η ημέρα, στα μισά δείγματα πραγματοποιείται θρέψη με DAP (200g/tn) και κατά την 10^η ημέρα παρατηρείται ότι απαλύνουν οι ελαττωματικές οσμές κόλλας, ασετόν και διαλύτη, αλλά και η έντονη μυρωδιά του αχλαδιού. Την 12^η ημέρα όλα τα δείγματα έχουν διαγάζει σε μεγάλο βαθμό. Οι μη παστεριωμένοι οίνοι με τη θρέψη μυρίζουν πολύ καλύτερα. Συγκεκριμένα, ο οίνος με εκκινήτη *M.pulcherrima* μυρίζει πράσινα φρούτα και μια αίσθηση ανθρακούχας φρεσκάδας, στο δείγμα με *H.uvarum* έχει απαλύνει στο ελάχιστο η οσμή της κόλλας και μυρίζει λίγο λιγότερα απ την *M.p* πράσινα φρούτα. Όσον αφορά για το *H.guilliermondii*, το ελάττωμα της κόλλας καλύπτει λίγο τη φρεσκάδα και τα πράσινα φρούτα. Οι αντίστοιχοι οίνοι με τα ίδια εμβόλια, αλλά χωρίς θρέψη έχουν πολύ εμφανή τα ελαττώματα.

B. ΠΙΝΑΚΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ – ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ Γ' ΚΑΙ Δ' ΚΥΚΛΟΥ

Πίνακας 49. Παστεριωμένο γλεύκος, διαδοχικός εμβολιασμός, μέγιστες τιμές αιθανόλης, τελικές οίνων και υπολειπόμενα σάκχαρα.

Θρεπτικό μέσο	Εμβολιασμός	Max EtOH (g L-1)	Τελική αιθανόλη οίνων (g L-1)	Υπολειπόμεν. sugars (g L-1)	Αλκοολικός βαθμός (οίνου) (% vol)
Παστεριωμένο γλεύκος ασύρτικο ≈ 240 g L-1	<i>M.pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>	97,95	86,74	9,99	8,67
	<i>M.pulcherrima</i> + <i>S.cerevisiae</i> επαναληπτική	98,00	89,14	4,7	8,91
	<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i>	92,67	Ίδια τιμή	3,51	9,27
	<i>H. uvarum</i> + <i>S.cerevisiae</i> επαναληπτική	96,58	Ίδια τιμή	4,4	9,66
	<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	97,18	Ίδια τιμή	3,63	9,72
	<i>H. guilliermondii</i> + <i>S.cerevisiae</i> επαναληπτική	97,8	Ίδια τιμή	2,44	9,78

Πίνακας 50. Μη Παστεριωμένο γλεύκος, διαδοχικός εμβολιασμός, μέγιστες τιμές αιθανόλης, τελικές οίνων και υπολειπόμενα σάκχαρα.

Θρεπτικό μέσο	Εμβολιασμός	Max EtOH (g L-1)	Τελική αιθανόλη οίνων (g L-1)	Υπολειπόμεν. sugars (g L-1)	Αλκοολικός βαθμός (οίνου) (% vol)
Μη παστεριωμένο γλεύκος Ασύρτικο 241,7 g L-1	<i>M.pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1,5L	101,8	80,25	3,47 (hplc) 1,056 (ανάγοντα)	8,03
	<i>M.pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1L	101,6	97,04	3,58 (hplc) 0,876 (ανάγοντα)	9,70

<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1,5L	96,92	96,09	3,49 1,056	9,61
<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1L	95,14	95,00	3,42 0,956	9,5
<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1,5L	100,04	78,21	3,01 1,036	7,82
<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1L	99,01	99,01	2,86 0,936	9,90

Η τιμή των αζύμων σακχάρων μετρήθηκε με τη μέθοδο ανάλυσης HPLC για όλα τα δείγματα, η οποία είναι εξαιρετικής ακρίβειας. Επιπλέον, η τιμή των αναγόντων σακχάρων, όπως πραγματοποιήθηκε με την οινολογική μέθοδο βρέθηκε να έχει κάποια σημαντική απόκλιση, διαφοροποιώντας αρκετά μεταξύ τους τις τιμές και αυτό οφείλεται στην αλληλοκάλυψη των εμβαδών μεταξύ των υπολλειπόμενων σακχάρων και των οξέων στη μέθοδο της HPLC, διότι έχουν παρόμοιους χρόνους απόκρισης και εμφανίζονται στο ίδιο σημείο. Γι' αυτό θα πρέπει να υπάρχει ξεχωριστή στήλη στο μηχάνημα, η οποία να ανιχνεύει και τα οξέα. Έτσι εξηγείται πως φαίνεται να υπάρχουν αυξημένα αζύμωτα σάκχαρα, ενώ στην πραγματικότητα το γλεύκος έχει ζυμωθεί μέχρι ξηρότητας. Επομένως οι τιμές που προκύπτουν από την HPLC για σάκχαρα 2,4- 4,4 g/l πρόκειται για ξηρό οίνο 0,9-1,2 g/l. Όλοι οι συνδυασμοί εμβολιασμών κατάφεραν να ζυμώσουν τα σάκχαρα του γλεύκους, ενώ σε στιγμές πενίας θρεπτικών υλικών, έλαβε χώρα ανακατανάλωση αιθανόλης και γλυκερόλης ανά περιπτώσεις.

Οι τελικοί παραγόμενοι οίνοι που παρήχθησαν από διαδοχικό εμβολιασμό παστεριωμένου γλεύκους, είχαν αλκοολικό τίτλο από 8,69-9,88 (% vol) κατά μειούμενη σειρά, *H. uvarum*, *H. guilliermondii* και *M. pulcherrima*.

Οι τελικοί παραγόμενοι οίνοι που παρήχθησαν από διαδοχικό εμβολιασμό μη παστεριωμένου γλεύκους, είχαν αλκοολικό τίτλο από 7,82-9,90 (% vol) με πρώτο τον ζυμομύκητα *H. uvarum*, και έπειτα ακολουθούν μαζί οι *H. guilliermondii* και *M. pulcherrima*. Στον πίνακα 49, παρατηρείται ανακατανάλωση της αιθανόλης για τους οίνους με εμβόλιο εκκίνησης *M. pulcherrima*. Στον πίνακα 50 παρατηρείται ανακατανάλωση της αιθανόλης σχεδόν για όλες τις ζυμώσεις και σε δύο περιπτώσεις, διαπιστώνεται και ανακατανάλωση της γλυκερόλης μετά την 20^η ημέρα, ειδικά στην αλκοολική ζύμωση διαδοχικού εμβολιασμού με *M.p/S.c.*, όπου διήρκησε 24-26 ημέρες συνολικά. Λογικά αυτό συνέβη, λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών στο υπόστρωμα.

Ο διαδοχικός εμβολιασμός του γλεύκους με εκκινητή μια εκ των τριών άγριων ζυμών και έπειτα από κάποιες ημέρες με δεύτερο εμβόλιο σακχαρομύκητα, όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα των πειραματικών μικροοινοποιήσεων σε παστεριωμένο και μη γλεύκος, επιταχύνει την κατανάλωση σακχάρων και αυξάνει την παραγωγή αιθανόλης και στις τρεις περιπτώσεις, με μεγαλύτερη κατανάλωση σακχάρων και παραγωγή αιθανόλης να παρουσιάζει το στέλεχος *Metschnikowia pulcherrima*, έπειτα το *Hanseniaspora guilliermondii* και τέλος, το *Hanseniaspora uvarum*. Αποτελέσματα που δε συνάδουν με της κινητικές των μονοκαλλιιεργειών τους.

Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι προηγούμενες οινοποιήσεις. Στο παστεριωμένο γλεύκος, όπως ήταν αναμενόμενο, η ζύμωση καθυστερεί σε σχέση με αυτήν του μη παστεριωμένου που διαθέτει τη δική του γηγενή μικροχλωρίδα, η οποία συνεργεί ή και ανταγωνίζεται την κατανάλωση των σακχάρων. Μόνο στην περίπτωση της ζύμης *M. pulcherrima* ίσως δεν ισχύει αυτό, καθώς όπως προαναφέρθηκε στο σχετικό εδάφιο, διαθέτει παράγοντα βιοελέγχου έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών, τη χρωστική πουλχεριμίνη (της οποίας το πρόδρομο οξύ δεσμεύει το σίδηρο του θρεπτικού μέσου). Επομένως η ζύμη ήταν αρκετά υποτονική σε σχέση με αυτή σε μη παστεριωμένο γλεύκος, ίσως λόγω περιορισμών των θρεπτικών συστατικών, ανεπάρκειας οξυγόνου μιας και εκτελούνταν σε συνθήκες σχεδόν ημιαεροβίωσης ή τέλος ίσως λόγω τοξικότητας της παραγόμενης αιθανόλης μιας και η ζύμη αυτή έχει μεγάλη ευαισθησία $\approx 3\%$ vol. Στην περίπτωση του σακχαρομύκητα μετά τη 10^η ημέρα εμφάνισε μέγιστη τιμή αιθανόλης, και τις επόμενες ημέρες ακολούθησε έντονη ανακατανάλωση της, προφανώς από την ίδια τη ζύμη εξαιτίας πενίας της πηγής του άνθρακα. Είναι φανερό πως ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* αποδείχθηκε άξιος επιλογής για την παραγωγή οίνου για ποικίλους λόγους. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρεται και από τους συγγραφείς Compagno et al, 2014, είναι άξιος για την ταχύτητα με την οποία καταναλώνει τα σάκχαρα, την υψηλή του απόδοση, αλλά και τη αντοχή του σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Γ. ΟΞΕΑ - ΟΞΥΤΗΤΑ

Κατά την 1η ημέρα ζύμωσης, του Γ' και Δ' κύκλου πραγματοποιήθηκε μέτρηση ολικής οξύτητας (g τρυγικού οξέος/l) και μέτρηση ενεργής οξύτητας pH όλων των δειγμάτων. Μετρήσεις αρχικού αζύμωτου γλεύκους Brix: 21,3 PH: 3,5, Ολική οξύτητα: 4,54. Θερμοκρασία περιβάλλοντος: 20±1°C. Στις συγκεκριμένες μικροοινοποιήσεις του διαδοχικού

εμβολιασμού, που έλαβαν χώρα στην παρούσα ερευνητική εργασία, το pH είχε τιμές ≈ 3 με σχετικά μικρές αποκλίσεις (της τάξης του 0,5).

Στους οίνους με διαδοχικό εμβολιασμό, το οξικό οξύ οξύ, μετά το σημείο (ημέρα) με τη μέγιστη τιμή αιθανόλης αυξάνεται, ιδιαίτερα τις τελευταίες ημέρες των ζυμώσεων του *H. uvarum* με ταυτόχρονη ανακατανάλωση της αιθανόλης, ενώ αντιθέτως οι τιμές του *H. guilliermondii* μειώνονται τις τελευταίες τρεις ημέρες. Το ηλεκτρικό οξύ, παρουσιάζει λίγο μικρότερες τιμές όταν το γλεύκος εμβολιάζεται με επιλεγμένο σακχαρομύκητα και δεν εκτελεί την ζύμωση ο γηγενής πληθυσμός, το αντίθετο φαίνεται να συμβαίνει στην περίπτωση του οξικού οξέος.

Πίνακας 51. Μετρήσεις ολικής οξύτητας και PH κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων Γ' κύκλου. Διαδοχικός Εμβολιασμός non-Saccharomyces/Saccharomyces

Γλεύκος	Παστεριωμένο – Γ' κύκλος οινοποίησης									
	Ολική Οξύτητα				PH					
Κωδικός Οίνου										
Ημέρες ζύμωσης	1 ^η	4 ^η	7 ^η	10 ^η	1 ^η	4 ^η	7 ^η	10 ^η	18 ^η	26 ^η
P.	5,025	5,625	6	6,3375	3,28	3,2	3,24	3,06	2,99	3,13
P.'	5,1	5,85	6,075	6,2625	3,29	3,175	3,28	3,06	2,98	3,16
U.	5,25	6,2625	6,525	7,125	3,26	3,19	3,22	3,1	3,12	
U.'	5,4	6,375	6,675	6,825	3,27	3,2	3,26	3,2	3,12	
G.	5,25	6,3	6,525	6,9	3,27	3,18	3,25	3,17	3,13	
G.'	5,1375	6,45	6,45	6,9375	3,27	3,18	3,2	3,15	3,12	

Πίνακας 52. Μετρήσεις ολικής οξύτητας και PH κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων Δ' κύκλου. Διαδοχικός Εμβολιασμός non-Saccharomyces/Saccharomyces

Γλεύκος	Μη παστεριωμένο – Δ' κύκλος οινοποίησης							
	Ολική Οξύτητα				PH			
Κωδικός Οίνου								
Ημέρες ζύμωσης	1 ^η	4 ^η	7 ^η	10 ^η	1 ^η	4 ^η	7 ^η	10 ^η
P. 1,5L	5,1	5,7	6,7875	3,9	3,27	3,17	3,26	3,09
P. 1L	5,025	5,7	6,5625	3,825	3,36	3,19	3,28	3,12
U. 1,5L	5,175	6,45	7,275	3,75	3,27	3,185	3,27	3,08
U. 1L	5,175	6,2625	7,2375	3,7875	3,35	3,24	3,29	3,11
G.1,5L	5,1	6,45	7,2	3,825	3,22	3,16	3,35	3,12
G. 1L	5,175	6,375	6,9	3,6	3,35	3,15	3,35	3,08

Μεταξύ μικτών ζυμώσεων παστεριωμένου γλεύκους και μη, υπήρξαν διαφορές μεταξύ στις τιμές PH και ολικής οξύτητας καθώς ήταν πιο αυξημένες οι τιμές του παστεριωμένου γλεύκους, όπως φαίνεται από τους πίνακες 51 και 52. Παρατηρήθηκαν μεταβλητά αποτελέσματα κατά την εξέταση μονοκαλλιιεργειών γλεύκους *S. cerevisiae* σε σύγκριση με διαδοχικές ζυμώσεις χρησιμοποιώντας *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae*, όπου η μείωση της ολικής οξύτητας σε διαδοχικές ζυμώσεις έχει παρατηρηθεί ότι δίνει τιμές με στατιστικά μη σημαντικές διαφορές (Benito et al. 2015, Chen et al. 2018) και σημαντικές (Comitini et al 2011, Dutraire et al.2019). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρήθηκαν υψηλότερα τελικά επίπεδα τιτλοδοτούμενης οξύτητας σε σύγκριση με τον έλεγχο *S. cerevisiae* (Rodriguez et al. 2016). Σύμφωνα με πολλές δημοσιευμένες εργασίες, η μείωση της πτητικής οξύτητας όταν χρησιμοποιείται το στέλεχος *M. pulcherrima* κυμαίνεται μεταξύ 10% και 75% (Jolly et al.2003, Hranilovic et al.2020, Roca-Mesa et al.2020) υποδηλώνοντας ότι η μείωση της πτητικής οξύτητας σε τέτοιες συνθήκες φαίνεται να είναι μια τάση. Το ίδιο παρατηρείται και στα ανωτέρω πειραματικά αποτελέσματα. Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν αναφέρει ίσες ποσότητες οξικού οξέος όταν χρησιμοποιήθηκε σε διαδοχική ζύμωση (Ruiz et al.2017, Benito et al.2015), ή ακόμη και αύξηση περίπου 20% (Dutraire et al.2019). Οι αυξημένες τιμές πτητικής οξύτητας των οίνων με εμβόλιο εκκίνησης *H. uvarum* και *H. guilliermondii*, δικαιολογούν τα αρνητικά χαρακτηριστικά που τους αποδόθηκαν (και στους συνεμβολιασμούς τους με σακχαρομύκητα και αναλύονται στο κεφάλαιο του οργανοληπτικού).

Παρατηρείται πως για το μη παστεριωμένο γλεύκος, η ολική οξύτητα στις ίδιες ημέρες ζύμωσης έχει αρκετά παρόμοιες τιμές με το παστεριωμένο, ενώ στην αρχή μέχρι την 7^η ημέρα αυξάνονται το ίδιο, κατά τη 10^η σχεδόν

μειώνεται στο μισό και ακολουθείται από μια μικρή μείωση του pH. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την 7^η ημέρα εμβολιάστηκαν με σακχαρομύκητα όλες οι μη παστεριωμένες φιάλες και κατά την 7-8^η ημέρα οι παστεριωμένες *H.uvarum* και *H.guilliermondii* και οι επαναληπτικές τους.

Πίνακας 53. Ηλεκτρικό και οξικό οξύ παραγόμενων οίνων (6 πρώτες σειρές παστεριωμένα δείγματα οίνων, 6 τελευταία μη παστεριωμένα).

Στέλεχος-Εμβόλιο εκκίνησης	Ηλεκτρικό οξύ (g l-1)	Οξικό Οξύ/πτητική οξύτητα (g L-1)
M.p1/S.c.	0,97	0,56
M.p2/S.c.	0,96	0,60
H.uv1/S.c.	0,73	0,73
H.uv2/S.c.	0,44	0,44
H.g1/S.c.	0,29	0,54
H.g2/S.c.	0,40	0,54
M.p1/S.c. Θ	0,63	0,66
M.p2/S.c. X.Θ,	0,96	0,96
H.uv1/S.c. Θ	0,66	0,69
H.uv2/S.c. X.Θ	0,50	0,60
H.g1/S.c. Θ	0,42	0,7
H.g2/S.c. X.Θ	0,36	0,68

Το ηλεκτρικό οξύ των μη παστεριωμένων οίνων μικτής καλλιέργειας σε σχέση με των μη παστεριωμένων δείχνει αύξηση μόνο για το στέλεχος *H.guilliermondii*.

Δ. ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ

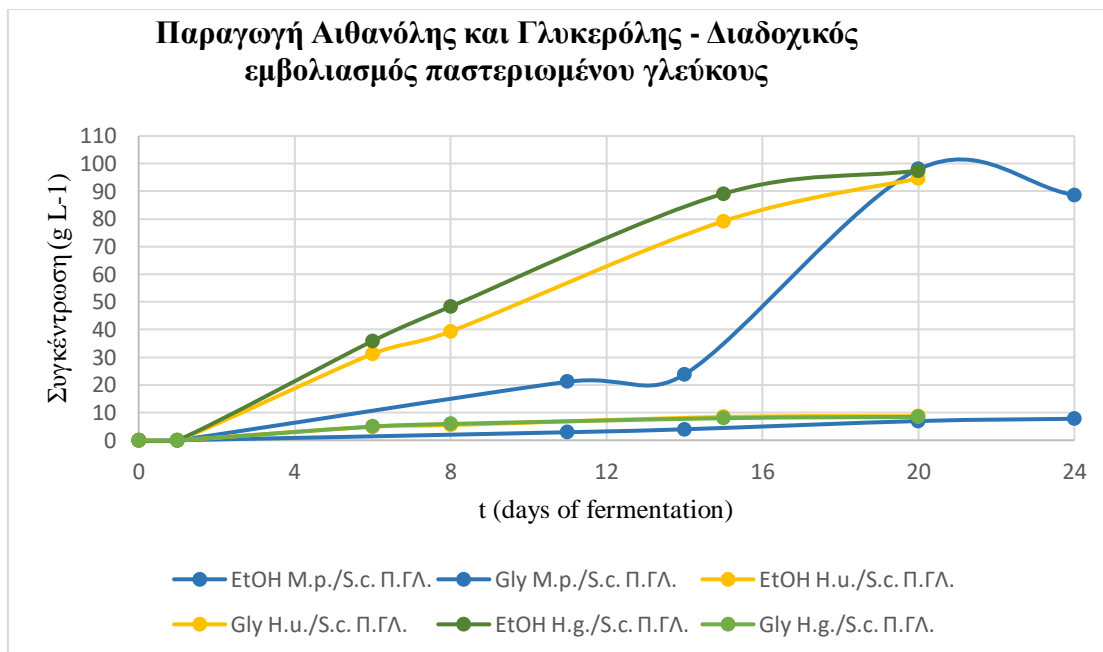
Η παραγόμενη γλυκερόλη στους τελικούς οίνους κυμαίνεται από 7,1-8,9 g/l, ενώ λίγες μέρες πριν την αποζύμωση τα περισσότερα δείγματα οίνων είχαν μεγαλύτερες τιμές, με μικρότερη συγκέντρωση στον διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima* - *S. cerevisiae*, έπειτα στους οίνους με εμβόλιο *H. guilliermondii* - *S. cerevisiae* και *H. uvarum* - *S. cerevisiae*, επισημάνθηκαν παρόμοιες τιμές (ενώ αυτό το αποτέλεσμα αντιστρέφεται λίγες μέρες πριν την αποζύμωση). Από ότι φαίνεται, η θρέψη με DAP των επαναληπτικών φιαλών, δεν επηρέασε ιδιαίτερα την παραγόμενη αιθανόλη των οίνων, αν και διαφαίνεται μια πραγματικά ελάχιστη μείωση αυτής, όπως και μία μικρή αύξηση της γλυκερόλης. Βέβαια, σίγουρα επηρέασε το αρωματικό προφίλ των παραγόμενων πειραματικών οίνων σε ένα βαθμό, παρόλο που δεν έλαβε, με ακρίβεια, χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο οινοποίησης των λευκών οίνων του εργαστηρίου Οινολογίας ΓΠΑ. Ακολουθούν πίνακες με τις τιμές παραγόμενης γλυκερόλης στους οίνους με διαδοχικό εμβολιασμό σε παστεριωμένο γλεύκος και μη (πίνακας 54) και σύγκρισή τους με τιμές σημοσιευμένων εργασιών με άγριες ζύμες ίδιου γένους και στελέχους (πίνακας 57).

Πίνακας 54. Παραγόμενη γλυκερόλη στους παραγόμενους οίνους με διαδοχικό εμβολιασμό του παρόντος πειράματος.

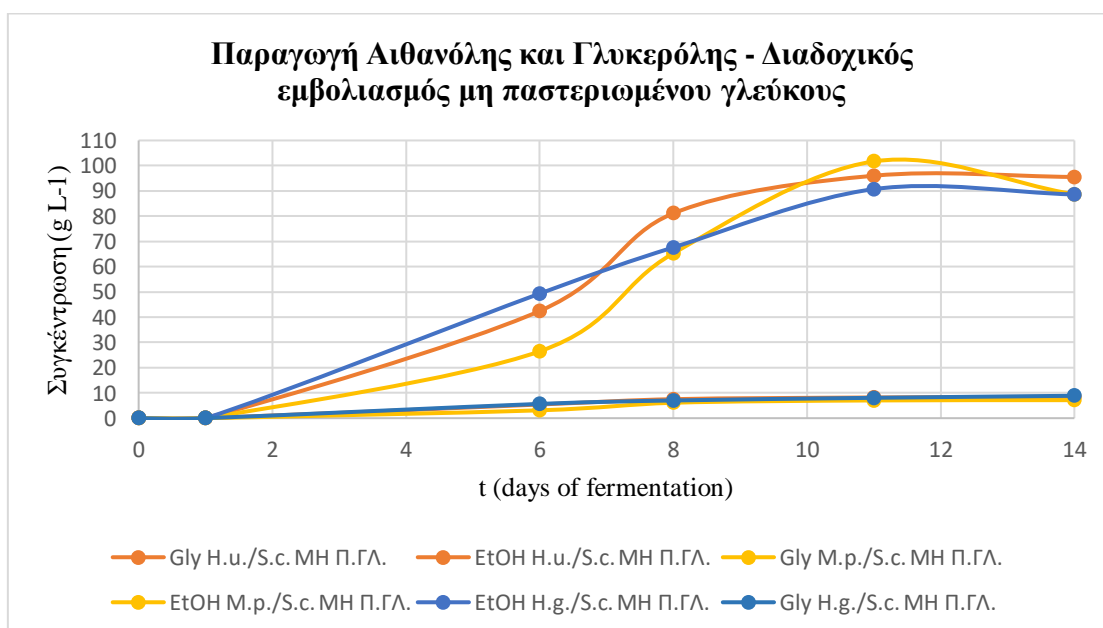
Διαδοχικός Εμβολιασμός	Γλεύκος οινοποίησης	Γλυκερόλη (g L-1) τελικές τιμές	Γλυκερόλη Μ.Ο. (g L-1) επαναληπτικών ζυμώσεων
<i>M.pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>	Παστεριωμένο (24d-26)	7,63	7,8
		7,9	
	Μη παστεριωμένο (14d)	7,10	7,1
		7,15	
<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i>	Παστεριωμένο (20-21d)	8,90	8,7
		8,47	
	Μη παστεριωμένο (14d)	8,29	8,5
		8,66	
<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	Παστεριωμένο (20d)	8,61	8,4
		8,26	

	Μη παστεριωμένο (14d)	8,67	8,9
		9,08	

*Στα παστεριωμένα γλεύκη, η δεύτερη τιμή είναι αυτή της επαναληπτικής ζύμωσης, ενώ στα μη παστεριωμένα γλεύκη, οι πρώτες τιμές αφορούν τους οίνους που παράχθηκαν χωρίς θρέψη και οι δεύτερες τιμές είναι αυτές με τη θρέψη. Παρατηρείται από τους ανωτέρω πίνακες των ζυμώσεων σε γλεύκος (49, 54), ότι σε σύγκριση με τις μονοκαλλιέργειες σε παστεριωμένα γλεύκη ή ακόμα και στο αρχικό αποστειρωμένο συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης, όλες οι τιμές αιθανόλης των οίνων με διαδοχικό εμβολιασμό έχουν αυξηθεί, όπως η συγκέντρωση της γλυκερόλης στις μονοκαλλιέργειες και στον διαδοχικό εμβολιασμό διαφέρει σημαντικά έχοντας άμεση σχέση με την κατανάλωση των σακχάρων του γλεύκους, το ίδιο και η παραγωγή αιθανόλης. Σε σύγκριση με τον οίνο αναφοράς με *S.cerevisiae* (εμβολίου εκκίνησης) που εμφανίζει τιμές 5,7-5,8 g/l, όλες οι τιμές γλυκερόλης διαδοχικού εμβολιασμού δείχνουν να έχουν αυξηθεί κατά πολύ.



Διάγραμμα 55. Παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης με τη στρατηγική του διαδοχικού εμβολιασμού παστεριωμένου γλεύκους



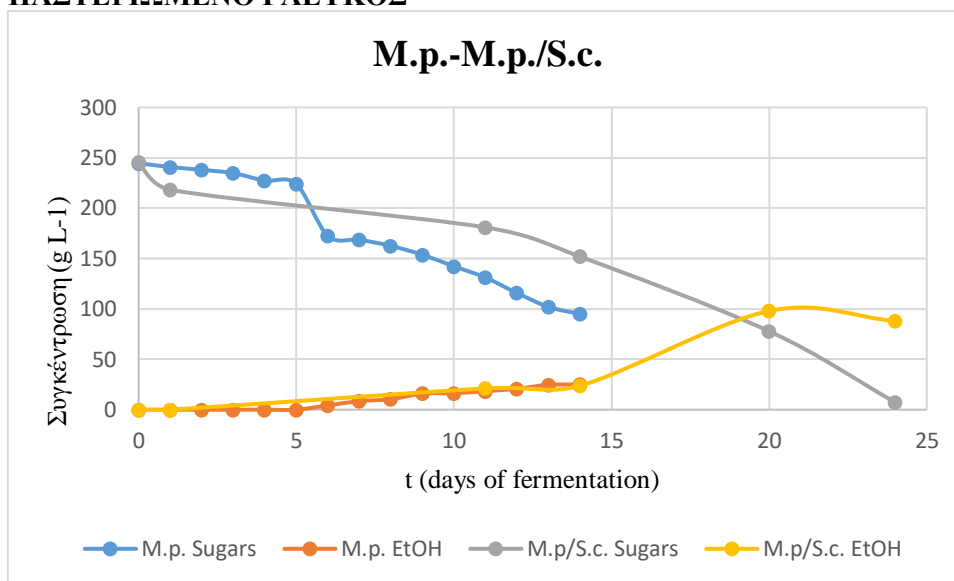
Διάγραμμα 56. Παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης με τη στρατηγική του διαδοχικού εμβολιασμού μη παστεριωμένου γλεύκους

Στα ανωτέρω διαγράμματα 55, 56 παρουσιάζεται η παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης κατά τη ζύμωση με διαδοχικό εμβολιασμό σε παστεριωμένο γλεύκος και μη, όπου όσον αφορά τη γλυκερόλη οι τιμές είναι παρόμοιες με μέγιστες διαφορές έως 0,5 g/l. Ακολούθως, όσον αφορά στη αιθανόλη που παράγεται από ζύμωση παστεριωμένου γλεύκους δεν παρατηρείται ανακατανάλωση μόνο στην περίπτωση της *M.pulcherrima* της οποίας η ζύμωση διήρκεσε 24-26ημέρες, ενώ αντίθετα στο μη παστεριωμένο γλεύκος παρατηρείται σε όλα τα δείγματα οίνου σε άλλα περισσότερο και σε άλλα λιγότερο.

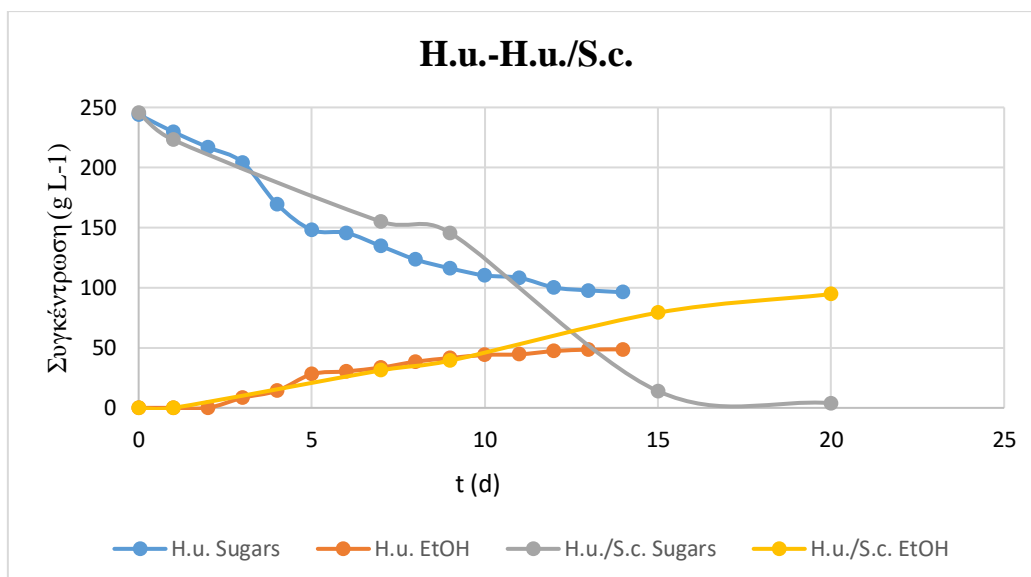
4. ΣΥΓΚΡΙΣΕΙΣ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΖΥΜΩΣΗΣ

A. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ

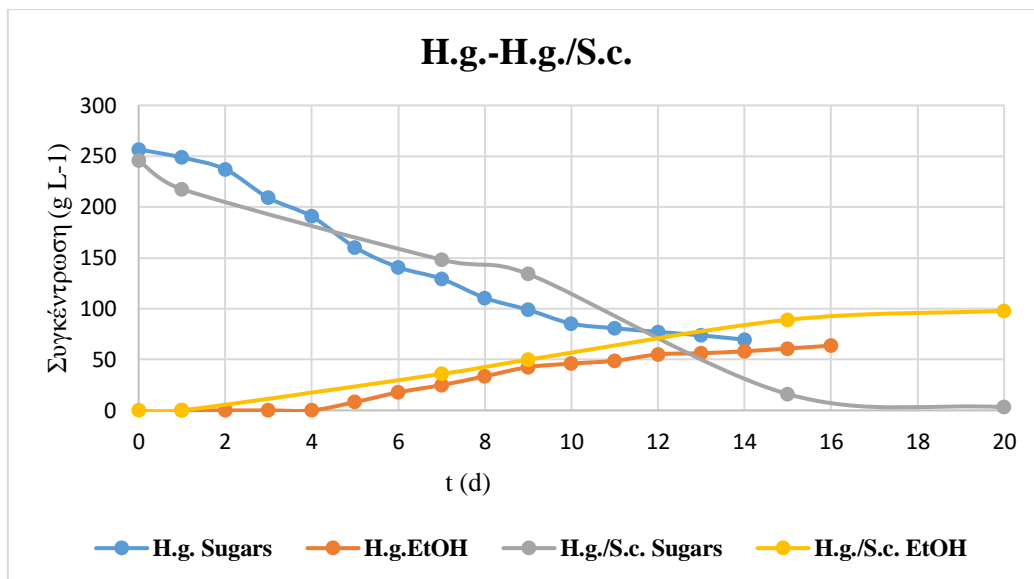
ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ



Διάγραμμα 57. Σύγκριση κινητικών *M.pulcherrima* ως μονοκαλλιέργεια σε παστεριωμένο γλεύκος και διαδοχικός εμβολιασμός παστεριωμένου γλεύκους *M.pulcherrima/S.cerevisiae*.



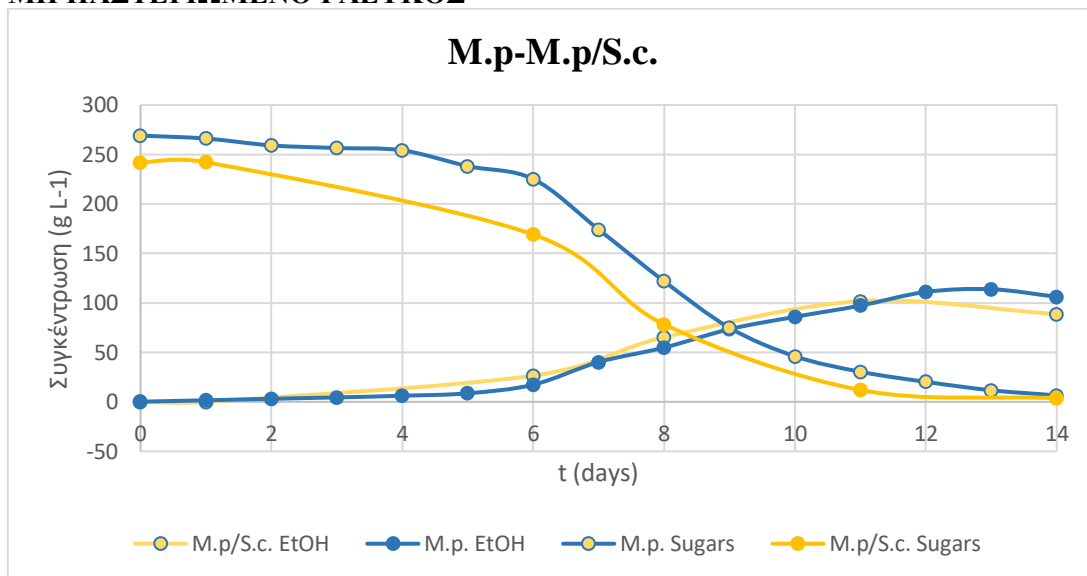
Διάγραμμα 58. Σύγκριση κινητικών *H.uvarum* ως μονοκαλλιέργεια σε παστεριωμένο γλεύκος και διαδοχικός εμβολιασμός παστεριωμένου γλεύκους *H.uvarum/S.cerevisiae*.



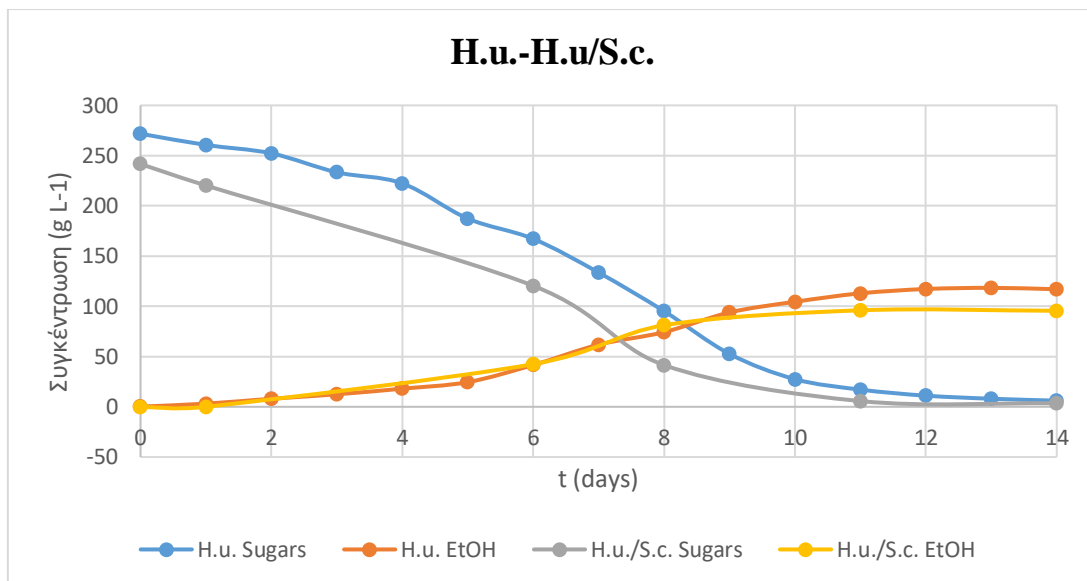
Διάγραμμα 59. Σύγκριση κινητικών *H. guilliermondii* ως μονοκαλλιέργεια σε παστεριωμένο γλεύκος και διαδοχικός εμβολιασμός παστεριωμένου γλεύκους *H. guilliermondii* / *S. cerevisiae*.

Το συμπέρασμα, το οποίο εξάγεται από τα διαγράμματα 57-59 είναι ότι οι non-Saccharomyces έχουν μικρότερη ταχύτητα και ζυμωτική ισχύ σε σχέση με το διαδοχικό εμβολιασμό τους με τον επιλεγμένο σακχαρομύκητα του πειράματος ονοποίησης. Με τον *H. guilliermondii* να σημειώνει τα καλύτερα αποτελέσματα μονοκαλλιέργειας. Είναι προφανές ότι χρειάζονταν περισσότερες ημέρες ζύμωσης προκειμένου να δοθούν τα τελικά τους αποτελέσματα (οινικά προϊόντα, με κάποια ποσότητα αζύμων σακχάρων), μιας και φαίνεται ότι έχουν μεγαλύτερη αντοχή σε αιθανόλη από την παραγόμενη, ιδιαίτερα για τον *H. guilliermondii*.

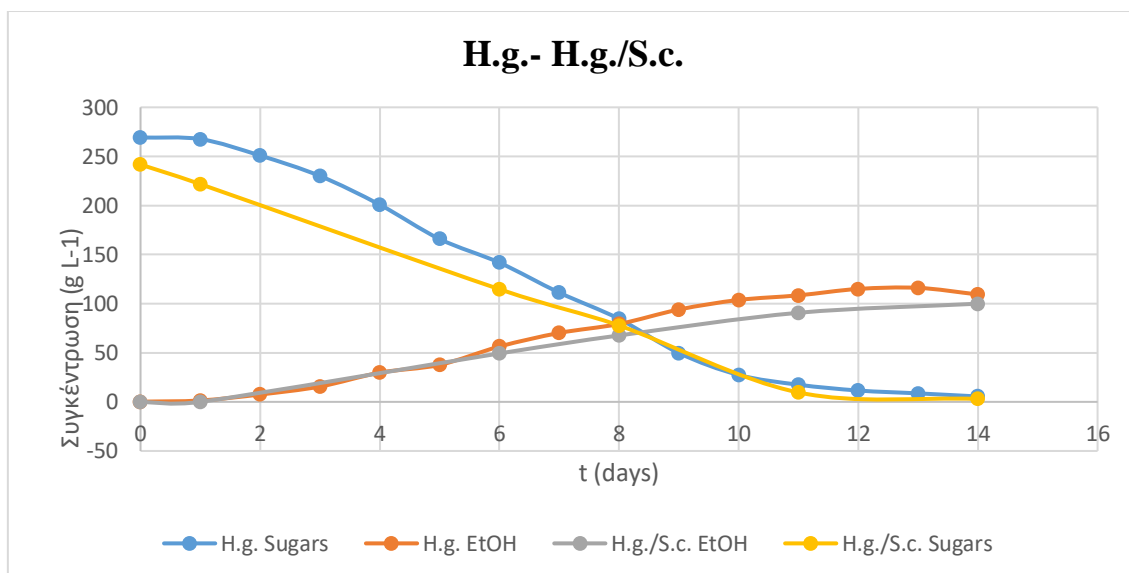
ΜΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ



Διάγραμμα 60. Σε αντιπαραβολή εμβολιασμός μη παστεριωμένου γλεύκους *M. pulcherrima* (&γηγενείς σακχαρομύκητες) / διαδοχικός εμβολιασμός *M. pulcherrima* με *S. cerevisiae* - Κατανάλωση σακχάρων και Παραγωγή αιθανόλης.



Διάγραμμα 61. Σε αντιπαραβολή εμβολιασμός μη παστεριωμένου γλεύκους *H.uvarum* (&γηγενείς σακχαρομύκητες) / διαδοχικός εμβολιασμός *H.uvarum* με *S.cerevisiae* - Κατανάλωση σακχάρων και Παραγωγή αιθανόλης.



Διάγραμμα 62. Σε αντιπαραβολή εμβολιασμός μη παστεριωμένου γλεύκους *H.guilliermondii* (&γηγενείς σακχαρομύκητες) / διαδοχικός εμβολιασμός *H.guilliermondii* με *S.cerevisiae* - Κατανάλωση σακχάρων και Παραγωγή αιθανόλης

Το συμπέρασμα που προκύπτει από τα τρία διαγράμματα 60-62, των μη παστεριωμένων γλευκών εν ζυμώσει, οι γηγενείς σακχαρομύκητες παράγουν περισσότερη αιθανόλη στους τελικούς οίνους και επιτυγχάνουν μεγαλύτερη κατανάλωση σακχάρων στον ίδιο χρόνο.

B. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ – ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας μέγιστων τιμών συγκέντρωσης αιθανόλης όλων των οινικών προϊόντων που παράχθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

Πίνακας 55. Συγκεντρωτικός πίνακας με τις μέγιστες τιμές αιθανόλης σε όλα τα προϊόντα που παράχθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία.

Θρεπτικό μέσο	Εμβολιασμός	Μέγιστη EtOH (g L ⁻¹)	Τελική αιθανόλη (g L ⁻¹)	Αλκοολικός βαθμός (% vol)
Ασύρτικο Σπάτων 2019 ≈ 240 g L ⁻¹	Safoeno GV S107 (Saccharomyces cerevisiae, Emulsifier: E491-sorbitan monostearate)	-	121	12,1 (οίνος αναφοράς οργανοληπτικού)
	Safoeno GV S107	-	122	12,2
Αποστειρωμένο Συνθετικό υπόστρωμα Γλυκόζης 70 g L ⁻¹	<i>M. pulcherrima</i> (80 g L ⁻¹)	24,24	24,04	2,4
	<i>H. uvarum</i>	17,78	12,88	1,29
	<i>H. guilliermondii</i>	15,19	12,79	1,28
	<i>S. cerevisiae</i> (60 g L ⁻¹)	21,2		2,12
Παστεριωμένο γλεύκος ασύρτικο 2018 ≈ 240 g L ⁻¹	<i>M. pulcherrima</i>	22,03 27,24	24,64	2,46
	<i>H. uvarum</i>	47,91 49,00	48,46	4,85
	<i>H. guilliermondii</i>	63,21 64,01	63,61	6,36
	<i>S. cerevisiae</i>	104,04	80,20	10,4*
	<i>M.pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>	97,95	86,74	8,67
	<i>M.pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i> επαναληπτική	98,00	89,14	8,91
	<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i>	92,67	Ίδια τιμή	9,27
	<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> επαναληπτική	96,58	Ίδια τιμή	9,66
	<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	97,18	Ίδια τιμή	9,72
	<i>H. guilliermondii</i> + <i>S.cerevisiae</i> επαναληπτική	97,8	Ίδια τιμή	9,78
Μη παστεριωμένο γλεύκος Ασύρτικο 2018 241,676 g L ⁻¹	<i>M. pulcherrima</i>	113,14 114,42	107,18 106,14	10,72 10,61
	<i>H. uvarum</i>	118,19 118,58	117,01 117,10	11,70 11,71
	<i>H. guilliermondii</i>	115,60	107,57	10,76
		116,56	111,22	11,12

<i>M.pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1L	101,8	80,25	8,03
<i>M.pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1,5L	101,6	97,04	9,70
<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1,5L	96,92	96,09	9,61
<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1L	95,14	95,01	9,50
<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1,5L	100,04	78,21	7,82
<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i> 1L	99,01	99,01	9,90

Αναφέρεται ότι ο οίνος (ασύρτικο '19) που οινοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο οινοποίησης του ΓΠΑ, είχε αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης 12,1-12,2 % (v/v) με ανάγοντα σάκχαρα 2-2,47 g/l (στοιχεία πίνακα 36).

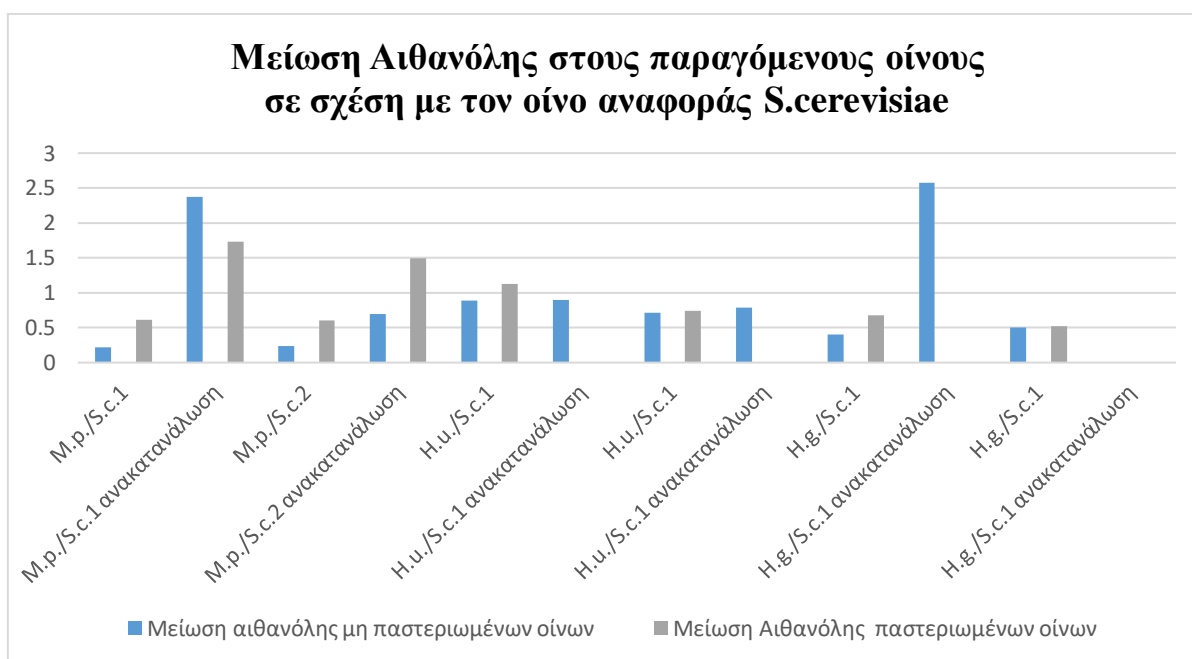
Στην οινοποίηση του μη παστεριωμένου γλεύκους με ένα μόνο εμβόλιο άγριας ζύμης ως εκκινήτη, όπου έπειτα από την αύξηση της αιθανόλης πάνω από 2-6%, αναλαμβάνουν να φέρουν εις πέρας τη ζύμωση μέχρι ξηρότητας οι γηγενείς σακχαρομύκητες του γλεύκους, οι τιμές καθορίζονται και για τους τρεις οίνους στο 10,61-11,71 % vol. Λογικά, ο γηγενής σακχαρομύκητας που προουπήρχε στο γλεύκος είχε μεγαλύτερη ζυμωτική ισχύ και αλκοολογόνο ικανότητα από τον *S.c.rhone*.

Σε κανονικές συνθήκες οινοποίησης, με διαδοχικό εμβολιασμό non-Saccharomyces και με τον σακχαρομύκητα *rhone* σε μη παστεριωμένο γλεύκος, οι τιμές διαμορφώνονται σε αρκετά διαφορετικό επίπεδο από 7,82 - 9,9 % vol. Με το διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima* - *S. cerevisiae* να καταλαμβάνει την πρώτη θέση μαζί με τον *H.guilliermondii* (μετά την ανακατανάλωση αιθανόλης) σε οίνους με το μικρότερο αλκοολικό τίτλο 8,03 και 7,82 αντίστοιχα σε % vol, άρα παρουσιάζεται μείωση του παραγόμενου οίνου σε αιθανόλη, ακολουθούμενοι με διαφορά από το εμβόλιο *H. uvarum* + *S. cerevisiae* με 9,51-9,69 % vol. Ενώ, σύμφωνα με τις μελέτες και τους μονούς εμβολιασμούς του γλεύκους, θα έπρεπε, η σειρά του διαδοχικού εμβολιασμού με σακχαρομύκητα, να διαμορφωθεί με πρώτη, όσον αφορά την παραγωγή ποσοστού αιθανόλης, τη ζύμη *H. guilliermondii*, έπειτα τη *H.uvarum* και τέλος *M.pulcherrima*, τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά με μικρή όμως απόκλιση μεταξύ τους. Επομένως, εδώ επιβεβαιώνεται η εικασία στη διαφορά των αποτελεσμάτων μονοκαλλιέργειας σε γλεύκος και συνθετικό μέσο, πως μπορούσε να συνεχιστεί για κάποιες ημέρες στο παστεριωμένο γλεύκος ή ότι η αντοχή του *H.uvarum* σε αιθανόλη είναι μικρότερη από του *H.guilliermondii*.

Παραγόμενος οίνος μη παστεριωμένου γλεύκους με εμβόλιο εκκίνησης *S.c.rhone* δεν πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για να χρησιμοποιηθεί ως οίνος αναφοράς, διότι δεν ήταν άμεσα διαθέσιμος τις ημέρες των πειραμάτων, αλλά έλαβε χώρα οινοποίηση σε παστεριωμένο γλεύκος, για να εξαχθούν οι απαραίτητες συγκρίσεις. Κατά την 10^η ημέρα εμφάνισε μέγιστη τιμή αιθανόλης 104,04 g/l με ζύμωση όλων των σακχάρων του γλεύκους σχεδόν μέχρι ξηρότητας και έπειτα ακολούθησε έντονη ανακατανάλωση της αιθανόλης μέχρι την 14^η ημέρα με τιμή 80g/l, όπου και το πείραμα οινοποίησης ολοκληρώθηκε. Όσον αφορά την οινοποίηση, υπό ασηπτικές συνθήκες, του παστεριωμένου γλεύκους με ένα μόνο εμβόλιο άγριας ζύμης, ως εκκινήτη, οι τιμές προσεγγιστικά καθορίζονται ως εξής: 2,5 % vol για το ζυμομύκητα *M. pulcherrima*, για τον *H. uvarum* 4,9 % vol και για τον *H. guilliermondii* 6,4 % vol με μεγαλύτερο αλκοολικό τίτλο εκ των τριών. Και ο σακχαρομύκητας, καταφέρνει να ζυμώσει το γλεύκος μέχρι \approx 10 % vol. Με το διαδοχικό εμβολιασμό, οι τιμές διαμορφώνονται σε παρόμοιο επίπεδο από 8,68 μέχρι 9,88 % vol. Ο διαδοχικός εμβολιασμός παρήγαγε οίνους, *H. guilliermondii* - *S. cerevisiae* 9,7- 9,88 % vol, το εμβόλιο *H. uvarum* - *S. cerevisiae* που διαμορφώνει τις τιμές οίνου από 9,27-9,66 % vol. και τέλος, το διαδοχικό εμβόλιο *M.pulcherrima* - *S. cerevisiae* 8,68-8,91 % vol. Επομένως, παρατηρείται μικρή μείωση της αιθανόλης των παραγόμενων οίνων μεταξύ των διαδοχικών εμβολιασμών παστεριωμένου γλεύκους και στον οίνο αναφοράς με εκκινήτη *S.c.rhone*, ανάλογα με τον non-Saccharomyces εκκινήτη: *M.p.* 0,6 μεταξύ μεγίστων τιμών αιθανόλης των δειγμάτων οίνων σε % vol και 1,49-1,72 % vol μετά την ανακατανάλωση της αιθανόλης με τις τελικές τιμές. Για το *H.uvarum* η μείωση που σημειώθηκε ήταν 0,74-1,13 και τέλος για τον *H.guilliermondii* 0,52-0,68 % vol, η μικρότερη. Οι τιμές συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μείωσης σε αιθανόλης των οίνων 0,5-1,7 % vol, του πίνακα 61. Τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος συνοινοποίησης με μείωση αιθανόλης, παρουσιάζονται αναλυτικά στον κάτωθι πίνακα (56).

Πίνακας 56. Μείωση αιθανόλης των παραγόμενων οίνων με διαδοχικό εμβολιασμό σε σχέση με τον οίνο αναφοράς *S.c.* 10,4 (% vol).

Διαδοχικός Εμβολιασμός/ Δείγμα οίνου	Αιθανόλη Μη παστεριωμένων Οίνων (% vol)	Αιθανόλη Παστεριωμένων Οίνων (% vol)	Μείωση αιθανόλης Μη παστεριωμένων οίνων (% vol)	Μείωση Αιθανόλης Παστεριωμένων Οίνων (% vol)
<i>M.pulcherrima</i> Με <i>S.cerevisiae</i>	10,18 → με ανακατανάλωση 8,03 τελικός οίνος	9,79 → με ανακατανάλωση 8,67	0,22 → Μετά ανακατανάλωση 2,37	0,61 → Ανακατανάλωση αιθανόλης 1,73
	10,16 → 9,7	9,8 → 8,91	0,24 → 0,7	0,6 → 1,49
<i>H.uvarum</i> με <i>S.cerevisiae</i>	9,51 → 9,5	9,27	0,89 → 0,9	1,13
	9,69 → 9,61	9,66	0,71 → 0,79	0,74
<i>H.guilliermondii</i> με <i>S.cerevisiae</i>	10 → 7,82	9,72	0,4 → 2,58	0,68
	9,9	9,88	0,5	0,52



Γράφημα 17. Μείωση αιθανόλης στους παραγόμενους οίνους σε σχέση με τον οίνο αναφοράς *S.c.* 10,4 % vol (από παστεριωμένο γλεύκος κα μη).

Γ. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Σύμφωνα με δημοσιευμένα άρθρα (βιβλιογραφική ανασκόπηση), η ποσότητα γλυκερόλης που σχηματίζεται σε οίνους αναφοράς (από στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*) κυμαίνεται μεταξύ 2-11 g/l.. Οι τιμές φαίνεται γενικά να συμφωνούν με τις δημοσιευμένες για λευκούς οίνους, ενώ παρατηρείται πως είναι λίγο αυξημένες κατά 1-2 g/l, ειδικά για το διαδοχικό εμβολιασμό *H.uvarum/S.cerevisiae*.

