



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
I) ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ II) ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη κινητικής αλκοολικής ζύμωσης και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών οίνων που παρήχθησαν με τη χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων

Στυλιανή Ε. Παπαδημητρίου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2022

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη κινητικής αλκοολικής ζύμωσης και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών οίνων που παρήχθησαν με τη χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων

“Study of alcoholic fermentation kinetics and organoleptic characteristics of wines produced by selected yeast strains”

Στυλιανή Ε. Παπαδημητρίου

Εξεταστική επιτροπή:

Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

Μετάφα Μαρία, Ερευνήτρια ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ

Μελέτη κινητικής αλκοολικής ζύμωσης και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών οίνων που παρήχθησαν με τη χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων

*ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων. Ι) Γαλακτοκομία ΙΙ) Οινολογία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Οινολογίας*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η ζυμωτική δράση 3 νέων στελεχών που απομονώθηκαν από αυθόρμητες ζυμώσεις. Μία αυθόρμητη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και αξιολογήθηκαν ως προς τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά στην ποικιλία Ασύρτικο. Σε όλες τις περιπτώσεις εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο οινοποίησης. Διεξήχθησαν τέσσερις μικροοινοποιήσεις, οι 3 με τα 3 απομονωμένα στελέχη ζυμομυκήτων σε δοχεία των 100 λίτρων και η αυθόρμητη σε δοχεία 700 λίτρων. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Συγκεκριμένα τα στελέχη Sc9 και Sc13 έχουν απομονωθεί από την ποικιλία Ασύρτικο στη Σαντορίνη ενώ το Y54 από την περιοχή της Νεμέας στην Πελοπόννησο (Nisiotou & Gibson, 2005) και ανήκουν στην ιδιωτική συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη) έγινε με υγρή χρωματογραφία. Η ζύμωση διήρκησε από 14- 37 ημέρες με αύξουσα σειρά αποζύμωσης τα στελέχη Sc9, Y54, Sc13 και τελευταία η αυθόρμητη. Όλοι οι παραγόμενοι οίνοι περιείχαν λιγότερα από 4 g/L σακχάρων.

Η ζυμωτική ικανότητα τόσο των επιλεγμένων στελεχών όσο και εκείνων που παρευρίσκονταν στην αυθόρμητη ζύμωση ήταν ικανοποιητική καθώς παρότι η συγκέντρωση σακχάρων στο γλεύκος ήταν αρχικά 224 g/L, η τελική αλκοόλη έφτασε τα 13,1% vol. αποδεικνύοντας ότι η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό. Όσον αφορά την κατανάλωση σακχάρων παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις. Ο μεγαλύτερος ρυθμός κατανάλωσης των αναγόντων σακχάρων ήταν 23,21 g/L/ημέρα και προήλθε από το στέλεχος Sc9. Ακολούθησε το Y54 με 16,27 g/L/ημέρα, το στέλεχος Sc13 με 14,3 g/L/ημέρα. και τέλος η αυθόρμητη με 12,54 g/L/ημέρα. Διαφορές μεταξύ των ζυμώσεων υπήρξαν και στην προτίμηση κατανάλωσης σακχάρων. Όλα τα απομονωμένα στελέχη παρουσίασαν μεγαλύτερο συντελεστή κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τη φρουκτόζη έστω και με μικρή διαφορά. Αυτό όμως δεν ίσχυσε στην περίπτωση της αυθόρμητης ζύμωσης όπου ο συντελεστής κατανάλωσης της γλυκόζης ήταν 4,92 g/L/ημέρα και αντίστοιχα της φρουκτόζης ήταν 7,52 g/L/ημέρα.

Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί ότι ο μεγαλύτερος συντελεστής κατανάλωσης της γλυκόζης προήλθε από το στέλεχος Sc9 με 15,96 g/L/ημέρα και ήταν τριπλάσιος από εκείνον της αυθόρμητης ζύμωσης. Ο συντελεστής κατανάλωσης της φρουκτόζης ήταν παρόμοιος σε όλες τις ζυμώσεις με μεγαλύτερο εκείνον του στελέχους Sc9.

Ο συντελεστής μετατροπής αιθανόλης ανά μονάδα σακχάρου του στελέχους Sc13 ήταν 0,46 g/g, ακολούθησε η αυθόρμητη ζύμωση με 0,42 g/g , έπειτα το Y54 με 0,40 g/g και τέλος το στέλεχος Sc9 με 0,31 g/g.

Η τελική συγκέντρωση αλκοόλης δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές. Αναλυτικότερα, το στέλεχος Sc13 είχε 95,84 g/L αιθανόλη (13,1 % vol) ακολούθησε το Sc9 με 87,47 g/L (13,1 % vol), έπειτα το στέλεχος Y54 με 87,38 g/L (13,0 % vol) και τέλος η αυθόρμητη ζύμωση με 86,14 g/L (13,0 % vol). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι παρότι οι ζυμώσεις όλων των στελεχών σημείωσαν παρόμοιο ποσοστό αλκοόλης υπήρξε μεγάλη διακύμανση στον ρυθμό παραγωγής. Πραγματοποιήθηκαν δύο οργανοληπτικοί έλεγχοι σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, από εξειδικευμένο και μη πάνελ δοκιμαστών και με διαφορετικό τύπο ερωτήσεων, για την ποιοτική αξιολόγηση των παραγόμενων οίνων. Στην πρώτη δοκιμή ξεχώρισε το δείγμα από τη ζύμωση με το στέλεχος Sc13 ωστόσο στην επόμενη δοκιμή αν και στα περισσότερα κριτήρια όλα τα στελέχη που συμμετείχαν είχαν μικρές αποκλείσεις στις ποιοτικές παραμέτρους, ο παράγοντας της οξείδωσης επιδρά αρνητικά στην τελική αξιολόγηση του οίνου. Συνεπώς από όλα τα παραπάνω φαίνεται πως αν και το δείγμα με το στέλεχος Sc13 είχε αρχικά ποιοτικότερα χαρακτηριστικά, η εξέλιξή του στο χρόνο δεν ήταν ικανοποιητική σε αντίθεση με το στέλεχος Sc9 που ήταν εξίσου καλό ποιοτικά και με καλύτερη αντοχή στο χρόνο.

Επιστημονική περιοχή: Οινολογία

Λέξεις κλειδιά: *S. cerevisiae*; παραγωγή αιθανόλης; αυθόρμητη ζύμωση; οργανοληπτική αξιολόγηση; εναρκτήριες καλλιέργειες; οίνοι terroir

Study of alcoholic fermentation kinetics and organoleptic characteristics of wines produced by selected yeast strains

*MSc in Modern Food Science and Technology, I) Dairy II) Oenology
Department of Food Science and Human Nutrition
Laboratory of Oenology & Spirits Technology*

ABSTRACT

In this present investigation, were studied the fermentations of 3 new isolated wild strains and one spontaneous fermentation as a control, in terms of their quality characteristics in the Assyrtiko grape variety. In all cases the same vinification protocol was applied. Four microvinifications were carried out. The 3 with the 3 different yeast strains ferment in 100 liters containers and one with the spontaneous ferment in 700 liters containers. In all vinifications there were repetitions. Specifically, strains Sc9 and Sc13 have been isolated from the Assyrtiko variety in Santorini, while Y54 from the Nemea area in the Peloponnese (Nisiotou & Gibson, 2005) and belong to the private collection of the Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology of the Agricultural University of Athens. The concentration of sugars (glucose and fructose) and determination was done by liquid chromatography. The fermentation lasted from 14-37 days with increasing order of fermentation the strains Sc9, Y54, Sc13 and finally the spontaneous. All the produced wines contained less than 4 g/L residual sugars.

The fermentation capacity of both selected strains and those attending the spontaneous fermentation was satisfactory as although the concentration of sugars in the must was initially 224 g/L, the total alcohol reached 13.1% vol. proving that the alcoholic fermentation was satisfactorily completed. Regarding the consumption of sugars, differences were observed. The highest consumption rate of the sugars (glucose and fructose) was 23.21 g/L/day and came from strain Sc9. Then follows the Y54 with 16.27 g/L/day, the Sc13 strain with 14.3 g/L/day and finally the spontaneous with 12.54 g/L/day. There were also differences between the fermentations in the consumption preference of sugars. All the isolates presented a higher consumption factor of glucose compared to fructose, even with a small difference. But this was not true in the case of spontaneous fermentation. The consumption factor of glucose was 4.92 g/L/day and correspondingly that of fructose was 7.52 g/L/day. It is also important to mention that the highest glucose consumption coefficient came from strain Sc9 with 15.96 g/L/day and was three times that of spontaneous fermentation with 4.92 g/L/day. The consumption

rate of fructose was similar in all fermentations with a higher one for strain Sc9.

Regarding ethanol, the yield coefficient of strain Sc13 was 0.46 g/g, followed by spontaneous fermentation with 0.42 g/g, then Y54 with 0.40 g/g and finally strain Sc9 with 0.31 g/g.

Total alcohol concentration showed no significant differences. More specifically, strain Sc13 had 95.84 g/L ethanol (13.1% vol) followed by strain Sc9 with 87.47 g/L (13.1% vol), then Y54 with 87.38 g/L (13,0% vol), and finally the spontaneous fermentation with 86.14 g/L (13.0% vol). However, it is worth mentioning that although the fermentations of all the strains showed a similar percentage of alcohol, there was a large variation in the production rate. Two sensory analysis were carried out with differences on dates, in specification of the panel and in the type of the questions, to evaluate the quality of the produced wines. In the first test, the sample from the fermentation with strain Sc13 stood out, however in the next test, although in most criteria all the strains involved had small exclusions in the quality parameters, the oxidation factor has a negative effect on the final evaluation of the wine. Therefore, from all the above it appears that although the sample with the Sc13 strain initially had better quality characteristics, its evolution over time was not satisfactory in contrast to the Sc9 strain which was equally good in quality and with better resistance over time.

Scientific area: Oenology

Keywords: *S. cerevisiae*; ethanol production; wild fermentation; sensory analysis; starter cultures; terroir wines

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Σταματίνα Καλλίθρακα για την επιστημονική καθοδήγηση, τις συμβουλές και το συντονισμό όπως και την υποψήφια διδάκτορα Στεφανία Χριστοφή τόσο για την υποστήριξη στο κομμάτι των εργαστηριακών αναλύσεων όσο και της διαδικασίας της συγγραφής της μεταπτυχιακής διατριβής.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου στο Οινοποιείο Χατζηδάκη στη Σαντορίνη και ιδιαίτερα στην οικογένεια Χατζηδάκη για την παραχώρηση του χώρου, του εξοπλισμού και των υλικών που χρειάστηκαν για την εκπόνηση της πειραματικής διαδικασίας της συγκεκριμένης μελέτης.

Τέλος ευχαριστώ ολόψυχα τους δικούς μου ανθρώπους για την κατανόηση αλλά και την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη.

Όλα τα παραπάνω συνέβαλαν στο να πραγματοποιηθεί αυτός ο προσωπικός στόχος και να ολοκληρωθεί αυτό το ταξίδι όπως το είχα ονειρευτεί.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	7
ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	8
ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Οίνος στη Σαντορίνη	11
1.2 Λευκή Οινοποίηση	13
1.3 Ζύμες	14
1.3.1 Κατηγορίες ζυμών και οι σημαντικότερες για την οινοποίηση	14
1.3.2 Κύκλος ανάπτυξης μικροοργανισμών	17
1.3.3 Απαιτήσεις σε θρέψη και παράγοντες ανάπτυξης ζυμών	17
1.3.4 Παράγοντες επιβίωσης.....	19
1.3.5 Παράγοντες παρεμπόδισης της αλκοολικής ζύμωσης	19
1.3.6 Επιλογή ζυμών.....	24
1.3.7 Ενώσεις που συμβάλλουν στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου	43
1.4 Γευσιγνωσία- Οργανοληπτική αξιολόγηση οίνου	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	51
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
2.1 Οινοποίηση	51
2.2 Χημική ανάλυση σε γλεύκος και οίνο	53
2.3 Οργανοληπτικός έλεγχος.....	54
2.4 Στατιστική ανάλυση.....	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	57
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου	73
Συζήτηση	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	95
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	95
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	96

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1** Ανάπτυξη μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (A) *non-Saccharomyces yeasts*, (B) *Saccharomyces*, (C) *Oenococcus oeni*, και (D) ζύμες αλλοίωσης και/ή βακτήρια κατά την οινοποίηση. (Kenneth C. et al., 2007)..... 15
- Εικόνα 2** Καλλιέργειες (A) *Saccharomcyes*, (B) *Brettanomyces*, and (C) *Pediococcus* σε οίνο όπως απεικονίστηκε με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης σε μεγέθυνση $\times 1000$. Η φωτογραφία παρέχεται από τους R. Thornton and E. Akaboshi. (Kenneth C. Et al., 2007).16
- Εικόνα 3** Ο κύκλος ανάπτυξης των ζυμών και η κινητική ζύμωσης γλεύκους με υψηλή συγκέντρωση σακχάρων (320 g/l) (Lafon-Lafourcade, 1983). (I) Συνολικός πληθυσμός ζυμών (II) Ο ενεργός πληθυσμός ζυμών (III) Τα ζυμωμένα σάκχαρα. (Ribereau-Gayon, 2006). 17
- Εικόνα 4** Διάγραμμα ροής που απεικονίζει τη διαδικασία απομόνωσης άγριας ζύμης βήμα προς βήμα από έναν αμπελώνα (Tannenbaum, 2019). 33
- Εικόνα 5** Αλκοολική ζύμωση σε δοχεία 100 λίτρων στις 15/08/21..... 52
- Εικόνα 6** Φωτογραφία από το ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε στην οργανοληπτική αξιολόγηση στο εργαστήριο οιολογίας.56

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Επίδραση διαφορετικών θερμοκρασιών ζύμωσης οίνου στη διάρκεια ζύμωσης και στα υπολοιπόμενα σάκχαρα (Larue et al., 1987).....	22
Πίνακας 2 Ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε στην οργανοληπτική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε στη Σαντορίνη στις 4/11/21 (ΟΙΥ, 2021).....	55
Πίνακας 3 Ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε στην οργανοληπτική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε στην Αθήνα στις 3/03/22.....	55
Πίνακας 4 Συγκεντρικός πίνακας παραγωγής και απόδοσης αιθανόλης ανά στέλεχος <i>S. Cerevisiae</i>	91

ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 Η κινητική ζύμωσης για την αυθόρμητη ζύμωση.	57
Σχήμα 2 Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.	58
Σχήμα 3 Ο ρυθμός κατανάλωσης της φρουκτόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.	58
Σχήμα 4 Η απόδοση της αιθανόλης σε σχέση με την κατανάλωση σακχάρων.	59
Σχήμα 5 Η παραγωγή γλυκερόλης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης	60
Σχήμα 6 Η κινητική ζύμωσης για το στέλεχος Y54.	61
Σχήμα 7 Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.	62
Σχήμα 8 Ο ρυθμός κατανάλωσης της φρουκτόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.	62
Σχήμα 9 Η απόδοση της αιθανόλης σε σχέση με την κατανάλωση σακχάρων.	63
Σχήμα 10 Η παραγωγή γλυκερόλης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης	63
Σχήμα 11 Η κινητική ζύμωσης του στελέχους Sc13.	64
Σχήμα 12 Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.	65
Σχήμα 13 Ο ρυθμός κατανάλωσης φρουκτόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.	65
Σχήμα 14 Η απόδοση της αιθανόλης σε σχέση με την κατανάλωση σακχάρων.	66
Σχήμα 15 Η παραγωγή γλυκερόλης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης	66
Σχήμα 16 Η κινητική ζύμωσης του στελέχους Sc9.	67
Σχήμα 17 Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.	68
Σχήμα 18 Ο ρυθμός κατανάλωσης φρουκτόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.	68
Σχήμα 19 Η απόδοση της αιθανόλης σε σχέση με την κατανάλωση σακχάρων.	69
Σχήμα 20 Η παραγωγή γλυκερόλης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης	69
Σχήμα 21 Τελικές συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος ανά στέλεχος.	70
Σχήμα 22 Η τελική συγκέντρωση γλυκερόλης ανά στέλεχος.	70
Σχήμα 23 Η τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος ανά στέλεχος.	71

Σχήμα 24 Η τελική συγκέντρωση οξικού οξέος ανά στέλεχος.....	71
Σχήμα 25 Η συγκέντρωση αιθανόλης ανά στέλεχος.	72
Σχήμα 26 Το αραχνόγραμμα απεικονίζει τους μέσους όρους από 27 δοκιμαστές σε αξιολόγηση δέκα παραγόντων σχετικούς με την ποιότητα του οίνου στις 4/11/21 στη Σαντορίνη.....	73
Σχήμα 27 Η βαθμολογία που συγκέντρωσε κάθε στέλεχος από τους μέσους όρους 27 δοκιμαστών στις 4/11/21.	73
Σχήμα 28 Το αραχνόγραμμα απεικονίζει τους μέσους όρους από 8 εκπαιδευμένους δοκιμαστές σε αξιολόγηση έντεκα παραγόντων σχετικούς με την ποιότητα του οίνου.....	74

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οίνος στη Σαντορίνη

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Η Σαντορίνη διαθέτει έναν από τους παλαιότερους αμπελώνες του κόσμου. Η καλλιέργεια της αμπέλου υφίσταται εδώ και τουλάχιστον 3.500 χρόνια. Στις ανασκαφές του Ακρωτηρίου στην τρίτη χιλιετία π.Χ., ευρήματα όπως κάρβουνα από ξύλα αμπέλου και τσαμπιά σταφύλια ως διακοσμητικά στοιχεία στην αγγειογραφία της εποχής μαρτυρούν ότι η αμπελοκαλλιέργεια ήταν μια από τις κύριες δραστηριότητες των κατοίκων. Ο προϊστορικός αυτός αμπελώνας, καταστράφηκε με τη μεγάλη έκρηξη του ηφαιστείου, γύρω στα 1.650 π.Χ., που εξαφάνισε κάθε ίχνος ανθρώπινης ζωής και φυτικής βλάστησης από το νησί για τρεις αιώνες περίπου.

Οι Φοίνικες, οι πρώτοι άποικοι μετά την καταστροφή, κατά τον Ηρόδοτο, αλλά και όσοι τους ακολούθησαν, έπρεπε να αντιμετωπίσουν ένα ακραίο οικοσύστημα, προκειμένου να επιβιώσουν. Για να καλύψουν τις ανάγκες διατροφής τους δοκίμασαν να καλλιεργήσουν φυτά διαφορετικών ειδών που έφεραν μαζί τους και τους ήταν γνώριμα. Η άμπελος κατόρθωσε να επιβιώσει στη διάρκεια των αιώνων στο αφιλόξενο περιβάλλον της Σαντορίνης. Φυτό ευπροσάρμοστο και ιδιαίτερα ανθεκτικό στις ξηροθερμικές συνθήκες του νησιού, διαθέτοντας πλούσιο και δυνατό ριζικό σύστημα καταφέρνει να διαπερνά τη θηραϊκή γη. Το σκληρό και συνεκτικό έδαφος που δημιουργήθηκε από αλληπάλληλα στρώματα ηφαιστειακών υλικών όπως, τέφρα, λάβα, ελαφρόπετρα και σκουριά, καλύπτοντας το ασβεστολιθικής και σχιστολιθικής προέλευσης υπέδαφος, κατά τις διαδοχικές εκρήξεις. Αιώνες ανθρώπινου μόχθου αποτυπώνονται πάνω στο νησιωτικό τοπίο και μαρτυρούν τις προσπάθειες των Σαντορινιών όλων των εποχών να τιθασεύσουν τη γη τους.

Από την περίοδο των αρχαϊκών και κλασικών χρόνων απουσιάζουν μαρτυρίες για την αμπελοκαλλιέργεια. Στην Ενετοκρατία (12ος - 17ος αι.), οι Βενετοί κυριάρχησαν στο νησί της Σαντορίνης. Ανέκαθεν, οι Ευρωπαίοι εκτιμούσαν τους ελληνικούς οίνους, όχι μόνο για την ποιότητά τους, αλλά και γιατί διατηρούταν στα μακρινά θαλάσσια ταξίδια. Έτσι, τα φράγκικα και τα βενετσιάνικα πλοία αρχίζουν να φορτώνουν όλο και πιο πολλά κρασιά, από τη Σαντορίνη. Η χρυσή εποχή των Σαντορινιών κρασιών στην Ενετοκρατία, θα λήξει με την οριστική κυριαρχία των Τούρκων, μετά από εξαιρετική πορεία, με ένδοξες στιγμές.

Η Σαντορίνη συνδύαζε πάντα μεγάλη παραγωγή με ποιότητα και εξωστρέφεια. Στην τουρκοκρατία η έλλειψη μεγάλων καλλιεργήσιμων εκτάσεων στο νησί συνέβαλε στο να μη μεταφερθούν μουσουλμανικοί πληθυσμοί. Οι Σαντορινιοί οργάνωσαν δημοκρατικά τις κοινότητές τους και, εκμεταλλευόμενοι την ηρεμία που κυριάρχησε στο Αιγαίο μετά την οθωμανική κατάκτηση, ανέπτυξαν, όπως και στα προϊστορικά χρόνια, το εμπόριο και τη ναυτιλία. Η Αλεξάνδρεια, το Ταγανρόκ και η Κωνσταντινούπολη ήταν τα σπουδαιότερα κέντρα όπου εξάγονταν μεγάλες ποσότητες σαντορινιών κρασιών. Ιστορικά είναι γνωστό ότι γινόταν εξαγωγή στη Ρωσία τουλάχιστον από το 1786. Μάλιστα, η οικονομία της Σαντορίνης οδηγήθηκε σε παρακμή, όταν, λόγω της Οκτωβριανής επανάστασης, σταμάτησε η εξαγωγή προς την χώρα αυτή.

Ο δεσμός της Σαντορίνης με την παραγωγή οίνου (πολιτιστικός, κοινωνικός και οικονομικός) επιβεβαιώνεται τα τελευταία χρόνια με σειρά εκδηλώσεων στο νησί, όπως τα συνέδρια «ΑΜΠΕΛΟΣ». Η Σαντορίνη επιλέχθηκε να είναι ο τόπος διεξαγωγής αυτών των διεθνών συνεδρίων για το αμπέλι, γιατί εκτός του ότι αποτελεί ένα από τα όμορφα και μοναδικά μέρη στον κόσμο, έχει παράδοση 3.500 χρόνων στην καλλιέργεια της αμπέλου και στην τέχνη της παραγωγής των κρασιών, παραγωγή η οποία ευνοείται από το ιδιόμορφο οικοσύστημα του ηφαιστιογενούς αυτού νησιού του Αιγαίου (Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007).

1.1.2 Τοποθεσία και κλίμα

Στη Σαντορίνη η αμπελοκαλλιέργεια σαν κύρια απασχόληση ήταν ευρέως διαδεδομένη από τον 18ο αιώνα. Πρόκειται για έναν από τους ελάχιστους αυτόρριζους αμπελώνες και αυτό γιατί η ανάπτυξη του εντόμου φυλλοξήρα παρεμποδίζεται σε αμμώδη και φτωχά σε άργιλο εδάφη (Kourakou-Dragona, 2015).

Η κύρια ποικιλία που καλλιεργείται είναι το Ασύρτικο καλύπτοντας το 75% του αμπελώνα. Η ποικιλία αυτή επικράτησε έναντι των ξενικών εξαιτίας της μεγάλης αντοχής της στο ωίδιο και τον περονόσπορο, δύο ασθένειες που είχαν έντονη παρουσία των προηγούμενο αιώνα.

Η έκταση του αμπελώνα είναι περίπου 10.000 στρέμματα. Ξεκινά από το επίπεδο της θάλασσας και καταλήγει με αναβαθμίδες στα 300 μέτρα υψόμετρο. Το κλίμα της περιοχής είναι το τυπικό μεσογειακό με έντονη ηλιοφάνεια, με ζεστά και ξηρά

καλοκαίρια και ήπιους χειμώνες. Η μέση ετήσια μέγιστη θερμοκρασία είναι 23°C, και η ελάχιστη 14°C. Το συνολικό μέσο ύψος ετήσιας βροχόπτωσης είναι 250 - 370 mm. Το σύνολο σχεδόν της Σαντορίνης αποτελείται από τριτογενείς αποθέσεις θηραϊκής γης, κίσηρη και λάβα. Το έδαφος της Σαντορίνης είναι αμμώδες με πολύ μικρό ποσοστό αργίλου. Είναι επίσης φτωχό σε οργανική ουσία και, με εξαίρεση μια μικρή περιοχή περί τον Προφήτη Ηλία, χωρίς ανθρακικό ασβέστιο. Για τους λόγους αυτούς, παρόλο που το έδαφος είναι πλούσιο σε κάλιο, το φυτό δεν μπορεί να απορροφήσει τις ποσότητες που απαιτούνται για να εξουδετερωθεί σε μεγάλο βαθμό το τρυγικό οξύ, στο οποίο οφείλεται η αυξημένη οξύτητα των παραγόμενων οίνων. Στη μειωμένη απορρόφηση καλίου συντελεί και το κλίμα με τις λίγες βροχές, καθώς και το γεγονός ότι οι αμπελώνες δεν ποτίζονται. Το νησί είναι εξαιρετικά ξηρό και στη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών, όταν ωριμάζουν τα σταφύλια, οι θερμοκρασίες μέσα στην ημέρα είναι πολύ υψηλές. Έτσι κατά τη διάρκεια αυτής της παρατεταμένης ξηρασίας, οι ανάγκες των φυτών σε νερό ανακουφίζονται από ομίχλες που δημιουργούνται από την εξάτμιση της θάλασσας και σκεπάζουν το νησί, ανεβαίνοντας από την Καλντέρα (Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007). Ύστερα από την εφαρμογή ενός τριετούς προγράμματος το 1971 καθιερώθηκε νομοθετικά η <<ονομασία προελεύσεως>> Σαντορίνη.

Ο λευκός ξηρός οίνος Π.Ο.Π. Σαντορίνη παράγεται από την ποικιλία Ασύρτικο σε ποσοστό τουλάχιστον 85%, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό από τις ποικιλίες Αηδάνι και Αθήρι, με την κλασική μέθοδο της λευκής οινοποίησης. Η θερμοκρασία κατά την αλκοολική ζύμωση δεν υπερβαίνει τους 20 °C.

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου όπως καθιερώθηκαν από τη σύγχρονη οινοποίηση χαρακτηρίζονται από ανοιχτό πρασινοκίτρινο χρώμα, με αρώματα εσπεριδοειδών, πλούσια γεύση και έντονη οξύτητα.

Ο ελάχιστος ολικός αλκοολικός τίτλος υποχρεούται να είναι 12% v/v και η περιεκτικότητα σε ολικά σάκχαρα από 0-4 g/L, ή έως 9 g/L, εφόσον η ολική οξύτητα, εκφρασμένη σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο, δεν είναι μικρότερη από την περιεκτικότητα σε αζύμωτα σάκχαρα, κατά περισσότερο από 2 γραμμάρια ανά λίτρο (Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007).

1.2 Λευκή Οινοποίηση

Η σημαντικότερη παράμετρος για μια υγιή και επιτυχημένη οινοποίηση είναι η κατάσταση της πρώτης ύλης. Πέραν από την ημερομηνία τρυγητού που καθορίζεται με βάση την τεχνολογική ωριμότητα της σταφυλής, καθοριστικός είναι και ο τρόπος μεταφοράς της πρώτης ύλης στους χώρους οινοποίησης. Ιδανικά η μεταφορά γίνεται κατά τις πρωινές ώρες, με φορτηγά ψυγεία και μέσα σε πλαστικά τελάρα έτσι ώστε να

αποφεύγεται η σύνθλιψη των σταφυλιών και η οξειδωση του γλεύκους λόγω επαφής με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας. Κατά την κλασική λευκή οινοποίηση το γλεύκος διαχωρίζεται σε κλάσματα με βάση το βαθμό πίεσης και κατά συνέπεια με βάση την ποιότητα, ενώ η ζύμωση γίνεται απουσία στεμφύλων αφού ο διαχωρισμός έχει επέλθει στο πιεστήριο. Στο πιεστήριο μπορούν να εισέλθουν τα σταφύλια είτε αποβοστριχωμένα είτε και ολόκληρα.

Προζυμωτικά υπάρχει η επιλογή της κρυοεκχύλισης. Μέσω της διεργασίας αυτής το γλεύκος εμπλουτίζεται σε πρόδρομες ενώσεις που συνεισφέρουν στο άρωμα. Στην περίπτωση της διαχείρισης λευκών ποικιλιών σημαντικό ρόλο κατέχει ο θειώδης ανυδρίτης έχοντας αντιοξειδωτικό και αντιμικροβιακό ρόλο. Απουσία ταννινών το γλεύκος αλλά και στη συνέχεια ο οίνος είναι πιο ευοξειδωτος και κατά συνέπεια η προστασία του πρέπει να είναι προσεκτική και τακτική. Εκτός από το θειώδη ανυδρίτη εξίσου σημαντικό είναι και ο ρόλος της θερμοκρασίας της πρώτης ύλης καθώς σε υψηλές θερμοκρασίες οι οξειδώσεις επιταχύνονται. Είναι επιθυμητό πριν από την πίεση τα σταφύλια να παραμείνουν για κάποιες ώρες σε ψυκτικό θάλαμο καθώς η συγκομιδή τους κατά τους θερινούς μήνες γίνεται κάτω από υψηλές θερμοκρασίες.

Στη συνέχεια μετά το πιεστήριο και πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης απομακρύνονται τα στερεά σωματίδια μέσω στατικής απολάσπωσης ή επίπλευσης. Όλες οι διεργασίες μέχρι να ξεκινήσει η ζύμωση θα πρέπει να γίνονται απουσία οξυγόνου με χρήση αδρανών αερίων. Η διαδικασία της ζύμωσης ξεκινά συνήθως με τον εμβολιασμό ενός εμπορικού πληθυσμού ζυμών είτε το γλεύκος αφήνεται να ξεκινήσει αυθόρμητα τη ζύμωση. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται μεγάλη προσοχή στη θερμοκρασία ζύμωσης η οποία δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τους 18 °C (Τσακίρης, 2014).

1.3 Ζύμες

1.3.1 Κατηγορίες ζυμών και οι σημαντικότερες για την οινοποίηση

Ζύμες οινοποίησης

Διαφορετικά γένη και είδη μικροοργανισμών έχουν βρεθεί σε γλεύκη και οίνους σε διαφορετικά στάδια κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης. Για παράδειγμα, είδη όπως *Saccharomyces*, *Brettanomyces* και *Pediococcus* μπορούν να συνυπάρχουν σε έναν οίνο (Εικόνα 2).

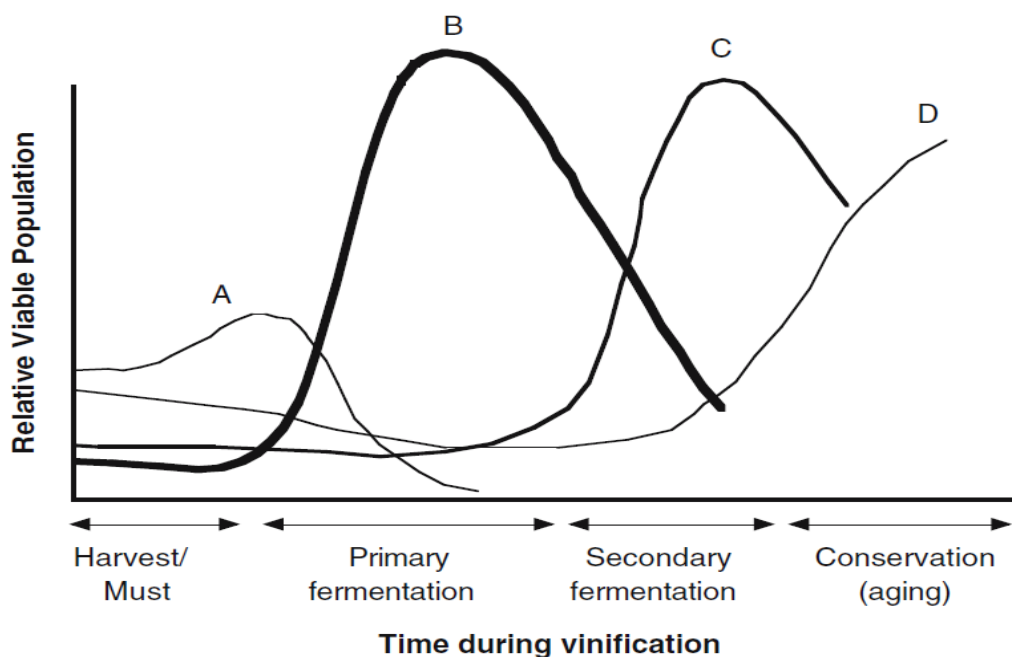
Η γηγενής ζυμογλωρίδα του γλεύκους προέρχεται από ώριμα σταφύλια στην επιφάνεια των οποίων αναπτύσσεται μετά από μεταφορά εντόμων και κυρίως της δροσόφιλας. Τα αριθμητικά επικρατέστερα στελέχη γηγενών ζυμών ανήκουν στο γένος *Hanseniaspora* ή *Kloeckera*, ενώ ακολουθούν στελέχη του γένους *Torulopsis* και τέλος στελέχη του

γένους *Saccharomyces cerevisiae* τα οποία συνολικά απαρτίζουν το 90% ολόκληρου του πληθυσμού. Αμέσως μετά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης ο πληθυσμός των ζυμών μεταβάλλεται, και μετά το σχηματισμό του 6-8% v/v αλκοόλης επικρατούν κυρίως στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*. Η συνέχεια της αλκοολικής ζύμωσης σε ποσοστό 90% οφείλεται κυρίως σε στελέχη *S.cerevisiae* που δύνανται να φτάσει την περιεκτικότητα της αλκοόλης έως και 13-14 % v/v.

Σε περιεκτικότητες μεγαλύτερες από 16-18 % v/v επικρατεί ο *Saccharomyces bayanus*. Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης είναι δυνατό να ξεκινήσει η μηλογαλακτική ζύμωση παρουσία του *Oenococcus* ή άλλων γαλακτικών βακτηρίων. Κατά την αποθήκευση του οίνου μπορεί να αναπτυχθούν διάφορα είδη ζυμών και βακτηρίων ικανών να προκαλέσουν αλλοιώσεις στο τελικό προϊόν (Εικόνα 1).

Η επικράτηση ενός είδους έναντι των υπόλοιπων μικροοργανισμών εξαρτάται σε κάθε στάδιο οινοποίησης από πολλούς παράγοντες, όπως το πλήθος των μικροοργανισμών που συμμετέχουν και την κατάσταση των σταφυλιών πριν από τον τρυγητό (υγρασία, φυσικές ζημιές από πτηνά και ανθρώπινους χειρισμούς, χρήση μυκητοκτόνων).

