ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
Ι) ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ ΙΙ) ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Οξυγαλακτικά βακτήρια του οίνου: από τα μεταβολικά μονοπάτια και τη διαχείριση της μηλογαλακτικής ζύμωσης έως τις σύγχρονες τεχνικές οινοποίησης

Βασιλική Ν. Στασινού

Επιβλέπων Καθηγητής:
Γεώργιος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2022

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Οξυγαλακτικά βακτήρια του οίνου: από τα μεταβολικά μονοπάτια και τη διαχείριση της μηλογαλακτικής ζύμωσης έως τις σύγχρονες τεχνικές οινοποίησης

Lactic acid bacteria in wine: from metabolic pathways and management of malolactic fermentation to modern vinification processes

Βασιλική Ν. Στασινού

Εξεταστική Επιτροπή:
Γεώργιος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)
Μαρία Δημοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΑΔΑ
Ευστάθιος Πανάγου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Οξυγαλακτικά βακτήρια του οίνου: από τα μεταβολικά μονοπάτια και τη διαχείριση της μηλογαλακτικής ζύμωσης έως τις σύγχρονες τεχνικές οινοποίησης

ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων. Ι) Γαλακτοκομία ΙΙ)Οινολογία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπάρχουν δύο κύριες ζυμώσεις που σχετίζονται με τη διαδικασία της οινοποίησης. Η αλκοολική ζύμωση, η οποία διεξάγεται από τους ζυμομύκητες και η μηλογαλακτική ζύμωση, η οποία λαμβάνει χώρα ως αποτέλεσμα της μεταβολικής δραστηριότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων των γενών *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc*. Η μηλογαλακτική ζύμωση, ορίζεται ως η βιομετατροπή του μηλικού οξέος προς γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και πέρα από τη μείωση της οξύτητας, συμβάλλει σημαντικά στη μικροβιακή σταθερότητα καθώς και στη βελτίωση του οργανοληπτικού προφίλ των οίνων. Επίσης, ανάλογα με τη χρονική στιγμή του εμβολιασμού και τα στελέχη της καλλιέργειας των οξυγαλακτικών βακτηρίων, μπορεί να επηρεαστεί το στυλ και η ποιότητα αυτών. Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, στοχεύει σε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση πάνω στις κύριες πτυχές και τα μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με την επίδραση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στους οίνους, εξετάζοντας παράλληλα τα αποτελέσματα της χρονικής στιγμής του εμβολιασμού. Κρίθηκε επίσης σημαντικό, να γίνει ξεχωριστή αναφορά στην εφαρμογή της μηλογαλακτικής ζύμωσης στους λευκούς οίνους, καθώς δεν προτιμάται τόσο συχνά, όσο στους ερυθρούς, παρ' όλα αυτά φαίνεται να έχει ενδιαφέροντα αποτελέσματα στο οργανοληπτικό προφίλ, εφόσον προσδίδει έναν πιο σύνθετο αρωματικό χαρακτήρα και μια πιο απαλή αίσθηση στο στόμα. Τέλος, γίνεται μια σύντομη αναφορά σε άλλες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως η μείωση της χρήσης του διοξειδίου του θείου (SO_2) ή ακόμα και η βιολογική αύξηση της οξύτητας. Είναι πλέον σαφές, ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν πολύ σημαντικά εργαλεία για τη σύγχρονη οινοποίηση.

Επιστημονική περιοχή: Οξυγαλακτικά βακτήρια οίνου

Λέξεις-Κλειδιά: Μηλογαλακτική ζύμωση, οξυγαλακτικά βακτήρια, χρόνος εμβολιασμού, λευκοί οίνοι, οργανοληπτικό προφίλ

Lactic acid bacteria of wine: from metabolic pathways and management of malolactic fermentation to modern vinification processes

MSc Advanced Food Technology. I) Dairy Science II) Enology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Oenology & Alcoholic Beverages

ABSTRACT

There are two main fermentations associated with the vinification process. Alcoholic fermentation, which is conducted by yeasts and malolactic fermentation, which takes place as a result of the metabolic activity of lactic acid bacteria of the genera *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc*. Malolactic fermentation is defined as the biotransformation of malic acid to lactic acid and carbon dioxide (CO_2) and besides deacidification, contributes significantly to microbial stability and often to the improvement of the sensory profile of wines. Also, depending on inoculation timing and the strain of lactic acid bacteria the style and quality of wine can be affected. The present master thesis is a literature review that focuses on the main aspects and metabolic pathways related to the effect of lactic acid bacteria on wines, while examining the results of inoculation timing. It was also considered important to make a special reference to the application of malolactic fermentation in white wines, as it is not preferred as often as in red wines, nevertheless it seems to have interesting effects on the sensory properties, since it gives a more complex aromatic profile and a smoother mouthfeel sensation. Finally, there is a brief reference to other applications of lactic acid bacteria, such as reducing the use of sulfur dioxide (SO_2) and biological acidification. It is now clear that lactic acid bacteria are very important tools for modern winemaking.

Scientific area: Lactic acid bacteria in wine

Keywords: Malolactic fermentation, lactic acid bacteria, inoculation timing, white wines, sensory profile

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 3
ABSTRACT 4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ 7
1. Εξέλιξη πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την οινοποίηση 9
2. Μηλογαλακτική ζύμωση 14
3. Επίδραση οξυγαλακτικών βακτηρίων πέραν της μηλογαλακτικής ζύμωσης 15
3.1 Μεταβολισμός του κιτρικού οξέος 15
3.2 Μεταβολισμός των υδατανθράκων 18
3.2.1 Μεταβολισμός μονο-, δισακχαριτών 18
3.2.2 Μεταβολισμός (εξω)πολυσακχαριτών 20
3.3 Μεταβολισμός των γλυκοζυλιωμένων παραγώγων (γλυκοζιτών) 22
3.4 Μεταβολισμός των φαινολικών ενώσεων 25
3.5 Καταβολισμός των αμινοξέων 29
3.5.1 Σχηματισμός βιογενών αμινών 31
3.5.2 Σχηματισμός Ανώτερων Αλκοολών 33
3.6 Σύνθεση και Υδρόλυση Εστέρων 34
4. Διαχείριση της μηλογαλακτικής ζύμωσης 37
4.1 Χρονική στιγμή εμβολιασμού 37
4.2 Εναλλακτικά στελέχη 40
4.3 Αυθόρμητη ζύμωση έναντι εμβολιασμού 44
5. Μηλογαλακτική ζύμωση στους λευκούς ξηρούς οίνους 45
5.1 Σύσταση λευκών οίνων 46
5.2 Χρονική στιγμή εμβολιασμού στους λευκούς οίνους 46
5.3 Κριτήρια επιλογής στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων στους λευκούς οίνους 47
5.4 Επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ των λευκών οίνων 48
6. Άλλες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηρίων 50
6.1 Μείωση της χρήσης διοξειδίου του θείου (SO_2) 50
6.2 Βιολογική αύξηση της οξύτητας 51
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 55

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η εξέλιξη του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη διάρκεια της οινοποίησης. Αναπαραγωγή από (Ribéreau-Gayon et al., 2006). 9
Εικόνα 2: Πιθανές ενζυματικές οδοί για τη βιομετατροπή του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό. MLE, μηλογαλακτικό ένζυμο, MDH, αφυδρογονάση του μηλικού, ME, μηλικό ένζυμο, OADC, αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού, LDH, αφυδρογονάση του γαλακτικού. Αναπαραγωγή από (Capozzi et al., 2021)..... 14
Εικόνα 3: Μεταβολισμός του κιτρικού οξέος. Οι αντιδράσεις, τα ένζυμα που τις καταλύουν και τα παράγωγα του μεταβολισμού. Αναπαραγωγή από (Swiegers et al., 2005). 16
Εικόνα 4: Οι οδοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων για το μεταβολισμό της γλυκόζης. Αναπαραγωγή από (Doran, 2013)..... 19
Εικόνα 5: Δομή των ανθοκυανιδινών και των ανθοκυανών. Η β-γλυκοζιδάση, δρα στο σημείο που συνδέεται το σάκχαρο, στη δομή της ανθοκυάνης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της ανθοκυανιδίνης. Αναπαραγωγή από Deveoglu & Karadag (2019). ... 23
Εικόνα 6: Κατηγορίες φλαβονοειδών που συναντώνται στους οίνους. Αναπαραγωγή από (Nishiumi et al., 2011). 25
Εικόνα 7: Η δράση της κινναμωμικής εστεράσης στο μεταβολισμό των υδροξυκινναμωμικών-τρυγικών οξέων. Αναπαραγωγή από (Collombel et al., 2019)..... 26
Εικόνα 8: Σχηματισμός ισταμίνης από την αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης. Αναπαραγωγή από (Huang et al., 2018). 31
Εικόνα 9: Το μονοπάτι Ehrlich και ο σχηματισμός των ανώτερων αλκοολών. Αναπαραγωγή από (Tse et al., 2021). 33
Εικόνα 10: Απλοποιημένος μεταβολικός χάρτης σχηματισμού εστέρων. Υποδεικνύονται τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που εμπλέκονται στο σχηματισμό των εστέρων. Αναπαραγωγή από (Belda et al., 2017). 35
Εικόνα 11: Χρονική στιγμή εμβολιασμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων του οίνου. Αναπαραγωγή από (Krieger-Weber et al., 2020)..... 37

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μηλογαλακτική ζύμωση, επίσης γνωστή ως δευτερογενής ζύμωση του οίνου, δεν αποτελεί -τεχνικά- ζύμωση, αλλά ενζυματική αποκαρβοξυλίωση του δικαρβοξυλικού L-μηλικού οξέος προς το σχηματισμό του μονοκαρβοξυλικού L-γαλακτικού οξέος, με παράλληλη απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα (CO_2). Η διαδικασία αυτή, συνήθως διαδέχεται την αλκοολική ζύμωση που διεξάγεται από τις ζύμες, αλλά μπορεί επίσης να συμβεί παράλληλα με αυτή, είτε αυθόρμητα -από τα γηγενή οξυγαλακτικά βακτήρια- είτε από προσθήκη εμπορικής καλλιέργειας εκκίνησης επιλεγμένου στελέχους βακτηρίου. Το *Oenococcus oeni (O. oeni)*, αποτελεί το κύριο είδος που είναι υπεύθυνο για τη διεξαγωγή αυτής της βιομετατροπής. Το συγκεκριμένο είδος γαλακτικού βακτηρίου είναι καλύτερα προσαρμοσμένο στο αφιλόξενο περιβάλλον που επικρατεί στο μέσο, με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης (Bartowsky, 2005), συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών υψηλής αλκοόλης, χαμηλού pH και παρουσίας διοξειδίου του θείου (SO_2) (Lonvaud-Funel, 1999; Wibowo et al., 1985). Ωστόσο, ορισμένα στελέχη που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Pediococcus* μπορούν επίσης να εκτελέσουν ή/και να συμβάλουν στη διαδικασία αυτή. Συγκεκριμένα, το είδος *Lactobacillus plantarum (L. plantarum)* έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλο για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Berbegal et al., 2016; Du Toit et al., 2011) και, στην πραγματικότητα, υπάρχουν και μερικοί εμπορικοί εκκινητές, του είδους αυτού.

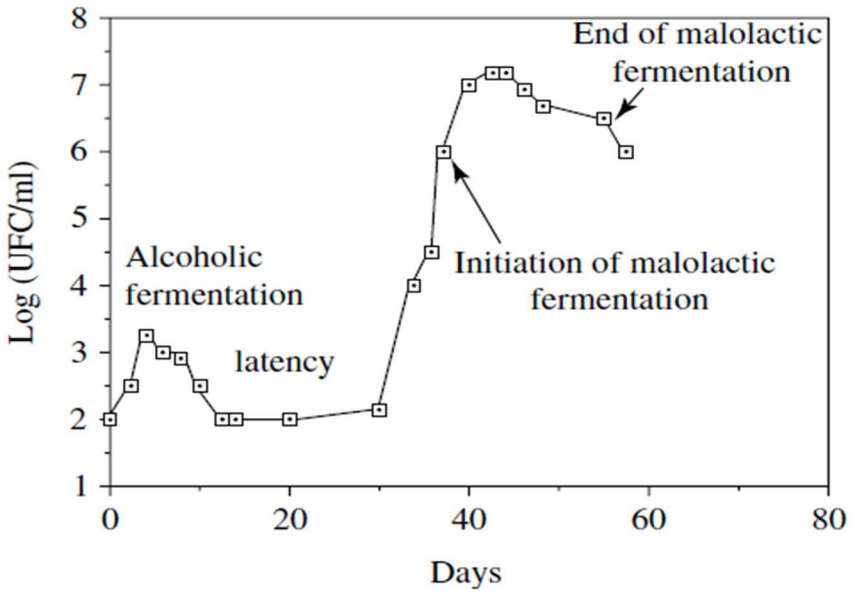
Αν και η μηλογαλακτική ζύμωση θεωρείται ως δευτερεύουσα διαδικασία ζύμωσης, έχει αναπόσπαστο ρόλο στην παραγωγή της πλειονότητας των ερυθρών, καθώς και ορισμένων λευκών και αφρωδών οίνων. Είναι γνωστό ότι συμβάλλει στη βελτίωση της γεύσης, μειώνοντας την οξύτητα που οφείλεται στο μηλικό οξύ και όχι μόνο. Παρέχει επίσης μικροβιακή σταθερότητα, με την απομάκρυνση του μηλικού οξέος ως πιθανό υπόστρωμα άνθρακα ενώ επίσης ενισχύει το οργανοληπτικό προφίλ του οίνου, συμβάλλοντας στην αρωματική του πολυπλοκότητα (Liu, 2002; Maicas et al., 1999; Ugliano et al., 2003). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, τα οξυγαλακτικά βακτήρια ζυμώνουν υπολειμματικά σάκχαρα -εξόζες και πεντόζες- που δεν έχουν αποικοδομηθεί από τις ζύμες και μετασχηματίζουν πολλά ακόμη συστατικά του οίνου. Ακόμα κι αν το μηλικό οξύ είναι το πιο σημαντικό, από άποψη ποσότητας και επίδρασης στη σύνθεση του οίνου, άλλα γνωστά και άγνωστα υποστρώματα μεταβολίζονται και πιθανώς έχουν καθοριστική επίδραση στην ποιότητά του (Lonvaud-Funel, 1999). Εκτός από την κύρια οργανοληπτική της δράση (εξάντληση του μηλικού οξέος), αυτή η δευτερογενής ζύμωση θα μπορούσε να

τροποποιήσει τα αρωματικά χαρακτηριστικά, απελευθερώνοντας σημαντικές ποσότητες διακετυλίου και άλλων καρβονυλικών ενώσεων που συμβάλλουν στο άρωμα βουτύρου. Πολλές άλλες βιοχημικές αντιδράσεις που εμφανίζονται, παράλληλα, ενισχύουν επίσης το άρωμα και την ποιότητα του οίνου. Η δραστηριότητα της εστεράσης, ο μεταβολισμός της μεθειονίνης και μερικοί μετασχηματισμοί που περιλαμβάνουν γλυκοζιδάσες, έχουν επίσης αποδειχθεί ότι συνδέονται με τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Moreno-Arribas & Polo, 2005; Muñoz et al., 2011). Σε χώρες με ψυχρότερο κλίμα, η διαδικασία μείωσης της οξύτητας θεωρείται ως η πιο σημαντική τροποποίηση που σχετίζεται με τη μηλογαλακτική ζύμωση, ενώ σε θερμότερες περιοχές, όπου τα σταφύλια εμφανίζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις μηλικού οξέος, η ενίσχυση του οργανοληπτικού προφίλ αποτελεί σημαντικότερο παράγοντα.

Παρά τη σημασία της μηλογαλακτικής ζύμωσης στους οίνους, η εμφάνισή της είναι συχνά απρόβλεπτη και είναι δύσκολο να ελεγχθεί ή να διαχειριστεί. Η ανεξέλεγκτη μηλογαλακτική ζύμωση ενδέχεται να επιδράσει αρνητικά στην ποιότητα, λόγω του σχηματισμού ανεπιθύμητων ενώσεων (συμπεριλαμβανομένων του οξικού οξέος και των πτητικών φαινολών, μεταξύ άλλων), με αντίκτυπο την απόρριψη από το κοινό. Ενώ είναι επίσης πιθανό, στη διάρκειά της, να παραχθούν επικίνδυνες ενώσεις για την ανθρώπινη υγεία όπως οι βιογενείς αμίνες. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της βιοχημικής αυτής διαδικασίας, στη διάρκεια της οινοποίησης, προκειμένου να διασφαλισθεί η τελική ποιότητα των παραγόμενων οίνων.

1. Εξέλιξη πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την οινοποίηση

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, μπορούν να απομονωθούν από πολλές επιφάνειες και περιβάλλοντα, όπως τα φύλλα της αμπέλου, τους βότρυς, τον εξοπλισμό των οινοποιείων, τα βαρέλια κ.α. (Muñoz et al., 2011). Κατά την παραγωγή των οίνων, είναι παρόντα σε όλα τα στάδια της οινοποίησης, ενώ η μικροχλωρίδα αυτών διέρχεται από διάφορες φάσεις (*Εικόνα 1*) (Ribéreau-Gayon et al., 2006), οι οποίες αναλύονται παρακάτω.



Εικόνα 1: Η εξέλιξη του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη διάρκεια της οινοποίησης. Αναπαραγωγή από (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Στις αρχικές φάσεις της οινοποίησης και κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της ζύμωσης, ο πληθυσμός των βακτηρίων βρίσκεται -συχνότερα- σε συγκεντρώσεις από 10^2 έως 10^4 CFU/mL (Ribéreau-Gayon et al., 2006), ενώ παράλληλα τα είδη, αυτών, ποικίλουν. Στη φάση αυτή, το μεγαλύτερο μέρος, αποτελείται από ομοζυμωτικά είδη, όπως τα *L. plantarum, Lactobacillus casei (L. casei)*, *Lactobacillus hilgardii (L hilgardii), Leuconostoc mesenteroides* και *Pediococcus damnosus (P. damnosus)*, ενώ τα *O. oeni* και *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) υπάρχουν σε μικρότερους πληθυσμούς (Muñoz et al., 2011). Το μέγεθος του πληθυσμού εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, από τις κλιματολογικές συνθήκες κατά τις τελευταίες ημέρες ωρίμανσης των σταφυλιών. Σε γενικές γραμμές, είναι χαμηλότερο όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για υγιή σταφύλια και σε αυτές τις περιπτώσεις ικανός βακτηριακός πληθυσμός του είδους αυτού είναι αδύνατο να απομονωθεί από τη ράγα (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Σε δεύτερη φάση και καθώς το γλεύκος ζυμώνεται από τις ζύμες, υπάρχει σταδιακή μείωση της ποσότητας και της ποικιλίας των παρόντων ειδών της μικροχλωρίδας. Στην περίπτωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, μόνο αυτά που έχουν τη μεγαλύτερη αντοχή στην αιθανόλη και το χαμηλό pH, καταφέρνουν να επιβιώσουν σε αυτό το στάδιο (Muñoz et al., 2011). Καθώς το γλεύκος περιέχει θρεπτικά συστατικά που ευνοούν την ανάπτυξη των ζυμών, αυτές πολλαπλασιάζονται γρήγορα και ξεκινούν την αλκοολική ζύμωση (Muñoz et al., 2011). Ούσες καλύτερα προσαρμοσμένες, εισβάλλουν γρήγορα στο μέσο με αυξημένους πληθυσμούς, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός των βακτηρίων να παραμένει σε χαμηλά επίπεδα (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Σε μεγάλο βαθμό, η συμπεριφορά των μικροοργανισμών, τη στιγμή αυτή, εξαρτάται από το pH του μέσου και το επίπεδο διοξειδίου του θείου (SO_2) (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Οι ζύμες, οι οποίες είναι λιγότερο ευαίσθητες στις επιδράσεις των θειωδών, αναπτύσσονται γρήγορα και ξεκινούν αλκοολική ζύμωση, η οποία συμβαίνει πρακτικά απουσία οξυγαλακτικών βακτηρίων (Muñoz et al., 2011). Κανονικά, οι δόσεις του SO_2 που προστίθενται (περίπου 5 g/hL) σε pH μεταξύ 3,2 και 3,4 δεν εμποδίζουν την ανάπτυξή τους, αλλά απλώς την περιορίζουν. Στη συνέχεια, από την πιο ενεργή φάση της αλκοολικής ζύμωσης έως την εξάντληση των σακχάρων και το πέρας αυτής, τα βακτήρια υποχωρούν γρήγορα σε 10^2 CFU/mL, αν και αυτό το επίπεδο εξαρτάται επίσης από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (pH και SO_2) (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Υπάρχει επίσης σημαντική μείωση της ετερογένειας των παρόντων ειδών. Αυτό είναι λογικό, καθώς ο μεταβολισμός των ζυμομυκήτων, που είναι υπεύθυνοι για την αλκοολική ζύμωση, αυξάνει σταδιακά τα επίπεδα αιθανόλης και δημιουργεί ενώσεις που είναι τοξικές για τα βακτήρια, όπως λιπαρά οξέα και SO_2, μεταβάλλοντας έτσι τη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος (Edwards et al., 1990; Muñoz et al., 2011).

Μετά την αλκοολική ζύμωση, ο βακτηριακός πληθυσμός παραμένει σε λανθάνουσα φάση για μια περίοδο που ποικίλει, η οποία μπορεί να διαρκέσει αρκετούς μήνες όταν οι παράμετροι pH και θερμοκρασία, βρίσκονται στα χαμηλότερα όριά τους και το ποσοστό αιθανόλης, βρίσκεται στα υψηλότερα όριά του (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Σε κανονικές συνθήκες, μόλις ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση, η λανθάνουσα φάση διαρκεί μεταξύ 10 και 15 ημερών και ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων παραμένει αμετάβλητος, καθώς η ανάπτυξή τους αναστέλλεται από την παρουσία ζωντανών ζυμών και ανασταλτικών ουσιών που εκκρίνονται από αυτές (Muñoz et al., 2011).

Στη συνέχεια, ακολουθεί η φάση της βακτηριακής ανάπτυξης, η οποία διαρκεί αρκετές ημέρες και αυξάνει τον πληθυσμό σε περίπου 10^6-10^7 CFU/mL ή και περισσότερο

(Ribéreau-Gayon et al., 2006). Προφανώς, η διάρκειά της επηρεάζεται από τα επιμέρους χαρακτηριστικά του μέσου όπως τα επίπεδα pH, θερμοκρασίας, SO_2 και αιθανόλης. Η ανάπτυξη ευνοείται από ένα σχετικά υψηλό pH (>3,5), μια συγκέντρωση SO_2, όχι μεγαλύτερη από 50 mg/L της ελεύθερης μορφής, μια περιεκτικότητα σε αιθανόλη 13% (vol/vol), και μια θερμοκρασία μεταξύ 19 και 26°C (Muñoz et al., 2011).

Η μηλογαλακτική ζύμωση, ξεκινά κατά τη φάση ανάπτυξης, μόλις ο συνολικός πληθυσμός υπερβεί τα 10^6-10^7 CFU/mL. Συνεχίζεται και ολοκληρώνεται κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης ή -μερικές φορές- στην αρχή της φάσης θανάτου. Σε εξαιρετικά ευνοϊκές συνθήκες, με περιορισμένη συγκέντρωση μηλικού οξέος, οι μηλογαλακτικές ζυμώσεις συχνά ολοκληρώνονται ακόμη και πριν από το τέλος της φάσης ανάπτυξης. Ο βέλτιστος πληθυσμός σε αυτές τις περιπτώσεις υπερβαίνει τα 10^8 CFU/mL. Μόλις σχηματιστεί επαρκής βιομάζα, το μηλικό οξύ αποικοδομείται (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Παράγοντες που ευνοούν τη μηλογαλακτική ζύμωση, είναι η παρατεταμένη επαφή μεταξύ του οίνου και του φλοιού των ραγών μετά την αλκοολική ζύμωση και η ωρίμανση με οινολάσπες, καθώς η αυτόλυση των ζυμών παρέχει θρεπτικά συστατικά που διεγείρουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Guilloux-Benatier et al., 1993; Muñoz et al., 2011).

Η σύνθεση του βακτηριακού πληθυσμού αλλάζει κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, καθώς τα στελέχη που είναι περισσότερο ανθεκτικά, σε αυτό το εχθρικό περιβάλλον, επιλέγονται σταδιακά. Τα πρώτα είδη που εξαφανίζονται είναι τα ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια, ακολουθούμενα από τα ετεροζυμωτικά και τα είδη του γένους *Pediococcus*. Το κυρίαρχο είδος μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης είναι το *O. oeni*. Αυτό είναι το είδος που προσαρμόζεται καλύτερα στις δύσκολες συνθήκες ανάπτυξης (χαμηλό pH και υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη) που χαρακτηρίζουν αυτήν τη φάση (Davis et al., 1985a; van Vuuren & Dicks, 1993), το οποίο εξηγεί γιατί είναι το κύριο είδος υπεύθυνο για τη μηλογαλακτική ζύμωση στους περισσότερους οίνους. Ορισμένα στελέχη που ανήκουν στα γένη *Pediococcus* και *Lactobacillus*, ωστόσο, μπορούν επίσης να επιβιώσουν σε αυτές τις αφιλόξενες συνθήκες (Muñoz et al., 2011).