Πίνακας 57. Συγκεντρώσεις γλυκερόλης σε οίνους από μελέτες ζυμών non-*Saccharomyces* με *S.c.* (σχετική βιβλιογραφία)

Ποικιλία σταφυλιών / Οίνος	Στέλεχος	Γλυκερόλη (g L ⁻¹)	Βιβλιογραφικές Αναφορές
Ερυθρό γλεύκος/ Tempranillo	<i>M. pulcherrima/S.c.</i>	8,2-8,6	Escribano-Viana et al. 2018
Λευκό γλεύκος / Viura, Macabeo		4,8	Escribano et al. 2018
Λευκό γλεύκος/ Chardonnay		5,5-7,8	Canonico et al. 2019

Sangiovese γλεύκος 234 ±7 g/L σάκχαρα		9,8 (S.C. EC1118)	Romani et al. 2020
Mango Οίνος		6,7	Varakumar et al. 2011
		6,53	Comitini et al. 20144
		5,3	Gonzalez-Royo et al. 2014
		6,12	Benito et al. 2015
		8,27	Escribano-Viana et al. 2018
Mango Οίνος		7,6	Varakumar et al.2011
Συνθετικό γλεύκος (220 g/L)	<i>M.p / S.c.EC1118</i>	5,07	Canonico et al. 2016
Φυσικό γλεύκος (202 g/L)		5,88	
Ερυθρό γλεύκος/ Negromaro	<i>H. uvarum/S.c.</i>	5,5	De Benedictis et al. 2011
Συνθετικό γλεύκος		3,5	Contreras et al.2015
Συνθετικό γλεύκος (220 g/L)	<i>H.u./ S.c.EC1118</i>	6,18	Canonico et al. 2016
Φυσικό γλεύκος (202 g/L)		5,88	
Mango Οίνος (αναφοράς)	<i>S. cerevisiae</i>	5,8	Varakumar et al.2011
		6,23	Comitini et al. 2011
		4,7	Gonzalez-Royo et al. 2014
		5,88	Benito et al. 2015
		7,55	Escribano-Viana et al. 2018
Συνθετικό γλεύκος (220 g/L)	<i>S.c.EC1118</i>	5,18 (72h)	Canonico et al. 2016 Canonico et al. 2016
Φυσικό γλεύκος (202 g/L)		5,87 (72h)	

Από τον ανωτέρω πίνακα 57, διαπιστώνεται πως υπάρχει ένα ευρύ φάσμα διαφορετικής παραγωγής γλυκερόλης, **ανάλογα με το στέλεχος ζύμης** και μπορεί να ταξινομηθεί σε παραγωγή χαμηλής, μεσαίας και υψηλής, επιπλέον εξαρτάται από το οίνο ανάλογα αν είναι λευκός η ερυθρός με τον δεύτερο να διαμορφώνει μεγαλύτερη τιμή. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η γλυκερόλη στο κομμάτι των μικροοινοποιήσεων κυμάνθηκε περίπου 7,1-8,7 g/l και θεωρείται υψηλή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα σχετικών ερευνών που κοινοποιούνται στον ανωτέρω πίνακα (57), οι τιμές παραγόμενης γλυκερόλης του παρόντος πειράματος, τις υπερβαίνουν σχεδόν όλες. Τη μέγιστη συγκέντρωση γλυκερόλης, την παρουσίασε το διαδοχικό εμβόλιο *H.uvarum* και *Saccharomyces cerevisiae* σε μη παστεριωμένο γλεύκος, με το μέγιστο να ισούται με 8,7 g/L. Όσον αφορά στην σύνθεση της γλυκερόλης από τις ζύμες, παρατηρήθηκε ότι άρχισε η παραγωγή της, με την κατανάλωση των σακχάρων. Δεδομένου ότι η παραγωγή γλυκερόλης συνδέεται στενά με τη διαθεσιμότητα των ζυμώσιμων σακχάρων που βρίσκονται στα γλεύκη, αυτή αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου (Prior et al. 2000, Arroyo-López et al.2010, Eglinton et al. 2002, Gawel et al. 2007, Pickering et al. 2005, Goold et al. Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines, 2017, Ivit et al. The Effect of Non-Saccharomyces and Saccharomyces Non-Cerevisiae Yeasts on Ethanol and Glycerol Levels in Wine, 2020, Nieuwoudt et al. South African wines – *M.pulcheerima*, et al. 2002, Nissen et al. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. Yeast, 2000, Scanes et

al. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine, 1998, Zironi et al. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts, 2008) όπως και συνέβη στη συγκεκριμένη μελέτη με τη διαφορά που παρατηρήθηκε στη ζύμωση υποστρώματος γλυκόζης 70g/l και γλεύκους με με 3,5 φορές περισσότερη ποσότητα σακχάρων. Στις μονοκαλλιέργειες, μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφάνισε η ζύμη *H.uvarum* 3,43g/l που θεωρείται οριακά μέτρια. Ανακατανάλωση γλυκόζης, μετά από την ανακατανάλωση της αιθανόλης συνέβη σε ορισμένες ζυμώσεις, όταν η ποσότητα των σακχάρων του γλεύκους λαμβανε τέλος και δεν υπήρχε άλλη διαθέσιμη πηγή άνθρακα για τις ζύμες.

Δ. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Πίνακας 58. Βιβλιογραφικές αναφορές παραγωγής αιθανόλης από διάφορα στελέχη του *S. cerevisiae*.

Μικροοργανισμός	Πηγή Άνθρακα (g/l)	Αιθανόλη (g/L)	YEthOH/Scon (g/g)	Αναφορά
<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	grape must (S ₀ =240 g/L)	119,2	0,49	Sarris et al., 2009
<i>S. cerevisiae</i>	White must (S ₀ =200 g/L)	89,60	0,45	Torija et al., 2003
<i>S. cerevisiae</i> 2399	Glucose (S ₀ =31.6 g/L)	13,70	-	Yu and Zhang, 2004
Immobilization of <i>S. cerevisiae</i> 24860	Glucose (S ₀ =150 g/L)	47,0	-	Najafpour et al.,2004
<i>S. cerevisiae</i> Pz90	Glucose (S ₀ =300 g/L)	103,00	-	Bafrcova et al.,1999
<i>S. cerevisiae</i> BCRC 21812	Glucose (S ₀ =260 g/L)	115,00	0,45	Chang, et al., 2018
<i>S. cerevisiae</i> UG 5	Glucose (S ₀ 100 g/L)	125,00	0,45	Strehaiano and Goma 1983
<i>S. cerevisiae</i> SCI	Sugar (S ₀ =100 g/L)	46,10	0,46	Maziar 2010
<i>S. cerevisiae</i>	Spent coffee grounds (SCG) (S ₀ =100 g/L)	11,70	0,26	Mussatto et al., 2012
<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	Molasses + OMW 0% (S ₀ =100 g/L)	37,30	0,44	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	Molasses + OMW 10% (S ₀ =100 g/L)	34,30	0,40	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	Molasses + OMW 20% (S ₀ =100 g/L)	33,90	0,41	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	Molasses + OMW 30% (S ₀ =100 g/L)	31,00	0,35	Sarris et al., 2014

<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	Molasses + OMW 40% (S ₀ =100 g/L)	28,40	0,35	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	Molasses OMW 50% (S ₀ =100 g/L)	24,20	0,27	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Cane molasses	80,0 – 100,0	0,45	Claassen et al., 1999
<i>S. cerevisiae</i>	SCG	11,7	0,26	Mussatto et al., 2012
<i>S. cerevisiae</i>	Cane molasses	53,7 - 98,1	0,41	Echegaray et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i>	Cane molasses	89,3 – 92,0	0,41	Morimura et al., 1997
<i>S. cerevisiae</i>	Cane molasses	30,0 – 70,0	0,48	Kosaric & Velikonjia 1995
<i>S. cerevisiae</i>	Molasses	37,3	0,44	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 10%	34,3	0,4	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 20%	33,9	0,41	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 30%	31,0	0,35	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 40%	28,4	0,35	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 50%	24,2	0,27	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Mol + OMW 20%	44,4	0,49	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i>	Γλυκόζη (60 g/l)	21,2	0,38	Αντωνάτου, 2017
<i>S. cerevisiae</i>	Glc +Fru (30+30g/l)	22,2	0,41	Αντωνάτου, 2017
<i>S.c.</i> Y35	104,08	30,14	0,45	Μπασά, 2020
<i>S.c.</i> Y35	247,7	40,84	0,25	Μπασά, 2020
<i>S.c.</i> Y25	104,08	26,58	0,47	Μπασά, 2020
<i>S.c.</i> Y25	247,7	47,42	0,29	Μπασά, 2020
<i>S.c.</i> Y54	117,36	40,93	0,36	Μπασά, 2020
<i>S.c.</i> Y54	226,16	68,00	0,37	Μπασά, 2020

<i>S.c.Y10</i>	121,79	30,44	0,39	Μπασά, 2020
<i>S.c.Y10</i>	226,16	40,02	0,30	Μπασά, 2020
<i>S.c.Symphony</i>	238,74	73,01	0,30	Μπασά, 2020
<i>S.c.Passion fruit</i>	200,55	91,11	0,45	Μπασά, 2020
<i>S.c.Cross X</i>	178,56	82,18	0,46	Μπασά, 2020
<i>S. cerevisiae Y54</i>	Grape must assyrtiko (221,5 g/l)	102,79	0,48	Μπασά, 2020
<i>S.cerevisiae passion fruit</i>	Grape must assyrtiko (221,5 g/l)	102,71	0,49	Μπασά, 2020
<i>S.cerevisiae</i>		139,3		Comitini et al. 2011
<i>S.cerevisiae</i>		107		Conzalez-Royo et al. 2014
<i>S.cerevisiae</i>		138		Benito et al. 2015
<i>S.cerevisiae</i>		125		Chen et al. 2018
<i>S.cerevisiae</i>		143		Escribano- Viana et al. 2018
<i>S.cerevisiae</i>		130		Ruiz et al. 2018
<i>S.cerevisiae</i>		132		Dytraive et al. 2019
<i>S. cerevisiae EC1118</i>	202 g/l φυσικό γλεύκος	120,6		Canonico et al. 2016
<i>S. cerevisiae EC1118</i>	220g/l συνθετικό γλεύκος	123,6		
<i>S.cerevisiae</i>	Γλεύκος μάνγκο	119		Varakumar et al. 2011

Παρατίθεται πίνακας (58) με πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών που πραγματοποιούνται την παραγωγή αιθανόλης σε μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, συγκεκριμένων στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* που εκτελούν την αλκοολική ζύμωση, σε σχέση με το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (πηγή άνθρακα) από αντίστοιχες δημοσιευμένες εργασίες. Η μέγιστη τιμή, παρουσιάζεται για το στέλεχος *S. cerevisiae* UG 5, σε υπόστρωμα γλυκόζης 100g/l με 125 g/l αιθανόλη και η ελάχιστη για το στέλεχος *S. cerevisiae* MAK-1, με θρεπτικό μέσο τη μελάσα 100g/l και παραγόμενη αιθανόλη 24,2 g/l.

Επόμενος, φαίνεται πως υπάρχουν τεράστιες διαφορές στη ζυμωτική ικανότητα ακόμα και των σακχαρομυκήτων με εμφανώς μεγάλο εύρος. Όσον αφορά τις αλκοολικές ζυμώσεις που λαμβάνουν χώρα σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα, δεν έχουν την ίδια απόδοση σε σχέση με αυτές που πραγματοποιούνται σε γλεύκος. Αναφέρεται ξεκάθαρα στις παρατηρήσεις αντίστοιχων δημοσιεύσεων. Τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας, όσον αφορά τη δράση του *Sc.rhone* 104,04 g/l δείχνουν να συμφωνούν περισσότερο με την εργασία της Μπασά, καθώς το πείραμα οινοποίησης πραγματοποιήθηκε με γλεύκος ασύρτικο Σπάτων, τρύγου της αμέσως επόμενης χρονιάς. Συγκεκριμένα, οι τιμές που αναφέρθηκαν για ζύμωση ασύρτικου (με συγκέντρωση σακχάρων 221,5 g/l) για τον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* Y54 ήταν 102,79 g/l παραγόμενη αιθανόλη και για τον *S.cerevisiae* passion fruit 102,71 g/l. Η τιμή της αιθανόλης στον τελικό οίνο εξαρτάται και διαμορφώνεται από τη ποσότητα σε σάκχαρα του διαθέσιμου θρεπτικού μέσου και αυξάνεται όσο αυξάνεται η ποσότητα σε αυτό μέχρι ενός ανωτάτου ορίου.

Πίνακας 59 . Βιβλιογραφικές αναφορές παραγωγής αιθανόλης από διάφορα στελέχη *M.pulcherrima*

Μικροοργανισμός	Πηγή Άνθρακα (g/l)	Αιθανόλη (g/L)	YEthOH/Scon (g/g)	Αναφορά
<i>M. pulcherrima</i>	Γλυκόζη (60 g/l)	17,4	0,32	Αντωνάτου, 2017
<i>M. pulcherrima</i>	Glc + Fru (30+30 g/l)	17,1	0,28	Αντωνάτου, 2017

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της ζύμης *M.pulcherrima*, σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης (80g/l), σε σύγκριση με αυτά της Αντωνάτου (60 g/l), είναι παρόμοια, καθώς πρόκειται για το ίδιο ακριβώς στέλεχος. Επομένως επαληθεύεται η τιμή της παραγόμενης αιθανόλης 16,39 g/l στις 18 h. με κατανάλωση γλυκόζης ίση με 59,64g/l και με συντελεστή YEthOH/Scon 0,399 (πίνακας 23 και πίνακας 59).

Πίνακας 60. Αντοχή *M.pulcherrima* σε αλκοολικές ζυμώσεις.

Αιθανόλη % (v/v)	Εμβολιασμός με στέλεχος	Βιβλιογραφική αναφορά
3,8	<i>M.pulcherrima</i>	Varakumar et al. 2011
4	<i>M.pulcherrima</i>	Herraiz et al.1990, Fleet et al. 1993, Ciani et al. 1995
2-3	<i>M.pulcherrima</i>	Kunkee et al.1970
6-7	<i>M.pulcherrima</i>	Combina et al.2005, Parapouli et al.2010

Η άγρια ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* φαίνεται να είναι λιγότερο ανεκτική στην αιθανόλη και ανίκανη να επιβιώσει σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, μερικές βιβλιογραφικές αναφορές παραδειγμάτων είναι καταχωρημένες στον ανωτέρω πίνακα (60).

Ε. ΣΥΓΚΡΙΣΕΙΣ ΜΕΙΩΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΣΕ ΓΛΕΥΚΗ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ ΜΕΙΩΣΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΣΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

Ο σακχαρομύκητας του οίνου, *S. cerevisiae*, είναι θετικός στο φαινόμενο **Crabtree**, που σημαίνει ότι παράγει αιθανόλη κάθε φορά που υπάρχουν σάκχαρα σε περίσσεια, ακόμη και υπό περίσσεια οξυγόνου (Albergaria et al. 2003) Σε αντίθεση, με το στέλεχος *S. cerevisiae*, το οποίο ευνοεί τον ζυμωτικό μεταβολισμό έναντι της αερόβιας αναπνοής όταν η συγκέντρωση σακχάρου υπερβαίνει τα 10 g/l (λόγω της επίδρασης Crabtree), πολλοί non-Saccharomyces είναι σε θέση να χρησιμοποιούν οξυγόνο για ανάπτυξη ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση σακχάρου (de Deken, 1966) και έτσι, εκτρέπουν τον άνθρακα σε άλλους μεταβολίτες (όπως η ζύμη *H. uvarum*-αρνητική κατά Crabtree) μειώνοντας τον σχηματισμό αιθανόλης (Canonico et al. 2019), (καταναλώνουν σάκχαρο με αναπνοή και όχι με ζύμωση), παράγοντας μέτρια απόδοση αλκοόλης και, μέσω επιθυμητών ενώσεων, μπορούν να επηρεάσουν **θετικά τα αισθητήρια χαρακτηριστικά των οίνων** (Liguori et al. 2018, Tofalo et al. 2016). Επιλογή στελεχών non-Saccharomyces, όπως η άγρια ζύμη *M. pulcherrima*, υπό αερόβιες συνθήκες με σχεδιασμό ενός συστήματος αερισμού, επιτρέπει τη μείωση των επιπέδων αιθανόλης. Ο αερισμός θα πρέπει να λαμβάνει χώρα ελεγχόμενα και συντηρητικά, για την αποφυγή της υπερβολικής οξειδωσης των συστατικών του γλεύκους. (Tofalo et al. 2016). Η ικανότητα του *M. pulcherrima* (σε λευκές ποικιλίες) να μειώνει την τελική περιεκτικότητα σε αιθανόλη μέσω του αναπνευστικού του μεταβολισμού έχει αποδειχθεί με διάφορες μελέτες (Liguori et al. 2018, Ivit et al. 2020) Όπως, επίσης, αρκετές δημοσιευμένες εργασίες, έχουν διερευνήσει τον οξειδωτικό μεταβολισμό που παρατηρείται σε ορισμένα είδη non-Saccharomyces με σκοπό τη μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης στον οίνο (Morales et al., 2015, Rocker et al., 2016). Το στέλεχος ***M. pulcherrima* IFI1244** επιλέχθηκε ως μια αντιπροσωπευτική ζύμη non-Saccharomyces για μείωση της περιεκτικότητας αλκοόλ στον οίνο. Η κατανάλωση των σακχάρων μετά από 48 ώρες ήταν υψηλή για το στέλεχος *M. pulcherrima*, περίπου 100 g / L, παρόλο που ήταν χαμηλότερη από το *S. cerevisiae*, 140 g / L. Υπό αυτές τις πειραματικές συνθήκες, οι διαφορές στις **αποδόσεις αιθανόλης και στα σάκχαρα είναι σαφώς υπέρ του *M. pulcherrima*, 0,20 g / g αντί 0,35 g / g για *S. cerevisiae*. Παρομοίως, η απόδοση οξικού οξέος μετά από 48 ώρες είναι σχεδόν μηδενική, σε αντίθεση *S. cerevisiae* με 0,38 mg / g. (Quiros et al. 2014).** Οι περισσότερες μη συμβατικές ζύμες είναι γενικά ανίκανες να αντιμετωπίσουν τα στρες που υφίστανται και σχετίζονται με την αύξηση συγκέντρωσης αιθανόλης και τη μειωμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, αφήνοντας αζύμωτα σάκχαρα (Jolly et al., 2014). **Σαν λύση προτείνονται διαδοχικοί εμβολιασμοί που χρησιμοποιούν στέλεχη *S. cerevisiae* για να διασφαλιστεί η ολοκλήρωση της ζύμωσης. Σε σχετική μελέτη, το στέλεχος *M. pulcherrima* AWR1149 παρουσίασε βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με πολλά από τα στέλεχη non-Saccharomyces που δοκιμάστηκαν (Contreras et al. 2014), σύμφωνα και με άλλες αναφορές, αλλά έφτασε σε υψηλότερο μέγιστο αριθμό κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι οι συνθήκες στρες, όπως το οσμωτικό στρες που προκαλείται από υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (Contreras et al. 2014), επηρεάζει τον αρχικό ρυθμό ανάπτυξης non- Saccharomyces, όπως του *M. pulcherrima*, ο οποίος είναι σταθερός, αλλά αργός. Σε διαδοχικό εμβολιασμό γλεύκους, ο πληθυσμός του *M. pulcherrima* μειώθηκε γρήγορα μέσα σε 2 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με *S. cerevisiae* (Contreras et al. 2014). Η ποικιλομορφία των non-Saccharomyces, περιλαμβάνει αύξηση και μείωση της απόδοσης αιθανόλης. **Ορισμένα είδη μπορούν να δώσουν αποδόσεις αιθανόλης παρόμοιες ή υψηλότερες από το *S. cerevisiae*, αλλά πολλά από αυτά συνήθως παρουσιάζουν μειωμένες αποδόσεις αιθανόλης.** (Ciani et al. 2016) Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η οξυγόνωση κατά τη ζύμωση του οινογλεύκους μπορεί να βοηθήσει στην περαιτέρω μείωση των αποδόσεων αιθανόλης μέσω αυτών, συχνά αρνητικών κατά Crabtree ζυμών, non-Saccharomyces. Ωστόσο, οι ζύμες non-Saccharomyces συχνά παρουσιάζουν **χαμηλή ισχύ ζύμωσης** και πρέπει να χρησιμοποιηθούν με *S. cerevisiae* προκειμένου να διασφαλιστεί η κατανάλωση όλων των σακχάρων του γλεύκους και να ολοκληρωθεί η διαδικασία ζύμωσης. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζυμομυκήτων Saccharomyces και non, μπορούν να αξιοποιηθούν για τη **διαμόρφωση του περιεχομένης αιθανόλης**(Ciani and Comitini, 2015, Wang et al., 2015). Δεδομένου ότι οι περισσότερες άγριες ζύμες είναι ευαίσθητες σε συγκεντρώσεις αιθανόλης πάνω από 6-8%, προκειμένου να διατηρηθεί η μικροβιολογική κυριότητα της ζύμωσης και να αποφευχθεί μια «κολλημένη» ή αργή ζύμωση (και συνάμα αλλοίωση του οίνου), η χρήση της αποτελεσματικής ζύμης του οίνου *S. cerevisiae*, **πραγματοποιείται ως είτε διαδοχικός είτε ταυτόχρονος εμβολιασμός** (συνεμβολιασμός). Η εισαγωγή μικτού εμβολιασμού στις συνήθειες πρακτικές οινοποίησης απαιτεί επίσης καλύτερο έλεγχο των παραμέτρων ζύμωσης, προσαρμοσμένες σε κάθε συγκεκριμένο συνδυασμό εκκινητών ζύμης. Ορισμένες**

παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη η αρχική συγκέντρωση σακχάρων του γλεύκους, η περιεκτικότητα θειώδους, η θερμοκρασία, οι ρυθμίσεις του pH, τα επίπεδα εμβολιασμού (και ο χρόνος, για τον διαδοχικό εμβολιασμό), η διατροφή ζύμης –άζωτο κ.ά., και τελικά τα επίπεδα οξυγόνωσης και ο χρόνος, μεταξύ άλλων παραμέτρων που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση γλυκερόλης και αιθανόλης, πρέπει επίσης να ρυθμιστούν και να ελεγχθούν (Ciani et al. 2016)

Στον πίνακα, 61, έγινε μια προσπάθεια καταγραφής των πειραματικών αποτελεσμάτων δημοσιευμένων εργασιών όσον αφορά στη μείωση αιθανόλης σε οίνους με διαδοχικό εμβολιασμό γλεύκους non-Saccharomyces/Saccharomyces και αναλύονται στις ακόλουθες αριθμημένες υποενότητες.

Πίνακας 61. Μείωση της αιθανόλης στους οίνους που παράγονται από μικτές ζυμώσεις με ζύμες non-Saccharomyces και Saccharomyces non-cerevisiae με σακχαρομύκητα S. cerevisiae. (Ivit et al. 2020 και άλλες αναφορές)

Ποικιλία σταφυλιών / τύπος οίνου	Μείωση αιθανόλης % (v/v)	Εμβολιασμός	Βιβλιογραφική αναφορά
Λευκό γλεύκος, Malvasia/Viura	0,8	Διαδοχικός εμβολιασμός με S.cerevisiae (αερισμός)	Tronchoni et al. 2018
Λευκό γλεύκος, Chardonnay	0,9	Διαδοχικός εμβολιασμός με S.cerevisiae	Contreras et al. 2014
Ερυθρό γλεύκος, Shiraz	0,9	Διαδοχικός εμβολιασμός με S.cerevisiae	Contreras et al. 2015a
Shiraz	0,9-1	Διαδοχικός εμβολιασμός M.p./S.c. S.u./S.c.	Contreras et al. 2015
Shiraz	1,6-1,8	Συνεμβολιασμός M.pulcherrima AWRI1149+ S.uvarum AWRI2846 και διαδοχικός εμβολιασμός με S.cerevisiae	
Ερυθρό γλεύκος, Merlot	1,4	M. Pulcherrima AWRI3050 Συνεμβολιασμός με S.cerevisiae	Varela et al. 2017
Συνθετικό γλεύκος 220g/L	1,1-1,3	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima (ακινητοποιημένα κύτταρα) με S.cerevisiae	Canonico et al. 2016
Λευκό γλεύκος, Verdicchio	1,2-1,6 ≈1,46	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima (ακινητοποιημένα κύτταρα) με S.cerevisiae	
Συνθετικό γλεύκος 220g/L	1,35	M. pulcherrima/ S. cerevisiae	
	0,78	H. uvarum/ S. cerevisiae	
Φυσικό γλεύκος 202 g/l	1,0	M. pulcherrima/ S. cerevisiae	
	0,94	H. uvarum/ S. cerevisiae	
Λευκό γλεύκος	0,7-1,6	Διαδοχικός εμβολιασμός (αερισμός)	Canonico et al. 2019

	1,4	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima (ακίνητοποιημένο) και S. cerevisiae	Canonico et al. 2016
	1,21	Διαδοχικός εμβολιασμός H.uvarum (ακίνητοποιημένο) με S.cerevisiae	Canonico et al. 2016
	1,38 (χωρίς αερισμό)	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima με S.cerevisiae	Canonico et al. 2019
	1,6 (αερισμός)		
Ερυθρό γλεύκος, Shiraz	1,6	Διαδοχικός εμβολιασμός με S.cerevisiae	Contreras et al. 2014
Λευκό γλεύκος, Malvasia/Viura	3,7	Διαδοχικός εμβολιασμός με S.cerevisiae (αερισμός)	Morales et al. 2013
Λευκό γλεύκος, Riesling	3,8	Διαδοχικός εμβολιασμός (αερισμός)	Rocker et al. 2016
Ερυθρό γλεύκος, Pinotage	0,8	Διαδοχικός εμβολιασμός με S.cerevisiae	Rossouw et al. 2017
Λευκό γλεύκος (με μεγαλύτερες μειώσεις στο συνθετικό CDGJM)	0,6-1,2	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima No2 με S.cerevisiae	Hranilovic et al. 2020
	0,9	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima με S.cerevisiae	Puskas et al.2019
μείωση αιθανόλης σε συνθετικό γλεύκος			
Λευκό γλεύκος Malvar (230 g/l)	1,25	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima CLI 68 με S. cerevisiae	Garcia et al. 2020
	0,84	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima CLI 460 με S.cerevisiae	
	Μέχρι 1,5	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima με S.cerevisiae	Quiros et al. 2014 Rocker et al. 2016 Varela et al.2016 Shekhawat et al. 2017
11,9 S.cerevisiae 3,8 M.p. 11,4 M.p./S.c.	0,5	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima με S.cerevisiae	Varakumar et al. 2011
	0,06	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima με S.cerevisiae	Comitini et al. 2011
	0,1	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima με S.cerevisiae	Conzalez-Royo et al. 2014
	0,18	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima με S.cerevisiae	Benito et al. 2015
	0,15	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima με S.cerevisiae	Escribano-

			Viana et al. 2018
	0,62	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima με S.cerevisiae	Ruiz et al. 2018
	0,22	Διαδοχικός εμβολιασμός M.pulcherrima με S.cerevisiae	Dytraive et al. 2019

1. ΠΡΟΤΑΣΗ ΓΙΑ ΜΕΙΩΣΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ: ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΓΡΙΩΝ ΖΥΜΩΝ ΩΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΩΝ

Φέρεται πως πολλά είδη ζύμης *non-Saccharomyces* έχουν ικανότητα να παράγουν οίνους με χαμηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης όταν χρησιμοποιούνται με διαδοχικό εμβολιασμό σε ζυμώσεις οινογλεύκου, ακόμα και υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων, με ένα στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*, σε σύγκριση με τους οίνους αναφοράς, οι οποίοι παράγονται με εμβόλιο εκκίνησης σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*. (Canonico et al., 2016, 2019 Ciani et al., 2016, Contreras et al., 2014, 2015, Loira et al., 2014, Quiros et κ.λπ., 2014). Σε εργασία των Varela et al. (2017), προέκυψαν πειραματικοί ερυθροί οίνοι με μειωμένη αλκοόλη από *M. pulcherrima* AWRI3050 σε διαδοχικό εμβολιασμό με *Saccharomyces cerevisiae*. Η μελέτη αυτή επέκτεινε προηγούμενες εργασίες, οι οποίες διερεύνησαν τη χρήση μη συμβατικών ζυμών για την παραγωγή οίνου με μειωμένη συγκέντρωση αιθανόλης (Contreras, Curtin, et al., 2015, Contreras et al., 2014, Varela et al., 2016). Επιπρόσθετα, πείραμα συνεμβολιασμού εκκίνησης ζύμωσης *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces non-cerevisiae* με διαδοχικό εμβολιασμό με *S.cerevisiae*, κατάφερε να συμβάλλει συνεργιστικά στη μείωση παραγόμενης αιθανόλης (Contreras et al.2015) και επιπλέον, παρατηρήθηκαν, υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης (και ηλεκτρικού οξέος) σε σύγκριση με οίνους από *S. cerevisiae*. Επομένως, από αυτό το πείραμα οινοποίησης, αποδεικνύεται ότι η γηγενής μικροχλωρίδα του σταφυλιού μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα του *M. pulcherrima* προς περαιτέρω μείωση των αποδόσεων αιθανόλης. (Contreras et al. 2015). Το πείραμα σε πραγματικές συνθήκες έδειξε ότι τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces* δεν ήταν αρκετά αποτελεσματικά στη μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης των οίνων, λόγω αλληλεπιδράσεων και ανταγωνιστικότητας με τους αυτόχθονες πληθυσμούς ζυμών του γλεύκου. (Puškaš et al. 2019). Τέλος, η διαχείριση του αζώτου είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την επίτευξη μείωσης της αιθανόλης, η οποία έχει επισημανθεί από συγγραφείς σε προηγούμενες μελέτες (Ivit et al. 2020). Συμπερασματικά, οι ερευνητές, αποφάνθηκαν, πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζυμομυκήτων *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces*, μπορούν να αξιοποιηθούν για τη διαμόρφωση του περιεχομένου της αιθανόλης στον οίνο, ενισχύοντας παράλληλα το αρωματικό προφίλ του (Ciani and Comitini, 2015, Wang et al., 2015).

2. ΠΡΟΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ ΧΡΟΝΟΥ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ: ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Χρησιμοποιώντας ως εκκινητές σε διαδοχικό εμβολιασμό επιλεγμένα στελέχη *non-Saccharomyces*, επιτεύχθηκε μείωση αιθανόλης, αλλά παρουσιάστηκε παρατεταμένος χρόνος καθυστέρησης του δεύτερου εμβολιασμού (όπως συνέβη στο παρόν πείραμα κατά τον Γ' κύκλο οινοποίησης παστεριωμένου γλεύκου με εμβόλιο-καλλιέργεια εκκίνησης *M.pulcherrima*) και αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν και με άλλα προγενέστερες μελέτες (Contreras et al., 2014, Quirós et al. , 2014). Η έρευνα Hranilovica (2020) και των επιστημονικών συνεργατών, περιγράφει την επιλογή και τον ενδεδειγμένο χαρακτηρισμό ενός *M. Pulcherrima* στέλεχους προς παραγωγή λευκών ξηρών οίνων χαμηλού επιπέδου αιθανόλης με διαδοχικές ζυμώσεις με *S. cerevisiae*. Ανάλογα με το χρόνο εμβολιασμού του *non-Saccharomyces*, *M.pulcherrima* No2, η μείωση διπλασιάζεται και με ταυτόχρονη αύξηση της γλυκερόλης. Επομένως ο χρόνος αυτός αποτελεί σημαντικό παράγοντα μείωσης της αιθανόλης. Οι Maturano et al. (2019) μελέτησαν δύο ζύμες *non-Saccharomyces*, μια εκ των οποίων, η *H. uvarum* με διαδοχικό εμβολιασμό με *S. cerevisiae* σε γλευκος Malbec. Η υψηλότερη μείωση αιθανόλης επιτεύχθηκε με το στέλεχος *H. uvarum* με μέγεθος εμβολίου 5×10^6 κύτταρα / ml και καθυστέρηση 48 - 37 λεπτά πριν λάβει χώρα και ο δεύτερος εμβολιασμός *S. cerevisiae* με θερμοκρασία ζύμωσης 25 °C. Η μελέτη έδειξε ότι ο χρόνος πριν από τον εμβολιασμό του *S. cerevisiae* επηρέασε την παραγωγή αιθανόλης με χρήση

non-Saccharomyces. Η υψηλή ικανότητα κατανάλωσης σακχάρου του *H. uvarum* μέσω οξειδωτικού μεταβολισμού έχει αναγνωρισθεί ως ο κύριος λόγος. Οπότε, σε ένα διαδοχικό εμβολιασμό για να επιτευχθεί κατανάλωση των μισών σακχάρων του οινογλεύκους από non-Saccharomyces ως εκκινήτη, χρειάζεται μεγάλη καθυστέρηση του δεύτερου εμβολίου με το επιλεγμένο στέλεχος σακχαρομύκητα που θα ολοκληρώσει επιτυχώς την αποζύμωση τους. Συνακολούθως, για τη λύση της μείωσης του ενδιάμεσου χρόνου, διερευνήθηκε η ζύμωση με μικροβιολογική προσέγγιση, χρησιμοποιώντας **ακίνητοποιημένα** επιλεγμένα στελέχη ζυμομυκήτων non-Saccharomyces, όπως *Metschnikowia pulcherrima* και *Hanseniaspora uvarum* ως εκκινήτες, ακολουθούμενα από διαδοχικό εμβολιασμό ελεύθερων κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*. Τα συνολικά αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερος ενθαρρυντικά, διότι οι διαδικασίες ακίνησης επέτρεψαν υψηλούς ρυθμούς εμβολιασμού, με τους συνακόλουθους υψηλούς ρυθμούς αντίδρασης (**μεταβολισμός σακχάρου 50%** σε 3 ημέρες), να αναπληρώνουν την καθυστέρηση του δεύτερου εμβολιασμού με *S. cerevisiae*. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται, επίσης, η πιθανή μόλυνση από την άγρια ιθαγενή μικροχλωρίδα που εμπεριέχεται στο γλεύκος, καθώς η ανταγωνιστικότητα των στελεχών non-Saccharomyces (εκτός από αυτά που εκκρίνουν τοξίνη «killer», όπως η *M. pulcherrima* με την χρωστική πουλχεριμίνη) είναι χαμηλή και τα άγρια στελέχη *S. cerevisiae* μπορούν εύκολα να κυριαρχήσουν στη διαδικασία ζύμωσης υπό πραγματικές συνθήκες οινοποίησης, (Canonico et al. 2016). **Η εφαρμογή διαδοχικών εμβολιασμών με μεγάλες καθυστερήσεις πριν από τον εμβολιασμό *S. cerevisiae* σε οινοποιεία θα μπορούσε πραγματικά να αποδειχθεί δύσκολη, καθότι ανταγωνιστικά εγγενή ή άγρια είδη *S. cerevisiae* που υπάρχουν εκτός από το γλεύκος και στο χώρο του οινοποιείου (δεξαμενές, μηχανήματα, δοχεία κ.ά.) είναι πιθανό να κυριαρχήσουν στη ζύμωση προτού προλάβει να επιτευχθεί ο δεύτερος εμβολιασμός (Ivit et al. 2020) Η διαδοχική ζύμωση επιτρέπει την εκμετάλλευση του μεταβολισμού της ζύμης non-Saccharomyces, ενώ η διαδικασία ακίνησης επιτρέπει υψηλή πυκνότητα κυττάρων.**

3. ΣΥΝΘΗΚΗ ΑΕΡΙΣΜΟΥ: ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Μια επιπλέον σημαντική παράμετρος μείωσης του ποσοστού της αιθανόλης στους παραγόμενους οίνους αποτελεί ο αερισμός. Ο αερισμός μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη και επικράτηση non-Saccharomyces κατά τη ζύμωση του οίνου (το οξυγόνο ευνοεί είτε τις γηγενείς άγριες ζύμες του γλεύκους, είτε ενισχυμένες ως εμβόλιο) (Englezos et al., 2018, Shekhawat et al., 2017), **Η επιλογή στελεχών ζύμης non-Saccharomyces, υπό αερόβιες συνθήκες με σχεδιασμό ενός συστήματος αερισμού επιτρέπει τη μείωση των επιπέδων αιθανόλης. Ο αερισμός, όμως, θα πρέπει να λαμβάνει χώρα συντηρητικά, για την αποφυγή της υπερβολικής οξείδωσης των συστατικών του γλεύκους.** (Tofalo et al. 2016). **Η χρήση διαφόρων ποσοτήτων μικροοξυγόνωσης ως ελεγχόμενος αερισμός, που προστέθηκαν κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης με μικτό εμβολιασμό οδήγησε σε σημαντική μείωση της περιεκτικότητας των οίνων σε αιθανόλη** (Contreras et al., 2015b, Morales et al., 2015).

4. ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΕΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ: ΙΔΙΑ ΜΕΙΩΣΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΜΕ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΜΕΙΩΣΗ ΚΟΣΤΟΥΣ

Διαφορετικές συνθήκες αερισμού μελετήθηκαν σε συνδυασμό με χρήση επιλεγμένου εμβολίου άγριας ζύμης, όπως η *M. pulcherrima* με διαδοχικό εμβολιασμό σακχαρομύκητα σε σύγκριση με προγενέστερη εργασία (Tofalo et al. 2016, Canonico et al. 2019), με χρήση μισής ποσότητας εμβολίου (5% (υγρό v/v)), αντί για 10% επίπεδο εμβολιασμού 10^8 κυττάρων / ml. Η ενέργεια αυτή κατάφερε να **μειώσει σημαντικά το κόστος χρήσης** της εφαρμογής, ενώ διατηρήθηκε η σχετική μείωση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη, σε σύγκριση με το στέλεχος αναφοράς *Saccharomyces cerevisiae*, με ροή αερισμού 20 ml/l/min τις πρώτες 72 ώρες ζύμωσης (Canonico et al. 2019)

5. ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΠΡΟΤΑΣΗ: ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΕΡΙΣΜΟΥ

Στην ερευνητική εργασία των Canonico et al. (2019) τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας σε αιθανόλη υπογράμμισαν ότι η συνδυασμένη χρήση **ακίνητοποιημένων κυττάρων σε μειωμένο επίπεδο εμβολιασμού (5%) και ροή αερισμού 20 ml/l/min** παρήγαγε οίνους μείωση της περιεχόμενης αιθανόλης. Βάσει των ανωτέρω, επιβεβαιώνεται πως η ζύμη *M.*

pulcherrima είναι ένα από τα πολλά υποσχόμενα είδη ζυμομυκήτων για χρήση **ακινήτοποιημένων μορφών με διαδοχικούς εμβολιασμούς γλεύκους για τη μείωση της περιεκτικότητας των παραγόμενων οίνων σε αιθανόλη** (Ciani and Ferraro, 1998, Contreras et al., 2014, 2015, Quirós et al., 2014) Η χρήση όμως υψηλών επιπέδων εμβολιασμού και διαδικασιών ακινήτοποίησης, ωστόσο, έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές αυξήσεις στο κόστος διαχείρισης της διαδικασίας ζύμωσης (Canonico et al. 2016).

ΣΤ. ΜΕΙΩΣΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΜΕ ΣΥΝΑΚΟΛΟΥΘΗ ΑΥΞΗΣΗ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ

Ζύμες non-Saccharomyces, στελέχη των γενών *Hanseniaspora* και *Metschnikowia* αποτελούν το κύριο μέρος γηγενούς μικροχλωρίδας των υγιών ώριμων σταφυλιών και είναι γνωστό ότι κυριαρχούν κατά τα αρχικά στάδια της αυθόρμητης ζύμωσης του οινογλεύκους (Fleet, 2003, Tamang and Fleet, 2009) **διεξάγοντας την αρχική φάση της αλκοολικής ζύμωσης, επηρεάζοντας έτσι τον τελικό χαρακτήρα των οίνων (Vicente et al. 2020), οι οποίες ενδέχεται να παραμείνουν σε άλλα στάδια επηρεάζοντας το στυλ του τελικού προϊόντος** (Liguori et al. 2018). Έπειτα από 1- 2 ημέρες, τα είδη *Saccharomyces*, ειδικότερα το στέλεχος *S. cerevisiae*, το οποίο είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στη μετατροπή του σακχάρου σε αλκοόλ και ανεκτικό σε συνθήκες στρες, αναπτύσσονται, κυριαρχούν και ολοκληρώνουν τη ζύμωση σχηματίζοντας υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, πολλές ενώσεις παράγονται ή μεταβολίζονται από ζύμες που συμβάλλουν στο **άρωμα των οινικών ποτών ή στην αλλοίωσή τους** (Tofalo et al. 2016) Σε ελεγχόμενες ζυμώσεις, χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο **επιλεγμένες καλλιέργειες εκκίνησης του *S. cerevisiae*, αλλά υπάρχει δυνατότητα χρήσης στελεχών non-Saccharomyces ως εκκινήτες σε μικτή καλλιέργεια με *S. cerevisiae* για ζύμωση οινογλεύκους, οι οποίες παρουσιάζουν ταυτόχρονα διττά αποτελέσματα, διότι δεν είναι σε θέση να ολοκληρώσουν τη ζύμωση, ως εκ τούτου η μεταγενέστερη προσθήκη του στελέχους *S. cerevisiae* καθίσταται απαραίτητη.**(Liguori et al. 2018, Tofalo et al. 2016). Η παρουσία αυτών των ζυμών περιορίζεται, όπως και στην αυθόρμητη ζύμωση, κυρίως στο πρώτο μισό της διαδικασίας αλκοολικής ζύμωσης, καθώς αντικαθίστανται γρήγορα από τον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*, ο οποίος έχει μεγαλύτερη ζυμωτική ισχύ, και αρχίζει να κυριαρχεί όταν το επίπεδο αλκοόλης αυξάνεται, και καθίσταται επιλεκτικός παράγοντας, καθότι μόνο μερικές ζύμες παρουσιάζουν υψηλή αντοχή στην αιθανόλη και μπορούν να αντεπεξέλθουν.

Το τρέχον οινολογικό ενδιαφέρον των non-Saccharomyces μικροοργανισμών προκλήθηκε αρχικά από τη θετική συμβολή τους στην αισθητηριακή πολυπλοκότητα ποιοτικών οίνων, μέσω της **παραγωγής αρωματικών ενώσεων** με τη μέθοδο του διαδοχικού εμβολιασμού, χρησιμοποιώντας non-Saccharomyces και Saccharomyces (πίνακας 37). Ως επί το πλείστον, αρκετές ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένες ζύμες non-Saccharomyces, μπορούν να **συμβάλουν θετικά στο άρωμα, στην αισθητική πολυπλοκότητα και στη χρωματική σταθερότητα του προκύπτοντος προϊόντος** (Sadoudi et al., 2012, Viana et al., 2008, 2011). Σε σχετική μελέτη, ο οίνος αναφοράς παραγόμενος από το **στέλεχος *S. cerevisiae* (ως εμβόλιο εκκίνησης σε γλεύκος) παρουσίασε τα χαμηλότερα ποιοτικά οργανοληπτικά** χαρακτηριστικά από ότι σε διαδοχικό εμβολιασμό με non-Saccharomyces (Varakumar et al. 2011). Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών αναφέρει ότι ορισμένα είδη non-Saccharomyces μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση της αιθανόλης, με θετικά στο τελικό άρωμα και γεύση του οίνου κατά το διαδοχικό εμβολιασμό γλεύκους με σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* (Albergaria et al. 2003). Σε εργασία των Varela et al. (2017), προέκυψαν πειραματικοί ερυθροί οίνοι με μειωμένη αλκοόλη από *M. pulcherrima* AWR13050 σε διαδοχικό εμβολιασμό με *Saccharomyces cerevisiae* και **με υψηλές βαθμολογίες για ποιοτικά χαρακτηριστικά και χαμηλές βαθμολογίες για αρνητικά ελαττωματικά χαρακτηριστικά**. Η μελέτη αυτή επεκτείνει προηγούμενες εργασίες, οι οποίες διερεύνησαν τη χρήση μη συμβατικών ζυμών για την παραγωγή οίνου με μειωμένη συγκέντρωση αιθανόλης (Contreras, Curtin, et al., 2015, Contreras et al., 2014, Varela et al., 2016). Η σύνθεση πτητικού αρώματος των οίνων διέφερε σημαντικά μεταξύ τους, υποδηλώνοντας ότι ανάλογα με τον **non-Saccharomyces που χρησιμοποιείται μπορεί να επηρεαστούν τα θετικά χαρακτηριστικά του οίνου**. Στην πραγματικότητα, αυτό έχει παρατηρηθεί σε **διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών και με διαφορετικά είδη non-Saccharomyces** (Benito et al., 2015, Gonzalez-Royo et al., 2015). Πλέον, οι non-Saccharomyces έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη βελτίωση του αρώματος και του προφίλ γεύσης του οίνου (Jolly et al., 2014, Maturano et al., 2012, Maturano et al., 2015) καθώς και για τον έλεγχο της ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας του (Oro et al., 2016, Oro et al., 2014) και είναι καλά τεκμηριωμένο ότι μια ζύμη non-Saccharomyces μπορεί να δώσει **νέους και επιθυμητούς χαρακτήρες στον οίνο, ενώ μπορεί να παραχθούν μεταβολίτες που επηρεάζουν αρνητικά το προφίλ γεύσης του** (Magyar & Toth, 2011). Κατα γενική

ομολογία, οι γηγενείς άγριες ζύμες είναι γνωστό ότι παράγουν **υψηλότερες συγκεντρώσεις ορισμένων ενώσεων ζύμωσης, όπως οξικό οξύ, γλυκερόλη, εστέρες και ακετοΐνη** (Albergaria et al. 2003). Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε οξικό οξύ, οι ζυμομυκήτες non-Saccharomyces γενικά παράγουν αυξημένη ποσότητα (Canonico et al. 2019). **Το οξικό οξύ έχει ξινή και πικρή γεύση και συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0,9 g/L θεωρούνται επιζήμιες για την ποιότητα του οίνου** (Ribéreau-Gayon et al., 2006) Έχει δειχθεί ότι οι υψηλές αναλογίες πυκνότητας κυττάρων μεταξύ ζυμομυκήτων non-Saccharomyces και *S. cerevisiae* σε πειράματα διαδοχικών εμβολιασμών έχουν συσχετιστεί με την παραγωγή ενώσεων, όπως του οξικού αιθυλεστέρα και οξικού οξέος, σε συγκεντρώσεις που θεωρούνται επιζήμιες για την ποιότητα του οίνου. Τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* παράγουν οξικό αιθυλεστέρα συνήθως σε ενδιάμεσες τιμές. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι ένας από τους κύριους εστέρες που παράγονται κατά τη ζύμωση του οίνου, ειδικά από non-Saccharomyces, και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (κάτω από 80 mg/l), προσδίδει ένα φρουτώδες άρωμα, ενώ οι συγκεντρώσεις άνω των 150-170 mg/l σχετίζονται με ανεπιθύμητες οσμές, όπως «ασετόν» και «διαλύτης» (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ NON-SACCHAROMYCES – ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ

Η μείωση του ποσοστού της αιθανόλης στα ανωτέρω πειράματα (σχετική υποεπένδυση) συνάδει τις περισσότερες των περιπτώσεων με αύξηση του αρωματικού προφίλ των παραγόμενων οίνων (Πίνακας 37). Η ζύμωση επιτρέπει ανταλλαγή μεταβολιτών μεταξύ εμβολιασμένων στελεχών, με αποτέλεσμα διακριτά **πηγικά προφίλ σε σχέση με οίνους που έχουν υποστεί ζύμωση με το κάθε στέλεχος χωριστά** (Fleet et al. 2006). Για κάθε στέλεχος ζύμης οινοποίησης, ο αντίκτυπος που έχει στην γεύση και το άρωμα του οίνου είναι κρίσιμης σημασίας. Επομένως, οι μικροβιολόγοι του οίνου αναζητούν μια ζύμη ικανή να μειώσει τη συγκέντρωση της αιθανόλης στον οίνο, βελτιώνοντας παράλληλα τη συνολική του ποιότητα. Εκτός από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται στις αποδόσεις αιθανόλης μεταξύ των στελεχών *S. cerevisiae* (Tilloy et al., 2015), οι προσπάθειες έχουν επεκταθεί ώστε να συμπεριλαμβάνουν την **ποικιλομορφία των ζυμομυκήτων non-Saccharomyces** (Jolly et al. 2014).

Η ευελιξία του *Metschnikowia pulcherrima*, θετική κατά Crabtree ζύμη, έγκειται στην ικανότητά του να ζυμώνει σε συνδυασμό με άλλα είδη ζύμης, καθώς και να ρυθμίζει τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών της ζύμωσης, ώστε να βελτιώσει την οργανοληπτική εικόνα του οίνου. Χαρακτηρίζεται από μια μέση ζυμωτική ισχύ και μια υψηλή ενζυματική ικανότητα να απελευθερώνει αρωματικές πρόδρομες ενώσεις από το σταφύλι. Επιπλέον, αυτή η ζύμη έχει δυναμικό παράγοντα βιοελέγχου προκειμένου να περιορίσει τον ανταγωνισμό με άλλες ζύμες στο μέσο ζύμωσης. (Morata et al. 2019). Η φυσιολογία του non-Saccharomyces *Hanseniaspora guilliermondii* μελετήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες σε υπόστρωμα γλυκόζης κλειστής καλλιέργειας και βρέθηκε ότι και αυτή είναι ζύμη **θετική στο φαινόμενο Crabtree με μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, 0,39 h⁻¹**. (Albergaria et al. 2003) Η ερευνητική εργασία των Canonico et al. (2019), έδειξε ότι με τη χρήση **ακίνητοποιημένων επιλεγμένων στελεχών *Metschnikowia pulcherrima* και *Hanseniaspora uvarum*** σε διαδοχική ζύμωση με *S. cerevisiae*, παράγονται οίνοι με μειωμένη περιεκτικότητα σε αιθανόλη και με **ποιοτικό πτητικό προφίλ**.

Σε πείραμα οινοποίησης, των Canonico και συν., το αναλυτικό προφίλ των παραγόμενων οίνων από διαδοχικό εμβολιασμό *M. pulcherrima* και στη συνέχεια *S. cerevisiae*, **δεν έδειξε κανένα αρνητικό χαρακτηριστικό** (οξικός αιθυλεστέρας σε αποδεκτό όριο). Από την άλλη πλευρά, **διαπιστώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης σημαντικών-βασικών φρουτώδων και ανθικών ενώσεων**. (Canonico et al. 2019). Συνακολούθως, οι ερευνητές Contreras et al., έδειξαν ότι τα διαδοχικά εμβολιασμένα γλεύκη Shiraz με *M. pulcherrima* AWR1149 και *S. cerevisiae* AWR11631 έδωσαν **χημικά προφίλ ποιοτικών οίνων**. Συγκεκριμένα, η συνολική συγκέντρωση **ανώτερων αλκοολών ήταν υψηλότερη βέβαια** κάτω των 400 mg/l, οπότε **συνέβαλε θετικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες των οίνων**. Η συνολική **συγκέντρωση πτητικών οξέων μειώθηκε σε σύγκριση με εκείνους τους οίνους που είχαν εμβολιασθεί μόνο με *S. cerevisiae***, ενώ οι συνολικές συγκεντρώσεις εστέρων δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές. Στο Chardonnay, η συνολική **συγκέντρωση εστέρων, με κύριες ενώσεις τον οξικό 2- και 3-μεθυλοβουτυλεστέρα, (190 μg /lt πάνω από το όριο ανίχνευσης) με άρωμα αχλαδιού και μπανάνας**, που αναμένεται να αυξήσει το φρουτώδες άρωμα των οίνων, ενώ ο **οξικός αιθυλεστέρας**, ο οποίος έχει αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά βρέθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα στο Chardonnay (αυξημένη συγκέντρωση και στις δύο ποικιλίες με διαδοχική ζύμωση). Αντίθετα, στον παραγόμενο οίνο Shiraz χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαδοχικό εμβολιασμό βρέθηκε σε σημαντικά μικρότερη ποσότητα (επιθυμητή πολυπλοκότητα). Η **συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών βρέθηκε υψηλότερη** (η 2-μεθυλ προπανόλη και η 2- και 3-μεθυλ βουτανόλη ήταν οι κύριες ενώσεις που ευθύνονται) για τους οίνους που παρήχθησαν από διαδοχικούς

εμβολιασμούς, ενώ η συνολική συγκέντρωση πτητικών οξέων ήταν σημαντικά χαμηλότερη (το 2-μεθυλο προπανοϊκό και εξανοϊκό οξύ ήταν οι κύριοι παράγοντες). Στην περίπτωση του Chardonnay, ανιχνεύθηκε περισσότερη γλυκερόλη και λιγότερο ηλεκτρικό οξύ, ενώ στο το Shiraz, υπήρχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης, ηλεκτρικού και μηλικού οξέος και οξικού αιθυλεστέρα από τον οίνο αναφοράς. Η συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα ήταν 6,5 φορές υψηλότερη στο Chardonnay (σημαντική αύξηση), ενώ ο οξικός 2- και 3-μεθυλοβουτυλεστέρας ήταν οι κύριες ενώσεις υπεύθυνες για την αυξημένη συνολική συγκέντρωση εστέρων. Οι ποσότητες 2-μεθυλο προπανόλης και 2- και 3-μεθυλοβουτανόλης ήταν σημαντικά υψηλότερες σε οίνους που παράγονται με διαδοχικό εμβολιασμό, αυξάνοντας τη συνολική συγκέντρωση υψηλότερων αλκοολών. Αν και τα περισσότερα πτητικά οξέα ήταν παρόντα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε διαδοχικούς οίνους εμβολιασμού, τα 2-μεθυλο προπανοϊκά και εξανοϊκά οξέα ήταν οι κύριες ενώσεις υπεύθυνες για τη χαμηλότερη συνολική συγκέντρωση πτητικών οξέων σε αυτούς τους οίνους. Το παραγόμενο Shiraz (με διαδοχικό εμβολιασμό) είχε σημαντικά λιγότερο οξικό αιθυλεστέρα, επομένως διαπιστώνεται ότι το επίπεδο (επιθυμητή πολυπλοκότητα) παραγωγής οξικού αιθυλεστέρα στις ζυμώσεις οίνου καθορίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, από την ποικιλία σταφυλιών που επιβεβαιώνει την μελέτη των Lilly et al. Συγκεκριμένα, η ζύμη *M. pulcherrima* στο Shiraz ενίσχυσε τις οργανοληπτικές ιδιότητες του, αλλά όχι και στο Chardonnay (Contreras et al. 2014).

