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

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Επιστήμη Οίνου και Ζύθου
Κατεύθυνση: Οίνος

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση του είδους ζυμομύκητα *Lachancea thermotolerans* στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου από την ποικιλία Μοσχάτο Αλεξανδρείας

Της

Ηλέκτρας Ξένου

ΑΜ: 22206

Παρουσιάσθηκε για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων για την απονομή του Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών στο Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

Επιβλέπουσα: Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρία Δημοπούλου

ΑΘΗΝΑ, 2024

UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCES
DEPARTMENT OF WINE, VINE & BEVERAGE SCIENCES

Master of Science in
Wine and Beer Science
Option: Wine

Master Thesis

Effect of the yeast species *Lachancea thermotolerans* on the sensory characteristics of wine from the variety Muscat of Alexandria

By

Ilektra Xenou

Presented for the partial fulfillment of the obligations for the award of the Master's Degree in the Department of Wine, Vine and Beverage Sciences of the University of West Attica

Supervisor: Assistant Professor Maria Dimopoulou

Athens, 2024

Διασαφήσεις

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Επίδραση του είδους ζυμομύκητα *Lachancea thermotolerans* στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου από την ποικιλία Μοσχάτο Αλεξανδρείας**» που παρουσιάσθηκε από την **ΗΛΕΚΤΡΑ ΞΕΝΟΥ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis titled "**Effect of the yeast species *Lachancea thermotolerans* on the sensory characteristics of wine from the variety Muscat of Alexandria**" presented by **ILEKTRA XENOU** and we affirm that it is accepted.

Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή 1ου Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 1st Commission Member):

MARIA DIMOPOULOU
Digitally signed by MARIA DIMOPOULOU
Date: 2024.07.01 16:50:28 +03'00'

Επίκουρη Καθηγήτρια Δημοπούλου Μαρία

Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή 2ου Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 2nd Commission Member):

PANAGIOTIS ARAPITSAS
Firmato digitalmente da PANAGIOTIS ARAPITSAS
Data: 2024.06.27 11:32:41 +02'00'

Επίκουρος Καθηγητής Αραπίτσας Παναγιώτης

Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή 3ου Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 3rd Commission Member):

Efthalia Ntourtoglou
Digitally signed by Efthalia Ntourtoglou
Date: 2024.06.27 22:49:51 +03'00'

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ντουρτόγλου Ευθαλία

Με την υποβολή αυτής της διατριβής, δηλώνω ότι το σύνολο των εργασιών που περιέχονται σε αυτή είναι το δικό μου, πρωτότυπο έργο, ότι εγώ είμαι ο μοναδικός δημιουργός τους (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), ότι η αναπαραγωγή και η δημοσίευσή της από το Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής δεν θα παραβιάζει οποιαδήποτε δικαιώματα τρίτων και ότι δεν έχω υποβάλει στο παρελθόν το σύνολο ή μέρος αυτής για την απόκτηση οποιουδήποτε τίτλου.
Η παρούσα εργασία δεν μπορεί να ανέβει στη βιβλιοθήκη της Σχολής ή να δημοσιοποιηθεί πριν τις 31/12/2025.

By submitting this thesis, I declare that the entirety of the work contained therein is my own, original work, that I am the sole author thereof (save to the extent explicitly otherwise stated), that reproduction and publication thereof by University of West Attica will not infringe any third-party rights and that I have not previously in its entirety or in part submitted it for obtaining any qualification.
Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή Υποψηφίου
(Surname and first name of the candidate):

Ξένου Ηλέκτρα (Xenou Ilektra)

Πνευματική ιδιοκτησία © 2024 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2024 University of West Attica
All rights reserved

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας στο τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της δράσης διαφορετικών ειδών ζυμών (*Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*) και συνθηκών εμβολιασμού στην κλασσική λευκή οινοποίηση από σταφύλια *Vitis vinifera* της ποικιλίας Μοσχάτο Αλεξανδρείας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Οι ζυμομύκητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *Saccharomyces cerevisiae* και *Lachancea thermotolerans*. Οι διαφορετικές συνθήκες εμβολιασμού που εφαρμόστηκαν ήταν: εμβολιασμός με μονοκαλλιέργεια στελέχους *S. cerevisiae* (συνθήκη Α), ταυτόχρονος συνεμβολιασμός του στελέχους *S. cerevisiae* και *L. thermotolerans* (συνθήκη Β) και τέλος διαδοχικός εμβολιασμός του στελέχους *L. thermotolerans* που ακολουθήθηκε από εμβολιασμό με το στέλεχος του *S. cerevisiae* 48 ώρες μετά (συνθήκη C). Η κάθε συνθήκη εμβολιασμού πραγματοποιήθηκε σε τριπλή βιολογική επανάληψη. Αρχικά έγινε η κινητική της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ στους παραγόμενους οίνους πραγματοποιήθηκαν οι βασικές οινολογικές αναλύσεις. Έπειτα, ακολούθησε οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων. Η οργανοληπτική αξιολόγηση χωρίστηκε σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος έλαβε χώρα η περιγραφική οργανοληπτική αξιολόγηση και οι οίνοι αξιολογήθηκαν στη μύτη και στο στόμα με βάση τα πρωτογενή χαρακτηριστικά της ποικιλίας, τα δευτερογενή αρώματα της ζύμωσης και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της ζύμης που χρησιμοποιήθηκε. Επίσης, ζητήθηκε από τα άτομα του πάνελ εκτίμηση της ποικιλίας των σταφυλιών που χρησιμοποιήθηκαν. Το δεύτερο μέρος αφορούσε δύο τεστ τριγωνικής δοκιμής. Στο τεστ αυτό, και στις δύο περιπτώσεις, το διαφορετικό δείγμα ήταν ο οίνος της συνθήκης C. Τα ίδια δείγματα ήταν της συνθήκης Α και της συνθήκης Β στο πρώτο και στο δεύτερο τεστ αντίστοιχα.

Με βάσει τα αποτελέσματα, η επίδραση του στελέχους *L. thermotolerans* στα χαρακτηριστικά του τελικού οίνου είναι άμεσα συνυφασμένη με τον τρόπο εμβολιασμού. Πιο συγκεκριμένα, ο διαδοχικός εμβολιασμός του είδους *L. thermotolerans* με τον *S. cerevisiae* φάνηκε να μειώνει τη συγκέντρωση σε αλκοόλη, να αυξάνει την ολική οξύτητα και να έχει τη τάση να αυξάνει τα τροπικά αρώματα, την βοτανικότητα, την αρωματική ένταση και επίγευση των οίνων. Συμπερασματικά ο χρόνος εμβολιασμού παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των δύο ειδών και στο τελικό αποτέλεσμα.

Λέξεις κλειδιά: Μοσχάτο Αλεξανδρείας, λευκή οινοποίηση, *Saccharomyces cerevisiae,* non-*Saccharomyces*, *Lachancea thermotolerans*, τεστ τριγωνικής δοκιμής, περιγραφική οργανοληπτική αξιολόγηση

ABSTRACT

Effect of the yeast species *Lachancea thermotolerans* on the sensory characteristics of wine from the variety Muscat of Alexandria

Xenou Ilektra
Department of Wine, Vine & Beverage Sciences,
University of West Attica, 2024

The present work was carried out in the Laboratory of Biochemistry & Biotechnology at the Department of Wine, Vine and Beverage Sciences of the University of West Attica. The aim of the present work is to study the effect of different yeast species (*Saccharomyces* and non-Saccharomyces) and inoculation conditions in classical white vinification from *Vitis vinifera* grapes of the variety Muscat of Alexandria on the organoleptic characteristics of the wines produced. The yeasts used were *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans*. The different inoculation conditions applied were: inoculation with monoculture *S. cerevisiae* strain (condition A), simultaneous co-inoculation of *S. cerevisiae* strain and *L. thermotolerans* strain (condition B) and finally sequential inoculation of *L. thermotolerans* strain followed by inoculation with *S. cerevisiae* strain 48 hours later (condition C). Each inoculation condition was carried out in a triple biological replicate. Initially, the kinetics of alcoholic fermentation was carried out while the basic oenological analyses were carried out on the wines produced. This was followed by a sensory evaluation of the wines. The sensory evaluation was divided into two parts. In the first part, a descriptive sensory evaluation took place and the wines were evaluated on the nose and in the mouth based on the primary characteristics of the variety, the secondary aromas of fermentation and the specific characteristics of the yeast used. In addition, the panelists were asked to estimate the variety of grapes used. The second part involved two triangular tasting tests. In this test, in both cases, the different sample was the wine of condition C. The same samples were of condition A and condition B in the first and second tests respectively.

Based on the results, the effect of the *L. thermotolerans* strain on the characteristics of the final wine is directly linked to the method of inoculation. More specifically, sequential inoculation of *L. thermotolerans* with *S. cerevisiae* was shown to reduce alcohol concentration, increase total acidity and tend to increase tropical aromas, herbalism, aromatic intensity and aftertaste of the wines. In conclusion, the time of inoculation plays an important role in the interaction of the two species and in the final result.

Keywords: Muscat of Alexandria, white vinification, *Saccharomyces cerevisiae*, non-*Saccharomyces*, *Lachancea thermotolerans*, triangular test, descriptive sensory evaluation.

Στην οικογένεια μου

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους, οι οποίοι άμεσα ή έμμεσα αποτέλεσαν αναπόσπαστα κομμάτια προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας εργασίας κα. Μαρία Δημοπούλου για τη βοήθεια και τη καθοδήγηση της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Ήταν ιδιαίτερη τιμή για εμένα να συνεργαστώ μαζί της και να δουλέψω στο εργαστήριο της. Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παναγιώτη Αραπίτσα, επίκουρο καθηγητή για την καθοδήγηση του ειδικά κατά την διάρκεια πραγματοποίησης των οινολογικών αναλύσεων. Ευχαριστώ την κα. Κατερίνα Τζαμουράνη, υποψήφια διδάκτορα του τμήματος για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την πραγματοποίηση του οργανοληπτικού ελέγχου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Ντουρτόγλου, επιστημονικό συνεργάτη του τμήματος Επιστήμης Οίνου, Αμπέλου και Πότων, την κα. Αλεξάνδρα Ευαγγέλου, επίκουρη καθηγήτρια και την κα. Κατερίνα Ξηρογιάννη, μέλος Ε.Τ.Ε.Π. Ευχαριστώ και τα μέλη του panel, που πραγματοποιήσαν την οργανοληπτική εξέταση των πειραματικών οίνων. Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κα. Μαρία Δημοπούλου, κα. Ευθαλία Ντουρτόγλου, και κ. Παναγιώτη Αραπίτσα για τον χρόνο τους.

Θα ήθελα όμως και να ευχαριστήσω αυτούς που έπαιξαν έμμεσο ρόλο στην επιτυχή ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αδελφή μου Ντορίνα, που στηρίζουν πάντα τις επιλογές μου και είναι πάντα εκεί για μένα.

Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών
«Επιστήμη Οίνου και Ζύθου», κατεύθυνση: Οίνος

Ηλέκτρα Ξένου

Τίτλος: **Επίδραση του είδους ζυμομύκητα *Lachancea thermotolerans* στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου από την ποικιλία Μοσχάτο Αλεξανδρείας**

Επιστημονικό Πεδίο: Οινολογία

Εκπλήρωσε τις απαιτήσεις για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών Επιστήμη Οίνου & Ζύθου με κατεύθυνση: Οίνος στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών, τον ΙΟΥΝΙΟ, 2024.

ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑΣ: Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρία Δημοπούλου

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... **ii**

ABSTRACT ..... **iii**

Αφιέρωση ..... **iv**

Ευχαριστίες ..... **v**

Πίνακας Περιεχομένων ..... **vii**

Κατάλογος Πινάκων ..... **ix**

Κατάλογος Γραφημάτων ..... **x**

Κατάλογος Εικόνων ..... **xi**

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ **1**

2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ **2**

2.1 Η ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΜΟΣΧΑΤΟ ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΑΣ 2

2.1.1 Γενικά ποικιλιακά χαρακτηριστικά 2

2.1.2 Αρωματικά Χαρακτηριστικά 4

2.1.3 Μη πτητικά Χαρακτηριστικά 7

2.2 ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ 8

2.2.1 Στάδια λευκής οινοποίησης 8

2.3 ΧΡΗΣΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ 12

2.3.1 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ 13

2.3.2 *Saccharomyces cerevisiae* 17

2.3.3 *Lachancea thermotolerans* 19

2.3.4 Συν εμβολιασμός *S. cerevisiae* με *L. thermotolerans* 24

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **26**

3.1 ΤΡΥΓΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΖΥΜΩΤΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ 26

3.2 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ 26

3.3 ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ 28

3.3.1 Μέτρηση κατανάλωσης σακχάρων 28
3.3.2 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων με τη μέθοδο Lüff 29
3.3.3 Προσδιορισμός ενεργούς οξύτητας (pH) 30
3.3.4 Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας (οξικό οξύ) 30
3.3.5 Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος 30
3.3.6 Προσδιορισμός τιτλοδοτούμενης οξύτητας 31
3.3.7 Προσδιορισμός θειώδους ανυδρίτη 31
3.3.8 Προσδιορισμός αλκοολικού βαθμού 32
3.4 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ 33
3.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 34
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ 35
4.1 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ 35
4.1.1 Μεταβολές κατά τη διάρκεια της ζύμωσης 35
4.1.2 Οινολογικές Αναλύσεις 40
4.2 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ 44
5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 56
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 58
Παράρτημα : Φύλλο αξιολόγησης οργανοληπτικού ελέγχου 73

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν στον εμβολιασμό 27

Πίνακας 2 Αποτελέσματα οινολογικών αναλύσεων (One Way ANOVA, *Tukey's* test $P_{value}<0.05$, $*P_{value}>0.05$, Minitab 19.) 40

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 1 Καμπύλη ζύμωσης των δειγμάτων της Α συνθήκης εμβολιασμού (*S. cerevisiae*). 35

Γράφημα 2 Καμπύλη ζύμωσης των δειγμάτων της Β συνθήκης εμβολιασμού (συνεμβολιασμός *S. cerevisiae* + *L. thermotolerans*)..... 36

Γράφημα 3 Καμπύλη ζύμωσης των δειγμάτων της C συνθήκης εμβολιασμού (*L. thermotolerans* + μετά από 48 ώρες *S. cerevisiae*)..... 37

Γράφημα 4 Γλυκόζη και Φρουκτόζη των δειγμάτων C2, C3 μετά τον εμβολιασμό με *S. cerevisiae* την 13η μέρα της ζύμωσης. (Μέτρηση με ενζυμικό αναλυτή Hyperlab Smart, Steroglass) 38

Γράφημα 5 Κινητικές ζύμωσης ανά συνθήκη εμβολιασμού (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). Συνθήκη Α (εμβολιασμός με *S. cerevisiae*), Συνθήκη Β (συνεμβολιασμός *S. cerevisiae* με *L. thermotolerans*), Συνθήκη C (εμβολιασμός με *L. thermotolerans* + μετά από 48 ώρες εμβολιασμός με *S. cerevisiae*)..... 39

