



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ζυμωτικό Δυναμικό Στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* από την Περιοχή
της Νεμέας**

Θάλεια Ελένη Τσιaré Κολλιοπούλου

Αριθμός Μητρώου:141099

Επιβλέπων:

Γεώργιος Μπανίλας

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ – 2022



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

SCHOOL OF FOOD SCIENCE

DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES

BACHELOR THESIS

**Fermenting potential of *Saccharomyces cerevisiae* strains from Nemea
region**

Thaleia Eleni Tsiare Kolliopoulou

Registration Number: 141099

Supervisor:

George Banilas

ATHENS, JULY – 2022



ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία
με τίτλο:

«Ζυμωτικό Δυναμικό Στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* από την Περιοχή
της Νεμέας»

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή Δρ. Μπανίλα Γεώργιου	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή Δρ. Κόρκα Ηλία	
Υπογραφή Κύριας Ερευνήτριας Δρ. Νησιώτου Ασπασία	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα Τσιαρέ Κολλιοπούλου Θάλεια Ελένη του Παναγιώτη, με αριθμό μητρώου 141099 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

ΤΣΙΑΡΕ ΚΟΛΛΙΟΠΟΥΛΟΥ ΘΑΛΕΙΑ ΕΛΕΝΗ



Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «Απομόνωση και αξιολόγηση άγριων ζυμών από ελληνικούς αμπελώνες: Ζυμωτικό Δυναμικό Στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* από την Περιοχή της Νεμέας» πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας του τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής το έτος 2018-2019. Το ερευνητικό μέρος της εργασίας διεξήχθη στο Εργαστήριο Οινολογίας του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων ΕΛΓΟ Δήμητρα .

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα με τα οποία συνεργάστηκα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της παραπάνω διπλωματικής εργασίας, καθένα από τα οποία έπαιξε μείζονα ρόλο στην εξέλιξή και διεκπεραίωση της.

Ξεκινώντας, λοιπόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια, Ασπασία Νησιώτου, για την επιστημονική της καθοδήγηση, τη συνεχή υποστήριξή της και τις ουσιώδεις συμβουλές που μου παρείχε καθ 'όλο το χρονικό διάστημα της διεξαγωγής της μελέτης και των εργαστηριακών πειραμάτων. Η συνεισφορά της ήταν πολύ σημαντική, καθώς συνέβαλε έντονα στην ανάπτυξη των εργαστηριακών και οργανωτικών δεξιοτήτων μου, αλλά επιπλέον μου παρείχε ηθική υποστήριξη κατά τη διάρκεια της έρευνας.

Στη συνέχεια, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κύριο Γεώργιο Μπανίλα, καθηγητή του τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, που μου εμπιστεύτηκε την παρούσα διπλωματική εργασία και μου παρείχε άμεση βοήθεια και στήριξη καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής. Επιπλέον, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ως καθηγητή, για όλη την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μού προσέφερε κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και κατά τη φοίτηση μου στο τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών.

Έπειτα, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου του Ινστιτούτο Οίνου, όπου καθένα από αυτά έδωσε τη δίκη του ξεχωριστή συνεισφορά, προσφέροντάς μου στήριξη τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Χαλβαντζή και τους συναδέλφους μου Γιώργο Σγούρο και Νικήτα Πρασά, για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν, την υποδειγματική συνεργασία και αλληλεγγύη, αλλά και για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Θα ήθελα να δώσω ένα ακόμη ευχαριστώ και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τα οποία επίσης, συνέβαλαν στη δημιουργία ενός ευχάριστου και φιλικού περιβάλλοντος εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στα αγαπημένα μου πρόσωπα, την οικογένεια μου που μού παρείχε στήριξη όλο αυτό το διάστημα και αποδέχτηκε όλες τις μέχρι τώρα επιλογές μου, αλλά και όλους τους στενούς μου φίλους για την θετική τους σκέψη, την καθημερινή τους ψυχολογική στήριξη και την υπομονή που έδειξαν, βοηθώντας στην εκπλήρωση των στόχων που συνεχώς θέτω.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη	9
Abstract.....	10
Εισαγωγή.....	11
1. Οι ζύμες και ο ρόλος τους στην παραγωγή οίνων	15
2. Η ζύμη <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3. Ζύμες και χαρακτηριστικά παραγόμενου οίνου.....	23
4. Επιβλαβείς επιπτώσεις ζυμών σε οίνους.....	26
5. Εμπορικές ζύμες.....	31
6. Γηγενή στελέχη ζυμών και παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας.....	33
7. Χημικές αναλύσεις οίνων	35
7.1 Ενεργός οξύτητα.....	37
7.2 Ογκομετρούμενη οξύτητα	38
7.3 Πτητική οξύτητα.....	39
8. Στατιστική επεξεργασία δεδομένων	40
8.1 Analysis of variance (ANOVA).....	40
8.2 Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)	41
8.3 PCA (Principle Component Analysis).....	41
Σκοπός Μελέτης	43
Υλικά και Μέθοδοι	44
1. Επιλογή στελεχών <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος YPD άγαρ.....	44
2. Ζυμώσεις εργαστηριακής κλίμακας με επιλεγμένα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 45	
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος YPD Broth	46
3. Οινολογικές Αναλύσεις.....	46
3.1 Προετοιμασία δείγματος.....	46
3.2 Μέτρηση Ενεργού Οξύτητας (pH).....	47
3.3 Μέτρηση ογκομετρούμενης (τιτλοδοτούμενης) οξύτητας.....	47
3.4 Μέτρηση πτητικής οξύτητας	48
4. Στατιστικές Αναλύσεις.....	49

Αποτελέσματα.....	51
Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	57
Βιβλιογραφία	60

Περίληψη

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής αξιολογήθηκε η φαινοτυπική ποικιλομορφία 20 ενδογενών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* από την περιοχή της Νεμέας. Εξετάστηκαν ως προς χαρακτηριστικά του ζυμωτικού και οινολογικού τους δυναμικού και ειδικότερα μελετήθηκε η διάρκεια και ο ρυθμός της αλκοολικής ζύμωσης για κάθε στέλεχος, η ενεργός, η πτητική και η ολική οξύτητα, καθώς επίσης και το παραγόμενο διοξείδιο του άνθρακα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Συνολικά, τα παρόντα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι διαφορετικά στελέχη *S. cerevisiae* έχουν τη δυνατότητα να εμφανίζουν διαφορετικούς οινολογικούς φαινοτύπους, υποδεικνύοντας την πιθανή ύπαρξη μικροβιακής διάστασης στο *terroir*. Η επιλογή και η χρήση γηγενών στελεχών *S. cerevisiae* από την περιοχή της Νεμέας, με ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ως εναρκτήριες καλλιέργειες για την οινοποίηση, μπορεί να αποτελέσει ισχυρό εργαλείο για τη βελτίωση της ποιότητας και την ενίσχυση του τοπικού χαρακτήρα των οίνων, αναδεικνύοντας ταυτόχρονα και τις τοπικές ποικιλίες αμπέλου.

Abstract

In the context of this thesis, the fermenting potential of 20 indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from Nemea region was evaluated. The fermenting and oenological potential, more specifically the duration and the rate of fermentation for each genotype, the pH, the total and volatile acidity of the produced wine were evaluated. The present results indicate that different strains of *S. cerevisiae* may produce different wine phenotypes, thereby supporting the concept of microbial terroir in winemaking. The selection and use of indigenous *S. cerevisiae* strains from the Nemea region with peculiar phenotypic characteristics as starter cultures could be a powerful tool for improving the quality of wines and enhancing the local character of wines, highlighting at the same time the local grapevine varieties.

Εισαγωγή

Η σχέση μεταξύ του οίνου και του ανθρώπου χρονολογείται χιλιάδες χρόνια πίσω. Η ανίχνευση άλατος ασβεστίου του τρυγικού οξέος και ρητίνης τερεβίνθου σε ένα κεραμικό σκεύος που χρονολογείται γύρω στο 5400-5000 π.Χ, αποτελούν την πρώτη πειραματική απόδειξη για την παρουσία οίνου στην περιοχή του Ιράν. Η σχέση μεταξύ οίνου και *S.cerevisiae* είναι εξίσου μακροχρόνια, καθώς βρέθηκε η παρουσία ριβοσωμικού DNA από *S.cerevisiae* σε ένα πιθάρι οίνου από την Αίγυπτο, το οποίο χρονολογείται στο 3150 π.Χ. Ωστόσο, η σύνδεση αυτή δεν έγινε νωρίτερα από το 1860, όταν ο Louis Pasteur διαπίστωσε για πρώτη φορά τον "κρυφό" κόσμο της δραστηριότητας των ζυμομυκήτων κατά τη ζύμωση του οίνου και αργότερα το 1890, όταν ο Müller-Thurgau πρότεινε τη διαδικασία ελεγχόμενων ζυμώσεων οίνων με καλλιέργειες εκκινητών. Αυτή η καινοτόμος πρακτική, η οποία βρήκε ευρεία εφαρμογή μετά από σχεδόν έναν αιώνα, τη δεκαετία του 1970, έφερε επανάσταση στην οινική βιομηχανία και είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας των οίνων, προσφέροντας καλύτερο έλεγχο και κατά συνέπεια καλύτερη επαναληψιμότητα και αξιοπιστία των ζυμώσεων.

Από την αρχή, το περιβάλλον της οινοποίησης εκθέτει τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο γλεύκος σταφυλιών σε πολλούς διαφορετικούς τύπους πίεσης ασκώντας επιλεκτική πίεση σε αυτούς. Στην πλειονότητα των βιομηχανικών ζυμώσεων προστίθενται, επίσης υψηλές συγκεντρώσεις του αντιοξειδωτικού και αντιμικροβιακού συντηρητικού διοξειδίου του θείου, που εντείνουν τις σκληρές συνθήκες, ενώ, καθώς η ζύμωση προχωρά, το στρες πολλαπλασιάζεται για μια πληθώρα λόγων, όπως αναερόβιες συνθήκες, εξάντληση των αποθεμάτων θρεπτικών συστατικών (άζωτο, λιπίδια, βιταμίνες), αυξημένες συγκεντρώσεις οξέων, τοξικότητα της αιθανόλης και διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Ο *S.cerevisiae* αν και βρίσκεται σε πολύ χαμηλούς πληθυσμούς σε αμπελώνες ή σταφύλια, επικρατεί στην ζύμωση κυριαρχώντας έναντι των άλλων ειδών ζύμης που αφθονούν στο φυσικό γλεύκος, καθώς διαθέτει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο στρεσογόνο περιβάλλον της ζύμωσης. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο έχει κυριαρχήσει ως "η μαγιά των οίνων" και αποτελεί το κύριο εργαλείο της οινοβιομηχανίας παγκοσμίως. Ένα άλλο σύνολο κριτηρίων για την επιτυχή επιλογή μιας καλλιέργειας εκκίνησης στη βιομηχανία είναι τα επίπεδα παραγωγής διαφόρων μεταβολιτών που σχηματίζουν το "μπουκέτο της ζύμωσης" και καθορίζουν τον σύνθετο οργανοληπτικό χαρακτήρα του παραγόμενου οίνου. Όπως έχει

αναφερθεί, οι ενώσεις που έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στο "μπουκέτο ζύμωσης" περιλαμβάνουν υψηλότερες αλκοόλες, εστέρες, αλδεΐδες και τερπένια. Η ζύμη *S.cerevisiae* είναι κυρίως υπεύθυνη για το σχηματισμό των τριών πρώτων κατηγοριών, καθώς δεν είναι επαρκής παραγωγός τερπενίων (Τσακίρης Α., 1998).

Οι ανώτερες αλκοόλες (αλκοόλες καύσης), από ποσοτική άποψη, είναι η σημαντικότερη ομάδα ενώσεων που παράγει η *S.cerevisiae* κατά τη ζύμωση. Η βιοσύνθεσή τους πραγματοποιείται μέσω του καταβολισμού των αμινοξέων, μέσω μιας οδού γνωστής ως οδός Ehrlich. Όπως αναφέρεται από τους Hazelwood et al. (2008), η εν λόγω οδός αποτελείται από τρία στάδια: Αρχικά οι τρανσαμινάσες, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια ARO8, ARO9, BAT1 και BAT2, αποαμινώνουν τα αμινοξέα στα αντίστοιχα α-κετοξέα. Δεύτερον, τα α-κετοξέα μετατρέπονται στις αντίστοιχες αλδεΐδες από μία από τις πέντε αποκαρβοξυλάσες (Pdc1p, Pdc5p, Pdc6p, Aro10p και Thi3p) που υπάρχουν στο γονιδίωμα του *S.cerevisiae*. Τέλος, οι αλκοολικές αφυδρογονάσες, Adh1p έως Adh6p και Sfa1p, καταλύουν την αναγωγή των αλδεϊδών στις αντίστοιχες ανώτερες αλκοόλες. Οι Styger et al. (2011, 2013) αξιοποίησαν τη βιβλιοθήκη διαγραφής ζύμης EUROSCARF προκειμένου να αποκτήσουν πρόσβαση στα γονίδια που έχουν τη σημαντικότερη συμβολή στην παραγωγή ανώτερων αλκοολών. Τα αποτελέσματά τους αναδεικνύουν το BAT2 ως το κυρίαρχο γονίδιο του μονοπατιού, γεγονός που υποδηλώνει ότι το αρχικό στάδιο της μεταμίνωσης είναι περιοριστικό του ρυθμού. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι των ανώτερων αλκοολών που απαντώνται στους οίνους είναι η 1-προπανόλη (αναισθητοποίηση), η 1-βουτανόλη (οσμή καυσαερίου), η ισοβουτανόλη (αλκοολούχο άρωμα), η 2-φαινυλαιθανόλη (λουλουδένιες, ροζέ νότες) και η ισοαμυλική αλκοόλη (άρωμα που παραπέμπει σε διαλυτικού). Σε περίπτωση που η συνολική τους συγκέντρωση υπερβαίνει τα 400 mg/l, συμβάλλουν αρνητικά στο μπουκέτο του οίνου, η βιομηχανία απαιτεί στελέχη με σχετικά χαμηλή παραγωγή αλκοόλης fusel. Η συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των αμινοξέων και της ποσότητας των υψηλότερων αλκοολών που παράγονται ακολουθεί ένα μοτίβο σύμφωνα με το οποίο σε επίπεδα YAN (Yeast Assimilable Nitrogen) κάτω από 200 mg/l, η παραγωγή υψηλότερων αλκοολών αυξάνεται μαζί με τις συγκεντρώσεις YAN, ενώ πάνω από 200 mg/l η σχέση αντιστρέφεται, μια τάση που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη για τη διαμόρφωση του σχηματισμού υψηλότερων αλκοολών στη βιομηχανία. Οι συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται, ωστόσο, σχετίζονται έντονα με το χρησιμοποιούμενο στέλεχος.

Οι εστέρες είναι η πιο επιθυμητή ομάδα ενώσεων που συνεισφέρουν φρουτώδη και ανθώδη αρώματα στο μπουκέτο του οίνου. Ο *S.cerevisiae* συνθέτει δύο κύριες ομάδες εστέρων κατά τη ζύμωση, δηλαδή τους οξικούς εστέρες των ανώτερων αλκοολών και τους αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας [MCFA]. Πρόσφατα, οι Ruiz et al. (2016) εξέτασαν εκτενώς τη συσχέτιση των σημαντικότερων πτητικών ενώσεων στους οίνους με την αντίστοιχη οσμή τους σε πολλές διαφορετικές ποικιλίες αμπέλου. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι ο οξικός αιθυλεστέρας είναι επιθυμητό να βρίσκεται σε συγκεντρώσεις κάτω των 150 mg/L, διαφορετικά προσδίδει χαρακτήρα αλλοίωσης στον οίνο. Επειδή η συγκέντρωση των περισσότερων εστέρων είναι χαμηλή και επομένως πολύ κοντά στο όριο ανίχνευσης της ανθρώπινης όσφρησης, καταλαβαίνουμε ότι οι ελάχιστες διακυμάνσεις στη συγκέντρωσή τους μπορεί να έχουν μεγάλη σημασία για την ποιότητα του τελικού προϊόντος της ζύμωσης (οίνος). Η βιοσύνθεση των οξικών εστέρων λαμβάνει χώρα ενδοκυτταρικά μέσω μιας ενζυμικής αντίδρασης μεταξύ του ακετυλο-συνενζύμου Α και μιας αλκοόλης που καταλύεται από μια ακετυλοτρανσφεράση της αλκοόλης (ΑΑΤάση). Στο *S.cerevisiae*, δύο τέτοια ένζυμα έχουν μελετηθεί εκτενώς: Η ΑΑΤάση Ι και η ΑΑΤάση ΙΙ που κωδικοποιούνται από τα γονίδια ATF1 και ATF2, αντίστοιχα, ενώ πρόσφατα ταυτοποιήθηκε επίσης μια ακετυλοτρανσφεράση αιθανόλης, που κωδικοποιείται από το EAT1, και αναφέρθηκε ότι έχει τη δυνατότητα να παράγει οξικούς και προπανοϊκούς εστέρες. Οι Eht1p και Eeb1p είναι τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση μεταξύ ενός λιπαρού οξέος μέσης αλυσίδας [MCFA]-CoA με αιθανόλη συνθέτοντας τους MCFA-αιθυλεστέρες, διαθέτοντας επίσης και δραστηριότητα εστεράσης. Όσον αφορά την υδρόλυση των οξικών εστέρων, το μόνο ένζυμο που εντοπίστηκε στον *S.cerevisiae* είναι η εστεράση που υδρολύει τον οξικό ισοαμύλιο [Iah1p]. Τα πειράματα των Kruijs et al. (2016), αποκάλυψαν ότι ακόμη και όταν όλες οι γνωστές συνθάσες εστέρων διαγράφηκαν στο *S.cerevisiae*, η βιοσύνθεση των εστέρων δεν καταργήθηκε πλήρως, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη άλλων συνθαζών εστέρων στον *S.cerevisiae*, οι οποίες δεν έχουν ακόμη ανακαλυφθεί. Επιπλέον, ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της εστεράσης σε μερικώς καθαρισμένα πρωτεϊνικά θραύσματα των κυττάρων *S.cerevisiae* οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στον *S.cerevisiae* υπάρχουν και άλλα άγνωστα ένζυμα με δραστηριότητα εστεράσης. Με βάση τις ανάγκες της σύγχρονης οινοποίησης, οι επιτυχείς εκκινητές θα πρέπει να διαθέτουν μέτρια δραστηριότητα εστεράσης.

Η κύρια αλδεΰδη που συντίθεται από τον *S.cerevisiae* κατά τη ζύμωση του οίνου είναι η ακεταλδεΰδη, η οποία αποτελεί πάνω από το 90% της συνολικής περιεκτικότητας του οίνου σε αλδεΰδες. Η ακεταλδεΰδη, είναι η τελευταία πρόδρομη ουσία στην αναερόβια οδό πριν από την αιθανόλη. Το πυροσταφυλικό, τελικό προϊόν της γλυκόλυσης, μετατρέπεται σε ακεταλδεΰδη από τα ένζυμα της πυρουβικής αποκαρβοξυλάσης, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια PDC1, PDC5 και PDC6, με τα δύο πρώτα ένζυμα *pdc*, να συμβάλλουν σημαντικά στη δραστηριότητα αποκαρβοξυλίωσης ελέγχοντας άμεσα τα επίπεδα της ακεταλδεΰδης. Η ακεταλδεΰδη μετατρέπεται περαιτέρω σε αιθανόλη, από την αφυδρογονάση που κωδικοποιείται από την ADH1, ενώ το ένζυμο που κωδικοποιείται από την ADH2 [*Adh2p*] καταλύει την αντίστροφη αντίδραση. Η ακεταλδεΰδη, όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις, προσδίδει ένα φρουτώδες ευχάριστο άρωμα, αλλά όταν βρίσκεται σε περίσσεια παράγει πράσινα και χορταριασμένα off-flavours. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΰδης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων οίνων με μέσες τιμές περίπου 80 mg/L για τον λευκό οίνο, 30 mg/L για τον κόκκινο οίνο και 300 mg/L για το sherry. Εκτός από την άμεση επίδραση της ακεταλδεΰδης στο αρωματικό προφίλ του οίνου, εξίσου σημαντική, αν όχι περισσότερο, είναι και η έμμεση επίδρασή της λόγω της υψηλής αντιδραστικότητάς της με άλλες ενώσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αμπελουργία παρουσιάζει η δεσμευτική δράση της ακεταλδεΰδης με το SO₂, το βασικό αντιμικροβιακό και αντιοξειδωτικό μέσο, σχηματίζοντας μια σύνθετη ένωση που προσφέρει περιορισμένη προστασία στον παραγόμενο οίνο. Η ακεταλδεΰδη μεσολαβεί επίσης στις αντιδράσεις συμπύκνωσης των ανθοκυανών που προέρχονται από τα σταφύλια με τις ταννίνες σε σταθερές χρωστικές του κόκκινου οίνου κατά την οινοποίηση. Καθώς διαφορετικά στελέχη του *S.cerevisiae* συνθέτουν σημαντικά διαφορετικές ποσότητες ακεταλδεΰδης, είναι κρίσιμο να επιλέγεται ένα στέλεχος κατάλληλο ανάλογα με τον τύπο του παραγόμενου οίνου (Olofsson, 2008).