Επιπρόσθετα, σε πείραμα ακινητοποίησης των κυττάρων της καλλιέργειας του εμβολίου-εκκινητή σε διαδοχικό εμβολιασμό non-Saccharomyces, *M. Pulcherrima* και *H. uvarum* (ακινητοποιημένα κύτταρα), με *S.cerevisiae* (ελεύθερα κύτταρα), οι παραγόμενοι οίνοι δεν παρουσίασαν μη επιθυμητά προϊόντα ζύμωσης, αλλά μάλλον αύξηση ορισμένων επιθυμητών ενώσεων (Canonico et al., 2016). Συγκεκριμένα, δεν παρουσίασαν αρνητικά χαρακτηριστικά με εξαίρεση τη διαδοχική ζύμωση *H. uvarum* που έδειξε σημαντική ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα (αυτό παρατηρήθηκε και στο παρόν πείραμα γενικά στα στελέχη *Hanseniaspora*, αν και δεν υπήρξε ακινητοποίηση των κυττάρων τους), που επηρεάζει αρνητικά το άρωμα του παραγόμενου οίνου, από την άλλη πλευρά, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση ορισμένων επιθυμητών ενώσεων, όπως γερανιόλη. Σε όλες τις δοκιμές ζύμωσης παρουσιάστηκε περιορισμένη αύξηση της περιεκτικότητας σε ακεταλδεΐδη. (Canonico et al. 2016)

Μια άλλη ομάδα ερευνητών, οι Varakumar et al. (2011), παρουσίασαν αποτελέσματα σύμφωνα με τα οποία υποστηρίχθηκε πως η ελαφριά ανάπτυξη του *M. pulcherrima* στα γλεύκη οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα οξικού οξέος, εστέρων και ανώτερων αλκοολών στον οίνο. Ωστόσο, στη μονοκαλλιέργεια του *M. pulcherrima* παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα, ενώ η παραγωγή γλυκερόλης ήταν μεγαλύτερη στους οίνους με το στέλεχος αυτό. Η παραγωγή πτητικής οξύτητας με εμβόλιο *S. cerevisiae* ήταν 1,28 g / l και δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ως προς τα πτητικά οξέα στην περίπτωση μονοκαλλιέργειών non-Saccharomyces. Η ολική οξύτητα ήταν χαμηλότερη στις ζυμώσεις μικτής καλλιέργειας, ενώ οι μονοκαλλιέργειες παρήγαγαν υψηλότερα επίπεδα με την μονοκαλλιέργεια του *S. cerevisiae* να έχει τη μεγαλύτερη εξ'αυτών (5,5) (Varakumar et al. 2011) Αντίθετα αποτελέσματα, δημοσίευσαν μελέτες που χρησιμοποίησαν ως διαδοχικό εμβολιασμό *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae*, οι οποίες ανέφεραν παραγόμενους οίνους με σημαντική μείωση της πτητικής οξύτητας (οξικό, γαλακτικό, προπανοϊκό και βουτανοϊκό οξύ) (Contreras et al. 2014), παρόλο που το στέλεχος *M. pulcherrima* έχει αναφερθεί ότι αυξάνει την η συγκέντρωση πτητικών ενώσεων στον οίνο. (Contreras et al. 2014). Συνακολούθως, μελετήθηκε η χρήση και άλλων ζυμομυκήτων non-Saccharomyces σε ζυμώσεις γλεύκους σταφυλιών που μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή οίνων με διαφορετικά χημικά προφίλ, τονίζοντας τη σημασία των *Hanseniaspora* ζυμών ως εκκινητών σε μικτές καλλιέργειες με *Saccharomyces cerevisiae*, στην οινοποίηση, οι οποίοι κυριολεκτικά κυριάρχησαν στη ζύμωση μέχρι συγκέντρωση αιθανόλης 6% (v/v) και παρέμειναν σε σημαντικά υψηλά επίπεδα μέχρι την συγκέντρωση της αιθανόλης στα 12,5% (v/v). Το γλεύκος που εμβολιάστηκε αρχικά με *H. guilliermondii* οδήγησε στην παραγωγή οίνου με υψηλότερες συγκεντρώσεις 1-προπανόλης, 2-φαινυλαιθυλ οξικού και 3- (μεθυλθιο) προπιονικού οξέος και χαμηλότερες ποσότητες εξανοϊκού αιθυλεστέρα, πεντανοϊκού οξέος, ελεύθερων λιπαρών οξέων, 2-μεθυλοτετραϋδροθειοφαιν-3-έναν και 3- (μεθυλοθιο) προπυλεστέρας οξικού οξέος, από τον οίνο που προκύπτει από την αυθόρμητη ζύμωση 14 ημερών. (Moreira et al. 2011). Μια διαφορετική μελέτη της επίδρασης του διαδοχικού εμβολιασμού ζυμών non-Saccharomyces και *Saccharomyces cerevisiae* στη σύνθεση και την ποιότητα παραγωγής του βασικού οίνου που προορίζεται για αφρώδη με διαφορετικά χαρακτηριστικά πραγματοποιήθηκε με το στέλεχος *M. pulcherrima* Flavia®, το οποίο αύξησε την ανθεκτικότητα αφρού (Hs) και άλλαξε το αρωματικό προφίλ, αυξάνοντας τις καπνιστές και ανθισμένες νότες του. (Gonzalez-Royo et al. 2014). Τέλος, οίνοι που παράγονται με συνδυασμό των

δύο ως εκκινητών *M. pulcherrima* AWR1149 και *S. uvarum* AWR12846, περιείχαν μέτριες συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα (δίχως να γίνεται αντιληπτό αρνητικά). Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία του *S. uvarum* επηρέασε τον σχηματισμό οξικού αιθυλεστέρα από τον ζυμομύκητα *M. Pulcherrima*, αναστέλλοντας την ανάπτυξη /μεταβολισμό του *M. pulcherrima* πριν συσσωρευτεί οξικός αιθυλεστέρας και οι παραγόμενοι οίνοι δεν εμφάνισαν αυξημένες συγκεντρώσεις πτητικών μεταβολιτών που θεωρούνται επιβλαβείς για τη γεύση και το άρωμα του οίνου (επιτυχημένη εφαρμογή). (Varela et al. 2016). Η μελέτη αυτή δείχνει τα ωφέλη μιας συνεργασίας non-Saccharomyces και Saccharomyces non-cerevisiae.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΕΡΙΣΜΟΥ

Ο αερισμός, με την προσθήκη οξυγόνου κατά τη ζύμωση, μπορεί επίσης να επηρεάσει αρνητικά το οραγμοληπτικό προφίλ του οίνου, με υπερπαραγωγή ανεπιθύμητων πτητικών ενώσεων, όπως το οξικό οξύ και οξικό αιθύλιο (Rocker et al., 2016, Tronchoni et al., 2018). Πράγματι, οι οίνοι που παρήχθησαν με διάφορα στελέχη non-Saccharomyces υπό αερόβιες συνθήκες, έπειτα από αξιολόγηση είχαν αυξημένες αρνητικές οργανοληπτικές βαθμολογίες όσον αφορά τον χαρακτηρισμό «ξύδι» (Rocker et al., 2016). Χρησιμοποιώντας επιλεγμένα στελέχη non-Saccharomyces, επιτεύχθηκε μείωση αιθανόλης, αλλά παρουσιάστηκαν κατά περίπτωση υψηλά επίπεδα οξικού οξέος και αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν και με άλλα προγενέστερες μελέτες (Contreras et al., 2014, Quirós et al., 2014). Διαδοχικοί non-Saccharomyces – Saccharomyces εμβολιασμοί συνοδευόμενοι υπό υψηλούς ρυθμούς ανάδευσης και αερισμού οδήγησαν σε απαράδεκτα υψηλές ποσότητες οξικού οξέος (Quirós et al., 2014, Contreras et al., 2015b, Rocker et al., 2016, 298 Shekhawat et al., 2017). Συγκεκριμένα, οίνοι που έχουν υποστεί ζύμωση με *M. pulcherrima* παρουσίασαν συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα (στο παρόν πείραμα εμφάνισε αυτό το ελάττωμα, αλλά σίγουρα είχε μικρότερη συγκέντρωση από αυτή των εκκινητών *Hanseniaspora*) που ενδέχεται να επηρεάσουν αρνητικά το άρωμα του οίνου. **Η αυξημένη παραγωγή οξικού οξέος ως απόκριση στον αερισμό σε λευκές ποικιλίες, έχει δείχθει ότι επηρεάζεται από τη σύνθεση του θρεπτικού μέσου / γλεύκους και μπορεί να ρυθμίσει ο σχηματισμός του μέσω αυτής.** (Tronchoni et al., 2018). **Το οξυγόνο έχει επίσης αποδειχθεί ότι μεταβάλλει την αναλογία οξικού οξέος προς αιθυλεστέρες και την αναλογία οξέων διακλαδισμένης αλύσου προς λιπαρά μέσης αλυσίδας οξέα** (Varela et al., 2012). Από την άλλη πλευρά, ο αερισμός, επιδρά και θετικά στον εν ζυμώσει γλεύκος με επηθυμητή αύξηση της συγκέντρωσης των εστέρων (Valero et al., 2002) και των ανώτερων αλκοολών (Shekhawat et al., 2017, Valero et al, 2002, Varela et al., 2012). Σε άλλες ερευνητικές εργασίες, παρουσιάζονται λίγο διαφορετικά αποτελέσματα, με την προσθήκη του οξυγόνου να αναφέρεται ότι αυξάνει την συγκέντρωση αιθυλεστέρων, συντελεί στη μείωση της συγκέντρωσης οξικών εστέρων (Bertrand και Torres-311 Alegre, 1984) και μείωση της συγκέντρωσης εστέρων (Fariña et al., 2012) και των ανώτερων αλκοολών (Bertrand and Torres-Alegre, 1984, Fariña et al., 2012). Γλεύκη που έχουν υποστεί ζύμωση με *M. pulcherrima* και *S. uvarum* χαρακτηρίστηκαν από αυξημένες συγκεντρώσεις 2-φαινυλαιθανόλης και οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα, και οι δύο συνδυάζονται με ποιοτικά χαρακτηριστικά στον οίνο. (Varela et al. 2017). Η ερευνητική ομάδα των Hranilovica (2020) έδειξαν ότι σε λευκούς οίνους που παρήχθησαν με εμβόλιο-εκκίνησης *M. pulcherrima* (No2), πως ανάλογα με το χρόνο του δεύτερου εμβολιασμού αυξάνεται η γλυκερόλη, **μειώνεται το οξικό οξύ και επιπλέον ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι οι υψηλές συγκεντρώσεις και αποδόσεις του κύκλου TCA στα προϊόντα (δηλ. φουμαρικό και ηλεκτρικό)**, καθώς και τα μεταβλητά πτητικά προφίλ, χωρίς ανίχνευση φαινομενικών αρωμάτων. Κατά συνέπεια, το επιλεγμένο χαρακτηριστικό στέλεχος **MP2 σε συνδυασμό με το *S. cerevisiae* λειτούργησαν ως μέσα ρύθμισης του επιπέδου της αιθανόλης και εξισορρόπησης του προφίλ γεύσης κατά τη ζύμωση γλεύκους με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα.** Στη μελέτη των Canonico et al. 2019, η συμπεριφορά του *M. pulcherrima* με διαδοχικό εμβολιασμό με σακχαριμύκητα *cerevisiae*, δοκιμάστηκε σε διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης, **υπό διαφορετικές συνθήκες αερισμού, οι οποίες φαίνεται να επηρέασαν το πτητικό αρωματικό προφίλ του οίνου, το οποίο εξαρτάται από το στέλεχος ζύμης. Η περιεκτικότητα σε οξικό οξύ ήταν συγκρίσιμη με αυτή που παρουσίασε του οίνου αναφοράς (*S. cerevisiae*).** Υπάρχει σχηματισμός ξικού αιθυλεστέρας, αλλά και ορισμένων αρωματικών ενώσεων σε αυξημένο ποσοστό, όπως ο **βουτυρικός αιθυλεστέρας και οξικός ισοαμυλεστέρας.** Αυτό σχετίζεται με **τον αερισμό, όπως αναφέρεται από τους Valero et al. και Shekhawat et al., οι οποίοι σε πειράματά τους έδειξαν αύξηση της συγκέντρωσης των εστέρων και των ανώτερων αλκοολών** στον οίνο. Συγκεκριμένα, ο οίνος που παράχθηκε με το στέλεχος *M. pulcherrima* υπό αερισμό 0,05 όγκου αέρα ανά όγκο καλλιέργειας ανά λεπτό (VVM) παρουσίασε **υπερβολική περιεκτικότητα σε οξικό αιθυλεστέρα.** Είναι ενδιαφέρον, ότι αυξημένη συγκεντρώση οξικού οξέος δεν παρατηρήθηκε για αερισμό 0,025 VVM, υποδηλώνοντας **το οξυγόνο οφείλεται για υπερπαραγωγή οξικού**

αιθυλεστέρα. Ο παραγόμενος οίνος είχε αποδεκτό χημικό πτητικό προφίλ. και η περιεκτικότητα σε γλυκερόλη στις 72 ώρες και η πτητική οξύτητα δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές. (Canonico et al. 2019).

Επιπρόσθετα σε άλλη ερευνητική εργασία, μελετήθηκε και διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση οξυγόνου, όσον αφορά την επιρροή του στο σχηματισμό των πτητικών θειολών, 4-μεθυλο-μερκαπτοπενταν-2-όνη (4MMP), cis-3-μερκαπτοεξάν-1-όλη (3MH) και 3-μερκαπτοεξυλ-οξικό οξύ (3MHA) (Coetsee et al., 2013), οι οποίες λειτουργούν ανάλαγα με τη συγκέντρωση τους και θετικά ενισχύοντας την τυπικότητα ορισμένων οίνων.

Υπάρχουν διαφορετικά αποτελέσματα σχετικά με την επίδρασή του οξυγόνου σε διάφορες αρωματικές ενώσεις, λόγω της χρήσης διαφορετικών στελεχών, γλεύκους σταφυλιών και συνθηκών ζύμωσης (αναφέρονται αναλυτικά στην εργασία των Canonico et al. 2019). **Αυτές οι διαφορές μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να οφείλονται στη χρήση διαφορετικών στελεχών, θρεπτικών μέσων και συνθηκών ζύμωσης.**

Στους κάτωθι πίνακες 62-66, αναφέρονται αποτελέσματα ερευνητικών εργασιών που αφορούν στις πτητικές ενώσεις των παραγόμενων οίνων με μικτή καλλιέργεια (συνήθως με τη στρατηγική του διαδοχικού εμβολιασμού) non-Saccharomyces/S.cerevisiae, σε αντιδιαστολή με την καλλιέργεια – οίνο αναφοράς με S.cerevisiae. Τα περισσότερα εξ' αυτών αναφέρονται στη M.pulcherrima, η οποία φαίνεται να έχει απασχολήσει ιδιαίτερα την οινική κοινότητα, αλλά υπάρχουν και στοιχεία για τα άλλα δύο στελέχη Hanseniaspora (πίνακες 63 και 67).

Πίνακας 62 .Τελικές τιμές διαφόρων παραμέτρων ποιότητας οίνου που ελήφθησαν σε διαφορετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκε διαδοχικός εμβολιασμός M. pulcherrima και S. cerevisiae (Mp/ Sc) σε αντιπαραβολή με τα αποτελέσματα οίνου αναφοράς με S. cerevisiae.

Μεταβολίτες	Comintini et al. 2011		Conzalez-Royo et al. 2014		Benito et al. 2015		Chen et al. 2018		Escribano-Viana et al. 2018		Ruiz et al. 2018		Dytraive et al. 2019	
	M.p./S.c.	S.c.	M.p./S.c.	S.c.	M.p./S.c.	S.c.	M.p./S.c.	S.c.	M.p./S.c.	S.c.	M.p./S.c.	S.c.	M.p./S.c.	S.c.
Εμβόλιο														
Μηλικό οξύ (g L-1)	-	-	-	-	-	-	1,7	2	1,87	2,46	1,62	1,83	2,1	2,28
Οξικό οξύ (g L-1)	0,3	0,46	0,21	0,18	0,37	0,38	0,17	0,19	0,11	0,16	0,36	0,39	0,3	0,25
Συνολικά οξέα (g L-1)	6,33	7,05	-	-	-	-	5,2	5,6	-	-	-	-	7	5,8
Ακεταλδεύδη (mg L-1)	41,84	30,48	1,57	2,33	33	53,50	7,94	10,11	-	-	39	54,67	18	13,74
2-φαινυλαιθανόλη (mg L-1)	9,49	12,07	-	-	19,10	24,67	27,82	41,16	64,99	47,8	21,92	17,81	-	-
3-μεθυλ-1-βουτανόλη (mg L-1)	-	-	231	178,6	14,63	16,54	-	-	-	-	96,45	163,85	-	-
Εξανόλη (mg L-1)	0,40	0,38	0,92	0,92	0,72	1,05	4	3,74	1,71	1,82	0,60	1,93	1,28	1,13
Συνολ. ανώτερες Αλκοόλες (mg L-1)	290,23	244,09	311,7	257,4	161,43	208,59	-	-	153,43	-	159,19	236,55	232,23	203,48
Βουτανοϊκός αιθυλεστέρας (mg L-1)	-	-	-	-	0,56	558,92	-	-	-	-	0,18	0,15	0,33	0,43
Εξανοϊκός αιθυλεστέρας (mg L-1)	0,14	0,185	0,68	1,03	1,33	1,21	-	-	-	-	0,57	0,53	1,99	1,88
Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (mg L-1)	0,15	0,38	0,14	0,39	0,68	0,65	-	-	-	-	0,27	0,20	0,55	0,44
Γαλακτικός αιθυλεστέρας (mg L-1)	3,71	7,66	6,78	8,01	8,57	9,76	7,37	10,06	2,57	0,48	-	-	-	-
Οξικός αιθυλεστέρας (mg L-1)	30,42	28,44	19,6	24,40	57,34	75,48	51,20	31,50	-	-	37,64	0,11	115,53	159,18
Οξικός ισοαμυλεστέρας (mg L-1)	0,22	0,26	0,53	0,46	2,44	3,67	8,02	6,61	1,99	2,13	1,15	1,33	-	-

Οξικός 2-φαινυλ-εστέρας (mg L-1)	-	-	1,82	2,37	0,83	0,96	-	-	0,16	0,13	0,34	0,21	0,36	0,43
Συνολική οξικοί εστέρες (mg L-1)	-	-	-	-	61,19	80,73	-	-	2,65	2,26	-	-	120,29	164,23
Συνολ. Εστέρες (mg L-1)	-	-	-	-	73,88	94,33	-	-	-	-	41,26	45,23	124,84	168,45
Εξανοϊκό οξύ (mg L-1)	1,95	0,8	3,75	4,62	12,82	11,98	-	-	-	-	7,09	7,04	11,38	11,13
Οκτανοϊκό οξύ (mg L-1)	1,02	1,05	15,86	20,11	6,55	6,72	-	-	1,87	2,57	5,55	4,84	11,56	11,99
Δεκανοϊκό οξύ (mg L-1)	0,81	0,23	0,3	0,6	2,9	3,1	-	-	-	-	1,09	0,68	4,23	4,21

Πίνακας 63. Κύριες πτητικές ενώσεις παραγόμενων οίνων με διαδοχικό εμβολιασμό, *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* και *H. uvarum*/*S. cerevisiae*σε, αντιπαραβολή με τον οίνο αναφοράς *S.c* (Canonico et al. 2016).

Εμβολιασμοί ζύμωσης/ Πτητικές ενώσεις	<i>S. cerevisiae</i> (οίνος αναφοράς) EC1118	<i>M. pulcherrima</i> / <i>S. cerevisiae</i>	<i>H. uvarum</i> / <i>S. cerevisiae</i>
Πτητική οξύτητα εκφρασμένη σε οξικό οξύ g/L (72h)	0,36-0,56 220g/l συνθετικό γλεύκος 202 g/l φυσικό γλεύκος	0,51-0,58 220g/l συνθετικό γλεύκος 202 g/l φυσικό γλεύκος	0,47-0,67 220g/l συνθετικό γλεύκος 202 g/l φυσικό γλεύκος
Ηλεκτρικό οξύ (g/L) (72h)	0,39-0,52 220g/l συνθετικό γλεύκος 202 g/l φυσικό γλεύκος	0,59-0,60 220g/l συνθετικό γλεύκος 202 g/l φυσικό γλεύκος	0,47-0,56 202 g/l φυσικό γλεύκος 220g/l συνθετικό γλεύκος
Εστέρες			
Βουτυρικός αιθυλεστέρας	0,17	0,21	0,20
Οξικός αιθυλεστέρας	36,94	83,10	195,79
Οξικός αιθυλεστέρας του φαινυλίου	0,043	0,037	0,035
Εξανοϊκός αιθυλεστέρας	0,11	0,10	0,08
Οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	0,089	0,084	0,032
Οξικός ισοαμυλεστέρας	0,20	0,22	0,22
Αλκοόλες			
n-προπανόλη	64,2	36,3	34,5
Ισοβουτανόλη	8,6	4,4	4,2
Αμυλική αλκοόλη	10,2	15,7	10,6
Ισοαμυλική αλκοόλη	99,8	94,9	84,7
β-Φαινύλ-αιθανόλη	30,8	21,0	23,3
Εξανόλη	0,047	0,026	0,27
Καρβονυλικές ενώσεις			
Ακεταλδεύδη	53,3	116,9	112,3
Ακετόϊνη	Not Detected	Not Detected	Not Detected

Λιναλοόλη	0,006	0,005	0,003
Νερόλη	0,217	0,065	0,030
Γερανιόλη	0,188	0,266	0,111

Ο non-Saccharomyces *M.pulcherrima* σε διαδοχικό εμβολιασμό με σακχαρομύκητα παράγει σημαντική ποσότητα γλυκερόλης και γερανιόλη, αλλά όχι αρνητικά προϊόντα, ενώ η ζύμη *H.uvarum* και *H.guilliermondii* παράγουν σημαντική ποσότητα οξικού οξέος.

Πίνακας 64. Παραγωγή πτητικών ενώσεων οίνου μάνγκο με διαδοχικό εμβολιασμό γλεύκους με *M. pulcherrima* και *Saccharomyces cerevisiae* (Varakumar et al, mango wine, 2011).

Διαδοχικός εμβολιασμός	Υψηλότερη παραγωγή σε σχέση με τον οίνο αναφοράς <i>S.c.</i>	Χαμηλότερη παραγωγή σε σχέση με τον οίνο αναφοράς <i>S.c.</i>
<i>M.pulcherrima/S.cerevisiae</i>	Ολικό ποσοστό ανώτερων αλκοολών Ολικό ποσοστό εστέρων Ολικό ποσοστό λακτόνων 3μεθυλο-1βουτανόλη 2-μεθυλοπροπανόλη 2-φαινυλ-ηλεκτρικός διαυθλεστέρας Ισοβαλερικός αιθυλεστέρας Οξικός αιθυλεστέρας Βανίλικός μεθυλεστέρας	Μεθειονόλη Ακεταλδεΐδη Γαλακτικός αιθυλεστέρας Δεκανοϊκό αιθύλιο Οξικός αιθυλεστέρας Οκτανοϊκό αιθύλιο Οξικός βουτυλεστέρας Οξική λιναλοόλη

Πίνακας 65. Πτητικές ενώσεις σε αντιπαραβολή *S.cerevisiae*, *M.pulcherrima*, και διαδοχικός εμβολιασμός γλεύκους μάνγκο *M.p./S.c.* (Varakumar et al, mango wine, 2011).

Πτητικά Συστατικά	<i>S.c.</i>	<i>M.p.</i>	<i>M.p./S.c.</i>
Ακεταλδεΐδη (mg/l)	36,7	12,9	26,5
Οξικός αιθυλεστέρας	57,9	29,7	52,5
n-προπανόλη	17,8	12,6	15,5
Ισοβουτανόλη	41,4	45,1	49,1
Αμυλικές αλκοόλες	242,4	77,1	233,4
Ολικές ανώτερες αλκοόλες	359,7	164,6	350,6

Οι τελικοί οίνοι μικτής καλλιέργειας παρουσίασαν διαφορές στη συγκέντρωση πτητικών. Μείωση της πτητικής οξύτητας από 1,28 έως 0,18 καθώς και της ολικής οξύτητας από 5,5 έως 3,8 (g / l). Αυτά τα χαρακτηριστικά επηρέασαν θετικά τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες. Τα αποτελέσματα υπογράμμισαν τη δυνατότητα χρήσης γηγενών στελεχών ζύμης non-Saccharomyces για την παραγωγή οίνων μάνγκο με βελτιωμένη γεύση.

Πίνακας 66. Συγκέντρωση των κυριότερων πτητικών ενώσεων σε παραγόμενους πειραματικούς οίνους εργαστηριακής κλίμακας (Puskas et al.2020).

Πτητικές ενώσεις	<i>S.c.</i> (οίνος αναφοράς)	Διαδοχικός εμβολιασμός <i>M.p.</i> μετά από 48h με <i>S.c.</i>
Ακεταλδεΐδη	6,5	18
Οξικός αιθυλεστέρας	49	48,2
1-προπανόλη	0,7	1
2μεθυλο-1προπανόλη	11,7	12,2
3μεθυλο-1βουτανόλη	26,4	28,1
1-επτανόλη	10,7	19,5
Φουρφουράλη	0,6	0,8

Βενζαλδεΐδη	48,5	49,5
1-οκτανόλη	22	21,7
1-νονανόλη	5,2	-
1-δεκανόλη	6,2	5,7
Βενζυλική αλκοόλη	10,5	11,2

Το άρωμα είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που καθορίζουν την ποιότητα και αξία ενός οίνου. Είναι ένα μοναδικό μίγμα πτητικών ενώσεων πρωτογενούς, δευτερογενούς και τριτογενούς αρώματος. Οι πιο σημαντικές πτητικές ενώσεις που συντίθενται από τη ζύμη περιλαμβάνουν ανώτερες αλκοόλες, οξικούς εστέρες, αιθυλεστέρες και αλδεύδες.

Πίνακας 67. Πτητικές ενώσεις που παράγονται σε ζυμώσεις με εμβόλιο *Hanseniaspora*. Moreira et al.2008

<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
Οξικοί και αιθυλ- εστέρες	Οξικοί και αιθυλ- εστέρες
Ενώσεις θείου	Βαριές ενώσεις θείου
Ανώτερες αλκοόλες	Ακετόνη
Λιπαρά οξέα	

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές υπογραμμίζουν ότι η **ανάπτυξη ζυμομυκήτων non-Saccharomyces κατά τις πρώτες ημέρες ζύμωσης ενισχύει την παραγωγή επιθυμητών ενώσεων, όπως εστέρων**, και μπορεί να μην έχει αρνητική επίδραση στην παραγωγή ανώτερων αλκοολών και ανεπιθύμητων βαριών ενώσεων θείου. **Αυτό εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες ζύμωσης, το γλεύκος και την επιλογή κατάλληλου non-Saccharomyces.** Η ανάπτυξη άγριων ζυμών μειώνει γενικά τη συνολική περιεκτικότητα σε ανώτερες αλκοόλες στους οίνους, σε σύγκριση με εκείνες που παράγονται από μια καθαρή καλλιέργεια *S. cerevisiae*. Επιπλέον, υψηλότερα επίπεδα οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα λαμβάνονται όταν ο *H. guilliermondii* εμβολιάζεται σε γλεύκη, ενώ το *H. uvarum* αυξάνει την περιεκτικότητα σε οξικό ισοαμυλεστέρα των οίνων. Επιπλέον, παράγονται υψηλές ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα. Ωστόσο, το επίπεδο αυτής της ένωσης μειώθηκε σε μικτές καλλιέργειες ζυμομυκήτων non-Saccharomyces και *S. cerevisiae*. Όταν ο σακχαρομύκητας *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια εκκίνησης, οι οίνοι παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης, 2-φαινυλαιθανόλης και εξανοϊκού αιθυλεστέρα. Σε μικτές καλλιέργειες non-Saccharomyces και *S. cerevisiae*, οι οίνοι παρουσιάζουν ποσότητες μεθειονόλης, οξικού οξέος-3-(μεθυλθιο) προπυλεστέρα, 4-(μεθυλθιο) -1-βουτανόλης, 2-μερκαπτοαιθανόλης και cis-2-μεθυλτετραϋδρο-θειοφαιν-3-ολι παρόμοια με αυτά που παράγονται από μια καθαρή καλλιέργεια του *S. cerevisiae*. Μια αύξηση στις ποσότητες 3-(αιθυλθιο) -1-προπυανόλης, trans-2-μεθυλτετραϋδρο-θειοφαιν-3-όλη και 3-μερκαπτο-1-προπυανόλης μπορεί να επιτευχθεί σε οίνους που παράγονται από μικτές καλλιέργειες με *H. Guilliermondii*, αλλά πάντα σε άμεση εξάρτηση από το γλεύκος και τις συνθήκες.

Πίνακας 68. Απλοποιημένη γενική επισκόπηση σχετικά με τις σχετικές με SO₂ δεσμευτικές καρβονυλικές ενώσεις που υπάρχουν στον οίνο. Υπό πρακτικές συνθήκες, η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται από πολύ χαμηλή έως υψηλή ανάλογα με τη μεταβολική δράση της ζύμης ή άλλων μικροοργανισμών. (Werner et al. 2008)

Καρβονυλική ένωση	Επιπτώσεις στη σύνδεση SO ₂	Προέλευση
Ακεταλδεΐδη	Υψηλή	Μεταβολισμός της ζύμης
Πυροσταφυλικό οξύ	Υψηλή	Μεταβολισμός της ζύμης
2-Κετογλουταρικό οξύ	Υψηλή	Μεταβολισμός της ζύμης
Μείωση σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη κ.ά.)	Υψηλή, εξαρτάται από την συγκέντρωση	Προέλευση από σταφύλια ή με προσθήκη
Γλυκονικό οξύ	Υψηλή	Μικροχλωρίδα σταφυλιών

5-Κετοφρουκτόζη	Υψηλή	Μικροχλωρίδα σταφυλιών
Ξυλοσόνη	Υψηλή	Μικροχλωρίδα σταφυλιών
Προπανάλη	Χαμηλή	Μικροβιακή δραστηριότητα
Βουτανάλη	Χαμηλή	Μικροβιακή δραστηριότητα
Γλυκεροαλδεΰδη	Χαμηλή	Μικροβιακή δραστηριότητα
Ισοβουτυλαλδεΰδη	Χαμηλή	Μικροβιακή δραστηριότητα
Διακετύλιο	Χαμηλή	Μικροβιακή δραστηριότητα

Μια αιτία γρήγορης οξείδωσης του οίνου πέραν της έκθεσής του σε περιβάλλον οξυγόνου, είναι η παραγωγή ουσιών που δεσμεύουν το θειώδη ανυδρίτη (υπολεφάλιο 1.2.4 «θειώδης ανυδρίτης»). Η ακεταλδεΰδη είναι πιθανώς η πιο γνωστή ουσία, επειδή η παρουσία της σε ελεύθερη μορφή επηρεάζει σημαντικά τον οργανοληπτικό χαρακτήρα ενός οίνου. Εάν υπάρχει σε ελεύθερη μορφή, προκαλεί μια «οξειδωτική νότα», η οποία θεωρείται συχνά ως άρωμα. Εκτιμάται μόνο για συγκεκριμένους τύπους οίνων. Εκτός από την ακεταλδεΰδη υπάρχουν πολλές άλλες καρβονυλικές ενώσεις (πίνακας 68) που μπορούν να λειτουργήσουν ως δεσμευτικοί παράγοντες για το SO₂ στον οίνο. Όσο υψηλότερη είναι η συνολική συγκέντρωση των ενώσεων σύνδεσης τόσο χαμηλότερη είναι η ποσότητα του ενεργού ελεύθερου SO₂ στον τελικό οίνο για μια δεδομένη προσθήκη διοξειδίου του θείου. Έρευνες έχουν δείξει ότι η φυσική παραγωγή των τριών ενώσεων σύνδεσης SO₂ ακεταλδεΰδης, πυροσταφυλικού και 2-κετογλουταρικού **εξαρτάται από το στέλεχος ζύμης και από τη σύνθεση του φυσικού γλεύκους**. Όσον αφορά τη θρεπτική σύνθεση του γλεύκους, η θειαμίνη παίζει βασικό ρόλο στο σχηματισμό ενώσεων που δεσμεύουν SO₂.

4.2.2 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΟΙΝΟΥΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ

Ακολουθεί μια συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσης ερευνητικής εργασίας με άλλες δύο (μεταπτυχιακή και διδακτορική διατριβή) που αφορούν τις αρωματικές ενώσεις του ασύρτικου, ως μια **προσπάθεια διερεύνησης των κοινών πτητικών ενώσεων** που ανιχνεύθηκαν, ούτως ώστε να προκύψουν **τα χαρακτηριστικά αρώματα της συγκεκριμένης ποικιλίας και σε δεύτερο πλάνο να μπορέσουν να εξαχθούν πληροφορίες για τη συμβολή των άγριων ζυμών στα αρωματικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου λευκού οίνου**.

Στον κάτωθι πίνακα παρουσιάζεται η ποιοτική καταγραφή όλων των πτητικών αρωματικών ενώσεων, καθώς και περιγραφή των αρωμάτων τους, δειγμάτων οίνου Ασύρτικου. Η οινοποίηση έλαβε χώρα στο ΓΠΑ κατά τα έτη 2012, 2013 με τις ίδιες οινοποιητικές τεχνικές διατηρώντας τις ίδιες συνθήκες) που ανιχνεύθηκαν στους πειραματικούς αυτούς οίνους από τις γεωγραφικές περιοχές της Δράμας, Νεμέας και Σαντορίνης, μέσω της ανάλυσης GC-MS αέριου χρωματογράφου- φασματογράφου μάζας. **Η πλειοψηφία των αρωματικών ενώσεων** (πίνακας 69) που καταγράφηκαν, βρέθηκαν σε όλους σχεδόν τους οίνους, γεγονός που τις κατατάσσει στην σκιαγράφιση του αρωματικού προφίλ της ποικιλίας καθώς φαίνεται να αποτελούν τον κοινό παρονομαστή του αρώματος της ποικιλίας Ασύρτικο **ανεξαρτήτως από την γεωγραφική περιοχή καλλιέργειας και οινοποιητικής τεχνικής**.

Πίνακας 69. Ποιοτική καταγραφή όλων των πτητικών ενώσεων και περιγραφή αρώματος (Διδακτορική διατριβή «Μελέτη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των λευκών οίνων της ποικιλίας Ασύρτικο» Δέσποινα Κεχαγιά, 2019).

ΠΗΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	
Ανώτερες αλκοόλες	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ
1-βουτανόλη	μεθυστική αλκοόλη
1-πεντανόλη	λιπαρή αλκοόλη, γλυκιά αίσθηση
ισοαμυλική αλκοόλη	δριμύς, γλυκό βάλσαμο, φρουτώδη, μπανάνα
3-μεθυλοθειό-1-προπανόλη	βραστά λαχανικά με πικάντικη νότα
1-εξανόλη	πράσινο-χορτώδες
3-έξεν-1-όλη	πράσινο-φυλλώδες, βότανα
1-οκταδεκανόλη	ελαφριά οσμή σαπουνιού
βενζυλική αλκοόλη	ανθικό, τριαντάφυλλο
φαινυλαιθανόλη	ανθικό, τριαντάφυλλο, ροδόνηρο
τυροσόλη	ελαφρά γλυκό, ανθικό, φρουτώδες
δικετονική αλκοόλη	ήπια οσμή, ευχάριστη
3-αιθόξυ 1-προπανόλη	μαύρο φραγκοστάφυλο
2-επτανόλη	εσπεριδοειδή οσμή, φρουτώδη
2-αιθυλ-1-εξανόλη	εσπεριδοειδή, ανθικά
1,2 βουτανοδιόλη	κρεμώδη οσμή βουτύρου
2,3 βουτανοδιόλη	άοσμη, ελαφρά πικρόπικρη γεύση
3-αιθόξυ-1-προπανόλη	μαύρο φραγκοστάφυλο
τρυπτοφόλη	προκαλεί υπνηλία, συστατικό ρητίνης πεύκου
Εστέρες	
γαλακτικός αιθυλεστέρας	βουτυρώδη-καραμέλας, γλυκιά κρεμώδη,βατόμουρο
εξανοϊκός αιθυλεστέρας	φρουτώδες, φράουλα, πράσινο μήλο,άνισο
οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	φρουτώδη, πεπόνι,ανανάς
Λινολεϊκός αιθυλεστέρας	ήπια, λιπαρή, φρουτώδη, ανθικό, φρεσκοκομμένου χόρτο, λεβάντα, περγαμόντο
παλμιτικός αιθυλεστέρας	φρουτώδη, κρεμώδη, γαλακτώδη με βαλσαμική χροιά
ηλεκτρικός αιθυλεστέρας	ήπια, φρουτώδη, μαγειρεμένο μήλο
β-ύδροξυ βουτυρικός αιθυλεστέρας	φρουτώδη, πράσινο, φλούδα μήλου
αιθυλεστέρας ακετυλογλυκίνης	Φρουτώδη
δι-μηλικός αιθυλεστέρας	μαύρη ζάχαρη, γλυκός οίνος, φρουτώδη και βοτανική
Οξικός – 2 - φαινυλαιθυλεστέρας	γλυκό, μέλι,γύρη, ανθικό- ρόδινο
βουτυρικός αιθυλεστέρας	φρουτώδες, ανανά,φράουλα
Οξικός ισοαμυλεστέρας	φρέσκια μπανάνα
ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας	Φράουλά, φρουτώδη οσμή,ανθικό,ρούμι

πυρομικός αιθυλεστέρας	αθηρική, φρουτώδη, γλυκιά με νότες από ρούμι
β-οξικός φαινυλαιθυλεστέρας	γλυκό, μέλι με κακάο, ανθικό, βαλσαμική χροιά
μυριστικός αιθυλεστέρας	γλυκό, κηρώδες, βιολέτα
Οκταδεκανοϊκός αιθυλεστέρας	Κόλιανδρο
<u>Οξέα</u>	
Βουτυρικό οξύ	Ξινή οσμή, βουτυρώδη
Ισοβουτυρικό οξύ	γαλακτοκομικά, βούτυρο
βανιλικό οξύ	γαλακτώδη, γλυκά, φυτό βανίλια
γαλακτικό οξύ	Γαλακτοκομικά
εξανοϊκό οξύ	ξινή, λιπαρή, ιδρωμένο τυρί
οκτανοϊκό οξύ	λιπαρή, κηρώδης, φυτική, τυρί
δεκανοϊκό οξύ	λιπαρή, ξινή, δυσάρεστη
n-νονανοϊκό οξύ	λιπαρή, κηρώδης με αρώματα επεξεργασμένου τυριού
οξικό οξύ	απότομη, πικάντικη, ξινή, ξύδι
μυριστικό οξύ	κηρώδη, λιπαρή, κρεμώδης, σαπουνι καρύδας
εξαδεκανοϊκό οξύ	βαριά κηρώδη, χροιά κεριού, λαρδί και ζωικό λίπος
4-ύδροξυ βουτανικό οξύ	ήπια φρουτώδη, μαγειρεμένο μήλο
δωδεκανοϊκό οξύ	ξηρή, μεταλλική, γεύση από λάδι δάφνης
ελαικό οξύ	λιπαρή, φυτικό έλαιο, λαρδί και ζωικό λίπος
β-φουρικό οξύ	οσμή μελιού
Ισοβαλερικό οξύ	Γαλακτοκομικά, τυρί
<u>Φαινόλες</u>	
2,4 δι-βούτυλο-φαινόλη	Φαινολική
ευγενόλη	Γαρύφαλλο
4 βινύλγουαιακόλη	πικάντικη μπαχαρένια, καπνιστή (μπέικον) ξυλώδη
θυμόλη	θυμάρι, ρίγανη
2-μεθόξυ-4 βινυλοφαινόλη	γαρύφαλλο, καπνιστό μπέικον, πικάντικη, φαινολική
4-((1E)-3-ύδροξυ-1-προπένυλο)-2-μεθόξυφαινόλη	κακάο, κονιάκ, ούισκι με φρουτώδη νότα πράσινου μήλου
<u>Λακτόνες</u>	
γ-βουτυρολακτόνη	κρεμώδη, λιπαρή, ροδάκινο
γ-δεκαλακτόνη	φρουτώδες, ροδάκινο
παντολακτόνη	βαμβάκι, ζαχαρωτό, μαλλί της γριάς
<u>Φουράνια</u>	
Κουμαραν	κηρώδη, λιπαρή κρεμώδη τυριού, πράσινου τσαγιού
<u>Αλδεύδες</u>	
νοναλδεύδη	φρουτώδη, πορτοκάλι
φουρφουράλη	οσμή αμυγδάλου
φαινυλαιθανάλη	πράσινη-ανθική, φρουτώδη, γλυκιά καρύδι

Άλλες ενώσεις	
Ισοβαλερικό γερανύλιο	φρουτώδες, πράσινο μήλο, ανανάς, βατόμουρο

Όλες οι αλκοόλες που ταυτοποιήθηκαν σε οίνους Ασύρτικο παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα 70.

Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής «Μελέτη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των λευκών οίνων της ποικιλίας Ασύρτικο» (Κεχαγιά Δ., 2019), στη δεύτερη στήλη αναγράφονται τα αποτελέσματα της παρούσης ερευνητικής εργασίας (μικροοινοπιήσεις γλεύκους Ασύρτικο Σπάτων με διαδοχικό εμβολιασμό) και τέλος, στην τρίτη στήλη αναδημοσιεύονται τα αποτελέσματα της μεταπτυχιακής διατριβής «Μελέτη της παράγωγης αιθανόλης κατά την αύξηση άγριων και εμπορικών ζυμών σε υποστρώματα προσομοίωσης γλεύκους και έλεγχος της δυνατότητας χρήσης των στελεχών αυτών προς παράγωγή οίνων υψηλής ποιότητας» με μικροοινοπιήσεις από στελέχη σακχαρομύκητα σε γλεύκος ασύρτικο Σπάτων (Μπασά Κ., 2020).

Πίνακας 70. Αλκοόλες που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους οίνους ποικιλίας Ασύρτικο.

ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ (Κεχαγιά, 2019)	ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΠΑΡΟΥΣΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (Μπασά, 2020)
1-βουτανόλη 1-πεντανόλη ισοαμυλική αλκοόλη 3-μεθυλοθείο-1- προπανόλη 1-εξανόλη 3-έξεν-1-όλη 1-οκταδεκανόλη βενζυλική αλκοόλη φαινυλαιθανόλη τυροσόλη δικετονική αλκοόλη 3-αιθόξυ 1-προπανόλη 2-επτανόλη 2-αίθυλ-1-εξανόλη 3-αίθοξυ-1-προπανόλη	1-προπανόλη 2-μεθυλ-1-προπανόλη 1-βουτανόλη 3-μεθυλ-1-βουτανόλη 1-πεντανόλη 3-πεντανόλη 3-μεθυλ-1-πεντανόλη 3-μεθυλ-4-πεντεν-2-όλη 3-αιθυλ-4-μεθυλοπενταν-1-όλη 1-επτανόλη 3-έξεν-1-όλη 1-οκτεν-4-όλη 1-οκτανόλη 3-οκτανόλη 3- (μεθυλθειο) -1-προπανόλη 2,3-διμεθυλ-1-βουτανόλη βενζυλική αλκοόλη φαινυλαιθυλική αλκοόλη	Αιθανόλη 1-προπανόλη 2-μεθυλ-1-προπανόλη, 3-Πεντανόλη 1-βουτανόλη 2-μεθυλ-1-βουτανόλη 3-μεθυλ-1-βουτανόλη 1-Πεντανόλη (S)-(+)-3-μεθυλ-1-πεντανόλη 1-εξανόλη 3-Εξεν-1-όλη, (E) -1-Οκτεν-3-όλη 1-Επτανόλη 2-αιθυλ-1-εξανόλη 2-Νονανόλη 2,3-βουτανοδιόλη, [R- (R *, R *)] -1-οκτανόλη 2,3-βουτανοδιόλη, [S- (R *, R *)] - 3- (Μεθυλθειο) -1- προπανόλη 1-Νονανόλη Φαινυλαιθυλ αλκοόλη 1-Δωδεκανόλη 1-τετραδεκανόλη

Από την πρώτη στήλη του πίνακα 70, μεταξύ οίνων από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και οινοποιητικές τεχνικές (με ίδιο πρωτόκολλο οινοποίησης), οι κοινές χαρακτηριστικές αρωματικές ενώσεις της ποικιλίας (ανεξαρτήτου της προέλευσης των σταφυλιών) από την κατηγορία των αλκοολών είναι αυτή της ισοαμυλικής (ισοπεντυλική) αλκοόλης και της 1-πεντανόλης (άρωμα καυστικό-δριμύ, με γλυκειά αίσθηση), της 3-μεθυλοθείο-1-προπανόλης και της 1-εξανόλης (με αρώματα πράσινα - χορτώδη, βραστών λαχανικών και πικάντικη νότα), της βενζυλικής αλκοόλης και της φαινυλαιθανόλης (με αρώματα ανθικά, τριαντάφυλλου και ροδόκερου) της τυροσόλης με την 2,3 βουτανοδιόλη (αρώματα ανθικά και φρουτώδη με ελαφρά γλυκόπικρη γεύση), η 1 βουτανόλη (μεθυστική αλκοόλη), η 1-πεντανόλη (λιπαρή , γλυκιά αίσθηση), η 1- οκταδεκανόλη (ελαφριά οσμή σαπουνιού), η βενζυλική αλκοόλη (ανθικό άρωμα τριαντάφυλλου), η δικετονική αλκοόλη (με ήπια ευχάριστη οσμή) και η 2-επτανόλη (με φρουτώδη οσμή απο εσπεριδοειδή).

Στη δεύτερη στήλη, που ανήκει στην παρούσα πειραματική οινοποίηση που έλαβε χώρα με γλεύκος ασύρτικο Σπάτων, οι αλκοόλες, οι οποίες ανιχνεύθηκαν κοινές σε όλους τους παραγόμενους οίνους, είναι οι κάτωθι:

1-προπανόλη, 2-μεθυλο-1-προπανόλη, **1-βουτανόλη**, 3-μεθυλο-1-βουτανόλη, 3-μεθυλο-1-πεντανόλη, 1-επτανόλη, 1-οκταν-4-όλη, 1-οκτανόλη (με αρώματα αλκοόλ, ούισκι, φρουτώδη, μπανάνα, πικάντικα, κονιάκ, κρασί, κακάο, πράσινο φρούτο, μπαγιάτικο, φυλλώδες, πράσινο, λαχανικό, μήλο, καρύδα, λιπαρότητα, κερι, εσπεριδοειδή, αλδεΐδικός, ανθικός, γλυκιά μυρωδιά) και **3-μέθυλοθειο-1-προπανόλη και φαινυλαιθανόλη**. Εκ των οποίων, η **1-βουτανόλη και οι δύο τελευταίες με αρώματα μεθυστικής αλκοόλης, πράσινα - χορτώδη, βραστών λαχανικών, πικάντικη νότα και ανθικά, τριαντάφυλλου και ροδόκερου**, βρέθηκαν κοινές σε όλους τους παραγόμενους οίνους του παρόντος οινοποιητικού πειράματος με αυτούς της διδακτορικής διατριβής που μελέτησε οίνους ασύρτικο από διάφορες περιοχές της Ελλάδος και της μεταπτυχιακής διατριβής. Τέλος, όσον αφορά την συγκρινόμενη μεταπτυχιακή εργασία, επιπλέον κοινές ενώσεις σε όλους τους πειραματικούς οίνους με την παρούσα ερευνητική εργασία βρέθηκαν να είναι η **1-προπανόλη, 1-επτανόλη και η 1-βουτανόλη. Με αρώματα όπως αλκοολούχας ζύμωσης, τεκίλας, γλεύκου, ζυμών, γλυκό φρουτώδες, αχλαδιού και μήλου, λιπαρού, γλυκού βαλσάμικου, ούισκι, μπαγιάτικου, πικάντικου, πράσινου φυλλώδες, λαχανικών και μπανάνας.**

Από την **τρίτη στήλη**, οι περισσότερες αλκοόλες ταυτοποιήθηκαν ως κοινές και στους δύο παραγόμενους πειραματικούς οίνους με διαφορετικό εμβόλιο σακχαρομύκητα (Ασύρτικο εμβολιασμένο με *Saccharomyces cerevisiae* Y54 και Ασύρτικο εμβολιασμένο με *Saccharomyces cerevisiae* Passion Fruit), εκτός των δύο: 2-μεθυλο-1-βουτανόλη και 1-Πεντανόλη.

Πίνακας 71. Εστέρες που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους οίνους ποικιλίας Ασύρτικο.

ΕΣΤΕΡΕΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ (Κεχαγιά, 2019)	ΕΣΤΕΡΕΣ ΠΑΡΟΥΣΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	ΕΣΤΕΡΕΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (Μπασά, 2020)
γαλακτικός αιθυλεστέρας εξανοϊκός αιθυλεστέρας οκτανοϊκός αιθυλεστέρας Λινολεϊκός αιθυλεστέρας παλμιτικός αιθυλεστέρας ηλεκτρικός αιθυλεστέρας β-ύδροξυ βουτυρικός αιθυλεστέρας αιθυλεστέρας ακετυλογλυκίνης δι-μηλικός αιθυλεστέρας Οξικός - 2 - φαινυλαιθυλεστέρας βουτυρικός αιθυλεστέρας Οξικός ισοαμυλεστέρας ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας πυρομικός αιθυλεστέρας β-οξικός φαινυλαιθυλεστέρας μυριστικός αιθυλεστέρας Οκταδεκανοϊκός αιθυλεστέρας	οξικός αιθυλεστέρας οξικός μεθυλεστέρας προπανοϊκός αιθυλεστέρας προπανοϊκός 2-μεθυλο- αιθυλεστέρας Βουτανοϊκός αιθυλεστέρας οξικό ισοβουτύλιο μυρμηκικός-1-μεθυλαιθυλ εστέρας 3-μεθυλο-οξική 1-βουτανόλη εξανοϊκός αιθυλεστέρας Προπανοϊκό 4-πεντεν-1-όλη οκτανοϊκός αιθυλεστέρας δεκανοϊκός αιθυλεστέρας οξικός 2-φαινυλαιθυλ εστέρας βουτανοϊκός-2- μεθυλβουτυλεστέρας 8-μη νονικός αιθυλεστέρας δαιθυλεστέρας βουτανοδιοϊκού οξέος 1,3-προπανοδιόλη, διοξική μυρμηκικός οκτυλεστέρας βουτανοϊκός 3-μεθυλο- αιθυλεστέρας μυρμηκικός επτύλιος εστέρας ηλεκτρικός αιθυλεστέρας Οξικός 1- αιθυλοπροπυλεστέρας προπανοϊκός 2-υδροξυ- αιθυλεστέρας 5-οξοτετραϋδροφουραν-2- καρβοξυλικός αιθυλεστέρας φθαλικό δαιθυλεστέρας φθαλικό διβουτύλιο φθαλικό οξύ, 2- πεντυλεστέρας βουτυλίου	Οξικός αιθυλεστέρας οξικό η-προπύλιο Οξικό ισοβουτύλιο Οξικός ισοαμυλεστέρας Οξικό εξύλιο 3-Εξεν-1-όλη, οξική, (E) - 3-Εξεν-1-όλη, οξική, (Z) - Γαλακτικός αιθυλεστέρας Οκτανοϊκός αιθυλεστέρας Οξικός κίτρονευλεστέρας, 3,7οξική διμεθυλο- 6-Οκτεν-1- όλη Ηλεκτρικός δαιθυλεστέρας 9-δεσενοϊκό αιθύλιο Οξικό γερανύλιο Οξικός οξύμεθυλεστέρας Προπανοϊκός οξύαιθυλεστέρας βουτανοϊκός οξύαιθυλεστέρας 3-μέθυλο-βουτανοϊκό οξύ αιθυλεστέρας εξανοϊκό οξύ, αιθυλεστέρας 3-Εξενικό οξύ, αιθυλεστέρας επτανοϊκό οξύ, αιθυλεστέρας προπανοϊκό οξύ, 2-υδροξυ- αιθυλεστέρας οξικό οξύ επτύλεστέρας Οκτανοϊκό οξύ, μεθυλεστέρας 7-Οκτενοϊκό οξύ, αιθυλεστέρας Νονανοϊκό οξύ, αιθυλεστέρας Δεκανοϊκό οξύ-μεθυλεστέρας Δεκανοϊκό οξύ-αιθυλεστέρας Οκτανοϊκό οξύ, 3- μεθυλβουτυλεστέρας Βουτανοδιοϊκό οξύ, δαιθυλεστέρας

	ηλεκτρικός βουτυλο-2-φαινυλαιθυλεστέρας πεντανοϊκός-3-υδροξυ-αιθυλεστέρας βουτανιοϊκός αιθυλ 3-μεθυλβουτυλεστέρας αιθυλεστέρας του p-υδροξυκινναμικού οξέος	Οξικό οξύ, 2-φαινυλαιθυλεστέρας Δωδεκανοϊκό οξύ, αιθυλεστέρας Οκτανοϊκό οξύ, οκτυλεστέρας
--	--	---

1^η στήλη (πίνακα 71): Στην κατηγορία των **εστέρων**, οι ενώσεις που βρέθηκαν κοινές σε όλους τους οίνους είναι ο **γαλακτικός αιθυλεστέρας** (άρωμα βουτυρώδη, γλυκιάς καραμέλας και βατόμουρου), ο **εξανοϊκός αιθυλεστέρας** (άρωμα φρουτώδη, φράουλας, πράσινου μήλου και άνισου), ο **οκτανοϊκός αιθυλεστέρας** (άρωμα φρουτώδη, πεπόνι και ανανά), ο **λινολεϊκός και παλμιτικός αιθυλεστέρας** (με άρώματα λιπαρά, φρουτώδη, γαλακτώδη με βαλσαμική χροιά), ο **ηλεκτρικός αιθυλεστέρας** (με άρώματα φρουτώδη μαγειρεμένου μήλου και φλούδας πράσινου μήλου), ο **β-υδροξυ-βουτυρικός αιθυλεστέρας** (με άρώματα γλυκά, μελιού ανθικά-γύρης), ο **αιθυλεστέρας της ακετυλογλυκίνης** και ο **δι-μηλικός αιθυλεστέρας** (με άρώματα φρουτώδη, μαύρης ζάχαρης, γλυκού οίνου και βαλσαμικά), ο **πυρομικός αιθυλεστέρας** και ο **β-οξικός φαινυλαιθυλεστέρας** (με άρώματα από ρούμι, γλυκά, μελιού, κακάο και ανθικά), ο **οξικός ισοαμυλεστέρας** (με άρωμα φρέσκιας μπανάνας) και ο **βουτυρικός αιθυλεστέρας** (με φρουτώδη άρώματα ανανάς και φράουλας).

2^η στήλη: Στην παρούσα πειραματική οиноποίηση που έλαβε χώρα, οι εστέρες, οι οποίοι ανιχνεύθηκαν κοινοί σε όλους τους παραγόμενους οίνους, είναι οι εξής: **οξικός αιθυλεστέρας, οξικός μεθυλεστέρας, προπανοϊκός αιθυλεστέρας, βουτανιοϊκός αιθυλεστέρας, οξικό ισοβουτύλιο, 1-βουτανόλη, 3-μεθυλ-οξικός εστέρας, εξανοϊκός αιθυλεστέρας, οκτανοϊκός αιθυλεστέρας, δεκανοϊκός αιθυλεστέρας, οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας, 8-νονανοϊκός αιθυλεστέρας, διαιθυλεστέρας βουτανιοϊκού οξέος, μυρμηκικός οκτυλεστέρας, βουτανιοϊκός 3-μεθυλ-αιθυλεστέρας, προπανοϊκός 2-υδροξυ-αιθυλεστέρας, φθαλικός διαιθυλεστέρας, φθαλικός βουτυλεστέρας 2-πεντυλεστέρας, ηλεκτρικός βουτυλο-2-φαινυλαιθυλεστέρας**. Εκ των οποίων, ο **εξανοϊκός αιθυλεστέρας, ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας και ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας** ταυτοποιήθηκαν ως κοινοί σε όλους τους παραγόμενους οίνους του παρόντος οиноποιητικού πειράματος με αυτούς της διδακτορικής διατριβής που μελέτησε οίνους ασύρτικο από διάφορες περιοχές της Ελλάδος. Αυτοί οι κοινοί εστέρες **αναδύουν άρώματα φρουτώδη, φράουλας, πράσινου μήλου, πεπονιού, ανανά, ρούμι, μελιού, κακάο και ανθικά**. Οι κοινοί εστέρες σε όλους τους οίνους με την 3^η στήλη παρά την παρατήρηση ότι υπερέχουν αριθμητικά από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις των οίνων, δεν έχουν ιδιαίτερα κοινά εκτός ελαχίστων, όπως ο οξικός αιθυλεστέρας με άρωμα αιθέριο, φρουτώδες και γλυκό σταφύλι.

3^η στήλη: Όλοι οι εστέρες στους δύο πειραματικούς οίνους ανιχνεύθηκαν ως κοινοί, εκτός από το γαλακτικό αιθύλιο, τον ηλεκτρικό διαιθυλεστέρα και το οξικό γερανύλιο, τον βουτανιοϊκό οξύ-διαιθυλεστέρα και τον 3-μεθυλ-βουτανιοϊκό οξύ – διαιθυλεστέρα.

Πίνακας 72. Κετόνες που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους οίνους ποικιλίας Ασύρτικο.

ΚΕΤΟΝΕΣ ΔΙΑΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ (Κεχαγιά, 2019)	ΚΕΤΟΝΕΣ ΠΑΡΟΥΣΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	ΚΕΤΟΝΕΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (Μπασά, 2020)
γ-βουτυρολακτόνη γ-δεκαλακτόνη παντολακτόνη	ακετόνη ακετοΐνη 1-(4-μεθυλφαινυλ) -αιθανόνη βουτυρολακτόνη 3-μεθυλ-3-βουτεν-2-όνη 1-(2-υδροξυ-5-μεθυλφαινυλ) -αιθανόνη παντολακτόνη 2H-πυραν-2,6- (3H) -διόνη	ακετόνη 2-νονανόνη βουτυρολακτόνη β-Δαμασκηνόνη 6,10-διμεθυλ-, (E)-5,9-Αντεκαδι-2-όνη

1^η (πίνακα 72): Κοινή ένωση για όλους τους οίνους: γ-βουτυρολακτόνη (κρεμώδη, λιπαρή με άρωμα ροδάκινου)

2^η: Οι κετόνες, οι οποίες ανιχνεύθηκαν κοινές σε όλους τους παραγόμενους οίνους της παρούσης εργασίας είναι οι εξής: **ακετόνη, 1-(4-μεθυλοφαινυλο) -αιθανόνη, βουτυρολακτόνη, 1-(2-υδροξυ-5-μεθυλοφαινυλο) -αιθανόνη**. Εκ των οποίων, **καμία δε βρέθηκε κοινή** ανάμεσα στις δύο πρώτες ερευνητικές εργασίες (1^η και 2^η στήλη). Οι δύο

μεταπτυχιακές εργασίες (2^η και 3^η στήλη) είχαν κοινές τις εξής ενώσεις: **ακετόνη και βουτυρολακτόνη**, οι οποίες μυρίζουν διαλύτη, αχλάδι μήλο και καραμέλα-κρεμώδη αίσθηση, λιπαρά, αντίστοιχα.