Η μηλογαλακτική ζύμωση διαρκεί συνήθως από 5 ημέρες έως 2-3 εβδομάδες, ενώ μπορεί να φτάσει να διαρκεί ακόμη και μήνα, ανάλογα με τις φυσικοχημικές συνθήκες του περιβάλλοντος και την ποσότητα μηλικού οξέος που πρόκειται να μετασχηματιστεί. Αυτό το οξύ θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην τόνωση της ανάπτυξης βακτηρίων, αλλά

όχι στο σχηματισμό της βιομάζας. Η εξάντληση του μηλικού οξέος εξασφαλίζει μικροβιολογική σταθερότητα αναστέλλοντας την περαιτέρω ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το pH είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων στον οίνο (Wibowo et al., 1985) και κάθε είδος έχει διαφορετικό όριο pH. Το γαλακτικό, το ηλεκτρικό και το τρυγικό οξύ αναστέλλουν τη μηλογαλακτική δράση των βακτηρίων, όπως και οι υψηλές συγκεντρώσεις μηλικού οξέος. Το φουμαρικό οξύ, αντίθετα, διεγείρει τη δραστηριότητα, όταν αυτό υπάρχει σε χαμηλά επίπεδα, αλλά αναστέλλει μόλις φτάσει σε επίπεδο μεταξύ 0,4 και 1,5 g/L. Τα λιπαρά οξέα όπως το δεκανοϊκό οξύ, ένα προϊόν μεταβολισμού ζύμης, έχουν ισχυρή ανασταλτική επίδραση στη μηλογαλακτική δραστηριότητα (Edwards & Beelman, 1987; Muñoz et al., 2011).

Η λανθάνουσα φάση συχνά δεν συμβαίνει όταν η οξύτητα των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του οίνου είναι χαμηλή, δηλαδή όταν έχουν υψηλό pH. Σε τέτοιες περιπτώσεις, τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορεί να εμφανιστούν πριν από το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, προκαλώντας αυτό που είναι γνωστό ως αλλοίωση από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, το οποίο είναι μια σημαντική αύξηση της πτητικής οξύτητας του οίνου καθώς τα βακτήρια αρχίζουν να μεταβολίζουν σάκχαρα ταυτόχρονα με μηλικό οξύ και να παράγουν κυρίως οξικό και γαλακτικό οξύ (Muñoz et al., 2011).

Η επιβίωση των βακτηρίων μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση εξαρτάται από το περιβάλλον, ιδιαίτερα από συνθήκες όπως το pH, η περιεκτικότητα σε αιθανόλη και, κυρίως, τα επίπεδα SO_2 (Muñoz et al., 2011). Εάν δεν προστεθεί, εξωγενώς, SO_2 στον οίνο, μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση, τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν για μήνες (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Ο Carre (1982) παρατήρησε μια μικρή μείωση από 10^7 CFU/mL σε 10^5 CFU/mL μετά από 6 μήνες συντήρησης σε οίνο αποθηκευμένο στους 19°C με pH 3,9 και αιθανόλη κατ' όγκο 11,25%. Η προσθήκη SO_2, αμέσως μετά το τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης πρόκειται να επιταχύνει τη φάση θανάτου. Δεν πρέπει να μείνει σημαντικός βιώσιμος πληθυσμός. Ακόμα κι αν δεν μπορούν πλέον να πολλαπλασιαστούν πολύ ενεργά, τα κύτταρα μπορούν να μεταβολίσουν διαφορετικά υποστρώματα, προκειμένου να διασφαλίσουν, έτσι, την επιβίωσή τους. Τα μεταβολικά, αυτά, μονοπάτια, δεν έχουν εξηγηθεί όλα, αλλά αυξάνουν τις συγκεντρώσεις ανεπιθύμητων ουσιών του οίνου, είτε από οργανοληπτική άποψη ή από άποψη υγείας (βιογενείς αμίνες, ουρεθάνη κ.λπ.) (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Τα βακτήρια *O. oeni* εξαφανίζονται γρήγορα, αφήνοντας τα βακτήρια από τα γένη

Pediococcus και *Lactobacillus* να κυριαρχήσουν. Σε οίνους χωρίς προσθήκη SO_2, ορισμένα στελέχη μπορούν να αλλάξουν την ποιότητα του οίνου με το μεταβολισμό συστατικών όπως κιτρικό οξύ, τρυγικό οξύ και γλυκερόλη. Αυτό είναι ιδιαίτερα συνηθισμένο στους οίνους χαμηλής οξύτητας (Muñoz et al., 2011).

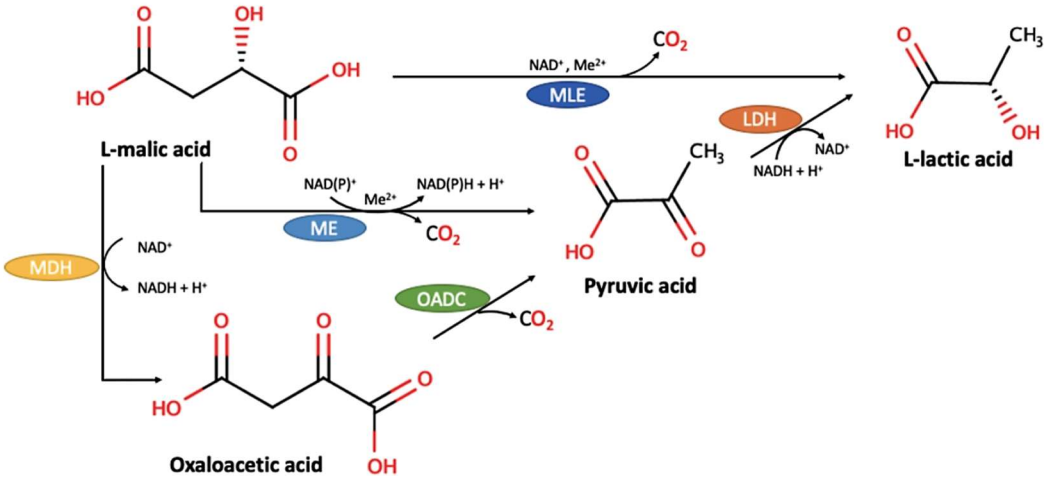
Ενώ μόνο η ελεύθερη μορφή διοξειδίου του θείου (SO_2) έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι των ζυμών του οίνου, όλες οι μορφές διοξειδίου του θείου έχουν δράση κατά των βακτηρίων. Η αντιβακτηριακή δράση, αυτού, εξαρτάται κυρίως από το pH. Τα επίπεδα ελεύθερου SO_2 που απαιτούνται για την αναστολή της δραστικότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυμαίνονται από 10 έως 20 mg/L για οίνους με χαμηλό pH και από 20 έως 40 mg/L για οίνους με υψηλό pH (Muñoz et al., 2011). Σε αυτήν τη συγκέντρωση, σχεδόν όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια θανατώνονται μέσα σε λίγες ημέρες (≤1-10 CFU/mL). Τα αποτελέσματα εξαρτώνται επίσης από τη σύνθεση του μέσου (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Τα είδη *Pediococcus, Oenococcus* και *Leuconostoc*, είναι λιγότερο ανθεκτικά από τα είδη *Lactobacillus*, όσον αφορά την επίδραση του SO_2 (Muñoz et al., 2011).

Επιπλέον, πολλές παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών διατηρείται ευκολότερα στο βαρέλι από ό,τι στη δεξαμενή. Κατά τη διάρκεια 18 μηνών ωρίμανσης σε βαρέλι, παρατηρήθηκε μείωση από 10^6 CFU/mL σε 10^3 CFU/mL παρά την συγκέντρωση ελεύθερου SO_2 μεταξύ 20 και 30 mg/L. Ωστόσο, το κολλάρισμα με ασπράδια αυγού, δείχνει να είναι αποτελεσματικό στην εξάλειψη των βακτηρίων (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Στην πραγματικότητα, η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού που εκτιμήθηκε μετρώντας τις αποικίες που αναπτύχθηκαν σε ένα θρεπτικό μέσο δεν παρέχει προφανώς μια ακριβή απόδοση της κατάστασης μετά την προσθήκη SO_2. Η μέτρηση των βακτηρίων με χρήση μικροσκοπίου επιφθορισμού δείχνει ότι μέρος του πληθυσμού διατηρεί κάποια μεταβολική δραστηριότητα, αν και τα κύτταρα είναι ανίκανα να πολλαπλασιαστούν σε θρεπτικό μέσο. Αυτή η φυσιολογική κατάσταση περιγράφεται ως «βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη» (Millet & Lonvaud-Funel, 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2006). Ένα τέτοιο παράδειγμα μεταβολισμού σύμφωνα με τον Coton (1996), είναι η συσσώρευση της ισταμίνης σε οίνους, καθώς τα βακτηριακά κύτταρα εξακολουθούν να έχουν υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης. Είναι, επομένως, πιθανό τα βακτήρια να είναι υπεύθυνα για άλλους μετασχηματισμούς στα συστατικά του οίνου, ακόμη και μετά τη θείωση και κατά την ωρίμανση. Αυτά τα αποτελέσματα, ωστόσο, δεν είναι απαραίτητα εντελώς αρνητικά (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

2. Μηλογαλακτική ζύμωση

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν τρεις πιθανές ενζυματικές οδούς (*Εικόνα 2*) (Lerm et al., 2010) για τη βιομετατροπή του L-μηλικού οξέος, σε L-γαλακτικό οξύ και την παράλληλη απελευθέρωση CO_2. Η πρώτη, από αυτές, είναι η άμεση βιομετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ, μέσω της αποκαρβοξυλάσης του μηλικού οξέος, επίσης γνωστή ως μηλογαλακτικό ένζυμο. Αυτή η αντίδραση απαιτεί NAD^+ και Mn^{2+} ως συμπαράγοντες και πραγματοποιείται απουσία ελεύθερων ενδιάμεσων (Naouri et al., 1990). Ο ρυθμός αποκαρβοξυλίωσης του μηλικού από τα οξυγαλακτικά βακτήρια συσχετίζεται με τη συγκεκριμένη μηλογαλακτική δραστηριότητα του βακτηριακού κυττάρου (Bartowsky, 2005). Τα κύρια οξυγαλακτικά βακτήρια του οίνου χρησιμοποιούν αυτό το μονοπάτι ώστε να παράγουν γαλακτικό οξύ. Σε άρθρο του Lonvaud-Funel (1995) υπογραμμίζονται τα κύρια χαρακτηριστικά του γονιδίου της αποκαρβοξυλάσης του μηλικού (mleA). Το ένζυμο έχει καθαριστεί από διάφορα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από οίνους και σταφύλια, συμπεριλαμβανομένων κάποιων ειδών από τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* (Lonvaud-Funel, 1995).

Η δεύτερη οδός, χρησιμοποιεί το μηλικό ένζυμο για να μετατρέψει το L-μηλικό οξύ σε πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται από την αφυδρογονάση του L-γαλακτικού σε γαλακτικό οξύ.



Εικόνα 2: Πιθανές ενζυματικές οδοί για τη βιομετατροπή του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό. MLE, μηλογαλακτικό ένζυμο, MDH, αφυδρογονάση του μηλικού, ME, μηλικό ένζυμο, OADC, αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού, LDH, αφυδρογονάση του γαλακτικού. Αναπαραγωγή από (Capozzi et al., 2021).

Η τρίτη πιθανή οδός είναι η αναγωγή του μηλικού από την αφυδρογονάση του μηλικού σε οξαλοξικό, ακολουθούμενη από αποκαρβοξυλίωση σε πυροσταφυλικό και αναγωγή σε γαλακτικό οξύ (Lonvaud-Funel, 1999).

Η κύρια φυσιολογική λειτουργία του μονοπατιού ζύμωσης μηλικού είναι να δημιουργήσει μια κινητήρια δύναμη πρωτονίου (PMF) ως μέσο για την απόκτηση ενέργειας για την προώθηση βασικών κυτταρικών διεργασιών (Konings, 2002). Η αντίδραση μηλογαλακτικής ζύμωσης που καταλύεται από το μηλογαλακτικό ένζυμο μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια: την πρόσληψη L-μηλικού οξέος από τα οξυγαλακτικά, την αποκαρβοξυλίωση του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό οξύ και CO_2 και την απέκκριση του L-γαλακτικού οξέος μαζί με ένα πρωτόνιο. Η αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης αποδίδει ηλεκτρικό δυναμικό (Δψ). Το πρωτόνιο που εκκρίνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης οδηγεί σε αύξηση του εσωτερικού pH του βακτηριακού κυττάρου που αποδίδει μια βαθμίδα pH (ΔpH) κατά μήκος της μεμβράνης. Αυτά τα δύο συστατικά αποτελούν την κινητήρια δύναμη πρωτονίου η οποία, στη συνέχεια, δημιουργεί ATP μέσω των ATPασών της μεμβράνης. Η κινητήρια δύναμη πρωτονίου, είναι αρκετή για να προκαλέσει αντιδράσεις κατανάλωσης ενέργειας π.χ. η μεταφοράς μεταβολιτών (Henick-Kling, 1993; Versari et al., 1999).

3. Επίδραση οξυγαλακτικών βακτηρίων πέραν της μηλογαλακτικής ζύμωσης

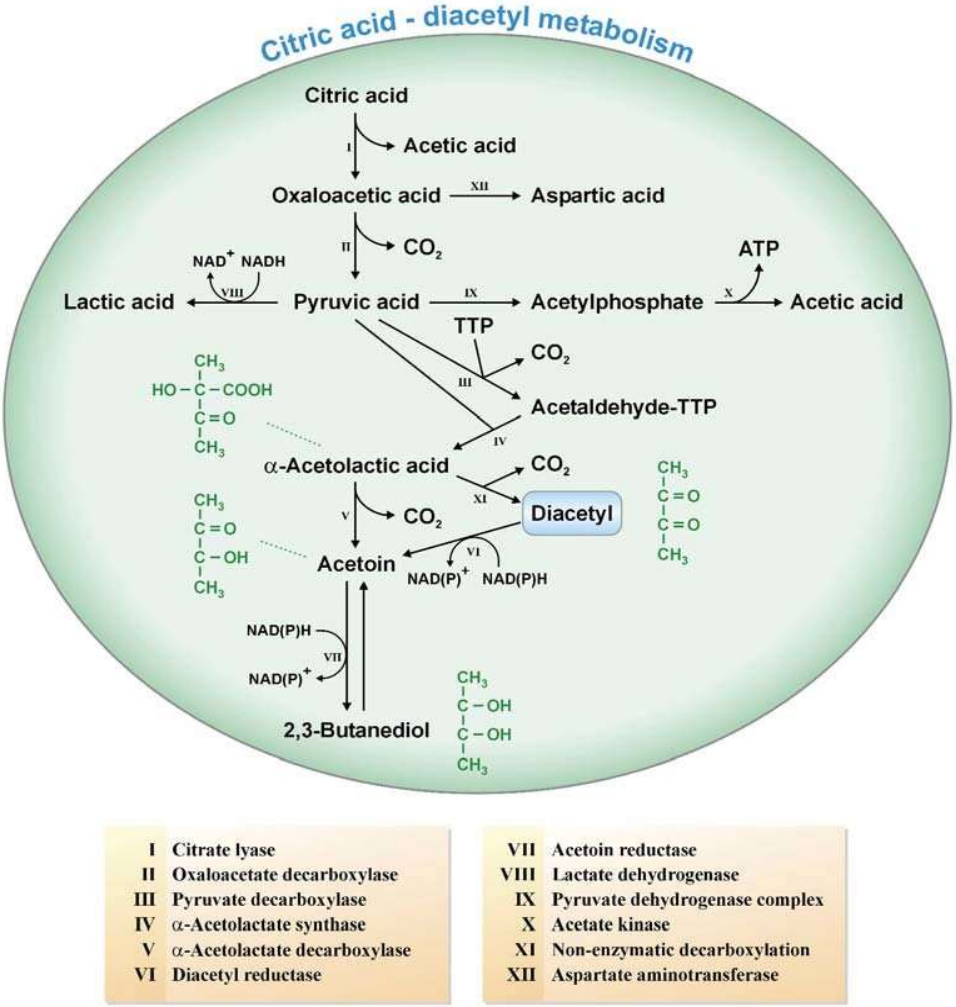
3.1 Μεταβολισμός του κιτρικού οξέος

Το κιτρικό οξύ, είναι ένα από τα οξέα που υπάρχουν τόσο στο σταφύλι, όσο και στο γλεύκος και βρίσκεται γενικά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,1-1 g/L) από τα κύρια οργανικά οξέα, το τρυγικό (2-8 g/L) και το μηλικό οξύ (1-7 g/L) (Belda et al., 2017). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια του οίνου -εκτός από εκείνα του γένους *Pediococcus* (Liu et al. 1995a)- είναι σε θέση να μεταβολίσουν το κιτρικό οξύ, δίνοντας οξικό οξύ και διακετύλιο ως κύρια τελικά προϊόντα, και επομένως επηρεάζοντας την αρωματική ποιότητα του οίνου (Bartowsky & Henschke, 2004).

Όπως και τα άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια, το *O. oeni* δεν χρησιμοποιεί το κιτρικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα, αλλά το μεταβολίζει παράλληλα με τη γλυκόζη, στη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Belda et al., 2017). Αυτός ο συμμεταβολισμός κιτρικού οξέος και γλυκόζης, έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τον ρυθμό ανάπτυξης και την απόδοση σε βιομάζα του βακτηρίου, κάτι το οποίο προκύπτει από την αυξημένη σύνθεση ATP μέσω

φωσφορυλίωσης, τόσο σε επίπεδο υποστρώματος από την κινάση του οξικού οξέος, όσο και με έναν χημειοσμωτικό μηχανισμό (Ramos & Santos, 1996).

Μετά τη μεταφορά του στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, το κιτρικό μετατρέπεται σε μείγμα γαλακτικού, οξικού, διακετυλίου, ακετοΐνης και 2,3-βουτανεδιόλης (*Εικόνα 3*). Θεωρητικά, 1 mol κιτρικού παράγει 1 mol οξικού οξέος, 2 mol διοξειδίου του άνθρακα και 0,5 mol ενός μείγματος που αποτελείται από διακετύλιο, ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόλη (Ramos et al., 1995; Ramos & Santos, 1996). Πιο συγκεκριμένα, το βακτήριο διασπά το κιτρικό σε οξαλοξικό οξύ μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο κιτρική λυάση. Αυτό το οξύ μετατρέπεται με την αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού οξέος σε πυροσταφυλικό, το οποίο -ως επί το πλείστον- ανάγεται σε γαλακτικό οξύ, παρουσία NADH. Ένα μέρος του πυροσταφυλικού, ωστόσο, με το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του α-ακετολακτικού οξέος μετατρέπεται σε 2,3-βουτανεδιόλη και ακετοΐνη. Με τη σειρά της, η χημική οξείδωση της ακετοΐνης, αποδίδει διακετύλιο. Η πρόδρομη ένωση του διακετυλίου



Εικόνα 3: Μεταβολισμός του κιτρικού οξέος. Οι αντιδράσεις, τα ένζυμα που τις καταλύουν και τα παράγωγα του μεταβολισμού. Αναπαραγωγή από (Swiegers et al., 2005).

(και της ακετοΐνης), το α-ακετολακτικό οξύ, είναι επίσης ένα ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση των αμινοξέων βαλίνη και λευκίνη. Η αποικοδόμηση του κιτρικού οξέος από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οδηγεί αυτόματα σε αύξηση της πτητικής οξύτητας στον οίνο (κατά μέσο όρο, 1,2 μόρια οξικού οξέος παράγονται από κάθε μόριο κιτρικού). Ωστόσο, λόγω των μικρών ποσοτήτων, το φαινόμενο αυτό δεν είναι επιζήμιο για την ποιότητα του οίνου (Belda et al., 2017). Σε συνδυασμό με το μεταβολισμό των σακχάρων βέβαια, το γεγονός αυτό μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το άρωμα, εάν συμβεί σε υπερβολικά επίπεδα (Liu, 2002).

Η μεγαλύτερη επίδραση που έχει η ζύμωση κιτρικού στον οίνο, σαφώς, σχετίζεται με την παραγωγή διακετυλίου, την ένωση που είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό άρωμα βουτύρου. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το διακετύλιο σχηματίζεται χημικά από την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του α-ακετολακτικού, μια ασταθή ενδιάμεση ένωση που παράγεται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού του κιτρικού. Στους οίνους που υφίστανται μηλογαλακτική ζύμωση παρατηρείται γενικά μεγαλύτερη συγκέντρωση διακετυλίου, σε σχέση με εκείνους που δεν υφίστανται (Martineau et al., 1995a). Επιπλέον, αυτή η μετατροπή ενισχύεται από την παρατεταμένη επαφή με τη βιομάζα των βακτηρίων ή τα υπολείμματα της αυτόλυσης των ζυμών. Ενώ τα μεσαία επίπεδα διακετυλίου έχουν θετική επίδραση στο άρωμα, τα υψηλά επίπεδα οδηγούν σε μια δυσάρεστη οσμή, οδηγώντας σε αλλοίωση (Nielsen & Richelieu, 1999). Πιο συγκεκριμένα, όταν περιέχεται σε συγκέντρωση που υπερβαίνει τα 5-7 mg/L, το διακετύλιο θεωρείται ανεπιθύμητο. Ωστόσο, αν η συγκέντρωσή του κυμαίνεται στα 1-4 mg/L, θεωρείται ότι συμβάλλει στην επιθυμητή γεύση του οίνου, ανάλογα βεβαίως με τον τύπο αυτού (Swiegers et al., 2005).

Οι Martineau και Henick-Kling (1995b) παρατήρησαν τη χρήση διακετυλίου από τα βακτήρια του γένους *Oenococcus*. Αυτό δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των *Oenococci*, περιέχουν αναγωγάση του διακετυλίου που μετατρέπει το διακετύλιο στις, πολύ λιγότερο αρωματικές ενώσεις, ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόλη (Ramos et al., 1995).

Η τελική συγκέντρωση διακετυλίου στον οίνο, πέρα από τη συγκέντρωση του κιτρικού, εξαρτάται επίσης από διάφορους παράγοντες, όπως το βακτηριακό στέλεχος, τον τύπο του οίνου και τις συγκεντρώσεις διοξειδίου του θείου και οξυγόνου (Nielsen & Richelieu, 1999). Γενικά, η οξυγόνωση, οι υψηλές συγκεντρώσεις κιτρικού και σακχάρων, η χαμηλότερη θερμοκρασία ζύμωσης (18°C), η απομάκρυνση των κυττάρων των ζυμομυκήτων πριν από την διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης και ο χαμηλός ρυθμός εμβολιασμού ευνοούν την παραγωγή διακετυλίου (Martineau et al., 1995). Αντιθέτως, η

παρουσία βιώσιμων κυττάρων ζυμομυκήτων κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής, η παρατεταμένη επαφή με τα οξυγαλακτικά βακτήρια και η προσθήκη διοξειδίου του θείου (SO_2), προκαλούν μείωση του διακετυλίου (Liu, 2002).

Οι αναλύσεις του γονιδιώματος του *O. oeni,* έδειξαν την παρουσία του τυπικού συμπλέγματος γονιδίων κιτρικής λυάσης, το οποίο περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν την κιτρική λυάση (cit-DEF), τη λιγάση κιτρικής λυάσης (citC), την οξαλοξική αποκαρβοξυλάση (mae) και τον μεταφορέα του κιτρικού (maeP) (Mills et al., 2005). Το γονιδίωμα αυτού, περιέχει επίσης γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι της βουτανεδιόλης (ilvB, alsD, butA) (Belda et al., 2017).

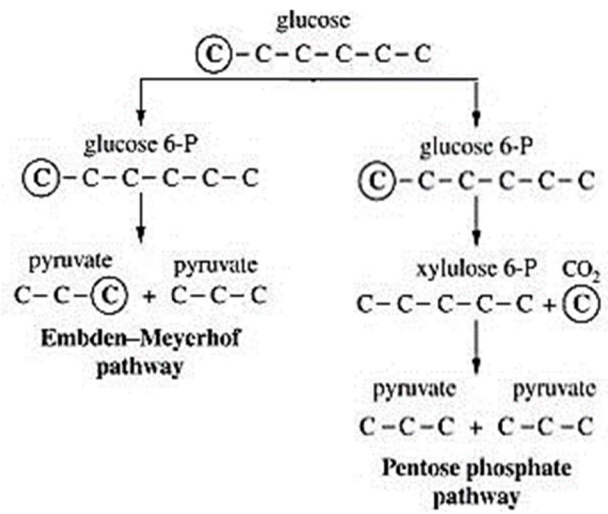
3.2 Μεταβολισμός των υδατανθράκων

3.2.1 Μεταβολισμός μονο-, δισακχαριτών

Ο οίνος περιέχει μια σειρά μονοσακχαριτών (πεντόζες και εξόζες) και δισακχαριτών, με την αραβινόζη, τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και την τρεχαλόζη να είναι τα κύρια σάκχαρα, από τα οποία αποτελείται (Liu & Davis, 1994). Η χρήση σακχάρων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια του οίνου, ως πηγές άνθρακα και ενέργειας, στη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες και διακρίνονται ορισμένες διαφορές, όσον αφορά τη χρήση τους, ανάμεσα στα είδη και τα στελέχη των βακτηρίων (Davis et al. 1986a, b; Liu et al. 1995a; Salou et al. 1994). Σε γενικές γραμμές, η γλυκόζη και η τρεχαλόζη, είναι τα σάκχαρα που προτιμώνται έναντι των υπολοίπων (Liu et al., 1995a).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν δύο κύριες οδούς για το μεταβολισμό της γλυκόζης και μία μόνο οδό για το μεταβολισμό των σακχάρων πεντόζης. Οι δύο οδοί για το μεταβολισμό της γλυκόζης, περιλαμβάνουν την οδό Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) και την πορεία των φωσφορικών πεντοζών ή φωσφοκετολάσης (*Εικόνα 4*) (Fugelsang & Edwards, 2007). Η γλυκόζη, ως ελεύθερο σάκχαρο, μεταφέρεται στο κύτταρο όπου φωσφορυλιώνεται από την εξοκινάση, μια αντίδραση που εξαρτάται από το ATP, προτού εισέλθει σε μία από τις δύο προαναφερθείσες οδούς. Η οδός EMP, επίσης γνωστή ως ομοζυμωτική γαλακτική ζύμωση στα οξυγαλακτικά βακτήρια, οδηγεί στο σχηματισμό γαλακτικού οξέος ως κύριο τελικό προϊόν, καθώς και στην παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (CO_2). Αυτό το μονοπάτι χωρίζεται σε δύο βήματα. Η πρώτη αντίδραση είναι η γλυκόλυση, όπου από τη γλυκόζη παράγεται το πυροσταφυλικό και ακολουθεί η μετατροπή αυτού σε γαλακτικό οξύ (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Αυτή η οδός χρησιμοποιείται από στελέχη του γένους *Pediococcus* και ο μεταβολισμός ενός γραμμομορίου γλυκόζης

παράγει δύο γραμμομόρια γαλακτικού οξέος καθώς και καθαρή ποσότητα δύο μορίων ATP. Η πορεία των φωσφορικών πεντοζών, επίσης γνωστή ως ετεροζυμωτική γαλακτική ζύμωση, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος και CO_2, αλλά και αιθανόλης και οξικού οξέος ως τελικά προϊόντα. Τα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που κάνουν χρήση αυτής της οδού περιλαμβάνουν όλα τα στελέχη του γένους *Leuconostoc*, ορισμένα στελέχη του γένους *Lactobacillus* και το *O. oeni*. Ένα γραμμομόριο γλυκόζης που μεταβολίζεται μέσω αυτής της οδού, θα οδηγήσει στο σχηματισμό ισομοριακών ποσοτήτων καθενός από τα γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και CO_2, καθώς και ένα γραμμομόριο ATP (Fugelsang & Edwards, 2007).