Γράφημα 6 Τριγωνική δοκιμή μεταξύ δειγμάτων οίνων των συνθηκών εμβολιασμού Α (*S. cerevisiae*) και C (*L. thermotolerans* + μετά από 48 ώρες *S. cerevisiae*). Τα δύο ίδια δείγματα του τεστ ήταν ο οίνος της συνθήκης Α, και το διαφορετικό δείγμα του τεστ ήταν ο οίνος της συνθήκης C. Ερώτηση του τεστ: Ποιο δείγμα είναι το διαφορετικό; 45

Γράφημα 7 Τριγωνική δοκιμή μεταξύ δειγμάτων οίνων των συνθηκών εμβολιασμού Β (*S. cerevisiae* + *L. thermotolerans* συνεμβολιασμός) και C (*L. thermotolerans* + μετά από 48 ώρες *S. cerevisiae*). Τα δύο ίδια δείγματα του τεστ ήταν ο οίνος της συνθήκης Β, και το διαφορετικό δείγμα του τεστ ήταν ο οίνος της συνθήκης C. Ερώτηση του τεστ: Ποιο δείγμα είναι το διαφορετικό;..... 46

Γράφημα 8 Αποτελέσματα περιγραφικής οργανοληπτικής αξιολόγησης σε μορφή ιστογράμματος..... 52

Γράφημα 9 Αποτελέσματα περιγραφικής οργανοληπτικής αξιολόγησης μετά από στατιστική επεξεργασία με One Way ANOVA..... 53

Γράφημα 10 Απαντήσεις του πάνελ ως προς την ποικιλία του οίνου της συνθήκης Α 53

Γράφημα 11 Απαντήσεις του πάνελ ως προς την ποικιλία του οίνου της συνθήκης Β 54

Γράφημα 12 Απαντήσεις του πάνελ ως προς την ποικιλία του οίνου της συνθήκης C 54

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 Μοσχάτο Αλεξανδρείας 2
Εικόνα 2 Μοσχάτο Αλεξανδρείας 2
Εικόνα 3 Κύριες οικογένειες παραγώγων C13-νορισοπρενοειδών στα σταφύλια (Ribereau-Gayon *et al*., 2006b) 5
Εικόνα 4 Κύριες μονοτερπενόλες που βρίσκονται στα σταφύλια και στον οίνο (Ribereau-Gayon *et al*., 2006b) 5
Εικόνα 5 Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου οσφρητικού συστήματος και της διαδικασίας όσφρησης που επιτρέπει την αντίληψη του αρώματος και της γεύσης του οίνου (Hart *et al*., 2019) 7
Εικόνα 6 Στάδια Λευκής Οινοποίησης 8
Εικόνα 7 Αλκοολική ζύμωση 11
Εικόνα 8 Γενική αναπαράσταση του μεταβολισμού των αρωματικών ενώσεων στον *S. cerevisiae* (Swiegers & Pretorius, 2005). 18
Εικόνα 9 Οπτικό μικροσκόπιο (A) *S. cerevisiae* (B) *L. thermotolerans*. Κλίμακα 10 μm (Morata *et al.*, 2018). 20
Εικόνα 10 Κύριες μεταβολικές οδοί στο *L. thermotolerans* σε συνθήκες ζύμωσης. Οι μεταβολικές διεργασίες υποδεικνύονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι ενδιάμεσοι ή τελικοί μεταβολίτες υποδεικνύονται με πορτοκαλί χρώμα. Η παρουσία ειδικών μεταφορέων υποδεικνύεται στο σχήμα. PPP: Οδός φωσφορικής πεντόζης. GSH: Γλουταθειόνη. ROS: Δραστικά είδη οξυγόνου (οξειδωτικό στρες).CAC: Κύκλος του κιτρικού οξέος (Vicente *et al*., 2021) 21
Εικόνα 11 Νταμιτζάνες που χρησιμοποιήθηκαν για την αλκοολική ζύμωση 26
Εικόνα 12 Αυτόματος ενζυμικός αναλυτής Hyperlab Smart, Steroglass 28
Εικόνα 13 Παρουσίαση δειγμάτων (1^{ο} μέρος οργανοληπτικής αξιολόγησης) 33
Εικόνα 14 Παρουσίαση δειγμάτων (2^{ο} μέρος οργανοληπτικής αξιολόγησης) 34

Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

L. thermotolerans	*Lachancea thermotolerans*
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
CO_2	Carbon Dioxide
PPP	Pentose Phosphate Pathway
GSH	Γλουταθειόνη
ROS	Δραστικά είδη οξυγόνου
CAC	Κύκλος του κιτρικού οξέος

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της δράσης διαφορετικών ειδών ζυμών και συνθηκών εμβολιασμού στην οινοποίηση σταφυλιών από την ποικιλία Μοσχάτο Αλεξανδρείας και η επίδραση τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Η εργασία αποτελείται από δύο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό.

Στο θεωρητικό μέρος έγινε βιβλιογραφική ανασκόπηση της διεθνούς και ελληνικής βιβλιογραφίας. Αρχικά αναφέρονται τα χαρακτηριστικά της ποικιλίας Μοσχάτο Αλεξανδρείας. Έπειτα αναφέρονται τα στάδια της κλασσικής λευκής οινοποίησης. Στην συνέχεια αναπτύσσεται η χρήση μικροοργανισμών στην οινοποίηση, δίνοντας έμφαση στα είδη ζυμομυκήτων *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea thermotolerans*, αλλά και στην εξέλιξη του μικροβιώματος κατά την διάρκεια της οινοποίησης.

Τα πειραματικό μέρος είναι χωρισμένο σε επιμέρους κεφάλαια. Υλικά και Μέθοδοι, όπου αναφέρονται όλα τα αντιδραστήρια και περιγράφονται αναλυτικά όλες οι πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Αναφέρεται η διαδικασία οινοποίησης, τα πρωτοκόλλα των οινολογικών αναλύσεων και ο τρόπος διεξαγωγής του οργανοληπτικού ελέγχου. Στο κεφάλαιο Αποτελέσματα και Συζήτηση, καταγράφονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας. Κλείνοντας γίνεται μια σύνοψη των συμπερασμάτων που διεξήχθησαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων και η παρουσίαση της βιβλιογραφίας που χρησιμοποιήθηκε. Στο τμήμα των Παραρτημάτων βρίσκεται το φύλλο αξιολόγησης που δόθηκε στο panel των δοκιμαστών κατά την διάρκεια του οργανοληπτικού ελέγχου των παραγόμενων οίνων.

2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1 Η ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΜΟΣΧΑΤΟ ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΑΣ

2.1.1 Γενικά ποικιλιακά χαρακτηριστικά

Η ποικιλία Μοσχάτο Αλεξάνδρειας είναι μια μεγαλόρωγη ποικιλία σταφυλιού που καλλιεργείται από την αρχαιότητα. Με πιθανή περιοχή καταγωγής τη Βόρεια Αφρική, το Μοσχάτο Αλεξανδρείας φυτεύτηκε στην Ελλάδα στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Η αγάπη της ποικιλίας για τη ζέστη τη βοήθησε να εγκλιματιστεί τέλεια στη χώρα, δίνοντας υπέροχα γλυκά και ξηρά κρασιά. Το Μοσχάτο Αλεξανδρείας χρησιμοποιείται όχι μόνο για την παραγωγή επιτραπέζιων σταφυλιών και σταφίδων αλλά και για την παραγωγή λευκών κρασιών με χαρακτηριστικό άρωμα λουλουδιών και φρούτων. Σε μεγαλύτερο ποσοστό παράγονται ξηρά, αρωματικά λευκά κρασιά με ονομασία προέλευσης, ενώ παράγονται και μερικά αφρώδη, ενισχυμένα, διάσημα επιδόρπια κρασιά. Επίσης σε μικρό ποσοστό γίνεται χρήση των σταφυλιών για την παραγωγή συμπυκνωμένου μούστου. Επιπλέον, λόγω του έντονου αρωματικού προφίλ, η ποικιλία αυτή χρησιμοποιείται και στην οινοποίηση λευκών πολυποικιλιακών οίνων, έτσι ώστε να βελτιώσει την τελική αρωματική σύνθεση τους (Lanaridis *et al.*, 2002; Buesa *et al.*, 2021; Marinaki *et al.*, 2023; Kovacevic Ganic *et al.*, 2003; Waterhouse *et al.*, 2016; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006a).

Εικόνα 1 Μοσχάτο Αλεξανδρείας

Εικόνα 2 Μοσχάτο Αλεξανδρείας

Παρά την εξάπλωσή στη Βόρεια Ελλάδα, η Λήμνος είναι ο τόπος όπου φημίζεται να αναδεικνύει τα χαρίσματα της συγκεκριμένης ποικιλίας. Το νησί της Λήμνου είναι μια από τις κυρίαρχες ελληνικές τοποθεσίες που παράγει γλυκά και ξηρά λευκά κρασιά αποκλειστικά από σταφύλια της ποικιλίας Μοσχάτο Αλεξάνδρειας. Το ηφαιστειακό έδαφος της Λήμνου συμπληρώνει τα χαρακτηριστικά της ποικιλίας στο έπακρο, με αποτέλεσμα την παραγωγή δύο οίνων με ονομασία προέλευσης. Οι οίνοι αυτοί είναι το γλυκό κρασί Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) Μοσχάτο Λήμνου και το ξηρό κρασί ΠΟΠ Λήμνος (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, 2007).

Η οριοθετημένη ζώνη παραγωγής οίνων Π.Ο.Π. Μοσχάτος Λήμνου καθορίστηκε με το Βασιλικό Διάταγμα αριθ. 502/16.7.1971 (ΦΕΚ 150/Α/26.7.1971) το οποίο στη συνέχεια τροποποιήθηκε από το Προεδρικό Διάταγμα αριθ. 243/18.3.1982 (ΦΕΚ 39/Α/29.3.1982). Η αμπελουργική ζώνη ΠΟΠ Μοσχάτος Λήμνου περιλαμβάνει όλη την νήσο Λήμνο.

Η οριοθετημένη ζώνη παραγωγής οίνων Π.Ο.Π. Λήμνος καθορίστηκε με το Βασιλικό Διάταγμα αριθ. 502/16.7.1971 (ΦΕΚ 150/Α/26.7.1971) και στη συνέχεια με το Προεδρικό Διάταγμα 243/ 18.3.1982 (ΦΕΚ 39/Α/29.3.1982) το οποίο τροποποιήθηκε από το Προεδρικό Διάταγμα 320 /7.8.1995 (ΦΕΚ 175/Α/22.8.1995) και το Π.Δ. 130/8.12.2011(ΦΕΚ 260/Α/13.12.2011). Η αμπελουργική ζώνη ΠΟΠ Λήμνου περιλαμβάνει όλη την νήσο Λήμνο.

Χαρακτηριστικά των κρασιών αυτών είναι το έντονο άρωμα, με νότες βερίκοκου, σταφυλιού, τριαντάφυλλου και μέντας, και η στρογγυλή παρουσία στο στόμα. Οι οίνοι αυτοί έχουν συνήθως μέτρια προς σχετικά πλούσια αίσθηση σώματος, μέτρια οξύτητα, και καταναλώνονται όταν είναι φρέσκοι. Οι καλύτερες εσοδείες διαθέτουν δυναμική παλαίωσης 5 έως 7 χρόνια. Συνοδεύουν εύκολα πλήθος φαγητών, όπως ψάρια και θαλασσινά, σαλάτες, πικάντικα πιάτα, τυριά, γλυκά, αλλά και απεριτίφ.

Η ποιότητα των κρασιών εξαρτάται άμεσα από την καλλιέργεια. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται όταν επικρατούν θερμά καλοκαίρια στην Λήμνο, γιατί το Μοσχάτο Αλεξανδρείας έχει την τάση να κατευθύνεται σε υψηλές ποσοτικές αποδόσεις καθώς και σε υψηλές περιεκτικότητες σακχάρων εις βάρος της οξύτητας.

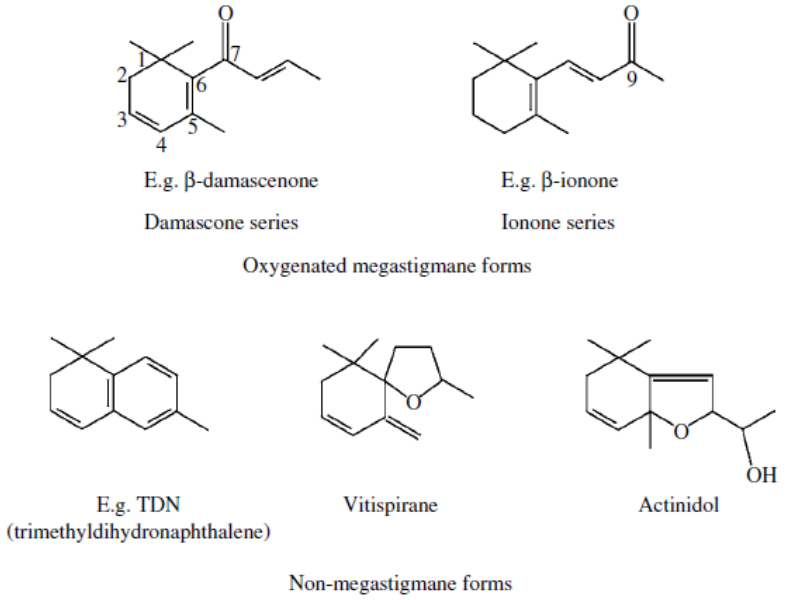
2.1.2 Αρωματικά Χαρακτηριστικά

Το άρωμα στη μύτη έχει πολύ μεγάλη σημασία για την αξιολόγηση της ποιότητας ενός οίνου, ιδιαίτερα όσον αφορά τις ποικιλίες λευκού Μοσχάτου (Bordiga *et al*., 2013). Το άρωμα των οίνων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Κάποιοι από αυτούς είναι η ποικιλία, η περιοχή, το κλίμα, η αλκοολική ζύμωση και το στέλεχος ζύμης που θα χρησιμοποιηθεί, η διαδικασία οινοποίησης και οι συνθήκες αποθήκευσης (Licen *et al*., 2021).

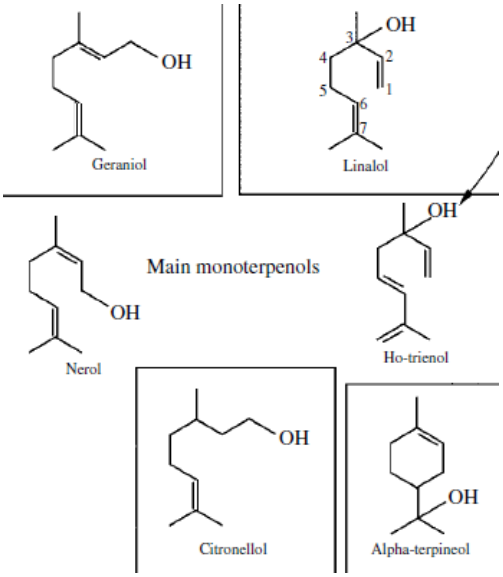
Το τυπικό «μπουκέτο» του οίνου είναι ένας σύνθετος συνδυασμός εκατοντάδων συστατικών που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες (Setkova *et al*., 2007). Μερικά από αυτά τα συστατικά προέρχονται από τα σταφύλια και άλλα σχηματίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση με τη δράση των μικροοργανισμών (Ribereau-Gayon *et al*., 2006b).