3^η: Όλες οι αναφερθείσες κετόνες ήταν κοινές και στους δύο πειραματικούς οίνους με εμβόλιο διαφορετικών σακχαρομυκήτων.

Πίνακας 73. Τερπένια και φαινόλες, που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους οίνους ποικιλίας Ασύρτικο.

ΤΕΡΠΕΝΙΑ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ (Κεχαγιά, 2019)	ΤΕΡΠΕΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	ΚΕΤΟΝΕΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (Μπασά, 2020)
1,2 βουτανοδιόλη 2,3 βουτανοδιόλη 2,4 δι-βούτυλο-φαινόλη ευγενόλη 4 -βινύλ-γουαϊακόλη θυμόλη 2-μεθόξυ-4 βινυλοφαινόλη 4-((1E)-3-ύδροξυ-1-προπένυλο)-2-μεθόξυ φαινόλη τρυπτοφόλη ισοβαλερικό γερανύλιο	1,2-προπανοδιόλη 2,3-βουτανοδιόλη [S- (R, R)] 2,3-βουτανοδιόλη [R- (R, R)] 1,2-βουτανοδιόλη μεσο-3,4-εξανοδιόλη RS-2,3-εξανοδιόλη σιτρονελόλη γεραμιόλη 3,5-δισ (1,1-διμεθυλαιθυλ) -1H-πυραζόλη	Λιμονένιο p-Κύμινο Λιναλόλη Σιτρονελόλη Γεραμιόλη Φαινόλη Χοτρενόλη

1^η (πίνακα 73): Στην κατηγορία των φαινολών η **2,4 δι-βούτυλο φαινόλη** (με φαινολικά αρώματα), η **4-βινυλ-γουαϊακόλη** (με αρώματα πικάντικα, μπαχαρένια καπνιστού μπίκον και ξυλώδη), η **θυμόλη** (με αρώματα θυμαριού και ρίγανης), η **4-((1E)-3- ύδροξυ-1-προπένυλο)-2-μεθόξυ φαινόλη** (με αρώματα κακάου, κονιάκ και ούισκυ με νότες πράσινου μήλου), η 4-βινυλ -γουαϊακόλη(άρωμα πικάντικο, μπαχαρένιο ,καπνιστό - μπίκον,ξύλου)και η **4-((1E)-3-ύδροξυ-1-προπένυλο)-2-μεθόξυ φαινόλη** (κακάο, κονιάκ,ούισκι με φρουτώδη νότα πράσινου μήλου) και το **ισοβαλερικό γερανύλιο** (φρουτώδες,πράσινου μήλου,ανανά και βατόμουρο).

2^η: Τα τερπένια, τα οποία βρέθηκαν σε όλους τους παραγόμενους οίνους του παρόντος πειράματος:

1,2-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη, μεσο-3,4-εξανοδιόλη, σιτρονελόλη. Εκ των οποίων, μόνο **2,3 βουτανοδιόλη, η οποία είναι μια άοσμη πτητική ένωση** ταυτοποιήθηκε ως κοινή σε όλους τους παραγόμενους οίνους του παρόντος οινοποιητικού πειράματος με αυτούς της διδακτορικής διατριβής που μελέτησε οίνους ασύρτικο από διάφορες περιοχές της Ελλάδος. Ανάμεσα στη 2^η και 3^η στήλη κοινές χημικές ενώσεις όλων των οίνων ποικιλίας Ασύρτικο είναι οι εξής δύο: **σιτρονελόλη και γεραμιόλη, με αρώματα** ανθισμένο τριαντάφυλλο, γλυκό εσπεριδοειδές, πράσινο, λιπαρό, τερπενοειδές άρωμα, οσμή δέρματος και κεριού και γλυκό λουλουδάτο τριαντάφυλλο, εσπεριδοειδές με φρουτώδεις νότες, σιτρονέλα και κηρώδεις αποχρώσεις, αντίστοιχα. Κάποια χημική ένωση κοινή και για τις τρεις στήλες δεν υπάρχει.

3^η: Όλα τα τερπενοειδή ήταν κοινά, εκτός από την ένωση **p-Κύμινο**.

Πίνακας 74. Οξέα που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους οίνους ποικιλίας Ασύρτικο.

ΟΞΕΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ (Κεχαγιά, 2019)	ΟΞΕΑ ΠΑΡΟΥΣΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	ΟΞΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (Μπασά, 2020)
Βουτυρικό οξύ Ισοβουτυρικό οξύ βανιλικό οξύ γαλακτικό οξύ εξανοϊκό οξύ οκτανοϊκό οξύ δεκανοϊκό οξύ n-νονανοϊκό οξύ οξικό οξύ μυριστικό οξύ εξαδεκανοϊκό οξύ 4-ύδροξυ βουτανικό οξύ δωδεκανοϊκό οξύ ελαϊκό οξύ	μεθοξυ-οξικό οξύ οξικό οξύ 2-μεθυλ- προπανοϊκό οξύ 2-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ 3-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ εξανοϊκό οξύ οκτανοϊκό οξύ η-δεκανοϊκό οξύ Βενζοϊκό οξύ βουτανοϊκό οξύ προπανοϊκό οξύ 4-μεθυλ-2-οξοβαλερικό οξύ Ανυδρίτης 2-μεθυλ-προπανοϊκού οξέος	Οξικό οξύ 2-μέθυλ-προπανοϊκό οξύ Βουτανοϊκό οξύ 3-μεθυλ-Βουτανοϊκό οξύ 2-μεθυλ-Βουτανοϊκό οξύ Οκτανοϊκό οξύ Νονανοϊκό οξύ η-δεκανοϊκό οξύ

3-φουροϊκό οξύ Ισοβαλερικό οξύ		
-----------------------------------	--	--

1^η στήλη (πίνακα 74): Σε ότι αφορά στην κατηγορία των οξέων τα κοινά οξέα για τους αναλυόμενους οίνους είναι το **οκτανοϊκό και δεκανοϊκό οξύ** (με αρώματα λιπαρά, τυριού, ξινά), το **μυριστικό οξύ** και το **εξαδεκανοϊκό οξύ** (με κηρώδες, λιπαρό άρωμα από σαπούνι καρύδας, χροιά κεριού και ζωικού λίπους), το **δωδεκανοϊκό οξύ** (με αρώματα από λάδι δάφνης και μεταλλική γεύση), το **βουτυρικό οξύ** (οσμή βουτυρώδη), το **ισοβουτυρικό οξύ** (γαλακτοκομικά, βουτυρο), το **βανιλικό οξύ** (γαλακτώδη αρώματα, φυτό βανίλιας), **εξανοϊκό οξύ** (λιπαρή οσμή, ξινή, ιδρωμένο τυρί), **ισοβαλερικό οξύ** (λιπαρό τυρί, ώριμο φρούτο) και τέλος το **ελαϊκό οξύ** (φυτικό έλαιο, λαρδί και ζωικό λίπος).

2^η: Τα οξέα, τα οποία ανιχνεύθηκαν σε όλους τους παραγόμενους οίνους αυτής της ερευνητικής εργασίας: **οξικό οξύ, 2-μεθυλ προπανοϊκό οξύ, 2-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ, 3-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ, οκτανοϊκό οξύ και η-δεκανοϊκό οξύ**. Εκ των οποίων, **μόνο το οκτανοϊκό και η-δεκανοϊκό οξύ ταυτοποιήθηκαν ως κοινά** σε όλους τους παραγόμενους οίνους του παρόντος οινοποιητικού πειράματος με αυτούς της διδακτορικής διατριβής που μελέτησε οίνους ασύρτικο από διάφορες περιοχές της Ελλάδος. Τα συγκεκριμένα οξέα έχουν αίσθηση: κηρώδη, τραγανή, ξινή, λιπαρού τυριού, λαχανικών και εσπεριδοειδών. Τα κοινά οξέα που ανιχνεύτηκαν σε όλους τους οίνους της **2^{ης} και 3^{ης} στήλης είναι: οξικό οξύ (αιχμηρό, ξύδι), 2-μέθυλ-προπανοϊκό οξύ (όπως η ακεταλδεύδη), 3-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ (ιδρώτας, τυρί, γαλακτοκομικά, όξινο, πικάντικο, ώριμο, λιπαρό φρουτώδες), 2-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ (πικάντικο, όξινο, φρουτώδες, βρώμικο τυρί ροκφόρ που έχει υποστεί ζύμωση), οκτανοϊκό οξύ και η-δεκανοϊκό οξύ, ουσιαστικά σχεδόν όλα.**

3^η: Μόνο το 2-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ δεν ανιχνεύθηκε κοινό και στα δύο δείγματα των οίνων.

Πίνακας 75. Φουράνια που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους οίνους ποικιλίας Ασύρτικο.

ΦΟΥΡΑΝΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ (Κεχαγιά, 2019)	ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	ΦΟΥΡΑΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	ΦΟΥΡΑΝΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (Μπασά, 2020)
Κουμαραν		2,3-διυδρο-βενζοφουράνιο	-

Το φουράνιο, το οποίο βρέθηκε κοινό σε όλους τους παραγόμενους οίνους της 2^{ης} στήλης: **2,3-διυδρο-βενζοφουράνιο (μυρωδιά μόσχου)**. Εκ των οποίων, κανένα δε βρέθηκε κοινό ανάμεσα στις τρεις ερευνητικές εργασίες.

Πίνακας 76. Αλδεύδες που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους οίνους ποικιλίας Ασύρτικο.

ΑΛΔΕΥΔΕΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ (Κεχαγιά, 2019)	ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	ΑΛΔΕΥΔΕΣ ΠΑΡΟΥΣΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	ΑΛΔΕΥΔΕΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (Μπασά, 2020)
Νοναλδεύδη φουρφουράλη φαινυλαιθανάλη		μεθυλ-βενζοακεταλδεύδη (Z) -2-βουτενάλη 5-δροξυμεθυλφουρφουράλη	Ακεταλδεύδη Εξαναλη Οκτάναλη Νοναλδεύδη Φουρφουράλη Δεκανάλη

Καμία κοινή αλδεύδη δεν ταυτοποιήθηκε σε όλους τους οίνους και των τριών μελετών. Κοινές μεταξύ πρώτης και τρίτης στήλης: **νοναλδεύδη (μυρωδιά τριαντάφυλλο-πορτοκάλι) και φουρφουράλη (άρωμα σαν αμύγδαλο)**. **3^η:** Όλες οι αλδεύδες κοινές στους δύο οίνους αυτού του πειράματος, εκτός από την οκτανάλη και δεκανάλη.

4.2.2.1 ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΣΥΓΚΡΙΣΕΩΝ ΤΩΝ ΔΥΟ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ

Οι μεγάλες ομοιότητες των πτητικών ενώσεων που παρατηρούνται ανάμεσα στην 2^η και 3^η στήλη, σε σχέση με την 1^η οφείλονται στο γεγονός ότι το γλεύκος και στις δύο περιπτώσεις των πειραματικών μικροοινοποιήσεων έχει ίδια γεωγραφική προέλευση (αμπελώνας ΓΠΑ Σπάτων, διαφορετικής χρονιάς τρύγος). Οι διαφοροποιήσεις εμπίπτουν στο γεγονός ότι στη 2^η στήλη, οι οίνοι παράχθηκαν με διαδοχικό εμβολιασμό μιας άγριας ζύμης και ενός σακχαρομύκητα (προδίδουν περισσότερα αρωματικά στους οίνους κατά τη ζύμωση, ελαττώνουν τη συγκέντρωση της αιθανόλης, αυξάνουν τη γλυκερόλη και ορισμένα πτητικά οξέα και εστέρες), ενώ στην 3^η στήλη μόνο με συγκεκριμένους σακχαρομύκητες και τήρηση του πρωτοκόλλου λευκής οινοποίησης (θρέψη, κ.ά.), και έλαβαν χώρα και σε συνθήκες αναεροβίωσης και ημιαεροβίωσης. Το αρωματικό προφίλ των παραγόμενων οίνων της 3^{ης} στήλης χαρακτηρίστηκε από αρωματικούς εστέρες που προδίδουν χαρακτήρα φρέσκων και ξηρών φρούτων, ενώ ο οργανοληπτικός έλεγχος επιβεβαίωσε την παρουσία αρώματος φρούτων και γενικά οίνους υψηλής ποιότητας. Όσον αφορά τα αποτελέσματα της 1^{ης} στήλης, οι κοινές αρωματικές ενώσεις οι οποίες βρέθηκαν σε οίνους διαφορετικών περιοχών είναι ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας (με αρώματα γλυκά, ανθικά, μελιού- γύρης και ρόδινα), ο οποίος βρέθηκε στους οίνους Δράμας και Νεμέας. Στους οίνους από την περιοχή της Δράμας και σε εκείνους από την περιοχή της Σαντορίνης βρέθηκαν ως κοινές αρωματικές ενώσεις, το εξανοϊκό οξύ (με αρώματα λιπαρά, ξινά ιδρωμένου τυριού) και το κούμαραν (με αρώματα τυριού, πράσινου τσαγιού, λιπαρά και κρεμώδη). Τέλος, οι κοινές αρωματικές ενώσεις για τους οίνους από σταφύλια από την περιοχή της Νεμέας και από την περιοχή της Σαντορίνης είναι ο οξικός ισοαμυλεστέρας (με αρώματα φρέσκιας μπανάνας) και το νονανοϊκό οξύ (με αρώματα λιπαρά, κηρώδη, επεξεργασμένου τυριού). Συγκεντρωτικά, με βάση την ποσοτικοποίηση των βασικών αρωματικών συστατικών των οίνων προκύπτει, ότι ο οίνος προζυμωτικής κρυσταλλικής όψιμων σταφυλιών της ποικιλίας Ασύρτικο από την περιοχή της Σαντορίνης χαρακτηρίζεται από αρώματα ανθικά, τριαντάφυλλου, ροδόενου, πράσινου χόρτου, γαλακτοκομικά αρώματα βούτυρου και τυριού, αρώματα φρέσκιας μπανάνας, πράσινου μήλου, ανανά, φράουλας, πεπονιού και ανανά μέσα σε μία δρυμιά οσμή γλυκιάς αίσθησης. Οι υπόλοιποι οίνοι από την περιοχή της Σαντορίνης χαρακτηρίζονται από τα παραπάνω αρώματα αλλά σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις και με μικρές αποκλίσεις μεταξύ τους. Γενικά, ο οίνος προζυμωτικής κρυσταλλικής όψιμων σταφυλιών χαρακτηρίστηκε με βάση την μεγαλύτερη συγκέντρωση του στα φρουτώδη αρώματα, φλούδας πράσινου μήλου. Ο οίνος κλασσικής οινοποίησης πρώιμων σταφυλιών έδειξε μία υπεροχή σε αρώματα φρούτων, πράσινου μήλου, άνισου ανθικά, μελιού και γύρης ενώ τέλος ο οίνος κλασσικής οινοποίησης όψιμων σταφυλιών έδειξε να χαρακτηρίζεται από αρώματα φρουτώδη από πεπόνι και ανανά.

Γενικό προφίλ (από μικροοινοποιήσεις παρούσης εργασίας) βάσει ταυτοποίησης κοινών πτητικών ενώσεων όλων των δειγμάτων πειραματικών οίνων Ασύρτικου

Οι συγκεκριμένες αλκοόλες που ανιχνεύθηκαν στους οίνους προσδίδουν αρώματα: αλκοόλ, οινοπνεύματος, φρουτώδη, όπως μπανάνα, πράσινο μήλο, ώριμο αχλάδι, γλυκό άρωμα, ανθικό, φρέσκο που παραπέμπει σε μέλι και τριαντάφυλλο, καρύδα, εσπεριδοειδή, πικάντικα, κονιάκ, κρασί, κακάο, πρασινάδα, μυρωδιά κεριού και εσπεριδοειδών, γλυκιά μυρωδιά μεθυστικής αλκοόλης, ίσως βραστών λαχανικών, πικάντικη νότα και ανθικά αρώματα, τριαντάφυλλου και ροδόενου.

Εστέρες: φρουτώδες άρωμα, πορτοκάλι, αγγούρι, πεπόνι, γλυκιά μυρωδιά, πράσινο μήλο, μούρο, φράουλα, δαμάσκηνο, σταφύλι, τροπικό φρούτο, όπως μπανάνα, ανανάς, tutti frutti, εσπεριδοειδή, ώριμο αχλάδι, βερίκοκο, πρασινάδα, κηρώδεις νότες, πικάντικη μυρωδιά, βαλσαμικό και αιθερικό άρωμα, ρούμι, μέλι, κακάο, καφές, αιχμηρή οσμή, βούτυρο, βούτυρο κακάο, ανθικό άρωμα με γήινες ζυμωμένες αποχρώσεις, ορχιδέα, πούδρα.

Τερπένια: Φρουτώδες, κρεμώδες, βουτυρώδες άρωμα, ανθισμένο τριαντάφυλλο, πρασινάδα, οσμή δέρματος και κεριού, εσπεριδοειδές άρωμα με φρουτώδεις νότες, κιτρονέλα και κηρώδεις αποχρώσεις.

Κετόνες: διαλύτης, κόλλα, αχλάδι, μήλο, καραμέλα, βουτυρώδης-κρεμώδης οσμή, ανθικά αρώματα, όπως μιμόζα, κουμαρινικό άρωμα, κεράσι, ακακία, βανίλια, φυτικό και βοτανικό άρωμα.

Οξέα: κηρώδης αίσθηση, αρώματα λαχανικών και εσπεριδοειδών, αιχμηρή οσμή, ξύδι, ακεταλδεύδη, ιδρώτας, γαλακτοκομικά, πικάντικο άρωμα, ώριμο φρουτώδες άρωμα, τυρί ροκφόρ που έχει υποστεί ζύμωση.

Αλδεύδες (αν και δεν υπάρχει κάποια που να βρίσκεται σε όλα τα δείγματα οίνων, η πιο κοινή): πρασινάδα, φύλλωμα, φλοιός, ξυλώδες άρωμα

Φουράνια: μυρωδιά μόσχου, πούδρας

Συγκεκριμένο αρωματικό προφίλ πειραματικών οίνων - διαχωρισμός με βάση τα στελέχη-εμβόλια εκκίνησης

Το δείγμα P 141L κατέχει τις περισσότερες πτητικές αρωματικές ενώσεις εκ των έξι συγκρινόμενων, σύμφωνα με τα γραφήματα 16 και 17. Τα συνολικά αρωματικά των παραγόμενων οίνων, δηλαδή το άθροισμα όλων των πτητικών ενώσεων κατατάσσουν τους οίνους με την εξής σειρά ως προς τη μεγαλύτερη συγκέντρωση προς τη μικρότερη: P14 1L, P14 1,5L, U14 1L, G14 1,5L, G14 1L, U14 1,5L με τους εστέρες να είναι η επικρατέστερη κατηγορία ενώσεων σε αναλογία συγκέντρωσης με την ίδια ακριβώς σειρά.

Οι περισσότερες ενώσεις, ιδιαίτερα αυτές που ανήκουν στις κατηγορίες των αλκοολών και των εστέρων είναι αυτές, οι οποίες διαμορφώνουν το αρωματικό προφίλ κατά κύριο λόγο. Φαίνεται πως έχουν παρόμοιους χαρακτηρισμούς οσμών και μεταξύ τους (αλληλοκάλυψη οσμών από διαφορετικές ενώσεις των ίδιων και διαφορετικών υποκατηγοριών π.χ. φρουτώδες ή ανθικό άρωμα έχουν πολλές από τις κάτωθι πτητικές ενώσεις), το οποίο θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως ενίσχυση του συγκεκριμένου αρώματος. Επιπλέον ανάλογα με τη συγκέντρωση οι πτητικές ενώσεις συμβάλλουν διαφορετικό τρόπο στην ποιότητα του αρώματος, και εκφράζονται είτε θετικά, είτε αρνητικά, με το να απουσιάζουν εντελώς ή κυρίως αν βρίσκονται σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις.

Οίνος Ασύρτικο με διαδοχικό εμβόλιο *M. pulcherrima* - *S.c.rhone*:

Αλκοόλες: Οι αλκοόλες που ταυτοποιήθηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στους οίνους με διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima* και *S.cerevisiae* είναι κατά φθίνουσα σειρά, η 3-μεθυλο-1-βουτανόλη με αρώματα κυρίως αλκοόλ/οινοπνεύματος, ζυμελαίων, αλλά και φρουτώδη, όπως αυτό της μπανάνας (αχλαδιού και πράσινου μήλου). Μυρωδιές οι οποίες υπερίσχυαν πραγματικά σε αυτά τα δείγματα των πειραματικών οίνων. Στη συνέχεια, σε λίγο μικρότερο ποσοστό, ταυτοποιείται ημιποσοτικά, η φαινολαιθυλική αλκοόλη με γλυκό άρωμα, ανθικό, φρέσκο που παραπέμπει σε μέλι και τριαντάφυλλο. Ακολουθεί με πολύ μικρό συγκριτικά ποσοστό, η κυκλοπροπυλική καρμπινόλη με οσμή οινοπνεύματος. Τέλος, στο αρωματικό προφίλ που αποδίδεται στις αλκοόλες συμμετέχουν και άλλες σε μικρότερες συγκεντρώσεις, που όμως η συμβολή τους στο χαρακτήρα του οίνου μπορεί να είναι αρκετή, διότι ορισμένες πτητικές ενώσεις έχουν πολύ μικρό όριο ανίχνευσης. Αναφέρονται τα αρώματα και των υπολοίπων αλκοολών: ελαφρώς ασφυκτική οσμή, θειώδες, μυρωδιά αιθέρα, οσμή βαλσάμικου, μελιού, ούισκι, πικάντικη μυρωδιά, ψωμιού, διαλύτη, κονιάκ, κακάο, πρασινάδας, κυρήθρας, εσπεριδοειδών, αλδεϋδική οσμή, ανθικό άρωμα, όπως τριαντάφυλλο, καρύδα, μυρωδιά μαγειρεμένου λαχανικού, φαινολική και χημική οσμή.

Εστέρες: Οι πτητικοί εστέρες με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στους δύο οίνους είναι κατά μειούμενη σειρά, ο οκτανοϊκός, ο δεκανοϊκός και 1-βουτανολ-3-μεθυλεστέρας. Μάλιστα στο δείγμα με τη θρέψη, η ποσότητα τους ήταν διπλάσια, όπου αυτό δείχνει τη θετική επιρροή της προσθήκης αζώτου. Κατά σειρά έντασης αναφέρονται οι περιγραφικοί αρωματικοί όροι των ενώσεων, φρουτώδες άρωμα κυρίως αχλαδιού, βερίκοκου, μπράντι και κηρύθρας. Έπειτα, ακολουθούν πάλι φρουτώδη αρώματα, όπως μήλου και σταφυλιού, αλλά επίσης και μπράντι, αλλά και κηρύθρας. Τέλος, και εδώ επικρατούν τα φρουτώδη αρώματα, όπως ώριμου αχλαδιού και μπανάνας, αλλά και πρασινάδας. Επομένως, **επιβεβαιώνεται ο φρουτώδης χαρακτήρας, κυρίως αυτός του αχλαδιού.** Σε ελάχιστες συγκεντρώσεις ανιχνεύονται ουσίες που έχουν άρωμα ζυμών, όξινο και, βουτυρώδες, οσμή αιθέρα, διαλύτη, αλκοολική, όπως κρασιού, κονιάκ, ανανά, οσμή ζύμωσης, egg nog, πικάντικο άρωμα, tutti frutti, τροπικό φρούτο, σταφύλι, κακάο, μπανάνα, μήλο, ώριμο αχλάδι, πράσινο ώριμο φρούτο-μαγειρεμένο μήλο, νότες κηρύθρας, βερίκοκο μέλι, άνθη όπως τριαντάφυλλο, ορχιδέα, μυρωδιά βαλσάμικου, νέκταρ, φραγκοστάφυλο, ιλάνγκ ιλάνγκ, πορτοκάλι, αγγούρι, αιχμηρή οσμή, φρεσκοκομμένο πράσινο χόρτο, άρωμα εσπεριδοειδών, αλδεϋδική μυρωδιά, οσμή ξύλου.

Κετόνες: Σε αυτή την κατηγορία επικρατούν οι εξής μυρωδιές, οσμή διαλύτη και αιθέρα, άρωμα φρούτων, όπως μήλο, αχλάδι, κεράσι, βουτυρώδης-κρεμώδης μυρωδιά, μυρωδιά άνθεων, βοτάνων, μιμόζας, κουμαρίνης, ακακίας, γλυκιά οσμή, πούδρας, βανίλιας, καραμέλας, ζαχαρωτού.

Αλδεϋδες: οσμή πρασινάδας, φλοιού, φυλλώματος, ξύλου και θαμνώδους φυτού «λιγούστρο»

Οξέα: έντονη οσμή, πικάντικη, ξινή όπως ξυδιού, μυρωδιά ακεταλδεϋδης, όξινη, φρουτώδης και ώριμων φρούτων, οσμή Roquefort τυριού, μυρωδιά βουτύρου και ζυμών, λιπαρή/ελαιώδης και κηρώδης οσμή, τραχεία, μυρωδιά λαχανικών, εσπεριδοειδών, βαλσάμικου.

Τερπένια: άρωμα φρούτων, κρεμώδες, βουτυρώδες, ανθικό όπως τριαντάφυλλου, γλυκού, εσπεριδοειδών, πρασινάδας, τερπενική οσμή, δέρματος και κηρύθρας

Φουράνιο: μυρωδιά μόσχου-πούδρας

Οίνος Ασύρτικο με διαδοχικό εμβολίο *H. uvarum* - *S.c.rhone*:

Αλκοόλες: Οι ίδιες ενώσεις (σε μικρότερη συγκέντρωση) είναι και σε αυτά τα δείγματα οίνου υπεύθυνες για τη διαμόρφωση του αρωματικού προφίλ, το οποίο αποτελείται από το σύνολο των αλκοολών, όπου και σε αυτή την περίπτωση υπερισχύουν τα αρώματα του οινοπνεύματος και των φρούτων όπως αχλάδι, πράσινο μήλο και μπανάνα, καθώς και γλυκό άρωμα, ανθικό, φρέσκο που παραπέμπει σε μέλι και τριαντάφυλλο. Επιπλέον σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις υπάρχει η μυρωδιά αλκοόλ και αιθέρα, ζυμών, οσμή τεκίλας, κονιάκ ή /και ούισκι, γλυκό φρουτώδες άρωμα, ελαφρώς ασφυκτική οσμή, βοτανική μυρωδιά, καρυδιού, πικάντικη, κακάο, ανθικό άρωμα όπως τριαντάφυλλο και βοτανικό - πρασινάδας, αλλά και λαχανικού, μυρωδιά κηρύθρας και εσπεριδοειδών, αλδεϋδική οσμή, καρύδα, θείο, κρεμμύδι, φαινολική και βαλσαμική μυρωδιά, φρέσκο ψωμί.

Εστέρες: Δυστυχώς σαν εστερας με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στους παραγόμενους οίνους εμφανίζεται ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος σε αυτές τις συγκεντρώσεις εκφράζεται με αρνητικές μυρωδιές, όπως αυτή της κόλλας και του ασετόν και εμφανίζεται ως ελάττωμα. Στη συνέχεια, ταυτοποιήθηκε ο οκτανοϊκός, ακολουθούμενος από τον 1-βουτανόλ-3μεθυλεστέρας, όπως και στα δείγματα των οίνων με εμβόλιο *M.pulcherrima* με φρουτώδες άρωμα κυρίως ώριμου αχλαδιού, βερίκοκου, μπράντι και κηρύθρας και γενικά επικρατούν τα φρουτώδη αρώματα όπως αχλαδιού και μπανάνας και πρασινάδας. Επομένως, **επιβεβαιώνεται ο φρουτώδης χαρακτήρας**. Αναφέρονται επιγραμματικά και τα υπόλοιπα αρώματα: οσμή αιθέρα, διαλύτη, οίνου, ρούμι, κονιάκ, ζουμερού ανανά, μυρωδιά ζύμωσης, egg nog, tutti frutti, τροπικό φρούτο, μπανάνα μήλο (και μαγειρεμένο), κακάο, αχλάδι, βερίκοκο, σταφύλι, φραγκοστάφυλο, εσπεριδοειδή όπως πορτοκάλι, μπράντι, κερι, μέλι, νέκταρ, άρωμα ανθικό όπως τριαντάφυλλο, ορχιδέα, οσμή ζύμης, ιλάνγκ ιλάνγκ, αγγούρι, αιχμηρή μυρωδιά, άρωμα βαλσάμικου, οσμή ξύλου, αλδεϋδική μυρωδιά, άρωμα πούδρας, μούρου, δαμάσκηνου και κινναμύλης (γλυκιά οσμή πούδρας και κανέλας - φινίρισμα μπαχαρικών), βουτυρώδης μυρωδιά. Σχεδόν όλη η ένταση των φρουτώδων αρωμάτων καλύπτεται από αυτό του οξικού αιθυλεστέρα, καθιστώντας τον οίνο οριακά μη αποδεκτό.

Κετόνες: οσμή διαλύτη και αιθέρα, γλυκό άρωμα μήλου, αχλαδιού, βουτυρώδης-κρεμώδης οσμή, ανθικά αρώματα, όπως μιμόζας και βοτανικά, κουμαρίνη, κεράσι, ακακία, πούδρα, βανίλια, καραμέλα.

Αλδεϋδες: άρωμα πρασινάδας, φλοιού, φυλλώματος, ξύλου και θαμνώδους φυτού «λιγούστρο», πικάντικη και ασφυκτική μυρωδιά.

Οξέα: έντονη οσμή, πικάντικη, μυρωδιά ξινή όπως του ξυδιού, όπως ακεταλδεϋδη, φρουτώδες και βουτυρώδες άρωμα, Roquefort τυρί, ζυμωμένου, γαλακτοκομικών όξινων και λιπαρών, οσμή ιδρώτα, κηρύθρας, τρωκτικών, λαχανικών, εσπεριδοειδών, βαλσάμικα αρώματα.

Τερπένια: άρωμα φρουτώδες, κρεμώδες, βουτυρώδες άρωμα, ανθικό άρωμα, όπως τριαντάφυλλο, άρωμα εσπεριδοειδών, πρασινάδας, δέρματος και κηρύθρας

Φουράνιο: μυρωδιά μόσχου

Οίνος Ασύρτικο με διαδοχικό εμβολίο *H. guilliermondii* - *S.c.rhone*:

Αλκοόλες: Τα αποτελέσματα και σε αυτά τα δείγματα οίνων συμφωνούν με τα προηγούμενα για τις κυριότερες αλκοόλες με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε αυτά. Οσμή οινοπνεύματος, πράσινων και τροπικών φρούτων, όπως μπανάνα, αχλάδι μήλο, αλλά και ζυμών καθώς και γλυκό άρωμα, ανθικό, φρέσκο που παραπέμπει σε μέλι και τριαντάφυλλο, υπερισχύουν. Τα υπόλοιπα απλά αναφέρονται ενδεικτικά και συμφωνούν με των χαρακτηρισμών των δειγμάτων *H.uvarum*, οσμή τεκίλας, κονιάκ ή /και ούισκι, γλυκό, φρουτώδες άρωμα, ελαφρώς ασφυκτική οσμή, μυρωδιά αιθέρα, οίνου, βαλσάμικου, πικάντικη, ψωμιού, μελιού διαλύτη, βοτανικό άρωμα, ελαφρώς ασφυκτική οσμή, καρυδιού, κακάο, ανθικό άρωμα όπως τριαντάφυλλο και βοτανικό - πρασινάδας, αλλά και λαχανικού, μυρωδιά κηρύθρας και εσπεριδοειδών, αλδεϋδική οσμή, καρύδα, θείο, κρεμμύδι, φαινολική και βαλσαμική μυρωδιά, φρέσκο ψωμί.

Εστέρες: Δυστυχώς και σε αυτή την περίπτωση, το άρωμα των φρούτων επικαλύπτεται από αυτό του οξικού αιθυλεστέρα που κυριαρχεί με τις ελαττωματικές οσμές κόλλας και ασετόν. Ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας έρχεται δεύτερος από άποψη συγκέντρωσης με φρουτώδη οινικά αρώματα, βερίκοκου, μπανάνας, αχλαδιού και μπράντι. Τέλος, ο 1-βουτανόλ-3μεθυλεστέρας, με αρώματα υπερώριμου φρούτου, μπανάνας, αχλαδιού και πρασινάδας. Τα υπόλοιπα αρώματα των ενώσεων σε μικρότερες συγκεντρώσεις είναι τα κάτωθι: κονιάκ, ρούμι, οίνος, νέκταρ, μέλι, κερι, tutti frutti, αρώματα τροπικών φρούτων, μπανάνα, ώριμο αχλάδι, μήλο (και μαγειρεμένο), σταφύλι, βερίκοκο, φραγκοστάφυλο ανθικό άρωμα, όπως ορχιδέας και τριαντάφυλλο, οσμή ζύμης, κακάο, βαλσάμικο, άρωμα εσπεριδοειδών όπως πορτοκάλι, ιλάνγκ ιλάνγκ, χαρακτηριστικό άρωμα διαλύτη, αγγούρι, μυρωδιά φρεσκοκομμένης πρασινάδας, οσμή ξύλου, αλδεϋδική μυρωδιά, αιθέρας, βουτυρώδες άρωμα.

Κετόνες: Οι υπάρχουσες κετόνες έχουν οσμή διαλύτη, αιθέρα, μήλο, αγλάδι, γλυκό, άρωμα βουτυρώδες – κρεμώδες - ελαιώδες, ανθικό άρωμα όπως μιμόζα, βοτανικά αρώματα, κουμαρίνη, κεράσι, ακακία, πούδρα, βανίλια, καραμέλα, πολύ πικάντικη μυρωδιά

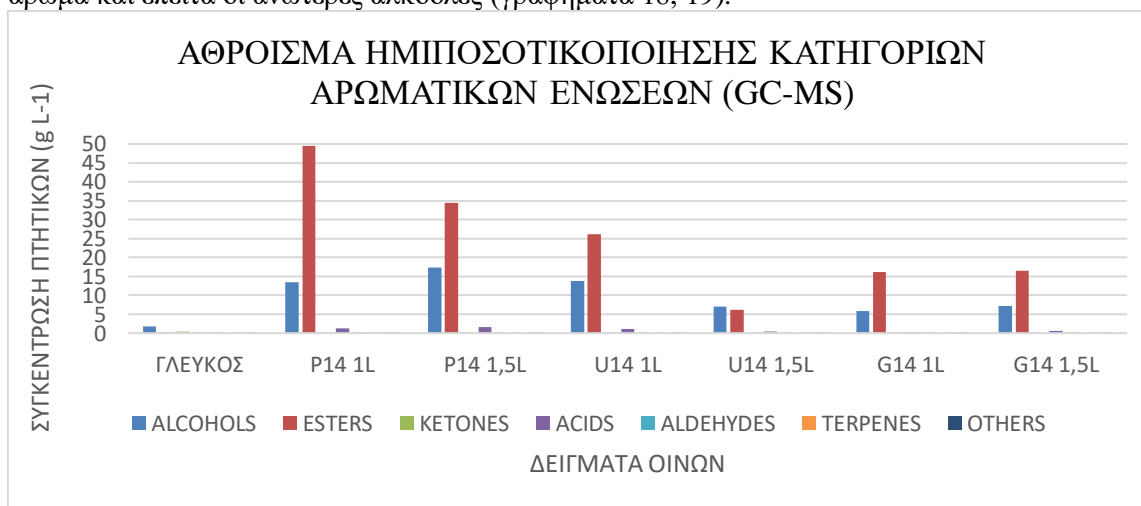
Αλδεΐδες: οσμή πρασινάδας, φλοιού, φυλλώματος, ξύλου και θαμνώδους φυτού «λιγούστρο», λιπαρά αρώματα και βουτυρώδη, μούγλα, κερι, μυρωδιά καραμέλας

Οξέα: αιχμηρή μυρωδιά, πικάντικη, όξινη όπως ξυδιού, οσμή όπως ακεταλδεΐδη, όξινη, άρωμα ώριμων φρούτων, Roquefort τυρί, γαλακτοκομικά με λιπαρά, οσμή ζύμωσης, κηρύθρα, οσμή λαχανικών, εσπεριδοειδών, βαλσάμικου.

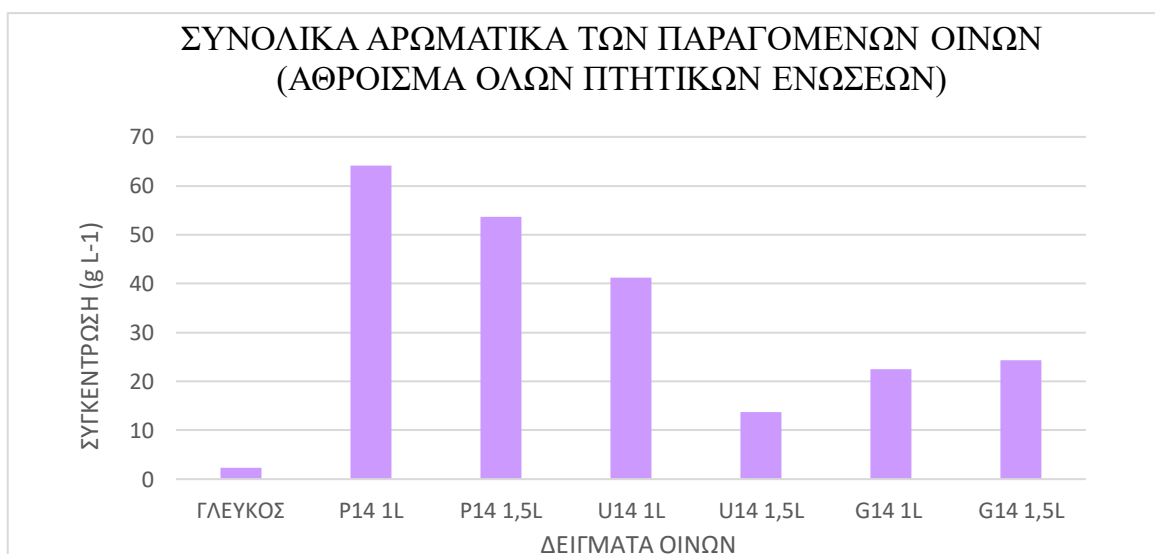
Τερπένια: άρωμα φρουτώδες, κρεμώδες, βουτυρώδες, ανθικά αρώματα όπως τριαντάφυλλο, γλυκιά οσμή, αρώματα εσπεριδοειδών, πρασινάδας,, δέρματος, κιτρονέλας, κηρώδεις μυρωδιές

Φουράνιο: μυρωδιά μόσχου

Τα συνολικά αρωματικά των παραγόμενων οίνων, δηλαδή το άθροισμα όλων των πτητικών ενώσεων κατατάσσουν τους οίνους με την εξής σειρά ως προς τη μεγαλύτερη συγκέντρωση προς τη μικρότερη: **P14 1L**, P14 1,5L, U14 1L, G14 1,5L, G14 1L, U14 1,5L με τους εστέρες να είναι η επικρατέστερη κατηγορία ενώσεων συμβάλλοντας τα μέγιστα στο άρωμα και έπειτα οι ανώτερες αλκοόλες (γραφήματα 18, 19).



Γράφημα 18. Άθροισμα ημιοσοτικοποίησης κατηγοριών των αρωματικών ενώσεων (αλκοόλες, εστέρες, κετόνες, οξέα, αλδεΐδες, τερπένια, κ.ά.) στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους σε σύγκριση με του γλέυκου, ημιοσοτικός προσδιορισμός με GC-MS.



Γράφημα 19. Συνολικά αρωματικά των παραγόμενων οίνων και του γλέυκου (άθροισμα όλων των πτητικών ενώσεων).

4.2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Στατιστική ανάλυση της οσφρητικής αξιολόγησης

Μετά την ολοκλήρωση των αλκοολικών ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση ως προς τα αρωματικά χαρακτηριστικά των παραγομενων πειραματικών οίνων.

Παρακάτω αναφέρονται τα αποτελέσματα του ερωτηματολογίου που προέκυψαν μέσω του Tuckey's test. Το Tuckey's HS (honest significant difference) που χρησιμοποιήθηκε. Είναι μια διεργασία πολλαπλής σύγκρισης και στατιστικής δοκιμής σε ένα βήμα. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των απαντήσεων για τον ίδιο οίνο (14 στο σύνολο) όταν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μετά την εφαρμογή ANOVA (επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας το 5%).

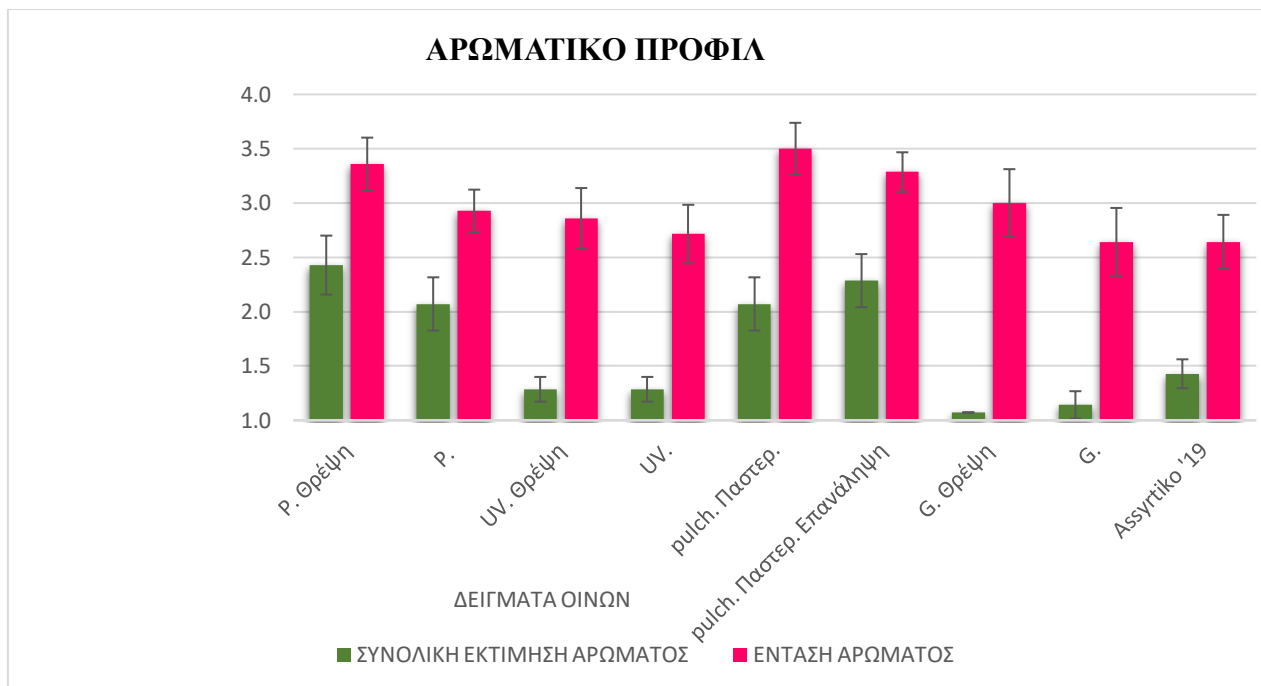
Ακολούθως, παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας του συνόλου των χαρακτηριστικών των οίνων, από το σύνολο των δοκιμαστών. Αρχικά το κάθε δείγμα βαθμολογήθηκε για κάθε ένα από τα χαρακτηριστικά του από 14 αξιολογητές. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο, με ελάχιστες εξαιρέσεις. Οι ερωτώμενοι αξιολόγησαν την ένταση του αρώματος των οίνων χαμηλή έως ικανοποιητική. Οι απαντήσεις για την συνολική εκτίμηση του αρώματος κυμάνθηκαν έως μέτρια ευχάριστο. Επίσης, τα αποτελέσματα που προέκυψαν φανέρωσαν ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων ασύρτικου παραγόμενου με διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima* και *S.c.rhone* και των *Hanseniaspora* με *S.c. rhone* ως προς τον παράγοντα της «εκτίμησης του αρώματος». Η διαφορά μεταξύ των πειραματικών οίνων εμφανίστηκε κυρίως στο κριτήριο οσμών των «φρέσκων φρούτων» (ελάχιστα έως αρκετή), του οξικού αιθυλεστέρα και της συνολικής εκτίμησης του αρώματος. Αυτά μπορεί να οφείλονται τόσο στο είδος ποικιλίας του γλεύκους (ποικιλία ασύρτικο), το οποίο προορίζεται να έχει πράσινο φρουτώδες άρωμα που του προσδίδουν κατά κύριο λόγο σε μεγάλη σχετικά ένταση οι συγκεκριμένες άγριες ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα οινοποίησης, όμως ποικιλιακά ίσως θα ήταν μικρότερης αρωματικής έντασης.

ΕΠΙΛΟΓΗ *M.pulcherrima* ΩΣ ΕΜΒΟΛΙΟ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΟ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ ΜΕ *S.cerevisiae*

Αναλυτικότερα, όπως έχει αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος, οι οίνοι «ασύρτικο» χαρακτηρίζονται με αρώματα κίτρινων φρούτων και νότες φλούδας πορτοκαλιού και λεμονιού. Όσον αφορά στα στελέχη, το κάθε ένα έχει τα δικά του χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα να προσδίδει το ανάλογο άρωμα στο εκάστοτε δείγμα. Επιλέχθηκε από όλα τα παραπάνω το στέλεχος *M.pulcherrima* λόγω του χαμηλού ποσοστού αλκοόλης που παράγεται κατά τη ζύμωση με συνεμβολιασμό, λόγω της διεθνούς τάσης για οίνους με χαμηλό αλκοολικό τίτλο. Γι' αυτό το λόγο προστέθηκαν στον οργανοληπτικό έλεγχο και τα παστεριωμένα δείγματα οίνων που προέκυψαν με το συγκεκριμένο εμβόλιο. Οι ελαττωματικές οσμές θα μπορούσαν να είχαν αποφευχθεί σε ένα μεγάλο βαθμό, με τη προσθήκη θρέψης σε όλους τους οίνους. Οι οίνοι που προέρχονταν από παστεριωμένο γλεύκος δεν θειώθηκαν πριν μπουν στο ψυγείο, αλλά λόγω της παστερίωσης βρέθηκαν να έχουν υψηλό ποσοστό θετικού αρωματικού προφίλ και χαμηλό αρνητικό προφίλ που αφορά τις ελαττωματικές οσμές. Μια τελευταία παρατήρηση, όσον αφορά στο αρωματικό προφίλ των οίνων, αυτοί που παράχθηκαν με εμβόλιο εκκίνησης *M.pulcherrima*, δίχως διαδοχικό εμβολιασμό με τον *S.cerevisiae rhone* ήταν πιο ποιοτικοί με περισσότερο φρουτώδη αρώματα και λιγότερα ελαττώματα οξικού αιθυλεστέρα κυρίως. Κάτι, το οποίο υποδηλώνει πως οι γηγενείς σακχαρομύκητες του γλεύκους ίσως λειτούργησαν καλύτερα στη μετάβαση ως κυρίαρχου πληθυσμού της ζύμωσης.

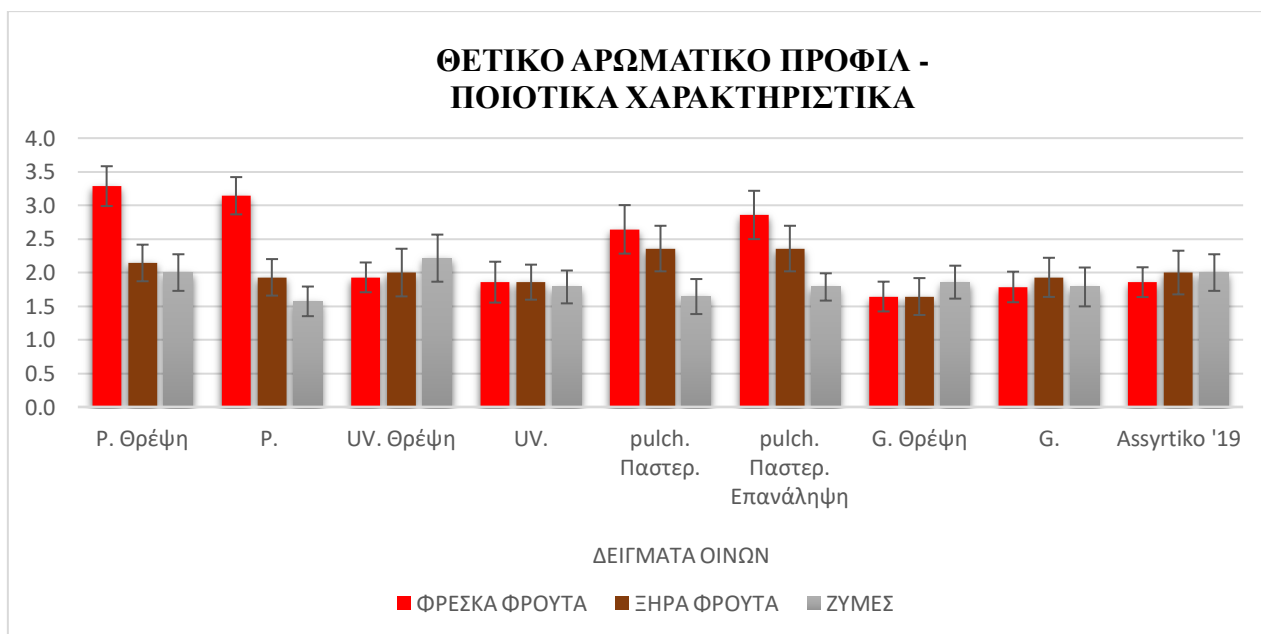
Πίνακας 77. Η συγκέντρωση αιθανόλης των υπό εξέταση δειγμάτων οίνου.

Κωδικός οίνου	Ασύρτικο '19	P.Θρέψη	P.	UV. Θρ	UV.	G.	G. Θρ	M.p.παστ.	M.p. παστ.2
Αιθανόλη (% v/v)	12,1	10,2	10,2	9,5	9,7	10	9,9	9,8	9,8



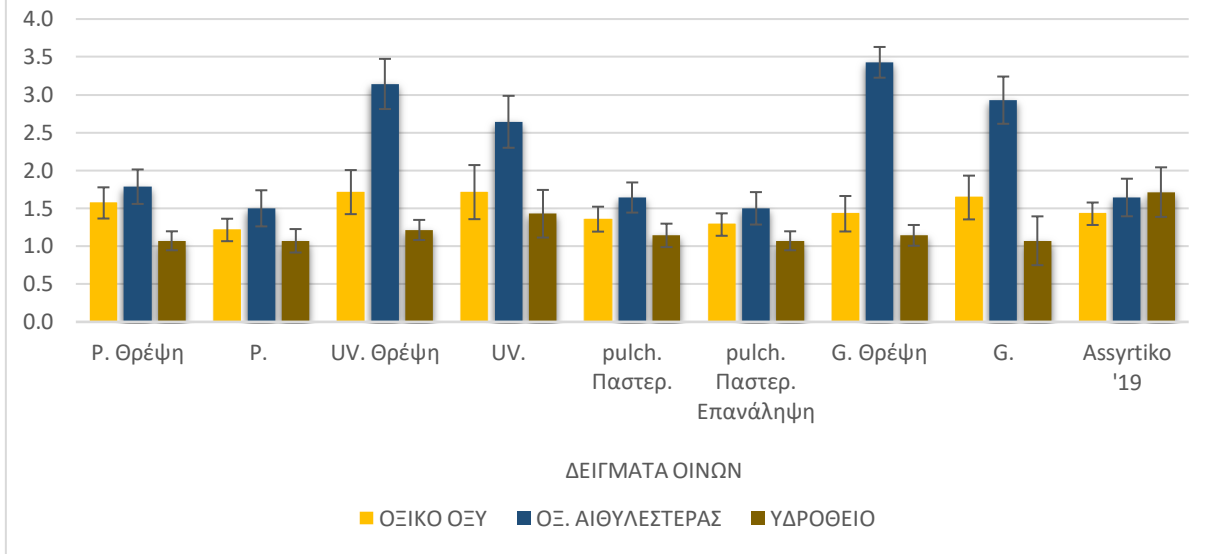
Γράφημα 20. Αρωματικό προφίλ Έντασης παραγόμενων πειραματικών Οίνων (Ένταση και Συνολική εκτίμηση αρώματος)

Όπως διαφαίνεται από το ανωτέρω γράφημα 20, τα καλύτερα δείγματα οίνων αναφορικά με την ένταση του αρωματικού προφίλ και συνάμα της συνολικής εκτίμησης του, προέρχονται από το διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima* και *S.cerevisiae* (με θρέψη, χωρίς και έπειτα τα δείγματα που προέρχονταν από παστεριωμένο γλεύκος). Το ίδιο ισχύει και για τα δύο γραφήματα που ακολουθούν (21, 22) με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά αρώματος και τις ελαττωματικές οσμές που ανιχνεύθηκαν στους οίνους.

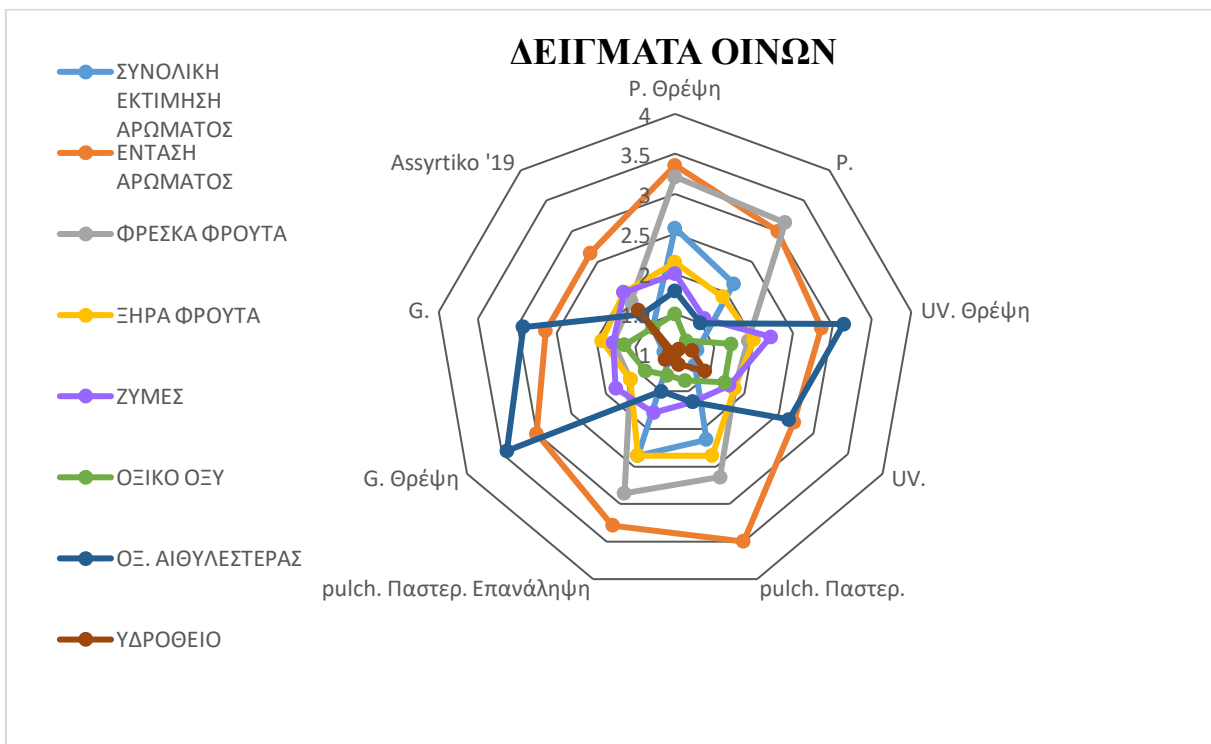


Γράφημα 21. Αρωματικό προφίλ – Ποιοτικά χαρακτηριστικά (άρωμα φρέσκων φρούτων, ξηρών φρούτων και ζυμών) παραγόμενων πειραματικών Οίνων με τα standard errors της στατικής επεξεργασίας μεταξύ των απαντήσεων.

ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ - ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΕΣ ΟΣΜΕΣ



Γράφημα 22. Αρωματικό προφίλ – Ελαττωματικές Οσμές (οξικό οξύ, οξικός αιθυλεστέρας, Υδροθείο) στους παραγόμενους πειραματικούς Οίνους με τα standard errors της στατικής επεξεργασίας μεταξύ των απαντήσεων.

