



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΟΙΝΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων κατά την αύξηση τους σε υποστρώματα με βάση τα σάκχαρα του γλεύκους, προς βιοτεχνολογική παραγωγή αιθανόλης

Μαρία Π. Ασημακοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2021**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων κατά την αύξηση τους σε υποστρώματα με βάση τα σάκχαρα του γλεύκους, προς βιοτεχνολογική παραγωγή αιθανόλης

“Study of the natural behavior of selected yeast strains during their growth on must sugar-based substrates, for biotechnological ethanol production”

Μαρία Π. Ασημακοπούλου

Εξεταστική επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Μαρία Μετάφα, Ερευνήτρια Γ' ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων κατά την αύξηση τους σε υποστρώματα με βάση τα σάκχαρα του γλεύκους, προς βιοτεχνολογική παραγωγή αιθανόλης

ΠΜΣ Τεχνολογία Οίνου και Αποσταγμάτων
Τμήμα Έπιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στον κλάδο της οινολογίας, όλο και περισσότερες έρευνες έχουν ως αντικείμενο την παραγωγή οίνων καλύτερης ποιότητας, όσον αφορά στη χημική τους σύσταση και τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Στην βιομηχανία, ξεκινώντας από την πρώτη ύλη και τις καλλιεργητικές επεμβάσεις, μέχρι τον παραγόμενο οίνο και τις τεχνικές ωρίμανσης και παλαίωσης, συναντούμε μια σειρά από πρακτικές, οι οποίες επηρεάζουν το τελικό προϊόν και τον χαρακτήρα του. Ένα από τα σημαντικότερα στάδια της πορείας αυτής αποτελεί η αλκοολική ζύμωση και η επιλογή της κατάλληλης ζύμης. Η ενίσχυση των χαρακτηριστικών της εκάστοτε ποικιλίας και η στροφή των τελευταίων χρόνων σε όσο το δυνατόν πιο φυσικά προϊόντα καθιστά την επιλογή της ζύμης ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για κάθε παραγωγό.

Στην παρούσα μελέτη, μελετήσαμε 4 νέα στελέχη ζυμομυκήτων κατηγορίας *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*, απομονωμένους αποκλειστικά από σταφύλια αμπελώνα Σαντορίνης και Αττικής. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα: *Torulaspora delbrueckii* OSV1EFL1, *Hanseniaspora opuntiae* OST1GW2, *Saccharomyces cerevisiae* OST2EFW10 και *Hanseniaspora uvarum* OAM2MFW1.

Στόχος της μελέτης ήταν η συμπεριφορά της ζύμωσης χρησιμοποιώντας καθαρές καλλιέργειες των συγκεκριμένων στελεχών σε συνθετικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση σακχάρου (γλυκόζης) 70 g/L. Πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε θερμοκρασία 28°C με σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180±5 rpm. Σε κάθε σημείο προσδιορίστηκαν η παραγόμενη βιομάζα, η καταναλωθείσα γλυκόζη, η παραγόμενη αιθανόλη, το ενδοκυτταρικό λίπος και οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες. Επίσης ήταν επιθυμητή η μελέτη της βιοφυσιολογικής και κινητικής συμπεριφοράς των στελεχών υπό συνθήκες αερισμού και ο χαρακτηρισμός τους ως προς το φαινόμενο Crabtree.

Στην οινοποίηση, η χρήση ελεγχόμενων μικτών καλλιεργειών επιλεγμένων στελεχών *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces* μπορεί να έχει πλεονεκτήματα

έναντι των ζυμώσεων εμβολιασμένων με καθαρές καλλιέργειες *Saccharomyces cerevisiae*, όπως συνηθίζεται μέχρι σήμερα. Απώτερος σκοπός της μελέτης είναι ο προσδιορισμός του οινολογικού δυναμικού των νέων αυτών στελεχών, ώστε στην συνέχεια να μελετηθούν σε φυσικό υπόστρωμα, καθώς αυτό μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα παραγωγή οίνων με επιθυμητά και ξεχωριστά χαρακτηριστικά.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία οίνου

Λέξεις κλειδιά: ζύμες οινοποίησης, φαινόμενο Crabtree, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora opuntiae*, οινολογικό δυναμικό

Study of the natural behavior of selected yeast strains during their growth on must sugar-based substrates, towards biotechnological production of ethanol

*MSc Wine and Spirits Technology
Department of Food Science and Human Nutrition
Laboratory of Foods Microbiology and Biotechnology*

ABSTRACT

Nowadays, wine producers and oenologists are interested in the production of wines presenting better quality concerning both the chemical composition and the organoleptic characteristics. In wine industry, from grapes, varieties and cultivation techniques to produced wine and techniques of maturation and aging, numerous techniques, practices, and parameters can significantly affect the final product and its quality. One of the most important stages of this process refers to the alcoholic fermentation and the choice of the most suitable wine yeast.

In the experiments carried out in this thesis, four newly isolated strains of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* genera were used. The strains *Torulaspora delbrueckii* OSV1EFL1, *Hanseniaspora opuntiae* OST1GW2 and *Saccharomyces cerevisiae* OST2EFW10, were isolated from grapes of Santorini's vineyards while the strain *Hanseniaspora uvarum* OAM2MFW1, was isolated from grapes of Attica's vineyards.

The aim of this study is to investigate the physiological behavior of aseptic cultures of these strains during alcoholic fermentation process. All cultures were carried out on media composed of glucose as sole source of carbon at an initial concentration of 70 g/L. All fermentations were carried out in the same conditions, with incubation temperature $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 180 ± 5 rpm. Dry biomass biosynthesis, microbial lipids and intracellular polysaccharides, were quantified during fermentation stages. Moreover, quantitative determination of consumed glucose and produced ethanol was also realized at each point of fermentations.

In wine-making, it would be useful to choose mixed cultures of selected *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* strains over pure *Saccharomyces cerevisiae* cultures. The ultimate goal of this study is to determine the oenological potential of these new strains, and subsequently, to investigate these microorganisms on natural musts, in order finally to achieve in the production of wines with special and desirable characteristics.

Scientific area: Wine microbiology

Keywords: winemaking yeasts, Crabtree effect, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora opuntiae*, oenological potentials

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου, με κατεύθυνση την Τεχνολογία Οίνου και Αποσταγμάτων.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Σεραφείμ Παπανικολάου, υπό την επίβλεψη του οποίου ολοκληρώθηκε η παρούσα μελέτη, για την ανάθεση του αξιόλογου και πρωτότυπου θέματος και την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής.

Ευχαριστώ εξίσου την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Σταματίνα Καλλίθρακα για την σημαντική παρουσία της και τις συμβουλές της για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης. Ακόμη, ευχαριστώ την ερευνήτρια Γ' του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ κ. Μαρία Μετάφα που με τιμά ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής και για τον χρόνο της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την κ. Ουρανία Καλαντζή και τις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου, για την βοήθεια και την καθοδήγηση σε όλες τις τεχνικές και τις αναλύσεις που ακολούθησα, καθώς και την κ. Νίκη Προξενιά του εργαστηρίου της Οινολογίας για την συνεργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συναδέλφους που συμπορευτήκαμε στο ταξίδι αυτό, και ιδιαίτερα την Δήμητρα Γεωργακάκη και την Μαρίζα Διαμάντη για όλες τις στιγμές, τις γνώσεις και τους προβληματισμούς που μοιραστήκαμε.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους φίλους εκείνους που έγιναν οικογένεια και με στηρίζουν με όλους τους τρόπους, ακόμη και από πολλά χιλιόμετρα μακριά.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την υποστήριξη, την αγάπη τους και την εμπιστοσύνη τους στις επιλογές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
Ευχαριστίες	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά των ζυμομυκήτων	11
1.2 Συνθήκες ανάπτυξης ζυμών	12
1.3 Αναζήτηση νέων ζυμών	13
1.4 Η αλκοολική ζύμωση	14
1.4.1 Γλυκόλυση	15
1.4.2 Αλκοολική ζύμωση	17
1.5 Μεταβολική ρύθμιση της αλκοολικής ζύμωσης	18
1.5.1 Φαινόμενο Crabtree	18
1.5.2 Φαινόμενο Pasteur	19
1.6 Δευτερογενή προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης	19
1.7 Οι πτητικές ενώσεις στον οίνο	20
1.8 <i>Non Saccharomyces</i> ζύμες	21
1.8.1 <i>Torulasporea delbrueckii</i>	22
1.8.2 <i>Hanseniaspora uvarum</i>	25
1.8.3 <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	27
1.9 Ζύμες <i>Saccharomyces</i>	29
1.10 Βιοαιθανόλη	31
1.11 ΣΚΟΠΟΣ	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	34
2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	34
2.2.1 Παρασκευή προκαλλιέργειας	34
2.2.2 Παρασκευή κύριας καλλιέργειας	34

2.3 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	35
2.3.1 Προσδιορισμός βιομάζας.....	35
2.3.2 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	36
2.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους.....	36
2.3.4 Προσδιορισμός ολικού SO ₂	37
2.3.5 Προσδιορισμός αιθανόλης, γλυκερόλης και γλυκόζης με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
3.1 Αλκοολική ζύμωση του <i>Torulaspora delbrueckii</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.....	40
3.2 Αλκοολική ζύμωση του <i>Hanseniaspora uvarum</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.....	43
3.3 Αλκοολική ζύμωση του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.....	46
3.4 Αλκοολική ζύμωση του <i>Hanseniaspora opuntiae</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	52
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάγκη για καινοτόμες ιδέες γύρω από την παραγωγή του οίνου δημιουργήθηκε τόσο από τον ευρύ ανταγωνισμό όσο και από την ζήτηση των καταναλωτών για οίνους με τις λιγότερες δυνατές επεμβάσεις. Αυτό οδήγησε και στην ανάπτυξη της μικροβιολογίας του οίνου όσον αφορά την αλκοολική ζύμωση και την βιοτεχνολογία γύρω από αυτήν. Μέχρι το πρόσφατο παρελθόν, η αλκοολική ζύμωση υπολογιζόταν ως μία αυθόρμητη διαδικασία, συνήθως από στελέχη του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Μία πρώτη κίνηση για βελτίωση της αλκοολικής ζύμωσης, δεδομένου ότι υπήρχαν και άλλα είδη ζυμών στην πρώτη ύλη, ήταν η απομόνωση των επιθυμητών στελεχών και ο στοχευμένος εμβολιασμός με καθαρές καλλιέργειες αυτών. Με αυτό τον τρόπο, αλλά και με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θειώδη ανυδρίτη, οι οινοποιοί είχαν ως στόχο την επικράτηση του *Saccharomyces cerevisiae* έναντι των υπολοίπων ζυμών και βακτηρίων και τον έλεγχο της διαδικασίας σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο βαθμό (Bisson et al., 2002; Pretorius & Bauer, 2002).

Ως μικροοργανισμοί νοούνται οι ζωντανοί οργανισμοί, συνήθως μονοκύτταροι, τους οποίους δεν μπορούμε να διακρίνουμε με γυμνό μάτι και εξετάζονται κάτω από μικροσκόπιο, καθώς το μέγεθός τους είναι μικρότερο από 0,1 mm. Στους μικροοργανισμούς ανήκουν οι ζύμες, τα βακτήρια, τα πρωτόζωα, οι ιοί και πολλοί μύκητες. Οι μικροοργανισμοί επιδρούν σημαντικά σε διάφορους τομείς όπως την γεωργία, τα φυτά, την βιομηχανία τροφίμων, ακόμα και το ανθρώπινο σώμα. Πολλές βιοχημικές πορείες βασίζονται σε αυτούς και οδήγησαν στην επιστήμη της Βιοτεχνολογίας.

Οι πρώτοι μικροοργανισμοί που παρατηρήθηκαν και περιγράφηκαν ήταν περίπου τον 17^ο αιώνα από τον Anthony van Leeuwenhoek. Η μελέτη όμως έγινε πιο συστηματική με την ανακάλυψη των σύνθετων μικροσκοπίων. Κατά το δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα, αποδείχθηκε ότι η αλκοολική ζύμωση είναι αποτέλεσμα της ζωής και της δράσης των ζυμομυκήτων (Pasteur). Η άποψη αυτή αμφισβητήθηκε από τον Buchner, καθώς υποστήριξε ότι υπεύθυνα ήταν μόνο τα περιεχόμενα στο κύτταρο ένζυμα και όχι ολόκληρο το κύτταρο. Η αλήθεια βρισκόταν κάπου στην μέση, αφού μπορεί να είναι υπεύθυνα τα ένζυμα για την αλκοολική ζύμωση, όμως η δράση τους περιορίζεται εντός των κυττάρων. Τα ένζυμα δεν εξέρχονται από τα κύτταρα ώστε να διασπασουν τα σάκχαρα, αλλά τα σάκχαρα εισέρχονται στα κύτταρα μέσω την διαπερατής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή τους.

Τα τελευταία χρόνια, πληθώρα ερευνών οδήγησαν σε σημαντική πρόοδο γύρω από την βιοχημεία και την δράση των ζυμομυκήτων στην παραγωγή του οίνου. Η αλκοολική ζύμωση αποτελεί μια πιο περίπλοκη διαδικασία από μια απλή κυριαρχία του *Saccharomyces cerevisiae* έναντι των υπόλοιπων ζυμομυκήτων, καθώς τα μεταβολικά μονοπάτια που επηρεάζουν τον χαρακτήρα του οίνου δεν αφορούν μόνο την μετατροπή των σακχάρων του γλεύκους σε αλκοόλη. Οι μελέτες αυτές λοιπόν βοήθησαν τους οινοποιούς να διαχειριστούν τον χαρακτήρα των προϊόντων τους μέσω της καλύτερης αξιοποίησης των ζυμομυκήτων, η οποία σταδιακά θα παράγει οίνους με ξεχωριστά χαρακτηριστικά (Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005).

1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά των ζυμομυκήτων

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί και το κύτταρό τους αποτελείται από τον πυρήνα, την κυτταρική μεμβράνη, το κυτόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και άλλα οργανίδια. Τα μακρομοριακά συστατικά του κυττάρου των ζυμών είναι οι πρωτεΐνες, οι γλυκοπρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες, τα πολυφωσφορικά, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα.

Στην παραγωγή του οίνου, η πολύπλοκη μικροβιακή διαδικασία που συναντάται, συνεπάγεται την διαδοχική ανάπτυξη και αλληλεπίδραση διαφόρων μικροοργανισμών. Η μικροβιακή χλωρίδα διαμορφώνεται τόσο από την πρώτη ύλη και το κλίμα στο περιβάλλον που καλλιεργείται όσο και από τις συνθήκες που επικρατούν στο οινοποιείο και τον εξοπλισμό. Οι μικροοργανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν διάφορα είδη ζυμομυκήτων, γαλακτικά και οξικά βακτήρια και διάφορους μύκητες. Πολλοί από τους μικροοργανισμούς ωστόσο είναι υπεύθυνοι και για ασθένειες στον οίνο και μη επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Ο πληθυσμός των ζυμομυκήτων, οι οποίοι είναι και υπεύθυνοι για την αλκοολική ζύμωση, αποτελείται από ένα μίγμα *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces* ζυμών, που βρίσκονται στην επιφάνεια των σταφυλιών και συνήθως στον εξοπλισμό του οινοποιείου. Μερικά από τα γένη που απαντώνται στο σταφύλι και πολλές φορές αναφέρονται ως άγριες ζύμες, είναι τα *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Kloeckera* κ.ά. Τα αρχικά στάδια της ζύμωσης κυριαρχούνται από την ανάπτυξη ζυμών *non-Saccharomyces*, όπως τα παραπάνω γένη, που όμως χαρακτηρίζονται συνήθως από χαμηλή ικανότητα ζύμωσης. Μάλιστα, μετά από τις

πρώτες μέρες της ζύμωσης, πεθαίνουν λόγω αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (Heard and Fleet, 1985, 1986). Στην συνέχεια, την αλκοολική ζύμωση αναλαμβάνουν και ολοκληρώνουν οι ζύμες του γένους *Saccharomyces*, οι οποίες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις συνθήκες της ζύμωσης.

Κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, οι συνθήκες είναι αποκλειστικά αναερόβιες, με αποτέλεσμα να απουσιάζουν αερόβιοι μικροοργανισμοί όπως οι μύκητες και κάποια βακτήρια. Οι άγριες ζύμες όμως είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί και ανταγωνίζονται τα στελέχη του ζυμομύκητα *Saccharomyces* ως προς τα θρεπτικά συστατικά του μέσου. Ωστόσο, οι συνθήκες στα επόμενα στάδια της ζύμωσης δεν είναι ευνοϊκές για τις ζύμες αυτές, με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύονται στο τέλος της ζύμωσης, παρά μόνο ένας μικρός αριθμός αυτών (Boulton et al., 1996).

1.2 Συνθήκες ανάπτυξης ζυμών

Η ανάπτυξη και αύξηση των ζυμών επηρεάζεται άμεσα από τις συνθήκες που επικρατούν στο θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύσσονται. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τις συνθήκες αυτές είναι η παρουσία ή απουσία οξυγόνου, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, η πηγή άνθρακα, η πηγή αζώτου, η θερμοκρασία, το pH, η ύπαρξη ανταγωνιστών κ.ά.

Ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία οξυγόνου, οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί, όπως είναι και οι ζύμες, μπορούν να ακολουθήσουν δύο διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια για την ενέργεια που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους. Το πρώτο είναι το μονοπάτι της αναπνοής, που ξεκινά με την γλυκόλυση και καταλήγει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, και το δεύτερο είναι το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης, που ξεκινά με την γλυκόλυση και καταλήγει στην αλκοολική ζύμωση (Sarris & Papanikolaou, 2016).

Η πηγή άνθρακα είναι αυτή που ενεργοποιεί τον μεταβολισμό των ζυμών. Η πιο σημαντική πηγή άνθρακα για τις ζύμες είναι τα σάκχαρα. Στην παραγωγή του οίνου, τα σάκχαρα φτάνουν τα 150 έως 250 g/l γλεύκους, ανάλογα με την ποικιλία, τον βαθμό ωρίμανσης, τις κλιματολογικές και εδαφικές συνθήκες, τις καλλιεργητικές τεχνικές κ.ά (Σουλής, 1992; Τσακίρης, 1988). Η πηγή αζώτου είναι εξίσου σημαντική για τους μικροοργανισμούς και παρόλο που το γλεύκος είναι πλούσιο σε άζωτο, πολλές φορές οι οινοποιοί επιλέγουν να προσθέσουν αμμωνιακά άλατα, καθώς τα ιόντα

αμμωνίου αποτελούν την πιο άμεσα αφομοιώσιμη μορφή αζώτου, ή θειαμίνη, η οποία επιδρά και στην μείωση της δέσμευσης του θειώδη ανυδρίτη.

Όσον αφορά την θερμοκρασία, είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την ανάπτυξη των ζυμών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από το εύρος στο οποίο μπορούν να αναπτυχθούν σε ψυχρόφιλες, μεσόφιλες, και θερμόφιλες (Walker, 1998). Εκτός αυτού του εύρους θερμοκρασιών, σε πολλούς μικροοργανισμούς μπορεί να επέλθει και κυτταρικός θάνατος. Οι περισσότερες ζύμες ανήκουν στην κατηγορία των μεσόφιλων με εύρος θερμοκρασιών 5-48 °C, με βέλτιστη μικροβιακή αύξηση στις θερμοκρασίες μεταξύ 30-40 °C. Βιομηχανικά στην οινοποίηση, συνήθως οι ζύμες ενεργοποιούνται σε θερμοκρασία περίπου 35-37 °C, ενώ η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται ανάλογα με το είδος του οίνου σε θερμοκρασίες 12-18 °C.

Όσον αφορά το pH, γενικότερα οι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται από διαφορετικές τιμές για την ανάπτυξή τους. Συγκεκριμένα, οι ζύμες κυμαίνονται σε βέλτιστες τιμές pH μεταξύ 4,5-6,0 με μέγιστες δυνατές τιμές 8,0-8,5 και ελάχιστες 1,5-3,5. Στην παραγωγή του οίνου, το pH του γλεύκους έχει τιμές μεταξύ 3,2-3,5 το οποίο έχει μικρή επίδραση στην δράση των ζυμομυκήτων (Adams & Moss, 2008; Jay, 2000; Νυχάς, 2014; Jackson, 2008).

1.3 Αναζήτηση νέων ζυμών

Η βιομηχανική οινοποίηση στηρίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, όμως η γνώση της ύπαρξης διαφορετικών ειδών ζυμομυκήτων στο σταφύλι οδήγησε στην σκέψη της εκμετάλλευσης των ειδών αυτών προς όφελος των οινοποιών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι διάφορα στελέχη *Hanseniaspora*, *Candida* και *Kloeckera* παίζουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, οπότε και πολλές μελέτες στόχευσαν στην αξιολόγηση των ειδών αυτών και την επιλογή τους ως καλλιέργειες εκκίνησης συνδυαστικά με τον *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius & Bauer, 2002; Romano & Suzzi, 1996).

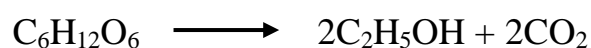
Η ανάγκη για καινοτομία έστρεψε το ενδιαφέρον προς τις ζύμες αυτές ώστε να ανακαλυφθούν στελέχη που προσδίδουν ξεχωριστά, επιθυμητά χαρακτηριστικά στον οίνο. Πέραν αυτού, με δεδομένο ότι δεν είναι όλα τα στελέχη του ζυμομύκητα *Saccharomyces* αποδεκτά στην οινοποίηση, απαιτείται περαιτέρω μελέτη και σε νέα στελέχη του είδους αυτού. Κατά συνέπεια, ένα πρώτο βήμα είναι η απομόνωση των

στελεχών που βρίσκονται σε μία συγκεκριμένη περιοχή και συγκεκριμένη ποικιλία, ώστε να ανακαλυφθούν ίσως χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αναδεικνύουν την ποικιλία αυτή στην εκάστοτε περιοχή και την τυπικότητά της (Pretorius, 2002).

