



**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**

Απομόνωση γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων από την ποικιλία Σαββατιανό

**Διονύσιος Ι. Γιαννόπουλος**

Επιβλέπων καθηγητής:  
Γιώργος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2023**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Απομόνωση γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων από την ποικιλία Σαββατιανό

Isolation of indigenous yeast strains from Savvatiano variety

**Διονύσιος Ι. Γιαννόπουλος**

Εξεταστική Επιτροπή:

Γιώργος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σταματίνα Καλλίθρακα, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Χρυσανγή Γαρδέλη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

## Απομόνωση γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων από την ποικιλία Σαββατιανό

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

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οινική εκπαίδευση και η κουλτούρα για την κατανάλωση οίνου τα τελευταία χρόνια έχει ανέβει σε αρκετά υψηλά επίπεδα. Κατά συνέπεια, ο κόσμος πλέον δεν αρέσκεται μόνο στην κατανάλωση ενός προϊόντος με έντονα, ευχάριστα αρώματα λουλουδιών ή βαρελιού αλλά επιζητά την πολυπλοκότητα και το τυπικό αρωματικό προφίλ κάθε ποικιλίας που θα σχετίζεται άμεσα με το terroir της περιοχής της. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων, από το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης γλεύκους της ποικιλίας Σαββατιανό, ως προς την ικανότητα ζύμωσης, τη κινητική ζύμωσης και το οργανοληπτικό προφίλ των τελικών οίνων. Συγκεκριμένα, αφού πραγματοποιήθηκε διαδικασία απομόνωσης κι επιλογής γηγενών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*, ακολούθησε εμβολιασμός των απομονωμένων στελεχών σε γλεύκος ποικιλίας Σαββατιανό και αξιολογήθηκε η κινητική της ζύμωσης. Στους οίνους που παράχθηκαν πραγματοποιήθηκαν βασικές αναλύσεις καθώς και οργανοληπτική αξιολόγηση έτσι ώστε να προσδιοριστεί το αρωματικό προφίλ τους. Στη μελέτη αξιολογήθηκαν τέσσερα διαφορετικά στελέχη ζυμομύκητα πραγματοποιώντας μικροοινοποιήσεις σε δύο επαναλήψεις για κάθε στέλεχος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλα τα στελέχη παρουσίασαν εξαιρετική αντοχή στην αιθανόλη, με ανάγοντα σάκχαρα κάτω από 1g/L (μέγιστη τιμή). Το pH σε όλους τις ζυμώσεις ήταν κάτω του 3,5 και η ολική οξύτητα κατά μέσο όρο κυμαινόταν στα 5 g/L τρυγικού οξέος. Η πτητική οξύτητα βρισκόταν σε χαμηλά επίπεδα με εξαίρεση το στέλεχος Sc1 όπου η πτητική του ήταν στα 0,6 g/L οξικού οξέος που θεωρείται οριακά για να είναι οργανοληπτικά αποδεκτή. Τέλος, στην οργανοληπτική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών από εκπαιδευμένο πάνελ, τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι οίνοι ήταν μεσαίας προς υψηλής αρωματικής έντασης, με έντονη πολυπλοκότητα στο αρωματικό προφίλ τους και με αρκετά καλή συνολική ποιότητα.

**Επιστημονικό Πεδίο:** Οινολογία

**Λέξεις κλειδιά:** αυθόρμητες ζυμώσεις, στελέχη ζυμομυκήτων, αλκοολική ζύμωση, οργανικά οξέα, *Saccharomyces cerevisiae*, *non Saccharomyces cerevisiae*

## **Isolation of indigenous yeast strains from Savvatiano variety**

*MSc Current Food Technology. I) Dairy Science & Technology II) Oenology  
Department of Food Science & Human Nutrition  
Laboratory of Oenology & Alcoholic Drinks*

### **ABSTRACT**

The wine education and the culture of wine consumption has risen to high levels in recent years. Consequently, people are no longer only fond of the consumption of one product with intense, pleasant flower or oaky aromas but also they are looking for the complexity and the typical aromatic profile of each variety directly related to terroir of its area. The aim of the present study is the evaluation of native yeast strains from the end of alcoholic fermentation must of Savvatiano variety in terms of fermentability, fermentation kinetics and the sensory profile of the final wines. Specifically, after a process of isolation and selection of indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* was carried out, the isolated strains were inoculated into must of the Savvatiano variety and the fermentation kinetics were evaluated. In wines produced, main analysis as well as sensory evaluation was conducted so as to determine their aromatic profile. In the study, four different yeast strains were evaluated in two repetitions for each strain. The results indicated that all the strains showed excellent resistance to ethanol with reducing sugars below 1g/L (maximum value). The pH in all fermentations was below 3.5 and the total acidity ranging, on average, to 5g/L of tartaric acid. The volatile acidity was at low levels except for the strain Sc1, in which acidity was at 0.6g/L of acetic acid, which is assumed marginal, in order to be organoleptically acceptable. Finally, the sensory test that took part at the premises of the Laboratory of Oenology by a trained panel, the results showed that the wines were of medium to high aromatic intensity with intense complexity to their aromatic profile and with fairly good overall quality.

**Scientific area:** Oenology

**Keywords:** spontaneous fermentations, yeast strains, alcoholic fermentation, organic acids, *Saccharomyces cerevisiae*, non-*Saccharomyces cerevisiae*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου οινολογίας και ιδιαίτερα την κα. Νίκη Προξενιά για τις συμβουλές και τη στήριξή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Οινολογίας κ. Γεώργιο Κοτσερίδη για την ανάθεση του θέματος μου αλλά και για όλες τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Δέσποινα Λόλα για όλη την καθοδήγηση, τις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθεια της στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, όπου με τη στήριξή της μπόρεσε να γίνει εφικτή η εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω και να αφιερώσω την εργασία αυτή στη γυναίκα μου Αθανασία και στα παιδιά μου Ιωάννα και Οδυσσέα για την τεράστια υπομονή που κάνανε όλο αυτό το διάστημα αλλά και για την εμπύχωση τους ώστε να επιτευχθεί αυτός ο πολυπόθητος στόχος.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ .....	8
1.1.1. Αμπελογραφικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας .....	8
1.1.2. Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά .....	9
1.1.3. Το γλεύκος της ποικιλίας .....	9
1.2. ΛΕΥΚΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ .....	10
1.3. ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ.....	11
1.3.1. Γηγενείς και εμπορικοί ζυμομύκητες .....	12
1.3.2. Αυθόρμητες και ελεγχόμενες ζυμώσεις .....	13
1.3.4. Ζυμωτικά χαρακτηριστικά επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων .....	14
1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ .....	15
1.4.1. Επίδραση στα ανάγοντα σάκχαρα .....	15
1.4.2. Επίδραση στα οξέα.....	16
1.4.3. Επίδραση στην οξείδωση .....	16
1.4.4. Επίδραση στα πτητικά συστατικά .....	17
1.4.5. Επίδραση στο τελικό προφίλ.....	18
1.5. ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ .....	19
1.6. ΤΟ ΑΡΩΜΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ .....	22
1.6.1. Πρωτογενές άρωμα του οίνου .....	22
1.6.2. Δευτερογενές άρωμα του οίνου.....	24
1.6.3. Τριτογενές άρωμα του οίνου .....	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	29
2.1. Σκοπός του πειράματος .....	29
2.2. Πειραματικός σχεδιασμός .....	29
2.3. Πρωτόκολλο οινοποίησης .....	30
2.4. Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	30
2.5. Μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας.....	30
2.6. Προσδιορισμός οργανικών οξέων, σακχάρων και αλκοολών με HPLC.....	31
2.7. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ .....	32
2.7.1. Προσδιορισμός ολικής οξύτητας.....	32
2.7.2. Μέτρηση ενεργούς οξύτητας - pH .....	32

2.7.3. Προσδιορισμός ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη .....	33
2.7.4. Προσδιορισμός ολικού θειώδους ανυδρίτη .....	33
2.7.5. Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας .....	33
2.7.6. Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου .....	34
2.8. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΟΙΝΩΝ .....	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	36
3.1. Εξέλιξη ζύμωσης .....	36
3.2. Εξέλιξη πληθυσμού ζυμομυκήτων .....	42
3.3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ .....	43
3.4. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ.....	46
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	48
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ

Το Σαββατιανό είναι γηγενής ποικιλία της Αττικής. Εκεί πρωτοκαλλιεργήθηκε και έπειτα μεταφέρθηκε στην Εύβοια, τη Βοιωτία και στα παράλια της Μαύρης Θάλασσας σύμφωνα με τον Όμηρο. Είναι γνωστή και με άλλα ονόματα όπως, Κουντούρα λευκή, Ασπρούδα, Σακέικο και Περαχωρίτικο. Αποτελεί τη βάση για τη παραγωγή της ρετσίνας, του πιο γνωστού και παραδοσιακού κρασιού της Ελλάδας. Παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στην ξηρασία και τη ζέση και για το λόγο αυτό η ποικιλία πρωταγωνιστεί στον Αττικό αμπελώνα, που είναι από τους πιο θερμούς και τους πιο ξηρούς με ετήσια βροχόπτωση μικρότερη από τα 480 mm.

Ο συνδυασμός μη αρδευόμενων αμπελώνων (50 ετών κατά μέσο όρο) και των σύγχρονων τεχνικών οινοποίησης, έχει σαν αποτέλεσμα τη παραγωγή οίνων μέτριου αρωματικού χαρακτήρα, με ικανοποιητική οξύτητα και δυνατότητα παλαίωσης. Από το Σαββατιανό παράγονται πολύ καλά ξηρά κρασιά. Σε αντίθεση με άλλες λευκές ποικιλίες, παρουσιάζει εντυπωσιακά αποτελέσματα με παλαίωσή του σε βαρέλι, αποκτώντας ενδιαφέροντα αρώματα μελιού και αποξηραμένου βερίκοκου. Τέλος, συνδυάζεται πολύ καλά με Ασύρτικο ή Ροδίτη προσδίδοντας βάθος και φινέτσα (Σταύρακας, 2015).



ΕΙΚΟΝΑ 1. ΣΤΑΦΥΛΗ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ ([WWW.ATHINORAMA.GR](http://WWW.ATHINORAMA.GR))

#### 1.1.1. Αμπελογραφικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας

Το Σαββατιανό θεωρείται μια από τις πιο πολυφυτεμένες ποικιλίες του Ελληνικού αμπελώνα. Είναι πολύ παραγωγική ποικιλία μέτριας ζωηρότητας, όπου ο τυφλός οφθαλμός είναι γόνιμος και ο καρποφόρος βλαστός φέρει μία με δύο σταφυλές. Το μέγεθος της σταφυλής είναι μέτριο,



με ρώγες μικρές, πυκνές, σφαιρικές, κίτρινου-λευκού χρώματος. Στη νεαρή βλάστηση η αυξανόμενη κορυφή είναι μετρίως ανοιχτή έως ανοιχτή με χνοώδη χνοασμό και μέτριας έντασης ανθοκυανικό χρωματισμό. Τα νεαρά φύλλα είναι πράσινα με πολύ ελαφριές χάλκινες αποχρώσεις και ο νεαρός βλαστός βρίσκεται σε ημι-όρθια θέση όπου το χρώμα της εσωτερικής πλευράς είναι πράσινου στους κόμβους και τα μεσογονάτια. Τα αναπτυσσόμενα φύλλα είναι μεσαίου μεγέθους, σφηνοειδή, πεντάκολλα-πεντάλοβα. Ο μίσχος του φύλλου είναι κοντός και ρόδινος ή φέρει ρόδινες ραβδώσεις. Παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στην ξηρασία και καλή αντοχή στον περονόσπορο, αλλά είναι αρκετά ευαίσθητη στο οίδιο. Για οίνους ποιότητας, απαιτεί ξηρά, φτωχά και ασβεστούχα χαλικιώδη εδάφη (Σταύρακας, 2015).

### **1.1.2. Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά**

Όπως προαναφέρθηκε, καρπίζει σε κεφαλές δύο οφθαλμών καθώς ο οφθαλμός της βάσης αλλά και ο τυφλός οφθαλμός είναι επαρκούς γονιμότητας. Η ποιότητα του σταφυλιού μειώνεται όταν καλλιεργείται σε αρδευόμενα και γόνιμα εδάφη καθώς και όταν γίνεται προσπάθεια για μεγάλες στρεμματικές αποδόσεις. Απαιτεί μεγάλη προσοχή στο στάδιο του τρυγητού, γιατί αν υπερωριμάσει χάνει εύκολα τα οξέα της. Η έναρξη της βλάστησης πραγματοποιείται προς τα τέλη Μαρτίου και η πλήρης άνθηση στο δεύτερο δεκάημερο του Μαΐου. Η έναρξη της ωρίμανσης πραγματοποιείται στα τέλη Ιουλίου με την πλήρη ωρίμανση να πραγματοποιείται στα μέσα του Σεπτεμβρίου ανάλογα με την περιοχή και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του αμπελώνα (Κεφαλοπούλου, 2015).

### **1.1.3. Το γλεύκος της ποικιλίας**

Το γλεύκος της ποικιλίας μπορεί να παράγει ξηρούς οίνους με μέτριο προς υψηλό αλκοολικό τίτλο, μέτριο σώμα, με αρώματα φρούτων όπως πράσινο μήλο, αχλάδι, ροδάκινο και κάποιες νότες λουλουδιών. Σε αρκετές περιπτώσεις προσδίδει έναν βοτανικό χαρακτήρα ή ακόμα και ορυκτότητα. Επίσης, το γλεύκος της ποικιλίας χρησιμοποιείται για την παραγωγή γλυκών και αφρωδών οίνων με μεγάλη επιτυχία εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της (Μακρυγιάννη, 2017). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι το Σαββατιανό μαζί με τον Ροδίτη, αποτελούν τις κυριότερες ποικιλίες για την παραγωγή ρετσίνας, προϊόν που παράγεται αποκλειστικά στη γεωγραφική επικράτεια της Ελλάδας και σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία η ονομασία Ρετσίνα αποτελεί <ονομασία κατά παράδοση>.

## 1.2. ΛΕΥΚΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Κύρια χαρακτηριστικά της λευκής οινοποίησης είναι η απουσία εκχύλισης συστατικών από τα στερεά μέρη του σταφυλιού κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και ο διαχωρισμός του γλεύκους σε κλάσματα. Για τους λόγους αυτούς, τόσο η εξαγωγή του γλεύκους όσο και η οινοποίηση έχουν μεγάλη σημασία.

Ο διαχωρισμός του γλεύκους από τα στέμφυλα γίνεται πριν από τη ζύμωση ώστε να ελαχιστοποιείται η εκχύλιση. Πραγματοποιείται μια μικρή εκχύλιση για την παραλαβή των αρωματικών συστατικών του σταφυλιού από τον φλοιό. Σημαντική φροντίδα για την παραγωγή των λευκών κρασιών είναι η ανάγκη προστασίας από τις οξειδώσεις που γίνεται χάρη στη προσθήκη θειώδη ανυδρίτη. Τα σταφύλια πρέπει να είναι υγιή και η θείωση του λευκού γλεύκους είναι απαραίτητη ως μέσον για την προστασία από τις οξειδώσεις. Επιβάλλεται η πολύ καλή απολάσπωση, δηλαδή η απομάκρυνση των στερεών σωματιδίων που αιωρούνται στο γλεύκος, πριν από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ είναι αναγκαία η ζύμωση σε χαμηλές θερμοκρασίες (Τσακίρης, 2017).

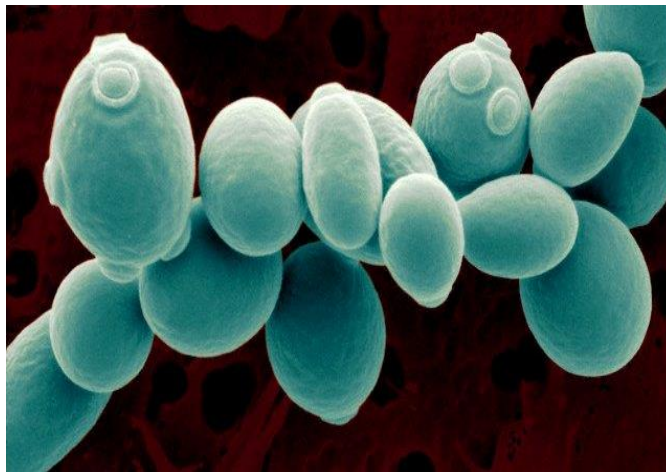
Αναλυτικότερα, το πρώτο στάδιο της λευκής οινοποίησης αποτελεί ο εκραγισμός. Το μηχάνημα που χρησιμοποιείται είναι ο εκραγιστήρας ο οποίος αποτελεί ένα διάτρητο κύλινδρο που περιστρέφεται. Στο εσωτερικό του κυλίνδρου βρίσκεται ένας άξονας με πτερύγια που περιστρέφεται με αντίθετη φορά και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των ραγών που περνούν από τις οπές του κυλίνδρου ενώ οι βόστρυχες βγαίνουν από το αντίθετο άκρο. Έπειτα, με την επένεργεια πίεσης ή φυγοκέντρωσης, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός από τα στέμφυλα και ο σταφυλοπολτός οδηγείται στο πιεστήριο. Πρώτα, λαμβάνεται ο πρόρωγος, δηλαδή το γλεύκος που προκύπτει χωρίς πίεση και αποτελεί τη βάση για την παραγωγή ποιοτικών οίνων και στη συνέχεια λαμβάνεται το γλεύκος πίεσης (πιέσεις). Στη συνέχεια, το γλεύκος οδηγείται σε δεξαμενή, όπου ψύχεται για 24 ώρες περίπου, και με τη βοήθεια πηκτινολυτικών ενζύμων θα διαυγάσει. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται στατική απολάσπωση, πρόκειται για απομάκρυνση των στερεών σωματιδίων από το γλεύκος, και γίνεται για να έχουν τα γλεύκη πιο καθαρό άρωμα, να είναι πιο σταθερό το χρώμα τους και με μικρότερο κίνδυνο από οξειδώσεις.

Το τελικό και σημαντικότερο στάδιο της λευκής οινοποίησης είναι η αλκοολική ζύμωση. Ο καθαρός πλέον χυμός μεταφέρεται στη δεξαμενή όπου θα πραγματοποιηθεί η αλκοολική ζύμωση, δηλαδή η μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη όπου παράλληλα παράγεται CO<sub>2</sub> και κάποιοι δευτερογενείς μεταβολίτες. Η ζύμωση προκαλείται είτε από γηγενείς ζυμομύκητες ή από εμβολιασμό επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων, προκειμένου να υπάρχει καλύτερος

έλεγχος της ζύμωσης και παραγωγή οίνου με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης η θερμοκρασία του γλεύκους αυξάνεται καθώς οι ζύμες παράγουν ενέργεια. Με σκοπό την διατήρηση των αρωματικών χαρακτηριστικών του γλεύκους, και κατ' επέκταση του οίνου, η δεξαμενή ψύχεται γύρω στους 18 βαθμούς Κελσίου. Μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, ακολουθεί η πρωτεϊνική και η τρυγική σταθεροποίηση του οίνου, ώστε να είναι διαυγής και να σταθεροποιηθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί ο λευκός οίνος να αποθηκευτεί για ένα διάστημα σε βαρέλια για να αποκτήσει πιο γεμάτο σώμα και αρώματα που θα πάρει από το ξύλο του βαρελιού (Ribereau-Gayon, 2006).