6. Microbial Ecology During Vinification



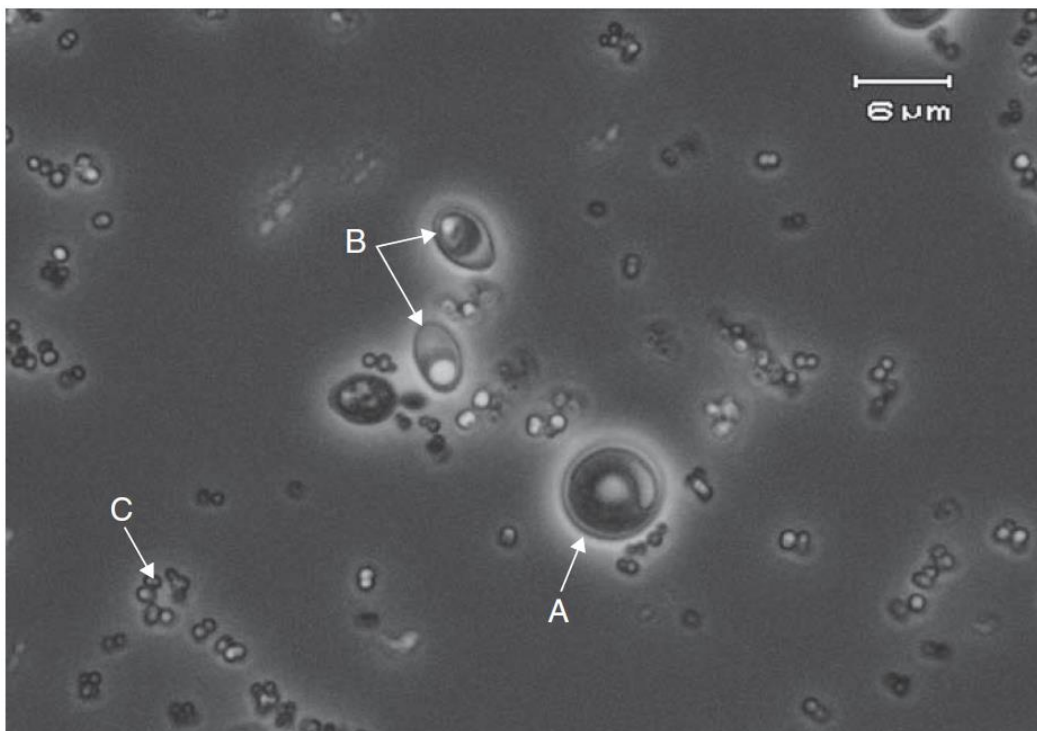
Εικόνα 1 Ανάπτυξη μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (A) non-*Saccharomyces* yeasts, (B) *Saccharomyces*, (C) *Oenococcus oeni*, και (D) ζύμες αλλοίωσης και/ή βακτήρια κατά την οινοποίηση (Kenneth C. et al., 2007).

Ζύμες ασθeneιών ή επαναζυμώσεων

Κατά τη διάρκεια αποθήκευσης οίνων με αζύμωτα σάκχαρα παρατηρείται το φαινόμενο της επαναζύμωσης από στελέχη με ανθεκτικότητα στο θειώδη ανυδρίτη όπως ο *Saccharomyces oniformis*, ο *Saccharomyces bailii*, ο *Saccharomycodes ludwigii* και στελέχη του γένους *Schizosaccharomyces*. Κάτι τέτοιο γίνεται εύκολα αντιληπτό καθώς στον οίνο δημιουργείται θόλωμα, παράγεται CO₂ και έπειτα εμφανίζεται ίζημα στη φιάλη. Οι επαναζυμώσεις συνήθως προκαλούνται από ένα μόνο είδος ζυμών, εκείνο που κατάφερε να προσαρμοστεί καλύτερα στις δυσμενείς συνθήκες του οίνου και να επικρατήσει.

Ζύμες επιμόλυνσεων

Στην κατηγορία των ζυμών επιμόλυνσης ανήκουν κυρίως οι μυκοδερμικές ζύμες που ανήκουν στα γένη *Candida*, *Pichia* και *Brettanomyces* και προκαλούν την άνθηση (fleur). Η άνθιση εκδηλώνεται με την εμφάνιση μυκηλίου στην επιφάνεια του οίνου. Οι μυκοδερμικές ζύμες οξειδώνουν την αιθανόλη σε ακεταλδεΐδη και αποσυνθέτουν τα οργανικά οξέα μειώνοντας την οξύτητα του οίνου. Η άνθιση συμβαίνει κυρίως σε οίνους με χαμηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη (9 και 10 % vol) οι οποίοι έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο και δεν είναι επαρκώς θειωμένοι (Σουφλερός, 2012).



Εικόνα 2 Καλλιέργειες (A) *Saccharomyces*, (B) *Brettanomyces*, and (C) *Pediococcus* σε οίνο όπως απεικονίστηκε με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης σε μεγέθυνση $\times 1000$. Η φωτογραφία παρέχεται από τους R. Thornton and E. Akaboshi (Kenneth C. Et al., 2007).

Ζύμες Θανάτωσης

Το αρνητικό αποτέλεσμα ενός killer στελέχους καθορίζεται από την αρχική αναλογία κυττάρων killer και μη killer στο γλεύκος, την ευαισθησία των κυττάρων ζύμωσης και την παρουσία προσροφητικών παραγόντων των πρωτεϊνών όπως ο μπεντονίτης (Carrau et al., 2008). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι υπάρχει αρνητική αλληλεπίδραση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Jacobs and Van Vuuren, 1991). Οι τοξίνες που παράγονται από τα θανατηφόρα στελέχη προσκολλώνται σε γλυκανικής φύσης υποδοχέα στο κυτταρικό τοίχωμα, μεταφέρονται με μηχανισμό που απαιτεί ενέργεια, στην πλασματική μεμβράνη και προκαλούν μη αναστρέψιμες αλλαγές όπως τη διακοπή των μηχανισμών μεταφοράς πρωτονίων και αμινοξέων, την μείωση του ενδοκυτταρικού pH και απώλειες ιόντων καλίου και μορίων ATP. Ο θάνατος του κυττάρου λαμβάνει χώρα 2-3 ώρες από την επαφή με την τοξίνη. Ο φονικός χαρακτήρας δεν εγγυάται την κυριαρχία ενός στελέχους σε ένα μικτό πληθυσμό της φυσικής μικροχλωρίδας κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (Zagorc et al., 2001). Υπάρχουν ωστόσο και στελέχη του *S.cerevisiae* που χρησιμοποιούνται ως εναρκτηρίες καλλιέργειες συμβάλλοντας στην βελτίωση της ποιότητας παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη killer ζυμών κατά τα πρώτα στάδια ζύμωσης (Comitini et al., 2004). Λόγω των σημερινών τάσεων για τη μείωση της χρήσης χημικών προσθέτων, η χρήση των καλλιεργειών εκκίνησης που παράγουν θανατηφόρες-τοξίνες είναι μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση για να αποφευχθεί η επιμόλυνση από ζύμες αλλοίωσης. Συνεπώς, το να συμπεριληφθεί ο “δολοφόνος” (killer) *S. cerevisiae* με κατάλληλες ιδιότητες ζύμωσης, είναι απαραίτητο για την επίτευξη ελεγχόμενης ζύμωσης, επισημαίνοντας τη σημασία μιας ορθής επιλογής στελεχών (Perez et al., 2017).

1.3.2 Κύκλος ανάπτυξης μικροοργανισμών

1.3.3 Απαιτήσεις σε θρέψη και παράγοντες ανάπτυξης ζυμών

Άνθρακας

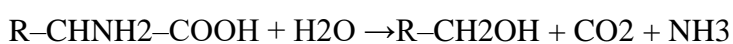
Οι ζύμες στο γλεύκος χρησιμοποιούν ως πηγές άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη. Συνήθως η αναμενόμενη συγκέντρωση σακχάρων για οίνους που θα παράξουν 10 έως 13% vol. αιθανόλη είναι περίπου 170- 220 g/L. Η συγκέντρωση των σακχάρων επηρεάζει τόσο το μεταβολισμό των ζυμών όσο και τη διάρκεια της ζύμωσης. Όταν το γλεύκος έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα 300 g/L επιμηκύνεται η περίοδος αναμονής, μειώνεται η ποσότητα σακχάρων που ζυμώνονται και αυξάνεται η πτητική οξύτητα. Η συγκέντρωση των σακχάρων σε γλεύκη που προορίζονται για γλυκούς οίνους μπορεί να είναι μεγαλύτερη από 350 g/L. Η συγκέντρωση σακχάρων επηρεάζει

την επιλογή και την επικράτηση των στελεχών των ζυμών έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η ολοκλήρωση της ζύμωσης (Fleet, 1992).

Άζωτο

Το γλεύκος περιέχει υψηλή συγκέντρωση σε αζωτούχες ενώσεις (0,1 έως 1 g άζωτο ανά λίτρο) ωστόσο αποτελεί το ένα τέταρτο του αζώτου που περιέχεται στα σταφύλια (Ribéreau-Gayon et al. 1975a). Σε αυτές τις ενώσεις περιλαμβάνονται αμμωνιακά κατιόντα (3- 10% του ολικού αζώτου), αμινοξέα (25-30%), πολυπεπτίδια (25-40%) και πρωτεΐνες (5-10%). Το άζωτο που απαντάται στα σταφύλια εξαρτάται από την ποικιλία, το υποκείμενο, το περιβάλλον και τις συνθήκες καλλιέργειας, ειδικά την αζωτούχο λίπανση. Η συγκέντρωση του αζώτου μειώνεται σε συνθήκες ξηρασίας και υδατικής καταπόνησης αλλά γενικά είναι ένας θετικός παράγοντας για την καλλιέργεια ερυθρών ποικιλιών. Επιπλέον οι φυτεύσεις εδαφοκάλυψης μειώνουν το άζωτο που είναι διαθέσιμο για το αμπέλι. Στην περίπτωση της Λευκής οινοποίησης η συγκέντρωση των αμινοομάδων και των πρωτεϊνών στο γλεύκος επηρεάζεται από τον τρόπο πίεσης των σταφυλιών. Η πίεση που είναι μεγαλύτερη σε διάρκεια και στην οποία έχει εφαρμοστεί κρυοεκχύλιση επιδιώκοντας την εκχύλιση από τους φλοιούς αυξάνει τη συγκέντρωση αζωτούχων ενώσεων (Dubourdieu et al., 1986). Οι ζύμες βρίσκουν στο γλεύκος το απαραίτητο για την επιβίωσή τους άζωτο. Τα αμμωνιακά κατιόντα είναι τα πιο εύκολα αφομοιώσιμα από τις ζύμες οι οποίες τα χρησιμοποιούν για να συνθέσουν τα απαραίτητα αμινοξέα. Πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες δεν συμβάλλουν στην ανάπτυξη των κυττάρων των ζυμών καθώς δεν υδρολύονται από τις ζύμες. Συνεπώς ο *S. cerevisiae* δεν χρειάζεται αμινοξέα για θρέψη καθώς έχει την ικανότητα να συνθέτει από μόνος του ό, τι χρειάζεται από το διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο. Παρόλα αυτά ο συνδυασμός αμινοξέων και αμμωνιακού αζώτου είναι πιο αποτελεσματικός για την έναρξη της ζύμωσης. Οι ζύμες χρησιμοποιούν τα αμινοξέα σύμφωνα με τρεις μηχανισμούς (Henschke and Jiranec, 1993). :

- Άμεση αφομοίωση ή μετατροπή τους σε πρωτεΐνες.
- Αποσύνθεση της αμινοομάδας, η οποία χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση διαφορετικών αζωτούχων ενώσεων. Το αντίστοιχο μόριο άνθρακα αποβάλλεται όπως στην αντίδραση του σχηματισμού ανώτερων αλκοολών:



- Αφομοίωση αμμωνιακού αζώτου από άλλες μεταβολικές αντιδράσεις. Τα μόρια των

αμινοξέων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή αζώτου και οι ζύμες με τη σειρά τους συμπληρώνουν ταυτόχρονα το αντίστοιχο αμμωνιακό άζωτο.

Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των κυττάρων. Μερικά στελέχη ζυμών έχουν ανάγκη συγκεκριμένων βιταμινών και σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Επομένως, πιθανή έλλειψη των βιταμινών προκαλεί αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων (Ough et al., 1989). Οι βιταμίνες εμπεριέχονται σε επαρκείς ποσότητες στο γλεύκος ωστόσο ένα σύνηθες φαινόμενο είναι η έλλειψη θειαμίνης. Σε τέτοιες περιπτώσεις θα πρέπει να προστεθεί εξωγενώς, καθώς συνδέεται τόσο με αυξητικούς παράγοντες των ζυμών, όπως και με τον πολλαπλασιασμό τους και το σχηματισμό δευτερογενών προϊόντων ζύμωσης. Οι ζύμες συνθέτουν μόνες τους τις βιταμίνες που χρειάζονται για την επιβίωσή τους. Ο πυροφωσφορικός εστέρας της θειαμίνης, η καρβοξυλάση, αποτελεί συνένζυμο πολλών αντιδράσεων αποκαρβοξυλίωσης και στην περίπτωση της αλκοολικής ζύμωσης συντελεί στην αποκαρβαξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος προς σχηματισμό ακεταλδεΐδης.

Μέταλλα

Μικρή ποσότητα μετάλλων, όπως, Fe, Cu, Co, Al, Mg, Zn, είναι αναγκαία για τη λειτουργία των κυττάρων. Αυξημένες ποσότητες όμως αυτών προκαλούν επιβράδυνση ή και αναστολή της ζύμωσης λόγω της τοξικότητάς τους για τα κύτταρα (Bisson, 2000).

1.3.4 Παράγοντες επιβίωσης

Μερικοί ακόμα παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των ζυμών είναι η θερμοκρασία, η παρουσία ή απουσία οξυγόνου, το pH, η αρχική συγκέντρωση σακχάρων και η αλληλεπίδρασή τους με άλλους μικροοργανισμούς. Αναλυτικότερα, το οξυγόνο στα πρώτα στάδια της ζύμωσης, συντελεί στη σύνθεση της εργοστερόλης, η οποία συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων των ζυμών ως προς την παραγόμενη αιθανόλη. Έτσι αποφεύγεται η πρόωμη λύση των κυττάρων (Lague et al., 1980; Lafon-Lafourcade, 1984). Στην οινοποίηση σε ζυμώσεις μεγάλου όγκου επιδιώκεται αερισμός στο γλεύκος κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και εμβολιασμός με εναρκτήριες καλλιέργειες ζυμών που είναι πλούσιες σε στερόλες.

1.3.5 Παράγοντες παρεμπόδισης της αλκοολικής ζύμωσης

Στους παράγοντες παρεμπόδισης ζύμωσης περιλαμβάνονται ένα πλήθος ουσιών που εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ζυμών όπως χημικά αντισηπτικά, αντιβιοτικά και

μυκητοκτόνα (Ribéreau-Gayon et al., 1975a). Η χρήση των αναστολέων ζύμωσης έχει καθιερωθεί για την αποθήκευση του οίνου και ιδιαίτερα η εφαρμογή του θειώδους ανυδρίτη.

1.3.5.1 Παρεμπόδιση από την αιθανόλη

Η σταδιακή παραγωγή αιθανόλης από τις ζύμες μέσω της αφομοίωσης του αζώτου αναστέλλει τη δράση των ίδιων των ζυμών. Η αιθανόλη επηρεάζει τον μεταβολισμό των κυττάρων και τη μακρομοριακή βιοσύνθεση, επάγοντας την παραγωγή πρωτεϊνών θερμικού σοκ, μειώνοντας το ποσοστό του RNA και της συσσώρευσης πρωτεϊνών, ενισχύοντας τις σημειακές μεταλλάξεις, μεταβάλλοντας τον μεταβολισμό και μετουσιώνοντας τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και τα γλυκολυτικά ένζυμα και μειώνοντας τη δραστηριότητα του (Walker, 1998).

Οι κύριες θέσεις που επιδρά η αιθανόλη στους ζυμομύκητες είναι οι κυτταρικές μεμβράνες, στις υδρόφοβες και υδρόφιλες πρωτεΐνες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Συγκεκριμένα, η αιθανόλη δρα ως διαλύτης λιπιδίων των μεμβρανών και μετουσιώνει τις ενζυμικές πρωτεΐνες τους αναστέλλοντας έτσι τη δράση τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μεταφέρονται συστατικά δια μέσου της μεμβράνης προκαλώντας τη διάλυση των λιπιδίων και αλλοιώνοντας τα ενζυμικά συστήματα. Επομένως, η παρουσία της ελαττώνει και κατόπιν παρεμποδίζει την αφομοίωση αζωτούχων συστατικών (Bisson, 2001).

Η επίδραση της αιθανόλης μεταβάλλει την επικοινωνία και από και προς το κύτταρο με το περιβάλλον του μέσω των κυτταρικών μεμβρανών (Henschke & Jiranec, 1993). Η ποσότητα που είναι ικανή να σταματήσει τη ζύμωση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων, του στελέχους των ζυμών, της θερμοκρασίας και του διαθέσιμου οξυγόνου. Η παρουσία αιθανόλης τη στιγμή του εμβολιασμού επιμηκύνει το τελικό στάδιο της ζύμωσης και μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των ζυμών. Η αύξηση της θερμοκρασίας ενισχύει την ανασταλτική της δράση της αιθανόλης. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να προκληθεί σταμάτημα της αλκοολικής ζύμωσης.

Οι ανώτερες αλκοόλες είναι επίσης τοξικές. Η παρεμπόδιση που προκαλούν είναι συνάρτηση του αριθμού των ατόμων άνθρακα που περιέχουν και αυξάνει με την αύξηση της περιεκτικότητάς τους (Τσακίρης, 2014).

1.3.5.2 Παρεμπόδιση από προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού

Έρευνες σχετικά με την επίδραση των λιπαρών οξέων μικρής ανθρακικής αλυσίδας με C6, C8, και C10 επηρεάζουν τη διαπερατότητα των μεμβρανών των κυττάρων και κατά συνέπεια την ανταλλαγή ουσιών μεταξύ κυττάρου και κυτταρικού μέσου. Όταν η ζύμωση σταματήσει, τα ενζυματικά συστήματα των κυττάρων συνεχίζουν να λειτουργούν αλλά τα σάκχαρα δεν μπορούν να εισέλθουν στο κύτταρο για να τα μεταβολίσει (Larue et al., 1982; Salmon et al., 1993). επιβεβαιώνοντας ότι η έλλειψη δραστηριότητας του *S. cerevisiae* συνδέεται με την αναστολή μεταφοράς των σακχάρων μέσα στο κύτταρο του. Η ζύμωση σταματά εξαιτίας των κορεσμένων λιπαρών οξέων (εξανοικό C6, οκτανοικό C8, δεκανοικό C10) μικρής ανθρακικής αλυσίδας.

Κάποιες από τις εφαρμογές στη φυτοπροστασία της αμπέλου έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν τη ζύμωση. Ενώσεις που περιέχουν θείο και χλώριο είναι οι πιο επιβλαβείς για τις ζύμες. Πολλές φορές δυσκολίες στο τελικό στάδιο της ζύμωσης αποδίδονται στην παρουσία τέτοιων ουσιών.

Ακόμη υψηλές συγκεντρώσεις ταννινών και ανθοκυανών σε ερυθρές ποικιλίες μπορούν να αναστείλουν τη δράση των κυττάρων λόγω της επιβεβαιωμένης αντιμικροβιακής τους δράσης.

Το διοξείδιο του άνθρακα σε μεγάλες συγκεντρώσεις ασκεί παρεμποδιστική δράση. Η μικρή αύξηση της εσωτερικής πίεσης στη δεξαμενή μπορεί να μειώσει την ταχύτητα ζύμωσης, ενώ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 7 bars η ζύμωση διακόπτεται. Το διοξείδιο του άνθρακα στην κλασική οινοποίηση εκτονώνεται και απελευθερώνεται άμεσα οπότε και δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα ζύμωσης.

Επιπλέον στα αρχικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης η παρουσία γαλακτικών βακτηρίων ή *Botrytis cinerea* οδηγούν σε προβληματική ζύμωση.

Η συγκέντρωση οξικού οξέος που φτάνει τα 0,5 g/L παρεμποδίζει σημαντικά την αλκοολική ζύμωση. Οξικό οξύ μπορεί να περιέχει το γλεύκος πριν από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Η περιεκτικότητα σε οξικό οξύ είναι αυξημένη προς το τέλος της ζύμωσης και στη συνέχεια μεταβολίζεται σε άλλα προϊόντα (Τσακίρης, 2014).

1.3.5.3 Φυσικοχημικοί παράγοντες

Θερμοκρασία

Στην ερυθρή οινοποίηση θερμοκρασίες μεταξύ 25 - 30°C διασφαλίζουν την αποτελεσματική εκχύλιση φαινολικών ουσιών από τους φλοιούς και τα γίγαρτα κατά τη

διάρκεια της ζύμωσης. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις απαιτείται ψύξη. Στη λευκή οινοποίηση η θερμοκρασία ζύμωσης δεν θα πρέπει να ξεπερνά τους 20°C για να μπορούν να διατηρούνται τα επιθυμητά αρώματα. Η θερμοκρασία έχει άμεση επίδραση στην ανάπτυξη των ζυμών και στην κινητική ζύμωσης (Fleet & Heard, 1992). καθώς και στη διάρκεια ζύμωσης (πίνακας 1). Ακόμη επηρεάζει την αναπνοή ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες η απόδοση σε αλκοόλ είναι μειωμένη. Επιπλέον λιπαρά οξέα, ανώτερες αλκοόλες και οι εστέρες τους παράγονται γρηγορότερα στους 20°C.

Πίνακας 1 Επίδραση διαφορετικών θερμοκρασιών ζύμωσης οίνου στη διάρκεια ζύμωσης και στα υπολοιπούμενα σάκχαρα (Larue et al., 1987).

Fermentation temperature	Duration of fermentation (days)	Residual sugar concentration at end of fermentation (g/l)
12°C	93	<2
12°C, transferred at 19°C after transformation of 40 g sugar/l.	56	27
19°C	50	<2
19°C, transferred at 12°C after transformation of 40 g sugar/l	21	108

Initial sugar concentration: 220 g/l.

Το οξυγόνο

Απουσία οξυγόνου είναι αδύνατο να υπάρξει πολλαπλασιασμός των ζυμών και να ολοκληρωθεί η ζύμωση (Ribéreau-Gayon et al., 1951). Επιπροσθέτως το οξυγόνο έχει ένα μη αμελητέο αντίκτυπο στην κινητική ζύμωσης του οίνου. Η προσθήκη του είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος που διαθέτει ο οινολόγος για να ελέγξει τη ζύμωση. Στη λευκή οινοποίηση τα αρώματα που παράγονται στην αρχή της ζύμωσης από πρόδρομες αρωματικές ενώσεις είναι ευαίσθητα στην οξειδωση, ενώ εκείνα που παράγονται μετέπειτα στη ζύμωση επηρεάζονται λιγότερο από το οξυγόνο. Ο αερισμός εντείνει την ταχύτητα ζύμωσης και κατά συνέπεια αυξάνει την ανάγκη σε άζωτο. Επιπλέον συμμετέχει στη σύνθεση στερολών και ακόρεστων λιπαρών οξέων βελτιώνοντας τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών (Ribéreau-Gayon et al., 1951). Η δράση του οξυγόνου στην κινητική ζύμωσης αυξάνει με την αύξηση της προστιθέμενης ποσότητας

του στο γλεύκος. Ακόμη σημαντικός είναι και ο χρόνος στον οποίο γίνεται η προσθήκη. Η καταλληλότερη προσθήκη γίνεται τη δεύτερη μέρα της ζύμωσης κατά τη φάση ανάπτυξης όπου τα κύτταρα των ζυμών πολλαπλασιάζονται. Σε αυτή την περίπτωση η ζύμωση έχει τον ίδιο ρυθμό με την περίπτωση που το γλεύκος θα ήταν μόνιμα εκτεθειμένο στο οξυγόνο και η μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη γίνεται με την ίδια ταχύτητα.

Συγκέντρωση υδρογονοϊόντων (pH)

Η συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου επηρεάζει σημαντικά τη ζύμωση των οίνων. Έχει σημαντική επίδραση στον έλεγχο της βακτηριακής μόλυνσης, καθώς και στην ανάπτυξη ζύμης, στα ποσοστά ζύμωσης και στον σχηματισμό παραπροϊόντων (Wayman and Parekh, 1990). Οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν σε pH που κυμαίνεται από 2 έως 7. Το βέλτιστο pH είναι μεταξύ 4-5 (5 είναι το pH στο εσωτερικό του κυττάρου). Σε υψηλό pH, όπως και σε μικρότερο του 3, ευνοείται η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση (Τσακίρης, 2014).

Συνδυασμός θερμοκρασίας και pH

Ο ορθός συνδυασμός της θερμοκρασίας ζύμωσης και του pH του γλεύκους επιδρά άμεσα στην ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, αλλά και στην ποιότητα του παραγόμενου οίνου. Σύμφωνα με τον Soufleros, 1978, ο συνδυασμός θερμοκρασίας 20°C και pH 3.4 αυξάνουν τις ανώτερες αλκοόλες κατά 35% και τους ανώτερους εστέρες κατά 100%, σε σχέση με το συνδυασμό θερμοκρασίας 30°C και pH 2.9 (Ribéreau-Gayon et al, 2006).

1.3.5.4 Εξωγενής παρεμπόδιση

Ο θειώδης ανυδρίτης είναι ευρέως διαδεδομένος για την αντιμικροβιακή του δράση. Η δράση του δεν είναι ακαριαία στη ζύμωση. Αρχικά η ζύμωση μοιάζει να έχει παρεμποδιστεί αλλά εξακολουθεί να πραγματοποιεί μία βραδεία γλυκόλυση.

Το σορβικό οξύ, το σαλικυλικό οξύ και τα άλατά του, το βενζοϊκό οξύ, τα φυτοφάρμακα, τα παράγωγα του θείου και του φωσφόρου δρούν παρεμποδιστικά στη ζύμωση. Η υπερβολική διαύγαση του γλεύκους είναι ικανή να προκαλέσει αιτία καθυστέρησης της ζύμωσης λόγω ελάττωσης του μικροβιακού φορτίου του γλεύκους. Η ελαφρά διαύγαση με καθίζηση των μεγάλων σωματιδίων του γλεύκους επιτρέπει την καλύτερη θρέψη των κυττάρων (Ribéreau-Gayon, 1985; Bisson, 2000).

1.3.6 Επιλογή ζυμών

1.3.6.1 Αναγκαιότητα επιλογής ζυμών

Η ποιότητα και τα χαρακτηριστικά του οίνου επηρεάζονται σημαντικά από τις ζύμες που θα επιλεγούν να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της ζύμωσης. Κάθε στέλεχος έχει διαφορετικό μεταβολικό μονοπάτι και παράγει σε διαφορετικές συγκεντρώσεις δευτερογενείς μεταβολίτες.

Τα διαφορετικά είδη και στελέχη ζυμών που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης, επηρεάζουν και καθορίζουν τα είδη και τις συγκεντρώσεις πολλών παραγόμενων προϊόντων που συμβάλλουν στο άρωμα και τη γεύση του κρασιού. Η γεύση του κρασιού θα μπορούσε, με την ευρύτερη έννοια του όρου, να θεωρηθεί ως η συνολική αισθητική εντύπωση τόσο του αρώματος όσο και των γευστικών ενώσεων και συνεπώς μπορεί να ενσωματώσει τις πιο μετρήσιμες πλευρές της οξύτητας, της γλυκύτητας, του αλκοολικού τίτλου, του διοξειδίου του άνθρακα, της στυπτικότητας και της πικράδας (Robinson, 1994).

Ο οργανοληπτικός χαρακτήρας του οίνου ταξινομείται ανάλογα με τις πηγές των διαφόρων ενώσεων που συμβάλλουν σε αυτόν. Περιλαμβάνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας (ενώσεις που προέρχονται από τα σταφύλια), προζυμωτική γεύση (ενώσεις που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης και συσκευασίας γλεύκους), ζύμωσης (που παράγεται από ζύμη και βακτήρια κατά τη διάρκεια αλκοολικής και μηλολακτικής ζύμωσης) και μεταζυμωτικό. Εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παλαίωσης με ενζυματικές ή φυσικοχημικές δράσεις στο ξύλο ή στη φιάλη) (Schreier, 1979; Boulton et al., 1995).

Ο μεταβολισμός των σακχάρων και των αμινοξέων του γλεύκους σε αιθανόλη επηρεάζει ουσίες, όπως οργανικά οξέα, γλυκερόλη, ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, αλδεϋδες, κετόνες, αμίνες και το πτητικό θείο. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως η κύρια αντίδραση κατά την οποία οι ζύμες επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά του οίνου (Larnbrechts et al., 2000). Σε πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των μεταβολιτών αυτών για διάφορα στελέχη του *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces*. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των ειδών της ζύμης και των στελεχών τους είναι τόσο εκτεταμένες, έτσι ώστε να είναι απαραίτητος ο έλεγχος για να επιλεχθούν εκείνα με τα αποδεκτά χαρακτηριστικά (π.χ. αυξημένη παραγωγή γλυκερόλης) και να απορριφθούν εκείνα με τα μη αποδεκτά (π.χ. υπερπαραγωγή του οξικού οξέος ή υδρόθειου). Με αυτή τη λογική, είδη ζυμών όπως *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Kluveromyces* και άλλα γένη έχουν τη δυνατότητα να συνεισφέρουν επιπλέον στην ποικιλομορφία της γεύσης και την πολυπλοκότητα του αρώματος των οίνων.

Η αυθόρμητη ζύμωση αποτελεί ακόμη παράδοση σε ορισμένες περιοχές που θέλουν να αναδείξουν τα ιδιαίτερα τους χαρακτηριστικά.

Παράλληλα αυξάνεται ο κίνδυνος αργών έως και σταματημένων ζυμώσεων και το αποτέλεσμα δεν είναι πάντα το αναμενόμενο. Η έλλειψη προβλεψιμότητας και επαναληψιμότητας έχουν οδηγήσει τους περισσότερους οινοπαραγωγούς στον εμβολιασμό με επιλεγμένα στελέχη.

Ακόμα και στα επιλεγμένα στελέχη το τελικό αποτέλεσμα τόσο το χημικό όσο και το οργανοληπτικό ποικίλει. Η γενικευμένη και καθολική χρήση εμπορικών καλλιιεργειών ζυμομυκήτων οδηγεί σε οίνους με παρόμοιο αναλυτικό και οργανοληπτικό προφίλ.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάδειξης της πρωτοτυπίας, της ιδιαιτερότητας και τέλος την αποτύπωση του χαρακτήρα και την πολυπλοκότητα της περιοχής .

Ωστόσο, οι αυθόρμητες ζυμώσεις συνήθως παρατείνονται σε διάρκεια και το αποτέλεσμα είναι εξαιρετικά απρόβλεπτο. Ως εκ τούτου, οι αυθόρμητες ζυμώσεις χρησιμοποιούνται μόνο σε μερικά οινοποιεία που εξαρτώνται περισσότερο από τη μεταβλητότητα των καλλιιεργειών και τα οποία είναι πρόθυμα να δεχτούν αυτούς τους κινδύνους για να επιτύχουν ξεχωριστά στυλ κρασιών που αντικατοπτρίζουν την ποικιλομορφία των ζυμών της συγκεκριμένης περιοχής.

Στα σύγχρονα, μεγάλης κλίμακας οινοποιεία, όπου οι ταχείες και αξιόπιστες ζυμώσεις είναι απαραίτητες για τη συνεπή γεύση και την προβλέψιμη ποιότητα του κρασιού, χρησιμοποιούνται ειδικά επιλεγμένα στελέχη καλλιέργειας *S. cerevisiae*, με γνωστές ιδιότητες. Εκτός από την πρωταρχική λειτουργία αυτών των ενεργών στελεχών να καταλύουν ταχεία, αποτελεσματικά και πλήρως τη μετατροπή των σακχάρων του σταφυλιού (γλυκόζη και φρουκτόζη) σε αλκοόλ χωρίς ανάπτυξη αρωμάτων αλλοίωσης, οι σημερινοί πρωτοπόροι οινοπαραγωγοί απαιτούν στελέχη αρχικής καλλιέργειας με μια ολόκληρη σειρά εξειδικευμένων ιδιοτήτων που θα μπορούν να προσθέσουν αξία στο τελικό προϊόν. Αυτή η αναζήτηση για στελέχη ζυμομυκήτων που βελτιστοποιούνται για συγκεκριμένες ιδιότητες που έχουν θέσει οι οινοποιοί, οδήγησαν στην αναπαραγωγή ζύμης και στη γενετική μηχανική (Pretorius, 2000).

Το κάθε στέλεχος επιλέγεται ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα τελικού προϊόντος.

Υπάρχει ένα εύρος επιλογών, που περιλαμβάνει:

- Φυσικές ζύμες από την επιφάνεια του σταφυλιού (μερικές φορές αναφέρονται ως «μη εμβολιασμένες» ή «άγριες» ζύμες).
- Μια αρχική καλλιέργεια όπου ένα μέρος μιας ενεργής ζύμωσης, ζυμώνει με υψηλό αριθμό κυττάρων που προστίθεται στο γλεύκος.
- Εμβολιασμός με επιλεγμένη (ενεργή) ξηρή ζύμη μετά από ενυδάτωση.
- Συνδυασμός επιλεγμένων και φυσικών ζυμών.

Κατανοώντας τον τρόπο με τον οποίο οι ζύμες επηρεάζουν τις βασικές ιδιότητες του αρώματος του οίνου, τη γεύση και το χρώμα, δημιουργείται μία βάση για την επιλογή των στελεχών που θα αποτελέσουν τις καλλιέργειες εκκίνησης και διαχείρισης της αλκοολικής ζύμωσης. Τέτοιοι μηχανισμοί τώρα εκτείνονται πέρα από τον γλυκολυτικό μεταβολισμό των σακχάρων του γλεύκους και σε γενικές γραμμές θεωρούνται οι εξής:

1. Μεταβολισμός των σακχάρων και του αζώτου του γλεύκους.
2. Η ενζυματική υδρόλυση των συστατικών των σταφυλιών και πως μπορούν να επηρεάσουν το άρωμα, το χρώμα και τη διαύγεια του οίνου.
3. Η αυτόλυση των απενεργοποιημένων κυττάρων .
4. Η βιοπροσρόφιση.