Η δράση των ζυμομυκήτων στην οиноποίηση και ο μηχανισμός που επηρεάζει την παραγωγή και τον χαρακτήρα του οίνου έγκειται στον μεταβολισμό των σακχάρων αλλά και στην δράση των ενζύμων που παράγονται από τους ζυμομύκητες. Όπως περιγράφεται παρακάτω, η μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία επηρεάζει ομάδες ενώσεων όπως οργανικά οξέα, αλδεΐδες, ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, κετόνες κ. ά. Κατά της διάρκεια του μεταβολισμού των σακχάρων, παράγονται από τις ζύμες πολλά άλλα ένζυμα (όπως αναγωγάσες, αποκαρβοξυλάσες, εστεράσες) τα οποία επηρεάζουν τον οίνο με τις ιδιότητές τους. Κάθε ζυμομύκητας παρουσιάζει διαφορετικές δυνατότητες, γεγονός που απαιτεί περαιτέρω μελέτες γύρω από αυτές.

1.4 Η αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση αποτελείται από ένα βιολογικό και ένα χημικό φαινόμενο. Το πρώτο αφορά τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των ζυμών και το δεύτερο αφορά την μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη, που οφείλονται . Μέσω της αλκοολικής ζύμωσης, οι ζύμες συμβάλλουν θετικά στις ιδιότητες του αρώματος, της γεύσης και του χρώματος του οίνου. Η αλκοολική ζύμωση δεν είναι μία απλή μετατροπή της εξόζης σε 2 μόρια αιθανόλης και 2 μόρια CO₂, αλλά μια πολύπλοκη σειρά αντιδράσεων, όπου η καθεμία καταλύεται από διαφορετικά ένζυμα. Επομένως, η αλκοολική ζύμωση δεν περιγράφεται απλά από την εξίσωση:



Το πρώτο στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης είναι η γλυκόλυση, η οποία αποτελείται από το σύνολο των αντιδράσεων που μετατρέπουν τις εξόζες (γλυκόζη, φρουκτόζη) σε πυροσταφυλικό οξύ. Το δεύτερο στάδιο είναι η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη, μέσω δύο αντιδράσεων, της αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού σε ακεταλδεΐδη και στη συνέχεια, της αναγωγής της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη (Berg et al., 2013).

Από την αποικοδόμηση της οργανικής ύλης, οι ζύμες αποκτούν την ενέργεια που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους. Ένα μέρος της ενέργειας διαχέεται υπό μορφή θερμότητας και το υπόλοιπο στην σύνθεση, τη μεταφορά και την κίνηση. Η μεταφορά της ενέργειας στα βιολογικά συστήματα πραγματοποιείται από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), ένα μόριο που θεωρείται το ενεργειακό νόμισμα των κυττάρων (Berg, Tymoczko & Stryer, 2013).

1.4.1 Γλυκόλυση

Η γλυκόλυση, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί το μεταβολικό μονοπάτι μετατροπής της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ με σχηματισμό ATP, το οποίο πραγματοποιείται στο κυτόπλασμα του κυττάρου. Η πορεία της γλυκόλυσης μπορεί να θεωρηθεί ότι περιλαμβάνει τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η μετατροπή της γλυκόζης σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, το δεύτερο στάδιο είναι η διάσπαση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης σε δύο μόρια των τριών ατόμων άνθρακα (φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και φωσφορική διυδροξυακετόνη) και το τρίτο στάδιο είναι η παραγωγή των ATP, όταν τα μόρια των τριών ατόμων άνθρακα καταβολίζονται προς πυροσταφυλικό (Berg, Tymoczko & Stryer, 2013).

Εισερχόμενο στο κύτταρο, το μόριο της γλυκόζης φωσφορυλιώνεται από την εξοκινάση με κατανάλωση ενός μορίου ATP, σχηματίζοντας την 6-φωσφορική γλυκόζη. Το στάδιο αυτό είναι αξιοσημείωτο καθώς η προσθήκη της φωσφορικής ομάδας αρχίζει να αποσταθεροποιεί τη γλυκόζη και έτσι διευκολύνεται ο περαιτέρω μεταβολισμός της. Στην συνέχεια, η 6-φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική φρουκτόζη με ισομερείωση η οποία καταλύεται από την ισομεράση της φωσφογλυκόζης. Μία δεύτερη αντίδραση φωσφορυλίωσης ακολουθεί την ισομερείωση. Η 6-φωσφορική φρουκτόζη φωσφορυλιώνεται σε 1,6-δισφωσφορική φρουκτόζη με την δράση της φωσφοφρουκτοκινάσης, καταναλώνοντας ένα ακόμη μόριο ATP. Συνολικά στο πρώτο στάδιο της γλυκολυτικής οδού χρησιμοποιήθηκαν 2 μόρια ATP για τον καταβολισμό ενός μορίου γλυκόζης (Berg, Tymoczko & Stryer, 2013).

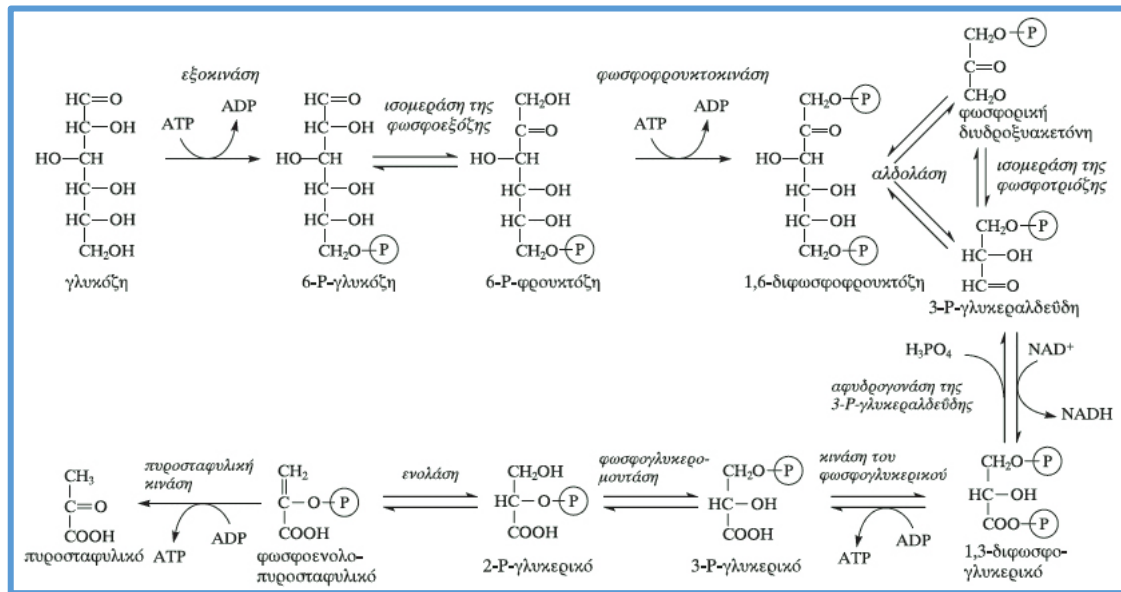
Η δεύτερη φάση συνεχίζεται με την διάσπαση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και φωσφορική διυδροξυακετόνη, η οποία καταλύεται από την αλδολάση, ενώ πραγματοποιείται και ισομερείωση μεταξύ των δύο τριοζών που καταλύεται από την ισομεράση των φωσφορικών τριοζών. Η ισομερείωση των δύο παραπάνω ενώσεων αποτελεί μια σημαντική αντίδραση, καθώς

στο γλυκολυτικό μονοπάτι συνεχίζει μόνο το μόριο της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Έτσι, αν δεν υπήρχε τρόπος μετατροπής της φωσφορικής διυδροξυακετόνης, θα χανόταν ένα μόριο τριών ατόμων άνθρακα, χρήσιμο στην παραγωγή ATP.

Το τρίτο στάδιο της γλυκολυτικής οδού ξεκινά με την μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3 διφωσφογλυκερικό, μια αντίδραση που καταλύεται από την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Στην συνέχεια, η κινάση του φωσφογλυκερικού καταλύει την μεταφορά της μίας φωσφορικής ομάδας του 1,3 διφωσφογλυκερικού στην ADP και τα προϊόντα που σχηματίζονται είναι η ATP και το 3-φωσφογλυκερικό. Εξαιτίας της δράσης της αλδολάσης στην προηγούμενη φάση της γλυκόλυσης, σχηματίζονται 2 μόρια 3-φωσφορικής γλυκόζης, τα οποία δημιουργούν και 2 μόρια ATP. Έτσι, στο σημείο αυτό αναπληρώνονται τα δύο μόρια ATP που καταναλώθηκαν στο πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης. Στα επόμενα βήματα της γλυκολυτικής οδού, το 3-φωσφογλυκερικό μετατρέπεται σε 2-φωσφογλυκερικό με μετατόπιση της θέσης της φωσφορικής ομάδας η οποία καταλύεται από την μουτάση του φωσφογλυκερικού. Έπεται μία αφυδάτωση του 2-φωσφογλυκερικού, η οποία καταλύεται από την ενολάση, σχηματίζοντας το φωσφο-ενολοπυροσταφυλικό. Η τελευταία ένωση είναι μία ασταθής μορφή που έχει την τάση να δώσει την φωσφορική ομάδα. Έτσι η ασταθής ενόλη μετατρέπεται (με μία ουσιαστικά μη αντιστρεπτή μεταβολή) σε πυροσταφυλικό, με δράση της κινάσης του πυροσταφυλικού, ενώ ταυτόχρονα σχηματίζεται ATP, από την μεταφορά της φωσφορικής ομάδας σε μόριο ADP. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, στην τελευταία αντίδραση παράγονται 2 μόρια ATP, από τον μεταβολισμό ενός μορίου γλυκόζης, τα οποία θεωρούνται «κέρδος» (Berg, Tymoczko & Stryer, 2013).

Η μετατροπή της γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού έχει σαν αποτέλεσμα την καθαρή σύνθεση ATP. Επομένως, μια πορεία μετατροπής ενέργειας που σταματά στο πυροσταφυλικό δεν θα προχωρούσε για πολύ, καθώς το ισοζύγιο οξειδοαναγωγής δεν θα παρέμενε σταθερό. Στην γλυκολυτική οδό, υπάρχει ακόμη ένα μόριο το οποίο καταναλώνεται και θα πρέπει να αναγεννηθεί. Το νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο NAD καταλύει τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής στην τρίτη φάση της γλυκόλυσης, συγκεκριμένα στην μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3 διφωσφογλυκερικό. Το NAD⁺ ανάγεται σε NADH και επειδή στο κύτταρο υπάρχουν περιορισμένες ποσότητες NAD⁺, για να προχωρήσει η γλυκόλυση θα πρέπει να αναγεννηθεί το μόριο αυτό, μέσω του μεταβολισμού του πυροσταφυλικού. Ένα από τα

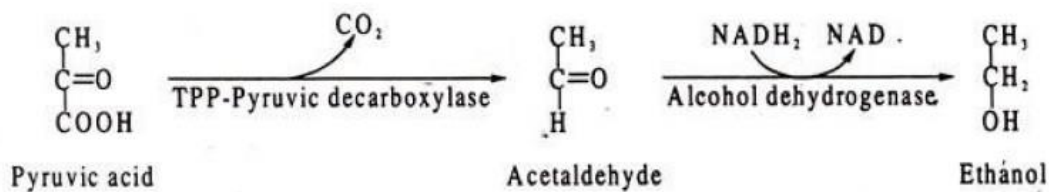
μεταβολικά μονοπάτια που μπορεί να ακολουθήσει το πυροσταφυλικό είναι οι αντιδράσεις της αλκοολικής ζύμωσης (Berg, Tymoczko & Stryer, 2013).



Εικόνα 1: Τα στάδια της γλυκόλυσης. Η μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ.

1.4.2 Αλκοολική ζύμωση

Οι συνθήκες σε μία δεξαμενή κατά την οινοποίηση είναι αναερόβιες και το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε αιθανόλη με δύο αντιδράσεις. Το πρώτο βήμα είναι η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού με απομάκρυνση ενός μορίου CO₂ και σχηματισμό ακεταλδεΐδης. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού. Το δεύτερο βήμα είναι η αναγωγή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη από το NADH, σε μία αντίδραση που καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογονάση. Αυτή η αντίδραση αναγεννά το NAD⁺ (Berg, Tymoczko & Stryer, 2013).



Εικόνα 2: Τα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη.



Εικόνα 3: Προετοιμασία ζυμομύκητα για αλκοολική ζύμωση βιομηχανικής κλίμακας.

1.5 Μεταβολική ρύθμιση της αλκοολικής ζύμωσης

Εκτός από τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω και αφορούν την θερμοκρασία, την ύπαρξη ή όχι οξυγόνου, την επάρκεια των θρεπτικών συστατικών, το pH κτλ, το ίδιο το μέσο μπορεί να αποτελεί έναν παράγοντα παρεμπόδισης για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων. Δύο από τα φαινόμενα που μπορεί να παρουσιαστούν είναι το φαινόμενο Crabtree και το φαινόμενο Pasteur (Sarris & Papanikolaou, 2016).

1.5.1 Φαινόμενο Crabtree

Το φαινόμενο αυτό περιγράφει την παρεμπόδιση της αναπνευστικής δραστηριότητας που μπορεί να υποστεί ο ζυμομύκητας από την συγκέντρωση των σακχάρων του μέσου. Σε καλλιέργειες ζυμομυκήτων όπου η συγκέντρωση των σακχάρων στο περιβάλλον αύξησης υπερβαίνει μια συγκεκριμένη κρίσιμη τιμή, ο κυτταρικός καταβολισμός ακολουθεί την αλκοολική ζύμωση αντί της αναπνευστικής οδού (Piskur et al., 2012). Αυτό συμβαίνει διότι υφίσταται καταβολική καταστολή. Όταν στο υπόστρωμα που αναπτύσσεται ο ζυμομύκητας η πηγή άνθρακα είναι περιορισμένη, η παραγωγή του CO₂ είναι ίση με την κατανάλωση του οξυγόνου. Αν η συγκέντρωση του σακχάρου ξεπεράσει την κρίσιμη τιμή, τότε ο ζυμομύκητας

«αντιλαμβάνεται» την ύπαρξη της γλυκόζης και παύει την αναπνευστική λειτουργία, αρχίζοντας την ζύμωση.

1.5.2 Φαινόμενο Pasteur

Το δεύτερο φαινόμενο περιγράφει την επίδραση του οξυγόνου στον καταβολισμό της γλυκόζης. Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον αύξησης κατέλθει μιας συγκεκριμένης κρίσιμης τιμής, ο κυτταρικός καταβολισμός κατευθύνεται προς την ζύμωση. Αυτό οφείλεται στην καταβολιστική καταστολή των πρώτων ενζύμων του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων και την αύξηση της ενεργότητας κάποιων ενζύμων του γλυκολυτικού μονοπατιού, όπως η φωσφοφρουκτοκινάση (Sarris & Papanikolaou, 2016).

1.6 Δευτερογενή προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης

Εκτός από την παραγωγή της αιθανόλης που περιγράφηκε παραπάνω εκτενώς, παράλληλα παράγονται και άλλα προϊόντα στην αλκοολική ζύμωση, τα περισσότερα από τα οποία είναι εξίσου σημαντικά στην χημική σύσταση του οίνου. Κάποια είναι επιθυμητά, καθώς συμβάλλουν θετικά στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου, ενώ κάποια άλλα θεωρούνται ανεπιθύμητα, καθώς οφείλονται για ελλατωματικές οσμές και δυσάρεστη γεύση.

Ανώτερες αλκοόλες: σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, 2-βουτανόλη, 2-μεθυλ-1-προπανόλη, 2-μεθυλ-βουτανόλη, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, 1-πεντανόλη, 1-εξανόλη (Houtman & Du Plessis, 2017; Yoshioka & Hashimoto, 1984).

Ακεταλδεΐδη: αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης που προκύπτει από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού. Η προσθήκη του θειώδους ανυδρίτη, κατά την οινοποίηση, οδηγεί σε δέσμευση της ακεταλδεΐδης (Houtman & Du Plessis, 2017; Yoshioka & Hashimoto, 1984).

Γλυκερίνη: αποτελεί και αυτή ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης (στο στάδιο της γλυκόλυσης). Ευνοείται σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε γλεύκη που έχει προστεθεί θειώδης ανυδρίτης, καθώς ο SO₂ ενώνεται με την ακεταλδεΐδη και έτσι προάγεται η γλυκόλυση.

Εστέρες: αποτελούν προϊόντα αντίδρασης αλκοόλης και οξέος, μέσω του μηχανισμού της εστεροποίησης. Στον οίνο συναντάται μεγάλη ποικιλία εστέρων με

σημαντικότερους τους εστέρες της αιθυλικής αλκοόλης (καθώς είναι η πιο σημαντική και δραστική αλκοόλη στον οίνο). Εξίσου σημαντικοί είναι και οι οξικοί εστέρες, καθώς προσδίδουν φρουτώδη γεύση και αρώματα, όπως τα αρώματα της μπανάνας και του μήλου που προκύπτουν από την εστεροποίηση οξικού οξέος και ανώτερων αλκοολών. Ο σημαντικότερος εστέρας στην οινοποίηση είναι ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου σε συγκεντρώσεις έως 150-200 mg/L. Πάνω από αυτές τις συγκεντρώσεις, ο οξικός αιθυλεστέρας προσδίδει δυσάρεστη οσμή και ανήκει στα ελαττώματα των οίνων.

Οξέα: στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα πτητικά και μη πτητικά οξέα. Το σημαντικότερο πτητικό οξύ είναι το οξικό οξύ, το οποίο προκύπτει είτε από την οξείδωση της ακεταλδεΐδης, είτε από την δράση των οξικών βακτηρίωντα οποία οξειδώνουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ, παρουσία οξυγόνου. Από τα μη πτητικά οξέα, τα πιο σημαντικά είναι το τρυγικό και το μηλικό οξύ, τα οποία προέρχονται από το γλεύκος.

Ακετάλες: αποτελούν προϊόντα αντίδρασης της ακεταλδεΐδης και της αιθανόλης. Απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στον οίνο, λόγω της μικρής συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης και προσδίδουν άρωμα βοτάνων (Houtman & Du Plessis, 2017; Yoshioka & Hashimoto, 1984)

1.7 Οι πτητικές ενώσεις στον οίνο

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, όπως το άρωμα και η γεύση, τα οποία οι οινοποιοί έχουν ως στόχο να βελτιώσουν, καθορίζονται από 3 στάδια της διαδικασίας της οινοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, το άρωμα καθορίζεται από:

- Την ποικιλία και τις συνθήκες καλλιέργειας
- Τις συνθήκες ζύμωσης και τους ζυμομύκητες
- Τις αντιδράσεις κατά την ωρίμανση και τις συνθήκες παλαίωσης (Styger, Prior & Bauer, 2011)

Το αρωματικό προφίλ του οίνου αποτελείται από έναν πολύ μεγάλο αριθμό αρωματικών ενώσεων. Οι βασικές κατηγορίες των πτητικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για το άρωμα είναι οι εξής: ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, καρβονυλικές ενώσεις, λακτόνες, ακετάλες, θειούχες ενώσεις, πτητικές φαινόλες, τερπένια, νορισοπρενοειδή, μεθοξυπυραζίνες και κάποια παράγωγα υδατανθράκων. Σε διάφορες

κατηγορίες οίνων έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα πάνω από 700 πτητικές ενώσεις, υπεύθυνες για την πολυπλοκότητα του αρώματος (Varnam, Sutherland & Χατήρης, 2006; Fischer, 2007).

Όπως αναφέρθηκε το άρωμα των οίνων καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά της εκάστοτε ποικιλίας και τα στέμφυλα (πρωτογενές άρωμα), από τους ζυμομύκητες και τις συνθήκες κατά την αλκοολική ζύμωση (δευτερογενές άρωμα) αλλά και τις συνθήκες ωρίμανσης και παλαίωσης (τριτογενές άρωμα). Πολλές από τις ενώσεις βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από mg/l έως ng/l. Η ελάχιστη συγκέντρωση μιας ένωσης, η οποία είναι ικανή ώστε να γίνεται αντιληπτή στην όσφρηση, καλείται κατώφλι αντίληψης, ενώ αν είναι αρκετή ώστε να την ταυτοποιήσουμε καλείται κατώφλι προσδιορισμού (Βέκιος κ.ά., 1994).

Μια αρωματική ένωση θα πρέπει να βρίσκεται σε πτητική κατάσταση ώστε να γίνει αντιληπτή. Το μεγαλύτερο ποσοστό των πτητικών ενώσεων που συνεισφέρει οργανοληπτικά στον οίνο, παράγεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Κάθε είδους ζυμομύκητας, που χρησιμοποιείται για την οινοποίηση, χαρακτηρίζεται από μια συγκεκριμένη μεταβολική δραστηριότητα, η οποία καθορίζει με την σειρά της την παραγωγή και τις συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών στον τελικό οίνο.

Είναι σημαντικό να κατανοηθεί ότι κάθε είδος ζυμομύκητα χαρακτηρίζεται από μεγάλη μεταβλητότητα, γεγονός που επηρεάζει τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του προϊόντος. Η χρήση των καθαρών καλλιεργειών έναρξης εφαρμόζεται από την μία για να εξασφαλιστεί μια ισορροπημένη γεύση στον οίνο, χωρίς απρόβλεπτες αλλαγές, και από την άλλη για να μειωθεί ο οποιοσδήποτε κίνδυνος αλλοίωσης από άλλους μικροοργανισμούς. Ωστόσο, μία λάθος επιλογή ζυμομύκητα μπορεί να προκαλέσει απώλεια του χαρακτηριστικού αρώματος ή της γεύσης, οδηγώντας σε ουδέτερα προϊόντα χωρίς χαρακτήρα.