### 1.3. ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ

Οι ζυμομύκητες παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην οινοποίηση καθώς το έργο τους βασίζεται στο σχηματισμό αιθανόλης, με το μεταβολισμό των σακχάρων. Ανήκουν στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το σχήμα των κυττάρων τους είναι γενικά ελλειψοειδές και οι διαστάσεις τους κυμαίνονται από 5-8 μm (Τσακίρης, 2017). Σε συνθήκες περίσσειας θρεπτικών υλών και ήπιων καλλιεργητικών συνθηκών, διπλασιάζονται ανά 90 λεπτά.



ΕΙΚΟΝΑ 2. SACCHAROMYCES CEREVISIAE (WWW.KRASIA.COM)

Ο κυτταρικός τους κύκλος περιλαμβάνει τέσσερις φάσεις: Τη λανθάνουσα, την εκθετική, τη στατική και τη φάση θανάτωσης. Τις πιο σημαντικές αποτελούν η λανθάνουσα και η εκθετική. Η λανθάνουσα θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο σύντομη, οι ζύμες θα πρέπει να αναπτύσσονται αμέσως μετά τον εμβολιασμό. Αν καθυστερήσει η ανάπτυξή τους, τα βακτήρια που υπάρχουν στο γλεύκος θα αρχίσουν να καταναλώνουν τα σάκχαρα και να παράγουν

μεταβολίτες που μπορεί να αλλοιώσουν τα χαρακτηριστικά του οίνου. Κατά την εκθετική φάση, αν η ταχύτητα παραγωγής της αιθανόλης είναι υψηλή, τότε θα είναι υψηλή και η παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα. Σαν αποτέλεσμα θα είναι να απογυμνωθεί ο οίνος από τα αρώματά του, καθώς θα συμπαρασέρονται από το διοξείδιο (Ταταρίδης, 2016).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί το σημαντικότερο στέλεχος για την πραγματοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς θεωρείται ένας από τους πιο προσαρμοσμένους μικροοργανισμούς για αυτήν τη διαδικασία (Martini and Vaughan-Martini, 1990). Η ζύμη αυτή βρίσκεται στα σταφύλια σε πολύ μικρούς πληθυσμούς, 10-100 CFU/g σταφυλιών (Fleet, 2003). Κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, ο *S. cerevisiae* συμμετέχει ελάχιστα. Μετά την έναρξη της ζύμωσης, ο πληθυσμός του αυξάνεται πολύ γρήγορα όπου επικρατεί σε ποσοστό 90% και είναι και εκείνος ο οποίος τελικά θα την ολοκληρώσει.

Μπορεί λοιπόν ο *S. cerevisiae* να αποτελεί το κυριότερο στέλεχος για την οινοποίηση, αλλά στην επιφάνεια των σταφυλιών υπάρχει πληθώρα από διάφορους ζυμομύκητες. Οι συνηθέστεροι είναι οι *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Torulasporea* και *Hansienasporea* οι οποίοι παρουσιάζουν χαμηλή αντοχή σε υψηλή αιθανόλη, σε έλλειψη οξυγόνου και σε υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων (Fleet, 2003). Επίσης, υπάρχουν και ζύμες όπως το είδος *Brettanomyces* όπου μπορούν να δημιουργήσουν ελάττωμα στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Συνοψίζοντας, στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης το λόγο έχουν τα *non-Saccharomyces* είδη όπως, *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Rhodotolura* και *Torulasporea* (Pretorius, 2000). Στη συνέχεια και κατά το μέσο της ζύμωσης όπου αρχίζει η εκθετική φάση, οι ζυμομύκητες αυτοί αρχίζουν να πεθαίνουν. Στο σημείο αυτό ο *S. cerevisiae* κυριαρχεί με πληθυσμούς  $10^7$ - $10^8$  cfu/mL όπου και ολοκληρώνει τη ζύμωση (Ταταρίδης, 2015). Ο πληθυσμός του *S. cerevisiae* μπορεί να αυξηθεί σημαντικά και στην αρχή της ζύμωσης όταν γίνει εμβολιασμός με κάποιο στέλεχος του.

### **1.3.1. Γηγενείς και εμπορικοί ζυμομύκητες**

Η γεύση και το άρωμα του οίνου οφείλονται στην πρώτη ύλη (γλεύκος), στο στέλεχος της ζύμης που θα πραγματοποιήσει την αλκοολική ζύμωση και στις συνθήκες οινοποίησης. Όπως έχει αναφερθεί, η οινοποίηση αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία που στηρίζεται στη ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους από μια μεγάλη ποικιλία ζυμών που βρίσκονται στο φλοιό των σταφυλιών.

Η αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση εκτελείται από τη διαδοχική δράση διαφόρων γενών και ειδών ζύμης που υπάρχουν στα σταφύλια και που συνεισφέρουν στο άρωμα του οίνου. Η ανάπτυξή τους είναι σημαντική και επηρεάζει τη χημική σύσταση του οίνου. Οι ζύμες αυτές είναι ευαίσθητες ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλκοόλης και έτσι όταν η αλκοόλη υπερβεί το 5-6 % (v/v), η ανάπτυξή τους αναστέλλεται και στο σημείο αυτό αρχίζει η ανάπτυξη του *S. cerevisiae*. Τα διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae* παράγουν διαφορετικά δευτερογενή προϊόντα που είναι σημαντικά για την ποιότητα του οίνου.

Οι εμπορικές ζύμες χρησιμοποιούνται για να μπορεί να ξεκινήσει άμεσα και να έχει επιτυχή έκβαση η ζύμωση του γλεύκους. Η χρήση τους όμως, αποκλείει την ανάπτυξη του γηγενούς πληθυσμού με αποτέλεσμα να χάνονται τα δευτερογενή προϊόντα αλλά και τα αρώματα που μπορούν να παραχθούν από τον πληθυσμό αυτό. Η χρήση επίσης των εμπορικών ζυμών έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή οίνων χωρίς τυπικά, ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

Η απομόνωση γηγενών στελεχών ζυμών, αποτελεί σημαντικό βήμα για την διατήρηση και χρησιμοποίηση της γηγενούς μικροβιακής βιοποικιλότητας για την παραγωγή οίνων. Η χρήση επιλεγμένων γηγενών στελεχών ζυμών αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο στην επίτευξη ιδιαίτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στους παραγόμενους οίνους. Τα γηγενή στελέχη των ζυμών αποτελούν ίσως την ιδανική επιλογή για γλεύκη που παράγονται από γηγενείς ποικιλίες σταφυλιών, έτσι ώστε να μπορούν να αναδείξουν τα χαρακτηριστικά, τις ιδιαιτερότητες αλλά και την τυπικότητα των τοπικών οίνων.

### **1.3.2. Αυθόρμητες και ελεγχόμενες ζυμώσεις**

Παλαιότερα οι ζυμώσεις γινόντουσαν αυθόρμητα, με αξιοποίηση της φυσικής ζυμογλωρίδας των σταφυλιών όπου και κυριαρχούσαν στελέχη ζυμομυκήτων που ήταν εγκλιματισμένα στις εδαφοκλιματικές συνθήκες της κάθε περιοχής. Η μικροβιακή γλωρίδα των σταφυλιών, διαφοροποιείται από χρονιά σε χρονιά καθώς πολλοί παράγοντες παίζουν ρόλο όπως: η περιοχή, η ποικιλία, η ηλικία του αμπελώνα, οι αμπελουργικές πρακτικές, το περιβάλλον και το κλίμα. Έτσι, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση θα ξεκινήσει από είδη *non-Saccharomyces* που θα αποτελούνται από διαφορετικούς πληθυσμούς και που θα παίξουν καθοριστικό ρόλο στα διάφορα στάδια της ζύμωσης ενώ την ολοκλήρωσή της την αναλαμβάνει συνήθως ο *S. cerevisiae*.

Σε μια ζύμωση που γίνεται με εμβολιασμό χρησιμοποιείται είτε μια ξηρή είτε μια υγρή καλλιέργεια ζυμομυκήτων για να ξεκινήσει και να ολοκληρώσει τη ζύμωση. Στις περισσότερες των περιπτώσεων είναι κάποιο στέλεχος του ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, που παρουσιάζει

ανθεκτικότητα σε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, παράγει χαμηλό υδρόθειο και παρουσιάζει πολύ καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στους οίνους.

Τα πλεονεκτήματα της αυθόρμητης ζύμωσης, είναι η πολυπλοκότητα και η δομή που μπορεί να προσδώσει στον οίνο. Διαφορετικά γένη δίνουν διαφορετικά πτητικά συστατικά ή διαφορετικές συγκεντρώσεις με αποτέλεσμα ένα περίπλοκο προφίλ γεύσης και αρώματος. Οι οίνοι αυτοί σχετίζονται άμεσα με το μοναδικό terroir της περιοχής τους, που τους δίνει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αλλά και πιο πλούσια δομή που οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερίνης που σχηματίζονται. Επίσης, η διαδικασία της αυθόρμητης ζύμωσης είναι μια διαδικασία αρκετά πιο οικονομική από αυτή του εμβολιασμού.

Στα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι αυθόρμητες ζυμώσεις συμπεριλαμβάνονται το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να ξεκινήσει η ζύμωση, η χαμηλή κινητική που παρουσιάζει ειδικά προς το τέλος της ζύμωσης, μια πιθανή επιμόλυνση από άλλους μικροοργανισμούς, οξείδωση, σταμάτημα ζύμωσης, δημιουργία απρόβλεπτων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και μεγάλες διαφορές από τρύγο σε τρύγο. Για αυτό το λόγο, όταν ακολουθείται οινοποίηση με αυθόρμητη ζύμωση, είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται μόνο τα υγιή σταφύλια με χαμηλό πληθυσμό μικροοργανισμών. Επίσης, σταφύλια με υψηλή συγκέντρωση σακχάρων θα πρέπει να αποφεύγονται καθώς είναι λόγος για να αργήσει η ζύμωση ή ακόμα και να σταματήσει (Ταταρίδης, 2015).

Συνοψίζοντας, ως αποτέλεσμα των θετικών χαρακτηριστικών της ζύμωσης, της αντοχής στο θειώδες και στην υψηλή αλκοόλη, της περιορισμένης δυνατότητας δημιουργίας ενώσεων με δυσάρεστες οσμές, οι ελεγχόμενες ζυμώσεις θεωρούνται σημαντικά πιο ασφαλείς.

#### **1.3.4. Ζυμωτικά χαρακτηριστικά επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων**

Η παραγωγή του οίνου είναι αποτέλεσμα της αλκοολικής ζύμωσης. Εκτός από τη μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη, κατά το μεταβολισμό των ζυμομυκήτων παράγονται πολλές ακόμη ενώσεις οι οποίες καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό το αρωματικό και γευστικό προφίλ του οίνου. Σε αυτό το στάδιο η επιλογή της ζύμης που θα πραγματοποιήσει την αλκοολική ζύμωση, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για να έχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η γνώση των ζυμωτικών χαρακτηριστικών του στελέχους του ζυμομύκητα που θα χρησιμοποιηθεί, θα ελαχιστοποιήσει πιθανά αρνητικά χαρακτηριστικά στον παραγόμενο οίνο.

Στα θετικά ζυμωτικά χαρακτηριστικά κατατάσσονται τα παρακάτω:

- Γρήγορη εκκίνηση και αποπεράτωση ζύμωσης

- Αντοχή στην αιθανόλη
- Αντοχή σε μεγάλη ωσμωτική πίεση για γλεύκη με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων
- Αντοχή στο θειώδες
- Ζύμωση σε χαμηλές θερμοκρασίες
- Αποικοδόμηση μηλικού οξέος
- Παραγωγή γλυκερίνης
- Παράγοντας killer

Ενώ στα αρνητικά ζυμωτικά χαρακτηριστικά κατατάσσονται τα ακόλουθα:

- Παραγωγή πτητικής οξύτητας
- Παραγωγή διοξειδίου του θείου
- Παραγωγή υδρόθειου
- Παραγωγή ακεταλδεύδης και πυροσταφυλικού οξέος

## **1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ**

### **1.4.1. Επίδραση στα ανάγοντα σάκχαρα**

Οι ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση καταναλώνουν τα σάκχαρα του γλεύκους που βρίσκονται σε συγκεντρώσεις από 140-260 g/L και συνήθως υπάρχει ένα κατάλοιπο μικρότερο των 2 g/L. Εκτός από την κατανάλωση των σακχάρων, είναι πολύ σημαντικός και ο ρυθμός της ζύμωσης έτσι ώστε να αποφεύγονται ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί. Τα είδη *H. uvarum*, *H. guilliermondii* και *C. zemplinina* θεωρούνται χαμηλής ζυμωτικής ικανότητας και χαμηλής ανθεκτικότητας στην αιθανόλη. Τα είδη αυτά παρουσιάζουν αποτυχία στην αφομοίωση των διαθέσιμων σακχάρων του γλεύκους και κατ' επέκταση, αφήνουν υψηλά ποσοστά αζύμων σακχάρων (30-100 g/L) με χαμηλά επίπεδα αιθανόλης (5-8% v/v) (Ciani and Picciotti, 1995). Σύμφωνα με μια μελέτη όπου κατέταξε αρκετά στελέχη ζυμομυκήτων ανάλογα με τα επίπεδα αιθανόλης που παράγουν σε (% v/v), προκύπτει: *S. cerevisiae*, 12–16 %, *Sd. ludwigii*, 10–12 %, *T. delbrueckii*, 6–10 %, *C. zemplinina*, 4–6 %, *H. uvarum*, 4–6 %, *K. apiculata*, 2–4 % (Ciani and Maccarelli, 1998).

Η επίδραση των ζυμομυκήτων στα ανάγοντα σάκχαρα και η καταλληλότητά τους, εξαρτάται και από άλλους παράγοντες που έχουν να κάνουν με την επιβίωσή τους κάτω από τις δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες που απαντώνται στο γλεύκος. Τέτοιες είναι οι υψηλές

συγκεντρώσεις σακχάρων, οι χαμηλές τιμές pH (3,0-3,5), η χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου, τα υψηλά επίπεδα αιθανόλης, οι χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου, τα οργανικά οξέα και άλλοι ζυμωτικοί μεταβολίτες (Albergaria and Arneborg, 2016).

#### 1.4.2. Επίδραση στα οξέα

Σε ψυχρές περιοχές όπου επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες, υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα σταφύλια δεν έχουν ολοκληρώσει τον κύκλο τους, με αποτέλεσμα να μην έχουν προλάβει να ωριμάσουν κατά τη συγκομιδή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας του γλεύκους, καθώς το μηλικό οξύ (δεύτερο πιο ισχυρό οξύ μετά το τρυγικό) βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις και δημιουργεί προβλήματα στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. Υπάρχουν στελέχη ζυμομυκήτων τα οποία κάτω από αναερόβιες συνθήκες, μπορούν να μεταβολίσουν το μηλικό οξύ σε αιθανόλη (Rankine, 1966; Rodriguez & Thornton, 1990). Τα διαφορετικά στελέχη αποικοδομούν με διαφορετικούς τρόπους το μηλικό οξύ. Ο *S.cerevisiae* αποικοδομεί μερικώς το μηλικό (10-25%) κατά την αλκοολική ζύμωση, όπου εισέρχεται στο κύτταρο της ζύμης με απλή διάχυση. Η αποικοδόμηση γίνεται καλύτερα σε χαμηλό pH. Στα στελέχη *Schizosaccharomyces*, η αλκοολική ζύμωση του μηλικού είναι πλήρης καθώς έχουν ενεργό σύστημα μεταφοράς του μηλικού.

Κατά την αλκοολική ζύμωση, οι ζύμες μπορούν να παράξουν γαλακτικό οξύ με την δράση των L(+) και D(-) αφυδρογονασών. Σε αναερόβιες συνθήκες οι ζύμες συνθέτουν κυρίως D(-) αφυδρογονάση, όπου παράγονται συνήθως 200-300 mg/L D(-) γαλακτικού και 12 mg/L (+) γαλακτικού, με το δεύτερο να παράγεται ουσιαστικά στην έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Προσδιορίζοντας τη συγκέντρωση του D(-) γαλακτικού σε έναν οίνο, μπορεί να διευκρινιστεί αν η προέλευσή του οφείλεται σε ζύμες ή γαλακτικά βακτήρια.

Επίσης, στελέχη ζυμών επιδρούν στο μεταβολισμό του οξικού οξέος μέσω του μονοπατιού του ακετυλο-CoA στη βιοσύνθεση λιπιδίων. Μπορούν να μεταβολίσουν μεγάλο μέρος του οξικού που εκκρίνεται στο γλεύκος κατά τη ζύμωση των πρώτων 50-100 g σακχάρων.

#### 1.4.3. Επίδραση στην οξείδωση

Υπάρχουν στελέχη ζυμών που παράγουν οξικό αιθυλεστέρα. Ανάλογα με την ικανότητα παραγωγής χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Αυτές που παράγουν μικρές συγκεντρώσεις όπως είναι όλοι οι σακχαρομύκητες και ο *Torulopsis stellata*, αυτές που έχουν μέση ικανότητα παραγωγής, όπως οι *Hanseniaspora* και *Brettanomyces* και αυτές που παράγουν μεγάλες ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα όπως οι *Pichia* και *Hansenula*. Οι ζύμες κατά την αλκοολική



ζύμωση μπορούν να σχηματίσουν μέχρι 50 mg/L οξικού αιθυλεστέρα. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τα 100 mg/L είναι ένδειξη βακτηριακής προσβολής.

Οι ζυμομύκητες σχηματίζουν οξικό οξύ με αφετηρία τα σάκχαρα. Οι παράγοντες που επιδρούν στο σχηματισμό οξικού οξέος είναι pH μικρότερο του 3 ή μεγαλύτερο του 4, η θερμοκρασία ζύμωσης, καθώς εννοείται ο σχηματισμός του σε θερμοκρασία 20-30 °C, η αυστηρή αναερόβωση και πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (Τσακίρης, 2017). Σε συνδυασμό με την οξείδωση ακολουθεί και η παραγωγή ακεταλδεΐδης. Κάποια στελέχη ζυμομυκήτων παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ακεταλδεΐδης κατά την αλκοολική ζύμωση από κάποια άλλα. Η ακεταλδεΐδη αποτελεί παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και προκύπτει από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη κατά την αλκοολική ζύμωση δεσμεύει την ακεταλδεΐδη με αποτέλεσμα να βρίσκεται σε υψηλά ποσοστά στους οίνους. Σύμφωνα με τον Αγοραστό (2017), η ακεταλδεΐδη είναι υπεύθυνη για τις οξειδώσεις σε υγιείς οίνους, όμως σε μικρές συγκεντρώσεις συμβάλλει θετικά στο οργανοληπτικό τους προφίλ, όπως οι οίνοι Sherry. Τα όρια κυμαίνονται μεταξύ 100-125 mg/L ενώ στους οίνους Sherry φτάνουν ως και τα 300 mg/L. Σε υψηλές συγκεντρώσεις αλλοιώνει το οργανοληπτικό προφίλ των οίνων προσδίδοντας οσμή υπερώριμου μήλου.

