



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

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Οινολογικό δυναμικό στελεχών του είδους *Metschnikowia pulcherrima*  
απομονωμένων από Ελληνικούς αμπελώνες

ΜΠΙΡΝΙΟ ΕΙΡΗΝΗ

ΑΜ: 18685036

Επιβλέπων

Όνοματεπώνυμο: ΜΠΑΝΙΛΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2024



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**  
**SCHOOL OF FOOD SCIENCE**  
**DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES**

**BACHELOR THESIS**

**Enological potential of**  
***Metschnikowia pulcherrima* strains**  
**isolated from vineyards in Greece**

**EIRINI BIRNIO**

**Registration Number: 18685036**

**Supervisor**

**name and surname: BANILAS GEORGIOS**

**ATHENS, 2024**



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

**ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με  
τίτλο:  
«Οινολογικό δυναμικό στελεχών του είδους *Metschnikowia pulcherrima* απομονωμένων από  
Ελληνικούς αμπελώνες»  
και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

<b>Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	
<b>Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	
<b>Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα Μπίρνιο Ειρήνη του Μιχάλη, με αριθμό μητρώου 18685036 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  
Μπίρνιο Ειρήνη



(Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή)

## Περίληψη

Οι γηγενείς ζύμες των σταφυλιών έχουν την ιδιότητα να προσδίδουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στον οίνο. Ωστόσο, η συνεχής χρήση εμπορικών στελεχών ζυμομυκήτων επισκιάζει την έκφραση των αυτόχθονων ζυμών στο τελικό προϊόν. Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην καλύτερη κατανόηση των σχέσεων που υπάρχουν μεταξύ της γεωγραφικής προέλευσης και του οινολογικού δυναμικού ζυμωτικών στελεχών απομονωμένων από δύο διαφορετικές αμπελουργικές ζώνες, των Πεζών και της Νεμέας. Απώτερος στόχος είναι η αξιοποίηση της φυσικής μικροχλωρίδας ζυμών μέσω της χρήσης ιθαγενών στελεχών στην αλκοολική ζύμωση γλευκών για την ανάπτυξη γευστικά βελτιωμένων, τοπικών οίνων. Για τη διερεύνηση των παραπάνω, έγινε σύγκριση του οινολογικού δυναμικού 40 στελεχών ζυμών του είδους *Metschnikowia pulcherrima*, 21 εκ των οποίων αποτελούσαν απομονώσεις από την αμπελουργική ζώνη της Νεμέας και 19 από των Πεζών. Πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακές μικροοινοποιήσεις με το κάθε στέλεχος ξεχωριστά και οι οίνοι που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε χημικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό της μεταβολής της οξύτητάς τους (pH, ολική οξύτητα, πτητική οξύτητα). Μέσω του πειράματος αναδείχθηκε η ικανότητα της *M. pulcherrima* να μειώνει την τελική πτητική οξύτητα των οίνων και η ποικιλομορφία των φαινοτύπων των διαφορετικών στελεχών. Αξιολογήθηκαν επίσης η πιθανότητα ύπαρξης μικροβιακού *terroir* στην περίπτωση αυτή και οι παράγοντες που συντελούν στην έκφρασή του.

**Λέξεις κλειδιά:** *Metschnikowia pulcherrima*, *non-Saccharomyces*, αλκοολική ζύμωση, τοπικός οίνος, οξύτητα, μικροοινοποίηση, ιθαγενές στέλεχος, ζύμες *terroir*, ελληνικός αμπελώνας

## Abstract

Indigenous yeasts of grapes have the attribute of giving special characteristics to wine. However, the constant use of commercial yeast strains overshadows the expression of indigenous yeasts in the final product. The present study aims to better understand the relation between the geographical origin and the oenological potential of strains isolated from two different viticultural zones, Peza and Nemea. The ultimate goal is to utilize the natural yeast microflora through the use of native strains in the alcoholic fermentation of musts for the development of taste-enhanced, local wines. In order to investigate the above, a comparison of the oenological potential of 40 yeast strains of the species *Metschnikowia pulcherrima* was made, 21 of which were isolates from the viticultural zone of Nemea and 19 of Peza. Laboratory microfermentations were conducted with each strain separately and the resulting wines were subjected to chemical analyses to determine the change in their acidity (pH, total acidity, volatile acidity). Through the experiment, the ability of *M. pulcherrima* to reduce the final volatile acidity of wines and the diversity of the phenotypes of the different strains were demonstrated. The possibility of a microbial terroir in this case and the factors contributing to its expression were also evaluated.

**Keywords:** *Metschnikowia pulcherrima*, non-*Saccharomyces*, alcoholic fermentation, local wine, acidity, microvinification, indigenous strain, terroir yeasts, greek vineyard

## Ευχαριστίες

*Για την υλοποίηση της παρούσας εργασίας οφείλω να ευχαριστήσω αρχικά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ Μπανίλα Γεώργιο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση του θέματος και την ευκαιρία που μου έδωσε να αναπτύξω τις γνώσεις μου εκτελώντας τη στα εργαστήρια του τμήματος οίνου του ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ (ΙΤΑΠ). Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Δρ Νησιώτου Ασπασία, κύρια ερευνήτρια του ινστιτούτου οίνου, η οποία ως συνεπιβλέποντας συνέβαλε με την καθοδήγηση και τις χρήσιμες υποδείξεις της στην άρτια ολοκλήρωση της εργασίας.*

*Ακόμη, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της ερευνητικής ομάδας του ΙΤΑΠ, τη Χαλβαντζή Ιωάννα και τον Μαρμαρά Ιωάννη, για την πολύτιμη συνεισφορά τους στη διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της εργασίας όπου συνέβαλαν με την εμπειρία τους αλλά και με την υπομονή που έδειξαν στη μεταλαμπάδευση των γνώσεων τους.*

*Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στα πρόσωπα που ήταν δίπλα μου καθόλη την πορεία μου στην απόκτηση του πρώτου τίτλου σπουδών μου, οι οποίοι με τη στήριξή τους συντέλεσαν στην πραγματοποίηση αυτού του έργου.*

*Ειρήνη Μπίρνιο*

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	iii
Abstract .....	iv
Ευχαριστίες .....	v
Περιεχόμενα .....	vi
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 ΖΥΜΕΣ .....</b>	<b>3</b>
Προέλευση ζυμών .....	4
Θρεπτικές απαιτήσεις ζυμών .....	5
Η αλκοολική ζύμωση .....	8
Συνθήκες ζύμωσης- Έλεγχος ανάπτυξης .....	8
Ζύμες <i>terroir</i> .....	11
Επιλογή ζύμης .....	13
Η <i>Metschnikowia pulcherrima</i> στην οινοποίηση .....	14
<b>2.2 Ο ΟΞΙΝΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ .....</b>	<b>15</b>
Τα οξέα του οίνου .....	16
pH .....	16
Πτητική οξύτητα .....	16
Ολική οξύτητα .....	17
<b>3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ .....</b>	<b>21</b>
Διαθλασιμετρία .....	22
Αφομοιώσιμο άζωτο (YAN) .....	22
Ελεύθερο και ολικό διοξείδιο του θείου .....	23
Ενεργός οξύτητα (pH) .....	24
Ολική οξύτητα .....	24
Πτητική οξύτητα (με ρεύμα υδρατμών) .....	25
<b>4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ &amp; ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>27</b>
Καμπύλες ζύμωσης .....	28
<b>4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>33</b>
<b>5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>36</b>





# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## *Η χρήση των ζυμών στην οινοποίηση*

«Οίνος» ονομάζεται το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με πλήρη ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών, είτε αυτά έχουν υποστεί έκθλιψη είτε όχι, ή γλεύκους σταφυλιών (EUR-lex, 2013) και αποτελεί ένα από τα αρχαιότερα αλκοολούχα ποτά (Gutiérrez-Escobar et al., 2021). Το κρασί αποτελεί μέρος του ανθρώπινου πολιτισμού εδώ και 6.000 χρόνια, εξυπηρετώντας διατροφικές, κοινωνικές και θρησκευτικές λειτουργίες. Η παραγωγή του λαμβάνει χώρα σε κάθε ήπειρο και η χημική του σύνθεση επηρεάζεται βαθιά από τις οινολογικές τεχνικές, την ποικιλία σταφυλιών από την οποία προέρχεται και τους κλιματολογικούς παράγοντες (Soleas et al., 1997).

Η σωστή επιλογή ποικιλίας αμπέλου, καθώς και οι πρακτικές ζύμωσης και οινοποίησης ήταν μέχρι πρόσφατα ο κεντρικός πυλώνας γύρω από τη μελέτη της παραγωγής ενός ποιοτικού οίνου (Snow, 1983). Ο ρόλος των ζυμών στην αλκοολική ζύμωση είναι η μετατροπή του γλεύκους σε οίνο, και καθιερώθηκε στα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Πριν ο ρόλος των ζυμών στην οινοποίηση γίνει αποδεκτός, υπήρχε η αντίληψη ότι η ζύμωση οφειλόταν αποκλειστικά και μόνο σε χημικές αντιδράσεις χωρίς τον παράγοντα της κυτταρικής δραστηριότητας. Ο Louis Pasteur απέδειξε ότι οι ζύμες ήταν υπεύθυνες για την αυθόρμητη ζύμωση του γλεύκους σταφυλιών (Ribéreau-Gayon et al., 2005; Pasteur, 1879). Η συμβολή των ζυμών στην αλκοολική ζύμωση έχει καθοριστικό ρόλο για τα τελικά αρωματικά και γευστικά συστατικά του οίνου. Ο αριθμός των ενώσεων που ενισχύουν το αρωματικό προφίλ του οίνου προέρχεται στη συντριπτική του πλειοψηφία από τα μεταβολικά προϊόντα των ζυμών (Soleas et al., 1997).

Η χρήση εκκινητών ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* ήταν καθιερωμένη από τις αρχές της δεκαετίας του 1980. Σήμερα, το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής κρασιού βασίζεται στη χρήση εμπορικών στελεχών, τα οποία έχουν απομονωθεί από αμπελώνες ή οινοποιεία και έχουν επιλεγεί για τις ιδιότητές τους για οινοποίηση. Αυτό μειώνει τον κίνδυνο αργών ή κολλημένων ζυμώσεων καθώς και μικροβιακής μόλυνσης. Η χρήση επιλεγμένων στελεχών *S. cerevisiae* έχει βελτιώσει σημαντικά την αξιοπιστία της διαδικασίας ζύμωσης και την ποιότητα των οίνων (Valero et al., 2007).

Παρά το γεγονός ότι όλο και περισσότερο χρησιμοποιούνται καλλιεργημένες ζύμες, μερικοί οινοποιοί προτιμούν να βασίζονται σε ζύμες που απαντώνται φυσικά στο οινοποιείο για να ξεκινήσουν τη ζύμωση χωρίς τη χρήση εμβολίου, επιστρέφοντας στην αυθόρμητη διεξαγωγή της (Clarke και Bakker, 2004). Αυτό συμβαίνει λόγω της προσπάθειας ικανοποίησης της ζήτησης των καταναλωτών για κρασιά που φέρουν ανέπαφο τοπικό χαρακτήρα και της διατήρησης της ποικιλομορφίας ανάμεσα στα στυλ κρασιών (Lambrechts και Pretorius, 2000). Όμως, η φυσική διαθεσιμότητα στελεχών ζυμών που διαθέτουν ιδανικό συνδυασμό οινολογικών χαρακτηριστικών είναι εξαιρετικά απίθανη. Επιπλέον, επιλεγμένα στελέχη *S. cerevisiae* παράγουν συνήθως κρασιά που στερούνται πολυπλοκότητας και γεύσης και έχουν υπερβολικά τυποποιημένο και συνηθισμένο αρωματικό προφίλ. Τα αδύναμα σημεία του *S. cerevisiae* έφεραν την ανάγκη για την εξερεύνηση νέων επιλογών καλλιεργειών εκκίνησης της ζύμωσης (Rainieri και Pretorius, 2000).

Ιστορικά, οι ζύμες *non-Saccharomyces* θεωρούνταν μικροοργανισμοί αλλοίωσης λόγω της παραγωγής οξικού οξέος, οξικού αιθυλεστέρα και ακεταλδεϋδης (Comitini et al., 2011). Ωστόσο, πολλά είδη *non-Saccharomyces* επαναξιολογούνται ως θετικοί παράγοντες που

συμβάλλουν στην ποιότητα του οίνου (Lambrechts και Pretorius, 2000; Jolly et al., 2014), με αυξημένη αρωματική πολυπλοκότητα και μοναδικά οργανοληπτικά προφίλ σε σύγκριση με οίνους που έχουν υποστεί ζύμωση μόνο με *S. cerevisiae* (Varela, 2016). Η ζύμωση από αυτόχθονες ζύμες που υπάρχουν σε μια συγκεκριμένη οινοπαραγωγική περιοχή μπορεί να δώσει οίνους με σύνθετες οινολογικές ιδιότητες, λόγω της παραγωγής διαφόρων συνδυασμών πτητικών ενώσεων (Clemente-Jimenez et al., 2014).

Η καλή γνώση των ειδών και στελεχών ζυμών που διεξάγουν την αλκοολική ζύμωση καθώς επίσης και της κινητικής της ανάπτυξης τους καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης είναι απαραίτητα για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι ζύμες επηρεάζουν την ποιότητα του οίνου και την ανάπτυξη νέων προοπτικών στη στιλιστική ποικιλομορφία του (Fleet, 2008). Οι μικροοργανισμοί που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη ανήκουν στο είδος *Metschnikowia pulcherrima*. Έχει βρεθεί ότι το συγκεκριμένο είδος *non-Saccharomyces* ζυμών μπορεί να συμβάλει ευεργετικά στην ποιότητα του οίνου ρυθμίζοντας τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών και την απελευθέρωση διαφορετικών εξωκυτταρικών ουσιών, μερικές από τις οποίες ενισχύουν την απελευθέρωση ποικιλιακών αρωματικών ενώσεων (Morata et al., 2019).

Στην εργασία μελετάται το ονομαζόμενο «μικροβιακό terroir» και η συμβολή ιθαγενών στελεχών στα χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου. Αναλυτικότερα, εξετάζονται στελέχη του είδους *M. pulcherrima*, απομονωμένα από αμπελώνες των αμπελουργικών ζωνών των Πεζών και της Νεμέας, ως προς το δυναμικό μεταβολής της οξύτητας του οίνου (ολική οξύτητα, pH, πτητική οξύτητα) μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Εξετάζεται η πιθανή συσχέτιση του οινικού προφίλ μίας περιοχής με τα τοπικά στελέχη ζυμών που συμμετέχουν στην διαδικασία παραγωγής του οίνου. Αναλύονται, επίσης, οι διαφορές και οι ομοιότητες μεταξύ των δύο περιοχών.

Η ανάγκη για καινοτομία στον οινολογικό τομέα πηγάζει τόσο από το διεθνή ανταγωνισμό στην αμπελοοινική αγορά, όσο και από τις απαιτήσεις των καταναλωτών για νεότερα στυλ κρασιών. Η αποσαφήνιση του οινολογικού δυναμικού των αυτόχθονων στελεχών ζύμης συντελεί στην καλύτερη αξιοποίησή τους μέσω της επιλογής τους ως καλλιέργειες εκκίνησης ζύμωσης ή μέσω της συνδυαστικής τους χρήσης μαζί με άλλα στελέχη ζυμών, αλλά και στη βαθύτερη κατανόηση της αναπόφευκτης συνεισφοράς τους στη μεταφορά του τοπικού χαρακτήρα στους παραγόμενους οίνους.

## 2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### 2.1 ΖΥΜΕΣ

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι, ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που ταξινομούνται ως «μύκητες». Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση ανήκουν γενικά στο γένος των *Saccharomyces* (Clarke και Bakker, 2004). Αποτελούν τους πιο απλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Ribéreau-Gayon et al. 2005). Η ταξινόμηση των ζυμομυκήτων μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, τον τρόπο αναπαραγωγής τους ή και τα φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά (Sonali, 2018). Οι πρώτες ταξινομήσεις βασίστηκαν στις φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των ζυμομυκήτων: σχήμα και μέγεθος κυττάρων, σχηματισμός σπορίων, χαρακτήρες αποικιών, ζύμωση και αφομοίωση διαφορετικών σακχάρων, αφομοίωση νιτρικών, ανάγκες αυξητικού παράγοντα και αντοχή στην κυκλοεξιμίδη (Ribéreau-Gayon et al. 2005).

Περισσότερα από 40 από τα 1500 γνωστά είδη ζύμης έχουν απομονωθεί από γλεύκος σταφυλιών (Jolly et al., 2014). Τα γένη στα οποία ανήκουν οι ζύμες που φιλοξενεί το γλεύκος είναι κυρίως τα *Hanseniaspora* (*anamorph Kloeckera*), *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* και *Saccharomyces* (Fleet, 2008). Άλλα είδη ζυμομυκήτων με πολύ περιορισμένη ανοχή στην αλκοόλη μπορούν επίσης να βρεθούν σε μικρότερες αναλογίες (Fleet και Heard, 1993). Οι ζύμες σχηματίζουν μια πολύπλοκη και ετερογενή ομάδα που βρίσκεται σε τρεις κατηγορίες μυκήτων, τους Ασκομύκητες, τους Βασιδιομύκητες και τους ατελείς μύκητες ή Δευτερομύκητες, μη σποροφόρες ζύμες, ανίκανες να αναπαραχθούν. Οι περισσότερες ζύμες που βρίσκονται στην επιφάνεια του σταφυλιού ανήκουν στους ασκομύκητες (Ribéreau-Gayon et al. 2005). Τα απλοειδή σπόρια ή ασκοσπόρια της κατηγορίας των ασκομυκήτων περιέχονται στον ασκό, έναν τύπο σάκου που παράγεται από βλαστικά κύτταρα. Σε αυτούς τους οργανισμούς, το ζυγωτό αναπτύσσεται μέσα στον ασκό, ενώ ο πυρήνας υφίσταται δύο μειωτικές διαιρέσεις, που συχνά ακολουθούνται από μία ή περισσότερες μιτωτικές διαιρέσεις. Ένα τοίχωμα σχηματίζεται γύρω από κάθε θυγατρικό πυρήνα και το κυτταρόπλασμα που τον περιβάλλει για να δημιουργήσει τέσσερα ασκοσπόρια μέσα στον ασκό. Ο ασκός στη συνέχεια σπάει και απελευθερώνει τα ασκοσπόρια, τα οποία μπορούν να βλαστήσουν και να παράγουν νέα βλαστικά κύτταρα (Ribéreau-Gayon et al. 2005). Το κύτταρο ζύμης περιέχει κυτταρικούς φακέλους, ένα κυτταρόπλασμα με διάφορα οργανίδια και έναν πυρήνα που περιβάλλεται από μια μεμβράνη και περικλείει τα χρωμοσώματα. Περιέχει δύο κυτταρικούς φακέλους: το κυτταρικό τοίχωμα και τη μεμβράνη. Ο περιπλασματικός χώρος είναι ο χώρος μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης. Τα κυτταρικά περιβλήματα ζύμης παίζουν ουσιαστικό ρόλο: συμβάλλουν στην επιτυχή αλκοολική ζύμωση και απελευθερώνουν ορισμένα συστατικά που προσθέτουν στη σύνθεση του κρασιού που προκύπτει (Ribéreau-Gayon et al. 2005).

Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται προκειμένου να παραχθούν αλκοολούχα ποτά, μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: σε *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces* (Jolly et al., 2006).

#### *Ζύμες Saccharomyces*

Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση ανήκουν συνήθως στο γένος *Saccharomyces*, με κύριο είδος το *cerevisiae* που έχει ορισμένα μοναδικά χαρακτηριστικά (Clarke και Bakker, 2004). Ο *S. cerevisiae*, όπως και άλλες σποροφόρες ζύμες που ανήκουν στην κατηγορία των ασκομυκήτων, μπορεί να πολλαπλασιαστεί είτε αγενώς, με αγενή πολλαπλασιασμό, είτε εγγενώς, σχηματίζοντας ασκοσπόρια (Ribéreau-Gayon et al. 2005). Ο *Saccharomyces*

*cerevisiae*, αντλεί το μεγαλύτερο μέρος της μεταβολικής του ενέργειας από γλυκόζη και φρουκτόζη και έχει περιορισμένη ικανότητα ζύμωσης άλλων ουσιών (Soleas et al., 1997). Είναι ένα είδος ζυμομύκητα που ειδικεύεται στα μεταβολικά μέσα που έχουν υψηλή σακχαροπεριεκτικότητα και μικρές ποσότητες αζωτούχων ενώσεων (Suárez-Lepe και Morata, 2012), επίσης έχει ανοχή στην αιθανόλη έως 15% v/v, τοξική ένωση για του περισσότερους άλλους μικροοργανισμούς (Clarke και Bakker, 2004).

### **Ζύμες non-Saccharomyces**

Οι ζύμες *non-Saccharomyces* είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία κρασιού και μεταξύ των μικροβιολόγων του οίνου, ο οποίος περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά είδη ζυμών. Αυτοί οι ζυμομύκητες ανήκουν είτε στους ασκομύκητες είτε στους βασιδιομύκητες και αναπαράγονται κυρίως με εκβλάστηση ή σχάση (Kurtzman et al. 2011). Τα *non-Saccharomyces* στελέχη είναι παρόντα τόσο σε αυθόρμητες όσο και σε ελεγχόμενες ζυμώσεις στους οίνους (Jolly et al., 2006). Συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με τα σταφύλια πριν από τη συγκομιδή και συναντώνται στα αρχικά στάδια της ζύμωσης, αλλά, γενικά, δεν είναι ικανά να ολοκληρώσουν την αλκοολική ζύμωση (Contreras, et al., 2014), κυρίως επειδή δεν είναι αρκετά ζωηρά ή ανταγωνιστικά σε οινολογικές συνθήκες. Επομένως, τα στελέχη αυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτοδύναμα ως καλλιέργειες εκκίνησης στις ζυμώσεις οίνου (Rainieri και Pretorius, 2000). Στη διαδικασία της οινοποίησης είναι τα πρώτα που ξεκινούν τη ζύμωση (Fugelsang και Edwards, 2007). Στην πραγματικότητα, πολλές *non-Saccharomyces* ζύμες πιστεύεται ότι έχουν χαμηλότερες ανοχές στην αιθανόλη σε σύγκριση με τις *Saccharomyces* (Deak and Beuchat, 1996). Η ευαισθησία των *non-Saccharomyces* ζυμών στην αιθανόλη περιορίζεται στο 5-6%. Σε αυτό το σημείο σταματάει η ικανότητα μεταβολισμού τους και θανατώνονται λόγω των δύσκολων συνθηκών (Fugelsang και Edwards, 2007). Οι ζύμες *non-Saccharomyces* θεωρούνται ότι συμβάλουν στην πολυπλοκότητα και στην απόδοση πρόσθετης γεύσης στο κρασί (Borren και Tian, 2021).