Η διαδικασία παραγωγής του μπουκέτου ζύμωσης είναι πολύπλοκη. Περιλαμβάνει σημαντικό αριθμό βιοσυνθετικών μονοπατιών και γονιδίων και επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης του μέσου ζύμωσης, των συνθηκών ζύμωσης και του χρησιμοποιούμενου εμβολίου. Αν και η γενετική τροποποίηση των στελεχών *S.cerevisiae* έχει ήδη προταθεί από τις αρχές του αιώνα με σκοπό τη δημιουργία στελεχών με ιδανικό συνδυασμό των επιθυμητών οινολογικών χαρακτηριστικών, εντούτοις,

όπως αποδεικνύει η πράξη, δεν είναι μια εναλλακτική λύση που βρίσκει έδαφος στη βιομηχανία που προτιμά τα φυσικά στελέχη για να καλύψει τις απαιτήσεις των καταναλωτών. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης που αποτελούνται από γηγενή στο περιβάλλον της οινοποίησης στελέχη, ενισχύουν τη γεύση του οίνου και προσδίδουν στον οίνο έναν ιδιαίτερο διακριτικό χαρακτήρα που αντανακλά την περιοχή προέλευσης (terroir). Ωστόσο, στη βιομηχανία δεν πραγματοποιούνται αυθόρμητες ζυμώσεις με τη χρήση γηγενών μικροχλωρίδων λόγω των πολύ σοβαρών μειονεκτημάτων τους, όπως τα ασυνεπή αποτελέσματα από χρονιά σε χρονιά και η επικράτηση ανεπιθύμητων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την παραγωγή αλλοιωμένων αρωμάτων που αλλοιώνουν τον οίνο. Αντιθέτως, στην παγκόσμια βιομηχανία η οινοποίηση πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση περιορισμένου αριθμού (<150) εμπορικά διαθέσιμων στελεχών *S.cerevisiae*. Αν και η πρακτική αυτή εξασφαλίζει αξιοπιστία και αναπαραγωγιμότητα, εντούτοις οδηγεί στην παραγωγή "βιομηχανοποιημένων" οίνων στους οποίους έχει ελαχιστοποιηθεί η θετική επίδραση της αυτόχθονης χλωρίδας. Δεδομένου ότι η μικροχλωρίδα των αμπελώνων είναι χαρακτηριστική, αποδεικνύοντας την ύπαρξη ενός μη τυχαίου μικροβιακού terroir, που εξαρτάται από περιφερειακούς, ποικιλιακούς και κλιματικούς παράγοντες, εύκολα συμπεραίνεται ότι υπάρχει μια πλούσια πηγή αυτοφυών στελεχών *S.cerevisiae* που πρέπει να αξιοποιηθεί από την οινοβιομηχανία. Για το σκοπό αυτό, η πρακτική αυτή μπορεί να εγγυηθεί τη διατήρηση της μικροβιακής βιοποικιλότητας και τη βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων που οδηγεί σε καλύτερη αποδοχή από τους καταναλωτές και, κατά συνέπεια, σε υψηλότερο οικονομικό κέρδος των βιομηχανιών οινοποίησης.

1. Οι ζύμες και ο ρόλος τους στην παραγωγή οίνων

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί, μονοκύτταροι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Έχουν πολύ μικρές διαστάσεις, με διάμετρο που κυμαίνεται από 4 έως 40 μm. Οι ζύμες ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής τους χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες στις σπορογόνες και στις άσπορες. Οι σπορογόνες πολλαπλασιάζονται με εκβλαστήσεις (αγενώς) και με σπόρια (εγγενώς), ενώ οι άσπορες παράγονται μόνο με εκβλαστήσεις. Το κύτταρό τους αποτελείται από το κυτταρικό τοίχωμα, την κυτταρική μεμβράνη, τον πυρήνα, το κυτόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και άλλα χαρακτηριστικά. Το κυτταρικό τοίχωμα των ζυμών,

διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην οινοποίηση, καθώς δεν προστατεύει απλά το εσωτερικό του κυττάρου, αλλά συμμετέχει ενεργά στην αλκοολική ζύμωση, απελευθερώνοντας χρήσιμα συστατικά που συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα του οίνου. Τα κύρια συστατικά που συνθέτουν το κυτταρικό τοίχωμα είναι οι γλυκάνες, οι μαννοπρωτεΐνες και σε μικρή ποσότητα η χυτίνη.

Οι 1,6 γλυκάνες, αποτελούν τον συνδετικό κρίκο των συστατικών του τοιχώματος και λειτουργούν ως υποδοχείς για το φαινόμενο killer (έκκριση τοξινών που θανατώνουν τους ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς επιτρέποντας στο συγκεκριμένο στέλεχος να επικρατήσει στον μούστο). Οι μαννοπρωτεΐνες αποτελούν το 25 με 50% του τοιχώματος. Πολλές μαννοπρωτεΐνες έχουν σημαντική ενζυμική λειτουργία, απαραίτητη για την λειτουργία του κυττάρου. Μια σημαντική κατηγορία ενζύμων του τοιχώματος αποτελούν οι γλυκανάσες. Οι γλυκανάσες, παραμένουν ενεργές για αρκετούς μήνες μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, ακόμη και σε νεκρά κύτταρα και εμπλέκονται στην ауτόλυση των κυττάρων, κατά την διάρκεια της ωρίμανσης με οινολάσπες, ονομαζόμενη και μέθοδος battonage ή της δεύτερης ζύμωσης, όταν αναφερόμαστε σε ορισμένους αφρώδεις οίνους.

Έχουν αναγνωριστεί περίπου 1.500 είδη μυκήτων, περισσότεροι από τους οποίους ανήκουν στο φύλο των Ασκομυκήτων και ορισμένοι των Βασιλομυκήτων. Μπορούμε να συναντήσουμε ζύμες στη φύση, παγκοσμίως, στο έδαφος, καθώς και στην επιφάνεια φυτών. Πολλές ποικιλίες ζυμών έχουν μεγάλη οικονομική σημασία για τη βιομηχανία των τροφίμων και των ποτών, ειδικότερα κάποια επιλεγμένα στελέχη ζυμών του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Κάθε στέλεχος έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά, τα οποία προσδίδουν ειδικές ιδιότητες στα αποστάγματα που προέρχονται από την ζύμωση και μόνο ένας περιορισμένος αριθμός ζυμών χρησιμοποιούνται για την ζύμωση του οίνου.

Κατά την αλκοολική ζύμωση τα σάκχαρα που εμπεριέχονται στα σταφύλια, μετατρέπονται από τη μεταβολική διαδικασία των ζυμών, σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Για την παραγωγή του οίνου χρησιμοποιούνται στελέχη ζυμών του είδους *Saccharomyces*, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν κάποια στελέχη ζυμών non-*Saccharomyces*, όπως *Candida*, *Lachancea* (*Kluveromyces*), *Metschnikowia* και *Torulasporea*, ανάλογα με τον χαρακτήρα που θέλουμε να δοθεί στον παραγόμενο οίνο (Comitini et al., 2011).

Οι ζύμες της οινοποίησης συναντώνται στα στέμφυλα και στο γλεύκος και επιτελούν την ζύμωση του κύριου όγκου των σακχάρων. Στην κατηγορία των σακχαρομυκήτων, πέρα από τον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, υπάγονται οι σακχαρομύκητες *Ellipsoideus*, *Apiculatus*, *Pasterianus*, *Bayanus* και άλλοι.

Οι κυριότεροι σακχαρομύκητες είναι οι:

- *Saccharomyces cerevisiae*: Συμμετέχει από την αρχή της ζύμωσης, αλλά σε μικρά ποσοστά. Στην συνέχεια, η συμμετοχή του αυξάνεται σε ποσοστό μέχρι και 90% στο σύνολο των ζυμών. Δεν έχει την δυνατότητα να ζυμώσει τη γαλακτόζη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πτητικής οξύτητας σε μικρά ποσοστά, κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Επιπλέον, έχει ζυμωτική ικανότητα μέχρι 13 – 14 % vol.
- *Saccharomyces chevalieri*: Δρα με παρόμοιο τρόπο με τον *Saccharomyces cerevisiae*, με τη διαφορά ότι δεν έχει την δυνατότητα ζύμωσης της μαλτόζης.
- *Saccharomyces bayanus*: Η περιεκτικότητά του στο σταφύλι είναι περιορισμένη, διαθέτει όμως την ικανότητα αναζύμωσης περίπου το 40%. Συνεχίζει την διαδικασία της ζύμωσης ύστερα τον *Saccharomyces cerevisiae*. Επίσης, η ζυμωτική του ικανότητα ανέρχεται σε ποσοστό περίπου 16 – 18 % vol και έχει ανθεκτικότητα στο θειώδες.
- *Schizosaccharomyces pombe*: Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Βρίσκεται σπάνια στα γλεύκη και στους οίνους και έχει την ικανότητα να μετατρέπει το μηλικό οξύ σε αλκοόλη. Επιπλέον, προσβάλλει τα αζύμωτα σάκχαρα στα θειωμένα γλεύκη. Η δυνατότητα αυτή του δίνεται γιατί παρουσιάζει ανθεκτικότητα στις μεγάλες συγκεντρώσεις του θειώδους ανυδρίτη.
- *Saccharomyces bailli*: Ο ζυμομύκητας αυτός δεν συναντάται πολύ συχνά στα σταφύλια και παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στον θειώδη ανυδρίτη. Επιπλέον, είναι υπεύθυνος για τις αναζυμώσεις που συμβαίνουν στους επιδόρπιους οίνους.
- *Hanseniaspora uvarum* - *Kloeckera apiculata*: Έχουν μικρή ζυμωτική ικανότητα περίπου 3 – 4 % vol, αλλά η παρουσία τους πάνω στο σταφύλι είναι μεγάλη.
- *Saccharomycodes ludwigii*: Είναι ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη και προκαλεί αναζυμώσεις στους οίνους που εμφιαλώνονται. Επίσης, παράγει μεγάλη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και η ικανότητα ζύμωσης ανέρχεται σε ποσοστό 17% vol.

- *Torulopsis basillaris*: Ο μύκητας αυτός είναι ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη και συμμετέχει στην ζύμωση σε ποσοστό 6 – 8% vol.
- *Candida*: Βρίσκεται σε μεγάλα ποσοστά στο σταφύλι και δεν έχει ζυμωτική ικανότητα, αλλά αναπνευστική. Προκαλεί την ασθένεια της άνθησης σχηματίζοντας στην επιφάνεια του οίνου μυκήλιο λευκού ή υποκίτρινου χρώματος. Τέλος, για να μπορέσει να αναπτυχθεί καταναλώνει αιθυλική αλκοόλη.
- *Brettanomyces*: Όπως και στο γένος *Candida* έτσι και σ' αυτό σχηματίζεται μυκήλιο λευκού ή υποκίτρινου χρώματος. Η ανάπτυξή του δεν είναι πολλές φορές επιθυμητή, διότι σχηματίζεται από τον πολλαπλασιασμό του οξικός αιθυλεστέρας και ακεταμίδιο (Τσακίρης Α., 1998).

Σε δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν το Μάιο του 2014 στο Domaine Chanson στη Βουργουνδία, δεν βρέθηκαν ζύμες τύπου *S.cerevisiae* πάνω στο σταφύλι. Το ίδιο συμπέρασμα βγήκε και σε δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στην κοιλάδα του Λίγηρα, σύμφωνα με το Ινστιτούτο Οίνου και Αμπέλου της περιοχής. Στις ράγες των σταφυλιών του αμπελώνα που μελετήθηκαν, βρέθηκε να κυριαρχεί η ζύμη *Aureobasidium pullulans*, ενώ δεν εντοπίστηκε καμία παρουσία *S.cerevisiae*. Στο έδαφος του αμπελώνα βρέθηκαν σακχαρομύκητες, καθώς πληρούσε ως οικοσύστημα καλύτερες προδιαγραφές για την ανάπτυξή τους. Σε διαφορετικά πειράματα που διεξήχθησαν στην αμπελουργική περιοχή του Ροδανού, σταφύλια που προήλθαν από έναν ίδιο αμπελώνα και μεταφέρθηκαν για να οινοποιηθούν σε διαφορετικά οινοποιεία, πραγματοποίησαν όλα αυθόρμητα ζυμώσεις από άλλες ζύμες, με κανένα κοινό στέλεχος, σε όλες τις περιπτώσεις. Οι ζύμες που πραγματοποιούν άγριες ζυμώσεις στο οινοποιείο, χωρίς τη χρήση των σημερινών καλλιεργημένων στελεχών προέρχονται από τη ζυμογλωρίδα του οινοποιείου, υπολείμματα ζυμών που έχουν απομείνει στον οινολογικό εξοπλισμό και στα φορητά με τα οποία μεταφέρονται τα σταφύλια. Αμέσως μετά την απελευθέρωση του μούστου από τα σταφύλια, αρχίζουν να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται πολλά διαφορετικά είδη ζυμομυκήτων, τα οποία παράγουν ελάχιστο αλκοόλ, όπως είναι η *Kloeckera*, η *Candida*, η *Metschnikowia* κλπ. Μετά από λίγες μέρες τα είδη αυτά εξαφανίζονται, εξαιτίας της μικρής ταντοχής που διαθέτουν στην αιθανόλη. Ο *S.cerevisiae* εντοπίζεται μετά από την προζυμωτική απολάσπωση στα λευκά και ευνοείται με την προσθήκη θειώδους, στο οποίο έχει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη ζυμομυκήτων που

εμφανίζονται. Έτσι, επικρατεί στο αντίζοο περιβάλλον του εν ζυμώνεται μούστου έναντι των υπολοίπων. Το θειώδες εν ολίγοις απομακρύνει όλες τις αδύναμες ζύμες, αφήνοντας ελάχιστα έως και μόνο ένα στέλεχος να αναπτυχθεί, το ισχυρότερο. Συνήθως, έχουμε από 5 έως 20 στελέχη ενός ζαχαρομύκητα στην ίδια δεξαμενή. Από αυτά μέσα στη δεξαμενή κυριαρχούν 1 με 2. Τα στελέχη που θα εγκατασταθούν θα «εμβολιάζουν» με φυσικό τρόπο τα γλεύκη για πολλά χρόνια μέχρι ένα ισχυρότερο στέλεχος να κυριαρχήσει. Επιπλέον, φαίνεται ότι στο κάθε οινοποιείο, ανάμεσα στις δεξαμενές όπου διεξάγονται άγριες ζυμώσεις, η κάθε μία δεξαμενή εμπεριέχει διαφορετικά στελέχη ζυμών που πραγματοποιούν τις ζυμώσεις αυτές, εκτός και αν υπάρχουν επιμολύνσεις με ζύμες εμπορίου από παλιότερα ή εάν η καθαριότητα του χώρου δεν είναι επαρκής. Τότε μπορούν να βρεθούν πλήθος διαφορετικών στελεχών *S.cerevisiae*, καθώς και άλλων ειδών ζυμομυκήτων όπως ο *Brettanomyces bruxellensis*.

Όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω, η βιοποικιλότητα των διαφόρων ειδών ζυμών στην επιφάνεια των σταφυλιών έχει διερευνηθεί σε αμπελώνες παγκοσμίως. Με την χρήση αναλυτικών τεχνικών, έχει υπολογιστεί μια συγκέντρωση 3×10^5 κύτταρα ζύμης/cm² της επιφάνειας της ράγας (Rosini et al., 1982). Άλλες μελέτες προτείνουν ένα εύρος από 10^4 έως 10^6 κύτταρα/cm². Οι παράγοντες που επηρεάζουν τα γένη και τα είδη έχουν επίσης αξιολογηθεί. Σε μια μελέτη σταφυλιών από ψυχρότερα κλίματα, οι βασιδιομύκητες, *Cryptococcus* και *Rhodotorula*, κυριάρχησαν σε αριθμό έναντι των ασκομυκήτων. Σε ένα άλλο, ο διμορφικός μύκητας, ο *Aureobasidium*, βρέθηκε ως η κυρίαρχη ζύμη στις επιφάνειες των σταφυλιών, εκτός από τον *Cryptococcus*, ακολουθούμενο από τη *Rhodotorula* και το *Rhodospiridium*, ανάλογα με την ποικιλία σταφυλιού. Ένας βασικός παράγοντας που καθορίζει τα είδη που υπάρχουν στην επιφάνεια του σταφυλιού φαίνεται να είναι και το μέγεθος της ζημιάς του καρπού. Η διαρροή σακχάρων, είτε μέσω φυσικής βλάβης που προκαλείται από έντομα, πτηνά ή επιβλαβή είδη μυκήτων, είτε ως συνέπεια γήρανσης και συρρίκνωσης του αμπελιού λόγω αφυδάτωσης, εμπλουτίζει τους ασκομύκητες. Ορισμένες μελέτες έχουν συσχετίσει την ποικιλία με τη βιοποικιλότητα της επιφάνειας του καρπού. Οι πρώτοι από τους ασκομυκήτες που εμφανίζονται είναι οι *Hanseniaspora*, *Candida* και *Metschnikowia* (Holzapfel, 2014). Αυτές οι ζύμες κυριαρχούν στη χλωρίδα της επιφάνειας του σταφυλιού καθώς τα σταφύλια ωριμάζουν. Όπως ειπώθηκε και παραπάνω, ο *Saccharomyces* μπορεί να ανιχνευθεί στις επιφάνειες των σταφυλιών, αλλά υπάρχει σε πολύ

χαμηλά επίπεδα (Prakitchaiwattana, 2004 ; Martini et al., 1996), ενώ σε ορισμένες μελέτες ήταν μη ανιχνεύσιμος (Combina et al., 2005 ; Peter et al., 2006). Σε μια ολοκληρωμένη μελέτη, εντοπίστηκαν 52 είδη ζύμης από τα ακόλουθα 22 γένη: *Auerobasidium*, *Auriculibuller*, *Brettanomyces*, *Bulleromyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Issatchenka*, *Kluyveromyasch*, *Pichia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Torulaspora*, *Yarrowia*, *Zygoascus* και *Zygosaccharomyces* (Renouf et al., 2007). Άλλοι ερευνητές βρήκαν επίσης τον *Hansenula* (Heard & Fleet, 1985 ; Longo et al., 1991 ; Mora & Mulet , 1991) και ο *Saccharomycodes* (Combina et al., 2005). Ο *Saccharomyces* συναντάται συχνότερα σε σταφύλια που έχουν υποστεί μεγάλη ζημιά ή σε περιπτώσεις που έχουν υποστεί σήψη (Mortimer et al., 1994). Έχει παρατηρηθεί ένα μοτίβο αλλαγής των ειδών στην επιφάνεια των σταφυλιών κατά τη διαδικασία ωρίμανση των σταφυλιών. Σύμφωνα με το μοτίβο αυτό, πρώιμη κυριαρχία στην επιφάνεια των σταφυλιών παρουσιάζουν οι βασιδιομύκητες *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Rhodosporidium* και *Rhodotorula*, κατά την πρώιμη ωρίμανση. Στη συνέχεια, την κυριαρχία διαδέχονται οι ασκομύκητες, ιδιαίτερα οι *Hanseniaspora* , *Metschnikowia* και *Candida*, καθώς ο καρπός ωριμάζει. Αργότερα κατά την ωρίμανση, οι βλάβες που εμφανίζονται στις ράγες, λόγω φυσικών ή βιολογικών παραγόντων, εμπλουτίζουν τις ζύμες αυτές, καθώς και τον *Saccharomyces*. Η παρουσία άλλων γενών ζυμομυκήτων εξαρτάται από τις τοπικές και κλιματικές επιρροές, την ποικιλία σταφυλιών, τις ασθένειες και το επίπεδο βλάβης των σταφυλιών, καθώς και τις πρακτικές που εφαρμόζονται στον αμπελώνα (Davenport, 1974).