1.8 *Non Saccharomyces* ζύμες

Οι ζυμομύκητες non-Saccharomyces θεωρούνται εδώ και πολλά χρόνια ως μικροοργανισμοί αλλοίωσης στην διαδικασία της οινοποίησης, λόγω παραγωγής υψηλών επιπέδων οξικού οξέος και άλλων ουσιών και οσμών που αποτελούν ή οδηγούν σε ελατώματα (Fleet & Heard, 1993). Ωστόσο, οι ιδιότητές τους έχουν αναθεωρηθεί τις τελευταίες δεκαετίες (Padilla et al., 2016). Οι ζυμομύκητες non-

Saccharomyces θεωρούνται δραστικοί στο πρώτο μέρος της ζύμωσης, όταν δηλαδή η συγκέντρωση της αιθανόλης δεν είναι πολύ υψηλή, και στην συνέχεια πεθαίνουν (Taillandier et al., 2014). Οι ζύμες αυτές προέρχονται συνήθως από τα γένη *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Metschnikowia* και *Zygosaccharomyces*.

Τα τελευταία χρόνια, οι ζύμες non-*Saccharomyces* έχουν αποκτήσει δημοτικότητα στην οινολογία λόγω της ικανότητάς τους να μειώνουν την περιεκτικότητα σε αιθανόλη, να αυξάνουν την οξύτητα, να αυξάνουν την σταθερότητα του χρώματος και να τροποποιούν συγκεκριμένες χημικές ή αρωματικές ενώσεις των οίνων (Ciani et al., 2010).

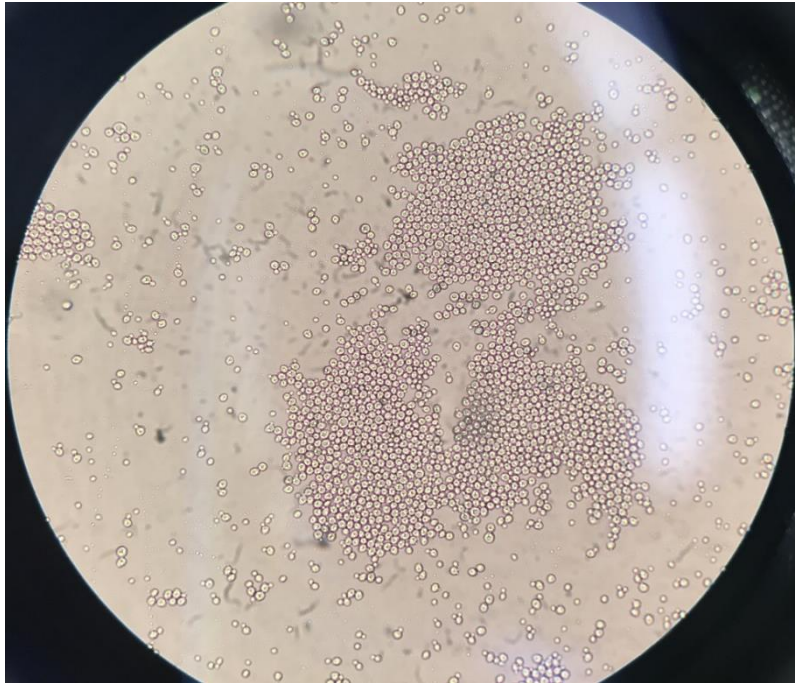
Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που καθορίζουν την προτίμηση του καταναλωτή για τον οίνο είναι το ισορροπημένο και πολύπλοκο άρωμα. Ένας κλάδος, που αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον λοιπόν, είναι η χρήση ζυμών non-*Saccharomyces* για την διαμόρφωση του αρωματικού προφίλ του οίνου (Varela, 2016). Διάφορα αρωματικά προφίλ οίνων παράγονται από διαφορετικά στελέχη που δεν ανήκουν στο είδος *Saccharomyces* και παρουσιάζουν μία έντονα εξαρτώμενη από το στέλεχος διαδικασία. Ακόμη, με τον συνδυασμό διαφορετικών στελεχών non-*Saccharomyces* και *Saccharomyces cerevisiae* διαπιστώθηκε ότι η επιλογή ζύμης έχει σημαντική επίδραση στο άρωμα του γλεύκους (Du Plessis et al., 2017). Ο συνδυασμός των δύο ειδών ζυμομυκήτων λοιπόν συμβάλλει στο άρωμα του οίνου τόσο λόγω της αλληλεπίδρασης που έχουν μεταξύ τους, όσο και μέσω της παραγωγής επιθυμητών μεταβολιτών.

Στην παρούσα μελέτη, τα στελέχη που μελετήθηκαν, τα οποία ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι τα *Torulaspora delbrueckii* OSV1EFL1, *Hanseniaspora uvarum* OAM2MFW1 και *Hanseniaspora opuntiae* OST1GW2.

1.8.1 *Torulaspora delbrueckii*

Γενικά χαρακτηριστικά: Μία non-*Saccharomyces* ζύμη που προσελκύει ιδιαίτερη προσοχή στην βιομηχανία του οίνου είναι η ζύμη *T. delbrueckii*, η οποία εμφανίζεται πολύ συχνά στην επιφάνεια του σταφυλιού και, όπως και η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, βρίσκεται στις περισσότερες περιοχές παραγωγής οίνου. Η ζύμη έχει σφαιρικό, ελλειψοειδές σχήμα (2-6μm X 6,6μm) και εμφανίζεται ως μεμονωμένα κύτταρα ή σε ζεύγη. Όσον αφορά στη ζύμωση, τα στελέχη της ζύμης *T. delbrueckii* παρουσιάζουν διακυμάνσεις στην ικανότητά τους να ζυμώνουν, ωστόσο

έχουν ήδη προταθεί για την οινοποίηση γλυκών χαμηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα και οξέα, ενώ έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ερυθρών και ροζέ οίνων στην Ιταλία και για την ποικιλία Sauvignon Blanc στην Νότια Αφρική (Van Breda et al., 2013).



Εικόνα 4: Από το μικροσκόπιο του εργαστηρίου. Καθαρή καλλιέργεια του στελέχους *Torulaspora Delbrueckii* OSVIEFL1.

Ειδικά χαρακτηριστικά: Ο ζυμομύκητας *T.delbrueckii* έχει υψηλή ικανότητα ζύμωσης και παράγει χαμηλά επίπεδα πτητικής οξύτητας και ακεταλδεΰδης, γεγονός που συνεισφέρει θετικά στην γεύση των οίνων, ενώ παρουσιάζει χαμηλότερα επίπεδα πτητικής οξύτητας και από την *S. cerevisiae*. Υπάρχουν ήδη στελέχη που έχουν διατεθεί στο εμπόριο από Ευρωπαίους και Καναδούς παραγωγούς ζυμομυκήτων και χρησιμοποιούνται υπό κανονικές συνθήκες, σε μικτές ή διαδοχικές καλλιέργειες με την *S.cerevisiae* (Ciani and Maccarelli, 1997; Ciani and Picciotti, 1995; Ciani et al., 2006). Η μεγάλη φυσική ποικιλία που υπάρχει στο συγκεκριμένο γένος υποδηλώνει ότι μεταγενέστερα υπάρχει δυνατότητα για στελέχη με βελτιωμένη απόδοση σε σύγκριση με τα εμπορικά στελέχη (Van Breda et al., 2013).

Μελέτες έδειξαν επίσης ότι ο ζυμομύκητας *T.delbrueckii* είχε θετική επίδραση στην γεύση των ποτών και εμφανίζει χαμηλή παραγωγή ανεπιθύμητων ενώσεων, όπως η ακεταλδεΰδη, η ακετοΐνη, το οξικό οξύ και ο οξικός αιθυλεστέρας (Ciani & Picciotti, 1995; Plata & Ortega, 2003; Ciani et al., 2006; Viana & Manzanares, 2008). Η

συγκεκριμένη ζύμη έχει προταθεί ως προς την ελαχιστοποίηση της παραγωγής του οξικού οξέος στον οίνο κάτω από πρότυπες ή υψηλές συνθήκες σακχάρων (Ciani et al., 2006; Bely et al., 2008).

Όσον αφορά το αρωματικό δυναμικό αυτού του είδους, χαρακτηρίζεται από χαμηλή ικανότητα παραγωγής εστέρων, ενώ ρυθμίζει σημαντικά τα επίπεδα διαφόρων αρωματικών ενώσεων (όπως νορισοπρενοειδή, τερπενόλες, πτητικές φαινόλες, βανιλίνη και λακτόνες) (Plata & Ortega, 2003; Escribano-Viana et al., 2018; Hernandez-Orte & Ferreira et al., 2008; Renault & Bely, 2009).

Στην οινολογία, η «βιοπροστασία» συνίσταται στην προσθήκη ζυμομυκήτων ή μίγματος μικροοργανισμών στο γλεύκος των σταφυλιών πριν από την αλκοολική ζύμωση, προκειμένου να μειωθεί η χρήση χημικών ενώσεων, όπως ο θειώδης ανυδρίτης. Ειδικότερα, οι non-Saccharomyces ζυμομύκητες χρησιμοποιούνται ως ολική ή μερική εναλλακτική λύση έναντι του θειώδη ανυδρίτη, ωστόσο δεν υπάρχουν επαρκή επιστημονικά δεδομένα, ικανά να αποδείξουν την αποτελεσματικότητα της δράσης των ζυμομυκήτων αυτών σε γλεύκος σταφυλιών. Έχουν παρατηρηθεί αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές επιδράσεις του γένους *T. delbrueckii* σε λευκή οινοποίηση σε δύο οινοποιεία της Βουργουνδίας ως εναλλακτική λύση του θειώδους ανυδρίτη. Η προσθήκη του ζυμομύκητα δεν επηρέασε την κινητική της αλκοολικής ζύμωσης όμως περιόρισε αποτελεσματικά την ανάπτυξη μικροοργανισμών αλλοίωσης με τον ίδιο τρόπο όπως η προσθήκη του θειώδους ανυδρίτη. Ο βιομηχανικός στόχος είναι να μειωθεί η δόση του θειώδους ανυδρίτη τα επόμενα χρόνια και να αντικατασταθεί η επίδρασή του, όσο το δυνατόν περισσότερο.

Οι παραγωγοί οίνου πρότειναν την χρήση ζυμών non-Saccharomyces κατά την έναρξη της διαδικασίας οινοποίησης, είτε για να αντικαταστήσουν πλήρως τον θειώδη ανυδρίτη είτε για να ελαττώσουν την προσθήκη του στον οίνο. Η προσθήκη του στελέχους *T. delbrueckii* ως βιοπροστατευτικός παράγοντας προκάλεσε μείωση της βιοποικιλότητας σε σύγκριση με τον μάρτυρα (δηλαδή με προσθήκη SO₂) στην αρχή της διαδικασίας της οινοποίησης. Οι αναλογίες των γενών *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Debaromyces*, *Cryptococcus* και *Wickerhamomyces* μειώθηκαν υπέρ της ανάπτυξης της τάξης *Saccharomycetales*, στο οποίο ανήκει το είδος *T. delbrueckii*. Τα στελέχη του είδους κυριάρχησαν και πιθανόν εμπόδισαν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, καθώς δεν ανιχνεύθηκε καμία διαφορά σε σύγκριση με την μέθοδο του SO₂. Αυτό το είδος ανήκει στους ζυμομύκητες που είναι

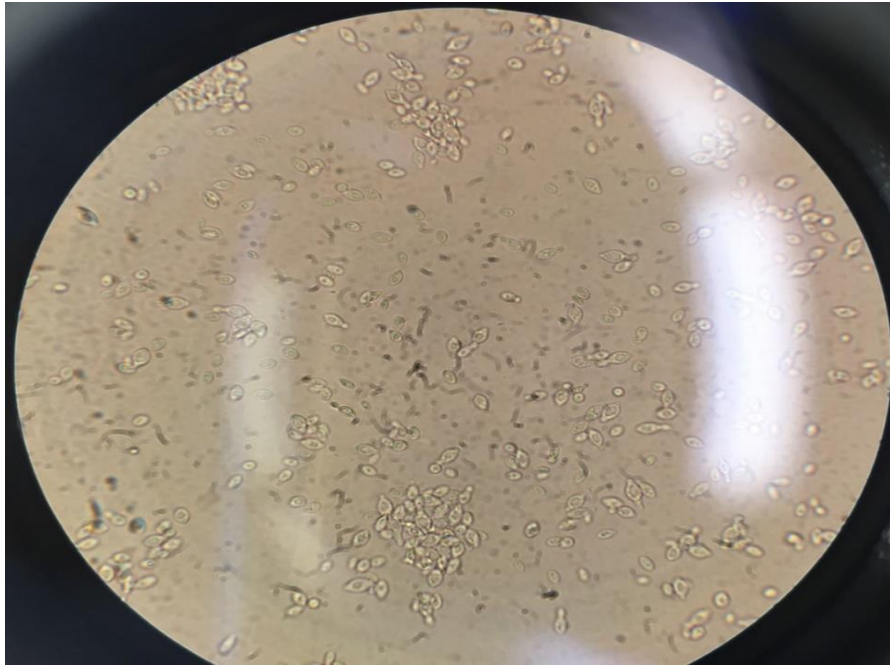
ανθεκτικοί στο SO₂ σε αντίθεση με άλλα είδη (όπως το *H.uvarum*) και μπορεί να παραμείνει μέχρι το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης (Ciani & Pepe, 2002; Constanti, 1998; Belda & Benito, 2014; Sadineni & Obulam, 2011; Ciani & Maccarelli, 1997).

Εκτός από την αντιμικροβιακή δράση του, ο θειώδης ανυδρίτης έχει και αντιοξειδωτική δράση, μία εξίσου σημαντική παράμετρος η οποία θα πρέπει να μελετηθεί στον βωμό της μερικής ή ολικής αντικατάστασης του θειώδους ανυδρίτη. Η παρουσία επαρκούς βιομάζας του *T.delbrueckii* μπορεί να καταναλώσει το οξυγόνο του μέσου και να προστατεύσει το γλεύκος από την οξείδωση (Shekhawat, Bauer & Setati, 2017). Η προστασία μερικής οξείδωσης μπορεί επίσης να οφείλεται στην παραγωγή μερικών ειδικών μεταβολιτών. Ωστόσο τα αποτελέσματα της μελέτης δεν ήταν ίδια και για τα δύο οινοποιεία στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις, επομένως χρειάζεται περαιτέρω εμβάθυνση σε αυτόν τον τομέα.

Οι περισσότερες μελέτες είχαν επικεντρωθεί σε λίγα μόνο στελέχη του είδους αυτού, επομένως δεν υπήρχε ικανοποιητική επισκόπηση των οινοποιητικών ιδιοτήτων τους. Ένα ευρύ δείγμα ζυμομυκήτων μελετήθηκε από τους Ciani και Maccarelli (1998), αλλά μετρούσαν μόνο μερικές οινολογικές παραμέτρους σε ένα γλεύκος σταφυλιών τροποποιημένο με εκχύλισμα ζύμης. Επομένως, η παρούσα μελέτη γεννάται από την ανάγκη για περισσότερη μελέτη των στελεχών του είδους αυτού.

1.8.2 *Hanseniaspora uvarum*

Γενικά χαρακτηριστικά: Ο ζυμομύκητας *H. uvarum* είναι γνωστός και με το όνομα *Kloeckera apiculata* και έχει σφαιρικό έως ωοειδές σχήμα (1,5-5μm X 2,5-11,5μm). Αποτελεί ζύμη που μπορεί να βρεθεί σε πολλά φυσικά προϊόντα και εκτός από τον οίνο, εμπλέκεται σε φυσικές ζυμώσεις σε ορισμένες μορφές μπίρας. Είναι ένας από τους κυρίαρχους ζυμομύκητες στα πρώιμα στάδια ζυμώσεων και περιγράφεται ως σημαντική παρουσία στα γλεύκη (Fleet & Heard, 1993; Pretorius, 2002).



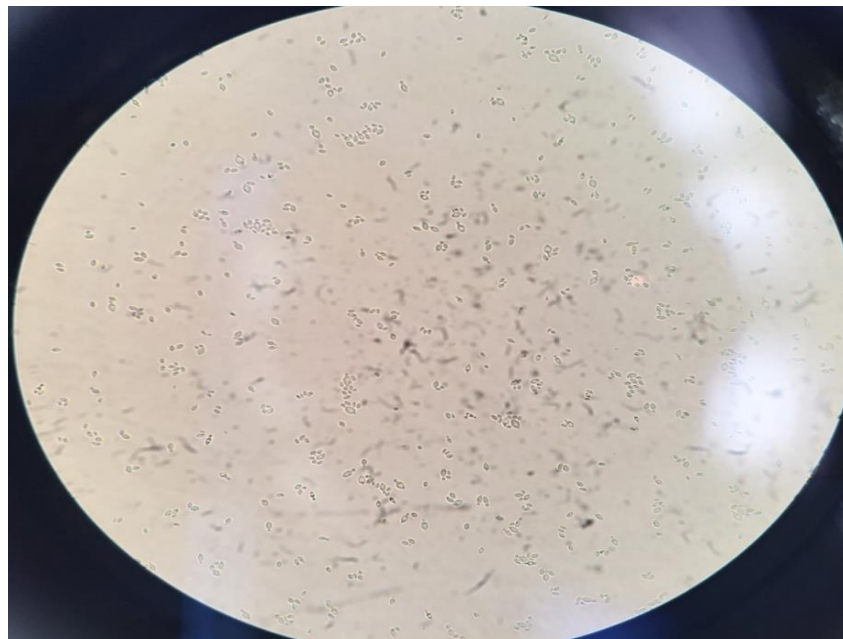
Εικόνα 5: Από το μικροσκόπιο του εργαστηρίου. Καθαρή καλλιέργεια του στελέχους *Hanseniaspora uvarum* OAM2MFW1.

Ειδικά χαρακτηριστικά: Το γένος αυτό συμμετέχει στο αρωματικό προφίλ των παραγόμενων οίνων μέσω της ικανότητάς του να παράγει ανώτερες αλκοόλες και πτητικούς εστέρες (Moreira & Vasconcelos, 2011; Romano, 2003; Grangeteau & Guilloux-Benatier, 2015). Ο ζυμομύκητας αυτός αποτελεί ένα από τα επικρατέστερα είδη, τα οποία δεν ανήκουν στο είδος *Saccharomyces*, που μπορούν να συμβάλουν θετικά στο φυσικό άρωμα του οίνου όταν χρησιμοποιούνται σε μικτές ζυμώσεις. Εκτός αυτού, ο μικροοργανισμός *H. uvarum* φαίνεται να έχει κάποια ενδιαφέροντα ένζυμα, όπως η β-γλυκοσιδάση, τα οποία είναι βασικά ένζυμα για την απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων κατά την διάρκεια της οινοποίησης (Kurtzman, 2011). Κάποια επιλεγμένα στελέχη μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μικτές ζυμώσεις για να βελτιώσουν την τυπικότητα του οίνου, όπως έχει μελετηθεί σε λευκό οίνο Sauvignon Blanc από την Ν.Αφρική και σε ερυθρό οίνο Negroamaro από την νότια Ιταλία (Tristezza, 2016). Ωστόσο, η υπερβολική δόση *H. uvarum* επιδρά στην κινητική της ζύμωσης, επιβραδύνοντας τον ρυθμό της και προκαλεί δυσάρεστες οσμές μέσω της αύξησης οξικών εστέρων και πτητικών φαινολών. Ένας συνδυασμός εργαστηριακών αναλύσεων και οργανοληπτικού ελέγχου πρότεινε ότι η μικτή ζύμωση *Saccharomyces cerevisiae*/ *Hanseniaspora uvarum* και η χρήση εξωκυτταρικού εκχυλίσματος *H.uvarum* θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση της συνολικής ποιότητας των αρωμάτων του οίνου (Hu & Tao, 2018).

Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι ο πληθυσμός του ζυμομύκητα *H.uvarum* μειώνεται απότομα στα τελευταία στάδια της ζύμωσης, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στους μεταβολίτες που εκκρίνονται από τον *S.cerevisiae* στην φάση αυτή. Η επαφή των κυττάρων των ζυμομυκήτων δεν φαίνεται να είναι η κύρια αιτία για την μείωση της δραστηριότητας του *H.uvarum*. Επίσης, τα σάκχαρα, η αιθανόλη και άλλες πιθανές ενώσεις δεν φάνηκε να επάγουν την μείωση της δραστηριότητας αλλά έπαιξαν κάποιο ρόλο κατά την διάρκεια της διαδικασίας (Wang, 2015).

1.8.3 *Hanseniaspora opuntiae*

Γενικά χαρακτηριστικά: Ο ζυμομύκητας *H. opuntiae* έχει ωοειδές έως επιμήκες σχήμα (3-16 μm X 1,5-5 μm) μονό ή σε ζεύγη (Cadez, 2003). Ο μικροοργανισμός *H. opuntiae* δεν ανήκει στα συνήθη είδη ζυμομυκήτων της κατηγορίας non-Saccharomyces που απαντώνται στην αλκοολική ζύμωση του οίνου και σε βιομηχανικό επίπεδο, το βιοτεχνολογικό δυναμικό των ειδών αυτών βρίσκεται ακόμη υπό αξιολόγηση, σε σύγκριση με τα συμβατικά στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*. Ως ένα νέο είδος, ο μικροοργανισμός *H. opuntiae* περιγράφηκε σχετικά πρόσφατα και υπάρχουν λίγες περιγραφές για τον μεταβολισμό του στις αρωματικές ενώσεις του οίνου (Luan, 2018). Σε πιο πρόσφατη μελέτη αναφέρθηκε ότι ο μικροοργανισμός *H. opuntiae* θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά την τελική συγκέντρωση αιθανόλης και να αυξήσει την περιεκτικότητα της γλυκερόλης στον οίνο (Rossouw & Bauer, 2016).