2.1.2.1 Πρωτογενή αρώματα Μοσχάτου Αλεξανδρείας

Το ποικιλιακό ή πρωτογενές άρωμα προέρχεται από το σταφύλι και είναι πολύ σημαντικό για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και για την ποιότητα του οίνου (Ribereau-Gayon *et al*., 2006b; Pedrosa-López *et al*., 2022). Ορισμένα αρώματα υπάρχουν σε ελεύθερη μορφή στο σταφύλι. Άλλα σχηματίζονται από πρόδρομες ουσίες που βρίσκονται στο γλεύκος, κατά τη διάρκεια της προζυμωτικής διαδικασίας, υπό τη δράση των ενζύμων του σταφυλιού, ή κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, μέσω της δράσης των ζυμών (Ribereau-Gayon *et al*., 2006a). Οι ζύμες είναι σε θέση να απελευθερώνουν ποικιλιακές αρωματικές ενώσεις, που αποτελούνται από τερπένια, C13-νορισοπρενοειδή και βενζοϊκά παράγωγα (Hernandez- Orte *et al*., 2008; Porter *et al*., 2019a).



Εικόνα 3 Κύριες οικογένειες παραγώγων C13-νορισοπρενοειδών στα σταφύλια (Ribereau-Gayon *et al*., 2006b)



Εικόνα 4 Κύριες μονοτερπενόλες που βρίσκονται στα σταφύλια και στον οίνο (Ribereau-Gayon *et al*., 2006b)

Τα τερπένια είναι μια σημαντική ομάδα αρωμάτων στους οίνους, ειδικά στους οίνους από Μοσχάτο Αλεξάνδρειας (Iriti & Faoro, 2006; Marinaki *et al*., 2023). Προσδίδουν στον οίνο το πρωτογενές άρωμα, αφού βρίσκονται κυρίως στη φλούδα των σταφυλιών και μεταφέρονται στον οίνο κατά τη διαβροχή (Diez-Ozaeta *et al*., 2021; Waterhouse *et al*., 2016; Soares *et al*., 2016).

Στην πραγματικότητα, αυτές οι ενώσεις συνδέονται στενά και με την έκφραση του μπουκέτου ενός οίνου, συμβάλλοντας με οσμές λουλουδιών, οι οποίες χαρακτηρίζουν την ποικιλία (Bordiga *et al*., 2013; Luki´c *et al*., 2017; Schievano *et al*., 2013).

Οι τερπενόλες, όπως η λιναλοόλη, η νερόλη, η γερανιόλη και η άλφα-τερπινεόλη, εκτός από την ελεύθερη πτητική τους μορφή μπορεί να είναι παρούσες και ως μη πτητικές, γλυκοσυδικά δεσμευμένες, πρόδρομες ουσίες (Styger *et al*., 2011). Η ενζυματική τους υδρόλυση κατά την αλκοολική ζύμωση μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση του αρώματος του οίνου (Gunata *et al*., 1985a; Gunata *et al*., 1985b; Zemni *et al*., 2007; Louw *et al*., 2006).

Παράγωγα βενζολίου (βενζυλική αλκοόλη και 2-φαινυλαιθανόλη), μαζί με C6-αλκοόλες (εξανόλες και εξενόλες, υπεύθυνες για τον βοτανικό χαρακτήρα), είναι οι πτητικές ενώσεις που προέρχονται από τα σταφύλια και ανιχνεύονται σε γλεύκη σταφυλιών και οίνους (Lanaridis *et al*., 2002).

2.1.2.2 Δευτερογενή αρώματα Μοσχάτου Αλεξανδρείας

Τα δευτερογενή αρώματα των ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση, τα οποία επηρεάζουν τη γεύση και την ποιότητα ενός οίνου αποτελούνται από διάφορες ομάδες ενώσεων (Buesa *et al*., 2021; Bakker & Clarke ,2011; Ribéreau-Gayon *et al*., 2006b). Ανώτερες αλκοόλες, οξέα, αιθυλικοί και οξικοί εστέρες και καρβονυλικές ενώσεις κυριαρχούν ποσοτικά στο δευτερεύον άρωμα, ιδιαίτερα σε ποιοτικούς λευκούς οίνους (Oliveira *et al*., 2020). Οι αιθυλεστέρες είναι οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες στους λευκούς οίνους. Παράγονται από ζυμομύκητες κατά την αλκοολική ζύμωση από την εστεροποίηση λιπαρών οξέων με αιθανόλη, προσδίδοντας ευχάριστα, φρουτώδη και ανθικά χαρακτηριστικά, (Buesa *et al*., 2021; Bordiga *et al*., 2013). Τα αντίστοιχα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας εμφανίζουν οσμές που περιγράφονται ως τυρί, ιδρώτα, ταγγισμένο ή οξύ (Buesa *et al*., 2021; Lanaridis *et al*., 2002).

Εικόνα 5 Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου οσφρητικού συστήματος και της διαδικασίας όσφρησης που επιτρέπει την αντίληψη του αρώματος και της γεύσης του οίνου (Hart *et al*., 2019)

2.1.3 Μη πτητικά Χαρακτηριστικά

Η μη πτητική σύνθεση του οίνου χαρακτηρίζεται, κυρίως, από τη σύνθεση ενός πολύπλοκου μείγματος ενώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Στα σταφύλια οι περισσότερες ποσοτικά σημαντικές ενώσεις είναι δύο σάκχαρα, η φρουκτόζη και η γλυκόζη. Δισακχαρίτες, όπως π.χ η σακχαρόζη ή η τρεχαλόζη, μη ζυμώσιμα σάκχαρα (ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη), αλκοόλες σακχάρων (μαννιτόλη, σορβιτόλη, αραβιτόλη), οξέα σακχάρων και γλυκοζίτες αποτελούν τη σύνθεση του μούστου σταφυλιών σε υδατάνθρακες. Η γλυκερίνη είναι η πιο άφθονη αλκοόλη σακχάρου στο γλεύκος σταφυλιών. Η γλυκερίνη είναι ένα από τα κύρια συστατικά του οίνου, τόσο ως προς τη συγκέντρωσή της (5-8 g/L) όσο και ως προς τη συμβολή της στη γεύση. (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006a). Οι ινοσιτόλες παρατηρούνται σε γλεύκη από Μοσχάτο Αλεξάνδρειας κυρίως στη (*myo*-) μορφή και σε μία από τις δευτερεύουσες (*skyllo*-) μορφές (Waterhouse *et al*., 2016; Ribéreau-Gayon *et al*., 2006b; Marinaki *et al*., 2023). Τα οργανικά οξέα είναι σημαντικά για τη σταθερότητα του οίνου, συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, χρώμα) και συνδέονται στενά με το άρωμα του οίνου (Robles *et al*., 2019). Ορισμένα οργανικά οξέα μικρού μοριακού βάρους θεωρούνται ευρέως, ως σχετιζόμενοι με το σταφύλι, οργανικοί δείκτες (π.χ. τρυγικό και

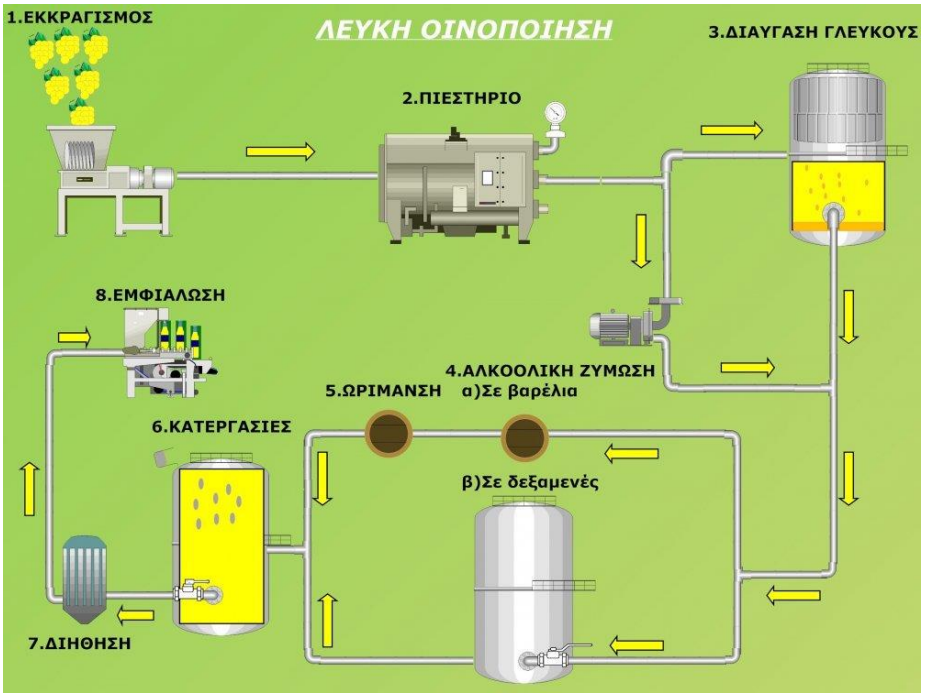
μηλικό οξύ) και δείκτες που σχετίζονται με την αλκοολική ζύμωση (π.χ. καφεϊκό και κιτρικό οξύ) (Blanco-Zubiaguirre *et al*., 2019).

2.2 ΛΕΥΚΟΙ ΟΙΝΟΙ

Σύμφωνα με τον ορισμό του OIV *« Οίνος είναι το ποτό που προκύπτει αποκλειστικά από τη μερική ή πλήρη αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών, θρυμματισμένων ή μη, ή γλεύκους σταφυλιών. Η πραγματική περιεκτικότητά του σε αλκοόλ δεν πρέπει να είναι μικρότερη από 8,5% vol.»* (Basic definition - OIV,1973).

Οι λευκοί οίνοι παράγονται κατά κύριο λόγο από γλεύκη που προέρχονται από λευκά σταφύλια και που ζυμώνεται ο χυμός τους, χωρίς τη παρουσία στερεών συστατικών του σταφυλιού (Σουφλερός, 2015).

2.2.1 Στάδια λευκής οινοποίησης



Εικόνα 6 Στάδια Λευκής Οινοποίησης

Σύμφωνα με τους Ribereau-Gayon *et al.,* 2006a και Σουφλερός, 2015 η διαδικασία της λευκής οινοποίησης διακρίνεται στα παρακάτω μέρη :

- Συλλογή και μεταφορά των σταφυλιών στο οινοποιείο

Η συγκομιδή των σταφυλιών είναι το πρώτο και εξαιρετικά σημαντικό στάδιο της λευκής οινοποίησης. Αυτή πρέπει να πραγματοποιηθεί στον σωστό χρόνο, έτσι ώστε τα σταφύλια που συλλέγονται να είναι υγιή και η οινολογική τους ωριμότητα (σάκχαρα, οξύτητα και άρωμα) να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφη. Το άρωμα μπορεί εν μέρει να χαθεί ή να αλλοιωθεί ήδη από τον τρύγο, εάν ορισμένοι κανόνες δεν τηρούνται. Κατά την συγκομιδή είναι απαραίτητο να συλλέγονται υγιή σταφύλια, καθώς η υγιεινή τους θα επηρεάσει σημαντικά την ποιότητα του παραγόμενου οίνου. Έπειτα τα σταφύλια μεταφέρονται άμεσα και με προσεκτικό τρόπο στο οινοποιείο, έτσι ώστε να είναι όσο το δυνατόν πιο άθικτα για να περιοριστεί η οξείδωση του γλεύκους και η εκχύμωση του στελέχους.

- Παραλαβή του γλεύκους και προζυμωτικές διεργασίες

Στην λευκή οινοποίηση ξηρών κρασιών, οι προζυμωτικές διεργασίες αποτελούν καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η διάχυση ορισμένων ουσιών από τον φλοιό των σταφυλιών στο χυμό, ιδιαίτερα φρουτωδών αρωμάτων και πρόδρομων αρωματικών ουσιών, πρέπει να προωθείται κατά τη διάρκεια αυτών των εργασιών. Ταυτόχρονα όμως πρέπει να περιοριστεί η εκχύλιση ενώσεων που σχετίζονται με τα στερεά μέρη του μούρου και μπορούν να προσδώσουν στον σταφυλοχυμό χορτώδη, βοτανική οσμή, αλλά και πικρή γεύση. Ο σχηματισμός ουσιών ικανών να μειώσουν την σταθερότητα των αρωμάτων πρέπει επίσης να αποφεύγεται. Οξειδωμένες ή οξειδώσιμες φαινολικές ενώσεις είναι ικανές να παγιδεύσουν ορισμένα αρώματα (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006a).

Στο στάδιο αυτό παραλαμβάνεται γλεύκος μέσω μηχανικής επεξεργασίας. Κατά τον απορραγγισμό στο εκραγιστήριο οι ράγες διαχωρίζονται από τους βόστρυχους. Έπειτα οι ράγες οδηγούνται στον σπαστήρα, όπου σπάζουν οι φλοιοί, με παράλληλη αποφυγή θλίψης των γιγάρτων. Κατά την έκθλιψη των ραγών απελευθερώνεται μεγάλο μέρος του χυμού. Η σύνθλιψη θεωρείται γενικά ότι αυξάνει τα χορτώδη αρώματα (εξανόλη, cis-3-εξενόλη και trans-2-εξενόλη) στο χυμό και τον οίνο, ειδικά στην περίπτωση της ανεπαρκούς ωριμότητας των σταφυλιών (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006a). Η σταφυλομάζα που παραλαμβάνεται οδηγείται στο πιεστήριο για πίεση. Η πίεση συνήθως γίνεται σε κλάσματα. Το πρώτο κλάσμα είναι ο πρόρωγος, ο οποίος παραλαμβάνεται με μηδενική ή ελάχιστη πίεση. Ύστερα ακολουθούν και άλλοι κύκλοι πιέσεων, όπου εφαρμόζονται διαδοχικά μεγαλύτερες πιέσεις ανά κλάσμα. Ο μέγιστος

όγκος του χυμού πρέπει να εξαχθεί με τη χαμηλότερη δυνατή πίεση και η θρυμματοποίηση πρέπει να είναι περιορισμένη.

Η χρήση σύγχρονων πνευματικών πιεστηρίων επιτρέπει την διαδικασία της πίεσης με ήπια μηχανική καταπόνηση της ράγας. Με αυτόν τον τρόπο παραλαμβάνεται και το υπόλοιπο μέρος του χυμού.

Το τελευταίο στάδιο πριν την αλκοολική ζύμωση περιλαμβάνει την επεξεργασία του γλεύκους μέσω φυσικών, χημικών και φυσικοχημικών διεργασιών. Όσον αφορά τις χημικές διεργασίες, αυτές λαμβάνουν χώρα πριν την απολάσπωση. Πραγματοποιείται η θείωση του σταφυλοπολτού, προκειμένου να προστατευθεί το γλεύκος από οξειδώσεις. Επίσης το γλεύκος δύναται να εμπλουτιστεί σε σάκχαρα και να διορθωθεί η οξύτητα του. Οι παρεμβάσεις αυτές μπορούν να γίνουν με συγκεκριμένους τρόπους που ορίζονται από την Ελληνική και Ευρωπαϊκή νομοθεσία.