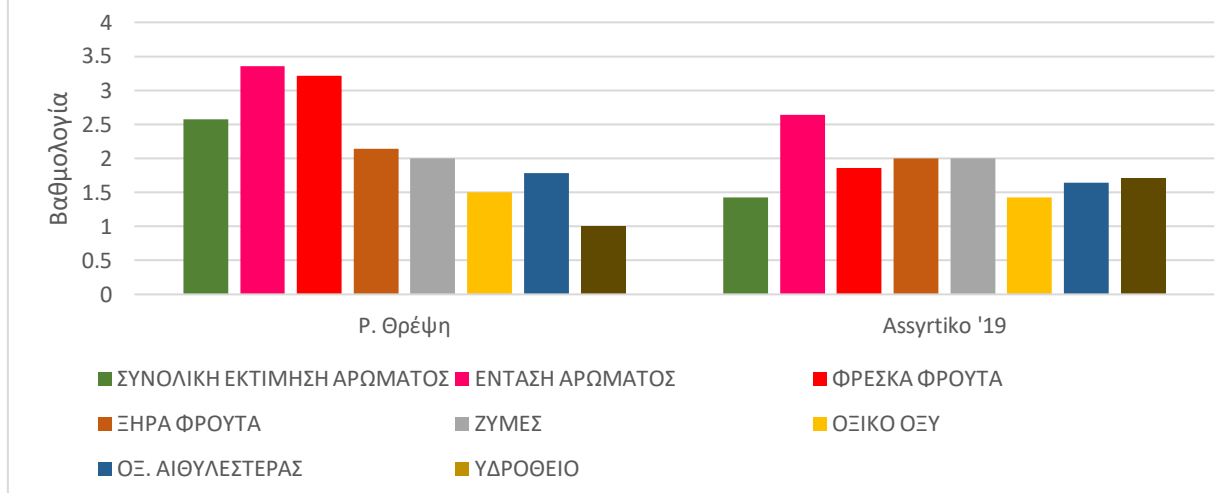


Γράφημα 23. Αποτελέσματα οσφρητικού οργανοληπτικού δειγμάτων οίνων.

Σύγκριση Οίνου Αναφοράς με το καλύτερο δείγμα ασύρτικο βάσει αξιολόγησης οσφρητικού Ελέγχου

Ακολουθεί η Σύγκριση του οίνου αναφοράς – Ασύρτικο '19 με τον πειραματικό οίνο, ο οποίος κατέκτησε την καλύτερη βαθμολογία στο ερωτηματολόγιο κατά τον οσφρητικό οργανοληπτικό έλεγχο.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΟΙΝΩΝ



Γράφημα 24. Σύγκριση οίνων – αθροιστική βαθμολογία ερωτηματολογίων – μεταξύ του παραγόμενου οίνου με διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima* – *S.c.rhone* και θρέψη και του Ασύρτικου '19, ο οποίος είναι ο οίνος αναφοράς.

Από το γράφημα προκύπτει, ότι ο οίνος που παράχθηκε με διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima* και *S.c.rhone* (και θρέψη DAP) είναι ανώτερος ποιοτικά από τον οίνο που ακολούθησε τη διαδικασία οινοποίησης βάσει του πρωτοκόλλου του εργαστηρίου οιнологίας (ασύρτικο'19), εφόσον παρουσιάζει καλύτερη βαθμολογία σε όλα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά αρώματος, ενώ το μόνο μειονέκτημά του έναντι του οίνου αναφοράς είναι η λίγο αυξημένη οσμή οξικού αιθυλεστέρα.

Συμπερασματικά, φαίνεται μέσω της οργανοληπτικής αξιολόγησης αρώματος, ότι επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των πτητικών ενώσεων των δειγμάτων με GC-MS, όπου ως ποιοτικότεροι βάσει αρώματος είχαν χαρακτηριστεί οι παραγόμενοι οίνοι με διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima*, οι οποίοι διέθεταν ενισχυμένο άρωμα φρούτων, όπως αχλαδιού και λιγότερες ελαττωματικές οσμές από τους υπόλοιπους (με διαδοχικό εμβολιασμό non-*Saccharomyces* ως εκκινητές *H.uvarum* και *H.guilliermondii*).

4.2.4 ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ

Σε όλα τα στάδια της διαδικασίας οινοποίησης έχουν προταθεί διαφορετικές προσεγγίσεις για τη μείωση των επιπέδων αλκοόλης στους οίνους, σε τέσσερις βασικές ομάδες (Varela et al., 2015). Οι στρατηγικές αμπελουργίας, αποτελεί την πρώτη από αυτές, ως πολλά υποσχόμενες, αλλά μακροπρόθεσμες τεχνικές, βασίζονται στην επιλογή νέων ποικιλιών σταφυλιών με χαμηλή συσσώρευση σακχάρων, πρακτικές αμπελουργίας προσαρμοσμένες σε άγουρα σταφύλια και διαφορετικές αγρονομικές μεθόδους (Olego et al., 2016). Από την άλλη πλευρά, η χρήση αντίστροφης όσμωσης, η νανοδιήθηση και η απόσταξη αντιπροσωπεύουν μια βραχυπρόθεσμου είδους τεχνική που εξαρτάται από τους ισχύοντες κανονισμούς ΕΕ και ΟΙΥ. Επιπλέον, αυτές οι διαδικασίες μπορεί να αυξήσουν το κόστος παραγωγής και επίσης να θέσουν σε κίνδυνο την οργανοληπτική ποιότητα του οίνου, λόγω μείωσης των πτητικών ενώσεων (Schmidtke et al. 2012). Λαμβάνοντας υπόψη τις πιθανές μικροβιολογικές προσεγγίσεις, η εφαρμογή στελεχών non-Saccharomyces, τα οποία να χαρακτηρίζονται από χαμηλότερα ποσοστά μετατροπής σακχάρων σε αιθανόλη, ως εμβολίων-εκκινητών ζύμωσης σε διαδοχικό εμβολιασμό με *Saccharomyces cerevisiae*, αποτελεί πλέον έναν αποτελεσματικό τρόπο αντιμετώπισης του προβλήματος των οίνων υψηλής αλκοόλης, ευρέως αποδεκτό, (Kutyna et al. 2010) με μείωση 0,5 έως 2 % vol. Πλέον, η έρευνα έχει στραφεί στην απομόνωση αυτών των στελεχών με στόχο τον χαρακτηρισμό τους υπό ελεγχόμενες αλκοολικές ζυμώσεις (στην παρούσα ερευνητική μελέτη, η απομόνωση των στελεχών *Hanseniaspora*, έλαβε χώρα σε αμπελώνες της Σαντορίνης το έτος 2018). Η χρήση μικτών καλλιέργειών επιλεγμένων ζυμών non-Saccharomyces σε συνδυασμό με *Saccharomyces* για την αλκοολική ζύμωση οίνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ποιοτικών αρωματικών ενώσεων, αλλά δυστυχώς και ανεπιθύμητων χαρακτηριστικών ενώσεων (π.χ. πτητικών φαινολών και οξικού αιθυλεστέρα) που μπορούν να επηρεάσουν τόσο τη δομή όσο και το αρωματικό προφίλ των παραγόμενων οίνων. Επιπλέον, τα μεταβολικά προϊόντα των διαφορετικών στελεχών non-Saccharomyces, μεμονωμένα ή σε μικτές καλλιέργειες, έχει αποδειχθεί ότι χρησιμεύουν ως αποτελεσματικός μηχανισμός τόσο μέσω αερόβιου (αναπνοής) όσο και αναερόβιου (ζύμωσης) μεταβολισμού (Ciani et al., 2016), για τη μείωση της παραγωγής αιθανόλης στους οίνους (Ciani et al. 2015). Τα αποτελέσματα των ερευνών που εστιάζουν προς αυτή την κατεύθυνση είναι αισιόδοξα, όμως χρειάζεται διεξοδικότερη μελέτη επί του θέματος, ώστε οι συγκεκριμένες ζύμες να μπορέσουν να κριθούν εμπορεύσιμες και κατάλληλες προς βιομηχανική χρήση.

Στόχοι Έργου

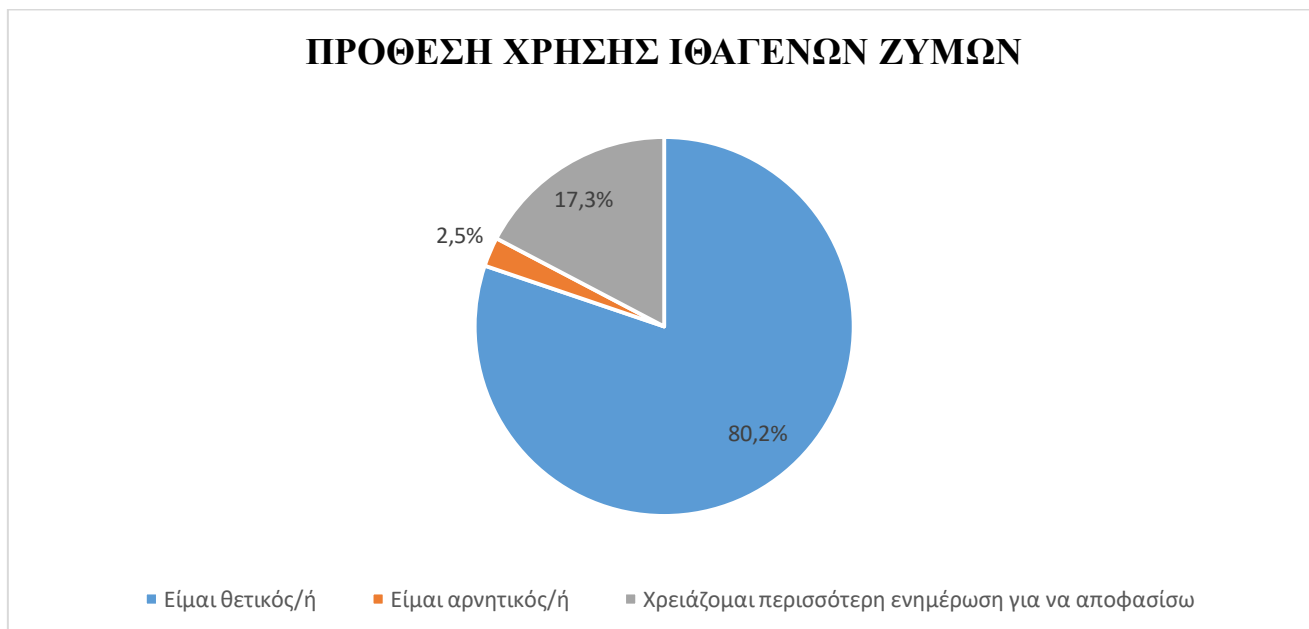
Η παρούσα ερευνητική εργασία αποτελεί μέρος σχετικού προγράμματος με τίτλο «Αξιοποίηση νέας φυσικής Ελληνικής μικροβιακής χλωρίδας προς παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας». Το πρόγραμμα έχει ως στόχο την απόκτηση επιστημονικής γνώσης μέσω της εφαρμοσμένης μικροβιακής βιοχημείας και της βιοτεχνολογίας, της μικροβιολογίας του οίνου της παθολογίας των φυτών, της οινοποίησης και της μοριακής βιοτεχνολογίας, με την ενδελεχή καταγραφή της φυσικής ιθαγενούς «άγριας» μικροχλωρίδας που σχετίζεται με τη διεργασία της αυθόρμητης οινοποίησης, η οποία θα οδηγήσει στην κατανόηση των διεργασιών (βοηθικές, μικροβιολογικές μεταβολές) που υφίστανται καθ'όλα τα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας της οινοποίησης. Αναφέρεται στην υλοποίηση οινοποιητικών επιχειρήσεων με σκοπό την παραγωγή υψηλής ποιότητας ελληνικού τυποποιημένου οίνου, με βάση εντελώς τοπικούς πόρους δηλαδή αρχικές ελληνικές ποικιλίες, τοπικά απομονωμένα και ταυτοποιημένα είδη ζυμομυκήτων κλπ., που θα καταφέρουν να αναδείξουν τις ιδιαίτερες οργανοληπτικές ιδιότητες του παραγόμενου οίνου και να αποκτήσουν ξεχωριστή θέση στην αγορά.

Το Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του ΓΠΑ, όπου έλαβαν χώρα οι πειραματικές οινοποιήσεις της παρούσης ερευνητικής εργασίας, είναι υπεύθυνο για τη διεξαγωγή εργαστηριακής κλίμακας οινοποίησης με τη χρήση επιλεγμένων στελεχών ζύμης, οργανοληπτικής αξιολόγησης και γευστιγνωσίας, καθώς και μεγάλης κλίμακας οινοποίησης και έρευνας αγοράς.

Ερωτηματολόγιο οινοποιείων

πο σχετική έρευνα σε οινοποιεία, η οποία έλαβε χώρα στις αρχές του ίδιου έτους με προσπάθεια του ΓΠΑ να προσεγγίσει το θέμα των άγριων ζυμών στην αγορά, φαίνεται πως υπήρξε σχετικά μικρή συμμετοχή από τα ελληνικά οινοποιεία, στα οποία απευθυνόταν. Το σχετικό ερωτηματολόγιο «πρόθεσης χρήσης ιθαγενών ζυμών στην οινοποίηση» δημιουργήθηκε με πρωτοβουλία της κ. Καλλίθρακα. Μόλις τα 80 μεγαλύτερα εκ των 600 συνολικά οινοποιείων, με τα οποία υπήρξε επικοινωνία, έλαβαν μέρος στην έρευνα που διεξήχθη (εικόνα 78, γράφημα 24). Στόχος ήταν να συμμετάσχουν όσο το δυνατόν περισσότερα, ώστε να εξαχθούν χρήσιμα αντιπροσωπευτικά στατιστικά αποτελέσματα της οινοπαραγωγής της Ελλάδος. Οι περισσότεροι οινοπαραγωγοί από αυτούς που συμπλήρωσαν το ερωτηματολόγιο, δήλωσαν ανοιχτοί σε ένα τέτοιο βήμα, εκδηλώνοντας ενδιαφέρον προς μια τέτοια κίνηση, η οποία χαρακτηρίστηκε θετική για την εξέλιξη της ελληνικής οινοποιίας, ακολουθώντας τις νέες τάσεις της αγοράς ως προς τον διεθνή ανταγωνισμό. Βέβαια, όσον αφορά στην τεράστια αποχή, διαφαίνεται αδιαφορία έως και κλίμα αρνητισμού, λόγω κυρίως της μεγάλης άγνοιας επί του θέματος και των επιστημονικών εξελίξεων που το συνοδεύουν τουλάχιστον την τελευταία δεκαετία ή μπορεί να συντρέχουν άλλοι λόγοι π.χ.οικονομικοί ή πολύ παραδοσιακά οινοποιεία χωρίς πρόθεση εκσυγχρονισμού.

Επιπλέον, προτάθηκε να λάβει χώρα μια ημερίδα με σκοπό την προσέλκυση οινικών επιχειρήσεων, μέσω της ενημέρωσης τους και της ενδεδειγμένης παρουσίασης του προγράμματος. Τελικός στόχος είναι τα οινοποιεία, τα οποία θα εκδηλώσουν πραγματικό ενδιαφέρον για το τελικό παραγόμενο προϊόν, να δείξουν και την αντίστοιχη διάθεση με το να επενδύσουν στην έρευνα με άμεση συνεργασία τους με το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.



Γράφημα 24. Πρόθεση χρήση ιθαγενών ζυμών από τα οινοποιεία.

Από τις 80 απαντήσεις των οινοποιείων ως προς την «πρόθεση ή μη χρήσης ιθαγενών ζυμών στην οινοπαραγωγή», θετικά αποκρίθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό 80,2 %, αρνητικά μόλις το 2,5 % και τέλος, το 17,3 % δήλωσε ότι χρειάζεται περισσότερη ενημέρωση για να αποφασίσει (γράφημα 24). Αυτό το ποσοστό αναποφασιστων οινοπαραγωγών θα μπορούσε με πρόσκληση να παρεβρεθεί στη σχετική ημερίδα, ώστε να κατανοήσει και να ενστερνιστεί τα οφέλη μιας τέτοιας καινοτομίας. Γενικά, τα αποτελέσματα του ερωτηματολογίου κρίνονται ως πολύ ενθαρρυντικά.

Επιλογή ζυμών:

Άλλο/α: (σημειώστε)

Πως αξιολογείτε τη χρήση ιθαγενών ζυμών: αρνητικά..., αδιάφορα..., θετικά....

Πως αξιολογείτε τα παρακάτω χαρακτηριστικά των ζυμών για την παραγωγή ενός ποιοτικού οίνου (ως προς την σημαντικότητά τους)

1 ελάχιστα σημαντικό, 2 λίγο σημαντικό, 3 μέτρια σημαντικό, 4 πολύ σημαντικό, 5 πάρα πολύ σημαντικό)

Αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες....

Αντοχή σε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης....

Παραγωγή διοξειδίου του θείου (SO₂)

Αντοχή σε SO₂

Διατήρηση χαμηλής πτητικής οξύτητας

Απουσία αναγωγικών οσμών....

Ενίσχυση φρουτώδους και ανθικού αρώματος.....

Παραγωγή πολύπλοκων αρωμάτων.....

Ρυθμός αλκοολικής ζύμωσης.....

Μεταβολή της ογκομετρούμενης οξύτητας.....

Παραγωγή γλυκερόλης (λιπαρότητα, σώμα οίνου).....

4. Χρήση ιθαγενών ζυμών

Ως επιχείρηση θα χρησιμοποιούσατε ιθαγενείς ζύμες; ΝΑΙ ΟΧΙ

Με ποιες προϋποθέσεις:

Εικόνα 78. Ερωτηματολόγιο προς οινοποιεία, με ερωτήσεις σχετικές με την πρόθεση χρήσης ιθαγενών/γηγενών ζυμών στην οινοποίηση.

4.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ NON-SACCHAROMYCES

Κατά την τελευταία δεκαετία, αναφέρθηκαν συγκεκριμένα στελέχη ζυμομυκήτων, τα οποία δεν ανήκουν στο είδος *Saccharomyces*, ως ικανά να βελτιώσουν διαφορετικές τεχνολογικές και οργανοληπτικές παραμέτρους του οίνου (π.χ. πολυπλοκότητα αρώματος, σταθερότητα χρώματος, οξύτητα, παραγωγή πολυσακχαριτών και διαύγαση) (Castrillo et al. 2019, Lin et al. 200). Η χρήση τους φαίνεται να επικεντρώνεται στη **μείωση της περιεκτικότητας των οίνων σε αιθανόλη και στην αύξηση της απελευθέρωσης μαννοπρωτεϊνών μαζί με την επίδραση των υδρολυτικών ενζύμων στην εξαγωγή προδρόμων χρώματος και αρώματος από σταφύλια** (Belda et al. 2016 (phenolic extraction), Esteves et al. 2019). Οι παραπάνω αναλυτική (αρωματικό προφίλ πειραματικών οίνων, υποκεφάλαιο 3.2.4) περιγραφή των παραγόμενων οίνων ασύρτικο, συμπίπτει αρκετά με την οργανοληπτική τους περιγραφή. Ορισμένες πτητικές ενώσεις δεν αναφέρονται ως αρωματικά συμβολής του χαρακτήρα, λόγω του ότι βρίσκονται κάτω από το κατώφλι αντίληψης (όριο ανίχνευσης). Παρατηρήθηκε ότι οι πτητικές αρωματικές ενώσεις είναι λίγο περισσότερες σε αριθμό και συγκέντρωση ανάμεσα στα δείγματα με θρέψη και σε αυτά χωρίς (3.2.4 υποενότητα)

Παρά το γεγονός ότι στο δεύτερο κύκλο οινοποίησης, δεν πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων, υπήρξε οσφρητική παρατήρηση και καταγραφή των αρωμάτων που ανέδιδε η κάθε φιάλη καθ' όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, η οποία ολοκληρώθηκε από τους γηγενείς σακχαρομύκητες του γλεύκους. Σημειώνεται ότι τα αρώματα ήταν πιο έντονα και ευχάριστα (άρωμα φρέσκων πράσινων φρούτων, όπως μήλο και αχλάδι και λιγότερο υπερώριμων) με λιγότερα ελαττώματα οσμής και συνεπώς οι παραγόμενοι οίνοι που προέκυψαν ήταν πιο ποιοτικοί. Δείγμα των οίνων έχει κρατηθεί σε κατεψυγμένη κατάσταση και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μελλοντικό χρόνο διερεύνηση των πτητικών, αρωματικών τους ενώσεων και έπειτα να υπάρξει μια σύγκριση μεταξύ των παραγόμενων οίνων από το δεύτερο και τέταρτο κύκλο οινοποίησης.

Αντίθετα, ορισμένες από τις προκλήσεις που συνδέονται με τη χρήση ειδών non-*Saccharomyces* στη σύγχρονη οινοποίηση σχετίζονται με τη χαμηλή ισχύ ζύμωσης τους και τη χαμηλή ανοχή τους στο SO₂, (Grazia et al. 2019-N/S mix starters, reduction of ethanol), γι' αυτό το λόγο θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν υποκατάστατά του.

Επιπλέον, η χρήση ορισμένων non-*Saccharomyces*, έχει αναφερθεί πως εμφανίζει αρνητικές συνέπειες για τους οίνους, που σχετίζονται με **την αργή ζύμωση ή την υπερβολική παραγωγή οξικού οξέος, οξικού αιθυλεστέρα, ακεταλδεϋδης ή ακετοΐνης** (Spano et al. 2016). Αυτό παρατηρήθηκε στους οίνους με εμβόλιο-εκκίνησης *Hanseniaspora*, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν με ιδιαίτερως αυξημένη συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα, οσμής κόλλας και ασετόν. Η αργή ζύμωση παρατηρήθηκε κατά τον διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima* με σακχαρομύκητα σε παστεριωμένο γλεύκος, όπου η *M.pulcherrima* μεταβόλιζε τα σάκχαρα με υπερβολικά μικρό ρυθμό σε σχέση με την αντίστοιχη ζύμωση ανοιχτή στο περιβάλλον. Το ότι το δοχείο είχε κλειστό στόμιο, μπορεί να θεωρηθεί ως περιβάλλον ημιαερόβιο που λειτούργησε ανασταλτικά στην ανάπτυξη της άγριας ζύμης.

Οι άλλες δυο άγριες ζύμες του γένους *Hanseniaspora* δεν εμφάνισαν κάποιο αντίστοιχο πρόβλημα πέραν του ότι σε ημιαερόβιες συνθήκες ο *H.guilliermondii* εμφάνισε μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης, ενώ αντιθέτως σε καθαρά αερόβιες συνθήκες (χωρίς όμως αερισμό) παρόμοια παραγωγή με τους οίνους *H.uvarum*. Κάτι το οποίο εξηγείται μέσω του μεταβολισμού τους, καθώς ο πρώτος είναι θετικός κατά Crabtree, ενώ ο δεύτερος αρνητικός.

Ωστόσο, άλλα είδη του ίδιου γένους, όπως το *M. viticola* (Liu et al. 2017 – Sequential fermentation) και το *M. fructicola* (Boscaino et al. 2019 – M.f.-S.c. mix starter-volatile compounds), χαίρουν επίσης επιστημονικής προσοχής και η ανάπτυξη της εφαρμογής τους στη βιομηχανία οίνου έχει ήδη αρχίσει.

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι ζυμομύκητες non-*Saccharomyces* είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή μιας μεγάλης ποικιλίας ενζύμων που συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων. **Μεταξύ αυτών, το γένος *Metschnikowia* ξεχωρίζει λόγω της ικανότητάς του να παράγει υδρολυτικά ένζυμα** (γλυκοσιδάσες, πρωτεάσες και πηκτινάσες), τα οποία μπορεί να επηρεάσουν άμεσα τις αισθητηριακές και τεχνολογικές ιδιότητες του οίνου (Jolly et al. 2014).

ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ

Η ποικιλία Ασύρτικο θεωρείται μία εκ των σημαντικότερων ελληνικών λευκών ποικιλιών και ανερχόμενη παγκοσμίως. Παρότι γηγενής ποικιλία από το νησί της Σαντορίνης, η προσαρμοστικότητά της και οι μεγάλες δυνατότητες των παραγόμενων οίνων μετέδωσαν γρήγορα την καλλιέργειά της σε πολλές διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές εντός και εκτός του Ελλαδικού χώρου. Το μεγάλο ενδιαφέρον, εγχώριο και διεθνές αποτέλεσε κίνητρο για την περαιτέρω μελέτη της ποικιλίας ασύρτικο στο παρόν πείραμα οινοποίησης που έλαβε χώρα με διαδοχικό εμβολιασμό, με εμβόλιο εκκίνησης non-*Saccharomyces* και έπειτα *Saccharomyces cerevisiae*, με ζητούμενο τη μείωση της συγκέντρωσης

αιθανόλης στους παραγόμενους οίνους, ενισχύοντας παράλληλα το ποιοτικό αρωματικό τους προφίλ. Μελετήθηκε η επίδραση που μπορεί να έχουν στη διαμόρφωση του οργανοληπτικού χαρακτήρα ενός οίνου και συμβολή τους στην οινοποίηση της συγκεκριμένης ποικιλίας χαρακτηρίστηκε ως θετική. Για τη μελέτη του αρώματος των παραγόμενων οίνων πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική δοκιμή και τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τα αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των πτητικών συστατικών του αρώματος των οίνων μέσω αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας GC/MS. Στο συγκεκριμένο πείραμα οινοποίησης, πέραν του *M.pulcherrima* που παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον τα τελευταία έτη, επιλέχθηκαν οι ζύμες *Hanseniaspora uvarum* & *H.guilliermondii*, διότι το ασύρτικο είναι γηγενής ποικιλία της Σαντορίνης, όπως και οι συγκεκριμένες ζύμες, οι οποίες έχει μελετηθεί πως κατέχουν το 90% της φυσικής μικροχλωρίδα των αμπελώνων της Σαντορίνης

ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ NON-SACCHAROMYCES – ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ (Crabtree)

Μια σημαντική παράμετρος που λαμβάνουν υπόψιν οι παραγωγοί οίνου είναι η **επιλογή του κατάλληλου στελέχους** μικροοργανισμού για να πραγματοποιηθεί η επιθυμητή διαδικασία. Υπάρχουν διαφορετικά στοιχεία που καθιστούν τον κάθε μικροοργανισμό κατάλληλο για την εκάστοτε οινοποίηση, όπως είναι η δυνατότητά τους να ζυμώνουν αρκετές κατηγορίες σακχαρούχων υποστρωμάτων. Επιπλέον, κάποιοι μικροοργανισμοί εμφανίζουν μεγαλύτερη αντοχή σε δυσκολίες κατά την αλκοολική ζύμωση, και ανταπεξέρχονται καλύτερα σε παραμέτρους όπως υψηλή θερμοκρασία, μεγάλη συγκεντρώση σακχάρων ή αυξημένα επίπεδα αιθανόλης. Τέλος, κάποιοι έχουν την ικανότητα ζύμωσης και των πεντοζών που εμπεριέχονται στο υπόστρωμα της ζύμωσης (Mohd Azhar et al., 2017). Επιπρόσθετα, είναι ευρέως γνωστό ότι οι ζύμες non-Saccharomyces επηρεάζουν την τελική ποιότητα των οίνων (Fleet 2008). Κατά συνέπεια, η διαδικασία οινοποίησης μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η γνώση του **μεταβολισμού των ζυμομυκήτων που εμπλέκονται στη διαδικασία**. θετικές στο φαινόμενο Crabtree είναι η *M.pulcherrima* και η *H.guilliermondii*, ενώ αρνητική είναι η *H.uvarum* που σημαίνει ότι έχει ζυμωτικό μεταβολισμό και όχι αναπνευστικό όπως οι άλλες δύο. Ο *S.cerevisiae* θεωρείται και αυτός θετική ζύμη, αλλά ενίοτε παρουσιάζει διττή φύση. Επίσης τα στελέχη του γένους *Hanseniaspora*, παρουσιάζονται ως ελαφρώς φρουκτόφιλοι μικροοργανισμοί, κάτι το οποίο επαληθεύεται και από δημοσιευμένες μελέτες, όπως των Martin et al.2018, όπου οι non-Saccharomyces, *Hanseniaspora*, παρουσίασαν ελάχιστα υψηλότερη κατανάλωση φρουκτόζης από ότι γλυκόζης, καθώς και αρκετοί άλλοι συγγραφείς ανέφεραν τον φρουκτοφιλικό χαρακτήρα των γηγενών ζυμών *H. uvarum* και *H. guilliermondii* (Ciani and Fatichenti 1999; Englezos et al. 2015). Οι μικτές καλλιέργειες των *H. guilliermondii* / SC, *H. uvarum* / SC αυξάνουν την ποικιλομορφία της γένυσης και την πολυπλοκότητα. Ποικιλίες λευκού και κόκκινου γλεύκους- όπως Bobal, Macabeo, Chardonnay, Pinot Noir, Negroamaro, το Tempranillo, το Cabernet Sauvignon, το Merlot και το Tannat – φέρεται ότι οδήγησαν σε οίνους με ποιοτικότερο αρωματικό προφίλ.

4.3.2 ΕΙΔΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή με θέμα «Μελέτη Αλκοολικής Ζύμωσης και Ποιοτικών Χαρακτηριστικών Οίνων που παρήχθησαν με χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων», κατά την πειραματική διαδικασία, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση τριών άγριων στελεχών ζυμών, *M.pulcherrima*, *H.uvarum* και *H.guilliermondii*, που ανήκουν στις άγριες ζύμες της φυσικής μικροχλωρίδας των σταφυλιών και του γλεύκους, ως προς τη χρήση τους σαν εμβόλια-εκκινητές αλκοολικής ζύμωσης οινογλεύκους προς παραγωγή ποιοτικών οίνων ποικιλίας ασύρτικο. Η μονοκαλλιέργεια των ζυμών ως εμβόλιο στην αρχή της ζύμωσης δεν επέφερε ικανοποιητικά αποτελέσματα, διότι οι non-Saccharomyces είναι ευαίσθητοι σε υψηλά επίπεδα αιθανόλης με όχι τόσο μεγάλη ζυμωτική ισχύ. Επομένως, δεν δύνανται να ολοκληρώσουν την αλκοολική ζύμωση και κρίνεται απαραίτητη η χρήση σακχαρομύκητα για την αποζύμωση μέχρι ξηρότητας.

Η οινοποίηση των τελικών πειραματικών οίνων επιλέχθηκε να λάβει χώρα με τη στρατηγική του διαδοχικού εμβολιασμού με επιλεγμένες ζύμες non-Saccharomyces με *Saccharomyces cerevisiae* και τα οινικά προϊόντα ελέγχθηκαν με στόχο την πιθανή μείωση της συγκέντρωσης τους σε αιθανόλης σε σχέση με τον οίνο αναφοράς (με εμβόλιο εκκίνησης *S.cerevisiae*), κάτι το οποίο στέφθηκε με επιτυχία, στα επίπεδα που περιγράφουν οι μέχρι τώρα δημοσιευμένες βιβλιογραφικές αναφορές, τις οποίες και επαλήθευσαν. Επιπρόσθετα, αυξήθηκε η συγκέντρωση των οίνων σε γλυκερόλη σε σχέση με τον οίνο αναφοράς και στις μονοκαλλιέργειες τους σε παστεριωμένο γλεύκος και μη, επιβεβαιώνοντας πάλι τα αποτελέσματα δημοσιευμένων ερευνών.

Στην οινοποίηση του μη παστεριωμένου γλεύκους με εμβόλιο μονοκαλλιέργειας άγριας ζύμης ως εκκινητή, όπου έπειτα από την αύξηση της αιθανόλης πάνω από 2-6%, αναλαμβάνουν να φέρουν εις πέρας τη ζύμωση μέχρι ξηρότητας οι γηγενείς σακχαρομύκητες του γλεύκους, οι τιμές καθορίζονται και για τους τρεις οίνους στο 10,61-11,71 % vol. Λογικά, ο γηγενής σακχαρομύκητας που προουπήρχε στο γλεύκος είχε μεγαλύτερη ζυμωτική ισχύ και αλκοολογόνο ικανότητα από τον *S.c.rhone*. Επιπρόσθετα, παρατηρείται από τον συγκεντρωτικό πίνακα 55, ότι η αλκοολική ζύμωση εξελίχθηκε με διαφορετική ταχύτητα στις κανονικές και τις επαναληπτικές φιάλες, παρόλο που διεξήχθησαν υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες.

Σε κανονικές συνθήκες οινοποίησης, με διαδοχικό εμβολιασμό διαφορετικού στελέχους non-Saccharomyces και με τον ίδιο σακχαρομύκητα rhone σε μη παστεριωμένο γλεύκος, οι τιμές διαμορφώνονται σε αρκετά διαφορετικό επίπεδο από 7,82 - 9,9 % vol. Με το διαδοχικό εμβολιασμό *M.pulcherrima* - *S. cerevisiae* να καταλαμβάνει την πρώτη θέση μαζί με τον *H.guilliermondii* (μετά την ανακατανάλωση αιθανόλης) σε οίνους με το μικρότερο αλκοολικό τίτλο 8,03 και 7,82 αντίστοιχα σε % vol, άρα παρουσιάζεται μείωση του παραγόμενου οίνου σε αιθανόλη, ακολουθούμενη με διαφορά από το εμβόλιο *H. uvarum* + *S. cerevisiae* με 9,5-9,61 % vol.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, οι non-Saccharomyces μπόρεσαν να μειώσουν τη συγκέντρωση αιθανόλης στους οίνους όταν η ζύμωση λαμβάνει χώρα σε περιβάλλον οξυγόνου, ακόμα και σε υπό ημιαεροβίωση, αλλά δε διερευνήθηκαν συγκεκριμένες συνθήκες αερισμού. Όλες οι ζύμες είναι θετικές κατά Crabtree (ο *S.c.* μπορεί να γίνεται δυνητικά), εκτός από το *H.uvarum* που είναι αρνητική και διαθέτει διαφορετικό μεταβολισμό.

Η μείωση αιθανόλης των παραγόμενων οίνων (πίνακας 56) από μη παστεριωμένο γλεύκος με διαδοχικό εμβολιασμό σε σχέση με τον οίνο αναφοράς *S.c.* 10,4 % vol. ανέρχεται από 0,6-1,73 % vol για *M.pulcherrima* εκκινητή, 0,74-1,13 % vol για *H.uvarum* εκκινητή και 0,52-0,68 % vol για *H.guilliermondii* εκκινητή-εμβόλιο.

Κατά τη στρατηγική οινοποίησης με διαδοχικό εμβολιασμό, μεσολάβησαν πολλές ημέρες μέχρι το δεύτερο εμβολιασμό. Συγκεκριμένα 7 ημέρες για τα μη παστεριωμένα γλεύκη και μέχρι 13 για τα παστεριωμένα. Αυτή η μεγάλη καθυστέρηση είναι αμφιλεγόμενη, διότι δίνεται η ευκαιρία σε άλλους μικροοργανισμούς του γλεύκους να αναπτυχθούν, οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν αλλοιώσεις στο τελικό προϊόν (συνήθως στις 3 ημέρες λαμβάνει χώρα ο διαδοχικός εμβολιασμός με σακχαρομύκητα). Η διάρκεια ζύμωσης του μη παστεριωμένου γλεύκους, σε πραγματικές συνθήκες οινοποίησης, μέχρι ξηρότητας, είναι 14 ημέρες, ενώ του αντίστοιχου εμβολιασμού σε παστεριωμένο γλεύκος φαίνεται να καθυστερεί από μία εβδομάδα έως 10 ημέρες και η ζύμωση μπορεί να χαρακτηριστεί αργή, υποτονική έως και «κολλημένη». Ακολούθως, η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν μικρότερη στα παστεριωμένα δείγματα οίνων, διότι έλαβε χώρα ο διαδοχικός εμβολιασμός όταν τα Brix ήταν κάτω από 15, το οποίο αποτέλεσε το κριτήριο επιλογής του χρόνου εμβολιασμού. Αυτό σημαίνει ότι σημαίνει οι non-Saccharomyces (επιλεγμένες άγριες ζύμες) είχαν μεταβολίσει με αναπνοή και όχι με ζύμωση αρκετά από αυτά, με αποτέλεσμα μικρότερη παραγωγή αιθανόλης και απαλευθέρωση περισσότερων αρωματικών. Επιπλέον, στο γλεύκος δεν υπήρχε μικροχλωρίδα (ανάπτυξη μικροχλωρίδας γλεύκους σε τριβλίο, εικόνα 63). Αντιθέτως, στο μη παστεριωμένο γλεύκος, λόγω τοξικότητας της αιθανόλης πάνω από μια συγκέντρωση και πριν τον εμβολιασμό με τον επιλεγμένο σακχαρομύκητα, φαίνεται πως τα ηνία της ζύμωσης πήρε κάποιος γηγενής σακχαρομύκητας, λίγο πιο ισχυρός από τον επιλεγμένο (θα ήταν χρήσιμο να είχε πραγματοποιηθεί απόμόνωση του και σχετική μελέτη). Αυτό εικάζεται ότι συνέβη, διότι ο διαδοχικός εμβολιασμός άργησε να γίνει (7^η ημέρα) και ίσως έπρεπε να είχε πραγματοποιηθεί νωρίτερα, κατά την 2-3^η ημέρα (48-72h), όπως προτείνεται από σχετικές δημοσιεύσεις. Αυτή η ενέργεια ίσως θα μπορούσε να μειώσει τις ελαττωματικές οσμές των παραγόμενων οίνων. Η ζύμη *M.pulcherrima* είναι γνωστό πως διαθέτει την πουλχεριμίνη που καταστέλλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών πέραν του *S.cerevisiae*. Ίσως γι' αυτό το λόγο τα μη παστεριωμένα δείγματα οίνων να είχαν καλύτερη βαθμολογία όσον αφορά στα ελαττωματικά χαρακτηριστικά, ενώ τα στελέχη *Hanseniaspora* που δε διαθέτουν αυτό τον παράγοντα βιολογικού ελέγχου, εμφάνισαν υψηλότερες τιμές οξικού αιθυλεστέρα. Από τη μία πλευρά, είναι γνωστό ότι παράγεται από τις συγκεκριμένες ζύμες, αυτός ο εστέρας, από την άλλη θα μπορούσε να ήταν απόρροια συνέργειας με άλλους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς του γλεύκους. Στην περίπτωση της *M.pulcherrima*, όπως προαναφέρθηκε, για 1-2 ημέρες κατά τον ενδιάμεσο χρόνο μεταξύ των δύο εμβολίων μπορεί να μην υπήρχε καθόλου στο γλεύκος και να είχε αναλάβει την σκυτάλη μέχρι το διαδοχικό εμβολιασμό η γηγενής μικροχλωρίδα.

Η παρούσα εργασία, αποτέλεσε προσπάθεια αξιολόγησης του συνολικό δυναμικού των επιλεγμένων στελεχών non-Saccharomyces και τη συνεισφορά τους στο αρωματικό προφίλ με παραγωγή επιθυμητών πτητικών ενώσεων και ταυτόχρονη μείωση της αιθανόλης των παραγόμενων οίνων. Επιπλέον, ξετάστηκαν οι ζύμες όσον αφορά τη δυνατότητα για γρήγορη εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης, η παραγωγή γλυκερόλης, η πλήρη αποζύμωση των σακχάρων μέχρι ξηρότητας αν είναι επιθυμητό κριτήριο και η αδρανολοποίηση των ιθαγενών μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τη δραστηριότητα βιοελέγχου της *M.pulcherrima*, η οποία είναι γνωστό ότι ανταγωνίζεται τη γηγενή άγρια μικροχλωρίδα του γλεύκους, αλλά όχι και τον *S.cerevisiae* φαίνεται να έχει ακόμα ένα πλεονέκτημα, έναντι των άλλων δύο, όπως προαναφέρθηκε. Αυτό φαίνεται να είναι απαραίτητο κριτήριο επιλογής, ειδικά αν ο ενδιάμεσος χρόνος μεταξύ του διαδοχικού (δεύτερου) εμβολιασμού είναι μεγάλος και καθυστερήσει ο επιλεγμένος σακχαρομύκητας να επικρατήσει

στη ζύμωση με πιθανή μόλυνση του εν ζυμώσει γλεύκους από άλλους άγριους ιθαγενείς σακχαρομύκητες ή γενικά μικροοργανισμούς όπως βακτήρια που μπορούν να επιφέρουν αλλοιώσεις στους παραγόμενους οίνους. Ο διαδοχικός εμβολιασμός του γλεύκους είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερων πτητικών ενώσεων, από ότι ο οίνος αναφοράς, οι οποίες αναλύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τόσο με GC-MS όσο και με οσφρητικό οργανοληπτικό έλεγχο που ολοκλήρωσε επιτυχώς την αξιολόγηση του αρωματικού προφίλ. Τα υπό εξέταση εννιά δείγματα του οργανοληπτικού είναι τα κάτωθι: τα έξι δείγματα οίνων που παράχθηκαν από μη παστεριωμένο γλεύκος ασύρτικο και διαδοχικό εμβολιασμό non-Saccharomyces και S.c.rhone και οι επαναληπτικές τους ζυμώσεις. Οι αντίστοιχοι παραγόμενοι οίνοι M.pulcherrima παστεριωμένου γλεύκους και ο οίνος αναφοράς ασύρτικο '19 με αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης 12,1-12,2 % (v/v). Οι ζύμες Hanseniaspora κατά το διαδοχικό εμβολιασμό παρουσίασαν ελαττώματα, όπως μεγάλες συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα με οσμή κόλλα/ασετόν/διαλύτη, τα οποία κάλυψαν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά συνεισφοράς τους και κρίνονται ως μη αποδεκτές. Το γλεύκος ασύρτικο κρίνεται κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, κυρίως σε συνδυασμό με την άγρια ζύμη M.pulcherrima, η οποία σαφώς ενισχύει το αρωματικό προφίλ των παραγόμενων οίνων με αρώματα κυρίως πράσινων φρέσκων φρούτων, όπως πράσινο μήλο και ώριμο αχλάδι. Ως γενικό συμπέρασμα εξάγεται ότι και οι τρεις άγριες ζύμες έχουν την ικανότητα να μειώσουν την συγκέντρωση αιθανόλης στους παραγόμενους οίνους με τη χρήση τους ως εμβόλιο εκκίνησης της ζύμωσης, με το μειονέκτημα ότι δε μπορούν να πραγματοποιήσουν αποζύμωση μέχρι ξηρότητας, και γι' αυτό το λόγο η παρουσία S.cerevisiae με διαδοχικό εμβολιασμό στο εν ζυμώσει γλεύκος κρίνεται απαραίτητη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση του οξικού οξέος και του οξικού αιθυλεστέρα που σε ορισμένες περιπτώσεις έτεινε να υποβαθμίσει την ποιότητα των οίνων, ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες. Στα κύρια πλεονεκτήματα αυτής της στρατηγικής του διαδοχικού εμβολιασμού non-Saccharomyce/S.cerevisiae, ανήκουν η μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης στους παραγόμενους πειραματικούς οίνους, η αύξηση της γλυκερόλης και των αρωματικών που συμβάλλουν στα ποιοτικά χαρακτηριστικά, κυρίως των εστέρων που αποτέλεσαν το μεγαλύτερο μέρος των πτητικών ενώσεων των δειγμάτων.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ M.PULCHERRIMA ΩΣ ΕΜΒΟΛΙΟ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΟ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ S.C.

Για τη μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης σε γλεύκος ασύρτικο, η άγρια ζύμη M.pulcherrima κρίνεται ως καταλληλότερη, διότι παρουσίασε τη μεγαλύτερη μείωση σε διαδοχικούς εμβολιασμούς από τις άλλες δύο ζύμες Hanseniaspora, και κατάφερε παράλληλα να ενισχύσει το ποιοτικό αρωματικό προφίλ των παραγόμενων πειραματικών, το οποίο χαρακτηρίστηκε από αρωματικούς εστέρες που προδίδουν χαρακτήρα τροπικών και φρέσκων πράσινων φρούτων, αλλά και ώριμων, όπως μπανάνας, αχλαδιού και μήλου, αλλά επίσης διακρίνεται και από αυξημένη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα ειδικά στα δείγματα οίνων Hanseniaspora, ενώ ο οργανοληπτικός έλεγχος επιβεβαίωσε και τα δύο. Γενικά οι συνολικοί εστέρες σε άθροισμα ήταν ιδιαίτερα αυξημένοι. Η σύγκριση έγινε μεταξύ των διαδοχικών εμβολιασμών διαφορετικών non-Saccharomyces, διότι GC-MS δεν κατάφερε να πραγματοποιηθεί σε οίνο αναφοράς, μόνο στο αντίστοιχο γλεύκος. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα πως τα στελέχη που μελετήθηκαν είναι ικανά να δώσουν λευκούς οίνους υψηλής ποιότητας διαφορετικής αρωματικής έντασης, καθώς και μερικών ελαττωμάτων. Στην συγκεκριμένη, όμως, ποικιλία φαίνεται να ταιριάζει περισσότερο ως εμβόλιο εκκίνησης, η άγρια ζύμη M.pulcherrima, η οποία αύξησε πολύ τους εστέρες και όχι με ανεπιθύμητο τρόπο, αλλά ενισχύοντας θετικά το αρωματικό προφίλ των παραγόμενων οίνων. Στη συνέχεια, προτείνεται μια στρατηγική οινοποίησης για νέο διαδοχικό εμβολιασμό γλεύκους ασύρτικο με διάφορες παραμέτρους που μπορούν να αλλάξουν προς βελτιστοποίηση της διαδικασίας και των παραγόμενων αρωμάτων.

Το στέλεχος M. pulcherrima, όπως έχει προαναφερθεί, παρουσιάζει χαμηλή έως μέτρια ζυμωτική ισχύ, όπως συμβαίνει με τα περισσότερα γηγενή είδη non-Saccharomyces που υπάρχουν στα σταφύλια. Αυτό το είδος είναι ευαίσθητο στις συγκεντρώσεις αιθανόλης άνω του 2–5% (v/v), οπότε φυσικά εξαφανίζεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης όταν ξεπεραστεί αυτή η συγκέντρωση αιθανόλης. Η ικανότητα ζύμωσης του M. pulcherrima είναι περιορισμένη υπό συνθήκες ζύμωσης απλού εμβολιασμού, εξαρτάται από το στέλεχος και την καλλιέργεια ανάλογα με τις συνθήκες ζύμωσης. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από ορισμένες ερευνητικές ομάδες σχετικά με την αρχική σύνθεση γλεύκους, το pH, το φωσφορικό διαμμώνιο, το διοξείδιο του θείου και τη θερμοκρασία δείχνουν τη σημασία της διεξαγωγής μελετών προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι που έχουν σημαντική επίδραση στον μεταβολισμό του M. pulcherrima (Jolly et al.2003, Zhu et al.2020). Οι περισσότερες μελέτες ανέφεραν ότι η άγρια ζύμη M. pulcherrima παρήγαγε έως και 4,5% (v/v) αιθανόλη (Hranilovic et al. 2020 – M.p/S.c. co-fermentation). Αυτή η μέτρια ισχύς ζύμωσης καθιστά αδύνατη τη χρήση ενός μόνο εμβολίου Metschnikowia για ζύμωση οίνου. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη του M. pulcherrima είναι σε θέση να παράγουν περίπου 9% (v / v) αιθανόλη, έπειτα από πολλές ημέρες ζύμωσης (Du plessis et al 2017) και το γλεύκος δεν κινδυνεύει από αλλοιώσεις άλλων μικροοργανισμών, διότι η πουλχεριμίνη που εκκρίνει είναι παράγοντας βιοελέγχου. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο

το στέλεχος *M. pulcherrima* προτιμάται για τη βελτίωση παραμέτρων ποιότητας, όπως το άρωμα σε διαδοχικές ζυμώσεις, όπου συνδυάζεται με ζύμες όπως το *S. cerevisiae*. Η **συνεργιστική δράση τους οφείλεται στην αντίστασή του σε όλες τις τοξίνες του *S. cerevisiae* και στην απουσία ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους** (Jolly et al 2003). Όταν εμβολιάζονται μαζί σε ίση πυκνότητα κυττάρων, ο πληθυσμός του *M. pulcherrima* μειώνεται ταχέως λόγω της χαμηλής αντοχής του σε αιθανόλη (Benito et al 2015 – N/S - S). **Η χρήση στρατηγικών διαδοχικού εμβολιασμού λύνει το πρόβλημα.** Η επίδραση του διαδοχικού εμβολιασμού εξαρτάται από την αρχική πυκνότητα του πληθυσμού *S. cerevisiae* που χρησιμοποιείται στο δεύτερο εμβολιασμό (Comitini et al. 2011), τα συγκεκριμένα στελέχη που χρησιμοποιούνται και τους συνδυασμούς (Contreras et al.2014). Η χρήση του διαδοχικού τρόπου ζύμωσης καθυστερεί συνήθως τον χρόνο αλκοολικής ζύμωσης κατά περίπου τέσσερις ημέρες σε σύγκριση με τους μάρτυρες *S. cerevisiae* (Sadoudi et al.2012).

ANTOXH ΣΕ SO₂ – ΠΟΥΛΧΕΡΙΜΙΝΗ : ΒΙΟΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ-ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ
Επιπλέον, παρόλο που το στέλεχος *M. pulcherrima* εμφανίζει μέτρια αντίσταση στο SO₂, υψηλότερη από ό, τι ορισμένα άλλα είδη οίνου που δεν είναι *Saccharomyces*, αυτή η ανοχή είναι πάντα χαμηλότερη από αυτήν που παρατηρείται για τα στελέχη οίνου *Saccharomyces* (Grazia et al. 2019, Morata et al. 2019). Προτείνονται για το λόγο αυτό μικρές θειώσεις ή και χρήση υποκαταστατών ή τεχνικών (αναφέρονται στην υποενότητα του θειώδη ανυδρίτη αναλυτικότερα, ουσίες και άλλες τεχνικές, ως υποκατάστατα Θειώδους Ανυδρίτη ή συνδυασμός αυτών. Εναλλακτικά Συντηρητικά αποτελούν οι αντιμικροβιακοί Παράγοντες: Λυσοζύμη, Σορβικό Οξύ, Δικαρβονικός διμεθυλεστερας (DMDC), Χιτοζάνη, Βακτηριοσίνες και το Κολλοειδές σύμπλοκο αργύρου (CSC), ενώ στους Αντιοξειδωτικούς Παράγοντες ανήκουν η Γλουταθειόν, το Ασκορβικό Οξύ, οι Φαινολικές Ενώσεις, τα Φυτικά Εκχυλίσματα. Οι Τεχνικές Υποκατάστασης SO₂ αποτελούν τα Παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF), η Υπεριώδης Ακτινοβολία, οι Υπέρηχοι και η Υψηλή Υδροστατική Πίεση (HHP)).

Για τους λόγους αυτούς, το *M. pulcherrima* πρέπει να χρησιμοποιείται επιπλέον σε μικτές ζυμώσεις με ζύμη που εμφανίζει υψηλότερη ζυμωτική ισχύ, όπως το *S. cerevisiae*, η οποία στη συνέχεια θα είναι το είδος που είναι υπεύθυνο για την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης (Zhang et al. 2018 – Mr&H.u Co-fermentation with S.c.-aroma). Κατά συνέπεια, **συνίσταται η χρήση επιλεγμένων στελεχών *M. Pulcherrima* σε διαδοχικό εμβολιασμό με *S. cerevisiae* προκειμένου να μεγιστοποιηθούν οι επιδράσεις του σε ορισμένα χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν**, όπως συνήθως γίνεται με άλλα εμπορικά είδη non-*Saccharomyces* (Roudil et al.2019).

Έχει προαναφερθεί, ότι το στέλεχος *M. pulcherrima* εμφανίζει έντονη **δραστηριότητα βιοελέγχου** έναντι διαφόρων γενών ζύμης που θεωρούνται επιβλαβή για την οικολογία (*Brettanomyces* / *Dekkera*, *Hanseniaspora* και *Pichia*) και αρκετούς νηματοειδείς μύκητες που προκαλούν αλλοίωση σταφυλιών (*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., Και *Fusarium* sp.), Ενώ έχει χαμηλή έως μηδενική επίδραση στην απόδοση του *S. cerevisiae*. Η χρωστική ουσία πουλχεριμίνη (δέσμευση του σιδήρου από το πρόδρομο οξύ της) θεωρείται υπεύθυνη για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του στελέχους κατά την οινοποίηση (Sipiczki et al 2006, Oro et al. 2014). Επιπλέον, η παρουσία δολοφονικών τοξινών δεν μπορεί να αποκλειστεί, καθώς η παραγωγή τους έχει περιγραφεί για άλλα είδη *Metschnikowia* (Tan et al 2018 – killer toxin M.p.). **Αν και θεωρείται ευρέως ότι το *M. pulcherrima* μπορεί να ασκήσει θετική επίδραση σε πολλές παραμέτρους ποιότητας του οίνου, αρκετοί ερευνητές ανέφεραν σημαντική μεταβλητότητα που εξαρτάται από το στέλεχος** (Comitini et al. 2011 – N/S multistarter / S.c, Caronico et al. 2019- reduction ethanol, Ruiz et al.2018 – M.p. volatile profile in white wine Verdjo).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Στη συνέχεια, εξετάζεται η **γλυκερόλη**, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στις ιδιότητες του οίνου, επειδή σχετίζεται με χαρακτηριστικά, όπως η γεύση και η λιπαρότητα (Laguna et al.2017). Η χρήση του *Metschnikowia* αυξάνει την τελική συγκέντρωση της γλυκερόλης στο οινικό προϊόν. Πρόσφατες μελέτες, αποκάλυψαν ότι η **αύξηση της γλυκερόλης κατά τον διαδοχικό εμβολιασμό κυμαίνεται από 4 έως 20%** (Benito et al.2015, Dutraire et al. 2019) ή ακόμη και έως περισσότερο από **40%** (Hranilovic et al.2020). Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσης ερευνητικής εργασίας ανέρχεται στα 9%. **Η παρουσία ανταγωνιστών μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή γλυκερόλης**, η οποία είναι υψηλότερη όταν η κυτταρική συγκέντρωση του *S. cerevisiae* είναι χαμηλότερη (Comitini et al.2011). Οι φυσικοχημικές συνθήκες είναι επίσης καθοριστικές για την παραγωγή γλυκερόλης. Η προσθήκη 60 mg/l διοξειδίου του θείου στο γλεύκος έχει δείξει ότι μειώνει την παραγωγή γλυκερόλης κατά το ένα τρίτο (Jolly et al.2003), κάτι που θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη χαμηλή αντίσταση της άγριας ζύμης στον θειώδη ανυδρίτη (Comitini et al.2011), γι'αυτό και προτείνονται υποκατάστατά του ή και διάφορες τεχνικές. Συνιστάται η προσθήκη αζώτου κατά τον εμβολιασμό *S. cerevisiae* για τη διευκόλυνση της ολοκλήρωσης της διαδικασίας ζύμωσης (Sequinot et al.2020), παρότι η άγρια αυτή

ζύμη δεν καταναλώνει όλες τις πηγές αζώτου, αλλά το κάνει εν συνεχεία ο σακχαρομύκητας. Θρέψη με DAP, πραγματοποιήθηκε στο παρόν πείραμα οινοποίησης, στις επαναληπτικές ζυμώσεις με διαδοχικό εμβολιασμό, κατά το δεύτερο εικοσιτετράωρο μετά τον δεύτερο εμβολιασμό με τον σακχαρομύκητα, όπως συνίσταται βάσει των αναγκών του σακχαρομύκητα σε άζωτο. **Αυτός είναι ένας από τους κύριους λόγους που παρατηρείται αρκετά μεγάλη διαφοροποίηση στη συγκέντρωση των ίδιων εστέρων των οίνων με θρέψη και χωρίς, το ίδιων και μερικών ανώτερων αλκοολών. Επειδή παράγονται ταυτόχρονα γλυκερόλη, οξικό οξύ (ζύμωση γλυκερόλης-πυροσταφυλικού) και αιθανόλη (αλκοολική ζύμωση), οι τελικές συγκεντρώσεις αυτών των μεταβολιτών θα μπορούσαν να δείξουν τη μεταβολική οδό που χρησιμοποιείται από τη ζύμη για την κατανάλωση σακχάρων (Ribéreau-Gayon et al. 2006)** Σύμφωνα με αρκετούς συγγραφείς, η απόκλιση του μεταβολισμού ζύμης στην αυξημένη παραγωγή γλυκερόλης θα είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη συγκέντρωση αιθανόλης (Kutyna et al. 2010; Tilloy, Ortiz-Julien και Dequin 2014). Από την άλλη πλευρά, η υπερπαραγωγή γλυκερόλης συχνά οδηγεί σε υψηλή παραγωγή οξικού οξέος (Remize, Sablayrolles και Dequin 2000, Eglinton et al. 2002). Ωστόσο, αυτή η μελέτη αποκάλυψε ασθενή συσχέτιση μεταξύ των τελικών τιμών της αιθανόλης, της γλυκερόλης και του οξικού οξέος. Επομένως, οι δύο τελευταίες ενώσεις θεωρήθηκαν μόνο ως παράμετροι ποιότητας οίνου. Είναι γνωστό ότι η γλυκερόλη συμβάλλει θετικά στην ποιότητα του οίνου παρέχοντας σώμα και γλυκύτητα σε τιμές μεταξύ 5,2 και 25 g /L (Tilloy, Ortiz-Julien και Dequin 2014), **ενώ το οξικό οξύ είναι επιζήμιο για τον οίνο όταν υπάρχει σε συγκεντρώσεις υψηλότερο από 0,7 g /L.** Υπάρχει διαμάχη σχετικά με τα επίπεδα οξικού οξέος που παράγονται από στελέχη εκτός *Saccharomyces*. Romano et al. (2003)

ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΠΡΟΦΙΛ ΑΡΩΜΑΤΟΣ

Αρώματα ζύμωσης

Οι ανώτερες αλκοόλες εμφανίζουν τα πιο ακανόνιστα αποτελέσματα για το στέλεχος *M. pulcherrima*. Ορισμένες μελέτες δείχνουν αυξήσεις έως και 33% στη συνολική συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών για διαδοχική ζύμωση που περιλαμβάνει *M. pulcherrima* σε σύγκριση με τους μάρτυρες με εμβόλιο *S. cerevisiae* (Chen et al.2018, Escribano et al. 2018, Rodriguez et al.2016). Ωστόσο, άλλες μελέτες αναφέρουν το αντίθετο αποτέλεσμα, με μειώσεις περίπου 30% (Comiti et al.2011, Liu et al.2017, Benito et al.2015, Varela et al. 2016). Η 2-φαινυλαιθανόλη περιγράφεται πάντα ότι αυξάνεται κατά περίπου 30% όταν το στέλεχος *M. Pulcherrima* ζυμώνει σε διαδοχικούς εμβολιασμούς (Dutraire et al. 2019, Saoudi et al., Rodriguez et al.2016) Άλλες ενώσεις που αυξάνονται υπό διαδοχικό εμβολιασμό είναι η μεθειονόλη (Escribano et al.2018), η ισοαμυλική αλκοόλη (Rodriguez et al. 2016), η εξανόλη (Sadoudi et al.2012) και η ισοβουτανόλη (Chen et al.2018). Από την άλλη πλευρά, αυτά που γενικά μειώνονται είναι 3-μεθυλ-1-βουτανόλη (Chen et al.2018), εξανόλη και βενζυλική αλκοόλη (Benito et al.2015). Η απόκλιση που παρατηρείται μεταξύ των διαφόρων μελετών εξηγείται από την μεταβλητότητα που παρατηρείται στο μεταβολισμό ανώτερης αλκοόλης μεταξύ των στελεχών *M. pulcherrima*, ο οποίος ποσοτικοποιείται σε περίπου 29% (1-βουτανόλη), 66% (2-φαινυλαιθανόλη) ή 65% (1-εξανόλη) ανάλογα με τη μελετημένη ανώτερη αλκοόλη (Escribano et al.2018 – *M.p&S.uvarum* – reduction of ethanol in wines-aroma). Στην παρούσα μελέτη, γίνεται σύγκριση μεταξύ των παραγόμενων οίνων από διαδοχικά εμβόλια και μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζουν τα δύο δείγματα οίνων με εμβόλιο εκκίνησης- *M.pulcherrima*, με ακόμα υψηλότερη εκ των δύο, αυτό χωρίς τη θρέψη, έπειτα αυτά με εμβόλιο-εκκίνησης *H.uvaum* (με μεγαλύτερη τιμή αυτό με τη θρέψη) και τέλος σε σχεδόν ίσες συγκεντρώσεις, οι οίνοι με *H.guilliermondii* και σακχαρομύκητα.