1.3.6.2 Γηγενή και εμπορικά στελέχη ζυμομυκήτων

Οι ζύμες που βρίσκονται στο γλεύκος/χυμό των σταφυλιών, κατηγοριοποιούνται ως ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και *non-Saccharomyces cerevisiae*. Επί του παρόντος, υπάρχουν περισσότερα από 300 στελέχη ζυμών που διατίθενται στην αγορά έχοντας απομονωθεί εδώ και δεκαετίες από οινοποιεία διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών σε όλο τον κόσμο (Richter et al., 2013). Οι *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιούνται συνήθως ως εμπορικά στελέχη κρασιού, λόγω της αξιόπιστης ισχυρής κινητικής ζύμωσής τους, Ωστόσο, υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο κάποια στελέχη ζύμης που δεν είναι *Saccharomyces cerevisiae*. Τα στελέχη άγριας ζύμης είναι πανταχού παρόντα στη φύση και βρίσκονται στα οινοποιήσιμα σταφύλια. Αυτά μεταφέρονται από τον αμπελώνα στο οινοποιείο και βρίσκονται στο γλεύκος. Για χρόνια, οι επιστήμονες πίστευαν ότι το *S. cerevisiae* βρισκόταν αρχικά σε φρούτα ή περιβάλλοντα που σχετίζονται με τη ζύμωση. Ωστόσο, οι μελέτες έχουν αποδείξει ότι είναι ευρέως διαδεδομένος έχοντας απομονωθεί από σφήκες, μύγες, βελανιδιές και τα σχετικά υποστρώματα τους, όπως φλοιός, έδαφος και άνθη (Alsammar and Delneri, 2020; Pontes et al., 2020). Με αυτόν τον τρόπο, ο *S. cerevisiae*, όντας σε θέση να επιβιώσει ακόμα και σε χαμηλή συγκέντρωση σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλόντων δεν περιορίζεται στην προσαρμοστικότητα απαραίτητα σε μια συγκεκριμένη θέση (Goddard and Greig, 2015). Πρόσφατες γονιδιωματικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένου μεγάλου αριθμού άγριων απομονώσεων, έδειξαν ότι η δομή του πληθυσμού του *S. cerevisiae* είναι πιο περίπλοκη

από ό,τι έχει αναφερθεί προηγουμένως (Liti et al., 2006; Legras et al., 2007), με άφθονη γονιδιωματική και φαινομενική ποικιλότητα. (Liti et al., 2009 ; Warringer et al., 2011 ; Bergström et al., 2014 ; Legras et al., 2018 ; Peter et al., 2018). Αυτές οι μελέτες έχουν περιγράψει περισσότερες από 20 ανεξάρτητες γενεαλογίες στο είδος, όπου 13 αντιστοιχούν σε άγριες ή μη ταυτοποιημένες γενεαλογίες (Duan et al., 2018; Peter et al., 2018; Pontes et al., 2020). Συνολικά, τα άγρια στελέχη εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα ετεροζυγωτίας, ποικιλομορφία αλληλουχιών, χαμηλότερα επίπεδα διπλασιασμού γονιδίων, χαμηλότερα συμβάντα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (HGT) και χαμηλότερη διακύμανση του περιεχομένου του γονιδιώματος (Peter et al., 2018). Επιπλέον, τα άγρια στελέχη είναι γενικά διπλοειδή και η ποικιλομορφία τους εξαρτάται από τα SNPs παρά από τις γονιδιωματικές αναδιατάξεις (Peter et al., 2018). Τα άγρια *S. cerevisiae* διαχωρίζονται γενετικά και φαινοτυπικά από τα βιομηχανικά στελέχη *S. cerevisiae*, κυρίως λόγω του αποτελέσματος της ανθρώπινης επιλογής (Duan et al., 2018; Peter et al., 2018; Pontes et al. , 2020). Γενικά, τα εμπορικά στελέχη παράγουν σχετικά χαμηλά επίπεδα εξωκυτταρικών αρωματικών ενώσεων (όπως βενζοϊκό, 4-αμινοβενζοϊκό και νικοτινικό) και έχουν χαμηλά επίπεδα σπορίωσης, αλλά παρουσιάζουν υψηλή αντοχή σε αιθανόλη και χαμηλό pH (Duan et al., 2018). Αντίθετα, τα άγρια στελέχη έχουν σχετικά υψηλά εξωκυτταρικά επίπεδα διαφορετικών δευτερογενών μεταβολιτών (όπως ο οξικός ισοαμυλεστέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας), υψηλή βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και υψηλότερη ροή ενέργειας προς τον κύκλο TCA. Αυτά τα χαρακτηριστικά μεταφράζονται άμεσα σε μεγαλύτερη παραγωγή λιπαρών οξέων, τα οποία συνδέονται με μια πιο ισχυρή απόκριση σε διαφορετικές καταπονήσεις, όπως υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και αιθανόλης, υψηλές θερμοκρασίες και οξειδωτικό στρες. Ως εκ τούτου, τα άγρια στελέχη τείνουν να παρουσιάζουν υψηλότερα εύρη αντοχής σε πολλαπλές συνθήκες και, κατά συνέπεια, προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες για χρήση σε ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών εφαρμογών (Kang et al., 2019). Επιπλέον, τα βιομηχανικά στελέχη εμφανίζουν επιλεκτική συμπεριφορά με γρήγορο ρυθμό κατανάλωσης γλυκόζης, μεγάλο μέγεθος κυττάρου και αποθήκευση θρεπτικών ουσιών μέσα στο κύτταρο. Αντίθετα, τα άγρια στελέχη εμφανίζουν συνεργατική συμπεριφορά και εκκρίνουν δευτερογενείς μεταβολίτες δρώντας τοξικά σε ανταγωνιστές (Spor et al., 2009). Αυτή η συμπεριφορά μπορεί να είναι πλεονεκτική κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Για παράδειγμα, τα άγρια στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί από άνθη και πηγές πλούσιες σε σάκχαρα μπορεί να παράγουν ένα διαφορετικό σύνολο πτητικών ενώσεων, διευρύνοντας το μπουκέτο των αρωμάτων και των γεύσεων στην αλκοολική ζύμωση (Pontes et al., 2020). Υπό αυτή την έννοια, οι ζυμώσεις στον οίνο χρησιμοποιώντας γηγενή άγρια στελέχη που λαμβάνονται από βελανιδιές παράγουν γήινα και θειούχα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και

ταυτόχρονα υψηλά επίπεδα εσπεριδοειδών και ανθέων (Hyma et al., 2011). Ωστόσο, τα γηγενή στελέχη που απομονώνονται από αμπελώνες, σταφύλια και έδαφος εμφανίζουν εξαιρετικές ιδιότητες ζύμωσης, αντίθετα τα άγρια στελέχη από φλοιούς βελανιδιάς δεν ολοκληρώνουν τη ζύμωση (Camarasa et al., 2011). Ως εκ τούτου, για την άμεση χρήση άγριων στελεχών απαιτούνται στρατηγικές για τη βελτίωσή τους.

1.3.6.3 Πηγές νέων ζυμών

Οι οινοπαραγωγοί αντιμετωπίζουν έναν εντεινόμενο ανταγωνισμό που προκαλείται από τη διεύρυνση του χάσματος ανάμεσα στην παραγωγή και την κατανάλωση κρασιού, την αλλαγή των προτιμήσεων των καταναλωτών από τον οίνο βασικής ποιότητας σε οίνο υψηλής ποιότητας και φυσικά την οικονομική παγκοσμιοποίηση. Η διαδικασία μετασχηματισμού της αμπελοοινικής βιομηχανίας από μια βιομηχανία παραγωγής σε μια βιομηχανία με προσανατολισμό στην αγορά, έχει ως αποτέλεσμα την αυξανόμενη εξάρτηση, μεταξύ άλλων, από τη βιοτεχνολογική καινοτομία. (Pretorius et al., 2002).

Με τη σωστή προσέγγιση, τα αποτελέσματα των βιοτεχνολογικών καινοτομιών μπορούν να εναρμονιστούν ουσιαστικά με ένα σύνολο εμπορικών, πολιτιστικών, κοινωνικών, περιβαλλοντικών και τεχνικών παραγόντων, χωρίς να καταργηθεί η αρχαία τέχνη της οινοποίησης.

Παρά το σημερινό σκεπτικισμό ορισμένων ομάδων καταναλωτών σχετικά με τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς και προϊόντα (οι αποκαλούμενοι GMO και GM products), δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η εφαρμογή της κορυφαίας τεχνολογίας γονιδίων στη βιομηχανία οίνου παρέχει πολλές δυνατότητες βελτίωσης.

Προκειμένου να υπάρξει τεχνολογική ισορροπία με την τεράστια πρόκληση που αντιμετωπίζουν οι καταναλωτές, οι παγκόσμιες βιομηχανίες οίνου στον κόσμο, όλο και περισσότερο, επικεντρώνονται στον γενετικό προγραμματισμό και τη βελτίωση των δύο κύριων οργανισμών που συμμετέχουν στην παραγωγή οίνου, δηλαδή της αμπέλου και των ζυμομυκήτων. Οι ζύμες κυριαρχούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του οίνου. Σε αυθόρμητες ζυμώσεις, υπάρχει ένα προοδευτικό μοντέλο ανάπτυξης των γηγενών ζυμών που προέρχονται από τις επιφάνειες των σταφυλιών και τον εξοπλισμό του οινοποιείου.

Πέρα όμως από τις γενετικά τροποποιημένες ζύμες, η βιομηχανία του οίνου του μέλλοντος πρέπει να στραφεί και πέρα από τα είδη του *Saccharomyces*, όπως επίσης και πέρα από το σταφύλι σαν φρούτο για την απομόνωση οινοποιητικών ζυμών. Σε άλλα φρούτα ή φυτικά υλικά μπορεί να υπάρχουν νέα είδη ζυμομυκήτων που μπορούν να καλύψουν τις ανάγκες της ζύμωσης κατά τη διαδικασία παραγωγής οίνου.

1.3.6.4 Απομόνωση και ταυτοποίηση ζυμών

Απομόνωση ζυμών από οινολογικό περιβάλλον

Ο εμβολιασμός δειγμάτων από διάφορες πηγές όπως το σταφύλι, τον οίνο, τον εξοπλισμό οινοποιείου είναι η συνηθέστερη μέθοδος απομόνωσης ζυμών και έπειτα γίνεται επώαση σε αποστειρωμένα τρυβλία με στερεά θρεπτικά υποστρώματα. Οι επικρατέστερες μέθοδοι είναι τόσο η τεχνική της ενσωμάτωσης όσο και της επίστρωσης (King et al., 1986).

Ως υποστρώματα επώασης χρησιμοποιούνται κυρίως μη εκλεκτικά υλικά όπως τα: Malt extract agar, Yeast Extract Glucose Peptone agar, Grape juice agar (Lafon-Lafourcade & Joyeux, 1979; Fleet et al., 1984; Mora et al., 1990).

Σε δείγματα τα οποία περιέχονται μικτοί πληθυσμοί ζυμών σε διαφορετικές αναλογίες, στα τρυβλία κυριαρχούν αποικίες των επικρατέστερων ειδών παρεμποδίζοντας την παρατήρηση των ειδών που διαβιούν σε μικρούς πληθυσμούς.

Στην αυτή την περίπτωση είναι απαραίτητη η χρήση παρεμποδιστικών θρεπτικών υλικών που επιλεκτικά εμποδίζουν την ανάπτυξη των κυρίαρχων ειδών επιτρέποντας όμως την ταυτόχρονη ανάπτυξη άλλων ειδών σε μικρότερους πληθυσμούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το Lysine agar που χρησιμοποιείται για απομόνωση *non-Saccharomyces* ειδών καθώς η λυσίνη δεν χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα από είδη *Saccharomyces* (Heard & Fleet, 1986; Martinez et al., 1989; Mora & Mulet, 1991). Επιπλέον, η χρήση 12% αιθανόλης και 0,015% μεταδιθειώδους σε θρεπτικό υλικό, εφαρμόζεται για την απομόνωση ειδών *Saccharomyces*, κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, λειτουργώντας ανασταλτικά στην ανάπτυξη ειδών *non-Saccharomyces* (Kish et al., 1983).

Στη συνέχεια θα αναλυθεί η διαδικασία απομόνωσης άγριας ζύμης από έναν αμπελώνα (εικόνα 5): (Tannenbaum, 2019).

1. Συλλογή δειγμάτων

Αρκετά δείγματα, όπως ράγες σταφυλιού, φλοιός κορμού, άνθη, φύλλα ή έδαφος θα πρέπει να εξαχθούν από την τοποθεσία του αμπελώνα και να εισαχθούν χωριστά σε μεμονωμένους πλαστικούς σωλήνες και να κλείσουν. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους 4 βαθμούς Κελσίου.

2. Ζύμωση των δειγμάτων

Στη συνέχεια, στους πλαστικούς σωλήνες εισάγεται θρεπτικό μέσο σε υγρή μορφή, διασφαλίζοντας ότι τα αντίστοιχα δείγματα από τον αμπελώνα είναι πλήρως βυθισμένα. Η έναρξη της ζύμωσης θα γίνει μετά από μερικές ημέρες.

3. Καλλιέργεια κυττάρων σε τρυβλία με μέσο ανάπτυξης

Κύρια σειρά:

Μετά την επιβράδυνση της ζύμωσης, οι σωλήνες πρέπει να ανακινηθούν. Χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο μέσο αφαιρείται μια σταγόνα υγρού από το σωλήνα που πραγματοποιείται η ζύμωση και τοποθετείται στην πλάκα του μέσου ανάπτυξης. Η σταγόνα του υγρού που εξάγεται από το σωλήνα σύρεται ελαφρά με μια μακρά κίνηση σάρωσης εμπρός-πίσω κατά μήκος της επιφάνειας της πλάκας του μέσου ανάπτυξης, έως ότου η μισή επιφάνεια του μέσου ανάπτυξης να έχει ραβδώσεις. Αυτό θα δημιουργήσει συμπαγείς γραμμές ζιγκ-ζαγκ στο μισό της πλάκας του μέσου ανάπτυξης.

Δευτερεύουσα σειρά:

Ο σκοπός της δευτερεύουσας σειράς είναι να διασκορπίσει και να αραιώσει τα κύτταρα σε όλη την επιφάνεια του μέσου ανάπτυξης. Αυτή η τεχνική θα διευκολύνει τον διαχωρισμό και την ανάπτυξη ανεξάρτητων αποικιών κυττάρων στο μέσο ανάπτυξης, με στόχο την απομόνωση και τη συλλογή μιας καθαρής καλλιέργειας ζύμης.

Με ένα αποστειρωμένο μέσο απλώνονται τα κύτταρα εκ νέου στον εναπομείναν κενό χώρο του μέσου ανάπτυξης δημιουργώντας συμπαγείς γραμμές ζιγκ ζαγκ. Θα πρέπει να μην επικαλύπτονται με τις κύριες γραμμές. Το βήμα σχηματισμού ραβδώσεων έχει ολοκληρωθεί όταν η σταγόνα υγρού έχει απλωθεί σωστά στην επιφάνεια της πλάκας του μέσου ανάπτυξης. Στη συνέχεια το τρυβλίο με την καλλιέργεια καλύπτεται προς αποφυγή επιμολύνσεων και αποθηκεύεται με το κάλυμμα της πλάκας του μέσου ανάπτυξης στραμμένο προς τα κάτω, για τη μείωση της εξάτμισης του μέσου ανάπτυξης.

Όταν απομονωθεί μια ενιαία αποικία ζύμης επαναλαμβάνεται η διαδικασία σχηματισμού ραβδώσεων.

Μετά από μερικές ημέρες, η κυτταρική ανάπτυξη θα πρέπει να είναι ορατή στην πλάκα του μέσου ανάπτυξης. Είναι πιθανό αυτή τη στιγμή να υπάρχουν πολλές διαφορετικές αποικίες ζυμών, βακτηρίων ή μούχλας στην πλάκα του μέσου ανάπτυξης. Η κύρια ιδέα σε αυτό το σημείο της διαδικασίας είναι η συγκομιδή και ο διαχωρισμός μιας καθαρής αποικίας ζύμης από την πλάκα του μέσου ανάπτυξης, απομονώνοντας έτσι αποτελεσματικά μια καθαρή καλλιέργεια ζύμης μακριά από ανεπιθύμητους

μικροοργανισμούς όπως βακτήρια ή μούχλα. Χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο μέσο, συλλέγεται αυτό που φαινομενικά είναι μια απομονωμένη αποικία ζυμομύκητα και ξαναστρώνεται σε μια νέα πλάκα αποστειρωμένου μέσου ανάπτυξης, για να την απόκτηση μιας καθαρής καλλιέργειας ζύμης.

5. Μικροσκοπία

Χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο μέσο, συλλέγεται μια αποικία ζύμης από το μέσο ανάπτυξης και αναλύεται χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο για να επιβεβαιωθεί ότι είναι κύτταρο ζύμης. Το κύτταρο ζυμομύκητα συλλέγεται και τοποθετείται σε γυάλινη πλάκα που περιέχει μία σταγόνα απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μια γυάλινη καλυπτρίδα τοποθετείται πάνω από το δείγμα σταγόνας, για να αιωρηθεί ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες. Η γυάλινη πλάκα τοποθετείται στη συνέχεια στο μικροσκόπιο για προβολή. Η μεγέθυνση 40x είναι συνήθως κατάλληλη.

6. Καλλιέργεια ζύμης εκκίνησης

Αφού η ανάλυση μικροσκοπίας επιβεβαιώσει ότι ο οργανισμός είναι ζυμομύκητας, θα πρέπει να αναπτυχθεί μια καλλιέργεια εκκίνησης. Χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο μέσο, εξάγεται μια μεμονωμένη αποικία ζύμης από το καθαρό μέσο ανάπτυξης καλλιέργειας και εισάγεται σε ένα παστεριωμένο οργανικό μέσο χυμού σταφυλιού χωρίς θειώδη. Αυτό το βήμα επιτρέπει την ανάπτυξη του επιλεγμένου καθαρού στελέχους ζυμομύκητα και δημιουργεί την καλλιέργεια εκκίνησης.

7. Πρότυπη δοκιμαστική Ζύμωση

Μόλις η καλλιέργεια εκκίνησης ζυμομύκητα αρχίσει να δημιουργεί κυτταρική βιομάζα και να ζυμώνει, το επόμενο βήμα σε αυτή τη διαδικασία είναι ο εμβολιασμός σε ένα πρότυπο γλεύκος, με την καθαρή αρχική καλλιέργεια ζύμης. Η εκτέλεση δοκιμαστικών ζυμώσεων είναι πολύ σημαντική έτσι ώστε να προσδιοριστεί η καταλληλότητα του επιλεγμένου στελέχους ζύμης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι πολλά στελέχη ζύμης που δεν είναι *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να παράγουν δυσάρεστες οσμές ή να συμβάλλουν σε μη επιθυμητή κινητική ζύμωσης, λόγω της χαμηλής αντοχής τους σε αιθανόλη. Ο σκοπός των δοκιμών είναι να διερευνηθεί και να προσδιοριστεί εάν το επιλεγμένο στέλεχος ζύμης μπορεί να παράγει ένα μοναδικό, υψηλής ποιότητας οίνο, ο οποίος περιέχει ενδιαφέροντα αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά. Μια άλλη επιλογή πρώτης δοκιμής είναι ο συν-εμβολιασμός μιας μικρής ποσότητας *Saccharomyces cerevisiae* που διατίθεται στο εμπόριο με την καλλιέργεια εκκίνησης άγριας ζύμης. Αυτό θα επιτρέψει στο άγριο στέλεχος να αναπτύξει ένα μοναδικό προφίλ

αρώματος και γεύσης στην αρχή της ζύμωσης, ενώ το εμπορικό στέλεχος που προστίθεται θα ολοκληρώσει τη ζύμωση.

8. Αξιολόγηση της πρότυπης Ζύμωσης

Η αξιολόγηση της πρότυπης ζύμωσης και ο προσδιορισμός καταλληλότητας του επιλεγμένου στελέχους ζύμης με βάση τις κινητικές ζύμωσης και τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

9. Ταυτοποίηση στελέχους ζύμης

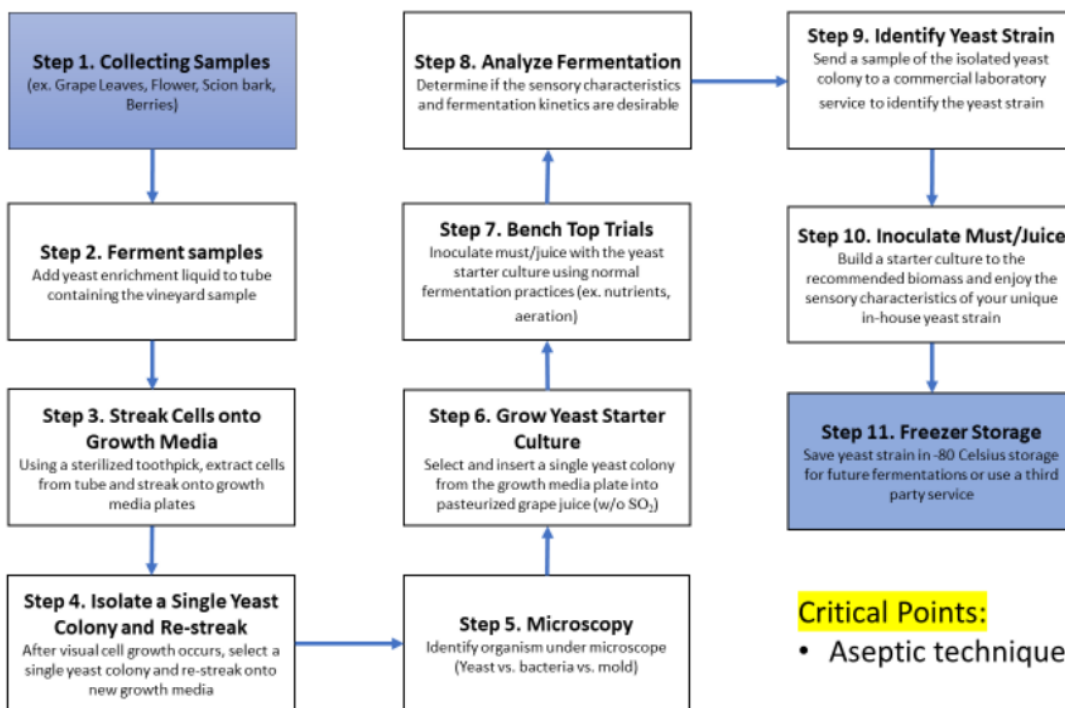
Εάν οι δοκιμαστικές ζυμώσεις ήταν επιτυχείς και το στέλεχος ζυμομύκητα διαπιστωθεί ότι διαθέτει επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και κινητικές ζύμωσης, η καθαρή αποικία ζύμης θα πρέπει να συλλέγεται από την πλάκα του μέσου ανάπτυξης και να αποστέλλεται για ταυτοποίηση του γένους και του είδους της απομονωμένου στελέχους.

10. Εμβολιασμός σε γλεύκος

Δημιουργώντας μία καλλιέργεια εκκίνησης από το απομονωμένο καθαρό στέλεχος ζύμης στη συνιστώμενη κυτταρική βιομάζα με αρχική συγκέντρωση (3×10^6) ζωντανών κυττάρων ανά ml γλεύκους εμβολιάζεται μια επιλεγμένη παρτίδα γλεύκους και η ζύμωση παρακολουθείται σύμφωνα με τα πρωτόκολλα οινοποίησης.

11. Αποθήκευση

Μόλις το γένος και το είδος του απομονωμένου στελέχους επιλεγεί μπορεί να σταλεί σε τράπεζα στελεχών όπου θα αποθηκευτεί στους -80 βαθμούς Κελσίου για μελλοντικές ζυμώσεις.



Εικόνα 4 Διάγραμμα ροής που απεικονίζει τη διαδικασία απομόνωσης άγριας ζύμης βήμα προς βήμα από έναν αμπελώνα (Tannenbaum, 2019).

Ταυτοποίηση ζυμών

Οι μέθοδοι ταυτοποίησης διακρίνονται σε συμβατικές που κάνουν χρήση κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών και σύγχρονες που βασίζονται στη μοριακή βιολογία.

Φαινοτυπική ανάλυση

Οι συμβατικές μέθοδοι είναι ακριβείς σε κάποιο βαθμό ως προς την ταυτοποίηση και διαφοροποίηση στελεχών, δεν απαιτούν μεγάλο κόστος εξοπλισμού, χαρακτηρίζονται από έλλειψη πολυπλοκότητας και εστιάζονται στη μελέτη φυσιολογικών, μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών. Ακόμη, η χρήση διαγνωστικών κιτ που βασίζονται στη μελέτη ανάπτυξης των ζυμών παρουσία συγκεκριμένων πηγών άνθρακα και αζώτου (API 20C, API-ATB 32C, API 50CH), διασφαλίζει αποτελέσματα ταυτοποίησης μέσα σε 48 ώρες (Lafon-Lafourcade & Joyeux, 1979; Subden et al., 1980; Ison, 1987; Lin & Fung, 1987; Deak & Beuchat, 1988; Rohm et al., 1990). Επιπλέον για μεγαλύτερη αξιοπιστία ταυτοποίησης γίνονται δοκιμές σε συνδυασμό με τα διαγνωστικά κιτ (Heard & Fleet, 1990). Τέλος για στελέχη που δεν ανήκουν σε σημαντικά είδη απαιτούνται συμπληρωματικές δοκιμές (Ramani et al., 1998). Η χρήση χρωμογόνων θρεπτικών υποστρωμάτων (εμπλουτισμένων με κάποια χρωστική) όπως το WLN agar, συμβάλλει στη διαφοροποίηση μεταξύ ειδών καθώς αλλάζει το χρώμα των

αποικιών που εμφανίζονται στην επιφάνεια του στερεοποιημένου υποστρώματος (Lawrence, 1983).

Γενοτυπική ανάλυση

Στις μέρες μας η διαφοροποίηση και ταξινόμηση των στελεχών βασίζεται σε τεχνικές της μοριακής βιολογίας αναλύοντας τον πολυμορφισμό μιτοχονδριακού/γονιδιωματικού DNA και δεν στηρίζονται στην ανάλυση προϊόντων μεταβολισμού του μικροοργανισμού όπως οι φαινοτυπικές δοκιμές.

Το γεγονός ότι οι γενετικές μέθοδοι δεν επηρεάζονται από τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων τους δίνει προβάδισμα έναντι των φαινοτυπικών καθώς οι γενετικές πληροφορίες, και κατά κανόνα το χρωμοσωμικό DNA, δεν μεταβάλλεται κατά την ανάπτυξη (Ness et al., 1993) και παράλληλα χαρακτηρίζονται από αυξημένη διακριτική ικανότητα μεταξύ συγγενών στελεχών (Zhang et al, 1996). Τα γενετικά χαρακτηριστικά προκύπτουν μέσω της ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων του κυττάρου με διάφορες τεχνικές της μοριακής βιολογίας (Vandamme et al., 1996; Olive & Bean, 1999):

- Ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλόμενου πεδίου του χρωμοσωμικού ή μιτοχονδριακού DNA (PFGE)
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και παραλλαγές της: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τυχαιοποιημένο πολλαπλασιασμό πολυμορφικού DNA (RAPD-PCR), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων περιοχών του DNA (species specific PCR), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης εκ του πολλαπλασιασμού γενετικών περιοχών ανάμεσα σε επαναλαμβανόμενο DNA (Rep-PCR), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης βασισμένη στον πολλαπλασιασμό διαγονιδιακών ενδιάμεσων ριβοσωμικών περιοχών (ITS-PCR)
- Πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων από περιοριστικό ένζυμο (RFLP), πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων από περιοριστικό ένζυμο που βασίζεται στον πολλαπλασιασμό τους (AFLP)
- Ανάλυση ποσοστού γουανίνης και κυτοσίνης στο DNA (G+C%)
- Ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing)
- Ανάλυση καρυοτύπου
- Ανάλυση μιτοχονδριακού DNA

- Πολυφασική ταξινόμηση

Μέσω της πολυφασικής ταξινόμησης, διαφορετικά φαινοτυπικά και γενοτυπικά χαρακτηριστικά μπορούν να εφαρμοστούν συνδυαστικά ώστε να πραγματοποιηθεί επιτυχώς ο διαχωρισμός αφενός μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους και αφετέρου μεταξύ ειδών που μοιάζουν από φαινοτυπική άποψη αλλά διαφέρουν αρκετά γενοτυπικά καθώς και το αντίθετο. Έχει παρατηρηθεί ότι στελέχη που προέρχονται από το ίδιο οικοσύστημα διαφέρουν φαινοτυπικά από το στέλεχος αναφοράς ενώ και μεταξύ τους παρατηρείται σημαντική παραλλακτικότητα. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν είδη που εμφανίζουν παρόμοιες ιδιότητες επειδή προσαρμόζονται σε συγκεκριμένες συνθήκες και εμφανίζουν κάποιο βαθμό παραλλακτικότητας στο γενότυπο τους καθώς αναπτύσσονται στο ίδιο περιβάλλον (Vandamme et al., 1996).

Ο καθορισμός του είδους ταξινόμησης ορίζει και την επιλογή των κατάλληλων τεχνικών. Συμπερασματικά, για την ανάλυση του γενετικού δυναμικού μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών είναι προτιμότερη η χρήση δύο διαφορετικών τεχνικών μοριακής βιολογίας και έπειτα ο φαινοτυπικός τους χαρακτηρισμός που παρέχει χρήσιμες πληροφορίες (Vandamme et al., 1996).

1.3.6.5 Κριτήρια επιλογής νέων στελεχών

Η επιλογή του στελέχους ζύμης αποτελεί από τα πιο σημαντικά κριτήρια βελτίωσης της ποιότητας του οίνου και τη διατήρηση της συνέπειας στην ποιότητα του προϊόντος. Η επιλογή του εκάστοτε στελέχους γίνεται ανάλογα με το τι θέλει να επιτευχθεί. Τα βασικά κριτήρια που απαιτούνται για την επιλογή ενός στελέχους *S. cerevisiae* για την παραγωγή οίνου διακρίνονται σε δύο κατηγορίες (Reed and Chan, 1979):

1. Πρωτεύοντα ή φυσικής κατάστασης χαρακτηριστικά, εκείνα τα οποία συνδέονται με το σχηματισμό αιθυλικής αλκοόλης με ζύμωση.
2. Δευτερεύοντα ή ποιοτικά χαρακτηριστικά, εκείνα που σχετίζονται με την παραγωγή ενώσεων που επηρεάζουν άλλες παραμέτρους, όπως το «σώμα» του κρασιού, την παραγωγή ανώτερων αλκοολών και την εμφάνιση ανεπιθύμητων αρωμάτων. Μέχρι σήμερα, καμία εμπορική οινολογική ζύμη δεν έχει όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και είναι γνωστό ότι οι ζύμες ποικίλλουν ως προς τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του παραγόμενου οίνου. Η κύρια πηγή της ποικιλομορφίας μπορεί να αποδοθεί στη γενετική σύσταση των ζυμών οίνου παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες αλκοολικής ζύμωσης είναι ελάχιστα επαναλήψιμες (Pretorius, 2000).

Τα βασικά κριτήρια για την επιλογή νέων στελεχών διακρίνονται σε εκείνα που

σχετίζονται με την πορεία της ζύμωσης, με τον αρωματικό χαρακτήρα που παράγουν, με τεχνολογικές και βιοχημικές ιδιότητες. Αναλυτικότερα:

Χαρακτηριστικά ζύμωσης

Ταχεία εκκίνηση ζύμωσης

Έχει παρατηρηθεί ότι στελέχη με εκτεταμένη διάρκεια ζύμωσης παρουσιάζουν μεγάλη πιθανότητα μη επιτυχούς ολοκλήρωσης της ζύμωσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ο παραγόμενος οίνος να είναι γλυκός και μικροβιολογικά ασταθής λόγω υψηλής συγκέντρωσης υπολειμματικών σακχάρων (Esteve-Zarzoso et al., 2000; Zilio et al., 1998).

Αποτελεσματικότητα ζύμωσης

Η αποτελεσματικότητα μετατροπής των σακχάρων του γλεύκους σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, διατηρώντας ελεγχόμενο ρυθμό ζύμωσης και αποτρέποντας τη δημιουργία ανεπιθύμητων αρωματικών ενώσεων είναι από τα σημαντικότερα κριτήρια επιλογής που ευρέως εφαρμόζονται (Henschke, 1997).

Αντοχή σε υψηλή οσμωτική πίεση

Σε γενικές γραμμές η συγκέντρωση σακχάρων του γλεύκους επηρεάζει την επιλογή στελεχών, υπεύθυνων για την αλκοολική ζύμωση (Fleet, 1993). Η αύξηση του οσμωτικού στρες, που προκαλείται από αυξημένη συγκέντρωση σακχάρων στο γλεύκος, επιμηκύνει τη φάση προσαρμογής, μειώνοντας το ρυθμό ανάπτυξης και τον πληθυσμό των ζυμών (Nishino et al., 1985) πολύ πριν η παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων αλκοόλης επιδράσει ανασταλτικά στην ανάπτυξη των ζυμών (Lafon-Lafourcade, 1983; Monk & Cowley, 1984).

Αντοχή σε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης

Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων ευθύνεται για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αλκοόλης και αποτελεί παράγοντα που οδηγεί σε πολύ αργές ή μη ολοκληρωμένες ζυμώσεις. Η επίδραση της αιθανόλης εστιάζεται στην διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών, με αποτέλεσμα τον περιορισμό πρόσληψης διαλυτών ουσιών (σάκχαρα, αμινοξέα), στη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, στην ικανότητα ζύμωσης και γενικά στη ζωτικότητα των κυττάρων (Boulton et al., 1996; Walker, 1998).

Ικανότητα ζύμωσης σε ακραίες θερμοκρασίες

Σε περιοχές με θερμό κλίμα καθώς και σε οινοποιεία χωρίς εξοπλισμό ψύξης η ικανότητα ζύμωσης σε υψηλές θερμοκρασίες (37-42°C) αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση περιστασιακές αυξήσεις της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας είναι πιθανό να οδηγήσουν σε μη ολοκληρωμένες ζυμώσεις (Regodon et al., 1997).

Αρωματικός χαρακτήρας

Παραγωγή υδρόθειου

Η παραγωγή του πτητικού υδρόθειου (H₂S) μπορεί να σχηματιστεί σε μεγάλες ποσότητες κατά τη ζύμωση του γλεύκους από τις ζύμες οινοποίησης, ως ενδιάμεσος μεταβολίτης κατά την παραγωγή αμινοξέων που περιέχουν θείο (Acree et al., 1972; Henschke & Jiranek, 1993).

Η ικανότητα παραγωγής υδρόθειου, εξαρτάται τόσο από τη γενετική προδιάθεση του στελέχους, όσο και από τη σύσταση του γλεύκους και τις συνθήκες ζύμωσης (Eschenbruch, 1974; Monk, 1986).

Παραγωγή πτητικής οξύτητας

Το οξικό οξύ αποτελεί το 90- 95% της πτητικής οξύτητας συνεπώς αποτελεί κριτήριο ποιότητας του οίνου (Henschke and Jiranek, 1993). Παράγεται κατά κύριο λόγο από βακτηριακές προσβολές, κακούς χειρισμούς κατά την οινοποίηση, κακή ποιότητα πρώτης ύλης, είτε κακή διατήρηση αλλά και σε μικρό ποσοστό από τις ζύμες. Η ζύμη *S. cerevisiae* παράγει κατά την αλκοολική ζύμωση συνήθως πολύ μικρές ποσότητες οξικού οξέος (100-300 mg/L). Σε ποσοστό μεγαλύτερο από 0,9 g/L ο οίνος είναι υποβαθμισμένος οργανοληπτικά με χαρακτηριστική γεύση ξυδιού και δυσάρεστη οσμή (Corison et al. 1979). Η εξέλιξη της πτητικής οξύτητα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης περνάει από ένα μέγιστο που συμπίπτει με την κατανάλωση της μισής σχεδόν ποσότητας σακχάρων και στη συνέχεια ελαττώνεται μετατρέπόμενο σε άλλα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού. Μία μικρή αύξηση του οξικού οξέος υφίσταται συνήθως μετά την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης από το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος (Ramos and Santos 1996). Η μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς την παραγωγή του οξικού οξέος οφείλεται στα διαφορετικά διάφορα στελέχη ζυμών

(Hannemann, 1985, Remize et al., 2000), ενώ παράγοντες που ευνοούν το σχηματισμό του, είναι η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, αναερόβιες συνθήκες, πολύ χαμηλό (<3,1) ή πολύ υψηλό (>4,0) pH και πολύ υψηλή θερμοκρασία ζύμωσης (Lafon-Lafourcade, 1983; Delfini et al., 1989; Verduyn et al., 1990).