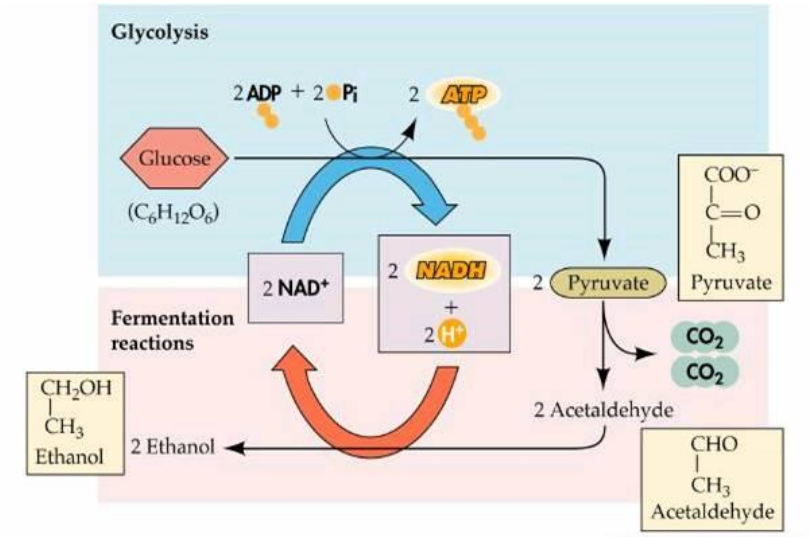
Η διαύγαση του γλεύκους είναι μια διεργασία που επιτρέπει στα αιωρούμενα σωματίδια να κατακρημνιστούν με φυσικό τρόπο, σε χαμηλή θερμοκρασία με την βοήθεια πηκτινολυτικών ενζύμων. Η διάρκεια της διαύγασης (στατικής απολάσπωσης) ποικίλλει από 12 έως 24 ώρες ανάλογα με το ποσοστό των λασπών. Οι οίνοι που προέρχονται από διαυγασμένα γλεύκη έχουν μεγαλύτερη φρεσκάδα, καθαρότερο άρωμα, υψηλότερη οξύτητα, και το χρώμα τους είναι σταθερότερο και λιγότερο ευαίσθητο στις οξειδώσεις, ενώ είναι απαλλαγμένοι από χορτώδεις γεύσεις. (Σουφλερός, 2015). Αντίθετα, κρασιά που έχουν παραχθεί από σταφυλοχυμούς που περιέχουν πάρα πολλά αιωρούμενα στερεά έχουν βαριά, πράσινα αρώματα και πικρή γεύση (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006a).

Στις φυσικοχημικές διεργασίες περιλαμβάνεται η προσθήκη μπεντονίτη. Ο μπεντονίτης ($Al_2O_5,4SiO_2,xH_2O$) είναι ένα πυριτικό άλας υδατούχου αλουμινίου, έχει κολλοειδή μορφή, αρνητικό φορτίο και μεγάλη προσροφητική ικανότητα. Χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών στο γλεύκος (Βλάχου, 2011). Σύμφωνα με τον Σουφλερός (2015), ο μπεντονίτης ενδείκνυται να προστίθεται στο γλεύκος, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, και όχι στον οίνο, θεωρώντας ότι εκείνη την στιγμή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της απαιτούμενης εργασίας, την μικρότερη ταλαιπωρία του φτιαγμένου οίνου και την καθίζηση του μπεντονίτη μετά την αλκοολική ζύμωση, χωρίς την επαύξηση του όγκου των οινολασπών. Σύμφωνα με τους Ribereau-Gayon *et al* (2006a), η χρήση μπεντονίτη στο χυμό πριν από τη ζύμωση προσφέρει πλεονεκτήματα, αλλά παρουσιάζει επίσης ορισμένες πιο πρόσφατα ανακαλυφθείσες δυσχέρειες. Η επεξεργασία του χυμού με μπεντονίτη συνιστάται για τους οίνους που

πρόκειται να διαυγαστούν αμέσως μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Ωστόσο, τα τεστ πρωτεϊνικής σταθερότητας που πραγματοποιούνται στον σταφυλοχυμό ενδέχεται να είναι ανακριβή και έτσι οι λευκοί οίνοι είναι μερικές φορές ασταθείς κατά την εμφιάλωση και απαιτούν πρόσθετη επεξεργασία με μπεντονίτη.

- Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση θεωρείται από τα πιο κρίσιμα στάδια, καθώς η παραγωγή καλής ποιότητας λευκών οίνων επιβάλλει την διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης σε τέτοιες συνθήκες που να εξασφαλίζουν το περισσότερο δυνατόν άρωμα (Σουφλερός, 2015). Αφού ολοκληρωθούν οι προζυμωτικές διεργασίες το γλεύκος μεταφέρεται στον οινοποιητή και εμβολιάζεται με επιλεγμένα στελέχη ζυμών. Κατά την αλκοολική ζύμωση ένα μόριο γλυκόζης παράγει 2 μόρια αιθανόλης, 2 μόρια CO_2, και 2 ATP. Για τον προσδιορισμό εξέλιξης της ζύμωσης είναι πολύ σημαντικό να μετρούνται και να ελέγχονται η θερμοκρασία και η πυκνότητα του γλεύκους. Εξίσου σημαντική είναι η προστασία του γλεύκους από το οξυγόνο και την οξείδωση. Η αλκοολική ζύμωση θεωρείται ολοκληρωμένη όταν η ποσότητα των αναγόντων σακχάρων μετρηθεί μικρότερη ή ίση από 2 g/L οίνου.



Εικόνα 7 Αλκοολική ζύμωση

- Μεταζυμωτικές Διεργασίες

Μία με δύο εβδομάδες μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης ακολουθεί η προσθήκη θειώδους. Κατά τις μεταζυμωτικές διεργασίες πραγματοποιείται μια σειρά από κατεργασίες, με σκοπό την σταθεροποίηση (τρυγική, πρωτεϊνική και μικροβιολογική) και εμφιάλωση ενός οίνου με τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

2.3 ΧΡΗΣΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Στη σύγχρονη παραδοσιακή οινοποίηση, ο *Saccharomyces cerevisiae* έχει θεωρηθεί ως το κύριο είδος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ποιοτικών οίνων. Τα ποσοστά εμφάνισης μη επιλεγμένων στελεχών *Saccharomyces* ή ευκαιριακών ζυμομυκήτων non-*Saccharomyces* κατά τη ζύμωση σχετίζονταν συνήθως με δυσάρεστες γεύσεις, όπως υψηλά επίπεδα οξικού οξέος, αιθυλοφαινολών και υψηλά επίπεδα ανώτερων αλκοολών. Ωστόσο, κατά την τελευταία δεκαετία, αρκετοί ερευνητές απέδειξαν ότι πολλοί non-*Saccharomyces* μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα του κρασιού και να λύσουν ορισμένες σύγχρονες οινολογικές προκλήσεις (Maicas, 2021). Ορισμένοι από τους παράγοντες που μπορούν να βελτιωθούν είναι η οξύτητα, η αρωματική πολυπλοκότητα, η συγκέντρωση σε πολυσακχαρίτες και η περιεκτικότητα σε γλυκερόλη, σε μαννοπρωτεΐνες, και σε ανθοκυανίνες. Μπορούν επίσης να μειώσουν την αιθανόλη, αλλά και τις συγκεντρώσεις ανεπιθύμητων ενώσεων που επηρεάζουν την ασφάλεια των τροφίμων, όπως η ωχρατοξίνη Α, ο καρβαμικός αιθυλεστέρας και οι βιογενείς αμίνες (Benito *et al.*, 2015; Belda *et al.*, 2015; Benito *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2001; Ciani *et al*., 2010; Comitini *et al*., 2011). Η καλύτερη απόδοση των ενζυμικών δραστηριοτήτων από non-*Saccharomyces*, όπως ο τύπος της γλυκοσιδάσης ή η β-λυάση, είναι ένα σχετικά νέο ζήτημα στη σύγχρονη οινολογία (Maicas, 2021). Η χρήση non-*Saccharomyces* φαίνεται επίσης να είναι ο μόνος μικροβιολογικός τρόπος για την παραγωγή οίνων με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλη σε θερμές περιοχές. Το κύριο πρόβλημα σχετικά με τη χρήση non-*Saccharomyces* στην οινολογία είναι η αναποτελεσματικότητά τους να ολοκληρώσουν σωστά την αλκοολική ζύμωση. Έτσι, τις περισσότερες φορές, απαιτείται η συνδυασμένη χρήση των στελεχών *S. cerevisiae* κατά την αλκοολική ζύμωση, προκειμένου να διασφαλιστεί ένα σωστό τέλος της ζύμωσης χωρίς υπολείμματα σακχάρων σε βιομηχανικό επίπεδο (Maicas, 2021).

Το 2018, κατέστη δυνατή η μελέτη συνδυασμών μεταξύ *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* και *S. pombe*. Έκτοτε, οι περισσότερες μελέτες συνδυάζουν το *L. thermotolerans* με το *S. cerevisiae* προκειμένου να εξασφαλιστεί η σωστή αλκοολική ζύμωση. Μια νέα τάση στην οινοποίηση είναι ο συνδυασμός του *L. thermotolerans* με άλλους μικροοργανισμούς με οινολογικό ενδιαφέρον (Vicente *et al*., 2021).

2.3.1 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ

Η παραγωγή κρασιού είναι μια πολύπλοκη διαδικασία από τον αμπελώνα μέχρι το οινοποιείο. Οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με το αμπέλι και μεταφέρονται στο γλεύκος έχουν βαθιά επίδραση στη σύνθεση του οίνου, τη γεύση και την ποιότητα του (Barata *et al*., 2012). Η εισαγωγή των σταφυλιών στο οινοποιείο και η έναρξη των διαδικασιών οινοποίησης τροποποιούν περαιτέρω τις μικροβιακές κοινότητες (Liu *et al*., 2019).

Αυξανόμενα στοιχεία υποστηρίζουν, ότι η μικροβιακή πτυχή των κρασιών μιας συγκεκριμένης περιοχής με παρόμοια χαρακτηριστικά μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, σε περιφερειακά δομημένες μικροβιακές κοινότητες ή στη μικροβιακή βιογεωγραφία. Η έννοια της κλίμακας είναι ζωτικής σημασίας για τον καθορισμό της μικροβιακής βιογεωγραφίας, καθώς τα γεωγραφικά και κλιματικά χαρακτηριστικά μεγάλης κλίμακας επηρεάζουν σημαντικά τις μικροβιακές κοινότητες. Σε μικρότερες κλίμακες οι διαφορές αυτές μπορεί να μην είναι εμφανείς. Οι Liu *et al* (2019) προτείνουν ότι η μικροβιακή βιογεωγραφία δίνει μια θεωρητική βάση στο terroir του κρασιού. Η βιογεωγραφία παρέχει περαιτέρω πληροφορίες στη βιομηχανία για την παραγωγή ξεχωριστών και ποιοτικών οίνων μέσω της μικροβιακής διαχείρισης. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η μικροβιακή γεωγραφική διαφοροποίηση στο γλεύκος αποδυναμώνεται, καθώς οι διεργασίες ζύμωσης διασπούν την ποικιλομορφία της κοινότητας, λόγω της κυριαρχίας των ζυμών *S. cerevisiae* (Morrison-Whittle & Goddard, 2018). Επιπλέον, ο *S. cerevisiae* μπορεί να παραμείνει για πολλά χρόνια σε έναν συγκεκριμένο αμπελώνα ή οινοποιείο εντός μιας και μόνο περιοχής, επιτρέποντας έτσι τη συνοχή του στυλ του κρασιού μεταξύ των εσοδειών (Börlin *et al*., 2016; Guzzon *et al*., 2018).

Οι καιρικές συνθήκες, το κλίμα, το έδαφος και οι ανθρωπογενείς πρακτικές μπορούν να επηρεάσουν τις μικροβιακές κοινότητες (Liu *et al*., 2019). Η σύνθεση του εδάφους μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση του οίνου, καθώς ο οίνος μπορεί να συνδεθεί με την προέλευσή του, μέσω της παρακολούθησης πολλαπλών κύριων στοιχείων και ιχνοστοιχείων από το έδαφος στο κρασί (Almeida & Vasconcelos, 2003; Kment *et al*., 2005). Σημαντικές συσχετίσεις αποδόθηκαν στη μετακίνηση των στοιχείων από το έδαφος στα σταφύλια και στους οίνους που προκύπτουν (Almeida & Vasconcelos, 2003). Συγκεκριμένες ανθρώπινες παρεμβάσεις, όπως η χρήση φυτοφαρμάκων, μυκητοκτόνων και ζιζανιοκτόνων, μπορούν να επηρεάσουν τη μικροβιακή ποικιλότητα σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα στους αμπελώνες. (Cadež *et al*., 2010; Fierer *et al*.,

2012; Perazzolli *et al*., 2014; Pinto *et al*., 2014; Chou *et al*., 2018). Οι συμβατικοί αμπελώνες υποβάλλονται συνήθως σε επεξεργασία με διάφορες γεωργικές χημικές ουσίες, ενώ οι βιολογικοί/βιοδυναμικοί αμπελώνες δέχονται μόνο σκευάσματα με βάση το θείο ή/και τον χαλκό. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει υψηλότερη μικροβιακή ποικιλομορφία σε σταφύλια που υπάρχουν σε βιολογικούς και βιοδυναμικούς αμπελώνες, τόσο για τις ζύμες (*Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*), όσο και για το σύνολο των μυκήτων (ζυμομύκητες και νηματοειδείς μύκητες) (Setati *et al*., 2012; Martins *et al*., 2014; Setati *et al.*, 2015). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι οι χημικές επεξεργασίες μειώνουν τον μικροβιακό πλούτο και την ποικιλομορφία που σχετίζονται με τα αμπέλια και το κρασί (Pinto *et al*., 2014; Escribano-Viana *et al*., 2018). Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να διατηρηθεί σε αυθόρμητες ζυμώσεις από βιολογικά/βιοδυναμικά γλεύκη, όπου παρατηρείται υψηλότερος πλούτος και ποικιλότητα ειδών ζύμης σε σύγκριση με γλεύκη από συμβατικά διαχειριζόμενους αμπελώνες. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα είδη ζυμομυκήτων που προκαλούν ζύμωση, όπως οι *H. uvarum*, *H. vineae*, *H. guilliermondii*, *Streptomyces bacillaris*, *L. thermotolerans* και *S. cerevisiae* (Cordero-Bueso *et al*., 2011; Bagheri *et al*., 2015). Όσον αφορά τα σχετιζόμενα με το σταφύλι βακτήρια, οι αντιδράσεις στις αμπελουργικές πρακτικές είναι αδύναμες σε σύγκριση με τους μύκητες. Ειδικά τα βακτήρια της επιφάνειας του σταφυλιού παρουσιάζουν περισσότερη ανθεκτικότητα από εκείνη των φύλλων (Schmid *et al*., 2011; Miura *et al*., 2017). Τα βιοδυναμικά μούρα βρέθηκαν πλούσια σε *Bacillales* συμπεριλαμβανομένων των γενών *Lysinibacillus*, *Bacillus* και *Sporosarcin*, τα οποία είναι τυπικά μικρόβια στην κοπριά (Mezzasalma *et al.*, 2017), αλλά οι επιρροές τους στη σύνθεση του οίνου δεν είναι σαφείς.