Η αλκοολική ζύμωση στους οίνους μπορεί να ξεκινήσει και αυθόρμητα, λόγω των ενδογενών ζυμών που προέρχονται από τα σταφύλια και τον εξοπλισμό του οινοποιείου. Η συνήθης πρακτική, ωστόσο, είναι ο εμβολιασμός του χυμού ή του μούστου με ένα ή περισσότερα στελέχη ζύμης γνωστών χαρακτηριστικών. Οι ζύμες δεν παράγουν μόνο το αλκοόλ, αλλά παρέχουν επίσης τα δευτερογενή αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά ή αλλιώς μπουκέτο, που χαρακτηρίζουν τους οίνους.

2. Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*

Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) είναι μονοκύτταρος μύκητας, που διαθέτει πυρηνικό γονιδιωματικό DNA 12068 kb (kilobase) οργανωμένο σε 16 χρωμοσώματα. Το γονιδιώμα του έχει αλληλουχηθεί πλήρως από τους Goffeau et al. (1996) και βρέθηκε ότι περιέχει περίπου 6000 γονίδια, εκ των οποίων τα 5570 (Wood et al., 2001). προβλέπεται να είναι γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Οι βιοπληροφορικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι ένας αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι ξένης προέλευσης, δηλαδή αποτέλεσμα πλευρικής γονιδιακής μεταφοράς, όπως ο όρος ορίστηκε από τον Doolittle (1999). Τα γονίδια αυτά, τα οποία εισήλθαν οριζόντια στο γονιδίωμα του *S.cerevisiae*, είναι είτε προκαρυωτικής είτε ευκαρυωτικής προέλευσης. Αυτό αποτέλεσε αρχικά έκπληξη, λόγω της παρουσίας ισχυρού κυτταρικού τοιχώματος, κυτταρικών και ενδοκυτταρικών μεμβρανών. Οι Hall et al. (2005) εντόπισαν 10 γονίδια υποθετικής προκαρυωτικής προέλευσης που υπάρχουν στο γονιδίωμα του *S.cerevisiae*. Ένα παράδειγμα απόκτησης ενός γονιδίου από άλλο ευκαρυώτη είναι το γονίδιο FSY1. Το FSY1 κωδικοποιεί έναν μεταφορέα φρουκτόζης (Galeote et al., 2010) και έχει πιθανώς προέλθει από κάποιον στενό συγγενή του *S.cerevisiae*. Το γονίδιο αυτό θεωρείται σημαντικό επειδή το προϊόν του προσδίδει πιθανώς στο στέλεχος ξενιστή του (EC 1118) αυξημένη ικανότητα αξιοποίησης της φρουκτόζης σε συνθήκες χαμηλών συγκεντρώσεων εξόζης που υπάρχουν στο γλεύκος, δηλαδή προς την τελική φάση της ζύμωσης.

Όσον αφορά τη γονιδιωματική των επιπλέον χρωμοσωμικών στοιχείων του *S.cerevisiae*, όλα τα στελέχη περιέχουν φυσικά μόρια μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), αλλά συχνά με διαφορετικά μεγέθη (de Zamaroczy & Bernardi, 1985). Η μεγαλύτερη έκδοση του mtDNA έχει μήκος περίπου 85780 bps (Foury et al., 1998). Επιπλέον, τα περισσότερα στελέχη *S.cerevisiae* φιλοξενούν στον πυρήνα τους ένα ξεχωριστό εξωχρωμοσωμικό γενετικό στοιχείο DNA που ονομάζεται κύκλος 2μm (Futcher, 1988). Αυτό το δίκλωνο στοιχείο DNA έχει τυπικό μήκος 6318 bps και αριθμό αντιγράφων περίπου 60 αντίγραφα ανά κύτταρο. Θεωρείται ως "εγωιστικό DNA" και δεν έχει σχεδόν καμία φαινοτυπική συνέπεια για τον ξενιστή του, εκτός από μια μικρή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του ξενιστή. Δεν έχει καμία χρησιμότητα για βιομηχανικές εφαρμογές, αλλά από την άλλη πλευρά ήταν εξαιρετικά χρήσιμο για διάφορες εφαρμογές που αφορούν τη γενετική χειραγώγηση του ξενιστή του. Άλλα εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία που φιλοξενούνται από διάφορα στελέχη του

S.cerevisiae περιλαμβάνουν μόρια μονόκλωνου και δίκλωνου RNA και ρετροϊούς (Wickner, 1996). Ορισμένα από αυτά τα στοιχεία έχουν σημαντική συμβολή στον φονικό φαινότυπο του *S.cerevisiae*.

Ο *S.cerevisiae* είναι ένας οργανισμός-μοντέλο, ένα πολύτιμο εργαλείο για όλες τις πτυχές της βασικής έρευνας. Σε αντίθεση όμως με άλλους οργανισμούς-μοντέλα, όπως η *Escherichia coli* ή ο *Caenorhabditis elegans*, ο *S.cerevisiae* είναι ταυτόχρονα και ένα πολύ πολύτιμο είδος για ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές. Ένας σημαντικός λόγος για αυτό το χαρακτηριστικό είναι ένα μέρος του τρόπου ζωής του, που ονομάζεται "κάνω-συσσωρεύω-καταναλώνω" (Thomson et al., 2005). Το χαρακτηριστικό αυτό βασίζεται στο φαινόμενο Crabtree, το οποίο συνίσταται στο γεγονός ότι ο *S.cerevisiae*, ακόμη και υπό αερόβιες συνθήκες, δεν χρησιμοποιεί τον αναπνευστικό μηχανισμό για να μεταβολίσει τους σακχαρίτες και να προωθήσει την ανάπτυξη της βιομάζας, αλλά, αντίθετα, παράγει αιθανόλη και άλλες ενώσεις δύο ανθράκων, μέσω του πυροσταφυλικού (Pronk et al., 1996). Συνέπεια αυτού του γεγονότος είναι ότι η *S.cerevisiae* παράγει και συσσωρεύει αιθανόλη, η οποία είναι τοξική ή στατική για τα περισσότερα άλλα μικροβιακά είδη που είναι σε θέση να ανταγωνιστούν μαζί της για τις ενώσεις σακχάρων και έτσι εξαλείφεται ο ανταγωνισμός. Αφού το *S.cerevisiae* έχει καθαρίσει τη συγκεκριμένη οινολογική θέση από τους περισσότερους ανταγωνιστές του, στη συνέχεια προχωρά στην κατανάλωση της παραγόμενης αιθανόλης, προωθώντας έτσι τη δική του ανάπτυξη. Σύμφωνα με τους Hagman et al. (2013), η στρατηγική αυτή εξελίχθηκε σταδιακά πριν από τον πλήρη διπλασιασμό του γονιδιώματος του *S.cerevisiae* και άλλων ειδών ζύμης, ο οποίος έλαβε χώρα πριν από περίπου 100 εκατομμύρια χρόνια (Wolfe & Shields, 1997). Συνίστατο στην απώλεια μιας συγκεκριμένης ρυθμιστικής αλληλουχίας cis-δράσης (AATTTT) πολλών υποκινητών, γονιδίων που εμπλέκονται στην αναπνοή. Η αλληλουχία αυτή υπάρχει και διατηρείται σε πολλά άλλα γένη ζυμομυκήτων, όπως τα *Kluyveromyces*, *Candida* και άλλα, ενώ απουσιάζει από το ζυμομύκητα *Dekkera*, ένα γένος που περιλαμβάνει είδη που είναι γνωστό ότι είναι αποτελεσματικοί παραγωγοί αιθανόλης (Rozpedowska et al., 2011). Βέβαια, υπάρχουν δύο ακόμη χαρακτηριστικά, τα οποία είναι πολύ σημαντικά για ορισμένες βιομηχανικές εφαρμογές του *S.cerevisiae*: η αξιοσημείωτη αντοχή/ανεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και η παραγωγή ορισμένων αρωματικών, πτητικών ενώσεων. Στο τελευταίο

χαρακτηριστικό θα δοθεί ιδιαίτερη προσοχή κατά τη διάρκεια της συζήτησης για την οينوποίηση (Pararouli et al., 2020).

3. Ζύμες και χαρακτηριστικά παραγόμενου οίνου

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, ιδιαίτερα, το φάσμα που ορίζεται ως γεύση και άρωμα, είναι οι πιο σημαντικές παράμετροι για την αξιολόγηση της ποιότητας των οίνων. Η προέλευση αυτών των χαρακτηριστικών προέρχεται από τέσσερις κύριες πηγές που είναι τα σταφύλια, η οينوποίηση, η ωρίμανση και η παλαίωση. Οι τελικές συγκεντρώσεις διαφόρων συστατικών που επηρεάζουν την οσμή εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Κατά την αλκοολική ζύμωση, τα ένζυμα του χυμού των σταφυλιών λειτουργούν ως καταλύτες μετατρέποντας τα σάκχαρα σε διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη. Κάποια από αυτά τα ένζυμα διασπούν τα σάκχαρα, ενώ άλλα απελευθερώνουν αρωματικές ενώσεις. Η ισορροπία μεταξύ των ενζύμων καθορίζει τη σακχαροπεριεκτικότητα των οίνων.

Συνολικά, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων μπορούν να διαχωριστούν στα πρωτογενή, τα οποία προέρχονται από την ποικιλία και τους φυσικούς παράγοντες στον αμπελώνα, τα δευτερογενή, τα οποία σχηματίζονται κατά τη διαδικασία της οينوποίησης και τα τριτογενή που δημιουργούνται κατά την ωρίμανση και την παλαίωση ενός οίνου. Υπάρχουν συγκεκριμένες κατηγοριοποιήσεις των αρωματικών προφίλ για έναν οίνο, όταν αναφερόμαστε στα αρώματα που δημιουργούνται από τις ζύμες. Η πρώτη μπορεί να περιγραφεί ως «κρεμώδης» γεύση. Αυτά μπορεί να ποικίλουν, από νότες τυριού κρέμας ή κρεμώδους ξινής κρέμας έως πιο ώριμο βούτυρο ή βουτυρόγαλα ή γιαούρτι. Στη συνέχεια, υπάρχει το προφίλ γεύσης του "ψωμιού, με αρώματα ψωμιού και μύρας. Αυτές οι γεύσεις υπάρχουν ιδιαίτερα σε αφρώδεις οίνους όπως η σαμπάνια, λόγω της αυτόλυσης των ζυμών, δηλαδή της διάσπασης των νεκρών κυττάρων των ζυμομυκήτων, αν και μπορούν να βρεθούν ακόμη και σε ορισμένους ερυθρούς οίνους. Οι ζύμες μπορούν επίσης να δημιουργήσουν όξινες γεύσεις στον οίνο, οι οποίες απαντώνται συχνά σε βιολογικούς οίνους, όπως για παράδειγμα τουρσί. Οι κύριες ενώσεις που σχηματίζονται κατά τη ζύμωση είναι πτητικές ενώσεις, όπως εστέρες, υψηλότερες αλκοόλες και καρβονυλ ενώσεις. Αποκωδικοποιώντας την προέλευση και τη συμβολή αυτών των συστατικών, οι σύγχρονοι οινοποιοί μπορούν να

κατευθύνουν και να χειριστούν τις ζύμες κατά τη ζύμωση προς όφελός τους (Mina & Tsaltas, 2017).

Ακόμη, λοιπόν, και πριν τη σύνθλιψη των σταφυλιών μετά τη συγκομιδή τους, υπάρχουν αρώματα που ζουν στα σάκχαρα των σταφυλιών. Αυτά τα αρώματα είναι γνωστά και ως κύρια αρώματα των οίνων και είναι συνήθως ανθικά, φρουτώδη, βοτανικά κ.α. Στη συνέχεια, κατά την ζύμωση απελευθερώνονται τα δευτερεύοντα αρώματα, τα οποία αποτελούν την πλειοψηφία των αρωμάτων που συναντούνται σε έναν οίνο. Τα χαρακτηριστικά δευτερογενή αρώματα είναι φρούτων, κυρίως αχλαδιού και μπανάνας, αλλά και βουτυρένια αρώματα που προκύπτουν από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Αφού και εφόσον ο οίνος μεταφερθεί σε βαρέλια, οι φυσικές ενώσεις που υπάρχουν σε αυτά θα αλληλεπιδράσουν με τον χυμό, προσθέτοντας έτσι στο αρωματικό του προφίλ. Παρόλα αυτά, ο οίνος αφού εμφιαλωθεί, συνεχίζει να εξελίσσεται με τη διαδικασία της παλαίωσης. Κατά τις διαδικασίες της ωρίμασης και της παλαίωσης δημιουργούνται τα τριτογενή αρώματα, συνήθως μπαχαρικών, καπνού, καβουρντισμένων καρπών, ξύλου.

Τα διαφορετικά είδη ζυμών επηρεάζουν την χημική υπόσταση των αρωμάτων στους οίνους. Σημαντικοί μεταβολίτες που παράγονται κατά την ζύμωση περιλαμβάνουν τους εστέρες, τις ανώτερες αλκοόλες, τα οξέα, τις αλδεΐδες, τις κετόνες και τις πτητικές ενώσεις θείου (Jeromel et al., 2019).

- Οι εστέρες είναι ενώσεις που ευθύνονται για τα πολλά αρώματα που βρίσκονται στα φρούτα και τα λουλούδια. Μπορεί να υπάρχουν αρκετές εκατοντάδες αιθυλεστέρες και οξικοί εστέρες στον οίνο. Οι εστέρες έχουν σχετικά υψηλή πτητικότητα και διαλυτότητα στο νερό και την αλκοόλη. Υπάρχουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, μερικές πολύ κάτω από 1 mg/L (ppm), αλλά έχουν πολύ χαμηλό αρωματικό προφίλ, συχνά στην περιοχή μg/L (ppb). Παραδείγματα εστέρων περιλαμβάνουν το οξικό ισοαμύλιο, το οποίο προσδίδει αρώματα της μπανάνας και την οξική φαινυλαιθανόλη, που είναι υπεύθυνη για το άρωμα τριαντάφυλλου.
- Οι λακτόνες είναι επίσης εστέρες, που οι ενώσεις έχουν μετατραπεί σε κυκλικές δομές, γεγονός που τους προσδίδει διαφορετικές χημικές ιδιότητες. Δεν υπάρχουν σημαντικές λακτόνες στον οίνο, τουλάχιστον όχι σε ποσότητες που να έχουν οργανοληπτικές επιπτώσεις. Οι λακτόνες είναι εξέχουσες στους οίνους που ωριμάζουν σε βαρέλια βελανιδιάς. Η λακτόνη sotolon, μια εξαιρετικά ισχυρή

αρωματική ένωση, προσδίδει άρωμα καρυδιού και πικάντικα αρώματα, άρωμα αμυγδάλου, κάρυ και ξηρών καρπών. Συναντάται σε σημαντικές ποσότητες στα Sherry.

- Οι επιπτώσεις της ζύμωση στα οξέα είναι πολύ περίπλοκη. Το τρυγικό οξύ δεν επηρεάζεται, αλλά ορισμένα στελέχη *S.cerevisiae* μπορούν να μεταβολίσουν το μηλικό οξύ σε άλλους μεταβολίτες. Το ηλεκτρικό οξύ είναι ένα οξύ ζύμωσης που παράγεται αναλογικά με την ποσότητα της παραγόμενης αιθανόλης και συνήθως βρίσκεται στους οίνους σε επίπεδα γύρω στο 1 g/L ή έως και 2 g/. Το πυροσταφυλικό και το οξικό οξύ είναι δύο άλλα σημαντικά οξέα. Το πυροσταφυλικό οξύ είναι ένας ενδιάμεσος μεταβολίτης, αλλά έχει σημασία μόνο για τους οίνους που παράγονται από σταφύλια που έχουν προσβληθεί από σήψη. Η ζύμη παράγει πάντα κάποιες μικρές ποσότητες οξικού οξέος, το οποίο γίνεται ανιχνεύσιμο μόνο υπό συνθήκες αλλοίωσης από βακτήρια οξικού ή γαλακτικού οξέος ή από οξειδωση με αιθανόλη.
- Η ακεταλδεϋδη είναι ο πρόδρομος της αιθανόλης στο μεταβολισμό της ζύμης και είναι η πιο σημαντική αλδεϋδη στους οίνους. Είναι περισσότερο γνωστή για τη μυρωδιά που θυμίζει ξηρούς καρπούς στους οίνους τύπου Sherry. Η ζύμη παράγει πάντα κάποιες μικρές ποσότητες ανάλογα με το στέλεχος, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση διοξειδίου του θείου (SO₂) — το SO₂ δεσμεύεται μη αναστρέψιμα με την ακεταλδεϋδη, γεγονός που αυξάνει περαιτέρω την παραγωγή της τελευταίας. Τα στελέχη ζύμης *S.cerevisiae* τείνουν να παράγουν περισσότερη ακεταλδεϋδη από τα μη *S.cerevisiae*.
- Οι κετόνες είναι αρωματικές ενώσεις που παράγονται σε μικρές ποσότητες. Οι γνωστές κετόνες περιλαμβάνουν το διακετύλιο και την ακετοΐνη, που προσδίδουν ένα ευχάριστο βουτυρένιο άρωμα, και είναι κυρίως το αποτέλεσμα βακτηρίων γαλακτικού οξέος από μηλογαλακτική ζύμωση (MLF).
- Οι πτητικές ενώσεις θείου, ή VSC, έχουν πολύ αρνητική χροιά, καθώς προσδίδουν δυσάρεστες οσμές, καλύπτουν ή ενισχύουν άλλες ενώσεις και βρίσκονται συνήθως σε οίνους που παράγονται σε συνθήκες υψηλής αναγωγής (απουσία αέρα). Από τα VSC, το υδρόθειο (H₂S), είναι γνωστό για τη δυσάρεστη μυρωδιά του σάπιου αυγού.
- Οι υψηλές αλκοόλες παράγονται σε μικρές συγκεντρώσεις από αμινοξέα και μπορούν να συνεισφέρουν στα αρωματικά χαρακτηριστικά του οίνου. Ωστόσο, μπορούν να

καλύψουν άλλα αρώματα σε υψηλά επίπεδα, και έτσι, η μετατροπή των προδρόμων αμινοξέων πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά.

Το χρώμα, είναι η πρώτη εικόνα που λαμβάνει ένας καταναλωτής από έναν οίνο και επηρεάζει τη γεύση. Το χρώμα δίνει μία πρώτη εντύπωση και προϊδεάζει για την ποιότητα του οίνου, την ηλικία, την οξείδωση και τη δομή του, οπότε έχει σημαντική επίδραση στην αντίληψη των καταναλωτών για τον οίνο. Οι ζύμες προσδίδουν σταθερότητα στο χρώμα του οίνου, αλλά επίσης επηρεάζουν τους οίνους προσροφώντας χρωστικές μέσω των κυτταρικών τοιχωμάτων τους, μία ιδιότητα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή λευκών οίνων από κόκκινες ποικιλίες σταφυλιών, γνωστό παγκοσμίως στον κόσμο των οίνων και ως blanc de noirs.

Σε μια εργαστηριακή έρευνα που πραγματοποιήθηκε, εννέα στελέχη *Saccharomyces*, που είχαν απομονωθεί στο παρελθόν από αμπελώνες στη Νότια Βραζιλία, χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης σε ζυμώσεις Sauvignon Blanc. Από τα στελέχη που μελετήθηκαν, τα στελέχη 01PP, 06CE, 12M, 41PP και 26PP έδειξαν πολλά υποσχόμενα χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν εμβόλια (όπως οι εμπορικές ζύμες). Αυτά τα επιλεγμένα στελέχη που ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*, τροποποίησαν το αρωματικό προφίλ του μούστου του Sauvignon Blanc που έχει υποστεί ζύμωση και χαρακτηρίζεται από φρουτώδεις και ανθικές νότες. Συγκεκριμένα στελέχη ζύμης παρήγαγαν τονισμένους αιθυλεστέρες, όπως ισοβαλερικό αιθυλεστέρα (13PP), οξικό αιθυλεστέρα (06CE), εξανοϊκό αιθυλεστέρα (26PP), επτανοϊκό αιθυλεστέρα (12M) και αιθύλ οκτανοϊκό (41PP). Επιπλέον, υπήρξαν έντονες διαφορές μεταξύ των στελεχών, σχετικά με αρώματά τους, όπως υποδεικνύεται από τα OAV (olfactory activity values/ τιμές οσφρητικής δραστηριότητας) τους (Mendes et al., 2022).