Εικόνα 6: Από το μικροσκόπιο του εργαστηρίου. Καθαρή καλλιέργεια του στελέχους *Hanseniaspora opuntiae* OST1GW2.

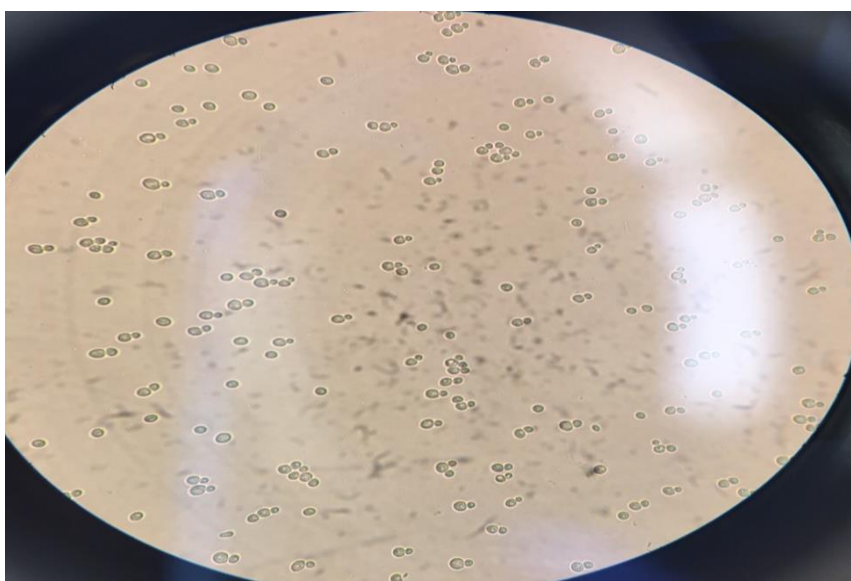
Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε Cabernet Sauvignon με μικτή καλλιέργεια ζυμομυκήτων των μικροοργανισμών *Saccharomyces cerevisiae/ Hanseniaspora oruntiae*, όπου μελετήθηκε και ο χρόνος κρυσταλλίωσης πριν από την αλκοολική ζύμωση, παρατηρήθηκε ότι ο πλυθισμός του μικροοργανισμού *H. oruntiae* έφτασε την μέγιστη τιμή έπειτα από 2 ημέρες ζύμωσης και στην συνέχεια μειωνόταν ραγδαία εξαιτίας της αδυναμίας αντοχής στην αιθανόλη (Luan, 2018). Στην ίδια μελέτη, ταυτοποιήθηκαν 46 αρωματικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων ανώτερων αλκοολών, λιπαρών οξέων, εστέρων, αλδεϋδών και τερπενίων. Αρκετές από αυτές τις ενώσεις βρίσκονταν σε συγκέντρωση υψηλότερη από το κατώφλι αντίληψης, γεγονός που επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα του αρώματος του οίνου (Guth, 1997). Μάλιστα, δεδομένα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο είδος έχει σχετικά ισχυρή ικανότητα σύνθεσης ανώτερων αλκοολών και εστέρων, που προσδίδουν επιθυμητά φρουτώδη αρώματα και οσμή τριαντάφυλλου. Η αλλαγή του χρόνου κρυσταλλίωσης πριν την αλκοολική ζύμωση σε συνδυασμό με εμβολιασμό μικτής καλλιέργειας των μικροοργανισμών *Saccharomyces cerevisiae/ Hanseniaspora oruntiae* θα μπορούσε να ήταν ένα χρήσιμο εργαλείο για την διαμόρφωση του αρωματικού προφίλ και της πολυπλοκότητας των οίνων (Luan, 2018).

Η συμβολή του συγκεκριμένου είδους στο αρωματικό προφίλ κατά την διάρκεια μιας ζύμωσης αποδεικνύεται και από μελέτη με αντικείμενο το γένος *Hanseniaspora* όσον αφορά την αλκοολική ζύμωση της μύρας. Στο στέλεχος της συγκεκριμένης μελέτης, το οποίο προήλθε από ερυθρό γλεύκος, αποδόθηκαν βοτανικά αρώματα, όπως η ρίγανη, αλλά και «γλυκά» αρώματα βουτύρου και καραμέλας (Bourdon-Melo et al., 2020).

Όπως αναφέρθηκε, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός ταυτοποιήθηκε και μελετήθηκε πολύ πρόσφατα. Ο μικροοργανισμός *H. oruntiae* ταυτοποιήθηκε και σε δείγματα σταφυλιών της πειραματικής αμπέλου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η συγκεκριμένη μελέτη περιελάμβανε δείγματα σταφυλιών από τις σπάνιες γηγενείς ποικιλίες «Μαυρολιάτης» και «Σέφκα», ένα υγιές δείγμα από κάθε ποικιλία αλλά και ένα δείγμα προσβεβλημένο από βοτρυτή για κάθε ποικιλία. Ο μικροοργανισμός *Hanseniaspora oruntiae* ταυτοποιήθηκε και στα 4 αυτά δείγματα, αν και ο επικρατέστερος ήταν ο μικροοργανισμός *Hanseniaspora uvarum* (Nisiotou & Nychas, 2007).

1.9 Ζύμες *Saccharomyces*

Γενικά χαρακτηριστικά: Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* θεωρείται πολλά χρόνια ως η μόνη ζύμη που εμπλέκεται στην παραγωγή του οίνου (Fleet & Heard, 1993). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι ένας μ0,51εγάλος αριθμός γηγενών στελεχών του είδους *S. cerevisiae* συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση (Vezinhet & Valade, 1992). Τα στελέχη του *S. cerevisiae* μπορούν να προέρχονται όχι μόνο από τον αμπελώνα αλλά και από το περιβάλλον του οινοποιείου (Cocolin & Ciani, 2004; Ciani & Mannazu, 2004; Mercado & Combina, 2007; Valero, 2007). Μερικά από τα στελέχη που προέρχονται από το περιβάλλον των οινοποιείων, περιγράφονται ως επίμονα για αρκετά χρόνια, έχουν βρεθεί σε γλεύκη σταφυλιών πριν από τη ζύμωση και παρατηρήθηκε να κυριαρχούν εις βάρος των στελεχών από τον αμπελώνα, κατά την διάρκεια της ζύμωσης (Mercado & Combina, 2007; Le Jeune & Lollier, 2006; Santamaria et al., 2005). Παρ' όλα αυτά, αν και το στέλεχος *S. cerevisiae* είναι το κυρίαρχο είδος στο τέλος της ζύμωσης, πολλά είδη non-*Saccharomyces* μπορούν να βρεθούν στο γλεύκος σταφυλιών (Grangeteau & Guilloux-Benatier, 2015). Αυτές οι διαφορές των ειδών ζυμομυκήτων και των στελεχών *S. cerevisiae* θεωρείται ότι σχετίζονται με την περιοχή παραγωγής, τις κλιματικές συνθήκες, την ηλικία των αμπελώνων, την ποικιλία σταφυλιών, τη διαχείριση της των αμπελουργικών επεμβάσεων και την τεχνική που ακολουθείται κατά την συγκομιδή (Di Maro & Coppola, 2004).



Εικόνα 7: Από το μικροσκόπιο του εργαστηρίου. Καθαρή καλλιέργεια του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* OST2EFW10.

Η τάση στην οινοποίηση χρησιμοποιεί τις καλλιέργειες εκκίνησης του *S. cerevisiae*, για να προκαλέσει αξιόπιστη και ταχεία ζύμωση, με αποτέλεσμα έναν οίνο σταθερής ποιότητας. Παρά τα πλεονεκτήματα των εμπορικών σκευασμάτων καλλιιεργειών ζυμομυκήτων, όσον αφορά τον εύκολο έλεγχο και την ομοιογένεια των ζυμώσεων, πρέπει να επιλέγονται στελέχη που είναι πιο συγκεκριμένα και κατάλληλα για τα μεμονωμένα χαρακτηριστικά συγκεκριμένων οίνων (Romano, 2003; Lambrechts & Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2000). Επιπλέον, ο οίνος είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης διαφορετικών ειδών ζυμομυκήτων, ιδίως μεταξύ ειδών non-*Saccharomyces* και ειδών *Saccharomyces*, από τα πρώιμα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης.

Ειδικά χαρακτηριστικά: Πολλοί συγγραφείς ισχυρίζονται ότι η συμβολή των ζυμομυκήτων non-*Saccharomyces* δεν μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα και η χρήση τους σε μικτές καλλιέργειες εκκίνησης με στελέχη του είδους *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να οδηγήσει σε οίνους που χαρακτηρίζονται από ένα πιο σύνθετο και καλύτερο άρωμα (Fleet & Heard, 1993; Romano, 2003; Lambrechts & Pretorius, 2000; Egli & Henick-Kling, 1998). Οι Henick-Kling (1998) έδειξαν, μέσω οργανοληπτικής αξιολόγησης σε οίνους ποικιλίας Riesling, ότι οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ των οίνων οφείλονταν στο κατά πόσον παρήχθησαν από αλκοολική ζύμωση χωρίς εμβολιασμό ή από εμβολιασμό με καλλιέργεια εκκίνησης. Υψηλότερες βαθμολογίες για τυπικά «φρουτώδη» αρώματα (μπαχαρικά, μήλο, πεπόνι και αχλάδι) παρατηρήθηκαν στους οίνους που δεν είχαν εμβολιαστεί με εμπορικό σκεύασμα, ενώ οι οίνοι με εμβολιασμό είχαν υψηλότερες βαθμολογίες σε δυσάρεστες οσμές (Egli & Henick-Kling, 1998).

Γενικότερα, οι ζυμομύκητες και ειδικότερα το είδος *S. cerevisiae* είναι το είδος που κυριαρχεί στην παραγωγή της αιθανόλης, καθώς κυριαρχεί έναντι των υπόλοιπων ειδών, χαρακτηρίζεται από αντοχή απέναντι στις υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση και ταχύτητα στην κατανάλωση των σακχάρων και διατηρεί την δραστηριότητά του μέχρι το τέλος της ζύμωσης (Romano, 2003; Kunkee, 1984; Fleet, 2003; Xufre et al., 2006; Dashko et al., 2014). Ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* αποτελεί τον πλέον χρησιμοποιούμενο ζυμομύκητα στην βιομηχανία των τροφίμων, και κυρίως στην οινοποίηση, και η μέγιστη θεωρητική απόδοσή του ανέρχεται σε 0,51 g/g (Sarris & Papanikolaou, 2016).

Το διοξείδιο του θείου (SO₂) ή θειώδης ανυδρίτης ή απλώς θειώδη (όπως αναγράφεται στις φιάλες οίνων) είναι μία ένωση άμεσα συνδεδεμένη με την οινοποίηση, κυρίως για την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή της δράση. Ο θειώδης ανυδρίτης παράγεται φυσικά, σε μικρές ποσότητες από τους ζυμομύκητες κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ωστόσο προστίθεται εξωγενώς με την μορφή σκόνης ή αερίου. Η προσθήκη αυτή αποτελεί αποδεκτή πρακτική στην οινοποίηση, ωστόσο μπορεί να δημιουργεί αλλεργικές αντιδράσεις σε μια μερίδα ανθρώπων. Μια πρόσφατη μελέτη σε 132 στελέχη του είδους *S.cerevisiae* έδειξε υψηλή ανθεκτικότητα στον θειώδη ανυδρίτη σε δόσεις μεταξύ 250mg/L και 300mg/L (Capese & Romano, 2012).

Στην ίδια μελέτη (Capese & Romano, 2012), τα περισσότερα στελέχη παρουσίασαν χαμηλή έως μεσαία παραγωγή υδρόθειου (H₂S), ενώ 17 στελέχη του είδους παρουσίασαν μηδενική παραγωγή υδρόθειου, μία ένωση που δίνει δυσάρεστη οσμή στον οίνο (οσμή κλούβιου αυγού). Η παραγωγή υδρόθειου σχετίζεται άμεσα με την επιλογή και την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων. Όπως αναφέρθηκε, οι ζυμομύκητες έχουν ανάγκη από πηγή αζώτου. Σε γλεύκος με ανεπάρκεια αζώτου, διαχωρίζονται τα αμινοξέα που περιέχουν άζωτο και το θείο απελευθερώνεται με την μορφή υδρόθειου.

1.10 Βιοαιθανόλη

Η αιθανόλη αποτελεί μία χημική ένωση μεγάλης σημασίας, η οποία χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που περιλαμβάνει τα αλκοολούχα ποτά, την βιοαιθανόλη και την παραγωγή βιοκαυσίμων, καθώς και φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά. Το μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης παράγεται από βιοτεχνολογικές ζυμώσεις, ενώ ένα μικρό ποσοστό παράγεται από την χρήση αιθενίου. Σύμφωνα με την οδηγία 2003/30/EK (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2003) η αιθανόλη που παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων καλείται βιοαιθανόλη. Χαρακτηρίζεται ως πολλά υποσχόμενη ανανεώσιμη και εναλλακτική πηγή ενέργειας, καθώς αξιοποιούνται διαφορετικά τα αγροτικά προϊόντα και θεωρείται κατάλληλη για την αντικατάσταση του πετρελαίου (το οποίο προκαλεί ανησυχία για το περιβαλλοντικό του αποτύπωμα αλλά και για την ραγδαία αύξηση της τιμής του εξαιτίας της εξάντλησης των πηγών του) (Sarris & Papanikolaou, 2016).

Αρκετές είναι οι χώρες οι οποίες έχουν επενδύσει στην παραγωγή αιθανόλης, με κυρίαρχες τις ΗΠΑ και την Βραζιλία (Balat and Balat, 2008). Στην Ελλάδα, δεν

έχουν γίνει ακόμη επενδύσεις στον τομέα αυτό, με αποτέλεσμα να γίνεται εισαγωγή αιθανόλης κυρίως για χρήση σε αλκοολούχα ποτά και παραγωγή οινοπνεύματος (Ιωαννίδης, 2013).

Στην παρούσα μελέτη, μέσω της παρατήρησης της βιοκινητικής συμπεριφοράς νέων, προσφάτως απομονωμένων στελεχών ζυμομυκήτων, διερευνάται η δυνατότητα παραγωγής βιοαιθανόλης σε εργαστηριακή κλίμακα σε συνθετικά υποστρώματα γλυκόζης αλλά και η εύρεση κατάλληλων στελεχών ζυμομυκήτων για την βιομηχανία του οίνου.

1.11 ΣΚΟΠΟΣ

Στην οινοποίηση, πλήθος μελετών ασχολείται με την επιλογή των κατάλληλων ζυμομυκήτων με στόχο την παραγωγή οίνων καλύτερης ποιότητας όσον αφορά την χημική τους σύσταση και τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Η ενίσχυση των χαρακτηριστικών της εκάστοτε ποικιλίας και η στροφή των τελευταίων χρόνων σε όσο το δυνατόν πιο φυσικά προϊόντα καθιστά την επιλογή της ζύμης ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για κάθε οινοποιό.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αλκοολικής ζύμωσης τεσσάρων νέων στελεχών ζυμομυκήτων των γενών *Torulaspora*, *Hanseniaspora* και *Saccharomyces* και η συμπεριφορά τους αρχικά σε συνθετικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση σακχάρου 70g/l. Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν ασυνεχείς (batch) σε κωνικές φιάλες, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο θάλαμο στους $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, υπό ανάδευση 180 ± 5 rpm. Οι διεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες χωρίς αερισμό με πηγή άνθρακα την γλυκόζη και το pH κυμαινόταν μεταξύ των τιμών 5-6.

Η αρχική συγκέντρωση σακχάρου που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την αναπνευστική δραστηριότητα των ζυμομυκήτων. Η παρεμπόδιση αυτή περιγράφεται από το φαινόμενο Crabtree. Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την παρατήρηση των στελεχών που επιλέχθηκαν ως προς το φαινόμενο αυτό.

Απώτερος σκοπός είναι η περαιτέρω μελέτη και η ανάλυση της συμπεριφοράς των στελεχών αυτών σε φυσικό υπόστρωμα γλεύκους, με στόχο την παραγωγή οίνων με ιδιαίτερες οργανοληπτικές ιδιότητες, ώστε να αποκτήσουν ξεχωριστή θέση στην αγορά.

Η επιστημονική γνώση μέσω της εφαρμοσμένης μικροβιακής βιοχημείας, βιοτεχνολογίας και της μικροβιολογίας του οίνου θα μπορούσε να βελτιστοποιήσει την οινοποίηση, με αποτέλεσμα την υψηλή ποιότητα στο ελληνικό τυποποιημένο οίνο, με βάση αποκλειστικά φυσικούς πόρους (αρχικές ελληνικές ποικιλίες, τοπικά απομονωμένα και ταυτοποιημένα είδη ζυμομυκήτων). Άρα, κρίνεται απαραίτητο να γίνουν εκτεταμένες έρευνες σχετικά με νέους μικροοργανισμούς και νέα στελέχη ζυμομυκήτων, ώστε να επιτευχθούν οι παραπάνω στόχοι.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά στελέχη ζυμών. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *Torulaspora delbrueckii* OSV1EFL1, το στέλεχος *Hanseniaspora opuntiae* OST1GW2 και το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* OST2EFW10 τα οποία απομονώθηκαν από αμπελώνες της Σαντορίνης καθώς και το στέλεχος *Hanseniaspora uvarum* OAM2MFW1, το οποίο απομονώθηκε από αμπελώνα της Αττικής.

Η διατήρηση των στελεχών γινόταν σε κεκλιμένους σωλήνες πληρωμένους με θρεπτικό μέσο YPDA (Yeast, Peptone, Dextrose, Agar) στους 4°C. Το θρεπτικό υλικό περιείχε 10g/L γλυκόζη, 10g/L πεπτόνη, 10g/L yeast extract και 20g/L άγαρ. Προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους πραγματοποιούνταν ανανεώσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου, τα στελέχη ανανεώνονταν προκειμένου να είναι ηλικίας περίπου 2-3 ημερών.

2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

2.2.1 Παρασκευή προκαλλιέργειας

Πριν από την έναρξη κάθε πειράματος, παρασκευαζόταν υγρή προκαλλιέργεια. Αυτή αποτελείται από υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPD (Yeast, Peptone, Dextrose), το οποίο προστίθεται σε κωνικές φιάλες των 250ml πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50 ± 1 ml), με ογκομετρικό κύλινδρο. Αφού τοποθετηθεί βαμβάκι και αλουμινόχαρτο στο στόμιο της φιάλης, ακολουθεί αποστείρωση σε θερμοκρασία 120°C για 50λεπτά. Οι φιάλες αφήνονται να κρυώσουν και εμβολιάζονται υπό ασηπτικές συνθήκες με τα κύτταρα της ζύμης. Τέλος, η προκαλλιέργεια τοποθετείται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο για επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία στους 28 ± 1 °C. Μετά από 48ώρες χρησιμοποιείται συγκεκριμένη ποσότητα της προκαλλιέργειας, η οποία αποτελεί το εμβόλιο της ζύμης για τον εμβολιασμό της κύριας καλλιέργειας.

2.2.2 Παρασκευή κύριας καλλιέργειας

Το θρεπτικό μέσο της κύριας καλλιέργειας περιείχε ως μοναδική πηγή άνθρακα την γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 70g/L. Σε καμία ζύμωση δεν χρησιμοποιήθηκε περιοριστικός παράγοντας. Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν πεπτόνη 5g/L και yeast extract 5g/L. Τέλος, προστέθηκαν τα παρακάτω άλατα:

Πίνακας 1: Σύσταση μεταλλικών αλάτων (Paranikolaou et al., 2001)

ΕΝΩΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (g/L)
MnSO ₄ *H ₂ O	0,06
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,50
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,02
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,15
FeCl ₃ *6H ₂ O	0,15
KH ₂ PO ₄	7,00
Na ₂ HPO ₄	2,50

Αφού παρασκευάστηκε η κύρια καλλιέργεια προσθέτοντας όλα τα συστατικά και το απιονισμένο νερό, μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες των 250ml πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50±1 ml), με ογκομετρικό κύλινδρο. Η αρχική τιμή του pH ήταν 5,5. Ακολούθησε αποστείρωση και στη συνέχεια, οι φιάλες εμβολιάστηκαν με 1ml εμβολίου υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, οι φιάλες τοποθετούνται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο, προς επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180±5 rpm και θερμοκρασία στους 28±1 °C. Όλες οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν ζυμώσεις βυθού και το pH κατά την διάρκεια των ζυμώσεων κυμαινόταν μεταξύ των τιμών 5 και 6.

2.3 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

2.3.1 Προσδιορισμός βιομάζας

Έπειτα από παραλαβή του υγρού της ζύμωσης σε falcon tube, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε τύπου Universal 320R Hettich Zentrifugen για 10 λεπτά, στις 9000 στροφές και στους 4°C, προκειμένου να διαχωριστεί η βιομάζα από το υπερκείμενο υγρό. Μετά από έκπλυση με απιονισμένο νερό, ακολουθούν 2 ακόμη φυγοκεντρήσεις στις ίδιες συνθήκες. Στην συνέχεια, η νωπή βιομάζα παραλαμβάνεται με απιονισμένο νερό και μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney, τα οποία τοποθετούνται σε φούρνο τύπου Gallenkamp oven BS OV-160 προς ξήρανση στους 70°C. Τέλος, μετά το πέρας της ξήρανσης, το φιαλίδιο ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό τύπου KERN EW 420-3NM και από την διαφορά του βάρους υπολογίζεται η παραγόμενη βιομάζα, η οποία εκφράζεται σε g/L.