Όμως, η έντονη χρήση μυκητοκτόνων θείου και χαλκού μειώνει τη βιοποικιλότητα των ζυμομυκήτων και των μυκήτων στις ζυμώσεις που προκύπτουν (Milanoviæ *et al*., 2013; Grangeteau *et al*., 2017). Ειδικότερα μύκητες που σχετίζονται με διαφορετικά διαχειριζόμενους αμπελώνες. Το *Basidiomycota* (κυρίως *Cryptococcus*) σχετίζεται κυρίως με βιολογικούς αμπελώνες, ενώ οι ζυμομύκητες *Saccharomyces*, *Metschnikowia* και *Hanseniaspora* βρέθηκαν κυρίως σε συμβατικά διαχειριζόμενους αμπελώνες (Grangeteau *et al*., 2017). Ο ζυμομυκητοειδής μύκητας *Aureobasidium pullulans* κυριαρχεί στους μύκητες της φυλλόσφαιρας στους βιολογικούς/βιοδυναμικούς αμπελώνες (Schmid *et al*., 2011; Pancher *et al*., 2012; Setati *et al*., 2012; Martins *et al*., 2014; Setati *et al*., 2015), αλλά τείνει να είναι παρών μόνο στα αρχικά στάδια της ζύμωσης.

Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, το γλεύκος των σταφυλιών υφίσταται μια διαδοχική μετατροπή, κατά την οποία οι πληθυσμοί των ειδών ζύμης οδηγούν σε διαφορετικές ποιότητες οίνου. Αυτές οι ζύμες μπορούν να παρέχουν χαρακτηριστικά της περιοχής καλλιέργειας των σταφυλιών, γεύση, άρωμα, επίπεδα αλκοόλης, οξύτητα και χρώμα στο κρασί (James *et al*., 2023). Αν και ολόκληρη η μικροβιακή κοινότητα του οίνου συμβάλλει στη σύνθεση του οίνου, οι ζύμες διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στη ζύμωση της αλκοόλης (Jolly *et al*., 2014). Ωστόσο, ορισμένα είδη ζυμών, όπως η *Pichia manshurica*, απελευθερώνουν ενώσεις, οι οποίες επηρεάζουν το κρασί με παράξενες γεύσεις και οσμές (Perpetuini *et al*., 2020).

Ορισμένες από τις ζύμες που είναι ζύμες non- *Saccharomyces* επικρατούν στα αρχικά στάδια της ζύμωσης, έως ότου αναλάβει δράση ο *S. cerevisiae* όταν αυξάνεται η συγκέντρωση αιθανόλης (Bagheri *et al*., 2017; Bagheri *et al*., 2020). Η ζύμωση αρχίζει συχνά με τον πολλαπλασιασμό ζυμωτικά ασθενών non- *Saccharomyces* ζυμών των ειδών *Candida, Debaryomyces, Hanseniaspora, Metschnikowia* και *Pichia*. Αυτές οι ζύμες δεν μπορούν να αντέξουν την αυξανόμενη συγκέντρωση αλκοόλης, καθώς και τα ανεπαρκή θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο, και έτσι θανατώνονται (Ciani *et al*., 2010; Liu *et al*., 2017). Τα ισχυρά ζυμωτικά είδη *T. delbrueckii* και *L. thermotolerans* πολλαπλασιάζονται έως ότου εξαντληθεί το οξυγόνο, και συνεπώς ο *S. cerevisiae* συνεχίζει την ζύμωση (Bagheri *et al*., 2020). Κατά συνέπεια, ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται συνήθως ως εμπορική καλλιέργεια εκκίνησης για τη ζύμωση της αλκοόλης και την παραγωγή επιθυμητών μεταβολιτών στον οίνο. Ωστόσο, η χρήση αμιγών καλλιεργειών *S. cerevisiae* θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή οίνων με τυποποιημένα χαρακτηριστικά. Ως εκ τούτου, προτάθηκε η χρήση μεικτής ζύμωσης με non- *Saccharomyces* και *Saccharomyces* για την παραγωγή οίνων με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτούς που προκύπτουν από αυθόρμητες ζυμώσεις, χωρίς όμως τον κίνδυνο υποτονικής ή κολλημένης ζύμωσης (James *et al*., 2023).

Σήμερα, οι οινοποιοί χρησιμοποιούν γηγενείς non- *Saccharomyces* ζύμες στο πλαίσιο της παραγωγής κρασιού με ενσωματωμένα διάφορα χαρακτηριστικά. Ωστόσο, η ανάπτυξη ορισμένων από τους non- *Saccharomyces* μπορεί να προκαλέσει ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών, και να οδηγήσει στη συσσώρευση μεταβολιτών συμπεριλαμβανομένων του οξικού και γαλακτικού οξέος, της γλυκερόλης, των αλδεϋδών, της ακετοΐνης, των οξικών εστέρων, των ανώτερων αλκοολών και των εστέρων αιθυλικών λιπαρών οξέων (Yan *et al*., 2020). Πάνω από 22 ζύμες non- *Saccharomyces*, οι οποίες έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν άμεσα την ποιότητα του

οίνου, περιλαμβάνουν το *Aureobasidium pullulans, Brettanomyces bruxellensis, Candida inconspicua, Candida stellata, Candida vini, Cryptococcus magnus, Cyberlindnera jadinii, Hanseniaspora uvarum, Hanseniaspora apiculate, Metschnikowia pulcherrima, Pichia fermentans, Pichia kluyveri, P. manshurica, Pichia membranifaciens, Pichia occidentalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula mucilaginosa, Saccharomycodes ludwigii, S. bacillaris, T. delbrueckii, Wickerhamomyces anomalus* και *Z. bailii* (Kačániová *et al*., 2020). Τα στελέχη των *L. thermotolerans, K. wickerhamii, Metschnikowia fructicola, M. pulcherrima, P. kluyveri, S. pombe, S. bacillaris* και *T. delbrueckii* χρησιμοποιούνται εμπορικά στην οινοποίηση. (Berbegal *et al*., 2017; Roudil *et al*., 2019). Έχουν εξεταστεί οι ενζυματικές δραστηριότητες των non- *Saccharomyces* που ενισχύουν τις λειτουργικές πολυφαινόλες, συμπεριλαμβανομένων των β-γλυκοσιδασών, των πρωτεασών και των πηκτινάσων. Οι ζύμες non- *Saccharomyces* αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεασών και έχουν καθιερωθεί ότι διαθέτουν υψηλότερη πρωτεολυτική δραστηριότητα από τις ζύμες *Saccharomyces*. Η πρωτεολυτική δραστηριότητα στις ζύμες non- *Saccharomyces* μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση των πεπτιδίων, των αμινοξέων και του αφομοιώσιμου αζώτου στον οίνο που ζυμώνεται και να διευκολύνει την εκχύλιση των πολυφαινολών από τα σταφύλια (Gaspar *et al*., 2019). Επίσης οι περισσότεροι από τους ζυμομύκητες *Saccharomyces* δεν παρουσιάζουν πηκτινολυτική δράση (Du Plessis *et al*., 2017). Αντίθετα, οι non- *Saccharomyces* ζυμομύκητες *Klyuveromyces marxiamunus, M. pulcherrima, M. Fructicola* και *R. mucilaginosa* παράγουν πηκτινάσες (Belda *et al*., 2016; Rollero *et al*., 2018).

Μια σειρά μεθόδων έχει αναπτυχθεί για την προώθηση της ζύμωσης των οίνων, από τις οποίες οι πιο αποτελεσματικές είναι ο εμβολιασμός καλλιεργούμενων στελεχών *S. cerevisiae* και η χρήση διοξειδίου του θείου (SO_2). Η επεξεργασία με SO_2 ευνοεί τον πρώιμο εμβολιασμό και την κυριαρχία του *S. cerevisiae*. Επίσης, μεταβάλλει τη μικροβιακή ποικιλότητα του οίνου και την εξέλιξη της ζύμωσης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Bokulich *et al*., 2015; Grangeteau *et al*., 2017). Η προζυμωτική εκχύλιση «εν ψυχρώ», μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή ερυθρών οίνων για να ευνοήσει τα χαρακτηριστικά του χρώματος, της γεύσης και της αίσθησης του στόματος του οίνου, μπορεί να επηρεάσει τη δυναμική του πληθυσμού των ζυμών ανάλογα με τη θερμοκρασία. Για παράδειγμα, μια ψυχρή εκχύλιση στους 14±1 ºC μπορεί να αυξήσει τους συνολικούς πληθυσμούς ζύμης και να ευνοήσει την ανάπτυξη

των *H. uvarum* και *Candida zemplinina*, ενώ η ψυχρή εκχύλιση στους 8±1 ºC ευνοεί την ανάπτυξη του *S. cerevisiae* (Maturano *et al.*, 2015).

2.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

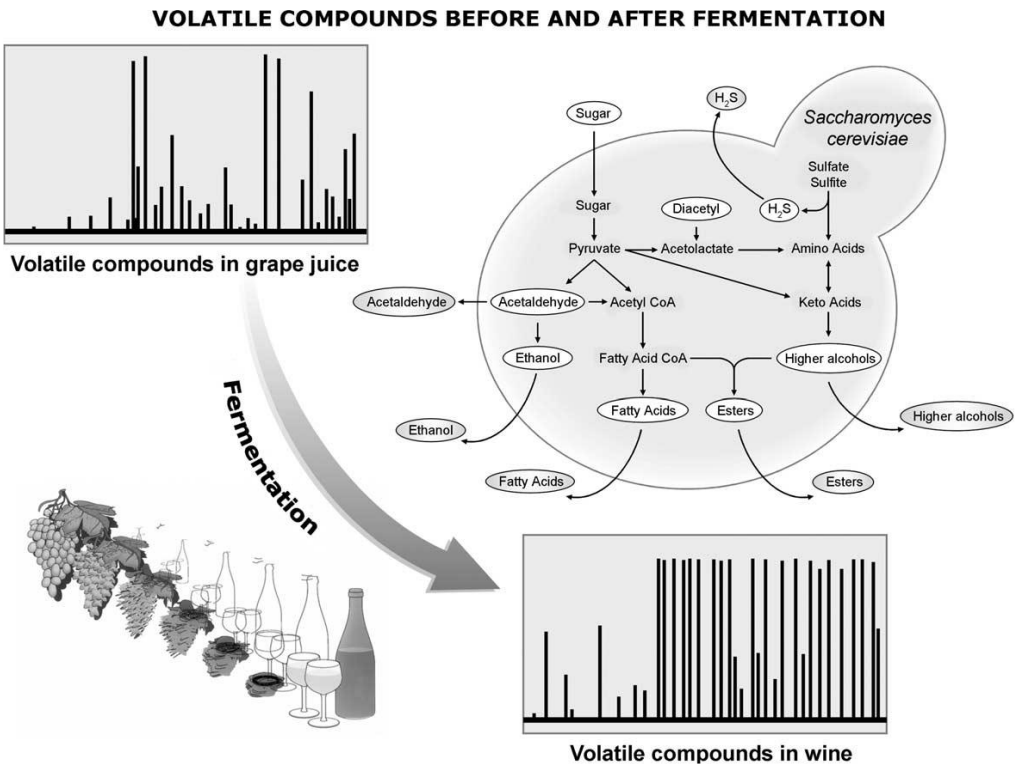
Ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae*, ο σημαντικότερος μικροοργανισμός στο κρασί, είναι ένας μονοκύτταρος μύκητας που μπορεί να αναπτυχθεί σε υψηλά επίπεδα σακχάρων (μεταξύ 220 και 250 g/L), χαμηλό pH (pH 3-4) και να επιβιώνει παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης. Τα χαρακτηριστικά αυτά προσδίδουν σε αυτή τη ζύμη ένα τεράστιο ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στο γλεύκος σταφυλιών, όπου ζυμώνει υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και φρουκτόζης σε περιβάλλον αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα (Schwiegers & Pretorius, 2005).

Αρκετά μοναδικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού της ζύμης συμβάλλουν στην ανταγωνιστικότητά της, πλεονέκτημα όταν καλλιεργείται σε γλεύκος σταφυλιών. Πρώτον, ο *S. cerevisiae* είναι θετικός στο φαινόμενο Crabtree. Ακόμη και παρουσία οξυγόνου, μια υψηλή συγκέντρωση σακχάρων οδηγεί σε ζύμωση (Pronk *et al*., 1996; Walker, 1998). Δεύτερον, η γλυκόλυση και το ζυμωτικό μονοπάτι είναι πολύ αποτελεσματικά σε αυτόν τον ζυμομύκητα. Ο μεταβολισμός της ζύμης μπορεί να μετατρέψει περίπου 16 g/L σάκχαρα σε 1 % αιθανόλη, καθιστώντας την βιολογική μετατροπή εξαιρετικά αποτελεσματική (Walker, 1998). Τρίτον, αυτή η ζύμη είναι σε θέση να αντέξει το οσμωτικό στρες που συνδέεται με την ανάπτυξη σε υψηλά επίπεδα σακχάρων, καθώς και τις διαταραχές που προκαλούνται από την αιθανόλη στις κυτταρικές δομές, όπως στις μεμβράνες (Alexandre *et al*., 1994; Bauer & Pretorius, 2000; Sales *et al*., 2000).

2.3.2.1 Αρωματική διαμόρφωση του οίνου από το S. cerevisiae

Είναι γνωστό ότι τα σταφύλια διαφορετικών ποικιλιών/καλλιεργειών παρουσιάζουν διαφορετικά αρώματα που χαρακτηρίζουν τους οίνους (Rapp & Mandery, 1986; Schreier *et al*., 1976). Ωστόσο, μπορεί να αποδειχθεί ότι αν και ορισμένες πτητικές αρωματικές ουσίες προκύπτουν από συστατικά των σταφυλιών, πολλές από αυτές τις ενώσεις μεταβάλλονται και ένα επιπλέον σημαντικό μέρος των αρωματικών ουσιών του οίνου σχηματίζεται κατά τη ζύμωση με ζύμες (Lambrechts & Pretorius, 2000). Ο

ζυμομύκητας και οι άλλοι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τον οίνο είναι κεντρικής σημασίας για την ανάπτυξη της γεύσης του κρασιού (Εικόνα 8).



Εικόνα 8 Γενική αναπαράσταση του μεταβολισμού των αρωματικών ενώσεων στον *S. cerevisiae* (Swiegers & Pretorius, 2005).

Διαφορετικές βιοσυνθετικές οδοί αλληλεπιδρούν κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του αρώματος των αλκοολούχων ποτών, και διαφορετικοί παράγοντες παίζουν τον ρόλο τους στον σχηματισμό του συνολικού αρώματος (Swiegers & Pretorius,2005).

Οι περισσότεροι εστέρες που βρίσκονται στα αλκοολούχα ποτά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από το *S. cerevisiae* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Engan, 1974). Η σύνθεσή τους συνδέεται με το μεταβολισμό των λιπιδίων και του ακετυλο-CoA (συνένζυμο Α), και αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες και σημαντικότερες ομάδες ενώσεων που επηρεάζουν τη γεύση στα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση (Fujii *et al*., 1994; Peddie, 1990). Οι σημαντικότεροι εστέρες είναι ο οξικός αιθυλεστέρας (φρουτώδης, διαλυτικός), ο οξικός ισοαμυλεστέρας (οξικός ισοπενθυλεστέρας, αχλαδιές), ο οξικός ισοβουτυλεστέρας (μπανάνα), ο καπροϊκός αιθυλεστέρας (εξανοϊκός αιθυλεστέρας, μήλο), και οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας (μέλι, φρουτώδες, λουλουδάτο) (Thurston *et al*., 1981; Swiegers & Pretorius, 2005).