Παραγωγή ανώτερων αλκοολών

Οι ανώτερες αλκοόλες παράγονται ως προϊόντα καταβολισμού των αμινοξέων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και επιδρούν δυσμενώς στο άρωμα του οίνου, σε περίπτωση που η συγκέντρωσή τους υπερβεί τα 400 mg/L (Giudici et al., 1994). Οι συνήθεις συγκεντρώσεις τους, στον οίνο, είναι μικρές (<300 mg/L) και θεωρείται ότι συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα του αρώματος του οίνου (Rapp & Versini, 1991). Η επιλογή του στελέχους βρίσκεται σε άμεση συνάρτηση με την ικανότητα παραγωγής ανώτερων αλκοολών (Zeeman et al., 1982; Cabrera et al., 1988; Mateo et al., 2001).

Ακόμη, παράγοντες όπως υψηλό pH (Rankine, 1967), αυξημένη θερμοκρασία ζύμωσης (Ciolfi et al., 1985) και εκτεταμένος αερισμός του γλεύκους (Crowel & Guymon, 1963) οδηγούν σε αύξηση της παραγωγής τους.

Ικανότητα απελευθέρωσης πρόδρομων αρωματικών ενώσεων

Τα μονοτερπένια παρουσιάζουν τεράστιο ενδιαφέρον στην οινολογία εξαιτίας της πτητικότητας και του αρώματος τους (Williams et al., 1982), απαντώνται είτε δεσμευμένα με μόρια γλυκόζης, είτε με τη μορφή μη πτητικών γλυκοσιδίων. Είναι υπεύθυνα για το ποικιλιακό άρωμα του σταφυλιού (Gunata, 1994). Με την υδρολυτική δράση των γλυκοσιδασών (Bayonove et al., 1992), απελευθερώνονται αρωματικές ενώσεις, συμβάλλοντας στο γευστικό και αρωματικό χαρακτήρα του οίνου (Darriet et al., 1988; Dubourdieu et al., 1988; Delcroix et al., 1994). Οι ζύμες οινοποίησης που εμφανίζουν δράση κυρίως β-γλυκοσιδάσης παρουσιάζουν έντονο ενδιαφέρον (Fernandez et al., 2000; Mendes Ferreira et al., 2001; Arevalo-Villena et al., 2007).

Εστερασική δραστηριότητα

Εξαιτίας της εστερασικής δραστηριότητας των ζυμών, παράγονται δύο κατηγορίες εστέρων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Οι αιθυλεστέρες, προέρχονται από λιπαρά οξέα με γραμμική αλυσίδα ατόμων άνθρακα, και οι οξικοί εστέρες, προέρχονται από ανώτερες αλκοόλες επιδρώντας θετικά στο δευτερογενές άρωμα του οίνου προσδίδοντας αρώματα φρούτων και ανθέων (Herraiz et al., 1990; Herraiz & Ough, 1993).

Τεχνολογικές ιδιότητες

Γενετική σταθερότητα

Η καθαρή καλλιέργεια εκκίνησης προέρχεται από την αναπαραγωγή ενός κυττάρου κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες. Ωστόσο κατά την διατήρησή του (λυοφυλίωση, υγρό άζωτο) (Driedonks, 1995) και τις διαδοχικές ανακαλλιέργειες, μπορεί να οδηγήσει το εκάστοτε στέλεχος ζύμης σε παραλλακτικότητα μετά από αρκετές γενεές, που οφείλονται σε αυθόρμητες μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και γονιδιακές μετατροπές (Snow, 1983).

Αντοχή στο διοξείδιο του θείου

Η επιλεκτική δράση του διοξειδίου του θείου έναντι διαφόρων ειδών ζυμών που εμπλέκονται στην αλκοολική ζύμωση και η καταστροφή ή αδρανοποίηση των βακτηρίων αποτρέποντας την ανάπτυξη τους στο γλεύκος κατά τη διάρκεια μετατροπής των σακχάρων σε αλκοόλη από τις ζύμες καθιστούν τη χρήση του απαραίτητη. Οι επιδράσεις του στην κινητική της αλκοολικής ζύμωσης εντοπίζονται στην επιμήκυνση του σταδίου προσαρμογής των ζυμών και κατά συνέπεια στην καθυστέρηση έναρξης της ζύμωσης. Εντούτοις, παρά το γεγονός ότι το είδος *S. cerevisiae* χαρακτηρίζεται από αυξημένη αντοχή στο διοξείδιο του θείου συγκριτικά με άλλες ζύμες και βακτήρια, η εκτεταμένη θείωση του γλεύκους είναι ικανή να οδηγήσει σε αργές ή μη ολοκληρωμένες ζυμώσεις (Boulton, 1996).

Ικανότητα αφρισμού

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παράγεται διοξείδιο του άνθρακα δημιουργώντας το σχηματισμό αφρού, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις η αυξημένη ικανότητα παραγωγής από διάφορα στελέχη ζυμών οδηγεί σε υπερχειλίση της δεξαμενής και απώλεια γλεύκους. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί και μείωση της συγκέντρωσης του πληθυσμού των ζυμών στο γλεύκος εξαιτίας συσσώρευσης τους στο στρώμα αφρού (Henschke, 1997).

Ικανότητα συσσωμάτωσης

Πρόκειται για το φαινόμενο αντιστρεπτής κυτταρικής συγκόλλησης η οποία προκύπτει από την ένωση γλυκοπρωτεϊνών που εντοπίζονται στο εξωτερικό του κυτταρικού τοιχώματος με μανοπρωτεΐνες γειτονικών κυττάρων, σχηματίζοντας συσσωματώματα κυττάρων που καθιζάνουν (Teunissen & Steensma, 1995; Stratford, 1996). Ο μεγάλος βαθμός διασποράς του πληθυσμού των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και η ομοιομορφία εξάπλωσής τους εξασφαλίζει ταχύ ρυθμό ζύμωσης. Αντίθετα η συσσωμάτωση και καθίζηση των κυττάρων των ζυμών είναι επιθυμητή αφού ολοκληρωθεί η μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη έτσι ώστε να διευκολυνθεί η απομάκρυνση τους και να επιταχυνθεί η διαύγαση του οίνου (Henschke, 1997). Η ικανότητα καθίζησης αποτελεί ιδιαίτερα επιθυμητό χαρακτηριστικό κατά την παραγωγή αφρώδους οίνου, κατά την οποία η επαναζύμωση λαμβάνει χώρα στις φιάλες.

Απαιτήσεις σε αζωτούχα συστατικά

Η κυριότερη αιτία μειωμένης κινητικής ή ακόμη και μη ολοκληρωμένης αλκοολικής ζύμωσης, βασίζεται στην ανεπάρκεια αφομοιώσιμων αζωτούχων συστατικών ή στις αυξημένες απαιτήσεις της καλλιέργειας σε άζωτο (Jiranek et al., 1991; Jiranek et al., 1995a; Jiranek et al., 1995b). Η συνολική συγκέντρωση αζωτούχων συστατικών αποτελεί κρίσιμο παράγοντα ως προς την ανάπτυξη των ζυμών καθώς κυμαίνεται από 60 έως 2400 mg/L (Henschke & Jiranek, 1993). Η ορθολογική αζωτούχος λίπανση της αμπέλου ή η προσθήκη αμμωνιακών αλάτων κατά τη ζύμωση εγγυώνται τα επιθυμητά επίπεδα αφομοιώσιμου αζώτου. Αντιθέτως, αυξημένα επίπεδα υπολειμματικού αζώτου οδηγούν σε μικροβιακές προσβολές του οίνου και σχηματισμό αιθυλοκαρβαμιδικών ενώσεων (Jiranek et al., 1995a; Jiranek et al., 1995b; Jiranek et al., 1995c). Μεγάλης

σημασίας είναι η γνώση του αζωτούχου δυναμικού του γλεύκους σε πρώιμο στάδιο οινοποίησης αλλά και οι απαιτήσεις της καλλιέργειας εκκίνησης σε άζωτο (Ough et al., 1991).

Αντοχή στην ξήρανση

Η καλλιέργεια εκκίνησης από επιλεγμένους ζυμομύκητες, προϋποθέτει την αντοχή τους στην ξήρανση, ιδιότητα που αποδίδεται στην επιλογή του στελέχους και στην περιεκτικότητα του κυττάρου σε τρεχαλόζη σε μεγάλης κλίμακας οινοποιήσεις. Ο ρόλος της τρεχαλόζης εντοπίζεται στην αντικατάσταση των μορίων νερού που απομακρύνονται (Lee et al., 1986; Chandrasekar & Graber, 1988) όπως ακόμη στο ότι διατηρεί την ακεραιότητα των μεμβρανών κάτω από συνθήκες έντονου στρες (Van Laere, 1989). Η τρεχαλόζη απαντάται στο κύτταρο σε συγκεντρώσεις 12-20% αλλά ο σχηματισμός της μπορεί να οφείλεται και στην αντίδραση του κυττάρου σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως την περιορισμένη πρόσληψη αζωτούχων συστατικών, φωσφορικών ή θειϊκών αλάτων, ακραίων θερμοκρασιών ή οσμωτικού στρες (Panek 1985, 1991; Thevelein 1984b).

Αποικοδόμηση του μηλικού οξέος

Σε βόρεια ψυχρά κλίματα συμβαίνει να μην επιτυγχάνεται η επιθυμητή ωριμότητα της σταφυλής κατά τη συγκομιδή με αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας του γλεύκους. Η συγκέντρωση του μηλικού ξεπερνά τις συνήθεις συγκεντρώσεις του τρυγικού οξέος (κυριότερου οργανικού οξέος του γλεύκους) δημιουργώντας δυσμενείς επιπτώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Η ικανότητα του *S. cerevisiae* να αφομοιώνει το μηλικό οξύ και να το μετατρέπει σε αιθανόλη κάτω από αναερόβιες συνθήκες ποικίλει, εξαρτάται από το στέλεχος (Rankine, 1966; Rodriguez & Thornton, 1990).

Παραγωγή γλυκερόλης

Η παραγωγή γλυκερόλης προέχεται από τη γλυκεροπυρουβική ζύμωση και έχει άμεση επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Χαρακτηρίζεται από ελαφρώς γλυκιά γεύση (όριο αντίχνευσης 5,2 g/L). Η περιεκτικότητα του οίνου σε γλυκερόλη

κυμαίνεται από 1-15 g/L και ζύμες οινοποίησης με αυξημένη ικανότητα παραγωγής γλυκερόλης επιδρούν θετικά στα χαρακτηριστικά του οίνου (Michnick et al., 1997; Remize et al., 2000). Συμβάλλει ουσιαστικά στην αύξηση της γλυκύτητας, της απαλότητας και βελτιώνοντας το «σώμα» του οίνου (Scanes et al., 1998). Ο μεταβολισμός της γλυκερόλης από τις ζύμες παίζει σημαντικούς ρόλους κατά τη διάρκεια της αναερόβιας ζύμωσης σακχάρων. Επιπλέον συμμετέχει στη σύνθεση φωσφολιπιδίων, στην προστασία από υψηλό οσμωτικό στρες και στη διατήρηση της ισορροπίας από την οξειδοαναγωγή των κυττάρων (Pronk et al. 1996).

Ικανότητα αυτόλυσης

Το φαινόμενο υδρόλυσης ενδοκυτταρικών βιοπολυμερών και σχηματισμού χαμηλού μοριακού βάρους προϊόντων ορίζεται ως αυτόλυση και προκύπτει λόγω αποδιοργάνωσης της δομής του κυττάρου που επέρχεται με το θάνατο του (Babayan & Bezrukov, 1985). Από το γεγονός της απελευθέρωσης ενώσεων, κυρίως πολυσακχαριτών, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων από το εσωτερικό του κυττάρου στο εξωτερικό περιβάλλον, τον οίνο, το φαινόμενο αυτό αποκτά οινολογικό ενδιαφέρον (Pueyo et al., 2000; Martinez-Rodriguez & Polo, 2000; Charpentier & Feuillat, 1993).

Πρωτεολυτική δραστηριότητα

Η πρωτεϊνική αστάθεια και το επακόλουθο θολώμα δεν εξαρτάται τόσο από τη συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών όσο από το είδος των πρωτεϊνών οι οποίες προέρχονται από το σταφύλι, των οποίων το μέγεθος ή οι ισοηλεκτρικές τους ιδιότητες οδηγούν σε μειωμένη διαλυτότητα (Boulton et al., 1996). Το πρωτεολυτικό σύστημα των ζυμών παρουσιάζει ενδιαφέρον αναφορικά με την πρόληψη πρωτεϊνικού θολώματος στον οίνο και ως προς την αυτόλυση των κυττάρων των ζυμών και την απελευθέρωση χημικών ενώσεων στο γλεύκος (Achestetter & Wolf, 1985; Nelson & Young, 1986). Η επεξεργασία με μπεντονίτη περιορίζει τον κίνδυνο πρωτεϊνικού θολώματος ταυτόχρονα όμως με την απομάκρυνση των πρωτεϊνών είναι πιθανή και η απώλεια σημαντικών αρωματικών ενώσεων (Canal-Liauberes, 1993).

Φονική συμπεριφορά

Η πρωτεϊνικής φύσης τοξίνη (K) είναι υπεύθυνη για τον φονικό (killer) χαρακτήρα που εμφανίζουν στελέχη *S. Cerevisiae*, η οποία είναι θανατηφόρος για άλλα στελέχη. Τα συγκεκριμένα στελέχη δεν είναι ευαίσθητα στην τοξίνη που παράγουν αλλά είναι πιθανό να παρουσιάζουν ευαισθησία σε τοξίνες άλλων στελεχών όχι μόνο του *S. cerevisiae* αλλά και άλλων ειδών. Κατά συνέπεια τα κριτήρια επιλογής ζυμών οινοποίησης θα πρέπει να περιλαμβάνει την αντοχή σε K2 τοξίνη (φονικό ή ουδέτερο φαινότυπο).

Βιοχημικές ιδιότητες

Παραγωγή αιθυλοκαρβαμιδικών ενώσεων

Η παρουσία αιθυλοκαρβαμιδικών ενώσεων συνδέεται με κίνδυνο καρκινογένεσης και μεταλλαξιογόνο δράση (Ough et al., 1988). Η εφαρμογή καλλιεργητικών τεχνικών στον αμπελώνα που εμπεριέχουν εκτεταμένη χρήση ουρίας σε λιπάσματα ή ψεκασμός με ουρία πριν τη συγκομιδή για απομάκρυνση των φύλλων σε συνδυασμό με την προσθήκη θρεπτικών συμπληρωμάτων κατά τη ζύμωση που περιέχουν ουρία αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πρόδρομων ενώσεων. Η ικανότητα παραγωγής ουρίας, που σχηματίζεται ως ενδιάμεσο προϊόν κατά τον μεταβολισμό της αργινίνης και μετατροπής της σε ορνιθίνη, αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα, διαφέρει στα διαφορετικά στελέχη *S. cerevisiae* (Ough et al., 1991; An & Ough, 1993), ενώ η περαιτέρω αποικοδόμηση της ουρίας παρεμποδίζεται από υπό υψηλές θερμοκρασίες ζύμωσης και υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας.

1.3.7 Ενώσεις που συμβάλλουν στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου

Τερπένια

Οι μεγαλύτερος αριθμός αρωματικών ενώσεων που έχουν περιγραφεί σε ποικιλίες *Vitis vinifera*, ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων.

Οι ενώσεις αυτής της οικογένειας είναι κυρίως τα μονοτερπένια (με 10 άτομα άνθρακα) και τα σесκιτερπένια (με 15 άτομα άνθρακα), τα οποία αποτελούνται από δυο και τρεις μονάδες ισοπρενίου αντίστοιχα. Τα μονοτερπένια συναντώνται κυρίως στην μορφή των απλών υδρογονανθράκων (λεμονένιο), των αλδευδών (λιναλάλη, γερανιάλη), των αλκοολών (λιναλοόλη, γερανιόλη), των οξέων (λιναλικό και γερανικό οξύ) ακόμη και των εστέρων αυτών.

Τα τερπένια που περιέχονται στα σταφύλια έχουν τη μορφή πρόδρομων ενώσεων καθώς εμφανίζονται και σε ελεύθερη και σε γλυκοζυλιωμένη μορφή (άοσμη). Έχει διαπιστωθεί ότι η πλειοψηφία των μονοτερπενίων που εντοπίζονται στο σταφύλι και τον οίνο δεν είναι στην ελεύθερη μορφή τους αλλά δεσμευμένα με την γλυκόζη ή κάποιο άλλο σάκχαρο. Τα δεσμευμένα μονοτερπένια αποτελούν πρόδρομες ενώσεις του μεταγενέστερου αρώματος χωρίς να συνεισφέρουν άμεσα στο άρωμα (Câmara, 2007; Câmara, 2004).

Νορισοπρενοειδή

Τα νορισοπρενοειδή είναι ενώσεις που συνεισφέρουν στο πρωτογενές άρωμα και προέρχονται από την χημική ή ενζυμική υδρόλυση των καροτενοειδών που υπάρχουν στο σταφύλι ενώ απαντώνται επίσης στην πρόδρομη γλυκοζυλιωμένη μορφή. Η οξειδωτική διάσπαση των καροτενοειδών, τερπενίων με 40 άτομα άνθρακα, δίνει παράγωγα με 9,10,11 ή 13 άτομα άνθρακα. Ανάμεσα σε αυτά τα συστατικά, τα νορισοπρενοειδή παράγωγα με 13 άτομα άνθρακα φαίνεται να έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τις αρωματικές τους ιδιότητες. Τα πιο γνωστά από αυτά είναι η β-δαμασκηνόνη και η β-ιονόνη με χαρακτηριστικά αρώματα λουλουδιών και τροπικών φρούτων (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Μεθοξυπυραζίνες

Οι μεθοξυπυραζίνες προσδίδουν σε ποικιλίες, όπως το Cabernet Sauvignon ένα χαρακτήρα βοτανικό και χορτώδη. Τα συστατικά αυτά υπάρχουν στο σταφύλι σε ελεύθερη μορφή και δεν έχουν καταγραφεί πρόδρομες ενώσεις αυτών. Οι μεθοξυπυραζίνες είναι αζωτούχα ετεροκυκλικά παράγωγα που παράγονται κατά τον μεταβολισμό των αμινοξέων.

Οι ενώσεις 2-methoxy-3-isopropylpyrazine, 2-methoxy-3-sec-butylpyrazine και 2-methoxy-3-isobutylpyrazine έχουν την χαρακτηριστική οσμή πράσινης πιπεριάς και σπαραγγιού, ακόμη και γήινα αρώματα. Αρκετά φυτά όπως οι πράσινες πιπεριές, ο αρακάς και οι πατάτες φαίνεται να περιέχουν 2-methoxy-3-isobutylpyrazine. Στους ερυθρούς οίνους του Bordeaux, το κατώφλι αντίληψης της 2-methoxy-3-isobutylpyrazine είναι της τάξης των 15 ng/L. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις είναι εντονότερος ο χορτώδης χαρακτήρας, γεγονός που είναι ανεπιθύμητο στους οίνους (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Θειούχες ενώσεις

Οι θειούχες ενώσεις έχουν εντοπιστεί στους οίνους ταξινομούνται σε πέντε κατηγορίες, σύμφωνα με τη χημική τους δομή: θειόλες, μερκαπτάνες, θειοεστέρες, σουλφίδια, και ετεροκυκλικές ενώσεις. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις προσδίδουν αρώματα, τα οποία έχουν περιγραφεί παρόμοια με του λάχανου, του σκόρδου και του κρεμμυδιού και σε αρκετές περιπτώσεις εμφανίζονται ως μη επιθυμητά.

Ορισμένες ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι, οι 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one, 3-mercaptohexan-1-ol ace-tate, 4-mercapto-4-methylpentan-1-ol, 3-mercaptohexan-1-ol και 3-mercapto-3-methyl-butan-1-ol. Συχνά ταυτίζονται επίσης με αρώματα τροπικών ή εξωτικών φρούτων και μαύρου πιπεριού (Howell et al., 2004).

Αλκοόλες

Ανάμεσα στα δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης βρίσκονται οι ανώτερες αλκοόλες με εξαίρεση την 1-εξανόλη, η οποία δεν προέρχεται από την ζύμωση αλλά από το σταφύλι και δίνει στους οίνους χορτώδη οσμή και γεύση.

Οι ανώτερες αλκοόλες προέρχονται από τα κετονοξέα, τα οποία σχηματίζονται με μηχανισμούς διαφορετικούς τόσο από τα σάκχαρα όσο και από τα αμινοξέα. Οι αμυλικές αλκοόλες φαίνεται να μην έχουν ευνοϊκή επίδραση στα οργανοληπτικά

χαρακτηριστικά των οίνων καθώς και η προπανόλη γιατί έχει ουδέτερη οσμή.

Η φαινυλο-2-αιθανόλη έχει ευχάριστη οσμή τριαντάφυλλου (Σουφλερός, 2009).

Η γλυκερόλη ανήκει στις πολυόλες και αποτελεί δευτερογενές προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης Έχει γλυκιά γεύση και η παρουσία της καθιστά τους οίνους πιο «μυελλώδεις». Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και οι 2,3-βουτανεδιόλη, η μαννιτόλη, η σορβιτόλη, η ινοσιτόλη και η τυροσόλη.

Εστέρες

Ο σχηματισμός εστέρων συμβαίνει κατά την αντίδραση των ελεύθερων οργανικών οξέων του οίνου με την αιθανόλη. Στον οίνο σχηματίζονται τόσο διά της χημικής οδού, κατά την παλαίωση αυτών όσο και διά της ενζυματικής οδού, κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ το τεχνολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οφείλεται στους οργανοληπτικούς χαρακτήρες αυτών. Αναλυτικότερα, εστέρες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχουν αρώματα λουλουδιών ή φρούτων, ενώ ο προπιονικός αιθυλεστέρας δεν φαίνεται να παίζει κάποιον ιδιαίτερο ρόλο στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων των οίνων. Αντίθετα οι οξικοί εστέρες του 2-μεθυλοπροπυλίου, του 3-μεθυλοβουτυλίου, του 2-φαινυλοαιθυλίου και οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα συμβάλλουν σημαντικά στη σύσταση του αρώματος και του μπουκέτου των οίνων (Σουφλερός, 2009).

Σημαντικότερος όλων θεωρείται ο οξικός αιθυλεστέρας ο οποίος αντιπροσωπεύει από μόνος του συχνά έως και το 80% του συνόλου των πτητικών εστέρων.

Η παρουσία του οξικού αιθυλεστέρα στους οίνους οφείλεται τόσο στην εστεροποίηση του οξικού οξέος και της αιθυλικής αλκοόλης, που πραγματοποιείται κατά την διάρκεια της παλαίωσης αυτών δια της χημικής οδού, όσο και στην σύνθεση αυτού από τους μικροοργανισμούς κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Το τεχνολογικό ενδιαφέρον του οξικού αιθυλεστέρα βρίσκεται στο γεγονός ότι το συστατικό αυτό είναι υπεύθυνο για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων που έχουν προσβληθεί από οξικά βακτήρια και όχι το οξικό οξύ, όπως θεωρούνταν παλαιότερα (Σουφλερός, 2009).

Οι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, κυρίως ο καπροϊκός και ο καπρυλικός, παράγονται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Οι εστέρες αυτοί έχουν ευχάριστη λιπαρή οσμή και οσμή μελιού, συνεισφέροντας ιδιαίτερα στο άρωμα λευκών οίνων.

Οι οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών (isoamyl acetate, phenylethyl acetate), συμπεριλαμβάνονται επίσης ανάμεσα στους εστέρες ζύμωσης. Έχουν ιδιαίτερα έντονη οσμή μπανάνας και μήλου συνεισφέροντας έτσι στην αρωματική πολυπλοκότητα ουδέτερων οίνων, όμως είναι πιθανό να καλύψουν το ποικιλιακό άρωμα. Ο σχηματισμός των εστέρων αυτών προωθείται κυρίως όταν η ζύμωση είναι αργή, λόγω απουσίας οξυγόνου και χαμηλών θερμοκρασιών (Bertrand, 1983; Dubois, 1979).

Καρβονυλικές ενώσεις

Οι αλδεΐδες αποτελούν επίσης μέρος των πτητικών ενώσεων που συμμετέχουν στο άρωμα του οίνου. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι η βανιλίνη, που σχετίζεται με την παλαιώση σε βαρέλια και έχει χαρακτηριστικό άρωμα βανίλιας. Στον φλοιό του σταφυλιού όμως περιέχεται μικρή ποσότητα αλδεϋδών. Η σημαντικότερη αλδεΐδη που εντοπίζεται στους οίνους είναι η ακεταλδεΐδη η οποία αποτελεί δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και παράγεται μετά την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος (ενζυματική οδός).

Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά μόρια με τις ιδιότητες των κετονών,

συμπεριλαμβανομένων των προπανόνη, βουτανόνη και πεντανόνη. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι η ακετυλομεθυλο-καρβιτόλη και το διακετύλιο. Επίσης έχουν ταυτοποιηθεί η γλυοξάλη, η μεθυλογλυοξάλη και η υδροξυπροπανεδιάλη με αρκετές από τις ιδιότητες αλδεϋδών και κετονών (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Άλλες καρβονυλικές ενώσεις όπως η υδροξυ-μεθυλο-φουρφουράλη, η ακετοΐνη και το διακετύλιο ή 2,3-βουτανεδιόνη (οσμή βούτυρου) συνεισφέρουν επίσης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Οι λακτόνες σχηματίζονται κατά την αντίδραση μιας εσωτερικής εστεροποίησης που συμβαίνει μεταξύ ενός οξέος και μιας αλκοόλης στο ίδιο μόριο. Η πιο διαδεδομένη είναι η γ-βουτυρολακτόνη. Οι λακτόνες μπορεί επίσης να προέρχονται από το σταφύλι συμμετέχοντας στο ποικιλιακό άρωμα (περίπτωση Riesling). Στα προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea* σταφύλια παράγεται επίσης σοτολόνη, η οποία

συμβάλει στο χαρακτηριστικό «ψημένο» άρωμα των οίνων που παράγονται από σταφύλια τα οποία έχουν προσβληθεί από «ευγενή σήψη».

Οι ακετάλες συντίθενται από την ένωση μιας αλδεϋδης με μια αλκοόλη. Σημαντικότερη θεωρείται το διαιθοξυαιθάνιο, λόγω του ότι χαρακτηρίζεται από ισχυρή οσμή αλδεϋδης.

Λιπαρά οξέα

Το βασικό στοιχείο της πτητικής οξύτητας θεωρείται το μικρομοριακό οξικό οξύ. Η συγκέντρωσή του υποδηλώνει την ύπαρξη και δράση βακτηρίων (γαλακτικών ή οξικών) προειδοποιώντας την επερχόμενη αλλοίωση του οίνου. Άλλα οξέα όπως το προπιονικό και το βουτυρικό, σχετίζονται επίσης με βακτηριακές αλλοιώσεις. Τα C6, C8 και C10 λιπαρά οξέα σχηματίζονται από τους ζυμομύκητες. Τα στοιχεία αυτά είναι ενεργοποιητές ζύμωσης, κυρίως υπό αναερόβιες συνθήκες. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι το ελεϊκό και το λινελεϊκό οξύ. Είναι ενεργά ακόμη και σε ελάχιστες ποσότητες και προέρχονται από την κηρώδη επιφάνεια του φλοιού των σταφυλιών. Τα λιπαρά αυτά οξέα, δύναται να ενσωματωθούν μέσω της Βιοχημικής διεργασίας σύνθεσης λιπιδίων από τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Papanikolaou et al., 2011) και να αποτελέσουν κύρια λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών του μύκητα. Έχει αποδειχθεί ότι όσο πιο ακόρεστα είναι τα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης του μικροοργανισμού, τόσο μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη εμφανίζει ο μικροοργανισμός αυτός (Sarris et al., 2016).

Επιπλέον, τα λιπαρά οξέα συνιστούν πρόδρομα βιοσύνθεσης αρωματικών συστατικών. Το άρωμα των λιπαρών οξέων έχει περιγραφεί κυρίως με αυτό του ξυδιού, του βουτύρου, του τυριού και των λαχανικών.

1.4 Γευσιγνωσία- Οργανοληπτική αξιολόγηση οίνου

Με την έννοια οργανοληπτική εξέταση του οίνου ορίζουμε την εκτίμηση της ποιότητάς του με τις αισθήσεις μας. Επιστρατεύοντας το σύνολο των αισθήσεων καθορίζονται οι οργανοληπτικοί χαρακτήρες. Σημαντικό κομμάτι είναι η περιγραφή αυτών των εντυπώσεων με σαφείς όρους και η αιτιολογημένη κριτική αυτών.

1.4.1 Σκοπός οργανοληπτικής δοκιμής

Σκοπός της οργανοληπτικής εξέτασης ενός οίνου είναι η αξιολόγηση και ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών του με αποτέλεσμα την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ποιότητά του. Οι χημικές αναλύσεις έχουν ταυτοποιήσει πάνω από 300 συστατικά που συμμετέχουν στην σύνθεσή του. Παρόλα αυτά τα πιο σημαντικά από ποιοτική άποψη που συνεισφέρουν στην γεύση και στα αρώματά του, δηλαδή στα χαρακτηριστικά του είναι και τα λιγότερο γνωστά. Η χημική ανάλυση επισημαίνει τα συστατικά που δίνουν την σύνθεση του κρασιού και αφήνει να διαφύγουν τα στοιχεία εκείνα, τα οποία αν και περιέχονται σε πολύ μικρές ποσότητες είναι υπεύθυνα τελικά για τον χαρακτήρα του. Αυτή την αδυναμία προσπαθεί να διορθώσει η οργανοληπτική δοκιμή (Charters et al., 2006).

Υπάρχουν δύο τύποι οργανοληπτικής δοκιμής, αυτή του καταναλωτή και αυτή του επαγγελματία δοκιμαστή. Από τη μια ο καταναλωτής ενδιαφέρεται μόνο για την ευχαρίστησή του και προσπαθεί να δημιουργήσει της συνθήκες εκείνες που θα οδηγήσουν στην απόλαυση της ποιότητας του κρασιού και από τη άλλη το ενδιαφέρον του επαγγελματία δοκιμαστή είναι να δημιουργήσει τις συνθήκες τις οποίες θα κάνουν φανερά τα σφάλματά του και θα αξιολογήσουν την ποιότητά του. Σε αυτή την περίπτωση η δοκιμή μπορεί να πάρει διάφορες διαστάσεις. Μπορεί να είναι απλή και οριακή ή και αναλυτική και ολοκληρωμένη.

Επομένως για μια επιτυχημένη οργανοληπτική αξιολόγηση είναι απαραίτητο να ακολουθηθεί μία ειδική τεχνική για την εξέταση της όψης, των αρωμάτων και των γευστικών χαρακτηριστικών του οίνου. Η οργανοληπτική αξιολόγηση και κατά συνέπεια, η βαθμολόγηση ενός οίνου απαιτεί εμπειρία και γνώσεις, συνεχή εκπαίδευση και ακολουθεί μια διαφορετική, πιο πολύπλοκη διαδικασία από την απλή κατανάλωση. Σκοπός της είναι η διαμόρφωση μιας ξεκάθαρης και αντικειμενικής εικόνας για την ποιότητα του οίνου. Η αξιολόγηση πρέπει να γίνεται από έμπειρους και ικανούς

δοκιμαστές, που είναι αμερόληπτοι και χωρίς οποιαδήποτε συμφέροντα, ενώ αφορά στην επιμέρους βαθμολόγηση κάθε σημείου της οργανοληπτικής εξέτασης. Το άθροισμα αυτών των βαθμών δίνει το σύνολο, τον τελικό, δηλαδή, βαθμό, που πολλές φορές συνοδεύεται και από κάποιον χαρακτηρισμό ή σχόλιο (Charters et al., 2006).

1.5 Σκοπός

Στην περίπτωση της Σαντορίνης, το ζεστό κλίμα το καλοκαίρι και η έντονη έκθεση στον ήλιο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σακχαροπεριεκτικότητας στα σταφύλια και κατά συνέπεια την παραγωγή οίνων με υψηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη (έως 14–15% vol). Παράλληλα το ηφαιστειογενές έδαφος σε συνδυασμό με την ποικιλία προάγει την παραγωγή οίνων με υψηλή οξύτητα και χαμηλό pH. Σε περίπτωση λοιπόν που επιδιώκεται η παραγωγή οίνων μέσω αυτόχθονων στελεχών, αυτά θα πρέπει να είναι ανθεκτικά στις συγκεκριμένες συνθήκες. Στο πλαίσιο της κλιματικής αλλαγής η καλλιέργεια της αμπέλου σε μία ήδη ξηροθερμική περιοχή απαιτεί έρευνα και γνώση νέων στρατηγικών και η χρήση γηγενών ποικιλιών αλλά και γηγενών ζυμομυκήτων είναι μία καλή διεξοδος λόγω της προσαρμοστικότητας.

Η απομόνωση και επιλογή στελεχών από την ίδια την ποικιλία και ακόμα καλύτερα από την περιοχή στην οποία καλλιεργείται δύναται να προσδώσει ένα ξεχωριστό αποτέλεσμα πιο κοντά στα χαρακτηριστικά των κρασιών της περιοχής εξασφαλίζοντας παραγωγή οίνων ποιότητας με γεωγραφική ταυτότητα και αυθεντικότητα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση απομονωθέντων στελεχών ζυμών (τα περισσότερα από τον αμπελώνα της Σαντορίνης και ένα από τη Νεμέα) ως προς συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που κρίνονται σημαντικά στη βιομηχανία του οίνου. Απώτερος στόχος ήταν η αξιολόγηση για τη χρήση τους ως εμβόλια εμπλουτισμού σε οινοποιήσεις, ώστε να οδηγήσουν στην παραγωγή οίνων με μοναδικά, βελτιωμένα και σταθερά οινολογικά χαρακτηριστικά. Η ανθεκτικότητα σε αιθανόλη και γλυκόζη, ο ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης- φρουκτόζης, η παραγωγή γλυκερόλης, και άλλων επιθυμητών ενώσεων ήταν τα κριτήρια για την αξιολόγησή τους. Συνολικά αξιολογήθηκαν τρία απομονωμένα στελέχη μέσω μικροοινοποιήσεων, και οι παραγόμενοι οίνοι συγκρίθηκαν με τον αντίστοιχο οίνο που παράχθηκε με αυθόρμητη ζύμωση κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μελέτης, τα σταφύλια ποικιλίας Ασύρτικου, προήλθαν από τον Πύργο Καλλίστης στη Σαντορίνη. Η διαδικασία της οινοποίησης ξεκίνησε τον Αύγουστο του 2021 στο Οινοποιείο Χατζηδάκη και οι αναλύσεις ολοκληρώθηκαν τον Φεβρουάριο του 2022 στο ΓΠΑ. Διεξήχθησαν συνολικά οκτώ μικροοινοποιήσεις, οι 3 με τα 3 απομονωμένα στελέχη ζυμομυκήτων σε δοχεία των 100 λίτρων και μία αυθόρμητη ζύμωση σαν μάρτυρας σε δοχείο 700 λίτρων. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και κάθε σημείο που εμφανίζεται αποτελεί τον μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

Σε όλα τα δοχεία ζύμωσης ακολουθήθηκε κοινό πρωτόκολλο οινοποίησης.