2.3.2 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν, προσδιορίστηκαν ποσοτικά οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες, με διαδικασία βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου, το οποίο προτάθηκε από τους Liang et al., 2009.

Αρχικά παραλαμβάνονται 0,05g ξηρής βιομάζας, τα οποία τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στην συνέχεια, προστίθενται 10ml υδροχλωρικού οξέος με συγκέντρωση 2M (HCl, 2M), με σκοπό την όξινη υδρόλυση των κυττάρων, σε υδατόλουτρο στους 80°C για 30 λεπτά. Αφού τα δείγματα κρυώσουν, προστίθενται 10ml υδροξειδίου του νατρίου με συγκέντρωση 2M (NaOH, 2M) προς εξουδετέρωση του HCl και ακολουθεί διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί, με στόχο να απομακρυνθεί η βιομάζα και το διήθημα να καταστεί διαυγές. Τέλος, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών, εφαρμόστηκε η φασματομετρική μέθοδος προσδιορισμού αναγόντων σακχάρων με χρήση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959).

Σύμφωνα με την μέθοδο, σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 0,5ml αντιδραστήριου DNS και 0,5ml δείγματος, ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος σε κυκλοαναμκτήρα (vortex) και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 5 λεπτά ακριβώς. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται να κρυώσουν και προστίθενται 5ml απιονισμένου νερού και μετά από ανάδευση του διαλύματος, ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 540nm με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης (g/L).

2.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

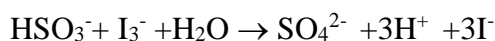
Για την εκχύλιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού λίπους ακολούθησε η παρακάτω πειραματική πορεία:

- Το φιαλίδιο McCartney, μέσα στο οποίο βρίσκεται η ξηρή βιομάζα, συμπληρώνεται με μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης σε αναλογία 2:1 ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1) (Folch et al., 1957; Papanikolaou et al., 2001). Το φιαλίδιο φυλάσσεται κλείσιμο αεροστεγώς στο σκοτάδι, προκειμένου να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων του λίπους για 72 ώρες με στόχο την εκχύλιση του λίπους.

- Διήθηση του περιεχόμενου του φιαλιδίου για απομάκρυνση της βιομάζας, σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη.
- Εξάτμιση του διηθήματος υπό κενό στους 40°C με την βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα τύπου Flash Evaporator- Rotavapor R-114, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να παραμείνει στην σφαιρική φιάλη μόνο το μικροβιακό λίπος.
- Τέλος, η σφαιρική φιάλη ζυγίζεται με την βοήθεια ζυγού ακριβείας και από την διαφορά μάζας υπολογίζεται το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος, το οποίο εκφράζεται σε g/L.

2.3.4 Προσδιορισμός ολικού SO₂

Ο προσδιορισμός του θειώδη ανυδρίτη βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση του διοξειδίου του θείου με το ιώδιο (I₂) ως εξής:



Η οξείδωση γίνεται σε ισχυρά όξινο περιβάλλον, διαφορετικά το ιώδιο αντιδρά με πολυφαινόλες, σάκχαρα, αλδεϋδες και άλλους αναγωγικούς παράγοντες.

Υλικά και εξοπλισμός:

- Διάλυμα θειϊκού οξέος H₂SO₄ 1/3
- Διάλυμα υδροξυλίου του νατρίου NaOH 5N
- Ποτήρι ζέσεως
- Σιφόνιο
- Ελαστικό poire

Διαδικασία προσδιορισμού:

Αρχικά, χρησιμοποιώντας το poire της συσκευής γεμίζουμε την προχοΐδα μέχρι ο τίτλος να φτάσει στο μηδέν. Μεταφέρονται στο κατάλληλο ποτήρι ζέσεως της συσκευής 20ml δείγματος και 2ml NaOH 5N, αναδεύονται ήπια και αφήνονται για 10 λεπτά σε ηρεμία. Στην συνέχεια, προστίθενται 4ml H₂SO₄ 1/3 (πυκνό θειϊκό οξύ αραιωμένο κατά 1/3). Το ποτήρι τοποθετείται πάνω στον κινητό δίσκο της βάσης τιτλοδότησης. Στην συνέχεια, ενεργοποιείται ο αναδευτήρας με το πλήκτρο start/stop και έπειτα από 4-5 sec πατάμε το κουμπί τιτλοδότησης. Το διάλυμα τιτλοδότησης (ιώδιο) ξεκινά να προστίθεται και ενεργοποιούνται προοδευτικά τα πορτοκαλί LEDs.

Στο τέλος της αντίδρασης, ακούγεται χαρακτηριστικός ήχος και με το κουμπί start/stop τα LEDs απενεργοποιούνται. Σημειώνεται η ένδειξη της προχοΐδας, η οποία δείχνει τα ml του ιωδίου που καταναλώθηκαν.

Έκφραση αποτελεσμάτων

Η συγκέντρωση του ολικού SO₂ δίνεται απευθείας από την ένδειξη της προχοΐδας και εκφράζεται σε mg SO₂ / L.

2.3.5 Προσδιορισμός αιθανόλης, γλυκερόλης και γλυκόζης με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης, της γλυκερόλης και της αιθανόλης πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε διαθέτει συνδυασμό ανιχνευτών UV και RI, ενώ η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των ουσιών ήταν η Phenomenex®, Rezex™ ROA-Organic Acid H+ 8%. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θειϊκού οξέος (H₂SO₄) με συγκέντρωση 5mM και ο ρυθμός ροής ήταν 0,5 mL/min. Η θερμοκρασία ήταν 60°C και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 31 min.

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και υπολογίστηκαν με την βοήθεια πρότυπων καμπυλών που προηγήθηκαν και εκφράστηκαν σε g/L.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθενται όλα τα πειραματικά αποτελέσματα, τα οποία συγκεντρώθηκαν από την μελέτη της κινητικής όλων των ζυμώσεων, καθώς και τα πειραματικά αποτελέσματα από τις διάφορες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν. Για κάθε στέλεχος, πραγματοποιήθηκαν 2 επαναληπτικές ζυμώσεις.

Συγκεκριμένα, από καθεμία ζύμωση και για κάθε στέλεχος μετρήθηκαν τα εξής δεδομένα: παραγωγή βιομάζας, παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, καταναλωθείσα γλυκόζη, παραγωγή μικροβιακού λίπους και παραγωγή αιθανόλης. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των παρακάτω παραμέτρων της μικροβιακής ανάπτυξης:

- Συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ($Y_{L/X}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα (g/g)

$$Y_{L/X} = \frac{\text{Παραγόμενο Ενδοκυτταρικό Λίπος L}}{\text{Παραγόμενη Ξηρή Βιομάζα X}}$$

- Συντελεστής απόδοσης βιομάζας ($Y_{X/S}$) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

$$Y_{X/S} = \frac{\text{Παραγόμενη Ξηρή Βιομάζα X}}{\text{Καταναλωθέν Υπόστρωμα S}}$$

- Συντελεστής ενδοπολυσακχαριτών ($Y_{IPS/X}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα (% w/w)

$$Y_{IPS/X} = \frac{\text{Παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες}}{\text{Παραγόμενη Ξηρή Βιομάζα X}}$$

Όλες οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν είχαν ως πηγή άνθρακα την γλυκόζη, η οποία επιλέχθηκε επειδή ανήκει στα φυσικά σάκχαρα που απαντώνται στο γλεύκος. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 70 g/L για όλους τους μικροοργανισμούς.

3.1 Αλκοολική ζύμωση του *Torulaspora delbrueckii* σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

Στο παράρτημα (πίνακας 6), παρουσιάζονται αναλυτικά για το στελέχος *Torulaspora delbrueckii* οι παράμετροι που μελετήθηκαν στην εξέλιξη του χρόνου. Απεικονίζονται η ανάπτυξη της βιομάζας, η κατανάλωση της γλυκόζης, ο προσδιορισμός του ενδοκυτταρικού λίπους και η παραγόμενη αιθανόλη. Από τα στοιχεία αυτά, υπολογίστηκε ο συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την βιομάζα που παράχθηκε, ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το υπόστρωμα που καταναλώθηκε και ο συντελεστής των ενδοπολυσακχαριτών ως προς την βιομάζα που παράχθηκε.

Πίνακας 2: Μέγιστα σημεία των ζυμώσεων βυθού του στελέχους *T.delbrueckii* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

	T (h)	X (g/L)	Gl _{cons} (g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{L/X} (g/g)	EtOH (g/L)
γ	4	0,35	4,5	0,100	0,078	0,00	0,286	0,00
β	8	2,09	7,1	0,560	0,292	12,10	0,268	0,00
δ	18	8,21	73,3	0,004	0,112	28,00	0,001	25,91
α, ε	24	9,38	74,2	0,177	0,126	23,80	0,019	28,15

α= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

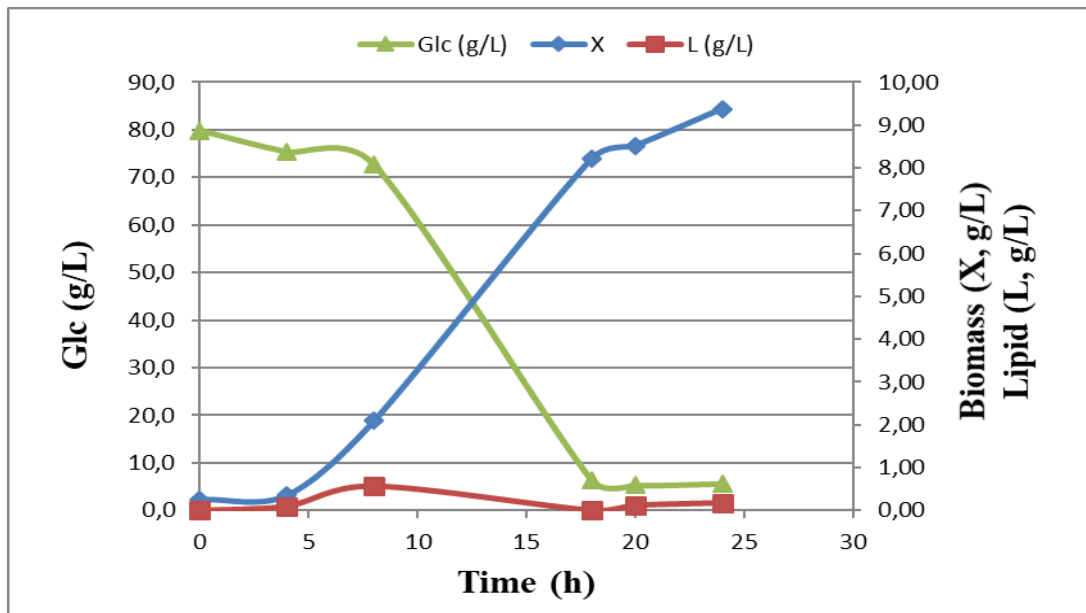
β= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

γ= Το σημείο με το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηρής βιομάζας (g/g).

δ= Το σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (% w/w).

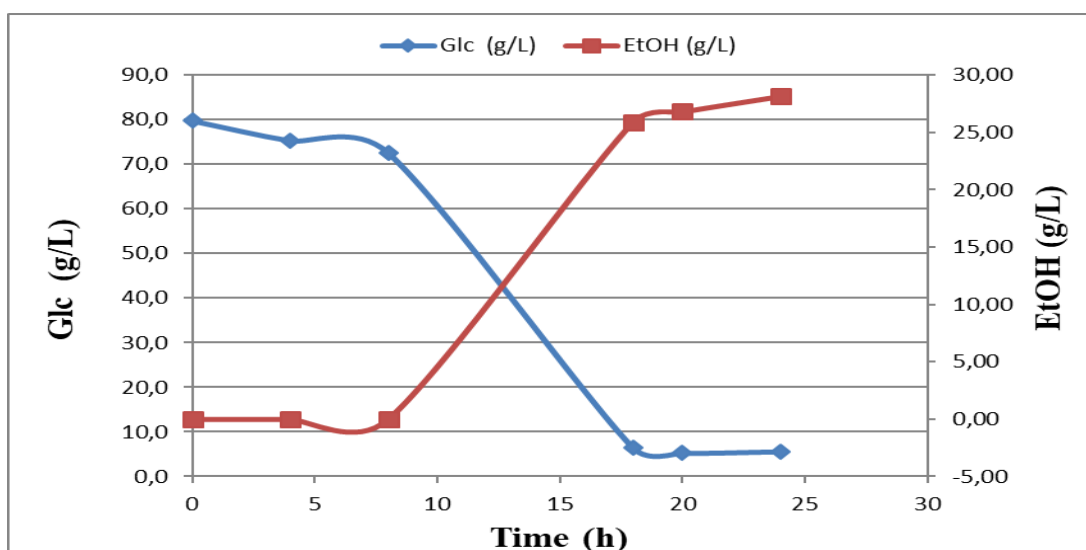
ε= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή αιθανόλης (g/L).

Στον πίνακα 2, υπογραμμίζονται τα μέγιστα των παραμέτρων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Παρατηρήθηκε ότι η βιομάζα αυξάνεται συνεχώς στο χρονικό διάστημα που μελετήσαμε, στο οποίο καταναλώνεται και όλο το ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκόζης. Η μέγιστη ποσότητα παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους σημειώνεται στις 8 ώρες ενώ η μέγιστη ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης σημειώνεται στις 24 ώρες από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, όπως και η παραγόμενη βιομάζα.



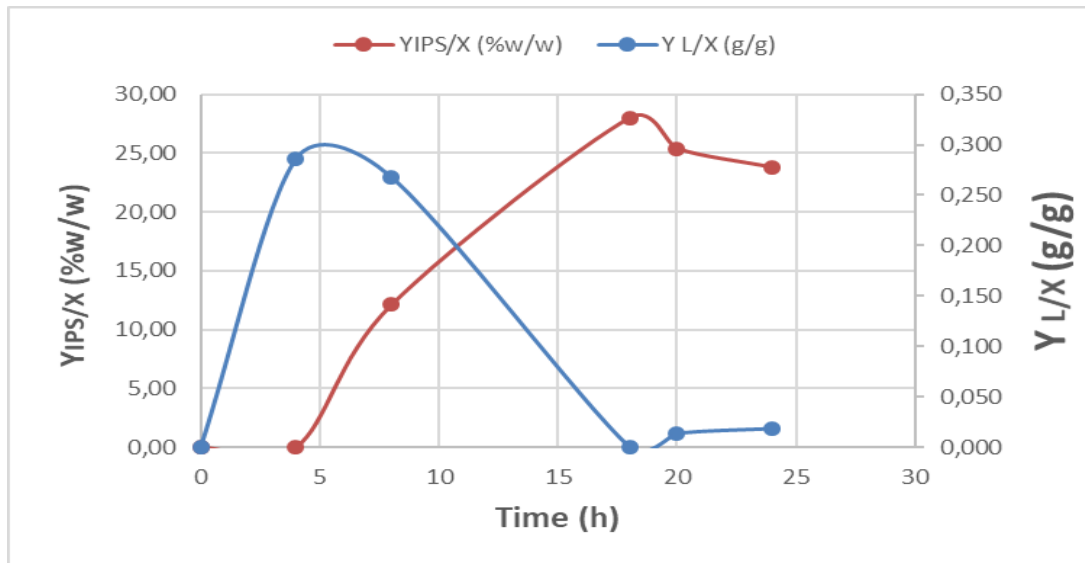
Γράφημα 1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *T. delbrueckii* ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 1, παρατηρούμε την συνεχή κατανάλωση της γλυκόζης με αναμενόμενο αποτέλεσμα την συνεχή αύξηση της ξηρής βιομάζας. Ακόμη και μετά την κατανάλωση του σακχάρου, η παραγόμενη βιομάζα δείχνει να αυξάνεται, γεγονός που αποδίδεται είτε στην προσαρμογή του ζυμομύκητα στο περιβάλλον που έχει δημιουργηθεί, είτε σε πιθανή ανακατανάλωση της αιθανόλης, αν και αυτό θα χρειαζόταν περισσότερα σημεία για να είναι ξεκάθαρο. Όσον αφορά το λίπος, παρατηρούμε ότι καθ' όλη την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δεν παράγεται αξιοσημείωτη ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους.



Γράφημα 2: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή αιθανόλης του *T. delbrueckii* ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 2, παρατηρούμε την συνεχή κατανάλωση της γλυκόζης με αποτέλεσμα την συνεχή παραγωγή της αιθανόλης. Αυτό είναι και το πιο αναμενόμενο αποτέλεσμα της δράσης των ζυμομυκήτων.



Γράφημα 3: Κινητικά δεδομένα για τον συντελεστή των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την παραγόμενη βιομάζα και τον συντελεστή του παραγόμενου λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα του μικροοργανισμού *T. delbrueckii* ως προς τον χρόνο.

3.2 Αλκοολική ζύμωση του *Hanseniaspora uvarum* σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

Στο παράρτημα (πίνακας 7), παρουσιάζονται αναλυτικά για το στελέχος *Hanseniaspora uvarum* οι παράμετροι που μελετήθηκαν, στην εξέλιξη του χρόνου. Απεικονίζονται η ανάπτυξη της βιομάζας, η κατανάλωση της γλυκόζης, η παραγόμενη αιθανόλη και ο προσδιορισμός του ενδοκυτταρικού λίπους. Από τα στοιχεία αυτά, υπολογίστηκε ο συντελεστής των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την βιομάζα που παράχθηκε, ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το υπόστρωμα που καταναλώθηκε και ο συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την βιομάζα που παράχθηκε.

Πίνακας 3: Μέγιστα σημεία των ζυμώσεων βυθού του στελέχους *H.uvarum* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

	T (h)	X (g/L)	GlCcons(g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	EtOH (g/L)
α	12	2,73	35,94	0,090	0,076	0,055	7,18
β, γ, δ	60	2,08	52,89	0,102	0,039	0,100	10,08

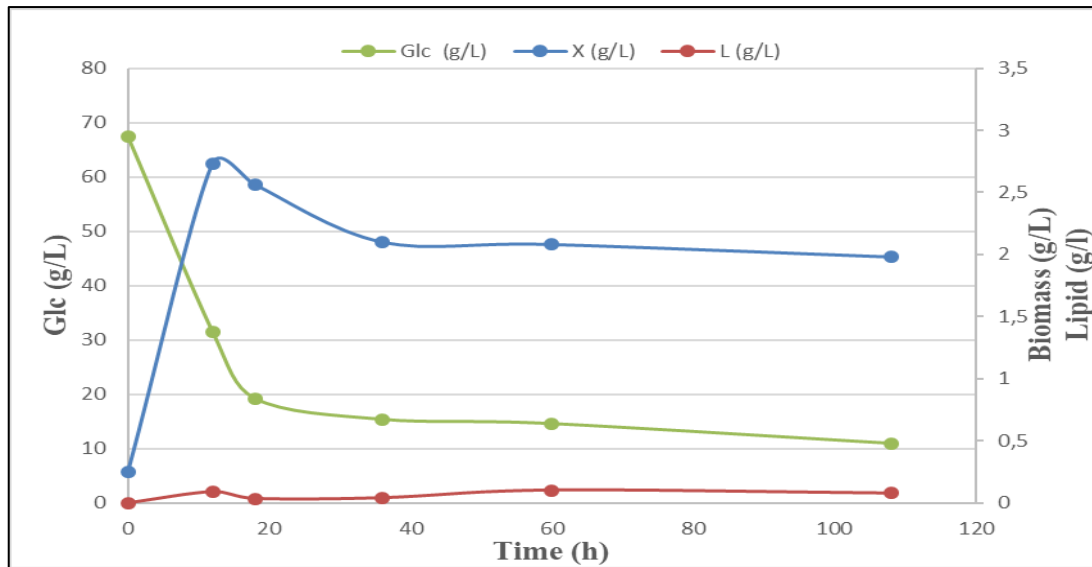
α= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

β= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

γ= Το σημείο με το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηρής βιομάζας (g/g).

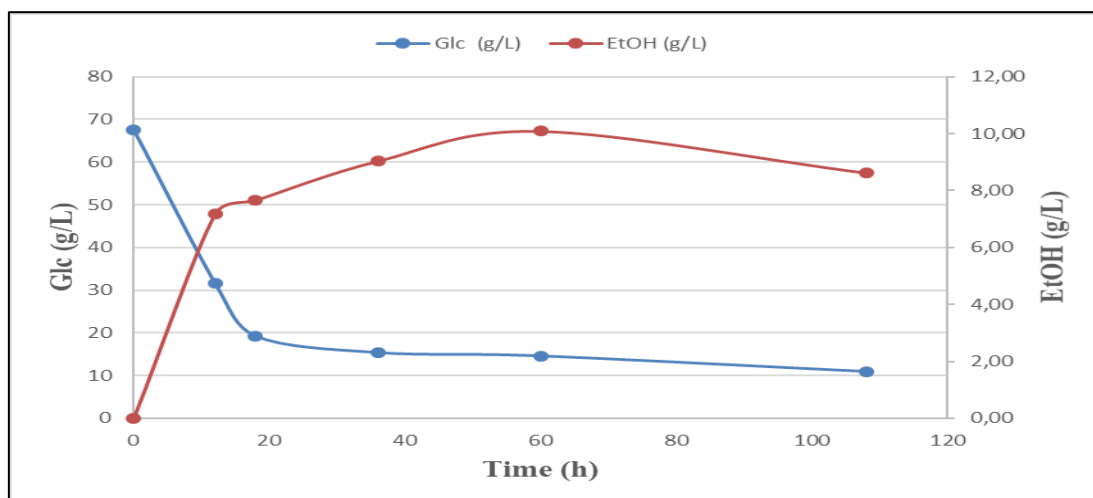
δ= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή αιθανόλης (g/L).