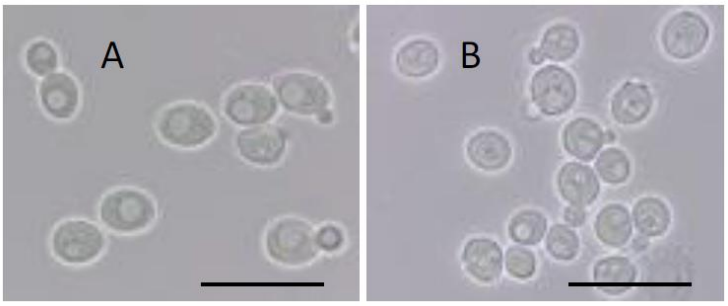
Ο μούστος των σταφυλιών περιέχει μόνο ίχνη πτητικών φαινολών. Παρόλα αυτά κατά τη ζύμωση παράγονται πτητικές φαινόλες από τις ζύμες, με αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων τους στον οίνο (Lambrechts & Pretorius, 2000). Τα μη φλαβονοειδή υδροξυκιναμωμικά οξέα λειτουργούν ως το κύριο υπόστρωμα για τον σχηματισμό πτητικών φαινολών. Ο *S. cerevisiae* έχει την ικανότητα να αποκαρβοξυλιώνει το p-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ σε μη οξειδωτική διαδικασία (Chatonnet *et al*., 1993). Έχει αναφερθεί ότι το p-κουμαρικό οξύ είναι υπεύθυνο για την παραγωγή 4-βινυλογουαϊακόλης (άρωμα γαρύφαλλου) και ότι το φερουλικό οξύ σχηματίζει 4-βινυλοφαινόλη (φαρμακευτικά αρώματα) (Chatonnet *et al*., 1993).

Στο *S. cerevisiae*, η υπερέκφραση του γονιδίου MET17, το οποίο κωδικοποιεί την διλειτουργική σουλφυδρυλάση O-ακετυλοσερίνης/O-ακετυλοχομοσερίνης, έχει ως αποτέλεσμα σημαντικά μειωμένο σχηματισμό H_2S (Swiegers & Pretorius, 2005).

2.3.3 *Lachancea thermotolerans*

Το είδος *L. thermotolerans* ήταν παλαιότερα γνωστό ως *Kluyveromyces thermotolerans*, αλλά επαναταξινομήθηκε στο γένος *Lachancea* σύμφωνα με την ανάλυση αλληλουχιών πολλαπλών γονιδίων (Kurtzman, 2003). Ο *L. thermotolerans* είναι ένα παγκόσμιο είδος ζύμης που μπορεί να βρεθεί συνήθως στα σταφύλια αλλά και σε άλλα ενδιαιτήματα όπως το έδαφος, τα έντομα και φυτά (Ganter, 2006) και είναι εκτεταμένα διαδεδομένος σε όλο τον κόσμο (Hranilovic *et al*., 2017). Μπορεί να βρεθεί σε φυσικές αυθόρμητες ζυμώσεις οίνου με χαμηλή επικράτηση κατά τις ημέρες 2-4 της ζύμωσης (Combina *et al*., 2005). Παρόλο που ο *L. thermotolerans* κατοικεί σε διαφορετικά περιβάλλοντα, μεταξύ αυτών, τα οινολογικά περιβάλλοντα έχουν αναδειχθεί ως η καλύτερη πηγή απομόνωσης λόγω του μεγάλου αριθμού στελεχών που έχουν απομονωθεί εκεί (Porter *et al*., 2019b; Vicente *et al*., 2021). Άλλα περιβάλλοντα, όπως οι χυμοί, που παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων είναι επίσης αποτελεσματικοί για την απομόνωση του. Αυτό συμφωνεί με τα βασικά χαρακτηριστικά του *L. thermotolerans*, δεδομένου ότι το είδος παρουσιάζει εξαιρετική ανοχή σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις και μπορεί να αναπτυχθεί σε συνθήκες συγκέντρωσης σακχάρων έως και 60 % (p/p) (Lachance & Kurtzman, 2012).

Μορφολογικά, είναι σφαιρικό ή ελλειψοειδές, μη διακριτό από το *S. cerevisiae* (Εικόνα 9) και μπορεί να βρεθεί ως μεμονωμένα κύτταρα σε υγρά μέσα ή σε μικρές ομάδες.

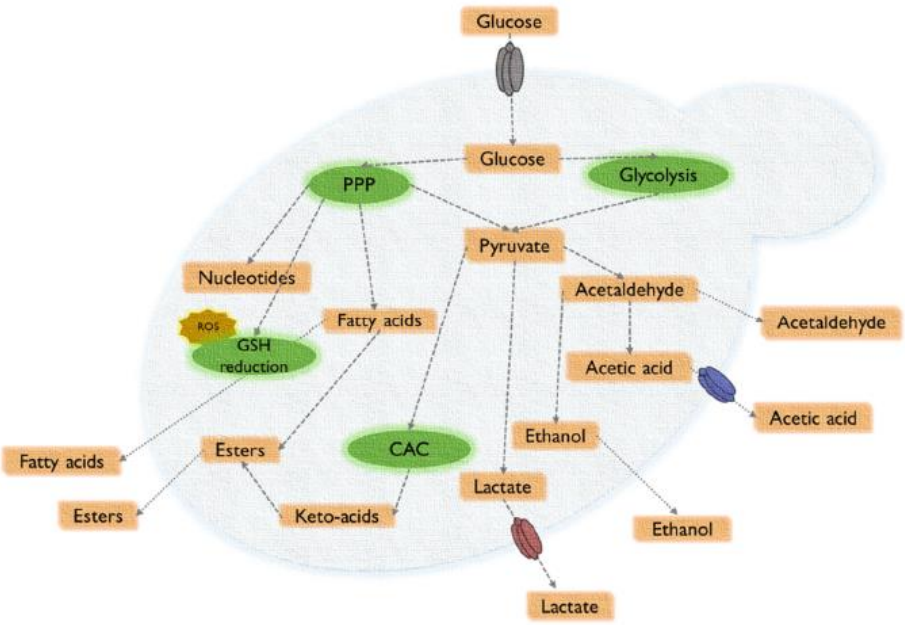


Εικόνα 9 Οπτικό μικροσκόπιο (A) *S. cerevisiae* (B) *L. thermotolerans*. Κλίμακα 10 μm (Morata *et al.*, 2018).

Πρόκειται για τελεόμορφο ζυμομύκητα που παρουσιάζει εγγενή αναπαραγωγή με το σχηματισμό 1-4 σφαιρικών ασκοσπορίων. Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται με πολυμερή εκβλάστηση. Ο *L. thermotolerans* σε στερεά μέσα σχηματίζει κρεμώδεις αποικίες με βουτυρώδη υφή (Morata *et al.*, 2018).

Ο *L. thermotolerans* είναι η πιο αξιόπιστη βιολογική επιλογή για την αύξηση της οξύτητας και τη μείωση του pH των οίνων από θερμές αμπελουργικές περιοχές (Benito, 2018; Petruzzi *et al*., 2017; Vilela, 2019; Ferreira & Mendes-Faia, 2020), λόγω της μοναδικής ικανότητάς του να παράγει γαλακτικό οξύ από το μεταβολισμό των σακχάρων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (Hranilovic *et al*., 2018), χωρίς η τελική συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος να εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του μηλικού οξέος (Benito,2018), όπως συμβαίνει με τα γαλακτικά βακτήρια (Urbina *et al.*, 2021). Η επιστημονική βιβλιογραφία αναφέρει αυξήσεις στο γαλακτικό οξύ έως και 8 g/L και μειώσεις του pH έως 0,5 για διαδοχικές ζυμώσεις του *L. thermotolerans* με *Saccharomyces* (Benito, 2018; Hranilovic *et al*., 2021).

Η θρέψη με άζωτο είναι παρόμοια με αυτή του *S. cerevisiae*, δηλαδή είναι απαραίτητα τουλάχιστον 200 mg/L YAN (αφομοιώσιμο άζωτο ζύμης) για να αποφευχθεί η υποτονικότητα ή το κόλλημα των ζυμώσεων (Ciani *et al*., 2006). Η σερίνη ως πηγή αζώτου έχει επίσης δείξει βελτίωση στη ζύμωση του *L. thermotolerans* (Kemsawasd *et al*., 2015). Τα στελέχη του *L. thermotolerans* μπορούν να εκφράσουν τις ακόλουθες εξωκυτταρικές ενζυμικές δραστηριότητες με επίδραση στο άρωμα του οίνου ή στην εκχύλιση φαινολών: εστεράση, εστεράση-λιπάση, β-γλυκοσιδάση, πηκτινάση, κυτταρινάση, ξυλανάση, γλουκανάση (Escribano *et al*., 2017).



Εικόνα 10 Κύριες μεταβολικές οδοί στο *L. thermotolerans* σε συνθήκες ζύμωσης. Οι μεταβολικές διεργασίες υποδεικνύονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι ενδιάμεσοι ή τελικοί μεταβολίτες υποδεικνύονται με πορτοκαλί χρώμα. Η παρουσία ειδικών μεταφορέων υποδεικνύεται στο σχήμα. PPP: Οδός φωσφορικής πεντόζης. GSH: Γλουταθειόνη. ROS: Δραστικά είδη οξυγόνου (οξειδωτικό στρες).CAC: Κύκλος του κιτρικού οξέος (Vicente *et al*., 2021)

Ο *L. thermotolerans* έχει μέτρια ζυμωτική ικανότητα και έχει διαπιστωθεί η ανοχή του σε αιθανόλη γύρω στο 5-9 % v/v σύμφωνα με δημοσιεύσεις (Fleet, 2003; Kapsopoulou *et al*., 2005; Comitini *et al.*, 2011; Gobbi *et al*., 2013; Aponte *et al*., 2016). Ο *L. thermotolerans* είναι σε θέση να ζυμώσει τη γλυκόζη και τη σακχαρόζη (Schnierda *et al*., 2014) και ασθενώς τη γαλακτόζη. Παρουσιάζει μεταβλητή ικανότητα να ζυμώσει τη μαλτόζη, την τρεχαλόζη και τη ραφινόζη (Lachance & Kurtzman,2011). Ο *L. thermotolerans* είναι, στην πραγματικότητα, μία από τις ζύμες με τη μεγαλύτερη ζυμωτική ικανότητα μεταξύ των non-*Saccharomyces*. Αυτό το χαρακτηριστικό, είναι ένα κερδοφόρο γνώρισμα, που οφείλεται στην ικανότητα μετατροπής των σακχάρων σε αιθανόλη τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Ο *L. thermotolerans* συγκαταλέγεται μεταξύ των ειδών που παρουσιάζουν το φαινόμενο Crabtree, οπότε υπό συνθήκες υψηλής γλυκόζης, η ζύμη αυτή παρουσιάζει αερόβια αλκοολική ζύμωση (Dashko *et al*., 2014; Vicente *et al*., 2021). Η μεταβολική ροή υπό αυτές τις συνθήκες στο είδος αυτό είναι ακόμη εν μέρει άγνωστη και για να διευκρινιστεί το σημείο αυτό, οι μελέτες μεταβολισμού του άνθρακα και έκφρασης είναι απαραίτητες (Vicente *et al*., 2021).

Έχει παρατηρηθεί κάποια επίδραση στη μείωση του αλκοολικού βαθμού των οίνων (0,7 % v/v) (Ciani *et al*., 2016). Όσον αφορά την αντοχή στο χρόνο, παρατηρήθηκε ότι είναι σε θέση να επιβιώσει αρκετές ημέρες παρουσία 9 % v/v αιθανόλης (Kapsopoulou *et al*., 2005; Kapsopoulou *et al*., 2007), και έχει επίσης καλή ανθεκτικότητα ακόμη και όταν η ζύμωση κυριαρχείται από το *S. cerevisiae* (Mills *et al*., 2002). Αυτές οι μεταβολικές ιδιότητες τον καθιστούν να εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της ενδιάμεσης φάσης της ζυμωτικής διαδικασίας πριν από την πλήρη επικράτηση των υψηλών ζυμωτικών στελεχών *S. cerevisiae*. Η χρήση του *L. thermotolerans* σε διαδοχικές ή μικτές ζυμώσεις έχει κάποια τάση να παράγει υποτονικές ζυμώσεις με περισσότερες δυσκολίες στη ζύμωση του κλάσματος φρουκτόζης των σακχάρων του σταφυλιού (Ciani *et al*., 2006). Επιπλέον, η απαίτηση διαθεσιμότητας οξυγόνου για τον *L. thermotolerans* φαίνεται να είναι υψηλότερη από ό, τι για το *S. cerevisiae* (Holm Hansen *et al*., 2001). Η ανοχή στη θερμοκρασία είναι παρόμοια με τον μέσο όρο των στελεχών του *S. cerevisiae* που παρουσιάζουν καλή ανάπτυξη στους 25-30 ^{o}C, αλλά βραδύτερη ανάπτυξη κάτω από τους 20 ^{o}C (Schnierda *et al*., 2014).

Οι Comitini *et al* (2011) εντόπισαν 5 απομονωμένα στελέχη που είναι σε θέση να αντιστέκονται σε 10-20 mg/L ελεύθερου SO_2, αλλά είναι δυνατόν να βρεθούν στελέχη ανθεκτικά σε περισσότερα από 100 mg/L ολικού SO_2 (Aponte & Blaiotta, 2016). Η ανθεκτικότητα στο DMDC είναι χαμηλή, από 25 έως 100 mg/L για πληθυσμούς που κυμαίνονται log2-log6 CFU/mL. Οι τυπικές τιμές για το *S. cerevisiae* είναι 100-300 mg/L με τον ίδιο πληθυσμό (Costa *et al*., 2008). Ορισμένα στελέχη *L. thermotolerans* έχουν χρησιμοποιηθεί ως παράγοντες βιοελέγχου μυκήτων σε σταφύλια και αμπέλια για την αναστολή της ανάπτυξης του *Aspergillus* (Fiori *et al*., 2014). Τα στελέχη αυτά δεν επηρεάζουν τις μεταβολικές ιδιότητες και την απόδοση των *S. cerevisiae* κατά την αλκοολική ζύμωση (Nally *et al*., 2018; Morata *et al*., 2018).

Ο *L. thermotolerans* παράγεται σε εμπορικό επίπεδο ως ξηρή ζύμη από τις Concerto™ (Hansen, Horsholm, Δανία), Levulia® Alcomeno (AEB, Brescia, Ιταλία) και Laktia™ (Lallemand, Montreal, QC, Canada) και Omega (BioLaffort, Γαλλία) γεγονός που καθιστά εύκολη την εφαρμογή του σε βιομηχανικό επίπεδο.