### **Επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά**

Η συνεισφορά των ζυμομυκήτων στην οινοποίηση είναι καθοριστική για το τελικό προϊόν, τον οίνο (Jolly et al., 2006). Ο ρόλος των ζυμών στην παραγωγή κρασιού, μετατρέποντας το γλεύκος σε οίνο, υπερβαίνει την απλή μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη, καθώς μια μεγάλη ποικιλία μεταβολικών οδών που προέρχονται από μικροβιακή ποικιλομορφία που σχετίζεται με τη ζύμωση του κρασιού εμπλέκεται στην παραγωγή χιλιάδων πτητικών και μη πτητικών ενώσεων που αποτελούν τις τελικές αισθητηριακές ιδιότητες ενός οίνου (Belda et al., 2017). Το λεγόμενο αρωματικό «μπουκέτο» του οίνου αποτελείται από τις πιο σύνθετες γευστικές ενώσεις του που εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της ζύμωσης, της ωρίμανσης και της παλαίωσης (Lambrechts και Pretorius, 2000).

### **Προέλευση ζυμών**

Ο Louis Pasteur απέδειξε ότι ένα ποσοστό των ζυμών του κρασιού προέρχεται από τον φλοιό των ραγών των σταφυλιών (Pasteur, 1879). Με μεθόδους έντονης πλύσης και ανάλυσης, έχει υπολογιστεί συγκέντρωση  $3 \times 10^5$  κυττάρων ζύμης  $\text{cm}^{-2}$  στην επιφάνεια των σταφυλιών (Rosini et al., 1982). Η επιφάνεια των υγιών σταφυλιών έχει την κυριαρχία των γενών *Aureobasidium*, *Metschnikowia*, *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Cryptococcus* και *Rhodotorula* ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας (Fleet, 2003). Η αλλαγή των γενών στην επιφάνεια των σταφυλιών που συμβαίνει κατά την ωρίμανση ακολουθεί ένα μοτίβο πρώιμης κυριαρχίας ξεκινώντας από τις βασιδιομυκητώδεις ζύμες, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridium* και *Rhodotorula*, και κατά την πρώιμη ωρίμανση, δίνουν τη θέση της, καθώς ο καρπός ωριμάζει, στους

ασκομύκητες, και ιδιαίτερα στα είδη *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* και *Candida*. Σε περίπτωση σχάσης της ράγας, που μπορεί να συμβεί αργότερα στην ωρίμανση λόγω φυσικών ή βιολογικών παραγόντων, οι ασκομύκητες, καθώς επίσης και οι κοινές ζύμες ζύμωσης όπως οι Σακχαρομύκητες, αποκτούν ακόμα μεγαλύτερο μερίδιο στην κυριαρχία στην επιφάνεια της ράγας. Τα κύρια είδη που εντοπίζονται στην επιφάνεια των σταφυλιών είναι τα κύρια είδη που απαντώνται κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Η πλήρης κατανόηση της χλωρίδας που υπάρχει κατά την παραγωγή του οίνου είναι σημαντική για τον καθορισμό των κατάλληλων στρατηγικών επεξεργασίας για την επίτευξη της επιθυμητής σύνθεσης του τελικού προϊόντος (Bisson και Joseph, 2009).

Άλλο ένα σημαντικό μέρος των ζυμών προέρχεται από τη χλωρίδα του ίδιου του οινοποιείου. Η μικροβιακή χλωρίδα συχνά επικαλύπτει επίσης τοίχους, εξωτερικές επιφάνειες βαρελιών, λάστιχα και αποχετεύσεις (König et al., 2009). Σε έρευνα που διεξάχθηκε από τους (Parle και Di Menna, 1966) εξετάστηκε η προέλευση των ζυμομυκήτων που ευθύνονται για την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους σταφυλιών. Θεωρήθηκε ότι η πηγή των ειδών ζύμης που βρέθηκαν στο γλεύκος ήταν το ίδιο το οινοποιείο. Τα στελέχη που βρέθηκαν ήταν πολύ σπάνια στο έδαφος του αμπελώνα και δεν ανακτήθηκαν από θραύσματα φλοιού και κλαδιά αμπέλων που συλλέχθηκαν το χειμώνα. Ο φορέας με τον οποίο τα είδη ζύμωσης έφταναν στα ώριμα σταφύλια ήταν πιθανώς έντομα (Parle και Di Menna, 1966). Πηγές απροσδόκητου εμβολιασμού μπορούν να βρεθούν ακόμα και κατά το στάδιο της παλαίωσης του οίνου στο βαρέλι. Η διαδικασία αυτή γίνεται συνήθως υπό συνθήκες υγρασίας οι οποίες ευνοούν τον πολλαπλασιασμό μικροοργανισμών. Οι συγκεκριμένες συνθήκες προτιμώνται καθώς βοηθούν να αποφευχθεί η απώλεια όγκου κρασιού που οφείλεται στην εξάτμιση (König et al., 2009).

Το πρωτόκολλο υγιεινής που ακολουθείται όπως και οι πρακτικές συμπλήρωσης με θρεπτικά συστατικά αποτελούν όλα παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροχλωρίδα του οινοποιείου (König et al., 2009). Σε συνθήκες εργαστηριακής καλλιέργειας εξασφαλίζεται να γίνει η αποστείρωση του εξοπλισμού. Ο στόχος της αποστείρωσης είναι να σκοτώσει ή να απομακρύνει φυσικά όλους τους ζωντανούς μικροοργανισμούς και τα αναπαραγωγικά σπόρια (κονιδιοσπόρια μυκήτων, ασκοσπόρια ζύμης ή βακτηριακά ενδοσπόρια). Η αποστείρωση των εργαστηριακών μέσων και εξοπλισμού μπορεί να επιτευχθεί με έκθεση σε α) βραστό νερό, β) συνδυασμένη υψηλή θερμοκρασία και πίεση (αυτόκλειστο), γ) ξηρή θερμότητα, δ) φυσική απομάκρυνση (διήθηση) ή ε) χημικές ουσίες (Fugelsang και Edwards, 2007).

### **Θρεπτικές απαιτήσεις ζυμών**

Το γλεύκος σταφυλιών είναι ένα πολύπλοκο μέσο που περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων. Ωστόσο, η ποικίλη σύνθεση των διαφόρων γλευκών, εκτός του ότι είναι ζωτικής σημασίας για τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, επηρεάζει τη δυναμική ανάπτυξης της ζύμης. Η διαθεσιμότητα ορισμένων θρεπτικών ουσιών μπορεί να λειτουργήσει ως περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη (Carrascosa et al., 2011). Τα μέσα στα οποία οι ζύμες έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να ζυμώνουν, πάντα περιέχουν πηγή αφομοιώσιμων σακχάρων, ανόργανων αλάτων και αζωτούχων οργανικών ενώσεων που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξή τους (Stern, 1899).

### **Σάκχαρα**

Τα σάκχαρα αποτελούν την πηγή της αλκοόλης και άλλων υποπροϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης. Συμβάλουν στις οργανοληπτικές ιδιότητες και στη θρεπτική αξία των κρασιών (Clarke και Bakker, 2004). Τα κύρια σάκχαρα σταφυλιών είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη και

εμφανίζονται σε περίπου ίσες αναλογίες κατά την ωρίμανση, ενώ τα υπερώριμα σταφύλια έχουν συχνά υψηλότερο ποσοστό φρουκτόζης (Soleas et al., 1997). Όλες οι «άγριες» ζύμες χρησιμοποιούν για την ανάπτυξή τους γλυκόζη, μαννόζη και φρουκτόζη. Διαφορετικά είδη μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιούν πολλά άλλα σάκχαρα και οργανικά οξέα. Ορισμένες ζύμες μπορούν να χρησιμοποιήσουν νιτρικά άλατα, άλλες μόνο άλατα αμμωνίου καθώς και ένα ευρύ φάσμα οργανικών αζωτούχων ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων τόσο των L- όσο και των D-αμινοξέων (LaRue και Spencer, 1968). Ενώ ο *S. cerevisiae* συνήθως δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει πεντόζες (Kurtzman et al. 2011), ορισμένοι ζυμομύκητες *non-Saccharomyces* μειώνουν τον κίνδυνο μικροβιακής αλλοίωσης μεταβολίζοντας τα σάκχαρα αυτά που δεν χρησιμοποιούνται από τον *S. cerevisiae* (Fugelsang και Edwards, 2007). Οι (Kurtzman et al. 2011) σημείωσαν ότι διαφορετικά στελέχη του *M. pulcherrima* ποικίλλουν στην ικανότητά τους να μεταβολίζουν πεντόζες.

### **Αρχική συγκέντρωση σακχάρων**

Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων είναι μια σημαντική παράμετρος, καθώς έχει άμεση επίδραση στο ρυθμό ζύμωσης. Η συνολική συγκέντρωση σακχάρων είναι γενικά μεταξύ 170 και 220 g/L και αντιστοιχεί σε κρασιά με δυνητικό αλκοολικό τίτλο μεταξύ 10 – 13 % vol. Γενικά, ο ρυθμός ζύμωσης αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης σακχάρων μέχρι ένα ορισμένο επίπεδο. Η ζύμωση είναι αργή σε γλεύκη με χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, ενώ η ταχύτητά της αυξάνεται στη συγκέντρωση 15-20 g σακχάρων ανά λίτρο και παραμένει σταθερή μέχρι περίπου τα 200 g/L. Πάνω από αυτή τη συγκέντρωση, η ζύμωση επιβραδύνεται. Όταν η συγκέντρωση σακχάρων είναι υπερβολικά υψηλή, υπερβαίνει την ικανότητα πρόσληψής τους από τα μικροβιακά κύτταρα. Με την υπερβολικά υψηλή συγκέντρωση σακχάρων εμποδίζεται η ανάπτυξη των ζυμών και μειώνεται ο μέγιστος πληθυσμός (Ribéreau-Gayon et al. 2005; Laopaiboon et al., 2007). Δεδομένου ότι δεν υπάρχει αιθυλική αλκοόλη στα νωπά σταφύλια ή στο γλεύκος, η περιεκτικότητα των σακχάρων από τα οποία προέρχεται κατά τη ζύμωση χρησιμοποιείται, επίσης, για την πρόβλεψη της τελικής περιεκτικότητας του οίνου σε αιθανόλη ή, αλλιώς, για την εκτίμηση του δυνητικού αλκοολικού τίτλου υποθέτοντας ότι η ζύμωση θα είναι πλήρης (Clarke και Bakker, 2004). Η αυξημένη παραγωγικότητα και απόδοση αιθανόλης μπορεί να επιτευχθεί με υψηλότερη αρχική συγκέντρωση σακχάρων, αλλά χρειάζεται περισσότερος χρόνος ζύμωσης με αποτέλεσμα να αυξάνεται το κόστος της διαδικασίας. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα δεδομένα, η βέλτιστη συγκέντρωση σακχάρων στη ζύμωση προσδιορίστηκε ως 24 ° Bx (ισοδύναμη με 190,0 g / L) (Laopaiboon et al., 2007). Υπάρχει μια βέλτιστη αναλογία στα γλεύκη μεταξύ της συγκέντρωσης μικροοργανισμών και της συγκέντρωσης σακχάρων στα 30,0 g / L και 200,0 g / L, αντίστοιχα (Louhichi et al., 2013).

### **Επιλογή μεταβολισμού**

Η ζύμη μπορεί να καταβολίσει τα σάκχαρα χρησιμοποιώντας δύο μεταβολικές οδούς: την αλκοολική ζύμωση και την κυτταρική αναπνοή, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Ειδικότερα, οι ζύμες υποβάλλονται σε αναπνοή ή ζύμωση με βάση την παρουσία ή την απουσία οξυγόνου ή / και γλυκόζης. Αυτές οι δύο διαδικασίες ξεκινούν με τον ίδιο τρόπο, μέσω της γλυκόλυσης. Η συγκεκριμένη σειρά αντιδράσεων, μετατρέποντας τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό με το σχηματισμό ATP, αποτελεί μια σχεδόν καθολική οδό στα βιολογικά συστήματα (Ribéreau-Gayon et al. 2005; Fugelsang και Edwards, 2007). Η ποσότητα και η δραστηριότητα των ενζύμων είναι καθοριστικοί παράγοντες της ρύθμισης του μεταβολισμού των μικροοργανισμών. Χάρη τη ρυθμιστική ικανότητα των ενζύμων αντιμετωπίζονται τα προβλήματα διαθεσιμότητας θρεπτικών ουσιών αποκτώντας τον κατάλληλο κάθε φορά μεταβολισμό (Entian και Barnett, 1992). Οι ζυμομύκητες *Saccharomyces* είναι προαιρετικά

αναερόβιοι, ικανοί να καταναλώνουν σάκχαρα απουσία οξυγόνου πιο αποτελεσματικά από τους *non-Saccharomyces* (Visser et al., 1990).

### **Δευτερογενή προϊόντα**

Ο Louis Pasteur έδειξε την επίδραση του οξυγόνου στην αφομοίωση των σακχάρων από ζύμες καθώς επίσης και τη δυνατότητα παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών όπως γλυκερόλη, πέρα από αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Έχει βρεθεί ότι όσο μεγαλύτερο το ποσοστό σακχάρων στο γλεύκος τόσο περισσότερο οξικό οξύ (και γλυκερόλη) παράγεται από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση (Ribéreau-Gayon et al. 2005; Pasteur, 1879). Αυτό συμβαίνει λόγω του μηχανισμού προσαρμογής που έχουν οι ζύμες σε μέσα με υψηλή σακχαροπεριεκτικότητα. Ο *S. cerevisiae* αυξάνει την ενδοκυτταρική συσσώρευση γλυκερόλης για να αντισταθμίσει την οσμωτική πίεση του μέσου για να επιτευχθεί ένα εσωτερικό περιβάλλον που ευνοεί τη λειτουργία των ενζύμων και την ανάπτυξη του υπό την πίεση νερού (Blomberg και Adler, 1992). Αυτός ο μηχανισμός οδηγεί επίσης αύξηση του επιπέδου μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή γλυκερόλης (GPD1) (Attfield και Kletsas, 2000). Ο σχηματισμός οξικού οξέος είναι αναπόσπαστο κομμάτι της ζύμωσης γλευκών υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη γιατί συμβάλει στην ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική ισορροπία αναγεννώντας μειωμένα ισοδύναμα του NADH (Ribéreau-Gayon et al. 2005).

### **Πηγή αζώτου**

Η περιεκτικότητα σε άζωτο είναι σημαντική, δεδομένου ότι τείνει να είναι περιοριστική για την ανάπτυξη των περισσότερων ζυμών (Ingledeew και Kunkee, 1985). Η έλλειψη αζώτου αποτελεί την κύρια αιτία των αργών ή κολλημένων ζυμώσεων (Bisson, 1999). Επομένως, μπορεί να οδηγήσει σε κρασιά με υψηλά υπολειμματικά σάκχαρα, μεγαλύτερους χρόνους οινοποίησης και κινδύνους μικροβιακής μόλυνσης (Jiménez-Martí et al., 2007). Από την άλλη πλευρά, η υπερβολική συμπλήρωσή του μπορεί επίσης να αποτελέσει πρόβλημα μεταβάλλοντας τη μικροβιολογική σταθερότητα του οίνου (Beltran et al., 2005).

Η τυπική οινολογική μέθοδος για την πρόληψη αυτών των προβλημάτων είναι η έγκαιρη προσθήκη αλάτων αμμωνίου στο γλεύκος. Ο συνολικός χρόνος ζύμωσης μειώνεται, ανεξάρτητα από το χρόνο προσθήκης (Jiménez-Martí et al., 2007). Ωστόσο, ο χρόνος των προσθηκών αζώτου είναι σημαντικός. Μπορεί να επηρεάσει την απόδοση βιομάζας, την απόδοση της ζύμωσης, τα πρότυπα κατανάλωσης αμμωνίου και αμινοξέων και την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Beltran et al., 2005). Η προσθήκη αζώτου παρέχει NADH στη διαδικασία εξισορρόπησης οξειδοαναγωγής, όπου μειώνει τον σχηματισμό πτητικής οξύτητας. Η παραγωγή πτητικής οξύτητας συσχετίζεται αντιστρόφως με τον μέγιστο κυτταρικό πληθυσμό και την αφομοιώσιμη συγκέντρωση αζώτου. Όσο υψηλότερη η συγκέντρωση αζώτου, τόσο λιγότερη η παραγόμενη πτητική οξύτητα. Η προσθήκη αζώτου στο τέλος της φάσης ανάπτυξης έχει ελάχιστη κατανάλωση από τις ζύμες και μικρότερη επίδραση στη μείωση της πτητικής οξύτητας (Bely, Rinaldi, & Dubourdieu, 2003). Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται όταν προστίθεται άζωτο κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (Beltran et al., 2005; Bely et al., 2003). Η βέλτιστη συγκέντρωση αζώτου στο γλεύκος είναι 190 mg/L (Bely et al., 2003). Είναι κοινή πρακτική στα οινοποιεία να συμπληρώνουν τα γλεύκη σταφυλιών με φωσφορικό διαμμώνιο (DAP) για την πρόληψη προβλημάτων ζύμωσης που σχετίζονται με το άζωτο (Marks, 2003). Για τη διευκόλυνση της ανάπτυξης των ζυμομυκήτων, επιτρέπεται από την Ε.Ε. η προσθήκη όξινου φωσφορικού αμμωνίου ή θεικού αμμωνίου με όριο χρήσης, για τους περισσότερους οίνους, 1 g/l



εκφραζόμενο σε άλας, ή υδροχλωρικής θειαμίνης μέχρι 0,6g/L ή όξινου θειώδους αμμωνίου με όριο χρήσης 0,2g/l (EUR-lex, 2009, L 193/7).

## Η αλκοολική ζύμωση

Σύμφωνα με το γαλλικό λεξικό Robert (Robert, 1975), ο όρος «ζύμωση» σημαίνει τη χημική μοριακή αλλοίωση μιας ουσίας οργανικής προελεύσεως, η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ενζύμου, χωρίς το ίδιο να υφίσταται αλλοίωση. Η έννοια της «αλκοολικής ζυμώσεως» ορίζεται στο ίδιο λεξικό ως η αλλοίωση της ζάχαρης κατά τρόπο ώστε να λαμβάνεται οινόπνευμα (Walter Van, 1991). Η αλκοολική ζύμωση είναι ο αναερόβιος μετασχηματισμός σακχάρων, κυρίως γλυκόζης και φρουκτόζης, σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Αυτή η διαδικασία, η οποία διεξάγεται από ζυμομύκητες και επίσης από ορισμένα βακτήρια όπως το *Zymomonas mobilis*, μπορεί να συνοψιστεί από αυτή τη συνολική αντίδραση:

$C_6H_{12}O_6$  (γλυκόζη ή φρουκτόζη)  $\rightarrow$  2  $CH_3CH_2OH$  (αιθανόλη) + 2  $CO_2$  (διοξείδιο του άνθρακα) (Moreno-Arribas και Polo, 2008). Θεωρητικά, 1 g σακχάρου πρέπει να δώσει 0,51 g αιθανόλης και 0,49 g  $CO_2$ . Η πρακτική απόδοση όμως της αλκοολικής ζύμωσης είναι 0,46 g αιθανόλης και 0,44 g  $CO_2$  από 1 g σακχάρου (Stewart και Russell, 1986). Από βιοχημική σκοπιά, κατά τη ζύμωση του γλεύκους, ο *Saccharomyces cerevisiae* κατευθύνει το πυροσταφυλικό οξύ στην παραγωγή αιθανόλης προκειμένου να αναγεννηθεί το  $NAD^+$  που καταναλώνεται από τη γλυκόλυση (Moreno-Arribas και Polo, 2008). Υπό τυπικές συνθήκες ζύμωσης, η αιθανόλη μπορεί να φτάσει σε περιεκτικότητα 14-15%, αλλά γενικά οι συγκεντρώσεις αιθανόλης στο κρασί κυμαίνονται μεταξύ 10-13% (Soleas et al., 1997). Λόγω της έκλυσης  $CO_2$  κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ένας τρόπος για να ελεγχθεί η πορεία της είναι μέσω της μέτρησης της μεταβολής βάρους του μέσου. Υπό στατικές περιβαλλοντικές συνθήκες, η μεταβολή αυτή αντιστοιχεί στο παραγόμενο  $CO_2$ . Όταν παρατηρείται σταθερό βάρος για 3 συνεχόμενες ημέρες μπορεί να θεωρηθεί ότι η ζύμωση έχει ολοκληρωθεί (Comitini et al., 2011). Εκτός από την αιθανόλη, αρκετές άλλες ενώσεις παράγονται καθ' όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, όπως ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, γλυκερόλη, ηλεκτρικό οξύ, διακετύλιο, ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη (Moreno-Arribas και Polo, 2008). Η ζύμωση αυξάνει τη χημική και γευστική πολυπλοκότητα του κρασιού βοηθώντας στην εκχύλιση ενώσεων που προέρχονται από στερεά μέρη που υπάρχουν στο γλεύκος. Έτσι, τροποποιούνται ορισμένες ενώσεις που προέρχονται από σταφύλια και παράγεται σημαντική ποσότητα μεταβολιτών από τις ζύμες. Από τους μεταβολίτες που προέρχονται από τη ζύμη, οι αλκοόλες, τα οξικά και οι αιθυλεστέρες C4-C8 π-λιπαρών οξέων βρίσκονται στην υψηλότερη συγκέντρωση στο κρασί. Ενώ οι πτητικοί μεταβολίτες συμβάλλουν στο μπουκέτο ζύμωσης των νεαρών οίνων. Τα επίπεδα παραγωγής αυτών των υποπροϊόντων είναι μεταβλητά και ειδικά για το κάθε στέλεχος ζύμης (Lambrechts και Pretorius, 2000).

## Συνθήκες ζύμωσης– Έλεγχος ανάπτυξης

Η διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης και τα προϊόντα της μπορούν να επηρεαστούν από πλήθος παραγόντων. Ακόμα και σε ζυμώσεις μικρής κλίμακας, στη διεξαγωγή της ζύμωσης καθώς επίσης και στην απόδοση αιθανόλης μπορεί να συμβάλουν η θερμοκρασία, το pH, ο χρόνος ζύμωσης, ο ρυθμός ανάδευσης, η αρχική συγκέντρωση σακχάρων, η ποσότητα του εμβολίου και η παρουσία  $SO_2$  (Zabed, et al., 2014). Με τη διαχείριση των παραπάνω παραγόντων μπορεί να γίνει φυσικά ο έλεγχος της ζυμοτικής διαδικασίας. Έτσι, ενισχύουμε την παρουσία των επιθυμητών ζυμομυκήτων ώστε με τη δράση τους να συντελέσουν στα θετικά χαρακτηριστικά του οίνου (Jolly et al., 2014).