Εικόνα 4: Οι οδοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων για το μεταβολισμό της γλυκόζης. Αναπαραγωγή από (Doran, 2013).

Πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια είναι σε θέση να ζυμώσουν πεντόζες και να κάνουν χρήση ειδικών περμεασών για την είσοδο, αυτών, στο κύτταρο. Οι πεντόζες φωσφορυλιώνονται, έχοντας μετατραπεί από επιμεράσες ή ισομεράσες στα φωσφορικά παράγωγα 5-φωσφορική-ριβουλόζη ή 5-φωσφορική-ξυλουλόζη, και στη συνέχεια μεταβολίζονται μέσω του δεύτερου μισού της οδού των φωσφορικών πεντοζών. Τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού αυτού, είναι ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος και CO_2.

Σύμφωνα με την οδό που χρησιμοποιείται για το μεταβολισμό των υδατανθράκων, τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες. Η κάθε μία από αυτές, διαφέρει επίσης ανάλογα με τα ένζυμα που απαιτούνται για τη διαδικασία αυτή. Στην πρώτη ομάδα, ανήκουν τα υποχρεωτικά ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούν μόνο την οδό EMP. Σε αυτή, περιλαμβάνονται όλα τα είδη του γένους

Pediococcus που εντοπίζονται στον οίνο. Κατέχουν το ένζυμο αλδολάση, αλλά το ένζυμο φωσφοκετολάση απουσιάζει από αυτά. Στη δεύτερη ομάδα, ανήκουν τα υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά, στα οποία περιλαμβάνονται τα είδη *L. brevis, L. hilgardii*, *Leuconostoc* και *O. oeni*. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αυτής, χρησιμοποιούν την πορεία των φωσφορικών πεντοζών για το μεταβολισμό των υδατανθράκων. Εμφανίζουν δραστηριότητα φωσφοκετολάσης, αλλά δεν διαθέτουν το ένζυμο αλδολάση. Τέλος, στην τρίτη ομάδα, ανήκουν ορισμένα είδη *Lactobacillus*, τα οποία είναι προαιρετικά ετεροζυμωτικά. Σε αυτά, περιλαμβάνονται τα *L. casei* και *L. plantarum*. Αυτά τα οξυγαλακτικά βακτήρια κάνουν χρήση της οδού EMP για το μεταβολισμό της εξόζης και της οδού των φωσφορικών πεντοζών για το μεταβολισμό των πεντοζών και άλλων υποστρωμάτων, ενώ διαθέτουν μόνο το ένζυμο αλδολάση (Fugelsang & Edwards, 2007).

Η κατανόηση των μεταβολικών απαιτήσεων των οξυγαλακτικών βακτηρίων, θα οδηγήσει τον εκάστοτε οινοποιό στη λήψη αποφάσεων σχετικά με τις απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και την ορθή διαχείριση της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

3.2.2 Μεταβολισμός (εξω)πολυσακχαριτών

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν μέρος των μορίων που παράγονται από το μικροβιακό μεταβολισμό και μπορούν -και αυτοί με τη σειρά τους- να επηρεάσουν την ποιότητα του οίνου. Δομικά τους συστατικά είναι επαναλαμβανόμενες μονάδες μονοσακχαρίτη, είτε ενός συγκεκριμένου (ομοπολυσακχαρίτες), είτε πολλών διαφορετικών (ετεροπολυσακχαρίτες), ενώ αποτελούν και το συστατικό του οίνου με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος (Dimopoulou et al., 2017).

Στα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι πολυσακχαρίτες έχουν την ικανότητα να συσσωρεύονται γύρω από το κύτταρο σχηματίζοντας μια λεπτή έως παχιά κάψουλα -ανάλογα με το στέλεχος- ή/και να εκκρίνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον με τη μορφή βλέννας (Cerning, 1990; De Vuyst & Degeest, 1999). Τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* και *Pediococcus* μπορούν να παράγουν εξωπολυσακχαρίτες σε διάφορα μέσα (Cerning, 1990).

Στη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, οι συγκεντρώσεις των διαλυτών πολυσακχαριτών αυξάνονται ή μειώνονται, ανάλογα με τον υπό εξέταση οίνο, γεγονός που υποδηλώνει ότι το *O. oeni*, το βακτηριακό είδος που είναι πιο συχνά υπεύθυνο για τη μηλογαλακτική ζύμωση, μπορεί τόσο να παράγει όσο και να αποικοδομήσει τους πολυσακχαρίτες, χωρίς να επιφέρει στον οίνο κάποια αλλαγή (Dols-Lafargue et al., 2007). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να

προκαλούν την «ασθένεια της πάχυνσης», έναν τύπο βακτηριακής αλλοίωσης. Οι οίνοι που «πάσχουν» από την ασθένεια αυτή, εμφανίζουν υψηλό ιξώδες, λόγω της απελευθέρωσης ενός συγκεκριμένου βακτηριακού εξωκυτταρικού πολυσακχαρίτη (Llaubères et al., 1990). Ο πρώτος και περισσότερο μελετημένος εξωπολυσακχαρίτης, που προκαλεί την «πάχυνση» του οίνου, είναι η υψηλού μοριακού βάρους (500-2000 kDa) β-γλυκάνη που παράγεται από τα στελέχη *Pediococcus parvulus* 2.6 και IOEB_8801 (Dimopoulou et al., 2017). Κάποια άλλα είδη, λιγότερο μελετημένα, φαίνεται πως παράγουν επίσης τη συγκεκριμένη β-γλυκάνη (Walling et al., 2005). Παρ' όλα αυτά, τα στελέχη *Lactobacillus collinoides* IOEB_0203 και *L. hilgardii* IOEB_0204, παρ' ότι προκαλούν επίσης την ασθένεια αυτή, δεν φαίνεται να περιέχουν αλληλουχίες παρόμοιες με τις γλυκοζυλ-τρανσφεράσες που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή των εξωπολυσακχαριτών των στελεχών που αναφέρθηκαν παραπάνω (Walling et al., 2005).

Όσον αφορά το *O. oeni*, περισσότερο από το 75% των στελεχών που έχουν μελετηθεί, παράγουν ετεροπολυσακχαρίτες, φτιαγμένους από γλυκόζη, γαλακτόζη και ραμνόζη, σε ποικίλες αναλογίες, που εξαρτώνται από το στέλεχος. Αυτά τα πολυμερή βρίσκονται είτε σε ελεύθερη είτε σε μορφή κάψουλας, αλλά δεν προκαλούν την «ασθένεια της πάχυνσης» (Dimopoulou et al., 2012; 2014; Ibarburu et al., 2007). Σαφώς υπάρχουν και μερικά στελέχη, τα οποία έχουν την ικανότητα παραγωγής της ίδιας β-γλυκάνης (β-1,3-β-1,2 glucan) με το *P. parvulus* -σε ελεύθερη μορφή ή μορφή κάψουλας- και εμφανίζουν καθαρά το φαινότυπο της ασθένειας (Dimopoulou et al., 2014; Ibarburu et al., 2007).

Ο βιολογικός ρόλος των εξωπολυσακχαριτών των βακτηρίων είναι, πιθανώς, να αποτελέσουν μια ασπίδα, ώστε να καταφέρουν να ξεπεράσουν το στρες που συναντάται στο εχθρικό -για το κύτταρο- περιβάλλον του οίνου (Caggianiello et al., 2016; Dimopoulou et al., 2016; Dols-Lafargue et al., 2008). Στην πραγματικότητα, η κάψουλα β-γλυκάνης εξασφαλίζει την αντοχή των στελεχών στο διοξείδιο του θείου (SO_2), την αιθανόλη και το χαμηλό pH (Caggianiello et al. 2016; Dols-Lafargue et al., 2008; Walling et al., 2005) αλλά και τη λυσοζύμη (Coulon et al., 2012). Η κάψουλα του ετεροπολυσακχαρίτη και η δεξτράνη που απελευθερώνονται, αυξάνουν την αντίσταση του *O. oeni* στο ψυχρό σοκ, το χαμηλό pH ή την ξήρανση με κατάψυξη (Dimopoulou et al., 2016). Προσφέρουν αυξημένη βακτηριακή προστασία, οδηγώντας έτσι σε βελτιωμένους ρυθμούς ζύμωσης και καλύτερη ποιότητα του οίνου. Επιπλέον, οι εξωπολυσακχαρίτες του *O. oeni* μπορούν να συμβάλουν στο σχηματισμό βιοϋμενίων, στο φλοιό των σταφυλιών και στον εξοπλισμό της οινοποίησης (Bastard et al., 2016), δομών που είναι γνωστό ότι ευνοούν την επιβίωση των κυττάρων υπό δυσμενείς συνθήκες (Kubota et al., 2009).

Στο παρελθόν, οι πολυσακχαρίτες των οξυγαλακτικών βακτηρίων θεωρούνταν ότι δεν είχαν καμία επίδραση στον οίνο, πέρα από τη συσσώρευση β-γλυκάνης και την ασθένεια της πάχυνσης. Ωστόσο, οι πολυσακχαρίτες συσσωρεύονται στον οίνο τόσο κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, όσο και αργότερα, ακόμη και όταν δεν παρατηρείται αύξηση του ιξώδους (Dimopoulou et al., 2014). Αυτά τα βιοπολυμερή θα μπορούσαν άμεσα ή έμμεσα να έχουν αντίκτυπο στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου, αντίστοιχο με τις μαννοπρωτεΐνες των ζυμομυκήτων (μείωση στυπτικότητας, βελτίωση της αίσθησης στο στόμα κ.α.) (Pérez-Serradilla & de Castro, 2008). Επιπλέον, ακόμα κι αν δεν αποτελούν πτητικά μόρια, μπορούν έμμεσα να συμβάλλουν στην αντίληψη του αρώματος των οίνων. Μάλιστα, οι Dimopoulou et al. (2018), πρότειναν για πρώτη φορά ότι οι βακτηριακοί εξωπολυσακχαρίτες που παράγονται στους οίνους, θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην αρωματική πολυπλοκότητα και τα φρουτώδη αρώματα αυτών.

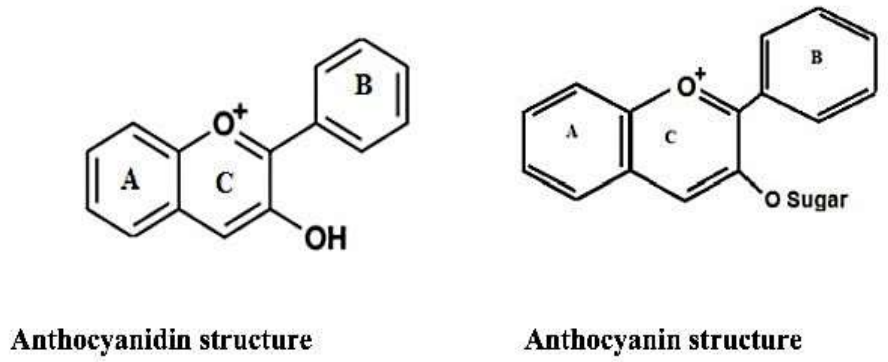
Είναι φανερό, λοιπόν, πως ανάλογα με τη δομή των πολυσακχαριτών, τα είδη που εμπλέκονται και το στάδιο της οινοποίησης, αυτοί μπορεί να είναι ουδέτεροι, ευεργετικοί ή επιζήμιοι για την ποιότητα του οίνου ή/και την επακόλουθη ανάπτυξη άλλων ειδών (Lonvaud-Funel, 1999). Η βαθύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα βακτήρια συμπεριφέρονται στον οίνο, καθώς και των παραγόντων που εμπλέκονται στη σύνθεση των πολυσακχαριτών, θα βοηθήσουν στη σωστή διαχείριση της ζύμωσης και ωρίμανσης του οίνου, ώστε να αποφευχθεί η πιθανή αλλοίωση αυτού.

3.3 Μεταβολισμός των γλυκοζυλιωμένων παραγώγων (γλυκοζιτών)

Το αρωματικό προφίλ των οίνων εξαρτάται -μεταξύ άλλων- και από τις αρωματικές ενώσεις που είναι χαρακτηριστικές για τις ποικιλίες των σταφυλιών, που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή τους. Οι ενώσεις αυτές, εντοπίζονται στα σταφύλια ως ελεύθερες πτητικές αλλά και -σε υψηλότερες συγκεντρώσεις- ως πρόδρομες, αρωματικών ενώσεων (Gil-Sánchez et al., 2019). Οι άοσμες πρόδρομες ενώσεις, έχουν τη μορφή γλυκοζυλιωμένων παραγώγων (π.χ. μονο-τερπενίων) και υδρολύονται με τη δράση του ενζύμου γλυκοζιδάση (π.χ. β-γλυκοζιδάση), απελευθερώνοντας την αρωματική ένωση από το σάκχαρο (Liu, 2002). Είναι φανερό, λοιπόν, πως αντιπροσωπεύουν μια φυσική δεξαμενή αρωματικών ενώσεων στους οίνους και μπορούν να απελευθερωθούν με φυσικό, αργό τρόπο κατά την ωρίμανση του οίνου ή σκόπιμα με τη χρήση οινολογικών ενζύμων κατά την οινοποίηση (Gil-Sánchez et al., 2019).

Το αντίθετο, βέβαια, ισχύει για το χρώμα των οίνων, καθώς η β-γλυκοζιδάση, υδρολύει τις συνδεδεμένες με σάκχαρο ανθοκυάνες, για να απελευθερώσει το σάκχαρο και την

αντίστοιχη ανθοκυανιδίνη (*Εικόνα 5*). Εάν ο γλυκοζιτικός δεσμός σπάσει, οι ανθοκυάνες γίνονται ασταθείς και μετατρέπονται εύκολα σε καφέ ή άχρωμες ενώσεις (Liu, 2002). Πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι τα στελέχη *O. oeni* και *L. plantarum* μπορούν να παράγουν ένζυμα β-γλυκοζιδάσης και επίσης να απορροφήσουν ανθοκυάνες, όπως ο 3-γλυκοζίτης της δελφινιδίνης, 3-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης και 3-γλυκοζίτης της πεονιδίνης μέσω του κυτταρικού τοιχώματος (Devi et al., 2019), οδηγώντας έτσι σε απώλεια χρώματος.



Εικόνα 5: Δομή των ανθοκυανιδινών και των ανθοκυανών. Η β-γλυκοζιδάση, δρα στο σημείο που συνδέεται το σάκχαρο, στη δομή της ανθοκυάνης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της ανθοκυανιδίνης. Αναπαραγωγή από Deveoglu & Karadag (2019).

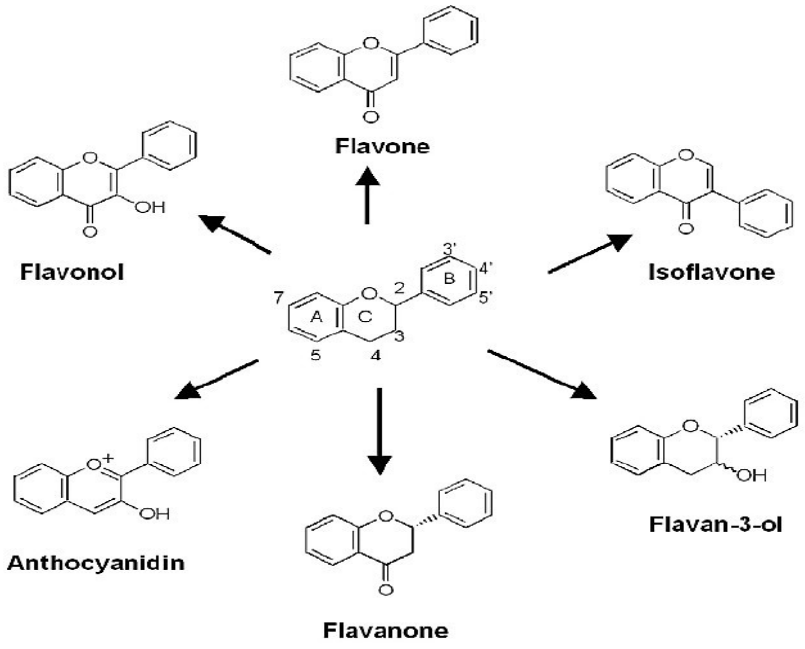
Ένας μεγάλος αριθμός γλυκοζυλιωμένων παραγώγων (συμπεριλαμβανομένων των α-D-γλυκοζιτών, των α-L-αραβινοφουρανοζυλ-β-D-γλυκοζιτών, των α-L-ραμνοπυρανοζυλ-β-D-γλυκοζιτών ή β-D-απιοφουρανοζυλ-β-D-γλυκοζιτών) που προέρχονται από το σταφύλι, το μεταβολισμό των ζυμών ή τη χρήση δρυός έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με τον οίνο (Swiegers et al., 2005). Η υδρόλυση αυτών των μορίων απελευθερώνει ενώσεις όπως τα νορισοπρενοειδή με δεκατρία άτομα άνθρακα (C_{13}), τις πτητικές φαινόλες, τα παράγωγα βενζολίου ή τις αλειφατικές ενώσεις, που συμβάλλουν στο άρωμα του οίνου. Για το λόγο αυτό, οι γλυκοζίτες θεωρούνται μια σημαντική πηγή αρώματος στον οίνο (Gil-Sánchez et al., 2019).

Οι Grimaldi et al. (2000) εντόπισαν ανιχνεύσιμες δράσεις της β-γλυκοζιδάσης σε έντεκα εμπορικά παρασκευάσματα βακτηρίων του γένους *Oenococcus*. Τα ευρήματα αυτά, υποδηλώνουν ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια του οίνου έχουν τη δυνατότητα να υδρολύουν γλυκοζυλιωμένα παράγωγα ώστε να επηρεάσουν το άρωμα και το χρώμα αυτού. Το γεγονός αυτό, έχει προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να αποσαφηνίσει το ρόλο των βακτηρίων στις αλλαγές που παρατηρούνται κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση και σχετίζονται με τα παραπάνω οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Οι Saguir et al. (2009)

έδειξαν ότι διαφορετικές καλλιέργειες *O. oeni* στο τέλος της εκθετικής τους ανάπτυξης είχαν ένα ανιχνεύσιμο και μεταβλητό επίπεδο δράσης του ενζύμου β-γλυκοζιδάση. Επιπλέον, αυτή η ενζυμική δράση έχει επίσης βρεθεί και σε άλλα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων του οίνου που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Pediococcus* (Grimaldi et al., 2005). Για παράδειγμα, κάποια στελέχη *L. brevis* και *L. casei* μπόρεσαν να αυξήσουν τη συγκέντρωση των νορισοπρενοειδών δεκατριών ατόμων άνθρακα (C_{13}) και μονοτερπενίων μετά την εκτέλεση μηλογαλακτικής ζύμωσης (Hernández-Orte et al., 2009). Η απελευθέρωση χαρακτηριστικών ποικιλιακών πτητικών ενώσεων, έχει παρατηρηθεί για τους οίνους των ποικιλιών Tannat, Chardonnay και Muscat συγκρίνοντας την επίδραση πολλών καλλιεργειών βακτηρίων της μηλογαλακτικής (Boido et al., 2002; D'Incecco et al., 2004; Ugliano et al., 2003). Τα ποικιλιακά αρώματα των σταφυλιών που απελευθερώνονται από βακτήρια ποικίλλουν ευρέως, ανάλογα με τα στελέχη και τα υποστρώματα τερπενίου που εμπλέκονται (Gil-Sánchez et al., 2019). Ορισμένοι ερευνητές έχουν αποδείξει ότι το *L. plantarum* παρουσιάζει διαφορετικό ενζυμικό προφίλ σε σύγκριση με άλλα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων (Iorizzo et al., 2016; Lerm et al., 2011). Συγκεκριμένα, οι Iorizzo et al. ταυτοποίησαν διαφορετικά στελέχη *L. plantarum* τα οποία εμφάνισαν ισχυρή δράση β-γλυκοζιδάσης και α-γλυκοζιδάσης σε συνθήκες οινοποίησης. Είναι ενδιαφέρον ότι το στέλεχος *L. plantarum* M10 απελευθέρωσε σημαντικές ποσότητες αρωματικών ενώσεων με χαμηλά κατώφλια αντίληψης και νότες ανθικών-εσπεριδοειδών στους οίνους, όπως τα τερπένια λιμονένιο και λιναλόλη, μεταξύ άλλων, τα οποία πρότειναν και πάλι μια σχετική επίδραση του *L. plantarum* για την παραγωγή σημαντικών αρωματικών μορίων στον οίνο (Iorizzo et al., 2016).

3.4 Μεταβολισμός των φαινολικών ενώσεων

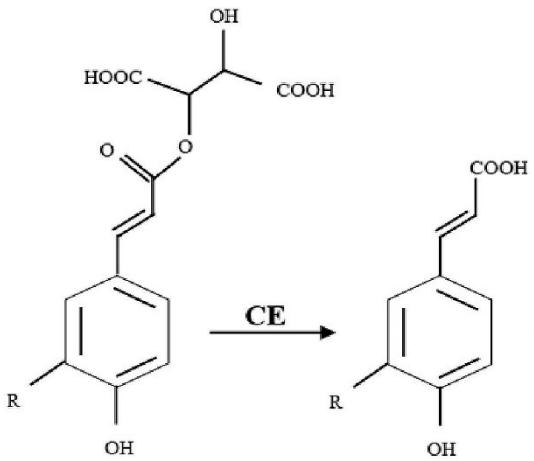
Οι φαινολικές ενώσεις των σταφυλιών και του οίνου, κατανέμονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή (*Εικόνα 6*) (750 έως 1060 mg/L στους ερυθρούς, 25 έως 30 mg/L στους λευκούς οίνους) (De Beer et al., 2002), που βρίσκονται στους φλοιούς, τα γίγαρτα και τους βοστρύχους, περιλαμβάνουν κυρίως τις ανθοκυάνες (40 έως 470 mg/L στους ερυθρούς), τα μονομερή φλαβαν-3-όλης (25 έως 560 mg/L στους ερυθρούς), π.χ. κατεχίνη (15 έως 390 mg/L στους ερυθρούς), τα ολιγομερή και πολυμερή προανθοκυανιδινών, τις φλαβονόλες (65 έως 240 mg/L στους ερυθρούς), π.χ. κουερσετίνη (1 έως 30 mg/L στους ερυθρούς), τις φλαβανόνες και τις φλαβόνες (De Beer et al., 2002; Garrido & Borges, 2013). Στα μη φλαβονοειδή (240 έως 500 mg/L στους ερυθρούς οίνους, 160 έως 260 mg/L στους λευκούς οίνους) (De Beer et al., 2002), τα οποία προέρχονται κυρίως από την σάρκα και τους φλοιούς των καρπών, ανήκουν τα φαινολικά οξέα τα οποία είναι παράγωγα υδροξυκινναμωμικών και υδροξυβενζοϊκών οξέων και τα στιλβένια. Όλες οι παραπάνω, αποτελούν σημαντικές ενώσεις -τόσο των σταφυλιών, όσο και του οίνου- λόγω της άμεσης και έμμεσης συμβολής τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως το χρώμα, τη γεύση, τη στυπτικότητα και τη δομή των οίνων (Garrido & Borges, 2013).



Εικόνα 6: Κατηγορίες φλαβονοειδών που συναντώνται στους οίνους. Αναπαραγωγή από (Nishiumi et al., 2011).

Η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στον οίνο, είναι ειδική για κάθε ποικιλία και εξαρτάται από τις διαδικασίες οινοποίησης που εφαρμόζει ο εκάστοτε οινοποιός (Rozès et al., 2003). Η αλληλεπίδραση μεταξύ οξυγαλακτικών βακτηρίων και φαινολικών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως το στέλεχος των οξυγαλακτικών βακτηρίων (García-Ruiz et al., 2008; Hernández et al., 2007) και ο τύπος και η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στον οίνο (García-Ruiz et al., 2008; Reguant et al., 2000; Stead, 1993). Λόγω αυτής της αλληλεπίδρασης, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να επηρεάσουν την περάτωση -ή μη- της μηλογαλακτικής ζύμωσης, καθώς και το ρυθμό αυτής (Vivas et al., 1997). Είναι γνωστό ότι, τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να μετασχηματίζουν τις πολυφαινολικές ενώσεις, καθώς έχει γίνει αναφορά για σαφείς διαφορές στο φαινολικό περιεχόμενο του οίνου, ως αποτέλεσμα της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Hernández et al., 2007). Οι κύριες ενώσεις που μπορούν να μετασχηματιστούν από διαφορετικά οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν τα υδροξυκινναμωμικά οξέα και τα παράγωγά τους, τις φλαβονόλες και τους γλυκοζίτες τους, τα μονομερή και ολιγομερή φλαβανόλης, καθώς και την trans-ρεσβερατρόλη και τον γλυκοζίτη της (Hernández et al., 2006; 2007).