Η αποθήκευση των στελεχών πραγματοποιήθηκε στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε φιαλίδια με γλυκορόλη (30%) και ενεργοποιήθηκαν με την προσθήκη 200 μL σε 10 ml yeast reptime dextrose (20 g/L γλυκόζη, 10 g/L εκχύλισμα ζύμης και 10 g/L πεπτόνη) όπου παρέμειναν στους $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 ώρες, ενώ η καθαρότητα κάθε στελέχους ελέγχθηκε μέσω οπτικού μικροσκοπίου. Για τις εναρκτήριες καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 ml που περιείχαν 50 ml του μέσου αφού πρώτα αποστειρώθηκαν σε κλίβανο στους $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1.5 atm για 15 λεπτά.

2.1 Οινοποίηση

Τα σταφύλια τρυγήθηκαν χειρωνακτικά στις 15/08/21 από το χωρίο Πύργος και συγκεκριμένα από αμπελώνες με 250 μέτρα υψόμετρο. Η πίεση των σταφυλιών έγινε σε ολόκληρο το σταφύλι (χωρίς αποβοστρίχωση) και κατά την παραλαβή του γλεύκους προστέθηκαν 4g/hl θειώδους ανυδρίτη (oenosteryl) και 20g/tn πηκτινολητικού ενζύμου (viazym mp). Στη συνέχεια το γλεύκος παρέμεινε σε θερμοκρασία $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 ώρες για διαύγαση και μεταφέρθηκε σε 8 δοχεία για να ξεκινήσει η ζύμωση στις 17/08/21 (Εικόνα 5). Το γλεύκος ήταν το ίδιο σε όλες τις οινοποιήσεις και κατά την παραλαβή είχε ανάγοντα σάκχαρα=224 g/L, πυκνότητα= $1,095\text{ kg m}^{-3}$, Ολική οξύτητα= 5,7 g/L τρυγικού οξέος, pH=3,13, NTU=118 και ελεύθερο SO_2 =15 ppm. Τα τρία στελέχη ζυμομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα (Y54, Sc9, Sc13). Συγκεκριμένα τα στελέχη Sc9 και Sc13 έχουν απομονωθεί από την ποικιλία Ασύρτικο στη Σαντορίνη ενώ

το Υ54 από την περιοχή της Νεμέας στην Πελοπόννησο (Nisiotou & Gibson, 2005) και ανήκουν στην ιδιωτική συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά εμβολιάστηκαν σε δοχεία των 5 L στους 24°C με 10^6 cfu/mL και προστέθηκαν αντίστοιχα 20g/hL (actiferm I) για θρέψη με θειαμίνη, αφομοιώσιμο άζωτο, κυτταρίνη και κύτταρα σακχαρομυκήτων καθώς και στη δεξαμενή με την αυθόρμητη ζύμωση. Η παρακολούθηση των δεξαμενών ήταν καθημερινή με μετρήσεις θερμοκρασίας και πυκνότητας και σε $d=1,030 \text{ kg m}^{-3}$ προστέθηκε 20g/hL (actiferm II) με αμμωνιακό άζωτο και κύτταρα σακχαρομυκήτων. Η συγκέντρωση των σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη) και ο προσδιορισμός έγινε με υγρή χρωματογραφία.

Στο τέλος στους οίνους προστέθηκε θειώδης ανυδρίτης και παρέμειναν με τις οινολάσπες για δύο εβδομάδες και έπειτα εμφιαλώθηκαν αφιλτράριστα και χωρίς καμία διορθωτική επέμβαση.



Εικόνα 5 Αλκοολική ζύμωση σε δοχεία 100 λίτρων στις 15/08/21.

2.2 Χημική ανάλυση σε γλεύκος και οίνο

Οι κλασσικές αναλύσεις των οίνων και του γλεύκους (ελεύθερος και ολικός θειώδης ανυδρίτης, αποκτημένος αλκοολικός τίτλος % vol, pH, ολική οξύτητα, πτητική οξύτητα και ανάγοντα σάκχαρα) προσδιορίστηκαν σύμφωνα τις διεθνείς μεθόδους του Διεθνούς Οργανισμού αμπέλου και οίνου (OIV).

Για τη συγκέντρωση γλυκερόλης, αιθανόλης, γλυκόζης και φρουκτόζης, χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία (Waters Association 600E apparatus) με ανιχνευτή RI (Waters 410, Midland, ON, Canada) ενώ για τη συγκέντρωση, οξικού οξέος, κιτρικού και ηλεκτρικού ανιχνευτή UV, με στήλη αποκλεισμού ιόντων (Aminex HPX-87H, Bio-Rad, CA, USA). Η στατική φάση αποτελείται από τη στήλη τύπου Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%) (300mm x 7.8mm) της εταιρείας Phenomenex με την οποία πετυχαίνεται ο διαχωρισμός του δείγματος. Η κινητή φάση είναι ένα αραιό υδατικό διάλυμα θεικού οξέος (H₂SO₄:10 mM σε δισ-απεσταγμένο και φιλτραρισμένο H₂O). Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 65 °C με ρυθμό έκλουσης 0,8 mL/min.

Για την ποσοτική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα (Sigma-Aldrich Ltd., Taufkirchen, Germany) προετοιμάστηκαν σε απιονισμένο νερό (Milli-Q, Merk, Taufkirchen, Germany) και για τα δείγματα του οίνου έγινε άμεση έκχυση στη στήλη. Ο όγκος έκχυσης του δείγματος ήταν 20 μL και η διάρκεια ανάλυσης ήταν 30 λεπτά. Στα γραφήματα που προέκυπταν πραγματοποιούνταν ολοκλήρωση των κορυφών με την χρήση του λογισμικού πακέτου Empower. Η ταυτοποίηση των διάφορων δειγμάτων βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης ή ανάσχεσης (R_f), ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά πρότυπα αυτών. Ο προσδιορισμός των ποσοτικοποιήσεων έγινε μέσω πρότυπων καμπυλών.

2.3 Οργανοληπτικός έλεγχος

Η Οργανοληπτική αξιολόγηση έγινε για όλους τους οίνους με περιγραφικά τεστ αξιολόγησης. Η πρώτη αξιολόγηση έγινε στις 4/11/21 για όλα τα δείγματα, από πάνελ 27 ατόμων που αποτελούνταν κυρίως από μεταπτυχιακούς φοιτητές Οινολογίας καθώς και καθηγητές και εργαζόμενους στη βιομηχανία του οίνου στη Σαντορίνη. Στη συνέχεια στις 3/03/22 έγινε αξιολόγηση τριών δειγμάτων από εκπαιδευμένο πάνελ 8 ατόμων με εμπειρία στην ανάλυση οίνου χρησιμοποιώντας την ποσοτική περιγραφή στην Αθήνα. Το δείγμα από το στέλεχος Y54 κρίθηκε από την πρώτη αξιολόγηση οξειδωμένο με αποτέλεσμα να μη συμμετέχει στη δεύτερη δοκιμή.

Τα δείγματα κωδικοποιήθηκαν με ένα διακριτό τριψήφιο κωδικό. Σε κάθε ποτήρι προστέθηκαν 25 mL από το κάθε δείγμα και η θερμοκρασία σερβιρίσματος ήταν στους 14°C (Εικόνα 6). Οι δοκιμαστές αξιολόγησαν εις διπλούν με τυχαία σειρά κάθε ποτήρι σαν ένα ξεχωριστό δείγμα.

Ο καθορισμός του οργανοληπτικού προφίλ έγινε με χρήση λεξιλογίου που ορίστηκε με ένα απλό περιγραφικό τεστ. Τα επιμέρους χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στη δημιουργία της συνολικής αισθητηριακής εκτίμησης βαθμολογούνται σε κλίμακα.

Συγκεκριμένα στην πρώτη αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα από 1 έως 5 (1 λιγότερο, 5 περισσότερο) για την αξιολόγηση της διαύγειας και της απόχρωσης ενώ κλίμακα από 6 έως 10 για τα χαρακτηριστικά καθαρότητα, ένταση και πολυπλοκότητα αρώματος, καθαρότητα, ένταση, πολυπλοκότητα γεύσης, επίγευση, ισορροπία, συνολική εκτίμηση ποιότητας και συγκεντρωτική βαθμολογία (Πίνακας 2).

Στον δεύτερο οργανοληπτικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκε κλίμακα από 1 έως 5 (1 λιγότερο, 5 περισσότερο) για την αξιολόγηση της απόχρωσης, έντασης αρώματος, λευκά άνθη, τροπικά φρούτα, εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα, αρώματα βοτάνων και οξειδωτικά- τριτογενή αρώματα, οξύτητα, λιπαρότητα και συνολική ποιότητα (Πίνακας 3).

Πίνακας 2 Ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε στην οργανοληπτική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε στη Σαντορίνη στις 4/11/21 (OIV, 2021).

	EVALUATION/DESCRIPTOR	EXCELLENT--> POOR				
		5	4	3	2	1
VISUAL ASPECT	Limpidity	5		3		1
	Colour & nuances	5	4	3	2	1
SMELL	Purity	10	9	8	7	6
	Olfactory intensity	10	9	8	7	6
	Olfactory Complexity	10	9	8	7	6
TASTE	Purity	10	9	8	7	6
	Intensity of flavours	10	9	8	7	6
	Structure & Complexity	10	9	8	7	6
	Persistence	10	9	8	7	6
OVERALL IMPRESSION	Balance & harmony	10	9	8	7	6
	General appreciation	10	9	8	7	6
TOTAL :						
DEFECT :						

Παρακαλώ όπως βαθμολογήσετε τα δείγματα από 1-5 (1 λιγότερο, 5 περισσότερο)

Πίνακας 3 Ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε στην οργανοληπτική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε στην Αθήνα στις 3/03/22.

	256	670	349	831	658	705
Απόχρωση (1 πράσινο, 5 καφέ)						
Μύτη						
Ένταση αρώματος						
Λευκά Άνθη						
Τροπικά						
Εσπεριδοειδή						
Πυρηνόκαρπα						
Βοτανικά						
Οξειδωση						
Στόμα						
Οξύτητα						
Λιπαρότητα-Σώμα						
Overall ποιότητα						

Οι κωδικοί 256 και 670 αντιστοιχούν στην οινοποίηση με τον αυτόχθονα πληθυσμό, οι κωδικοί 349 και 831 στην οινοποίηση με το Sc13 και τέλος το 658 και το 705 στο στέλεχος Sc9.



Εικόνα 6 Φωτογραφία από το ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε στην οργανοληπτική αξιολόγηση στο εργαστήριο οιολογίας.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση (Ανάλυση διακύμανσης) Analysis of variance (ANOVA) των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση το λογισμικού προγράμματος Statistica V.7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) για να προσδιορίσει αν οι μέσοι όροι των τιμών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά για περισσότερες από δύο ομάδες. Για τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων χρησιμοποιήθηκε η Tukey's HSD (1953) (Tukey's method for paired comparisons), γνωστή και ως HSD test (Honestly Significant Difference test) με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας το 5% ANOVA ($p < 0.05$).

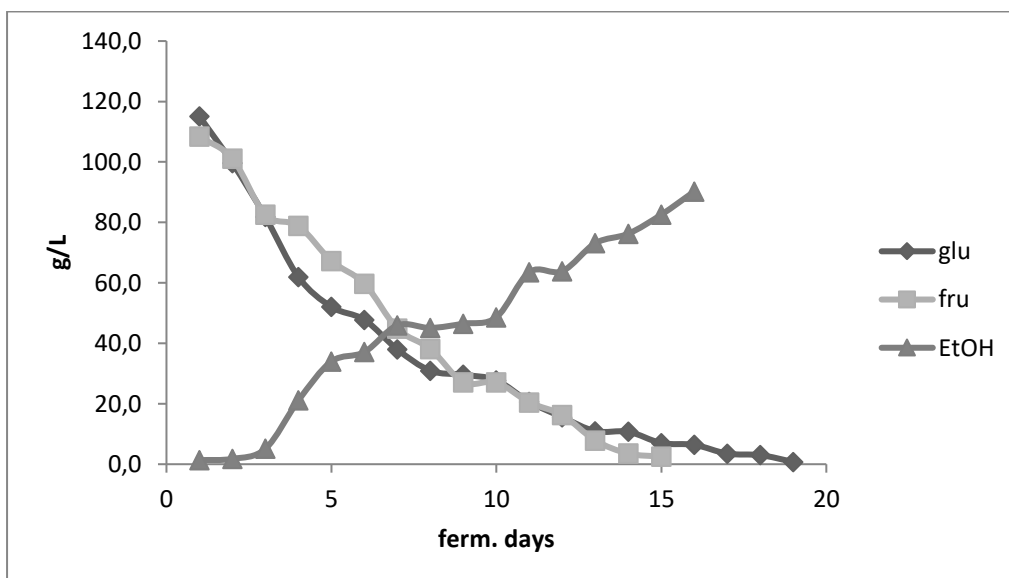
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ζυμώσεων 3 απομονωμένων στελεχών καθώς και της αυθόρμητης ζύμωσης η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

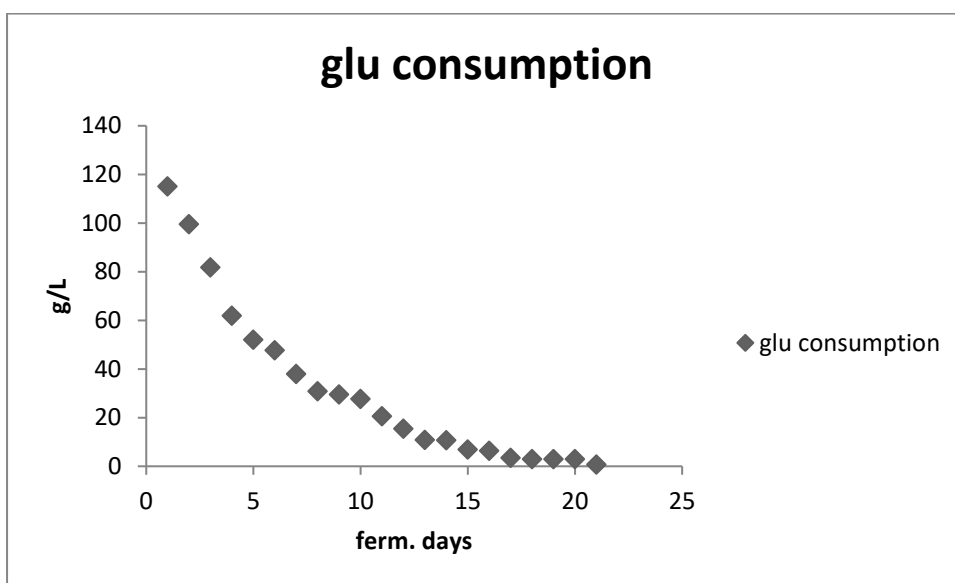
Αυθόρμητη ζύμωση

Η αυθόρμητη ζύμωση στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία λειτούργησε ως μάρτυρας έτσι ώστε να υπάρχει σύγκριση των ποιοτικών χαρακτηριστικών με τα απομονωμένα στελέχη. Στο Οινοποιείο Χατζηδάκη που διεξήχθη το πείραμα δεν χρησιμοποιούνται εμπορικά στελέχη ως εναρκτήριες καλλιέργειες αλκοολικής ζύμωσης. Η ζύμωση ξεκίνησε μία ημέρα αργότερα σε σχέση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν εναρκτήριες καλλιέργειες (Sc9, Sc13) με εξαίρεση το Y54 και διήρκησε 34 ημέρες. Η θερμοκρασία ζύμωσης δεν ξεπέρασε τους 18 °C . Ο κτηθής αλκοολικός τίτλος έφτασε τα 13,0 % vol., τα ανάγοντα σάκχαρα τα 1,99 g/L και η πτητική οξύτητα τα 0,54 g/L οξικού οξέος .

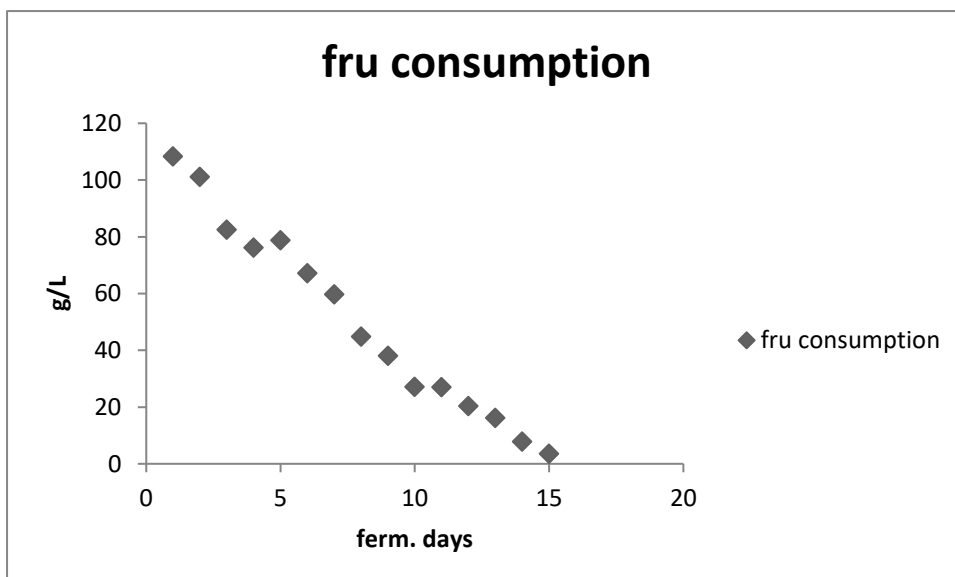


Σχήμα 1 Η κινητική ζύμωσης για την αυθόρμητη ζύμωση.

Κατά την αυθόρμητη ζύμωση, η συγκέντρωση γλυκόζης και φρουκτόζης έφτασε το 50% μετά από 4 και 6 ημέρες ζύμωσης αντίστοιχα (Σχήμα 1).



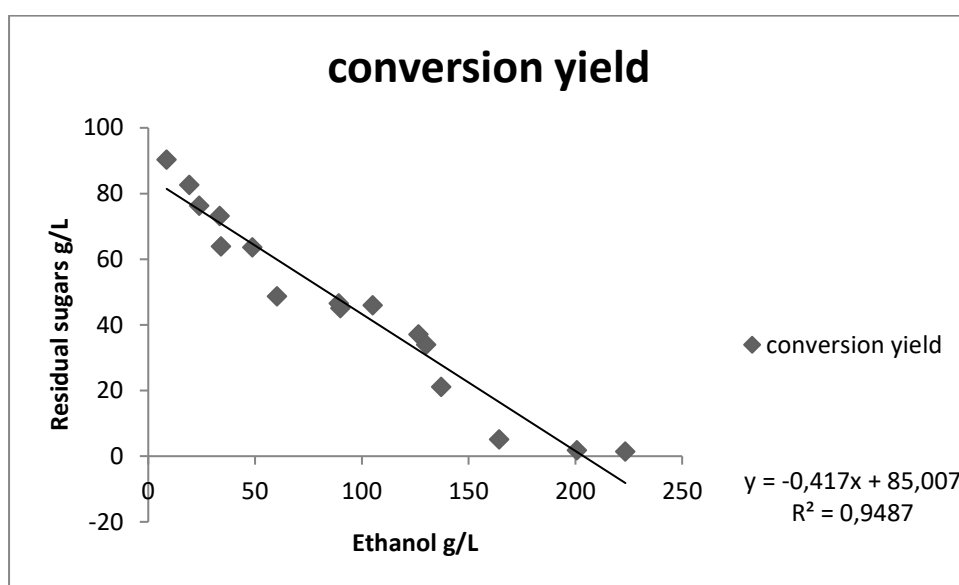
Σχήμα 2 Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.



Σχήμα 3 Ο ρυθμός κατανάλωσης της φρουκτόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.

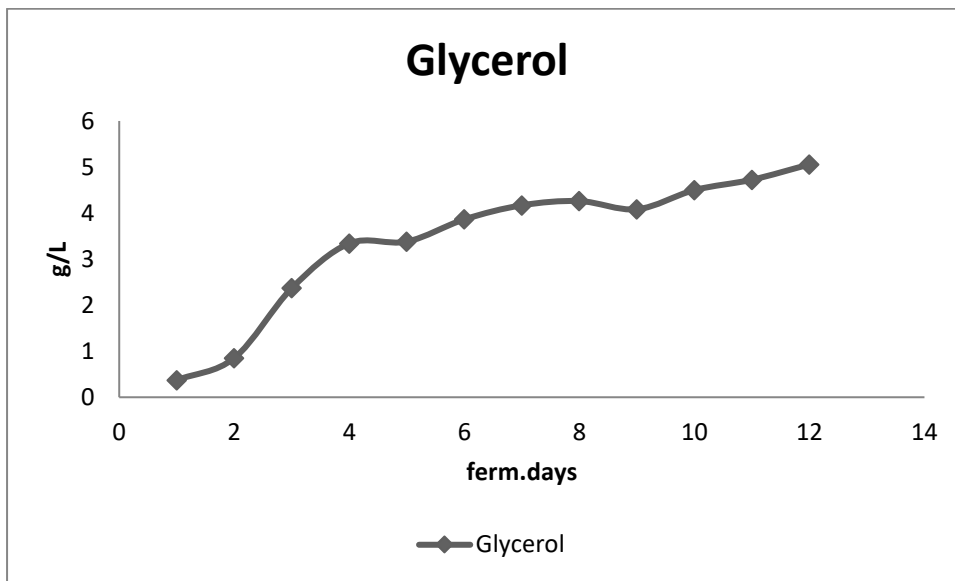
Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης στην πορεία ολόκληρης της ζύμωσης ήταν 4,92 g/L/ημέρα ενώ της φρουκτόζης 7,52 g/L/ημέρα. Ρυθμός σχεδόν διπλάσιος σε σχέση με

της γλυκόζης, αποτελώντας την πρώτη ένδειξη για υπερίσχυση πιο φρουκτόφιλων στελεχών ζυμών κατά την αυθόρμητη ζύμωση. Αυτό φαίνεται να βρίσκεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, στην οποία υποστηρίζεται η κυριαρχία *non Saccharomyces* στελεχών στις αυθόρμητες ζυμώσεις που συνήθως παρουσιάζουν πιο έντονα φρουκτόφιλο χαρακτήρα (Benedict et al., 2011, Raymon Eder & Rosa 2021).



Σχήμα 4 Η απόδοση της αιθανόλης σε σχέση με την κατανάλωση σακχάρων.

Ο συντελεστής μετατροπής αιθανόλης ανά μονάδα σακχάρων για την αυθόρμητη ζύμωση έφτασε τα 0,42 g/g. Η τιμή αυτή για την αυθόρμητη ζύμωση είναι δικαιολογημένη, δεδομένου ότι ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης ανέρχεται στα 0,51 g/g (Sarris & Papanikolaou, 2016). Λαμβάνοντας υπόψη το πλήθος στελεχών που μπορεί να συνυπάρχουν σε μία τέτοια ζύμωση, και ειδικότερα τα *non- Saccharomyces* στελέχη που χαρακτηρίζονται από μικρότερους συντελεστές απόδοσης, η τιμή αυτή είναι λογικό να είναι μικρότερη της μέγιστης θεωρητικής τιμής (Garcia Esteve- Zarzoso & Arroyo, 2016).



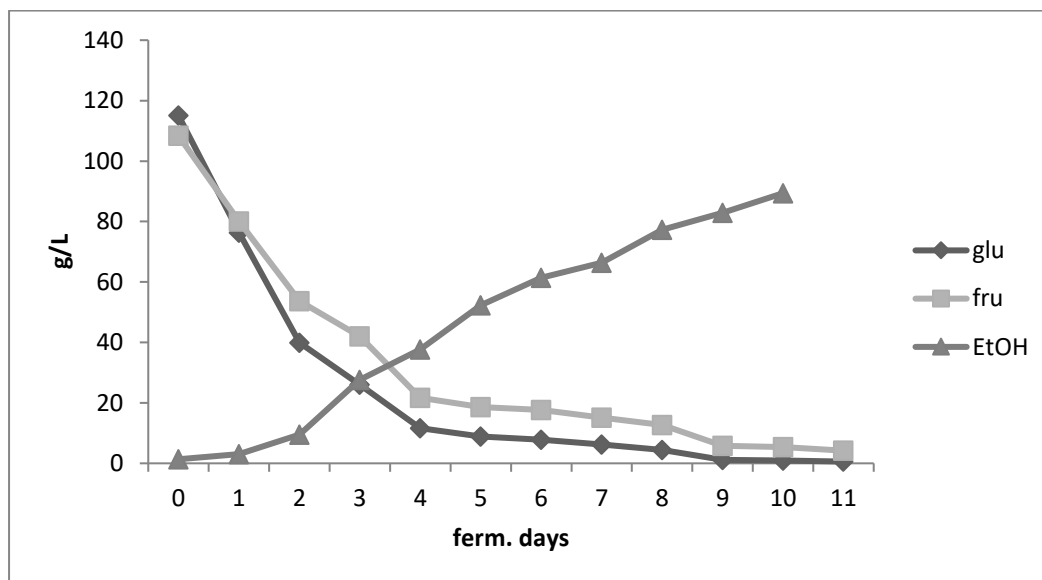
Σχήμα 5 Η παραγωγή γλυκερόλης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.

Ο μέσος όρος για την παραγωγή γλυκερόλης στις αυθόρμητες ζυμώσεις ήταν 5,05 g/L, τιμή μικρότερη από το κατώφλι αντίληψης (5,2 g/L) όπως έχει προκύψει από οργανοληπτικές δοκιμές (Michnick et al., 1997; Remize et al., 2000). Με βάση τη βιβλιογραφία, οι τιμές γλυκερόλης μπορούν να κυμανθούν από σχεδόν μηδενικές μέχρι και 14 g/L (Zhao, Procorio & Becker, 2015). Τα επίπεδα γλυκερόλης εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία ζύμωσης, η επιλογή στελέχους κ.α. (Iviti, Longo & Kemp, 2020). Μπορεί στις αυθόρμητες ζυμώσεις να λαμβάνουν μέρος αρκετά *non- Saccharomyces* στελέχη που φαίνεται να ευνοούν την παραγωγή γλυκερόλης, ωστόσο οι χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνεται να έπαιξαν πιο καθοριστικό ρόλο στην τελική τιμή, περιορίζοντάς την σε μεσαία επίπεδα.

Το στέλεχος Y54

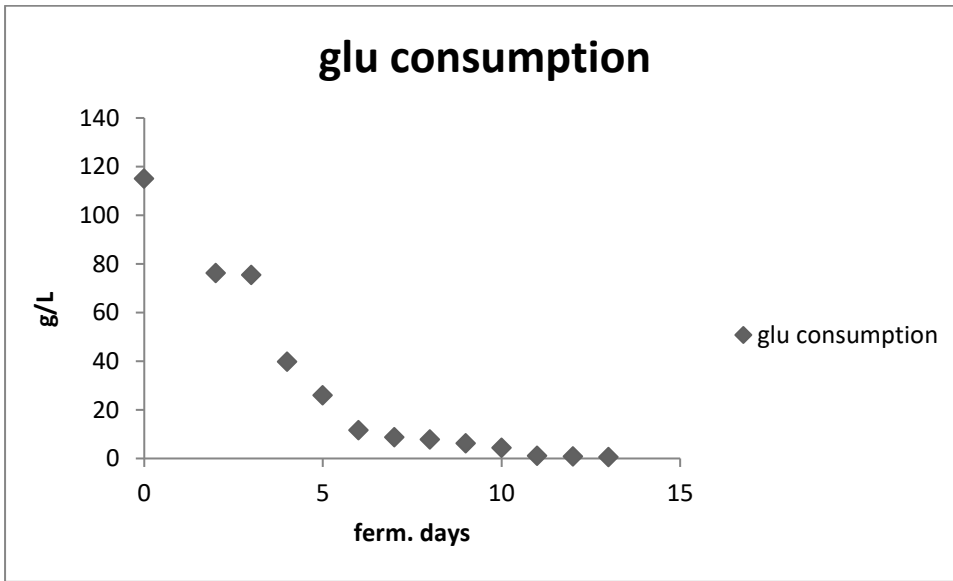
Το προφίλ ζυμωτικής ικανότητας του στελέχους Y54 παρουσίασε ομοιότητες ως προς την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης (AZ) με τις αυθόρμητες ζυμώσεις, αφού παρουσίασε καθυστέρηση 48 ωρών για την έναρξή της. Ωστόσο η διάρκεια της AZ ήταν 26 ημέρες (8 ημέρες πιο σύντομη από την αυθόρμητη). Ο κτηθής αλκοολικός τίτλος έφτασε τα 13,0 % vol., τα ανάγοντα σάκχαρα τα 3,2 g/L και η πτητική οξύτητα τα 0,84 g/L οξικού οξέος. Όταν οι συγκεντρώσεις του οξικού οξέος προσεγγίσουν το

κατώφλι αντίληψης (0,7- 1,1 g/L) έχουν αρνητικό αντίκτυπο στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου (Lambrechts and Pretorius, 2000).

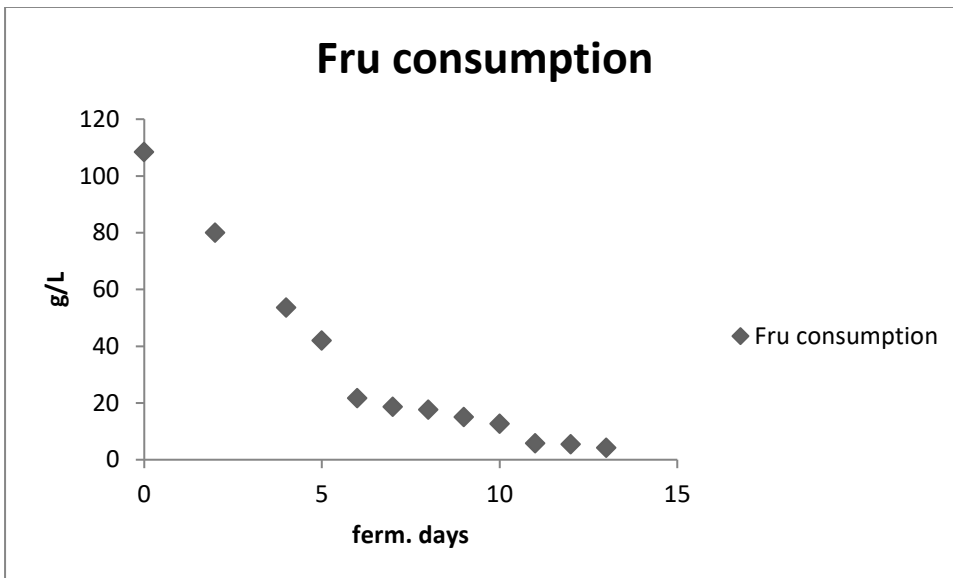


Σχήμα 6 Η κινητική ζύμωσης για το στέλεχος Y54.

Η συγκέντρωση γλυκόζης και φρουκτόζης έφτασε ταυτόχρονα το 50% μετά από 4 ημέρες ζύμωσης (Σχήμα 7). Η κατανάλωση της φρουκτόζης έγινε 2 μέρες μετά από της γλυκόζης (Σχήμα 6, Σχήμα 7). Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε 9 ημέρες πιο σύντομα από την αυθόρμητη κάτι το οποίο είναι λογικό όταν χρησιμοποιείται ένας μεγάλος πληθυσμός ζυμομυκήτων ως εναρκτήρια καλλιέργεια. Η μειωμένη ανταγωνιστικότητα των στελεχών *non- Saccharomyces* και η καθυστέρηση ολοκλήρωσης ή και η αποτυχία ζύμωσης οφείλεται κυρίως στην έλλειψη υψηλής ζυμοτικής ικανότητας και στη δυσκολία αντοχής σε συνθήκες στρες συγκριτικά με στελέχη *S. Cerevisiae* (Fleet et al., 1984, Parrish and Carroll, 1985).

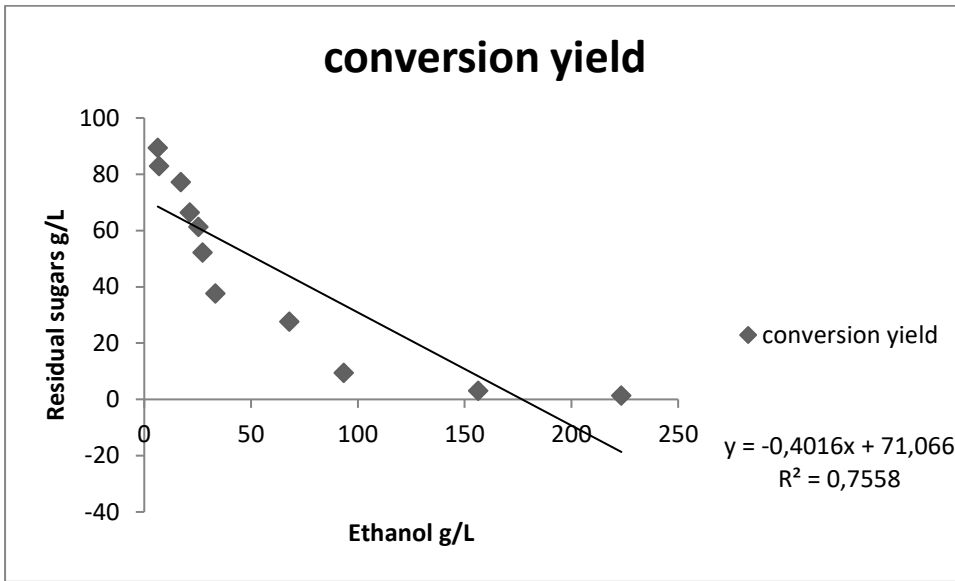


Σχήμα 7 Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.