### **Ποσότητα εμβολίου**

Μετά τη συγκομιδή, η ανάπτυξη επιλεγμένων ειδών ζύμης στα σταφύλια ή στα γλεύκη επηρεάζεται από τις συνθήκες οινοποίησης. Αρχικά, οι πληθυσμοί σε γλεύκη/χυμούς μπορεί να κυμαίνονται μεταξύ  $10^4$  και  $10^6$  CFU/ml (Cordero-Bueso et al., 2013). Μόλις ξεκινήσει η ζύμωση, οι πληθυσμοί μπορούν να φτάσουν από  $10^6$  μέχρι και  $10^9$  CFU/ml μέσα σε λίγες ημέρες (Barata et al., 2012). Οι υψηλότερες πυκνότητες εμβολιασμού συντομεύουν την εκθετική φάση ανάπτυξης. Οι προκαλλιέργειες που προορίζονται για τον εγκλιματισμό των ζυμών αναπτύσσονται στο ίδιο υπόστρωμα και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό κάθε ζύμωσης. Η ποσότητα αρχικού εμβολίου ( $1 \times 10^6$  CFU/ml) είναι μία καλή αρχική ποσότητα που εξασφαλίζει την ολοκλήρωση της ζύμωσης (Comitini et al., 2011).

### **pH**

Η συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου (pH) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καλλιέργεια και τον εντοπισμό μικροοργανισμών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλεκτική προώθηση της ανάπτυξης ορισμένων έναντι άλλων (Fugelsang και Edwards, 2007). Γενικά, οι ζύμες προτιμούν ένα ελαφρώς όξινο μέσο με βέλτιστο pH ανάπτυξης μεταξύ 4,5 και 5,5. Ωστόσο, είναι ανθεκτικές σε ένα ευρύ φάσμα pH και αναπτύσσονται εύκολα σε τιμές pH μεταξύ 3 και 10, το pH που βρίσκεται στους περισσότερους χυμούς φρούτων, ποτών και αναψυκτικών. Το εύρος pH ανάπτυξης για ένα δεδομένο είδος εξαρτάται από το είδος του οξέος που διασπάται στο μέσο (Deak, 2006). Το σύνηθες εύρος pH που βρίσκεται στην οινοποίηση κυμαίνεται στο 3-3,8 (Manzanares et al., 1999). Σε χαμηλές θερμοκρασίες το ελάχιστο pH που επιτρέπει την ανάπτυξη είναι υψηλότερο (Deak, 2006). Η ισχυρότερη ανάπτυξη ζυμομυκήτων σε χαμηλό pH σε σύγκριση με τα βακτήρια οδηγεί στην κυριαρχία τους σε όξινα τρόφιμα. Πολύ λίγα είδη αναπτύσσονται σε pH 9,0 και ορισμένα είδη παρουσιάζουν ασθενή ή καθόλου ανάπτυξη σε pH 7,0 -7,5 (Kurtzman et al. 2011). Το χαμηλό pH ευνοεί την υδρόλυση των δισακχαριτών και, συνεπώς, τη ζύμωση. Επιπλέον, ο όξινος χαρακτήρας του γλεύκους εμποδίζει την εμφάνιση μικροοργανισμών που επιφέρουν αλλοίωση. Κατά συνέπεια, μερικές φορές προστίθενται οξέα όπως το τρυγικό οξύ (η προσθήκη 1 g / L, για παράδειγμα, μειώνει το pH κατά 0,1 μονάδες). Ωστόσο, η προσθήκη περίσσειας τρυγικού οξέος μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητο ίζημα (Carrascosa et al., 2011).

### **Θερμοκρασία**

Η θερμοκρασία είναι ο σημαντικότερος φυσικός παράγοντας στην ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και στην εξέλιξη της ζύμωσης (Fleet και Heard, 1993). Ο ρυθμός μετατροπής των σακχάρων είναι εξαρτημένος από αυτή (Clarke και Bakker, 2004). Μεσόφιλο θεωρείται το είδος του μικροοργανισμού που δρα με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 20-40°C (Kurtzman et al. 2011). Οι περισσότερες ζύμες είναι μεσόφιλες και αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 30°C (Deak, 2006; Battcock και Azam-Ali, 1998) Πολλά μικροβιολογικά εργαστήρια χρησιμοποιούν θερμοκλίβανους για τον έλεγχο των θερμοκρασιών ανάπτυξης (Fugelsang και Edwards, 2007). Όταν πρόκειται για επώαση ζυμών προτιμώνται θερμοκρασίες που κυμαίνονται σε αυτή την κλίμακα τιμών (Kurtzman et al. 2011).

Στην οινοποίηση συναντώνται, συνήθως, θερμοκρασίες εντός του εύρους 20-30°C (Manzanares et al., 1999). Στην κλίμακα μεταξύ 15 και 35°C, η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης και η καθυστέρηση πριν από την έναρξη της ζύμωσης μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Ταυτόχρονα, η κατανάλωση αζώτου από ζυμομύκητες αυξάνεται (Ribéreau-Gayon et al. 2005). Οι θερμοκρασίες  $\geq 30^\circ\text{C}$  αναστέλλουν την ανάπτυξη και το μεταβολισμό

ειδών όπως το *M. pulcherrima* (Kurtzman et al. 2011). Η βέλτιστη θερμοκρασία ζύμωσης για το *M. Pulcherrima* παρουσία  $\leq 0,4$  mg/L μοριακού SO<sub>2</sub> βρέθηκε να είναι 20°C (Carbon, 2022).

Η θερμοκρασία και το pH επηρεάζουν την παραγωγή διαφόρων πτητικών ενώσεων. Η επεξεργασία σε χαμηλότερη θερμοκρασία και υψηλότερο pH μπορεί να θεωρηθεί καλύτερη για τη ζύμωση του κρασιού. Οι επεξεργασίες σε χαμηλή θερμοκρασία (20 °C) παράγουν σχετικά υψηλότερα επίπεδα αιθυλεστέρων και οξικών εστέρων, ωστόσο, οι επεξεργασίες με υψηλό pH (3,9) παράγουν υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης αλλά σχετικά χαμηλότερα επίπεδα ανώτερων αλκοολών (Lu, et al., 2017). Όταν η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι ζύμες παράγουν αρωματικούς εστέρες (π.χ. οξικό ισοαμύλιο, οξικό ισοβουτύλιο) (Van Leeuwen, 2006). Τα λιπαρά οξέα, οι ανώτερες αλκοόλες και οι εστέρες τους επηρεάζονται επίσης από τη θερμοκρασία. Ο σχηματισμός τους είναι στο μέγιστο περίπου στους 20°C και στη συνέχεια μειώνεται προοδευτικά (Ribéreau-Gayon et al. 2005). Ωστόσο, υπερβολικά χαμηλές θερμοκρασίες δεν συνιστώνται, καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε κολλημένη ζύμωση όταν αρχίζει να επηρεάζεται η ρευστότητα της μεμβράνης της ζύμης (Bisson, 1999). Επιπλέον, με τη μείωση της θερμοκρασίας αυξάνεται ο χρόνος ζύμωσης (Clarke και Bakker, 2004). Η υπερβολικά αυξημένη θερμοκρασία δεν είναι επίσης επιθυμητή λόγω της ανάλογης αύξησης που προκαλεί στην τοξικότητα της αιθανόλης. Επιπλέον, οι υψηλότερες θερμοκρασίες οδηγούν στην εξάτμιση τόσο της αιθανόλης, όσο και άλλων πτητικών ενώσεων που είναι απαραίτητες για τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού. Στο εύρος θερμοκρασιών 15–20°C το άθροισμα όλων των δευτερογενών προϊόντων (γλυκερόλη, οξικό και ηλεκτρικό οξύ και ακεταλδεΐδη) αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας ζύμωσης. Ωστόσο, όταν η θερμοκρασία ξεπερνάει τους 20°C η συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης σταδιακά μειώνεται (Torija, 2003).

### **Διοξειδίο του θείου**

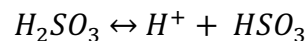
Το SO<sub>2</sub> αποτελεί ένα απαραίτητο βοήθημα στην οινοποίηση. Οι ζύμες παράγουν μικρές ποσότητες SO<sub>2</sub> κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Γενικά, η ποσότητα που σχηματίζεται σπάνια υπερβαίνει τα 10 mg/l, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να υπερβαίνει τα 30 mg/l. Οι κύριες ιδιότητές του είναι οι εξής: 1) Αντισηπτικό: αναστέλλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα στα βακτήρια από ό, τι στις ζύμες. 2) Αντιοξειδωτικό: παρουσία καταλυτών, δεσμεύεται με διαλυμένο το οξυγόνο. Προστατεύει τα κρασιά από χημικές οξειδώσεις, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στις ενζυματικές οξειδώσεις, οι οποίες είναι πολύ γρήγορες. 3) Αντιοξειδασικό: αναστέλλει στιγμιαία τη λειτουργία των ενζύμων οξειδώσεως (τυροσινάση, λακκάση) και μπορεί να εξασφαλίσει την καταστροφή τους με την πάροδο του χρόνου. 4) Δεσμεύοντας αιθανάλη και άλλα παρόμοια προϊόντα, προστατεύει τα αρώματα του κρασιού και εξαφανίζει τον επίπεδο χαρακτήρα (Ribéreau-Gayon et al. 2005).

Η επεξεργασία με θειώδη άλατα είναι ο πιο συνηθισμένος τρόπος για την πρόληψη της αλλοίωσης του μούστου σταφυλιών στην οινοποίηση, επειδή ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός σε αυτή τη χημική ουσία. Η αντοχή στα θειώδη άλατα εξαρτάται από το μεταβολισμό του θείου και της αδενίνης. Η ποσότητα αδενίνης και μεθειονίνης σε ένα χημικά καθορισμένο μέσο ανάπτυξης ρυθμίζει την αντοχή των ζυμών κρασιού σε θειώδη άλατα. Η παρουσία μεθειονίνης έχει το αντίθετο αποτέλεσμα, προκαλώντας υψηλότερη ευαισθησία στο SO<sub>2</sub>. Η συγκέντρωση μεθειονίνης, αδενίνης και θειώδους άλατος σε ένα συνθετικό γλεύκος σταφυλιών επηρεάζει την πρόοδο της ζύμωσης και την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου, της αδενίνης και της ακεταλδεΐδης. Το θειώδες μεταβάλλει την έκφραση όλων αυτών των γονιδίων (Aranda et al., 2006). Παρόλα

αυτά, το θειώδες άλας συνήθως καθυστερεί μόνο την έναρξη της ζύμωσης και δεν επηρεάζει το ρυθμό ή την ολοκλήρωση της διαδικασίας (Carrascosa et al., 2011).

Το ελεύθερο SO<sub>2</sub> αναφέρεται στο ποσοστό του θειώδους που παραμένει ελεύθερο στον οίνο, μετά την προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας ολικού θειώδους. Η μοριακή του μορφή (SO<sub>2</sub>) είναι η πλέον δραστική. Το μοριακό SO<sub>2</sub>, όπου αποτελεί ένα ποσοστό του ελεύθερου θειώδους, εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία και τον αλκοολικό τίτλο. Το μοριακό SO<sub>2</sub> αυξάνεται με τη μείωση του pH, την αύξηση του αλκοολικού τίτλου και την αύξηση της θερμοκρασίας. Όπως επίσης αυξάνεται και η οργανοληπτική του παρουσία, η οποία αποτελεί ελάττωμα (Ribéreau-Gayon et al. 2005).

Το ελεύθερο διοξείδιο του θείου ορίζεται ως το διοξείδιο του θείου που υπάρχει στο γλεύκος ή τον οίνο με τις ακόλουθες μορφές: H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, HSO<sub>3</sub>, των οποίων η ισορροπία ως συνάρτηση του pH και της θερμοκρασίας είναι:



Το H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> αντιπροσωπεύει τη μοριακή μορφή. Το ολικό διοξείδιο του θείου ορίζεται ως το σύνολο των διαφόρων μορφών του που υπάρχουν στον οίνο, είτε σε ελεύθερη κατάσταση είτε δεσμευμένων με άλλα συστατικά του.

Το ελεύθερο διοξείδιο του θείου προσδιορίζεται με άμεση τιτλοδότηση με ιώδιο. Η δεσμευμένη μορφή του προσδιορίζεται στη συνέχεια με ιωδομετρική τιτλοδότηση μετά από αλκαλική υδρόλυση. Όταν προστίθεται στο ελεύθερο, δίνει το ολικό διοξείδιο του θείου. (OIV, Sulfur dioxide (Iodometry) (Type-IV), 2022)

Η συνολική περιεκτικότητα των οίνων σε διοξείδιο του θείου κατά τη διάθεσή τους στην αγορά για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 150 χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο για τους περισσότερους ερυθρούς οίνους ή τα 200 χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο για τους περισσότερους λευκούς και ερυθρωπούς οίνους (EUR-lex, 2009, 62/391L).

## **Ζύμες terroir**

### ***H έννοια του terroir***

Η φύση του εδάφους στο οποίο καλλιεργείται το αμπέλι ήταν πάντα μέρος του μυστηρίου της ευχάριστης γεύσης κρασιού, και αυτό συνήθως αναφέρεται ως αποτέλεσμα του «*terroir*» (Clarke και Bakker, 2004). Παρά την ενασχόληση των ανθρώπων με τον αμπελοοινικό τομέα για περισσότερα από 10.000 χρόνια, η κατανόηση της έννοιας του *terroir* έγινε δυνατή μόνο όταν οι καλλιεργούμενες εκτάσεις οριοθετήθηκαν με βάση διαφορετικά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Η έννοια του *terroir* συντίθεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το κλίμα, η σύσταση του εδάφους, η διαχείριση των υδάτων, οι άνεμοι και η ποιότητα του αέρα, το υψόμετρο, η πανίδα και χλωρίδα και τα μικρόβια. Όλα αυτά μαζί συμβάλλουν σε ένα μοναδικό στυλ κρασιού (Carrau et al. 2020). Επιπλέον, οι άνθρωποι παράγοντες πρέπει να προστεθούν στους φυσικούς παράγοντες, καθώς ο αμπελουργός έχει τη δυνατότητα να παρέμβει στα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες του εδάφους με τη χρήση βελτιωτικών εδάφους, χημικής λίπανση και μερικές φορές με άρδευση (Seguin, 1986). Η σημασία της έννοιας του *terroir* βρίσκεται στη συσχέτιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του κρασιού με τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες καλλιεργούνται τα σταφύλια. Μεσώ αυτού εξηγούνται η ιεράρχηση της ποιότητας και το στυλ του κρασιού. Ωστόσο, το *terroir* είναι δύσκολο να μελετηθεί σε επιστημονική βάση, επειδή εμπλέκονται πολλοί παράγοντες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν. Η καλύτερη έκφραση του *terroir* επιτυγχάνεται όταν η ποικιλία αμπέλου είναι προσαρμοσμένη στις τοπικές κλιματολογικές συνθήκες κατά τέτοιο τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται πλήρης ωρίμανση μέχρι το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Οι οίνοι που

παράγονται από ποικιλίες πρώιμης ωρίμανσης σε θερμά κλίματα στερούνται έκφρασης *terroir* επειδή τα σταφύλια δεν περιέχουν υψηλό επίπεδο αρωματικών ενώσεων (Van Leeuwen, 2006). Όσο μικρότερη η οριοθετημένη περιοχή τόσο πιο εμφανής καθίσταται η συνεισφορά και η αυθεντικότητα του *terroir* στο κρασί μέσω της διαφοροποίησης στην ποιότητά του (Carrau et al. 2020). Σύμφωνα με ψήφισμα του ΟΙV (Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου, 2010), το «*terroir*» αναφέρεται σε «μια περιοχή στην οποία αναπτύσσεται η συλλογική γνώση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αναγνωρίσιμου φυσικού και βιολογικού περιβάλλοντος και των εφαρμοζόμενων αμπελουργικών και οινολογικών πρακτικών, δίνοντας ιδιαίτερα χαρακτηριστικά για τα προϊόντα που προέρχονται από αυτήν την περιοχή».

### **Μικροβιακό *terroir***

Τα *Vitis vinifera* και ο καρπός τους, το σταφύλι, αποτελούν σημεία ανάπτυξης εγγενών ζυμών. Υπάρχουν περισσότερα από 100 είδη ζύμης και εκατομμύρια στελέχη που συμμετέχουν και συμβάλλουν στη σύνθεση του μικροβιακού *terroir*. Μέσω των νέων τεχνολογιών μπορεί να γίνει παρακολούθηση των περιβαλλοντικών αλλαγών και της επίδρασής τους στη διαμόρφωση των μικροβιακών προφίλ των διαφόρων αμπελουργικών περιοχών (Carrau et al. 2020). Το μικροβιακό *terroir* μπορεί να επηρεαστεί από πλήθος παραγόντων όπως η σχετική υγρασία, οι βροχοπτώσεις, η θερμοκρασία, το υψόμετρο και η χρήση μυκητοκτόνων, επηρεάζοντας ιδιαίτερα το φορτίο των «άγριων» ζυμών (Jara et al., 2016; Boulton et al. 1996). Επίσης, η μικροβιακή χλωρίδα επηρεάζεται από μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ των διαφόρων ειδών. Οι μηχανισμοί με τους οποίους ένα είδος/στέλεχος επηρεάζει ένα άλλο στα οικοσυστήματα σταφυλιού-οίνου περιλαμβάνουν: παραγωγή λυτικών ενζύμων, αιθανόλης, διοξειδίου του θείου και τοξινών δολοφόνων/βακτηριοκινών όπως πεπτιδίων· εξάντληση θρεπτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένης της απομάκρυνσης οξυγόνου, και παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα με ταυτόχρονη απελευθέρωση κυτταρικών αυτολυτικών συστατικών (Fleet, 2003).

Χάρη την εξέλιξη του τομέα της βιοτεχνολογίας είναι πλέον δυνατή αναγνώριση ειδών της μικροβιακής χλωρίδας που σχετίζεται με τα αμπέλια (Carrau et al. 2020). Κάθε είδος μπορεί να συμβάλει διαφορετικά, θετικά ή αρνητικά, στην ποιότητα του κρασιού. Τα είδη που ανήκουν σε μη-σακχαρομόκητες θεωρούνται βιοτεχνολογικός πόρος στη ζύμωση του κρασιού (Capozzi et al., 2015). Οι οίνοι που παρασκευάζονται με γηγενείς ή, αλλιώς, «άγριες» ζύμες θεωρούνται πιο περίπλοκοι παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ποικιλία γεύσεων. Οι γηγενείς ζύμες είναι σημαντικές για την ικανότητά τους να επηρεάζουν τον ποικιλιακό χαρακτήρα των οίνων μετατρέποντας μη πτητικές ενώσεις σε πτητικά αρώματα μέσω της ενζυματικής τους δράσης. Τα πτητικά προϊόντα που προέρχονται από το μεταβολισμό των ζυμών παρέχουν μια χημική βάση για τον χαρακτήρα «άγριας ζύμης» (Varela et al., 2009; Jara et al., 2016). Τόσο οι αυθόρμητες όσο και οι ελεγχόμενες εμβολιασμένες ζυμώσεις επηρεάζονται από την ποικιλομορφία του μικροβιακού *terroir* (Lambrechts και Pretorius, 2000).

Οι (Banilas et al., 2016) παρατήρησαν ότι οι γηγενείς ζύμες ενδέχεται να ευθύνονται για τον τοπικό χαρακτήρα των οίνων. Επομένως, δίνεται το έμβασμα για την αξιοποίηση επιλεγμένων αυτόχθονων στελεχών για τη μεταφορά του ιδιαίτερου τοπικού χαρακτήρα της περιοχής προέλευσής τους. Η χρήση αυτόχθονων στελεχών ως εναρκτήριες καλλιέργειες της ζύμωσης που αποτελούνται τόσο από ζύμες *S. cerevisiae* όσο και από *non-Saccharomyces* μπορεί να προωθήσει σημαντικά την έκφραση της τοπικής διαφοροποίησης των οίνων όπως επίσης και η σειρά με την οποία γίνεται ο εμβολιασμός των στελεχών ζυμών (Nisiotou et al., 2018). Ειδικότερα, οι (Nisiotou et al., 2018) παρατήρησαν ότι η διαφοροποίηση είναι μεγαλύτερη όταν

η προσθήκη των επιλεγμένων στελεχών προηγείται εκείνης του *S. cerevisiae* αντί του ταυτόχρονου εμβολιασμού τους. Επιπλέον, υπογραμμίστηκε ότι ο διαδοχικός εμβολιασμός σε αποστειρωμένο γλεύκος προσδίδει το πιο διαφοροποιημένο χημικό προφίλ. Οι (Chalvantzi et al., 2021) εντόπισαν μικροβιακές συνθέσεις που μπορούν να συσχετιστούν με συγκεκριμένες αμπελουργικές ζώνες. Οι συγκεκριμένες αποικίες ζυμών συνέβαλαν σημαντικά στην οριοθέτηση των περιοχών, υπογραμμίζοντας τη δυναμική επιρροή τους στην ιδιαιτερότητα των χαρακτηριστικών του οίνου. Το γεγονός ότι η κλίμακα επιρροής τους ήταν γεωγραφικά περιορισμένη αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό της έννοιας του μικροβιακού *terroir*. Εάν εφαρμοστούν στρατηγικές «οινοποίησης χαμηλών εισροών», το φαινόμενο *terroir* αναμένεται να είναι πιο αυθεντικό όσον αφορά τη διαφοροποίηση της ποιότητας (Carrau et al. 2020).

## Επιλογή ζύμης

Στο παρελθόν, η ζύμωση γινόταν αυθόρμητα από αυτόχθονα στελέχη που προϋπήρχαν στο μικροβίωμα σταφυλιών, αλλά σήμερα προτιμάται ο εμβολιασμός με επιλεγμένα στελέχη (Suárez-Lepe και Morata, 2012). Στις αυθόρμητες ζυμώσεις καθίσταται δύσκολη η πρόβλεψη του αποτελέσματος όσον αφορά το άρωμα και τη γεύση του κρασιού αλλά και στη διαδικασία παραγωγής του, επιφέροντας κολλημένες ή αργές ζυμώσεις και ασυνέπειες στην ποιότητά του (Mannazzu et al., 2002).