2.3.3.1 Επίδραση του L. thermotolerans στο άρωμα και τη γεύση του οίνου

Η χρήση του *L. thermotolerans* στην οινοποίηση συνιστάται για την αύξηση της πολυπλοκότητας και της έντασης της γεύσης, για την βελτίωση του αρώματος του παραγόμενου οίνου, (Escribano *et al*., 2018; Dutraive *et al*., 2019; Borren & Tian, 2020) για τη βελτίωση της συνολικής οξύτητας, για τη μείωση της πτητικής οξύτητας (Petruzzi *et al*., 2017), την αύξηση των πολυσακχαριτών (Comitini *et al*., 2011; Gobbi *et al*., 2013; Domizio *et al*., 2014; Belda *et al*., 2016; Snyman *et al*., 2021),και την χρωματική βελτίωση (Hranilovic *et al*., 2018; Benito *et al*., 2016; Chen *et al*., 2018; Urbina *et al*., 2021). Η παραγωγή H_2S κυμαίνεται από μέτρια έως υψηλή (25 απομονώσεις). Οι Comitini *et al* (2011) παρατήρησαν επίσης σε 5 στελέχη *L. thermotolerans* παραγωγή SH_2 που κυμαίνεται από 3-5 σε κλίμακα 0-5. Τα επίπεδα ακεταλδεΰδης μπορούν ομοίως να μειωθούν με τη χρήση του *L. thermotolerans* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Balikci *et al*., 2016; Ciani & Comitini, 2011). Ο *L. thermotolerans* έχει παρατηρηθεί να παράγει μέτριες ποσότητες ανώτερων αλκοολών (Balikci *et al*., 2016). Είναι αποδεδειγμένο ότι ο *L. thermotolerans* είναι ικανός να παράγει οίνους με υψηλότερες "πικάντικες" και όξινες νότες, βελτιώνοντας έτσι τη συνολική ποιότητα του οίνου (Gobbi *et al*., 2013; Balikci *et al*., 2016). Περιγράφεται επίσης ως παραγωγός ισοβουτυρικού αιθυλεστέρα (αποχρώσεις φράουλας). Οι βελτιώσεις στην φρουτώδη γεύση, που πιθανώς ευνοούνται από την αύξηση της οξύτητας, είναι τυπικοί αισθητηριακοί περιγραφικοί παράγοντες όταν ο *L. thermotolerans* χρησιμοποιείται για τη ζύμωση ουδέτερων ποικιλιών (García *et al*., 2017). Ο *L. thermotolerans* έχει περιγραφεί ως παραγωγός της β-D-γλυκοσιδάσης (β DG) (Rosi *et al*., 1994), και της λυάσης άνθρακα-θείου (CSL) (Zott *et al*., 2011), ένζυμα που εμπλέκονται στην απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων από τις πρόδρομες ουσίες της ποικιλίας. Συνήθως οι non-*Saccharomyces* είναι πιο αποτελεσματικοί στην παραγωγή 3-μερκαπτοεξαν-1-όλης (3MH) από την 4-μερκαπτο-4-μεθυλοπενταν-2-όνη (4MMP) (Padilla *et al*., 2016). Ωστόσο, όταν ο *L. thermotolerans* χρησιμοποιήθηκε σε ζύμωση γλεύκους, απελευθερώθηκαν σημαντικές ποσότητες 4MMP και μέτριες ποσότητες 3MH. Η παραγωγή σημαντικών συγκεντρώσεων 4-μεθυλ-4-σουλφανυλοπενταν-2-όνης (4MSP- αρώματα πυξού) και 3-σουλφανυλεξαν-1όλη (3SH- αρώματα γκρέιπφρουτ και φρούτων του πάθους) έχει επίσης περιγραφεί (Zott *et al*., 2011; Morata *et al*., 2018).

Ένας από τους πιο σημαντικούς ρόλους του *L. thermotolerans* είναι η παραγωγή γλυκερόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αυτή η αύξηση της γλυκερόλης έχει παρατηρηθεί κατά την αυθόρμητη ζύμωση (Comitini *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 1997; Henick-Kling *et al.*, 1998), και σε διαδοχικούς εμβολιασμούς μεταξύ *L. thermotolerans* και *S. cerevisiae* (Comitini *et al.*, 2011; Gobbi *et al.*, 2013; Kapsopoulou *et al.*, 2007). Ωστόσο, στην περίπτωση των διαδοχικών εμβολιασμών το κύριο πλεονέκτημα είναι ότι η γλυκερόλη παράγεται με μειωμένη τη πτητική οξύτητα και τη συγκέντρωση οξικού οξέος (Comitini *et al.*, 2011; Domizio *et al.*, 2011). Η παραγωγή γλυκερόλης σχετίζεται επίσης σε μεγάλο βαθμό με την θερμοκρασία ζύμωσης (Gobbi *et al.*, 2013) και αυξάνεται με την οξυγόνωση (Shekhawat *et al.*, 2018). Σε γενικές γραμμές, η έκταση της επιρροής που μπορεί να ασκήσει ο *L. thermotolerans* σε μια δεδομένη ζύμωση είναι σχετική με το χρονικό διάστημα που περνά μόνος του σε επαφή με το γλεύκος (Gobbi *et al.*, 2013; Kapsopoulou *et al.*, 2007). Η γλυκερόλη, ο επόμενος σημαντικός μεταβολίτης της ζύμης μετά την αιθανόλη, συνδέεται με την απαλότητα (αίσθηση του στόματος), τη γλυκύτητα και την πολυπλοκότητα στους οίνους (Ciani & Maccarelli, 1998). Ωστόσο, ο αισθητηριακός αντίκτυπος της γλυκερόλης συνδέεται επίσης στενά με την ποικιλία σταφυλιών και το στυλ του οίνου (Nieuwoudt *et al.*, 2002; Morata *et al.*, 2018).

2.3.4 Συν εμβολιασμός *S. cerevisiae* με *L. thermotolerans*

Η μοριακή βάση της επιρροής του είδους *L. thermotolerans* στον *S. cerevisiae* είναι απαραίτητη για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο εξελίσσεται η ζύμωση. Σε συνθήκες συνεμβολιασμού με *L. thermotolerans*, το πρωτεομικό προφίλ του *S. cerevisiae* δείχνει διαφορετικά σημάδια στρες υπό την παρουσία του *L. thermotolerans*. Εμφανίζει διάφορους μηχανισμούς καταπολέμησης και άμυνας για να διατηρηθεί κυρίαρχος στα πρώτα στάδια της ζύμωσης. Καθώς η ζύμωση εξελίσσεται και ο πληθυσμός του *L. thermotolerans* μειώνεται, ο *S. cerevisiae* αυξάνει την ενζυμική του δραστηριότητα για να επιτρέψει την καλύτερη επιβίωση (Peng *et al.*, 2019). Στα πρώτα στάδια, ο *S. cerevisiae* αυξάνει τη διαθεσιμότητα και την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, συνθέτοντας ειδικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν την κατανάλωση δευτερογενών πηγών άνθρακα και αζώτου (π.χ. αμινομεθυλοτρανσφεράσες για την αξιοποίηση της γλυκίνης). Επίσης συνθέτει άλλες πρωτεΐνες για την αντοχή στο στρες

(π.χ. πρωτεΐνες θερμικού σοκ και μεθειονίνη), και την καταστολή της απόπτωσης. Αντίθετα, σε προχωρημένα στάδια της ζύμωσης, τα κύτταρα του *L. thermotolerans* επάγουν τη σύνθεση πρωτεϊνών (κυρίως εκείνων που εμπλέκονται στη μετάφραση, τη βιογένεση των ριβοσωμάτων και τις αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες) και καταστέλλουν την απόκριση στο στρες (Peng *et al*., 2019; Vicente *et al*., 2021).

Σε μικτές ζυμώσεις, οι αναερόβιες συνθήκες αναγκάζουν τον *L. thermotolerans* να εμφανίζει ισχυρότερη τροποποίηση στο προφίλ έκφρασής του από ό,τι ο *S. cerevisiae* (Shekhawat *et al*., 2019). Αυτή η αλλαγή στις συνθήκες καλλιέργειας επηρεάζει σημαντικά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και τη βιοσύνθεση των λιπιδίων στο *L. thermotolerans*. Αντίθετα, υπό αναερόβιες συνθήκες, κατά τη σύγκριση των αμιγών με τις μικτές καλλιέργειες, οι πιο εμπλουτισμένες διεργασίες είναι αυτές που σχετίζονται με την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, κυρίως νηματοειδούς ανάπτυξης (ως απόκριση στην ασιτία), και την ομοιόσταση του σιδήρου. Παρ' όλα αυτά, υπό αυτές τις συνθήκες, το κυτταρικό συστατικό που επηρεάζεται περισσότερο είναι το κυτταρικό τοίχωμα κατά την ενεργοποίηση των γονιδίων για τη βιογένεση και τη σταθεροποίηση μέσω της σύνθεσης β-γλυκάνης. Συνολικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ της ανάμιξης και της ανοξίας πυροδοτεί μια ισχυρή απόκριση στο *L. thermotolerans*, παρουσιάζοντας αυξημένα σήματα κυτταρικής συσσωμάτωσης, κυτταρικού θανάτου, οσμωτικού και οξειδωτικού στρες. Το στρες στο οποίο εκτίθενται τα κύτταρα μεταβάλλει τον κύριο μεταβολισμό του άνθρακα στο *L. thermotolerans*. Αυτό συμβαίνει με την ανακατεύθυνσή του από τη γλυκόλυση στην οδό φωσφορικής πεντόζης (PPP), ως πιθανό εργαλείο για την προστασία από το οξειδωτικό στρες (Bertels *et al*., 2021; Vicente *et al*., 2021) (Εικόνα 10). Όλα τα γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό της φαινυλαλανίνης και της φαινυλαιθανόλης ρυθμίζονται προς τα πάνω, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες σχετικά με την ανάλυση της σύνθεσης του γλεύκους. Αυτές δείχνουν ότι, σε συνθήκες ανάμειξης, η παραγωγή φαινυλαιθανόλης είναι αυξημένη σε σύγκριση με τις μεμονωμένες ζυμώσεις με τη χρήση *L. thermotolerans* (Benito, 2018; Benito, 2020).

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΤΡΥΓΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΖΥΜΩΤΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

Το απολασπωμένο γλεύκος από Μοσχάτο Αλεξανδρείας που χρησιμοποιήθηκε για το παρόν πείραμα προήλθε από το οινοποιείο Νικολού στο Κορωπί, το οποίο εμπορεύτηκε τα σταφύλια από το νησί της Λήμνου. Στο πλαίσιο του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 9 γυάλινες νταμιτζάνες συνολικού όγκου 15 L, στις οποίες πραγματοποιήθηκε η οινοποίηση. Σε καθεμία από αυτές τις νταμιτζάνες προστέθηκαν 12 L απολασπωμένου γλεύκους.

Εικόνα 11 Νταμιτζάνες που χρησιμοποιήθηκαν για την αλκοολική ζύμωση

3.2 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Το γλεύκος εμβολιάστηκε με καθαρές καλλιέργειες των προς μελέτη ζυμών με τελικό πληθυσμό ζυμών στο γλεύκος 10^6 cfu/mL. Οι συνθήκες με τις οποίες πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός παρατίθενται στον Πίνακα 1. Κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε σε τριπλή βιολογική επανάληψη (Συνθήκη Α: δείγματα Α1, Α2, Α3;

Συνθήκη Β: δείγματα Β1, Β2, Β3; Συνθήκη C: δείγματα C1, C2, C3). Το στέλεχος του *Saccharomyces cerevisiae* ανήκει στη συλλογή του ΠΑΔΑ και έχει απομονωθεί από τη Σαντορίνη (Tzamourani *et al*., 2023), ενώ η non-*Saccharomyces* ζύμη, *Lachancea thermotolerans*, ανήκει στη συλλογή του Πανεπιστημίου του Τορίνο και παραχωρήθηκε από τον ερευνητή Βασίλειο Εγγλέζο στα πλαίσια συνεργασίας με τίτλο του project "Esplorazione delle interazioni microbiche in vini prodotti in Italia e Grecia tramite analisi metabolomiche".

Πίνακας 1 Στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν στον εμβολιασμό

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	**ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΜΒΟΛΙΟΥ**
A	*S. cerevisiae* UNIWAY6
B	*S. cerevisiae* UNIWAY6 + *L. thermotolerans* (**συνεμβολιασμός**)
C	*L. thermotolerans* + **μετά από 48 ώρες** *S. cerevisiae* UNIWAY6 (**διαδοχικός εμβολιασμός**)

Πριν πραγματοποιηθεί ο πρώτος εμβολιασμός προστέθηκαν 300 mg/L θρεπτικά (NUTRISTART™, Laffort, Floirac, France) σε κάθε νταμιτζάνα. Η πορεία της ζύμωσης παρακολουθούταν καθημερινά μετρώντας την πυκνότητα και τα σάκχαρα με την χρήση αραιόμετρου Baume. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 18-20 ^{o}C. Στις 72 ώρες από τον πρώτο εμβολιασμό έγινε προσθήκη 3 g θρεπτικών στις νταμιτζάνες των συνθηκών Α, Β. Στις 96 ώρες έγινε προσθήκη 3 g θρεπτικών στις νταμιτζάνες των συνθηκών C. Τη 5^{η} και την 8^{η} ημέρα κρίθηκε απαραίτητο να προστεθούν ακόμη 150 mg/L και 200 mg/L θρεπτικών αντίστοιχα στη νταμιτζάνα C1. Λόγω της δυσκολίας τους να ζυμώσουν ύστερα από 13 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό τους με το *L. thermotolerans,* τα δείγματα C2 και C3 εμβολιάστηκαν ξανά με *S. cerevisiae.* Δύο ημέρες μετά προστέθηκε σε καθένα από αυτά 1 g θρεπτικών, το οποίο διαλυτοποιήθηκε σε μία μικρή ποσότητα του αρχικού γλεύκους που είχε αποθηκευτεί. Όταν αποζύμωσαν τα γλεύκη, οι νταμιτζάνες τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 10 ^{o}C. Ο έλεγχος της αποζύμωσης έγινε μέσω της μέτρησης των σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη) με τη χρήση ενζυμικού αναλυτή Hyperlab smart της εταιρείας Steroglass. Αποζυμωμένα θεωρήθηκαν τα γλεύκη με τιμή σακχάρων μικρότερη από 2 g/L οίνου. Οι νταμιτζάνες με τα δείγματα C2, C3 δεν

κατάφεραν να αποζυμώσουν έπειτα από 23 ημέρες και 22 μέρες ζύμωσης και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο με τιμή σακχάρων 6,02 g/L και 4,01 g/L αντίστοιχα.
Με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης έγινε χρήση μπεντονίτη (1:10) προσθέτοντας 150 mg/L μπεντονίτη ανά λίτρο οίνου και τα δείγματα απολασπώθηκαν. Μετά την απολάσπωση έγινε θείωση των δειγμάτων προσθέτοντας 50 mg/L potassium metabisulfite (57.2 % SO_2). Τέλος οι φρέσκοι οίνοι εμφιαλώθηκαν.

3.3 ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

3.3.1 Μέτρηση κατανάλωσης σακχάρων

Η μέτρηση των σακχάρων (φρουκτόζη και γλυκόζη) για τον έλεγχο της αποζύμωσης έγινε με τη χρήση του αυτόματου ενζυμικού αναλυτή Hyperlab smart της εταιρίας Steroglass και του kit Glucose – Fructose Auto της εταιρείας Steroglass S.r.l., Strada Romano di Sopra 2/C 06132 San Martino in Campo (PG).