Στον πίνακα 3, υπογραμμίζονται τα μέγιστα των παραμέτρων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η βιομάζα σημειώνει αύξηση στις πρώτες 12 ώρες από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ το ίδιο διάστημα παρατηρείται και η μεγαλύτερη κατανάλωση της ποσότητας του υποστρώματος. Τις επόμενες ώρες η παραγόμενη ξηρή βιομάζα παραμένει σχεδόν σταθερή μέχρι το τέλος της ζύμωσης, ενώ η γλυκόζη καταναλώνεται με πιο αργό ρυθμό. Η μέγιστη ποσότητα παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους αλλά και η μέγιστη ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης σημειώνεται στις 60 ώρες, από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, το σημείο όπου παρατηρήθηκε και η μέγιστη κατανάλωση γλυκόζης.



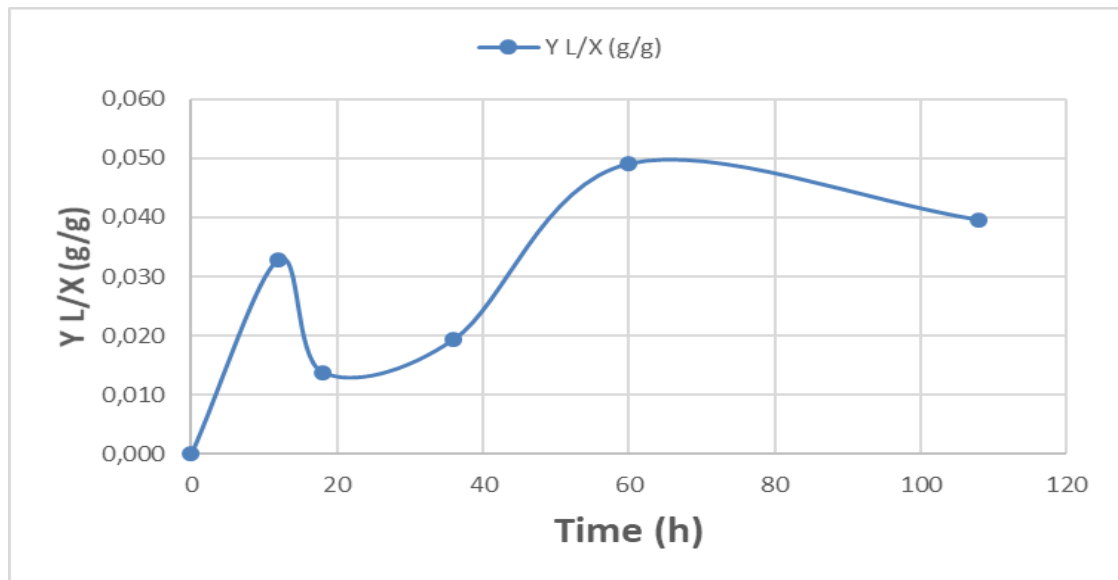
Γράφημα 4: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *H. uvarum* ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 4, παρατηρούμε την συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης της γλυκόζης και της αύξησης της ξηρής βιομάζας. Η αύξηση της παραγόμενης βιομάζας είναι ταχεία όσο το μέσο είναι πλούσιο σε σάκχαρα, ενώ σημειώνει σημαντική μείωση όταν η γλυκόζη έχει σχεδόν καταναλωθεί. Στην συνέχεια, παρατηρείται σταθεροποίηση της παραγόμενης βιομάζας, η οποία οφείλεται στην προσαρμογή του ζυμομύκητα στο περιβάλλον που έχει δημιουργηθεί αλλά και στην ανακατανάλωση της αιθανόλης από εκείνο το σημείο και μετά, όπως φαίνεται και στο επόμενο γράφημα. Όσον αφορά το λίπος, παρατηρούμε ότι καθ' όλη την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δεν παράγεται αξιοσημείωτη ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους.



Γράφημα 5: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή αιθανόλης του *H. uvarum* ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 5, παρατηρούμε την συνεχή κατανάλωση της γλυκόζης με αποτέλεσμα την συνεχή παραγωγή της αιθανόλης. Έπειτα από τις 60 ώρες, παρατηρούμε επίσης και σταδιακή μείωση της παραγόμενης αιθανόλης, προς κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του ζυμομύκητα.



Γράφημα 6: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή του συντελεστή παραγόμενου λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα του μικροοργανισμού *H. uvarum* ως προς τον χρόνο.

3.3 Αλκοολική ζύμωση του *Saccharomyces cerevisiae* σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

Στο παράρτημα (πίνακας 8), παρουσιάζονται αναλυτικά για το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* οι παράμετροι που μελετήθηκαν, στην εξέλιξη του χρόνου. Απεικονίζονται η ανάπτυξη της βιομάζας, η κατανάλωση της γλυκόζης, η παραγόμενη αιθανόλη και ο προσδιορισμός του ενδοκυτταρικού λίπους. Από τα στοιχεία αυτά, υπολογίστηκε ο συντελεστής των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την βιομάζα που παράχθηκε, ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το υπόστρωμα που καταναλώθηκε και ο συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την βιομάζα που παράχθηκε.

Πίνακας 4: Μέγιστα σημεία των ζυμώσεων βυθού του στελέχους *S.cerevisiae* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

	T (h)	X (g/L)	Gl _{cons} (g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{L/X} (g/g)	EtOH (g/L)
β, γ	10	4,63	42,5	0,490	0,109	0,00	0,136	17,02
ε	26	8,91	63,1	0,292	0,141	0,18	0,025	25,47
α, δ	48	10,96	64,2	0,217	0,171	4,97	0,022	19,83

α= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

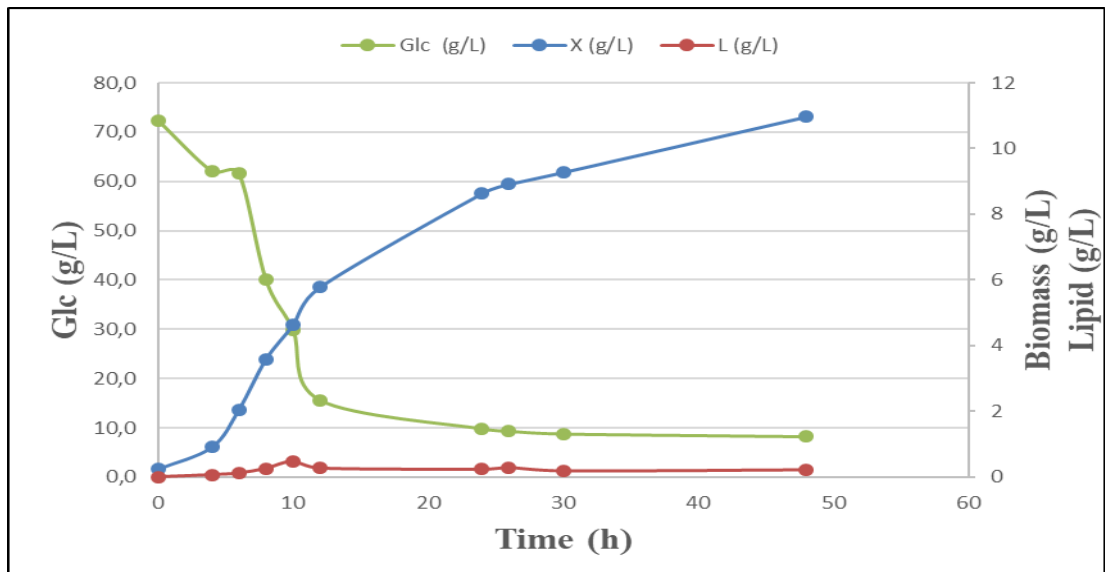
β= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

γ= Το σημείο με το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς βιομάζας (g/g).

δ= Το σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (% w/w).

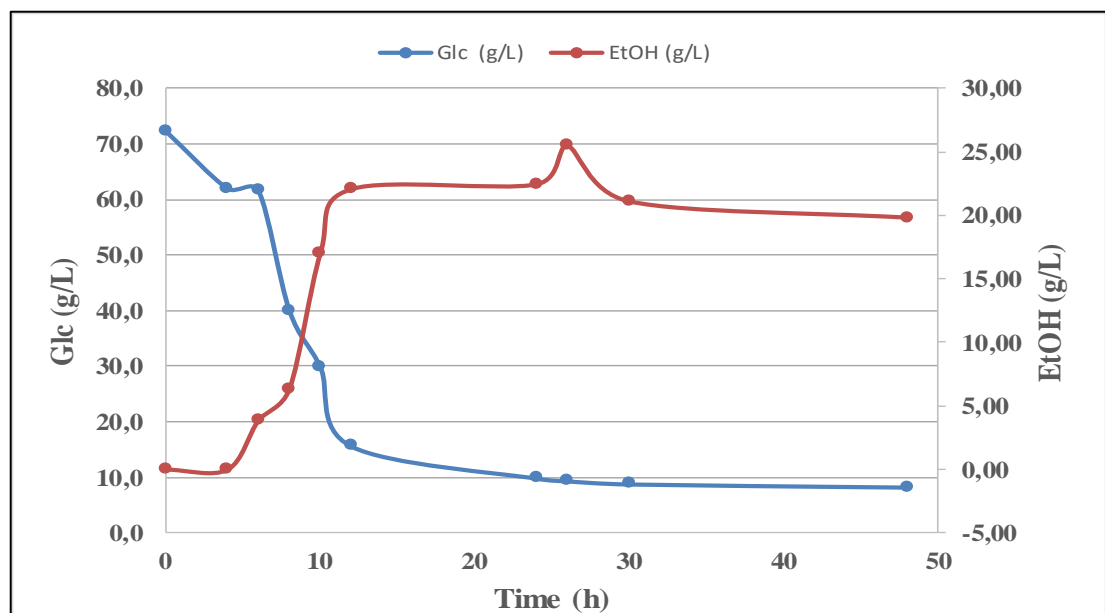
ε= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή αιθανόλης (g/L).

Στον πίνακα 4, υπογραμμίζονται τα μέγιστα των παραμέτρων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Παρατηρήθηκε πως η βιομάζα αυξάνεται συνεχώς στο χρονικό διάστημα που μελετήσαμε, στο οποίο καταναλώνεται και το μεγαλύτερο ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκόζης. Η μέγιστη ποσότητα παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους σημειώνεται στις 10 ώρες ενώ η μέγιστη ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης σημειώνεται στις 26 ώρες από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης.



Γράφημα 7: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *S.cerevisiae* ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 7, παρατηρούμε την συνεχή κατανάλωση της γλυκόζης με αποτέλεσμα την συνεχή αύξηση της ξηρής βιομάζας. Η παραγόμενη βιομάζα συνεχίζει να αυξάνεται ακόμα και μετά την κατανάλωση του σακχάρου του μέσου, γεγονός που οφείλεται στην κατανάλωση της αιθανόλης, έπειτα από την σημαντική μείωση της γλυκόζης, όπως φαίνεται και στο επόμενο γράφημα. Όσον αφορά το λίπος, παρατηρούμε ότι καθ' όλη την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δεν παράγεται αξιοσημείωτη ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους.



Γράφημα 8: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή αιθανόλης του μικροοργανισμού *S.cerevisiae* ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 8, παρατηρούμε την συνεχή κατανάλωση της γλυκόζης με αποτέλεσμα την συνεχή παραγωγή της αιθανόλης. Αυτό είναι και το πιο αναμενόμενο αποτέλεσμα της δράσης των ζυμομυκήτων. Έπειτα από τις 26 ώρες, παρατηρούμε και μια μικρή μείωση στην παραγόμενη αιθανόλη, η οποία αποδίδεται σε κατανάλωση από τον ζυμομύκητα προς κάλυψη των ενεργειακών του αναγκών, λόγω εξάντλησης του σακχάρου.

3.4 Αλκοολική ζύμωση του *Hanseniaspora oruntiae* σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

Στο παράρτημα (πίνακας 9), παρουσιάζονται αναλυτικά για το στελέχος *Hanseniaspora oruntiae* οι παράμετροι που μελετήθηκαν, στην εξέλιξη του χρόνου. Απεικονίζονται η ανάπτυξη της βιομάζας, η κατανάλωση της γλυκόζης, η παραγόμενη αιθανόλη και ο προσδιορισμός του ενδοκυτταρικού λίπους. Από τα στοιχεία αυτά, υπολογίστηκε ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το υπόστρωμα που καταναλώθηκε και ο συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την βιομάζα που παράχθηκε.

Πίνακας 5: Μέγιστα σημεία των ζυμώσεων βουθού του στελέχους *H. oruntiae* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L

	T (h)	X (g/L)	Glccons(g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	EtOH (g/L)
β, γ, δ	42	4,63	42,5	0,158	0,109	0,032	19,11
α	108	9,74	64,2	0,217	0,171	0,022	19,83

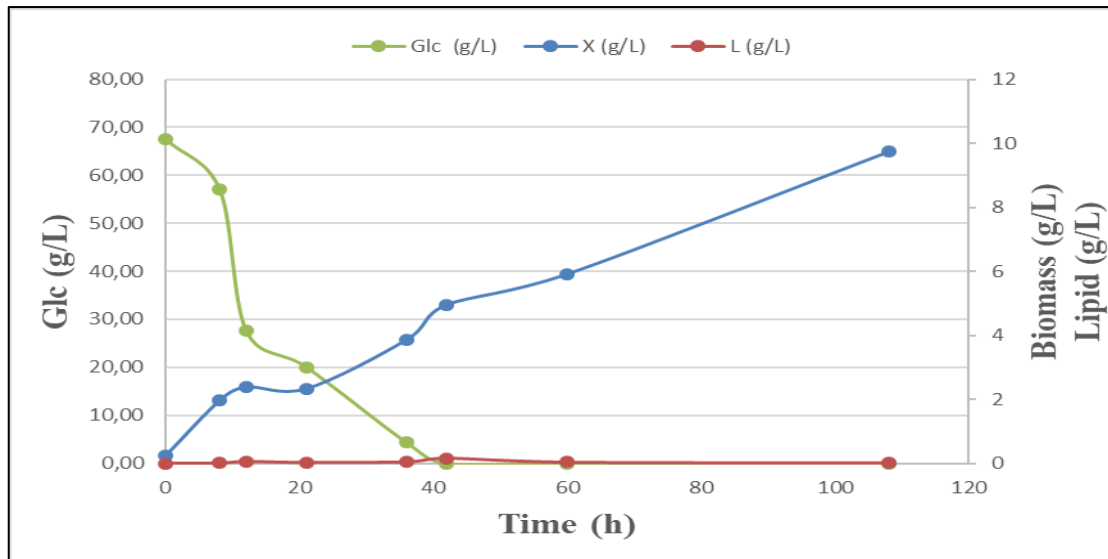
α= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

β= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

γ= Το σημείο με το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηρής βιομάζας (g/g).

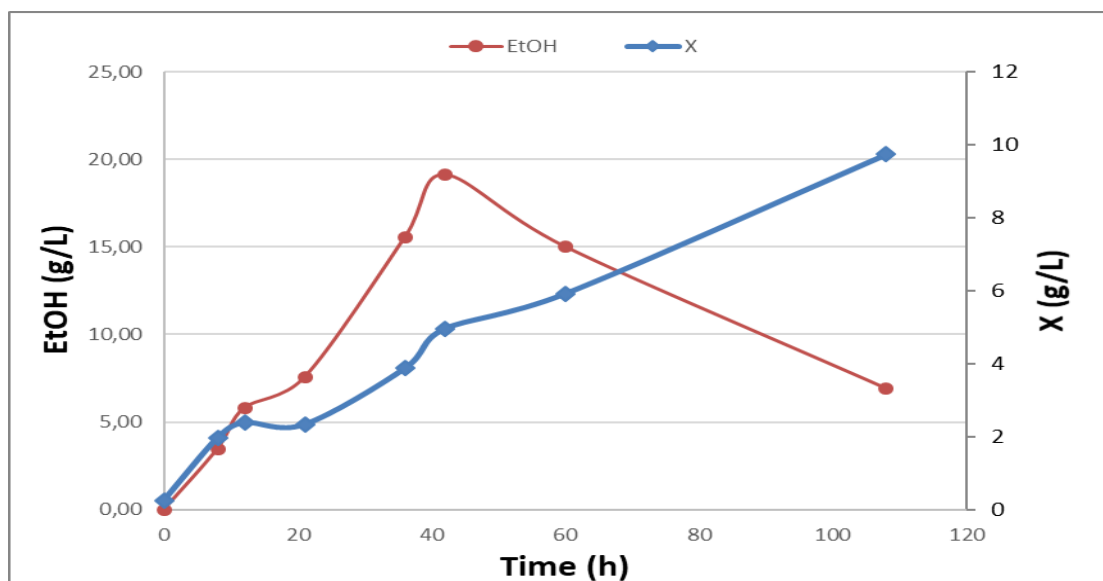
δ= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή αιθανόλης (g/L).

Στον πίνακα 5, υπογραμμίζονται τα μέγιστα των παραμέτρων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Παρατηρήθηκε ότι η βιομάζα αυξάνεται στο χρονικό διάστημα που μελετήσαμε, στο οποίο καταναλώνεται όλη η ποσότητα της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκόζης. Η μέγιστη ποσότητα παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους σημειώνεται στις 42 ώρες από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, όπως και η μέγιστη ποσότητα παραγόμενης αιθανόλης. Ακόμη, υπολογίστηκε ο συντελεστής παραγόμενου λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα.



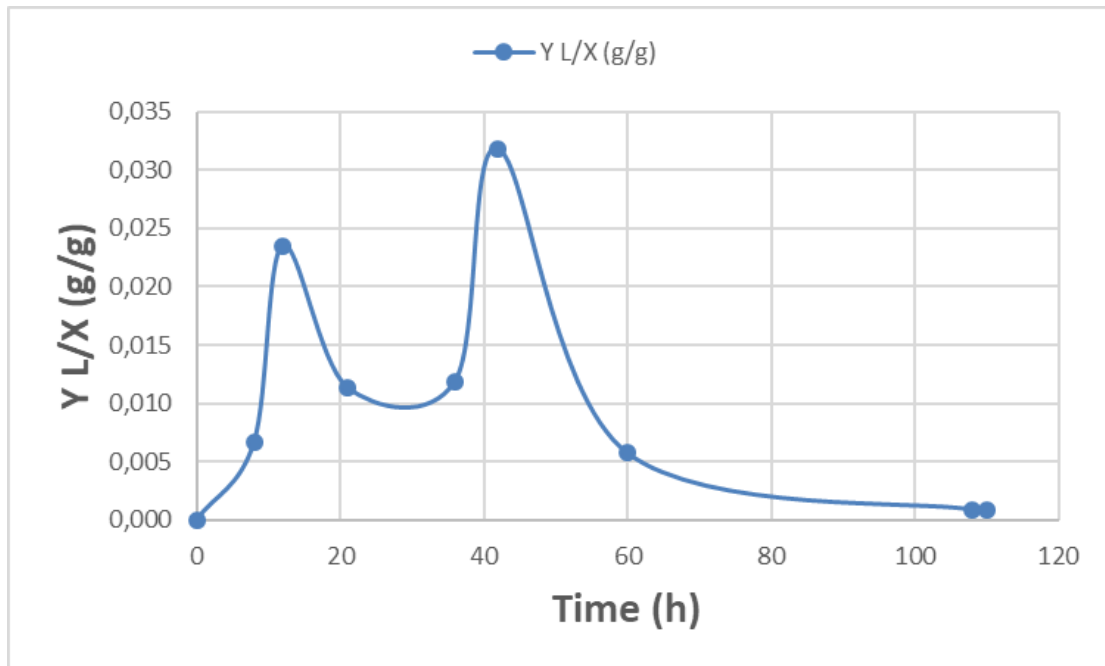
Γράφημα 9: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *H. oruntiae* ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 9, παρατηρούμε την συνεχή κατανάλωση της γλυκόζης με αποτέλεσμα την αύξηση της ξηρής βιομάζας. Η παραγόμενη βιομάζα σημειώνει μικρή μείωση στα στάδια της ζύμωσης όπου τα σάκχαρα μειώνονται σημαντικά. Στην συνέχεια, ο μικροοργανισμός προσαρμόζεται στο περιβάλλον που έχει δημιουργηθεί και η συνεχής αύξηση της παραγόμενης βιομάζας οφείλεται στην κατανάλωση της αιθανόλης (έπειτα από την μείωση του σακχάρου στο μέσο, όπως φαίνεται και στο επόμενο γράφημα). Όσον αφορά το λίπος, παρατηρούμε ότι καθ' όλη την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δεν παράγεται αξιοσημείωτη ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους.



Γράφημα 10: Κινητικά δεδομένα για την παραγωγή αιθανόλης και βιομάζας του *H. oruntiae* ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 10, παρατηρείται η συνεχόμενη αύξηση της βιομάζας καθώς η παραγόμενη αιθανόλη μειώνεται με ταχύ ρυθμό. Αυτό οφείλεται στην ανακατανάλωση της αιθανόλης προς κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του ζυμομύκητα. Η αιθανόλη αποτελεί την μοναδική πηγή άνθρακα έπειτα από την κατανάλωση του σακχάρου και ο ζυμομύκητας την χρησιμοποιεί για την περαιτέρω ανάπτυξή του.