#### **1.4.4. Επίδραση στα πτητικά συστατικά**

Μέσω της αλκοολικής ζύμωσης, οι ζύμες μπορούν να συνεισφέρουν ενεργά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με την αξιοποίηση των συστατικών του γλεύκους, με τη παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης που βοηθά στην εκχύλιση διαφόρων ενώσεων από τα στερεά μέρη του καρπού, μέσω της παραγωγής διαφόρων ενζύμων που μετατρέπουν τις πρόδρομες άοσμες ενώσεις, σε ποικιλιακό άρωμα στον τελικό οίνο, με την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών όπως: οξέα, αλκοόλες, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες, πτητικές θειούχες ενώσεις και τέλος με την αυτολυτική αποικοδόμηση των νεκρών κυττάρων ζυμών. Οι αντιδράσεις αυτές ποικίλουν ανάλογα με το στέλεχος του ζυμομύκητα (Fleet, 2003).

Μια από τις τεχνικές στη σύγχρονη οινοποιία, αποτελεί η χρήση διαφορετικών στελεχών ζυμών ανάλογα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά που θέλει να προσδώσει στον τελικό οίνο (Suarez-Lepe and Morata, 2012). Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια η επιστημονική έρευνα έχει στραφεί στην απομόνωση στελεχών ζυμών που επιδρούν στις διάφορες πτητικές ενώσεις αυξάνοντας το φρουτώδη χαρακτήρα των οίνων, ευνοούν τη παραγωγή θειολών και τερπενίων από πρόδρομες ενώσεις του σταφυλιού, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο τον ποικιλιακό

χαρακτήρα των οίνων (Doubourdieu, 2006). Όλα τα παραπάνω έχουν σαν αποτέλεσμα, τα τελευταία χρόνια, την υιοθέτηση ελεγχόμενων ζυμώσεων με χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων κατά την οινοπαραγωγή (Sablayrolles, 2009).

#### 1.4.5. Επίδραση στο τελικό προφίλ

Οι ζυμομυκήτες επιδρούν στα χαρακτηριστικά των οίνων με μηχανισμούς που εκτείνονται πέρα από το μεταβολισμό των σακχάρων του γλεύκους οι οποίοι είναι οι εξής:

- Μεταβολισμός των σακχάρων του γλεύκους και των στοιχείων του αζώτου
- Ενζυμική υδρόλυση των στοιχείων του σταφυλιού που θα επιδράσουν στο άρωμα, τη γεύση, το χρώμα και τη διαύγεια του οίνου
- Αυτόλυση
- Βίο-προσρόφηση

Οι ζύμες, μέσω της αλκοολικής ζύμωσης, επιδρούν στο άρωμα, στα οργανικά οξέα, τη γλυκερίνη, τις αλκοόλες, τους εστέρες, τις αλδεΐδες, τις κετόνες, τις πτητικές θειούχες ενώσεις και τις αμίνες (Lambrechts & Pretorius, 2000; Swiegers, 2005). Επηρεάζουν ουσιαστικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων και διευκολύνουν τον οίνο να εκφράσει τον ποικιλιακό του χαρακτήρα. Υπάρχουν αντιδράσεις μέσω των οποίων προκύπτουν συστατικά του γλεύκους τα οποία είναι γευστικά ανενεργά. Από αυτές τις αντιδράσεις η περισσότερη μελετημένη είναι η απελευθέρωση των τερπενίων. Οι αλκοόλες μονοτερπενίων, όπως η γερανιόλη, η λιναλοόλη και η νερόλη προκύπτουν φυσικά στα σταφύλια δίνοντας χαρακτηριστικά φρουτώδη, ανθικά και φυτικά αρώματα. Όμως, ένα μεγάλο ποσοστό των τερπενίων αυτών, είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τη γλυκόζη ή και άλλα σάκχαρα όπου η δεσμευμένη μορφή δεν έχει επίδραση στη γεύση. Οι γλυκοζιδάσεις, που παράγονται από τις ζύμες, σπάνε το δεσμό αυτό και απελευθερώνουν τα πτητικά τερπένια που επιδρούν σημαντικά στον χαρακτήρα του οίνου. Η παραγωγή γλυκοζιδασών, ποικίλει ανάλογα το είδος και το στέλεχος της ζύμης. Σύμφωνα με μελέτες, τα είδη *Hanseniaspora*, *Debaryomyces* και *Dekkera* παράγουν περισσότερα ένζυμα από ότι ο *S. cerevisiae* και πιθανώς να έχουν σημαντικότερο ρόλο στην απελευθέρωση των τερπενίων αυτών (Fia et al., 2005; Maicas & Mateo, 2005; Swiegers et al., 2005; Villena et al., 2007).

Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της ζύμης, το 50% των σακχάρων μετατρέπεται σε αιθυλική αλκοόλη, το 45% σε διοξείδιο του άνθρακα, το 4% σε γλυκερίνη και το 1% σε άλλες ουσίες που παίζουν χαρακτηριστικό ρόλο στο τελικό προφίλ του οίνου. Τα σημαντικότερα

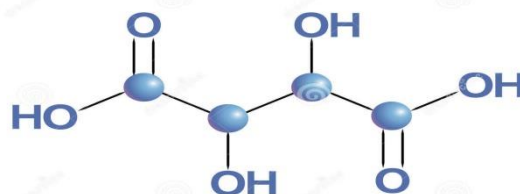
υποπροϊόντα είναι η ακεταλδεΐδη, το οξικό οξύ και όπως έχει αναφερθεί διάφορες αλκοόλες και εστέρες που καθορίζουν τα βασικά και οσφρητικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Είναι πολύ σημαντικό λοιπόν να γνωρίζουμε τη κατεύθυνση, το χαρακτήρα και γενικά το προφίλ που θέλουμε να έχει ο οίνος που θα παραχθεί, έτσι ώστε να επιλέξουμε τα αντίστοιχα στελέχη και σε συνέργεια των θρεπτικών, της θολερότητας και της θερμοκρασίας ζύμωσης να μπορούμε να φτάσουμε κοντά στο στόχο μας.

## 1.5. ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα κυριότερα οργανικά οξέα των σταφυλιών είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό, ενώ κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται το γαλακτικό, το ηλεκτρικό και το οξικό οξύ. Τα οξέα επιδρούν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων προσδίδοντας μια ξινή γεύση και παράλληλα μια φρεσκάδα (Reynaud & Blouin, 1996). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η υψηλή οξύτητα και το χαμηλό pH παρεμποδίζουν την ανάπτυξη βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών προστατεύοντας τον οίνο από διάφορες αλλοιώσεις. Το τρυγικό είναι το πιο ισχυρό οξύ στους οίνους, το οποίο ευθύνεται και για τη διαμόρφωση του pH τους.

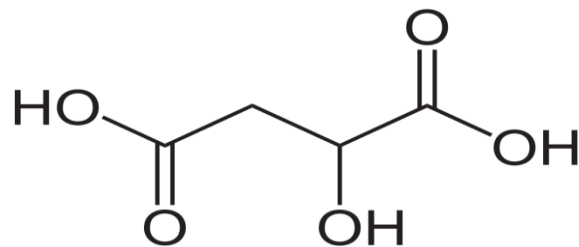
**Τρυγικό οξύ:** Το αμπέλι είναι το μόνο φυτό στο οποίο βρίσκεται το τρυγικό οξύ και αποθηκεύεται στα νεαρά φύλλα και στις πράσινες ράγες. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, αποτελεί το πιο ισχυρό οξύ στους οίνους και είναι υπεύθυνο για τη διαμόρφωση του pH τους. Η συγκέντρωσή του στο σταφύλι είναι στα 7,5-15 g/L, στα γλεύκη 2-6 g/L ανάλογα τη τοποθεσία και στους οίνους φτάνει στα 1,5-2,5 g/L ως D(-) ισομερές. Είναι το πιο ισχυρό στις βακτηριακές προσβολές, η αποικοδόμησή του όμως από τα γαλακτικά βακτήρια αποτελεί πρόβλημα για τον οίνο και ονομάζεται εκτροπή ή εκτροπίαση και μειώνει αισθητά τη συγκέντρωσή του (Τσακίρης, 2017).



**Tartaric acid**

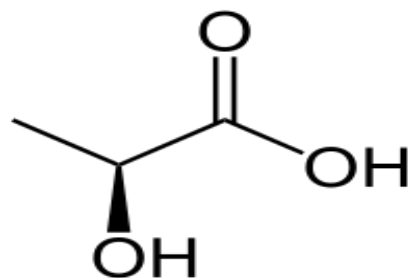
ΕΙΚΟΝΑ 3. ΔΟΜΗ ΤΡΥΓΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ Γ.Π.Α)

**Μηλικό οξύ:** Η συγκέντρωση του μηλικού οξέος στον οίνο κυμαίνεται από 0-4,0 g/L ως L(-) ισομερές. Στην Ελλάδα τα σταφύλια είναι φτωχά σε μηλικό οξύ (περίπου 2,5 g/L), ενώ είναι πιο πλούσιο στη κεντρική και βόρεια Ευρώπη λόγω χαμηλότερων θερμοκρασιών. Κατά την ωρίμανση της σταφυλής η συγκέντρωσή του μειώνεται, καθώς υπάρχει αραίωση λόγω αύξηση του μεγέθους της ράγας και σε φαινόμενα αναπνοής των κυττάρων της ράγας. Επιπλέον, κατά την αλκοολική ζύμωση η συγκέντρωσή του μειώνεται κατά 10-25%. Τα γαλακτικά βακτήρια μετατρέπουν το μηλικό σε γαλακτικό οξύ (μηλογαλακτική ζύμωση) όπου με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η παραγωγή σε πιο ‘στρογγυλά’, φρουτώδη και με σώμα κρασιά, καθώς εξασφαλίζεται σταθερότητα στους οίνους και ειδικά σε αυτούς που προορίζονται για παλαίωση (Τσακίρης, 2017).



ΕΙΚΟΝΑ 4. ΔΟΜΗ ΜΗΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (EL.WIKIPEDIA.GR)

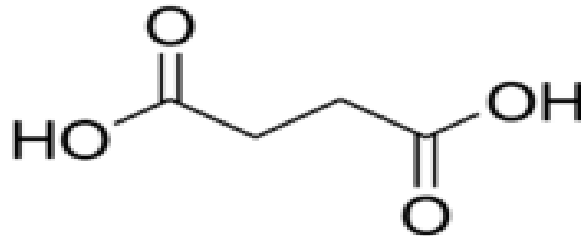
**Γαλακτικό οξύ:** Παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση, δεν υπάρχει στο σταφύλι. Οι ζύμες σχηματίζουν από 0,1-0,4 g/L D(-) γαλακτικό οξύ και κατά τη μηλογαλακτική μπορούν να παραχθούν περίπου 3 g/L L(+) γαλακτικό. Επίσης, παράγεται κατά την αποικοδόμηση του τρυγικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια όπου εκεί έχουμε συνεχή αύξηση του D(-).



ΕΙΚΟΝΑ 5. ΔΟΜΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (EL. WIKIPEDIA.GR)

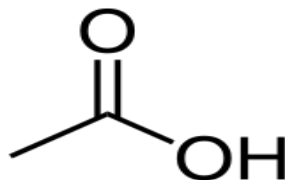
**Ηλεκτρικό οξύ:** Το ηλεκτρικό οξύ παράγεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης των σακχάρων, σε συγκεντρώσεις από 0,5-1,5 g/L. Ένα μεγάλο μέρος του μπορεί να σχηματιστεί και με αναγωγή του μηλικού οξέος. Συμβάλει ενεργά στη διαμόρφωση της γεύσης των οίνων

καθώς συνδυάζει το ξινό, το πικρό και το αλμυρό αυξάνοντας έτσι την πολυπλοκότητά τους. Δεν συνιστάται για την αύξηση της οξύτητας των οίνων λόγω της πικρής και αλμυρής του γεύσης (Τσακίρης, 2017).



ΕΙΚΟΝΑ 6. ΔΟΜΗ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (EL.WIKIPEDIA.GR)

**Οξικό οξύ:** Κατά την αλκοολική ζύμωση παρατηρείται παραγωγή οξικού οξέος όπου περνά ένα μέγιστο και στη συνέχεια μειώνεται, δίνοντας δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης. Επίσης, παραγωγή οξικού παρατηρείται και κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, από το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος, παράγοντας από 0,2-0,4 g/L. Παρουσία οξικού οξέος στους οίνους μπορεί να υπάρχει και από ανεπιθύμητα φαινόμενα όπως: χημική οξείδωση της αλκοόλης που δημιουργείται από το οξυγόνο της ατμόσφαιρας και ενζυματική οξείδωση της αλκοόλης από τα οξικά βακτήρια και από προσβολή διαφόρων συστατικών του οίνου (σάκχαρα, τρυγικό κ.α) από τα γαλακτικά βακτήρια. Το οξικό οξύ αποτελεί το 90-95% της πτητικής οξύτητας. Η συγκέντρωσή του στους οίνους αποτελεί κριτήριο της υγιεινής τους κατάστασης, καθώς υποβαθμίζει τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Νομοθετικά, δεν επιτρέπεται η διάθεση οίνων στους καταναλωτές με πτητική οξύτητα πάνω από 0,98 g/L για τους λευκούς οίνους και πάνω από 1,2 g/L για τους ερυθρούς. Συνεπώς, θα πρέπει να κρατιέται σε χαμηλά επίπεδα (< 0,5-0,6 g/L), αν και υπάρχουν περιπτώσεις, σε ερυθρούς οίνους που, μέχρι και 0,7 g/L οξικού, συμμετέχει ευχάριστα στο άρωμά τους (Τσακίρης, 2017).



ΕΙΚΟΝΑ 7. ΔΟΜΗ ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (EL.WIKIPEDIA.GR)

## 1.6. ΤΟ ΑΡΩΜΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Το άρωμα και η γεύση του οίνου συνδέονται άμεσα με τη χημεία ολόκληρης της διαδικασίας οινοποίησης. Μέσω της ενόργανης ανάλυσης και της αέριας χρωματογραφίας, έχουν εντοπιστεί πάνω από 400 πτητικά συστατικά όπου αρκετά από αυτά έχουν προσδιοριστεί ποσοτικά σε μεγάλο αριθμό οίνων. Διακρίνονται σε μικρές έως πολύ μικρές συγκεντρώσεις και εκφράζονται σε ppm (mg/L), ppb (μg/L) και ppt (nm/L) (Jackson, 2002; Ribereau-Gayon et al., 2006). Η χημική σύσταση λοιπόν του οίνου είναι το θεμέλιο της αρωματικής του ποιότητας. Μαζί με τα συστατικά της σταφυλής, πολλές από τις αρωματικές ενώσεις στους οίνους παράγονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους από τις ζύμες (Rodriguez et al., 2016).

Η συνεισφορά των γηγενών ή αλλιώς ‘άγριων’ ζυμομυκήτων στα πτητικά χαρακτηριστικά, και κατά συνέπεια στο αρωματικό προφίλ του οίνου, φαίνεται να είναι καθοριστική στη σύνθεση των συστατικών αυτών. Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί φαίνεται πως η ζύμωση με ‘άγριες’ ζύμες, είτε ταυτόχρονα είτε πριν τη ζύμωση του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* επιφέρει καλύτερο οργανοληπτικό αποτέλεσμα (Lambrechts & Pretorius, 2000). Οι πτητικές ενώσεις που προέρχονται από ζύμωση με γηγενείς ζύμες, οφείλονται στον ανταγωνισμό μεταξύ των στελεχών αυτών με το μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* (Grde- Cerdan & Ancin- Azpilicueta, 2005).

Στον οίνο διακρίνουμε τρεις κατηγορίες αρωμάτων. Τα πρωτογενή αρώματα, που προέρχονται από το σταφύλι και διατηρούνται στον οίνο. Τα δευτερογενή αρώματα, που αναπτύσσονται κατά την αλκοολική ζύμωση και είναι αποτέλεσμα των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από τις ζύμες και τις συνθήκες οινοποίησης. Τα τριτογενή αρώματα, που εμφανίζονται κατά τη παλαίωση των οίνων στο βαρέλι ή στην φιάλη και είναι αποτέλεσμα διάφορων χημικών και ενζυμικών αντιδράσεων και όπου καλούνται συχνά με τον όρο ‘μπουκέτο’ (Ταραντίλης, 2019).

### 1.6.1. Πρωτογενές άρωμα του οίνου

Το πρωτογενές άρωμα του οίνου αποτελούν οι πτητικές ενώσεις που προέρχονται από το σταφύλι και είναι χαρακτηριστικές της κάθε ποικιλίας, όπου σε συνδυασμό με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, παίζουν το κυριότερο ρόλο στη ποιότητα και την τυπικότητα των οίνων. Οι πρόδρομες πτητικές ενώσεις του σταφυλιού, αποτελούν το κλειδί για τη διαμόρφωση του ποικιλιακού αρώματος του οίνου. Εντοπίζονται σε όλες τις ποικιλίες σταφυλιών, αλλά οι διαφορετικές συγκεντρώσεις τους και οι διαφορετικοί συνδυασμοί τους συμβάλλουν στο

χαρακτηριστικό άρωμα κάθε ποικιλίας (Ribereau-Gayon et al., 2006). Τα πτητικά συστατικά του αρώματος του σταφυλιού ανήκουν σε διάφορες τάξεις χημικών ενώσεων, με κυριότερα τα τερπένια (χαρακτηριστικά των ‘μοσχατίζουσων’ ποικιλιών), τις πυραζίνες, τις φαινολικές ενώσεις, αλλά και αλκοόλες όπως η μεθανόλη και η εξανόλη (Τσακίρης, 2017).