Οι ζύμες έχουν σημαντικό ρόλο στην τελική μορφή και το μπουκέτο ενός οίνου, καθώς έχουν την δυνατότητα να προάγουν ή να υποβαθμίσουν την όψη, τη γεύση και τα αρώματα των οίνων. Η συντριπτική πλειοψηφία των γεύσεων και των αρωμάτων που δίνονται σε έναν οίνο από μια ζύμη, σχηματίζονται κατά τη διαδικασία ζύμωσης.

4. Επιβλαβείς επιπτώσεις ζυμών σε οίνους

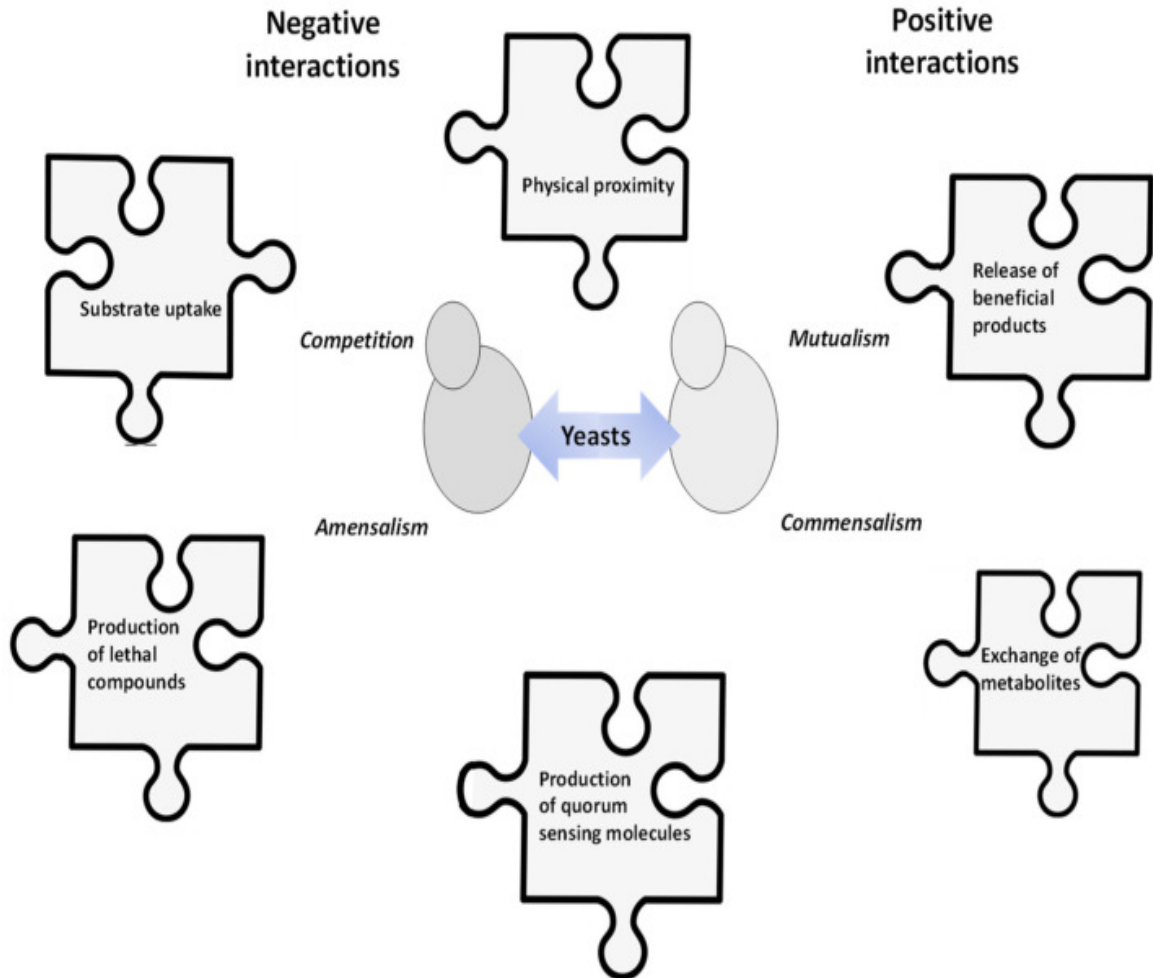
Στην οινοποίηση οι ζυμομόκητες συμμετέχουν ευεργετικά στη διαδικασία της ζύμωσης, για την παραγωγή αλκοόλης και τη δημιουργία οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Κατά την

παραγωγική διαδικασία ενός οίνου, μπορεί να υπάρξει προσβολή και από άλλα είδη ζυμών, που ενδέχεται να προκαλέσουν αλλοιώσεις στον προς παραγωγή οίνο. Οι ζυμομύκητες που είναι υπεύθυνοι για τις αλλοιώσεις στους οίνους, στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι ανθεκτικοί σε ακραίες συνθήκες, όπως υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, σχετικά χαμηλό pH και θανατηφόρα συγκέντρωσηθειωδών (S02) ή διττανθρακικού διμεθυλίου (DMDC), που χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακοί παράγοντες. Ορισμένα γένη ζυμών προκαλούν αλλοιώσεις, λόγω της ανεπιθύμητης ανάπτυξής τους σε τρόφιμα και ποτά, στα οποία μπορούν να προκαλέσουν ποιοτική υποβάθμιση και κατά συνέπεια να οδηγήσουν σε υγειονομικό κίνδυνο, που μπορεί να οδηγήσει σε απόσυρση των προϊόντων και οικονομικές απώλειες.

Μία από τις «ασθένειες» του οίνου, που προκαλείται από ζύμες είναι η άνθηση, η οποία οφείλεται στις ζύμες *Candida*, *Pichia*, *Brettanomyces*. Με την επίδραση του αέρα(αερόβιοι μικροοργανισμοί) σχηματίζεται από τους μύκητες στην επιφάνεια του οίνου ένα λευκό ή υποκίτρινο στρώμα. Από την προσβολή αυτή κινδυνεύουν οίνοι με χαμηλή αλκοολοπεριεκτικότητα. Όσο πιο πλούσιοι είναι οι οίνοι σε αζωτούχες ουσίες, τόσο ευκολότερα αναπτύσσεται η άνθηση, γιατί οι μύκητες βρίσκουν θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη τους. Έτσι, πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα στους φρέσκους οίνους, διότι περιέχουν μικρές ποσότητες αζωτούχων υλών. Στην αρχή, προσβάλλεται η αλκοόλη, η οποία οξειδώνεται και μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Παράλληλα, όμως, προσβάλλονται και τα οξέα και οι εκχυλισματικές ύλες του οίνου. Έτσι, ο οίνος χάνει τη γευστική του ισορροπία λόγω της απώλειας αλκοόλης, οξέων και εκχυλίσματος. Εάν προχωρήσει η προσβολή της άνθησης, εμφανίζεται γρήγορα η ασθένεια του ξινίσματος. Όταν το pH είναι 3–3,2 αναπτύσσεται πολύ δύσκολα η ασθένεια. Προλαμβάνεται με απογέμισμα των οινοδοχείων και με 30 mg/lit σε ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη. Θεραπεύεται με παστερίωση στους 65°C, όταν η ασθένεια δεν έχει προχωρήσει αρκετά και δεν έχουν αλλοιωθεί τα ουσιώδη συστατικά του οίνου.

Η αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση καθοδηγείται από μια ποικιλία αυτοφυών ειδών ζύμης NS, τα οποία ανταγωνίζονται ή συνεργάζονται μεταξύ τους έως ότου αντικατασταθούν σταδιακά από τον *S.cerevisiae*, το είδος με την ισχυρότερη ζυμωτική ικανότητα. Η παρουσία και η διαδοχή αυτών των ειδών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης συνδέεται με το αναλυτικό προφίλ του οίνου. Παρά το γεγονός ότι για μεγάλο χρονικό διάστημα οι ζύμες NS που

υπάρχουν στο φρεσκοθρυμματισμένο σταφύλι πρέπει να θεωρούνταν ως παράγοντες αλλοίωσης, ο ρόλος τους έχει επανεκτιμηθεί και γίνονται συνεχείς προσπάθειες για την αξιοποίησή τους στην οινοποίηση (Borren & Tian, 2021 ; Padilla et al., 2016).



ΕΙΚΟΝΑ 1: Το puzzle των αλληλεπιδράσεων των ζυμομυκήτων του οίνου (Zilelidou & Nisiotou, 2021).

Η συμβολή κάθε NS πληθυσμού στο συνολικό μεταβολικό προφίλ δεν είναι προκαθορισμένη με βάση τις ιδιαίτερες φυσιολογικές του ιδιότητες, αλλά είναι αποτέλεσμα των ενώσεων των ζυμών κατά την οινοποίηση. Ως εκ τούτου, ο τρόπος με τον οποίο οι ζύμες αυτές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθορίζει τη σύνθεση της κοινοπραξίας των ειδών στα διάφορα στάδια της οινοποίησης και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Παρ' όλα αυτά, οι αλληλεπιδράσεις NS έχουν αγνοηθεί, κλιμακώνοντας τις δυσκολίες στην κατανόηση και την πρόβλεψη της επίδρασης του μικροβιώματος του οίνου στη διαδικασία της ζύμωσης (Bagheri et al., 1988).

Οι Pena κ.ά. διαπίστωσαν ότι τα πεπτίδια χαμηλής μάζας που παράγονται από την *Candida intermedia* LAMAP1790 μπορεί να έχουν επιλεκτική αντιμικροβιακή δράση κατά των ζυμομυκήτων αλλοίωσης, όπως οι *Dekkera bruxellensis* και *Pichia guilliermondii*. Η επίδραση της *Metschnikowia pulcherrima* στο μεταβολισμό άλλων ζυμών NS έχει επισημάνει τη δυνατότητά της να ασκεί ανταγωνιστική δράση έναντι σημαντικών γενών ζυμών στην οينوποίηση, όπως η *Hanseniaspora* και η *Pichia*. Το σκεπτικό και οι υποθέσεις πίσω από την αντιμικροβιακή δράση του *M.pulcherrima* (δηλαδή παραγωγή του pulcherrimin, ενός παράγοντα που δεσμεύει τον σίδηρο) έχουν πρόσφατα επανεξεταστεί. Οι Johnson et al. διερεύνησαν την επίδραση επιλεγμένων εμπορικών στελεχών *Metschnikowia spp.*, *Lachancea thermotolerans* και *Torulaspora delbrueckii* κατά του *H.uvarum* κατά τη διάρκεια ψυχρής διαβροχής πριν από τη ζύμωση, μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των κόκκινων σταφυλιών πριν από την αλκοολική ζύμωση. Τα αποτελέσματά τους αποκαλύπτουν μια σημαντική μείωση της παραγωγής οξικού οξέος από το *H.uvarum* σε μικτές καλλιέργειες σε σύγκριση με το μοντέλο μονοκαλλιέργειας, που πιθανώς σχετίζεται με την αναστολή της ανάπτυξης του *H.uvarum* παρουσία ανταγωνιστικών ειδών. Οι Bagheri et al. κατασκεύασαν μια κοινοπραξία ζυμομυκήτων επτά ειδών που προσεγγίζει ένα οικοσύστημα γλεύκους σταφυλιών για να αξιολογήσουν την επίδραση κάθε μεμονωμένης ζύμης NS στην πορεία της ζύμωσης, τη δυναμική του πληθυσμού των ζυμομυκήτων και το προφίλ των πτητικών ουσιών σε συνθετικό χυμό σταφυλιών. Τα αποτελέσματά τους υποδηλώνουν ότι το χημικό προφίλ των οίνων μπορεί πράγματι να επηρεάζεται από πολύπλοκες έμμεσες ή άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων ειδών ζύμης NS. Υπογράμμισαν τον ρόλο της κυτταρικής πυκνότητας στη διαμόρφωση της δομής της κοινότητας των ζυμομυκήτων και, ως εκ τούτου, στον σχηματισμό διαφορετικών αρωματικών υπογραφών στον οίνο. Αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση άνθρακα, αζώτου ή αρωματικών αμινοξέων στο συνθετικό γλεύκος σχετίζεται με την παραγωγή υψηλότερων αλκοολών από είδη NS αμπελομυκήτων όπως οι *T.delbrueckii*, *M.pulcherrima* και *Starmellera bacillaris*. Προηγούμενες έρευνες αποκάλυψαν ότι οι εν λόγω αλκοόλες μπορεί να δρουν ως μόρια σηματοδότησης που ανιχνεύουν το quorum και παράγοντες ρύθμισης της ανάπτυξης, καθιστώντας σημαντική τη μελέτη τους σε σχέση με τις αλληλεπιδράσεις των ζυμών NS (Zilelidou & Nisiotou, 2021).

Στον παρακάτω Πίνακα 1 συνοψίζονται, ορισμένα γένη ζυμών που είναι υπεύθυνα για αλλοιώσεις στους οίνους και πού συναντώνται, οι ενώσεις που μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα και το αποτέλεσμα του παραγόμενου προϊόντος, μαζί με τους πιθανούς κινδύνους που μπορούν να επιφέρουν στην υγεία.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Μερικές από τις πιο κοινές ζύμες που απαντώνται συχνά στα σταφύλια, τα γλεύκη και τους οίνους και μπορούν να θεωρηθούν είδη ζυμών που προκαλούν αλλοίωση.

Είδη ζύμης	Παράγωγα	Ενώσεις αλλοίωσης	Παρατηρούμενη επίδραση
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Επιδόρπιοι οίνοι		Επαναζύμωση και παραγωγή CO ₂
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Σταφύλια ωριμασμένα σε βαρέλια και εμφιαλωμένοι οίνοι	αιθυλοφαινόλη, 4-αιθυλγουαιακόλη, οξικό οξύ, τετραϋδροπυριδίνες	Αρώματα αλλοίωσης, θολερότητα σε αφρώδεις οίνους, δυσάρεστοι τόνοι ιατρικών αρωμάτων
<i>Pichia anomala</i>	Μπύρα, ενσίρωση		
	Οίνος, οινοποίηση	Οξικός αιθυλεστέρας, ακεταλδεϋδη, εστέρες, οξικό οξύ	Οξειδωση αιθανόλης
<i>Pichia guilliermondii</i>	Χυμός σταφυλιού	4-αιθυλοφαινόλη	Άρωμα αλλοίωσης ή κοπριά
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Εμφιαλωμένοι οίνοι		Καταστροφή από σχηματισμό ιζημάτων ή θολερότητας
	Οίνος	Υψηλό επίπεδο	Κροκίδες

		ακετοΐνης	
<i>Hanseniaspora/ Kloeckera</i>	Νωπός μούστος		
	Μούστος σε ζύμωση	Παραγωγή οξικού άλατος	Τροποποίηση αρώματος στο αρχικό στάδιο ζύμωσης στην οινοποίηση

Αρκετές αντιμικροβιακές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, για τον έλεγχο της παρουσίας επιβλαβών ζυμομυκήτων σε προϊόντα διατροφής. Οι τεχνικές αυτές αποσκοπούν στη μείωση των οικονομικών επιπτώσεων και των πιθανών απειλών για την υγεία των καταναλωτών. Ορισμένες από αυτές τις τεχνικές χρησιμοποιούνται ήδη από τη βιομηχανία οινοποίησης. Η τάση που έχει παρατηρηθεί είναι, ότι η βιομηχανία οινοποίησης στοχεύει στη χρήση αβλαβών τεχνικών ελέγχου για την αποφυγή αλλοιώσεων από ζύμες, καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας, προκειμένου να διατηρηθούν τα αρώματα που προέρχονται από την ποικιλία των σταφυλιών, να προστατευθεί και να ενισχυθεί η απόδοση εκχύλισης των ανθοκυανινών και να παρατηρηθεί βελτίωση της ποιότητας των οίνων (Carlos et al. 2017).

5. Εμπορικές ζύμες

Πιστεύεται ότι υπάρχουν εκατοντάδες στελέχη *Saccharomyces* και μη *Saccharomyces* ζύμες που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση. Μερικά είδη που είναι κοινώς γνωστά είναι *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae beticus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Brettanomyces*.

Υπάρχουν αρκετές εταιρείες που ειδικεύονται στη δημιουργία μιγμάτων ζυμομυκήτων, που έχουν επιλεγεί προσεκτικά για να είναι ιδανικοί για συγκεκριμένους τύπους οίνων ή για να διαχειρίζονται ειδικές συνθήκες οινοποίησης. Όταν οι εμπορικές εταιρείες άρχισαν να παράγουν ζυμομύκητες, ο σκοπός ήταν η επιτυχημένη ζύμωση του οίνου. Σήμερα, καθώς συνεχίζεται η βελτίωση και ο εκσυγχρονισμός της οινοποίησης, η εμπορική παραγωγή ζυμομυκήτων έχει γίνει πιο εξειδικευμένη. Παρά την αυξανόμενη ποικιλία των εμπορικών

ζυμομυκήτων που είναι διαθέσιμοι, πολλοί πιστεύουν ότι η εξάρτηση από αυτούς καταργεί την ιδιαίτερη προσωπικότητα του οίνου. Υπάρχει ένας αυξανόμενος αριθμός οινοποιών που επιστρέφουν στην παράδοση, πραγματοποιώντας τις δικές τους παραδοσιακές ζυμώσεις με "άγριους" ζυμομύκητες.

Στην σύγχρονη οινοποίηση, η χρήση εμπορικών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* ως εναρκτήριες καλλιέργειες συνηθίζεται προκειμένου να εξασφαλισθεί η παραγωγή ενός προϊόντος συγκεκριμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά και να μειωθεί ο κίνδυνος αλλοίωσης του οίνου. Ωστόσο, όπως ειπώθηκε παραπάνω, η χρήση τους έχει οδηγήσει στην παραγωγή οίνων με παρόμοια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αποστερημένων γεωγραφικής ταυτότητας και πολυπλοκότητας. Η επιλογή και χρήση αυτοχθόνων στελεχών *S.cerevisiae* θα μπορούσε να αποτελέσει ένα ισχυρό εργαλείο για την ενίσχυση της εντοπιότητας, του χαρακτήρα και της ταυτότητας των Ελληνικών οίνων.

Με στόχο τη βελτίωση, την τυποποίηση της ποιότητας των οίνων και την αύξηση της παραγωγής, η σύγχρονη βιομηχανική οινοποίηση στηρίζεται στην χρήση εμπορικών στελεχών *S.cerevisiae* ως εναρκτήριες καλλιέργειες για τη διεξαγωγή της ζύμωσης. Τις περισσότερες φορές όμως η πληθυσμιακή υπεροχή του εμπορικού στελέχους προκαλεί τον άριστο ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά με τους αυτόχθονες πληθυσμούς ζυμών, που φέρει ως αποτέλεσμα την επισκίασή του καθ' όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Αυτό συνεπάγεται με την επικράτηση της εμπορικής ζύμης και την παραγωγή οίνων με παρόμοια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αποστερημένων γεωγραφικής ταυτότητας και πολυπλοκότητας.

Η μεγαλύτερη παραγωγή οίνου βασίζεται σε εμπορικές ζύμες, οι οποίες απομονώνονται από κυρίως φυσικές ποικιλίες των οίνων και επιλέγονται λόγω των ανώτερων ιδιοτήτων ζύμωσης. Ωστόσο, η φαινοτυπική ποικιλομορφία των ζυμομυκήτων που έχει προέλθει ως αποτέλεσμα στις αλλαγές που συντελέστηκαν στις οινολογικές παραμέτρους, κατά την οινοποίηση, δεν έχει αξιολογηθεί επαρκώς. Η έντονη μεταβλητότητα που παρατηρείται μεταξύ των φυσικών ζυμών, σε συνδυασμό με την εκτεταμένη πλειοτροπία, υποδεικνύει ότι οποιοδήποτε στέλεχος επιλεγεί από άγριες ζύμες, είναι απίθανο να έχει έναν «ιδανικό» συνδυασμό οινολογικών χαρακτηριστικών. Έτσι, από οινολογικής όψεως, είναι σημαντικό να μελετηθεί μεμονωμένα η καταλληλότητα των εμπορικών στελεχών με συντελεστή τις πιο σημαντικές οινολογικές παραμέτρους και να καθοριστεί το ανταγωνιστικό τους πλεονέκτημα

έναντι των *non-Saccharomyces* ειδών και άλλων ιθαγενών στελεχών *Saccharomyces* (Estéfani et al., 2014).