Η χρήση επιλεγμένων καθαρών εμβολίων ζύμης βοηθά στην παραγωγή οίνου σε μεγάλη κλίμακα, όπου οι ταχείες και αξιόπιστες ζυμώσεις είναι απαραίτητες για τη σταθερή γεύση του κρασιού και την προβλέψιμη ποιότητα (Pretorius, 2000). Συνήθως, γίνεται εμβολιασμός με ένα στέλεχος του *S. cerevisiae* (Clarke και Bakker, 2004). Αυτό συμβαίνει λόγω των θετικών χαρακτηριστικών του, όπως τη γρήγορη έναρξη της ζύμωσης, την ικανότητα ολοκλήρωσης της ζύμωσης του γλεύκους και την υψηλή απόδοση αιθανόλης, τα οποία μπορούν επίσης να επηρεάσουν θετικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (Rainieri και Pretorius, 2000).

Με τη σημαντικότητα του ρόλου του *S. cerevisiae* στην οινοποίηση να έχει πλέον εδραιωθεί, υπάρχει μια συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για νέα και βελτιωμένα στελέχη ζύμης κρασιού, που ξεπερνούν τον πρωταρχικό ρόλο της απλής μετατροπής των σακχάρων των σταφυλιών σε αλκοόλη χωρίς την ανάπτυξη δυσάρεστων γεύσεων που να ανταποκρίνονται στις συνεχώς αυξανόμενες απαιτήσεις της οινικής αγοράς (Pretorius, 2000). Έχει βρεθεί ότι η συνεχής χρήση εμπορικών ζυμομυκήτων μειώνει την ποικιλομορφία των αυτόχθονων στελεχών *S. cerevisiae* λόγω του ανταγωνισμού στη ζύμωση (Beltran et al., 2002). Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί αισθητή αύξηση της ζήτησης για αυτόχθονες ζύμες κρασιού που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές ζύμωσης (Mannazzu et al., 2002).

## Απόκτηση νέων στελεχών

Το πρώτο βήμα για την απόκτηση νέων επιθυμητών των στελεχών είναι η απομόνωση των άγριων ζυμών από το φυσικό περιβάλλον που συνδέεται με την περιοχή οινοποίησης που ενδιαφέρει. Το στάδιο της απομόνωσης πρέπει να ακολουθείται από διεξοδική ανάλυση της οινολογικής ικανότητας των απομονωθέντων στελεχών και επιλογή των απομονωμένων στελεχών που παρουσιάζουν βιοτεχνολογικές ιδιότητες που εφαρμόζονται στην οινοποίηση. (Mannazzu et al., 2002). Οι απαιτήσεις για αυτές τις ζύμες είναι η ικανότητα να κυριαρχούν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης και να ενισχύουν, ταυτόχρονα, τα τυπικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων που προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες αμπέλου (Mannazzu et al., 2002). Τα αυτόχθονα επιλεγμένα στελέχη που πληρούν αυτά τα

κριτήρια χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια σε μια προσπάθεια απόκτησης οίνων που διατηρούν τα οργανοληπτικά προφίλ που συνδέονται με συγκεκριμένες αμπελουργικές περιοχές (Snow, 1983).

### **Μεικτή καλλιέργεια**

Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση μικτών καλλιεργειών εκκίνησης, στις οποίες *non-Saccharomyces* στελέχη συμβάλλουν επιθυμητά, ιδίως όσον αφορά την οργανοληπτική ποιότητα του οίνου, συμπληρώνοντας τη ζυμοτική δράση των *Saccharomyces* ζυμών (Fleet, 2008). Η χρήση νέων στελεχών *non-Saccharomyces* θεωρείται αποτελεσματικός τρόπος βελτίωσης της αρωματικής πολυπλοκότητας των οίνων ώστε να ανταποκρίνονται στις προσδοκίες των καταναλωτών για διαφοροποιημένη οργανοληπτική ποιότητα. Τα *Saccharomyces* εμφανίζουν ξεχωριστό χαρακτήρα αρωμάτων όταν ζυμώνουν μόνα τους από ότι σε μεικτή καλλιέργεια με *non-Saccharomyces* στελέχη (Bo-Qin et al., 2018). Οι μεικτές ζυμώσεις *Saccharomyces cerevisiae* και *non-Saccharomyces* στελεχών αποτελούν έναν εφικτό τρόπο βελτίωσης της πολυπλοκότητας και ενίσχυσης των ιδιαίτερων και ειδικών χαρακτηριστικών των οίνων. Η συνδυασμένη χρήση διαφορετικών ειδών συχνά οδηγεί σε απρόβλεπτες ενώσεις ή/και διαφορετικά επίπεδα προϊόντων ζύμωσης, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τόσο τη χημική όσο και την αρωματική σύνθεση των οίνων. Επιπλέον, οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ζυμομυκήτων θα μπορούσαν να αποτελέσουν εργαλείο για την εφαρμογή νέων τεχνολογιών στη ζύμωση (Ciani et al., 2010).

### **Η *M. pulcherrima* ως συνεκκινιτής ζύμωσης**

Η ζύμη *M. pulcherrima* μπορεί να έχει αξιόλογες εφαρμογές σε μελλοντική βιομηχανική εφαρμογή ως συνεκκινιτής, μειώνοντας την αιθανόλη, το οξικό οξύ και την τελική πτητική οξύτητα, και για τη μείωση στα επίπεδα υδρόθειου στα κρασιά (Barbosa et al., 2018). Το υδρόθειο ανήκει στα ελαττώματα που μπορεί να έχει ένας οίνος καθώς η ύπαρξη του φέρει αρώματα που παραπέμπουν σε σάπιο αυγό (Smith et al., 2015). Εξαιτίας της μέτριας ζυμοτικής της ισχύς, θεωρείται ιδιαίτερα χρήσιμη η διαδοχική ή μικτή χρήση της με στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* για την πλήρη ζύμωση των γλευκών των σταφυλιών (Morata et al., 2019). Στο μέλλον, ενδέχεται ορισμένοι οινοποιοί να προτιμούν τη χρήση μειγμάτων ιθαγενών ειδών ζύμης με καθορισμένα στελέχη *non-Saccharomyces*, όπως η *Metschnikowia pulcherrima*, ως καλλιέργειες εκκίνησης ώστε οι παραγόμενοι οίνοι να αντικατοπτρίζουν τη βιοποικιλότητα και τη στιλιστική ιδιαιτερότητα μιας δεδομένης περιοχής (Lambrechts και Pretorius, 2000).

### **Η *Metschnikowia pulcherrima* στην οινοποίηση**

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξανόμενο ενδιαφέρον για τους *non-Saccharomyces*, ιδιαίτερα για το είδος *Metschnikowia pulcherrima* (Morata et al., 2019). Η *Metschnikowia pulcherrima* είναι ευρέως εμφανιζόμενη σε αυθόρμητες ζυμώσεις. Οι *Metschnikowia*, *Hanseniaspora* και *Candida* ανήκουν στις πρώτες από τις ζύμες που εμφανίστηκαν και πλέον κατατάσσονται στην κατηγορία των ασκομυκήτων. Αυτές οι ζύμες αποκτούν την κυριαρχία της μικροχλωρίδας της επιφάνειας των σταφυλιών καθώς αυτά ωριμάζουν (Prakitchaiwattana et al., 2004). Έχει βρεθεί ότι η χρήση αντιμυκητιασικών παραγόντων στον αμπελώνα έχει ως αποτέλεσμα αυξημένους πληθυσμούς *Metschnikowia* (Regueiro et al., 1993).

### **Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά**

Τα κύτταρα του γένους *Metschnikowia* είναι σφαιροειδή έως ελλειψοειδή, καθώς και πυρόμορφα, κυλινδροειδή ή σεληνοειδή. Η βλαστική αναπαραγωγή σε αυτό το γένος συμβαίνει

μέσω πολυμερούς εκβλάστησης. Οι ασκοί του είναι επιμήκεις και τα ασκοσπόρια του έχουν σχήμα βελόνας, εξασθενημένα στο ένα ή και στα δύο άκρα και χωρίς προσάρτημα σαν μαστίγιο. Μερικά είδη είναι παρασιτικά στα ασπόνδυλα, καθώς και ελεύθερα σε υδρόβιους βιότοπους, ενώ άλλα είναι χερσαία, ελεύθερα και συχνά συνδέονται με λουλούδια (Miller και Phaff, 1998). Το υπόστρωμα ανάπτυξης είναι κυρίως γλυκόζη και άλλα σάκχαρα ενώ δεν αφομοιώνει τα νιτρικά (Kurtzman et al. 2011). Ένα από τα ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της *Metschnikowia pulcherrima* είναι η απέκκριση υδατοδιαλυτής, κοκκινωπής (καφέ) χρωστικής ουσίας που ονομάζεται pulcherrimin, μια κοκκινωπή ένωση που περιέχει σίδηρο. Η pulcherrimin δίνει στην *Metschnikowia pulcherrima* ορισμένα ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους *non-Saccharomyces* ζυμομύκητες, καθώς και ορισμένες αντιμυκητιακές και αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Morata et al., 2019; Kántor et al., 2015; Kurtzman et al. 2011). Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τους (Kántor et al., 2015) βρέθηκε πως η ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση της pulcherrimin ήταν έναντι των ειδών *Candida* και *Pichia manshurica*. Η pulcherrimin δεν έχει επίδραση σε όλα τα είδη ζυμών, όπως για παράδειγμά τους *S. cerevisiae*, γεγονός που τους καθιστά συμβατούς για τη μικτή χρήση τους στη ζύμωση για την παραγωγή κρασιού.

### **Η επίδραση στο αρωματικό προφίλ του οίνου**

Ορισμένες ζύμες *non-Saccharomyces*, συμπεριλαμβανομένης της *Metschnikowia pulcherrima*, έχουν προταθεί ως επιλεγμένοι εκκινητές λόγω της συμβολής τους στο συνολικό άρωμα και τα χημικά προφίλ των οίνων (Barbosa et al., 2018). Η βιογένεση νέων αρωμάτων στα φρούτα/λαχανικά συμβαίνει με εξωγενή ένζυμα, προερχόμενα από μικροοργανισμούς (ζύμες, μύκητες και βακτήρια), που εισέρχονται στους κατεστραμμένους ιστούς φρούτων και τους χυμούς τους. Με την εισβολή τους μπορούν να προκαλέσουν γεύσεις «αποσύνθεσης» ή «αλλοίωσης». Οι αρχικές γεύσεις από το φρούτο μπορεί να παραμείνουν ή να μην παραμείνουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Clarke και Bakker, 2004). Ορισμένα ένζυμα από ζυμομύκητες μπορεί να εμπλέκονται στην υδρόλυση των ποικιλιακών προδρόμων αρωμάτων στα κρασιά (Darriet και Boidron, 1988). Τα ποικιλιακά αρώματα, που τυπικά ορίζονται ως τερπένια και θειόλες, προέρχονται από τις μη πτητικές πρόδρομες ουσίες τους που απελευθερώνονται κατά τη ζύμωση του κρασιού από διαφορετικά υδρολυτικά ένζυμα της ζύμης. Αρωματικές ενώσεις όπως οι εστέρες ή οι ανώτερες αλκοόλες που βρίσκονται σε πλειοψηφία καλύπτουν τις μειοψηφικές τυπικές αρωματικές ενώσεις που αναδεικνύουν την εκάστοτε ποικιλία. Η χημική βάση του κρασιού είναι καθοριστική για την αντίληψη των ενώσεων αυτών (Ruiz et al., 2018). Η *Metschnikowia pulcherrima* χαρακτηρίζεται από μέτρια ζυμοτική ισχύ και υψηλή ενζυματική δράση απελευθέρωσης αρωματικών πρόδρομων ουσιών από το σταφύλι. Τα ένζυμα που παράγει κατά τη ζύμωση του κρασιού συμβάλουν στη βελτίωση της αρωματικής πολυπλοκότητας του οίνου (Morata et al., 2019).

## **2.2 Ο ΟΙΝΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ**

Το γεγονός ότι οι οινολόγοι πρέπει να κάνουν διάκριση μεταξύ ολικής οξύτητας, pH και πτητικής οξύτητας καταδεικνύει τη σημασία της έννοιας της οξύτητας στο κρασί. Αυτό οφείλεται στα διαφορετικά οργανοληπτικά αποτελέσματα αυτών των τριών τύπων οξύτητας (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Μέσω του ελέγχου της εξέλιξης της οξύτητας κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων οινοποίησης μπορούν να ανιχνευθούν σημαντικές αλλαγές στο κρασί (Robles et al., 2019). Παρέχονται πληροφορίες τόσο για την πορεία της ζύμωσης όσο και για



τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (χρώμα, άρωμα και γεύση) (Esteves et al., 2004). Η οξύτητα σχετίζεται με την όξινη γεύση. Η χαμηλή οξύτητα δίνει γενικά κρασιά με επίπεδη γεύση, ενώ η περίσσειά της δίνει την αίσθηση του ξινού. Η οξύτητα σχετίζεται επίσης με το pH, το οποίο είναι γνωστό ότι επηρεάζει πολλές πτυχές της χημείας του κρασιού, πολλές από τις οποίες σχετίζονται άμεσα με τη μυρωδιά, τη γεύση ή την ποιότητα (Clarke και Bakker, 2004).

### Τα οξέα του οίνου

Υπάρχουν διαφορετικά οξέα, σε ελεύθερη ή δεσμευμένη κατάσταση. Μερικά προέρχονται φυσικά από το σταφύλι (μηλικό, τρυγικό και κιτρικό οξύ) και άλλα (ηλεκτρικό, οξικό και γαλακτικό οξύ) προκύπτουν από τις διάφορες διαδικασίες ζύμωσης. Οι ζυμώσεις ενός κρασιού συμβάλλουν στον μετασχηματισμό, την εξαφάνιση ή την εμφάνιση των διαφόρων οξέων (Robles et al., 2019). Τα οξέα του οίνου που συναντώνται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι το τρυγικό οξύ, το μηλικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το κιτρικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ (Flamys et al., 2015). Αποτελούν, επίσης, τα κύρια οξέα που συμβάλουν στην αντιληπτή οξύτητα των οίνων. Υπάρχουν αρκετά ακόμα οξέα που συμβάλουν στην όξινη γεύση, οργανικά συνήθως ή ανόργανα σε μικρότερες ποσότητες, προερχόμενα απευθείας από το σταφύλι ή τη ζύμωση ή από μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων ειδικών ενώσεων που παράγονται από βοτρυτωμένα σταφύλια (Clarke και Bakker, 2004).

### pH

Οι οίνοι είναι μείγματα ασθενών οξέων, που συνδυάζονται για να σχηματίσουν άλατα σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό ανάλογα με το pKa τους. Η αναλογία αλάτων εξαρτάται επίσης από τη γεωγραφική προέλευση, την ποικιλία σταφυλιών, τις καλλιεργητικές επεμβάσεις των αμπελιών και τις πρακτικές οινοποίησης που χρησιμοποιούνται. Η τιμή του pH εκφράζει τη δραστηριότητα των ιόντων υδρογόνου ενός διαλύματος. Το pH ενός διαλύματος που περιέχει ένα ασθενές μονοπρωτικό οξύ και το ισχυρό βασικό άλας του καθορίζεται από την εξίσωση Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left( \frac{[\text{σχηματιζόμενο άλας}]}{[\text{εναπομένον οξύ}]} \right)$$

Αυτή η εξίσωση εφαρμόζεται στο γλεύκος και το κρασί, όπου τα ισχυρότερα οξέα είναι τα δι-οξέα. Αποτελεί μια προσέγγιση, υποθέτοντας την συμβάλλουσα οξύτητα του κάθε οξέος στο σύνολο (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Για τον υπολογισμό του pH, μετρείται η διαφορά δυναμικού μεταξύ δύο ηλεκτροδίων βυθισμένων στο υπό δοκιμή υγρό. Το ένα από αυτά τα δύο ηλεκτρόδια έχει δυναμικό που είναι συνάρτηση του pH του υγρού, ενώ το άλλο έχει σταθερό και γνωστό δυναμικό και αποτελεί το ηλεκτρόδιο αναφοράς (OIV, pH (Type-I), 2022).

Ένα σχετικά χαμηλό pH βοηθά στην προστασία του οίνου από τη μικροβιακή αλλοίωση και καθιστά αποτελεσματικότερη τη χρήση διοξειδίου του θείου. Βοηθά επίσης να εκφραστεί το χρώμα στους ερυθρούς οίνους και μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης καφετιάσματος λόγω των φαινολικών ενώσεων. Το pH επηρεάζει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό ενός οίνου και είναι σημαντικό για τη σταθερότητά του (Clarke και Bakker, 2004). Ποσοτικά, τα καρβοξυλικά οξέα όπως τρυγικό, μηλικό, γαλακτικό, ηλεκτρικό, οξαλικό, φουμαρικό και κιτρικό οξύ καθορίζουν το pH του κρασιού (Soleas et al., 1997).

### Πτητική οξύτητα

Στο κρασί, τα οξέα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: πτητικά και μη πτητικά. Το πρώτο αναφέρεται στα οξέα που μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν με απόσταξη, ενώ το δεύτερο

αναφέρεται στα καρβοξυλικά οξέα. Το πιο κοινό πτητικό οξύ στο κρασί είναι το οξικό οξύ (Soleas et al., 1997). Το οξικό οξύ είναι η πτητική ένωση που παράγεται στον οίνο κατά τη διάρκεια ή μετά την περίοδο ζύμωσης και είναι υπεύθυνη για την ξινή γεύση στο ξίδι. Μια υπερβολικά υψηλή ποσότητα οξικού οξέος θεωρείται σφάλμα του οίνου (Lelova et al., 2018). Η πτητική οξύτητα του οίνου αποτελείται από ελεύθερες και συνδυασμένες μορφές πτητικών οξέων. Εκφράζεται συνήθως σε g/l οξικού οξέος (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Το όριο σφάλματος της πτητικής οξύτητας θεωρείται ότι είναι περίπου 0,8 g/L. Πάνω από αυτό, οι περισσότεροι καταναλωτές μπορούν εύκολα να αναγνωρίσουν το αρνητικό χαρακτηριστικό του ξιδιού (Benito et al., 2019). Η μέγιστη περιεκτικότητά οξικού οξέος αποτελεί αντικείμενο νομοθεσίας. Στην πλειονότητα των οίνων, η πτητική οξύτητα δεν μπορεί να υπερβαίνει: α) τα 18 χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο, προκειμένου για γλεύκη σταφυλιών που έχουν υποστεί μερική ζύμωση· β) τα 18 χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο, προκειμένου για λευκούς και ερυθρούς οίνους· ή γ) τα 20 χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο προκειμένου για ερυθρούς οίνους (EUR-lex, 2009, σ. L 193/31). Η παρουσία οξικού οξέος οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε ξένους μικροοργανισμούς, αν και μπορεί να προκύψει και από ζύμωση (Clarke και Bakker, 2004). Η παρουσία οξυγόνου προάγει πάντα το σχηματισμό οξικού οξέος. Έτσι, αυτό το οξύ σχηματίζεται τόσο στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης όσο και προς το τέλος, όταν η διαδικασία επιβραδύνεται (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Στο υγιές γλεύκος σταφυλιών με μέτρια συγκέντρωση σακχάρων (μικρότερη από 220 g/l), ο *S. cerevisiae* παράγει σχετικά μικρές ποσότητες (100-300 mg/l), οι οποίες ποικίλλουν ανάλογα με το στέλεχος. Σε ορισμένες συνθήκες οινοποίησης, ακόμη και χωρίς βακτηριακή μόλυνση, η παραγωγή οξικού οξέος από ζύμες μπορεί να είναι ασυνήθιστα υψηλή και να αποτελέσει πρόβλημα για τον οινοποιο (Ribéreau-Gayon et al. 2005).

Η επίσημη μέθοδος προσδιορισμού της πτητικής οξύτητας, με απόσταξη ατμού, απαιτεί τα συνδυασμένα κλάσματα να καθίστανται ελεύθερα και πτητικά με οξίνιση του οίνου με τρυγικό οξύ (περίπου 0,5 g ανά 20 ml). Το τρυγικό οξύ είναι ισχυρότερο από τα πτητικά οξέα, επομένως τα εκτοπίζει από τα άλατά τους (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Για τον υπολογισμό της πτητικής οξύτητας, το διοξείδιο του άνθρακα απομακρύνεται πρώτα από το κρασί. Τα πτητικά οξέα διαχωρίζονται από τον οίνο με απόσταξη ατμού και τιτλοδοτούνται με πρότυπο υδροξείδιο του νατρίου. Η οξύτητα του ελεύθερου και δεσμευμένου διοξειδίου του θείου που αποστάζεται υπό αυτές τις συνθήκες πρέπει να αφαιρείται από την οξύτητα του αποστάγματος (OIV, Volatile Acidity (Type-I), 2022).

## Ολική οξύτητα

Η ολική οξύτητα του οίνου, γνωστή και ως «ογκομετρούμενη οξύτητα», είναι το άθροισμα των ογκομετρήσιμων οξυτήτων του όταν τιτλοδοτείται σε pH 7 έναντι ενός τυπικού αλκαλικού διαλύματος που αντιστοιχεί στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων (-COO, COOH) συγκεκριμένου όγκου δείγματος οίνου. Το διοξείδιο του άνθρακα δεν περιλαμβάνεται στη συνολική οξύτητα. Το διάλυμα του καυστικού νατρίου (NaOH 0,1 M) που χρησιμοποιείται στις τιτλοδοτήσεις, δεν είναι σταθερό : αντιδρά με το διοξείδιο του άνθρακα (ατμοσφαιρικό) και σχηματίζει ανθρακικά άλατα (NaCO<sub>3</sub>) με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται ο τίτλος του διαλύματος. Συνεπώς, οι οίνοι πρέπει να απαερώνονται πριν από την ανάλυση τόσο της ολικής όσο και της πτητικής οξύτητας. Το τελικό σημείο της μέτρησης προσδιορίζεται συχνά μέσω ενός έγχρωμου αντιδραστηρίου (δείκτη), όπως το μπλε της βρωμοθυμόλης ή η φαινολοφθαλείνη. Γίνεται ποτενσιομετρική ογκομέτρηση ή τιτλοδότηση με τον κατάλληλο

δείκτη και σύγκριση με χρωματικό πρότυπο τελικού σημείου (OIV, Total Acidity (Type-I), 2022).