#### *1.6.1.1. Τερπένια*

Στη φύση έχουν εντοπισθεί πάνω από 4.000 τερπενικές ενώσεις και σε αυτές αποδίδεται το άρωμα των λουλουδιών. Στο σταφύλι έχουν ανιχνευτεί περισσότερες από 70 ενώσεις, κυρίως μονοτερπένια, που μπορεί να είναι υδρογονάνθρακες, αλδεΐδες, αλκοόλες ή ακόμα και εστέρες. Πρόκειται για ενώσεις με έντονο και ευχάριστο χαρακτήρα αρώματος με σημαντική οργανοληπτική επίδραση. Στις μοσχάτες ποικιλίες τα τερπένια καθορίζουν το άρωμά τους. Εντοπίζονται στον φλοιό των σταφυλιών, αυξάνονται κατά την ωρίμανση ενώ από ένα σημείο και μετά αρχίζουν και μειώνονται. Αποτελούν πρόδρομες ενώσεις που μπορεί να είναι είτε ελεύθερες, είτε σε μορφή γλυκοζιτών. Το άρωμα διαφόρων αρωματικών ποικιλιών, οφείλεται σε τερπενικές ενώσεις όπως η τερπινόλη, λιναλοόλη, γερανιόλη, νερόλη και σε παράγωγα αυτών. Η συνολική συγκέντρωση των ενώσεων αυτών είναι 1-3 mg/L και έχει αποδειχθεί, μέσω μελετών, ότι εμφανίζουν φαινόμενα αλληλεπίδρασης η μία με την άλλη. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης οι ενώσεις αυτές ελαττώνονται, ενώ κατά την παλαίωση του οίνου, οξειδώνονται σε ενώσεις λιγότερο αρωματικές (Τσακίρης, 2017).

#### *1.6.1.2. Πυραζίνες*

Οι πυραζίνες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο στο μόριό τους και παράγονται από το μεταβολισμό των αμινοξέων. Ανήκουν στα πρωτογενή αρώματα και έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης της τάξης ng/L. Προσδίδουν στον οίνο χορτώδη χαρακτήρα όπως, πράσινη πιπεριά, σπαράγγι, βρασμένα λαχανικά κλπ. Η περιεκτικότητά τους εξαρτάται κυρίως από τις κλιματικές συνθήκες (Gonzalez- Barreiro et al., 2015). Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί 3 μεθοξυπυραζίνες, η 3-ισοβουτυλο-2-μεθοξυπυραζίνη, η 3-ισοπρότυλο-2-μεθοξυπυραζίνη και η δευτεροταγής βουτυλο-2-μεθοξυπυραζίνη με χαρακτηριστική οσμή πράσινου πιπεριού. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις και για ορισμένα στυλ οίνων, θεωρούνται επιθυμητές. Παίζουν σημαντικό ρόλο στο άρωμα διαφόρων ποικιλιών όπως Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon, Merlot κλπ. Ωστόσο, θεωρούνται ανεπιθύμητες σε υψηλές συγκεντρώσεις (>25 ng/L) (Robinson et al., 2014).

### *1.6.1.3. Πτητικές φαινολικές ενώσεις*

Οι πτητικές φαινόλες είναι ουσίες που προέρχονται από το σταφύλι και η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως, τη θερμοκρασία, τη ποικιλία του σταφυλιού, το νερό, το φως, τα θρεπτικά στοιχεία, τις ασθένειες κλπ. Σημαντικό ρόλο επίσης παίζει και η παρέμβαση του οινολόγου κατά τη ζύμωση του γλεύκους και κατά την παλαίωση του οίνου (Δήμου, 2012). Τα φαινολικά οξέα από μόνα τους δεν αποτελούν ιδιαίτερα οσμηρές ενώσεις, αλλά μέσα από κάποιες χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, εμφανίζουν αρώματα καπνού, ξύλου ή δέρματος. Κατά τη ζύμωση, ένα μέρος τους χάνεται από οξειδώσεις, ενώ οι ζύμες μπορούν να τα αποκαρβοξυλιώσουν και να δώσουν πτητικά παραπροϊόντα (Τσακίρης, 2017).

### *1.6.1.4. Μεθανόλη και εξανόλη*

Η μεθανόλη αποτελεί τοξική ένωση και η συγκέντρωσή της αυξάνεται κατά την οινοποίηση, ειδικότερα σε υψηλές θερμοκρασίες και σε pH 4-5. Προέρχεται από την απομεθυλίωση των πηκτινών από τα πηκτινολυτικά ένζυμα. Η χρήση τέτοιων ενζύμων ευνοεί την εμφάνιση μεθανόλης στον οίνο (Τσακίρης, 2017). Οι ερυθρές ποικιλίες περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες μεθανόλης από τις λευκές, λόγω της εκχύλισης που γίνεται στις ερυθρές ποικιλίες. Σε ορισμένες συγκεντρώσεις δίνει άρωμα μήλου. Η εξανόλη προέρχεται από το σταφύλι και υπάρχει και στο γλεύκος. Είναι αποτέλεσμα της αναγωγής της εξανάλης. Γίνεται αισθητή σε μεγάλες συγκεντρώσεις προσδίδοντας μια χορτώδη οσμή.

## **1.6.2. Δευτερογενές άρωμα του οίνου**

Τα δευτερογενή αρώματα δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από τη δράση των ζυμομυκήτων και των διάφορων μικροοργανισμών. Σε αυτά συναντούμε το μεγαλύτερο αριθμό πτητικών ενώσεων που απαντώνται στους οίνους, ποιοτικά αλλά και ποσοτικά. Οι κυριότερες ενώσεις που προέρχονται από το δευτερογενές άρωμα είναι: Αιθανόλη, ανώτερες αλκοόλες, πτητικά οξέα, εστέρες, ενώσεις του θείου, και οι πτητικές φαινόλες που δημιουργούνται κατά την οινοποίηση. Οι ποσότητες των ενώσεων αυτών διαφοροποιούνται ανάλογα με το στέλεχος της ζύμης που πραγματοποιεί την αλκοολική ζύμωση. Δευτερογενή αρώματα παράγονται ακόμα και στο στάδιο πριν τη ζύμωση, όπως κατά τη διάρκεια της σύνθλιψης των σταφυλιών αλλά και κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση (Maarse, 1991).



### *1.6.2.1. Αιθανόλη*

Η αιθανόλη αποτελεί το κύριο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης που παράγεται κατά βάση από τον καταβολισμό των σακχάρων από τις ζύμες. Αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές αλκοόλες του οίνου συμβάλλοντας παράλληλα στο άρωμα και τη γεύση του. Η οσμή της αιθανόλης αναφέρεται ως αρκετά δριμεία και ιδιαίτερα χαρακτηριστική που προσδίδει αρώματα μήλου. Χαρακτηριστικό των ενώσεων αυτών είναι ότι όσο πιο μικρό είναι το μόριό τους, τόσο πιο οσφρητικές είναι και όσο πιο πτητικές είναι άλλο τόσο έντονο άρωμα έχουν (Maarse, 1991).

### *1.6.2.2. Ανώτερες αλκοόλες*

Οι ανώτερες αλκοόλες παράγονται είτε από τον μεταβολισμό των σακχάρων ή από τον καταβολισμό των αμινοξέων μέσω του μονοπατιού του Ehrlich από τους ζυμομύκητες. Μπορούν να επηρεάσουν ενεργά το άρωμα του οίνου, προσδίδοντας ελαττωματικές οσμές ή να ενισχύσουν θετικά το άρωμα του μπουκέτου του οίνου. Οι ανώτερες αλκοόλες εμπλέκονται επίσης στο σχηματισμό εστέρων που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο άρωμα του οίνου.

Οι κυριότερες ανώτερες αλκοόλες που συναντούμε στους οίνους είναι: Η 1-προπανόλη (σε συγκεντρώσεις 10-70 mg/L), 2-προπανόλη, 1-βουτανόλη (σε συγκεντρώσεις 0,5-8 mg/L), 2-βουτανόλη-2 και ισοβουτανόλη (2-μέθυλο-1-προπανόλη). Η 2-μέθυλο-1-βουτανόλη σε συγκεντρώσεις 15-150 mg/L και η 3-μέθυλο-1-βουτανόλη σε συγκεντρώσεις 30-500 mg/L. Επίσης, βρίσκουμε την εξανόλη, επτανόλη, οκτανόλη και τη δεκανόλη (Τσακίρης, 2017). Ορισμένες αλκοόλες που θεωρείται ότι έχουν υψηλής έντασης οσμή, όπως η 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, η 2-φαινυλαιθανόλη ή η ισοαμυλική αλκοόλη σε μέτριες συγκεντρώσεις, προσφέρουν αρώματα λουλουδιών, μελιού και φρούτων. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών στον οίνο είναι κάτω από 300 mg/L. Στις τιμές αυτές, παρέχουν φρουτώδεις και ανθισμένες νότες ενώ σε συγκεντρώσεις άνω των 400 mg/L καθίστανται αρνητικές προσθέτοντας βαριά οσμή με έντονα δυσάρεστα αρώματα (Carpena et al., 2021).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό ζύμωσης, αυξάνουν και το σχηματισμό των ανώτερων αλκοολών. Σημαντικό ρόλο επίσης παίζει και η χρήση διαφορετικών στελεχών ζυμομυκήτων που συμβάλει ενεργά στα επίπεδα των αλκοολών στον οίνο. Επιπλέον, η συγκέντρωση των αμινοξέων στο γλεύκος τα οποία λειτουργούν ως πρόδρομοι των ανώτερων αλκοολών, επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή των αλκοολών αυτών αυξάνοντας τη συγκέντρωσή τους (Belda et al., 2017).

### *1.6.2.3. Πτητικά λιπαρά οξέα*

Τα πτητικά λιπαρά οξέα έχουν χαμηλό κατώφλι αντίληψης και σε φυσιολογικές θερμοκρασίες βρίσκονται σε επαρκή ποσότητα (Μαλλούχος, 2003). Το άρωμα των οξέων δε θεωρείται ευχάριστο, συμβάλλει όμως στην πολυπλοκότητα του οίνου και στην οσφρητική του ισορροπία. Τα λιπαρά οξέα αποτελούνται από 2 έως 12 άτομα άνθρακα, όπως το βουτυρικό και το ισοβαλεριανικό που οι οσμές τους θυμίζουν άρωμα τυριού. Λιπαρά οξέα με 5 έως 12 άτομα άνθρακα έχουν πιο ουδέτερη οσμή αλλά δίνουν αρωματικά ευχάριστους εστέρες. Τα οξέα με μεγαλύτερο μοριακό βάρος δεν έχουν ιδιαίτερη οργανοληπτική σημασία.

Το λινελαϊκό και το λινολενικό είναι τα οξέα από τα οποία προέρχεται η εξανόλη και εξανάλη, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις φυτικές οσμές των οίνων που προέρχονται από τα άγουρα σταφύλια (Τσακίρης, 2017). Το οξικό οξύ σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι ανεπιθύμητο στον οίνο, σε χαμηλές συγκεντρώσεις όμως, δίνει μια πολυπλοκότητα στο άρωμα του οίνου.

### *1.6.2.4. Εστέρες*

Οι εστέρες αποτελούν μια ομάδα χημικών ενώσεων, που δίνουν ίσως τα πιο ευχάριστα αρωματικά στοιχεία στο κρασί αλλά που παραμένουν στον οίνο για μικρότερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με τις υπόλοιπες ενώσεις. Η ομάδα αυτή, συνδέεται με φρουτώδεις οσμές όπως μπανάνα και ανανά ή και με αρώματα εσπεριδοειδών και ανθέων.

Σχηματίζονται κατά την αλκοολική και τη μηλογαλακτική ζύμωση με ενζυμική εστεροποίηση αλλά και κατά την παλαίωση του οίνου με χημική εστεροποίηση. Δύο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό των εστέρων είναι τα στελέχη της ζύμης και η θερμοκρασία ζύμωσης. Τα στελέχη των ζυμών που παράγουν μικρές ποσότητες εστέρων αποκαλούνται 'ουδέτερες' ζύμες, ενώ αυτά που δίνουν υψηλότερες συγκεντρώσεις πτητικών ενώσεων αποκαλούνται 'αρωματικές' ή αν παράγουν συγκεκριμένα εστέρες 'εστερικές'. Η θερμοκρασία ζύμωσης είναι ο δεύτερος πιο σημαντικός παράγοντας για την ποσότητα και των τύπων των εστέρων που παράγονται αλλά και για τον βαθμό διατήρησής τους στον οίνο. Έχει παρατηρηθεί ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης (10-15°C), παράγονται εστέρες που προσδίδουν αρώματα τροπικών φρούτων αλλά και ανθέων.

Στον οίνο συναντούμε δύο ομάδες εστέρων. Η μια ομάδα είναι οι εστέρες των λιπαρών οξέων με αιθανόλη, που προσδίδουν αρώματα φρούτων, μελιού ή κεριού και είναι: Ο προπανοϊκός αιθυλεστέρας, ο βουτανοϊκός αιθυλεστέρας, ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας, ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας, ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας και ο δωδεκανοϊκός αιθυλεστέρας. Η άλλη ομάδα είναι οι εστέρες των ανώτερων αλκοολών με το οξικό οξύ, όπως ο οξικός ισοαμυλεστέρας που

έχει άρωμα μπανάνας και βρίσκεται σε περιεκτικότητες 0,2-6 mg/L. Συναντάμε επίσης, τον οξικό εξυλεστέρα, τον οξικό επτυλεστέρα, τον οξικό οκτυλεστέρα και τον οξικό 2 φαινυλαιθυλεστέρα (Τσακίρης, 2017). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι εστέρες είναι επιθυμητοί, ενισχύουν τη φρουτώδη οσμή και τον αρωματικό χαρακτήρα της ποικιλίας. Σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να καλύψουν τα άρώματα της ποικιλίας ή ακόμα και να εμφανίσουν δυσάρεστες οσμές.

#### *1.6.2.5. Θειούχες ενώσεις*

Οι πτητικές θειούχες ενώσεις, είναι μια ομάδα ενώσεων που προσδίδουν άλλοτε θετικά και άλλοτε αρνητικά χαρακτηριστικά στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις τους. Προκύπτουν είτε από την αποικοδόμηση των αμινοξέων που περιέχουν θείο (κυστεΐνη, μεθειονίνη), είτε από την αυτόλυση των ζυμών, είτε κατά την παλαίωση των οίνων (τριτογενές άρωμα). Εκτός από το υδρόθειο, οι ενώσεις αυτές ανήκουν σε διάφορες ομάδες όπως οι θειόλες, θειοεστέρες, σουλφίδια και ετεροκυκλικές ενώσεις (Δήμου, 2012).

Το υδρόθειο αποτελεί την πιο γνωστή θειούχο ένωση και συνήθως είναι αυτή που υποβαθμίζει το άρωμα των οίνων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις δίνει οσμή κλούβιου αυγού, η οποία μπορεί να απομακρυνθεί με αερισμό. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι επιθυμητό καθώς ενισχύει το δευτερογενές άρωμα του οίνου και γιατί επιτρέπει τη παραγωγή θειούχων ενώσεων, όπως θειαμίνη, κυστεΐνη, μεθειονίνη, απαραίτητων στην ανάπτυξη των ζυμών και συνδεδεμένη με τον μεταβολισμό του αζώτου. Το υδρόθειο μπορεί επίσης να προέρχεται από την αποικοδόμηση πρωτεϊνών από τις ζύμες σε περιβάλλον που υπάρχει έλλειψη αφομοιώσιμου αζώτου. Το διμεθυλοσουλφίδιο αποτελεί προϊόν δευτερεύοντος μεταβολισμού του θείου που λαμβάνεται από την κυστεΐνη, που επίσης μπορεί να παραχθεί κατά την ωρίμανση του οίνου, συμμετέχοντας στην οσφρητική πολυπλοκότητα (Τσακίρης, 2017).

#### *1.6.2.6. Πτητικές φαινόλες*

Οι πτητικές φαινόλες μπορούν να σχηματιστούν από τις ζύμες με αποκαρβοξυλίωση των φαινολικών οξέων (p-κουμαρικό οξύ και φερουλικό οξύ) και σχηματίζεται αντίστοιχα η 4-βινυλο-φαινόλη και η 4-βινυλο-γουαϊακόλη με χαρακτηριστικό άρωμα γαρύφαλλο. Οι ενώσεις αυτές συναντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις κυρίως στους λευκούς οίνους, καθώς οι ερυθροί περιέχουν ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους (τανίνες) οι οποίες δρουν παρεμποδιστικά στο σχηματισμό των βινυλο-φαινολών (Chattonet et al., 1993). Στους ερυθρούς οίνους, η 4-αιθυλο-φαινόλη προσδίδει άρώματα ξύλου, δέρματος, φαρμακευτικό και μπορεί το άρωμα να γίνει δυσάρεστο όταν η συγκέντρωσή της αυξηθεί. Πτητικές φαινόλες μπορούν να σχηματιστούν

και από τη χημική αποικοδόμηση της λιγνίνης των βαρελιών κατά την παλαίωση του οίνου. Σημαντικό ρόλο σε αυτό παίζει ο τύπος του βαρελιού και ο τρόπος κατεργασίας του (Etievant, 1991).

### **1.6.3. Τριτογενές άρωμα του οίνου**

Μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του οίνου, πραγματοποιούνται διάφορες χημικές αντιδράσεις. Για την περιγραφή των αρωμάτων των παλαιωμένων οίνων, συνηθίζεται να χρησιμοποιείται ο όρος ‘μπουκέτο’. Κατά τη φάση αυτή, τα ελεύθερα μονοτερπένια υποβάλλονται αργά σε αντιδράσεις οξειδωσης, ενώ η όξινα καταλυόμενη υδρόλυση που πραγματοποιείται απελευθερώνει τα χημικά δεσμευμένα τερπένια ισορροπώντας έτσι τη συγκέντρωσή τους στον οίνο (Berger, 2007; Winterhalter et al., 1999). Ταυτόχρονα, παράγονται νέες πτητικές ενώσεις που θα αποτελέσουν το τριτογενές άρωμα του κρασιού.

Τα πρώτα χρόνια της παλαίωσης, οι εστέρες του οξικού οξέος που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης θα υποστούν διάσπαση με όξινη υδρόλυση. Ταυτόχρονα σχηματίζονται νέοι αιθυλεστέρες λόγω αντιδράσεων εστεροποίησης της αιθανόλης με οξέα του οίνου όπως το τρυγικό, το ηλεκτρικό και το μηλικό οξύ. Η φύση των εστέρων εξαρτάται από το pH του οίνου. Σε υψηλό pH σχηματίζονται ουδέτεροι εστέρες (Τσακίρης, 1998). Οι συγκεντρώσεις των αλδευδών αυξάνονται, ως αποτέλεσμα της οξειδωτικής παλαίωσης που γίνεται στα βαρέλια (μικροοξυγόνωση μέσω των πόρων του ξύλου) και ταυτόχρονα η εκχύλιση διαφόρων ενώσεων από το ξύλο των καινούριων βαρελιών. Σε παλαιά βαρέλια το ποσοστό της εκχύλισης των ενώσεων αυτών μειώνεται. Μερικές από τις ενώσεις αυτές είναι η βανιλίνη, η λιγνίνη και κάποιες τανίνες (Grainger, 2009).

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Σκοπός του πειράματος

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η απομόνωση γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων από το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης γλεύκους της ποικιλίας Σαββατιανό με απώτερο στόχο την αξιολόγηση των στελεχών ως προς την ικανότητα ζύμωσης, την κινητική ζύμωσης και το οργανοληπτικό προφίλ των τελικών οίνων. Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από την παρούσα μελέτη θα οδηγήσουν στην αξιολόγηση και αξιοποίηση της γηγενούς μικροχλωρίδας, για την παραγωγή ποιοτικών οίνων με πολύπλοκο και πιο τυπικό αρωματικό προφίλ.