Οι Hernández et al. (2006) διερεύνησαν την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στις φαινολικές ενώσεις ερυθρού οίνου και συνέδεσαν τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν σε αυτόν, με το μεταβολισμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, στη μελέτη αυτή, παρουσίασαν δράση κινναμωμικής εστεράσης (*Εικόνα 7*), κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, με παρατηρούμενη μείωση της συγκέντρωσης των trans-καφεϋλ-



Εικόνα 7: Η δράση της κινναμωμικής εστεράσης στο μεταβολισμό των υδροξυκινναμωμικών-τρυγικών οξέων. Αναπαραγωγή από (Collombel et al., 2019).

τρυγικού οξέος και trans-p-κουμαρυλ-τρυγικού οξέος, που οδήγησε σε ταυτόχρονη αύξηση στις αντίστοιχες ελεύθερες μορφές, trans-καφεϊκού οξέος και trans-p-κουμαρικού οξέος (υδροξυκινναμωμικά οξέα), αντίστοιχα (*Πίνακας 1*). Ομοίως, οι Cabrita et al. (2008) διαπίστωσαν ότι η εξάντληση των υδροξυκινναμωμικών-τρυγικών οξέων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των ελεύθερων μορφών στη διάρκεια τόσο της αυθόρμητης, όσο και της ελεγχόμενης, μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Πίνακας 1: Οι εστέρες του τρυγικού οξέος και τα παράγωγα από τη δράση της κινναμωμικής εστεράσης.

Εστέρες Τρυγικού Οξέος	**HCAs**
R=H: p-κουμαρυλ-τρυγικού οξέος	p-κουμαρικό οξύ
R=OH: καφεϋλ-τρυγικού οξέος	καφεϊκό οξύ

Παρατηρείται επίσης ότι, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να επηρεάσουν τον βακτηριακό μεταβολισμό (Rozès et al., 2003; Vivas et al., 1997), με τρόπο που ορισμένες αναστέλλουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Reguant et al., 2000), ενώ άλλες έχουν την ικανότητα να διεγείρουν, για παράδειγμα, το *O. oeni* (Vivas et al., 1997). Οι García-Ruiz et al. (2008) ανέφεραν το μεταβολισμό φαινολικών ενώσεων, από οξυγαλακτικά βακτήρια, σε συγκεντρώσεις από 100 έως 250 mg/L πριν από την αναστολή αυτού από συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα 500 mg/L. Οι Reguant et al. (2000) διαπίστωσαν ότι τα υδροξυκινναμωμικά οξέα αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, προκαλώντας καθυστέρηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης από το p-κουμαρικό οξύ σε συγκεντρώσεις άνω των 100 mg/L και από το φερουλικό οξύ σε συγκεντρώσεις άνω των 500 mg/L. Ομοίως, οι García-Ruiz et al. (2008) ανέφεραν τη χρήση ελεύθερων υδροξυκινναμωμικών οξέων, ως μέσο ελέγχου της ανάπτυξης του *L. plantarum* και διαπίστωσαν ότι το φερουλικό οξύ είναι ισχυρότερα ανασταλτικό από το p-κουμαρικό, ενώ οι εστέρες του φερουλικού οξέος δεν επηρεάζουν την ανάπτυξή του. Οι Vivas et al. (1997) εντόπισαν μια μικρή ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του *O. oeni* από το βανιλλικό οξύ, ενώ το πρωτοκατεχικό οξύ δεν φάνηκε να έχει κάποια επίδραση.

Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους οι φαινολικές ενώσεις αναστέλλουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν είναι απολύτως σαφείς, έχουν γίνει κάποιες εικασίες. Οι πιθανοί μηχανισμοί βασίζονται στις αλληλεπιδράσεις των φαινολικών ενώσεων με τα κυτταρικά ένζυμα (Campos et al., 2003; García-Ruiz et al., 2008) και την προσρόφηση αυτών στα κυτταρικά

τοιχώματα (Campos et al., 2003). Οι φαινολικές ενώσεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε απώλεια ιόντων καλίου, γλουταμινικού οξέος και ενδοκυτταρικού RNA, καθώς και να προκαλέσουν αλλαγή στη σύνθεση των λιπαρών οξέων (García-Ruiz et al., 2008; Rozès & Perez, 1998). Ορισμένα χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων του οίνου, όπως η παραγωγή πτητικών οξέων και η μηλογαλακτική δραστηριότητα, επηρεάζονται διαφορετικά από την παρουσία φαινολικών, και αυτό εξαρτάται από το βακτηριακό στέλεχος (Campos et al., 2009).

Αξίζει να σημειωθεί βέβαια ότι, ορισμένες φαινολικές ενώσεις μπορούν επίσης να έχουν διεγερτική επίδραση στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Οι ελεύθερες ανθοκυάνες και άλλες φαινολικές ενώσεις, όπως το γαλλικό οξύ, είναι ικανές να διεγείρουν την ανάπτυξη των κυττάρων και την αποικοδόμηση του μηλικού οξέος από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα φαινολικά καρβοξυλικά οξέα και η κατεχίνη φαίνεται να διεγείρουν την ανάπτυξη του *O. oeni*, ενισχύοντας το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος και μειώνοντας τη φάση προσαρμογής στον οίνο (Rozès et al., 2003; Vivas et al., 1997). Σε έρευνα από τους Reguant et al. (2000), πάνω στην επίδραση των φαινολικών ενώσεων, στη φυσιολογία του *O. oeni*, παρατηρήθηκε καλύτερη ανάπτυξή του, παρουσία της κατεχίνης και της κουερσετίνης. Οι Rozès et al. (2003) μελέτησαν την επίδραση των φαινολικών (τα φαινολικά οξέα, p-κουμαρικό, φερουλικό, καφεϊκό και γαλλικό οξύ, καθώς και την κατεχίνη και την ανθοκυάνη, 3,5-διγλυκοζίτη της μαλβιδίνης) σε ένα συνθετικό μέσο, στην ανάπτυξη του *O. oeni*. Παρατήρησαν ότι, μια συγκέντρωση της τάξης των 50 mg/L των φαινολικών ενώσεων, ήταν ικανή να συντελέσει θετικά στην ανάπτυξη του *O. oeni*. Το αποτέλεσμα αυτό, μπορεί να αποδοθεί στην προστασία που παρέχουν τα φαινολικά, στα βακτηριακά κύτταρα, έναντι της αιθανόλης, καθώς και στο γεγονός ότι οι φαινολικές ενώσεις μειώνουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του οίνου που προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων (Rozès et al., 2003).

Σαφώς, ο μεταβολισμός των φαινολικών ενώσεων, στη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, μπορεί να επιφέρει ορισμένες αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, επηρεάζοντας, έτσι, την ποιότητα του οίνου. Οι Cavin et al. (1993) ανέφεραν την ικανότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων να αποκαρβοξυλιώνουν τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πτητικών φαινολών (4-αιθυλ-φαινόλης, 4-αιθυλ-γουαϊακόλης) και την παραγωγή ανεπιθύμητων οσμών (Cavin et al., 1993; de las Rivas et al., 2009). Από τους Campos et al. (2009), μελετήθηκε επίσης ένα στέλεχος του *O. oeni* που κατάφερε να παράγει υψηλότερες συγκεντρώσεις οξικού οξέος, παρουσία ορισμένων φαινολικών

οξέων. Το γεγονός αυτό, πιθανότατα οφείλεται στον αυξημένο μεταβολισμό του κιτρικού οξέος -παρουσία φαινολικών οξέων- όπως τεκμηριώνεται από τους Rozès et al. (2003). Διαπιστώθηκε επίσης ότι αυτό το φαινόμενο εξαρτάται από το στέλεχος. Σε αντίθεση βρίσκονται τα λεγόμενα των Reguant et al. (2000), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι το γαλλικό οξύ ήταν ικανό να καθυστερήσει ή και να αναστείλει πλήρως τον σχηματισμό οξικού οξέος από κιτρικό οξύ. Τέλος, τα στελέχη *L. plantarum* (όχι το *O. oeni*), φαίνεται ότι παρουσιάζουν δραστηριότητα ταννάσης, η οποία επιτρέπει την υδρόλυση εστερικών δεσμών σε υδρολυόμενες τανίνες, απελευθερώνοντας γαλλικό οξύ και γλυκόζη (Curiel et al., 2009). Η δράση της ταννάσης θα μπορούσε ενδεχομένως να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μείωση της στυπτικότητας και του σχηματισμού θολώματος στον οίνο (Vaquero et al., 2004).

Η επίδραση που έχουν οι φαινολικές ενώσεις στη μεταβολική δραστηριότητα και την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, φαίνεται να εξαρτάται από τον τύπο της ένωσης και τη συγκέντρωσή της, καθώς φυσικά και από το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου.

3.5 Καταβολισμός των αμινοξέων

Οι πρωταρχικές αντιδράσεις του μικροβιακού καταβολισμού των αμινοξέων περιλαμβάνουν την αποκαρβοξυλίωση, την τρανσαμίνωση, την απαμίνωση και την αποθείωση αυτών. Η αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων οδηγεί στο σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και αμινών, οι οποίες μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Νέα αμινοξέα και α-κετονοξέα παράγονται μέσω της τρανσαμίνωσης των αμινοξέων, ενώ η απαμίνωση αυτών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή α-κετονοξέων και αμμωνίας. Πτητικές ενώσεις θείου παράγονται μέσω της αποθείωσης των αμινοξέων που περιέχουν το στοιχείο αυτό, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη. Οι δευτερεύουσες αντιδράσεις του καταβολισμού αμινοξέων περιλαμβάνουν τη μετατροπή των παραπάνω ενώσεων (αμίνες, α-κετονοξέα και αμινοξέα) σε αλδεΰδες. Τέλος, η αναγωγή των αλδεϋδών σε αλκοόλες ή/και η οξείδωση τους σε οξέα αποτελεί τις τελικές αντιδράσεις του μετασχηματισμού των αμινοξέων (Liu, 2002).

Ο καταβολισμός των αμινοξέων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια του οίνου, αναμένεται να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ποιότητα αυτού, δεδομένου ότι μια σειρά από αρωματικές ενώσεις μπορούν να παραχθούν, πέρα από αμίνες, όπως αλδεΰδες, αλκοόλες και οξέα. Εύρος αμινοξέων εντοπίζονται στον οίνο (Lehtonen, 1996) αν και η συγκέντρωση ορισμένων αυξάνεται, ενώ αυτή κάποιων άλλων μειώνεται στη τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Davis et al. 1986a; 1986b). Ωστόσο, λίγες μελέτες έχουν

συνδέσει τη χρήση συγκεκριμένων αμινοξέων με μεμονωμένα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων του οίνου (Liu, 2002).

Η αργινίνη είναι ένα σημαντικό αμινοξύ που είναι παρόν στον οίνο. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που αποικοδομούν την αργινίνη, την καταβολίζουν μέσω του μονοπατιού αποϊμίνωσης της αργινίνης (Liu et al., 1996). Η αποικοδόμηση αργινίνης μέσω της αυτής της οδού, παράγει ενέργεια (ATP) η οποία είναι ευεργετική για την επιβίωση και την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων αυτών του οίνου (Liu, 2002; Stuart et al., 1999; Tonon & Lonvaud-Funel, 2000). Παράγοντες που επηρεάζουν την αποικοδόμηση αργινίνης περιλαμβάνουν το στέλεχος του βακτηρίου, το pH, τη συγκέντρωση αργινίνης και τον τύπο σακχάρου (Granchi et al., 1998; Liu et al., 1995b; Liu, 2002; Mira de Orduña et al., 2001).

Η κιτρουλίνη, που απεκκρίνεται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού της αργινίνης και η ορνιθίνη μπορούν επίσης να καταβολιστούν από κάποια οξυγαλακτικά βακτήρια του οίνου (Arena et al., 1999). Μερικά στελέχη *O. oeni* μπορούν να καταβολίσουν επίσης τη σερίνη, με επακόλουθο το σχηματισμό αμμωνίας (Granchi et al., 1998).

Η χρήση τυροσίνης και φαινυλαλανίνης από το *L. plantarum* έχει παρατηρηθεί στη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Ενώ η μεταβολική οδός των δύο αμινοξέων στο γένος *Lactobacillus* δεν είναι γνωστή, είναι πιθανό ότι αποκαρβοξυλιώνονται προκειμένου να σχηματίσουν τις αντίστοιχες αμίνες, τυραμίνη και φαινυλαιθυλαμίνη, δεδομένης της επικράτησης των δύο αμινών που σχετίζονται με τους *Lactobacillus* στον οίνο (Liu, 2002).

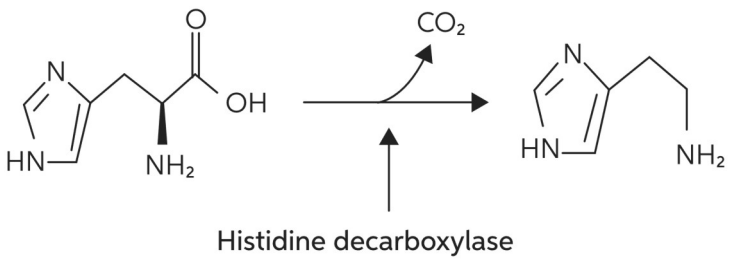
Οι Vasserot et al. (2001), μελέτησαν την επίδραση του ασπαρτικού οξέος στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό του μηλικού οξέος και της γλυκόζης από το *O. oeni*. Παρ' ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις (<0.3 mmol l^{-1}) ασπαρτικού οξέος παρατηρήθηκαν να διεγείρουν την ανάπτυξη των βακτηρίων του γένους *Oenococcus*, οι υψηλές συγκεντρώσεις (>6 mmol l^{-1}) ανέστειλαν την ανάπτυξη αυτών, με αντίστοιχη μείωση της αποικοδόμησης του μηλικού οξέος, αλλά αύξηση της χρήσης της γλυκόζης.

Αξίζει να αναφερθεί ότι, μια υπερβολική ποσότητα ασπαρτικού οξέος είχε ως αποτέλεσμα μεγάλη παραγωγή οξικού οξέος και μειωμένο σχηματισμό αιθανόλης. Καθώς η αναλογία οξικού/αιθανόλης εξαρτάται από το δυναμικό οξειδοαναγωγής του συστήματος (Kandler 1983), με οποιαδήποτε πρόσθετη οδό με οξείδωση NADH H+ που οδηγεί σε μετατόπιση από την παραγωγή αιθανόλης σε οξικό, μπορεί να υποτεθεί ότι αυτό το δυναμικό οξειδοαναγωγής τροποποιείται όταν η συγκέντρωση του L-ασπαρτικού οξέος αυξάνεται.

3.5.1 Σχηματισμός βιογενών αμινών

Οι βιογενείς αμίνες είναι χαμηλού μοριακού βάρους, οργανικές βάσεις, που απαντώνται συχνά σε ζυμώμενα τρόφιμα και ποτά (Silla Santos, 1996; ten Brink et al., 1990). Στην περίπτωση του οίνου, έχουν περιγραφεί έως και 25 διαφορετικές αμίνες, με τη συνολική περιεκτικότητα αυτών, να κυμαίνεται από ίχνη έως 130 mg/L (Soufleros et al., 1998). Αν και αυτές οι ποσότητες είναι πολύ χαμηλές σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, είναι αρκετά σημαντικές, καθώς η αιθανόλη του οίνου μπορεί να εντείνει τις τοξικές τους επιδράσεις αναστέλλοντας τις αμινο-οξειδάσες που είναι υπεύθυνες για τον καταβολισμό τους (Silla Santos, 1996).

Οι βιογενείς αμίνες που απαντώνται συχνότερα στον οίνο είναι η ισταμίνη, η τυραμίνη και η πουτρεσκίνη. Αυτές οι ενώσεις σχηματίζονται κυρίως από τα αντίστοιχα πρόδρομα αμινοξέα τους (ιστιδίνη, τυροσίνη και ορνιθίνη) μέσω της ενζυμικής αποκαρβοξυλίωσης ειδικής για το υπόστρωμα (ten Brink et al., 1990) (*Εικόνα 8*). Η κατανάλωση υψηλών συγκεντρώσεων βιογενών αμινών, μπορούν να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις σε ευαίσθητα άτομα, όπως πονοκεφάλους, γαστρεντερικές διαταραχές, δύσπνοια, πτώση της αρτηριακής πίεσης, απώλεια αισθήσεων και ακόμη και καρδιακή αρρυθμία σε σοβαρές περιπτώσεις (Alvarez & Moreno-Arribas, 2014; Moreno-Arribas et al., 2010). Η ισταμίνη και η τυραμίνη θεωρούνται ως οι πιο τοξικές και ιδιαίτερα σχετικές με την ασφάλεια των τροφίμων. Η πουτρεσκίνη και η καδαβερίνη είναι γνωστό ότι ενισχύουν αυτά τα αποτελέσματα.



Εικόνα 8: Σχηματισμός ισταμίνης από την αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης. Αναπαραγωγή από (Huang et al., 2018).

Ο ρόλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη βιοσύνθεση των βιογενών αμινών έχει αναφερθεί ευρέως (Moreno-Arribas & Lonvaud-Funel, 2001; Moreno-Arribas et al., 2003; Smit et al., 2008). Η παραγωγή βιογενών αμινών στους οίνους απαιτεί τη διαθεσιμότητα

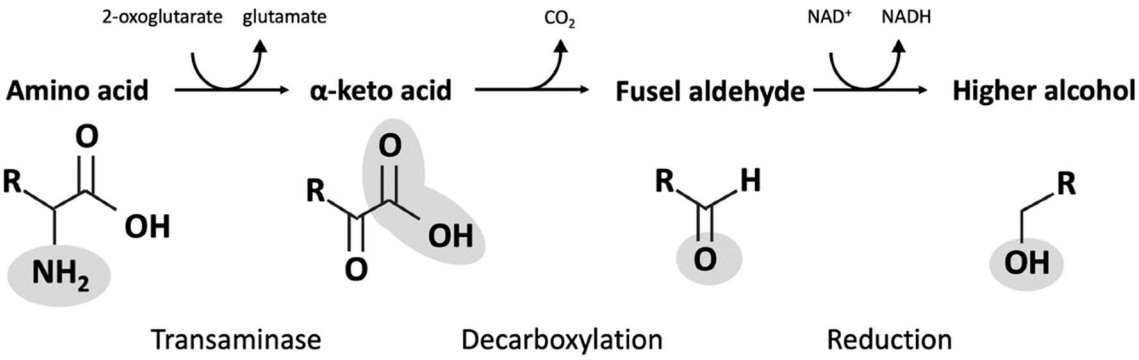
πρόδρομων ενώσεων (δηλαδή αμινοξέων), την παρουσία βακτηρίων που συνθέτουν αποκαρβοξυλάσες των αμινοξέων και ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη και την αποκαρβοξυλιωτική τους δράση (Costantini et al., 2009). Η ικανότητα παραγωγής βιογενών αμινών φαίνεται να εξαρτάται από το στέλεχος και όχι να αποτελεί χαρακτηριστικό του είδους (Smit et al., 2008). Παρ' όλο που ορισμένα στελέχη *O. oeni* έχουν αποδείξει την ικανότητά τους να παράγουν ισταμίνη, πουτρεσκίνη και καδαβερίνη (Cañas et al., 2009; Guerrini et al., 2002), τα είδη των γενών *Pediococcus* και *Lactobacillus* είναι τα κυρίως υπεύθυνα για το σχηματισμό βιογενών αμινών (Moreno-Arribas & Polo, 2008). Η παραγωγή αυτών των ενώσεων είναι ένα από τα βασικά κριτήρια που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή των εκκινητήριων καλλιεργιών της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οι Berbegal et al. (2016), σε μια μελέτη έδειξαν την ικανότητα ενός γηγενούς (μη εμπορικού) στελέχους *O. oeni* που χρησιμοποιείται ως εκκινητήρια καλλιέργεια μηλογαλακτικής ζύμωσης, για τη μείωση του σχηματισμού ισταμίνης στο οινοποιείο.

Η υπεροχή των οξυγαλακτικών βακτηρίων που εμπλέκονται στη διαδικασία ζύμωσης προσεγγίζεται κυρίως υιοθετώντας βακτηριακούς εκκινητές που δεν έχουν τις οδούς αποικοδόμησης των πρόδρομων αμινοξέων (Landete et al., 2007; Moreno-Arribas et al., 2003; Prete et al., 2009). Ωστόσο, σε μια προσπάθεια ελέγχου της παραγωγής βιογενών αμινών, οι μικροοργανισμοί που προορίζονται να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης σε οποιοδήποτε ζυμώμενο τρόφιμο θα πρέπει να επιβεβαιωθούν ότι, όχι μόνο δεν παράγουν βιογενείς αμίνες, αλλά και ότι είναι σε θέση να ξεπεράσουν τα γηγενή βακτήρια υπό συνθήκες παραγωγής και αποθήκευσης (Marcobal et al., 2006; Moreno-Arribas & Polo, 2008).

Προς το παρόν, στην αγορά δεν χρησιμοποιούνται αποτελεσματικές διαδικασίες για τον περιορισμό της περιεκτικότητας του οίνου σε βιογενείς αμίνες. Η ενζυμική αφαίρεση βιογενών αμινών, μπορεί να αποτελέσει έναν ασφαλή και οικονομικό τρόπο εξάλειψης αυτών των ανεπιθύμητων ενώσεων από τους οίνους και από άλλα ζυμώμενα προϊόντα. Οι Cueva et al. (2012), έχουν αναφερθεί σε μια διαδικασία που βασίζεται στη χρήση ενός ενζυμικού εκχυλίσματος από το *Penicillium citrinum* CIAL-274,760, απομονωμένο από αμπελώνες. Η προσθήκη αυτού στον οίνο, φαίνεται να μειώνει ή ακόμη και να εξαλείφει πλήρως τις βιογενείς αμίνες. Σαφώς και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την παροχή οριστικών αποδεικτικών στοιχείων για την εφαρμογή παρόμοιων στρατηγικών σε πραγματικές συνθήκες οινοποίησης.

3.5.2 Σχηματισμός Ανώτερων Αλκοολών

Οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται με την αποκαρβοξυλίωση και την επακόλουθη αναγωγή των α-κετονοξέων. Τα α-κετονοξέα παράγονται -ως ενδιάμεσα προϊόντα- κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης και του καταβολισμού των αμινοξέων, το αναφερόμενο και ως μονοπάτι Ehrlich (*Εικόνα 9*). Η βιοσύνθεση αμινοξέων είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες από τις ανώτερες αλκοόλες που σχηματίζονται κατά τη ζύμωση (Ugliano & Henschke, 2009). Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (λιγότερο από 300 mg/L), οι ανώτερες αλκοόλες μπορούν να συμβάλουν στην πολυπλοκότητα και να ενισχύσουν τα φρουτώδη αρώματα του οίνου, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (πάνω από 400 mg/L) θα μπορούσαν να είναι επιζήμιες για το άρωμα και την ποιότητα του οίνου λόγω των έντονων, χημικών οσμών (Swiegers et al., 2005).



Εικόνα 9: Το μονοπάτι Ehrlich και ο σχηματισμός των ανώτερων αλκοολών. Αναπαραγωγή από (Tse et al., 2021).

Οι Jeromel et al. (2008) διαπίστωσαν ότι η μηλογαλακτική ζύμωση είχε ασήμαντη επίδραση στη συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών του οίνου, εκτός από τις σημαντικές αυξήσεις της ισοβουτανόλης και της 2-φαινυλαιθανόλης. Οι Herjavec et al. (2001) δεν παρατήρησαν καμία αλλαγή στα επίπεδα της 1-προπανόλης, της ισοβουτανόλης, της ισοαμυλικής αλκοόλης ή της 2-φαινυλαιθανόλης. Αυτό υποστηρίζεται και από τους Maicas et al. (1999), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η παραγωγή ισοβουτανόλης, 1-προπανόλης, 1-βουτανόλης και ισοαμυλικής αλκοόλης εξαρτάται από το στέλεχος που χρησιμοποιείται για την εκτέλεση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οι Pozo-Bayón et al. (2005) παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα ανώτερων αλκοολών μετά το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης, αλλά καμία από τις αυξήσεις δεν ήταν σημαντική. Το γεγονός ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια φαίνεται να έχουν περιορισμένη ικανότητα παραγωγής ανώτερων αλκοολών θα μπορούσε να είναι ευεργετικό, καθώς οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις προσδίδουν έντονα

αρώματα διαλύτη στον οίνο. Η συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών που έχουν είτε θετική είτε αρνητική επίδραση στο άρωμα του οίνου, είναι πιθανό να εξαρτάται τόσο από την ένταση του αρώματος των αντίστοιχων αλκοολών όσο και από τον τύπο του οίνου (Ugliano & Henschke, 2008).