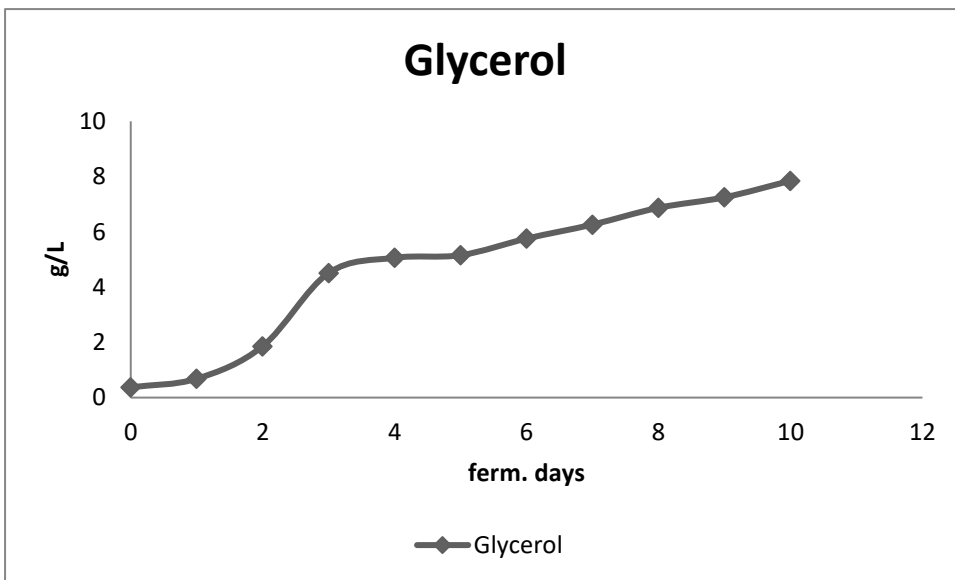
Σχήμα 8 Ο ρυθμός κατανάλωσης της φρουκτόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.

Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης είναι 8,19 g/L/ημέρα, σχεδόν ίδιο με της φρουκτόζης που ήταν 7,63 g/L/ημέρα κάτι το οποίο φανερώνει ότι η κατανάλωση σακχάρων έγινε σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό και στα δύο σάκχαρα, με μεγαλύτερη ωστόσο προτίμηση στη γλυκόζη καθώς καταναλώθηκε πλήρως 2 ημέρες νωρίτερα από τη φρουκτόζη (Σχήμα 6, Σχήμα 7).



Σχήμα 9 Η απόδοση της αιθανόλης σε σχέση με την κατανάλωση σακχάρων.

Ο συντελεστής μετατροπής αιθανόλης ανά μονάδα σακχάρων για το στέλεχος Y54 έφτασε τα 0,40 g/g. Η τιμή αυτή είναι σχεδόν ίδια με εκείνη της αυθόρμητης ζύμωσης (0,42 g/g).



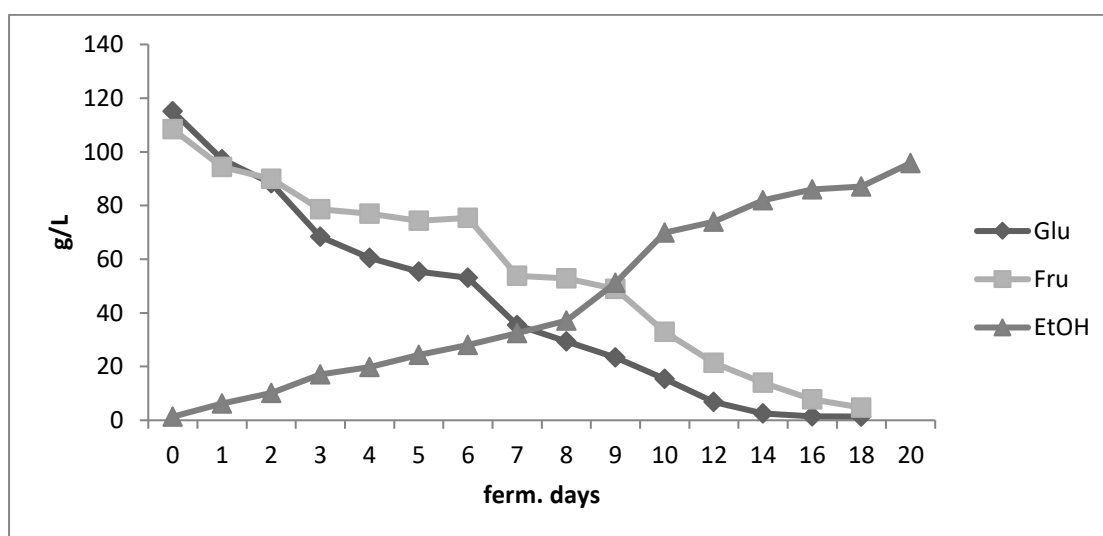
Σχήμα 10 Η παραγωγή γλυκερόλης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.

Ο μέσος όρος παραγωγής γλυκερόλης από τις ζυμώσεις με το στέλεχος Y54 ήταν τα 7,8 g/L, αρκετά μεγαλύτερος από εκείνον των αυθόρμητων ζυμώσεων (5,05 g/L) και ο υψηλότερος συγκριτικά με τα υπόλοιπα απομονωμένα στελέχη. Όπως αναφέρθηκε

παραπάνω τα επίπεδα γλυκερόλης εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Δεδομένου ότι τηρήθηκε κοινό πρωτόκολλο οινοποίησης και ίδιες θερμοκρασίες ζύμωσης, η διαφοροποίηση οφείλεται κατά κύριο λόγο στην επιλογή στελέχους. Η αυξημένη παραγωγή γλυκερόλης έρχεται σε συμφωνία με αντίστοιχη οινοποίηση σε ποικιλία Μαυροτράγανο σε σύγκριση με άλλα στελέχη (Μπασά, 2020).

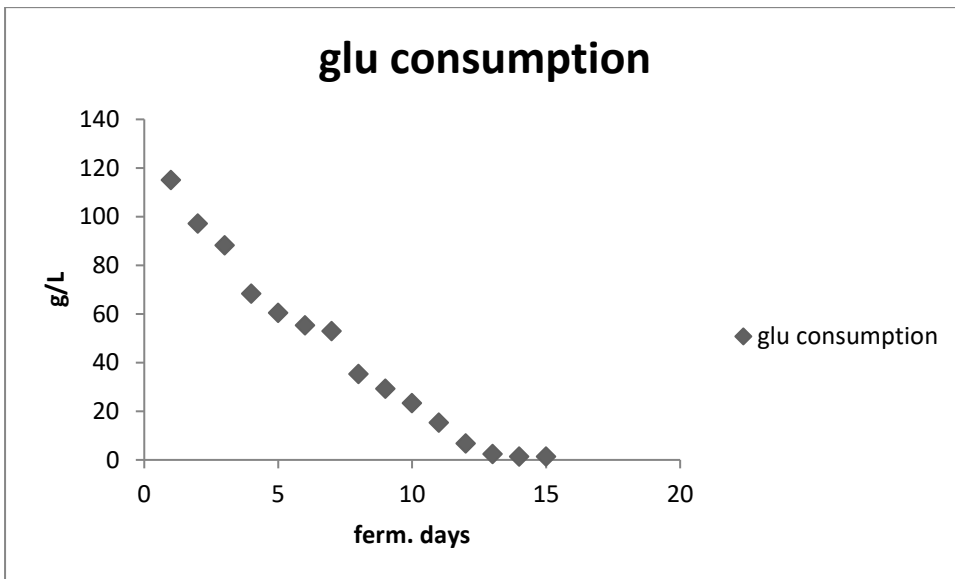
Το στέλεχος Sc13

Η αλκοολική ζύμωση του στελέχους Sc13 ξεκίνησε 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό, μία ημέρα συντομότερα από την αυθόρμητη ζύμωση και από εκείνη που ολοκληρώθηκε από το στέλεχος Y54. Η διάρκεια της (AZ) ήταν 30 ημέρες, κατά 4 ημέρες πιο σύντομα από την αυθόρμητη ζύμωση. Ο κτηθής αλκοολικός τίτλος έφτασε τα 13,1 % vol., τα ανάγοντα σάκχαρα τα 2 g/L και η πτητική οξύτητα τα 0,68 g/L οξικού οξέος .

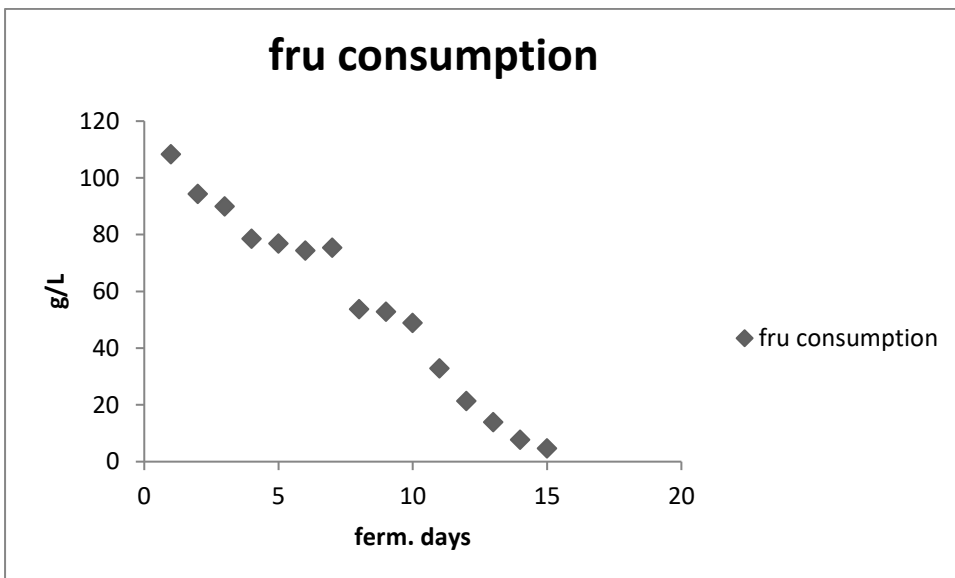


Σχήμα 11 Η κινητική ζύμωσης του στελέχους Sc13.

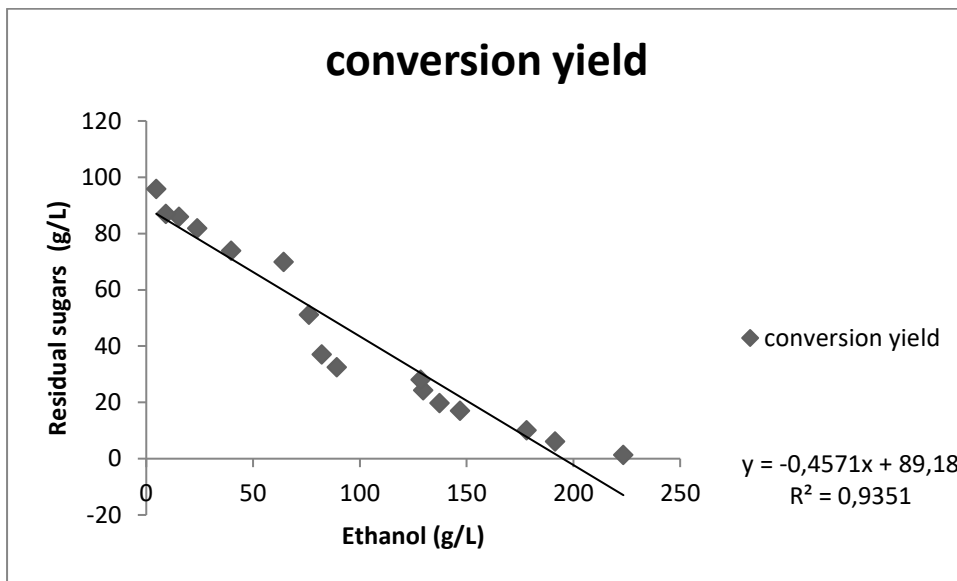
Η συγκέντρωση της γλυκόζης αλλά και της φρουκτόζης έφτασε το 50 % της αρχικής, την έβδομη ημέρα ζύμωσης (Σχήμα 11). Η πλήρης κατανάλωση της φρουκτόζης έγινε με διαφορά 2 ημερών από εκείνη της γλυκόζης, την 28^η και 30^η ημέρα αντίστοιχα (Σχήμα 12, Σχήμα 13), 10 ημέρες αργότερα από την αυθόρμητη ζύμωση. Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης είναι 8,1 g/L/ημέρα ενώ της φρουκτόζης ήταν 7,36 g/L/ημέρα.



Σχήμα 12 Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.

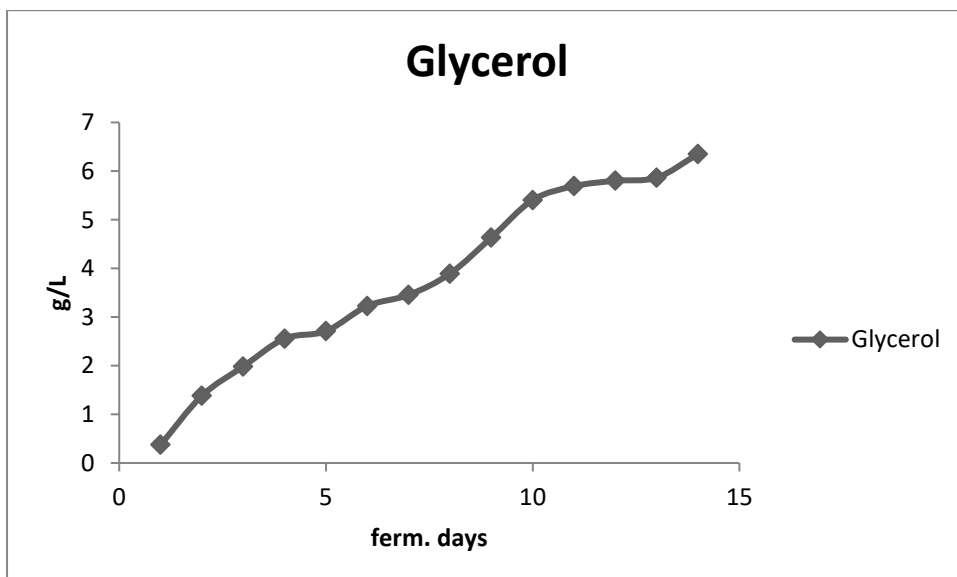


Σχήμα 13 Ο ρυθμός κατανάλωσης φρουκτόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.



Σχήμα 14 Η απόδοση της αιθανόλης σε σχέση με την κατανάλωση σακχάρων.

Ο συντελεστής μετατροπής αιθανόλης ανά μονάδα σακχάρων για το στέλεχος Sc13 έφτασε τα 0,46 g/g προσεγγίζοντας σημαντικά το μέγιστο συντελεστή απόδοσης που ανέρχεται στα 0,51 g/g (Sarris & Papanikolaou, 2016). Συγκριτικά τόσο με τον συντελεστή μετατροπής της αυθόρμητης ζύμωσης όσο και με εκείνους των άλλων 2 συμμετεχόντων στελεχών ήταν ο υψηλότερος.



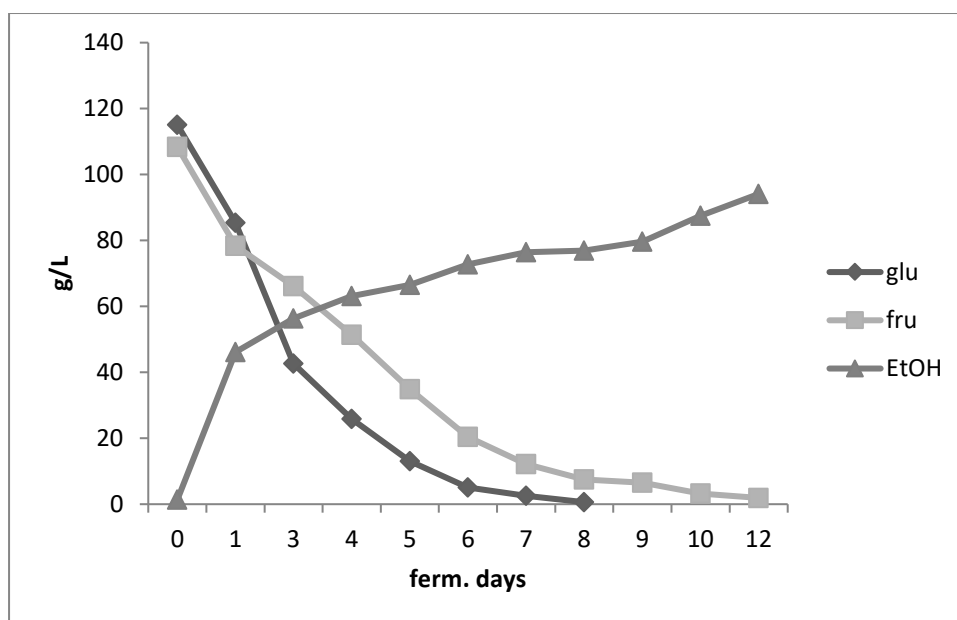
Σχήμα 15 Η παραγωγή γλυκερόλης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.

Ο μέσος όρος για την παραγωγή γλυκερόλης στο στέλεχος Sc13 ήταν τα 6,4 g/L, τιμή

μεγαλύτερη από εκείνη της αυθόρμητης ζύμωσης. Σε σχέση με όλα τα στελέχη που συμμετείχαν σημείωσε τη δεύτερη υψηλότερη συγκέντρωση μετά το Y54 (7,8g/L).

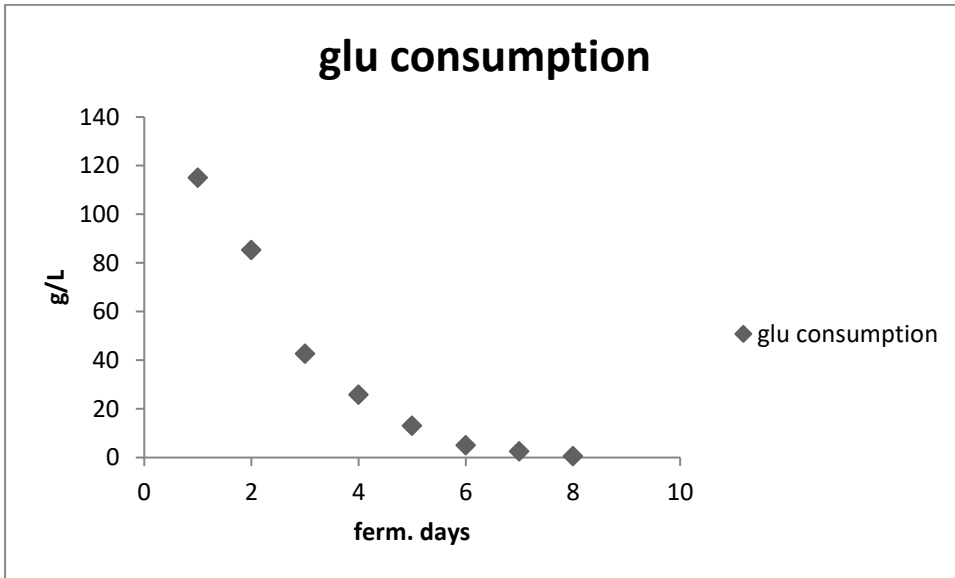
Το στέλεχος Sc9

Στην περίπτωση του στελέχους Sc9 η ζύμωση ξεκίνησε μία ημέρα μετά τον εμβολιασμό, παρόμοια με το Sc13 και διήρκησε για 16 ημέρες. Σε σχέση με την αυθόρμητη αποζύμωσε 18 ημέρες νωρίτερα. Ο κτηθής αλκοολικός τίτλος έφτασε τα 13,1 % vol. , τα ανάγοντα σάκχαρα τα 2 g/L και η πτητική οξύτητα τα 0,5 g/L οξικού οξέος .

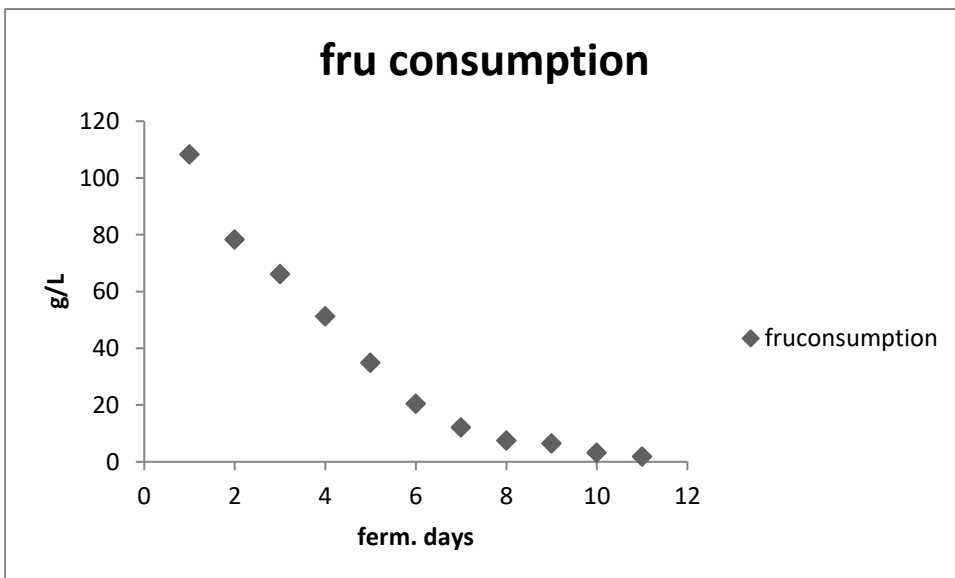


Σχήμα 16 Η κινητική ζύμωσης του στελέχους Sc9.

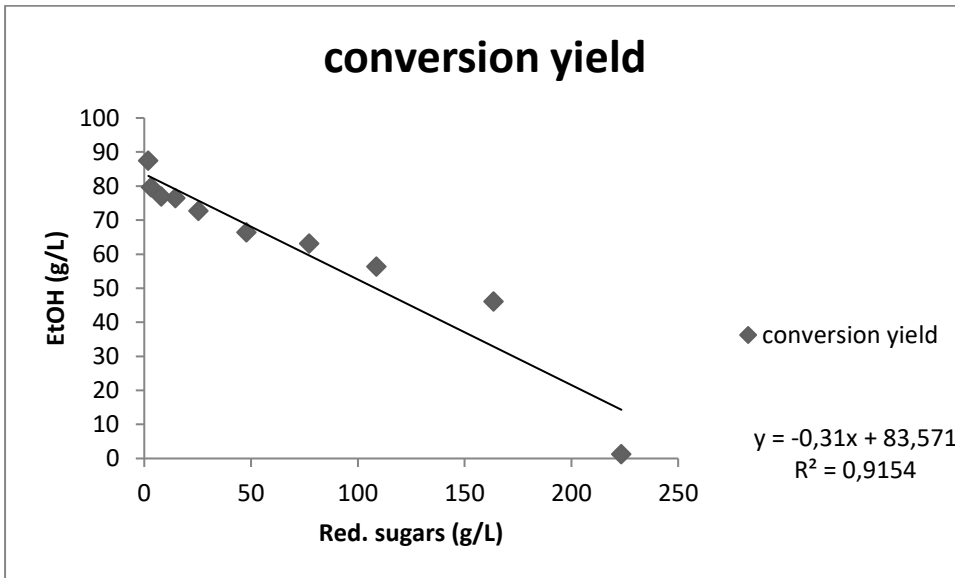
Κατά την αλκοολική ζύμωση για το στέλεχος Sc9 η κατανάλωση γλυκόζης και φρουκτόζης έφτασαν στο 50% την 2^η και την 3^η ημέρα αντίστοιχα (Σχήμα 16). Την 8^η ημέρα η γλυκόζη είχε καταναλωθεί πλήρως (Σχήμα 17), ενώ η κατανάλωση φρουκτόζης ολοκληρώθηκε την 14^η μέρα, 6 ημέρες αργότερα από τη γλυκόζη (Σχήμα 18). Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης είναι 15,96 g/L/ημέρα με μεγάλη διαφορά από εκείνον της φρουκτόζης που ήταν 10,2 g/L/ημέρα κάτι το οποίο φανερώνει ότι καταναλώνει σχεδόν 2 φορές γρηγορότερα τη γλυκόζη (Σχήμα 17, Σχήμα 18). Συνεπώς η πλήρης κατανάλωση των σακχάρων γίνεται τη 14^η ημέρα, 1 εβδομάδα νωρίτερα σε σχέση με την αυθόρμητη ζύμωση.



Σχήμα 17 Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.

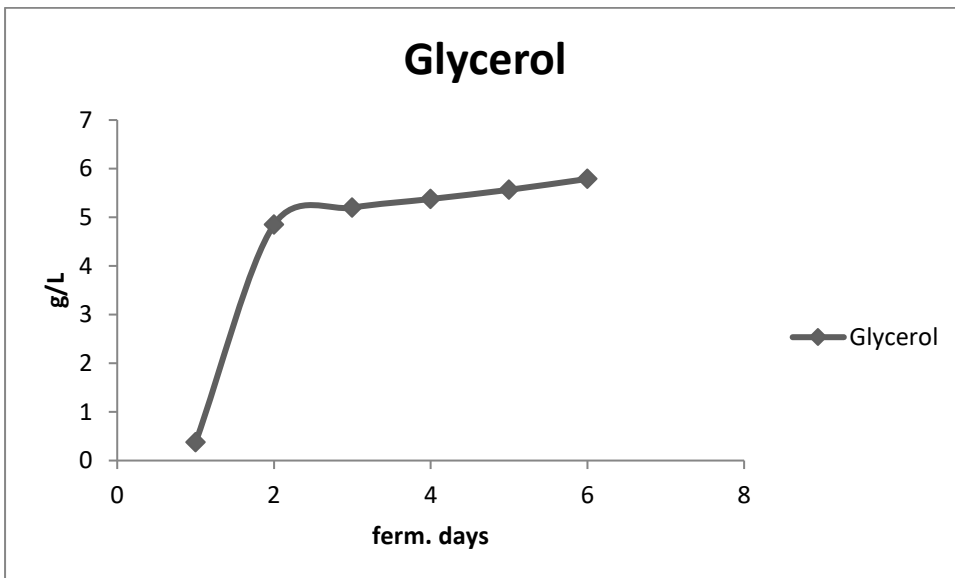


Σχήμα 18 Ο ρυθμός κατανάλωσης φρουκτόζης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.



Σχήμα 19 Η απόδοση της αιθανόλης σε σχέση με την κατανάλωση σακχάρων.

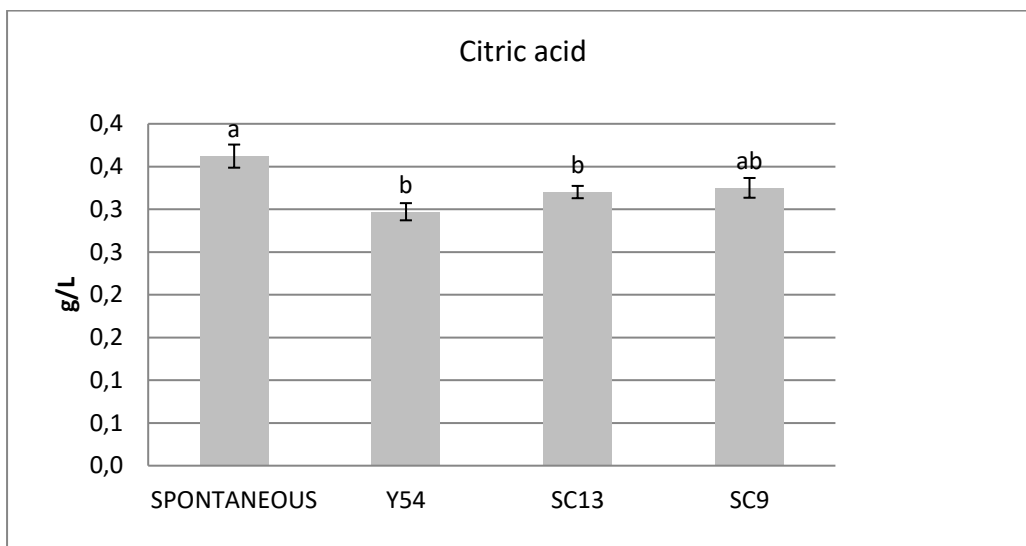
Ο συντελεστής μετατροπής αιθανόλης ανά μονάδα σακχάρων για την ζύμωση με το στέλεχος Sc9 έφτασε τα 0,31 g/g. Η τιμή αυτή ήταν χαμηλότερη τόσο σε σχέση με την αυθόρμητη ζύμωση (0.42 g/g) όσο και με τα άλλα δύο στελέχη (Y54, Sc13).



Σχήμα 20 Η παραγωγή γλυκερόλης σε σχέση με τις ημέρες ζύμωσης.

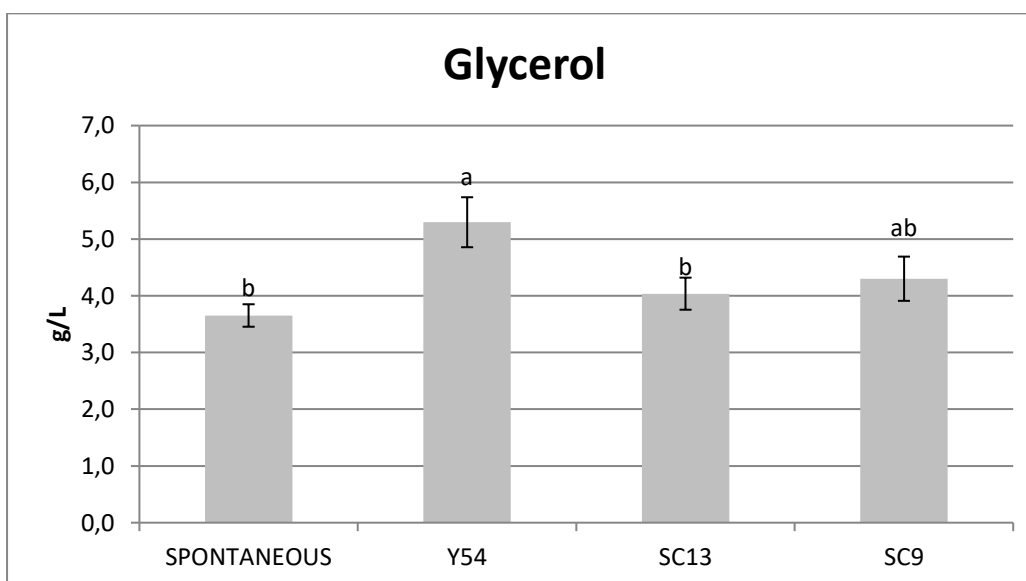
Ο μέσος όρος για την παραγωγή γλυκερόλης για το στέλεχος Sc9 έφτασε τα 5,8 g/L ξεπερνώντας το επίπεδο παραχθείσας γλυκερόλης της αυθόρμητης ζύμωσης (5,05 g/L).

Στη συνέχεια έγινε σύγκριση με στατιστική ανάλυση μεταξύ των διαφορετικών ζυμώσεων ως προς τις συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν από τα αποτελέσματα της HPLC.



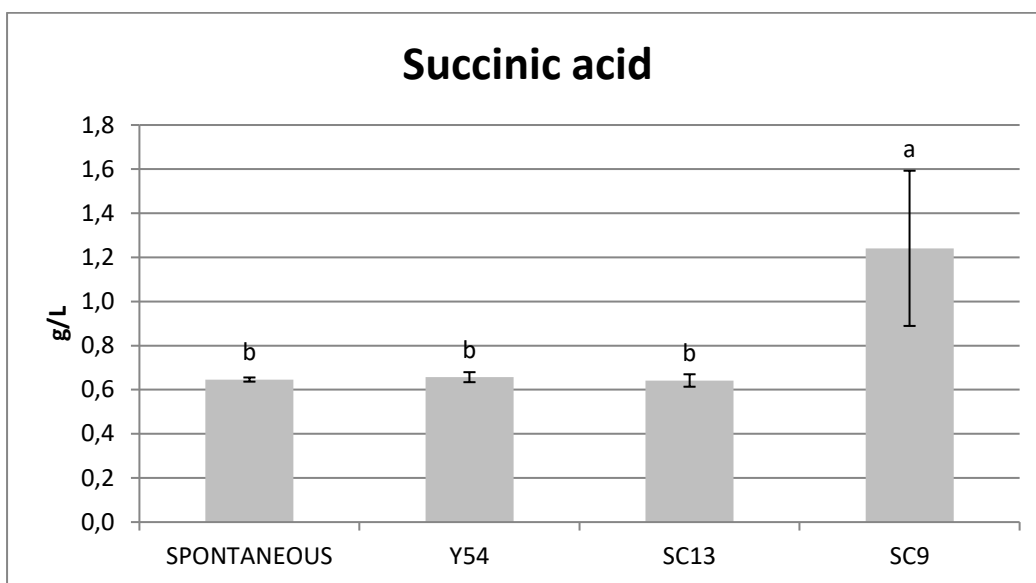
Σχήμα 21 Τελικές συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος ανά στέλεχος.

Σύμφωνα με το Σχήμα 21, η μεγαλύτερη συγκέντρωση κιτρικού οξέος πραγματοποιήθηκε από την αυθόρμητη ζύμωση και διέφερε στατιστικά σημαντικά από τα στελέχη Y54 και Sc13.



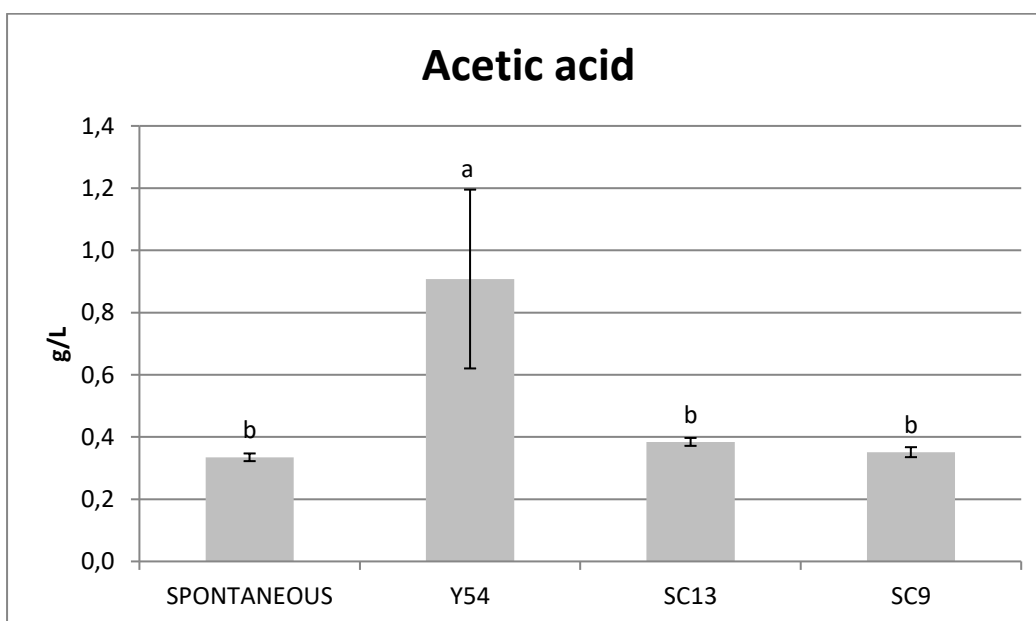
Σχήμα 22 Η τελική συγκέντρωση γλυκερόλης ανά στέλεχος.