### 2.2. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την απομόνωση των μικροοργανισμών θα πραγματοποιηθεί δειγματοληψία σε γλεύκος από την ποικιλία Σαββατιανό στο τέλος αυθόρμητης αλκοολικής ζύμωσης προκειμένου να συλλεχθεί μια ικανοποιητική ποσότητα βιομάζας. Στη συνέχεια θα πραγματοποιηθούν διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος και εξάπλωση σε ειδικό θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των αποικιών. Τα στελέχη που θα επιλεγθούν, θα απομονωθούν και θα ταυτοποιηθούν με συγκεκριμένα πρωτόκολλα ενώ κριτήριο επιλογής θα είναι ειδικά τεστ παραγωγής υδρόθειου, αντοχής σε αλκοόλη και σε θειώδη ανυδρίτη. Επιλέχθηκαν 4 στελέχη ζυμομύκητα (*S. cerevisiae*) για απομόνωση και καθαρισμό (Sc1, Sc2, Sc3, Sc4).

Ακολουθεί εμβολιασμός των απομονωμένων στελεχών σε γλεύκος ποικιλίας Σαββατιανό και θα αξιολογηθεί η κινητική της ζύμωσης. Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε συμπυκνωμένο γλεύκος της ποικιλίας Σαββατιανό από τα Μεσόγεια Αττικής. Οι οινοποιήσεις έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με κοινό πρωτόκολλο οινοποίησης. Το γλεύκος αραιώθηκε με νερό σε αναλογία 30/70 και χωρίστηκε σε γυάλινα δοχεία Duran του 1 L. Οι ζυμώσεις έγιναν σε 2 επαναλήψεις για κάθε στέλεχος. Κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων πραγματοποιούνταν μικροβιολογικές δειγματοληψίες στα γλεύκη για τη μέτρηση του πληθυσμού και των αποικιών καθώς επίσης και μοριακές αναλύσεις επιβεβαίωσης του στελέχους ζύμωσης. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν οι βασικές αναλύσεις για την παρακολούθηση της πορείας των ζυμώσεων (κατανάλωση σακχάρων, κινητική οργανικών οξέων, παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης) .

Στους οίνους που θα παραχθούν θα πραγματοποιηθούν βασικές αναλύσεις (αλκοόλη, ολική οξύτητα, πτητική οξύτητα, pH, μηλικό οξύ, γαλακτικό οξύ, ελεύθερος και ολικός SO<sub>2</sub>) καθώς και οργανοληπτική αξιολόγηση προκειμένου να προσδιοριστεί το αρωματικό τους προφίλ. Η

ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα βασιστεί στη σύγκριση των βασικών αναλύσεων των οίνων για κάθε στέλεχος και στην οργανοληπτική αξιολόγηση για τον προσδιορισμό του αρωματικού τους προφίλ από εκπαιδευμένο πάνελ.

### **2.3. Πρωτόκολλο οινοποίησης**

Οι οινοποιήσεις έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκε συμπυκνωμένο γλεύκος της ποικιλίας Σαββατιανό 54,3 Brix το οποίο προηγουμένως είχε θειωθεί με 10 g/hL. Στη συνέχεια το γλεύκος αραιώθηκε σε αναλογία 30/70 σε σακχαροπεριεκτικότητα 22,7 Brix και τοποθετήθηκε σε γυάλινα δοχεία Duran 1L. Ως καλλιέργεια έναρξης χρησιμοποιήθηκαν τα τέσσερα γηγενή στελέχη σακχαρομύκητα που απομονώθηκαν (Sc1, Sc2, Sc3, Sc4) και για κάθε ένα από αυτά η οινοποίηση έγινε εις διπλούν, έτσι στο σύνολο χρησιμοποιήθηκαν οκτώ γυάλινες φιάλες Duran.

Τα στελέχη εμβολιάστηκαν στο γλεύκος και οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C. Οι ζυμώσεις παρακολουθούνταν καθημερινά με μετρήσεις της θερμοκρασίας και προσδιορισμό των σακχάρων με ηλεκτρονικό διαθλασίμετρο. Ταυτόχρονα έγινε μέτρηση στη πορεία ζύμωσης της γλυκόζης, φρουκτόζης, των οργανικών οξέων, αιθανόλης και γλυκερόλης με HPLC. Στο τέλος των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη) και όλων των βασικών αναλύσεων.

### **2.4. Μικροβιολογικές αναλύσεις**

Κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων γινόντουσαν μικροβιολογικές αναλύσεις στα γλεύκη για τη μέτρηση του πληθυσμού σε καθημερινή βάση. Κατά την δειγματοληψία, λαμβάνονταν ασηπτικά 1 mL από κάθε ζύμωση προστίθονταν σε ισοτονικό διάλυμα και ακολουθούσαν διαδοχικές αραιώσεις. Κατόπιν, 100μL από κάθε αραιώση τοποθετούνταν ομοιόμορφα σε τρυβλία με αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα και ακολουθούσε επώαση πέντε ημερών στους 22 °C. Την πέμπτη μέρα γινόταν αρίθμηση των αποικιών.

### **2.5. Μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας**

Η μέτρηση της σακχαροπεριεκτικότητας κατά την ρύθμιση του γλεύκους αλλά και κατά την παρακολούθηση της αλκοολικής ζύμωσης πραγματοποιούνταν με διαθλασιμετρία. Δείγμα μερικών σταγόνων λαμβάνονταν και από τις 8 δεξαμενές ζύμωσης και γίνονταν οι μετρήσεις με διαθλασίμετρο ABBE REFRACTOMETER (WAY-1S). Με το διαθλασίμετρο γίνεται μέτρηση των ολικών διαλυτών στερεών σε ένα υγρό μέσω του δείκτη διάθλασης και

κατευθείαν αντιστοίχιση του δείκτη διάθλασης σε συγκέντρωση σακχάρων σε βαθμούς <sup>0</sup>Brix (g σακχάρων/100g γλεύκους). Το διαθλασίμετρο ήταν βαθμονομημένο στους 20<sup>0</sup>C και γινόταν αυτόματη προσαρμογή στη θερμοκρασία αναφοράς.

## **2.6. Προσδιορισμός οργανικών οξέων, σακχάρων και αλκοολών με HPLC**

Τα δείγματα γλεύκους κατόπιν φυγοκέντρησης (10 min, 6500 RPM) πέρασαν από φίλτρο 0,2 μm και ακολούθησε η ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ο χρωματογράφος Shimadzu LC-20 με σύζευξη των ανιχνευτών Shimadzu SPD-20A UV-VIS και Shimadzu RID-10A Refractive Index Detector. Η στήλη ιοντοανταλλαγής ήταν η Agilent Hi-Plex H Column 300 mm x 7.7 mm (8.0μm) συνδεδεμένη με προστήλη Hi-Plex 5mm x 3 mm (Agilent Technologies). Το παραπάνω σύστημα ήταν συνδεδεμένο με απαερωτή (DGU-20A) και αυτόματο δειγματολήπτη (SIL 20A).

Η θερμοκρασία της στήλης παρέμεινε σταθερή στους 70 °C κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ενώ της κυψελίδας ροής του Ανιχνευτή Δείκτη Διάθλασης (RID) στους 50 °C.

Η ένεση που πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα ήταν 10μL και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 mM σε ισοκρατική ροή της τάξης του 0,5 mL/min.

Ο προσδιορισμός των οργανικών οξέων έγινε στα 210nm με τη βοήθεια του UV ανιχνευτή, ενώ των σακχάρων και των αλκοολών με τον RID.

Για την ταυτοποίηση του χρόνου έκλουσης κάθε ένωσης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα του εμπορίου, από τα οποία έγιναν και οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς, για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης τους.

## Πρότυπες Καμπύλες Οργανικών Οξέων, Σακχάρων και Αλκοολών

Οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς για τα Οργανικά οξέα, Σάκχαρα και Αλκοόλες φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ, ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΩΝ

Ενώσεις	Εύρος Συγκέντρωσης (g/L)	Πρότυπη καμπύλη Αναφοράς	R <sup>2</sup>
Γλυκόζη	0,5-50	$y=166770x-1962,4$	1,000
Φρουκτόζη	0,5-50	$y=152374x-170,81$	1,000
Τρυγικό οξύ	0,05-5	$y=2E+06x-20784$	1,000
Μηλικό οξύ	0,05-5	$y=943422x-8223,9$	1,000
Ηλεκτρικό οξύ	0,05-5	$y=120198x-236,73$	1,000
Γαλακτικό οξύ	0,06-6	$y=766921x-3861,5$	1,000
Κιτρικό Οξύ	0,05-5	$y=1E+06x-7646,5$	1,000
Οξικό οξύ	0,03-3	$y=84243x-342,21$	0,999
Αιθανόλη	0,20-20 (% v/v)	$y=705957x-71656$	1,000
Γλυκερόλη	0,16-16	$y=123686x-4609,4$	1,000

## 2.7. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

### 2.7.1. Προσδιορισμός ολικής οξύτητας

Για τη μέτρηση της ολικής οξύτητας το δείγμα πρέπει να είναι διαυγές και απαιτείται να έχει απομακρυνθεί το CO<sub>2</sub> καθώς παρεμβάλλεται στη μέτρηση. Σε μια κωνική φιάλη τοποθετούνται 10 mL δείγματος, λίγες σταγόνες δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης και περίπου 30mL απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια, γεμίζεται μια προχοΐδα με διάλυμα NaOH συγκέντρωσης 0.1 M και λαμβάνεται η αρχική τιμή. Η τιτλοδότηση γίνεται με το διάλυμα NaOH αναδεύοντας την κωνική φιάλη μέχρι να αλλάξει το χρώμα (κυανοπράσινη χροιά) και καταγράφεται η κατανάλωση. Η διαφορά της αρχικής με την τελική τιμή στην προχοΐδα μας δίνει την ολική οξύτητα του δείγματος.

(<https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-3-acids/total-acidity-%28type-i%29>).

### 2.7.2. Μέτρηση ενεργούς οξύτητας - pH

Το πρώτο στάδιο για την μέτρηση της ενεργής οξύτητας είναι η βαθμονόμηση του οργάνου με ρυθμιστικά διαλύματα συνήθως 4 και 7. Στη συνέχεια σε ένα ποτήρι ζέσεως τοποθετείται μια ποσότητα δείγματος και μέσα στο δείγμα εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο του pH-μέτρου. Το



δείγμα πρέπει να έχει θερμοκρασία 20-25 °C. Παίρνουμε τη μέτρηση όταν σταθεροποιηθεί η τιμή. Λαμβάνονται δύο μετρήσεις από το δείγμα και στη συνέχεια βγαίνει ο μέσος όρος που θα έχει δύο δεκαδικά ψηφία.

(<https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-3-acids/ph-%28type-i%29>).

### **2.7.3. Προσδιορισμός ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη**

Για τον προσδιορισμό του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη, σε μια κωνική φιάλη των 250 mL, τοποθετήθηκαν 50 mL οίνου, 5 mL διαλύματος θεικού οξέος 25% και 1 mL δείκτης αμύλου και ακολουθεί ανάδευση. Η τιτλοδότηση έγινε με πρότυπο διάλυμα ιωδίου κανονικότητας 0.02 N μέχρι να εμφανιστεί στο δείγμα μια μπλε χροιά και να παραμείνει σταθερή για περίπου 20 δευτερόλεπτα. Έπειτα, καταγράφηκαν τα mL ιωδίου που καταναλώθηκαν και πολλαπλασιάζοντάς τα με το συντελεστή 12.8 υπολογίστηκαν τα mg/L του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη.

(<https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-2-non-organic-compounds/section-3-2-3-other-non-organic-compounds/free-sulfur-dioxide-%28titrimetry%29-%28type-iv%29>).

### **2.7.4. Προσδιορισμός ολικού θειώδους ανυδρίτη**

Σε κωνική φιάλη των 250 mL τοποθετούνταν 50 mL δείγματος και 25 mL διαλύματος καυστικού νατρίου. Μετά από ανακίνηση, το μίγμα αφήνονταν να αντιδράσει για δέκα λεπτά και κατόπιν προστίθονταν 10 mL διαλύματος θεικού οξέος 25% και 1 mL δείκτης αμύλου με νέα ανακίνηση. Ακολουθεί τιτλοδότηση με διάλυμα ιωδίου κανονικότητας 0.02 N μέχρι να εμφανιστεί μπλε χροιά στο δείγμα και να μείνει σταθερή για περίπου 20 δευτερόλεπτα. Πολλαπλασιάζοντας τα mL ιωδίου που καταναλώθηκαν με τον συντελεστή 12.8, υπολογιζόταν η τιμή του ολικού θειώδη ανυδρίτη.

(<https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-2-non-organic-compounds/section-3-2-3-other-non-organic-compounds/total-sulfur-dioxide-%28titrimetry%29-%28type-ii%29>).

### **2.7.5. Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας**

Πριν την έναρξη της διαδικασίας προσδιορισμού της πτητικής οξύτητας, αφαιρείται το διοξείδιο του άνθρακα από τον οίνο με τη βοήθεια αντλίας κενού. Σε 20 mL δείγματος προστίθενται 0.5 g τρυγικού οξέος και ακολουθεί απόσταξη μεθ' υδρατμών συλλέγοντας

τουλάχιστον 250 mL αποστάγματος. Το απόσταγμα ογκομετρείται με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0.1 M και δείκτη διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης για τον προσδιορισμό των πτητικών οξέων. Στη συνέχεια προστίθενται τέσσερις σταγόνες υδροχλωρίου, 2 mL διαλύματος αμύλου και μερικούς κρυστάλλους KJ και ακολουθεί τιτλοδότηση με διάλυμα ιωδίου 0.005 M για την εξαίρεση του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη από την μέτρηση. Η πτητική οξύτητα εκφράζεται σε g οξικού οξέος/ λίτρο με δύο δεκαδικά ψηφία και δίνεται από τον τύπο:

$$A=0,300 (n-0,1 n_1)$$

(<https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-3-acids/volatile-acidity-%28type-i%29>).

### **2.7.6. Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου**

Ο προσδιορισμός του αλκοολικού τίτλου κατ' όγκο γίνεται αρχικά με απόσταξη και στη συνέχεια με αραιομετρία. Αφού τοποθετηθούν 200 mL από το δείγμα σε μια ογκομετρική φιάλη και μετρηθεί και η θερμοκρασία, στη συνέχεια το δείγμα μεταγγίζεται στη σφαιρική φιάλη της αποστακτικής συσκευής. Η ογκομετρική ξεπλένεται τέσσερις φορές από 5 mL με νερό το οποίο μεταφέρεται και αυτό στη σφαιρική φιάλη. Προστίθενται 10 mL CaOH και μερικά κομμάτια ελαφρόπετρας. Γίνεται η απόσταξη μέχρι να συλλεχθούν τα  $\frac{3}{4}$  της αρχικής ποσότητας του οίνου και, σε θερμοκρασία με απόκλιση 2 βαθμών από την αρχική, συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι την χαραγή των 200 mL με απιονισμένο νερό. Το απόσταγμα μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο και γίνεται μέτρηση της περιεκτικότητας σε αλκοόλη με αλκοολόμετρο (φαινομενικός τίτλος) ενώ παράλληλα καταγράφεται και η θερμοκρασία που δεν πρέπει να έχει διαφορά από αυτή του περιβάλλοντος μεγαλύτερη από 5 °C. Για τον υπολογισμό του πραγματικού αλκοολικού τίτλου στην θερμοκρασία αναφοράς (20 °C) χρησιμοποιούνται διορθωτικοί πίνακες.

(<https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-2-alcohols/alcoholic-strength-by-volume-%28type-i-and-iv%29>).

## **2.8. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΟΙΝΩΝ**

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών από εκπαιδευμένο πάνελ για τους τέσσερις τελικούς οίνους από τα τέσσερα στελέχη ζυμομύκητα που μελετήθηκαν. Έγινε

προετοιμασία πρότυπων οσμών για την εξοικείωση και την εκπαίδευση του πάνελ και οι οίνοι αξιολογήθηκαν ως προς την ένταση των δώδεκα περιγραφικών όρων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα με κλίμακα από το 1-5. Για την παρασκευή των πρότυπων οσμών χρησιμοποιήθηκε λευκός εμπορικός οίνος ο οποίος είχε αποαρωματιστεί με κατεργασία με αποσμητικό άνθρακα σε συγκέντρωση 20 g/L (ανάδευση over night και διήθηση).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΣΥΝΤΑΓΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΑΡΩΜΑΤΩΝ**

1. Άνθη: 2 mL ανθόνερο σε 100 mL διαλύματος νερό ή οίνο, 50:50
2. Τριαντάφυλλο: 2,5 mL ροδόνηρο σε 100 mL νερό
3. Εσπεριδοειδή: 0,5 g φλούδα πορτοκάλι και 0,5 g φλούδα grapefruit σε 110 mL οίνο βάσης
4. Λεμόνι: 1g φλούδα λεμονιού σε 100 mL οίνο βάσης
5. Πράσινο μήλο: 12 µL standard vioryl apple σε 100 mL οίνο βάσης
6. Ροδάκινο: 30 mL χυμό ροδάκινο σε 100 mL οίνο βάσης
7. Ανανάς: 6 µL standard vioryl pineapple σε 100 mL οίνο βάσης
8. Μπανάνα: 3,25 mL model solution isoamylacetate 1g/L σε 100 ml οίνο βάσης
9. Πεπόνι: 6 µL standard vioryl melon σε 100 mL οίνο βάσης
10. Βοτανικό: 0,3 g θυμάρι και 1 φύλλο δάφνης και 1 φακελάκι τσάι του βουνού και 1 φακελάκι τσάι μέντα σε 200 mL οίνο βάσης
11. Μέλι: 15 g σε 100 mL οίνο βάσης
12. Βανίλια: 0,03 g σε 100 mL οίνο βάσης

Για την αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή Compusense Cloud η οποία παρέχει τριψήφιους αριθμούς, κατά τυχαία σειρά, με τους οποίους επισημάνθηκαν τα δείγματα. Τέλος, τα ποτήρια για την αξιολόγηση των οίνων ήταν γυάλινα ποτήρια οργανοληπτικής αξιολόγησης ISO σε σχήμα τουλίπας επικαλυμμένα με καπάκι για τη μείωση της απώλειας των αρωμάτων.