Οι εμπορικές ζύμες πραγματοποίησαν την εμφάνισή τους για πρώτη φορά ως μέθοδος επίλυσης του προβλήματος των οινοποιών, για τις ζυμώσεις που δεν μπόρεσαν να ολοκληρωθούν. Οι εμπορικές ζύμες είναι στοχευμένες και εξειδικευμένες, καθώς συχνά είναι σχεδιασμένες να λειτουργούν με συγκεκριμένες ποικιλίες σταφυλιών. Οι φυσικές ζύμες από ορισμένες περιοχές έχουν πλέον τη δυνατότητα να απομονωθούν και να αναπαραχθούν, κάτι που έχει αλλάξει εντελώς τις μεθόδους παραγωγής του οίνου σε όλο τον κόσμο. Υπάρχουν πολλοί ειδήμονες της βιομηχανίας των οίνων, που υποστηρίζουν και προτιμούν τις εμπορικές ζύμες, αλλά αυτό δεν σημαίνει ότι όλοι ενστερνίζονται αυτή την άποψη. Πολλοί θεωρούν ότι οι εμπορικοί ζυμομύκητες οδηγούν στην ομογενοποίηση της κουλτούρας του οίνου και αυτό έχει ωθήσει ορισμένους οινοπαραγωγούς να χρησιμοποιούν ζύμες που δεν έχουν παραχθεί εμπορικά, υπερασπιζόμενοι την χρήση γηγενών ζυμών. Ανατρέχοντας στην ιστορία, υπάρχουν πολλές οινοπαραγωγικές περιοχές που έγιναν γνωστές για τα μοναδικά αρώματα που συναντώνται στους οίνους. Οι περισσότεροι θεωρούσαν το έδαφος υπεύθυνο για αυτό, αλλά τελικά καθορίστηκε ότι οι γηγενείς ζύμες που υπάρχουν στον εξοπλισμό και στα κελάρια τους, ήταν υπεύθυνες για αυτές τις τοπικές ιδιαιτερότητες.

6. Γηγενή στελέχη ζυμών και παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας

Οι άγριες ζύμες, επίσης γνωστές ως γηγενείς, αυτόχθονες ή φυσικές ζύμες, εισέρχονται στο κελάρι μέσω της επιφάνειας των σταφυλιών και προσκολλώνται στο κελάρι κι τον αμπελουργικό εξοπλισμό.

Στους οίνους άμεσης κατανάλωσης, που δεν περνούν παλαίωση, οι ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου προέρχονται από δύο πιθανές προελεύσεις, τα σταφύλια και τους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στην οινοποίηση. Οι ζύμες, όπως αναφέρεται και στα προηγούμενα κεφάλαια, διαδραματίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, λόγω του ρόλου τους στη διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης. Μελέτες έχουν αναδείξει ότι η βιοποικιλότητα των ζυμών επηρεάζεται σημαντικά από τα γεωγραφικά και τεχνολογικά γνωρίσματα της κάθε αμπελουργικής περιοχής. Η ανάγκη ικανοποίησης των απαιτήσεων μιας ολοένα και πιο

ανταγωνιστικής και παγκοσμιοποιημένης διεθνούς αγοράς, αλλά και η ζήτηση των καταναλωτών για νέα στυλ οίνων, με την καλύτερη σχέση ποιότητας / τιμής επιβάλλει στον παραγωγικό τομέα νέες προκλήσεις, που απαιτούν έρευνα και καινοτομία. Η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης που αναπτύχθηκαν από γηγενείς ζύμες, οι οποίες απομονώνονται από συγκεκριμένες οινοπαραγωγικές περιοχές και έχουν επιλεχθεί για τις οινολογικές τους ιδιότητες, εμφανίζεται ως πολύτιμο εργαλείο για τη διαφοροποίηση, την ποικιλομορφία και τη βελτίωση της ποιότητας των οίνων. Οι γνώσεις που κατακτήθηκαν με το πέρασμα του χρόνου, συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση των διαδικασιών που σχετίζονται με την παραγωγή βελτιωμένων οίνων από αυτόχθονες ποικιλίες, μια σημαντική πρακτική για την ανάπτυξη μιας πιο ανταγωνιστικής τοπικής βιομηχανίας οίνου (Silvana et al., 2016).

Οι οίνοι που έχουν παραχθεί με αυθόρμητη ζύμωση, διαφοροποιούνται από τους οίνους οι οποίοι προέρχονται από ζυμώσεις με εμπορικές ζύμες αισθητικά. Για αυτό το λόγο πολλοί οινοπαραγωγοί προτιμούν τη χρήση των εμπορικών ζυμών. Η παραγωγή οίνων με τη χρήση άγριων ζυμών είναι πιο απρόβλεπτη από τις συμβατικές διαδικασίες ζύμωσης.

Οι τρεις βασικοί κίνδυνοι της ζύμωσης με την χρήση άγριων ζυμών είναι:

- Αργή ζύμωση: Η αντίσταση στο αλκοόλ είναι κοινή στις άγριες ζύμες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αργή ζύμωση και υψηλή ποσότητα ανεπιθύμητων υπολειμματικών σακχάρων.
- Πιο αργή έναρξη της διαδικασίας ζύμωσης: Οι άγριες ζύμες υπάρχουν στα σταφύλια σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις από ότι οι εμπορικές ζύμες στα εμβόλια. Ως αποτέλεσμα, η ζύμωση καθυστερεί περισσότερο να ξεκινήσει, αφήνοντας τα σταφύλια πιο ευάλωτα σε επιμολύνσεις από οργανισμούς αλλοίωσης και οξείδωση.
- Ανεπιθύμητα υποπροϊόντα που παράγονται από άγριες ζύμες στον οίνο μπορεί να οδηγήσουν σε δυσάρεστα χαρακτηριστικά

Μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε με τη συνεργασία τριών πανεπιστημίων, από τη Βόρεια Μακεδονία, την Πορτογαλία και τη Γερμανία και ενός οινοποιείου στη Βόρεια Μακεδονία, σχετικά με τη επίδραση των αυτόχθον και εμπορικών στελεχών ζύμης στην ζύμωση και την ποιότητα των οίνων που παράγονται από ποικιλίες σταφυλιών Vranec και Cabernet Sauvignon από την οινοπαραγωγική περιοχή Tikveš της Δημοκρατία της Βόρειας Μακεδονίας. Στην έρευνα απομονώθηκαν και μελετήθηκαν δύο γηγενή στελέχη της οινολογικής περιοχής, σε σύγκριση με ένα εμπορικό στέλεχος που εμβολιάστηκε σε οίνους

των ίδιων ποικιλιών. Οι ζυμώσεις διήρκησαν 16, σε θερμοκρασίες 23-25°C. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των οίνων που παράχθηκαν από το κάθε στέλεχος, όσο αφορά την αλκοολοπεριεκτικότητα, τα φαινολικά, τις ανθοκυάνες και την ένταση του χρώματος. Το ένα από τα αυτόχθονα στελέχη σε οίνους Vranec είχε τις υψηλότερες ενδείξεις στα φαινολικά, τις ανθοκυάνες, την ένταση χρώματος και το αλκοόλ, ενώ το άλλο αυτόχθον στέλεχος στους οίνους Vranec είχε τη χαμηλότερη αλκοολοπεριεκτικότητα, φαινολικά και ανθοκυάνες. Στους οίνους Cabernet Sauvignon το εμπορικό και το ένα από τα αυτόχθονα στελέχη είχαν πανομοιότυπες τιμές όσο αφορά την ένταση του χρώματος (Piéva et al., 2021).

Μία επιτυχημένη οινοποίηση με άγριες ζύμες μπορεί να θεωρείται αυθόρμητη, αλλά πρέπει να υπάρχει έντονη επίβλεψη, καθώς και έρευνα των στελεχών που θα επιλεχθούν, για την παρασκευή οίνων υψηλής ποιότητας. Ένας έμπειρος οινοποιός οφείλει να παρακολουθεί τον οίνο που ζυμώνεται συνεχώς, ελέγχοντας τις οσμές, τις θερμοκρασίες, τα φαινολικά και το αλκοόλ.

7. Χημικές αναλύσεις οίνων

Ο οίνος θεωρείται σύνθετο ποτό λόγω της χημικής του σύνθεσης. Η παρουσία ενώσεων που προέρχονται από τα σταφύλια προσδίδει πολυπλοκότητα στον οίνο. Τα κυρίαρχα συστατικά του λευκού οίνου είναι οι κύριες ζυμωτικές ενώσεις, όπως η αιθανόλη, η γλυκερόλη, οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και οι πτητικές ουσίες, οι οποίες προέρχονται από τα σταφύλια κατά τη διαδικασία οινοποίησης. Περίπου 600-800 ενώσεις επηρεάζουν την ποιότητα του οίνου και την αποδοχή και προτίμηση των καταναλωτών λόγω της επίδρασης στα αισθητηριακά χαρακτηριστικά, όπως το άρωμα. Το άρωμα του οίνου είναι το πιο εξέχον ποιοτικό χαρακτηριστικό, το οποίο επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά των καταναλωτών και την κατανάλωση οίνου. Επιπλέον, το άρωμα παραμένει από το άρωμα στο ποτήρι του οίνου μετά την κατάποση, επηρεάζοντας την ηδονική συμπεριφορά. Οι πτητικές ενώσεις στον οίνο επηρεάζουν τόσο τις ποιοτικές όσο και τις ποσοτικές πτυχές, συμπεριλαμβανομένου του αρώματος και της γεύσης. Διάφορες αισθήσεις διεγείρονται από τα πτητικά συστατικά και η αντίληψη της οσμής προάγεται από μόρια που δεσμεύονται στους οσφρητικούς υποδοχείς, οδηγώντας τους καταναλωτές είτε στην αποδοχή είτε στην απόρριψη του οίνου. Τα μη πτητικά συστατικά παρέχουν γευστική και απτική αίσθηση και

δημιουργούν μια ψυχολογική αισθητηριακή βάση για τη γεύση που προκαλείται από τα πτητικά συστατικά. Τα οργανικά οξέα επηρεάζουν την οξύτητα και άλλες αισθητηριακές αντιλήψεις. Το τρυγικό οξύ καταστέλλει τη γλυκύτητα και επηρεάζει το ιξώδες, το μηλικό οξύ συμβάλλει στη "σκληρή γεύση", το γαλακτικό οξύ συμβάλλει στο "μαλάκωμα του οίνου" και το γλυκόξινο οξύ προσδίδει μια "πικρή" νότα που προκαλεί σιελογόρροια. Επιπλέον, αυτά τα προφίλ οργανικών οξέων αποτελούν σημαντικές παραμέτρους που καθορίζουν τη χημική σύνθεση του οίνου. Οι μη πτητικές φαινόλες που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά της γεύσης, του αρώματος και της αίσθησης του στόματος, όπως η πικράδα και η στυπτικότητα, είναι εγγενείς ουσίες στα σταφύλια και τον οίνο. Οι γεύσεις που προέρχονται από φαινόλες μπορούν να επηρεαστούν από αλληλεπιδράσεις με αισθητηριακά χαρακτηριστικά, όπως η οξύτητα και η γλυκύτητα άλλων συστατικών του οίνου. Άλλα μη πτητικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων και της γλυκερίνης, επηρεάζουν το ιξώδες και την πυκνότητα. Τα σάκχαρα επηρεάζουν άμεσα το οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. Η γλυκερόλη συνδέεται με διάφορα χαρακτηριστικά, όπως η λιπαρότητα και η απαλότητα. Οι πληροφορίες σχετικά με τον χημικό χαρακτήρα, τις συνθέσεις και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου είναι απαραίτητες για την καλύτερη κατανόηση των χημικών ουσιών που συνθέτουν έναν οίνο που προσφέρει επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητες. Οι τεχνικές χρωματογραφίας, συμπεριλαμβανομένης της αέριας χρωματογραφίας (GC) και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιούνται ευρέως για την ποσοτικοποίηση ουσιών και τον προσδιορισμό των ουσιών στην έρευνα για τον οίνο. Διάφορα αρωματικά πτητικά συστατικά είναι παρόντα στο χώρο κορυφής του δοχείου και η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (GC--MS) επιτρέπει την ανάλυση των χαρακτηριστικών αυτών των αρωματικών πτητικών συστατικών στο χώρο κορυφής. Χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές για την εξαγωγή διαφόρων ουσιών από τον οίνο. Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) είναι μια αποτελεσματική και απλή μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για δειγματοληψία χωρίς διαλύτες ποτών. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), εξοπλισμένη με ανιχνευτή UV/Vis και στήλη C18, χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό των μη πτητικών ενώσεων στον οίνο. Η εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιείται γενικά για τον διαχωρισμό των πολυφαινολών, των οργανικών οξέων και των σακχάρων στον οίνο για τη συγκράτηση του υδρόφοβου συστατικού και την έκλυση του αναλύτη στο υδατικό διάλυμα.

Η αναλυτική χημεία παίζει ολοένα και πιο σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια βιομηχανία οίνου. Οι χημικές αναλύσεις του οίνου είναι απαραίτητες για τη διασφάλιση της ασφάλειας των προϊόντων και την τήρηση των κανονισμών που διέπουν τη διεθνή αγορά, καθώς και την κατανόηση των θεμελιωδών πτυχών της παραγωγής σταφυλιών και οίνου, για τη βελτίωση των παραγωγικών διαδικασιών. Οι προηγμένες μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης έχουν αξιοποιηθεί εκτενέστερα τα τελευταία χρόνια έχοντας βρει εφαρμογή και στη βιομηχανία οίνου.

7.1 Ενεργός οξύτητα

Η ενεργός οξύτητα ή pH εκφράζει την ολική συγκέντρωση των ελεύθερων υδρογονοκατιόντων (H_3O^+) σε ένα διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, ως pH συμβολίζεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης κατιόντων υδρογόνου στο διάλυμα.

$$pH = - \log_{10} [H_3O^+]$$

Στην κλίμακα pH, οι τιμές που είναι κάτω από το 7 είναι όξινα διαλύματα, τιμές άνω των 7 δηλώνουν αλκαλικά/βασικά διαλύματα και όταν $pH=7$, τότε το διάλυμα θεωρείται ουδέτερο.

Στην οινοποίηση, οι παραγωγοί χρησιμοποιούν το pH ως μέθοδο μέτρησης της ωρίμανσης σε σχέση με την οξύτητα. Οι οίνοι με χαμηλό pH παρουσιάζουν όξινο και «τραγανό» ουρανίσκο, ενώ οι οίνοι με υψηλό pH είναι πιο ευάλωτοι στην ανάπτυξη βακτηρίων. Το pH των περισσότερων οίνων κυμαίνεται γύρω στο 3,1 με 3,8, ανάλογα με την περιεκτικότητα σε τανίνες. Για τους λευκούς οίνους το επιθυμητό pH κυμαίνεται γύρω στο 3,0 έως 3,4, ενώ για τους ερυθρούς οίνους γύρω στο 3,3 με 3,6. Οι ζύμες της οινοποίησης πιέζονται σε pH που είναι χαμηλότερα του 3 και η θερμοκρασία της ζύμωσης πρέπει να κυμαίνεται στους 20°C. Στη μηλογαλακτική ζύμωση, το pH του γλεύκους δεν πρέπει να είναι χαμηλότερο από 3,2, διότι σε κατώτερες τιμές τα βακτήρια γαλακτικού οξέος καταστέλλονται έντονα. Οι ιδανικότερες τιμές pH για τη μηλογαλακτική ζύμωση είναι μεταξύ 3,2 και 3,4 και παρουσία λίγης αλκοόλης (5% και άνω). Σε αυτές τις τιμές, ο *Oenococcus oeni* θα κυριαρχήσει σε όλα τα άλλα βακτήρια γαλακτικού οξέος. Σε περίπτωση πολύ χαμηλού pH, η απομάκρυνση των οξέων από τον οίνου θα πραγματοποιηθεί με την προσθήκη ανθρακικού καλίου ή ανθρακικού ασβεστίου, τα οποία θα αντιδράσουν με τα οξέα

του σταφυλιού (μηλικό και τρυγικό) για να σχηματίσουν αδιάλυτα άλατα. Το διοξείδιο του άνθρακα θα απελευθερωθεί ως αποτέλεσμα του ανθρακικού τμήματος του σχηματισμού άλατος. Τα οξέα σταφυλιού έχουν αρνητικό φορτίο και αντιδρούν με το κάλιο ή το ασβέστιο που φέρουν θετικά φορτία. Το κάλιο έχει ένα μόνο θετικό φορτίο και ως αποτέλεσμα θα σχηματίσει διάφορους τύπους αλάτων με τρυγικό οξύ και μηλικό οξύ που σχηματίζονται φυσικά κατά την οινοποίηση. Το ασβέστιο έχει δύο θετικά φορτία και ως αποτέλεσμα θα σχηματίσει μόνο μερικά άλατα. Ωστόσο, το ασβέστιο μπορεί να σχηματίσει ένα άλας με μηλικό και τρυγικό οξύ ταυτόχρονα και η αντίδραση αυτή έχει ονομαστεί τεχνική «διπλού αλατιού». Ο σχηματισμός του διπλού αλατιού είναι αρκετά σπάνιος και ευνοεί την απομάκρυνση του τρυγικού οξέος παρά του μηλικού οξέος, εκτός εάν οι αρχικές συγκεντρώσεις μηλικού οξέος είναι διπλάσιες από τις συγκεντρώσεις του τρυγικού οξέος. Έτσι η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε ένα μέρος του χυμού (~25%), γιατί διαφορετικά θα αποσταθεροποιούσε τον οίνο αφήνοντας πίσω κυρίως μηλικό οξύ, το οποίο μεταβολίζεται εύκολα από τις ζύμες και τα βακτήρια. Αυτό σημαίνει ότι η ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου για ολόκληρη την παρτίδα προστίθεται μόνο σε ένα μέρος του χυμού. Επειδή χρησιμοποιείται τόσο μεγάλη συγκέντρωση ανθρακικού ασβεστίου, ο επεξεργασμένος χυμός θα φτάσει πάνω από το pH 4,5-6,5. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να ξαναγίνει αναπροσαρμογή του pH με προσθήκη χυμού. Για να αποφευχθεί η ανάπτυξη βακτηρίων αλλοίωσης, το pH πριν από τη μηλογαλακτική ζύμωση, θα πρέπει να παραμείνει κάτω από 3,4. Για να αφαιρεθούν μικρές ποσότητες περίσσειας οξύτητας πριν την εμφιάλωση γίνεται χρήση διττανθρακικού καλίου (Jim & Thomas,2010). Το pH αφορά τη μικροβιακή σταθερότητα, την «αίσθηση του στόματος», τη δομή και την ηλικιακή ικανότητα ενός οίνου (Andrew, 2017).