Το στέλεχος με τη μεγαλύτερη παραγωγή γλυκερόλης ήταν το Y54 και ήταν το μόνο στέλεχος που διέφερε στατιστικώς σημαντικά από την αυθόρμητη ζύμωση. Ωστόσο αυτή η τιμή δεν επαληθεύεται από την οργανοληπτική δοκιμή στη Σαντορίνη όπου και συμμετείχε καθώς το δείγμα ήταν αρκετά οξειδωμένο έτσι ώστε να αξιολογηθεί ορθά.



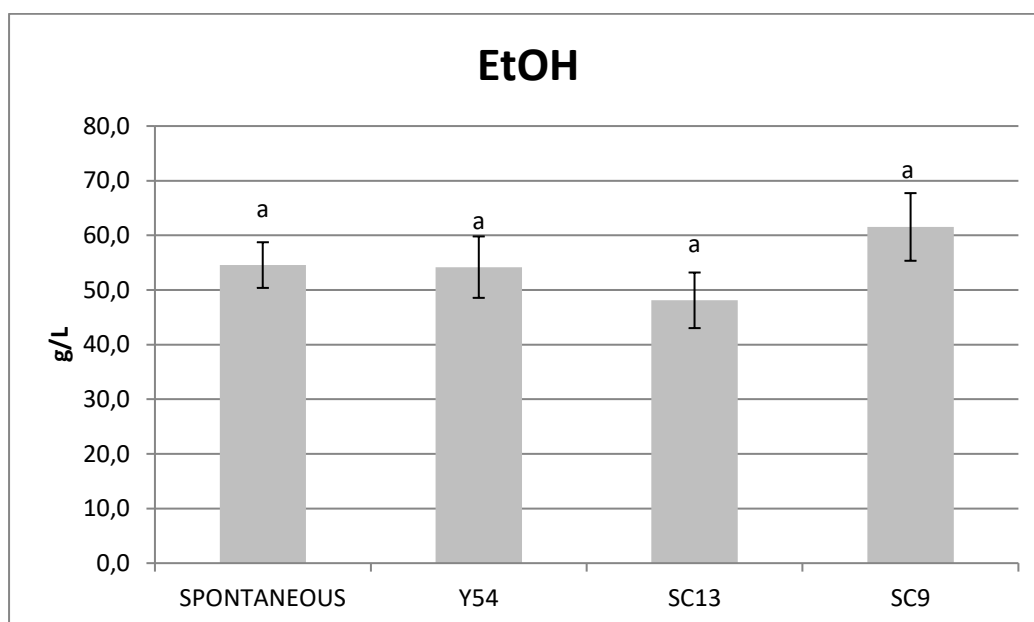
Σχήμα 23 Η τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος ανά στέλεχος.

Η μεγαλύτερη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος έγινε από το Sc9 και ήταν στατιστικά σημαντική από όλα τα υπόλοιπα στελέχη (Σχήμα 23).



Σχήμα 24 Η τελική συγκέντρωση οξικού οξέος ανά στέλεχος.

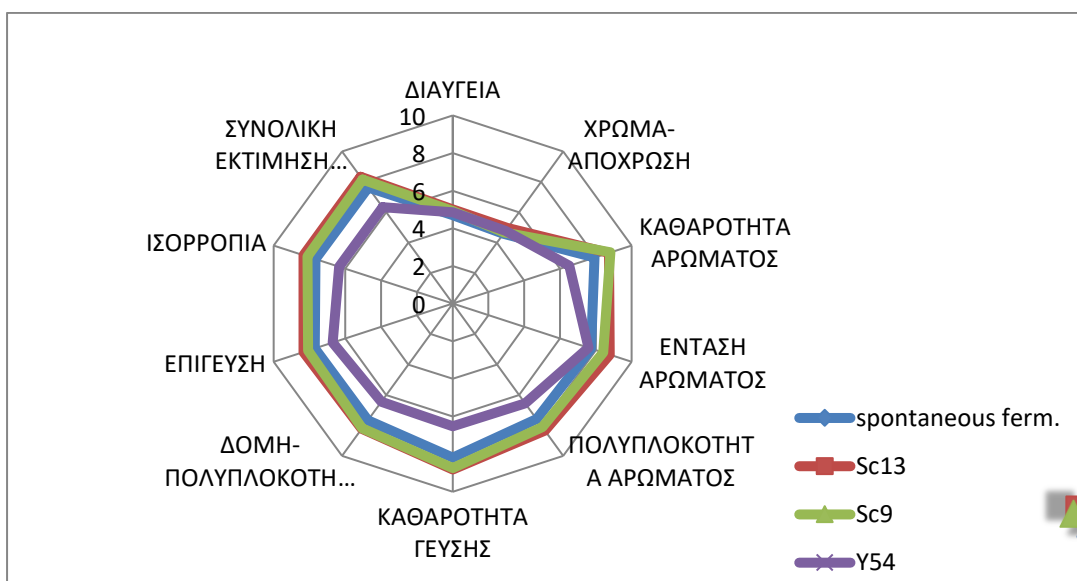
Στο παραπάνω σχήμα (Σχήμα 24) παρατηρούμε ότι το Y54 παρήγαγε τη μεγαλύτερη ποσότητα οξικού οξέος με στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σχεδόν μη αποδεκτά όρια ενώ τα υπόλοιπα στελέχη έμειναν εντός επιτρεπτών ορίων. Αυτή η τιμή μέτρησης του οξικού οξέος έρχεται σε συμφωνία με την οργανοληπτική δοκιμή όπως θα παρουσιαστεί στη συνέχεια, καθώς το δείγμα συγκέντρωσε τη χαμηλότερη βαθμολογία στην παράμετρο καθαρότητα αρώματος, ωστόσο στην ένταση αρώματος συγκέντρωσε παρόμοια βαθμολογία με τα υπόλοιπα στελέχη. Αυτό αποτέλεσε και την αιτία αποκλεισμού του από την επόμενη οργανοληπτική δοκιμή που διεξήχθη στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.



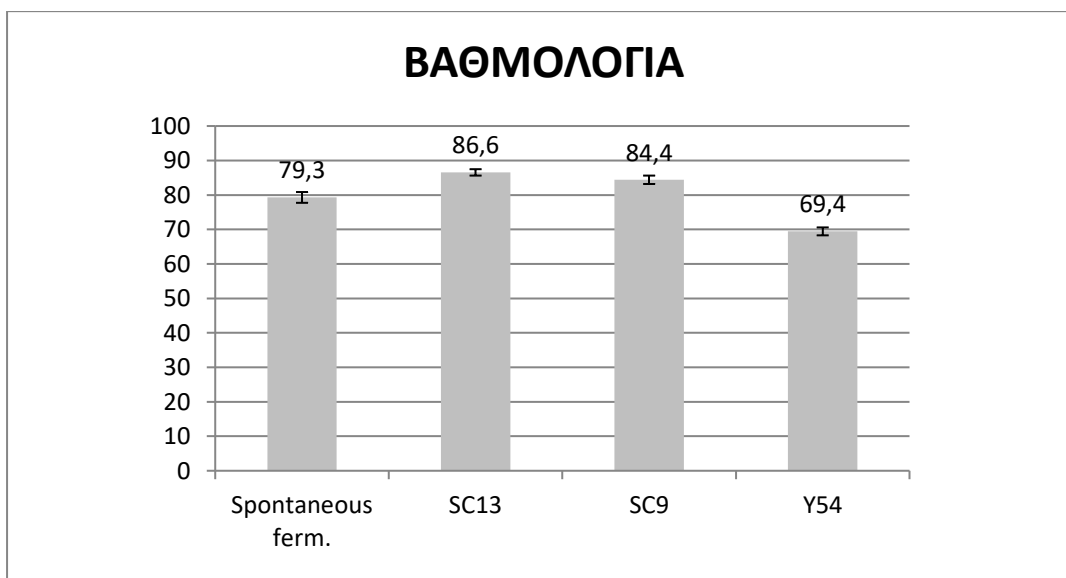
Σχήμα 25 Η συγκέντρωση αιθανόλης ανά στέλεχος.

Όλοι οι παραγόμενοι οίνοι είχαν ολικό αλκοολικό τίτλο ανώτερο του 13,0 % χωρίς κανένα στέλεχος να διαφέρει στατιστικά σημαντικά ως προς την τελική παραγωγή αιθανόλης.

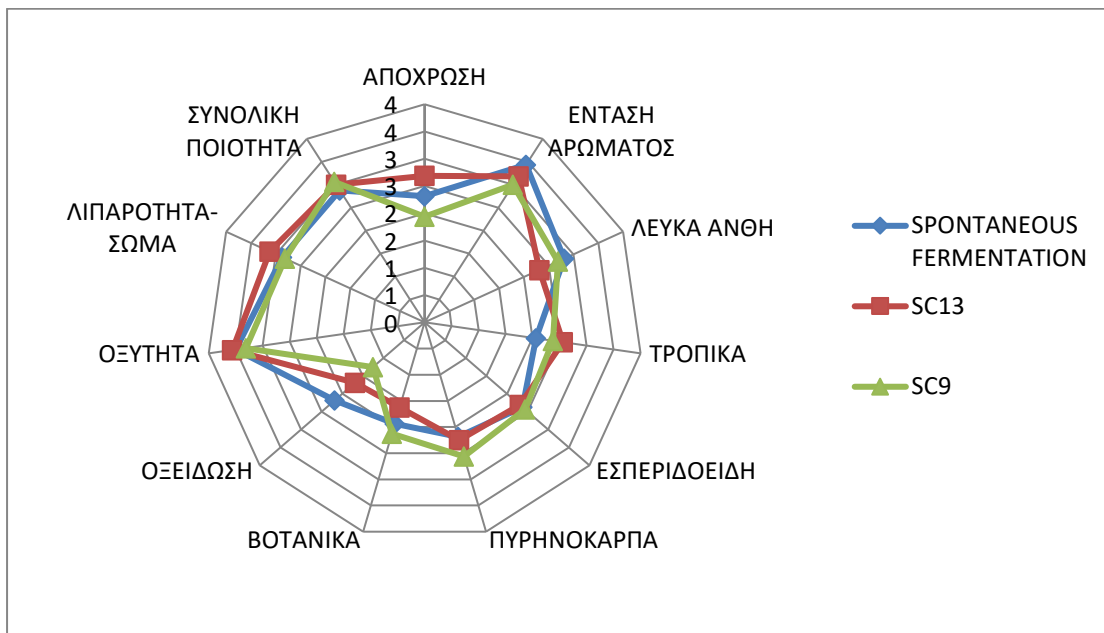
Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου



Σχήμα 26 Το αραχνόγραμμα απεικονίζει τους μέσους όρους από 27 δοκιμαστές σε αξιολόγηση δέκα παραγόντων σχετικούς με την ποιότητα του οίνου στις 4/11/21 στη Σαντορίνη.



Σχήμα 27 Η βαθμολογία που συγκέντρωσε κάθε στέλεχος από τους μέσους όρους 27 δοκιμαστών στις 4/11/21.



Σχήμα 28 Το αραχνόγραμμα απεικονίζει τους μέσους όρους από 8 εκπαιδευμένους δοκιμαστές σε αξιολόγηση έντεκα παραγόντων σχετικούς με την ποιότητα του οίνου.

Η αξιολόγηση που απεικονίζεται στο Σχήμα 28, έγινε στις 3/03/22 στο εργαστήριο Οινολογίας και αλκοολούχων ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι οίνοι είναι διανυγείς ωστόσο υπάρχουν διαφορές κυρίως στο αρωματικό προφίλ από την πρώτη δοκιμή. Επιπλέον απουσιάζει το δείγμα Y54 καθώς είχε υποβαθμισμένο οργανοληπτικό προφίλ από την πρώτη κιάλας δοκιμή.

Παρακάτω αναφέρονται τα αποτελέσματα των ερωτηματολογίων που προέκυψαν μέσω του Tuckey's test αντίστοιχα από κάθε δοκιμή.

Από τον οργανοληπτικό στις 4/11/21 στη Σαντορίνη.

1η Ερώτηση: Διαύγεια

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα πρώτης ερώτησης που αφορούσε στη διαύγεια .

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	4,7 ± 0,14	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	4,85 ± 0,10	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	5,0 ± 0,00	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	4,93 ± 0,07	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

2η Ερώτηση: Απόχρωση- χρώμα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα δεύτερης ερώτησης που αφορούσε στην απόχρωση - χρώμα.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	4,59 ± 0,17	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	4,78 ± 0,15	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	4,67 ± 0,14	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	4,96 ± 0,04	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

3η Ερώτηση: Καθαρότητα αρώματος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι του Sc9 και του Sc13 κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο, ενώ η αυθόρμητη ζύμωση και το Y54 διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τα παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα το Y54 αλλά και σε μικρότερο βαθμό η αυθόρμητη ζύμωση είχαν εμφανίσει τριτογενή και οξειδωτικά αρώματα σε τέτοιο βαθμό που κάλυπτε τον ποικιλιακό αρωματικό τους χαρακτήρα.

Αποτελέσματα τρίτης ερώτησης που αφορούσε στην καθαρότητα αρώματος.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,93 ± 0,21	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,52 ± 0,17	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,81 ± 0,19	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,74 ± 0,19	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b,c : υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

4η Ερώτηση: Ένταση αρώματος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 καθώς και τα Y54 με την αυθόρμητη ζύμωση μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Ωστόσο οι μέσοι όροι των Sc9 και Sc13 διέφεραν από αυτούς του Y54 και της αυθόρμητης. Συνεπώς στην ένταση του αρώματος φαίνεται να υπερτερεί το *S. cerevisiae* Sc13.

Αποτελέσματα τέταρτης ερώτησης που αφορούσε στην ένταση αρώματος.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,74 ± 0,15	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	7,59 ± 0,23	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,41 ± 0,14	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,78 ± 0,11	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

5η Ερώτηση: Πολυπλοκότητα αρώματος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά διέφεραν ως προς την αυθόρμητη ζύμωση και το Y54.

Αποτελέσματα πέμπτης ερώτησης που αφορούσε στην πολυπλοκότητα του αρώματος.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,59 ± 0,15	c
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,56 ± 0,12	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,11 ± 0,11	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,33 ± 0,15	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

6η Ερώτηση: Καθαρότητα γεύσης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9, Sc13 και η αυθόρμητη μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά διέφεραν από το Y54 το οποίο είχε υποστεί οξείδωση υπερκαλύπτοντας οποιοδήποτε άλλο άρωμα.

Αποτελέσματα έκτης ερώτησης που αφορούσε στην καθαρότητα γεύσης.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	8,19 ± 0,23	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,52 ± 0,17	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,74 ± 0,2	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,82 ± 0,17	a

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

7η Ερώτηση: Ένταση γεύσης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα της αυθόρμητης ζύμωσης με του Sc9 και του Sc9 με το Sc13 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Ωστόσο όλα τα παραπάνω διαφέρουν από το Y54.

Αποτελέσματα έβδομης ερώτησης που αφορούσε στην ένταση της γεύσης.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,89 ± 0,22	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,82 ± 0,2	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,22 ± 0,16	ab
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,7 ± 0,18	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

8η Ερώτηση: Δομή- πολυπλοκότητα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα της αυθόρμητης ζύμωσης, του Sc9 και του Sc13 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ όλα διαφέρουν ως προς το Y54.

Αποτελέσματα όγδοης ερώτησης που αφορούσε στην δομή και πολυπλοκότητα.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,67 ± 0,19	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,44 ± 0,13	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,19 ± 0,18	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,22 ± 0,18	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

9η Ερώτηση: Επίγευση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 καθώς και η αυθόρμητη με το Sc9 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά διαφέρουν από το Y54.

Αποτελέσματα ένατης ερώτησης που αφορούσε στην επίγευση.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,7 ± 0,19	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,7 ± 0,18	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,07 ± 0,16	ab
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,33 ± 0,14	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

10η Ερώτηση: Ισορροπία

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 καθώς και η αυθόρμητη με το Sc9 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά διαφέρουν από το Y54.

Αποτελέσματα δέκατης ερώτησης που αφορούσε στην ισορροπία.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,67 ± 0,18	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,33 ± 0,11	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,11 ± 0,17	ab
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,33 ± 0,13	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

11η Ερώτηση: Συνολική εκτίμηση ποιότητας

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 καθώς και η αυθόρμητη με το Sc9 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά διαφέρουν από το Y54.

Αποτελέσματα ενδέκατης ερώτησης που αφορούσε στη συνολική εκτίμηση ποιότητας.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,63 ± 0,17	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,33 ± 0,09	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,15 ± 0,15	ab
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,33 ± 0,14	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

12η Ερώτηση: Συνολική βαθμολογία

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά και οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο, αλλά διέφεραν ως προς την αυθόρμητη ζύμωση και το Y54.

Αποτελέσματα δωδέκατης ερώτησης που αφορούσε στη συνολική βαθμολογία.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	79.3 ± 1,57	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	69.44 ± 1.15	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	84.41 ± 1.22	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	86.56 ± 0,93	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

Συμπερασματικά οι διαφορές που διαπιστώθηκαν είχαν να κάνουν με την καθαρότητα, την ένταση και την πολυπλοκότητα του αρώματος, όπως και με την καθαρότητα και την ένταση γεύσης, την δομή και πολυπλοκότητα, την ισορροπία, την επίγευση και τη συνολική εκτίμηση. Το στέλεχος *S. cerevisiae* Y54 συγκέντρωσε τις χαμηλότερες βαθμολογίες σε όλα τα παραπάνω με στατιστικά σημαντική διαφορά και χαρακτηρίστηκε οξειδωμένο τόσο στα αρώματα όσο και στη γεύση. Αντιθέτως, το στέλεχος *S. cerevisiae* Sc13, τόσο ως προς τη συνολική εκτίμηση ποιότητας αλλά και την τελική βαθμολογία που συγκέντρωσε, όσο και από όλα τα παραπάνω, φαίνεται να υπερτερεί έναντι της αυθόρμητης και του *S. cerevisiae* Y54. Ωστόσο αν και είχε τη μεγαλύτερη βαθμολογία η οποία αντιστοιχούσε και σε μέταλλιο (>85%) δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από το *S. cerevisiae* Sc9.

Οργανοληπτικός στο εργαστήριο Οινολογίας και αλκοολούχων ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Εν συνεχεία, παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας του συνόλου των χαρακτηριστικών των οίνων, από το σύνολο 8 των δοκιμαστών. Αρχικά το κάθε δείγμα βαθμολογήθηκε για κάθε ένα από τα χαρακτηριστικά του από και 8 αξιολογητές αντίστοιχα. Η δοκιμασία των δειγμάτων έγινε εις τριπλούν από κάθε δοκιμαστή.

Στα αποτελέσματα των αναλύσεων, αναγράφεται η τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων ως \pm του μέσου όρου αυτών. Με τα γράμματα a, b χαρακτηρίζεται η στατιστική διαφορά των δειγμάτων (σε επίπεδο 0.05%), ενώ δείγματα με ίδιο γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

1η Ερώτηση: Απόχρωση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και η αυθόρμητη όπως και η αυθόρμητη με το Sc13 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά και οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο, ενώ το Sc9 με το Sc13 διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Αποτελέσματα πρώτης ερώτησης που αφορούσε στην απόχρωση.

A/A	Δείγμα	M.T \pm T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.31 \pm 0.20	ab
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	1.94 \pm 0.06	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	2.69 \pm 0,15	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

2η Ερώτηση: Ένταση αρώματος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα δεύτερης ερώτησης που αφορούσε στην ένταση αρώματος.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	3.44 ± 0.18	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	3.00 ± 0.18	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	3.19 ± 0,16	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

3η Ερώτηση: Λευκά άνθη

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα τρίτης ερώτησης που αφορούσε στα αρώματα λευκών άνθεων.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.81 ± 0.34	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.69 ± 0.27	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	2.31 ± 0,24	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

4η Ερώτηση: Τροπικά φρούτα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα τέταρτης ερώτησης που αφορούσε στα αρώματα τροπικών φρούτων.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.06 ± 0.21	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.38 ± 0.27	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	2.56 ± 0,26	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

5η Ερώτηση: Εσπεριδοειδή

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα πέμπτης ερώτησης που αφορούσε στα αρώματα εσπεριδοειδών.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.38 ± 0.22	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.44 ± 0.18	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	2.31 ± 0,15	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

6η Ερώτηση: Πυρηνόκαρπα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα έκτης ερώτησης που αφορούσε στα αρώματα πυρηνόκαρπων.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.19 ± 0.23	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.56 ± 0.35	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	2.25 ± 0,25	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

7η Ερώτηση: Βοτανικά αρώματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα έβδομης ερώτησης που αφορούσε στα βοτανικά αρώματα.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	1.94 ± 0.19	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.13 ± 0.22	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	1.63 ± 0,20	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

8η Ερώτηση: Οξείδωση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα της αυθόρμητης ζύμωσης με το Sc9 μεταξύ τους, παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Αντιθέτως, η αυθόρμητη με το Sc13 και το Sc9 με το Sc13 δεν παρουσίασαν διαφορές και οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα όγδοης ερώτησης που αφορούσε σε αρώματα οξείδωσης.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.19 ± 0.21	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	1.25 ± 0.14	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	1.69 ± 0,22	ab

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

9η Ερώτηση: Οξύτητα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα ένατης ερώτησης που αφορούσε στην οξύτητα.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	3.5 ± 0.20	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	3.31 ± 0.24	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	3.56 ± 0,18	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

10η Ερώτηση: Λιπαρότητα- σώμα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα δέκατης ερώτησης που αφορούσε στην λιπαρότητα και το σώμα.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.88 ± 0.22	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.81 ± 0.26	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	3.13 ± 0,24	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

11η Ερώτηση: Συνολική εκτίμηση ποιότητας

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα ενδέκατης ερώτησης που αφορούσε στην συνολική εκτίμηση ποιότητας.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.88 ± 0.18	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	3.06 ± 0.21	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	3.00 ± 0,18	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0.05).

Τα 3 στελέχη δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με εξαίρεση την απόχρωση και τα αρώματα οξείδωσης με την αυθόρμητη ζύμωση να παρουσιάζει το μεγαλύτερο βαθμό οξείδωσης και να έπεται το Sc13. Αντιθέτως το στέλεχος Sc9 δεν εμφάνισε οξειδωτικά αρώματα.

Συζήτηση

Ολοκληρώνοντας την μεταπτυχιακή μελέτη η οποία αφορούσε στη σύγκριση 3 στελεχών ζυμομυκήτων και μίας αυθόρμητης ζύμωσης στην ποικιλία Ασύρτικο προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα.

Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν σε ανοξείδωτες δεξαμενές (των 100 λίτρων για τα στελέχη Y54, Sc13, Sc9 και των 700 λίτρων για τις αυθόρμητες ζυμώσεις), σε συνθήκες που προσομοιάζουν τη βιομηχανική οινοποίηση. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι όλες οι ζυμώσεις κατάφεραν να ολοκληρωθούν και σε όλες τις περιπτώσεις τα υπολειπόμενα σάκχαρα ήταν λιγότερα από 4 g/L.

Η ζυμωτική ικανότητα τόσο των επιλεγμένων στελεχών όσο και εκείνων που παρευρίσκονταν στην αυθόρμητη ζύμωση ήταν ικανοποιητική καθώς παρότι η συγκέντρωση σακχάρων στο γλεύκος ήταν αρχικά γλεύκος 224 g/L και τελική αλκοόλη έφτασε τα 13,1% vol. αποδεικνύοντας ότι κατάφεραν να τα καταναλώσουν σε ικανοποιητικό βαθμό. Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν σε συνθήκες μικροοινοποίησης έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα παραγωγής αιθανόλης. Συγκεκριμένα, όλα μπόρεσαν να αποδώσουν το δυναμικό τους. Είναι γνωστό ότι 17 g/L σακχάρου στο λευκό γλεύκος ή 18-17 g/L στο ερυθρό γλεύκος δίνουν 1% vol (Τσακίρης, 2014). Επομένως, το γλεύκος με αρχικά σάκχαρα 224 g/L έπρεπε να δώσει 13,18% vol κάτι το οποίο συνέβη με μικρή απόκλιση. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η αιθανόλη δεν αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα για τη ζύμωση. Αντιθέτως, παρατηρήθηκαν πολύ θετικά αποτελέσματα για την ζυμωτική ικανότητα των στελεχών στα γλεύκη. Συγκεκριμένα, οι συντελεστές απόδοσης σε κάποια από τα στελέχη ήταν σχεδόν ίσοι με αυτούς της θεωρητικής απόδοσης (0.51 g/L).

Όσον αφορά την κατανάλωση σακχάρων παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις. Ο μεγαλύτερος συντελεστής κατανάλωσης των αναγόντων σακχάρων ήταν 23,21 g/L/ημέρα και προήλθε από το στέλεχος Sc9. Στη συνέχεια έπεται το Y54 με 16,27

g/L/ημέρα, το στέλεχος Sc13 με 14,3 g/L/ημέρα και τέλος η αυθόρμητη με 12,54 g/L/ημέρα σχεδόν το μισό του στελέχους Sc9 κάτι το οποίο σχετίζεται άμεσα και με τη διάρκεια της ζύμωσης. Διαφορές μεταξύ των ζυμώσεων υπήρξαν και στην προτίμηση σακχάρων. Σε γενικές γραμμές οι σακχαρομόκητες παρουσιάζουν επιλεκτική κατανάλωση της γλυκόζης. (Liccioli et al., 2010; Junior et al., 2008; Karpel et al., 2008). Αυτό αποδεικνύεται και στη συγκεκριμένη μελέτη καθώς όλα τα απομονωμένα στελέχη παρουσίασαν μεγαλύτερο συντελεστή κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τη φρουκτόζη έστω και με μικρή διαφορά. Κάτι τέτοιο δεν ίσχυσε ωστόσο στην περίπτωση της αυθόρμητης ζύμωσης. Ο συντελεστής κατανάλωσης της γλυκόζης ήταν 4,92 g/L/ημέρα και αντίστοιχα της φρουκτόζης ήταν 7,52 g/L/ημέρα. Ρυθμός σχεδόν διπλάσιος σε σχέση με της γλυκόζης, αποτελώντας την πρώτη ένδειξη για υπερίσχυση πιο φρουκτόφιλων στελεχών ζυμών κατά την αυθόρμητη ζύμωση. Αυτό φαίνεται να βρίσκεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, στην οποία υποστηρίζεται η κυριαρχία *non Saccharomyces* στελεχών στις αυθόρμητες ζυμώσεις που συνήθως παρουσιάζουν πιο έντονα φρουκτόφιλο χαρακτήρα (Benedict et al., 2011, Raymon Eder & Rosa 2021).

Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί ότι ο μεγαλύτερος συντελεστής κατανάλωσης της γλυκόζης προήλθε από το στέλεχος Sc9 με 15,96 g/L/ημέρα και ήταν τριπλάσιος από εκείνον της αυθόρμητης ζύμωσης με 4,92 g/L/ημέρα. Ο συντελεστής κατανάλωσης της φρουκτόζης ήταν παρόμοιος σε όλες τις ζυμώσεις με μεγαλύτερο εκείνον του στελέχους Sc9. Παρόμοια αποτελέσματα ως προς τους συντελεστές κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης αναφέρονται από τους (Karaoglan et al., 2021) αποδεικνύοντας ότι εκτός από τις συνθήκες θερμοκρασίας και συγκέντρωσης αιθανόλης εξίσου σημαντική είναι και η επιλογή στελέχους. Αναλυτικότερα, ως προς την κατανάλωση γλυκόζης υπήρξε διακύμανση από 4,00 έως 20,18 g/L/ημέρα και αντίστοιχα ως προς τη φρουκτόζη από 4,7 έως 10,63 g/L/ημέρα.

Ως προς την αιθανόλη, ο συντελεστής απόδοσης του στελέχους Sc13 ήταν 0,46 g/g , ακολούθησε η αυθόρμητη ζύμωση με 0,42 g/g, έπειτα το Y54 με 0,40 g/g και τέλος το στέλεχος Sc9 με 0,31 g/g .

Η μέγιστη θεωρητική απόδοση της αιθανόλης είναι 0,51 g/g και αναφέρεται ως η υψηλότερη δυνατή απόδοση. Η μέγιστη απόδοση αιθανόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος σακχάρου για τις περισσότερες μικροβιακές πηγές ζύμωσης της αιθανόλης και συγκεκριμένα από *S. cerevisiae* και *Zymomonas mobilis* είναι 0,51 g/g (Sarris et al., 2016; Lin et al., 2006 ; Puligundla et al., 2019 ; Sarris et al., 2016).

Επομένως οι μετατροπές που πραγματοποιούνται από το στέλεχος LMBF-Y 18 σε

θεραπευτικό μέσο γλεύκους χωρίς την προσθήκη myclobutanil ήταν 0,48 και 0,49 g/g αντιστοιχούσε περίπου στο 95% της μέγιστης θεωρητικής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης, αποτελώντας μια από τις υψηλότερες τιμές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Η τελική συγκέντρωση αλκοόλης δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές. Αναλυτικότερα, το στέλεχος Sc13 είχε 95,84 g/L αιθανόλη (13,1 % vol) ακολούθησε το Sc9 με 87,47 g/L (13,1 % vol) , έπειτα το στέλεχος τοY54 με 87,38 g/L (13,0 % vol) και τέλος η αυθόρμητη ζύμωση με 86,14 g/L (13,0 % vol). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι παρότι οι ζυμώσεις σημείωσαν παρόμοιο ποσοστό αλκοόλης υπήρξε μεγάλη διακύμανση στους χρόνους που αυτές κατόρθωσαν να το παράξουν. Από 14- 37 ημέρες διήρκησε η ζύμωση ανά στέλεχος, με αύξουσα σειρά αποζύμωσης τα στελέχη Sc9, Y54, Sc13 και τελευταία η αυθόρμητη. Τα περισσότερα εμπορικά στελέχη καλλιέργειας ζυμομυκήτων ολοκληρώνουν τη ζύμωση μέσα σε δύο εβδομάδες. Αντιθέτως οι 37 ημέρες δείχνουν μία αργή ζύμωση και αναμένεται το τελικό προϊόν να είναι υποβαθμισμένο σε σχέση με εκείνο που τελείωσε νωρίτερα. Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν σε συνθήκες μικροοινοποίησης έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα παραγωγής αιθανόλης (Πίνακας 4).

Πίνακας 4 Συγκεντρωτικός πίνακας παραγωγής και απόδοσης αιθανόλης ανά στέλεχος *S. Cerevisiae*.

Στέλεχος		EtOH		YEth/S	Χρόνος
<i>S. cerevisiae</i>	S ₀ (g/L)	(g/L)	vol (%)	(g/g)	(ημέρες)
Αυθόρμητη ζύμωση	224	86,14	13	0,42	34
<i>S. cerevisiae</i> Y54	224	87,38	13	0,40	26
<i>S. cerevisiae</i> Sc9	224	87,47	13,1	0,31	16
<i>S. cerevisiae</i> Sc13	224	95,84	13,1	0,46	30

Η συγκέντρωση της γλυκερόλης επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, ωστόσο στη συγκεκριμένη μελέτη δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Έπειτα από οργανοληπτικούς ελέγχους σε λευκούς οίνους έχει αποδειχθεί ότι το κατώφλι αντίληψης της γλυκερόλης είναι 5,2 g/L προσδίδοντας γλυκύτητα στο στόμα. Σε όλες τις ζυμώσεις η παραγωγή γλυκερόλης ήταν μεγαλύτερη από το κατώφλι αντίληψης εκτός από την αυθόρμητη ζύμωση (5,05 g/L). Συγκεκριμένα τη μεγαλύτερη

τελική συγκέντρωση είχε το στέλεχος Y54 με 7,85 g/L, έπειτα το στέλεχος Sc13 με 6,35 g/L, το στέλεχος Sc9 με 5,79 g/L και τέλος η αυθόρμητη ζύμωση με 5,05 g/L. Με μία πρώτη ματιά είναι εύκολο να κατανοήσει κανείς ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της διάρκειας ζύμωσης και της παραγωγής γλυκερόλης καθώς το Y54 με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση είχε διάρκεια ζύμωσης 31 ημέρες και η αυθόρμητη ζύμωση με 37 ημέρες ζύμωσης είχε τη μικρότερη συγκέντρωση. Συνεπώς η διαφορά τους περισσότερο θα μπορούσε να αποδοθεί στα χαρακτηριστικά του στελεχούς.

Η τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος σε όλες τις περιπτώσεις κυμάνθηκε μεταξύ 0,77 έως 0,84 g/L και δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά.

Αντιθέτως οι τελικές συγκεντρώσεις οξικού οξέος παρουσίασαν διαφορές.

Το στέλεχος Y54 διέφερε στατιστικά σημαντικά από τα υπόλοιπα καθώς ήταν εκείνο που παρουσίασε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε οξικό οξύ και πτητική οξύτητα. Η τελική συγκέντρωση οξικού οξέος ήταν 0,81 g/L και η πτητική οξύτητα εκφρασμένη σε οξικό οξύ ήταν 0,84 g/L υποβαθμίζοντας το οργανοληπτικό και ποιοτικό προφίλ του παραγόμενου οίνου. Στη συνέχεια το στέλεχος Sc13 ενώ είχε 0,47 g/L οξικό οξύ ταυτόχρονα είχε πτητική οξύτητα 0,68 g/L. Τέλος η αυθόρμητη ζύμωση και το στέλεχος Sc9 δεν είχαν διαφορές και συγκεκριμένα το οξικό οξύ αντίστοιχα ήταν 0,42 g/L και 0,40 g/L παρόμοια και για την πτητική οξύτητα.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου παρατηρήθηκε ότι στην γευστική δοκιμή που έγινε αρχικά στις 4/11/21 τα δείγματα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με εξαίρεση τις ερωτήσεις για την απόχρωση και τη διαύγεια για τις οποίες δεν υπήρξαν διαφορές. Συγκεκριμένα σε ό, τι είχε να κάνει με το αρωματικό προφίλ των δειγμάτων το στέλεχος Y54 διέφερε σημαντικά από τα υπόλοιπα και συγκέντρωσε τις χαμηλότερες βαθμολογίες. Αναλυτικότερα, στην ερώτηση που τέθηκε για την καθαρότητα του αρώματος το Y54 διέφερε στατιστικά σημαντικά από όλα τα άλλα δείγματα έχοντας βαθμολογία 6,5 σε αντίθεση με το στέλεχος Sc9 που είχε την υψηλότερη βαθμολογία με 8,8. Η μειωμένη βαθμολογία του Y54 στην καθαρότητα του αρώματος μπορεί να συνδεθεί με την αυξημένη τιμή πτητικής οξύτητας η οποία έφτασε τα 0,84 g/L οξικού οξέος. Στην ερώτηση για την ένταση του αρώματος πάλι το Y54 είχε τη χαμηλότερη βαθμολογία όπως εξίσου χαμηλή βαθμολογία είχε και η αυθόρμητη ζύμωση. Η διαφορά και των δύο ήταν στατιστικά σημαντική από τις βαθμολογίες των

στελεχών Sc13 και Sc9.