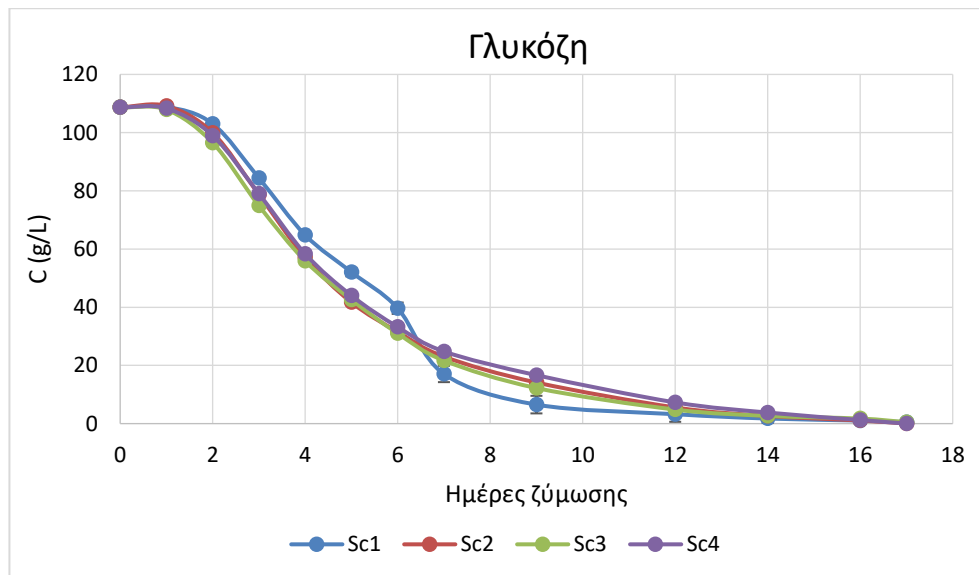
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ζυμωτική συμπεριφορά των 4 στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* Sc1, Sc2, Sc3 και Sc4, που απομονώθηκαν από την γηγενή χλωρίδα της ποικιλίας Σαββατιανό, με εμβολιασμό τους σε γλεύκος της ίδιας ποικιλίας και παρακολούθηση της εξέλιξης των ζυμώσεων μέσω συλλογής δεδομένων που αφορούν διάφορες παραμέτρους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα ακόλουθα σχήματα.

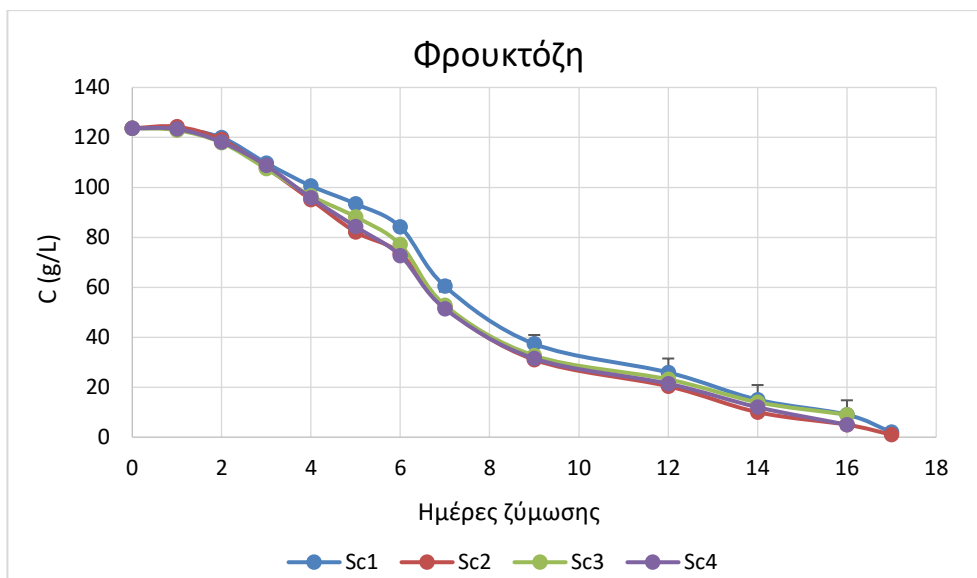
#### 3.1. Εξέλιξη ζύμωσης

Με την βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης συλλέχθηκαν δεδομένα που αφορούν την κατανάλωση των ζυμώσιμων σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη), την παραγωγή αλκοολών (αιθανόλης και γλυκερόλης) και την εξέλιξη των οργανικών οξέων.

Στα σχήματα 1 και 2 παρουσιάζονται οι μεταβολές της γλυκόζης και της φρουκτόζης αντίστοιχα κατά την διάρκεια των πρότυπων ζυμώσεων με τα στελέχη που μελετώνται για περίπου 17 ημέρες. Η κατανάλωση της γλυκόζης και από τα τέσσερα στελέχη είναι πιο γρήγορη σε σχέση με το ρυθμό κατανάλωσης της φρουκτόζης. Η ζύμωση και των δύο σακχάρων ολοκληρώθηκε την δέκατη έβδομη ημέρα με υπολειπόμενα σάκχαρα κάτω από 2 g/L για όλα τα στελέχη, με το μεγαλύτερο να είναι του στελέχους Sc1 στα 1,3 g/L σύμφωνα με τη μέθοδο του OIV.

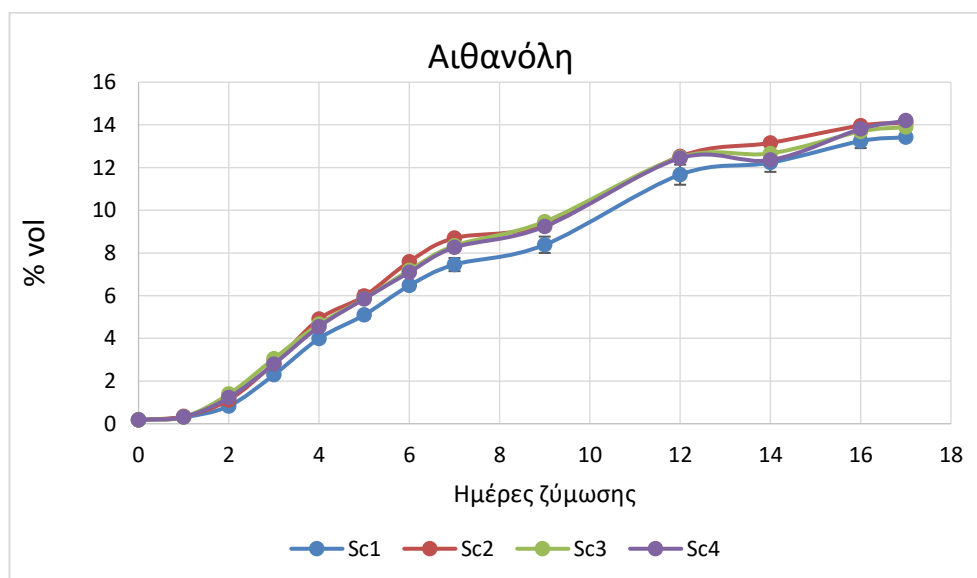


**ΣΧΗΜΑ 1: ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟΥ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ**



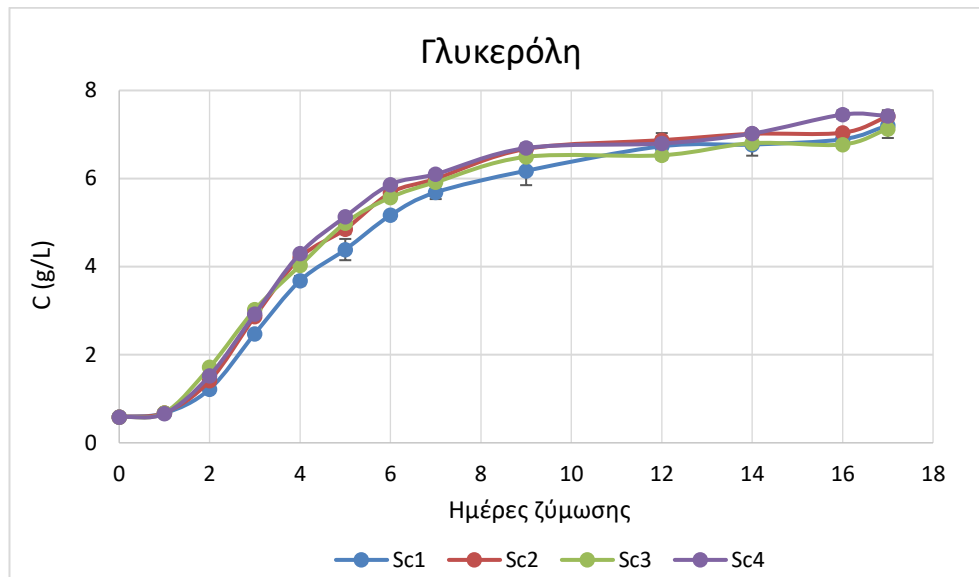
**ΣΧΗΜΑ 2: ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΥΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟΥ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ**

Στο σχήμα 3 παρουσιάζεται η πορεία παραγωγής της αιθανόλης ως προϊόν του μεταβολισμού των σακχάρων. Τα επίπεδα της αιθανόλης και για τα τέσσερα στελέχη είναι αρκετά υψηλά καθώς όλοι οι αλκοολικοί τίτλοι είναι από 14,45% vol και πάνω. Αυτό φαίνεται και από την κατανάλωση των υπολειπόμενων σακχάρων όπου είναι κάτω από 1g/L για όλα τα στελέχη. Συνεπώς, σύμφωνα με το σχήμα 3, φαίνεται πως τα συγκεκριμένα στελέχη ζυμομυκήτων παρουσιάζουν υψηλή αντοχή στην αιθανόλη.



**ΣΧΗΜΑ 3: ΠΟΡΕΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΘ' ΟΛΗ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΥΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟΥ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ**

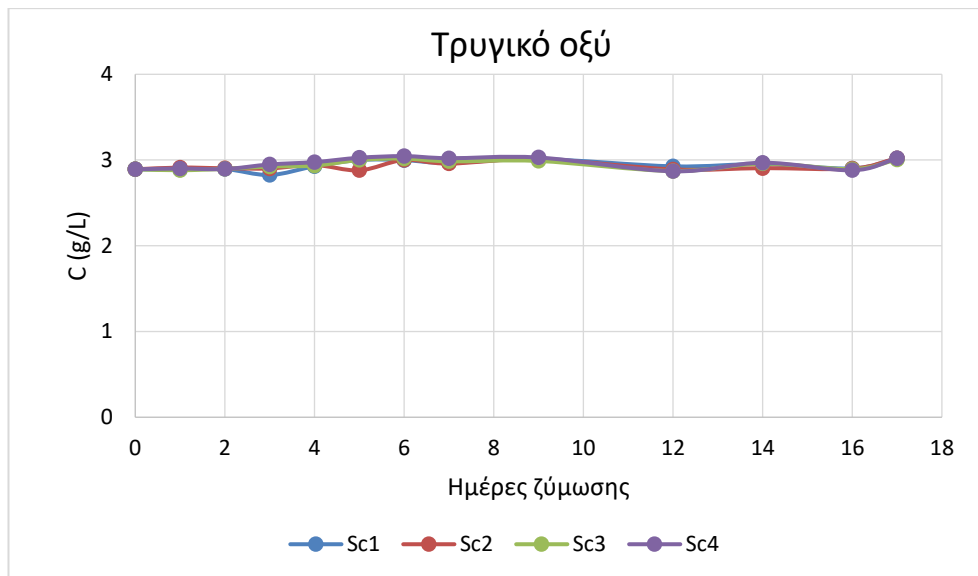
Σύμφωνα με τους Ribereau-Gayon et al. (2006) η έντονη την αίσθηση του ‘σώματος’ των οίνων στο στόμα, οφείλεται πιθανότατα σε πιο υψηλές παραγωγές γλυκερόλης. Οι τιμές παραγωγής της γλυκερόλης, και για τα τέσσερα στελέχη ζυμομυκήτων, κατά την διάρκεια των ζυμώσεων και τελικά και στους παραγόμενους οίνους, παρουσιάζονται στο σχήμα 4. Η συγκέντρωση της γλυκερόλης έφτασε μέχρι πάνω από 7g/L με υψηλότερη εκείνη του στελέχους Sc4.



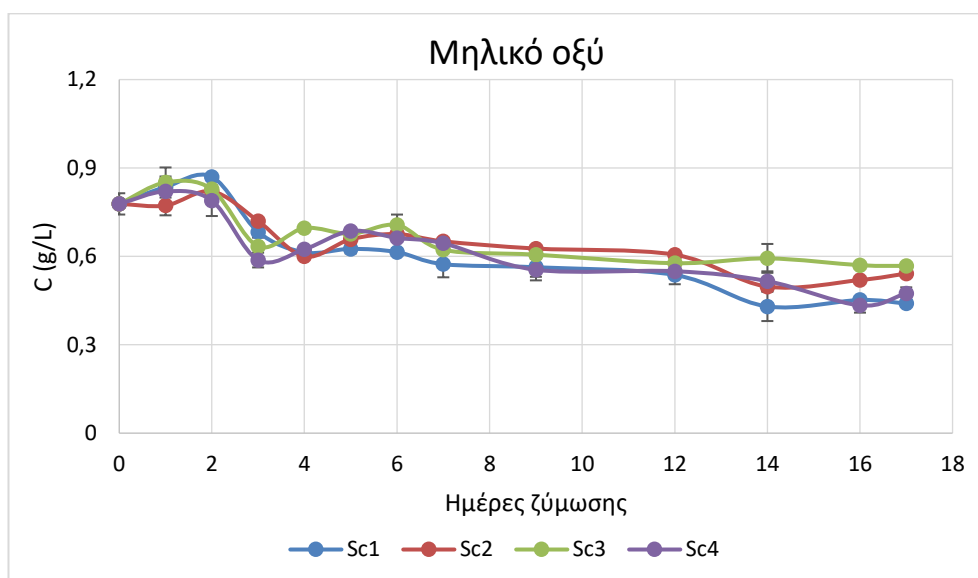
**ΣΧΗΜΑ 4: ΠΟΡΕΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟΥ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ**

Με την ίδια μέθοδο HPLC και με ανιχνευτή UV καταγράφηκε η πορεία εξέλιξης των οργανικών οξέων του γλεύκους και κατ' επέκταση των οίνων. Στα σχήματα 5 έως 10 που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μεταβολές των κυριότερων οξέων μιας αλκοολικής ζύμωσης.

Το τρυγικό οξύ βρίσκεται στα γλεύκη σε συγκεντρώσεις από 2-6 g/L και η περιεκτικότητά του σχετίζεται με την περιοχή (νότια-βόρεια) που βρίσκονται τα σταφύλια. Στους οίνους η περιεκτικότητά του είναι από 1,5-2,5 g/L και σταδιακά μειώνεται λόγω της μερικής αδιαλυτοποίησης των τρυγικών αλάτων από το σχηματισμό της αιθανόλης (Κοτσερίδης, Σημειώσεις ΠΜΣ Οινολογίας Γ.Π.Α). Στο σχήμα 5 παρατηρούμε ότι την ημέρα 0 το γλεύκος είχε συγκέντρωση τρυγικού οξέος γύρω στα 2,8 g/L. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάστηκαν μικρές αυξομειώσεις, ενώ τη τελευταία μέρα ζύμωσης όλα τα στελέχη παρουσίασαν περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ στα 3 g/L.



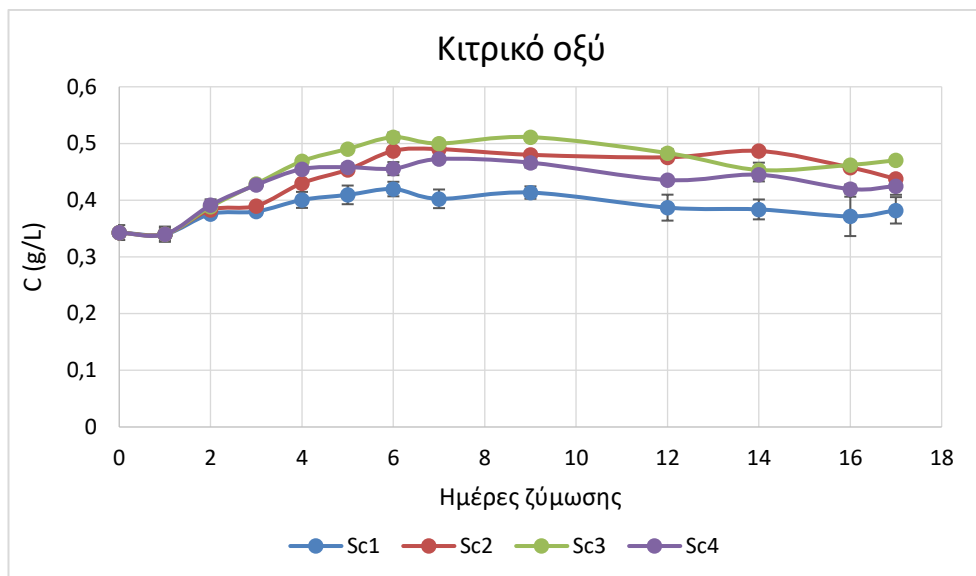
**ΣΧΗΜΑ 52: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΤΡΥΓΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟΥ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ**



**ΣΧΗΜΑ 6: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΜΗΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟΥ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ**

Σε ότι αφορά το μηλικό οξύ, η περιεκτικότητά του είναι αρκετά μικρή σε ξηροθερμικά περιβάλλοντα όπως της Ελλάδας μιας και ‘καίγεται’ σε θερμοκρασίες πάνω από 30 °C. Στο σχήμα 6 παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του μηλικού στο γλεύκος, στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, είναι περίπου 0,8 g/L, τη δεύτερη μέρα ζύμωσης παρουσιάζει μια ελαφριά αύξηση καθώς τα σάκχαρα μπορούν να σχηματίσουν μια μικρή ποσότητα μηλικού οξέος (Τσακίρης, 2017) και στη συνέχεια η συγκέντρωση αρχίζει να μειώνεται. Στη ζύμωση με το στέλεχος Sc3

παρουσιάζεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε μηλικό οξύ (στα 0,58 g/L) ενώ η μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζεται στη ζύμωση με το στέλεχος Sc1 (στα 0,42 g/L).