7.2 Ογκομετρούμενη οξύτητα

Η ογκομετρούμενη ή τιτλοδοτούμενη οξύτητα αναφέρεται στη συνολική συγκέντρωση ελεύθερων πρωτονίων και μη διαχωρισμένων οξέων σε διάλυμα που αντιδρά με ισχυρή βάση και εξουδετερώνεται, η μεταβολή παρατηρείται με τη χρήση δείκτη. Μπορεί να εκφραστεί ως γραμμομοριακή ποσότητα, τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράζονται ως g τρυγικού οξέος/L. Η τιτλοδοτούμενη οξύτητα στους οίνους πρέπει να κυμαίνεται στα 4.0-8.0 g/dm³ εκφραζόμενη σε τρυγικό οξύ. Για τους ερυθρούς οίνους, η τιτλοδοτούμενη οξύτητα

κυμαίνεται γύρω στα 6 g τρυγικού οξέος/L σε ορισμένες περιπτώσεις στα 7.0 g τρυγικού οξέος/L. Εάν η ογκομετρούμενη οξύτητα του μούστου είναι υψηλότερη από 7.0 g τρυγικού οξέος/L, τότε θα πρέπει να γίνει προσθήκη ανθρακικού καλίου ή ανθρακικού ασβεστίου. Για τους λευκούς οίνους η προτεινόμενη ογκομετρούμενη οξύτητα κυμαίνεται από 7-9 g τρυγικού οξέος/L. Η ογκομετρούμενη οξύτητα είναι πιθανό να αυξηθεί περίπου κατά 10% στη διάρκεια πρωτογενούς ζύμωσης με αποτέλεσμα το σχηματισμού ηλεκτρικού οξέος. Συνήθως, στους οίνους συναντώνται 0,5-1,5 g ηλεκτρικού οξέος/L, αλλά έχουν ανιχνευθεί υψηλότερες συγκεντρώσεις έως 3,0 g ηλεκτρικού οξέος/L σε ορισμένους ερυθρούς οίνους. Η ρύθμιση της οξύτητας θα πρέπει να πραγματοποιηθεί πριν από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, για να επιτραπεί η καλύτερη ενσωμάτωση των προστιθέμενων ενώσεων και να διασφαλιστούν ότι οι συνθήκες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης θα ευνοήσουν την ποιότητα και τη μικροβιακή σταθερότητα του τελικού προϊόντος. Με αυτή την τεχνική υπάρχει ο κίνδυνος οι οίνοι να έχουν πολύ όξινη γεύση, εάν προβλεφτεί με ακρίβεια η ποσότητα του ηλεκτρικού οξέος που θα παραχθεί κατά την αλκοολική ζύμωση (Jim & Thomas,2010).

7.2.1 Ολική οξύτητα

Ολική οξύτητα είναι η ισοδυναμία πρωτονίων της ποσότητας ανιόντων οργανικού οξέος που υπάρχει σε έναν οίνο. Είναι ο αριθμός πρωτονίων (ιόντα υδρογόνου ή απλά H^+) όπου τα οργανικά οξέα (γαλακτικό, ηλεκτρικό, κιτρικό, οξικό και θειικά οξέα) θα περιείχαν αν ήταν μη διαχωρισμένα. Υπολογίζεται με τη μέτρηση της συγκέντρωσης του ανιόντος οξέος με φασματομετρία ή χρωματογραφία, εκφράζοντάς τα ως γραμμομοριακές ποσότητες (αριθμός μορίων ανά όγκο) και στη συνέχεια πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των πρωτονίων που θα προέκυπταν από πλήρη διάσταση.

7.2.2 Διαφορά ογκομετρούμενης και ολικής οξύτητας

Πολλοί άνθρωποι χρησιμοποιούν την ογκομετρούμενη οξύτητα και ολική οξύτητα ως συνώνυμα, αλλά δεν είναι. Η ογκομετρούμενη οξύτητα είναι πάντα μικρότερη από την ολική οξύτητα, αυτό διότι είναι αδύνατον να βρεθούν όλα τα ιόντα υδρογόνου κατά τον προσδιορισμό της ογκομετρούμενης οξύτητας. Η ογκομετρούμενη οξύτητα είναι πιο εύκολο να μετρηθεί.

7.3 Πτητική οξύτητα

Η πτητική οξύτητα ορίζεται ως η περιεκτικότητα των οξέων του οίνου που μπορούν εύκολα να αφαιρεθούν με απόσταξη. Η πτητική οξύτητα είναι ένας δείκτης αλλοίωσης του οίνου και επομένως ρυθμίζεται ως παράμετρος διασφάλισης ποιότητας. Η αλλοίωση μπορεί να προκληθεί από βακτηριακή δράση, όπως προκαλείται από βακτήρια οξικού οξέος ή ζύμες αλλοίωσης, όπως το *Brettanomyces*. Ο ΟΙV υπαγορεύει απόσταξη ατμού και τιτλομετρία ως μέθοδο αναφοράς για πτητική οξύτητα. Η μέγιστη πτητική οξύτητα, για τους ερυθρούς οίνους είναι 0,14 g οξικό οξύ/100 mL και 0,12 g οξικό οξύ/100 mL για τους λευκούς οίνους. Σε οίνους με υψηλή πτητική οξύτητα πραγματοποιείται αντίστροφη όσμωση για να μειωθεί η συγκέντρωση του οξικού οξέος. Οι ζύμες παράγουν μικρές ποσότητες οξικού οξέος κατά τη ζύμωση ως υποπροϊόν μεταβολισμού. Τα γαλακτικά βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν μία ελαφριά αύξηση της συγκέντρωσης οξικού οξέος, κατά τη διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης, λόγω του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος. Μικρές ποσότητες οξικού οξέος και οξικού αιθυλεστέρα παράγονται από βακτήρια οξικού οξέος κατά την αποθήκευση του οίνου σε δρύινα βαρέλια. Αυτά τα βακτήρια είναι υποχρεωτικά αερόβια και παράγουν μικρές ποσότητες πτητικής οξύτητας κάθε φορά που ο οίνος εκτίθεται στον αέρα. Σε περίπτωση που ο οίνος εκτεθεί στον αέρα λοιπόν υπάρχει κίνδυνος οξειδωσής του (Pascal et al., 2006).

8. Στατιστική επεξεργασία δεδομένων

8.1 Analysis of variance (ANOVA)

Η ανάλυση της διασποράς ANOVA είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος ελέγχου σημαντικότητας (test of significance), ή άλλως, ελέγχου υποθέσεων αναφορικά με την σύγκριση των μέσων τιμών τριών ή περισσότερων πληθυσμών (συχνά αναφέρονται και ως ομάδες). Συνεπώς, η ανάλυση της διασποράς ANOVA μπορεί να θεωρηθεί ως μια επέκταση των στατιστικών ελέγχων που αφορούν στη σύγκριση των μέσων τιμών δύο πληθυσμών.

Οι προϋποθέσεις που πρέπει να ισχύουν για να χρησιμοποιηθεί η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα είναι:

- τα δείγματα είναι αντιπροσωπευτικά και οι τιμές που τα απαρτίζουν οφείλονται σε ανεξάρτητες παρατηρήσεις,
- η κατανομή των τιμών των δειγμάτων είναι κανονική, και
- οι πληθυσμοί από τους οποίους έχουν επιλεγεί τα δείγματα έχουν την ίδια διακύμανση

Η ANOVA χρησιμοποιείται συχνά για την ανάλυση δεδομένων από τους ακόλουθους τύπους μελετών:

- Μελέτες πεδίου
- Δειγματοληπτικές έρευνες
- Πειράματα Οιονεί πειράματα (Quasi-experiments)

Η ANOVA χρησιμοποιείται συνήθως για να ελεγχθούν τα εξής:

- Στατιστικές διαφορές μεταξύ των μέσων δύο ή περισσότερων πληθυσμών (ή ομάδων).
- Στατιστικές διαφορές μεταξύ των μέσων για δύο ή περισσότερες παρεμβάσεις (πχ. θεραπείες, μεθόδους κ.α.)
- Στατιστικές διαφορές μεταξύ των μέσων δύο ή περισσότερων επιδόσεων, βαθμών κτλ.

8.2 Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)

Η PERMANOVA είναι μία πολυμεταβλητή ανάλυση η οποία εξετάζει την ταυτόχρονη απόκριση μίας ή περισσότερων μεταβλητών σε έναν ή περισσότερους παράγοντες. Χρησιμοποιείται για τη σύγκριση ομάδων αντικειμένων και τη δοκιμή της μηδενικής υπόθεσης ότι τα κεντροειδή και η διασπορά των ομάδων, όπως αυτά ορίζονται από το διάστημα μέτρησης, είναι ισοδύναμα για όλες τις ομάδες. Η απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης σημαίνει ότι είτε το κεντροειδές ή / και η εξάπλωση των αντικειμένων είναι διαφορετική μεταξύ των ομάδων. Ως εκ τούτου, η δοκιμή βασίζεται στον προηγούμενο υπολογισμό της απόστασης μεταξύ των δύο αντικειμένων που περιλαμβάνονται σε ένα πείραμα.

- PseudoF (R1, grps) = το ψευδο F στατιστικό PERMANOVA
- (R1, grps, iter) = η τιμή p για Permutational MANOVA με βάση πολλές επαναλήψεις

$$P = \frac{(\text{count } F^p \geq F) + 1}{(\text{total count } F^p) + 1}$$

8.3 PCA (Principle Component Analysis)

Η μέθοδος PCA (Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών), αποτελεί μία γραμμική μέθοδο συμπίεσης δεδομένων η οποία συνίσταται από τον επαναπροσδιορισμό των συντεταγμένων ενός συνόλου δεδομένων σε ένα άλλο σύστημα συντεταγμένων το οποίο θα είναι καταλληλότερο στην επικείμενη ανάλυση δεδομένων. Αυτές οι νέες

συντεταγμένες είναι το αποτέλεσμα ενός γραμμικού συνδυασμού προερχόμενου από τις αρχικές μεταβλητές και εκπροσωπούνται σε ορθογώνιο άξονα, ενώ τα επικείμενα σημεία διατηρούν μια φθίνουσα σειρά όσο αφορά στη τιμή της διακύμανσής τους. Για το λόγο αυτό, το πρώτο κύριο συστατικό (principal component) διατηρεί περισσότερες πληροφορίες δεδομένων σε σύγκριση με το δεύτερο το οποίο δεν διατηρεί πληροφορίες οι οποίες έχουν εισέλθει νωρίτερα (στο πρώτο συστατικό). Τα principal components δεν συσχετίζονται. Η συνολική ποσότητα των principal components είναι ίση με τη ποσότητα των αρχικών μεταβλητών και παρουσιάζει τις ίδιες πληροφορίες στατιστικής. Εντούτοις, η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την μείωση του συνόλου των μεταβλητών, καθώς τα πρώτα συστατικά (principal components) διατηρούν περισσότερο από το 90% των στατιστικών δεδομένων από τα αρχικά δεδομένα. Λόγω αυτών των σημαντικών πλεονεκτημάτων, η μέθοδος αυτή είναι ευρέως διαδεδομένη στην συμπίεση εικόνας.

Σκοπός Μελέτης

Στη σύγχρονη βιομηχανία παραγωγής οίνων, έχει επί των πλείστων εδραιωθεί η χρήση των εμπορικών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*. Αυτή η πρακτική έχει, κατά κύριο λόγο, θεμελιωθεί στον χώρο των οίνων, διότι κάνει την διαδικασία της ζύμωσης ελεγχόμενη και πιο σταθερή. Η αυξημένη όμως χρήση εμπορικών ζυμών από τα οινοποιεία μπορεί να οδηγήσει σε οίνους χωρίς ιδιαίτερο χαρακτήρα. Σε αντίθεση, μέσω της χρήσης γηγενών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* θα μπορούσε να τονιστεί ο ιδιαίτερος χαρακτήρας κάθε περιοχής ή ακόμα και αμπελώνα, καθώς κάθε στέλεχος είναι μοναδικό, προσδίδοντας έτσι μία χαρακτηριστική προσωπικότητα στους παραγόμενους οίνους. Για αυτό, ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι να εξεταστούν τα γηγενή στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* από την περιοχή της Νεμέας ως προς το ζυμωτικό και οινολογικό τους δυναμικό, προκειμένου να παραχθούν οίνοι υψηλής ποιότητας, οι οποίοι θα αναδείξουν τον τοπικό χαρακτήρα.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Επιλογή στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας επιλέχθηκαν 20 διαφορετικά στελέχη ζυμών *Saccharomyces cerevisiae*, από σημαντική αμπελουργική ζώνη της Ελλάδας (Νεμέα-Κορινθία). Τα γηγενή στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* έχουν απομονωθεί από αυθόρμητες ζυμώσεις γλεύκους σταφυλιών που είχαν πραγματοποιηθεί τα προηγούμενα χρόνια και διατηρήθηκαν στις συλλογές του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων (πρώην Ινστιτούτου Οίνου) του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «Δήμητρα» (ΕΛ.Γ.Ο. «Δήμητρα»).

Τα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποθηκευμένα στους -80°C σε διάλυμα γλυκερόλης 30%v/v, ανανεώθηκαν από τους -80°C σε τρυβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα YPD άγαρ (Πίνακας 2) και επωάστηκαν για δύο με τρεις μέρες στους 28°C.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος YPD άγαρ

YPD άγαρ	
Εκχύλισμα ζύμης	10g
Πεπτόνη	20g
Γλυκόζη	20g
Άγαρ	20g
Απιονισμένο νερό (dH ₂ O)	1000 ml

2. Ζυμώσεις εργαστηριακής κλίμακας με επιλεγμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η γενετική ποικιλομορφία των στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* έχει αντίκτυπο στους οινολογικούς φαινοτύπους, διαφορετικοί γονότυποι *Saccharomyces cerevisiae* δοκιμάστηκαν σε ζυμώσεις εργαστηριακής κλίμακας.

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με διπλή επανάληψη, έτσι ώστε να υπάρχει μικρότερο περιθώριο σφάλματος στα αποτελέσματα. Η θερμοκρασία κατά την οποία εκτυλίχθηκαν οι ζυμώσεις ήταν οι 20°C, σε κωνικές φιάλες που περιείχαν 110ml παστεριωμένου γλεύκους, της ποικιλίας «Μοσχοφίλερο» (Πίνακας 3).

Κάθε στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύχθηκε ανεξάρτητα σε κωνικές φιάλες που περιείχαν αποστειρωμένο YPD Broth (Πίνακας 4) στους 26°C υπό ανάδευση(180rpm). Μετά από 24 ώρες επώασης 10⁶ κύτταρα από την κάθε προαναφερθείσα καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό γλεύκους με σκοπό τον εγκλιματισμό τους. Μετά από το πέρας, αυστηρά, 18 ωρών 10⁶ εγκλιματισμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό νέου γλεύκους με σκοπό την έναρξη των ζυμώσεων.

Η πορεία της ζύμωσης παρακολούθηθηκε σε καθημερινή βάση, μέσω της απώλειας του βάρους, λόγω της εξάτμισης του διοξειδίου του άνθρακα. Οι ζυμώσεις θεωρήθηκαν πλήρεις όταν ο ρυθμός της απώλειας του βάρους ήταν κάτω από 0,08 g/ημέρα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Χαρακτηριστικά γλεύκους σταφυλιών της ποικιλίας Μοσχοφίλερο

Χαρακτηριστικά γλεύκους σταφυλιών της ποικιλίας Μοσχοφίλερο	Αρχικές Τιμές	Συμπλήρωση	Τελικές Τιμές	Μέθοδος Ανάλυσης
Σάκχαρα	190 g/L (19.9 brix)	17g/L	207 g/l (21.0 brix)	Διαθλασιμετρία
Αφομοιώσιμο άζωτο (YAN)	88 mg/L	(DAP): (απόθεμα α-αμινοξέος) αναλογία YAN 35:65	220 mg/l	Μέθοδος τιτλοδότησης με φορμόλη, όπως περιγράφεται από τους Gump et al. (2000)
Ολικό SO₂	23ppm			Τιτλοδότηση
Ολική οξύτητα	6,4gr/L			Τιτλοδότηση

(εκφρασμένη σε gr τρυγικού οξέος/l)				
pH	3,08			Ψηφιακό πεχάμετρο

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος YPD Broth

YPD Broth	
Εκχύλισμα ζύμης	10g
Πεπτόνη	20g
Γλυκόζη	20g
Απιονισμένο νερό (dH ₂ O)	1000 ml

3. Οινολογικές Αναλύσεις

Στο τέλος κάθε ζύμωσης προσδιορίστηκε το pH, η ολική και η πτητική οξύτητα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (OIV).

3.1 Προετοιμασία δείγματος

Το δείγμα (γλεύκος ή οίνος) έπρεπε να είναι διαυγές. Στην περίπτωση που το δείγμα ήταν θολό προηγήθηκε διήθηση με διηθητικό χαρτί ή βαμβάκι, πριν αρχίσουν οι αναλύσεις. Τα δείγματα έπρεπε να βρίσκονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Για την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα, μεταφέρθηκαν τα 50 ml οίνου σε μία φιάλη κενού των 250 ml, και τοποθετήθηκαν για ανάδευση, για περίπου δύο λεπτά στις 750, ενώ ταυτόχρονα δημιουργήθηκε κενό με τη βοήθεια αντλίας ύδατος. Το διοξείδιο του άνθρακα που βρέθηκε διαλυμένο στον οίνο απομακρύνθηκε για να μην προσμετρηθεί στις χημικές αναλύσεις, στην ογκομετρούμενη οξύτητα με τη μορφή ανθρακικού οξέος.

3.2 Μέτρηση Ενεργού Οξύτητας (pH)

Η μέτρηση της ενεργού οξύτητας (pH) έγινε με την χρήση πεχαμέτρου, το οποίο πρώτα βαθμονομήθηκε. Με τη συμβουλή του εγχειριδίου χειριστή για να βαθμονομηθεί, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα, με pH=7. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έκπλυση με απιονισμένο νερό, του ποτηριού ζέσεως, των μαγνητών και των ηλεκτροδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε επαρκή ποσότητα δείγματος γλεύκους ή οίνου σε ποτήρι ζέσεως ώστε να είναι εμβαπτισμένα σε αυτό οι συνδέσεις ηλεκτροδίων και το θερμομέτρο του πεχαμέτρου. Έπειτα, τα ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν στο δείγμα μέχρι τη σταθεροποίηση της μέτρησης για να γίνει η καταγραφή της. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τουλάχιστον δύο φορές. Καθ' όλη τη διάρκεια το δείγμα αναδεύονταν σε μαγνητικό αναδευτήρα.

Όλοι οι οίνοι βρίσκονταν στην όξινη πλευρά του φάσματος του pH και τα περισσότερα κυμαίνονταν από 2,5 έως περίπου 4,5 (Madeline, 2015).

3.3 Μέτρηση ογκομετρούμενης (τιτλοδοτούμενης) οξύτητας

Αρχικά, παρασκευάστηκε ένα τυφλό διάλυμα, το οποίο το χρησιμοποιήθηκε ως προτύπο σύγκρισης χρώματος, για τις ογκομετρήσεις. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε γέμισμα της προχοΐδας με καυστικό νάτριο (NaOH) 0,1N μέχρι την ένδειξη «0», το οποίο είναι ισχυρή βάση, ώστε να εξουδετερωθούν τα οξέα του οίνου, που είναι ασθενή οξέα, με τιτλοδότηση. Έπειτα, μεταφέρθηκαν με σιφώνι πληρώσεως 10 ml από το δείγμα γλεύκους/οίνου σε κωνική των 250 ml και προστέθηκαν 30 ml απιονισμένο νερό και 1 ml δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης, που έχει περιοχή αλλαγής χρώματος το pH 7, σε διάλυμα με pH <7 (όξινο διάλυμα), αποκτά κίτρινο χρώμα, σε ουδέτερο διάλυμα, αποκτά πράσινο χρώμα και σε διάλυμα με pH >7,6 αποκτά μπλε χρώμα. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε ανάδευση και τιτλοδότηση με NaOH 0,1N μέχρι την αλλαγή του χρώματος του δείκτη από πορτοκαλί σε πράσινο/σμαραγδί. Τέλος, καταγράφηκε η κατανάλωση του NaOH. Μόνο για την παρασκευή του τυφλού διαλύματος προστέθηκαν 5 ml ρυθμιστικό διάλυμα για τη «διόρθωση του χρώματος».

Εκφραζόμενη σε g τρυγικού οξέος ανά λίτρο, δίνεται από τον τύπο:

Ογκομετρούμενη οξύτητα **= κατανάλωση (mlNaOH 0.1N) × 0,75**

Η ογκομετρούμενη οξύτητα πρέπει να κυμαίνεται από 4 έως 8g τρυγικού οξέος / L.

3.4 Μέτρηση πτητικής οξύτητας

Ο προσδιορισμός της πτητικής οξύτητας έγινε με ογκομέτρηση των πτητικών οξέων που διαχωρίστηκαν από τον οίνο με απόσταξη με ρεύμα ατμών, σε αυτόματη αποστακτική.