Γράφημα 12: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή του συντελεστή παραγόμενου λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα του μικροοργανισμού *H. oruntiae* ως προς τον χρόνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

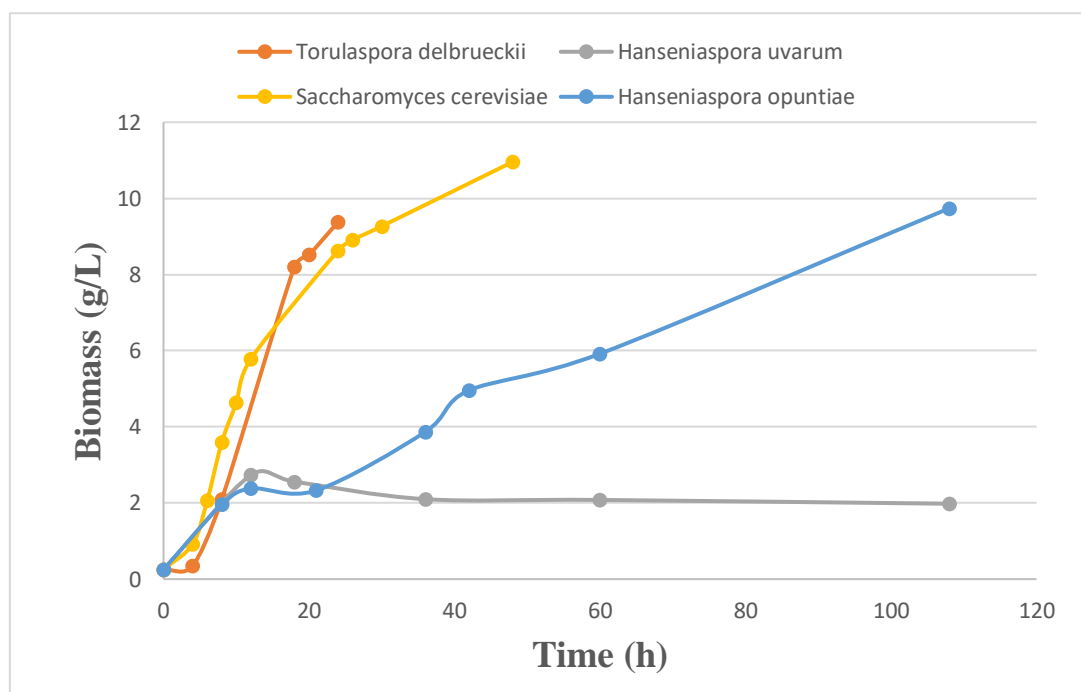
Η επιλογή της κατάλληλης ζύμης για την οινοποίηση στηρίζεται στις ιδιότητες του εκάστοτε ζυμομύκητα που επηρεάζουν την σύσταση, την ποιότητα και τον χαρακτήρα του οίνου, τις ιδιότητες που επηρεάζουν την διαδικασία της οινοποίησης και την απόδοση, αλλά και τις ιδιότητες που σχετίζονται με την μαζική παραγωγή των ζυμομυκήτων και την διάθεσή τους στο εμπόριο.

Ένα από τα απαραίτητα χαρακτηριστικά ενός ζυμομύκητα αποτελεί η σχετικά γρήγορη αλλά και πλήρης ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους. Ο ζυμομύκητας που θα ολοκληρώσει την ζύμωση θα πρέπει να είναι αλκοολοανθεκτικός αλλά και ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη που προστίθεται κατά την σύνθλιψη του σταφυλιού για την αντιοξειδωτική του δράση, πριν την έναρξη της ζύμωσης. Ακόμη, στην βιομηχανική εφαρμογή, ο ζυμομύκητας θα πρέπει να είναι ανθεκτικός και αποδοτικός στις χαμηλές θερμοκρασίες της οινοποίησης. Για λευκούς οίνους, οι θερμοκρασίες κυμαίνονται συνήθως μεταξύ 12-15 °C, ενώ για ερυθρούς οίνους μεταξύ 18-25 °C. Ένα ακόμη κριτήριο για την επίλογη του κατάλληλου ζυμομύκητα είναι η ομοιόμορφη ανάπτυξη και κατανομή του σε όλο τον όγκο του γλεύκους και η ελάχιστη παραγωγή ιζημάτων και αφρού, ώστε ο όγκος των οινολασπών να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος.

Όσον αφορά την επίδραση του ζυμομύκητα στο τελικό προϊόν, θα πρέπει να μην επηρεάζεται αρνητικά ο οργανοληπτικός χαρακτήρας του οίνου. Συγκεκριμένα, θα πρέπει να μην επηρεάζει το χρώμα του οίνου, να συμβάλλει θετικά στο άρωμα και να επιτρέπει στην εκάστοτε ποικιλία να εκφράσει την τυπικότητά της, ώστε να γίνεται αντιληπτός ο χαρακτήρας της ποικιλίας στον καταναλωτή. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στις ανεπιθύμητες ενώσεις που επηρεάζουν την γεύση και το άρωμα του τελικού προϊόντος, προκαλώντας ελαττωματικές και δυσάρεστες οσμές.

Επιπρόσθετα, ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια, στην μαζική παραγωγή ζυμομυκήτων και την διάθεσή τους στους οινοποιούς, είναι το κόστος παραγωγής, το οποίο θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε το τελικό προϊόν να μην είναι απαγορευτικό για όλο τον κλάδο. Ο ζυμομύκητας θα πρέπει να είναι ανθεκτικός από την παραγωγή μέχρι την χρήση του, αυτό περιλαμβάνει τις διαδικασίες της ξήρανσης, της συσκευασίας και αποθήκευσης, αλλά και την επανυδάτωσή του.

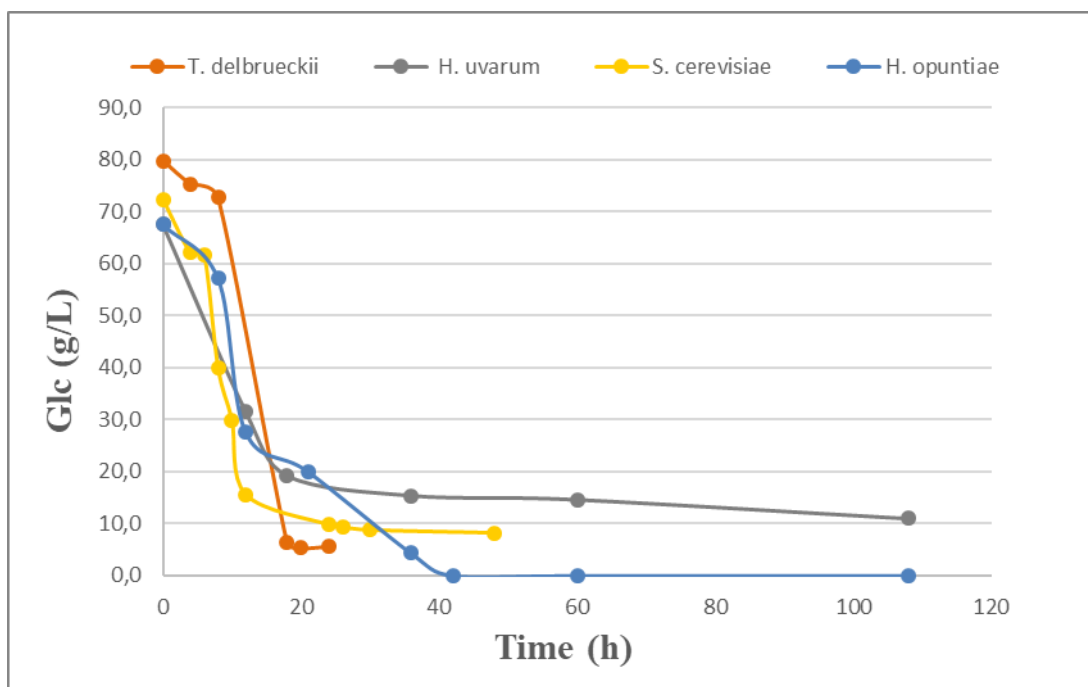
Στην παρούσα έρευνα, η αλκοολική ζύμωση των στελεχών που μελετήθηκαν, δείχνει ότι για κάποια από στελέχη απαιτούνται περαιτέρω πειράματα, τα οποία θα είναι περισσότερο στοχευμένα στην οινοποίηση και στις πραγματικές συνθήκες αυτής. Φαίνεται να υπάρχουν δυνατότητες αξιοποίησης των στελεχών αυτών σαν οινοποιητικές ζύμες. Ακόμα και τα στελέχη που η απόδοσή τους δεν είναι αρκετά μεγάλη ώστε να χρησιμοποιηθούν ως αποκλειστικός ζυμομύκητας σε ζύμωση γλεύκους με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 200-220 g/L, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ζύμες εκκίνησης ή/και σε συνδυασμό με τις ζύμες που χρησιμοποιούνται συνήθως.



Γράφημα 13: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας όλων των στελεχών που μελετήθηκαν, ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 13, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της βιομάζας για όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν, συγκεντρωτικά. Παρατηρήθηκε μεγάλη μεταβλητότητα στην παραγωγή ξηρής βιομάζας και στον χρόνο της κυτταρικής αύξησης. Στο γράφημα διακρίνεται ότι, στα πρώτα στάδια της ζύμωσης, η αύξηση της βιομάζας για τα στελέχη των ζυμομυκήτων *T.delbrueckii* και *S. cerevisiae* είναι ταχεία, ενώ για τα στελέχη *Hanseniaspora*, η αύξηση διαφοροποιείται αρκετά. Για το στέλεχος *H.uvarum* παρατηρείται μικρή αύξηση τις πρώτες ώρες, όμως στα επόμενα στάδια της ζύμωσης η συγκέντρωση της βιομάζας σταθεροποιείται μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Όσον

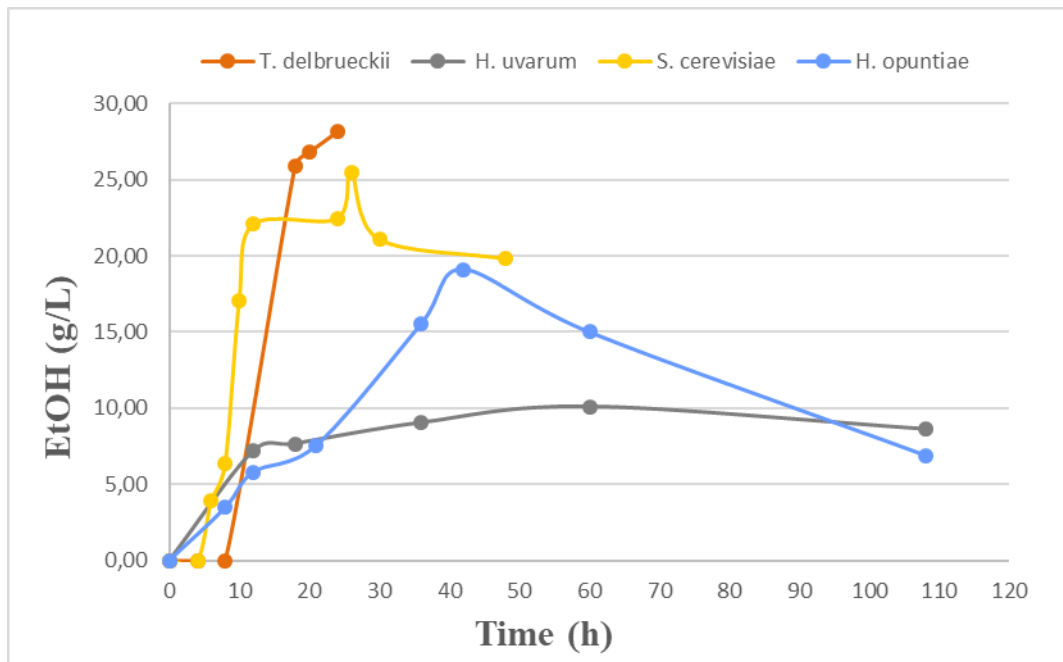
αφορά το *H. opuntiae*, η παραγωγή της βιομάζας αυξάνεται καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης, ακόμη και μετά την κατανάλωση της ποσότητας της γλυκόζης, γεγονός που θα αυξάνει τα ιζήματα (οινολάσπες) σε μια βιομηχανική οινοποίηση.



Γράφημα 14: Κινητικά δεδομένα για την κατανάλωση της γλυκόζης όλων των στελεχών που μελετήθηκαν, ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 14, παριστάνεται η κατανάλωση της γλυκόζης για όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν. Οι ζυμομύκητες φαίνεται να καταναλώνουν το μεγαλύτερο ποσοστό του υποστρώματος εντός των 20 πρώτων ωρών. Στην συνέχεια, η κατανάλωση γίνεται με πιο αργό ρυθμό και μόνο το στέλεχος του ζυμομύκητα *H. opuntiae* καταναλώνει το σύνολο της ποσότητας της γλυκόζης.

Στα πλαίσια της σχετικά γρήγορης και πλήρης κατανάλωσης των σακχάρων, που απαιτείται συνήθως στην οινοποίηση, από τους ζυμομύκητες που μελετήθηκαν, θα ήταν πιθανότερη η χρήση των στελεχών *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae*, καθώς θα πρέπει να υπολογίσουμε ότι η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων του γλεύκους, συνήθως ξεπερνά τα 200 g/L. Από το γράφημα, παρατηρείται πιο αργός ρυθμός κατανάλωσης στα στελέχη *Hanseniaspora*, γεγονός που καθιστά αμφίβολο αν τα στελέχη αυτά καταφέρουν να αποζυμώσουν σε φυσικό υπόστρωμα.



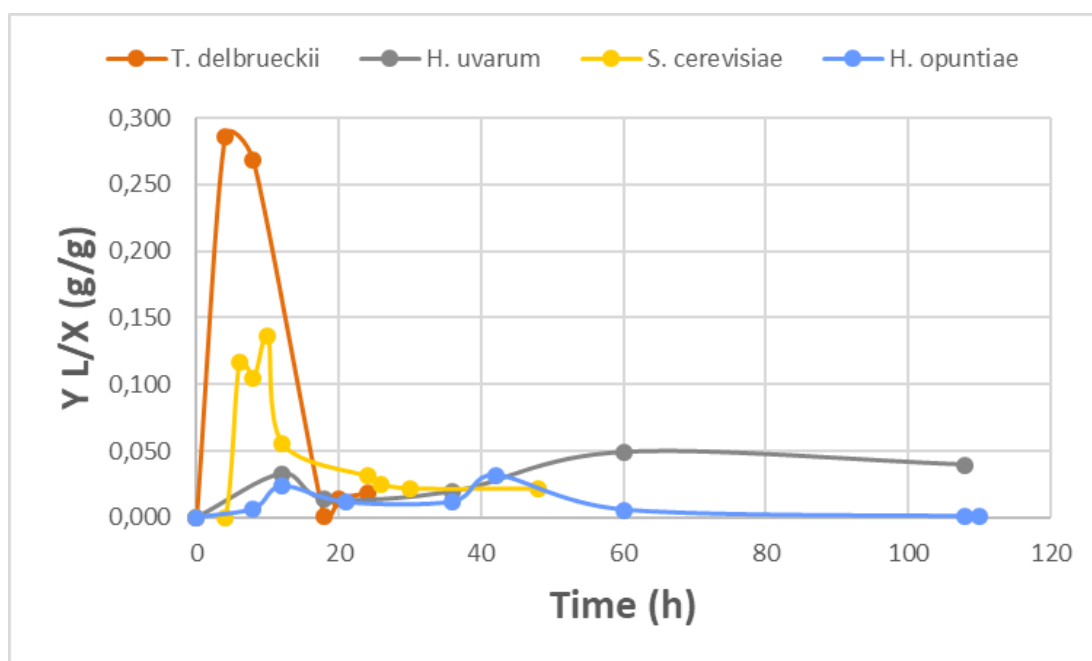
Γράφημα 15: Κινητικά δεδομένα για την παραγωγή αιθανόλης όλων των στελεχών που μελετήθηκαν, ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 15, απεικονίζεται η παραγωγή της αιθανόλης για όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν. Παρατηρείται μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των ζυμομυκήτων, αν και θα ήταν απαραίτητα μερικά ακόμη σημεία για τα στελέχη *T.delbrueckii* και *S.cerevisiae*. Στα 2 αυτά στελέχη, παρατηρείται ραγδαία αύξηση, περίπου στις πρώτες 15 ώρες, ενώ για τα στελέχη *Hanseniaspora*, η παραγωγή της αιθανόλης γίνεται σταδιακά και φτάνει στην μέγιστη ποσότητα αιθανόλης περίπου μεταξύ 40-50 ωρών. Στην συνέχεια, παρατηρούμε μείωση της παραγόμενης αιθανόλης και στα στελέχη *Hanseniaspora* αλλά και στο στέλεχος *S.cerevisiae*, με μεγαλύτερο ρυθμό μείωσης στα στελέχη *S.cerevisiae* και *H.opuntiae*.

Ένα ακόμη σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει στην παρούσα μελέτη και αφορά την παραγόμενη αιθανόλη είναι ότι στα τελευταία σημεία της ζύμωσης υπάρχει ανακατανάλωσή της. Το συγκεκριμένο φαινόμενο παρατηρείται όταν τα σάκχαρα του μέσου καταναλώνονται ή τείνουν να καταναλωθούν πλήρως. Όταν η συγκέντρωση του σακχάρου κατέλθει μιας συγκεκριμένης κρίσιμης τιμής, ο μικροοργανισμός αρχίζει να καταναλώνει την αιθανόλη που έχει παραχθεί. Η χαμηλή συγκέντρωση των σακχάρων λοιπόν ωθεί τον μικροοργανισμό να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες μέσω της αιθανόλης, ελλείψει άλλης πηγής άνθρακα.

Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν μερικά στελέχη ζυμομυκήτων, τα οποία όταν μεταβολίζουν και εξαντλούν τα διαθέσιμα σάκχαρα μέσω της αλκοολικής ζύμωσης,

μπορούν να καταναλώσουν την αιθανόλη προκειμένου να δημιουργήσουν εκ νέου κύτταρα. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου υπερβεί μία κρίσιμη τιμή και ταυτόχρονα δεν υπάρχουν σάκχαρα στο μέσο. Τότε η ήδη παραγόμενη αιθανόλη αποτελεί τη μοναδική πηγή άνθρακα και χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα. (Sarris and Papanikolaou, 2016)

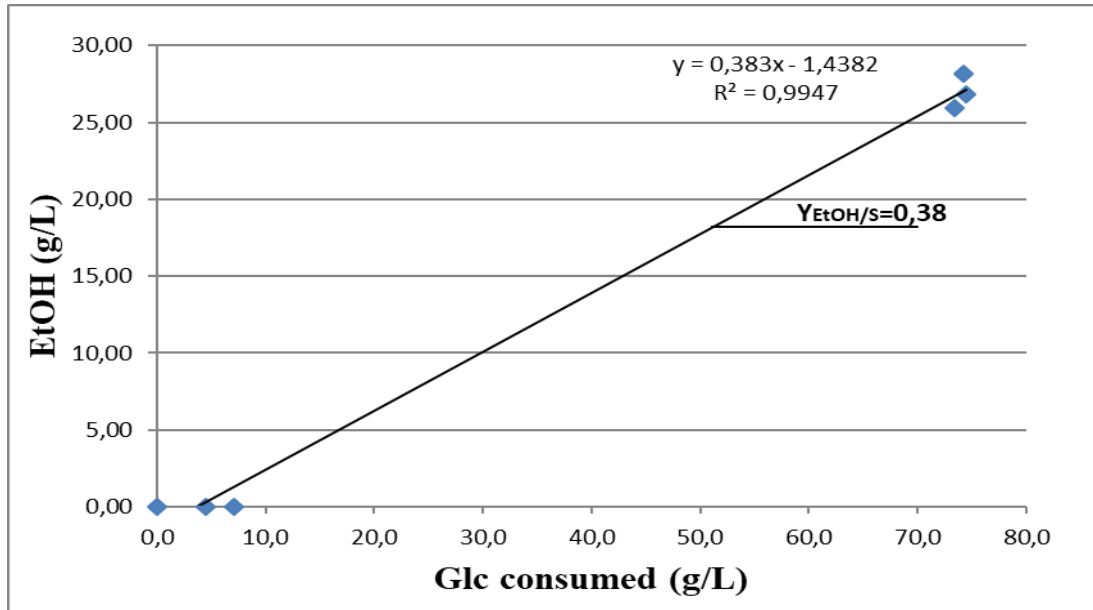


Γράφημα 16: Κινητικά δεδομένα για τον συντελεστή του παραγόμενου λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα όλων των στελεχών που μελετήθηκαν, ως προς τον χρόνο.

Στο γράφημα 16, απεικονίζεται ο συντελεστής του παραγόμενου λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα συναρτήσει του χρόνου για κάθε ζυμομύκητα. Παρατηρείται και εδώ μεγάλη μεταβλητότητα ανάμεσα στα διαφορετικά είδη, όμως κανένα από τα στελέχη δεν παράγει αξιοσημείωτα ποσά ενδοκυτταρικού λίπους ώστε να χαρακτηριστεί ελαιογόνος. Συγκεκριμένα, ως ελαιογόνοι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται εκείνοι οι οποίοι δύνανται να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% (w/w) επί της ξηράς ουσίας (Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ageitos et al., 2011).