Στην ερώτηση για την πολυπλοκότητα του αρώματος υπερίσχυσε το στέλεχος Sc13 και ακολούθησε το στέλεχος Sc9 και έπειτα η αυθόρμητη και το Y54.

Στις ερωτήσεις που αφορούσαν στη γεύση και τη συνολική ποιότητα αλλά και στην τελική συγκεντρωτική βαθμολογία το στέλεχος Y54 συνέχισε να κατέχει την τελευταία θέση. Αναλυτικότερα, στην ερώτηση που αφορούσε στην καθαρότητα γεύσης ήταν το μόνο που διέφερε στατιστικά σημαντικά.

Στην ερώτηση για την ένταση της γεύσης το Y54 διέφερε από όλα τα υπόλοιπα τα οποία μεταξύ είχαν παρόμοιες βαθμολογίες με μεγαλύτερη εκείνη του στελέχους Sc13.

Στην ερώτηση για τη δομή και την πολυπλοκότητα εκείνο που με διαφορά συγκέντρωσε τη χαμηλότερη βαθμολογία ήταν το στέλεχος Y54.

Στις ερωτήσεις που αφορούσαν στην επίγευση, την ισορροπία και την συνολική εκτίμηση το στέλεχος Y54 συγκέντρωσε την χαμηλότερη βαθμολογία ενώ το στέλεχος Sc13 την υψηλότερη.

Τέλος λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αλλά και τις συγκεντρωτικές βαθμολογίες φαίνεται ότι το στέλεχος Sc13 υπερίσχυσε με τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά και ακολούθως το στέλεχος Sc9 χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Έπειτα η αυθόρμητη ζύμωση και τελευταίο το Y54 συγκέντρωσαν τις χαμηλότερες βαθμολογίες. Στον οργανοληπτικό που έγινε στις 3/03/22 οι ερωτήσεις που αφορούσαν στην απόχρωση του οίνου αλλά και στην οξείδωση ήταν οι μόνες που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές παρότι δεν συμμετείχε στην αξιολόγηση το Y54 εξαιτίας της οξειδωτικής εξέλιξής του.

Πιο συγκεκριμένα στις ερωτήσεις που είχαν να κάνουν με κατηγορίες αρωμάτων όπως τα λευκά άνθη, τροπικά φρούτα, εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα και βοτανικά, τα δείγματα δεν παρουσίασαν διαφορές. Το ίδιο ίσχυσε και για την ένταση των αρωμάτων τους, την οξύτητα, τη λιπαρότητα στο στόμα καθώς και τη συνολική τους ποιότητα.

Αντιθέτως, στην ερώτηση για την απόχρωση το στέλεχος Sc13 είχε την πιο έντονη απόχρωση υποδηλώνοντας την ταχύτερη εξέλιξή του, ενώ το στέλεχος Sc9 είχε τη λιγότερη ένταση χρώματος κάτι το οποίο συνάδει με το ότι ήταν φρέσκο.

Τέλος στην ερώτηση που αφορούσε στην οξείδωση, το στέλεχος Sc9 εμφάνισε το μικρότερο βαθμό οξείδωσης με διαφορά από το δείγμα της αυθόρμητης ζύμωσης που είχε τη μεγαλύτερη οξείδωση.

Η χρονική διαφορά μεταξύ των δοκιμών παρότι δεν ήταν μεγάλη, ήταν αρκετή για να αλλάξει το οργανοληπτικό προφίλ των δειγμάτων. Στην πρώτη δοκιμή ξεχώρισε το

δείγμα από τη ζύμωση με το στέλεχος Sc13 ωστόσο στην επόμενη δοκιμή αν και στα περισσότερα κριτήρια όλα τα στελέχη που συμμετείχαν είχαν μικρές αποκλείσεις ο παράγοντας της οξείδωσης επιδρά αρνητικά στην τελική αξιολόγηση του οίνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι όλα τα στελέχη που επιλέχθηκαν παρουσίασαν καλή ζυμωτική ικανότητα και έδωσαν βέλτιστα αποτελέσματα παραγωγής αιθανόλης χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Το στέλεχος Y54 ήταν το μόνο που δεν είχε απομονωθεί από Ασύρτικο Σαντορίνης αλλά από την περιοχή της Νεμέας στην Πελοπόννησο (Nisiotou & Gibson, 2005), παρήγαγε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση οξικού οξέος. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι δεν πραγματοποιήθηκε μικροβιολογικός έλεγχος σε κανένα στάδιο των ζυμώσεων με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ταυτοποίηση του στελέχους που επικράτησε ολοκληρώνοντας την αλκοολική ζύμωση. Ειδικότερα στην οινοποίηση που χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Y54 υπάρχει περίπτωση να μην ήταν εκείνο που τελικά ολοκλήρωσε τη ζύμωση. Οι εμβολιασμοί έναρξης ζύμωσης έγιναν ταυτόχρονα με αποτέλεσμα τα στελέχη Sc9 και Sc13 να ξεκινήσουν μέσα σε 24 ώρες. Αντίθετα το Y54 και η αυθόρμητη ζύμωση ξεκίνησαν μετά από 48 ώρες. Από τις πρώτες κιόλας ημέρες ζύμωσης για το στέλεχος Y54 υπήρχε έντονη οσμή ακεταλδεϋδης και έντονος αφρισμός, παρόλα αυτά η ζύμωση κατάφερε να ολοκληρωθεί. Στον οργανοληπτικό έλεγχο διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος Sc13 είχε αρχικά ποιοτικότερα χαρακτηριστικά η αντοχή του στο χρόνο δεν ήταν αρκετή σε αντίθεση με το στέλεχος Sc9 που ήταν εξίσου καλό ποιοτικά και με καλύτερη διάρκεια. Σε γενικές γραμμές το αρωματικό προφίλ των παραγόμενων οίνων ήταν μεσαίας προς μεγάλης έντασης με πολύπλοκο αρωματικό χαρακτήρα και χαρακτηριστικά αρώματα λευκών ανθέων, τροπικών φρούτων, πυρηνοκάρπων και εσπεριδοειδών. Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε πως τα στελέχη που μελετήθηκαν είναι ικανά να δώσουν λευκούς οίνους υψηλής ποιότητας με την χαρακτηριστική τυπικότητα.

BIBΛIOΓPAΦIA

- Achstetter T., & Wolf D.H. (1985). Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *S. cerevisiae*. *Yeast*, 1, 139-157.
- Acree, T.E., Sonoff, E.P. & Splittstoesser, D.F. (1972). Effect of yeast strain and type of sulfur compounds on hydrogen sulfide production. *Am. J. Enol. Vitic.*, 23, 6-9.
- An, D. & Ough, C.S. (1993). Urea excretion and uptake by wine yeasts as affected by various factors. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 34-40.
- Arévalo-Villena, M., Úbeda-Iranzoa, J.F. & Briones-Pérez, A.I. (2007). β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enz. Microbiol. Techn.*, 40, 420-425.
- Babayan, T.L. & Bezrukov, M.G. (1985). Autolysis in yeasts. *Acta Biotechn.*, 5, 129-136.
- Bayonove, C., Gunata, Z., Sapis, J.C., Baumes, R.L., Dugeley, I., Grassin, C., 1992. Augmentation des arômes dans le vin et utilisation d'enzymes. *Rév. Oenol.* 64, 15-18.
- Benedict et al., 2011, Raymon.
- Bergström A, Simpson JT, Salinas F, Barré B, Parts L, Zia A, Nguyen Ba AN, Moses AM, Louis EJ, Mustonen V, Warringer J, Durbin R, Liti G. (2014). A high-definition view of functional genetic variation from natural yeast genomes. *Mol Biol Evol* 31(4):872-88.
- Bertrand A., (1983). *Conn. Vigne Vin*, 17, 43-53.
- Bisson, L.F. and C.E. Butzke. 2000. Diagnosis and rectifications of stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 168-177.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1996). *Principles and practices of winemaking*, pp. 102-181. Chapman & Hall.
- Cabrera, M.J., Moreno, J., Ortega, J.M. & Medina, M. (1988). Formation of ethanol, higher alcohols, esters and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39, pp. 283-287.
- Câmara J.S., Marques J.C., Perestrelo F R. M., Oliveira R. L., Andrade P., Caldeira M. (2007). Comparative study of the whisky aroma profile based on headspace solid phase microextraction using different fibre coatings. *Journal of Chromatography A* Volume 1150, Issues 1-2, 25 May 2007, Pages 198-207.

- Câmara J.S, Herbert P., Marquesa J.C.,Alves M.A. (2004). Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines.
- Camarasa C., Sanchez I., Brial P., Bigey F., Dequin S., (2011). Phenotypic Landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: Evidence for Origin-Dependent Metabolic Traits.
- Canal-Llaube` res, R.M., 1993. Enzymes in winemaking. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, pp. 477–506.
- Carrau F., Rland K.M., Fariña L., Dellacassa E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains.
- Chandra L. Richter, Barbara Dunn, Gavin Sherlock, Tom Pugh. (2013). Comparative metabolic footprinting of a large number of commercial wine yeast strains in Chardonnay fermentations. *FEMS Yeast Research*, Volume 13, Issue 4, June 2013, Pages 394–410.
- Chandrasekar, I. & Graber, B.P. (1988). Stabilization of the biomembrane by small molecules: interaction of trehalose with the phospholipids bilayer. *J. Biomolec. Struct. Dynam.*, 55, 1163-1171.
- Charpentier, C. & Feuillat, M. (1993). Yeast autolysis. In: *Wine microbiology and biotechnology*, G.H. Fleet (Ed.), pp., 225–242. Switzerland: Harwood Academic Publishers.
- Charters Steve, Simone Pettigrew. (2006). Product involvement and the evaluation of wine quality. *Qualitative Market Research* 9(2).
- Ciolfi, C., Castino, M. & Di Stefano, R. (1985). Studio sulla riposte metabolica di lieviti di specie diverse fermentati un unico mosto a temperature comprese fra 10 e 40°C. Nota II. *Riv. Vitic. Enol.*
- Comitini F., Di Pietro N., Zacchi L., Ciani M.(2004). *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: Purification and characterization. *Microbiology* 150(Pt 8):2535-41.
- Corison C.A., Ough C. S., Berg H. W., Nelson K.E. (1979). Must Acetic Acid and Ethyl Acetate as Mold and Rot Indicators in Grapes. *Am J Enol Vitic.* January 1979 30: 130-134; published ahead of print January 01, 1979.
- Crowell, E.A. & Guymon, J.F. (1963). Influence of aeration and suspended material on higher alcohols, acetoin and diacetyl during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 14, 214-222.
- Da Silva, G.A. (1997). The occurrence of killer, sensitive and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Appl. Microbiol. Biotechn.*, 46, 112-121.

- Deák T., L. R. Beuchat. (1988). Evaluation of simplified and commercial systems for identification of foodborne yeasts. *Int J Food Microbiol.* 1988 Oct;7(2):135-45.
- Delcroix, A., Günata, Z., Sapis, J., Salmon, J., Bayonove, C. (1994). Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: Effect on the terpenol content of Muscat wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 291–296.
- Delfini, C., Garcia-Moruno, E., Pagliara, A. & Contiero, M. (1989). Technological and biological factors causing the production of large amounts of acetic acid by wine yeasts during alcoholic fermentation. *Proceedings of the VII International Symposium on Yeasts*, pp. 30-31, Leuven.
- Dongwan,D. Kang, Feng Li, Edward Kirton, Ashleigh Thomas, Rob Egan, Hong An, Zhong Wang. (2019). MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies.
- Driedonks, R.A., Toschka, H.Y., Van Almkerk, J.W., Schaffers, I.M. & Verbakel, J.M.A. (1995). Expression and secretion of antifreeze peptides in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11, 849-864.
- Duan SF, Han PJ, Wang QM, Liu WQ, Shi JY, Li K, Zhang XL, Bai FY .(2018). The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. *Nat Commun* 9(1):2690.
- Dubois E. & Grenson M., (1979). *Molecular and general genetics*, 175, 67–76.
- Dubourdieu, D. (1986). Wine technology: Current trends. *Experientia* 42, 914–921.
- Dubourdieu, D., Darriet, P., Ollivier, C., Boidron, J.N., Ribéreau-Gayon, P. (1988). Rôle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans l'hydrolyse enzymatique des hétérosides terpéniques du jus de raisin. *Comptes Rendus Academie Des Sciences Paris*, 306, 489–493.
- Eschenbruch, R. (1974). Sulfite and sulphide formation during wine making: a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 25, 157-161.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostincar, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A., (2000). Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the “El Penedés” area (Spain). *Food Microbiol.* 17, 553–562.
- Fernandes, J.O. & Ferreira, M.A. (2000). Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *J. Chrom., A*, 886, 183-195.
- Fleet G. H., S. Lafon-Lafourcade, P. Ribéreau-Gayon. (1984). Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines.

- Fleet. (1992). Spoilage yeasts. *Crit Rev Biotechnol* 12:1 -44.
- Fleet G.H. & Heard G.M. (1992) *In Wine Microbiology and Biotechnology* (Ed. G.M. Fleet). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 27–54.
- Fleet, G.H., Heard, G.M. (1993). Yeast growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, pp. 27–54.
- Garcia Esteve- Zarzoso & Arroyo, 2016.
- Giudici, P., Kunkee, R.E. (1994). The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wines yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 107–112.
- Goddard MR, Greig D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: A nomadic yeast with no niche? Source PubMed FEMS Yeast Research 15(3).
- Gonzalez Ramon , Pilar Morales. (2017). Wine secondary aroma: Understanding yeast production of higher alcohols. *Microbial Biotechnology* 10(6).
- Gunata, Z., Vallier, M.J., Sapis, J.C., Baumes, R. & Bayonove, C. (1994). Enzymatic-synthesis of monoterpenyl beta-D-glucosides by various beta-glucosidases. *Enz. Microbiol. Techn.*, 16, 1055-1058.
- Hannemann, W. (1985). Ausscheidung von essigsäure durch gärende hefen und die reinigung und charakterisierung einer NADP-spezifischen aldehyddehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Mainz.
- Heard G., G. Fleet. (1986). Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. Published 1986 Analyse qualitative et quantitative et cinétique des populations de levures de vinification dans des vins blancs ou rouges.
- Henschke, P., & Jiranec, V. (1993). Yeasts – Metabolism of nitrogen compounds. In: *Wine microbiology and biotechnology*, G.
- Henschke, P. (1997). *Wine yeast. In: Yeast sugar metabolism, biochemistry, genetics, biotechnology and applications*, Zimmerman, F.K. & Entian, K.D., (eds.), pp. 527–560. Technomic Publishing, Lancaster, UK.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J. & Cabezudo, M.D. (1990). The Influence of the Yeast and Type of Culture on the Volatile Composition of Wines Fermented Without Sulfur Dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 313-318.
- Herraiz, T. & Ough, C.S. (1993). Formation of Ethyl Esters of Amino Acids by Yeasts During the Alcoholic Fermentation of Grape Juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 41-48.
- Howell Kate , Jan Hendrik Swiegers, Gordon M Elsey, Tracey E Siebert, Eveline Bartowsky, Graham H Fleet, Isak S. Pretorius, Miguel Antonio de Barros

- Lopes. (2004). Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiology Letters* 240(2):125-9.
- Hughson Angus L, Boakes Robert. (2002). The knowing nose: The role of knowledge in wine expertise. *Food Quality and Preference* 13(7):463-472.
- Ison R. W., C. S. Gutteridge. (1987). Determination of the carbonation tolerance of yeasts. *Letters of applied microbiology: Volume 5, Issue 1 July 1987*. Pages 11-13.
- Ivit, Longo & Kemp, 2020.
- Jacobs C. J., H. J. J. Van Vuuren. (1991). Effects of Different Killer Yeasts on Wine Fermentations. *Am J Enol Vitic.*
- Jiranek, V., Langridge, P. & Henschke, P.A. (1991). Yeast nitrogen demand: Selection criterion for wine yeasts for fermenting low nitrogen musts. *In Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine* (Seattle 1991). Edited by Rantz, J., pp. 266-269, Davis, CA.
- Jiranek, V., Langridge, P. & Henschke, P.A. (1995a). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 75-83.
- Jiranek, V., Langridge, P. & Henschke, P.A. (1995b). Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 461-467.
- Jiranek, V., Langridge, P. & Henschke, P.A. (1995c). Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast under enological conditions. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 269-273.
- Júnior MM, Batistote M, Ernandes JR (2008) Glucose and fructose fermentation by wine yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. *J Inst Brew* 114:199–204.
- Katie E. Hyma, Sofie M. Saerens, Kevin J. Verstrepen, Justin C. Fay. (2011). Divergence in wine characteristics produced by wild and domesticated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, Volume 11, Issue 7, November (2011), Pages 540–551.
- Karaoglan H. A., Ozcelik F., Musatti A., and Rollini M. (2021). Mild Pretreatments to Increase Fructose Consumption in *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains. *Foods*. 2021 May; 10(5): 1129. doi: 10.3390/foods10051129.
- Karpel JE, Place WR, Bisson LF (2008) Analysis of the major hexose transporter genes in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Enol Vitic* 59:265–275.

- Kenneth C. Fugelsang, Charles G. Edwards. (2007). *Wine Microbiology Practical Applications and Procedures*, Second edition, page 83.
- Kenneth C. Fugelsang, Charles G. Edwards. (2007). *Wine Microbiology Practical Applications and Procedures*, Second edition, page 84.
- King, A.D., Pitt, J.I., Beuchat, L.R. and Corry, J.E.L. (1986). *Methods for the mycological examination for food*. New York, Plenum Press.
- Kish S.,R. Sharf, P. Margalith. (1983). A note on a selective medium for wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*.
- Lafon-Lafourcade, S. (1983). Wine and brandy. *Biotechn.* 5, 81–163.
- Lambrechts M.G. and I.S. Pretorius. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma. Institute for Wine Biotechnology and Department of Viticulture & Oenology, University of Stellenbosch, Private Bag XI, 7602 Matieland (Stellenbosch), South Africa. June 2000 *J. Enol Vitic* :97-129.
- Larue F., S. Lafon-Lafourcade, P. Ribereau-Gayon. (1980). Relationship Between the Sterol Content of Yeast Cells and Their Fermentation Activity in Grape Must.
- Larue F., Lafon-Lafourcade S. and Ribereau-Gayon P. (1982) *CR Acad. Sci.*, Serie III, 294, 587.
- Larue F., S. Lafon-Lafourcade & P. Ribereau-Gayon. (1984). Relationship between the inhibition of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and the activities of hexokinase and alcohol dehydrogenase. *Biotechnology Letters* volume 6, pages 687–692 (1984).
- Larue F., Couralet M. and Ribereau-Gayon P. (1987). In *Compte-rendu des activites de recherches (1984– 1986) de l’Institut d’Enologie*, Universite de Bordeaux II.
- Lawrence, D.R. (1983). Yeast differentiation and identification. Proceedings of the European Brewing Convention Congress, pp449-456. London, IRL Press: Oxford.
- Lee, C.W.B., Waugh, J.S. & Griffin, R.G. (1986). Solid state NMR study of trehalose/1,2-dipalmitoyl-sn-phosphatidylcholine interactions. *Biochem.*, 25, 3737-3742.
- Legras J. L., Merdinoglu D., Cornuet J. M., Karst F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history.
- Legras JL, Galeote V, Bigey F, Camarasa C, Marsit S, Nidelet T, Sanchez I, Couloux A, Guy J, Franco-Duarte R, Marcet-Houben M, Gabaldon T, Schuller D, Sampaio JP, Dequin S. (2018). Adaptation of *S. cerevisiae* to Fermented Food Environments Reveals Remarkable Genome Plasticity and the Footprints of Domestication. *Mol Biol Evol* 35(7):1712-1727.
- Lesschaeve Isabelle, Ann C. Noble. (2022). Sensory analysis of wine. In book:

Managing Wine Quality.

- Lin CC, Fung DY. (1987). Conventional and rapid methods for yeast identification. Department of Quality Assurance, Burger King Corporation, Miami, Florida. *Critical Reviews in Microbiology*, 01 Jan 1987, 14(4):273-289.
- Lin, Y.; Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 69, 627–642.
- Liti G., Barton D. B. H., Louis E. J. (2006). Sequence Diversity, Reproductive Isolation and Species Concepts in *Saccharomyces*. *Genetics*, Volume 174, Issue 2, 1 October 2006, Pages 839–850.
- Liti G., Carter D. M., Moses A. M., Warringer J., Parts L., James S. A., Davey R. P., Roberts I. N., Burt A., Koufopanou V., Tsai I. J., Bergman C. M., Bensasson D., O’Kelly M. J. T., Van Oudenaarden A., Barton D. B. H., Bailes E., Nguyen A. N., Jones M., Quail M. A., Goodhead I., Sims S., Smith F., Blomberg A., Richard Durbin & Edward J. Louis. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* volume 458, pages 337–341 (2009).
- Liccioli T, Chambers PJ, Jiranek V. (2010). A novel methodology independent of fermentation rate for assessment of the fructophilic character of wine yeast strains. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011 Jul;38(7):833-43. doi: 10.1007/s10295-010-0854-y. Epub 2010 Nov 15. PMID: 21076969.
- Martinez J. I. & Jarillo J. C. (1989). The Evolution of Research on Coordination Mechanisms in Multinational Corporations. *Journal of International Business Studies* volume 20, pages 489–514 (1989).
- Martínez-Rodríguez, A.J. & Carmen Polo, M. (2000). Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1081 -1085.
- Mateo, J.J., Jimenez, M., Pastor, A. & Huerta, T. (2001). Yeast starter cultures affecting wine fermentation and volatiles. *Food Res. Int.*, 34, 307-314.
- Mendes Ferreira, A. Clímaco, M.C. & Mendes Faia, A. (2001). The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components--a preliminary study. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 67-71.
- Michnick, S., Roustan, J.L., Remize, F., Barre, P. & Dequin, S. (1997). Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPDI encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*, 13, 783-793.
- Monk, P.R. (1984). Aspects of yeast technology. Advances in viticulture and oenology for economic gain: proceedings of the 5th Australian wine industry technical conference, 29th November- 1 December, 1983, Perth, WA, edited by Lee, T.H. and Sommers, T.C., pp.403-418. Adelaide SA: The Australian Wine Research Institute.

- Monk, P.R. (1986). Formation, utilization and excretion of hydrogen sulphide by wine yeast. *Wine Ind. J.*, Nov., 10-16.
- Mora A., Payá M., Ríos J.L., Alcaraz M.J. (1990). Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. Departamento de Farmacología y Farmacotecnia, Facultad de Farmacia, Avda, Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain.
- Mora J., A. Mulet. (1991). Effects of Some Treatments of Grape Juice on the Population and Growth of Yeast Species During Fermentation. *Am J Enol Vitic.* January 1991 42: 133-136; published ahead of print January 01, 1991.
- Nelson, G. & Young, T.W. (1986). Yeast extracellular proteolytic enzymes for chill-proofing beer. *J. Inst. Brew.*, 92, 599-603.
- Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M. & Dulau, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.*, 62, 89-94.
- Nishino, H., Miyazaki, S. & Tohjo, K. (1985). Effect of osmotic pressure on the growth rate and fermentation activity of wine yeast. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 170-174.
- Nisiotou & Gibson, 2005- Nisiotou, A.A., Gibson, G.R. 2005. Isolation of culturable yeasts from market wines and evaluation of the 5.8S-ITS rDNA sequence analysis for identification purposes. *Lett Appl Microbiol*, 41 (6), 454-63.
- Olive, D.M. and Bean P. (1999). Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1661-1669. Genotyping of *E. coli* Isolated from Urinary Tract Infection Patients Containing B-Lactamase Resistance Gene CTX-M Group 1 in Sanandaj Medical Health Centers.
- Ough, C.S., Crowell, E.A. & Mooney L.A. (1988). Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 243-249.
- Ough C. S., M. Davenport, K. Joseph. (1989). Effects of Certain Vitamins on Growth and Fermentation Rate of Several Commercial Active Dry Wine Yeasts. *Am J Enol Vitic.* January 1989 40: 208-213.
- Ough, C.S., Huang, Z., An, D. & Stevens, D. (1991). Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: effects on urea excretion and readsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 26-40.
- Panek, A.D. (1985). Trehalose metabolism and its role in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechn.*, 3, 121-130.

- Panek, A.D. (1991). Storage carbohydrates. In: *The yeasts*, v4, Organelles, Rose, A.H. & Harrison, J.S., (eds), pp. 655-678. London, Academic press.
- Papanikolaou S., Aggelis G., Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011, 113, 1031-1051.
- Parrish, M.E. and Carroll, D.E. (1985) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture* 12, 3–31.
- Perez María Florencia, Ana Sofía Isas, Azzam Aladdin, Hesham A. El Enshasy & Julián Rafael Dib (2017). Killer Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons. Part of the Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future book series.
- Peter J, De Chiara M, Friedrich A, Yue JX, Pflieger D, Bergström A, Sigwalt A, Barre B, Freel K, Llored A, Cruaud C, Labadie K, Aury JM, Istace B, Lebrigand K, Barbry P, Engelen S, Lemainque A, Wincker P, Liti G, Schacherer J (2018) Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature* 556(7701) : 339-344.
- Pontes J., Rodrigues R. T., Melgarejo-Giménez A. R. (2020). Brazilian rattlesnake in Atlantic Forest, RJ In book: *Invasive Species: Ecology, impacts, and potencial uses Edition: First Chapter: 2* Publisher: Nova Science Publishers, NY. An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus March 2020.
- Pretorius Isak S., (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking yeast. Pages 675-729.
- Pretorius Isak S., Florian F. Baner. (2002). Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains.
- Pronk J. T., H. Steensma H. Y., Van Dijken J. P. (1996). Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Volume12, Issue16.Pages 1607-1633.
- Pueyo, E., Martínez-Rodríguez, A., Carmen Polo, M., Santa-María, G. & Bartolomé, B. (2000). Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 116 -122.
- Puligundla, P., Smogrovicova, D., Mok, C., Obulam. (2019).V.S.R. A review of recent advances in high gravity ethanol fermentation. *Renew. Energy* 2019, 133, 1366–1379).
- Ramani R., Gromadzki S., Pincus D. H., Salkin I. F., Chaturvedi V. (1998). Efficacy of API 20C and ID 32C Systems for Identification of Common and Rare Clinical Yeast Isolates. *ASM Journals Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 36, No. 11.
- Ramos M.F.S. ,E.P. Santos ,C.H.B. Bizarri , H.A. Mattos , M.R.S. Padilha , H.M.

- Duarte. (1996). Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. *International journal of cosmetic science* Volume18, Issue3 June 1996 Pages 87-101.
- Rankine, B.C. (1967). Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds. *J. Sci. Food Agric.*, 18, 583-589.
- Rankine, B. C. & Bridson, D. A. (1971). Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 22, 6–12.
- Rapp, A. & Versini, G. (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In: International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine. Washington: *Am. Soc. Enol.*
- Raymon, Eder & Rosa 2021.
- Reed G. & Chan SL. (1979). Evaluating commercial active dry wine yeasts by fermentation activity. *Am J Enol Vitic*; 29, 165–168.
- Regodon, J.A., Pérez, F., Valdés, M., De Miguel, C., Ramirez, M. (1997). A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol.* 14, 247–254.
- Remize, F., Sablayrolles, J.M., & Dequin, S. (2000). Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 371–378.
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E. and Lafourcade S. (1951) *Ind. Agri. Alim.* 68, 141.
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P. and Sudraud P. (1975a) *Sciences et Techniques du Vin*. Vol 2: Caractères des Vins, Maturation du raisin, Levures et bactéries. Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdiou D, Doneche B & Lonvaud A. 2006. Cytology, taxonomy and ecology of grape and wine yeasts. *Handbook of Enology*, Vol.1, The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley and Sons, New York, NY, 1–52.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdiou D., *Handbook of Enology* Volume 2: The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- Robinson Anne Skaja, Victoria Hines & K. Dane Wittrup. (1994). Protein Disulfide Isomerase Overexpression Increases Secretion of Foreign Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology* volume 12, pages381–384 (1994).
- Rodriquez, S. & Thornton, R. (1990). Factors influencing the utilization of L-malate by yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 72, 17-22.

- Rohm H., Lechner F., Lehner M. (1990). Microflora of Austrian Natural-Set Yogurt. *J Food Prot* (1990) 53 (6): 478–480.
- Rozes N., F. Larue, P. Ribéreau-Gayon. (1988). Effect of a variation of grape must temperature on the fermentative ability and the neutral lipid content of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* volume 10, pages 821–824.
- Ruiz Javier, Florian Kiene, Ignacio Belda, Daniela Fracassetti, Domingo Marquina, Eva Navascués, Fernando Calderón, Angel Benito, Doris Rauhut, Antonio Santos & Santiago Benito. (2019). Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* volume 103, pages 7425–7450 (2019).
- Salmon J.M., Vincent O., Mauricio J.C., Bely M. and Barre P. (1993) *Am. J. Enol. Vitic.*, 44 (1), 58.
- Sarris, D.; Matsakas, L.; Aggelis, G.; Koutinas, A.A.; Papanikolaou, S. (2014). Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. *Ind. Crop. Prod.* 2014, 56, 83–93.
- Sarris, D.; Papanikolaou, S. (2016). Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Eng. Life Sci.* 2016, 16, 307–329.
- Scanes, K.T., Hohmann, S. & Prior, B.A. (1998). Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 19, 17-24.
- Schreier P. & Jennings w. G. (1979). *Flavor composition of wines*. Pages 59-111.
- Snow, R. (1983). Genetic improvement of wine yeast. In: *Yeast genetics - fundamental and applied aspects*, Spencer, J.F.T., Spencer, D.M., Smith, A.R.W. (eds). Springer-Verlag: New York, pp. 439-459.
- Soufleros, A. (1978) University thesis by Ribereau- Gayon, P. (1978) *Wine Flavor of Foods and Beverages* (eds. G. Charalambous & G. Inglett), p.369 (different yeasts), p. 370(ester formation).
- Spor Aymé, Nidelet Thibault, Simon Jonattan, Bourgais Aurélie, Dominique de Vienne & Sicard Delphine. (2009). Niche-driven evolution of metabolic and life-history strategies in natural and domesticated populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Evolutionary Biology* volume 9, Article number: 296 (2009).
- Stratford, M. (1996). Induction of flocculation in brewing yeasts by change in pH value. *FEMS Microbiol. Lett.* 136, 13-18.
- Subden R. E., R. Cornell, A. C. Noble. (1980). Evaluation of API 20C Clinical Yeast

- Identification System for Must and Wine Yeast Identification. *Am J Enol Vitic.* January 1980 31: 364-366; published ahead of print January 01, 1980.
- Suzanne Lafon-Lafourcade, Annick Joyeux. (1979). Techniques simplifiées pour le dénombrement et l'identification des microorganismes vivants dans les moûts et les vins. *Vol. 13 No. 4 (1979): Journal internationale des sciences de la vigne et du vin.*
- Tannenbaum J. (2019). A practical winemaker's guide to isolating wild yeast species to produce unique in-house strains for wine fermentations. A Project Paper Presented to the Faculty of the Graduate School of Cornell University In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Professional Studies in Agriculture and Life Sciences Field of Food Science Viticulture and Enology.
- Teunissen, A.W. & Steensma, H.Y. (1995). Review: The dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* 11, 1001-1013.
- Thevelein, J.M. (1984). Regulation of trehalose mobilisation in fungi. *Microbiol. Rev.*, 48, 42-59.
- Vandamme P., B Pot, M Gillis, P de Vos, K Kersters, J Swings. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *ASM Journals. Microbiological Reviews.* Vol. 60, No. 2.
- Van Laere, A. (1989). Trehalose, reserve and/or stress metabolite. *FEMS Microbiol. Lett. Reviews*, 63, 210.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A. & van Dijken, J.P. (1990). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 395-403.
- Vişan Luminiţa, Radiana-Maria Tamba-Berehoiu, Ciprian NICOLAE Popa, Silvana Dănăilă-Guidea, Rodica Culea. (2018). Aromatic compounds in wines. Project: The quality of wine.
- Walker, G.M. (1998). *Yeast. Physiology and Biotechnology.* John Wiley & Sons, New York, NY.
- Warringer J., Zörgö E., Cubillos F. A., Amin Zia, Gjuvsland A., Simpson J. T., Forsmark A., Durbin R., Omholt S. W., Louis E. J., Liti G., Moses A., Blomberg A. (2011). Trait Variation in Yeast Is Defined by Population History.
- Wayman, Morris, and Sarad R. Parekh. (1990). *Biotechnology of biomass conversion: fuels and chemicals from renewable resources.* Milton Keynes, England: *Open University Press.*
- Wendy V., Parrac James A., Greenb K., Geoffrey Whiteb, C. (2007). The distinctive

flavour of New Zealand Sauvignon blanc: Sensory characterisation by wine professionals. *Food Quality and Preference*. Volume 18, Issue 6, September 2007, Pages 849-861.

Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B. & Massy-Westropp, R.A. (1982). Studies on the hydrolysis of Vitis Vinifera monoterpene precursor compounds and model monoterpene P-D-Glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 1219-1223.

Zagorc, T., Maráz, A., Cadez, N., Jemec, K.P., Péter, G., Resnik, M., et al. (2001). Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiol.* 18, 441–451. doi:10.1006/fmic.2001.0422.

Zeeman, W., Snyman, J.P. & van Wyk, C.J. (1982). The influence of yeast strain and malolactic fermentation on some volatile bouquet.

Zhao, Procopio & Becker, 2015.

Zhang, S. and Farber, J.M. (1996). The Effects of Various Disinfectants Against *Listeria Monocytogenes* on Fresh-Cut Vegetables. *Food Microbiology*, 13, 311-321. Handling Strategies and Facilities for Horticultural Crops.

Zilio, F., Lombardi, A., Galeotto, A., & Comi, G. (1998). Profili di restrizione del DNA mitocondriale di ceppi di *Saccharomyces* isolati nella zona di produzione del vino Soave D.O.C. *Rivista di Viticoltura ed Enologia*, 3, 33–41.

Ελληνική βιβλιογραφία

Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης. Τεχνικός Φάκελος βάσει του άρθρου 118 γ. άρθρο 17 παράγραφος 5 του κατ' εξουσιοδότηση κανονισμού (ΕΕ) 2019/33 της Επιτροπής.

Κουρακού Σ. (2015). *Σαντορίνη Ιστορικό Οινοπέδιο*. Ελλάδα: Φοίνικα, σελ. 112.

Μπασά Κ. (2020). Μελέτη της παραγωγής αιθανόλης κατά την αύξηση άγριων και εμπορικών ζυμών σε υποστρώματα προσομοίωσης γλεύκους και έλεγχος της δυνατότητας χρήσης των στελεχών αυτών προς την παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας.

Παναγιωτάκης Σ. (2013). Μελέτη της γεύσης του πικρού στην ουσία PTC σε ομάδα ατόμων Ελληνικής καταγωγής. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Τμήμα Επιστήμης Διατροφολογίας- Διατροφής.

Τσακίρης Α. (2014). *Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί*, 4η Έκδοση. Αθήνα: Ψύχαλου, σελ 47-49).

Σουφλερός Ε. (2009). *Οινολογία: Επιστήμη και Τεχνογνωσία*. Τόμος 1. Ελλάδα: Ιδιωτική σελ 239-240.