Όσον αφορά στους εστέρες, μεγαλύτερη συγκέντρωση ανάμεσα στους οίνους με διαδοχικό εμβολιασμό παρουσιάζει αυτός με εμβόλιο εκκίνησης *M.pucherrima* με θρέψη, έπειτα αυτός χωρίς θρέψη, στη συνέχεια ο *H.uvaum* με θρέψη, ο *H.guilliermondii* με θρέψη και χωρίς και τέλος ο *H.uvaum* χωρίς θρέψη. Υποδηλώνεται ότι η θρέψη λειτούργησε ευνοϊκά στη δημιουργία αυξημένων ποσοτήτων εστέρων. Το στέλεχος *M. pulcherrima* αυξάνει συνήθως τη συνολική συγκέντρωση εστέρων, κατι το οποίο επιβεβαιώνεται από τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσης εργασίας (Jolly et al.2013, Sadoudi et al.2012, Rodriguez et al.2016), με αύξηση των πρόδρομων ενώσεών τους, όπως το σικιμικό οξύ. Η τελική συγκέντρωση του σικιμικού οξέος μειώνεται όταν η ζύμη *M. pulcherrima* ζυμώνει σε μικτές ζυμώσεις μαζί με το *S. cerevisiae*. Ορισμένες μελέτες παρατήρησαν μια στατιστικά σημαντική απώλεια σικιμικού οξέος που αντιστοιχεί σε περίπου 0,66%. Αυτό το γεγονός θα μπορούσε να σχετίζεται με το σχηματισμό αρωματικών ενώσεων από το σιμιμικό οξύ, το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει σε ένα πιο περίπλοκο τελικό προϊόν (Dutraire et al.2019). Μεταξύ όλων των αιθυλεστέρων, ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας είναι ο πιο σημαντικός καθώς η συγκέντρωσή του αυξάνεται περίπου στο 14% (Dutraire et al.2019). Τα οξικά μπορεί να μειωθούν (περίπου 30% λιγότερο) όταν ζύμωση ειδών χωρίς *Saccharomyces* (Benito et al.2015, Rodriguez et al. 2016, Dutraire et al. 2019). Η τελική συνολική συγκέντρωση λιπαρών οξέων γενικά αυξάνεται από 0,52% σε 7,5% όταν το στέλεχος *M. pulcherrima* χρησιμοποιείται ως εμβόλιο ζύμωσης (Benito et al. 2015, Ruiz et al.2018, Dutraire et al.2019). Τα λιπαρά οξέα όπως το οκτανοϊκό ή το δεκανοϊκό οξύ δείχνουν μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των μελετών. Ωστόσο, άλλα όπως το εξανοϊκό ή το πεντανοϊκό οξύ αυξάνονται πάντα

όταν το *M. pulcherrima* ζυμώνει (Benito et al. 2015, Ruiz et al.2018, Dutraire et al.2019). Η ακετοΐνη και το διακετύλιο γενικά αυξάνονται όταν χρησιμοποιείται ο ζυμομύκητας *M. pulcherrima*. Οι αυξήσεις της ακετοΐνης κυμαίνονταν από 10 έως 400%, ενώ η διακετυλο διπλασιάζεται (Escribano et al.2018). Η ακεταλδεΐδη συνήθως μειώνεται όταν στη ζύμωση συμμετέχουν είδη non-*Saccharomyces*, βελτιώνοντας το αρωματικό προφίλ του παραγόμενου οίνου (Han et al.2019). Ορισμένες μελέτες αναφέρουν μικρές διαφορές στην ακεταλδεΐδη, χωρίς στατιστική σημασία (Comitini et al.2011, Ruiz et al.2018, Escribano et al.2018), ενώ άλλες αναφέρουν στατιστικά σημαντικές μειώσεις έως και 40% (Benito et al.2015) για ζυμώσεις που περιλαμβάνουν στέλεχος *M. pulcherrima*. Γενικά, τα αποτελέσματα των αναλύσεων της παρούσης μεταπτυχιακής εργασίας συμφωνούν με αυτά των δημοσιευμένων εργασιών, αν και δυστυχώς δεν υπήρξε οίνος αναφοράς παραγόμενος από *S.cerevisiae* μόνο, για την συσχέτιση των τιμών. Η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των άλλων οίνων διαφορετικού εμβολίου εκκίνησης της αλκοολικής ζύμωσης.

Ποικιλιακά αρώματα

Οι πτητικές θειόλες είναι σημαντικές ενώσεις αρώματος, συμπεριλαμβανομένων τόσο ευχάριστων όσο και δυσάρεστων αρωμάτων στον οίνο. Η β-λυάση είναι υπεύθυνη για την κύρια ενζυματική δραστηριότητα που εμπλέκεται σε ποικιλίες θειόλης που απελευθερώνονται από τις συζευγμένες με *S* πτητικές πρόδρομες ουσίες τους. Η χρήση ζυμομυκήτων non-*Saccharomyces* είναι μια νέα προσέγγιση για την ενίσχυση των προφίλ θειόλης του οίνου (Ruiz et al.2019). Μερικά στελέχη *M. pulcherrima* παρουσιάζουν δραστηριότητα β-λυάσης (Zott et al.2011), με το *M. viticola* να είναι το είδος *Metschnikowia* με υψηλότερη δραστηριότητα β-λυάσης καθώς το 60% των προϊόντων απομόνωσης εμφανίζουν την ενζυματική δράση, ενώ άλλα είδη *Metschnikowia* παρουσιάζουν περίπου 10% (Belda et al.2011). Μία μελέτη αναφέρει ότι η συγκέντρωση θειόλης (4 μεθυλο-4-σουλφανυλοπενταν-2-όνη (4-MSP) και 3-σουλφανυλεξαν-1-όλη (3-SH)) μειώνεται όταν το *M. pulcherrima* χρησιμοποιείται με *S. cerevisiae* σε μικτές ζυμώσεις (Sadoudi et al.2012). Αντιθέτως, μια άλλη μελέτη (Ruiz et al. 2018) δείχνει ένα στέλεχος *M. pulcherrima* σε διαδοχικό εμβολιασμό με *S. cerevisiae* αύξηση της συγκέντρωσης 4-MSP σε σύγκριση με τον οίνο-ελέγχου από *S. cerevisiae*. Ο χαρακτήρας θειόλης (δηλ. τροπικά, αρώματα εσπεριδοειδών) αυτών των οίνων αυξήθηκε ως μείωση της συνολικής συγκέντρωσης ανώτερων αλκοολών, η οποία επισκιάζει το μπουκέτο οίνου, συνοδευόμενη από την παραγωγή θειόλης. Τα περισσότερα στελέχη του γένους *Metschnikowia* δεν εμφανίζουν δραστηριότητα θειώδους ρεδοκτάσης. Αυτή η δραστηριότητα παράγει H₂S εκτός γεύσης (Belda et al.2016, Barbosa et al.2018, Mendoza et al. 2019). Ένα επιλεγμένο στέλεχος *M. Pulcherrima* με υψηλή δραστηριότητα κυσταθειονίνης-β-λυάσης απελευθέρωσε επτά φορές περισσότερη 4-μεθυλ-4-σουλφανυλοπενταν-2-όνη (4-MSP) από το μάρτυρα *S. cerevisiae*. Αυτό το στέλεχος δεν επηρέασε την τελική συγκέντρωση της ακετυλιωμένης 3-σουλφανυλ-εξανόλης (3-SHA) και της 3-SH υπέστη ελαφρά μείωση [21]. Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ίχνη της μεθυλιωμένης μορφής μεθανοθειόλης (MeSH) σε όλες τις ζυμώσεις που περιελάμβαναν *M. pulcherrima* (Dutraire et al.2019)

Τα Τερπένια είναι οι πιο σημαντικές ενώσεις αρωματικών ποικιλιών στον οίνο. Η υδρολυτική δραστηριότητα των ενζύμων γλυκοσιδάσης (κυρίως β-γλυκοσιδάση, β-d-ξυλοσιδάση και α-1-αραβινοφουρανοσιδάση) απελευθερώνει τερπένια από τους γλυκοσιδικούς μη πτητικούς προδρόμους τους (Rodrigues et al. 2004). Μια νεότερη ευρεία έρευνα που περιελάμβανε διαφορετικά είδη *Metschnikowia* (*M. viticola*, *M. pulcherrima* και *M. fructicola*) ανέφερε ότι οι περισσότεροι έδειξαν δραστηριότητες β-γλυκοσιδάσης, α-1-αραβινοφουρανοσιδάσης και β-d-ξυλοσιδάσης (Belda et al.2016). Το εμπορικό στέλεχος του *M. pulcherrima* Flavia MP346 αυξάνει τις πτητικές συγκεντρώσεις τερπενίου στον οίνο, λόγω της εξωκυτταρικής α-αραβινοφουρανοσιδάσης του. (Boscaino et al.2019). Αν και η δράση της β-γλυκοσιδάσης της ζύμης *Metschnikowia* είναι αποτελεσματική στην αύξηση του επιπέδου των μονοτερπενολών στο κρασί, ορισμένες περιβαλλοντικές παράμετροι, όπως το pH, η γλυκόζη, η αιθανόλη και το SO₂, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη για τη βελτιστοποίηση της απελευθέρωσης αυτών των επιθυμητών αρωματικών ενώσεων (Rodriguez et al.2007) Αρκετές μελέτες ανέφεραν αύξηση της συνολικής συγκέντρωσης τερπενίων στο τέλος των διαδοχικών ζυμώσεων που περιελάμβαναν *M. pulcherrima* σε σύγκριση με την απλή ζύμωση του *S. cerevisiae* έως και 100%. Η λιναλόλη επηρεάστηκε περισσότερο από τον *M. pulcherrima* στη διαδικασία ζύμωσης (Dutraire et al.2019, 4Sadoudi et al. 2012, Rodriguez et al. 2016). Όσον αφορά τη β-δαμασκενόνη, μια μελέτη ανέφερε αυξημένη συγκέντρωση όταν το *M. pulcherrima* ζυμώθηκε μαζί με το *S. cerevisiae* (Garcia et al.2020, Sadoudi et al.2012). Άλλα είδη *Metschnikowia* επηρεάζουν επίσης θετικά το άρωμα του οίνου, σε μικτές καλλιέργειες βελτιώνοντας την αρωματική πολυπλοκότητα των οίνων, αυξάνοντας το περιεχόμενο εστέρα και τερπενίου (Boscaino et al. 2019), με αύξηση των γεύσεων μούρων και φρούτων στους παραγόμενους οίνους (Liu et al. 2017 - Η μελέτη συνέκρινε το *M. viticola* με άλλα είδη non-*Saccharomyces* που απομονώθηκαν στη Δανία, όπως το *Hanseniaspora uvarum* σε διαδοχικές ζυμώσεις με το *S. cerevisiae*). Στην παρούσα ερευνητική εργασία, μεγαλύτερη τιμή τερπενίων παρουσίασε ο οίνος με διαδοχικό εμβόλιο *H.uvaum* και *S.cerevisiae* (με θρέψη), έπειτα με μικρή διαφορά τα δύο δείγματα *M.pulcherrima* με ίδια συγκέντρωση, έπειτα ο οίνος με *H.guilliermondii* χωρίς θρέψη, *H.uvarum* με θρέψη και τέλος, χωρίς.

Οργανοληπτική επίδραση στον οίνο

Υπάρχουν πολλές μελέτες που περιγράφουν λεπτομερώς την επίδραση του είδους *Metschnikowia* στις οργανοληπτικές ιδιότητες των οίνων. Μια οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων Μοσχάτο Αλεξανδρείας που ζυμώθηκαν με *M. pulcherrima* έδειξε περισσότερα φρουτώδη και ανθικά αρώματα σε διαδοχικές ζυμώσεις από ότι σε οίνους με τη ζύμη-μάρτυρα *S. cerevisiae* (οίνος αναφοράς) (Rodríguez et al.2016). Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίχθηκαν, με χημική ανάλυση των παραγόμενων οίνων (παρατηρούμενες συγκεντρώσεις ενώσεων, όπως τερπενόλες, ανώτερες αλκοόλες και εστέρες). Ένα από τα αρώματα που έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνεται όταν χρησιμοποιείται το στέλεχος *M. pulcherrima* είναι ο «χαρακτήρας αχλαδιού», ο οποίος σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με υψηλότερα επίπεδα οκτανοϊκού αιθυλίου (Jolly et al.2014)

Οι οίνοι που λαμβάνονται με διαδοχική ζύμωση *M. pulcherrima* εμφανίζουν υψηλότερη συνολική βαθμολογία από ότι αυτά που παράγονται με *S. cerevisiae*-μάρτυρες, λόγω της καλύτερης ποιότητας αρώματος (Benito et al.2015). Οι ζυμώσεις με εμβόλιο *M. pulcherrima* εμφανίζουν υψηλότερη βαθμολογία στον φρουτώδη χαρακτήρα τους, που δικαιολογείται λόγω χαμηλότερης τελικής συγκέντρωσης ανώτερων αλκοολών και υψηλότερης συγκέντρωσης συγκεκριμένων φρουτωδών εστέρων, όπως εξανοϊκού αιθυλεστέρα, οκτανοϊκού αιθυλεστέρα και δεκανοϊκού αιθυλεστέρα. Επιπρόσθετα, οι ζυμώσεις με *M. Pulcherrima* έδειξαν χαμηλότερη οξειδωτική συμπεριφορά, που αποδίδεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης. Επιπλέον έδειξαν υψηλότερη τυπικότητα ποικιλιακού αρώματος Riesling και υψηλότερη βαθμολογία σε περιγραφές Riesling, όπως ροδάκινο / βερίκοκο και ειδικά στον χαρακτήρα εσπεριδοειδών / σταφυλιών / φρούτων. Περαιτέρω μελέτες συσχετίζουν υψηλότερες βαθμολογίες στην τυπικότητα του Verdejo με υψηλότερες συγκεντρώσεις σε θειόλες σε διαδοχικούς εμβολιασμούς γλεύκους με *M. pulcherrima*, ειδικά για θειόλη 4-μεθυλ-4-σουλφανυλοπενταν-2-όνη, της οποίας το περιεχόμενο ήταν 5 φορές υψηλότερο από τον οίνο-έλεγχου με *S. cerevisiae* (Ruiz et al.2018). Αυτά τα αποτελέσματα δικαιολογούν την αύξηση της τυπικότητας Riesling που αναφέρθηκε νωρίτερα (Benito et al.2015), καθώς ορισμένοι από τους οργανοληπτικούς περιγραφικούς όρους αρώματος σχετίζονται με ενώσεις θειόλης (Ruiz et al. 2019). Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ζυμώσεις που περιλαμβάνουν *M. pulcherrima* για να δείξουν χαμηλότερες βαθμολογίες σε οργανοληπτικές περιγραφές οίνου όπως το σώμα, η στυπτικότητα ή η πικρία από τους ελέγχους του *S. cerevisiae* (Chen et al.2018). Η παρατηρούμενη χαμηλότερη τελική συγκέντρωση τανίνης δικαιολογεί αυτά τα αποτελέσματα από χημική άποψη. Μια μελέτη σχετικά με τους συν-εμβολιασμένους ζυμώσεις που περιλαμβάνουν *M. Pulcherrima*, *S. cerevisiae* και βακτήρια γαλακτικού οξέος έδειξε ότι οι ειδικοί προτίμησαν αυτήν την επιλογή από τον έλεγχο που συνεπάγεται συν-εμβολιασμό μεταξύ *S. cerevisiae* και βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Minnaar et al.2017, 2019). Στη μελέτη, οι ζυμώσεις που αφορούσαν τον *M. pulcherrima* σημείωσαν χαμηλότερα επίπεδα στυπτικότητας και πικρίας. Ωστόσο, άλλοι συγγραφείς ανέφεραν ζυμώσεις που αφορούσαν τον *M. pulcherrima* για να δείξουν υψηλότερη στυπτικότητα από τον έλεγχο *S. cerevisiae* (Hranilovic et al.2018 – chemical & sensory profiling Shiraz).παράμετροι οικολογικού ενδιαφέροντος όπως παραγωγή γλυκερόλης, οξικού οξέος, υδρόθειου και ορισμένων ενζυματικών ενεργειών.

4.3.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΡΙΟ ΣΤΟΧΟ ΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, διαμορφώθηκε ο κάτωθι πίνακας 78, που παραθέτει τους παράγοντες και τις παραμέτρους ενός σχεδιασμού στρατηγικής ζύμωσης με στόχο τη μείωση της αιθανόλης των παραγόμενων οίνων.

Πίνακας 78. Παράγοντες που επιδρούν στην ΑΖ - Παράμετροι επιλογής ζυμομυκήτων, σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΖ - ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΖΥΜΩΝ	
ΣΤΕΛΕΧΟΣ Saccharomyces	<ol style="list-style-type: none"> 1. Μελέτη κλώνων κ.ά. – υβριδισμός – για τροποποίηση χαρακτηριστικών ΓΤ 2. Απόδοση αιθανόλης μεταξύ στελεχών σακχαρομύκητα (διερεύνηση) 3. Ζυμωτική ισχύς (γρήγορη εξέλιξη της ΑΖ) 4. Πλήρης αποζύμωση 5. Παραγωγή επιθυμητών αρωματικών ενώσεων 6. Αδρανοποίηση ιθαγενών ζυμών
ΣΤΕΛΕΧΟΣ non-Saccharomyces	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ζυμωτική ισχύς 2. Ρυθμός ανάπτυξης βιομάζας – πολλαπλασιασμός πληθυσμού 3. Θετικό στο φαινόμενο Crabtree 4. Συνεισφορά στο αρωματικό προφίλ (παραγωγή επιθυμητών πτητικών ενώσεων με σχετική μείωση ανώτερων αλκοολών, αύξηση εστέρων και ποικιλιακών αρωμάτων π.χ.θειόλες) 5. Μείωση αιθανόλης παραγόμενων οίνων 6. Αύξηση γλυκερόλης 7. Μείωση πτητικής οξύτητας 8. Μείωση απορρόφησης ανθοκυανών σε λευκούς οίνους 9. Αύξηση πολυσακχαριτών 10. Συνεργασία με σακχαρομύκητα 11. Ανταγωνισμός – βιοέλεγχος – μείωση ανταγωνιστών, αλλά και αλλοιώσεων (M.p.- χρωστική πουλχεριμίνη) 12. Μείωση ελαττωμάτων (όπως διακετυλένιο, ακετόϊνη, ακεταλδεύδη, οξικός αιθυλεστέρας) 13. Ανοχή στην αιθανόλη και SO₂ 14. Διαυγαστικά ένζυμα, όπως πρωτεάση (M.p), για αποφυγή χρήσης μπετονίτη
ΠΟΙΚΙΛΙΑ	Γλεύκος ζύμωσης ερυθρό ή λευκό, θρεπτικά συστατικά κ.ά.
ΕΜΒΟΛΙΟ	Ποσοστό εμβολίου και ημέρα εμβολιασμού
ΤΡΟΠΟΙ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ	<ol style="list-style-type: none"> 1. Συνεμβολιασμός (μικτή αρχική καλλιέργεια N-S/S) 2. Διαδοχικός εμβολιασμός (N-S/S) με διαφορά κάποιες ημέρες ή ώρες 3. Εμβολιασμός εκκίνησης με N-S και έπειτα συνέχιση της ζύμωσης με τους γηγενείς σακχαρομύκητες του γλεύκους
ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ακινητοποιημένα κύτταρα 2. Αερισμός / μικροοξυγόνωση 3. Συνδυασμός των παραπάνω (1&2) 4. Καθυστέρηση εμβολίου

Ο πίνακας 78 προέκυψε, έπειτα από μελέτη των στρατηγικών διαδοχικού εμβολιασμού των οίνων προς μείωση αιθανόλης του τελικού προϊόντος με παράλληλη ενίσχυση του αρώματος. Για να επιτευχθεί ο οίνος με τα επιθυμητά ανωτέρω χαρακτηριστικά πρέπει να εξετασθούν ενδελεχώς τα παρακάτω κριτήρια και να σχεδιασθεί μια νέα στρατηγική, που θα αποφέρει ακόμα πιο εντυπωσιακά αποτελέσματα, ενισχύοντας τα όσα παράχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Αρχικά, η πρώτη παράμετρος που οφείλει να λαμβάνεται υπόψη σε μια διαδικασία επιλογής στελεχούς non-Saccharomyces πρέπει να είναι η **απουσία ανταγωνισμού έναντι του S. cerevisiae**, καθώς οποιαδήποτε θετική επίδραση στον οίνο δεν θα είχε νόημα εάν δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σωστή αλκοολική ζύμωση. Το στέλεχος M.pulcherrima

σε διαδοχικό εμβολιασμό με *S.cerevisiae*, έχει ως κύριο πλεονέκτημα τη θετική επίδραση του non-Saccharomyces στο άρωμα του οίνου. Σχετικά με αυτό το γεγονός, τα στελέχη *M. Pulcherrima* θα πρέπει να επιλέγονται βάσει των ενώσεων που μπορούν να απελευθερώσουν, όπως ποικιλιακών που απαρτίζονται από θειόλες και τερπένια, ενώ είναι ικανά να παράγουν φρουτώδεις εστέρες, όπως οκτανοϊκό αιθυλεστέρα.

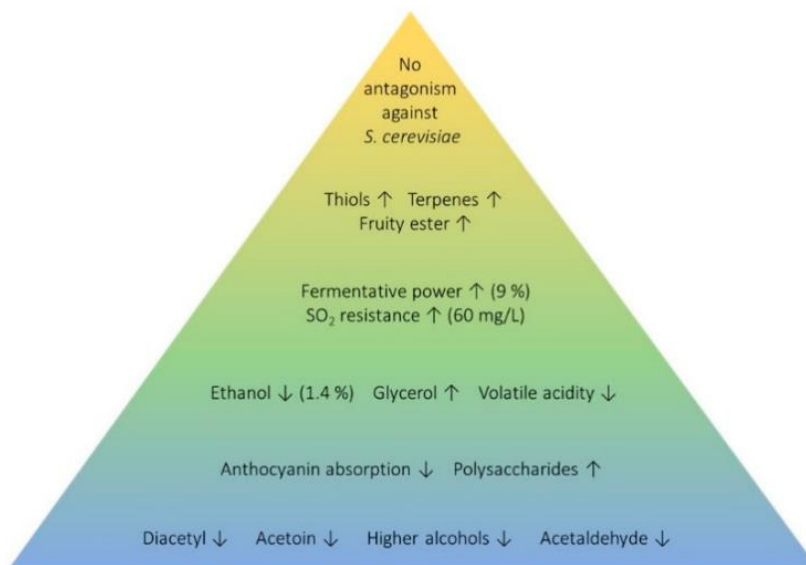
Η ζυμωτική ισχύς μαζί με την ανοχή στην αιθανόλη και το διοξείδιο του θείου πρέπει να ληφθεί υπόψη προκειμένου να επιτραπεί στα επιλεγμένα στελέχη να αποδίδουν περισσότερο κατά τη διάρκεια βιομηχανικών αλκοολικών ζυμώσεων, ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη των επιθυμητών ποιοτικών στόχων. Αυτές οι παράμετροι παραμένουν ως ο κύριος περιορισμός των διαθέσιμων εμπορικών στελεχών.

Άλλα δευτερεύοντα θετικά αποτελέσματα που θα μπορούσαν να επιλεγούν είναι η ικανότητα μείωσης της τελικής περιεκτικότητας σε αιθανόλη και αύξησης της συγκέντρωσης γλυκερόλης στα τελικά προϊόντα. Στην παρούσα εργασία κρίνονται ως κύρια χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων.

Ορισμένες παράμετροι επιπρόσθετου ενδιαφέροντος είναι η απορρόφηση ανθοκυάνης και η απελευθέρωση πολυσακχαριτών, ειδικά σε ερυθρές ποικιλίες.

Τέλος, ορισμένες αρνητικές παράμετροι, όπως διακετύλιο, ακετόνη, ανώτερες αλκοόλες ή ακεταλδεΐδη πρέπει να αποφεύγονται στα επιλεγμένα στελέχη.

Συμπερασματικά, η αξία της ζύμης *M. pulcherrima* για τη βιομηχανία οίνου έγκειται στην ανταγωνιστική συμπεριφορά της με άλλα, ανεπιθύμητα είδη, αλλά όχι τον *S.cerevisiae*, την γρήγορη εκκίνηση ζύμωσης, το χαμηλό αλκοολικό τίτλο οίνων, τη ζυμωτική ισχύ του μέχρι 9%, την αύξηση παραγόμενης γλυκερόλης και την απελευθέρωση των αρωματικών προδρόμων που βελτιώνουν την οργανοληπτική αίσθηση του οίνου, με σχετική μείωση της πτητικής οξύτητας. Διαθέτει αντίσταση σε SO₂ μέχρι 60 mg/l και διαυγαστικά ένζυμα, επομένως αποφεύγεται η χρήση μπετονίτη. Τέλος, συμβάλλει στη μείωση απορρόφησης ανθοκυανών και αύξηση πολυσακχαριτών, ενώ μειώνει τη συγκέντρωση του διακετύλιου, ακετοΐνης, ανώτερων αλκοολών και ακεταλδεΐδης στους παραγόμενους οίνους.



Εικόνα 79. Παράμετροι επιλογής και υπεροχής *M.pulcherrima* έναντι άλλων non-Saccharomyces (Vicente et al.2020)

ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΟΙΝΟΥ ΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ

Ανάλυση κριτηρίων μείωσης αιθανόλης και ενίσχυσης αρωματικού προφίλ

1. Επιλογή ποικιλίας – λευκή ή ερυθρή – ενίσχυση ποικιλιακού χαρακτήρα
2. Ωριμότητα σταφυλιών (περισσότερα σάκχαρα, αλλά και μεγαλύτερη φαινολική σταθερότητα)
3. Τεχνική γλεukoποίησης (κλασική, προζυμωτική κρυσταλλοποίηση, παρουσία αδρανούς αερίου κ.ά.)

Η τεχνική της οινοποίησης παίζει καθοριστικό ρόλο στην αλκοολική ζύμωση. Η επιλογή της ποικιλίας των σταφυλιών από την οποία προέρχεται το γλεύκος και η ωριμότητα σταφυλιών είναι σημαντικές καθότι αποτελούν την πρώτη ύλη οινοποίησης (Ribereau-Gayon, 1985, Bisson, 2000 &2001). Για παράδειγμα, η προζυμωτική κρυσταλλοποίηση παρέχει πιο ισορροπημένους και πιο ολοκληρωμένους οίνους με ισχυρό σώμα στο στόμα, μεγάλη αύξηση του φρουτώδους αρώματος και ειδικά της συγκέντρωσης των τερπενίων στα λευκά γλεύκη.

4. Χαρακτηριστικά γλεύκους ως θρεπτικό υπόστρωμα, σάκχαρα, άζωτο και εμπλουτισμός με σάκχαρα όπου κρίνεται απαραίτητος (π.χ. αν περιέχει λιγότερα από 200g/l) ή οργανικό άζωτο YAN πρέπει 250 mg/l (θρέψη)
5. Μικρο-φιλτράρισμα ή παστερίωση (μη αποδεκτή πρακτική οινολογικά) γλεύκους
6. Θείωση γλεύκους ή χρήση υποκατάστατων ουσιών ή τεχνικών
7. **Επιλογή κατάλληλου στελέχους non-Saccharomyces ως εκκίνητή της ζύμωσης** (αρώματα)
8. Συνδυασμός στελεχών Non-Saccharomyces, Saccharomyces non-cerevisiae, Saccharomyces cerevisiae (συμβατά, να μην ανταγωνίζονται, τοξίνη «killer» για βιοέλεγχο στη γηγενή μικροχλωρίδα)
9. Ποσότητα εμβολίου (ιδανική και οικονομική)
10. Χρήση τεχνικής ακινητοποίησης των κυττάρων της καλλιέργειας εκκίνησης
11. Στρατηγικές εμβολιασμού
 - A. Απλός εμβολιασμός εκκίνησης (εμβόλιο μονοκαλλιέργειας)
 - B. Συνεμβολιασμός εκκίνησης (μικτή καλλιέργεια)
 - C. Διαδοχικός εμβολιασμός με εμβόλιο εκκίνησης non-Saccharomyces και δεύτερο εμβολιασμό με S.cerevisiae.
 - D. Διαδοχικός εμβολιασμός με συνεμβολιασμό εκκίνησης non-Saccharomyces και Saccharomyces non-cerevisiae και δεύτερο εμβολιασμό με S.cerevisiae.
 - E. Διαδοχικός εμβολιασμός με εμβόλιο εκκίνησης non-Saccharomyces και δεύτερο εμβολιασμό με S.cerevisiae.
12. Χρόνος μεταξύ των εμβολιασμών (καθυστέρηση από μερικά λεπτά έως ημέρες) απαραίτητη ώστε να επιτευχθεί μεγάλη μείωση των σακχάρων έως και 50%, όμως πιθανή μόλυνση από ιθαγενείς ζύμες-αλλοιώσεις οίνου)
13. Βέλτιστες συνθήκες ζύμωσης (θερμοκρασία, pH)

Είναι γνωστό ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες επηρεάζουν την κατανάλωση σακχάρων και βελτιώνουν την ανοχή σε αιθανόλη των ζυμών. Κατά συνέπεια, οι χαμηλές θερμοκρασίες θα μπορούσαν να επιτρέψουν μια παρατεταμένη μονιμότητα των ζυμομυκητικών ζυμομυκήτων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης (Jolly, Augustyn and Pretorius 2006, Tronchoni et al. 2009). Αυτή η κατάσταση θα ενίσχυε επίσης την ποιότητα του οίνου προσθέτοντας γεύσεις.

14. Αερισμός (ποσότητα και ρυθμός – αποδεκτός 2,020-0,025ml/l/min)

Η επιλογή στελεχών ζύμης non-Saccharomyces, υπό αερόβιες συνθήκες με σχεδιασμό ενός συστήματος αερισμού επιτρέπει τη μείωση των επιπέδων αιθανόλης. Ο αερισμός, όμως, θα πρέπει να λαμβάνει χώρα συντηρητικά, για την αποφυγή της υπερβολικής οξειδωσης των συστατικών του γλεύκους. (Tofalo et al. 2016). Η χρήση διαφόρων ποσοτήτων μικροοξυγόνωσης ως ελεγχόμενος αερισμός, που προστέθηκαν κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης με μικτό εμβολιασμό οδήγησε σε σημαντική μείωση της περιεκτικότητας των οίνων σε αιθανόλη (Contreras et al., 2015b, Morales et al., 2015).
15. Κόστος

Το κόστος μειώνεται, με τη μείωση της ποσότητας του εμβολίου. Βέβαια, αν μειωθεί η ποσότητα του εμβολίου πρέπει να ενισχυθεί κάποια άλλη παράμετρος, όπως ο αερισμός ή τα αρχικά ακινητοποιημένα κύτταρα καλλιέργειας ως εμβόλιο εκκίνησης, ώστε να εξαχθούν παρόμοια αποτελέσματα.

4.3.4 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. Προτείνεται οι προκαλλιέργειες ή καλλιέργειες εκκίνησης, να παρασκευάζονται με αραιωμένο 1:1 γλεύκος, ώστε οι ζύμες να έχουν και καλύτερη μετέπειτα προσαρμογή στην κυρίως καλλιέργεια και αποφυγή οσμωτικού σοκ.
2. Το εμβόλιο των μικροοινοποιήσεων ήταν ίσο με 1ml/50ml γλεύκους, ενώ σε διαφορες ερευνητικές μελέτες 5-10% με σαφώς μεγαλύτερο κόστος. Σε οινοποιεία, προφανώς και επηρεάζει οικονομικά την παραγωγή.
3. Μέτρηση φασματοσκοπίας Uv 680nm για μέτρηση πληθυσμού 10^6 δεν πραγματοποιήθηκε (ή ανάπτυξη σε τριβλία και μέτρηση αποικιών) βασίστηκε στο θόλωμα της καλλιέργειας με οπτική παρατήρηση και σε βιβλιογραφικά και πειραματικά δεδομένα και όταν επιλέχθηκε μια τιμή, παρέμεινε σταθερή σε όλα τα πειράματα, ώστε να μπορούν τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα και επεξεργάσιμα.
4. Θα έπρεπε να έχει μετρηθεί το YAN του γλεύκους πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης για να προσδιορισθεί το οργανικό άζωτο και να ρυθμιστεί περίπου στα 250 mg/l με προσθήκη φωσφορικού διαμμωνίου (DAP), εξ αρχής και να λάβει χώρα κανονικά η θρέψη των ζυμομυκήτων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο οινοποίησης των λευκών.
5. Η παστερίωση θα μπορούσε να είχε αποφευχθεί και να είχε πραγματοποιηθεί μικροφιλτράρισμα του γλεύκους (λόγω του ότι είναι πολύ χρονοβόρα διαδικασία δεν προτιμήθηκε), ώστε να μπορούν να εξχαθούν πιο ρεαλιστικά αποτελέσματα. Πιθανή καραμελοποίηση προκαλείται στα σάκχαρα μετά από θέρμανση και καταλήγει στην αποδόμηση τους απουσία αμινοξέων και πρωτεϊνών.δημιουργία με παραγωγή φουρφουράλης που συνοδεύεται με το όχι τόσο ποιοτικό άρωμα καραμέλας (Βαφοπούλου-Μαστρογιάννη, 2003).
6. Θα μπορούσε να λάβει χώρα πειραματική μικροοινοποίηση, αλλά με μεγαλύτερο όγκο γλεύκους, διότι σε φιάλες 1-2L είναι πολύ εύκολο μια ζύμωση να «ξεφύγει»/εκτραπεί έστω και για μία ημέρα παραπάνω με ολέθριες συνέπειες για τα ποιοτικά αρωματικά στοιχεία του οίνου. Θεωρώ πως στην παρούσα εργασία, λόγω το ότι δε μπορούσε να είναι καθημερινή η χρήση HPLC κατά τις τελευταίες ημέρες του Γ' και Δ' κύκλου που πραγματοποιήθηκαν παράλληλα, υπήρξε κάτι ανάλογο και ενώ τα δείγματα οίνων ήταν πολύ αρωματικά, την αμέσως επόμενη ημέρα μύριζαν πολύ διαφορετικά.
7. Καλλιέργεια αναφοράς -κινητικής ανάπτυξης και μεταβολιτών- οίνος αναφοράς S.c. σε μη παστεριωμένο γλεύκος δεν έλαβε χώρα, διότι δεν ήταν διαθέσιμος προς καλλιέργεια ο σακχαρομύκητας *ihone* εκείνο το διάστημα που πραγματοποιήθηκαν τα συγκεκριμένα πειράματα οινοποίησης. Επιπλέον, αυτή η αλκοολική ζύμωση θα έπρεπε να είχε λάβει χώρα και να είχαν αναλυθεί οι πτητικές ενώσεις με GC-MS προκειμένου να υπάρχει ένας οίνος αναφοράς για να πραγματοποιηθούν οι σχετικές συγκρίσεις. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ των οίνων και βιβλιογραφικά με δύο άλλες ερευνητικές εργασίες πάνω σε οίνους ασύρτικο της Κεχαγιά και της Μπασά. Ο οίνος αναφοράς από παστεριωμένο γλεύκος έχει φυλαχθεί σε κατεψυγμένη μορφή και συνίσταται να αναλυθεί μελλοντικά με GC-MS για πιο ρεαλιστικά αποτελέσματα με την παρούσα εργασία.
8. Επιπλέον, δείγματα οίνων από το εμβόλιο εκκίνησης non-Saccharomyces μη παστεριωμένου γλεύκους έχουν κρατηθεί σε κατεψυγμένη μορφή για πιθανή ανάλυση με GC-MS. Προτείνεται να πραγματοποιηθούν καμπύλες αναφοράς για ποσοτική ανάλυση των πτητικών ενώσεων του παραγόμενου πτητικού οίνου. Είχε παρατηρηθεί κατά την αλκοολική ζύμωση πως τα αρώματα ώριμου αγγουριού, πράσινου μήλου και φρεσκάδας με τη μορφή διοξειδίου του άνθρακα ήταν πιο έντονα από ότι στο αντίστοιχο πείραμα διαδοχικού εμβολιασμού.
9. Τέλος, λόγω του ότι δεν υπήρξε ο ανωτέρω οίνος, δε μπόρεσε να χρησιμοποιηθεί ως οίνος αναφοράς του οσφρητικού οργανοληπτικού ελέγχου ο αντίστοιχος σε παστεριωμένο γλεύκος με μονοκαλλιέργεια εκκίνησης *S.cerevisiae*, αλλά χρησιμοποιήθηκε ένας οίνος κοινά αποδεκτός από το εργαστήριο Οινολογίας ΓΠΑ, ο αντίστοιχος οίνος ασύρτικο'19 (ο ακριβός επόμενος τρύγος από αυτό το γλεύκος που οινοποιήθηκε κατά την παρούσα πειραματική διαδικασία) που έλαβε χώρα με οινοποίηση βάσει το σχετικό πρωτόκολλο του Εργαστηρίου.

4.3.5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

1. Προτείνεται σε συνδυασμό με την περιεκτικότητα σε αιθανόλη και γλυκερόλη, η μελλοντική έρευνα με το στέλεχος *M. pulcherrima* (μονοκαλλιέργεια-εμβόλιο εκκίνησης ή διαδοχικές ζυμώσεις) να περιλαμβάνει μια σειρά στρατηγικών αερισμού. Να ακολουθηθεί η ίδια πειραματική διαδικασία, υπό διαφορετικές συνθήκες αερισμού (έλεγχος αερισμού-μικρο και μακρο οξυγόνωσης για την εκτίμηση της ιδανικής ποσότητας και ρυθμού).
2. Επιπλέον, ως συνέχεια προτείνεται μια σειρά ποσοστών εμβολιασμού και έρευνα για το χρονικό διάστημα πριν από τον εμβολιασμό της ζύμης *S. cerevisiae*, για να καταστεί εφικτή η εφαρμογή της σε εμπορική κλίμακα οινοποίησης για την επίτευξη μείωσης αιθανόλης με ενίσχυση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Αυτή η ερευνητική εργασία θα μπορούσε να επιβεβαιώνει την παρούσα, στην οποία αποδείχθηκε ότι το στέλεχος *M. pulcherrima*, σε συνδυασμό με διαδοχικό εμβολιασμό *S. cerevisiae*, μειώνει την ποσότητα αιθανόλης στον οίνο.
3. Νέα επιλογή ζυμών, κατά προτίμηση, αρνητικών κατά Crabtree, κατάλληλων για χρήση ως εμβόλιο εκκίνησης. Αυτή η μεταβολική συμπεριφορά μπορεί να αξιοποιηθεί για τη μείωση της παραγωγής αιθανόλης, ειδικά μέσω μερικού και ελεγχόμενου αερισμού γλεύκους.
4. Τα επιλεγμένα στελέχη (*Metschnikowia pulcherrima*) να ελεγχθούν προς διαθεση στην αγορά με περαιτέρω έρευνα και εμπορευματοποίηση
5. Να ακολουθηθεί η ίδια πειραματική διαδικασία διαδοχικού εμβολιασμού, με εμβόλιο εκκίνησης συνεμβολιασμού *M. pulcherrima* και άλλου συμβατού ζυμομύκητα, είτε άλλου non-Saccharomyces, είτε Saccharomyces non-cerevisiae, όπως έχει πραγματοποιηθεί στην περίπτωση του *S. uvarum* με πολύ θετικά αποτελέσματα και στη μείωση αλκοόλης και στην αύξηση των αρωματικών και περιορισμό των ελαττωμάτων.
6. Ίδιες συνθήκες, αλλά να γίνει έλεγχος διαφορετικών ποσοστών ακινητοποίησης των κυττάρων προς εμβολιασμό εκκίνησης της διαδοχικής ζύμωσης *M. pulcherrima*, η οποία είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη μείωση αιθανόλης και θα μπορούσε να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας διαδοχική ζύμωση ακινητοποιημένων επιλεγμένων στελεχών non-Saccharomyces. Έτσι, επιτυγχάνεται μεγάλη κατανάλωση σακχάρων έως και 50% από τους non-Saccharomyces γρήγορα και αποφεύγεται πιθανή μόλυνση από άλλους μικροοργανισμούς με πιθανή αλλοίωση των χαρακτηριστικών των οίνων.
7. Προτείνεται η άγρια ζύμη *M. pulcherrima* να δοκιμασθεί με διαδοχικό εμβολιασμό σε γλεύκη άλλων λευκών ποικιλιών. Το στέλεχος *M. pulcherrima* εκτός από την παραγωγή της χαρακτηριστικής ρόδινης χρωστικής του-δραστηριότητα βιοελέγχου έναντι άλλων μικροοργανισμών, ενισχύει αποδεδειγμένα τα αρώματα φρέσκων φρούτων, όπως μήλου και ώριμου αχλαδιού, ειδικά σε συνδυασμό με τη ποικιλία. Γεγονός, το οποίο σημαίνει ότι ίσως θα ταίριαζε ως εμβόλιο εκκίνησης σε ζύμωση γλεύκους μιας πιο φρουτώδους αρωματικής ποικιλίας, π.χ. όπως η Μαλαγουζιά, ώστε να ενισχυθεί το τυπικό ποικιλιακό της προφίλ. Η πειραματική αυτή μικροοινοποίηση μπορούσε να λάβει χώρα σε μελλοντική ερευνητική εργασία.
8. Και οι τρεις non-Saccharomyces ζύμες του παρόντος πειράματος, αποδεδειγμένα ενισχύουν το χρώμα και τα αρώματα θείου στον οίνο. Σε γλεύκος ερυθρής ποικιλίας θα μπορούσε να δοκιμασθεί η ζύμη *H. uvarum* και η ζύμη *H. guilliermondii*, καθώς φέρεται να βοηθούν στην ενίσχυση των φαινολικών, συμβάλλοντας στην πολυφαινολική σύνθεση και το χρώμα του ερυθρού οίνου ενισχύοντάς το (Martin et al, 2018), παράγοντας και πιο βαριές ενώσεις θείου (ενίσχυση ποικιλιακού αρώματος). Θα μπορούσε να δειχθεί για πρώτη φορά ότι η αυξημένη ανθοκυάνη προέρχεται από ενώσεις που δημιουργούνται από τη ζύμωση μκτής καλλιέργειας, αναδεικνύοντάς το (ενίσχυση χρώματος).
9. Απαραίτητη κρίνεται η σύσταση εξειδικευμένου πάνελ δοκιμαστών με την προϋπόθεση να διεξάγονται περισσότεροι οσφρητικοί οργανοληπτικοί ελέγχοι, αλλά και γευστικές δοκιμές.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adams A.M., Yeasts in horticultural soils, pp 79-82, Ontario, 1960
2. Adams MR and Moss MO, "Food Microbiology", 3rd edition, Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp:367, 2008
3. Aiba S. and Shoda M., Reassessment of the product inhibition in alcoholic fermentation, 99-87, Proc. S. Afric. Soc. Enol. Vitic. 1969
4. Albergaria Helena, Ana R. Torrao, Timothy Hogg, Francisco M. Girio, Physiological behaviour of *Hanseniaspora guilliermondii* in aerobic glucose-limited continuous cultures, Elsevier, FEMS Yeast Research 3 211-216, 2003
5. Allen J.P., G. Feher, M. Y. Okamura & D. C. Rees, Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centres, Nature volume 339, pages111–116, 1989
6. Amerine M A, R E Kunkee, Microbiology of Winemaking, Annual Review of Microbiology, Vol. 22:323-358, 1968
7. Amerine M. A., The Technology of wine making. 4th edition, Oesterreichischer Milchwirtschaftsfonds, Vienna, 1980
8. Anocibar Beloqui Angel, A. Bertrand, Study of sulfur compounds in wine: Preliminary results, Italian Journal of Food Science 3(3):279-288, Project: Sulfur compounds in wine, 1995
9. Arévalo M. Villena, J. Díez Pérez, J.F.Úbeda, E.Navascués, A.I.Briones Analytical, Nutritional and Clinical Methods, A rapid method for quantifying aroma precursors: Application to grape extract, musts and wines made from several varieties, Food Chemistry, Volume 99, Issue 1, Pages 183-190, 2006
10. Arroyo-López, F.N., Pérez-Torrado, R., Querol, A., Barrio, E. Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from that exhibited by *Saccharomyces cerevisiae* and their hybrid. Food Microbiol., Pubmed, 27, 628–637, 2010
11. Arslan, E., Çelik, Z.D., Cabarog̃ lu, T. Effects of pure and mixed autochthonous *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on fermentation and volatile compounds of narince wines. Foods, PubMed, 7, 147, 2018
12. Augustyn PH, J Marais, Aroma components in freon extracts of wine, South African Journal of Enology, 1982
13. Augustyn, O.P.H., Rapp, A., Van Wyk, C.J., Some volatile aroma components of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc, S. Afr. J. Enol. Vitic.3,53–59, 1982
14. Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., Zapparoli, G. Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. Eur. Food Res. Technol. 235, 303–313, 2012
15. Bafrcnová Petra, Daniela šmogrovičová, Iveta Sláviková, Jaroslava Pátková & Zoltán Dömény, Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology Letters volume 21, pages337–341, 1999
16. Bakker H. M, L. C. van Loon, C. M. J. Pieterse, Systemic Resistance Induced By Rhizosphere Bacteria, Annual Review Of Phytopathology, Vol. 36:453-483, Department Of Plant Ecology And Evolutionary Biology, Utrecht University, 1998
17. Bakker Jokie & Ronald J. Clarke, Wine Flavour Chemistry, Second edition, 1986
18. Bakker Jokie, Ronald J. Clarke, Wine: Flavour Chemistry, 2011
19. Balch, Oliver, "Scientists reveal revolutionary palm oil alternative: Yeast (*M.pulcherrima*)", The Guardian, 2015
20. Balikci, E.K., Tanguler, H., Jolly, N.P., Erten, H. Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. Yeast 33, 313–321., 2016
21. Ballester-Tomás, L., Prieto, J.A., Gil, J.V., Baeza, M., Randez-Gil, F. The Antarctic yeast *Candida sake*: Understanding cold metabolism impact on wine. Int. J. Food Microbiol., 245, 59–65, 2017
22. Barbosa C., Lage P., Esteves M., Chambel L., Mendes-Faia A., Mendes-Ferreira A. Molecular and Phenotypic Characterization of *Metschnikowia pulcherrima* Strains from Douro Wine Region. Fermentation. 4:8, 2018
23. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D, Yeasts: Characteristics and Identification (3rd Ed) Cambridge: Cambridge University Press. Cambridge, UK., 2000
24. Baumes, R. L., Bayonove, C. L., Barillere, J. M., Samson, A., & Cordonnier, R. E., La mac ration pelliculaire dans la vinification en blanc. Incidence sur la composante volatile des vins. Vitis, 28, 31–48, 1989

25. Beavan M.J., Charpentier C., Rose A.H., Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431, *J. Gen. Microbiol.* 128:1447-1455, 1982
26. Beccaria Franca & Albertina Pretto, The quality of wine between innovation and tradition. A study of a changing 'Mediterranean drinking culture', Cambridge University, 2021
27. Belda I., Conchillo L.B., Ruiz J., Navascués E., Marquina D., Santos A. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *Int. J. Food Microbiol.*, 223:1–8., 2016
28. Belda I., Navascues E., Marquina D., Santos A., Calderon F., Benito S. Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast.* 33:329–338, 2016
29. Belda I., Ruiz J., Alastruey-Izquierdo A., Navascues E., Marquina D., Santos A. Unraveling the Enzymatic Basis of Wine "Flavorome": A Phylo-Functional Study of Wine Related Yeast Species. *Front. Microbiol.* 7:12. 2016
30. Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., Benito, S. Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 1911–1922, 2015
31. Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., Santos, A. Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, 257, 183–191, 2017
32. Beltran Gemma, Albert Mas, José M. Guillamón, *Microbiol, Non-conventional Yeast in the Wine Industry*, 2016
33. Beltran Gemma, Maria Jesús Torija, Maite Novo, Noemí Ferrer, Montserrat Poblet, José M. Guillamón, Nicolas Rozès, Albert Mas, *Systematic and Applied Microbiology, Volume 25, Issue 2, Pages 287-293, Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study*, 2002
34. Benítez Tahía & Jiménez Juan, Characterization of wine yeasts for ethanol production, *Applied Microbiology and Biotechnology* volume 25, pages150–154, 1986
35. Benito Á., Calderón F., Benito S. The combined use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans*—effect on the anthocyanin wine composition. *Molecules.* 22:739, 2017
36. Benito Á., Calderón F., Benito S. The Influence of Non-*Saccharomyces* Species on Wine Fermentation Quality Parameters. *Fermentation.* 5:54, 2019
37. Benito S. Combined Use of *Lachancea thermotolerans* and *Schizosaccharomyces pombe* in Winemaking: A Review. *Microorganisms.* 8:655, 2020
38. Benito S. The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102:6775–6790, 2018
39. Benito S. The impacts of *Schizosaccharomyces* on winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103:4291–4312, 2019
40. Benito S. The Management of Compounds that Influence Human Health in Modern Winemaking from an HACCP Point of View. *Fermentation*, 2019
41. Benito S., Hofmann T., Laier M., Lochbühler B., Schüttler A., Ebert K., Fritsch S., Röcker J., Rauhut D. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential fermentation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 241:707–717, 2015
42. Benito S., Palomero F., Morata A., Calderon F., Suarez-Lepe J.A. A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wines. *J. Appl. Microbiol.* 106:1743–1751, 2009
43. Benito, Á., Calderón, F., Benito, S. Combined use of *S. pombe* and *L. thermotolerans* in winemaking. Beneficial effects determined through the study of wines' analytical characteristics. *Molecules*, 21:1744, 2016
44. Benito, Á., Calderón, F., Benito, S., Mixed alcoholic fermentation of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* and its influence on mannose-containing polysaccharides wine composition. *AMB Express* 9, 17., 2019
45. Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., Benito, S. Quality and composition of Airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol. PubMed*, 54, 135–144, 2016
46. Benito, S. The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018
47. Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderon, F., Palmero, D., Suárez-Lepe, J. Physiological features of *Schizosaccharomyces pombe* of interest in making of white wines. *Eur. Food Res. Technol.* 236, 29–36, 2013
48. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L., *Biochemistry*. 5th. New York: WH Freeman, 38(894), 76, 2002
49. Bevan, E. A., and M. Makower, The physiological basis of the killer character in yeast, 1963
50. Bibek R., "Fundamental Food Microbiology", 3rd edition, CRC Press, 2004