3.6 Σύνθεση και Υδρόλυση Εστέρων

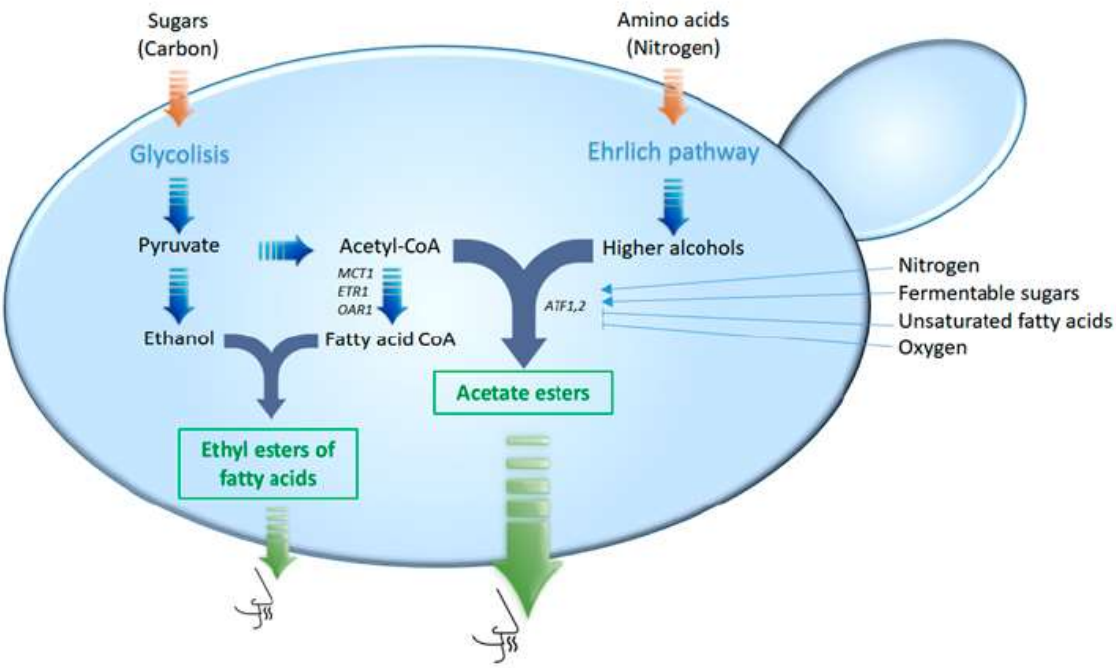
Οι εστέρες των οίνων, σχηματίζονται κατά την αλκοολική, τη μηλογαλακτική ζύμωση αλλά και την ωρίμανση. Αποτελούν μια πολύ σημαντική ομάδα πτητικών ενώσεων, που συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ και ανάλογα με τη συγκέντρωση στην οποία βρίσκονται, μπορούν να επηρεάσουν, θετικά ή αρνητικά, την ποιότητα του οίνου (Swiegers et al., 2005). Η συσσώρευση αυτών κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, είναι γνωστό ότι είναι το αποτέλεσμα της ισορροπίας ενζυμικών αντιδράσεων σύνθεσης και υδρόλυσης που περιλαμβάνουν εστεράσες και αντιδράσεων σύνθεσης που περιλαμβάνουν ακετυλοτρανσφεράσες αλκοόλης (Matthews et al., 2007).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι πτητικοί εστέρες έχουν μεγαλύτερη επίδραση στο άρωμα του οίνου σε σύγκριση με τις ανώτερες αλκοόλες, αν και εντοπίζονται σε μικρές ποσότητες -της τάξης λίγων mg/L- και η συγκέντρωσή τους μειώνεται με τη χημική υδρόλυση, στη διάρκεια της παλαίωσης (Garofolo & Piracci, 1994). Οι ενώσεις αυτές, χαρακτηρίζονται ως φρουτώδεις ή ανθικές. Ωστόσο, εάν υπάρχουν σε πολύ υψηλές ποσότητες, μπορούν να καλύψουν τα ποικιλιακά αρώματα, μειώνοντας την πολυπλοκότητα του οίνου (οι οίνοι που περιέχουν περισσότερα από 90 mg/L οξικού αιθυλ-εστέρα ή 200 mg/L ολικών εστέρων θεωρούνται ελαττωματικοί).

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες εστέρων που σχηματίζονται στον οίνο: οι αιθυλ-εστέρες των λιπαρών οξέων και οι οξικοί εστέρες των ανώτερων αλκοολών (*Εικόνα 10*). Οι αιθυλ-εστέρες σχηματίζονται ανάμεσα σε αιθανόλη και λιπαρά οξέα ή μη πτητικά οργανικά οξέα και συμβάλλουν στο άρωμα του οίνου με οσμές που θυμίζουν κερί ή σαπούνι (Belda et al., 2017). Οι οξικοί εστέρες, πιο σημαντικοί από τους αιθυλ-εστέρες των λιπαρών οξέων, προέρχονται από τη σύζευξη μιας αλκοόλης με ένα οξύ. Εκτός από την αιθανόλη, οι κοινές αλκοόλες -που βρίσκονται στους εστέρες- προέρχονται από την αποικοδόμηση των αμινοξέων μέσω της οδού Ehrlich. Τους πιο σημαντικούς, αποτελούν ο οξικός ισοβουτυλ-εστέρας (φρουτώδες άρωμα), ο οξικός ισοαμυλ-εστέρας (μπανάνα) και ο οξικός 2-φαινυλ-αιθυλ-εστέρας (άρωμα ανθέων), οι οποίοι προκύπτουν από την εστεροποίηση των αντίστοιχων ανώτερων αλκοολών τους: ισοβουτανόλη (προέρχεται από το αμινοξύ

βαλίνη), ισοαμυλική αλκοόλη (προέρχεται από τη λευκίνη) και 2-φαινυλαιθανόλη (προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη), αντίστοιχα (Stribny, et al., 2016; Styger, et al., 2011).

Η πλειονότητα των εστέρων του οίνου παράγονται ως δευτερογενή προϊόντα από τους ζυμομύκητες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ωστόσο μόλις ολοκληρωθεί αυτή



Εικόνα 10: Απλοποιημένος μεταβολικός χάρτης σχηματισμού εστέρων. Υποδεικνύονται τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που εμπλέκονται στο σχηματισμό των εστέρων. Αναπαραγωγή από (Belda et al., 2017).

η διαδικασία, το προφίλ των εστέρων μπορεί να τροποποιηθεί από τη δραστηριότητα της εστεράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Matthews et al., 2004). Σε αυτό το πνεύμα, η μηλογαλακτική ζύμωση σχετίζεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των αιθυλ-εστέρων των λιπαρών οξέων (γαλακτικός αιθυλ-εστέρας, οξικός αιθυλ-εστέρας, εξανοϊκός αιθυλ-εστέρας και οκτανοϊκός αιθυλ-εστέρας), έναντι της συγκέντρωσης των οξικών εστέρων (Cappello et al., 2017; Lerm et al., 2010; Liu, 2002). Όπως και στην περίπτωση του διακετυλίου, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι όλες αυτές οι πτητικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για το επιθυμητό φρουτώδες άρωμα των οίνων, όταν βρίσκονται στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Αντιθέτως, όταν εντοπίζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, μπορούν να έχουν επιζήμια επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια εμφανίζουν συχνά ενζυμική δραστηριότητα που μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της περιεκτικότητας των αιθυλ-εστέρων του οίνου (Antalick et al., 2012; Pozo-Bayón et al., 2005). Ωστόσο, ενώ οι εστεράσες από ζυμομύκητες έχουν μελετηθεί ευρέως, η δραστηριότητα εστεράσης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια του οίνου δεν είναι καλά τεκμηριωμένη (Pérez-Martín et al., 2013; Sumby et al., 2014). Για παράδειγμα, το *O. oeni* παρήγαγε σημαντικά επίπεδα εξανοϊκού αιθυλ-εστέρα και οκτανοϊκού αιθυλ-εστέρα μετά από ανάπτυξη σε δοκιμαστικό μέσο αιθανόλης και επίσης εστεροποίησε την 1-προπανόλη για την παραγωγή οκτανοϊκού προπυλ-εστέρα (Costello et al., 2013). Όμως, οι συγκεντρώσεις ορισμένων ενώσεων φαίνεται να επηρεάζονται από το είδος και το στέλεχος που χρησιμοποιείται, αντανακλώντας έναν βαθμό ποικιλομορφίας μεταξύ των στελεχών του ίδιου είδους (Pozo-Bayón et al., 2005).

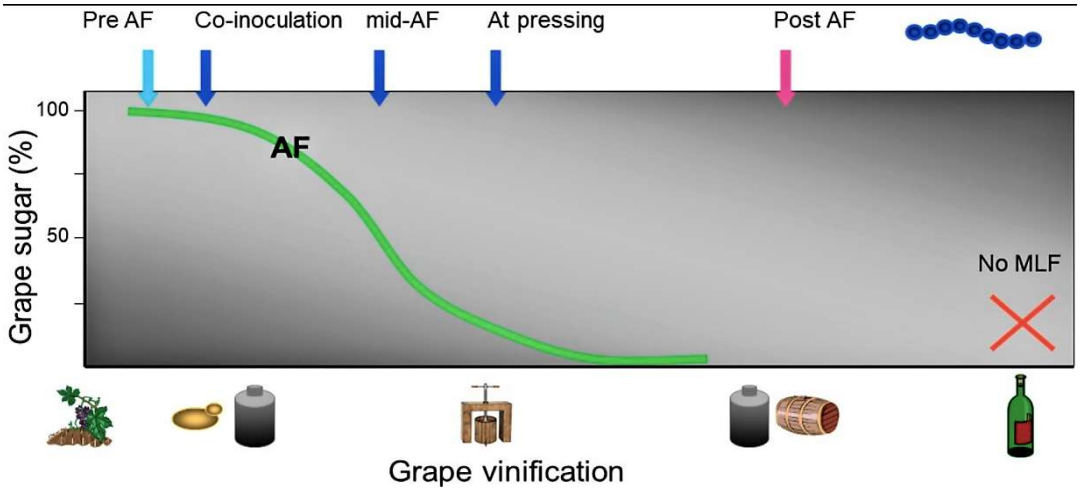
Οι ενδοκυτταρικές εστεράσες από τα γένη *O. oeni* και *L. hilgardii*, χαρακτηρίστηκαν υπό συνθήκες οίνου. Σύμφωνα με τους Sumby et al. (2013), και οι δύο εστεράσες είναι σταθερές και διατηρούν τη δράση τους σε αυτές τις συνθήκες, ενώ παράλληλα έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν τους αιθυλ-εστέρες βραχείας αλυσίδας, όπως ο οξικός αιθυλ-εστέρας (Sumby et al., 2013). Μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων του οίνου, εκτός από το *O. oeni*, τα στελέχη *L. plantarum* είναι μια καλή πηγή εστερασών και στην πραγματικότητα, ορισμένες εστεράσες έχουν καθαριστεί και χαρακτηριστεί για αυτό το είδος (Esteban-Torres et al., 2013). Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των γονιδίων που κωδικοποιούν τις εστεράσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων του οίνου και την πιθανή συμβολή τους στο αρωματικό προφίλ.

Είναι φανερό ότι υπάρχουν διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις εστέρων κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, οι οποίες υποδηλώνουν ότι οι αυτές εμπλέκονται τόσο στη σύνθεση όσο και στην υδρόλυση των εστέρων. Οι αλλαγές αυτές, στη συγκέντρωση των εστέρων, έπειτα από το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης, μπορούν να οδηγήσουν είτε σε βελτίωση, είτε σε υποβάθμιση της ποιότητας του οίνου, ανάλογα με τον μεταβολιζόμενο εστέρα.

4. Διαχείριση της μηλογαλακτικής ζύμωσης

4.1 Χρονική στιγμή εμβολιασμού

Υπάρχουν τέσσερα πιθανά σενάρια, με βάση τη χρονική στιγμή του εμβολιασμού, που αφορούν τη μηλογαλακτική ζύμωση στους οίνους (*Εικόνα 11*). Σε αυτά περιλαμβάνονται, ο ταυτόχρονος εμβολιασμός του οίνου με ζύμες και οξυγαλακτικά βακτήρια (συν-εμβολιασμός), ο εμβολιασμός με οξυγαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και ο εμβολιασμός μετά την ολοκλήρωση αυτής (διαδοχικός εμβολιασμός) (Fugelsang & Edwards, 2007; Henick-Kling, 1993). Βέβαια, κυρίως στους λευκούς οίνους, η μηλογαλακτική ζύμωση, μπορεί να εκδηλωθεί ακόμα και πριν την έναρξη της αλκοολικής, χρησιμοποιώντας στέλεχος του *L. plantarum*[1] (Lasik, 2013).



Εικόνα 11: Χρονική στιγμή εμβολιασμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων του οίνου. Αναπαραγωγή από (Krieger-Weber et al., 2020).

Όσον αφορά το σενάριο του συν-εμβολιασμού, οι Alexandre et al. (2004) και οι Henick-Kling & Park (1994), ανέφεραν στους πιθανούς κινδύνους, την ανάπτυξη ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ζυμών και βακτηρίων, τη διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης και την παραγωγή ανεπιθύμητων οσμών. Με τις αναφορές αυτές, συμφωνούν και οι Bartle et al. (2019) και Du Plessis et al. (2019). Αντιθέτως, οι Jussier et al. (2006) και οι Massera et al. (2009) δεν παρατήρησαν κάποιο αρνητικό αντίκτυπο στην επιτυχία της ζύμωσης ή στην κινητική αυτής που να σχετίζεται με τον ταυτόχρονο εμβολιασμό, σε σύγκριση με τον εμβολιασμό του οίνου μετά την αλκοολική ζύμωση και ουδεμία διαφορά στην τελική

[1] βλ. Ενότητα 5.2

ποιότητα των οίνων των ποικιλιών Chardonnay και Malbec, αντίστοιχα. Μέσα από τα αποτελέσματά τους, γίνεται σαφές ότι, ο ταυτόχρονος εμβολιασμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την υπέρβαση των υψηλών επιπέδων αιθανόλης και της μειωμένης περιεκτικότητας σε άζωτο μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Οι Zapparoli et al. (2009), διερεύνησαν τη χρήση των εγκλιματισμένων βακτηριακών κυττάρων στο συν-εμβολιασμό και το διαδοχικό εμβολιασμό, ως μέσο για την πραγματοποίηση μηλογαλακτικής ζύμωσης σε οίνους με υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Ο συν-εμβολιασμός, είχε ως αποτέλεσμα την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε μικρότερο χρονικό διάστημα, σε σύγκριση με εκείνο του διαδοχικού εμβολιασμού. Σύμφωνα με τους Sumby et al. (2019), τα κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής του συν-εμβολιασμού, σε σύγκριση με τον πιο παραδοσιακό διαδοχικό εμβολιασμό, είναι η δυνητικά θετική συμβολή στη σύνθεση του οίνου και η μείωση του κινδύνου μικροβιακής αλλοίωσης. Η μείωση του συνολικού χρόνου αλκοολικής και μηλογαλακτικής ζύμωσης, επιτρέπει στον οινοποιό να προστατεύει το προϊόν με προσθήκες SO_2, νωρίτερα στη διαδικασία οινοποίησης, αποφεύγοντας έτσι την παραγωγή πτητικών φαινολών από μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση όπως το *Brettanomyces bruxellensis* (Sumby et al., 2019).

Κατά τη διάρκεια του συν-εμβολιασμού, ο ταυτόχρονος μεταβολισμός του κιτρικού οξέος και της γλυκόζης θα μπορούσε να οδηγήσει στη μεγαλύτερη παραγωγή οξικού οξέος από το *O. oeni*, ένα ετεροζυμωτικό γαλακτικό βακτήριο (Costello, 2006; Liu, 2002). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι οι οίνοι που έχουν υποβληθεί σε ταυτόχρονο εμβολιασμό με ζύμες και οξυγαλακτικά βακτήρια, τείνουν να είναι λιγότερο βουτυρώδεις, ενώ διατηρούν περισσότερα φρουτώδη αρώματα με αποτέλεσμα να έχουν αυξημένη πολυπλοκότητα και καλύτερη δομή, με οριακά υψηλότερα, αλλά οργανοληπτικά ασήμαντα, επίπεδα οξικού οξέος (Bartowsky et al., 2002; Henick-Kling, 1993; Jussier et al., 2006; Krieger, 2006; Massera et al., 2009). Οι Jussier et al. (2006) και Semon et al. (2001), συνέκριναν το συν-εμβολιασμό με το διαδοχικό εμβολιασμό σε οίνους της ποικιλίας Chardonnay. Οι Jussier et al. (2006) δεν βρήκαν αρνητικές επιπτώσεις του συν-εμβολιασμού στην επιτυχία της ζύμωσης ή στις τελικές παραμέτρους του οίνου. Το πάνελ του οργανοληπτικού ελέγχου, δεν κατάφερε να κάνει διάκριση μεταξύ των οίνων των δύο τεχνικών εμβολιασμού και, παρόλο που παράχθηκαν ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα οξικού οξέος κατά το συν-εμβολιασμό -και στις δύο μελέτες- οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές και παρέμειναν εντός του εύρους των συγκεντρώσεων που εντοπίζονται συνήθως στον οίνο. Ο

συν-εμβολιασμός είχε επίσης το πλεονέκτημα της μείωσης της συνολικής χρονικής διάρκειας της ζύμωσης. Άλλα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν, την πιο αποτελεσματική μηλογαλακτική ζύμωση σε μη ευνοϊκά περιβάλλοντα (π.χ. χαμηλό pH), λόγω χαμηλών επιπέδων αιθανόλης και υψηλότερων συγκεντρώσεων θρεπτικών ουσιών τη στιγμή του εμβολιασμού. Οι οίνοι είναι επίσης άμεσα διαθέσιμοι για μετάγγιση, κολλάρισμα και προσθήκη SO_2 (Davis et al., 1985a; Jussier et al., 2006). Οι Knoll et al. (2012), φαίνεται επίσης ότι συμφωνούν με τους παραπάνω σύμφωνα με τα αποτελέσματα που άντλησαν από μελέτη τους σε οίνους της ποικιλίας Riesling. Επιπλέον παρατήρησαν ότι, σε σύγκριση με τον διαδοχικό εμβολιασμό, οι οίνοι με συν-εμβολιασμό έτειναν να έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθυλ-εστέρων λιπαρών οξέων και οξικών εστέρων ανώτερων αλκοολών, συμπεριλαμβανομένων του φαινυλ-αιθυλ-εστέρα του οξικού οξέος, του 3-μεθυλ-βουτυλ-εστέρα του οξικού οξέος, του αιθυλ-εστέρα του βουτυρικού οξέος, του αιθυλ-εστέρα του γαλακτικού οξέος και του δι-αιθυλ-εστέρα του ηλεκτρικού οξέος. Τέλος, σύμφωνα με τους Abrahamse και Bartowsky (2012), μεγαλύτερη απώλεια χρώματος παρατηρείται κατά το διαδοχικό εμβολιασμός, παρά με το συν-εμβολιασμό. Με βάση τα αποτελέσματα του συν-εμβολιασμού, όπως αυτά αναφέρθηκαν παραπάνω, η πρακτική αυτή επισημαίνεται ως μια βιώσιμη επιλογή και λύση για ασφαλή διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης ακόμα και σε λευκά γλεύκη, ψυχρού κλίματος, με χαμηλό pH και με πιθανώς υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη, εφόσον ληφθεί μέριμνα σχετικά με τη σωστή επιλογή στελεχών τόσο των οξυγαλακτικών βακτηρίων, όσο και των ζυμών.

Ο εμβολιασμός με την καλλιέργεια εκκίνησης οξυγαλακτικών βακτηρίων, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δεν είναι κοινή πρακτική και σύμφωνα με τους Rosi et al. (2003) παρουσιάζει τον ισχυρότερο ανταγωνισμό μεταξύ ζυμών και βακτηρίων. Οι βακτηριακοί πληθυσμοί παρουσίασαν δραστικές μειώσεις με αυτόν τον τρόπο εμβολιασμού και αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες, όπως η κατανάλωση των θρεπτικών ουσιών από τις ζύμες, η συσσώρευση SO_2, η παραγωγή αιθανόλης και τοξικών μεταβολιτών από τις ζύμες καθώς και οξέων, που μειώνουν το pH του μέσου. Η ίδια μελέτη διαπίστωσε ότι μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, η παρουσία ζυμών ευνόησε την ανάπτυξη και τη μηλογαλακτική δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αυτόλυση των ζυμών που απελευθερώνει βιταμίνες, αμινοξέα, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες που διεγείρουν τον βακτηριακό μεταβολισμό (Henick-Kling, 1993). Τα πρώτα αποτελέσματα ορισμένων συγγραφέων, υποστηρίζουν τον διαδοχικό εμβολιασμό ως μέσο αποφυγής των

προβλημάτων που σχετίζονται με τον πρώιμο εμβολιασμό (Henick-Kling, 1993; Ribéreau-Gayon, 1985). Τα πλεονεκτήματα του διαδοχικού εμβολιασμού, περιλαμβάνουν την έλλειψη ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ζυμών και βακτηρίων καθώς και τον μειωμένο κίνδυνο παραγωγής οξικού οξέος, λόγω μικρότερων συγκεντρώσεων υπολειμματικών σακχάρων (Costello, 2006). Παρ' όλα αυτά, εξακολουθούν να υπάρχουν κίνδυνοι που σχετίζονται με αυτή την πρακτική και μια απώλεια βιωσιμότητας μπορεί πιθανώς να αποδοθεί στο εχθρικό -για τα βακτήρια- περιβάλλον, την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης, χαμηλού pH, SO_2, άλλων αντιμικροβιακών ενώσεων που παράγονται από τις ζύμες καθώς και την εξάντληση των θρεπτικών ουσιών (Larsen et al., 2003).

Ένας άλλος παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει την ανάπτυξη των βακτηρίων είναι η παρουσία βακτηριοφάγων (Davis et al., 1985b; Henick-Kling et al., 1986), καθώς οι βακτηριακές καλλιέργειες εκκίνησης μπορεί να διατρέχουν κίνδυνο επίθεσης από αυτούς. Σύμφωνα με τους Davis et al. (1985b), ένας βακτηριοφάγος καταφέρνει να επιβιώσει σε οίνους με pH 3,5 ή υψηλότερο, αλλά απενεργοποιείται σε χαμηλότερο pH ή με την προσθήκη SO_2 ή μπεντονίτη. Ωστόσο, οι Henick-Kling et al. (1986) εντόπισαν ενεργό φάγο, ακόμα και σε οίνους με pH 3,2, ο οποίος μάλιστα δεν επηρεάστηκε από παρουσία συγκέντρωσης 50 mg/L SO_2. Η έκταση των βακτηριοφάγων στους οίνους δεν είναι γνωστή, αλλά δυνητικά χαμηλή, δεδομένου του γενικού ποσοστού επιτυχίας στην πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Fugelsang & Edwards, 2007).

Σε γενικές γραμμές και σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, γίνεται σαφές ότι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο θα λάβει χώρα ο εμβολιασμός, αξίζει να εξεταστεί προσεκτικά προτού ληφθεί η τελική απόφαση, εφόσον επρόκειτο να επηρεάσει, αναλόγως, το στυλ και την ποιότητα του οίνου. Ωστόσο, ανεξάρτητα από το χρόνο εμβολιασμού, το κλειδί της επιτυχίας, φαίνεται να βρίσκεται και στη σωστή διαχείριση της τεχνικής του εμβολιασμού (Lombardi et al., 2020). Για παράδειγμα, η προσαρμογή των βακτηριακών εκκινητών σε μη βέλτιστο pH (5,0), πριν τον εμβολιασμό τους στο μέσο, μπορεί να βελτιώσει την κατανάλωση του μηλικού οξέος, όπως αναφέρουν οι Lombardi et al. (2020).

4.2 Εναλλακτικά στελέχη

Υπάρχει ένας αριθμός οξυγαλακτικών βακτηρίων που έχουν χρησιμοποιηθεί ως εκκινητές μηλογαλακτικής ζύμωσης που ανήκουν στα είδη *O. oeni*, *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. casei* και *Pediococcus* spp. Το καθένα έχει επιδείξει διαφορετικές ιδιότητες, οι

οποίες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το στέλεχος. Τα στελέχη του *O. oeni* έχουν συμπαγές γονιδίωμα 1,8 Mb και αρκετές μεταβολικές οδούς που σχετίζονται με την ανάπτυξη σε οινολογικά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένης της μηλογαλακτικής ζύμωσης και της παραγωγής αρώματος (Mills et al., 2005). Επιπλέον, το συμπαγές γονιδίωμά του πιθανότατα αντανακλά υψηλό επίπεδο οργάνωσης και απλότητας (Sternes & Borneman, 2016). Αυτή η γονιδιωματική οργάνωση, μπορεί να είναι η βάση για την προσαρμογή του στο περιβάλλον του οίνου και την ικανότητά του να επιβιώνει στις σκληρές συνθήκες (Mills et al., 2005), γι' αυτό άλλωστε αποτελεί και το πιο συνηθισμένο είδος της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Όμως, τα τελευταία χρόνια, αυξημένη έρευνα έχει κατευθυνθεί προς άλλα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων, που θα μπορούσαν να προσφέρουν νέα χαρακτηριστικά στους οίνους. Για παράδειγμα, οι Bou & Krieger (2012) περιέγραψαν τη χρήση στελεχών, των γενών *Lactobacillus* και *Pediococcus* που ήταν ικανά να ξεκινήσουν και να ολοκληρώσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση μετά από απευθείας εμβολιασμό, χωρίς προηγούμενο στάδιο εγκλιματισμού.