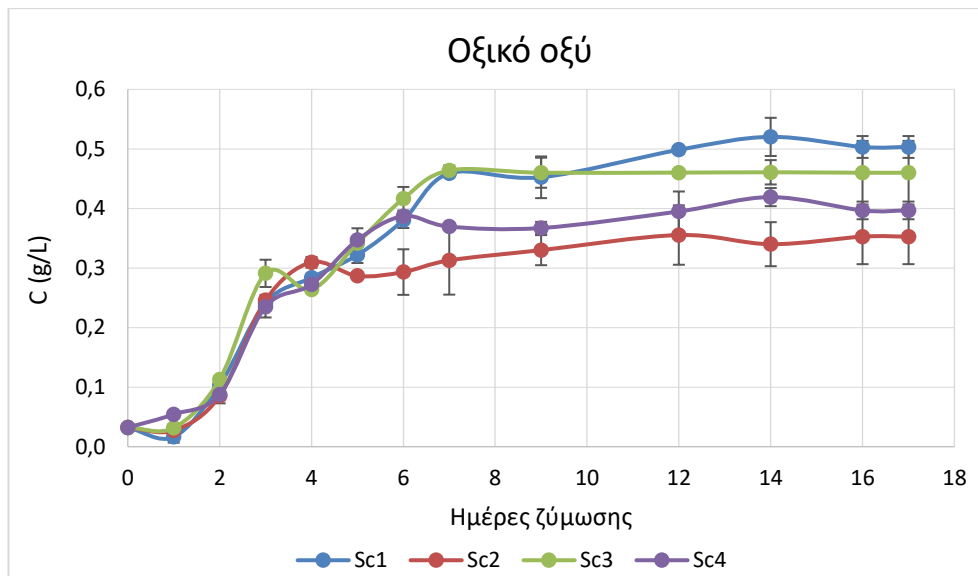


**ΣΧΗΜΑ 7: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟΥ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ**

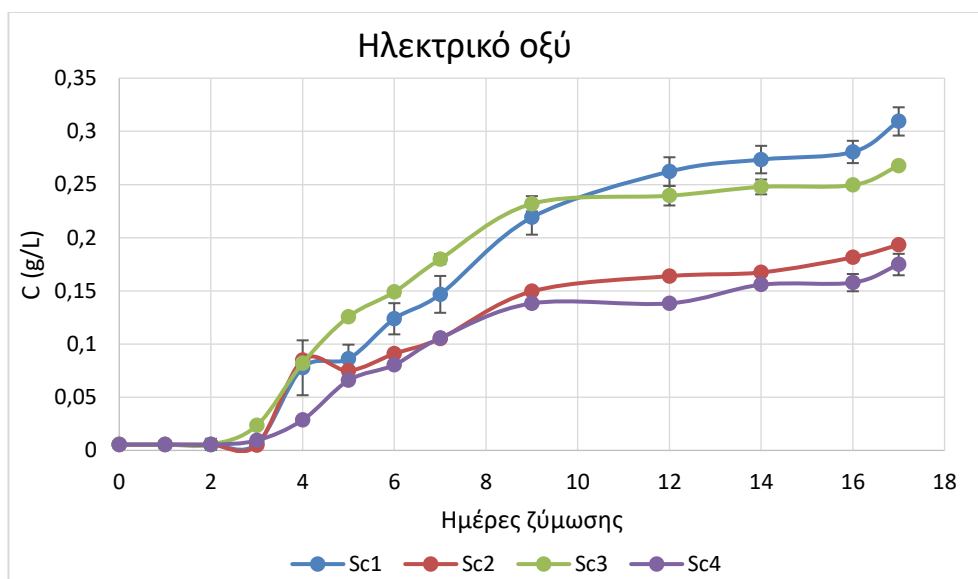
Η εξέλιξη του κιτρικού οξέος κατά την διάρκεια των ζυμώσεων φαίνεται στο σχήμα 7. Η συγκέντρωση αυτού του οξέος βρίσκεται κοντά στα 0,35 g/L στο γλεύκος και παρουσιάζει μια αυξητική τάση μέχρι και την ένατη μέρα ζύμωσης ενώ στη συνέχεια αρχίζει να μειώνεται ελαφρώς. Η μέγιστη τιμή παρουσιάστηκε στη ζύμωση με το στέλεχος Sc3 (στα 0,48 g/L). Στις ζυμώσεις με τα στελέχη Sc2 και Sc4 εμφανίζουν πολύ κοντινές τιμές ενώ η ελάχιστη τιμή παρουσιάζεται στο στέλεχος Sc1, στα 0,38 g/L.

Αντίστοιχα με τα παραπάνω, στο σχήμα 8 παρουσιάζεται η εξέλιξη του οξικού οξέος, ενός σημαντικού οξέος για την ποιότητα του τελικού προϊόντος που παράγεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης σε φυσιολογικά επίπεδα. Η παρουσία του οξικού οξέος αυξάνεται με έντονο ρυθμό στις πρώτες 6 ημέρες των ζυμώσεων και μετά σταθεροποιείται περισσότερο ή λιγότερο σε επίπεδα 0,3 – 0,5 g/L. Οι τιμές για τα στελέχη Sc2, Sc3, Sc4 κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα χωρίς ιδιαίτερα μεγάλες διακυμάνσεις, ενώ η παραγωγή οξικού οξέος του στελέχους Sc1 αρχίζει και αυξάνεται από τη δέκατη ημέρα ζύμωσης με το υψηλότερο σημείο να παρουσιάζεται τη δέκατη τέταρτη ημέρα και έπειτα να ελαττώνεται σε αποδεκτά όρια για την οργανοληπτική αξιολόγηση.



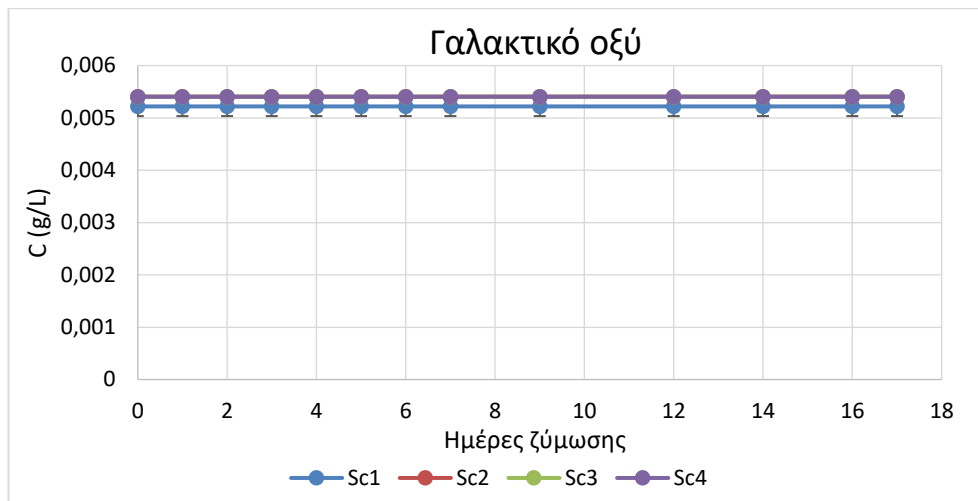


**ΣΧΗΜΑ 8: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΥΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟΥ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ**



**ΣΧΗΜΑ 9: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΥΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟΥ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ**

Το ηλεκτρικό οξύ σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, είναι βιολογικά σταθερό και παράγει εστέρες με την αιθανόλη που προσδίδουν άρωμα λουλουδιών (Τσακίρης, 2017). Η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος φαίνεται πως ξεκινάει την Τρίτη μέρα ζύμωσης, με αυξητική τάση για όλα τα στελέχη μέχρι και την τελευταία μέρα ζύμωσης. Οι ζυμώσεις με τα στελέχη Sc1 και Sc3 παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές στα 0,3 και 0,26 g/L αντίστοιχα ενώ τα στελέχη Sc2 και Sc4 εμφανίζουν μικρότερες τιμές στα 0,19 και 0,17 g/L.

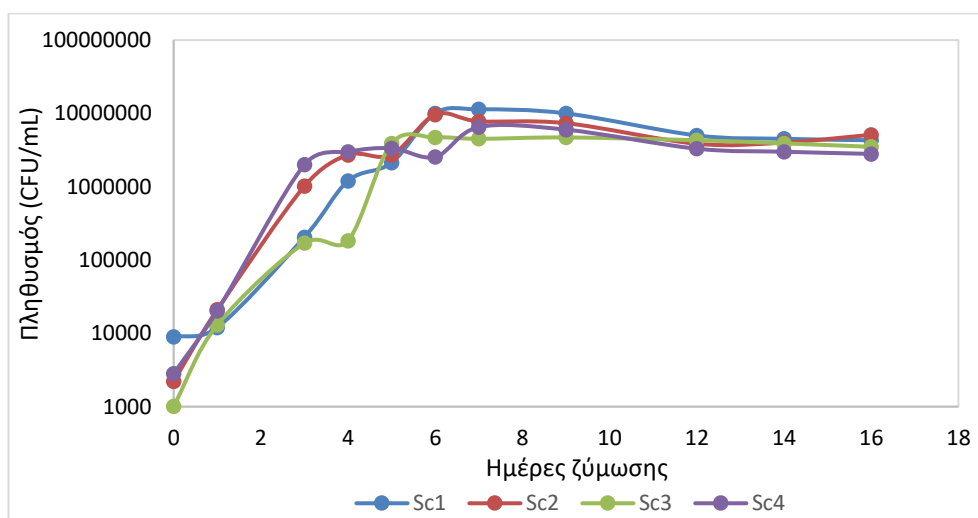


**ΣΧΗΜΑ 10: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟΥ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ**

Τέλος, το γαλακτικό οξύ σχηματίζεται σε μικρές συγκεντρώσεις κατά την αλκοολική ζύμωση από τους ζυμομύκητες καθώς επίσης σχηματίζεται και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Όπως φαίνεται στο σχήμα 10, όπου παρουσιάζονται οι μεταβολές στην συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στις ζυμώσεις με τα στελέχη, έχουν παραχθεί πολύ μικρές ποσότητες γαλακτικού οξέος που κυμαίνονται σχεδόν στα ίδια επίπεδα, καθώς δεν πραγματοποιήθηκε μηλογαλακτική ζύμωση.

### 3.2. Εξέλιξη πληθυσμού ζυμομυκήτων

Η μικροβιακή ανάπτυξη κατά την διάρκεια των ζυμώσεων με τα απομονωθέντα στελέχη παρακολούθηθηκε και καταγράφηκε με μέτρηση των αποικιών από ζώντα κύτταρα σε τρυβλία με εκλεκτικό υπόστρωμα ζυμών μετά από δεκαδικές αραιώσεις.

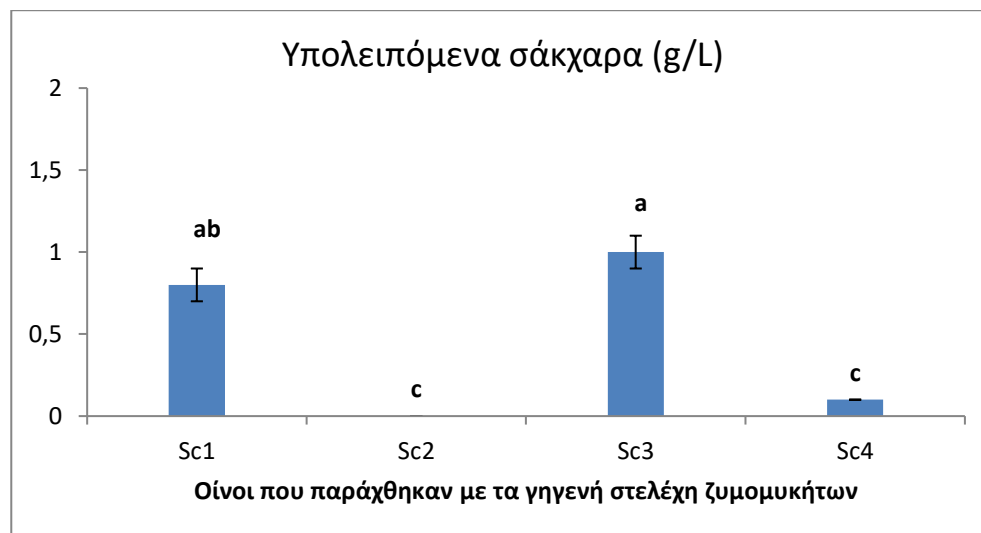


**ΣΧΗΜΑ 11. ΠΟΡΕΙΑ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΙΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ ΜΕ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ**

Στο σχήμα 11 παρουσιάζεται η λογαριθμική πορεία εξέλιξης του πληθυσμού των ζυμομυκήτων από τη λανθάνουσα φάση, στην εκθετική που ξεκινάει από την πρώτη μέρα εμβολιασμού και φτάνει μέχρι περίπου την πέμπτη ημέρα. Στη συνέχεια από την έκτη ημέρα ζύμωσης ακολουθεί η στατική φάση όπου και διαρκεί σχεδόν δέκα ημέρες και έπειτα ακολουθεί η φάση θανάτου. Τα στελέχη Sc1 και Sc2 έφτασαν σε πληθυσμό μέχρι και  $10^6$  cfu/mL ενώ όπως φαίνεται στο διάγραμμα τα στελέχη Sc3 και Sc4 βρίσκονται σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα.

### 3.3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

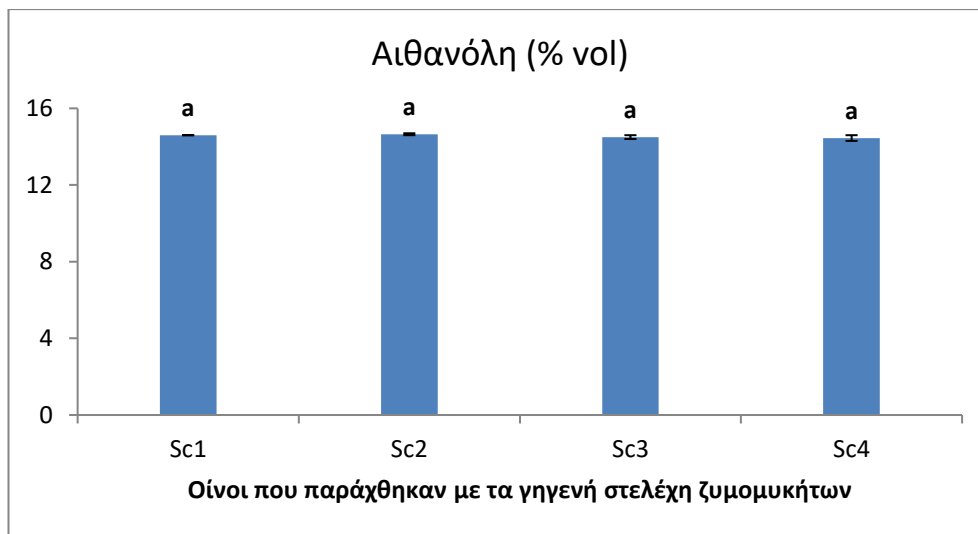
Οι οίνοι που παράχθηκαν από τις ζυμώσεις του γλεύκους με τα 4 γηγενή στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* αναλύθηκαν ως προς τις βασικές παραμέτρους οίνων και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα σχήματα που ακολουθούν. Στα ραβδογράμματα εμφανίζονται οι μέσοι όροι των επαναλήψεων και η τυπική απόκλιση των δειγμάτων ενώ με του χαρακτήρες διαφοροποίησης επιβεβαιώνεται η στατιστική τους διαφορά ή όχι σε επίπεδο σημαντικότητας 5 %. Διαφορετικοί χαρακτήρες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά.



**ΣΧΗΜΑ 12: ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΑ ΣΑΚΧΑΡΑ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΧΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΓΗΓΕΝΗ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ**

Ο προσδιορισμός των υπολειπόμενων-αναγόντων σακχάρων είναι η ανάλυση που επιβεβαιώνει το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης όταν στόχος είναι η πλήρης ζύμωση των σακχάρων. Στην παρούσα μελέτη βέβαια η συγκέντρωση των ζυμώσιμων σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη) παρακολουθούνταν καθημερινά. Στο σχήμα 12 παρουσιάζονται οι τελικές τιμές των υπολειμματικών σακχάρων σε επίπεδο γλυκόζης/φρουκτόζης, δηλαδή όταν οι ζυμώσεις θεωρήθηκαν πλήρεις, εκφρασμένα σε g/L. Παρατηρείται ότι, και στα τέσσερα στελέχη, η συγκέντρωση των σακχάρων κυμαίνεται κάτω από τα 4 g/L που είναι τα επίπεδα ενός ξηρού

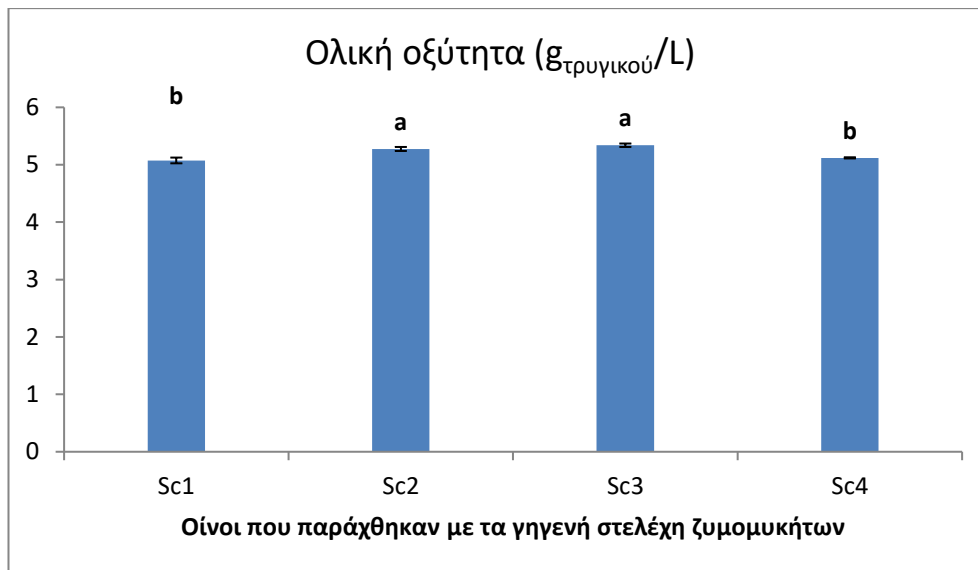
οίνου. Το στέλεχος Sc2 και το Sc4 κατανάλωσαν σχεδόν όλα τα σάκχαρα ενώ τα στελέχη Sc1 και Sc3 παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση υπολειμματικών σακχάρων στο 0,8 και στο 1 g/L αντίστοιχα.



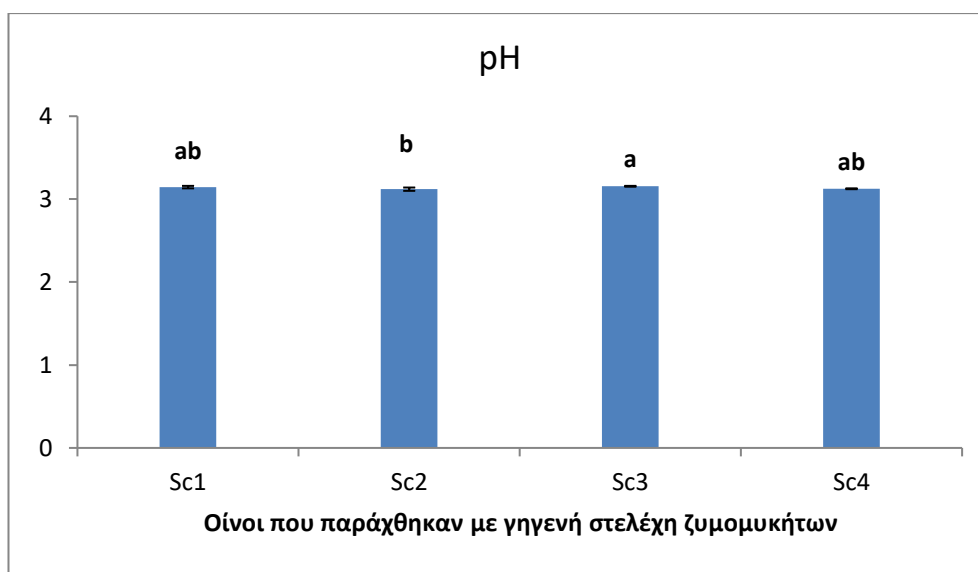
**ΣΧΗΜΑ 13: ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΧΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΓΛΥΚΟΥΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΓΗΓΕΝΗ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ**

Στο σχήμα 13 φαίνεται ο αλκοολικός τίτλος των οίνων (% vol). Όλα τα δείγματα παρουσιάζουν υψηλούς αλκοολικούς τίτλους με τιμές πάνω από 14 % vol, με την μεγαλύτερη να είναι αυτή του δείγματος Sc2 με τιμή 14,65% vol. Συνεπώς φαίνεται πως και τα τέσσερα στελέχη παρουσιάζουν υψηλή αντοχή στην αιθανόλη με εξαιρετική ζυμωτική ικανότητα.