Πριν και μετά από την απόσταξη και τον καθαρισμό, πραγματοποιήθηκε έκπλυση των τμημάτων της αποστακτικής (σφαιρική φιάλη απόσταξης, σωλήνα εκτόνωσης) με απιονισμένο νερό. Αρχικά, η αποστακτική τέθηκε για καθαρισμό για 4 λεπτά με απιονισμένο νερό και τρυγικό οξύ. Ύστερα, προστέθηκαν κρύσταλλοι τρυγικού οξέος (0,5g) στο δοχείο της αποστακτικής, μαζί με 20ml δείγματος γλεύκους/οίνου. Το τρυγικό οξύ προστέθηκε για να ελευθερωθεί το οξικό και τα άλλα πτητικά οξέα από τα άλατά τους. Αν δε γινόταν προσθήκη τρυγικού οξέος κατά την απομάκρυνση του οξικού οξέος από τον οίνο, θα σχηματιζόταν νέα ποσότητα οξικού οξέος, που θα είχε ελευθερωθεί από τα άλατά του, λόγω μετατόπισης του σημείου ισορροπίας. Στο pH του οίνου η αντίδραση αυτή δεν είναι πλήρης και για αυτό προστέθηκε τρυγικό οξύ. Ο χρόνος απόσταξης τέθηκε στα 7 λεπτά. Κατά την απόσταξη συλλέχθηκαν 250 ml αποστάγματος. Έγινε επανάληψη για το κάθε δείγμα. Τέλος, καθαρίστηκε η αποστακτική, με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε στην αρχή.

Μετά την απόσταξη, το δείγμα μεταφέρθηκε σε κωνική των 500 ml και προστέθηκαν σε αυτό 5 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλείνης. Ο δείκτης φαινολοφθαλείνης αλλάζει χρώμα σε τιμές pH από 8,7 έως 10,7 (εξουδετέρωση ασθενούς οξέος από ισχυρές βάσεις). Ογκομετρήθηκε με NaOH 0,1N, ώστε να εξουδετερωθούν τα οξέα του οίνου, μέχρι την αλλαγή του χρώματος του δείκτη σε ρόδινο, όπου έστω n ο αριθμός των καταναλωθέντων ml NaOH 0,1N.

Στη συνέχεια, προστέθηκαν 4 σταγόνες αραιωμένου 1/4 HCl, μερικούς κρυστάλλους KJ και 2 ml διαλύματος αμύλου 0,5% w/v, για να επανέλθει το διάλυμά και να προχωρήσει η επόμενη ογκομέτρηση. Ογκομετρήθηκε το ελεύθερο διοξείδιο του θείου (SO₂) με διάλυμα ιωδίου 0.005M, μέχρι την αλλαγή του χρώματος σε ανθρακί, όπου έστω n' ο αριθμός των καταναλωθέντων ml NaOH 0,1N.

Κατόπιν, προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα βορικού νατρίου (8-10 ml) για την επαναφορά του ρόδινου χρωματισμού στο διάλυμα και ογκομετρήθηκε το δεσμευμένο διοξειδίο του θείου με διάλυμα ιωδίου 0,005M μέχρι αλλαγής του χρώματος σε μωβ, όπου έστω n' ο αριθμός των καταναλωθέντων ml NaOH 0,1N.

Εκφραζόμενη σε g οξικού οξέος ανά λίτρο με δύο δεκαδικά ψηφία, δίνεται από τον τύπο:

$$A = 0,300 (n - 0.1n' - 0.05n'')$$

Η πτητική οξύτητα πρέπει να κυμαίνεται από 0,2 έως 0,4g οξικού οξέος / L.

4. Στατιστικές Αναλύσεις

Για την επεξεργασία και την ανάλυση των μετρήσεων, πραγματοποιήθηκαν στατιστικές αναλύσεις.

Αρχικά, μέσω της ανάλυσης ANOVA (Analysis of Variance), μίας μεθοδολογίας της οποίας η διαδικασία περιλαμβάνει το διαχωρισμό των όλων των δεδομένων και την παρατήρηση των διακυμάνσεών τους, με συντελεστές τους διάφορους παράγοντες που ληφθήκαν ως κριτήρια. Η ανάλυση ANOVA επιτρέπει τη διενέργεια υποθετικών δοκιμών για τον προσδιορισμό των παραγόντων που επηρέασαν τα αποτελέσματα του πειράματος και τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Οι αναλύσεις ANOVA διεξήχθησαν με σκοπό τη σύγκριση των φαινοτύπων *S.cerevisiae* σε σχέση με κάθε παράγοντα ξεχωριστά, δηλαδή ως προς τη διάρκεια της ζύμωσης, το pH, την ολική και πτητική οξύτητα και τέλος το ολικό διοξειδίο.

Στη συνέχεια, για τη σύγκριση των φαινοτύπων αναφορικά με όλους τους παράγοντες(διάρκεια της ζύμωσης, το pH, την ολική και πτητική οξύτητα και τέλος το ολικό διοξειδίο), χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance), μία πολυμεταβλητή ανάλυσης η οποία εξετάζει την ταυτόχρονη απόκλιση μίας ή περισσότερων μεταβλητών σε έναν ή περισσότερους παράγοντες (Anderson, 2001).

Επιπλέον, τα διαγράμματα διασποράς όπου απεικονίζονται οι ομοιότητες των στελεχών *S.cerevisiae*, έγιναν με τη μέθοδο PCA (Principal Component Analysis) η οποία αναπαριστά ένα πίνακα συνδιακύμανσης ενός συνόλου «αρχικών» μεταβλητών μέσα από ένα

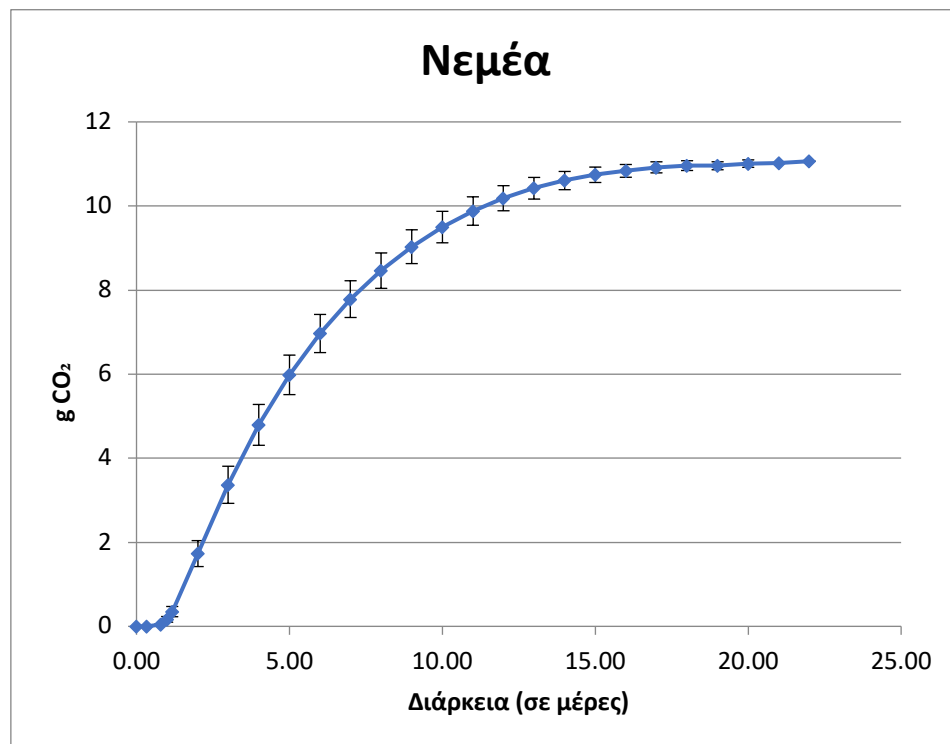
διαφορετικό (και συνήθως μικρότερο) σύνολο «νέων» μεταβλητών οι οποίες προκύπτουν από τον γραμμικό συνδυασμό των «αρχικών» μεταβλητών.

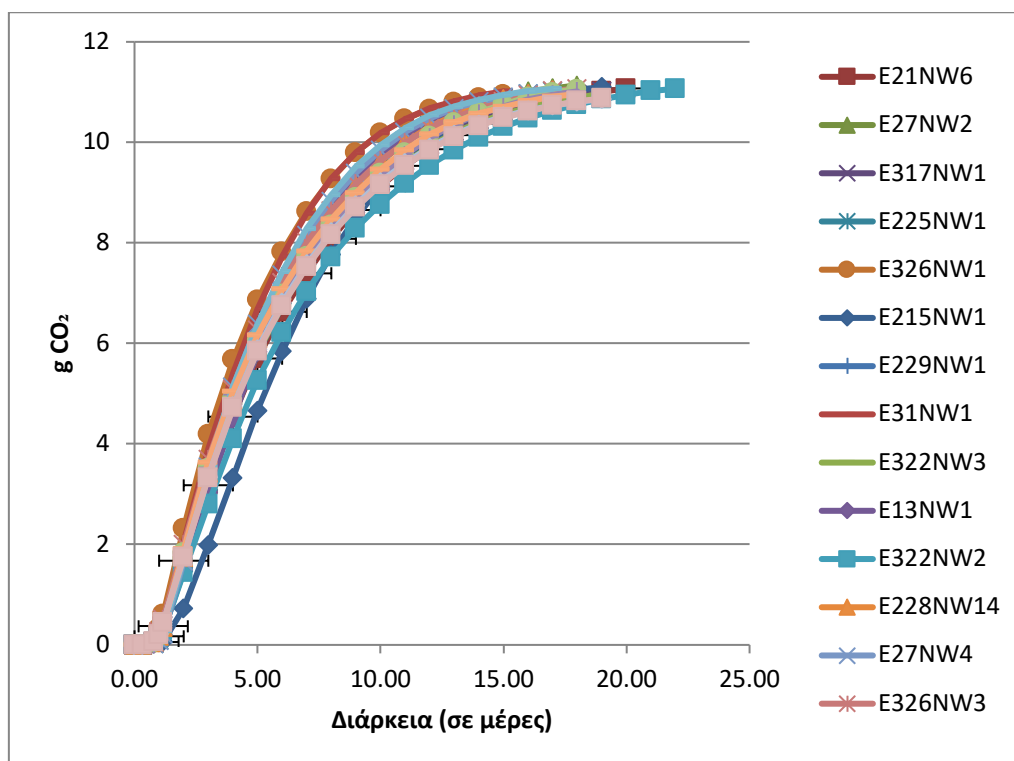
Οι παραπάνω αναλύσεις υλοποιήθηκαν με το λειτουργικό PAST (PAleontological STatistics), ένα λογισμικό για την ανάλυση παλαιοντολογικών δεδομένων, το οποίο όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και από άλλα πεδία επιστημών, όπως οικονομικά, μηχανολογία, βιολογία καθώς και άλλους κλάδους (Hammer et al., 2001).

Αποτελέσματα

Συνολικά αξιολογήθηκαν 20 διαφορετικοί γονότυποι *S.cerevisiae*, σε μικροζυμώσεις εργαστηριακής κλίμακας. Η διερεύνηση πραγματοποιήθηκε έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν οι οινολογικοί φαινότυποι επηρεάζονται από διαφορετικούς γονότυπους *S.cerevisiae*.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων διαπιστώθηκε ότι όλοι οι γονότυποι εμφάνισαν παρόμοια ζυμωτική απόδοση με τιμές 11g CO₂/110ml υποδεικνύοντας την πλήρη ζύμωση των αρχικά 200g σακχάρων στο γλεύκος. Η διάρκεια των ζυμώσεων κυμαινόταν από 15 έως 20 μέρες υποδηλώνοντας έτσι χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των απομονώσεων *S.cerevisiae*, με εξαίρεση το στέλεχος Nem9 που εμφάνισε μεγαλύτερη διάρκεια ζύμωσης. Το pH όλων των ζυμώσεων ήταν κατά μέσο όρο στο 3, η πτητική οξύτητα στο 0,4g οξικού οξέος / L και η ολική οξύτητα στα 7g τρυγικού οξέος / L. Οι κινητικές της ζύμωσης των στελεχών *S.cerevisiae*, που απομονώθηκαν από αμπελώνες της Νεμέας εικονίζονται στο σχήμα 1&2.





ΣΧΗΜΑ 1&2: Κινητικές ζυμώσεις στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* από την περιοχή της Νεμέας.

Τα βασικά οινολογικά (pH, πτητική οξύτητα, ολική οξύτητα) και κινητικά χαρακτηριστικά των διαφορετικών γονότυπων *S. cerevisiae* που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Κινητικά και οινολογικά χαρακτηριστικά στελεχών.

Στελέχη	pH	Πτητική οξύτητα g/L	Ολική οξύτητα g/L	Παραγωγή gCO ₂ /24h	Παραγωγή gCO ₂ /48h	Παραγωγή gCO ₂ /72h	Ολικό CO ₂	Διάρκεια (σε μέρες)
Nem1	3,05±0,00 7	0,6±0,07	7,3±0	0,25±0,007	1,00±0,01	1,2±0,02	11,1±0,02	18±0
Nem2	3,11±0,00 7	0,4±0	7,1±0,007	0,18±0,007	0,85±0,007	1,08±6,59	11,0±0,007	19±0
Nem3	3,12±0,02	0,6±0	7,1±0,01	0,10±0,02	0,81±0,06	1,08±0,07	11,0±0,007	17±0,7
Nem4	3,07±0,00 7	0,6±0,07	7,4±0,05	0,32±0,03	1,16±0,06	1,40±0,05	10,9±0,01	15±0
Nem5	3,1±0,007	0,5±0	7,1±0,03	0,12±0	0,85±0,03	1,12±0,04	11,1±0,01	18±0,7
Nem6	3,11±0,00 7	0,3±0	6,8±0,04	0,16±0,02	1,03±0,2	1,30±0,2	11,1±0,05	16±1,4

Nem7	3,1±0	0,4±0,08	7,0±0	0,19±0	0,86±0,0 07	1,10±0,0 07	11,0±0,05	19±0
Nem8	3,1±0,01	0,5±0,08	6,9±0, 03	0,11±0, 007	0,74±0,0 3	1,01±0,0 4	11,0±0,05	17±0
Nem9	3,1±0	0,4±0	7,1±0, 02	0,13±0, 007	0,72±0,0 3	0,93±0,0 4	11,1±0,02	22±0
Nem10	3,08±0,00 7	0,4±0	7,1±0, 008	0,18±0, 03	0,87±0,0 2	1,14±0,0 2	11,1±0,03	17±0,7
Nem11	3,07±0	0,3±0	7,3±0, 008	0,09±0	0,83±0,0 2	1,18±0,0 2	11,0±0	16±0
Nem12	3,08±0	0,6±0	7,4±0, 04	0,27±0, 01	1,00±0,0 4	1,23±0,0 4	11,1±0,03	18±0
Nem13	3,1±0,007	0,4±0,08	7,0±0, 02	0,15±0	0,92±0,0 2	1,17±0,0 2	11,1±0,03	18±0
Nem14	3,11±0	0,4±0,08	7,0±0, 008	0,11±0	0,87±0,0 1	1,17±0,0 2	11,0±0,02	18±0
Nem15	3,1±0	0,6±0	7,1±0, 04	0,13±0	0,86±0,0 2	1,18±0,0 2	11,1±0,00 7	17±0
Nem16	3,15±0,00 7	0,5±0	7,1±0, 02	0,18±0, 01	0,95±0,0 3	1,21±0,0 3	11,0±0,03	18±0
Nem17	3,09±0	0,4±0	7,1±0	0,22±0, 01	0,88±0,0 07	1,11±0,0 1	11,0±0,04	19±0
Nem18	3,08±0,00 7071	0,4±0	7,1±0, 008	0,20±0, 02	0,87±0,0 5	1,11±0,0 4	11,0±0,03	19±0
Nem19	3,07±0,00 7	0,4±0	7,1±0, 03	0,17±2	0,84±0,0 04	1,06±0,0 03	11,1±0,01	20±0
Nem20	3,06±0,00 7	0,4±0	6,8±0, 02	0,04±0, 007	0,36±0,0 07	0,66±0,0 1	11,1±0,01	19±0

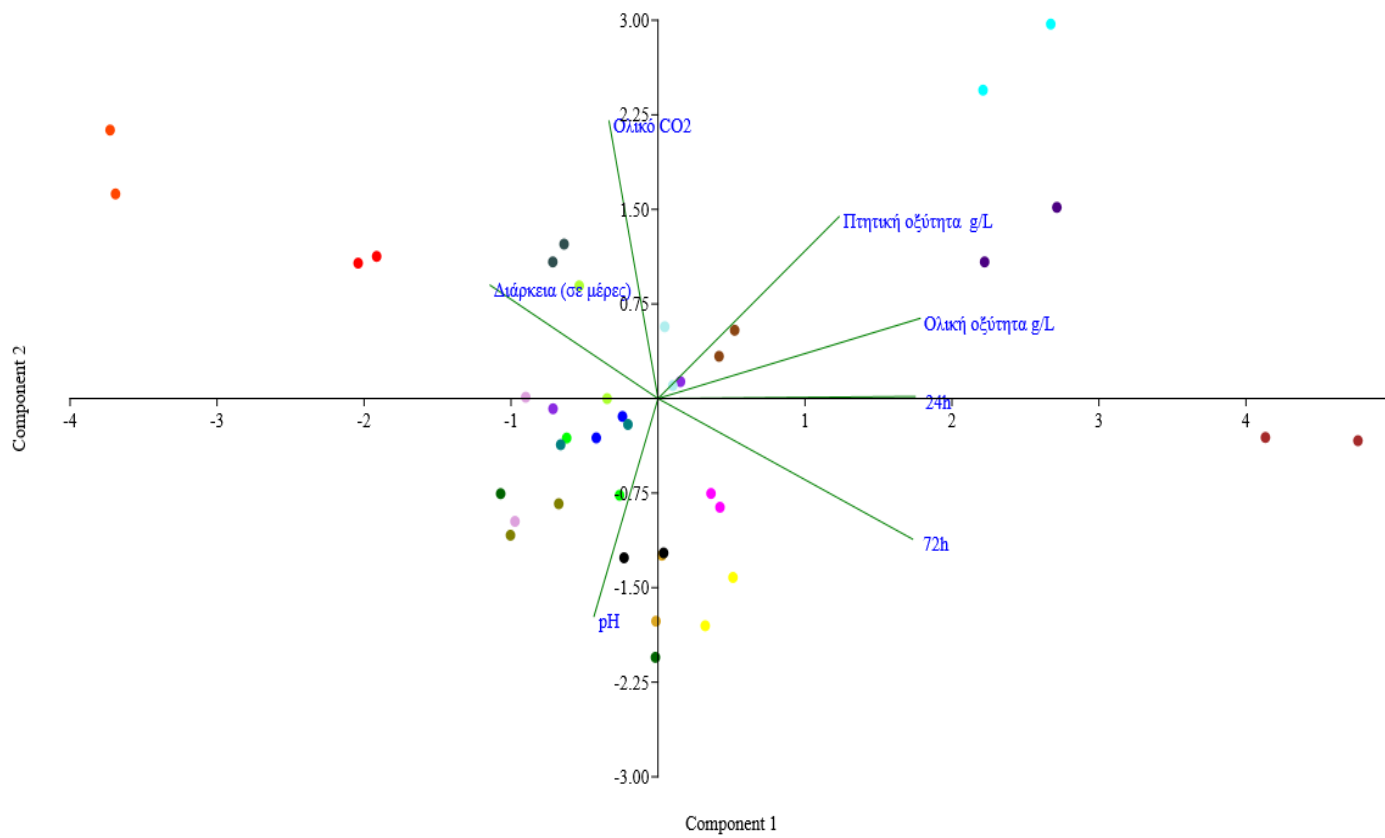
Όλες οι ζυμώσεις ολοκληρώθηκαν, σύμφωνα με μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν από την κα Χαλβαντζή εκτός της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Τα υπολειπόμενα σάκχαρα ήταν σε κάθε περίπτωση < 3,6 g/L.

Οι αναλύσεις ANOVA αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*, ως προς τον κάθε παράγοντα που μελετήθηκαν (διάρκεια της ζύμωσης, το pH, την ολική και πτητική οξύτητα και τέλος το ολικό διοξείδιο). Αναλυτικότερα, η ανάλυση ANOVA έδειξε σημαντικές αποκλίσεις στο pH (F=18.25 & p=0.0001), στην ολική οξύτητα (F=11.24 & p=0.0004), στην πτητική οξύτητα (F=27.62 & p=0.0001), στην παραγωγή CO₂ ανά 24h (F=48.4 & p=0.0001), στην παραγωγή CO₂ ανά 72h (F=33.66 & p=0.0001), στο ολικό CO₂ (F=12.71 & p=0.0001) και στη διάρκεια της ζύμωσης (F=24.73 & p=0.0001).