51. Binati, R.L., Lemos Junior, W.J.F., Luzzini, G., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., Torriani, S. Contribution of non-Saccharomyces yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. and *Starmerella bacillaris* strains isolated in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 318, 2020
52. Bindon, K., Varela, C., Kennedy, J., Holt, H., Herderich, M. Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet sauvignon 1. Grape and wine chemistry. *Food Chem*, 138, 1696–1705, 2013
53. Bisson F Linda Christina L Pallmann, James A Brown, Tammi L Olineka, Luca Cocolin, David A Mills, Use of WL medium to profile native flora fermentations, *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 52, Issue 3, Pages, 198-203, 2001
54. Bisson F. Linda, C.E. Butzke, Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations, *American Journal of Enology and Viticulture* 51(2):168-177, 2000
55. Bisson LF, L Cocolin, DA Mills, Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations, *FEMS microbiology letters*, Volume 189, Issue 1, Pages 81-87, Blackwell Publishing Ltd, 2000
56. Black C.A., M. Parker, T.E. Siebert, D.L. Capone and I.L. Francis, Terpenoids and Their Role in Wine Flavour: Recent Advances, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 21, 582–600, 2015
57. Blake A., Y.Kotseridis, I.D.Brindle, D.Inglis, G.J.Pickering, Effect of light and temperature on 3-alkyl-2-methoxypyrazine concentration and other impact odourants of Riesling and Cabernet Franc wine during bottle ageing, *Food Chemistry*, Volume 119, Issue 3, pages 935-944, 2010
58. Bonnefond Caroline, Evelyne Aguera, Christelle Deytieux, Jean-Michel Salmon, Impact of Oxygen Addition during Enological Fermentation on Sterol Contents in Yeast Lees and Their Reactivity towards Oxygen, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95(5):496-503, PubMed, Daniel Granès's Lab, 2003
59. Bordet F., Joran A., Klein G., Roullier-Gall C., Alexandre H. Yeast-Yeast Interactions: Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition. *Microorganisms*; 8:600, microorganisms 2020
60. Boscaino F., Ionata E., La Cara F., Guerriero S., Marcolongo L., Sorrentino A. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia fructicola* autochthonous mixed starter on Aglianico wine volatile compounds. *J. Food Sci. Technol.* 56:4982–4991, 2019
61. Bosso Antonella, Massimo Guaita, Loretta Panero, Daniela Borsa, Roberto Follis, Influence of Two Winemaking Techniques on Polyphenolic Composition and Color of Wines, *Am J Enol Vitic.* 60: 379-385, 2009
62. Botezatu Andreea , Pickering Gary J., Kotseridis Yorgos, Development of a rapid method for the quantitative analysis of four methoxypyrazines in white and red wine using multi-dimensional Gas Chromatography – Mass Spectrometry, *Food Chemistry* 160, 141–147, 2014
63. Boulton Roger B., Vernon L. Singleton, Linda F. Bisson, Ralph E. Kunkee, Principles and Practices of Winemaking pp 102-192, *Yeast and Biochemistry of Ethanol Fermentation*, 1999
64. Braell P.A. , Acree T.E., Butts R.M., Zhou P.G., in: T.H.Parliment, R. Croteau (Eds.), *Biogenesis of Aromas*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Wasington,DC, pp. 75–84, 1986
65. Bruwer Johan & Karin Alant, *Wine Tourism Behaviour In The Context Of A Motivational Framework For Wine Regions And Cellar Doors*, Pages 27-37, 2007
66. Brysch-Herzberg M., Seidel M. Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions. *Int. J. Food Microbiol.* 214:137–144, 2015
67. Bucher, T., Deroover, K., Stockley, C. Low-alcohol wine: A narrative review on consumer perception and behaviour. *Beverages*, 4, 82., 2018
68. Buttery R.G., R. M. Seifert, D. G. Guadagni, and L. C. Ling, *Characterization of Additional Volatile Components of Tomato*, 1969
69. Cabrita M.J., Ofélia Anjos, A.P.Belchior, Ilda Caldeira, Sara Canas, J.Granja-Soares, Rita Roque, Effect of innovative technology using staves and micro-oxygenation on the odorant and sensory profile of aged wine spirit, *Food Chemistry*, Volume 333, 127450, 2020
70. Cabrita M.J., P. Herbert , N. Ratola , O. Laureano & A. Alves, Relationship Between Biogenic Amines and Free Amino Acid Contents of Wines and Musts from Alentejo (Portugal), Pages 1171-1186, 2007
71. Canas Izquierdo, P.M., Palacios Garcia, A.T., Garcia Romero, E. Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-Saccharomyces (*Hansenula* and *Torulasporea*) and *Saccharomyces* yeast starter. *VITIS-J. Grapevine Res.*50, 177–182, 2011
72. Canas, S., Caldeira, I., Anjos, O., Lino, J., Soares, A., & Belchior, A., Physicochemical and sensory evaluation of wine brandies aged using oak and chestnut wood simultaneously in wooden barrels and in stainless steel tanks with staves. *International Journal of Food Science and Technology* (51), 2537–2545, 2016
73. Canonico Laura Laura, Francesca Comitini, Lucia Oro, Maurizio Ciani, Sequential Fermentation with Selected Immobilized Non-Saccharomyces Yeast for Reduction of Ethanol Content in Wine, *Front Microbiol.*7, 278, 2016

74. Canonico Laura, Francesca Comitini, and Maurizio Ciani, *Metschnikowia pulcherrima* Selected Strain for Ethanol Reduction in Wine: Influence of Cell Immobilization and Aeration Condition, *Foods*, 8, 378.,2019
75. Canonico Laura, Mark Solomon, Francesca Comitini, Maurizio Ciani, Cristian Varela, Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-Saccharomyces yeasts under different aeration conditions, *Food microbiology*, 84, 2019
76. Canonico, L., Galli, E., Ciani, E., Comitini, F., Ciani, M. Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process. *Microorganisms*, 7, 11., 2019
77. Carre E., S. Lafon-Lafourcade, P. Ribéreau-Gayon, Occurrence of Lactic Acid Bacteria During the Different Stages of Vinification and Conservation of Wines, *Food Microbiology*, 1983
78. Casassa Luis F., Santiago E. Sari, Sensory and chemical effects of two alternatives of prefermentative cold soak in Malbec wines during winemaking and bottle ageing, *Food science and technology*, 2014
79. Casassa, L. F., Bolcato, E. A., & Sari, S. E., Chemical, chromatic, and sensory attributes of 6 red wines produced with prefermentative cold soak. *Food, chemistry*, 174, 110-118, 2015
80. Castelli T., The wine yeasts, *Arch Mikrobiol*, 20(4):323-42, 1954
81. Castrillo D., Rabunal E., Neira N., Blanco P. Oenological potential of non-Saccharomyces yeasts to mitigate effects of climate change in winemaking: Impact on aroma and sensory profiles of Treixadura wines. *Fems. Yeast Res.* 19:65, 2019
82. Cecchini, F., Morassut, M., Moruno, E.G., Di Stefano, R. Influence of yeast strain on Ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiol.* 23, 411–417, 2006
83. Chang, Silke Wissing, Stefan Wölfl, Zhaojie J. Zhang, Richard Y. Zhao, Bing Zhou, Lorenzo Galluzzi, Guido Kroemer, Frank Madeo, et al, *Microb Cell.* 5(1): 4–31, Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature, 2019
84. Chatonnet P., D. Dubourdieu, J. N. Boidron, The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines, *Am J Enol Vitic.* 46: 463-468, 1995
85. Chatonnet Pascal, Denis Dubourdieu, Jean-noël Boidron, Valérie Lavigne, Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines, *SCI, Journal of the science of food and agriculture*, 62:191-202, 1993
86. Chen K., Escott C., Loira I., del Fresno J.M., Morata A., Tesfaye W., Calderon F., Suárez-Lepe J.A., Han S., Benito S. Use of non-Saccharomyces yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiol.* 69:51–63, 2018
87. Chen, EC-H, The relative importance of Ehrlich and biosynthetic pathways to the fermentation of fusel alcohols, quoted by Jackson, R.S (1994), loc.cit.p.185, 1978
88. Cheng-Jen Chang, Yen-Chang Hsiao, Martin C. Mihm Jr., J. Stuart Nelson Pilot study examining the combined use of pulsed dye laser and topical Imiquimod versus laser alone for treatment of port wine stain birthmarks, 2008
89. Cheynier V., J.-M. Souque, A. Samson And M. Moutounet, Hyperoxidation: influence of various oxygen supply levels on oxidation kinetics of phenolic compounds and wine quality, *Vitis* 30, 107-115, 1991
90. Ciani M. and F. Maccarelli, Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* volume 14, pages199–203, 1997
91. Ciani Maurizio, Francesca Comitini, Mirko Gobbi, Paola Domizio, Cristina Romani, Livio Lencioni, Ilaria Mannazzu, Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Microbiol*, 28(5):873-82, 2011
92. Ciani Maurizio, Laura Canonico, Francesca Comitini, Lucia Oro, Sequential Fermentation with Selected Immobilized Non-Saccharomyces Yeast for Reduction of Ethanol Content in Wine, *Frontiers in Microbiology*, 2016
93. Ciani Maurizio, Marzia Stringini, Francesca Comitini, Manuela Taccari, Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon, *Food Microbiology*, Elsevier, Volume 26, Issue 4, Pages 415-420, 2009
94. Ciani Maurizio, Pilar Morales, Francesca Comitini, Jordi Tronchoni, Laura Canonico, José A. Curie, Lucia Oro, Alda J. Rodrigues, and Ramon Gonzalez, Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines, *Front Microbiol* 4,7:642, 2016

95. Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., Comitini, F. Footprint of Nonconventional Yeasts and Their Contribution in Alcoholic Fermentations. In *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*, Academic Press: Cambridge, MA, USA, pp. 435–465, 2020
96. Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., Romano, P. Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Front. Microbiol.*, 7, 555, 2016
97. Ciani, M., Comitini, F. Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behaviour of *Candida stellata* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 619–623, 2006
98. Ciani, M., Comitini, F. Use of non-*Saccharomyces* yeasts in red winemaking. In *Red Wine Technology*, Antonio, M., Ed., Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 51–68., 2019
99. Clemente-Jimenez J.M., L.Mingorance-Cazorla, S.Martínez-Rodríguez, F.J.Las Heras-Vázquez, F.Rodríguez-Vico, Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 98, Issue 3, Pages 301-308, Elsevier, 2005
100. Cocolin Luca, Mills A. David, Wine Yeast Inhibition by Sulfur Dioxide: A Comparison of Culture-Dependent and Independent Methods, *Am J Enol Vitic.*, 54: 125-130, 2003
101. Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.*, 99, 237–243, 2005
102. Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.*, 28, 873–882, 2011
103. Compagno Concetta, Sofia Dashko, Nerve Zhou, Jure Piškur, Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?, *FEMS Yeast Research*, Volume 14, Issue 6, Pages 826–832, 2014
104. Constantí Magda, Montserrat Poblet, Lluís Arola, Albert Mas, José M. Guillamón, Analysis of Yeast Populations During Alcoholic Fermentation in a Newly Established Winery, *Am J Enol Vitic.* 48: 339-344, 1997
105. Contreras A., A. C. Hidalgo, P. A. Henschke, P. J. Chambers, C. Curtin, and C. Varela, Evaluation of Non-*Saccharomyces* Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine, *Appl Environ Microbiol.* 80(5): 1670–1678, 2014
106. Contreras A., C. Curtin & C. Varela, Yeast population dynamics reveal a potential ‘collaboration’ between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology* volume 99, pages 1885–1895
107. Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P.A., Curtin, C., Varela, C. The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int. J. Food Microbiol.*, 205, 7–15, 2015
108. Conway Gordon, Robert Chambers, Sustainable rural livelihoods: practical concepts for the 21st century, *IDS Discussion Paper* 296, 1992
109. Crabtree Herbert Grace, Observations on the carbohydrate metabolism of tumours, *Biochem J.* 23(3): 536–545, 1929
110. D'amore T, CJ Panchal, I Russell & G. G. Stewart, A study of ethanol tolerance in yeast. *Critical Reviews in Biotechnology*, *Crit Rev Biotechnol.* 9(4):287-304, 1990
111. Darriet P., R.Ghidossi, C.Poupot, C.Thibon, A.Pons, L.Riquier, G.De Revel, M.Mietton Peuchot, The influence of packaging on wine conservation, *Food Control*, Volume 23, Issue 2, Pages 302-311, 2012
112. De Benedictis, M., Bleve, G., Grieco, F., Tristezza, M., Tufariello, M. An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99, 189–200, 2011
113. De Deken, R. The crabtree effect: A regulatory system in yeast. *Microbiology*, 44, 149–156., 1966
114. Del Fresno, J.M., Morata, A., Loira, I., Bañuelos, M.A., Escott, C., Benito, S., Chamorro, C.G., Suárez-Lepe, J.A. Use of non-*Saccharomyces* in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. *Eur. Food Res. Technol.*, 243, 2175–2185, 2017
115. Delfini Claudio, Joseph V. Formica, *Wine Microbiology: Science and Technology*, 2001
116. Demole E., P. Enggist, U. Sauberli, M. Stoll, E. Kovats, *Helv. Chim. Acta* 53, 541, 1970
117. Devatine Audrey, Igor Chiciuc, Christian Poupot, Mme Mietton-Peuchot, Micro-oxygenation of wine in presence of dissolved carbon dioxide, *Chemical Engineering Science* 62(17):4579-4588, 2007
118. Devatine Audrey, Mme Mietton-Peuchot, A mathematical approach for oxygenation using micro bubbles: Application to the micro-oxygenation of wine, *Chemical Engineering Science* 64(9):1909–1917, 2007

119. Di Gianvito, P., Perpetuini, G., Tittarelli, F., Schirone, M., Arfelli, G., Piva, A., Patrignani, F., Lanciotti, R., Olivastri, L., Suzzi, G. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* strains on traditional sparkling wines production. *Food Res. Int.*, 109, 552–560, 2018
120. Di Maio, S., Genna, G., Gandolfo, V., Amore, G., Ciaccio, M., Oliva, D. Presence of *Candida zemplinina* in Sicilian musts and selection of a strain for wine mixed fermentations. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 33, 80–87, 2012
121. Domizio, P., Lencioni, L., Calamai, L., Portaro, L., Bisson, L.F. Evaluation of the yeast *Schizosaccharomyces japonicus* for use in wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*, 69, 266–277, 2018
122. Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L., Barile, D. Cell wall polysaccharides released during the alcoholic fermentation by *Schizosaccharomyces pombe* and *S. Japonicus*: Quantification and characterization. *Food Microbiol.*, 61, 136–149, 2017
123. Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., Ciani, M. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 147, 170–180, 2011
124. Du Plessis H., Du Toit M., Hoff J., Hart R., Ndimba B., Jolly N. Characterisation of non-*Saccharomyces* yeasts using different methodologies and evaluation of their compatibility with malolactic fermentation. *J. South Afr. J. Enol. Vitic.* 38:46–63, 2017
125. Du Plessis H., J. J. Spies, H. Liebenberg, The genus *Rubus* in South Africa. II. Meiotic chromosome behavior, 1984
126. Duarte F.L., Egipto R., Baleiras-Couto M.M., Mixed fermentation with *Metschnikowia pulcherrima* using different grape varieties. *Fermentation* 5, 59, 2019
127. Dutraive O., Benito S., Fritsch S., Beisert B., Patz C.-D., Rauhut D. Effect of Co-fermentation with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation*. 5:79., 2019
128. Eglinton, J.M., Heinrich, A.J., Pollnitz, A.P., Langridge, P., Henschke, P.A., de Barros Lopes, M. Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the *ald6* aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast*, 19, 295–301, 2002
129. Englezos, V., Giacosa, S., Rantsiou, K., Rolle, L., Cocolin, L. *Starmerella bacillaris* in winemaking: Opportunities and risks. *Curr. Opin. Food Sci.* 17, 30–35, 2017
130. Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., Rolle, L., Cocolin, L. *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 12, 5515–5526, 2019
131. Escott, C., Del Fresno, J.M., Loira, I., Morata, A., Suárez-Lepe, J.A. *Zygosaccharomyces rouxii*: Control strategies and applications in food and winemaking. *Fermentation*, 4, 69, 2018
132. Escribano R., González-Arenzana L., Portu J., Garijo P., López-Alfaro I., López R., Santamaría P., Gutiérrez A. Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones. *J. Appl. Microbiol.* 124:1521–1531, 2018
133. Escribano-Viana R., Gonzalez-Arenzana L., Portu J., Garijo P., Lopez-Alfaro I., Lopez R., Santamaria P., Gutierrez A.R. Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts. *Food Res. Int.* 112:17–24, 2018
134. Esteban Veronica, Nathalie Cueille, Ekaterina Salimova, Miguel Blanco, Sergio Moreno, Avelino Bueno, Viesturs Simanis, *Flp1*, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or *rum1p* stabilisation at the end of mitosis, *Journal of Cell Science*, 114: 2649-2664, 2001
135. Esteves M., Barbosa C., Vasconcelos I., Tavares M.J., Mendes-Faia A., Mira N.P., Mendes-Ferreira A. Characterizing the Potential of the Non-Conventional Yeast *Saccharomyces ludwigii* UTAD17 in Winemaking. *Microorganisms*. 7:478. *microorganisms*, 2019
136. Eti vant P.-X., Issanchou S.N and Bayonove C-L, The flavor of Muscat wine, the sensory contribution of some volatile compounds *J.Sci.Food Agric.*,34,497-504, 1983
137. Falcão, L. D., de Revel, G., Perello, M. C., Moutsiou, A., Zanús, M. C., & Bordignon-Luiz, M. T. A survey of seasonal temperatures and vineyard altitude influences on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, C13-norisoprenoids, and the sensory profile of Brazilian Cabernet Sauvignon wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), pp. 3605-3612, 2007
138. Falcao, L.D., Revel, G.D. Perello, M.C., Riquier, L, Rosier, J.P., Uberti, A. A. A. Volatile profile characterization of young Cabernet-Sauvignon wines from a new grape growing region in Brazil. *International Journal of Vine and Wine Sciences*, 42(3), pp.133–146., 2008
139. Fang Fang, Jing-Ming Li, Ping Zhang, Ke Tang, Wei Wang, Qiu-Hong Pan, Wei-Dong Huang, Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines, *Food Research International*, Volume 41, Issue 1, Pages 53-60, 2008
140. Fatichenti F., G. A. Farris, P. Deiana, S. Ceccarelli, M. Serra, Commercial Trial of Winemaking Using Two Selected Starters of *Saccharomyces Cerevisiae* Which Do Not Reduce Malic Acid Content, *Am J Enol Vitic.* 32: 236-240, 1981

141. Fatichenti Fabrizio, Giovanni Antonio Farris, Pietrino Deiana & Salvatore Ceccarelli, Malic acid production and consumption by selected of *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic and aerobic conditions, *Applied Microbiology and Biotechnology* volume 19, pages427–429, 1984
142. Fernanda Cosme, Fernando M. Nunes, et al., *Wine Microbial Spoilage: Advances in Defects Remediation*, in *Microbial Contamination and Food Degradation*, 2018
143. Fernández M., J.F Úbeda, A.I Briones, Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making, *Elsevier, International Journal of Food Microbiology*, Volume 59, Issues 1–2, Pages 29-36, 2000
144. Fernández-Espinar, Amparo Querol, M.Teresa, Marcel Del Olmo, Eladio Barrio, *International Journal of Food Microbiology*, Review: Adaptive evolution of wine yeast, Volume 86, Issues 1–2, Pages 3-10, 2003
145. Fischer, U., Noble, C.A. The effect of ethanol, catechin concentration, and ph on sourness and bitterness of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 6–10, 1994
146. Fleet G. H., S. Lafon-Lafourcade, P. Ribéreau-Gayon, *Food Microbiology, Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines*, 1984
147. Fleet H. Graham, *Wine yeasts for the future, FEMS Yeast research*, 2008
148. Fleet H.G., Science direct, Review article: Yeast interactions and wine flavor, *International Journal of Food Microbiology* 86 11 – 22, 2013
149. Fleet, G. H., & Heard, G. M., *Yeasts-growth during fermentation*. In G. H. Fleet (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology*, Lausanne (pp. 27-55). Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993
150. Fleet, G. H., *Yeast interactions and wine flavour*. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11-22, 2003
151. Foroni, F., Vignando, M., Aiello, M., Parma, V., Paoletti, M. G., Squartini, A., & Rumiati, R. I. The smell of terroir! Olfactory discrimination between wines of different grape variety and different terroir. *Food Quality and Preference*, 58, 18-23, 2017
152. Fowlis A. Ian, *Gas Chromatography: Analytical Chemistry by Open Learning*, 1995
153. Francesca, N., Gaglio, R., Alfonso, A., Settanni, L., Corona, O., Mazzei, P., Romano, R., Piccolo, A., Moschetti, G. The wine: Typicality or mere diversity? The effect of spontaneous fermentations and biotic factors on the characteristics of wine. *Agric. Agric. Sci. Procedia*, 8, 769–773, 2016
154. Francisco M. Carrau, Eduardo Boido and Eduardo Dellacasa, *Terpenoids in Grapes and Wines: Origin And Micrometabolism During The Vinification Process*, Vol.3, No 4, 577-592, Npc, 2008
155. Fugelsang, K., & Edwards, C., *Wine microbiology, practical applications and procedures*, Vol. 2. New York: Springer Science Business Media/LLC, 2007
156. Gachons, C. P., Leeuwen, C. V., Tominaga, T., Soyer, J. P., Gaudillère, J. P., & Dubourdieu, D., Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc in field conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 73-85, 2005
157. Gao, C., Fleet, G. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* 1988, 65, 405–409, 1988
158. Garcia M., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J.M., Arroyo, T. Sequential non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* fermentations to reduce the alcohol content in wine. *Fermentation*, 6, 60, 2020
159. Garcia-Ruiz A, Bartolome B, Cueva C, Martin-Alvarez PJ, Moreno-Arribas MV, Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. *J Appl Microbiol* 107(3):1042–1053, 2009
160. Garde-Cerdán Teresa, Carmen Ancín-Azpilicueta, Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation, *Elsevier, LWT - Food Science and Technology*, Volume 41, Issue 3, Pages 501-510, 2008
161. Garde-Cerdan, T., Marselles-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Ancin-Azpilicueta, C., & Martin- Belloso, O., Effect of storage conditions on the volatile composition of wines obtained from must stabilised by PEF during ageing without SO₂. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 469–476, 2008
162. Gastaminza, G., Quirce, S., Torres, M., Tabar, A., Echechipía, S., Muñoz, D., et al., Pickled onion-induced asthma: a model of sulfite-sensitive asthma? *Clinical & Experimental Allergy*, 25, 698-703, 1995
163. Gawel, R., Sluyter, S.V., Waters, E.J. The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 13, 38–45, 2007
164. Giacosa Elisa, Matteo Rossi, Giuseppe Festa, Alberto Ferraris, Wine and the "Spirit" of the Territory: The Langhe Case as a Successful Wine Tourism Destination "System", *Tourism Analysis* 24(3):291-304, 2019
165. Giacosa S., Segade S. R., Cagnasso E., Caudana A., Gerbi L., R., Gerbi V., SO₂ in Wines: Rational Use and Possible Alternatives, *Red Wine Technology*, Chapter 21, 309-321, 2019

166. Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.*, 33, 271–281, 2013
167. Godden, P., Wilkes, E., Johnson, D. Trends in the composition of Australian wine 1984–2014. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 21, 741–753, 2015
168. Gonzalez, R., Quirós, M., Morales, P. Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends Food Sci. Technol.*, 29, 55–61., 2013
169. González-Barreiro C., B.Cancho-Grande, J.Simal-Gándara, R.Noguerol-PatoT.Sieiro-Sampedro, Evaluation of the effect of fenhexamid and mepanipyrim in the volatile composition of Tempranillo and Graciano wines, *Food Research International*, Volume 71, Pages 108-117, Elsevier, 2015
170. González-Barreiro C., R Rial-Otero, B Cancho-Grande, J Simal-Gándara, Wine aroma compounds in grapes: a critical review, *Critical reviews in food science and nutrition* 55 (2), 202-218, 2015
171. González-Barreiro Carmen, Patricia Reboredo-Rodríguez, Raquel Rial-Otero, Beatriz Cancho-Grande & Jesús Simal-Gándara, Effects of Sugar Concentration Processes in Grapes and Wine Aging on Aroma Compounds of Sweet Wines—A Review, Pages 1053-1073, 2015
172. González-Barreiro Carmen, Raquel Rial-Otero, Beatriz Cancho-Grande & Jesús Simal-Gándara, Wine Aroma Compounds in Grapes: A Critical Review, Pages 202-218, 2014
173. González-Royo E., Pascual O., Kontoudakis N., Esteruelas M., Esteve-Zarzoso B., Mas A., Canals J.M., Zamora F. Oenological consequences of sequential fermentation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* 240:999–1012, 2014
174. González-Royo Elena, Olga Pascual, Nikolaos Kontoudakis, Mireia Esteruelas, Braulio Esteve-Zarzoso, Albert Mas, Joan Miquel Canals, Fernando Zamora, Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production, *Eur Food Res Technol*, 2014
175. Goodwin H. Paul, Grace Y.-J Chen, High expression of a sucrose non-fermenting (SNF1)-related protein kinase from *Colletotrichum gloeosporoides* f. sp. *malvae* is associated with penetration of *Malva pusilla*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 215, Issue 2, Pages 169–174, 2002
176. Goold, H.D., Kroukamp, H., Williams, T.C., Paulsen, I.T., Varela, C., Pretorius, I.S. Yeast’s balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microb. Biotechnol.*, 10, 264–278, 2017
177. Gore-Lloyd D., Sumann I., Brachmann A.O., Schneeberger K., Ortiz-Merino R.A., Moreno-Beltran M., Schlafl M., Kirner P., Santos Kron A., Rueda-Mejia M.P., et al. Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Mol. Microbiol.* 112:317–332, 2019
178. Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., Rosellini, D., & Vincenzini, M. Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentations for the production of Brunello di Montalcino wines. *Food Technology and Biotechnology*, 36, 313-318, 1998
179. Grazia A., Pietrafesa A., Capece A., Pietrafesa R., Siesto G., Romano P. Exploitation of technological variability among wild non-*Saccharomyces* yeasts to select mixed starters for the production of low alcohol wines; *Proceedings of BIO Web of Conferences*, 42nd World Congress of Vine and Wine; Geneva, Switzerland. p. 02031, 2019
180. Guerrero Raúl F., Emma Cantos-Villar, Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 42, Issue 1, Pages 27-43, Elsevier, 2015
181. Gunata Y,Z., C.L.Bayonove, R.L.Baumes, R.E.Cordonnier, The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components, *Journal of Chromatography A*, Volume 331, Pages 83-90, 1985
182. Guth, H., Quantification and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3027-3032, 1997
183. Gutiérrez López C. *Taxonomía de levaduras de origen enológico por espectrometría de masas*. Universidad Complutense de Madrid; Madrid, Spain, 2017.
184. Guzmán B., Lachance M.-A., Herrera C.M. Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect–yeast association: Have yeast and angiosperm lineages co-diversified? *J. Mol. Phylogenetics Evol.* 68:161–175, 2013
185. Hagman Anre, Jure Piškur, A Study on the Fundamental Mechanism and the Evolutionary Driving Forces behind Aerobic Fermentation in Yeast, 2015
186. Hagman Arne, Torbjörn Säll, Concetta Compagno, Jure Piskur, Yeast “Make-Accumulate-Consume” Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication, 2013
187. Hames Gina, *Alcohol in World History*. London: Routledge, 2012

188. Hamilton, R. P. and B.G. Coombe, Harvesting of Wine Grapes. In: Viticulture, Vol. 2 (Practices) (B.G. Coombe and P.R. Dry, eds.) Adelaide, Australia: Winetitles, 1992
189. Han G., Webb M.R., Waterhouse A.L. Acetaldehyde reactions during wine bottle storage. *Food Chem.* 290:208–215, 2019
190. Hansen, H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. C., & Arneborg, N. The effect of oxygen on the survival of non-Saccharomyces yeasts during mixed cultures fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 541-547, 2001
191. Harlé O., Legrand J., Tesnière C., Pradal M., Mouret J.-R., Nidelet T. Kinetic analysis of yeast-yeast interactions in oenological conditions. *J. Biorxiv.* 363531, 2019
192. Hashizume Katsumi, Takashi Samuta, Grape Maturity and Light Exposure Affect Berry Methoxypyrazine Concentration, *Am J Enol Vitic.* 50: 194-198, 1999
193. Heimann Barbara, Karin Moelling, Peter Beimling, Ulf R. Rapp & Thomas Sander, Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag–mil and gag–raf proteins, *Nature* volume 312, pages 558–561, 1984
194. Henderson, J. Patrick, Rex, Dellie, *About Wine*, 2011
195. Henk van den Berg, Martijn van der Gaag, Henk Hendriks, *Influence of Lifestyle on Vitamin Bioavailability*, 2013
196. Henschke Paul A., Francisco M. Carrau, Karina Medina, Laura Farina, Eduardo Boido, Eduardo Dellacassa, Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains, *FEMS Yeast Research*, Pages 1196–1207, Volume 8, Issue 7, 2008
197. Hernández-Orte, Juan F. Cacho, and Vicente Ferreira, Relationship between Varietal Amino Acid Profile of Grapes and Wine Aromatic Composition. Experiments with Model Solutions and Chemometric Study Purificación, *J. Agric. Food Chem.* 50, 10, 2891–2899, 2002
198. Hershkovitz V., Sela N., Taha-Salaime L., Liu J., Rafael G., Kessler C., Aly R., Levy M., Wisniewski M., Droby S. De-novo assembly and characterization of the transcriptome of *Metschnikowia fructicola* reveals differences in gene expression following interaction with *Penicillium digitatum* and grapefruit peel. *BMC Genom.* 14:168, 2013
199. Hirao A.S., Imai R., Endoh R., Ohkuma M., Degawa Y. Draft Genome Sequence of Novel *Metschnikowia* sp. Strain JCM 33374, a Nectar Yeast Isolated from a Bumblebee. *Microbiol. Resour. Announc.* 8:e00704-00719, 2019
200. Hong M., Li J., Chen Y. Characterization of tolerance and multi-enzyme activities in non-Saccharomyces yeasts isolated from Vidal blanc icewine fermentation. *J. Food Biochem.* 43:e13027, 2019
201. Hranilovic A., Li S., Boss P.K., Bindon K., Ristic R., Grbin P.R., Van der Westhuizen T., Jiranek V. Chemical and sensory profiling of Shiraz wines co-fermented with commercial non-Saccharomyces inocula. *Aust. J. Grape Wine Res.* 24:166–180, 2018
202. Hranilovic Ana, Joanna M. Gambetta, David W. Jeffery, Paul R. Grbin, Vladimir Jiraneka, Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: the effect of sequential inoculation timing, *International Journal of Food Microbiology* 2020
203. Hugh D. Goold, Heinrich Kroukamp, Thomas C. Williams, Ian T. Paulsen, Cristian Varela, Isak S. Pretorius, *Microbial Biotechnology*, Minireview, Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines, 2017
204. Ivit Nedret Neslihan, Rocco Longo and Belinda Kemp, Review, The Effect of Non-Saccharomyces and Saccharomyces Non-Cerevisiae Yeasts on Ethanol and Glycerol Levels in Wine, *Fermentation*, 2020
205. Ivit, N.N., Loira, I., Morata, A., Benito, S., Palomero, F., Suárez-Lepe, J.A. Making natural sparkling wines with non-Saccharomyces yeasts. *Eur. Food Res. Technol.*, 244, 925–935, 2018
206. Ivit N, Kemp B., The Impact of Non-Saccharomyces Yeast on Traditional Method Sparkling Wine, *fermentation*, 2018
207. Jackson D. I., P. B. Lombard, Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - A Review, *Am J Enol Vitic.* 44: 409-430, 1993
208. Jackson R. S., Oak and Cooperage. In: *Wine Science Principles and Applications*. 3rd edition, Academic Press, USA: (452- 472), 2008
209. Jackson Ron S., *Wine Tasting: A Professional Handbook*, 2002
210. Jackson Ronald S., *Wine Science, Principles and Applications: A volume in Food Science and Technology*, Third Edition, Elsevier, 2008
211. Jackson S. Ronald, *Wine Tasting: A Professional Handbook*, third edition, Elsevier, 2006
212. Jackson, R.S., Fermentation. In *Wine Science: Principles and Applications (Food Science and Technology)*, Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, Chapter 7, p. 493, 2014
213. Jay MJ, Loessner M and Golden D, “Modern Food Microbiology”, 7th edition, Springer, New York., 2006
214. Jolly N. P., Augustyn, O. P. H, Pretorius, I. S, The role and use of non-saccharomyces yeasts in wine production, 2006

215. Jolly N., Augustyn O., Pretorius I. The effect of non-Saccharomyces yeasts on fermentation and wine quality. *J. South Afr. J. Enol.* 24:55–62, 2003
216. Jolly N., Augustyn O., Pretorius I. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *J. South Afr. J. Enol. Vitic.* 24:63–69, 2003
217. Jolly N.P., Varela C., Pretorius I.S. Not your ordinary yeast: Non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *J. Fems. Yeast Res.* 14:215–237, 2014
218. Jones K.O., D.Williams, P.A.Montgomery, D.Phipps. Elsevier, IFAC Proceedings Volumes, Volume 25, Issue 2, Pages 247-250, IFAC Proceedings Volumes, Dissolved Oxygen Control in a Fermentation of *Saccharomyces Cerevisiae* using an Automatic Tuning PID Controller, Biotechnical Processes, Colorado, USA, 1992
219. Jones Samuel T., Iowa State University, Theodore J. Heindel, Mechanical Engineering Conference Presentations, Papers, and Proceedings, A Review of Dissolved Oxygen Concentration Measurement Methods for Biological Fermentations, Iowa State University, 2007
220. José Gómez-Míguez M., Manuela Gómez-Míguez, Isabel M. Vicario, Francisco J.Heredia, Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type, *Journal of Food Engineering*, Volume 79, Issue 3, Pages 758-764, 2007
221. Jouanneau S., Weaver R.J., Nicolau L., Herbst-Johnstone M., Benkwitz F., and Kilmartin P.A., Subregional survey of aroma compounds in Marlborough Sauvignon Blanc wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(3), pp.329-343, 2012
222. Jouanneau Sara, Farhana R. Pinu, Laura Nicolau, Richard C. Gardner, Silas G. Villas-Boas Concentrations of the Volatile Thiol 3-Mercaptohexanol in Sauvignon blanc Wines: No Correlation with Juice Precursors, *Am J Enol Viti.* 63: 407-412, 2012
223. Kallis Michalis, Konstantinos Sideris, Nikolaos Kopsahelis, Loulouda Bosnea, Yiannis Kourkoutas, Antonia Terpou and Maria Kanellaki Pistacia terebinthus Resin as Yeast Immobilization Support for Alcoholic Fermentation, 2019
224. Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., Nerantzis, E. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 23, 735–739, 2007
225. Karagiannis Stelios, Panos Lanaridis, The Effect of Various Vinification Parameters on the Development of Several Volatile Sulfur Compounds in Greek White Wines of the Cultivars Batiki and Muscat of Hamburg, *Am J Enol Vitic.*, 1999
226. Karbowskiak Thomas Julie Chanut, Aurélie Lagorce, Sonia Lequin, Régis D.Gougeon, Jean-Marc Simon, Jean-Pierre Bellat, Fast manometric method for determining the effective oxygen diffusion coefficient through wine stopper, Elsevier, Volume 93, 2021
227. Karbowskiak Thomas, Anna Katharine Mansfield, V. Daniela Barrera-García, David Chassagne, Sorption and diffusion properties of volatile phenols into cork, Elsevier, Volume 122, Issue 4, Pages 1089-1094, 2010
228. Karbowskiak, T., Gougeon, R. D., Alinc, J. B., Brachais, L., Debeaufort, F., Voilley, A., et al., Wine oxidation and the role of cork. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(1), 20–52, 2010
229. Kazemi Mohammad Amin, Hanieh Bamdad, Sadegh Papari, Soheila Yaghmaei Modeling and control of dissolved oxygen concentration in the fermentation of Glucose to Gluconic Acid, *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* 57(1-2) Mathematical modeling, , 2013
230. Keith, S. Elizabeth, John J. Powers, Stepwise Discriminant Analysis of Gas Chromatographic Data as an Aid in Classifying the Flavor Quality of Foods, 1968
231. Kelly, J.M., van Dyk, S.A., Dowling, L.K., Pickering, G.J., Kemp, B., Inglis, D.L. *Saccharomyces uvarum* yeast isolate consumes acetic acid during fermentation of high sugar juice and juice with high starting volatile acidity. *OENO ONE Int. J. Vine Wine Sci.*, 54, 199–211, 2020
232. Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B., Marchal, R. Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 19–38. 2015
233. Killiam, E and Ough C.S, Fermentation esters- formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am .J. Enol. Vitic* 30, 301-305, 1979
234. Koshinsky H.A., R.H. Cosby and G.G. Khachatourians, Effects of T-2 toxin on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotech App. Biochem*, 12:121-31, 1992
235. Kotseridis Yorgos, Angel Anocibar Beloqui, A Bertrand, JP Doazan, An Analytical Method for Studying the Volatile Compounds of Merlot noir Clone Wines, *American Journal of Enology and Viticulture* 49(1):44-48, 1998
236. Kotseridis Yorgos, M Spink, Ian D Brindle, Gary J Pickering, Quantitative analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in juice and wine using stable isotope labelled internal standard assay, *Journal of Chromatography A* 1190(1-2):294-301, PubMed, 2008

237. Kotseridis Yorgos, Raymond L. Baumes, Alain Bertrand, George Skouroumounis, Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay, *Journal of Chromatography A* 841(2):229-37 PubMed, 1999
238. Kourakou, S., Degre De Maturite Optimal Du Raisin Selon Le Type Du Vin A Elaborer. Ii. *Bull. O.I.V.*, 50, Pp.617-640, 1977
239. Kourakou, S., Mise Au Point D' Une Politique Globale De La Vigne Et Du Vin. *Bull. O.I.V.*, 49, Pp.914-951, 1976
240. Krahe E. Thomas, Alexandre E. Medina, David M. Coppola and Ary S. Ramoa, Neonatal Alcohol Exposure Induces Long-Lasting Impairment of Visual Cortical Plasticity in Ferrets, *Journal of Neuroscience*, 23 (31) 10002-10012, 2003
241. Kreger-Van Rij, The Yeasts, 3rd Edition, A Taxonomic Study, Elsevier Science, 1984
242. Kruger J Nicholas, Antje von Schaewen The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organization, *Current Opinion in Plant Biology* 6(3):236-46, PubMed, 2003
243. Kunkee E. Ralph, *Fems Microbiology Letters*, Volume 88, Issue 1, Pages 55-71, Elsevier, Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making, 1991
244. Kunkee R.E., Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation, Elsevier, *Food Microbiology*, Volume 1, Issue 4, Pages 315-332, 1984
245. Kunkee, R. E., Bisson, L. F., Wine-making yeasts, Department of Viticulture and Ecology, University of California, Davis, CA 95616, USA., Book chapter: The yeasts. Volume 5: yeast technology. No.Ed. 2 pp.69-127 ref.9 pp., 1993
246. Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier; Amsterdam, Netherlands, 2011.
247. Kurtzman P Cletus, Christie J Robnett, Eleanor Basehoar, Todd J Ward, Four new species of *Metschnikowia* and the transfer of seven *Candida* species to *Metschnikowia* and *Clavispora* as new combinations, 111(11):2017-2035, Pubmed, 2018
248. Lachance M.A. *Metschnikowia*: Half tetrads, a regicide and the fountain of youth. *Yeast*. 33:563–574, 2016
249. Lafon-Lafourcade S., C. Geneix, P. Ribéreau-Gayon, Inhibition of Alcoholic Fermentation of Grape Must by Fatty Acids Produced by Yeasts and Their Elimination by Yeast Ghosts, *Food Microbiology*, 1984
250. Lagace S. Linda, Linda F. Bisson Survey of Yeast Acid Proteases for Effectiveness of Wine Haze Reduction, *Am J Enol Vitic.* 41: 147-155, 1990
251. Laguna L., Bartolomé B., Moreno-Arribas M.V. Mouthfeel perception of wine: Oral physiology, components and instrumental characterization. *Trends Food Sci. Technol.* 59:49–59, 2017
252. Lambrechts MG, IS Pretorius, Yeast and its importance to wine aroma-a review, *South African Journal of Enology*, 2000
253. Lambropoulos Ioannis, Roussis G. Ioannis, Panagiotis Tzimas, Ioannis Boutaris, Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008
254. Lambropoulos, I., and Roussis, I. G., Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by caffeic acid and gallic acid. *Food Research International*, 40(1), pp.176-181, 2007
255. Landaud, S., Helinck, S., & Bonnarme, P., Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 1191-1205, 2008
256. Laurie Anna, Robert A. Neimeyer, *African Americans in Bereavement: Grief as a Function of Ethnicity*, 2008
257. Leao C. and N. Van Uden, Effects of ethanol and others alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *App. Microbiol. Biotechnol.* 22:359-363, 1985
258. Lee F. A., *Alcoholic Fermentation*, Chapter 14, *Basic Food Chemistry*, The AVI Publishing Company, Inc., 1983
259. Li Hua, Anque Guo, Hua Wang, Review: Mechanisms of oxidative browning of wine, *Food Chemistry*, Volume 108, Issue 1, Pages 1-13, Elsevier, 2008
260. Li, H., Du, G., Li, H.-L., Wang, H.-L., Yan, G.-L., Zhan, J.-C., Huang, W.-D. Physiological response of different wine yeasts to hyperosmotic stress. *Am. J. Enol. Vitic.*, 61, 529–535, 2010
261. Liang Na-Na, Lin Mu, Qiu-Hong Pan, Jun Wang, Malcolm J. Reeves, and Chang-Qing Duan, Fei He, Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression, *Molecules*. 17(2): 1571–1601, 2012
262. Liang-Liang Sun, Hou Gang-Ling, Ge Bin, Xing Kai-Xin, A study on wine sensory evaluation by the statistical analysis method. *Czech J. Food Sci.*, 38: 1-10, 2020
263. Liguori Loredana, Marisa Di Matteo Production of Low-Alcohol Beverages: Current Status and Perspectives in Food Processing for Increased Quality and Consumption, 2018

264. Lin M.M., Boss P.K., Walker M.E., Sumby K.M., Grbin P.R., Jiranek V. Evaluation of indigenous non-Saccharomyces yeasts isolated from a South Australian vineyard for their potential as wine starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 312:108373, 2020
265. Liu J., Arneborg N., Toldam-Andersen T.B., Petersen M.A., Bredćje W.L. Effect of sequential fermentations and grape cultivars on volatile compounds and sensory profiles of Danish wines. *J. Sci. Food Agric.* 97:3594–3602, 2017
266. Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M.J., González, C., Calderón, F., Suárez-Lepe, J.A. Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspora delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. *Food Res. Int.*, 76, 325–333, 2015
267. Loira, I., Morata, A., Palomero, F., González, C., Suárez-Lepe, J.A. *Schizosaccharomyces pombe*: A promising biotechnology for modulating wine composition. *Fermentation*, 4, 70, 2018
268. Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., Suárez-Lepe, J. Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT-Food Sci. Technol.* 59, 915–922, 2014
269. Longo, R., Blackman, J.W., Antalick, G., Torley, P.J., Rogiers, S.Y., Schmidtke, L.M. A comparative study of partial dealcoholisation versus early harvest: Effects on wine volatile and sensory profiles. *Food Chem.* 261, 21–29, 2018
270. Longo, R., Blackman, J.W., Antalick, G., Torley, P.J., Rogiers, S.Y., Schmidtke, L.M. Volatile and sensory profiling of Shiraz wine in response to alcohol management: Comparison of harvest timing versus technological approaches. *Food Res. Int.*, 109, 561–571, 2018
271. Longo, R., Blackman, J.W., Torley, P.J., Rogiers, S.Y., Schmidtke, L.M. Changes in volatile composition and sensory attributes of wines during alcohol content reduction. *J. Sci. Food Agric.*, 97, 8–16, 2017
272. Lu Wang, Barbara Belisle, Mansour Bassiri, Behzad Khosrovi et al., “Chemical Characterization and Biological Properties of NVC-422, a Novel, Stable N-Chlorotaurine Analog”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(6):2688-92, PubMed, 2011
273. Lytra Georgia, Sophie Tempere Gilles de Revel, and Jean-Christophe Barbe, Impact of Perceptive Interactions on Red Wine Fruity Aroma, *J. Agric. Food Chem.* 60, 50, 12260–12269, 2012
274. Lytra Georgia, Sophie Tempere, Gilles de Revel, and Jean-Christophe Barbe, Distribution and Organoleptic Impact of Ethyl 2-Hydroxy-4-methylpentanoate Enantiomers in Wine, *J. Agric. Food Chem.*, 60, 6, 1503–1509, 2012
275. Maarse Henk, *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, 1991
276. Machado Donato, Rita Margarete, Maria Cecília, Figueiredo Toledo & Eduardo Vicente, Sulfite content in some Brazilian wines: analytical determination and estimate of dietary exposure, *European Food Research and Technology* volume 229, pages383–389, 2009
277. Madigan M.T., Martinko J. M., Dunlap PV., and ClarkDP, “*Brock biology of microorganisms*”, 12th edition, Prentice Hall., 2008
278. Magyar, I., Tóth, T. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.*, 28, 94–100, 2011
279. Maicas Sergi, Jose Mateo, Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: A review, *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(3):322-35, PubMed, 2005
280. Maiherbe S., F.F. Bauer and M. Du Toit, *Understanding Problem Fermentations - A Review*, Institute for Wine Biotechnology, 2007
281. Mantzourani Ioanna, Antonia Terpou, Argyro Bekatorou, Athanasios Mallouchos, Athanasios Alexopoulos, Athanasios Kimbaris, Eugenia Bezirtzoglou, Athanasios A.Koutinas, Stavros Plessas, Functional pomegranate beverage production by fermentation with a novel synbiotic *L. paracasei* biocatalyst, *Food Chemistry*, Volume 308, 2020
282. Marais J., *A review: Terpenes in the aroma of grapes and wines*, 1983
283. Marais J., *Terpenes in The Aroma of Grapes and Wines: A Review*, Viticultural Snd Oenological Research Institute, Republic of South Africa, 1983
284. Marangon M., Van Sluyter S.C., Robinson E.M., Muhlack R.A., Holt H.E., Haynes P.A., Godden P.W., Smith P.A., Waters E.J. Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization. *Food Chem.* 135:1157–1165, 2012
285. Marnie Old, *Wine: A Tasting Course (ένα ταξίδι γευστηγνώσιας)*, Εκδόσεις Ψυχογιός, 2015
286. Martin Bruno, Patrick X. Etiévant Jean Luc Le Quéré, and Pascal Schlich, More Clues about Sensory Impact of Sotolon in Some Flor Sherry Wines, *J. Agrie. Food Cham*, 40, 475-478 475, 1992
287. Martin Valentina, Maria Jose Valera , Karina Medina, Eduardo Boido and Francisco Carrau, Oenological Impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera*, Yeast Genus on Wines—A Review, *Fermentation*, 2018

288. Masuda B. M., A. C. Noble, R. A. Arnold, S. D. Pecore, J. O. Schmidt, P. M. Stern, Progress Towards a Standardized System of Wine Aroma Terminology, *Am J Enol Vitic.* 35: 107-109, 1984

289. Matthews A. Mark, Michael M. Anderson, Fruit Ripening in *Vitis vinifera* L.: Responses to Seasonal Water Deficits, *Am J Enol Vitic.* 39: 313-320, 1988

290. Maturano, Y.P., Mestre, M.V., Kuchen, B., Toro, M.E., Mercado, L.A., Vazquez, F., Combina, M. Optimization of fermentation-relevant factors: A strategy to reduce ethanol in red wine by sequential culture of native yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, 289, 40–48, 2019

291. Mauricio J. C., C.Millan and J.M. Ortega, Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*, University of Cordoba (Spain), *world Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1998

292. Maziar, Excavations at Köhné Pāsgāh Tepesi, the Araxes Valley, Northwest Iran, Sepideh, Vol. 47, Pages: 165-193, 2010

293. Mbuyane, L.L., de Kock, M., Bauer, F.F., Divol, B. *Torulaspora delbrueckii* produces high levels of c5 and c6 polyols during wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 18, 2018.

294. McMaster C.R., Fairn G. D., Emerging roles of the oxysterol-binding protein family in metabolism, transport, and signaling, *Cellular and Molecular Life Sciences* volume 65, pages228–236, 2008

295. Mecca, D., Benito, S., Beisert, B., Brezina, S., Fritsch, S., Semmler, H., Rauhut, D. Influence of nutrient supplementation on *Torulaspora delbrueckii* wine fermentation aroma. *Fermentation*, 6, 35, 2020

296. Meilgaard B., Morten C., Thomas Carr, Gail Vance Civille, *Sensory Evaluation Techniques*, Fourth Edition, 2006

297. Meilgaard M., G. V. Civille and B. T. Carr, “*Sensory Evaluation Techniques*,” 4th Edition, CRC Press, Boca Raton, 2007.

298. Mendez-Costabel M.P., Kerry Leigh Wilkinson, Susan E P Bastian, , N.K. Dokoozlian, Effect of increased irrigation and additional nitrogen fertilisation on the concentration of green aroma compounds in *Vitis vinifera* L. Merlot fruit and wine, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20(1), 2014

299. Mendonca-Hagler L.C., Hagler A.N., Kurtzman C.P. Phylogeny of *Metschnikowia* species estimated from partial rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:368–373, 1993

300. Mendoza L.M., Vega-Lopez G.A., Fernandez de Ullivarri M., Raya R.R. Population and oenological characteristics of non-*Saccharomyces* yeasts associated with grapes of Northwestern Argentina. *Arch Microbiol.* 201:235–244, 2019

301. Mestre Furlani María Victoria, Yolanda Paola Maturano, Mariana Combina, Laura Analía Mercado, María Eugenia Toro, Fabio Vazquez, Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content, *FEMS Yeast Research*, Volume 17, Issue 2, 2017

302. Mestres Montse, M P Martí, Olga Busto, J Guasch, Analysis of low-volatility organic sulphur compounds microextraction and gas chromatography, *Journal of Chromatography A* 881(1-2):583-90, PubMed, 2000

303. Metsoviti M., Spiros Paramithiotis, Paramithiotis Eleftherios, H Drosinos, Seraphim Papanikolaou, Screening of bacterial strains capable of consuming biodiesel-derived raw glycerol, *Engineering in Life Sciences* 12:57, 2012

304. Metsoviti Maria , Spiros Paramithiotis, Eleftherios H Drosinos, Panagiotis N Skandamis, Maria Galiotou-Panayotou, Seraphim Papanikolaou, Biotechnological valorization of low-cost sugar-based media for bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131, *N Biotechnol.* (6):600-9, 2011

305. Meyer A. Sally, Ruth E. Brown, And Maudy T. Smith, Species Status of *Hanseniaspora Guilliermondii* Pijper, *International Journal of Systematic Bacteriology* Vol 27, No2, P. 162-164, 1977

306. Michnick Sumio, Jean-Louis Roustan, Fabienne Remize, Pierre Barre, Sylvie Dequin, Modulation of Glycerol and Ethanol Yields During Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressed or Disrupted for GPD1 Encoding Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase, 1998

307. Mihne, M., Gonz lez-SanJos , M. L., Ortega-Heras, M., & Prez-Magariño, S., A comparative study of the volatile content of Mencía wines obtained using different pre-fermentative maceration techniques. *Food Science and Technology*, 64, 32-41, 2015

308. Miljic, U., Puškaš, V., Vucurovic, V., Muzalevski, A. Fermentation characteristics and aromatic profile of plum wines produced with indigenous microbiota and pure cultures of selected yeast. *J. Food Sci.*, 82, 1443–1450., 2017

309. Miller G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Vol. 31, No. 3, 1959

310. Minnaar P.P., du Plessis H.W., Jolly N.P., van der Rijst M., du Toit M. Non-Saccharomyces yeast and lactic acid bacteria in Co-inoculated fermentations with two *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: A strategy to improve the phenolic content of Syrah wine. *Food Chem. X.* 4:100070, 2019
311. Minnaar, P., Jolly, N., Paulsen, V., Du Plessis, H., Van Der Rijst, M. *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in sequential fermentations: Effect on phenolic acids of fermented kei-apple (*Dovyalis caffra* L.) juice. *Int. J. Food Microbiol.*, 257, 232–237, 2017
312. Moenne Isabel, Pedro Saa, Felipe Laurie, Eduardo Agosin, Oxygen Incorporation and Dissolution During Industrial-Scale Red Wine Fermentations, *Food and Bioprocess Technology* 7(9), Project: Bioprocess and biosystems modelling, 2014
313. Mohammadi Aniseh, Razavi, Seyyed Hadi, Mousavi, Seyyed Mohammad, Rezaei, Karamatollah, «A comparison between sugar consumption and ethanol production in wort by immobilized *Saccharomyces Cerevisiae*, *Saccharomyces Ludwigii* and *Saccharomyces Rouxii* on Brewer's Spent Grain», *Industrial Microbiology, J. Microbiol.* vol.42 no.2 São Paulo, 2011
314. Mohd Azhar, Siti Hajar, Rahmath Abdullaa, Siti Azmah Jambo, Hartinie Marbawi, Jualang Azlan Gansau, Ainol Azifa Mohd Faik, Kenneth Francis Rodrigues, Yeasts in sustainable bioethanol production: A review, Volume 10, Pages 52-61. Elsevier, 2017
315. Montville T.J., Matthews K.R., “Μικροβιολογία Τροφίμων”, 2010
316. Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., Gonzalez, R. The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3993–4003, 2015
317. Morata Antonio, Iris Loira, Carlos Escott, Juan Manuel del Fresno, María Antonia Bañuelos and José Antonio Suárez-Lepe, Review Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in Wine Biotechnology, fermentation, MDPI, 2019
318. Morata, A., Escott, C., Bañuelos, M.A., Loira, I., del Fresno, J.M., González, C., Suárez-Lepe, J.A. Contribution of non-Saccharomyces yeasts to wine freshness. A review. *Biomolecules*, 10, 34, 2020
319. Morata, A., Escott, C., Loira, I., Del Fresno, J.M., González, C., Suárez-Lepe, J.A. Influence of *Saccharomyces* and non-Saccharomyces yeasts in the formation of pyranoanthocyanins and polymeric pigments during red wine making. *Molecules*, 24, 4490, 2019
320. Moreira E. Nathalie, Cristina Pina, F. Mendes, Isabel Vasconcelos, Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications, *Food Control*, vol22(Issue5):pages 662-667, 2011
321. Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., & Vasconcelos, I., Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 231-238, 2008
322. Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., & Vasconcelos, I., Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 285-294, 2005
323. Moreno-Arribas V. and Carmen Polo M., Volatile Compounds and Wine Aging. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*. 1st ed., Springer Science+Business Media: pp. 295-309, 2009
324. Murray E. Keith, Frank B. Whitfield, The occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables, 1975
325. Mussatto I. Solange, Ercília M.S.Machado, Lívia M.Carneiro, José A.Teixeira, *Applied Energy*, Volume 92, Pages 763-768, Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates, 2012
326. Naicker Mahendran Chinnamara, I. Seul Jo & Hana I, Identification of chaperones in freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Microbiology* volume 50, pages882–887, 2012
327. Najafpour Ghasem, Babol Noshirvani, Dissolved Oxygen Measurement And Mixing, University Of Technology, Chapter2, Elsevier, *Biochemical Engineering And Biotechnology*, 2007
328. Najafpour Ghasem, Habibollah Younesi, Ku Syahidah Ku Ismail, Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 92(3):251-60, 2004
329. Navarre C, Degand H, Bennett KL, Crawford JS, Mørtz E, Boutry M, Subproteomics: identification of plasma membrane proteins from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteomics* 2(12):1706-14, 2002
330. Navarro J.M., Durand G, Alcohol fermentation: effect of temperature on ethanol accumulation within yeast cells, *Annales de Microbiologie*, 129B(2):215-224, 1978
331. Naves Y.R. and G. Mazuyer, *Natural Perfume Materials: A Study of Concretes, Resinoids, Floral Oils and Pomades*, 1947
332. Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M., *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2008
333. Neuberg, *The Biochemistry of Yeast*, *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 15:435-472 C, 1946

334. Nevares I., Fernández de Simón, E., Cadahía, M., del Álamo, Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them, Volume 660, Issues 1–2, 15, Pages 211–220, *Analytica Chimica Acta B*, 2010
335. Nevares I., M. del Álamo, Measurement of dissolved oxygen during red wines tank aging with chips and micro-oxygenation, *Analytica Chimica Acta*, Volume 621, Issue 1, Pages 68–78, 2008
336. Ngqumba Z., Ntushelo N., Jolly N.P., Ximba B.J., Minnaar P.P. Effect of *Torulaspora delbrueckii* Yeast Treatment on Flavanols and Phenolic Acids of Chenin blanc Wines. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 38:192–200, 2017
337. Nielsen Jan Clair, Marianne Richelieu, Control of Flavor Development in Wine during and after Malolactic Fermentation by *Oenococcus oeni*, 1999
338. Nieuwoudt, H., Prior, B., Pretorius, L., Bauer, F. Glycerol in South African table wines: An assessment of its relationship to wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 23, 22–30., 2002
339. Nissen, P., & Arneborg, N., Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 5, 65–71, 2003
340. Nissen, P., Nielsen, D., & Arneborg, N., Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast*, 20, 331–341, 2003
341. Nissen, T.L., Hamann, C.W., Kielland-Brandt, M.C., Nielsen, J., Villadsen, J. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast*, 16, 463–474, 2000
342. Nurgel, C., Pickering, G. Modeling of sweet, bitter and irritant sensations and their interactions elicited by model ice wines. *J. Sens. Stud.*, 21, 505–519, 2006
343. Nykänen L., H. Suomalainen, *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages*, 1983
344. Occhipinti Ambrogi A., Forni G., Silvestri C., Argyrou, M., Jordana E., Mavric B., Pinedo, S., Simboura N., Gorazd Urbanic, G., The Mediterranean intercalibration exercise on soft-bottom benthic invertebrates with special emphasis on the Italian situation. *Marine Ecology*, 30(4), 495–504, 2009
345. Ohloff G., *Chemistry of odor stimuli*, *Experientia* volume 42, pages 271–279, 1986
346. OIV. Oiv International Standard for the Labelling of Wines 2015, OIV: Paris, France, 2015.
347. Oliveira Carla Maria, António César Silva Ferreira, Victor De Freitas, Artur M.S. Silva, Review: Oxidation mechanisms occurring in wines, Elsevier, *Food Research International*, Volume 44, Issue 5, Pages 1115–1126, 2011
348. Oro L., Ciani M., Comitini F. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 116:1209–1217, 2014
349. Oro L., Feliziani E., Ciani M., Romanazzi G., Comitini F. Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *Int. J. Food Microbiol.* 265:18–22, 2018
350. Ortega, C., López, R., Cacho, J., & Ferreira, V., Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923, 205–14, 2001
351. Oucault, A.P. (Ed.), *Centrifugal partition chromatography*. *Chromatographic Science Series*, vol. 68, Marcel Dekker, N.Y., 1994
352. Ough S. Cornelius and John Almy, *Urea Analysis for Wines*, 1989
353. Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol.*, 7, 411, 2016
354. Palomero, F., Morata, A., Benito, S., Calderón, F., Suárez-Lepe, J. New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chem.*, 112, 432–441, 2009
355. Pamment N.B., Overall kinetics and mathematical modeling of ethanol inhibition in yeasts, pp 1–75, 1989
356. Parapouli Maria, Leonidas Fragkos-Livanios, Martina Samiotaki, Anna-Irini Koukkou, Angelos Perisynakis, Efsthios Hatziloukas, George Panayotou, Constantin Drainas, Comparative proteomic analysis of alcoholic fermentation employing a new environmental strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Process Biochemistry*, Volume 45, Issue 7, Pages 1094–1102, 2010
357. Pérez-Coello M.S., A.I. Briones Pérez, J.F. Ubeda Iranzo, P.J. Martín Álvarez, Elsevier, Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region, *Food Microbiology*, Volume 16, Issue 6, , Pages 563–573, 1999
358. Pérez-Magariño Silvia, Ma Luisa, González-San José, Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade, *Food Chemistry*, Volume 96, Issue 2, Pages 197–208, 2006
359. Pérez-Magariño Silvia, Marta Bueno-Herrera, Pedro López de la Cuesta, Miriam González-Lázaro, Leticia Martínez-Lapuente, Zenaida Guadalupe & Belén Ayestarán, Volatile composition, foam characteristics and sensory properties of