Περαιτέρω ανάλυση γηγενών στελεχών ικανών να ολοκληρώσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, που εξαρτώνται από την περιοχή ή/και την ποικιλία, θα έχει τη δυνατότητα να προσφέρει νέα στελέχη με αυξημένη γενετική ποικιλότητα και καλύτερη προσαρμογή. Τα γηγενή βακτήρια που απομονώθηκαν στο τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης από 16 διαφορετικά οινοποιεία της Χιλής, είχαν γονίδια, διαφορετικά από τα εμπορικά στελέχη, τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που συμβάλλουν στο αρωματικό προφίλ. Μεταξύ αυτών, το στέλεχος 139 παρουσίασε μεγαλύτερο αριθμό γλυκοζιδασών και πολλά υποσχόμενες οινολογικές ιδιότητες και έτσι θα μπορούσε να προταθεί ως ο καλύτερος υποψήφιος για χρήση ως εκκινητής μηλογαλακτικής ζύμωσης (Romero et al. 2018).

Τα *Lactobacillus* spp. είναι μια από τις ομάδες με τη μεγαλύτερη ποικιλία ειδών που σχετίζονται με το περιβάλλον του οίνου. Ορισμένα είδη *Lactobacillus*, έχουν επιδείξει την ικανότητα να επιβιώνουν στις σκληρές συνθήκες του μέσου αυτού και, εντός αυτής της ομάδας, το είδος *L. plantarum* έχει δείξει τις περισσότερες δυνατότητες ως καλλιέργεια εκκίνησης για την διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Υπό συνθήκες υψηλού pH, τα βακτήρια του *L. plantarum* έχουν δείξει ιδιαιτέρως ενδιαφέροντα αποτελέσματα (Bou & Krieger, 2004), όχι μόνο για την ικανότητά τους να προκαλούν μηλογαλακτική ζύμωση όταν εμβολιάζονται είτε λίγο μετά τους ζυμομύκητες (συν-εμβολιασμός) στο γλεύκος, είτε σε διαδοχικό εμβολιασμό μετά από αλκοολική ζύμωση, αλλά και για ομοζυμωτικές

ιδιότητες για το μεταβολισμό των σακχάρων της εξόζης, που ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο παραγωγής οξικού οξέος (Krieger-Weber et al., 2020). Ωστόσο, ακόμη και σε πολύ χαμηλά pH, η σωστή διαχείριση των στρατηγικών εμβολιασμού μπορεί να καθορίσει τόσο την επιτυχία της μηλογαλακτικής ζύμωσης όσο και τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Σε πρόσφατη έρευνα, ο διαδοχικός εμβολιασμός με *L. plantarum*, σε συνδυασμό με εγκλιματισμό των κυττάρων σε μη βέλτιστο pH, αποδείχτηκαν καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχία της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Lombardi et al., 2020). Στην έρευνα των Iorizzo et al. (2016), τα απομονωθέντα στελέχη του *L. plantarum* δεν παρήγαγαν βιογενείς αμίνες, ενώ σε εκείνη των Cappozzi et al. (2012), βρέθηκαν δύο στελέχη ικανά να αποικοδομήσουν την πουτρεσκίνη και την τυραμίνη υπό συνθήκες παρόμοιες του οίνου, κάτι που αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την πιθανή χρήση τους ως καλλιέργειες εκκίνησης. Ακόμη, το *L. plantarum* βρέθηκε να διαθέτει ένα πιο περίπλοκο ενζυματικό σύστημα, όπως β-γλυκοζιδάσες, πρωτεάσες, εστεράσες και αποκαρβοξυλάσες, το οποίο θα μπορούσε να παίξει ρόλο στην τροποποίηση του αρώματος του οίνου (du Toit et al. 2011; Iorizzo et al., 2016; Matthews et al., 2004). Τα αποτελέσματα από μια ερευνητική εργασία, έδειξαν ότι διαφορετικά είδη και στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, μπορούν να μεταβολίσουν την ακεταλδεΰδη με διαφορετικούς ρυθμούς, κάτι που με τη σειρά του θα επηρεάσει το χρώμα του ερυθρού οίνου μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Το *L. plantarum* μεταβολίζει την ακεταλδεΰδη με βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με τα στελέχη του *O. oeni*, με αποτέλεσμα να σημειωθεί μικρότερη απώλεια χρώματος στους οίνους με *L. plantarum* (Bartowsky & Krieger-Weber, 2020). Βέβαια, η εφαρμογή αυτού του είδους στο γλεύκος σταφυλιών και στον οίνο είναι αρκετά νέα, καθώς μόλις πρόσφατα διατέθηκαν εμπορικές καλλιέργειες εκκίνησης, οι οποίες μπορούν να επιβιώσουν και σε υψηλότερα επίπεδα αλκοόλης και μπορούν να διεξάγουν, αξιόπιστα, τη μηλογαλακτική ζύμωση. Επομένως, απαιτείται περισσότερη έρευνα για πιο σίγουρα αποτελέσματα.

Το γένος *Pediococcus* θεωρείται γενικά ένας μικροοργανισμός αλλοίωσης των οίνων (Wade et al., 2018). Τα είδη *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* και *P. pentosaceus* έχουν αναφερθεί ότι παράγουν υπερβολική ποσότητα διακετυλίου, εξωπολυσακχαριτών, βιογενών αμινών, ακρολεΐνης και γενικότερα έχουν αρνητική επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ, υποβαθμίζοντας έτσι την ποιότητα (Wade et al., 2018). Ωστόσο, πρόσφατα ευρήματα έδειξαν ότι η παρουσία του *Pediococcus*, δεν οδηγεί πάντα σε αλλοίωση και ότι ορισμένα είδη και στελέχη αυτού του γένους μπορεί να συμβάλουν θετικά στο προφίλ του οίνου και μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό της 4-αιθυλ-φαινόλης από τον *B.*

bruxellensis (Strickland et al., 2016; Wade et al., 2018). Από τους Strickland et al. (2016), 9 στελέχη του *Pediococcus* spp. που απομονώθηκαν από εμπορικούς οίνους μελετήθηκαν για την επίδρασή τους στη χημεία, τη μικροβιολογία και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων της ποικιλίας Pinot Noir. Τα στελέχη που μελετήθηκαν έδειξαν ένα εύρος στην παραγωγή του διακετυλίου, με ορισμένες συγκεντρώσεις απόδοσης πάνω από 12 mg/L και μόνο ένα προϊόν απομόνωσης που παράγει μετρήσιμα επίπεδα της ισταμίνης (3,3 mg/L). Ωστόσο, οι συνθήκες του οίνου μπορεί να μην ήταν οι βέλτιστες για την παραγωγή βιογενών αμινών και αυτό το αποτέλεσμα θα πρέπει να δοκιμαστεί σε πολλαπλούς οίνους για να οριστικοποιηθεί. Ορισμένα βακτήρια από τα απομονωθέντα, μείωσαν την ένταση του χρώματος στους ερυθρούς οίνους (μέτρηση στα 520nm) κατά περισσότερο από 10%, ενώ η περιεκτικότητα σε πολυμερή χρωστικής μειώθηκε σχεδόν κατά 30% στους οίνους που είχαν εμβολιαστεί με ένα στέλεχος του *P. parvulus*. Τέτοιες επιπτώσεις μπορεί να είναι ανεπιθύμητες ανάλογα με το στυλ του οίνου. Ωστόσο, οι επιθυμητοί οργανοληπτικοί περιγραφικοί δείκτες όπως τα «ανθικά αρώματα», «φρούτώδη» και «αρώματα κόκκινων φρούτων» ήταν συχνά υψηλότερα σε οίνους υπό την επίδραση του *Pediococcus* spp., συγκριτικά με τον μάρτυρα, υποδεικνύοντας ότι η ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων μπορεί να μην οδηγεί πάντα σε αλλοίωση του οίνου (Strickland et al., 2016). Επίσης, οι Juega et al. (2014) αναφέρουν την επιτυχή εφαρμογή δύο γηγενών στελεχών *P. damnosus*, που απομονώθηκαν από οίνο της ποικιλίας Caiño, στη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε λευκούς οίνους των ποικιλιών Albariño και Caiño (pH 3,51 και pH 3,71, αντίστοιχα) όπου ένα στέλεχος του *O. oeni*, απέτυχε. Είναι σημαντικό ότι διαπιστώθηκε πως τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών και βιογενών αμινών, απουσίαζαν τα συγκεκριμένα στελέχη. Παρ' όλα αυτά, γίνεται σαφές πως οι πληροφορίες σχετικά με αυτά τα οξυγαλακτικά βακτήρια, είναι περιορισμένες. Επομένως, ο περαιτέρω χαρακτηρισμός των ειδών και των στελεχών *Pediococcus* και η γνώση πάνω στο ενζυματικό δυναμικό τους, θα βοηθήσει στη μεγαλύτερη κατανόηση της επίδρασης που μπορεί να έχουν στο περιβάλλον του οίνου.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν δοκιμαστεί και μικτές καλλιέργειες εμβολιασμού. Η χρήση μικτών καλλιεργειών *L. plantarum* και *O. oeni* ως εκκινητές μηλογαλακτικής ζύμωσης, μπορεί να διευκολύνει την ταχεία κατανάλωση του μηλικού οξέος, ενώ συμβάλλει σημαντικά και στο αρωματικό προφίλ του οίνου (Brizuela et al., 2018).

4.3 Αυθόρμητη ζύμωση έναντι εμβολιασμού

Η διαδικασία της αυθόρμητης ζύμωσης, εκδηλώνεται με την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των γηγενών οξυγαλακτικών βακτηρίων, που είναι άριστα προσαρμοσμένα στις περιβαλλοντικές συνθήκες του εκάστοτε μέσου και χώρου. Ένα από τα κύρια είδη που εντοπίστηκαν κατά τη διάρκεια αυθόρμητης μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι το *O. oeni*, δεδομένου ότι είναι το πιο ανθεκτικό είδος στις αντίξοες συνθήκες του οίνου (Lonvaud-Funel, 1999). Κατά τη διαδικασία αυτή, εφόσον δεν μπορεί να γίνει η επιλογή συγκεκριμένου στελέχους, είναι λογικό και επόμενο να ελλοχεύουν κίνδυνοι που να αφορούν τόσο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, όσο και την υγεία των καταναλωτών. Οι πιθανοί, αυτοί, κίνδυνοι περιλαμβάνουν, την παρουσία ανεπιθύμητων βακτηρίων αλλοίωσης που έχουν την ικανότητα να παράγουν ανεπιθύμητες οσμές ή ακόμα και βιογενείς αμίνες (Davis et al., 1985a), την καθυστέρηση της έναρξης ή της ολοκλήρωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Nielsen et al., 1996) και την ανάπτυξη βακτηριοφάγων (Bauer & Dicks, 2004). Όλα τα παραπάνω, συμβάλλουν στην υποβάθμιση της ποιότητας του οίνου (Bartowsky & Henschke, 1995; Fugelsang & Edwards, 2007). Αντιθέτως, εμβολιάζοντας το μέσο με μια εμπορική καλλιέργεια εκκίνησης, οι περισσότερες από τις οποίες περιέχουν *O. oeni* ως μοναδική καλλιέργεια οξυγαλακτικών βακτηρίων, μπορεί να μειωθεί ο κίνδυνος ύπαρξης βακτηρίων αλλοίωσης ή βακτηριοφάγων, καθώς θα γίνει ταχεία έναρξη και ολοκλήρωση της ζύμωσης και επιπλέον θα συμβάλλουν στη βελτίωση του οργανοληπτικού προφίλ του παραγόμενου οίνου (Krieger-Weber, 2009).

Πέρα από τον *Brettanomyces*, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι επίσης γνωστό ότι έχουν την ικανότητα να παράγουν πτητικές φαινόλες, δίνοντας έτσι τις χαρακτηριστικές οσμές στον οίνο. Στη μελέτη του Nelson (2008), διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών σεναρίων μηλογαλακτικής ζύμωσης στην παραγωγή πτητικών φαινολών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν ικανά να παράγουν σημαντικά επίπεδα πτητικών φαινολών, ενώ διαπιστώθηκε επίσης ότι η αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερα επίπεδα αυτών.

Σε ότι αφορά τις βιογενείς αμίνες, οι Martín-Álvarez et al. (2006), συνέκριναν την αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση, με τη μηλογαλακτική ενός εμβολιασμένου ισπανικού ερυθρού οίνου και παρατήρησαν ότι η συχνότητα εμφάνισης βιογενών αμινών μειώθηκε στον εμβολιασμένο οίνο. Ομοίως, οι Cañas et al. (2008) διαπίστωσαν ότι οι συγκεντρώσεις

ισταμίνης, τυραμίνης και πουτρεσκίνης αυξήθηκαν κατά 68% σε ισπανικούς οίνους, λόγω της αυθόρμητης μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Στην έρευνα των Lasik-Kurdyś et al. (2018), έγινε σύγκριση της επίδρασης της μηλογαλακτικής ζύμωσης, στον οίνο, με εμβολιασμό σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, έναντι της αυθόρμητης ζύμωσης. Η οργανοληπτική αξιολόγηση έδειξε ότι η χρονική στιγμή και η μέθοδος του εμβολιασμού επηρέασαν σημαντικά τη γεύση και το άρωμα των οίνων. Για τους οίνους που υποβλήθηκαν σε συν-εμβολιασμό, διαπιστώθηκε ότι έχουν περισσότερα φρουτώδη, φρέσκα και ανθικά αρώματα από τους οίνους με διαδοχικό εμβολιασμό, καθώς η συνολική συγκέντρωση των αναλυθέντων αιθυλ-εστέρων ήταν υψηλότερη στην πρακτική του συν-εμβολιασμού. Αντιθέτως, από την αυθόρμητη ζύμωση, παράχθηκαν οίνοι με περίσσεια διακετυλίου, που έδιναν περισσότερο βουτυρώδεις και πικρές νότες, υποβαθμίζοντας έτσι την ποιότητα αυτών. Ευχάριστα και ισορροπημένα αρώματα βουτύρου και ξηρών καρπών βρέθηκαν επίσης στους οίνους με συν-εμβολιασμό, ενώ οι οίνοι με διαδοχικό εμβολιασμό ή αυθόρμητη ζύμωση, δεν είχαν αρώματα ξηρών καρπών, παρά μόνο έντονα αρώματα βουτύρου.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, προκύπτει ότι ο εμβολιασμός με μια εμπορική καλλιέργεια εκκίνησης θα μειώσει τους κινδύνους που σχετίζονται με την αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση. Αυτές οι καλλιέργειες, επιλέγονται για την ικανότητά τους να επιβιώσουν στο εχθρικό περιβάλλον του οίνου και να πραγματοποιήσουν επιτυχώς το σκοπό τους. Ο συν-εμβολιασμός μάλιστα, φαίνεται να αποτελεί μια αποτελεσματική οινολογική πρακτική, με δυνατότητα μείωσης της χρονικής διάρκειας της μηλογαλακτικής και των κινδύνων που συνδέονται με το διαδοχικό εμβολιασμό ή την αυθόρμητη ζύμωση, και μπορεί ακόμη να συμβάλλει θετικά στο άρωμα και τη γεύση του οίνου, οδηγώντας στην παραγωγή οίνων ποιότητας.

5. Μηλογαλακτική ζύμωση στους λευκούς ξηρούς οίνους

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μηλογαλακτική ζύμωση είναι μια δευτερεύουσα ζύμωση που πραγματοποιείται στους περισσότερους ερυθρούς και σε ορισμένους λευκούς ξηρούς οίνους. Συχνά εκδηλώνεται αυθόρμητα, μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, ή μπορεί επίσης να προκληθεί μέσω εμβολιασμού με ένα επιλεγμένο στέλεχος γαλακτικού βακτηρίου.

Σε σύγκριση με τους ερυθρούς οίνους, η απόφαση να πραγματοποιηθεί μηλογαλακτική ζύμωση σε λευκούς οίνους, βασίζεται γενικά σε κριτήρια ανάλογα με το στυλ αυτών όπως,

η μείωση της οξύτητας ή η αλλαγή του αρωματικού προφίλ και της αίσθησης στο στόμα. Ωστόσο, λόγω των συγκριτικά σκληρότερων συνθηκών, που επικρατούν σε αυτά τα μέσα, για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, η εκδήλωση μηλογαλακτικής σε λευκούς οίνους μπορεί να είναι συχνά ιδιαιτέρως δύσκολη. Υπό αυτές τις συνθήκες, είναι απαραίτητο να επιλεγεί μια κατάλληλη γαλακτική καλλιέργεια εκκίνησης.

5.1 Σύσταση λευκών οίνων

Η χημική σύσταση των λευκών οίνων, μπορεί να παρέχει ένα σκληρό ή ακόμη και εχθρικό περιβάλλον για τις καλλιέργειες εκκίνησης της μηλογαλακτικής. Οι βασικοί παράγοντες περιλαμβάνουν χαμηλό pH (2,9 - 3,4), μέτριες έως υψηλές συγκεντρώσεις ολικού SO_2 (έως 50 - 60 mg/L) και χαμηλότερες θερμοκρασίες ζύμωσης (έως 12°C). Παρακάτω (*Πίνακας 2*) συνοψίζονται οι ευνοϊκές και δυσμενείς συνθήκες για τη μηλογαλακτική ζύμωση σε λευκούς οίνους. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, περισσότεροι από έναν παράγοντες μπορούν να δρουν συνεργιστικά, με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Πίνακας 2: Ευνοϊκές και δυσμενείς συνθήκες για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, που επικρατούν στους λευκούς οίνους (AWRI, Sept. 2020).

Οινική Παράμετρος	Ευνοϊκές Συνθήκες	Μέτριες Συνθήκες	Δύσκολες Συνθήκες	Εχθρικές Συνθήκες
Θερμοκρασία (°C)	18 – 22	15 – 18	12 – 15	<12
pH	>3,3	3,2 - 3,3	3,1 - 3,2	<3,1
Ολικό SO_2 (mg/L)	<30	30 – 50	50 – 60	>60
Αλκοόλ (%v/v)	<12	12 – 13	13 – 14	>14

5.2 Χρονική στιγμή εμβολιασμού στους λευκούς οίνους

Ο εμβολιασμός μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορα στάδια στη διάρκεια της οινοποίησης, όπως έχει γίνει αναφορά σε προηγούμενο κεφάλαιο. Ο διαδοχικός εμβολιασμός είναι ο πιο συνηθισμένος, αλλά πιο πρόσφατα υπάρχει μια τάση πρώιμου εμβολιασμού (συν-εμβολιασμός), μια πρακτική που μπορεί να μειώσει τη συνολική διάρκεια της οινοποίησης ή/και να βοηθήσει στην προσαρμογή του βακτηριακού στελέχους στις ιδιαίτερα δύσκολες συνθήκες των λευκών οίνων. Σύμφωνα με αυτήν την προσέγγιση, τα βακτήρια εμβολιάζονται συνήθως 24-48 ώρες μετά την προσθήκη των ζυμομυκήτων, κάτι που βοηθά στην μετρίαση των επιπτώσεων του ελεύθερου SO_2 που

προκύπτει από την όποια προσθήκη σε προηγούμενα στάδια της οινοποίησης (π.χ. συγκομιδή, έκθλιψη).

Στην περίπτωση των λευκών οίνων ωστόσο, η μηλογαλακτική ζύμωση, μπορεί να εκδηλωθεί ακόμα και πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, χρησιμοποιώντας στέλεχος του *L. plantarum*, που χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλή αντοχή στην αιθανόλη (Lasik, 2013). Σε αυτή την περίπτωση, σύμφωνα με τον Prahl (1989), πραγματοποιείται εμβολιασμός με την ετεροζυμωτική καλλιέργεια εκκίνησης απευθείας στο γλεύκος, προκειμένου να προκληθεί μηλογαλακτική ζύμωση, χωρίς σημαντική κατανάλωση σακχάρων και ουσιαστικά χωρίς την παραγωγή πτητικής οξύτητας. Ένα βέλτιστο pH δεν μπορεί να είναι χαμηλότερο από 3,4, ενώ τα ίδια βακτήρια δεν μπορούν να επιβιώσουν σε οίνο που έχει υποστεί ζύμωση. Σε αυτήν την πρακτική, τα βακτήρια προστίθενται στο γλεύκος σε επίπεδο 5×10^7 CFU/mL, ενώ οι ζύμες προστίθενται 24 έως 48 ώρες μετά τον εμβολιασμό των βακτηρίων (Prahl, 1989). Σε μια τέτοια παραλλαγή του εμβολιασμού, η αποικοδόμηση του μηλικού οξέος ξεκινάει γρήγορα, στην πορεία επιβραδύνεται και σταματά όταν τα επίπεδα αλκοόλης φτάνουν περίπου το 5–8% (v/v), που είναι και το σημείο θανάτου της γαλακτικής καλλιέργειας. Ανάλογα με τις παραμέτρους, κυρίως το pH, τη θερμοκρασία και την ταχύτητα της αλκοολικής ζύμωσης, μπορεί να αποικοδομηθεί περισσότερο ή λιγότερο μηλικό οξύ. Το μειονέκτημα είναι ότι δεν μπορεί να επιτευχθεί μικροβιακή σταθερότητα, καθώς ένα μέρος του μηλικού οξέος παραμένει στο μέσο ως πηγή για την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Η ποσότητα μηλικού οξέος που αποικοδομείται ποικίλλει και δεν είναι προβλέψιμη. Σε αυτήν την περίπτωση, μπορεί επίσης να δημιουργηθεί διαφορετικό προφίλ δευτερογενών μεταβολιτών. Υπάρχει κίνδυνος παραγωγής ανεπιθύμητων ενώσεων, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν στην υποβάθμιση της ποιότητας του παραγόμενου οίνου, με αποτέλεσμα τη μη αποδοχή αυτού από τους καταναλωτές (Barrajón-Simancas et al., 2011; Knoll et al., 2012).

5.3 Κριτήρια επιλογής στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων στους λευκούς οίνους

Τα πρωταρχικά κριτήρια για την επιλογή ενός κατάλληλου βακτηριακού στελέχους επικεντρώνονται γενικά στην ικανότητά του να αντέχει τις φυσικές και χημικές συνθήκες του οίνου. Γίνεται σαφές ότι, για τον εμβολιασμό λευκών οίνων όπου, για παράδειγμα, το pH πλησιάζει στο 3,1 ή και χαμηλότερα, η επιλογή του στελέχους περιορίζεται σε εκείνα που είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε χαμηλές τιμές pH. Ομοίως, καθώς οι τιμές του ολικού SO_2 υπερβαίνουν τα 50 mg/L, πρέπει να επιλεγεί ένα στέλεχος με υψηλή αντοχή σε αυτό.

Η συμβατότητα ζυμών και οξυγαλακτικών βακτηρίων, είναι ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που μπορεί να συμβάλλει στην επιτυχία ή την αποτυχία της μηλογαλακτικής ζύμωσης, ειδικά σε λευκούς οίνους. Ορισμένα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή της πρωτογενούς ζύμωσης. αναστέλλουν τη μηλογαλακτική ζύμωση μέσω της παραγωγής μεταβολιτών όπως το SO_2 και ορισμένα λιπαρά οξέα. Επιπλέον, καθώς ένας διαυγής λευκός οίνος, μπορεί να είναι ήδη φτωχός σε θρεπτικά συστατικά, η χρήση ενός στελέχους ζύμης με υψηλές απαιτήσεις αζώτου μπορεί να εξαντλήσει περαιτέρω το υπολειπόμενο άζωτο για τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Για την αποφυγή των πιθανών κινδύνων που ελλοχεύουν για τη μηλογαλακτική ζύμωση σε λευκούς οίνους, είναι σημαντικό, λοιπόν, να γίνει επιλογή ενός συμβατού και ευνοϊκού συνδυασμού ζύμης/βακτηρίων (AWRI, Sept. 2020).

5.4 Επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ των λευκών οίνων

Στους λευκούς οίνους, η μηλογαλακτική ζύμωση δεν αποτελεί συνήθη πρακτική, καθώς χαρακτηρίζονται -κατά βάση- από φρέσκες νότες και υψηλή οξύτητα και, επομένως, η επίδρασή της -εφόσον μειώνει την οξύτητα- δεν μπορεί να φέρει, συχνά, επιθυμητά αποτελέσματα. Παρ' όλα αυτά, ορισμένες φορές συμβαίνει, προκειμένου ο οίνος να αποκτήσει ένα πιο σύνθετο αρωματικό χαρακτήρα, όπως και για θέματα μικροβιολογικής σταθερότητας. Επιπλέον, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, φαίνεται πως διαθέτουν γλυκοζιδάσες, με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν -με τη δράση τους- ενώσεις όπως τερπένια, νορισοπρενοειδή, φαινόλες και βανιλίνη από τις προόδρομες γλυκοζυλιωμένες ενώσεις των σταφυλιών, προσδίδοντας έτσι, νέα χαρακτηριστικά στους οίνους (Hernández-Orte et al., 2009).

Σύμφωνα με τους Herjavec et al. (2001), οι λευκοί οίνοι της ποικιλίας Riesling που υποβλήθηκαν σε μηλογαλακτική ζύμωση -είτε αυθόρμητη, είτε με εμβολιασμό *O. oeni*- ήταν καλύτερης ποιότητας από εκείνους, που δεν υποβλήθηκαν σε αυτή τη διαδικασία. Μάλιστα, οι οίνοι της αυθόρμητης, ήταν σημαντικά ανώτερης ποιότητας από τους υπόλοιπους, καθώς είχαν πιο σύνθετο, φρουτώδες άρωμα και πιο στρογγυλή και απαλή αίσθηση στο στόμα. Οι οίνοι που υποβλήθηκαν στη δευτερογενή ζύμωση, είχαν χαμηλότερες ποσότητες ορισμένων οξικών εστέρων, αλλά περιείχαν ελαφρώς υψηλότερες ποσότητες, εξανοϊκού και οκτανοϊκού, αιθυλ-εστέρα. Ακόμη, στους οίνους αυτούς, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση γαλακτικού αιθυλ-εστέρα και ηλεκτρικού δι-αιθυλ-εστέρα, ενώ παράλληλα, σε καμία από τις τρεις κατεργασίες, δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στις συγκεντρώσεις πτητικής οξύτητας και οξικού αιθυλ-εστέρα. Επομένως, φαίνεται ότι η

μηλογαλακτική ζύμωση είχε επιθυμητή επίδραση στην ποιότητα των λευκών οίνων Riesling.