Η ολική οξύτητα του γλεύκους ή του οίνου λαμβάνει υπόψη όλους τους τύπους οξέων. Η συμβολή κάθε τύπου οξέος στην ολική οξύτητα καθορίζεται από την ισχύ του, η οποία καθορίζει την κατάσταση διάσπασής του, καθώς και από τον βαθμό στον οποίο έχει συνδυαστεί για να σχηματίσει άλατα (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Συνήθως, η ολική οξύτητα εκφράζεται σε ισοδύναμα τρυγικού οξέος. Το τρυγικό οξύ είναι το κυρίαρχο οργανικό οξύ στα σταφύλια και τους οίνους που παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της χημικής σταθερότητας του κρασιού, του χρώματος του και επηρεάζει τη γεύση του τελικού κρασιού. Η περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ μειώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ως αποτέλεσμα της καθίζησης σε μορφή τρυγικών κρυστάλλων (Lelova et al., 2018). Το τρυγικό οξύ υπάρχει κυρίως στο γλεύκος και το κρασί ως άλας μονοκαλίου οξέος, το οποίο εξακολουθεί να συμβάλλει στην ολική οξύτητα. Είναι δύσκολο να προβλεφθεί η ολική οξύτητα ενός κρασιού με βάση την οξύτητα του γλεύκους από το οποίο παράγεται, για διάφορους λόγους. Μέρος των αρχικών οξέων φρούτων μπορεί να καταναλωθεί από ζύμες και, ιδίως, βακτήρια. Από την άλλη, οι ζύμες και τα βακτήρια παράγουν οξέα, π.χ. ηλεκτρικό και γαλακτικό οξύ. Επιπλέον, τα όξινα άλατα καθίστανται λιγότερο διαλυτά ως αποτέλεσμα της αύξησης της περιεκτικότητας σε αλκοόλη. Αυτό συμβαίνει, ειδικότερα, με τη μονοκαλιομορφή τρυγικού οξέος, η οποία προκαλεί μείωση της ολικής οξύτητας κατά την κρυστάλλωση, καθώς το διτρυγικό κάλιο εξακολουθεί να έχει λειτουργία καρβοξυλικού οξέος (Ribéreau-Gayon et al. 2006).

## 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Με το ακόλουθο πείραμα εξετάστηκαν 40 επιλεγμένα, ταυτοποιημένα στελέχη του είδους *Metschnikowia pulcherrima* που είχαν απομονωθεί από τις αμπελουργικές ζώνες των Πεζών και της Νεμέας. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 19 στελέχη από τα Πεζά και 21 από τη Νεμέα. Πραγματοποιήθηκαν με αυτά εργαστηριακές μικροζυμώσεις, με δύο επαναλήψεις ανά στέλεχος, όλες υπό τις ίδιες συνθήκες ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Η πορεία των ζυμώσεων ελεγχόταν καθημερινά μέσω ζύγισης. Η διαφορά βάρους μεταξύ των ημερών αντιστοιχεί στο εκλύμενο CO<sub>2</sub>. Όταν ο ρυθμός εκλύμενου CO<sub>2</sub> είχε μειωθεί αρκετά ώστε να παρατηρείται ευθυγράμμιση στο διάγραμμα μεταβολής βάρους η ζύμωση θεωρήθηκε ολοκληρωμένη. Τα κρασιά που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε χημικές αναλύσεις. Έπειτα, τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν μέσω διαγραμμάτων και επεξεργάστηκαν στατιστικά, ώστε να μπορεί να γίνει η παρατήρηση και σύγκρισή τους.

### 3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

#### *Προετοιμασία ζυμώσεων*

Επιλέχθηκαν προς μελέτη 40 ταυτοποιημένα στελέχη του είδους *Metschnikowia pulcherrima*. Οι μητρικές καλλιέργειες διατηρούνταν σε τρυβλία άγαρ στους -80°C. Τα στελέχη αποτελούσαν απομονώσεις αυθόρμητων ζυμώσεων από τις αμπελοοινικές περιοχές των Πεζών και της Νεμέας από τη συλλογή του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «Δήμητρα» (ΕΛ.Γ.Ο. «Δήμητρα»). Για την ανανέωση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν από τους -80°C, μετά την επιλογή τους έγινε στρικόρισμα σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα YPD agar (1% εκχύλισμα ζύμης, 2% πεπτόνη, 2% γλυκόζη, 2% άγαρ) και επώαση για 3 μέρες στους 26°C.

Έγινε αποστείρωση του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού (στους 120°C για 20 λεπτά) και των υποστρωμάτων ανάπτυξης (στους 120°C για 15 λεπτά) των ζυμών.

#### *Προετοιμασία γλεύκους για ζύμωση*

Το γλεύκος από την παραλαβή του διατηρούταν κατεψυγμένο στους -20°C. Για την προετοιμασία του προς ζύμωση, μεταφέρθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ξεπαγώσει. Έπειτα, αφέθηκε σε ηρεμία μέχρι να γίνει η απολάπωσή του στατικά. Η απολάπωση βασίστηκε στο φυσικό φαινόμενο διαχωρισμού των ουσιών του γλεύκους όπου τα πιο βαριά υλικά καθιζάνουν στον πυθμένα ώστε να αφήσουν το υπερκείμενο τμήμα πιο διαυγές. Σκοπός ήταν η αφαίρεση αδιάλυτων στερεών ξένων σωματιδίων όπως φλούδες, κουκούτσια, χρώμα κλπ.

Έγινε με προσοχή παραλαβή του υπερκείμενου γλεύκους, αποφεύγοντας όσο ήταν δυνατό τις βαριές λάσπες του πυθμένα, μέσω εύκαμπτου σωλήνα και μεταφέρθηκε σε καθαρό περιέκτη.

Το γλεύκος στη συνέχεια μοιράστηκε σε φιάλες duran και ακολούθησε αποστείρωση στους 120°C για 20 λεπτά. Τα αρχικά σάκχαρα του γλεύκους μετρήθηκαν διαθλασιμετρικά και βρέθηκαν 186,2g/l. Με στόχο την περιεκτικότητα σε αρχικά σάκχαρα ~200g/L, η τιμή θεωρήθηκε αποδεκτή και δεν έγινε κάποια επέμβαση προσθήκης σακχάρων στο γλεύκος.

Μετρήθηκε το αρχικό αφομοιώσιμο άζωτο (YAN) και βρέθηκε 109,6mg/L. Στο πλέον αποστειρωμένο γλεύκος προστέθηκε συμπλήρωμα NH<sub>4</sub>Cl και αμινοξέων ώστε το αρχικό YAN να φτάσει τα 200mg/L. Η προσθήκη έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες πριν τον δεύτερο

εμβολιασμό προς εγκλιματισμό των ζυμών. Το αποστειρωμένο γλεύκος διατηρήθηκε στους 4°C μέχρι τη χρήση του.

### ***1<sup>ος</sup> εμβολιασμός σε YPD broth***

Αφού αναπτύχθηκαν οι ζύμες στα τρυβλία έγινε επιλογή μίας μονής καθαρής αποικίας. Η αποικία σημειώθηκε για τυχόν μελλοντική χρήση. Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά μικρής ποσότητας βιομάζας από την αποικία με μικροβιολογικό κρίκο και διάλυση υπό ασηπτικές συνθήκες σε κωνική φιάλη που περιείχε αποστειρωμένο YPD broth (1% εκχύλισμα ζύμης, 2% πεπτόνη, 2% γλυκόζη) έως το 1/5 του αναγραφόμενου όγκου της. Συγκεκριμένα, σε κωνική 150 ml περιέχονταν 30 ml YPD broth. Ακολούθησε επώαση στους 28°C υπό ανάδευση (180 rpm) για περίπου 24h.

Μετά από 24 ώρες, αφού διαπιστώθηκε ότι η καλλιέργεια είχε θολώσει αρκετά, εμβολιάστηκαν με αυτήν 30ml γλεύκους που είχαν προηγουμένως μεταφερθεί σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη των 150ml. Ελέγχθηκε ώστε το γλεύκος πριν τον εμβολιασμό να είχε έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Η ποσότητα του εμβολίου ήταν  $\sim 10^6$  CFU/ml από το YPD broth (300  $\mu$ l). Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση (180 rpm) στους 28°C αυστηρά για 16-18h.

### ***Προετοιμασία για την έναρξη των ζυμώνσεων***

Σε 80 αποστειρωμένες κωνικές των 150 ml προστέθηκαν 100ml (108,09g/κωνική φιάλη) αποστειρωμένου γλεύκους με YAN 200 mg/L. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε 2 διαφορετικές ημέρες προετοιμάζοντας 40 κωνικές ζύμωσης την κάθε φορά. Όλη η διαδικασία έγινε σε laminar. Προετοιμάστηκαν τα πόματα σιλκόνης με εμφύσηση σε αιθανόλη 70% για περίπου 15 λεπτά και ύστερα σε αιθανόλη 96% ώστε να βοηθήσει στο καλύτερο στέγνωμα. Αφού στέγνωσαν στο laminar ήταν έτοιμα για χρήση. Εφαρμόστηκαν καλά σε κάθε κωνική μαζί με αεροπαγίδα στην οποία προστέθηκαν 4 ml γλυκερόλης 50% v/v και από πάνω καπάκι. Οι αεροπαγίδες εξασφαλίζουν τις αναερόβιες συνθήκες μετά την κατανάλωση όλου του οξυγόνου στον ελεύθερο χώρο. Οι κωνικές ζύμωσης διατηρήθηκαν στους 4°C μέχρι τη χρήση τους.

### ***3<sup>η</sup> Ημέρα: Εμβολιασμός γλεύκους για την έναρξη των ζυμώνσεων***

Ελέγχθηκε πριν τον εμβολιασμό το γλεύκος να έχει έρθει στη θερμοκρασία ζύμωσης 20°C, τη θερμοκρασία δηλαδή της ακολουθούμενης ζύμωσης. Πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) από το εμβόλιο εγκλιματισμού σε διάλυμα Ringer. Μεταφέρθηκαν 100  $\mu$ l εμβολίου σε με 900  $\mu$ l Ringer ( $10^{-1}$  αραιώση) και έπειτα από την  $10^{-1}$  αραιώση μεταφέρθηκαν 100  $\mu$ l σε 900  $\mu$ l Ringer ( $10^{-2}$  αραιώση).

Μετρήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο ο πληθυσμός των ζυμών με πλάκα Neubauer από την αραιώση  $10^{-2}$ . Από τις μετρήσεις του πληθυσμού υπολογίστηκε η απαιτούμενη ποσότητα εμβολίου για κάθε στέλεχος με στόχο ο αρχικός πληθυσμός σε κάθε ζύμωση να είναι  $10^6$  CFU/ml.

Ο πληθυσμός των κυττάρων των ζυμών, εκφρασμένος σε CFU/ml (Colony-Forming Units per milliliter), υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$5 \cdot 10^v \cdot 10^4 = \text{CFU/ml, όπου}$$

5 : ο αριθμός με τον οποίο πολλαπλασιάστηκαν τα τετράγωνα που καταμετρήθηκαν για να καλυφθεί όλο το πλέγμα

$10^v$  : ο συντελεστής αραιώσης

$10^4$ : ο συνολικός όγκος που δέχεται το πλέγμα

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η ποσότητα του εμβολίου από τον τύπο:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2 \text{ όπου,}$$

C1: ο πληθυσμός των εμβολιαζόμενων κυττάρων

C2: ο επιθυμητός πληθυσμός των κυττάρων εμβολιασμού

V1: ο όγκος εμβολιασμού

V2: ο όγκος του εμβολιαζόμενου μέσου

Η ανάλογη ποσότητα γλεύκος αφαιρέθηκε πρώτα από τις κωνικές ζύμωσης και αναπληρώθηκε με το εμβόλιο ώστε ο αρχικός όγκος να παραμείνει στα 100 ml.

Για την επαλήθευση στα αναμενόμενα μεγέθη εμβολίων έγινε στρικάρισμα 0,05ml από την αραιώση  $10^{-3}$  του εμβολιασμένου γλεύκος σε τρυβλία με επίστρωση YPD agar με δύο επαναλήψεις για τον κάθε εμβολιασμό. Μετά από ανάπτυξη για 3 ημέρες σε θερμοκλίβανο ρυθμισμένο στους 26°C, οι αποικίες μπορούσαν να καταμετρηθούν.

Τα τρυβλία Petri έχουν το πλεονέκτημα ότι τα αποτελέσματα μπορούν να διαβαστούν μετά από 2-4 ημέρες, μετά την επώαση στην απαιτούμενη θερμοκρασία, και ότι τυχόν μολυσματικοί οργανισμοί μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν, γεγονός που τα καθιστά πολύ κατάλληλα για τον προκαταρκτικό έλεγχο πολλών απομονωμένων στελεχών (Kurtzman et al. 2011).

Ο πληθυσμός των τρυβλίων υπολογίζεται από το τύπο:

$$(\text{αριθμός αποικιών}) / [(\text{συντελεστής αραιώσεως}) \cdot (\text{ποσότητα εμβολίου})] = \text{CFU/ml}$$

Αφού οι κωνικές ζύμωσης εμβολιάστηκαν, ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 20°C.

#### ***Παρακολούθηση της κινητικής των ζυμώσεων με ζύγισμα***

Την επόμενη μέρα οι κωνικές ζυγίστηκαν 2 φορές, στις 24h και στις 28h. Συνεχίστηκε η καταγραφή των ζυγισμάτων μία φορά/μέρα κάθε 24h μέχρι την αποζύμωση.

#### ***Τέλος αλκοολικής ζύμωσης***

Όταν ο ρυθμός εκλύομενου CO<sub>2</sub> μειώθηκε αρκετά ώστε να παρατηρείται ευθυγράμμιση στο διάγραμμα μεταβολής βάρους η ζύμωση για το ανάλογο κάθε φορά στέλεχος θεωρήθηκε ολοκληρωμένη. Την επόμενη μέρα έγινε η τελευταία ζύγιση των κωνικών και ακολούθησαν οι χημικές αναλύσεις.

### **3.3 ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ**

Χρησιμοποιήθηκε γλεύκος από σταφύλια της ποικιλίας Μοσχάτο Αλεξανδρείας (Λήμνου) της χρονιάς 2022. Σε όλα τα δείγματα οίνων και στο γλεύκος πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις pH, ολικής οξύτητας και πτητικής οξύτητας. Στο γλεύκος έγιναν επιπλέον οι αναλύσεις του ελεύθερου και ολικού θειώδους ανυδρίτη, του αφομοιώσιμου αζώτου και η μέτρηση των σακχάρων. Όλες οι αναλύσεις προσδιορίστηκαν σύμφωνα τις διεθνείς μεθόδους του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (OIV) (International Organisation of Vine and Wine), εκτός του αφομοιώσιμου αζώτου που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο τιτλοδότησης φορμόλης των Gump et al., 2001.

## Διαθλασιμετρία

Ο δείκτης διάθλασης στους 20°C, εκφραζόμενος είτε ως απόλυτη τιμή είτε ως εκατοστιαία αναλογία κατά μάζα σακχαρόζης, βρίσκεται από τον κατάλληλο πίνακα ώστε να παρέχεται ένα μέσο για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε σάκχαρα σε γραμμάρια ανά λίτρο και σε γραμμάρια ανά χιλιόγραμμο για τα γλεύκη σταφυλιών.

### Διαδικασία:

Αφού το δείγμα φέρθηκε σε θερμοκρασία πλησίον των 20°C, τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα δείγματος στο κατώτερο πρίσμα του διαθλασίμετρου, προσέχοντας ώστε να καλύπτει ομοιόμορφα την επιφάνεια του γυαλιού. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες λειτουργίας του χρησιμοποιούμενου οργάνου. Έπειτα, διαβάστηκε η ποσότητα σακχάρων σε g/l με ακρίβεια 0,1.

(OIV, Evaluation by refractometry of the sugar concentration in grape musts, concentrated grape musts and rectified concentrated grape musts (Type-I), 2022)

## Αφομοιώσιμο άζωτο (YAN)

Η τιτλοδότηση φορμόλης είναι μια απλή και ταχεία μέθοδος για τον προσδιορισμό της ποσότητας αφομοιώσιμου αζώτου στο γλεύκος. Παρέχει έναν κατά προσέγγιση, αλλά χρήσιμο, δείκτη θρεπτικής αξίας του γλεύκους. Η διαδικασία συνίσταται στην εξουδετέρωση ενός δείγματος γλεύκους με βάση σε ένα δεδομένο pH, προσθέτοντας μια περίσσεια εξουδετερωμένης φορμαλδεΰδης και επανατιτλοδοτώντας το προκύπτον διάλυμα στο τελικό σημείο. Η φορμαλδεΰδη αντιδρά με ελεύθερες αμινομάδες α-αμινοξέων προκαλώντας στο αμινοξύ να χάσει ένα πρωτόνιο το οποίο μπορεί στη συνέχεια να τιτλοδοτηθεί. Η ελεύθερη αμμωνία τιτλοδοτείται επίσης. Η προλίνη, ένα από τα σημαντικότερα αμινοξέα στα σταφύλια που γενικά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τις ζύμες, είναι μερικώς τιτλοδοτημένη. Η αργινίνη, η οποία περιέχει τέσσερα άτομα αζώτου αλλά μόνο μία καρβοξυλική ομάδα, τιτλοδοτείται στο βαθμό ενός μοναδικού οξέος.

### Μέθοδος:

1. Τοποθετήθηκαν 100 ml δείγματος σε ποτήρι ζέσεως των 200 ml.
2. Το δείγμα εξουδετερώθηκε σε pH 8,0 χρησιμοποιώντας NaOH 1 N και πεχάμετρο.
3. Το επεξεργασμένο δείγμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml. Ο όγκος συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε ανακίνηση και διήθηση.
4. Μεταφέρθηκαν 100 ml του διηθήματος σε ποτήρι ζέσεως και ελέγχθηκε το pH. Μετά από ανάμειξη το pH ρυθμίστηκε εκ νέου στο 8,0, εφόσον χρειαζόταν, με διάλυμα NaOH.
5. Προστέθηκαν 25 ml εξουδετερωμένης φορμαλδεΰδης (40% w/v και σε pH 8,0 που ελέγχθηκε με πεχαμετρική ταινία και όχι με ηλεκτρόδιο υάλου), και μετά από ανάδευση τιτλοδοτήθηκε έως ότου pH 8,0 χρησιμοποιώντας υδροξείδιο του νατρίου 0,1 N. Έστω n τα ml του NaOH 0,1 N που καταναλώθηκαν.

Η συγκέντρωση του αφομοιώσιμου αζώτου υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Αφομοιώσιμο άζωτο (mg/l)} = n * 28$$

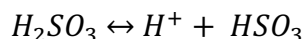
Αφομοιώσιμο άζωτο = αμμωνιακό (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) + άζωτο αμινοξέων (εκτός προλίνης)

(Gump et al., 2001).

## Ελεύθερο και ολικό διοξείδιο του θείου

Ταχεία μέθοδος για δείγματα με μικρή ποσότητα SO<sub>2</sub>.

Το ελεύθερο διοξείδιο του θείου ορίζεται ως το διοξείδιο του θείου που υπάρχει στο γλεύκος ή τον οίνο με τις ακόλουθες μορφές: H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, HSO<sub>3</sub>, των οποίων η ισορροπία ως συνάρτηση του pH και της θερμοκρασίας είναι:



Το H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> αντιπροσωπεύει τη μοριακή μορφή. Το ολικό διοξείδιο του θείου ορίζεται ως το σύνολο των διαφόρων μορφών του που υπάρχουν στον οίνο, είτε σε ελεύθερη κατάσταση είτε δεσμευμένων με άλλα συστατικά του.

### Αρχή της μεθόδου

Το ελεύθερο διοξείδιο του θείου προσδιορίζεται με άμεση τιτλοδότηση με ιώδιο. Η δεσμευμένη μορφή του προσδιορίζεται στη συνέχεια με ιωδομετρική τιτλοδότηση μετά από αλκαλική υδρόλυση. Όταν προστίθεται στο ελεύθερο, δίνει το ολικό διοξείδιο του θείου.

### Ελεύθερο διοξείδιο του θείου

Τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 500 ml:

1. 50 ml γλεύκος
2. 5 ml διαλύματος αμύλου 5g/L
3. 30 mg EDTA
4. 3 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%v/v

Ακολούθησε άμεση τιτλοδότηση με ιώδιο 0,01 M, μέχρι το μπλε χρώμα να παραμείνει σταθερό για 10 με 15 δευτερόλεπτα. Έστω  $n$  ml ο όγκος του χρησιμοποιούμενου ιωδίου.

### Δεσμευμένο διοξείδιο του θείου

Στη συνέχεια, προστέθηκαν 8ml διαλύματος NaOH 4 M. Το μείγμα ανακινήθηκε μία φορά και ύστερα αφέθηκε σε ηρεμία επί 5 λεπτά. Προστέθηκε, με έντονη ανάδευση, το περιεχόμενο ενός μικρού ποτηριού ζέσεως στο οποίο είχαν τοποθετηθεί 10 ml θεικού οξέος. Τιτλοδοτήθηκε άμεσα με διάλυμα ιωδίου 0,01 M. Έστω  $n'$  ο όγκος που χρησιμοποιήθηκε.

Έπειτα προστέθηκαν 20 ml διαλύματος NaOH, έγινε ανακίνηση μία φορά και αφέθηκε σε ηρεμία για 5 λεπτά. Ακολούθησε αραίωση με 200 ml παγωμένου νερού. Στη συνέχεια, προστέθηκε με έντονη ανάδευση το περιεχόμενο δοκιμαστικού σωλήνα στον οποίο είχαν προηγουμένως τοποθετηθεί 30 ml θεικού οξέος. Έγινε άμεση τιτλοδότηση του ελεύθερου διοξειδίου του θείου με το ιώδιο 0,01 M και έστω  $n''$  ο όγκος του χρησιμοποιούμενου ιωδίου.

### Έκφραση των αποτελεσμάτων

Το ελεύθερο διοξείδιο του θείου σε χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο δίνεται από τον τύπο:

$$(\text{mg ελεύθερου διοξειδίου του θείου /l}) = 12,8 * n$$

Το ολικό διοξείδιο του θείου σε χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο δίνεται από τον τύπο:

$$(\text{mg ολικού διοξειδίου του θείου/l}) = 12,8 * (n + n' + n'')$$



(OIV, Sulfur dioxide (Iodometry) (Type-IV), 2022)

### *Αναλύσεις γλεύκους και δειγμάτων οίνων*

Η μέτρηση του pH και της ολικής οξύτητας πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά την αποζύμωση. Ξεκινώντας με τη μέτρηση του pH, αφαιρέθηκαν με προσοχή τα πώματα και οι αεροπαγίδες που περιείχαν τη γλυκερόλη. Έπειτα, το δείγμα μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως 100ml με απόχυση του υπερκείμενου υγρού, αποφεύγοντας το ίζημα. Ακολούθησε η μέτρηση του pH.

### **Ενεργός οξύτητα (pH)**

Έγινε βαθμονόμηση του πεχαμέτρου με ρυθμιστικά διαλύματα γνωστού pH, 4 και 7.