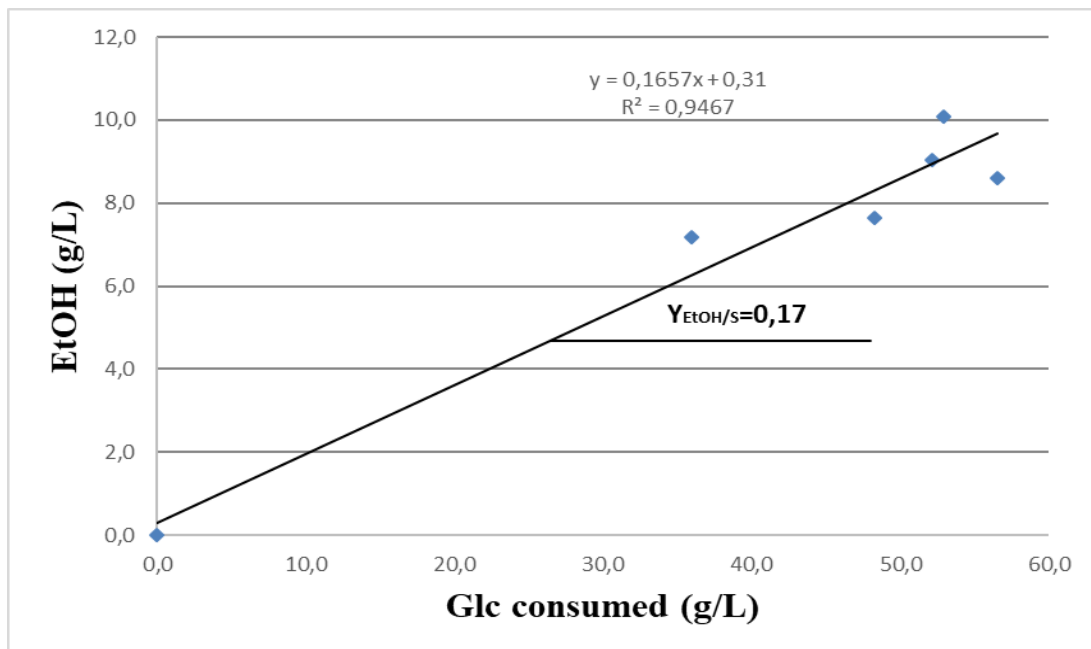
Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα στο προηγούμενο κεφάλαιο, στην αλκοολική ζύμωση των στελεχών που μελετήθηκαν παρατηρείται συνεχής παραγωγή αιθανόλης, όσο το υπόστρωμα είναι πλούσιο σε σάκχαρα (συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, σε γλυκόζη). Αυτό το συμπέρασμα όμως, αναφέρεται στις συγκεκριμένες ζυμώσεις, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 70 g/L. Το ενδιαφέρον λοιπόν στρέφεται σε αντίστοιχες ζυμώσεις με συγκεντρώσεις υποστρώματος που

προσομοιάζουν το γλεύκος. Ο συντελεστής απόδοσης είναι ένας δείκτης που αποτυπώνει την ικανότητα ζύμωσης του ζυμομύκητα.

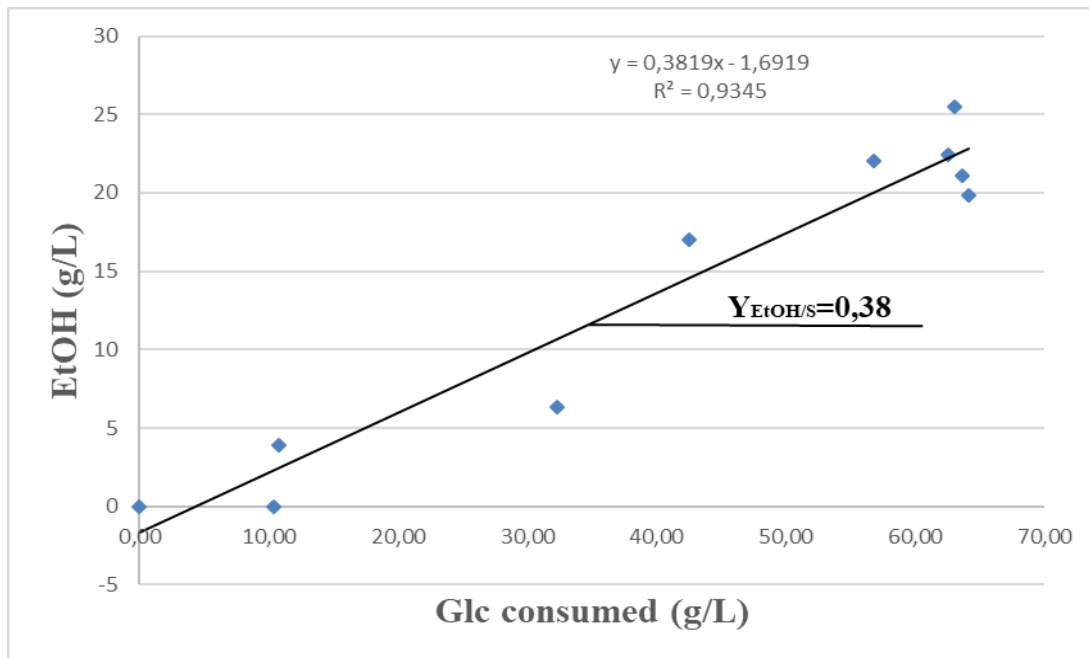


Γράφημα 17: Συντελεστής απόδοσης προϊόντος-υποστρώματος (αιθανόλης-καταναλωθείσας γλυκόζης) για τον *Torulaspora delbrueckii*.

Στο γράφημα 17, υπολογίστηκε ο συντελεστής απόδοσης του *T.delbrueckii* $Y_{EtOH/S} = 0,38$ g/g που θεωρείται ικανοποιητικός. Αντιθέτως, όπως φαίνεται παρακάτω στο γράφημα 18, ο συντελεστής απόδοσης του *H.uvarum* $Y_{EtOH/S} = 0,17$ g/g δεν μπορεί να θεωρηθεί αρκετά αποδοτικός για την ολοκλήρωση μίας αλκοολικής ζύμωσης φυσικού υποστρώματος.

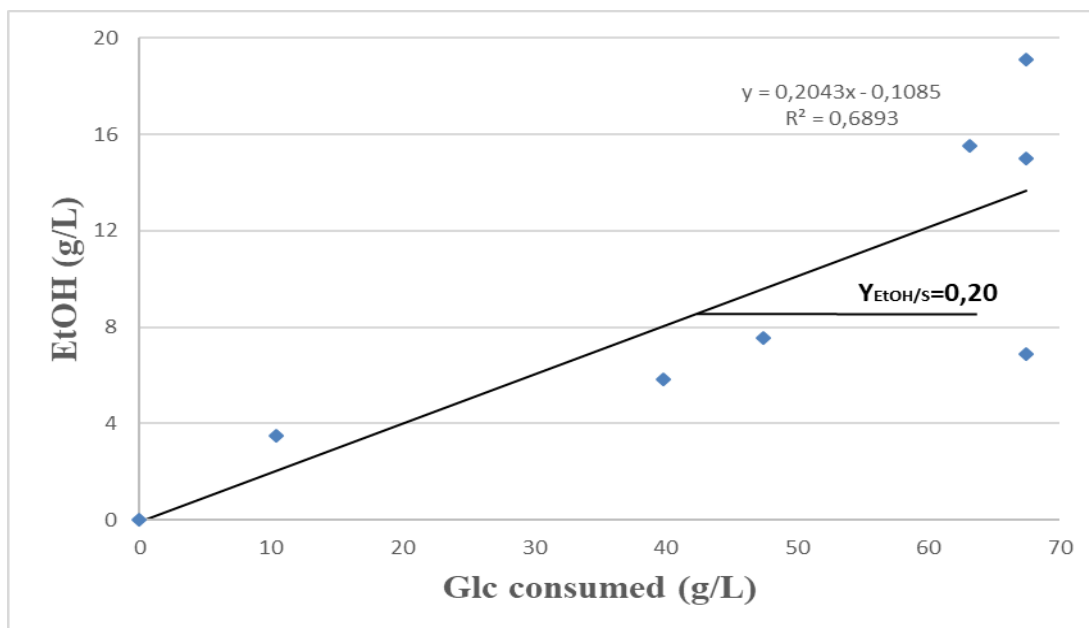


Γράφημα 18: Συντελεστής απόδοσης προϊόντος-υποστρώματος (αιθανόλης-καταναλωθείσας γλυκόζης) για τον *Hanseniaspora uvarum*.



Γράφημα 19: Συντελεστής απόδοσης προϊόντος-υποστρώματος (αιθανόλης-καταναλωθείσας γλυκόζης) για τον *Saccharomyces cerevisiae*.

Αντίστοιχα, στο γράφημα 19, υπολογίστηκε ο συντελεστής απόδοσης του *S.cerevisiae* $Y_{EtOH/S} = 0,38$ g/g, ο οποίος θεωρείται ικανοποιητικός. Αντιθέτως, όπως φαίνεται στο γράφημα 20, ο συντελεστής απόδοσης του *H.ortuntiae* $Y_{EtOH/S} = 0,20$ g/g δεν μπορεί να θεωρηθεί αρκετά αποδοτικός για την ολοκλήρωση μίας ζύμωσης οίνου σε κανονικές συνθήκες (συγκέντρωση σακχάρων, θερμοκρασία, pH, κτλ).



Γράφημα 20: Συντελεστής απόδοσης προϊόντος-υποστρώματος (αιθανόλης-καταναλωθείσας γλυκόζης) για τον *Hanseniaspora ortuntiae*.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6: Κινητικά δεδομένα των ζυμώσεων βυθού του στελέχους *T. delbrueckii* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

T (h)	X (g/L)	Glc _{cons} (g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{L/X} (g/g)	EtOH (g/L)
0	0,25	0,0	0,000	0,000	0,00	0,000	0,00
4	0,35	4,5	0,100	0,078	0,00	0,286	0,00
8	2,09	7,1	0,560	0,292	12,10	0,268	0,00
18	8,21	73,3	0,004	0,112	28,00	0,001	25,91
20	8,52	74,5	0,119	0,114	25,40	0,014	26,80
24	9,38	74,2	0,177	0,126	23,80	0,019	28,15

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±rpm), θερμοκρασία στους 28°C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης περίπου 70g/L, pH μεταξύ 5 έως 6, υπό αερόβιες συνθήκες.

T (h): χρόνος ζύμωσης

X (g/L): βιομάζα

Glc_{cons} (g/L): καταναλωθέν υπόστρωμα

L (g/L): ενδοκυτταρικό λίπος

Y_{X/S} (g/g): συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα

Y_{IPS/X} (% w/w): οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ως προς την παραχθείσα βιομάζα

Y_{L/X} (g/g): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα

EtOH (g/L): η παραγόμενη αλκοόλη

Πίνακας 7: Κινητικά δεδομένα των ζυμώσεων βυθού του στελέχους *H. uvarum* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

T (h)	X (g/L)	Glc _{cons} (g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	EtOH (g/L)
0	0,25	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00
12	2,73	35,94	0,090	0,076	0,000	7,18
18	2,56	48,25	0,035	0,053	0,033	7,66
36	2,10	52,10	0,041	0,040	0,014	9,03
60	2,08	52,89	0,102	0,039	0,019	10,08
108	1,98	56,52	0,078	0,035	0,049	8,62

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±rpm), θερμοκρασία στους 28°C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης περίπου 70g/L, pH μεταξύ 5 έως 6, υπό αερόβιες συνθήκες.

T (h): χρόνος ζύμωσης

X (g/L): βιομάζα

Glc_{cons} (g/L): καταναλωθέν υπόστρωμα

L (g/L): ενδοκυτταρικό λίπος

Y_{X/S} (g/g): συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα

Y_{L/X} (g/g): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα

EtOH (g/L): η παραγόμενη αλκοόλη

Πίνακας 8: Κινητικά δεδομένα των ζυμώσεων βυθού του στελέχους *S. cerevisiae* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

T (h)	X (g/L)	Glccons(g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{LX} (g/g)	EtOH (g/L)
0	0,25	0,00	0,000	0,000	0,00	0,000	0,00
4	0,92	10,3	0,070	0,089	0,00	0,000	0,00
6	2,06	10,8	0,121	0,191	0,00	0,117	3,88
8	3,59	32,3	0,267	0,111	0,00	0,105	6,34
10	4,63	42,5	0,49	0,109	0,00	0,136	17,02
12	5,78	56,8	0,272	0,102	0,00	0,056	22,07
24	8,63	62,6	0,237	0,138	2,56	0,031	22,45
26	8,91	63,1	0,292	0,141	0,18	0,025	25,47
30	9,27	63,6	0,184	0,146	3,01	0,022	21,11
48	10,96	64,2	0,217	0,171	4,97	0,022	19,83

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±rpm), θερμοκρασία στους 28°C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης περίπου 70g/L, pH μεταξύ 5 έως 6, υπό αερόβιες συνθήκες.

T (h): χρόνος ζύμωσης

X (g/L): βιομάζα

Glccons (g/L): καταναλωθέν υπόστρωμα

L (g/L): ενδοκυτταρικό λίπος

Y_{X/S} (g/g): συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα

Y_{IPS/X} (% w/w): οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ως προς την παραχθείσα βιομάζα

Y_{LX} (g/g): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα

EtOH (g/L): η παραγόμενη αλκοόλη

Πίνακας 9: Κινητικά δεδομένα των ζυμώσεων βυθού του στελέχους *H. oruntiae* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 70g/L.

T (h)	X (g/L)	Glccons(g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{LX} (g/g)	EtOH (g/L)
0	0,25	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00
8	1,96	10,38	0,013	0,189	0,007	3,47
12	2,38	39,89	0,056	0,060	0,024	5,80
21	2,33	47,44	0,027	0,049	0,011	7,54
36	3,87	63,18	0,046	0,061	0,012	15,53
42	4,96	67,49	0,158	0,073	0,032	19,11
60	5,92	67,49	0,034	0,088	0,006	15,00
108	9,74	67,49	0,009	0,144	0,001	6,90
110	9,74	67,5	0,008	0,144	0,001	7,00

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±rpm), θερμοκρασία στους 28°C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης περίπου 70g/L, pH μεταξύ 5 έως 6, υπό αερόβιες συνθήκες.

T (h): χρόνος ζύμωσης

X (g/L): βιομάζα

Glccons (g/L): καταναλωθέν υπόστρωμα

L (g/L): ενδοκυτταρικό λίπος

Y_{X/S} (g/g): συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα

Y_{LX} (g/g): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα

EtOH (g/L): η παραγόμενη αλκοόλη

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1219–1227.
- Balat, M., Balat, H., Oz, C., (2008) Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* 34, 551-573.
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., & Benito, S. (2014). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspota delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1911–1922.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspota delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 312–320.
- Berg M. Jeremy, John L. Tymoczko, Lubert Stryer 2013, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
- Bisson, L. F., Waterhouse, A. L., Ebeler, S. E., Walker, M. A., & Lapsley, J. T. (2002). The present and future of the international wine industry. *Nature*, 418(6898), 696–699.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. & Kunkee, R. E., 1996. Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York
- Bourbon-Melo, N., Palma, M., Rocha, M. P., Ferreira, A., Bronze, M. R., Elias, H., & Sá-Correia, I. (2020). Use of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora opuntiae* to enhance the aromatic profile of beer in mixed-culture fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 103678.
- Cadez, N. (2003) *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2012). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian “heroic vine-growing area.” *Food Microbiology*, 31(2), 159–166.

- Ciani, M., & Pepe, V. (2002). The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(5), 573–578.
- Ciani, M., & Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behavior of some non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*, 17(11), 1247–1250.
- Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). Fermentation behavior and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 239–245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10(2), 123–133.
- Ciani, M., Maccarelli, F. (1997) Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 199–203.
- Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., & Martini, A. (2004). Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(2), 159–164.
- Constantí, M. (1998). Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 41(3), 169–175.
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., & Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, 14(6), 826–832.
- Di Maro, E., Ercolini, D., & Coppola, S. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2), 201–210
- Du Plessis, H., Du Toit, M., Nieuwoudt, H., Van der Rijst, M., Kidd, M., & Jolly, N. (2017). Effect of *Saccharomyces*, Non-Saccharomyces Yeasts and Malolactic Fermentation Strategies on Fermentation Kinetics and Flavor of Shiraz Wines. *Fermentation*, 3(4), 64.

- Egli, C. M., Edinger, W. D., Mitrakul, C. M., & Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology*, 85(5), 779–789.
- Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non- *Saccharomyces*/*Saccharomyces* yeasts. *Food Research International*, 112, 17–24.
- Fischer, U. (2007), Wine aroma. In: *Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Berger R.G. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Fleet G. & Heard GM (1993) Yeast growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. pp. 27–54
- Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11–22.
- Grangeteau, C., Gerhards, D., Rousseaux, S., von Wallbrunn, C., Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2015). Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation? *Food Microbiology*, 50, 70–77.
- Guth, H. (1997). Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3027–3032.
- Hagman, A., Säll, T., Compagno, C., & Piskur, J. (2013). Yeast “Make-Accumulate-Consume” Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication. *PLoS ONE*, 8(7), e68734
- Henschke, P., (1997) Wine yeast. In Zimmermann F.K. & Entian K.D. (Eds.), *Yeast sugar metabolism: biochemistry, genetics, biotechnology, and applications*
- Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., & Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry*, 107(3), 1064–1077.

Houtman, A. C., & du Plessis, C. S. (2017). The Effect of Grape Cultivar and Yeast Strain on Fermentation Rate and Concentration of Volatile Components in Wine. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 7(1).

Hu, K., Jin, G.-J., Xu, Y.-H., & Tao, Y.-S. (2018). Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 108, 119–127.

Jackson, R.S. *Wine Science Principles and Applications*, Academic Press

Jay, J.M. (2000). *Modern Food Microbiology*, 6th Edition, Aspen Publishers, Maryland, USA.

Kunkee, R. E. (1984). Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiology*, 1(4), 315–332.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). Gene Sequence Analyses and other DNA-Based Methods for Yeast Species Recognition. *The Yeasts*, 137–144.

Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2019). Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 21(1).

Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C., & Lollier, M. (2006). Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 23(8), 709–716.

Luan, Y., Zhang, B.-Q., Duan, C.-Q., & Yan, G.-L. (2018). Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*. *LWT, Food Science and Technology*, 92, 177–186.

Luca Cocolin, Vincenzo Pepe, Francesca Comitini, Giuseppe Comi, Maurizio Ciani, (2004). Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research*, 5(3), 237–245.

Martin R. Adams and Maurice O. Moss (2008). *Food Microbiology*, 3rd Edition, RSC Publishing, London, UK.

Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., & Combina, M. (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to

fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, 24(4), 403–412.

Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J. A., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control*, 22(5), 662–667.

Nisiotou, A. A., & Nychas, G.-J. E. (2007). Yeast Populations Residing on Healthy or Botrytis-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2765–2768.

Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7.

Papanikolaou S., Aggelis G. (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113(8), 1031-1051.

Papanikolaou S., Aggelis G. (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1052–1073.

Piškur, J., Ling, Z., Marcet-Houben, M., Ishchuk, O. P., Aerts, A., LaButti, K., Phister, T. (2012). The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 202–209.

Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. ., & Ortega, J. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, 20(2), 217–224.

Pretorius, I. S., & Bauer, F. F. (2002). Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends in Biotechnology*, 20(10), 426–432.

Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675–729.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2000. *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*, vol. I. Wiley, West Sussex, England

Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., & Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in

- Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 201–210.
- Romano, P. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 169–180.
- Romano P. and Suzzi G. 1996. *Appl. Envirom. Microbial.*
- Rossouw, D., & Bauer, F. F. (2016). Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. *Food Microbiology*, 55, 32–46.
- Sadineni, V., Kondapalli, N., & Obulam, V. S. R. (2011). 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), 1353–1360.
- Santamaria, P., Garijo, P., Lopez, R., Tenorio, C., & Rosagutierrez, A. (2005). Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 49–56
- Sarantou, S., Stoforos, N. G., Kalantzi, O., & Papanikolaou, S. (2021). Biotechnological valorization of biodiesel-derived glycerol: Trials with the non-conventional yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium* sp. *Carbon Resources Conversion*, 4, 61-75.
- Sarris, D., & Papanikolaou, S. (2016). Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Engineering in Life Sciences*, 16(4), 307–329.
- Shekhawat, K., Bauer, F.F. & Setati, M.E. (2017) Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 2479–2491.
- Styger Gustav, Bernard Prior, Florian F. Bauer, Wine flavor and aroma
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139–173.

Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., & Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 1959–1967.

Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., & Grieco, F. (2016). The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. *Frontiers in Microbiology*, 7.

Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., & Dequin, S. (2007). Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Research*, 7(2), 317–329

Van Breda, V., Jolly, N., & van Wyk, J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 80– 88.

Varela, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9861–9874.

Varnam, A. H., Sutherland Jane P., Χατήρης, Ι. (2006). Ποτά: Τεχνολογία, χημεία και μικροβιολογία, Εκδόσεις Ίων, Αθήνα

Vezinhet, F., Barre, P., Laurent, M., & Valade, M. (1992). Introduction of flocculation into an industrial yeast strain by transfer of a single chromosome. *Journal of the Institute of Brewing*, 98(4), 315–319.

Viana, F., Gil, J., Genoves, S., Valles, S., & Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*, 25(6), 778–785.

Walker 1998, *Yeast Physiology and Biotechnology*, εκδοτικός οίκος, τοποθεσία

Wang, C., Mas, A., & Esteve-Zarzoso, B. (2015) Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*.

Xufre, A., Albergaria, H., Inacio, J., Spencermartins, I., & Girio, F. (2006). Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population

dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology*.

Yoshioka, K., & Hashimoto, N. (1984). Ester formation by brewers' yeast during sugar fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(2), 333–340

Βέκιος, Γ., Δ.Κουκής, Α.Τσακίρης, Το βιβλίο του κρασιού, 1994

Ιωαννίδης Χ. Η βιοαιθανόλη στην Ελλάδα. Παρόν και Προοπτικές. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καβάλας, (2003)

Νυχάς, Γ.Ι. Σημειώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2014

Παπανικολάου Σ. Μικροβιολογία Οίνου, Πανεπιστημιακές σημειώσεις, 2014

Σουλής Θ., Μαθήματα οινοποιίας, Μέρος Α' . Α.Π.Θ., Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο, Θεσσαλονίκη, 1992.

Σουφλερός Ευάγγελος, Οινολογία, Θεσσαλονίκη 2012

Τσακίρης Α., Οινολογία: Από το σταφύλι στο κρασί, Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα, 1988