Λαμβάνοντας υπόψη όλους τους παράγοντες που αναλύθηκαν(διάρκεια της ζύμωσης, το pH, την ολική και πτητική οξύτητα και τέλος το ολικό διοξείδιο), η ανάλυση PERMANOVA αποκάλυψε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* που μελετήθηκαν($F=18.34$ & $p=0.0001$).

Τα κινητικά και οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *S.cerevisiae* από την αμπελουργική ζώνη της Νεμέας αναλύθηκαν με την ανάλυση των κύριων συνιστωσών (PrincipalComponentAnalysis - PCA)(Εικόνα 7). Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες αντιστοιχούσαν στο 60,6% (40.2% και 20.4% για PC1 και PC2, αντίστοιχα) της συνολικής μεταβλητότητας. Τα περισσότερα από τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* που μελετήθηκαν βρίσκονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο μοιράζοντας αρνητικές τιμές στο PC2 για το pH. Τα στελέχη E322NW2-A, E322NW2-B, E215NW1-A, E215NW1-B, E21NW6-A και E21NW6-B διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα στελέχη για τη διάρκεια της ζύμωσης και το ολικό CO₂ έχοντας θετικές στο PC2. Τα στελέχη E27NW2-A, E27NW2-B, E326NW1-A, E326NW1-B, E326NW3-A, E326NW3-B, E330NW10-A και E330NW10-B με θετικές τιμές κατά μήκος του PC1 για την πτητική οξύτητα και την ολική οξύτητα.

ΕΙΚΟΝΑ 2: Διαγραμματική αναπαράσταση της στατιστικής διαδικασίας PCA.



E27NW2-A	●	E27NW4-A	●
E27NW2-B	●	E27NW4-B	●
E317NW1-A	●	E326NW3-A	●
E317NW1-B	●	E326NW3-B	●
E225NW1-A	●	E330NW9-A	●
E225NW1-B	●	E330NW9-B	●
E326NW1-A	●	E228NW2-A	●
E326NW1-B	●	E228NW2-B	●
E229NW1-A	●	E330NW10-A	●
E229NW1-B	●	E330NW10-B	●
E31NW1-A	●	E31NW2-A	●
E31NW1-B	●	E31NW2-B	●
E322NW3-A	●	E312NW16-A	●
E322NW3-B	●	E312NW16-B	●
E13NW1-A	●	E312NW20-A	●
E13NW1-B	●	E312NW20-B	●
E322NW2-A	●	E21NW6-A	●
E322NW2-B	●	E21NW6-B	●
E228NW14-A	●	E215NW1-A	●
E228NW14-B	●	E215NW1-B	●

ΕΙΚΟΝΑ 3: Πίνακας διαγραμματικής αντιστοίχισης στελεχών.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, για την εκπόνηση της παραπάνω πτυχιακής εργασίας, μελετήθηκαν 20 διαφορετικά στελέχη *S.cerevisiae* από τη σημαντική οινολογική περιοχή της Νεμέας-Κορινθίας. Η έρευνα είχε ως στόχο να αναδείξει την υψηλή ποιότητα και τον τοπικό χαρακτήρα που μπορεί να προσδώσει στους οίνους η χρήση γηγενών ζυμών του γένους *Saccharomyces cerevisiae*, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και όχι εμπορικών ζυμών.

Κατά τη διάρκεια της έρευνας το κάθε στέλεχος και μία επανάληψη του, μελετήθηκαν ως προς τα οινολογικά και ζυμωτικά τους χαρακτηριστικά. Μελετήθηκαν ως προς το pH, την πτητική και την ολική τους οξύτητα, καθώς επίσης παρατηρήθηκαν και το παραγόμενο CO₂, η μεταβολή του βάρους τους και η διάρκεια της ζύμωσης σε καθένα από αυτά. Βάση των αποτελεσμάτων των παραπάνω μετρήσεων, έγιναν αναλύσεις ANOVA, PERMANOVA και PCA μέσω του προγράμματος PAST. Οι αναλύσεις αυτές έδειξαν ότι τα στελέχη μεταξύ τους, αλλά και ως προς τον κάθε παράγοντα ξεχωριστά, φέρουν σημαντικές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, το μεγαλύτερο μέρος των στελεχών έχει χαμηλές τιμές pH, εντός των επιθυμητών ορίων, χαρακτηριστικό που καθιστά τους οίνους πιο ανθεκτικούς στην ανάπτυξη βακτηρίων και οργανοληπτικά τους προσδίδει πιο “τραγανή” γεύση. Ορισμένα από τα στελέχη μοιράζονται υψηλές τιμές πτητικής και ολικής οξύτητας, γεγονός που μπορεί να καταστήσει την χρήση ανεπιθύμητη, καθώς οι οίνοι που θα παράγονταν από ζύμωση με τα συγκεκριμένα στελέχη, πιθανότατα να ήταν πιο ευάλωτοι σε αλλοιώσεις, οξειδωση και οργανοληπτικά να έφεραν ανεπιθύμητα όξινη γεύση. Τέλος, κάποια από τα στελέχη φέρουν παρόμοιες τιμές ως προς τη διάρκεια της ζύμωσης και το ολικό CO₂, φέροντας έτσι πανομοιότυπη ζυμωτική ικανότητα.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από την Nisiotou et al. (2018), διαπιστώθηκε ότι η χρήση γηγενών στελεχών *S.cerevisiae* σε συνδυασμό με *non Saccharomyces* στελέχη ως εκκινητές ζύμωσης, οδηγεί σε οίνους με χημικά διαφοροποιημένα προφίλ και τους προσδίδει τοπικά χαρακτηριστικά. Σε μία άλλη έρευνα, που πραγματοποιήθηκε από την Nisiotou et al. (2019), διαπιστώθηκε ότι η χρήση ενός *non Saccharomyces* στελέχους ως εκκινητή καλλιέργειας, σε συνδυασμό με επιλεγμένο γηγενές *S.cerevisiae* στέλεχος θα μπορούσε να ενισχύσει τα τυπικά ανθικά και φρουτώδη αρώματα της ποικιλίας «Μοσχοφίλερο». Οι Suzzi et al.(2011) διερεύνησαν την επίδραση των γηγενών στελεχών *S.cerevisiae* στην ποιότητα του ερυθρού οίνου Montepulciano d'Abruzzo. Για την επιστημονική τους μελέτη

χρησιμοποίησαν επιλεγμένα γηγενή στελέχη *S.cerevisiae* ως εκκινητές των ζυμώνσεων. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι κάποια από τα επιλεγμένα στελέχη-εκκινητές με υψηλή ζυμωτική ικανότητα, έχουν τη δυνατότητα να κυριαρχήσουν στο γλεύκος καλύτερα από άλλες φυσικές ζύμες του οίνου, ενώ ορισμένα μπορούν να συμβιώσουν και να αλληλεπιδράσουν με άλλες γηγενής ζύμες στο γλεύκος κατά τη ζύμωση. Οίνοι που παρήχθησαν από ζύμωση με γηγενή στελέχη παρουσίασαν ορισμένα διαφορετικά χαρακτηριστικά, σύμφωνα με χημικές και οργανοληπτικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν. Τα αυτόχθονα στελέχη ζύμης παρήγαγαν οίνους με διαφορετικά πτητικά προφίλ, μερικά από τα οποία ήταν πλούσια σε αλκοόλες και κάποια άλλα σε φρουτώδεις εστέρες. Επομένως, μπορεί να υπάρξει θετική ή αρνητική επίδραση στην ποιότητα του κρασιού και για το λόγο αυτό πρέπει να γίνεται προσεκτική επιλογή ζυμών για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών των παραδοσιακών οίνων. Οι Nikolaou et al.(2006) σε αυθόρμητες ζυμώσεις των ποικιλιών «Ξινόμαυρο» και «Μοσχάτο Αμβούργου», μελέτησαν την χλωρίδα των γηγενών στελεχών ζυμών. Εκατόν δέκα στελέχη απομονώθηκαν, από τα οποία ογδόντα τέσσερα ταυτοποιήθηκαν ως *S.cerevisiae* και από αυτά έξι επιλέχθηκαν να μελετηθούν ως εκκινητές ζύμωσης. Η ποιότητα των παραγόμενων κρασιών αξιολογήθηκε μετά τον προσδιορισμό των αρωματικών ενώσεων και την οργανοληπτική ανάλυση. Οι ζυμώσεις αποκάλυψαν την επίδραση των επιλεγμένων στελεχών στην παραγωγή ποιοτικών οίνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορές στις παραγόμενες ποσότητες πτητικών ενώσεων (αλκοόλ, εστέρες, καρβονυλικές ενώσεις, λιπαρά οξέα) μεταξύ των στελεχών, που οδήγησαν σε διαφορετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Στους περισσότερους παραγόμενους οίνους, η αντίληψη του φρουτώδους αρώματος ήταν δυνατός. Αυτό το γεγονός σχετιζόταν με υψηλά επίπεδα εστέρων, όπως οξικός ισοαμυλεστέρας και οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας. Η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε και απέδειξε τη σημαντικότητα της χρήσης επιλεγμένων στελεχών ζυμών για την παραγωγή οίνων με επιθυμητά χαρακτηριστικά (Regodon et al., 1997 ; Perez-Coello et al., 1999). Σε μελέτη που διεξήχθη από τους Feng et al.(2020) σχετικά με τη δυναμική του πληθυσμού των ζυμών κατά την αυθόρμητη ζύμωση «Icewine (Eiswein)» και την επιλογή γηγενών στελεχών *S.cerevisiae* για την οινοποίηση στο Qilian της Κίνας, επτά είδη από πέντε γένη συμπεριλαμβανομένου του *S.cerevisiae*, ταυτοποιήθηκαν από τη μορφολογία αποικίας. Ο *S.cerevisiae* ήταν στα κυρίαρχα είδη, αντιπροσωπεύοντας σχεδόν το 87% των συνολικών απομονώσεων των ζυμομυκήτων. Όλα τα επιλεγμένα στελέχη

S.cerevisiae μπόρεσαν να ολοκληρώσουν τις ζυμώσεις και οι οινολογικές και χημικές παράμετροι ήταν εντός των αποδεκτών ορίων της οινοποιίας. Κάποιο από τα στελέχη παράγαγε οξέα χαμηλής πτητικότητας και το αντίστοιχο «Icewine» παρουσίασε υψηλότερες τιμές σε ορισμένα αρωματικά. Οι οίνοι «Icewine» που παράχθηκαν με ορισμένα από τα στελέχη ήταν ανώτερης οργανοληπτικής ποιότητας και τα στελέχη αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εκκινήτες για τη βελτίωση του τοπικού χαρακτήρα των οίνων. Οι Carpece et al. (2019) επέλεξαν και μελέτησαν 16 γηγενή στελέχη *S.cerevisiae*, με σκοπό την ωφέλιμη στρατηγική της διατήρησης των τυπικών χαρακτηριστικών του οίνου Primitivo. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι τα γηγενή στελέχη έτειναν να κυριαρχούν και ότι η αρωματική ποιότητα των οίνων επηρεάστηκε έντονα.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι, τα γηγενή στελέχη *S.cerevisiae* από την οινολογική περιοχή της Νεμέας, πιθανώς να μπορούσαν να δώσουν οίνους με ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και ξεχωριστούς φαινοτύπους που θα αναδείκνυαν τοπικό χαρακτήρα, υποστηρίζοντας την ύπαρξη μικροβιακής όψης στο *terroir*. Ενδείκνυται να γίνει περαιτέρω έρευνα, με σκοπό την καλύτερη αναγνώριση των γηγενών στελεχών και των χαρακτηριστικών που προσδίδουν στους παραγόμενους οίνους, ώστε να γίνει ανάλυση της τοπικής οινολογικής ταυτότητας. Η χρήση γηγενών στελεχών *S.cerevisiae* με ιδιότυπους φαινοτύπους ως εναρκτήριες καλλιέργειες στην οινοποίηση θα μπορούσε να αποτελέσει ισχυρό εργαλείο για τη βελτίωση της ποιότητας των οίνων.

Βιβλιογραφία

- Τσακίρης, Α. Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί. Εκδόσεις Ψύχαλου **1998**, 173-174, 259.
- Anderson, M., J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **2001**, 26(1):32-46.
- Bagheri, B., Bauer, F.F., Setati, M.E. The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations. *Front. Microbiol* **2017**, 8:1988.
- Borren, E. & Tian, B. The important contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to the aroma complexity of wine: A review. *Foods* **2021**, 10(1):13.
- Capece, A., Pietrafesa, R., Siesto, G., Romaniello, R., Condelli, N., Romano, P. Selected Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains as Profitable Strategy to Preserve Typical Traits of Primitivo Wine. *Fermentation* **2019**, 5(4):87.
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International journal of food microbiology* **2005**, 99(3): 237-43.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* **2011**, 28(5):839-1110.
- Davenport, R.R. Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis* **1974**, 13:123-130
- De Villiers, A., Alberts, P., Tredoux, A.G., Nieuwoudt, H.H. Analytical techniques for wine analysis: an African perspective; a review. *Anal Chim Acta* **2012**, 730:2-23.
- De Zamaroczy, M. & Bernardi, G. Sequence organization of the mitochondrial genome of yeast- a review. *Gene* **1985**, 37:1-17.
- Doolittle, W.F. Lateral genomics. *Trends Cell Biol* **1999**, 9:M5-8.

Drew, C.H. Grape breeding & enology project. Practical high-acidity winemaking strategies for the Midwest **2017**. (19/1/2017): <https://www.prairiefirewinery.com/Cellar/wp-content/uploads/2017/01/high-acidity-winemaking-5.0-KC-ver-pdf.pdf>

Escott, C. , Loira, I. , Morata, A. , Suárez-Lepe J.A., Bañuelos, M. A. Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy. *Yeast - Industrial Applications* **2017**, 4.

Feng, L., Wang, J., Ye, D., Song, Y., Qin, Y., Liu, Y. Yeast population dynamics during spontaneous fermentation of icewine and selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the winemaking in Qilian, China. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2020**, 100(15):5385-5394.

Futcher, A.B. The 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1988**, 4:27–40.

Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **1998**, 440:325–331.

Galeote, V., Novo, M., Salema-Oom, M., Brion, C., Valério, E., Gonçalves, P., Dequin, S. FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H⁺ symporter. *Microbiology* **2010**, 156(12):3754–3761.

García-Ríos, E., Gutiérrez, A., Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Guillamon, J.M. The Fitness Advantage of Commercial Wine Yeasts in Relation to the Nitrogen Concentration, Temperature, and Ethanol Content under Microvinification Conditions. *American Society for Microbiology Journals* **2014**, 80(2):704–713.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. Life with 6000 genes. *Science* **1996**, 274(5287):546, 563-7.

Hagman, A., Säll, T., Compagno, C., Piskur, J. Yeast ‘make-accumulate-consume’ life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLoS One* **2013**, 8(7):e68734.

Hall, C., Brachat, S., Dietrich, F.S. Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **2005**, 4(6):1102–1115.

Heard, G.M. & Fleet, G.H. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl Environ Microbiol* **1985**, 50:727-728.

Holzappel, W. Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits **2014**, 440-441.

Ihmels, J., Bergmann, S., Gerami-Nejad, M., Yanai, I., McClellan, M., Berman, J., Barkai, N. Rewiring of the yeast transcriptional network through the evolution of motif usage. *Science* **2005**, 309:938–940.

Ilieva, F., Petrov, K., Veličkovska, S.K., Gunova, N., Dimovska, V., Rocha, J.M.F., Esatbeyoglu, T. Influence of Autochthonous and Commercial Yeast Strains on Fermentation and Quality of Wines Produced from Vranec and Cabernet Sauvignon Grape Varieties from Tikveš Wine-Growing Region, Republic of North Macedonia **2021**, 11, 6135.

Jim, H. & Thomas, H. Managing high acidity in grape must and wine **2010**. (13/10/2010): <https://wine.wsu.edu/2010/10/13/managing-high-acidity/>

Jeromel, A., et al (2019). An Influence of Different Yeast Species on Wine Aroma Composition. *Fermented Beverages*, 171–285.

Kaufmann, J. & Schering, A. Analysis of Variance AN OVA **2014**.

Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., Villa, T.G. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am J Enol Vitic* **1991**, 42:141-144.

Madeline, P. *Wine Folly: The Essential Guide to Wine* **2015**, 32–33.

Martini, A., Ciani, M., Scorzetti, G. Direct Enumeration and Isolation of Wine Yeasts from Grape Surfaces **1996**, 47:435-440

Mendes, S.D.C., Arcari, S.G., Werner, S.S., Valente, P., Ramirez-Castrillon, M. Wild *Saccharomyces* Produced Differential Aromas of Fermented Sauvignon Blanc Must. *Fermentation* **2022**, 8:177.

Mina, M., & Tsaltas, D. Contribution of Yeast in Wine Aroma and Flavour. *Yeast - Industrial Applications* **2017**, 5.

Mora, J. & Mulet, A. Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. *Am J Enol Vitic* **1991**, 42:133-136

Morata, A. & Loira, I. Influence of Yeasts in Wine Colour. *Grape and Wine Biotechnology* **2016**,13.

Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G., Polsinelli, M. Genome renewal: A new phenomenon revealed from an examination of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentations of grape musts. *Yeast* **1994**, 10:1543-1552.

Mota-Gutierrez, J., Barbosa-Pereira, L., Ferrocino, I., Cocolin, L. Traceability of functional volatile compounds generated on inoculated Cocoa fermentation and its potential health benefits. *Nutrients* **2019**, 11:884.

Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., & Tzanetakis, N. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology* **2006**, 23(2):205–211.

Nisiotou, A., Sgouros, G., Mallouchos, A., Nisiotis, C.S., Michaelidis, C., Tassou, C., Banilas, G. The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. *Food Research International* **2018**, 111:498–508.

Nisiotou, A., Mallouchos, A., Tassou, C., Banilas, G. Indigenous Yeast Interactions in Dual-Starter Fermentations May Improve the Varietal Expression of Moschofilero Wine. *Frontiers in microbiology* **2019**, 10:1712.

Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels* **2008**, 1(1):7.

Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P. Past and future of non-Saccharomyces yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol* **2016**, 7:411.

Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.S., Hatziloukas, E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology* **2020**, 6(1):1–31.

Pascal, R. G., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition* **2006**, 239.

Paul, J. C., & Isak S. Pretorius . Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Rep* **2010**, 11:914-920.

Peña, R. & Ganga, M.A. Novel antimicrobial peptides produced by *Candida intermedia* LAMAP1790 active against the wine-spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Antonie Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol* **2019**, 112:297–304.

Pérez-Coello, M.S., Pérez, A.I., Iranzo, J.F., & Álvarez, P.J. Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiol* **1999**, 16:563–573.

Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Mozina, S.S., Cadez, N. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia, *International Journal of Food Microbiology* **2006**, Volume 109:1–2, 97-102.

Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS yeast research* **2004**, 4:865-77.

Pronk, J.T., Yde Steensma, H., Van Dijken, J.P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1996**, 12:1607–1633.

Ramirez, M., Perez, F., Regodon, J.A. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol* **1997**, 14:247–254.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, 75(1):149-64.

Ronald, S. J. Fermentation. *Wine science* **2014**, 427-524.

Rosini, G., Federici, F., Martini A. Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbial Ecology* **1982**, 8(1):83–89.

Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O.P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., Piskur, J. Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat Commun* **2011**, 2:302.

Mónaco, S. M. D. , Curilen, Y. , Carmen Maturano, R. D. , Bravo, S. M. E. , Caballero, A. B. S. A. C. The Use of Indigenous Yeast to Develop High-Quality Patagonian Wines. *Grape and Wine Biotechnology* **2016**, 15.

Suzzi, G., Arfelli, G., Schirone, M., Corsetti, A., Perpetuini, G., Tofalo, R. Effect of grape indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains on Montepulciano d’Abruzzo red wine quality. *Food Research International* **2012**, 46(1):22–29.

Thomson, J.M., Gaucher, E.A., Burgan, M.F., De Kee, D.W., Li, T., Aris, J.P., Benner, S.A. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Genet* **2005**, 37:630–635.

Wickner, R.B. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Reviews* **1996**, 60:250–265.

Wolfe, K.H., Shields, D.C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **1997**, 387:708–713.

Wood, V., Rutherford, K.M., Ivens, A., Rajandream, M.A., Barrell, B. A re-annotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Comp Funct Genomics* **2001**, 2(3):143-54.

Zilelidou, E.A. & Nisiotou, A. Understanding Wine through Yeast Interactions. *Microorganisms* **2021**, 9:1620.