Ελέγχθηκε η επάρκεια της ποσότητας του οίνου στο ποτήρι ζέσεως ώστε το ηλεκτρόδιο και το θερμόμετρο του πεχαμέτρου να ήταν εμβαπτισμένα μέσα στο δείγμα. Το δείγμα κατά τη μέτρηση βρισκόταν υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Η μέτρηση επαναλήφθηκε δύο φορές.

Το pH του γλεύκους και των οίνων καταγράφηκαν με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων.

### *Προετοιμασία δειγμάτων*

Στη συνέχεια, τα δείγματα προετοιμάστηκαν για τη μέτρηση της ολικής και πτητικής οξύτητας. Αρχικά έγινε φυγοκέντρωση στα 7000g για 10min στους 25°C και έπειτα διήθηση με φίλτρα MN640m διαμέτρου 110mm κατευθείαν σε κωνική κενού των 100ml ή των 250ml. Για την απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> δημιουργήθηκε κενό με τη βοήθεια αντλίας ύδατος με ταυτόχρονη ανάδευση. Η διαδικασία της απαέρωσης διήρκησε 3 λεπτά σε κάθε δείγμα.

Τα δείγματα προς μέτρηση της πτητικής οξύτητας φυλάχθηκαν φυγοκεντρημένα και απαερωμένα στους -20°C. Συγκεκριμένα, μεταφέρθηκαν με σιφόνι πλήρωσεως ακριβείας 20ml δείγματος, όσα απαιτούνται για την ανάλυση, σε αριθμημένο falcon των 50ml.

### **Ολική οξύτητα**

#### *Τυφλό*

Από τα πλέον φυγοκεντρημένα και απαερωμένα δείγματα παρασκευάστηκε αρχικά το τυφλό (πρότυπο σύγκρισης χρώματος). Μεταφέρθηκε ποσότητα από το κάθε δείγμα κατευθείαν σε κρυσταλλωτήριο ώστε να συμπληρωθεί με 10ml δείγματος. Η προχοΐδα συμπληρώθηκε μέχρι την ένδειξη «0» με NaOH 0,1N. Προστέθηκαν 25ml ddH<sub>2</sub>O και 1ml δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης. Ακολούθησε ανάδευση και τιτλοδότηση με διάλυμα NaOH 0,1N μέχρι αλλαγής του χρώματος του δείκτη από πορτοκαλί σε πράσινο/σμαραγδί. Τέλος, προστέθηκαν 5ml από ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 για «διόρθωση» του χρώματος.

#### *Δείγμα*

Αφού η προχοΐδα συμπληρώθηκε μέχρι την ένδειξη «0» με NaOH 0,1N, μεταφέρθηκαν 10ml του γλεύκους/οίνου σε κρυσταλλωτήριο. Προστέθηκαν 30ml ddH<sub>2</sub>O και 1ml δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης. Ακολούθησε ανάδευση και ογκομέτρηση μέχρι την αλλαγή του χρώματος του δείκτη από πορτοκαλί σε πράσινο/σμαραγδί. Έγινε σύγκριση με το «τυφλό» για να διαπιστωθεί ότι η ογκομέτρηση ολοκληρώθηκε. Καταγράφηκε η κατανάλωση για κάθε δείγμα (ml NaOH 0,1N). Για να εκφραστεί η ογκομετρούμενη οξύτητα σε g/lit ως προς το τρυγικό οξύ χρειάζεται το ισοδύναμο βάρος 1 mole τρυγικού οξέος:  $M_{\text{τρυγικού}} = 150 \text{ g/mole}$ . Το τρυγικό οξύ έχει δύο καρβοξυλομάδες στο μόριο του άρα το

ισοδύναμο βάρος του είναι:  $150/2 = 75 \text{ g}$ . Επομένως προκύπτει ότι η ολική οξύτητα υπολογίζεται από τον τύπο:

$$(\text{gr τρυγικού οξέος/ L}) = \text{κατανάλωση (ml NaOH 0,1N)} \times 0,75$$

## **Πτητική οξύτητα (με ρεύμα υδρατμών)**

### ***Προετοιμασία αυτόματης αποστακτικής:***

Αρχικά, έγινε καθαρισμός της συσκευής απόσταξης με dH<sub>2</sub>O (στη σφαιρική φιάλη απόσταξης και στο σωλήνα εκτόνωσης). Προστέθηκαν λίγοι κρύσταλλοι τρυγικού οξέος και λίγο dH<sub>2</sub>O στη σφαιρική φιάλη απόσταξης με σκοπό την αποδέσμευση του οξικού οξέος από τα άλατά του.

Ο χρόνος καθαρισμού ορίστηκε στα 4 λεπτά. Μετά το τέλος τους καθαρισμού η σφαιρική φιάλη και ο σωλήνας εκτόνωσης ξεπλύθηκαν με dH<sub>2</sub>O.

### ***Απόσταξη μεθ' ατμών:***

Για τη μέτρηση της πτητικής οξύτητας, αρχικά, αποψύχθηκαν τα αποθηκευμένα σε falcons δείγματα από τους -20°C. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για απόψυξη στους 25°C για περίπου 1 ώρα και 15 λεπτά. Στη σφαιρική φιάλη της συσκευής απόσταξης προστέθηκε ένας κρύσταλλος τρυγικού οξέος (0.5g). Στη συνέχεια, το περιεχόμενο (20ml) μεταφέρθηκε ποσοτικά στον βραστήρα της αποστακτικής με dH<sub>2</sub>O χρησιμοποιώντας όσο το δυνατό λιγότερη ποσότητα (4x4ml περίπου). Ο χρόνος απόσταξης ορίστηκε στα 7 λεπτά. Μαζί με τα ξεπλύματα της συσκευής και την καταγραφή των αποτελεσμάτων για μέτρηση 18 δειγμάτων (όσα περίπου μετρήθηκαν ανά ημέρα) πτητικής οξύτητας χρειάστηκαν περίπου 4 ώρες και 10 λεπτά (χωρίς τη 1 ώρα και 15 λεπτά της απόψυξης).

Κατά την απόσταξη συλλέχθηκαν τουλάχιστον 250 ml αποστάγματος για να θεωρηθεί ότι είχε συλλεχθεί όλη η ποσότητα.

Σε κάθε αλλαγή δείγματος γινόταν ξέπλυμα με dH<sub>2</sub>O στο καπάκι, στη σφαιρική φιάλη, στον σωλήνα εκτόνωσης και στο σωληνάκι της απόσταξης που βυθίζεται στην ογκομετρική φιάλη.

Δόθηκε προσοχή ώστε το μπιτονάκι να είναι γεμάτο με dH<sub>2</sub>O κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

Στο τέλος των μετρήσεων έγινε ξανά καθαρισμός της αυτόματης αποστακτικής με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκε πριν την έναρξη της ανάλυσης.

### ***Ογκομέτρηση***

Το απόσταγμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 500 ml. Αφού προστέθηκαν 5 σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλείνης, ογκομετρήθηκε με διάλυμα NaOH 0.1N μέχρι αλλαγής του χρώματος του δείκτη σε ρόδινο. Έστω n ο αριθμός των καταναλωθέντων ml. Έπειτα, προστέθηκαν 4 σταγόνες HCl αραιωμένου ¼, μερικοί κρύσταλλοι KI και 2 ml διαλύματος αμύλου 0,5% w/v.

Το ελεύθερο SO<sub>2</sub> ογκομετρήθηκε με διάλυμα ιωδίου 0.005 M (N/100) μέχρι αλλαγής χρώματος σε ανθρακί. Έστω n' ο αριθμός των καταναλωθέντων ml.

Κατόπιν προστέθηκε κεκορεσμένο διάλυμα βορικού νατρίου (8-10ml) μέχρι να επανεμφανισθεί ο ροδόχρους χρωματισμός. Το δεσμευμένο SO<sub>2</sub> ογκομετρήθηκε με το διάλυμα ιωδίου 0,005 M (N/100) μέχρι αλλαγής χρώματος σε μωβ. Έστω n'' ο αριθμός των καταναλωθέντων ml.

#### *Έκφραση αποτελεσμάτων*

Η πτητική οξύτητα, εκφραζόμενη σε χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο με ένα δεκαδικό ψηφίο, δίνεται από τον τύπο:

$$A = 5 (n - 0.1 n' - 0.05 n'')$$

Η πτητική οξύτητα, εκφραζόμενη σε g οξικού οξέος ανά λίτρο με δύο δεκαδικά ψηφία, δίνεται από τον τύπο:

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

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος που περιγράφηκε.

#### Αναλύσεις γλεύκους

Το χρησιμοποιούμενο γλεύκος προερχόταν από την ποικιλία Μοσχάτο Λήμνου της χρονιάς 2022. Αφού αποστειρώθηκε στους 120°C για 20 λεπτά πραγματοποιήθηκαν χημικές αναλύσεις ώστε να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά του. Τα αρχικά σάκχαρα υπολογίστηκαν διαθλασιμετρικά και βρέθηκαν ίσα με 186,2g/l, το ολικό SO<sub>2</sub> 36mg/l (το ελεύθερο 3mg/l και το δεσμευμένο: 30mg/l), το αφομοιώσιμο άζωτο (YAN) ήταν αρχικά 109,2mg/l και ύστερα από συμπλήρωση φέρθηκε στα 200mg/l, η ολική οξύτητα εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ 4,54g/l, η πτητική οξύτητα εκφρασμένη σε οξικό οξύ 0,20g/l και το pH ίσο με 3,49.

#### Αναλύσεις οίνων

Στους οίνους που προέκυψαν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης μετρήθηκαν το pH, η ολική οξύτητα και η πτητική οξύτητα. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές με το τυπικό σφάλμα τους, καθώς επίσης και οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές που εμφάνισαν οι οίνοι χωρισμένοι ανάλογα με την προέλευση του στελέχους εμβολιασμού τους. Ο μέσος όρος υπολογίστηκε από τον τύπο  $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{N}$ , όπου N το πλήθος των δεδομένων του δείγματος και  $\bar{x}$  ο αριθμητικός μέσος για το δείγμα. Τα δεδομένα εκφράστηκαν με τη μορφή του τυπικού σφάλματος του μέσου:  $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$ , όπου  $\sigma_{\bar{x}}$  το τυπικό σφάλμα του μέσου που υπολογίζεται από τον τύπο:  $\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma_x}{\sqrt{N}}$ . Το  $\sigma_x$  αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση, η οποία ορίζεται ως  $\sigma_x =$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

Πίνακας 1: Σύγκριση βασικών χημικών αναλύσεων

Περιογή	Νεμέα			Πεζά		
	mean	max	min	mean	max	min
pH	3,53±0,01	3,55	3,50	3,54±0,01	3,58	3,51
Ολική οξύτητα(g/L τρυγικού οξέος)	4,68±0,01	4,84	4,54	4,66±0,01	4,80	4,58
Πτητική οξύτητα (g/L οξικού οξέος)	0,14±0,01	0,20	0,06	0,13±0,01	0,24	0,05
Ολικό CO <sub>2</sub> (gCO <sub>2</sub> στην ολοκλήρωση της ζύμωσης)	1,94±0,03			1,94±0,04		

Οι μέσες τιμές των αναλύσεων μεταξύ των δύο περιοχών έχουν διαφορές μόλις 0,01 για το pH, 0,02 για την ολική οξύτητα και 0,01 για την πτητική οξύτητα, ενώ για τα ολικά gCO<sub>2</sub> που απελευθερώθηκαν με το τέλος της ζύμωσης οι μέσες τιμές τους είναι πανομοιότυπες.

Παρακάτω, στον Πίνακα 2 συγκρίνονται οι διαφορές που υπήρχαν μεταξύ των τιμών του γλεύκους και των μέσων τιμών του pH, της ολικής οξύτητας και της πτητικής οξύτητας των τελικών οίνων που παρήχθησαν με τα στελέχη από τα Πεζά και από τη Νεμέα αντίστοιχα. Η μέση τιμή της κάθε μεταβλητής υπολογίστηκε από τον τύπο  $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{N}$ , όπου N το πλήθος των δεδομένων του δείγματος και  $\bar{x}$  ο αριθμητικός μέσος για το δείγμα. Από την κάθε τιμή που προέκυψε αφαιρέθηκε η διαφορά των αντίστοιχων τιμών των μεταβλητών από τα αρχικά στοιχεία του γλεύκους.

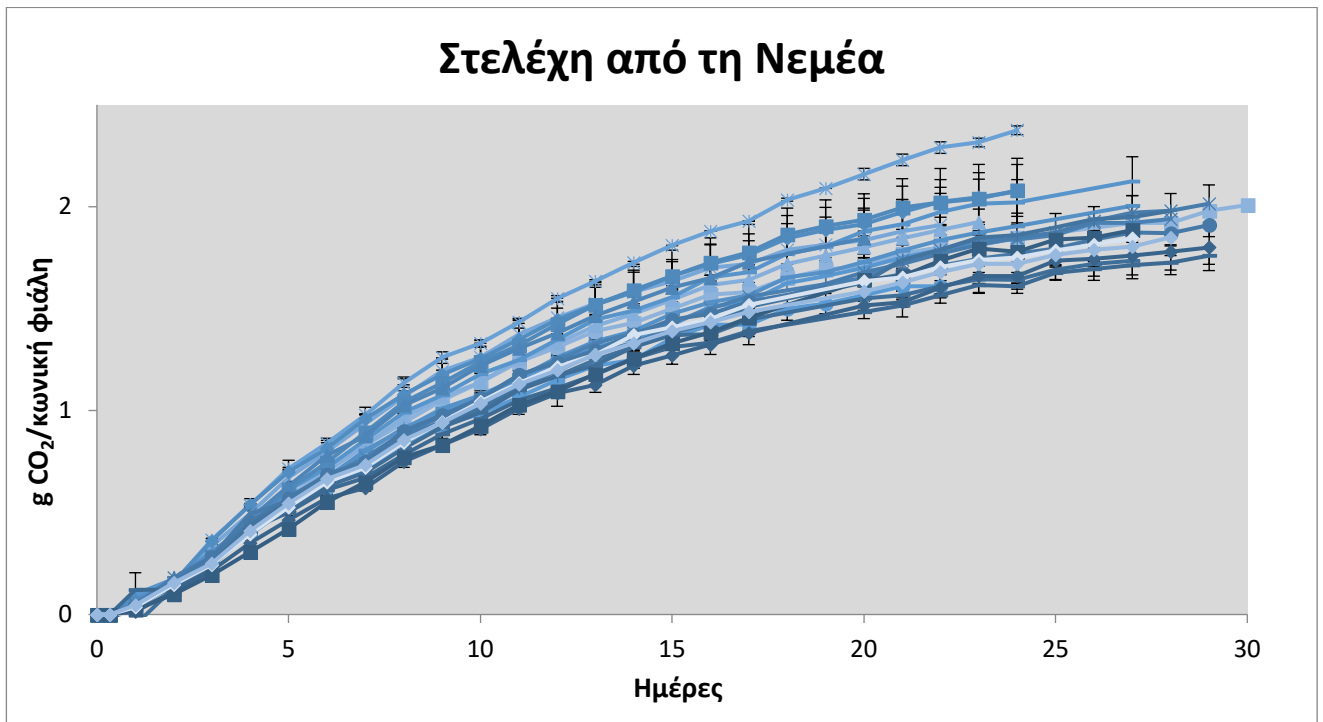
*Πίνακας 2: Μεταβολή των μέσων τιμών της οξύτητας μεταξύ γλεύκους-οίνου*

<b>Μέση μεταβολή από το αρχικό γλεύκος</b>		
<b>Περιοχή</b>	<b>Νεμέα</b>	<b>Πεζά</b>
<b>pH</b>	0,04	0,05
<b>Ολική οξύτητα (g/L τρυγικού οξέος)</b>	0,14	0,12
<b>Πτητική οξύτητα (g/l οξικού οξέος)</b>	-0,06	-0,07

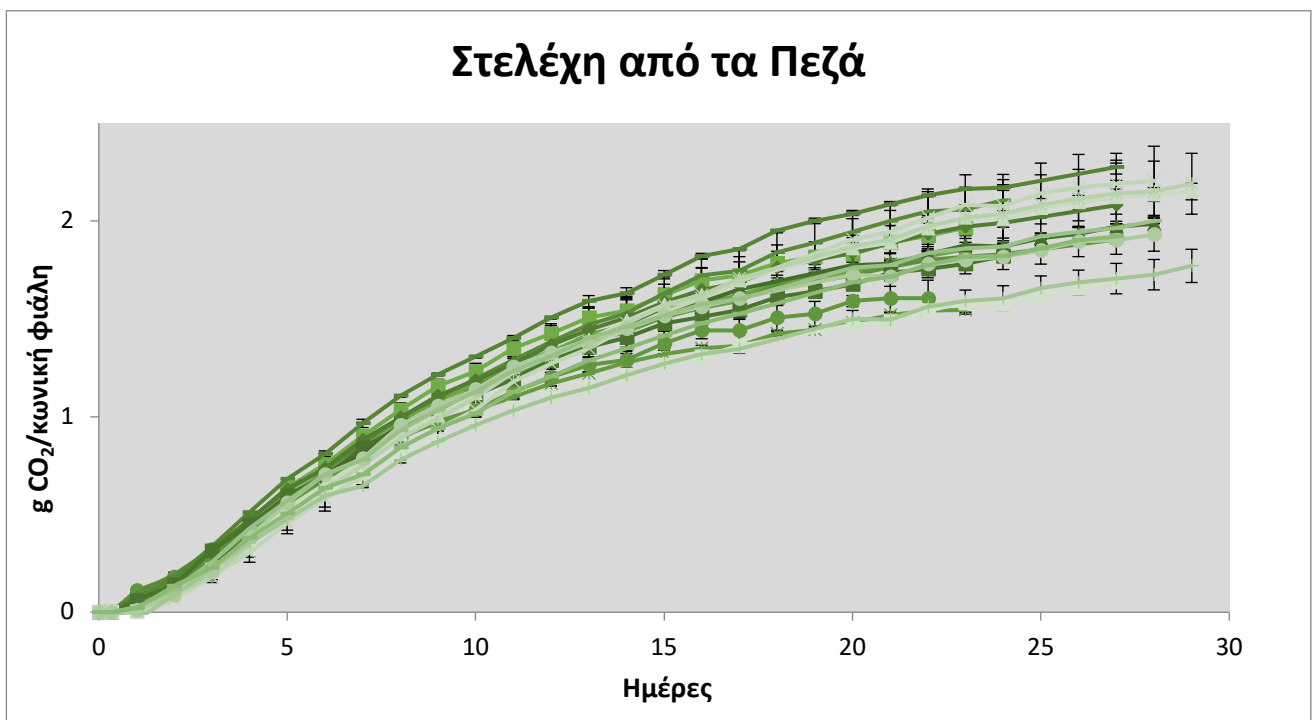
Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 2, και στις δύο περιπτώσεις το pH και η ολική οξύτητα αυξάνονται, ενώ η πτητική οξύτητα μειώνεται με την ολοκλήρωση της ζύμωσης.

### ***Καμπύλες ζύμωσης***

Τα διαγράμματα 1,2 και 3 απεικονίζουν την πορεία των ζυμώσεων ανάλογα με το εκλυόμενο CO<sub>2</sub> που υπολογίστηκε από την καθημερινή διαφορά βάρους των κωνικών φιαλών ζύμωσης. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η πορεία της ζύμωσης των στελεχών από τη Νεμέα και με πράσινο χρώμα των στελεχών από τα Πεζά.

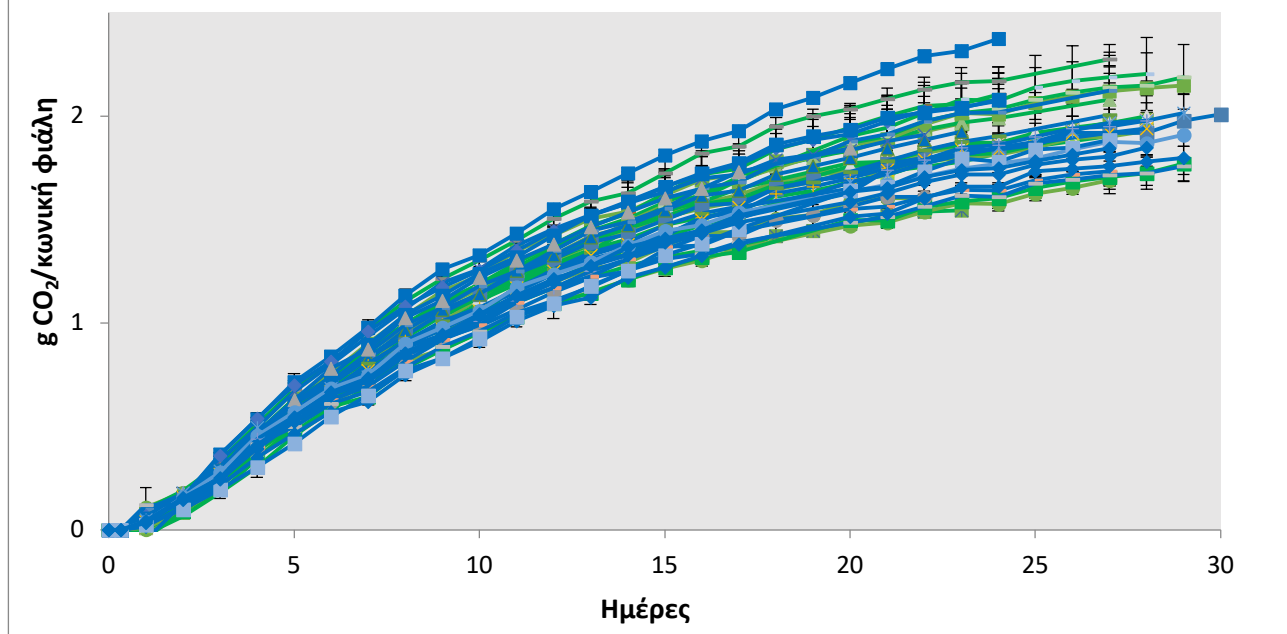


Διάγραμμα 1: Καμπύλες ζύμωσης των στελεχών από τη Νεμέα



Διάγραμμα 2: Καμπύλες ζύμωσης των στελεχών από τα Πεζά

### Όλα τα στελέχη από τη Νεμέα και τα Πεζά



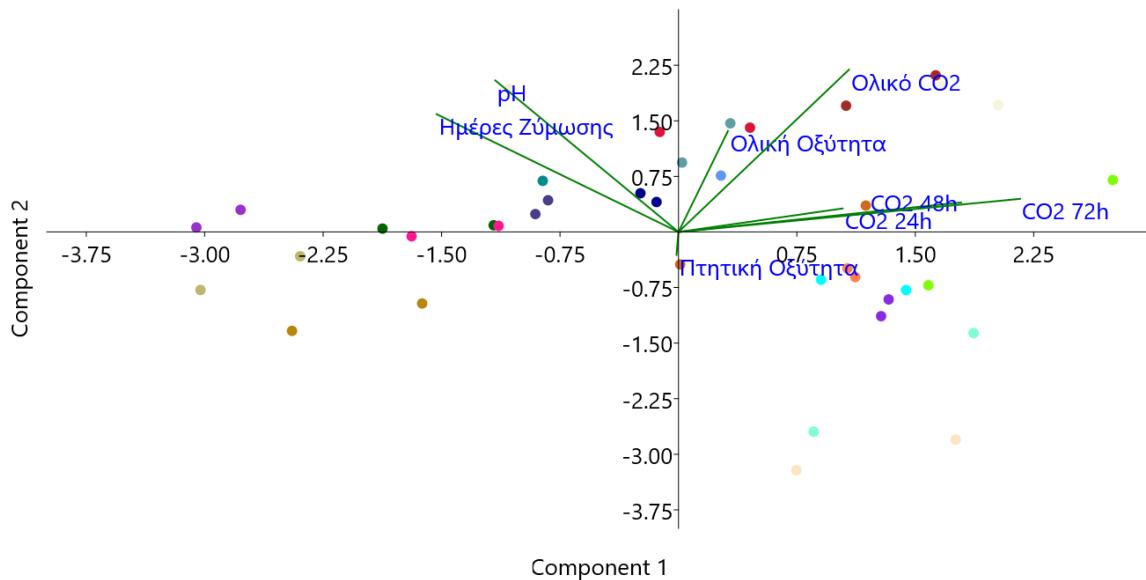
Διάγραμμα 3: Καμπύλες ζύμωσης όλων των στελεχών

Το γεγονός ότι οι καμπύλες ζύμωσης των διαφορετικών στελεχών δεν συμπίπτουν μεταξύ τους (Διαγράμματα 1 και 2), είναι μια ακόμα ένδειξη της μοναδικότητας των φαινοτύπων τους. Από το Διάγραμμα 3 φαίνεται πως η πορεία ανάπτυξης ακολουθεί τον ίδιο ρυθμό για όλα τα στελέχη ανεξάρτητα από την τοποθεσία απομόνωσής τους. Οι διαφορές μεταξύ των στελεχών γίνονται όλο και πιο εμφανείς προς το τέλος της ζύμωσης όπου οι καμπύλες διαχωρίζονται και αντιστοιχούν η κάθε μία σε διαφορετικό σημείο πάνω στον άξονα y των ολικών γραμμαρίων CO<sub>2</sub> που εκλύθηκαν.