Στην έρευνα των Knoll et al. (2011) οι οίνοι Chardonnay και Riesling, μετά το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης, εμφάνισαν σημαντικές διαφορές με συνολικά υψηλότερα ποσοστά ανώτερων αλκοολών, εστέρων και οξέων που παίζουν σημαντικό ρόλο στο οργανοληπτικό προφίλ και την ποιότητα του οίνου. Παρατηρήθηκε ότι, ακόμα και οι οίνοι των δύο ποικιλιών, οι οποίοι είχαν υποβληθεί μόνο σε μερική μηλογαλακτική ζύμωση, έδειξαν αυξήσεις σε φρουτώδεις εστέρες όπως ο αιθυλ-εστέρας του οξικού οξέος, ο αιθυλ-εστέρας του προπιονικού οξέος και ο αιθυλ-εστέρας του βουτυρικού οξέος. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν επίσης ότι, το χαμηλότερο pH του μέσου, οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση του φρουτώδη χαρακτήρα. Ο αιθυλ-εστέρας του γαλακτικού οξέος -που σχετίζεται με το φρουτώδη χαρακτήρα, τις γαλακτώδεις νότες και τη βελτιωμένη αίσθηση στο στόμα- και ο αιθυλ-εστέρας του οξικού οξέος ήταν ποσοτικά οι κυρίαρχοι σε όλες τις κατεργασίες.

Πέρα από τους εστέρες, στη μελέτη αυτή, η περιεκτικότητα των τερπενίων trans- και cis-οξειδίου της λιναλόλης και α-τερπινεόλης αυξήθηκε σε χαμηλότερες τιμές pH και η περιεκτικότητα σε λιναλόλη αυξήθηκε σε υψηλότερες τιμές pH. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε ακεταλδεΰδη μειώθηκε και διαπιστώθηκε ότι η αποικοδόμηση αυτής της ένωσης και άλλων αλδεϋδών, μπορεί να οδηγήσει στη μείωση των βοτανικών και άγουρων αρωμάτων (Osborne et al., 2000). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι το *O. oeni*, συμβάλλει σημαντικά στο σχηματισμό πτητικών ενώσεων σε λευκούς οίνους, όπως το Chardonnay και το Riesling, και ότι το pH και το ποσοστό αιθανόλης είναι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά το αρωματικό προφίλ.

Ακόμη, οι Juega et al. (2014), στην έρευνά τους σε λευκούς οίνους των ποικιλιών Albariño και Caíño, μελέτησαν την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στο οργανοληπτικό προφίλ. Για την έρευνα αυτή αξίζει να σημειωθεί ότι, η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε από στελέχη του *P. damnosus.* Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, ο οργανοληπτικός έλεγχος έδειξε ότι η πρακτική αυτή επέφερε στον οίνο από την ποικιλία Albariño, τόσο αρωματική αλλαγή, όσο και μια σημαντική διαφορά στο χρώμα, το οποίο έγινε πιο κίτρινο-χρυσό, καθώς και μείωση της οξύτητας. Επιπλέον, σημειώθηκε, μικρή βελτίωση της γεύσης και του σώματος, ενώ ο οίνος ήταν περισσότερο μαλακός. Από την άλλη πλευρά, ο οίνος από την ποικιλία Caíño, χαρακτηρίστηκε -μετά το πέρας της

μηλογαλακτικής ζύμωσης- πιο ώριμος, με χαμηλότερη οξύτητα, ενώ παρατηρήθηκε και παραγωγή αρώματος καραμέλας. Όσον αφορά τη φαινολική σύσταση, δεν επηρεάστηκε σε κανέναν από τους δύο οίνους.

Σε γενικές γραμμές, ο οργανοληπτικός έλεγχος έδειξε ότι η μηλογαλακτική ζύμωση προσέδωσε νέα χαρακτηριστικά στους οίνους, χωρίς να επηρεάσει τον ανθικό τους χαρακτήρα, και παράλληλα δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή βιογενών αμινών ή εξωπολυσακχαριτών από τα επιλεγμένα στελέχη *Pediococcus*. Επομένως, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι σε οίνους με υψηλό pH, όπως το Albariño και το Caíño, ο *Pediococcus* είναι καλά προσαρμοσμένος και μπορεί να εκτελεί τη μηλογαλακτική ζύμωση με επιτυχία.

6. Άλλες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηρίων

6.1 Μείωση της χρήσης διοξειδίου του θείου (SO_2)

Το διοξείδιο του θείου (SO_2) είναι το βασικό πρόσθετο για τη συντήρηση των οίνων. Βέβαια, ορισμένες ενώσεις του οίνου, έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται με αυτό, μειώνοντας, έτσι, την αποτελεσματικότητά του, με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι απαιτήσεις. Η αυξημένη ζήτηση των καταναλωτών για χαμηλότερες ποσότητες και βιολογικούς οίνους δημιουργεί προκλήσεις στην παραγωγή, εφόσον δεν υπάρχει σωστή διαχείριση των ενώσεων, που δεσμεύουν το SO_2, κατά την οινοποίηση. Μια σημαντική στρατηγική, που μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα δεσμευμένου SO_2, είναι η μείωση των συγκεντρώσεων των καρβονυλικών και κετονικών ενώσεων που συνδέονται μαζί του, ώστε να αυξηθεί το ποσοστό του ελεύθερου (Ribéreau-Gayon et al., 1998). Η ακεταλδεΰδη είναι μια από τις κύριες ενώσεις, του οίνου, που το δεσμεύουν. Άλλες ενώσεις συμπεριλαμβανομένων του πυροσταφυλικού, του α-κετογλουταρικού και του γαλακτουρονικού οξέος μπορεί επίσης να έχουν σημαντική επίδραση στα επίπεδα του δεσμευμένου SO_2 (Ribéreau-Gayon et al., 1998). Οι Jackowetz & Mira de Orduña (2012), αναφέρουν ότι η διαχείριση των ενώσεων που συνδέονται με το SO_2 αποτελεί αναπόσπαστο μέρος για τη βέλτιστη χρήση του στην οινοποίηση και αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Στην έρευνά τους σε λευκό οίνο, κατά τη διάρκεια της δευτερογενούς ζύμωσης -και για δύο με τρεις εβδομάδες μετά το πέρας αυτής- το πυροσταφυλικό οξύ, η ακεταλδεΰδη και το α-κετογλουταρικό οξύ, αποικοδομήθηκαν σε διάφορους βαθμούς από το *O. oeni*, με αποτέλεσμα να μην είναι σε θέση πλέον να το δεσμεύσουν. Οι ίδιοι προτείνουν ότι, το χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας -μετά την

εξάντληση του μηλικού οξέος- μπορεί να είναι αποτελεσματικό για την απαραίτητη μείωση των ενώσεων αυτών, πριν επέλθει η μικροβιακή σταθεροποίηση, κάτι που ελαχιστοποιεί και τον κίνδυνο μεταβολικών μετασχηματισμών, επιζήμιων για τη συνολική ποιότητα του οίνου (π.χ. παραγωγή οξικού οξέος και βιογενών αμινών).

Επομένως, για τη μηλογαλακτική ζύμωση, ο τρόπος με τον οποίο συμβάλλει στη μικροβιακή σταθεροποίηση είναι διττός. Όχι μόνο απομακρύνει πιθανά υποστρώματα που καταναλώνονται από αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, αλλά και συμβάλλει στη μείωση των ενώσεων που δεσμεύουν το SO_2, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο, την ελεύθερη και δραστική του μορφή, όπως και την προστατευτική του δράση, ενώ διασφαλίζεται και η τήρηση των εθνικών και διεθνών κανονισμών για τα όρια του SO_2.

6.2 Βιολογική αύξηση της οξύτητας

Μερικές από τις συνέπειες της υπερθέρμανσης του πλανήτη είναι η απότομη μείωση της οξύτητας των οίνων σε πολλές περιοχές και η ανισορροπία μεταξύ φαινολογικού σταδίου και ωρίμανσης. Το γεγονός αυτό, οδηγεί σε τρύγο σταφυλιών με χαμηλή ολική οξύτητα και υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, παράγοντας οίνους με ανισορροπία στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά και μεγάλη ευαισθησία στη μικροβιακή αλλοίωση. Επί του παρόντος, η χημική αύξηση της οξύτητας, χρησιμοποιείται συνήθως για την επίλυση αυτού του προβλήματος. Όμως, οι βιολογικές μέθοδοι μπορούν, επίσης, να αποτελέσουν μια καλή εναλλακτική λύση.

Η εφαρμογή των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην οινοποίηση, δεν περιορίζεται στη μείωση της οξύτητας μέσω της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οι Lucio et al. (2016) έχουν προτείνει στελέχη του *L. plantarum* για τη βιολογική αύξηση της οξύτητας των οίνων. Τα επιλεγμένα, αυτά, στελέχη αναπτύσσονται γρήγορα στο γλεύκος και μπορούν να συνθέσουν γαλακτικό οξύ από τα σάκχαρα του γλεύκους -μέσω γαλακτικής ζύμωσης- χωρίς τον κίνδυνο σύνθεσης οξικού οξέος. Η σύνθεση γαλακτικού οξέος κατά την οινοποίηση γλεύκους με υψηλό pH, προκαλεί την επιθυμητή μείωση του τελικού pH. Επιπλέον, τα στελέχη *Lactobacillus*, όπως το *O. oeni*, περιέχουν και το μηλογαλακτικό ένζυμο. Επομένως, αυτά τα βακτήρια θα μπορούν να πραγματοποιήσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση και τη ζύμωση των σακχάρων, ταυτόχρονα, στη διάρκεια της οινοποίησης. Ως εκ τούτου, το μηλικό οξύ καταναλώνεται, με αποτέλεσμα μια σχετική αύξηση του pH, η οποία όμως είναι στιγμιαία και αντισταθμίζεται σύντομα από τη σύνθεση του γαλακτικού οξέος με τη ζύμωση των σακχάρων. Η διαδικασία αυτή εξασφαλίζει τη μικροβιολογική σταθερότητα του οίνου, τόσο με την αντιμικροβιακή δράση του γαλακτικού οξέος, όσο και με τη μείωση του pH

(επηρεάζοντας άλλους παράγοντες όπως η περιεκτικότητά του σε ελεύθερο και μοριακό SO_2). Μπορεί φυσικά να φανεί και ιδιαίτερα χρήσιμη στην οινοποίηση των βιολογικών οίνων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μηλογαλακτική ζύμωση, αποτελεί ένα κλασικό ζήτημα στην οινολογία, με μεγάλη και συνεχόμενη σημασία μέχρι τη σύγχρονη οινοποίηση. Ο ρόλος που παίζει η εφαρμογή της στους οίνους, είναι κάτι περισσότερο από τη μείωση της οξύτητας. Το μεταβολικό δυναμικό των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι ποικίλο και πολύπλοκο και γίνεται μεγάλη προσπάθεια, προκειμένου να γίνει η αποσαφήνισή του. Όπως έχει ήδη συζητηθεί, μέσα από αυτά τα μεταβολικά μονοπάτια, τα οξυγαλακτικά βακτήρια επιδρούν σημαντικά στο οργανοληπτικό προφίλ, συμβάλλοντας στην ενίσχυση της πολυπλοκότητας του αρώματος και της γεύσης και προσδίδοντας μικροβιολογική σταθερότητα στους οίνους. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, απελευθερώνονται σημαντικές ποσότητες διακετυλίου που συμβάλλουν στο άρωμα βουτύρου, ενώ η ενζυμική δραστηριότητα των εστερασών και των γλυκοζιδασών, απελευθερώνει επίσης πτητικές ενώσεις με φρουτώδη και ανθικό χαρακτήρα. Βέβαια, ο μεταβολισμός των βακτηρίων μπορεί να οδηγήσει και στο σχηματισμό πτητικών φαινολών, οι οποίες μπορούν υποβαθμίσουν το άρωμα αλλά και στην παραγωγή βιογενών αμινών που αποτελούν κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών. Τα ζητήματα αυτά, ωστόσο, μπορούν να ελεγχθούν με τη σωστή διαχείριση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Η διαχείριση, είναι ένα πολύ σημαντικό ζήτημα που χρήζει ιδιαίτερης προσοχής. Η χρονική στιγμή του εμβολιασμού, αλλά και η επιλογή του κατάλληλου στελέχους, αποτελούν κρίσιμα σημεία για την επιτυχή ολοκλήρωσή της αλλά και για την παραγωγή του επιθυμητού, οργανοληπτικού χαρακτήρα. Πέρα από το *O. oeni*, υπάρχει πληθώρα οξυγαλακτικών βακτηρίων που παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον και έχουν να προδώσουν νέα χαρακτηριστικά στους οίνους, με πρωτοπόρο το *L. plantarum*. Μελλοντικά θα είναι σημαντικό να διερευνηθεί η γονιδιωματική τους ποικιλομορφία, ως βάση των πολλά υποσχόμενων μεταβολικών χαρακτηριστικών τους. Νέα στελέχη, ιδανικά για το μοναδικό κλίμα μιας περιοχής, τους ερυθρούς έναντι των λευκών οίνων ή ακόμη και την ποικιλία του σταφυλιού, αξίζουν να διερευνηθούν διεξοδικά. Διαφορετικά γένη καθώς και μείγμα καλλιεργειών, θα μπορούσαν να ληφθούν υπόψη για μελλοντική χρήση ως καλλιέργειες εκκίνησης. Ακόμη, παρ' ότι η χρήση γηγενών στελεχών εξακολουθεί να είναι κοινή πρακτική, οι στρατηγικές και οι συνθήκες για την καλύτερη απόδοσή τους, δεν έχουν εξεταστεί λεπτομερώς. Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια και η μηλογαλακτική ζύμωση, έχουν να προσφέρουν πολλά τόσο στους ερυθρούς, όσο και στους λευκούς οίνους. Από τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, μέχρι την μικροβιακή σταθερότητα του μέσου και από τη μείωση της χρήσης του SO_2, μέχρι την

αύξηση της οξύτητας και πολλών ακόμα εφαρμογών, είναι φανερό πως αποτελούν σημαντικά εργαλεία για τη σύγχρονη οινοποίηση. Η περαιτέρω κατανόηση του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, η σωστή διαχείριση και η ανάπτυξη νέων καλλιεργειών εκκίνησης, μπορούν να οδηγήσουν σε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα και μια νέα εποχή στην εφαρμογή της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abrahamse, C. & Bartowsky, E. (2012), Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 255-265.

2. Alexandre, H.; Costello, P.J.; Remize, F.; Guzzo, J. & Guilloux-Benatier, M. (2004), *Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives, *Int. J. Food Microbiol*. **93**, 141-154.

3. Alvarez, M.A. & Moreno-Arribas, M.V. (2014), The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic aminedegrading microorganisms as a solution, *Trends Food Sci. Technol.* **39**, 146-155.

4. Antalick, G.; Perello, M. C. & de Revel, G. (2012), Characterization of fruity aroma modifications in red wines during malolactic fermentation, *Journal of agricultural and food chemistry* **60**(50), 12371–12383.

5. Araque, I.; Gil, J.; Carreté, R.; Bordons, A. & Reguant, C. (2009), Detection of *Arc* genes related with the ethyl carbamate precursors in wine lactic acid bacteria, *J. Agric. Food Chem.* **57**, 1841–1847.

6. Arena, M.E.; Saguir, F.M. & Manca de Nadra, M.C. (1999), Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine, *International Journal of Food Microbiology* **52**, 155–161.

7. Barrajón-Simancas, N.; Giese, E.; Arévalo-Villena, M.; Úbeda, J. & Briones, A. (2011), Amino acid uptake by wild and commercial yeasts in single fermentations and co-fermentations, *Food Chem* **127**, 441–446.

8. Bartle, L.; Sumby, K.; Sundstrom, J. & Jiranek, V. (2019), The microbial challenge of winemaking: yeast-bacteria compatibility, *FEMS Yeast Res.* **19**, foz040.

9. Bartowsky, E. J. (2005), *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena, *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**(2), 174-187.

10. Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A. (1995), Malolactic fermentation and wine flavor, *Aust. Grapegrow. Winemak.* **378**, 83-94.

11. Bartowsky, E.J.; Costello, P. & Henschke, P.A. (2002), Management of malolactic fermentation - wine flavour manipulation, *Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak.* **461**, 7-8 and 10-12.

12. Bartowsky, E. J.; Costello, P. J. & Chambers, P. J. (2015), Emerging trends in the application of malolactic fermentation, *Australian Journal of Grape and Wine Research* **21**(S1), 663-669.

13. Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A. (2004), The 'buttery' attribute of wine--diacetyl--desirability, spoilage and beyond, *Int J Food Microbiol*.

14. Bartowsky, E.; Krieger-Weber, S. (2020), Management of malolactic fermentation to enhance red wine colour, *Grapegrow. Winemak.* **673**, 66–70.

15. Bastard, A.; Coelho, C.; Briandet, R.; Canette, A.; Gougeon, R.; Alexandre, H.; Guzzo, J. & Weidmann, S. (2016), Effect of Biofilm Formation by *Oenococcus oeni* on Malolactic Fermentation and the Release of Aromatic Compounds in Wine, *Frontiers in microbiology* **7**, 613.

16. Bauer, R. & Dicks, L.M.T. (2004), Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **25**, 74-88.

17. Belda, I.; Ruiz, J.; Esteban-Fernández, A.; Navascués, E.; Marquina, D.; Santos, A. & Moreno-Arribas, M.V. (2017), Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement, *Molecules* **22**, 189.

18. Benito, S. (2019), The management of compounds that influence human health in modern winemaking from an HACCP point of view, *Fermentation* **5**:33.

19. Berbegal, C.; Benavent-Gil, Y.; Navascues, E.; Calvo, A.; Albors, C.; Pardo, I. & Ferrer, S. (2016), Lowering histamine formation in a red Ribera del Duero wine (Spain) by using an indigenous *O. oeni* strain as a malolactic starter, *International Journal of Food Microbiology* **244**.

20. Boido, E.; Lloret, A.; Medina, K.; Carrau, F. & Dellacassa, E. (2002), Effect of β-glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2344–2349.

21. Bou, M. & Krieger, S. (2004), Alcohol-Tolerant Malolactic Strains for the Maturation of Wines with Average or High pH. U. S. Patent 7,625,745.

22. Bou, M. & Krieger, S. (2012), Alcohol-Tolerant Malolactic Strains for the Maturation of Wines with Average or High pH., U. S. Patent 8,114,449.

23. Brizuela, N. S.; Bravo-Ferrada, B. M.; Curilén, Y.; Delfederico, L.; Caballero, A. & Semorile, L. (2018), Advantages of using blend cultures of native *L. plantarum* and *O. oeni* strains to induce malolactic fermentation of Patagonian Malbec wine, *Front. Microbiol.* **9**:2109.

24. Cabrita, M. J.; Torres, M.; Palma, V.; Alves, E.; Patão, R. & Freitas, A. M. C. (2008), Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds, *Talanta* **74**(5), 1281-1286.

25. Caggianiello, G.; Kleerebezem, M. & Spano, G. (2016), Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms, *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 3877–3886.

26. Campos, F. M.; Couto, J. A. & Hogg, T. A. (2003), Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*, *Journal of Applied Microbiology* **94**(2), 167-174.

27. Campos, F. M.; Figueiredo, A. R.; Hogg, T. A. & Couto, J. A. (2009), Effect of phenolic

acids on glucose and organic acid metabolism by lactic acid bacteria from wine, *Food microbiology* **26**(4), 409–414.

28. Cañas, P. M. I.; Romero, E. G.; Alonso, S. G.; González, M. F. & Herreros, M. L. L. P. (2008), Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines, *Journal of Food Composition and Analysis* **21**(8), 731-735.

29. Cañas, P.; Gómez-Alonso, S.; Ruiz, P.; seseña, S.; Romero, E. & Herreros, M. (2009), Biogenic Amine Production by *Oenococcus oeni* Isolates from Malolactic Fermentation of Tempranillo Wine, *Journal of food protection* **72**, 907-10.

30. Cappello, M. S.; Zapparoli, G.; Logrieco, A. & Bartowsky, E. J. (2017), Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour, *International Journal of Food Microbiology* **243**, 16-27.

31. Capozzi, V.; Russo, P.; Ladero, V.; Fernández, M.; Fiocco, D.; Alvarez, M.A.; Grieco, F.; Spano, G. (2012), Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: Toward a potential application in wine. *Front. Microbiol.* **3**, 1–6.

32. Capozzi, V.; Tufariello, M.; De Simone, N.; Fragasso, M. & Grieco, F. (2021), Biodiversity of Oenological Lactic Acid Bacteria: Species- and Strain-Dependent Plus/Minus Effects on Wine Quality and Safety, *Fermentation* **7**(1).

33. Carre, E. (1982), Thèse de Doctorat, Institut d'OEnologie, Université de Bordeaux II.

34. Cavin, J.F.; Andioc, V.; Etievant, P.X. & Diviès, C. (1993), Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids*, Am. J. Enol. Vitic*. **44**, 76-80.

35. Cerning J. (1990), Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, *FEMS microbiology reviews*, **7**(1-2), 113–130.

36. Collombel, I.; Melkonian, C.; Molenaar, D.; Campos, F.M. & Hogg, T. (2019), New Insights Into Cinnamoyl Esterase Activity of *Oenococcus oeni*, *Front. Microbiol* **10**:2597.

37. Costantini, A.; García-Moruno, E. & Moreno-Arribas, M.V. (2009), Biochemical transformations produced by malolactic fermentation, In: Moreno-Arribas, M.V. & Polo, M.C. (Eds.), Wine Chemistry and Biochemistry, Springer, New York, NY.

38. Costello, P. (2006), The chemistry of malolactic fermentation. In: Morenzoni, R. (ed.), Malolactic fermentation in wine - understanding the science and the practice, Lallemand, Montréal. pp. 4.1-4.11.

39. Costello, P. J.; Siebert, T. E.; Solomon, M. R. & Bartowsky, E. J. (2013), Synthesis of fruity ethyl esters by acyl coenzyme A: alcohol acyltransferase and reverse esterase activities in *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*, *Journal of Applied Microbiology* **114**(3), 797-806.

40. Coton, E. (1996), Thèse de Doctorat, Faculté d'OEnologie, Université de Bordeaux II.

41. Coulon, J.; Houlès, A.; Dimopoulou, M.; Maupeu, J. & Dols-Lafargue, M. (2012), Lysozyme resistance of the ropy strain *Pediococcus parvulus* IOEB 8801 is correlated with beta-glucan accumulation around the cell, *International journal of food microbiology* **159**(1), 25–29.

42. Cueva, C.; García-Ruiz, A.; González-Rompinelli, E.; Bartolome, B.; Martín-Álvarez, P. J.; Salazar, O.; Vicente, M. F.; Bills, G. F., & Moreno-Arribas, M. V. (2012), Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking, *Journal of applied microbiology*, **112** (4), 672-682.

43. Curiel, J. A.; Rodríguez, H.; Acebrón, I.; Mancheño, J. M.; de las Rivas, B. & Muñoz, R. (2009), Production and physicochemical properties of recombinant *Lactobacillus plantarum* tannase, *Journal of agricultural and food chemistry* **57**(14), 6224–6230.

44. Davis, C. R.; Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Lee, T. H. & Fleet, G. H. (1985a), Practical implications of malolactic fermentation, A review. *Am. J. Enol. Vitic*., **36**, 290-301.

45. Davis, C. R.; Silveira, N. F. A. & Fleet, G. H. (1985b), Occurrence and properties of bacteriophage of *Leuconostoc oenos* in Australian wines, *Appl. Environ. Microbiol*. **50**, 872–876.

46. Davis, C.R.; Wibowo, D.; Fleet, G.H & Lee, T.H. (1986a), Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH, *Applied and Environmental Microbiology* **51**, 539–545.

47. Davis, C.R.; Wibowo, D.; Fleet, G.H. & Lee, T.H. (1986b), Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Australian wines, *Food Technology in Australia* **38**, 35–40.

48. De Beer, D.; Joubert, E.; Gelderblom, W.C.A. & Manley, M. (2002), Phenolic compounds: A review of their possible role as in vivo antioxidants of wine, *S. Afr. J. Enol. Vitic*. **23**, 48-61.

49. De las Rivas, B.; Rodríguez, H.; Curiel, J. A.; Landete, J. M., & Muñoz, R. (2009), Molecular screening of wine lactic acid bacteria degrading hydroxycinnamic acids, *Journal of agricultural and food chemistry* **57**(2), 490–494.

50. Deveoglu, O. & Karadag, R. (2019), A Review on the Flavonoids -A Dye Source Doğal Boya Kaynağı -Flavonoidler Üzerine Derleme.

51. Devi, A.; Aiyappaa, A. A. K. & Waterhouse, A. L. (2019), Adsorption and biotransformation of anthocyanin glucosides and quercetin glycosides by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* in model wine solution, *J. Sci. Food. Agric.* **100**, 2110–2120.

52. De Vuyst, L. & Degeest, B. (1999), Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *FEMS microbiology reviews* **23**(2), 153–177.

53. Dimopoulou, M.; Hazo, L. & Dols-Lafargue, M. (2012), Exploration of phenomena contributing to the diversity of *Oenococcus oeni* exopolysaccharides, *Int J Food Microbiol* **153**, 114–122.

54. Dimopoulou, M.; Vuillemin, M.; Campbell-Sills, H.; Lucas, P.M.; Ballestra, P.; Miot-Sertier, C.; Favier, M.; Coulon, J.; Moine, V.; Doco, T.; Roques, M.; Williams, P.; Petrel, M.; Gontier, E.; Moulis, C.; Remaud-Simeon, M. & Dols-Lafargue, M. (2014), Exopolysaccharide (EPS) synthesis by *Oenococcus oeni*: from genes to phenotypes, *PLoS One* **9**(6):e98898.