Tempranillo red sparkling wines elaborated using different techniques to obtain the base wines, *European Food Research and Technology* volume 245, pages1047–1059, 2019

360. Pérez-Navado, F., Albergaria, H., Hogg, T., & Gírio, F., Cellular death of two non-Saccharomyces wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 336-345, 2006
361. Pérez-Torrado, R., Barrio, E., Querol, A. Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 58, 1780–1790, 2018
362. Petering J.E., M R Symons, P Langridge, and P A Henschke, Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain, *Appl Environ Microbiol.* 57(11): 3232–3236, 1991
363. Petruzzi, L., Capozzi, V., Berbegal, C., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Spano, G., Sinigaglia, M. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. *Front. Microbiol.*, 8, 995, 2017
364. Pfeiffer Thomas and Annabel Morley, *An evolutionary perspective on the Crabtree effect*, 2014
365. Phaff H. J., Miller M. W., Mrak, E. M., *The life of yeasts*, Cambridge, Mass., Harvard Univ. Press, 1966
366. Pickering G.J., A. Moyes, M.R. Bajec, N. Decourville, *Thermal Taster Status Associates With Oral Sensations Elicited By Wine*, 2010
367. Pickering G.J., S. J. Wheeler , A.S. Black, Vineyard floor management improves wine quality in highly vigorous *Vitis vinifera* 'Cabernet Sauvignon' in New Zealand, *Pages 317-32*, 2005
368. Pickering Gary, Canan Nurgel, *Contribution of Glycerol, Ethanol And Sugar To The Perception Of Viscosity And Density Elicited By Model White Wines*, 2005
369. Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., & Hogg, T., Ethanol tolerance of five non- *Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*- influence of different culture conditions. *Food Microbiology*, 21, 439-447, 2004
370. Pineau Bénédicte, Jean-Christophe Barbe, Cornelis Van Leeuwen, and Denis Dubourdieu, Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific “Red-” and “Black-berry” Aromas in Red Wines, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 9, 3702–3708, 2009
371. Piombo E., Sela N., Wisniewski M., Hoffmann M., Gullino M.L., Allard M.W., Levin E., Spadaro D., Droby S. Genome sequence, assembly and characterization of two *Metschnikowia fructicola* strains used as biocontrol agents of postharvest diseases. *Front. Microbiol.* 9:593, 2018
372. Piškur Jure, Elżbieta Rozpędowska, Silvia Polakova, Annamaria Merico, Concetta Compagno, How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, Volume 22, Issue 4, Pages 183-186, 2006
373. Piškur Jure, Sofia Dashko, Nerve Zhou, Concetta Compagno, Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res.* 14(6): 826–832, 2014
374. Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. C., & Ortega, J. M., Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, 20, 217-224, 2003
375. Pollack RA, “*Laboratory exercises in Microbiology*”, 3rd edition, John Wiley & Sons, 2009
376. Porter, T.J., Divol, B., Setati, M.E. *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Res. Int.*, 119, 378–389, 2019
377. Portno A. D., B.Sc, M.I.Biol, *The Influence Of Dissolved Oxygen On Fermentation In A Selected Continuous System*, (Brewing Industry Research Foundation, Nuifield, Surrey), 1967
378. Postma E., C Verduyn, W A Scheffers, J P Van Dijken, *Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of Saccharomyces cerevisiae*, 1989
379. Postma Erik, Hendrik Van Urk, W. Alexander Scheffers and Johannes P. Van Dijken, *Microbiology Volume 135, Issue 9, Glucose Transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts*, 1989
380. Pretorius, I., *Tailoring Wine Yeast for the New Millennium: Novel Approaches to the Ancient Art of Winemaking*. *Yeast*, 15, 675-629, 2000
381. Pretorius, I.S. *Conducting wine symphonics with the aid of yeast genomics*. *Beverages* 2, 36., 2016
382. Prior, B., Toh, T., Jolly, N., Baccari, C., Mortimer, R. Impact of yeast breeding for elevated glycerol production on fermentative activity and metabolite formation in Chardonnay wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21, 92–99, 2000
383. *Proc. Xlth Int. Congr. Genet*, 1, 202-203
384. Puskas Vladimir S., Uroš D. Miljić, Jovana J. Djuran, Vesna M. Vučurović, *The aptitude of commercial yeast strains for lowering the ethanol content of wine*, *Food science* 8, 1489-1498, 2020
385. Quirós Manuel, Virginia Rojas, Ramon Gonzalez, Pilar Morales, *Selection of non-Saccharomyces yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration*, *International Journal of Food Microbiology* 181C:85-91, PubMed, 2014

386. Ramírez, M., Velázquez, R. The yeast *Torulaspora delbrueckii*: An interesting but difficult-to-use tool for winemaking. *Fermentation*, 4, 94, 2018
387. Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L., Cocolin, L. *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 1987–1994, 2012
388. Rapp Adolf, Matthias Güntert, Gary R. Takeoka & Walter Jennings, HRGC and HRGC-MS applied to wine constituents of lower volatility: HRGC und HRGC-MS angewandt auf Weinaromastoffe geringerer Flüchtigkeit, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* volume 182, pages200–204, 1986
389. Rapp Adolf, Matthias Güntert, John Almy, Identification and Significance of Several Sulfur-Containing Compounds in Wine, *Am J Enol Vitic.* 36: 219-221, 1985
390. Rauhut Doris, Antonio Santos, Santiago Benito, A. Contreras, C. Curtin & C. Varela, Yeast population dynamics reveal a potential ‘collaboration’ between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014
391. Ribereau-Gayon Gilles, Marianne Frantz, Marie-Louise Jung, Robert Anton, Modulation of Mistletoe (*Viscum album* L.) Lectins Cytotoxicity by Carbohydrates and Serum Glycoproteins, 2000
392. Ribéreau-Gayon P., A. Joyeux, S. Lafon-Lafourcade, Evolution of Acetic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Wine, 1984
393. Ribéreau-Gayon P., Anthocyanins as Food Colors, chapter 8, The anthocyanins of grapes and wines, 1982
394. Ribereau-Gayon P., D. Dubourdieu, B. Doneche and A. Lonvaud, Biochemistry of Alcoholic Fermentation and Metabolic Pathways of Wine Yeasts, *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications* 2nd Edition, , pp. 79–114 John Wiley & Sons, Ltd, 2006
395. Ribereau-Gayon P., D. Dubourdieu, Y. Glories and A. Maujean, *Handbook of Enology, Volume 2, The chemistry of Wine Stabilization and Treatments: Alcohols and Other Volatile Compounds* p51–64 - Aging Red Wines in Vat and Barrel: Phenomena Occurring During Aging. In: *Handbook of Enology* pp. 388-430, 2nd Edition, Wiley edition, 2006
396. Roca-Mesa H., Sendra S., Mas A., Beltran G., Torija M.J. Nitrogen Preferences during Alcoholic Fermentation of Different Non-*Saccharomyces* Yeasts of Oenological Interest. *Microorganisms.* 8:157, 2020
397. Röcker Jessica, Sebastian Strub, Kristin Ebert & Manfred Grossmann Usage of different aerobic non-*Saccharomyces* yeasts and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines, *European Food Research and Technology* volume 242, pages2051–2070, 2016
398. Röcker, J., Strub, S., Ebert, K., Grossmann, M. Usage of different aerobic non-*Saccharomyces* yeasts and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines. *Eur. Food Res. Technol.*, 242, 2051–2070, 2016
399. Rodrigues, A.J., Raimbourg, T., Gonzalez, R., Morales, P. Environmental factors influencing the efficacy of different yeast strains for alcohol level reduction in wine by respiration. *LWT-Food Sci. Technol.*, 65, 1038–1043, 2016
400. Rodríguez M.E., Lopes C., Valles S., Giraud M.R., Caballero A. Selection and preliminary characterization of β -glycosidases producer Patagonian wild yeasts. *Enzym. Microb. Technol.* 41:812–820, 2007
401. Rodriguez M.E., Lopes C.A., Barbagelata R.J., Barda N.B., Caballero A.C. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int. J. Food Microbiol.* 138:19–25, 2010
402. Rodriguez M.E., Lopes C.A., van Broock M., Valles S., Ramon D., Caballero A.C. Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *J. Appl. Microbiol.* 96:84–95, 2004
403. Rolle, L., Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Río Segade, S., Rantsiou, K., Giacosa, S., Gambuti, A., Gerbi, V., Cocolin, L. Alcohol reduction in red wines by technological and microbiological approaches: A comparative study. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 24, 62–74, 2017
404. Romani Chr., Livio Lencioni, lessandra Biondi Bartolini, Maurizio Ciani, Iliaria Mannazzu and Paola Domizio Pilot Scale Fermentations of Sangiovese: An Overview on the Impact of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts, *Fermentation*, 2020
405. Romano P., C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso, A. Capece, Function of Yeast Species and Strains in Wine Flavor, Elsevier, *International Journal of Food Microbiology* 86 169– 180, 2003
406. Romano Patrizia, Giovanna Suzzi, Roberto Zironi, And Giuseppe Comi, Biometric Study of Acetoin Production in *Hanseniaspora Guilliermondii* and *Kloeckera Apiculata*, *Applied and Environmental Microbiology*, P. 1838-1841, Vol 59, No 6, 1993
407. Room Robin, Thomas K. Greenfield, John Holmes, Ludwig Kraus, Michael Livingston, Amy Pennay, Pages 467-473, *Supranational changes in drinking patterns: factors in explanatory models of substantial and parallel social change*, 2019
408. Rose A.H. and J. S. Harrison, *The Yeasts, Vol. 5: Yeast Technology*, London—New York, Academic Press, 2nd edition, 1993

409. Rosenfeld Eric, Bertrand Beauvoit, Bruno Blondin and Jean-Michel Salmon, Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics, American Society for Microbiology, Laboratoire de Microbiologie et de Technologie des Fermentations, Vol 69, No1, p113–121, Bordeaux, France, 2003
410. Rosenfeld Eric, Bertrand Beauvoit, Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*, 2003
411. Rosenfeld Eric, Jacques Schaeffer, Bertrand Beauvoit & Jean-Michel Salmon, Antonie van Leeuwenhoek, Isolation and properties of promitochondria from anaerobic stationary-phase yeast cells, volume 85, pages9–21, 2004
412. Ross F. Carolyn, Catherine Hinken, Karen Weller, Efficacy Of Palate Cleansers For Reduction Of Astringency Carryover During Repeated Ingestions Of Red Wine, 2007
413. Rossouw, D.; Bauer, F.F. Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity, *Food Microbiol.*, 55, 32–46, 2016
414. Roudil L., Russo P., Berbegal C., Albertin W., Spano G., Capozzi V. Non-*Saccharomyces* commercial starter cultures: Scientific trends, recent patents and innovation in the wine sector. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 10:1–13, 2019
415. Roujou de Boubée Dominique, A.M. Cumsille, M. Pons, Denis Dubourdieu, Location of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet Sauvignon grape bunches and its extractability during vinification, *American Journal of Enology and Viticulture* 53(1):1-5, 2002
416. Roujou Dominique, Dominique Roujou de Boubée, Research on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in grapes and wines, 2003
417. Roustan, J., Sablayrolles, J. Impact of the addition of electron acceptors on the by-products of alcoholic fermentation. *Enzym. Microb. Technol.*, 31, 142–152, 2002
418. Rozpędowska Elżbieta, Linda Hellborg, Olena P. Ishchuk, Furkan Orhan, Silvia Galafassi, Annamaria Merico, Megan Woolfit, Concetta Compagno, and Jure Piškur, Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts, *Nat Commun*, 2011
419. Ruiz J., Kiene F., Belda I., Fracassetti D., Marquina D., Navascues E., Calderon F., Benito A., Rauhut D., Santos A., et al. Effects on varietal aromas during wine making: A review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103:7425–7450, 2019
420. Ruiz Javier, Ignacio Belda, Beata Beisert, Eva Navascués, Domingo Marquina, Fernando Calderón, Doris Rauhut, Antonio Santos & Santiago Benito, Applied Microbiology and Biotechnology, Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines, *Applied Microbial And Cell Physiology*, 102:8501–8509, 2018
421. Rupasinghe Vasantha Vazhappilly Cijo George, Graham Dellaire, H.P., Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability, Elsevier, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Volume 45, Pages 1-14, 2017
422. Ryona Imelda, Bruce S. Pan, Diego S. Intrigliolo, Alan N. Lakso, and Gavin L. Sacks, Effects of Cluster Light Exposure on 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine Accumulation and Degradation Patterns in Red Wine Grapes (*Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Franc), *J. Agric. Food Chem.*, 56, 22, 10838–10846, 2008
423. Saa A. Pedro, M. Isabel Moenne, J. Ricardo Pérez-Correa & Eduardo Agosin, Modeling oxygen dissolution and biological uptake during pulse oxygen additions in oenological fermentations, *Bioprocess and Biosystems Engineering* volume 35, pages1167–1178, 2012
424. Saa Pedro, V. Felipe Laurie, J. Ricardo Pérez-Correa M. Isabel Moenne, & Eduardo Agosin, Oxygen Incorporation and Dissolution During Industrial-Scale Red Wine Fermentations, *Food and Bioprocess Technology* volume 7, pages2627–2636, 2014
425. Sablayrolles J. –M, G. Insa V. Douza, Alcoholic fermentation under oenological conditions, Use of a combination of data analysis and neural networks to predict sluggish and stuck fermentations, *Bioprocess Engineering* volume 13, pages171–176, 1995
426. Sablayrolles J.-M Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect, *Food Research International*, Volume 42, Issue 4, Pages 418-424, 2009
427. Sablayrolles Jean-Marie, Claude Dubois, Claire Manginot, Jean-Louis Roustan, Pierre Barre, Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations, Sablayrolles, Elsevier, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Volume 82, Issue 4, Pages 377-381, 1996
428. Sabon Isabelle, Gilles De Revel, Yorgos Kotseridis, Alain Bertrand, Determination of Volatile Compounds in Grenache Wines in Relation with Different Terroirs in the Rhone Valley, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(22):6341-5, PubMed, 2002
429. Sacchi KL, Linda F Bisson, DO Adams, A Review of the Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines, *American Journal of Enology and Viticulture* 56(3):197-206, 2015

430. Sadoudi M., Tourdot-Marechal R., Rousseaux S., Steyer D., Gallardo-Chacon J.J., Ballester J., Vichi S., Guerin-Schneider R., Caixach J., Alexandre H. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiol.* 32:243–253, 2012
431. Sadoudi M., Rousseaux S., David V., Herve Alexandre, Tourdot-Marechal R, Metschnikowia pulcherrima influences the expression of genes involved in PDH bypass and glyceripyruvic fermentation in Saccharomyces cerevisiae, *Front. Microbiol.*, 2017
432. Saha, B., Longo, R., Torley, P., Saliba, A., Schmidtke, L. SPME method optimized by Box-Behnken design for impact odorants in reduced alcohol wines. *Foods*, 7, 127, 2018
433. Sala M.J, M.Ruiz de Adana, L.M.López, *Applied Thermal Engineering*, Volume 25, Issues 5–6, Pages 709-718, A Fickian model for calculating wine losses from oak casks depending on conditions in ageing facilities, 2005
434. Saliba, A., Ovington, L., Moran, C. Consumer demand for low-alcohol wine in an Australian sample. *Int. J. Wine Res.*, 5, 1–8, 2013
435. Salmon C. Wesley, *Four Decades of Scientific Explanation*, 2006
436. Samanidou Viktoria, Papadogiannis Ioannis, Uddin M. N., Bio-sample preparation and analytical methods for the determination of tricyclic antidepressants (A Review), *Bioanalysis*, vol.3 no.1, p.97-118, 2011
437. Samanidou Viktoria, Stafylis A. H., Papadogiannis Ioannis, Direct HPLC method for the routine determination of glycine betaine and its metabolite N,N-dimethylglycine in pharmacokinetic studies during homocystinuria therapy and in renal disorder monitoring, *Journal of Liquid Chromatography and related technologies*, ISSN:1082-6076, vol. 24 no. 1, p. 1 – 14, 2001
438. Santos F., M.de Castro, M. Gómez-Gesteira, I. Álvarez, Differences in coastal and oceanic SST warming rates along the Canary upwelling ecosystem from 1982 to 2010, *Elsevier*, Volume 47, Pages 1-6, 2012
439. Santos M. C., Nunes, C., Jourdes, M., Teissedre, P. L., Rodrigues, A., Amado, O., Coimbra, M., Evaluation of the potential of high pressure technology as an enological practice for red wines. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 76–83, 2016
440. Saravanakumar D., Ciavorella A., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L. Metschnikowia pulcherrima strain MACH1 outcompetes Botrytis cinerea, Alternaria alternata and Penicillium expansum in apples through iron depletion. *Postharvest Biol. Technol.* 49:121–128, 2008
441. Sarris D., L Matsakas, G Aggelis, AA Koutinas, S Papanikolaou, Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by Saccharomyces cerevisiae under non-aseptic conditions, *Industrial Crops and Products* 56, 83-93, 2014
442. Sarris D., Papanikolaou S., *Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies*, *Eng. Life Sci.* 16, 307–329, 2016
443. Sarris Dimitris, Axel André, Afroditi Chatzifragkou, Panagiota Diamantopoulou, Antonios Philippoussis, Maria Galiotou-Panayotou, Michael Komaitis, Seraphim Papanikolaou, Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by Yarrowia lipolytica strains, 2009
444. Sarry Jean-Emmanuel, Ziya Günata, Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors, *Food Chemistry*, Volume 87, Issue 4, Pages 509-521, 2004
445. Scanes, K., Hohnmann, S., Prior, B. Glycerol production by the yeast Saccharomyces cerevisiae and its relevance to wine: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 19, 17–24, 1998
446. Schlenk Fritz, *Early Research On Fermentation — A Story Of Missed Opportunities*, (Reprinted From *New Beer In An Old Bottle: Eduard Buchner And The Growth of Biochemical Knowledge*), pp. 43–50, 1997
447. Schreier Peter, Friedrich Drawert and Albrecht Junker, *Identification of Volatile Constituents from Grapes*, 1976
448. Schwab Melanie, Gerhard Krammer, Peter Winterhalter, and Peter Schreier, Glycosidically Bound Aroma Compounds in the Fruits of Prunus, Species: Apricot (P. armeniaca, L.), Peach (P. pérsica, L.), Yellow Plum, (P. domestica, L. ssp. Syriaca), *J. Agric. Food Chem.* 39, 778-781, 1991
449. Scollary G.R., C. Barril, D.N. Rutledge, A.C. Clark, Review Article: Ascorbic acid and white wine production: a review of beneficial versus detrimental impacts, 2016
450. Sefton A. Mark, I. Leigh Francis, and Patrick J. Williams, Volatile Norisoprenoid Compounds as Constituents of Oak Woods Used in Wine and Spirit Maturation, *The Australian wine research institute*, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 2045-2049, 1990
451. Sefton Martin, Forsythe Robert, Horowitz Joel L, Savin N.E., Fairness in Simple Bargaining Experiments, *Games and Economic Behavior*, Volume 6, Issue 3, Pages 347-369, 1994

452. Seguinot P., Ortiz-Julien A., Camarasa C. Impact of Nutrient Availability on the Fermentation and Production of Aroma Compounds Under Co-fermentation with *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 11:305, 2020
453. Shagufta Perveen, Introductory Chapter1: Terpenes and Terpenoids, Department of Pharmacognosy, College of Pharmacy, King Saud University, Intech Open, 2018
454. Sharma A.K., Pranay Nath Singh, S. D. Sawant, Evaluation of Fermentation Efficiency of Yeast Strains and Their Effect On Quality of Young Wines, *Indian J Microbiol*, 52(3):495–499, 2012
455. Shekhawat, K., Bauer, F.F., Setati, M.E. Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 101, 2479–2491, 2017
456. Silva Edelberto, Dolly Montoya, Sandra Spitia, Wolfgang H.Schwarz, Isolation of mesophilic solvent-producing clostridia from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis, *Journal of Biotechnology*, Volume 79, Issue 2, Pages 117-126, 2000
457. Silva M. Luz, F. Xavier Malcata, Relationships Between Storage Conditions of Grape Pomace and Volatile Composition of Spirits Obtained Therefrom, *Am J Enol Vitic.* 49: 56-64, 1998
458. Silva, S., Ramón-Portugal, F., Andrade, P., Abreu, S., de Fatima Texeira, M., Strehaiano, P. Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54, 50–55, 2003
459. Simpson, R.F., Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage and aging. *Vitis*, , 17, 274-287, 1978
460. Singleton L.Vernon, Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications, *Am J Enol Vitic.* January 1987 38: 69-77, 1987
461. Sipiczki M. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl. Env. Microbiol.* 72:6716–6724, 2006
462. Sipiczki M., Horvath E., Pfliegler W.P. Birth-and-Death Evolution and Reticulation of ITS Segments of *Metschnikowia andauensis* and *Metschnikowia fructicola* rDNA Repeats. *Front. Microbiol.* 9:1193, 2018
463. Sipiczki M., Pfliegler W.P., Holb I.J. *Metschnikowia* Species Share a Pool of Diverse rRNA Genes Differing in Regions That Determine Hairpin-Loop Structures and Evolve by Reticulation. *PLoS ONE.* 8:e67384, 2013
464. Site aua : <https://www2.aua.gr/el/info/panepistimioypoli-kai-agroktimata>
465. Smith Th. M., Species Status of *Hanseniaspora Guilliermondii* Pijper, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1977
466. Snyman C., Theron L.W., Divol B. The expression, secretion and activity of the aspartic protease MpAPr1 in *Metschnikowia pulcherrima* IWB T Y1123. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 46:1733–1743, 2019
467. Soden, A., Francis, I., Oakey, H., Henschke, P. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 6, 21–30, 2000
468. Sokolowsky Martina, Annett Rosenberger, Ulrich Fischer, Sensory impact of skin contact on white wines characterized by descriptive analysis, time–intensity analysis and temporal dominance of sensations analysis, *Food Quality and Preference*, Volume 39, elsevier, Pages 285-297, 2015
469. Spadaro D., Garibaldi A. Containment of Mycotoxins in the Food Chain by Using Decontamination and Detoxification Techniques. In: Gullino M.L., Stack J., Fletcher J., Mumford J., editors. *Practical Tools for Plant and Food Biosecurity*. Springer; Dordrecht, The Netherlands. pp. 163–177, 2017
470. Spano G., Torriani S. Editorial: Microbiota of Grapes: Positive and Negative Role on Wine Quality. *Front. Microbiol.*, 7:2036, 2016
471. Spinthiropoulou Haroula, Marinos Vassilios, The adaptation capability of the grape variety Xinomavro (*V. Vinifera* L) to the different terroirs of the “Naoussa” A.O.C. region, The third International Symposium on Sangiovese. *Terroir model for fine wine*, 2008
472. Stavrakakis, Biniari, Hatzopoulos, Identification and discrimination of eight Greek grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) by random amplified polymorphic DNA markers, *Vitis* 36 (4), 175-178, 1997
473. Stewart G.G., *Saccharomyces Cerevisiae*, Associates, Cardiff, UK, Elsevier Ltd., (Revision of The Previous Edition Article By B.C. Viljoen, G.M. Heard, volume 3, pp 1918–1925, 1999, Elsevier Ltd), Science direct, Reference Work, Second Edition, Pages 297-301, 2014
474. Strehaiano P., M. Mota & G. Goma, Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation, *Biotechnology Letters* volume 5, pages135–140, 1983
475. Symeou, E., Galiotou-Panayotou, M., Kechagia, D., and Kotseridis, Y., Analysis of major aroma compounds of Asyrtiko wines subjected to pre-fermentative skin maceration. *Journal of Agricultural Science* 145, 577-585, 2007

476. Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 1959–1967, 2014
477. Tan C., Wang L., Xue Y., Lin S., Yu G., Yang S. Purification and molecular characterization of a *Metschnikowia saccharicola* killer toxin lethal to a crab pathogenic yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 365:fny038, 2018
478. Tavernarakis N., Benos P., Brogna S., Thireos G. and Savakis C., Acquisition of a potential marker for insect transformation: isolation of a novel alcohol dehydrogenase gene from *Bactrocera oleae* by functional complementation in yeast. *Molecular Genetics and Genomics*, 263: 90-95., 2000
479. Terpou Antonia, Vassilios Ganatsios, Maria Kanellaki, Athanasios A. Koutinas, Entrapped Psychrotolerant, Yeast Cells within Pine Sawdust for Low Temperature Wine Making: Impact on Wine Quality, Food Biotechnology Group, Section of Analytical Environmental and Applied Chemistry, 2020
480. Thomas D.S. and Rose A.H., Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid compositions, *Arch. Microbiol.*, 122:49-55, 1979
481. Tiefenbacher P. John, Christi Townsend, *The Semiofoodscape of Wine: The Changing Global Landscape of Wine Culture and the Language of Making, Selling, and Drinking Wine*, Handbook of the Changing World Language Map pp 4103-4145, 2019
482. Tofalo R., G. Suzzi, *Yeasts*, Reference Module in Food Science, Encyclopedia of Food and Health, Pages 593-599, Elsevier, 2016
483. Tominaga Takatoshi, Anton Furrer, Robert Henry, Denis Dubourdieu, Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines, 1998
484. Torija M. Jesus, Nicolas Rozes, Montse Poblet, Jose Manuel Guillamon, Albert Mas, Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. Elsevier, *International Journal of Food Microbiology* vol 80 & 85, Issues 1-2, 15, Pages: 47– 53 & 127-136, 2003
485. Tristezza Marianna, Maria Tufariello, Vittorio Capozzi, Giuseppe Spano, Giovanni Mita, and Francesco Grieco, The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production, *Front Microbiol.* 7: 670, 2016
486. Tronchoni, J., Curiel, J.A., Sáenz-Navajas, M.P., Morales, P., De-La-Fuente-Blanco, A., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Gonzalez, R. Aroma profiling of an aerated fermentation of natural grape must with selected yeast strains at pilot scale. *Food Microbiol.* 2018, 70, 214–223, 2018
487. Türkel, Sezai, Korukluoğlu, Mihriban, Yavuz, Mümine (2014). "Biocontrol Activity of the Local Strain of *Metschnikowia pulcherrima* on Different Postharvest Pathogens". *Biotechnology Research International*, 1–6, 2014
488. Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V., Clinical effects of sulphite additives. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(11), 1643–1651, 2009
489. Van Leeuwen, C., Darriet, P. The impact of climate change on viticulture and wine quality. *J. Wine Econ.* 2016
490. Van Uden N., Thermodynamics of the chemostat, *Journal of basic microbiology*, Volume 11, Issue 6, Pages 541-550, 1971
491. Varakumar Sadineni, Naresh Kondapalli, Vijaya Sarathi, Reddy Obulam, Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine, *Annals of Microbiology* 62(4), 2011
492. Varela C., A. Barker, T. Tran, A. Borneman, C. Curtin, Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*, *Int. J. Food Microbiol.*, 252, 1–9, 2017
493. Varela C., Sengler F., Solomon M., Curtin C. Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* 209:57–64, 2016
494. Varela, C., Dry, P., Kutyna, D., Francis, I., Henschke, P., Curtin, C., Chambers, P. Strategies for reducing alcohol concentration in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 21, 670–679, 2015
495. Veech Joseph A, A probabilistic model for analysing species co-occurrence, *Global Ecology and Biogeography*, Volume 22, Issue 2, 2013
496. Venkatesh A., Murray A.L., Boyle A.B., Quinn Farrington L., Maher T.J., O’Gaora P., Wolfe K.H., O’Brien C.E., Butler G. Draft genome sequence of a highly heterozygous yeast strain from the *Metschnikowia pulcherrima* Subclade, UCD127. *Genome Announc.* 6:e00550-00518, 2018
497. Vezinhet F., J.M. Salmon, P. Barre, Anabolic role of l-malic acid in *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobiosis during alcoholic fermentation, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 42, Issue 2-3, July 1987, Pages 213–220, 1987
498. Vicente Javier, Javier Ruiz, Ignacio Belda, Iván Benito-Vázquez, Domingo Marquina, Fernando Calderón, Antonio Santos, and Santiago Benito, *The Genus Metschnikowia in Enology*, *Microorganisms*, 8(7): 1038, 2020

499. Vidal Stéphane, Olav Aagaard Jean-Baptiste Diéval, Measurement of the Oxygen Transmission Rate of Co-extruded Wine Bottle Closures Using a Luminescence-Based Technique, *Packaging Technology and Science* 24(7), 2011
500. Vigentini, I., Barrera Cardenas, S., Valdetara, F., Faccincani, M., Panont, C.A., Picozzi, C., Foschino, R. Use of native yeast strains for in-bottle fermentation to face the uniformity in sparkling wine production. *Front. Microbiol.*, 8, 1225, 2017
501. Vilela, A. Use of nonconventional yeasts for modulating wine acidity. *Fermentation* 5, 27, 2019
502. Vlassides Sophocles, David E. Block, Evaluation of Cell Concentration Profiles and Mixing in Unagitated Wine Fermentors, *Am J Enol Vitic.* 51: 73-80, 2000
503. Voirin Stephane, Ziya Gunata, Jean-Marc Brillouet, Raymond Baumes, and Robert Cordonnier, Purification and Some Properties of an -L-Arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on Grape Monoterpenyl Arabinofuranosylglucosides, *J. Agric. Food Chem.* 38, 772-776, 1990
504. Vontrobová Eva, Petra Kubizniaková, Jaromír Fiala, Jirí Sochor, Dagmar Matoulková, Autochthonous Yeasts as one of The Tools to Produce Wines By Original Technologies, *Kvasny Prumysl*, 65:38-454, 2019
505. Walker Graeme M., *Yeast Physiology and Biotechnology*, WILEY, 1998
506. Walker M. Graeme and Graham G. Stewart, *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages, *Beverages* 2(4), 30, 2016
507. Wang Lu, Barbara Belisle, Mansour Bassiri, Behzad Khosrovi et al, Chemical Characterization and Biological Properties of NVC-422, a Novel, Stable N-Chlorotaurine Analog, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(6):2688-92, PubMed, 2011
508. Wang Yajing, Gibson M. Alugongo, Jianxin Xiao, Zhaohai Wu, Shengli Li, & Zhijun Cao, Review: Utilization of yeast of *Saccharomyces cerevisiae* origin in artificially raised calves, *Journal of Animal Science and Biotechnology* volume 8, Article number: 34, 2017
509. Wang, C., Esteve-Zarzoso, B., Cocolin, L., Mas, A., Rantsiou, K. Viable and culturable populations of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) during Barbera must fermentation. *Food Res. Int.*, 78, 195–200, 2015
510. Warren Albertin, Mathabatha E.Setati, Cécile Miot-Sertier, Talitha T.Mostert, Benoit Colonna-Ceccaldi, Joana Coulon, Patrick Girard, Virginie Moine, Myriam Pillet, Franck Salin, Marina Bely, Benoit Divol and Isabelle Masneuf-Pomarede, *Hanseniaspora uvarum* from Winemaking Environments Show Spatial and Temporal Genetic Clustering, *Front. Microbiol.*, 2016
511. Werner M., Rauhut D., Cottureau Ph., *Yeasts And Natural Production Of Sulphites*, 2008
512. Weusthuis A. Ruud, Wiebe Visser, Jack T. Pronk, W. Alexander Scheffers and Johannes P. van Dijken, *Microbiology* Volume 140, Issue 4, Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect, 1994
513. Whiton R.S., Bruce Zoecklein, Determination of ethyl carbamate in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry, *American Journal of Enology and Viticulture* 53(1):60-63, 2002
514. Williams J. Patrick, Christopher R. Strauss, Bevan Wilson, and Ralph A. Massy-Westropp, Studies on the Hydrolysis of *Vitis vinifera* Monoterpene Precursor Compounds and Model Monoterpene β -D-Glucosides Rationalizing the Monoterpene Composition of Grapes, *J. Agric FoodChem*, 30. 1219-1223, 1219, 1982
515. Williams A.A., *Recent Developments In The Field Of Wine Flavour Research*, 1982
516. Williamson, P.O., Robichaud, J., Francis, I.L. Comparison of Chinese and Australian consumers' liking responses for red wines. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 18, 256–267, 2012
517. Winterhalter Peter, George K. Skouroumounis, Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation, *Biotechnology of Aroma Compounds* pp 73-105., 2006
518. Yan-Kui Lin, Liang Hong, Wang Bing-Tao, Wang Yao-Yu, Yan Zhi, Wang Lou-Ming, Shen Yan, Comparison of Several Determination Methods for Sulfur Dioxide In Wine, *Food Science*, 2012
519. Yu Xiao-Ping, Zhong-Xian Lu, Jian-Ming Chen, Xu-Song Zheng, Hong-Xing Xu, Jue-Feng Zhang, Lie-Zhong, Biological Control, Dynamics of Yeast-like Symbiote and Its Relationship with the Virulence of Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, to Resistant Rice Varieties, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, Volume 7, Issue 3, Pages 317-323, 2004
520. Yu-Chih Huang, Tyson L. Ringold, J. Stuart Nelson, Bernard Choi, Noninvasive blood flow imaging for real-time feedback during laser therapy of port wine stain birthmarks, 2008
521. Zambonelli Carlo, Andrea Antonelli, Lorena Castellari, and Alberta Carnacini, Yeast Influence on Volatile Composition of Wines, *J. Agric. Food Chem.* 47, 3, 1139–1144, 1999

522. Zapparoli, G., Tosi, E., Azzolini, M., Vagnoli, P., Krieger, S. Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in high-alcohol wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 30, 49–55, 2009
523. Zhang B.Q., Shen J.Y., Duan C.Q., Yan G.L. Use of Indigenous *Hanseniaspora vineae* and *Metschnikowia pulcherrima* Co-fermentation With *Saccharomyces cerevisiae* to Improve the Aroma Diversity of Vidal Blanc Icewine. *Front. Microbiol.* 9:2303, 2018
524. Zheng Rongjian and Feng Pan On-Line Tendency Control of Dissolved Oxygen Concentration during Aerobic Fed-Batch Fermentations, Applied Science, Mdpi, 2019
525. Zhu X., Navarro Y., Mas A., Torija M.J., Beltran G. A Rapid Method for Selecting Non-Saccharomyces Strains with a Low Ethanol Yield. *Microorganisms.* 0:658, 2020
526. Zhu Xiao-Lin, Kai Hu, Yi Qin, Yong-Sheng Tao, Chuan-Tao Peng, Niamat Ullah, Potential of Glycosidase from Non-Saccharomyces Isolates for Enhancement of Wine Aroma, *Food Microbiology & Safety*, 2016
527. Zironi R., P. Romano, G. Suzzi, F. Battistutta & G. Comi, Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Letters* volume 15, pages235–238, 1993
528. Zironi R., P. Romano, G. Suzzi, G. Comi, M. Maifreni, Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts, 2008
529. Zironi Roberto, Patrizia Romano, Giovanna Suzzi, Giuseppe Comi, Biometric Study of Acetoin Production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*, 1993
530. Zoecklein B.W., R. S. Whiton, Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction for Analysis of Wine Aroma Compounds, *Am J Enol Vitic.* 51: 379-382, 2000
531. Zoecklein W. Bruce, Kenneth C. Fugelsang, Barry H. Gump, Fred S. Nury, Sulfur Dioxide and Ascorbic Acid, *Wine Analysis and Production* pp 178-191, 1995
532. Zott K., Thibon C., Bely M., Lonvaud-Funel A., Dubourdieu D., Masneuf-Pomarede I. The grape must non-Saccharomyces microbial community: Impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol.* 151:210–215, 2011
533. Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lanvaud-Funel, A., & Masneuf-Pomarede, I. Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 197-203, 2008

5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

534. Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, Επιμέλεια Ανάγνου, Παπαζαφείρη, Παπαματθαϊάκης, Σταματόπουλος, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, Αθήνα 2006
535. Αγγελής Γ., Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Πατρών, Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία, Β΄ Έκδοση, Unibooks, Αθήνα 2017
536. Αναγνωστάκης Ηλίας, «Ο οίνος στην ποίηση. Τόμος 2.2: Οίνος ο βυζαντινός: Η άμπελος και ο οίνος στή βυζαντινή ποίηση και υμνογραφία», Ίδρυμα "Φανή Μπουτάρη" Αθήνα 1995
537. Αντωνάτου Ε. Δήμητρα, «Μελέτη της παραγωγής αιθανόλης κατά την αύξηση άγριων ζυμών σε σακχαρούχα υποστρώματα υπό αερόβιες συνθήκες και ο έλεγχος της δυνατότητας χρήσης των στελεχών αυτών στη βιομηχανία οίνου», Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γ.Π.Α., Αθήνα 2017
538. Αργύρης Τσακίρης, Οινολογία – από το σταφύλι στο κρασί, 4η έκδοση, Εκδόσεις Ψυχάλου, Αθήνα 2017
539. Boulton Roger, V.Singleton, Bisson, Kunkee, Οινολογία – Βασικές Αρχές και Μέθοδοι Οινοποίησης, Επιμέλεια Έκδοσης Β.Γ.Ντουρτόγλου, Καθηγητής, Τμήμα Επιστημών Οίνου Αμπέλου και ποτών, ΠΔΑ, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Broken Hill Publishers LTD, Κύπρος 2018
540. Βαφοπούλου – Μαστρογιαννάκη Α., Καθηγήτρια Α.Π.Θ., Βιοχημεία Τροφίμων, Εργαστήριο Χημείας και Βιοχημείας Τροφίμων – Τμήμα Γεωπονίας, Εκδόσεις Ζητη, Θεσσαλονίκη 2003
541. Βέκιος Γ., Κούκης Δ., Τσακίρης Α. (2001). Το Βιβλίο του Κρασιού. Εκδόσεις Ψύχαλου.
542. Βιοτεχνία και περιβάλλον, 8^ο εξάμηνο, εργαστηριακές ασκήσεις, σχολή χημικών μηχανικών ΕΜΠ, Αθήνα 2013 (φωτομετρία, κατασκευή καμπύλης αναφοράς, επίδραση του pH στην επίδραση των ενζύμων, κινητική ενζυμικής δράσης, Ποσοτικός προσδιορισμός κυτταρικής συγκέντρωσης, ενζυμική κατάλυση σε μη συμβατικά συστήματα, υπολογισμός παραμέτρων κυτταρικής ανάπτυξης σε βιοαντιδραστήρα).

543. Βουκίδης Ι., Μελέτη αρωματικών συστατικών οίνων λευκών ποικιλιών με χρήση χρωματογραφίας-ολφακτομετρίας. Μεταπτυχιακή Διατριβή, 2014
544. Γεωργακάκη Ι. Δήμητρα, Επίδραση της Υψηλής Πίεσης στα Ποιοτικά Χαρακτηριστικά Ερυθρού Οίνου, Μεταπτυχιακή εργασία, ΓΠΑ, 2019
545. Γιαβάσης Ι., Καράς Π., Εργαστηριακές Σημειώσεις, Γενικής Μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, 2020
546. Γιάννοβιτς – Αργυριάδη Ν., Δρ. Χημικός, Οργανοληπτικός έλεγχος αρωμάτων/flavor τροφίμων», Skylab-Med A.E.
547. Γκιαούρης Ευστάθιος, «Γενική Μικροβιολογία – Θρέψη και μεταβολισμός των μικροοργανισμών», διάλεξη, Ανοικτά ακαδημαϊκά μαθήματα, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Σχολή Περιβάλλοντος, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, 2013
548. Γκουλιώτη Α. Ι., Το δευτερογενές άρωμα των οίνων. Ο Οινολόγος, αρ. τεύχους 32, 1996
549. Δαμηλάκος Π. Σπ., Καθηγητής, Οινολογία – Αναλύσεις Οίνων και Ποτών – Εφηρμοσμένη εργαστηριακή έρευνα, Τόμος Δ, Β: Οινολογία 1990
550. Δήμου Φ. Ευάγγελος, Μελέτη των πτητικών συστατικών που συμμετέχουν στο άρωμα των οίνων από ερυθρές ποικιλίες Ξινόμαυρο και Μαυροτράγανο, Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη, ΓΠΑ, Αθήνα 2012
551. Δρόσου Κ, Μελέτη πτητικών συστατικών σταφυλιών και οίνων της ποικιλίας Μουχτάρο. Μεταπτυχιακή Διατριβή, 2017
552. Δρούζα Χ, Ε. Μιχαηλίδου , Κ. Τσαούση, «Ανάλυση του αρωματικού προφίλ οίνων από γηγενείς κυπριακές ποικιλίες», Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων, Λεμεσός 2013
553. Καλλια Ειρήνη «Αλκοολική Ζύμωση του μικροοργανισμού Candida Oleophila», Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γ.Π.Α., Αθήνα 2015
554. Καπουζάς Δημήτρης, Εργαστηριακές Ασκήσεις, Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας (εργαστηριακή Άσκηση 3: Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου β-γλυκοσίδαση), Λάρισα 2013
555. Καραγιάννης Στυλιανός, Διδακτορική Διατριβή, Μελέτη πτητικών θειούχων ενώσεων σε ελληνικούς λευκούς ξηρούς οίνους, ΕΚΠΑ, 1999
556. Κατινάκης Π., Καθηγητής Γ.Π.Α., Βιοχημεία, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα 2004
557. Κεχαγιά Π. Δέσποινα, Μελέτη των Οργανοληπτικών Χαρακτηριστικών των Λευκών Οίνων και Αποσταγμάτων αυτών, της Ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης, Διδακτορική Διατριβή, ΓΠΑ, Αθήνα 2019
558. Κολιάης Σ.Ι., Σιβροπούλου Α.Θ., «Μικροβιολογία», University Studio Press, 2001
559. Κοντοκάστας Σ., Οι επιδράσεις της ζύμωσης και της ωρίμανσης του κρασιού στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Πτυχιακή Διατριβή, 2010
560. Κοτζεκίδου-Ρουκά Π., «Μικροβιολογία Τροφίμων», Εκδ. Σ. Γιαχούδης & ΣΙΑ ΟΕ., 2009
561. Κοτσερίδης Γ., Αναπλ. Καθηγητής, Σ. Καλλίθρακα, Επικ. Καθ., Ν. Προξενιά, ΕΕΔΠ, Οινολογία ΙΙ, Εργαστηριακές ασκήσεις, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του ανθρώπου, Εργαστήριο Οινολογίας, Γ.Π.Α., Αθήνα, 2017
562. Κοτσερίδης Γ., Επικ.Καθ., Προξενιά Ν., ΕΕΔΠ, Οινολογία Ι, Εργαστηριακές ασκήσεις, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του ανθρώπου, Εργαστήριο Οινολογίας, Γ.Π.Α., Αθήνα, 2017
563. Κοτσερίδης, Γ., Κόστος Εγκατάστασης ενός Μικρομεσαίου Οινοποιείου. Συνέδριο. Σύγχρονες δυνατότητες στον Επιχειρηματικό Τομέα. Αθήνα Γ.Π.Α., 2013
564. Κούνδουρας Στέφανος, "Το φυσικό περιβάλλον της αμπέλου και η σημασία του για τον αμπελώνα της Δράμας", Εργαστήριο Αμπελουργίας
565. Κουράκου – Δραγώνα Σ., Σωτηρόπουλος Σ., Σκοπιμότητα καλλιέργειας εν Ελλάδι ποικιλιών οινοποιίας διαδεδομένων εις την αλλοδαπήν, Εκδ. Υπουργείο Γεωργίας. Αθήνα 1975
566. Κουράκου – Δραγώνα Σταυρούλα, Σαντορίνη ιστορικό οικοπέδιο, Εκδόσεις του Φοίνικα, Αθήνα, 2015
567. Κουράκου-Δραγώνα Σταυρούλα, Θέματα οινολογίας: Επιστήμη και τεχνολογία στον τομέα της οινοποιητικής τεχνικής, Εκδόσεις: Τροχαλία, 1998
568. Κουράκου-Δραγώνα, Σ., Σεμινάριο Γευσιγνωσίας γηγενών ποικιλιών Βορείου Ελλάδος. Θεσσαλονίκη. Τμήμα Γεωπονίας, Α.Π.Θ., 2003
569. Κουτσουμανής Κ., Αν. Καθηγητής, Σχολή Γεωπονίας, διάλεξη «Γενική Μικροβιολογία», Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων, Α.Π.Θ, Θεσσαλονίκη 2007
570. Λέλεκας Θεόδωρος, Οίνοχοος, 19-10-2010
571. Μαλλούχος Α., Μελέτη δευτερογενούς αρώματος με GC/MS οίνων που παράγονται με ακινητοποιημένα κύτταρα. Διδακτορική Διατριβή, 2003
572. Μαντούβαλου Π., Ο ρόλος των ζυμών και των βακτηρίων στην τεχνολογία της οινοπαραγωγής, Πτυχιακή εργασία, ΤΕΙ Γεωπονίας, Καλαμάτα, 2009

573. Μαρκάκη Π, Μαστρονικόλη Σ., Σημειώσεις για το εργαστήριο μικροβιολογίας, Εργαστήριο Χημείας τροφίμων, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2008
574. Μασσαούτης Ιωάννης, Αμπελογραφική Μελέτη και Αξιολόγηση Μερικών Ποικιλιών Αμπέλου Επιτραπέζιας Χρήσης, Μεταπτυχιακή Μελέτη, ΓΠΑ, Αθήνα 2005
575. Μπακέας Ευάγγελος, Ευσταθίου Κων/νος. Εισαγωγή στους Αναλυτικούς Διαχωρισμούς, “Ενόργανη Ανάλυση Γ”, Αθήνα 2008
576. Μπακέας, Ε., Αεριοχρωματογραφία, 2013
577. Μπαλατσαούρας Γ., Μικροβιολογία Τροφίμων, Ομότιμος καθηγητής Γ.Π.Α., Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα 2006
578. Μπεγερτζής Ευάγγελος, Σύγκριση Χαρακτηριστικών των Ποικιλιών Ασύρτικο και Σαββατιανό και Προοπτικές Διάδοσής τους στους Νομούς Αττικής, Βοιωτίας και Μακεδονίας, ΤΕΙ Καλαμάτας, 2002
579. Μπιμπίλας Ανδρέας, Επίδραση διεργασιών οινοποίησης στα φαινολικά συστατικά του οίνου, Διδακτορική Διατριβή, ΕΜΠ, Αθήνα, 2017
580. Μπίνιαρη Αικ., Γηγενείς ποικιλίες του ελληνικού αμπελώνα, πανεπιστημιακές σημειώσεις, Εργαστήριο Αμπελολογίας ΓΠΑ, Αθήνα 2018
581. Μποβιάτση Ευθυμία, Προπτυχιακή διατριβή, «Αντιοξειδωτική Προστασία Οίνων Ποικιλίας Μοσχοφίλερο : Επίδραση προσθήκης διοξειδίου του άνθρακα και ασκορβικού οξέος», Επιβλέπων καθηγήτρια: Σταματίνα Καλλίθρακα, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α. , Τμήμα Ε.Τ.Δ.Α Αθήνα, 2014.
582. Μπόσκος Δ., Γαρταγάνης Δ., Χημεία τροφίμων, Εκδόσεις, 1997
583. Μπουκαρά Ευαγγελία-Ελένη, Μελέτη Παραγόντων που επιδρούν στα αρωματικά χαρακτηριστικά του Οίνου, Πτυχιακή Μελέτη, ΤΕΙ Πελοποννήσου, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Καλαμάτα 2008
584. Μπρατάκος Μ.Σ. , Ενόργανη χημική ανάλυση σε τρόφιμα και ποτά, 2003
585. Νεοφύτου Σταυρούλα, Αμπελογραφική Περιγραφή Ορισμένων Ελληνικών Ποικιλιών της Αμπέλου (Vitis Vinifera L.) Με Τον Κώδικα Αμπελογραφικής Περιγραφής του Ο.Ι.Β., 2015
586. Νεραντζής Η., Αραπίνη Ε., “Γενική Μικροβιολογία”, Εκδ. Σ. Βασιλειάδης, 2010
587. Νεράντζης Ηλίας, Ταταρίδης Παναγιώτης, Λιούνη Μαρία, Βαρελάς Βασίλειος, Μικροβιολογία Οίνου, Εκδόσεις Έμβρυο, 2015
588. Ντουρτόγλου Θάλεια, Αρωματικές ενώσεις οίνου, Σημειώσεις, ΤΕΙ Αθήνας, Τμήμα Οινολογίας και Τεχνολογίας Ποτών
589. Παληογιάννη Π. Άννα, «Μελέτη Πηκτικών Συστατικών Ελληνικών Οίνων & Αποσταγμάτων – Παραγωγή Βιολειτουργικών Οίνων με Βάση Φυτά του Γένους Sideritis», Διδακτορική Διατριβή, Γ.Π.Α., Αθήνα 2017
590. Παναγοπούλου Μαριλένα Θ., Μελέτη βελτίωσης ποιοτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών οίνου από σταφύλια της ποικιλίας Μοσχοφίλερο, ΓΠΑ, Αθήνα 2017
591. Παπαδογιάννης, Ι., Σαμανίδου Βικτωρία, Ενόργανη χημική ανάλυση, Εκδόσεις: Πήγασος, (1990 πρώτη έκδοση, 2011
592. Παπαδοπούλου Μαρία, Παραγωγή Βιοιθανόλης από σοργο, Πτυχιακή εργασία, Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, 2012
593. Παπανικολάου Σ., «Αρχές Βιοτεχνολογίας Τροφίμων – Εφαρμογές Βιομηχανικής Βιοτεχνολογίας: Στοιχεία μικροβιακού Μεταβολισμού», διάλεξη, Γ.Π.Α., 2013
594. Παπανικολάου Σ., Αρχές Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα: Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Ενότητα 3: Εφαρμογές Βιομηχανικής, Βιοτεχνολογίας: Στοιχεία, Μικροβιακού Μεταβολισμού, ΓΠΑ, 2017
595. Παπανικολάου Σ., Μικροβιολογία Οίνου – Τεχνολογία Ζυμώσεων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Τεχνολογίας Τροφίμων, ΓΠΑ, 2017
596. Παπαντωνίου Δ., “Γενική Μικροβιολογία”, Αυτοέκδοση, 2008
597. Πετροπούλου - Καραγιαννοπούλου Σμαραγδή, Γεωπόνος, Καθηγήτρια ΤΕΙ Πελοποννήσου, Αμπελουργία, Καλαμάτα 2018
598. Πίκουλας Αν. Καθηγητής Αρχαίας Ελληνικής Ιστορίας, Άμπελος και οίνος: η έρευνα στην Ελλάδα (1990-2006), Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΙΑΚΑ), εκδότης περιοδικού ΗΟΡΟΣ, 2006
599. Ρούμπος, Ι., Σύγχρονη Αμπελουργία, Βόλος, 1996
600. Ρούσος Ι., Οινολογία. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2016
601. Σγουρού Μ. Γεωργία, «Επίδραση προσθήκης ριניσμάτων ξύλου Γαλλικής και Αμερικανικής δρυός στον οργανοληπτικό χαρακτήρα οίνων ποικιλίας Αγιωργίτικο», μεταπτυχιακή διατριβή, Γ.Π.Α. Αθήνα 2014
602. Σουφλερός Ηρ. Ε., Η Παλαιώση του Οίνου. Ο Οινολόγος, αρ. τεύχους 43, 1999
603. Σουφλερός Ηρ. Ευάγγελος, Καθηγητής Οινολογίας / Γεωπόνος Α.Π.Θ., Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνολογία, Τρίτη έκδοση, Θεσσαλονίκη 2015
604. Σουφλερός Ηρ. Ευάγγελος, Οινολογία Επιστήμη και τεχνολογία, 2^{ος} τόμος, Θεσσαλονίκη, 2009.
605. Σουφλερός Ηρ. Ευάγγελος, Οινολογία, Επιστήμη και τεχνολογία, 1^{ος} τόμος, Θεσσαλονίκη, 2009.
606. Σπινθηροπούλου, Χ., Οινοποιήσιμες Ποικιλίες του Ελληνικού Αμπελώνα. Αθήνα. Εκδόσεις Σταμούλης, 2009
607. Σταυρακάκης Μανόλης Ν., Αμπελογραφία, Δεύτερη έκδοση, Εκδόσεις Τροπή, Αθήνα 2015

608. Σταύρακας Δημήτριος Ε. Αμπελογραφία, Εκδόσεις Ζήτη, 2011
609. Σύμπουρα Φ., Απομόνωση και μελέτη βιοδραστικών συστατικών αρωματικών φυτών. Μεταπτυχιακή Διατριβή, 2009
610. Ταβερναράκη, Ν., Αμπέλι και οίνος. Αμερικάνικη Γεωργική Σχολή, Θεσσαλονίκη, 2000
611. Τζιτζη Μαρία, Πάρις Κυπαρισσία, Στοιχεία οινολογίας η τέχνη του οινοχόου, β' έκδοση, 2010
612. Τσακίρης Αργύρης, Ποτογραφία, Εκδόσεις Ψύχαλου, σελ. 129-142, 2000.
613. Τσακίρης, Α. Οινογνωσία. Αθήνα. Εκδόσεις. Ηνίοχος, 1995.
614. Τσετούρας Λ. Παναγιώτης, Τα Μυστικά του Καλού Κρασιού, 2014
615. Τσέτουρας Π., Η τέχνη της αμπελοργίας. Εκδ. Σταμούλης, Αθήνα 2014
616. Τσέτουρας, Π. Λ, Οινοτεχνία : η επιστήμη του κρασιού στην πράξη, Σταμούλης, Αθήνα, 2003
617. Τσιβεριώτου Α. Μαρία, Γιάννης Β. Ζαμπούτης, Στοιχεία αμπελοργίας και οινολογίας, 2003
618. Τσουκάτου Μαρίνα, «Γευσιγνωσία στο κρασί», Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Πελοποννήσου, πτυχιακή εργασία, 2018

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΟΙ ΤΟΠΟΙ

619. <https://eclass.duth.gr/modules/document/course> - Μοριακή Μικροβιολογία – Μικροβιακός Μεταβολισμός
620. <https://www.oenology.aau.gr/?p=3541>
621. <https://twominutesangie.com/asyrtiko/>
622. https://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/metschnikowia_pulcherrima.html
623. <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/Hanseniaspora-uvarum>
624. <https://Wineserver.Ucdavis.Edu/Industry-Info/Enology/Wine-Microbiology/Yeast-Mold/Hanseniaspora-Guilliermondii>
625. <https://winesofgreece.org/el/varieties/%ce%b1%cf%83%cf%8d%cf%81%cf%84%ce%b9%ce%ba%ce%bf/>
626. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/metschnikowia>
627. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/hanseniaspora-uvarum>
628. <https://www.theguardian.com/sustainable-business/2015/feb/17/scientists-reveal-revolutionary-palm-oil-alternative-yeast>