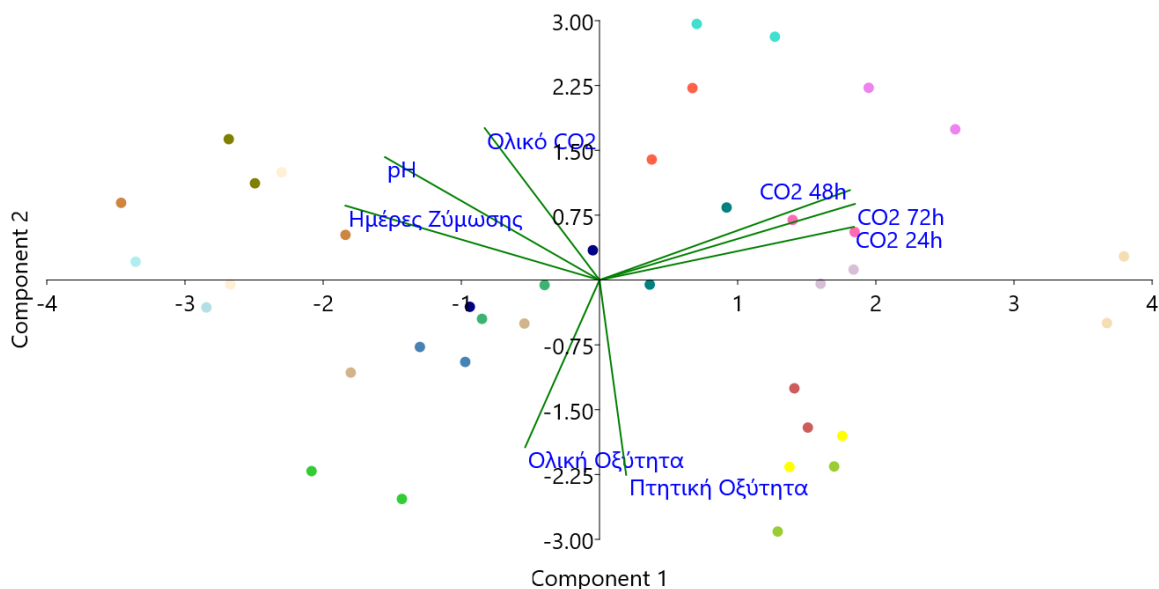
Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ANOVA για να προσδιοριστεί εάν υπήρχε στατιστική συσχέτιση μεταξύ της γεωγραφικής προέλευσης των στελεχών και των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους που μελετήθηκαν. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό PAST. Αφού τα στελέχη χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την περιοχή απομόνωσής τους, εξετάστηκαν ξεχωριστά η πτητική οξύτητα, η ολική οξύτητα, το pH, οι συνολικές ημέρες ζύμωσης, το CO<sub>2</sub> που εκλύθηκε από την κάθε κωνική φιάλη τις πρώτες 24, 48 και 72 ώρες, αλλά και το ολικό CO<sub>2</sub> που απελευθερώθηκε με την ολοκλήρωση της κάθε ζύμωσης. Το επίπεδο εμπιστοσύνης ορίστηκε στο 95% και τα δεδομένα με  $p < 0,05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά.

Οι αναλύσεις ANOVA έδειξαν πως δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των στελεχών των δύο περιοχών. Αναλυτικότερα, για την πτητική οξύτητα ( $p=0,5481$ ,  $F=0,3673$ ), την ολική οξύτητα ( $p=0,4155$ ,  $F=0,6779$ ), το pH ( $p=0,226$ ,  $F=1,515$ ), τις ημέρες για την ολοκλήρωση της ζύμωσης ( $p=0,6346$ ,  $F=0,2297$ ), το ολικό CO<sub>2</sub> ( $p=0,9748$ ,  $F=0,001008$ ), το CO<sub>2</sub> στις 24 ώρες ( $p=0,1848$ ,  $F=1,824$ ) και το CO<sub>2</sub> στις 72 ώρες ( $p=0,2008$ ,  $F=1,695$ ), οι διαφορές κρίθηκαν στατιστικά ασήμαντες. Η μόνη σημαντική διαφορά εντοπίζεται στο εκλύόμενο CO<sub>2</sub> στις 48 ώρες ( $p=0,007287$ ,  $F=8,042$ ).

Προκειμένου να γίνουν εμφανείς οι σχέσεις μεταξύ της περιοχής προέλευσης των στελεχών και του οινολογικού τους δυναμικού, όπως το pH, η ολική οξύτητα, η πτητική οξύτητα των τελικών οίνων, οι ημέρες για την ολοκλήρωση της ζύμωσης και το ολικό CO<sub>2</sub> αλλά και ο ρυθμός του εκλυόμενου CO<sub>2</sub>, πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Η ανάλυση έγινε με τη χρήση του λογισμικού PAST.

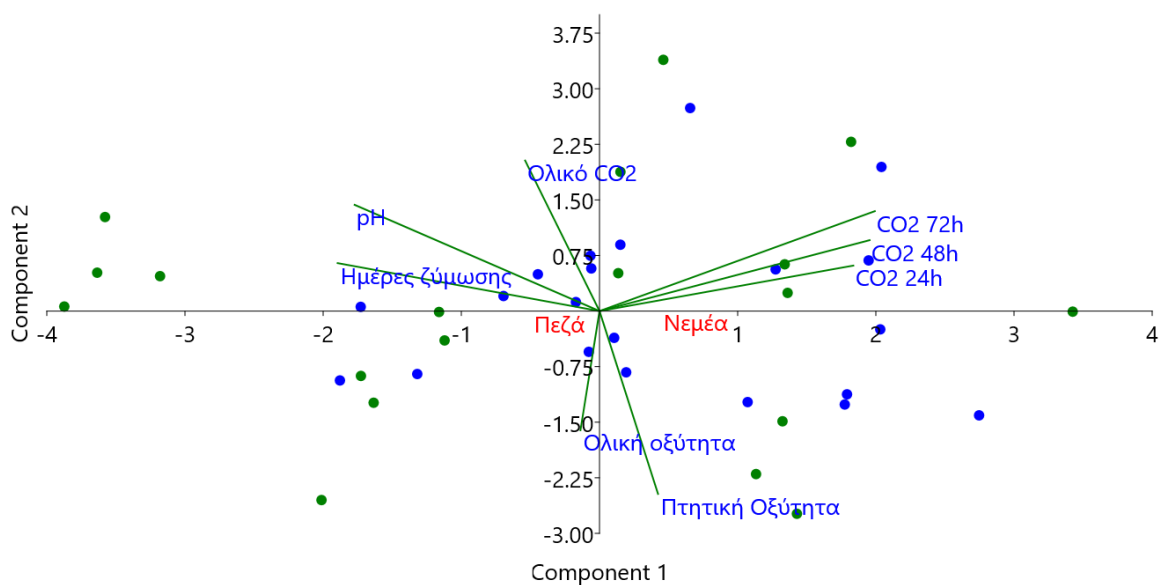


Διάγραμμα 4: Διάγραμμα διασποράς στελεχών από τη Νεμέα



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα διασποράς στελεχών από τα Πεζιά





Διάγραμμα 6: Διάγραμμα διασποράς όλων των στελεχών από τα Πεζά και τη Νεμέα

Στο Διάγραμμα 6, με πράσινο χρώμα αναπαρίστανται τα στελέχη από τα Πεζά και με μπλε τα στελέχη από τη Νεμέα. Τα δεδομένα περιγράφουν τα χαρακτηριστικά των 40 στελεχών *Metschnikowia pulcherrima* από τις δύο περιοχές απομόνωσης. Οι 2 πρώτες κύριες συνιστώσες αντιστοιχούν σε περισσότερο από 62% της συνολικής μεταβλητότητας.

Από τα 19 στελέχη από τα Πεζά και τα 21 στελέχη από τη Νεμέα που μελετήθηκαν, παρατηρείται μία ισόποση κατανομή ως προς την περιοχή προέλευσης σε όλο τον χώρο της PCA. Ήδη από τα διαγράμματα 4 και 5 που εξετάζονται τα στελέχη της κάθε περιοχής ξεχωριστά, είναι ορατή η μεγάλη ποικιλομορφία που υπάρχει ακόμα και μεταξύ στελεχών με την ίδια γεωγραφική προέλευση. Για το λόγο αυτό, η ποικιλομορφία και η αδυναμία ομαδοποίησης των στελεχών που εμφανίζεται στο Διάγραμμα 6, που περιλαμβάνει τα στελέχη και από τις δύο περιοχές απομόνωσης μαζί, είναι αναμενόμενη.

Παρατηρείται, επίσης, από το διάγραμμα 6 ότι τα στελέχη από την περιοχή της Νεμέας εμφανίζουν την τάση να βρίσκονται στις θετικές τιμές του component 2, σε αντίθεση σε τα στελέχη από τα Πεζά που τείνουν προς τις αρνητικές τιμές του άξονα.

Επιπλέον, η διασπορά που εμφανίζεται σε όλα τα διαγράμματα της PCA (Διαγράμματα 4, 5 και 6) είναι μία ακόμα ένδειξη πως τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των στελεχών πράγματι διαφέρουν επηρεάζοντας το τελικό αποτέλεσμα της οινοποίησης. Ωστόσο, 4 στελέχη από τα Πεζά, και συγκεκριμένα τα B30PW15, E340PL2, B53PW14, B55PW15, φαίνεται να ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα εμφανίζοντας μία τάση ομαδοποίησης όσον αφορά το pH και τις ημέρες ζύμωσης κατέχοντας τις πιο ακραίες τιμές ως προς τις μεταβλητές αυτές.

## 4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μία μελέτη σε επίπεδο στελέχους του είδους *M. pulcherrima* που να εστιάζει στην ιδιαιτερότητα της γεωγραφικής προέλευσης δεν είχε προηγουμένως διεξαχθεί στους ελληνικούς αμπελώνες. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε παρόμοιο πείραμα από τους (Barbosa et al., 2018), οι οποίοι εξέτασαν γηγενή στελέχη του είδους *M. pulcherrima* απομονωμένα από διαφορετικές τοποθεσίες της αμπελουργικής περιοχής του Douro. Στα αποτελέσματά τους δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των στελεχών και της γεωγραφικής τους προέλευσης μετά από σύγκριση των γονοτυπικών τους προφίλ. Τα διάφορα οινολογικά χαρακτηριστικά που αξιολογήθηκαν ήταν σε μεγάλο βαθμό εξαρτώμενα από το στέλεχος. Επίσης, η *M. pulcherrima* βρέθηκε ικανή να μειώνει την αιθανόλη, το οξικό οξύ και τα επίπεδα υδρόθειου στους οίνους. Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης με αυτή των (Barbosa et al., 2018) εμφανίζουν κοινά σημεία τόσο στην απουσία σύνδεσης του τελικού οινολογικού χαρακτήρα με την γεωγραφική προέλευση των στελεχών της ζύμωσης, όσο και στην ανάδειξη της ικανότητας των στελεχών της *M. pulcherrima* να μειώνουν την τελική πτητική οξύτητα των οίνων. Επίσης, υπάρχει συμφωνία στην αποδοχή της εξάρτησης των τελικών οινολογικών χαρακτηριστικών από το στέλεχος. Οι ομοιότητες των πειραμάτων ενδέχεται να οφείλονται στις παρόμοιες συνθήκες διεξαγωγής των ζυμώσεων τους οι οποίες είχαν σκοπό να αναδείξουν τα οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *M. Pulcherrima* όταν βρίσκονται ανεξάρτητα από το μείγμα μικροοργανισμών στο οποίο συναντώνται στην αυθόρμητη ζύμωση.

Οι (Banilas et al., 2016) διερευνήσαν την ύπαρξη μικροβιακού *terroir* στην περίπτωση των *L. thermotolerans* απομονωμένων από τις ίδιες αμπελουργικές ζώνες της Ελλάδας όπως και στην παρούσα εργασία, αυτές των Πεζών και της Νεμέας. Στο πείραμά τους επιλέχθηκαν 25 στελέχη από διαφορετικές γονοτυπικές ομάδες και εξετάστηκαν σε έναν αριθμό φαινοτυπικών δοκιμών. Παρά την ποικιλομορφία των γονοτύπων των στελεχών που συναντήθηκαν εντός της ίδιας αμπελουργικής ζώνης, υπήρχαν διακριτές διαφορές μεταξύ των απομονώσεων των δύο περιοχών. Τα αποτελέσματα της έρευνας υποστηρίζουν την έννοια του μικροβιακού *terroir* στην περίπτωση των *L. thermotolerans* στην Ελλάδα. Ωστόσο, δεν έγινε ξεκάθαρο εάν η έννοια του μικροβιακού *terroir* μπορεί να εφαρμοστεί ευρέως σε ζύμες *non-Saccharomyces*. Στην τωρινή εργασία έγινε εμβάθυνση στα χαρακτηριστικά ζυμών που ανήκουν στους *non-Saccharomyces*. Παρόλο που τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων ανέδειξαν την ποικιλομορφία των φαινοτύπων των διαφόρων στελεχών της *M. pulcherrima*, δεν προσέφεραν την εικόνα της διακριτής διαφοροποίησης ανάλογα με την περιοχή προέλευσης.

Σε σχετικές έρευνες που αφορούν την επίδραση του παράγοντα της γεωγραφικής προέλευσης ανήκει η αυτή των (Hawkins et al., 2023), οι οποίοι διερεύνησαν την υπόθεση ότι οι μικτές αποικίες ζυμομυκήτων, που περιλαμβάνουν πολλαπλά, ειδικά για την περιοχή στελέχη, συμβάλλουν στον τοπικό χαρακτήρα του οίνου. Βρέθηκε ότι η περιοχή προέλευσης ζυμομυκήτων είχε σημαντικό αντίκτυπο στο άρωμα του οίνου. Αυτό αποδόθηκε στην ιδιαίτερη σύνθεση των διαφόρων ζυμομυκήτων που συναντάται σε κάθε περιοχή, η οποία είναι ικανή να διαμορφώσει τις αρωματικές ενώσεις του οίνου με ξεχωριστό τρόπο επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι ο παράγοντας του μικροβιακού προφίλ συμβάλει στην τοπική ιδιαιτερότητα, ή αλλιώς *terroir*, για το Pinot Noir της Νέας Ζηλανδίας. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι (Schuller et al., 2005) με 18 σημεία δειγματοληψίας τριών αμπελώνων. Βρέθηκε ότι το τελικό αποτέλεσμα της ζύμωσης ήταν εξαρτημένο από την ειδική σύνθεση των στελεχών ζυμομυκήτων του γλεύκους. Παρόλο που τα στελέχη *M. pulcherrima* που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία δεν ήταν ικανά από μόνα τους να προβάλλουν την στιλιστική ιδιαιτερότητα

της περιοχής προέλευσής τους, ενδέχεται η συνδυαστική χρήση τους μαζί με άλλα στελέχη ζυμομυκήτων να είναι ο παράγοντας που μπορεί να αναδείξει τη συμβολή του μικροβιακού *terroir* στο τοπικό προφίλ του οίνου.

Όπως γίνεται αντιληπτό, η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά συμβάλει καθοριστικά στο *terroir* μια δεδομένης περιοχής. Η κύρια συμβολή του παράγοντα της γεωγραφικής προέλευσης, όπως υποδεικνύουν οι έρευνες των (Jara et al., 2016) και των (Valero et al., 2007) οι οποίοι εξέτασαν την παρουσία και την ποσότητα ζυμών οινολογικού ενδιαφέροντος από αμπελώνες της Χιλής και της νότιας Γαλλίας αντίστοιχα, βρίσκεται στον κλιματολογικό χαρακτήρα της εκάστοτε περιοχής. Αναλυτικότερα, οι (Jara et al., 2016) σύγκριναν τα γονιδιακά προφίλ στελεχών τα οποία, αν και δεν ήταν πανομοιότυπα, εμφάνιζαν διαφορές και ομοιότητες ανάλογα με την περιοχή απομόνωσης τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει την ποσότητα των εμφανιζόμενων ζυμών είναι οι κλιματολογικές συνθήκες και ιδιαίτερα η υγρασία. Τα αποτελέσματα συμπίπτουν με αυτά των (Chalvantzi et al., 2021) όπου παρατήρησαν πως η διαδοχική ύπαρξη συγκεκριμένων αποικιών στα αμπέλια μπορεί να επηρεαστεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η μέγιστη θερμοκρασία, το υψόμετρο και τα επίπεδα βροχοπτώσεων. Αντίστοιχα, οι (Valero et al., 2007) επίσης συμπέραναν ότι η κύρια επιρροή ήταν οι κλιματολογικές συνθήκες δίνοντας έμφαση σε συγκεκριμένους παράγοντες που σχετίζονται με την ηλικία και την έκταση των αμπελώνων. Στην περίπτωση των στελεχών από τα Πεζά και τη Νεμέα, παρόλο που η γεωγραφική απόσταση μεταξύ των περιοχών είναι μεγαλύτερη από 350 χιλιόμετρα, οι κλιματολογικές συνθήκες δεν ήταν σε θέση να μεταβάλουν αρκετά τους φαινοτύπους των εξεταζόμενων στελεχών ώστε να είναι σαφής ο διαχωρισμός με βάση την προέλευσή τους. Επιπλέον των περιβαλλοντικών συνθηκών, ο ανθρώπινος παράγοντας χρειάζεται να συμψηφιστεί για μια ολοκληρωμένη εικόνα του *terroir* μιας περιοχής. Οι (Regueiro et al., 1993) μελέτησαν τις επιπτώσεις των οινολογικών πρακτικών στις αποικίες ζυμών που συμμετείχαν σε αυθόρμητη ζύμωση από δύο περιοχές της νοτιοδυτικής Γαλικίας (βορειοδυτική Ισπανία) με πολύ παρόμοιες κλιματολογικές, γεωγραφικές και εδαφολογικές συνθήκες. Συμπέραναν ότι οι αντιμυκητιασικές θεραπείες που χρησιμοποιούνται στους αμπελώνες και η υγιεινή του εξοπλισμού του οινοποιείου αποτελούσαν τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρέαζαν τη συχνότητα εμφάνισης των ζυμών.

Δεδομένου ότι η διαδοχική ύπαρξη ορισμένων μικροοργανισμών σε μία τοποθεσία είναι αυτή που μπορεί να τους ανάγει σε μικροοργανισμούς *terroir*, οι (Vezinhe et al., 1992) μελέτησαν τη μικροχλωρίδα στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* δύο αμπελώνων (Champagne και Loire Valley) επί έξι συναπτά έτη. Βρέθηκε ότι ορισμένα στελέχη ζυμομυκήτων είναι ευρέως κατανομημένα και αντιπροσωπευτικά ενός αμπελώνα ή μίας οινοπαραγωγικής περιοχής και μπορούν να βρεθούν σε διαδοχικά έτη. Αυτό υποδεικνύει πως υπάρχουν στελέχη που κυριαρχούν στις μικροβιακές κοινότητες των αμπελώνων, υποδηλώνοντας την εμφάνιση συγκεκριμένων ιθαγενών στελεχών που μπορούν να συσχετιστούν με ένα *terroir*. Σε αντίθετα, όμως, συμπεράσματα κατέληξαν οι (Vigentini et al. 2015) σε παρόμοια έρευνα που έκαναν απομονώνοντας στελέχη από αμπελουργικές περιοχές της βόρειας Ιταλίας επί τρία συναπτά έτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα στέλεχος δεν απομονώθηκε εκ νέου στον ίδιο αμπελώνα ή για διαδοχικά έτη. Επομένως, διεξήχθη το συμπέρασμα ότι το έτος απομόνωσης (εσοδεία) είχε σημαντική επιρροή στην ποικιλομορφία των ειδών ζύμης σε αντίθεση με τη γεωγραφική προέλευση (*terroir*). Ως εκ τούτου, η διερεύνηση της βιοποικιλότητας των αυτόχθονων ζυμοτικών στελεχών μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση και την επιλογή στελεχών με συγκεκριμένους φαινοτύπους. Η διαφορά στα αποτελέσματα των δύο

πειραμάτων ενδέχεται να οφείλεται στη διαφορά που είχαν στη διάρκεια των ετών διεξαγωγής τους. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της κάθε εσοδείας και συνεπώς τα αποτελέσματα να έρχονται σε συμφωνία με τα συμπεράσματα των (Jara et al., 2016; Valero et al., 2007;Chalvantzi et al., 2021) όσον αφορά το αντίκτυπο των κλιματολογικών συνθηκών που αναφέρθηκε παραπάνω. Η πιο διακριτή εμφάνιση του χαρακτήρα «άγριας ζύμης», δύναται να εντοπιστεί στα πτητικά προϊόντα της ζύμωσης, όπως αναφέρουν οι (Varela et al., 2009). Επομένως, μία μελέτη που να συμπεριλαμβάνει αναλυτικότερα τα τελικά πτητικά προϊόντα της ζύμωσης θα μπορούσε να κάνει πιο ξεκάθαρη την εικόνα της προέλευσης του τοπικού προφίλ των οίνων. Φαίνεται πως ενώ οι ζύμες αποτελούν μέρος του *terroir* επηρεάζοντας την ιδιομορφία του, το ίδιο το περιβάλλον είναι αυτό που επηρεάζει σημαντικά και μεταβάλλει τη φαινοτυπική έκφραση των ζυμών και δρουν ως παράγοντες αλληλεξαρτώμενοι στην τελική έκφρασή τους στον οίνο. Επιπλέον, η μελέτη των μεμονωμένων στελεχών σε ζύμωση, ενώ μας παρέχει πληροφορίες για τις ιδιότητες τους, δεν μας παρέχει την εικόνα της αλληλεπίδρασης με την υπόλοιπη μικροχλωρίδα που βρίσκεται φυσικά στο περιβάλλον τους και επομένως δεν είναι ικανά να μεταφέρουν αυτόνομα την ιδιότητα του τοπικού χαρακτήρα.

## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την ανάδειξη των σχέσεων που υπάρχουν μεταξύ της γεωγραφικής προέλευσης και του οινολογικού δυναμικού, ειδικότερα του δυναμικού της οξύτητας, στελεχών που απομονώθηκαν από τις αμπελουργικές ζώνες των Πεζών και της Νεμέας. Επίσης, στόχευε στην καλύτερη κατανόηση της έννοιας του τοπικού χαρακτήρα των οίνων και των παραγόντων που συντελούν στην έκφρασή του. Οι πληροφορίες που αποκτώνται για τα στελέχη που εξετάζονται μπορούν να συμβάλουν στην αξιοποίηση της φυσικής μικροχλωρίδας μέσω της ανάπτυξης παρασκευασμάτων που λειτουργούν ως εναρκτήριες καλλιέργειες της ζύμωσης. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να καλυφθούν οι απαιτήσεις του διεθνούς ανταγωνισμού και των καταναλωτών για γευστικά βελτιωμένους οίνους στους οποίους αποτυπώνεται η στιλιστική ιδιαιτερότητα της περιοχής προέλευσής τους.

Τα αποτελέσματα βασίστηκαν στις μικροοινοποιήσεις διπλής επαναλήψεως 40 στελεχών του είδους *M. pulcherrima*, 21 εκ των οποίων αποτελούσαν απομονώσεις από την αμπελουργική περιοχή της Νεμέας και 19 από την αμπελουργική περιοχή των Πεζών. Οι χημικές αναλύσεις του γλεύκους και των παραχθέντων οίνων που ακολούθησαν αφορούσαν τα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την οξύτητά τους, δηλαδή την ολική οξύτητα, το pH και την πτητική τους οξύτητα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, μέσω αναλύσεων ANOVA και PCA, ξεκαθάρισε την εικόνα της οινολογικής δράσης των *M. pulcherrima* και των σχέσεων μεταξύ των απομονώσεων των δύο περιοχών.

Τα αποτελέσματα, συνολικά, ως προς τους παράγοντες που εξετάστηκαν, έδειξαν ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στο οινολογικό δυναμικό των στελεχών *M. pulcherrima* μεταξύ των δύο περιοχών απομόνωσης και ότι, συνεπώς, δεν είναι ικανά να μεταφέρουν αυτόνομα την ιδιότητα του τοπικού χαρακτήρα στους οίνους. Επιπλέον, αναδείχθηκε η ικανότητα της *M. pulcherrima* να μειώνει την τελική πτητική οξύτητα των οίνων και να έρχεται σε συμφωνία με σχετικές οινολογικές μελέτες (Barbosa et al., 2018) που αναφέρουν το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό του είδους. Αντιθέτως, το pH και η ολική οξύτητα παρουσίασαν αύξηση μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης. Από την ανάλυση PCA, αναδείχθηκε η διασπορά και η ποικιλομορφία των φαινοτύπων των στελεχών, ενώ δεν παρουσιάστηκε κάποια εμφανής ομαδοποίηση που να υποδηλώνει τη σύνδεση με την περιοχή απομόνωσής τους. Ωστόσο, 4 στελέχη από τα Πεζά εμφάνισαν κοντινά προφίλ ως προς το pH και τη διάρκεια της ζύμωσης. Επίσης, όπως έδειξε η ανάλυση ANOVA, η στατιστική διαφορά των χαρακτηριστικών των στελεχών για τις δύο γεωγραφικές περιοχές είναι αμελητέα, με τα αποτελέσματα να έρχονται σε συμφωνία ως προς την αδυναμία εντοπισμού διαφορών με βάση τη γεωγραφική προέλευση. Επομένως, το οινολογικό αποτέλεσμα επηρεάζεται με ξεχωριστό τρόπο από τη ζυμοτική δράση του κάθε στελέχους.

Παρόλο που τα στελέχη *M. pulcherrima* που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία δεν ήταν ικανά να καθορίσουν ανεξάρτητα τη στιλιστική ιδιαιτερότητα της περιοχής προέλευσής τους, ενδέχεται η συνδυαστική χρήση τους μαζί με άλλα στελέχη ζυμομυκήτων να είναι ο παράγοντας που μπορεί να αναδείξει τη συμβολή της μικροβιακής χλωρίδας στο τοπικό προφίλ των οίνων. Καθίσταται χρήσιμη περαιτέρω έρευνα που να εστιάζει στη συνδυαστική χρήση των διαφόρων ιθαγενών στελεχών και την παρακολούθηση της αλληλεπίδρασής τους. Η συσχέτιση της έννοιας του τοπικού χαρακτήρα των οίνων με το μικροβιακό αποτύπωμα μιας περιοχής επάγεται τόσο στην συχνότητα εμφάνισης των ιθαγενών στελεχών όσο και στα

προϊόντα που αυτά παράγουν μέσω της ζύμωσης. Το ίδιο το περιβάλλον είναι αυτό που καθορίζει και μεταβάλλει τα χαρακτηριστικά των αυτόχθονων αποικιών και δρουν ως παράγοντες αλληλεξαρτώμενοι στην τελική έκφρασή τους στον οίνο. Επομένως, κρίνεται ωφέλιμη μία μελέτη που να περιλαμβάνει ποσοτικούς και ποιοτικούς προσδιορισμούς των μικροβιακών κοινοτήτων και των προϊόντων του μεταβολισμού τους. Η γεωγραφική απόσταση των δύο περιοχών δεν έδειξε σημαντική διαφοροποίηση στα στελέχη της *M. pulcherrima*. Ενδεχομένως να είναι πιο εμφανές το αντίκτυπο του *terroir* σε περιοχές όπου τα κλιματολογικά τους χαρακτηριστικά και οι οινολογικές πρακτικές διαφέρουν σημαντικά και είναι σε θέση να μεταβάλλουν τους φαινοτύπους των στελεχών που απαντώνται φυσικά στους αμπελώνες. Οι περισσότερες έρευνες που αφορούν βιοκοινότητες *non-Saccharomyces* είναι περιορισμένες ενώ θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει εμβάθυνση των γνώσεων σε επίπεδο στελεχών ενός είδους, όπως και στην τωρινή μελέτη. Η διερεύνηση της βιοποικιλότητας των αυτόχθονων ζυμοτικών στελεχών μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση και στην κατάλληλη επιλογή εναρκτηρίων καλλιεργειών συγκεκριμένων επιθυμητών φαινοτύπων.

Μέσω της παρούσας εργασίας έγινε ένα ακόμα βήμα προς την αποσαφήνιση της έννοιας του χαρακτήρα *terroir* των οίνων. Ωστόσο, οι παράγοντες που την απαρτίζουν δεν έχουν καθοριστεί ακόμα με σαφήνεια. Μέχρι η έρευνα γύρω από τη δράση των αυτόχθονων ζυμομυκήτων να προχωρήσει και να είναι σε θέση να εξηγήσει ξεκάθαρα την αλληλεπίδραση μεταξύ του *terroir* και των μικροοργανισμών που το συνθέτουν, η έννοια αυτή ορίζεται αυθαίρετα από το οινικό κοινό και αναφέρεται στην εξάρτηση του οινολογικού δυναμικού από αμπελουργικούς ή γεωλογικούς παράγοντες.

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aranda A, Jiménez-Martí E, Orozco H, Matallana E, Del Olmo M. 2006. Sulfur and adenine metabolisms are linked, and both modulate sulfite resistance in wine yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(16), 5839-5846.
- Attfield, P., Kletsas, S., (2000). Hyperosmotic stress response by strains of bakers' yeasts in high sugar concentration medium. *Letters in Applied Microbiology* 31(4), 323-327.
- Banilas, G., Sgouros, G., Nisiotou, A.A. (2016). Development of microsatellite markers for *Lachancea thermotolerans* typing and population structure of wine-associated isolates. *Microbiological Research* 193, 1-10.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153(3), 243-59.
- Barbosa, C., Lage, P., Esteves, M., Chambel, L., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., (2018). Molecular and Phenotypic Characterization of *Metschnikowia pulcherrima* Strains from Douro Wine Region. *Fermentation* 4(1):8.
- Battcock, M., & Azam-Ali, S. (1998). *Fermented Fruits and Vegetables: A Global Perspective*.
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. (2017). Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* 22(2):189.
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., Mas, A.,(2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 287-293.
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2005). Influence of the Timing of Nitrogen Additions during Synthetic Grape Must Fermentations on Fermentation Kinetics and Nitrogen Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (4), 996-1002.
- Bely, M., Rinaldi, A., & Dubourdieu, D. (2003). Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering* 96(6), 507–512.
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2019). The Influence of Non-Saccharomyces Species on Wine Fermentation Quality Parameters. Στο *Fermentation* 5(3):54.
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 50 (1), 107-119
- Bisson, L. F., & Joseph, C. L. (2009). Yeasts. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. H. König, G. Unden, & J. Fröhlich, pp. 47-60.
- Blomberg, A., & Adler, L. (1992). Physiology of Osmotolerance in Fungi. *Advances in Microbial Physiology*. A. Rose, 33, pp. 145-212.

- Bo-Qin, Z., Shen, J.-Y., Chang-Qing, D., & Guo-Liang, Y. (2018). Use of Indigenous *Hanseniaspora vineae* and *Metschnikowia pulcherrima* Co-fermentation With *Saccharomyces cerevisiae* to Improve the Aroma Diversity of Vidal Blanc Icewine. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., & Kunkee, E. (1996). Principles and Practices of Winemaking.
- Borren, E., Tian, B. (2021). The Important Contribution of Non-*Saccharomyces* Yeasts to the Aroma Complexity of Wine: A Review. *Foods*.10(1):13.
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research* 181, 75-83.
- Carbon, H. N. (2022). Determining Fermentation Parameters and Mechanisms Responsible for Alcohol Reduction in Wine by *Metschnikowia pulcherrima* and *Meyerozyma guilliermondii*. Washington State University.
- Carrascosa, A. V., Muñoz, R., & González, R. (2011). *Molecular Wine Microbiology*.
- Carrau, F., Boido, E., & Ramey, D. (2020). Chapter Three - Yeasts for low input winemaking: Microbial terroir and flavor differentiation. *Advances in Applied Microbiology* S. S. Geoffrey Michael Gadd 111, pp. 89-121.
- Chalvanti, I., Banilas, G., Tassou, C., Nisiotou, A. (2021). Biogeographical Regionalization of Wine Yeast Communities in Greece and Environmental Drivers of Species Distribution at a Local Scale. *Frontiers in Microbiology* 12.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10(2), 123-133.
- Clarke, R. J., Bakker, J. (2004). *Wine Flavour Chemistry*.
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Heras-Vázquez, F. J., & Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* 21(2), 149-155.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28(5), 873-882.
- Contreras, A., C., H., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of Non-*Saccharomyces* Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Applied and Environmental Microbiology* 80(5), 1670-1678.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., & Arroyo, T. (2013). Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *European Food Research and Technology* 236, 193–207



- Darriet, P., Boidron, J.-N., & Dubourdieu, D. (1988). L'hydrolyse des hétérosides terpéniques du Muscat a petits grains par les enzymes périplasmiques de *Saccharomyces cerevisiae*. *OENO One*, 22(3), 189–195.
- Deak, T. (2006). Environmental Factors Influencing Yeasts, in *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. The Yeast Handbook, Rosa. C.A. and Peter, G, pp 155–174.
- Entian, K., & Barnett, J. (1992). Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in biochemical sciences* 17(12), 506-510.
- Esteves, V.I., Lima, S.S.F., Lima, D.L.D., Duarte, A.C. (2004). Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. *Analytica Chimica Acta* 513(1), 163-167.
- EUR-lex. (2013). Σημείο 1 του μέρους II του παραρτήματος VII του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1308/2013. Ανάκτηση από <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02013R1308-20230101>
- EUR-lex. (2009). σ. L 193/7 και σ. 62/391L και σ. L 193/31 Παράρτημα IB. Ανάκτηση από <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0606>
- Flamys, L., Eduardo Morgado, S., Cláudio Luiz, M., Marcos Nogueira, E., & Alexandra Christine, H. (2015). Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical. Methods* 7, 53-62. The Royal Society of Chemistry.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11-22.
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. Στο *FEMS Yeast Research* 8, 979–995.
- Fleet, G., & Heard, G. (1993). Yeast-Growth during Fermentation. *Wine, Microbiology and Biotechnology* pp. 27-54.
- Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). *Wine Microbiology* (2 εκδ.).
- Gump, B., Zoecklein, B., & Fugelsang, K. (2001). Prediction of Prefermentation Nutritional Status of Grape Juice. *Methods in Biotechnology*. J. Spencer, & A. Ragout de Spencer, 14, pp. 283-296.
- Gutiérrez-Escobar, R. M.-G.-V. (2021). Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review. *Molecules* 26, p. 718.
- Hawkins, D. L., Ryder, J., Lee, S. A., Parish-Virtue, K., Fedrizzi, B., Goddard, M. R., Knight, S. J., (2023). Mixed yeast communities contribute to regionally distinct wine attributes. *FEMS Yeast Research* 23, foad005
- Ingledeu, W., & Kunkee, R. E. (1985). Factors Influencing Sluggish Fermentations of Grape Juice. *American Journal of Enology and Viticulture* 36, 65-76.
- Jara, C., Laurie, V. F., Mas, A., & Romero, J. (2016). Microbial Terroir in Chilean Valleys: Diversity of Non-conventional Yeast. *Frontiers in Microbiology* 7., p. 663.
- Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., & del Olmo, M. (2007). The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a

- Saccharomyces cerevisiae strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92, 61-75.
- Jolly, N. P., Varela, C., Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14, 215-237.
- Jolly, N., Augustyn, O., Pretorius, I. (2006). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *South African Journal of Enology and Viticulture* 27(1).
- Kántor, A., Hutková, J., Petrová, J., Hleba, L., & Kacaniova, M. (2015). Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* 5, 282-285.
- König, H., Unden, G., & Fröhlich, J. (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study* (5 εκδ.).
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21(1).
- Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Jaisil, P., & Laopaiboon, P. (2007). Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, pp. 1497–1501.
- LaRue, T., & Spencer, J. (1968). Utilization of organic nitrogen compounds by yeasts of the genus *Saccharomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 34, 53–158.
- Lelova, Z., Ivanova-Petropulos, V., Masár, M., Lisjak, K., Bodor, R., (2018). Optimization and Validation of a New Capillary Electrophoresis Method with Conductivity Detection for Determination of Small Anions in Red Wines. *Food Anal. Methods* 11, 1457–1466.
- Louhichi, B., Belgaib, J., benamor, H., & Hajji, N. (2013). Production of bioethanol from three varieties of dates. *Renewable Energy* 51, 170-174.
- Lu, Y., Voon, M. K., Huang, D., Lee, P.-R., & Liu, S.-Q. (2017). Combined effects of fermentation temperature and pH on kinetic changes of chemical constituents of durian wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 3005–3014.
- Mannazzu, I., Clementi, F., & Ciani, M. (2002). Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*, pp.19– 34.
- Manzanares, P., Ramón, D., & Querol, A. (1999). Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the production of  $\beta$ -D-xylosidase activity. *International Journal of Food Microbiology* 46(2), 105-112.
- Marks, V. D., van der Merwe, G. K., & van Vuuren, H. J. (2003). Transcriptional profiling of wine yeast in fermenting grape juice: regulatory effect of diammonium phosphate. *FEMS Yeast Research* 3(3), 269-287.
- Miller, M., & Phaff, H. (1998). 39 - *Metschnikowia Kamienski*. Στο C. P. Kurtzman, & J. W. Fell, *The Yeasts* 4 εκδ., 256-267.

- Morata, A., Loira, I., Escott, C., del Fresno, J., Bañuelos, M., & Suárez-Lepe, J. (2019). Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in Wine Biotechnology. *Fermentation* 5(3):63.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2008). *Wine Chemistry and Biochemistry* (1 εκδ.).
- Nisiotou A.A., Sgouros G., Mallouchos A., Nisiotis C.S., Michaelidis C., Tassou C., Banilas, G. (2018). The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. *Food Research International* 111, 498-508.
- OIV. (2010). DEFINITION DU « TERROIR » VITIVINICOLE. RESOLUTION OIV/VITI 333/2010. *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. International Organisation of Vine.
- OIV. (2022). Evaluation by refractometry of the sugar concentration in grape musts, concentrated grape musts and rectified concentrated grape musts (Type-I). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. International Organisation of Vine.
- OIV. (2022). pH (Type-I). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. International Organisation of Vine.
- OIV. (2022). Sulfur dioxide (Iodometry) (Type-IV). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis* (Τόμ. 2). International Organisation of Vine.
- OIV. (2022). Total Acidity (Type-I). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. International Organisation of Vine.
- OIV. (2022). Volatile Acidity (Type-I). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. International Organisation of Vine.
- Parle, J. N., Di Menna, M. E. (1966). The source of yeasts in New Zealand wines. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 9, 98-107.
- Pasteur Louis (1879). *Studies on Fermentation: The Diseases of Beer, Their Causes, and the Means of Preventing Them*.
- Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., & Heard, G. M. (2004, September). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4, 865–877.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Pretorius, I., van der Westhuizen, T., & Augustyn, O. (1999). Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry. A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 20, 61-74.
- Rainieri, S., & Pretorius, I. (2000). Selection and improvement of wine yeast. *Annals of Microbiology* 50.
- Regueiro, L. A., Costas, C. L., & López Rubio, J. E. (1993). Influence of Viticultural and Enological Practices on the Development of Yeast Populations During Winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture* 44(4), 405-408.

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2005). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications* (2 εκδ.).
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*.
- Robert, P. (1975). *Dictionnaire alphabétique et analogique lie la langue française*.
- Robles, A., Fabjanowicz, M., Chmiel, T., & Płotka-Wasyłka, J. (2019). Determination and identification of organic acids in wine samples. Problems and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 120, 115630.
- Rosini, G. F. (1982, June). Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbial Ecology* 8, 83-89.
- Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Santos, A., Benito, S. (2018). Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 8501–8509.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M. (2005). Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology* 52 (2), 167-177.
- Seguin, G. (1986). ‘Terroirs’ and pedology of wine growing. *Experientia* 42, 861-873.
- Smith, M.E., Bekker, M.Z., Smith, P.A. and Wilkes, E.N. (2015). Sources of volatile sulfur compounds in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21: 705-712.
- Snow, R. (1983). Genetic Improvement of Wine Yeast. *Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects*. J. F. pencer, D. M. Spencer, & A. R. Smith 439-459.
- Soleas, G. D. (1997). Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 11(5), 287-313.
- Sonali, P. (2018). Yeast: Characteristics and Economic Significance. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 8.
- Stern, A. L. (1899). XXIV.—The nutrition of yeast. Part I. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 75, 201-207.
- Stewart, G., & Russell, I. (1986). ONE HUNDRED YEARS OF YEAST RESEARCH AND DEVELOPMENT IN THE BREWING INDUSTRY. *Journal of the Institute of Brewing* 92, 537-558.
- Suárez-Lepe, J., & Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology* 21, 39-50.
- Tempère, S., Marchal, A., Barbe, J.-C., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Marullo, P., & Albertin, W. (2018). The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 3995–4007.
- Toledo, O. Z. de ., Teixeira, C. G.. (1959). Fermentação do mosto de uva: influência do sistema de vinificação sobre a acidez volátil do vinho. *Bragantia*, 18, 107–111.

- Toriya, M., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 80, 47-53.
- Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., & Dequin, S. (2007). Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Research* 7(2), 317–329.
- Van Leeuwen, C. (2006). The concept of terroir in viticulture. *Journal of Wine Research*. G. Seguin, 17, 1-10.
- Varela, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 9861–9874.
- Varela, C., Siebert, T., Cozzolino, D., Rose, L., Mclean, H., & Henshke, P. (2009). Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with ‘wild’ indigenous and inoculated yeasts: role of yeast volatile compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15, 238-248.
- Veziñhet, F., Hallet, J.-N., Valade, M., & Poulard, A. (1992). Ecological Survey of Wine Yeast Strains by Molecular Methods of Identification. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 83-86.
- Vigentini, I., De Lorenzis, G., Fabrizio, V., Valdetara, F., Faccincani, M., Panont, C.A., Picozzi, C., Imazio, S., Failla, O., Foschino, R. (2015). The vintage effect overcomes the terroir effect: a three year survey on the wine yeast biodiversity in Franciacorta and Oltrepò Pavese, two northern Italian vine-growing areas. *Microbiology* 161 (2), 362-373.
- Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-van der Vegte, W. H., & van Dijken, J. P. (1990). Oxygen requirements of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 3785-3792.
- Walter Van, G. (1991). <http://publications.europa.eu/>. Ανάκτηση από <http://publications.europa.eu/>: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/HTML/?uri=CELEX:61990CC0075&from=EN>
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R., & Nasrullohaq Boyce, A. (2014). Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice. *The Scientific World Journal*. C. Ilkilic, A. Acir, & L. Pochini, 2014.