Στο σχήμα 14 απεικονίζεται η ολική οξύτητα των τεσσάρων δειγμάτων εκφρασμένη σε g/L τρυγικού οξέος. Η ολική οξύτητα συνυπολογίζει το σύνολο των οξέων του οίνου είτε προέρχονται από το γλεύκος είτε παράχθηκαν κατά την αλκοολική ζύμωση και ξεπερνάει τα 5 g/L σε όλα τα δείγματα. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι τα στελέχη του ζυμομύκητα προέρχονται από τη ποικιλία Σαββατιανό του Αττικού αμπελώνα, θα μπορούσε να θεωρηθεί πως τα επίπεδα της οξύτητας παρουσιάζουν φυσιολογικές για την ποικιλία τιμές. Παράλληλα, στο σχήμα 15 φαίνεται η διαφοροποίηση του pH στους οίνους της μελέτης. Όλες οι τιμές του pH κυμάνθηκαν σε φυσιολογικά και χαμηλά επίπεδα με την χαμηλότερη τιμή να είναι στο 3,12 και την υψηλότερη στο 3,16, χωρίς να προκύπτει κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των παραγόμενων οίνων.



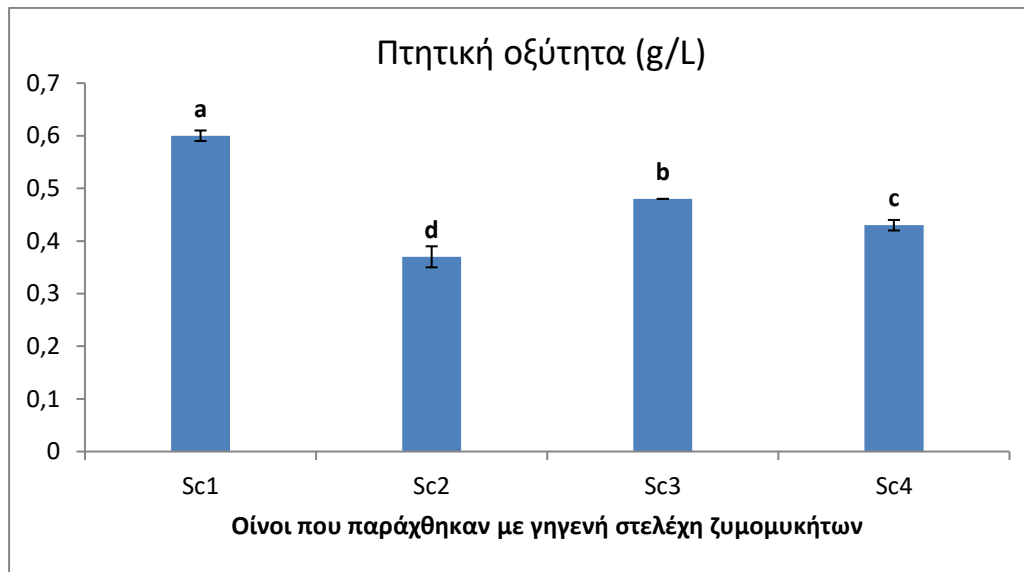
**ΣΧΗΜΑ 14: ΟΛΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΧΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΓΗΓΕΝΗ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ**



**ΣΧΗΜΑ 15: pH ΟΙΝΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΧΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΓΗΓΕΝΗ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ**

Σαν τελευταία παράμετρος στους παραχθέντες οίνους εξετάστηκε η πτητική οξύτητα, ένδειξη ποιότητας και απρόσκοπτης εξέλιξης των ζυμώσεων. Η πτητική οξύτητα εκφράζεται σε g/L οξικού οξέος και η παρουσία της στους οίνους πάνω από ορισμένες συγκεντρώσεις επηρεάζει αρνητικά το οργανοληπτικό τους προφίλ, καθώς δημιουργεί αίσθηση ξηρότητα; στο στόμα αλλά και οσμή και γεύση ξυδιού. Τιμές οι οποίες ξεπερνούν τα 0,6 g/L, σε ισοδύναμα οξικού οξέος, υποδηλώνουν οίνους προβληματικούς που συνήθως ευθύνεται η κακή υγιεινή των

σταφυλιών, ενώ σύμφωνα με τη νομοθεσία σε οίνους με πτητική οξύτητα μεγαλύτερη του 1-1,2 απαγορεύεται η εμπορεία.



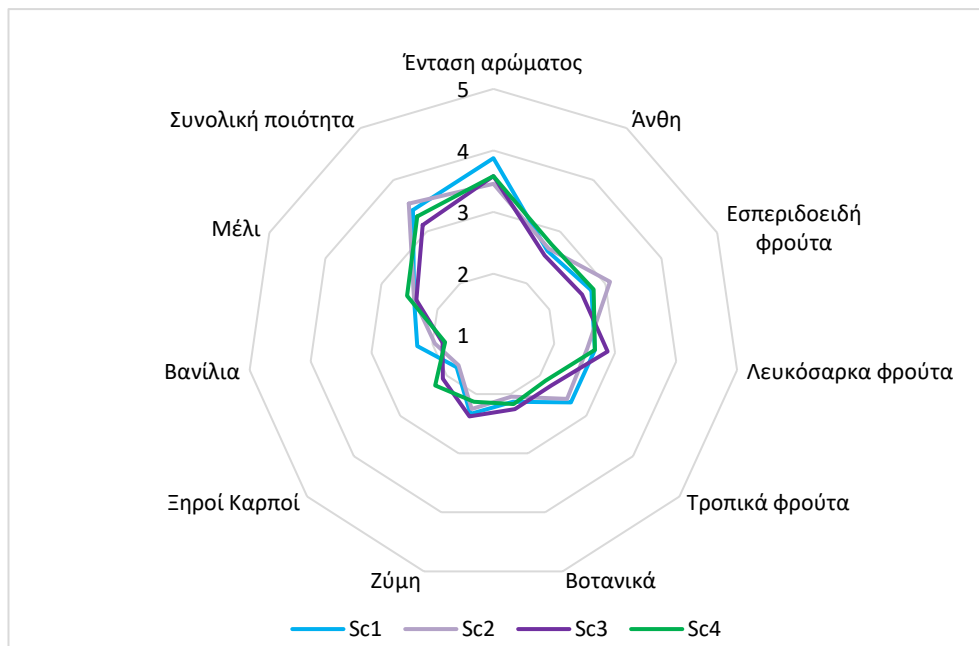
**ΣΧΗΜΑ 16: ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ ΟΙΝΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΧΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΓΗΓΕΝΗ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ**

Στους οίνους της μελέτης, το δείγμα Sc1 παρουσίασε την υψηλότερη τιμή η οποία κυμαίνεται μεν σε φυσιολογικές τιμές και μπορεί ο οίνος να είναι οργανοληπτικά αποδεκτός αλλά οι συγκεντρώσεις των πτητικών οξέων μικρής ανθρακικής αλυσίδας πλησιάζουν σε επίπεδα που πιθανόν να γίνουν αντιληπτά. Το δείγμα Sc1 παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τα υπόλοιπα τρία δείγματα που κυμαίνονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και συνεπώς έχουν καλύτερη ζυμωτική συμπεριφορά δεδομένου ότι οι ζυμώσεις ξεκίνησαν από το ίδιο γλεύκος. Στους υπόλοιπους οίνους, την χαμηλότερη πτητική οξύτητα είχε το στέλεχος Sc2 (0.37 g/L) και την μεγαλύτερη ο οίνος Sc3 (0,48 g/L).

### **3.4. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ**

Σκοπός της συγκεκριμένης οργανοληπτικής αξιολόγησης ήταν να βαθμολογήσουν οι δοκιμαστές τους τέσσερις οίνους, σύμφωνα με τα αρώματα στη μύτη, την ένταση του αρώματος αλλά και την συνολική ποιότητα έτσι ώστε να μπορούν να αξιολογηθούν οι διαφορές των τεσσάρων γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων. Όπως αναφέρθηκε στις Μεθόδους, οι οίνοι αξιολογήθηκαν ως προς την ένταση δώδεκα περιγραφικών όρων με κλίμακα 1-5 με τη βοήθεια του λογισμικού Compusense Cloud.

Τα σκορ της αξιολόγησης συλλέχθηκαν, επεξεργάστηκαν και προέκυψε το σχήμα/αραχνόγραμμα 17. Παρατηρείται ότι στην συνολική ποιότητα οι τιμές των τεσσάρων δειγμάτων βρίσκονται πολύ κοντά με μεγαλύτερη εκείνη του δείγματος Sc2. Αντίθετα στην ένταση των αρωμάτων οι δοκιμαστές αξιολόγησαν το στέλεχος Sc1 ως πιο έντονο στη μύτη συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη, ενώ τα στελέχη Sc3 και Sc4 βαθμολογήθηκαν ακριβώς με την ίδια ένταση. Όσο αφορά το είδος των αρωμάτων, στο αραχνόγραμμα φαίνεται πως το στέλεχος Sc1 εμφανίζει πιο έντονα τα αρώματα μελιού, βανίλιας και τροπικών φρούτων και αμέσως μετά ακολουθούν τα αρώματα ζυμών. Το στέλεχος Sc2 εμφανίζει πιο έντονα ανθικά αρώματα και κυρίως αρώματα εσπεριδοειδών. Ακριβώς αντίθετα, το στέλεχος Sc3 εμφανίζει πιο έντονα βοτανικά αρώματα, αρώματα ζύμης και ξηρών καρπών. Τέλος, το στέλεχος Sc4, παρουσιάζει κοντινές τιμές με το στέλεχος Sc1, βγάζει ανθικά αρώματα, αρώματα εσπεριδοειδών, μελιού και σε μικρότερη ένταση αρώματα ξηρών καρπών.



ΣΧΗΜΑ 17: ΑΡΑΧΝΟΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΟΙΝΩΝ

## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί συνέχεια ερευνητικής εργασίας που είχε ως αντικείμενο την απομόνωση γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων από το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης γλεύκους της ποικιλίας Σαββατιανό. Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την αξιολόγηση των στελεχών ως προς την ικανότητα ζύμωσης, τη κινητική ζύμωσης και τέλος το οργανοληπτικό προφίλ των παραγόμενων οίνων.

Όλα τα στελέχη (Sc1, Sc2, Sc3, Sc4) που εμβολιάστηκαν σε γλεύκος της ποικιλίας Σαββατιανό, ολοκλήρωσαν τις ζυμώσεις με αλκοολικούς τίτλους πάνω από 14% vol και με ανάγοντα σάκχαρα κάτω από 1g/L εμφανίζοντας ιδιαίτερα υψηλή αντοχή στην αιθανόλη. Τα αποτελέσματα των βασικών αναλύσεων έδειξαν εμφανώς τιμές που αντιστοιχούν σε οίνους ποιότητας, καθώς το pH όλων των παραγόμενων οίνων κυμαίνεται από 3,12 έως 3,16 όπου σύμφωνα με την (Eva Schvarczona et al., 2017) οι τιμές αυτές επηρεάζουν θετικά την ποιότητα τους όσον αφορά τη γεύση, το χρώμα, τη χημική του σταθερότητα, αλλά και τη διατήρηση της φρεσκάδας του. Η ολική οξύτητα για όλα τα δείγματα ξεπερνάει τα 5 g/L τρυγικού οξέος και εδώ είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη πως όλα τα στελέχη των ζυμομυκήτων αλλά και το γλεύκος που εμβολιάστηκαν, προέρχεται από την ποικιλία Σαββατιανό. Τα επίπεδα γλυκερόλης παρουσίασαν ικανοποιητικές τιμές καθώς κατά μέσο όρο κυμάνθηκαν στα 7 g/L, εμφανίζοντας έτσι περισσότερο όγκο στο σώμα των οίνων αλλά και αυξάνοντας την αίσθηση της γλυκάδας. Η πτητική οξύτητα για τα στελέχη Sc2, Sc3 και Sc4 κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα ενώ το στέλεχος Sc1 παρουσίασε υψηλότερη πτητική οξύτητα στα 0,6 g/L οξικού οξέος που κυμαίνεται στα όρια για να είναι οργανοληπτικά αποδεκτή.

Στην οργανοληπτική αξιολόγηση, η βαθμολογία των κριτών σχετικά με τη συνολική ποιότητα των οίνων, έφερε και τα τέσσερα δείγματα σε κοντινές τιμές με διαφορά το δείγμα Sc2 που είχε λίγο καλύτερο σκορ. Η ένταση των αρωμάτων για όλα τα δείγματα αξιολογήθηκε στο 3,5-4 με κλίμακα από το 1-5. Τα είδη των αρωμάτων, για κάποια στελέχη, θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι κοινά αλλά με το κάθε στέλεχος να παρουσιάζει μια υψηλότερη νότα σε διαφορετικό άρωμα όπως αρώματα βανίλιας, ξηρών καρπών, ζυμών, βοτανικά αλλά και ανθικά αρώματα.

Συνοψίζοντας, η χρήση εμπορικών στελεχών ζυμομυκήτων κατά τη ζύμωση αποτελεί μια συνηθισμένη πρακτική καθώς διασφαλίζει την ποιότητα και μειώνει τον κίνδυνο αλλοίωσης του οίνου. Ωστόσο, αυτό μπορεί προοδευτικά να προκαλέσει την υποκατάστατη της τοπικής μικροχλωρίδας και τη μείωση της μικροβιακής βιοποικιλότητας όπου κατ' επέκταση οδηγεί σε απώλεια της τυπικότητας και της πολυπλοκότητας του οίνου. Τα αποτελέσματα που



προκύπτουν από τη παρούσα μελέτη, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα γηγενή στελέχη ζυμομυκήτων μπορούν να παράγουν οίνους υψηλής ποιότητας και κυρίως οίνους με πολύπλοκο και πιο τυπικό αρωματικό προφίλ που θα σχετίζονται άμεσα με το μοναδικό terroir της περιοχής τους.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albergaria, H., & Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*, 2035-2046.
- Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 821.
- Berger, S., Sinha, A. K., & Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of experimental botany*, *58*(15-16), 4019-4026.
- Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Soria-Lopez, A., Garcia-Oliveira, P., & Prieto, M. A. (2021). Essential oils and their application on active packaging systems: A review. *Resources*, *10*(1), 7.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., & Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *62*(2), 191-202.
- Ciani, M., & Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *14*(2), 199.
- Ciani, M., & Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*, *17*, 1247-1250.
- Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., des Gachons, C. P., & Murat, M. L. (2006). The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: the example of Sauvignon blanc. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*(1), 81-88.
- Etievant, P. X. (1991). Volatile compounds in food and beverages. In *Wine* (pp. 483-546). Marcel Dekker New York.
- Schvarczová, E. V. A., ŠTEFÁNIKOVÁ, J., Jankura, E., & Kolek, E. (2017). Selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains for production of typical Pinot Gris wines. *Journal of Food & Nutrition Research*, *56*(4).
- Fia, G., Giovani, G., & Rosi, I. (2005). Study of  $\beta$ -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(3), 509-517.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology*, *86*(1-2), 11-22.
- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: A critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *55*(2), 202-218.
- Grainger, K. (2009). *Wine quality: tasting and selection* (Vol. 8). John Wiley & Sons.

- Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. *European Food Research and Technology*, 222, 15-25.
- Jackson, J. F., & Linskens, H. F. (Eds.). (2002). *Analysis of taste and aroma* (Vol. 21). Springer Science & Business Media.
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma-a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1), 97-129.
- Mottram, D. S., & Maarse, H. (1991). *Volatile compounds in foods and beverages*. New York: Marcel Dekker, 107-177.
- Maicas, S., & Mateo, J. J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 67, 322-335.
- Vaughan-Martini, A., & Martini, A. (1993). A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(1), 113-119.
- Peynaud, E., & Blouin, J. (1996). *The taste of wine: The art science of wine appreciation*. John Wiley & Sons.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675-729.
- Rankine, B. C. (1966). *Pichia membranaefaciens*, a yeast causing film formation and off-flavor in table wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 17(2), 82-86.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Robinson, A. L., Boss, P. K., Solomon, P. S., Trengove, R. D., Heymann, H., & Ebeler, S. E. (2014). Origins of grape and wine aroma. Part 1. Chemical components and viticultural impacts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(1), 1-24.
- Rodríguez-Méndez, M. L., De Saja, J. A., González-Antón, R., García-Hernández, C., Medina-Plaza, C., García-Cabezón, C., & Martín-Pedrosa, F. (2016). Electronic noses and tongues in wine industry. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4, 81.
- Rodríguez, S. B., & Thornton, R. J. (1990). Factors influencing the utilisation of L-malate by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 72(1-2), 17-22.
- Sablayrolles, J. M. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, 42(4), 418-424.
- Suárez-Lepe, J. A., & Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 39-50.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of grape and wine research*, 11(2), 139-173.

Villena, M. A., Iranzo, J. F. Ú., & Pérez, A. I. B. (2007).  $\beta$ -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3), 420-425.

Winterhalter, P. (1991). 1, 1, 6-Trimethyl-1, 2-dihydronaphthalene (TDN) formation in wine. 1. Studies on the hydrolysis of 2, 6, 10, 10-tetramethyl-1-oxaspiro [4.5] dec-6-ene-2, 8-diol rationalizing the origin of TDN and related C13 norisoprenoids in Riesling wine. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 39(10), 1825-1829.

Αγοραστός Νικόλαος, 2021 (oinologos.com).

Κεφαλοπούλου, 2015 (wine roads of Athens).

Μακρυγιάννη, Μ., 2017 (House of Wine).

Μαλλούχος, Α. (2003). Μελέτη δευτερογενούς αρώματος με GC/MS οίνων που παράγονται με ακινητοποιημένα κύτταρα (Doctoral dissertation, Πανεπιστήμιο Πατρών. Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας).

Σταύρακας, Δ. Ε., (2015), Αμπελογραφία, εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

Νερατζής Η., Ταταρίδης Π., Λιούνη Μ., Βαρελάς Β., << Μικροβιολογία οίνου >>, Αθήνα, Εκδόσεις Έμβρυο.

Τσακίρης Α., <<Οινολογία >>, Αθήνα, Εκδόσεις Ψυχάλου, 2017.