55. Dimopoulou, M.; Bardeau, T.; Ramonet, P.Y.; Miot-Certier, C.; Claisse, O.; Doco, T.; Petrel, M.; Lucas, P. & Dols-Lafargue, M. (2016), Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: From genomic and phenotypic analysis to technological valorization, *Food Microbiol* **53**,10–17.

56. Dimopoulou, M.; Lonvaud-Funel, A. & Dols-Lafargue, M. (2017), *Polysaccharide Production by Grapes Must and Wine Microorganisms*, pp. 293-314.

57. Dimopoulou, M.; Raffenne, J.; Claisse, O.; Miot-Sertier, C.; Iturmendi, N.; Moine, V.; Coulon, J. & Dols-Lafargue, M. (2018), *Oenococcus oeni* Exopolysaccharide Biosynthesis, a Tool to Improve Malolactic Starter Performance, *Frontiers in Microbiology* **9**, 1276.

58. D'Incecco, N.; Bartowsky, E.; Kassara, S.; Lante, A.; Spettoli, P. & Henschke, P. (2004), Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation, *Food Microbiology* **21**(3), 257 - 265.

59. Dols-Lafargue, M.; Gindreau, E.; Le Marrec, C.; Chambat, G.; Heyraud, A. & Lonvaud-Funel, A. (2007), Changes in Red Wine Soluble Polysaccharide Composition Induced by Malolactic Fermentation, *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 9592-9.

60. Dols-Lafargue, M.; Lee, H. Y.; Le Marrec, C.; Heyraud, A.; Chambat, G. & Lonvaud-Funel, A. (2008), Characterization of gtf, a glucosyltransferase gene in the genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine, *Applied and environmental microbiology* **74**(13), 4079–4090.

61. Doran, P. M. (2013), Chapter 12 - Homogeneous Reactions, *in* Pauline M. Doran, ed., Bioprocess Engineering Principles (Second Edition), Academic Press, London, pp. 599-

703.

62. Du Plessis, H.; Du Toit, M.; Nieuwoudt, H.; Van der Rijst, M.; Hoff, J. & Jolly, N. (2019), Modulation of wine flavor using *Hanseniaspora uvarum* in combination with different *Saccharomyces cerevisiae*, lactic acid bacteria strains and malolactic fermentation strategies. *Fermentation* **5**:64.

63. Du Toit, M.; Engelbrecht, L.; Lerm, E. & Krieger-Weber, S. (2011), *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures-an overview, *Food Bioprocess Technol.* **4**, 876-906.

64. Edwards, C. G. & Beelman, R. B. (1987), Inhibition of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* (PSU-1), by decanoic acid and subsequent removal of the inhibition by yeast ghosts, *Am. J. Enol. Vitic*., **38**, 239-242.

65. Edwards, C. G.; Beelman, R. B.; Bartley, C. E. & McConnell, A. (1990), Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification, *Am. J. Enol. Vitic*., **41**, 48-56.

66. Esteban-Torres, M.; Reverón, I.; Mancheño, J. M.; de Las Rivas, B. & Muñoz, R. (2013), Characterization of a feruloyl esterase from *Lactobacillus plantarum*, *Applied and environmental microbiology* **79**(17), 5130–5136.

67. Fang, F.; Feng, T.; Du, G. & Chen, J. (2016), Evaluation of the impact on food safety of a *Lactobacillus coryniformis* strain from pickled vegetables with degradation activity against nitrite and other undesirable compounds, *Food Addit. Contam. Part A* **33**, 623–630.

68. Fugelsang, K. C. & Edwards, C. (2007), *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*, Springer, New York.

69. García-Ruiz, A.; Bartolomé, B.; Martínez-Rodríguez, A. J.; Pueyo, E.; Martín-Álvarez, P. J. & Moreno-Arribas, M. V. (2008), Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine, *Food Control* **19**(9), 835-841.

70. Garofolo, A. & Piracci, A. (1994), Évolution des esters et acids gras pendant la conservation des vins, constantes d'équilibre et énergies d'activation [Evolution of esters and fatty acids in the wine preservation, Equilibrium constants and activation energies], *Bulletin de L'OIV* **67**, 225–245.

71. Garrido, J. & Borges, F. (2013), Wine and grape polyphenols — A chemical perspective, *Food Research International* **54**(2), 1844-1858.

72. Gil-Sánchez, I.; Suáldea, B. B. & Moreno-Arribas, M. V. (2019), *Chapter 6 Malolactic Fermentation*, pp. 85-98.

73. Granchi, L.; Paperi, R.; Rosellini, D. & Vincenzini, M. (1998), Strain variation of arginine catabolism among malolactic *Oenococcus oeni* strains of wine origin, *Italian Journal of Food Science* **10**, 351–357.

74. Grimaldi, A.; Mclean, H. & Jiranek, V. (2000), Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*, *Am. J. Enol. Vitic* **51**, 362.

75. Grimaldi, A.; Bartowsky, E. & Jiranek, V. (2005), Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology, *Journal of applied microbiology* **99**, 1061-9.

76. Guerrini, S.; Mangani, S.; Granchi, L. & Vincenzini, M. (2002), Biogenic Amine Production by *Oenococcus oeni*, *Current microbiology* **44**, 374-8.

77. Guilloux-Benatier, M; Son, H. S.; Bouhier, S. & Feuillat, M. (1993), Activités enzymatiques: Glycosidases et peptidases chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bactérienne, Influence des macromelécules de levures, *Vitis*, **32**, 51-57.

78. Henick-Kling, T. (1993), Malolactic fermentation. In: Fleet, G.H. (ed.). Wine Microbiology and Biotechnology, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 289-326.

79. Henick-Kling, T. & Park, Y.H. (1994), Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO_2 and timing of inoculation, *Am. J. Enol. Vitic.* **45**, 464-469.

80. Henick-Kling, T.; T.H. Lee & D.J.D. Nicholas (1986), Inhibition of bacterial growth and malolactic fermentation in wine by bacteriophage, *J. Appl. Bacteriol*. **61**: 287–293.

81. Herjavec, S.; Tupajić, P. & Majdak, A., (2001), Influence of malolactic fermentation on the quality of Riesling wine, *Agric. Conspec. Sci*. **66**(1), 59-64.

82. Hernández, T.; Estrella, I.; Carlavilla, D.; Martín-Álvarez, P. J. & Moreno-Arribas, M. V. (2006), Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees, *Analytica Chimica Acta* **563**(1), 116-125.

83. Hernández, T.; Estrella, I.; Pérez -Gordo, M.; Alegría, E.G.; Tenorio, C.; Ruiz-Larrea, F. & Moreno-Arribas, M.V. (2007), Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine, *J. Agric. Food. Chem.* **55**, 5260-5266.

84. Hernández-Orte, P.; Cersosimo, M.; Loscos, N.; Cacho, J.; Garcia-Moruno, E. & Ferreira, V. (2009), Aroma development from non-floral grape precursors by wine Lactic acid bacteria, *Food Research International* **42**, 773-781.

85. Huang, H.; Li, Y.; Liang, J. & Finkelman, F. D. (2018), Molecular Regulation of Histamine Synthesis, *Frontiers in Immunology* **9**, 1392.

86. Ibarburu, I.; Soria-Díaz, M. E.; Rodríguez-Carvajal, M. A.; Velasco, S. E.; Tejero-Mateo, P.; Gil-Serrano, A. M.; Irastorza, A. & Dueñas, M. T. (2007), Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs, *Journal of applied microbiology* **103**(2), 477–486.

87. Iorizzo, M.; Testa, B.; Lombardi, S.J.; García-Ruiz, A.; Muñoz-González, C.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. (2016), Selection and technological potential of *Lactobacillus plantarum* bacteria suitable for wine malolactic fermentation and grape aroma release,

LWT-Food Sci. Technol. **73**, 557–566.

88. Jackowetz, J. N. & Mira de Orduña, R. (2012), Metabolism of SO_2 binding compounds by *Oenococcus oeni* during and after malolactic fermentation in white wine, *International journal of food microbiology*, **155**(3), 153–157.

89. Jeromel, A.; Herjavec, S.; Orlić, S.; Redžepović, S. & Wondra, M., (2008), Changes in volatile composition of Kraljevina wines by controlled malolactic fermentation*, J. Cent. Eur. Agric.* **9**, 363-372.

90. Juega, M.; Costantini, A.; Bonello, F.; Cravero, M. C.; Martinez-Rodriguez, A. J.; Carrascosa, A. V. & Garcia-Moruno, E. (2014), Effect of malolactic fermentation by *Pediococcus damnosus* on the composition and sensory profile of Albariño and Caiño white wines, *Journal of applied microbiology*, **116**(3), 586–595.

91. Jussier, D.; Morneau, A.D. & Mira de Orduña, R.M. (2006), Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate Chardonnay, *Appl. Environ. Microbiol*. **72**, 221-227.

92. Kandler, O. (1983), Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* **49**, 209-224.

93. Knoll, C.; Fritsch, S.; Schnell, S.; Grossmann, M.; Rauhut, D. & du Toit, M. (2011), Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines, *LWT - Food Science and Technology* **44**(10), 2077-2086.

94. Knoll, C.; Fritsch, S.; Schnell, S.; Grossmann, M.; Krieger-Weber, S.; Du Toit, M. & Rauhut, D. (2012), Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma, *World journal of microbiology & biotechnology* **28**, 1143-53.

95. Konings W. N. (2002), The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* **82**(1-4), 3–27.

96. Krieger, S. (2006), Determining when to add malolactic bacteria. In: Morenzoni, R. (ed), Malolactic fermentation in wine - understanding the science and the practice, Lallemand, Montréal. pp. 12.1-12.10.

97. Krieger-Weber, S. (2009), Application of yeast and bacteria as starter cultures, In: König, H.; Unden, G. & Fröhlich, J. (eds), Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine, Springer, Berlin. pp. 498-511.

98. Krieger-Weber, S.; Heras, J. M. & Suarez, C. (2020), *Lactobacillus plantarum*, a New Biological Tool to Control Malolactic Fermentation: A Review and an Outlook, *Beverages* **6**(2).

99. Kubota, H.; Senda, S.; Nomura, N.; Tokuda, H. & Uchiyama, H. (2008), Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress, *Journal of bioscience and bioengineering* **106**(4), 381–386.

100. Landete, J.M.; De Las rivas, B.; Marcobal, A. & Muñoz, R. (2007), Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods, *Int. J. Food Microbiol*. **117**, 258-269.

101. Larsen, J.T.; Nielsen, J.-C.; Kramp, B.; Richelieu, M.; Bjerring, P.; Riisager, N.A. & Edwards, C.G. (2003), Impact of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* **54**, 246-251.

102. Lasik, M. (2013), The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: a review, *Eur Food Res Technol* **237**, 843–850.

103. Lasik-Kurdyś, M.; Majcher, M. & Nowak, J. (2018), Effects of Different Techniques of Malolactic Fermentation Induction on Diacetyl Metabolism and Biosynthesis of Selected Aromatic Esters in Cool-Climate Grape Wines, *Molecules* (Basel, Switzerland), **23**(10), 2549.

104. Lehtonen, P. (1996), Determination of amines and amino acids in wine – a review,

American Journal of Enology and Viticulture **47**, 127–133.

105. Lerm, E.; Engelbrecht, L. & Du Toit, M. (2010), Malolactic fermentation: the ABC's of MLF, *South African Journal of Enology and Viticulture* **31**.

106. Lerm, E.; Engelbrecht, L. & Du Toit, M. (2011), Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* south african wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **32**, 280-295.

107. Liu, S.-Q. (2002), Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification, *Journal of Applied Microbiology* **92**(4), 589-601.

108. Liu, S.-Q. & Davis, C.R. (1994), Analysis of wine carbohydrates using capillary gas-liquid chromatography, *American Journal of Enology and Viticulture* **45**, 229–234.

109. Liu, S.-Q.; Davis, C.R. & Brooks, J.D. (1995a), Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine, *American Journal of Enology and Viticulture* **46**, 166–174.

110. Liu, S.-Q.; Pritchard, G. G.; Hardman, M. J. & Pilone, G. J. (1994), Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*, *Am. J. Enol. Vitic.* **45**, 235–242.

111. Liu, S.-Q.; Pritchard, G.G.; Hardman, M.J. & Pilone, G.J. (1995b), Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria, *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 310–316.

112. Liu, S.-Q.; Pritchard, G.G.; Hardman, M.J. & Pilone, G.J. (1996), Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway, *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 486–492.

113. Llaubères, R.-M.; Richard, B.; Lonvaud, A.; Dubourdieu, D. & Fournet, B. (1990), Structure of an exocellular β-d-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria,

Carbohydrate Research **203**(1), 103-107.

114. Lombardi, S. J.; Pannella, G.; Iorizzo, M.; Testa, B.; Succi, M.; Tremonte, P.; Sorrentino, E.; Di Renzo, M.; Strollo, D. & Coppola, R. (2020), Inoculum Strategies and Performances of Malolactic Starter *Lactobacillus plantarum* M10: Impact on Chemical and Sensorial Characteristics of Fiano Wine, *Microorganisms* **8**(4), 516.

115. Lonvaud-Funel, A. (1995), Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects, *FEMS Microbiology Letters* **126**(3), 209-214.

116. Lonvaud-Funel, A. (1999), Lactic acid bacteria and the quality improvement and depreciation of wine, *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 317–331.

117. Lucio, O.; Pardo, I.; Krieger-Weber, S.; Heras, J. M. & Ferrer, S. (2016), Selection of *Lactobacillus* strains to induce biological acidification in low acidity wines, *LWT* **73**, 334-341.

118. Maicas, S.; Gil, J-V.; Pardo, I. & Ferrer, S. (1999), Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria, *Food Res. Int.* **32**, 491.

119. Marcobal, A.; Martin-Alvarez, P.J.; Polo, M.C.; Muñoz, R. & Moreno-Arribas, M.V. (2006), Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine, *J. Food Prot.* **69**, 397-404.

120. Martín-Álvarez, P.J.; Marcobal, Á.; Polo, C. & Moreno-Arribas, M.V. (2006), Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines, *Eur. Food Res. Technol.* **222**, 420-424.

121. Martineau, B.; Henick-Kling, T.; Acree, T. (1995a), Reassessment of the influence of malolactic fermentation on the concentration of diacetyl in wines, *Am. J. Enol. Vitic.,* **46**, 385–388.

122. Martineau, B. & Henick-Kling, T. (1995b), Formation and degradation of diacetyl in wine during alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strain EC1118 and

malolactic fermentation with *Leuconostoc oenos* strain MCW, *American Journal of Enology and Viticulture* **46**, 442–448.

123. Massera, A.; Soria, A.; Catania, C.; Krieger, S. & Combina, M. (2009), Simultaneous inoculation of Malbec (*Vitis vinifera*) musts with yeast and bacteria: effects on fermentation performance, sensory and sanitary attributes of wines, *Wine Food Technol Biotechnol* **47**(2):192–201.

124. Matthews, A.; Grimaldi, A.; Walker, M.; Bartowsky, E.; Grbin, P. & Jiranek, V. (2004), Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification, *Applied and environmental microbiology* **70**(10), 5715–5731.

125. Matthews, A.; Grbin, P.R. & Jiranek, V. (2007), Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria, *Appl Microbiol Biotechnol* **77**, 329–337.

126. Millet, V. & Lonvaud-Funel, A. (2000), The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage, *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**(2), 136-41.

127. Mills, D. A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D., & Makarova, K. (2005), Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking, *FEMS microbiology reviews* **29**(3), 465–475.

128. Mira de Orduña, R.; Patchett, M.L.; Liu, S.-Q. & Pilone, G.J. (2001), Growth, arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri*, *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations, *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1657–1662.

129. Moreno-Arribas, V. & Lonvaud-Funel, A. (2001), Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine, *FEMS Microbiol. Lett.* **195**, 103-107.

130. Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (2005), Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 265-286.

131. Moreno-Arribas, M.V. & Polo, M.C., (2008), Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines, *Food Microbiol*. **25**, 875-881.

132. Moreno-Arribas, M.V.; Polo, M.C.; Jorganes, F. & Muñoz, R. (2003), Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine, *Int. J. Food Microbiol*. **84**, 117-123.

133. Moreno-Arribas, M.V.; Smit, A.Y. & Du toit, M. (2010), Biogenic amines and the winemaking process, In: Reynolds, A.G. (Ed.), Managing Wine Quality: Oenology and Wine Quality, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

134. Muñoz, R.; Moreno-Arribas, M.V. & De las Rivas, B. (2011), Lactic acid bacteria. In: Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R. (Eds.), Molecular Wine Microbiology, Academic Press, San Diego, CA.

135. Naouri, P.; Chagnaud, P.; Arnaud, A. & Galzy, P. (1990), Purification and properties of a malolactic enzyme from *Leuconostoc oenos* ATCC 23278, *Journal of basic microbiology* **30**(8), 577–585.

136. Nelson, L. (2008), The production of volatile phenols by wine microorganisms, Master Thesis, Department of Viticulture and Oenology, Stellenbosch University, South Africa.

137. Nielsen, J.C., Prahl, C. & Lonvaud-Funel, A. (1996), Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures, *Am. J. Enol. Vitic.* **47**, 42-48.

138. Nielsen, J.C. & Richelieu, M. (1999), Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*, *Appl. Environ. Microbiol*. **65**, 740–745.

139. Nishiumi, S.; Miyamoto, S.; Kawabata, K.; Ohnishi, K.; Mukai, R.; Murakami, A.; Ashida, H. & Terao, J. (2011), Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors, *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* **3**, 1332-62.

140. Osborne, J. P.; Mira de Orduña, R.; Pilone, G. J. & Liu, S. Q. (2000), Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria, *FEMS microbiology letters*, **191**(1), 51–55.

141. Pérez-Martín, F.; Seseña, S.; Izquierdo, P. M. & Palop, M. L. (2013), Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines, *International Journal of Food Microbiology* **163**(2), 153-158.

142. Pérez-Serradilla, J. A. & de Castro, M. D. L. (2008), Role of lees in wine production: A review, *Food Chemistry* **111**(2), 447-456.

143. Pozo-Bayón, M.A.; G-Alegría, E.; Polo, M.C.; Tenorio, C.; Martín-Álvarez, P.J.; Calvo de la Banda, M.T.; Ruiz-Larrea, F. & Moreno Arribas, M.V. (2005), Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures, *Journal of agricultural and food chemistry* **53**(22), 8729–8735.

144. Prahl, C. (1989), La décarboxylation de l'acide L-malique dans le moût par l'ensemencement de lactobacilles homofermentaires, *Revue des Œnologues* **54**, 13–17.

145. Prete, V.; Costantini, A.; Cecchini, F.; Morassut, M. & Garcia-Moruno, E. (2009), Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes, *Food Chemistry* **112**, 474-481.

146. Ramos, A.; Lolkema, J.S.; Konings, W.N. & Santos, H. (1995), Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*, *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1303–1310.

147. Ramos, A. & Santos, H. (1996), Citrate and sugar cofermentation in *Leuconostoc oenos*, a ^{13}C nuclear magnetic resonance study, *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2577–2585.

148. Reguant, C.; Bordons, A.; Arola, L. & Rozès, N. (2000), Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine, *Journal of applied microbiology* **88**, 1065-71.

149. Ribéreau-Gayon, P. (1985), New developments in wine microbiology, *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 1-10.

150. Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B. & Lonvaud-Funel, A. (1998), Traité d'Oenologie, I. Dunod, Paris.

151. Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B. & Lonvaud, A. (2006), (2nded), The microbiology of wine and vinifications, In: Ribureau-Gayon P. (ed.), *Handbook of Enology*, vol 1. Wiley, Chichester, England.

152. Romero, J.; Ilabaca, C.; Ruiz, M. & Jara, C. (2018), *Oenococcus oeni* in Chilean Red Wines: Technological and Genomic Characterization, *Frontiers in Microbiology* **9**, 90.

153. Rosi, I.; Fia, G. & Canuti, V. (2003), Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*, *Aust. J. Grape Wine Res.* **9**, 194-199.

154. Rozès, N. & Peres, C. (1998), Effects of phenolic compounds on growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*, *Applied Microbiology and Biotechnology* **49**, 108-111.

155. Rozès, N.; Arola, L. & Bordons, A. (2003), Effect of phenolic compounds on the co-metabolism of citric acid and sugars by *Oenococcus oeni* from wine, *Letters in Applied Microbiology* **36**(5), 337-341.

156. Saguir, F.; Campos, I.; Carmen, M. & Nadra, M. (2009), Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from grape juices. Assessment of its biochemical activities relevant to flavor development in wine, *International Journal of Wine Research* **1**.

157. Salou, P.; Loubiere, P. & Pareilleux, A. (1994), Growth and energetics of *Leuconostoc* oenos during cometabolism of glucose with citrate or fructose, *Applied and environmental microbiology* **60**, 1459-66.

158. Semon, M.J.; Edwards, C.G.; Forsyth, D. & Dinn, C. (2001), Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of *Oenococcus oeni*, *Aust. J. Grape Wine Res.* **7**(1):52–59.

159. Silla Santos, M.H. (1996), Biogenic amines: their importance in foods*, Int. J. Food Microbiol.* **29**, 213-231.

160. Smit, A.Y.; Du toit, W.J. & Du toit, M. (2008), Biogenic amines in wine: understanding the headache, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **29**, 109-127.

161. Soufleros, E.; Barrios, M.-L.; Bertrand, A. (1998), Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds, *Am. J. Enol. Vitic.* **49**, 266.

162. Stead, D. (1993), The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria, *Journal of Applied Bacteriology* **75**(2), 135-141.

163. Sternes, P.R. & Borneman, A.R. (2016), Consensus pan-genome assembly of the specialised wine bacterium *Oenococcus oeni*, *BMC Genomics* **17**, 308.

164. Stribny, J.; Querol, A. & Pérez-Torrado, R. (2016), Differences in Enzymatic Properties of the *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* Alcohol Acetyltransferases and Their Impact on Aroma-Active Compounds Production, *Frontiers in microbiology* **7**, 897.

165. Strickland, M. T.; Schopp, L. M.; Edwards, C. G. & Osborne, J. P. (2016), Impact of *Pediococcus* spp. on Pinot noir Wine Quality and Growth of *Brettanomyces*, *American Journal of Enology and Viticulture* **67**(2), 188-198.

166. Stuart, M.R.; Chou, L.S. & Weimer, B.C. (1999), Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp. lactis, *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 665–673.

167. Styger, G.; Prior, B. & Bauer, F. F. (2011), Wine flavor and aroma, *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **38** (9), 1145–1159.

168. Sumby, K.; Bartle, L.; Grbin, P. & Jiranek, V. (2019), Measures to improve wine malolactic fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 2033–2051.

169. Sumby, K. M.; Grbin, P. R. & Jiranek, V. (2013), Characterization of EstCOo8 and EstC34, intracellular esterases, from the wine-associated lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*, *Journal of applied microbiology* **114**(2), 413–422.

170. Sumby, K. M.; Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2014), Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine, *Applied microbiology and biotechnology* **98**(19), 8111–8132.

171. Swiegers, J.H.; Bartowsky, E.J.; Henschke, P.A. & Pretorius, I.S., (2005), Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor, *Aust. J. Grape Wine Res*. **11**, 139, 173.

172. ten Brink, B.; Damink, C.; Joosten, H. M. L. J. & in 't Veld, J. H. J. H. (1990), Occurrence and formation of biologically active amines in foods, *International Journal of Food Microbiology* **11**(1), 73 - 84.

173. The Australian Wine Research Institute, Malolactic Fermentation in White and Sparkling Wines (Sept. 2020), Retrieved from: www.awri.com.au/information_services/fact-sheets/.

174. Tonon, T. & Lonvaud-Funel, A. (2000), Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*, *Journal of Applied Microbiology* **89**, 526–531.

175. Tse, T. J.; Wiens, D. J.; Chicilo, F.; Purdy, S. K. & Reaney, M. J. T. (2021), Value-Added Products from Ethanol Fermentation—A Review, *Fermentation* **7**(4).

176. Ugliano, M.; Genovese, A. & Moio, L. (2003), Hydrolysis of Wine Aroma Precursors during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*, *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 5073-8.

177. Ugliano M. & Henschke P.A. (2009), Yeasts and Wine Flavour. In: Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (eds) Wine Chemistry and Biochemistry, Springer, New York, NY.

178. van Vuuren, H. J. J. & Dicks, L. M. T. (1993), *Leuconostoc oenos*: A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 99-112.

179. Vaquero, I.; Marcobal, A. & Muñoz, R. (2004), Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine, *International journal of food microbiology* **96,** 199-204.

180. Vasserot, Y.; Dion, C.; Bonnet, E.; Maujean, A. & Jeandet, P. (2001), A study into the role of L-aspartic acid on the metabolism of L-malic acid and D-glucose by *Oenococcus oeni*, *Journal of Applied Microbiology* **90**, 380–387.

181. Vivas, N. A.; Lonvaud-Funel, A. & Glories, Y. (1997), Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium, *Food Microbiology* **14**, 291-300.

182. Wade, M. E.; Strickland, M. T.; Osborne, J. P. & Edwards, C. G. (2018), Role of *Pediococcus* in winemaking, *Aust. J. Grape Wine Res.* **25**, 7–24.

183. Walling, E.; Gindreau, E. & Lonvaud-Funel, A. (2005), A putative glucan synthase gene dps detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider, *International journal of food microbiology,* **98**(1), 53–62.

184. Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Davis, C.R.; Fleet, GH. & Lee, TH. (1985), Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 302-313.

185. Zapparoli, G.; Tosi, E.; Azzolini, M.; Vagnoli, P. & Krieger, S. (2009), Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in high-alcohol wines, *S. Afr. J. Enol. Vitic*. **30**, 49-55.