Εικόνα 12 Αυτόματος ενζυμικός αναλυτής Hyperlab Smart, Steroglass

3.3.2 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων με τη μέθοδο Lüff

Το σύνολο των σακχάρων τα οποία έχουν μια ελεύθερη αλδεϋδομάδα ή κετονομάδα μπορούν σε αλκαλικό περιβάλλον να ανάγουν τον δισθενή χαλκό σε μονοσθενή και να προσδιορισθούν χημικά. Ο οίνος αντιδρά με το αλκαλικό διάλυμα χαλκού και η περίσσεια των ιόντων Cu^{2+} που δεν αντέδρασαν με τα σάκχαρα προσδιορίζονται με ιωδομετρία, μετατρέποντας τα ιόντα Cu^{2+} σε ιόντα Cu^{+} μέσω της προσθήκης KI. Το KI σε όξινο περιβάλλον δίνει μοριακό ιώδιο (I_2).

$$2I^{-} + 2Cu^{2+} \longleftrightarrow I_2 + 2Cu^{+}$$

Ο προσδιορισμός του I_2 που παράγεται, πραγματοποιείται με διάλυμα $Na_2S_2O_3$ σύμφωνα με την αντίδραση:

$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \longleftrightarrow 2I^{-} + S_4O_6^{2-}$$

Με την χρήση δείκτη αμύλου γίνεται ο προσδιορισμός του τέλους της αντίδρασης, καθώς το άμυλο με το μοριακό ιώδιο δίνουν ένα σύμπλοκο κυανόυ χρώματος, το οποίο αποχρωματίζεται στο σημείο αλλαγής.

Το αλκαλικό διάλυμα θειικού χαλκού 25% w/v παρασκευάστηκε με διάλυση 25 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ σε 100 mL απεσταγμένου νερού, 50 g κιτρικού οξέος ($C_6H_8O_7$, H_2O) διαλύθηκαν σε 300 mL απεσταγμένου νερού, και 144 g άνυδρου Na_2CO_3 σε 300 mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα του κιτρικού οξέος αναμίχθηκε με το διάλυμα του ανθρακικού νατρίου, έπειτα προστέθηκε το διάλυμα του θειικού χαλκού και συμπληρώθηκε νερό μέχρις όγκου 1 L.

Σε σφαιρική φιάλη με σμύρισμα μεταφέρθηκαν 25 mL διαλύματος $CuSO_4$ 25% w/v, 25 mL κατάλληλα προετοιμασμένου οίνου (αν ο οίνος περιέχει ανάγοντα σάκχαρα 0-2,5 g/L δεν αραιώνεται (m=1), ενώ αν περιέχει 2,5-25 g/L αραιώνεται με απεσταγμένο νερό σε συγκέντρωση 1:10 (m=10). Έστω **m** ο συντελεστής αραίωσης.) και 4-5 σφαίρες βρασμού. Η φιάλη προσαρμόστηκε σε κάθετο ψυκτήρα και το διάλυμα αφέθηκε να βράσει για 10 λεπτά ακριβώς. Μετά τοποθετήθηκε η φιάλη σε τρεχούμενο νερό για να κρυώσει και προστέθηκαν 10 mL KI (30% w/v), 25mL H_2SO_4 (25% w/v) και 5 mL αμύλου (10 g/L). Το διάλυμα τιτλοδοτήθηκε με διάλυμα θειοθεϊκού νατρίου $Na_2S_2O_3$ 0,1 N έως ότου το χρώμα του διαλύματος γίνει γαλακτερό λευκό. Έστω **n** τα ml που καταναλώθηκαν.

Παράλληλα, έγινε προσδιορισμός δείγματος-μάρτυρα ώστε να βρεθεί η ολική οξειδωτική ικανότητα των 25 mL του διαλύματος H_2SO_4. Στο δείγμα αυτό, αντί του οίνου, χρησιμοποιήθηκαν 25 mL απεσταγμένου νερού και πραγματοποιήθηκε η

παραπάνω διαδικασία παραλείποντας τον βρασμό. Έστω **n′** τα mL $Na_2S_2O_3$ που καταναλώθηκαν.

Έγινε ο υπολογισμός n΄ - n και μεταφορά του αποτελέσματος σε πίνακα μετατροπής των καταναλωθέντων mL $Na_2S_2O_3$ 0,1 N (n΄ - n) σε ανάγοντα σάκχαρα (mg). Από τον πίνακα προκύπτει ένας αριθμός, έστω **k**.

Έκφραση αποτελεσμάτων: ανάγοντα σάκχαρα (g/L)= (m*k)/25.

3.3.3 Προσδιορισμός ενεργούς οξύτητας (pH)

Για τον προσδιορισμό του pH χρησιμοποιήθηκε το πεχάμετρο HI 2210 pH Meter της εταιρείας Hanna Instruments. Το πεχάμετρο καλυμπραρίστηκε αρχικά με χρήση buffer pH=4.00 και έπειτα buffer pH=7.00. Το βαθμονομημένο πεχάμτερο (ηλεκτρόδιο και θερμόμετρο) τοποθετήθηκε στο ποτήρι ζέσεως, που περιείχε το δείγμα, έως ότου σταθεροποιηθεί η ένδειξη. Πριν το καλυμπράρισμα, ανάμεσα στις μετρήσεις με τα buffer, ανάμεσα στις μετρήσεις του pH των δειγμάτων, και στο τέλος των μετρήσεων, το ηλεκτρόδιο και το θερμόμετρο καθαρίζονταν με απιονισμένο νερό και σκουπίζονταν ελαφρά.

3.3.4 Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας (οξικό οξύ)

Ο προσδιορισμός του οξικού οξέος έγινε με τη χρήση του αυτόματου ενζυμικού αναλυτή Hyperlab smart της εταιρίας Steroglass και του kit Acetic acid auto της εταιρείας Steroglass S.r.l., Strada Romano di Sopra 2/C 06132 San Martino in Campo (PG).

3.3.5 Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος

Ο προσδιορισμός του γαλακτικού οξέος έγινε με τη χρήση του αυτόματου ενζυμικού αναλυτή Hyperlab smart της εταιρίας Steroglass και του kit L-Lactic acid auto της εταιρείας Steroglass S.r.l., Strada Romano di Sopra 2/C 06132 San Martino in Campo (PG).

3.3.6 Προσδιορισμός τιτλοδοτούμενης οξύτητας

Ο προσδιορισμός της τιτλοδοτούμενης οξύτητας βασίζεται στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων του δείγματος με το πρότυπο διάλυμα NaOH παρουσία του δείκτη της φαινολοφθαλεϊνης. Η φαινολοφθαλεϊνη έχει περιοχή εξουδετέρωσης pH=8,0-9,8.

Κατά την προετοιμασία του δείγματος πρέπει να αφαιρεθεί το CO_2 (μέσω λουτρού υπερήχων) από τον προς εξέταση οίνο και το προστιθέμενο απεσταγμένο νερό, διότι παρεμβάλλεται στην μέτρηση.

Σε μια κωνική φιάλη μεταφέρθηκαν 10 mL οίνου και 10 mL απεσταγμένου νερού. Προστέθηκαν 3-4 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεϊνης και το δείγμα τιτλοδοτήθηκε με χρήση NaOH (0,1 N), έως ότου το χρώμα γίνει ελαφρύ ροζ και παραμείνει για 10-20 δευτερόλεπτα. Σημειώθηκε η κατανάλωση του NaOH. Έστω A η κατανάλωση του NaOH σε mL.

Έκφραση αποτελεσμάτων: τιτλοδοτούμενη οξύτητα εκφρασμένη σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο (g/L) =A*0.75

3.3.7 Προσδιορισμός θειώδους ανυδρίτη

Ο προσδιορισμός του θειώδους ανυδρίτη βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση του διοξειδίου του θείου με το ιώδιο:

$$HSO_3^- + I_3^- + H_2O \rightarrow SO_4^{-2} + 3H^+ + 3I^-$$

Είναι απαραίτητο η οξείδωση να πραγματοποιείται σε ισχυρά όξινο περιβάλλον, προκειμένου το ιώδιο να μην αντιδράσει με αναγωγικούς παράγοντες. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με την εμφάνιση μπλε-μωβ χρώματος.

3.3.7.1 Προσδιορισμός ολικού θειώδους ανυδρίτη

Σε μια κωνική φιάλη 250 mL προστέθηκαν 20 mL δείγματος (οίνος ή γλεύκος), 10 mL NaOH (4 M). Η κωνική φιάλη πωματίστηκε και παρέμεινε σε σκοτεινό μέρος για 10 λεπτά. Έπειτα προστέθηκαν 3 mL διαλύματος αμύλου (10 g/L), το οποίο χρησιμοποιείται ως δείκτης, και 6 mL θειικού οξέος (H_2SO_4 25% v/v). Το δείγμα τιτλοδοτήθηκε με ήπια ανακίνηση με πρότυπο διάλυμα ιωδίου 0,01 N έως ότου παρατηρηθεί μπλε-μωβ απόχρωση και αυτή να παραμείνει για 10-20 δευτερόλεπτα. Σημειώθηκε η κατανάλωση του I_2.

Έστω Α η κατανάλωση του ιωδίου σε mL. Έκφραση αποτελεσμάτων:
Ολικός SO_2(mg/l)=A*16

3.3.7.2 Προσδιορισμός ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη

Σε μια κωνική φιάλη 250 mL προστέθηκαν 50 mL δείγματος (οίνος ή γλεύκος) και 3 mL διαλύματος αμύλου (10 g/L), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης. Στην συνέχεια προστέθηκαν 3 mL θειικού οξέος (H_2SO_4 25% v/v). Το δείγμα τιτλοδοτήθηκε με ήπια ανακίνηση με πρότυπο διάλυμα ιωδίου 0,01 N έως ότου παρατηρηθεί μπλε-μωβ απόχρωση και αυτή να παραμείνει για 10-20 δευτερόλεπτα. Σημειώθηκε η κατανάλωση του I_2.
Έστω Α η κατανάλωση του ιωδίου σε mL. Έκφραση αποτελεσμάτων:
Ελεύθερος SO_2(mg/L)=A*6.4
Δεσμευμένος SO_2 = ολικός SO_2- ελεύθερος SO_2

3.3.8 Προσδιορισμός αλκοολικού βαθμού

Ο προσδιορισμός της αιθυλικής αλκοόλης στα δείγματα οίνου έγινε με την μέθοδο της απόσταξης. Σε γυάλινη σφαιρική φιάλη απόσταξης τοποθετήθηκαν 250 mL δείγματος οίνου και πέτρες βρασμού (προκειμένου να μην αφρίσει το δείγμα). Η φιάλη συνδέθηκε στην αποστακτική συσκευή. Στην έξοδο της αποστακτικής συσκευής τοποθετήθηκε μια ογκομετρική φιάλη, στην οποία είχαν προστεθεί περίπου 5-10 mL απεσταγμένου νερού (για αποφυγή εξάτμισης). Το δείγμα θερμάνθηκε ήπια και συλλέχθηκε το παραγόμενο απόσταγμα. Η απόσταξη σταμάτησε όταν είχαν συλλεχθεί περίπου 210 mL αποστάγματος στην ογκομετρική φιάλη. Στην ογκομετρική φιάλη προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι την χαραγή των 250 mL και η φιάλη ανακινήθηκε. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο. Με την χρήση ενός αλκοολομέτρου και ενός θερμομέτρου μετρήθηκε η αλκοολική περιεκτικότητα (% v/v) και η θερμοκρασία του δείγματος. Τέλος έγιναν οι απαραίτητες διορθώσεις ανάλογα με την θερμοκρασία του δείγματος, λαμβάνοντας υπ’ όψη την αποδεκτή διεθνή θερμοκρασία (20 ^oC).

3.4 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Οι οίνοι αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά από πάνελ (10 άτομα) του Τμήματος Αμπέλου, Οίνου και Ποτών του ΠΑΔΑ. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σε χώρο, απαλλαγμένο από εξωτερικές οσμές, με θερμοκρασία 20 ºC. Η παρουσίαση των δειγμάτων έγινε σε ποτήρια γευσιγνωσίας ISO κατάλληλα για την δοκιμή οίνου. Στα ποτήρια αναγράφηκε τριψήφιος κωδικός, ενώ χρησιμοποιήθηκαν 25 mL δείγματος ανά ποτήρι. Η γευσιγνωσία των οίνων έγινε ανά συνθήκη εμβολιασμού. Για αυτό το λόγο αναμίχθηκαν ισόποσες ποσότητες από τα τρία δείγματα της κάθε συνθήκης.

Η οργανοληπτική αξιολόγηση χωρίστηκε σε δύο μέρη. Στο 1ο μέρος έγινε με βάση τα παρακάτω χαρακτηριστικά και με χρήση ελεύθερης κλίμακας επιλογής (ελάχιστο το 0 και μέγιστο το 10). Στα Παραρτήματα βρίσκεται το φύλλο αξιολόγησης που δόθηκε στους δοκιμαστές. Οι παραγόμενοι οίνοι εξετάστηκαν ως προς τα χαρακτηριστικά : Αρωματική Ένταση, Φρουτώδη αρώματα, Εσπεριδοειδή, Πυρηνόκαρπα- Γιγαρτόκαρπα (Ροδάκινο, Βερίκοκο, Μήλο, Αχλάδι), Τροπικά φρούτα, Ανθικά αρώματα, Τριαντάφυλλο, Άνθη πορτοκαλιάς, Βοτανικά αρώματα, Φρέσκα αρώματα, Μέντα, και Μικροβιολογικά αρώματα (γαλακτικό). Οι κατηγορίες αρωμάτων επιλέχθηκαν με βάση τον αρωματικό τροχό (Noble *et al.*, 1987) και τα χαρακτηριστικά αρώματα της ποικιλίας. Οι οίνοι αξιολογήθηκαν επίσης ως προς το σώμα, τη πικρή γεύση, την γλυκιά γεύση, την οξύτητα και την επίγευση τους. Τέλος ζητήθηκε από τους δοκιμαστές να βαθμολογήσουν τους οίνους σε κλίμακα ελεύθερης επιλογής με βάση την αρέσκεια τους, αλλά και να μαντέψουν την ποικιλία σταφυλιού από την οποία παράχθηκαν οι οίνοι.

Εικόνα 13 Παρουσίαση δειγμάτων (1ο μέρος οργανοληπτικής αξιολόγησης)

Το 2ο μέρος της αξιολόγησης περιλάμβανε δύο τεστ τριγωνικής δοκιμής. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν με βάση τα αρώματα στην μύτη, χωρίς οι δοκιμαστές να γευτούν τους οίνους. Το πρώτο τεστ αποτελούταν από 2 δείγματα της συνθήκης A και ένα δείγμα της συνθήκης C. Το δεύτερο τεστ αποτελούταν από 2 δείγματα της συνθήκης B και ένα δείγμα της συνθήκης C. Οι δοκιμαστές κλήθηκαν και στα δύο τεστ να εντοπίσουν το διαφορετικό δείγμα (δείγμα συνθήκης C).

Εικόνα 14 Παρουσίαση δειγμάτων (2ο μέρος οργανοληπτικής αξιολόγησης)

3.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

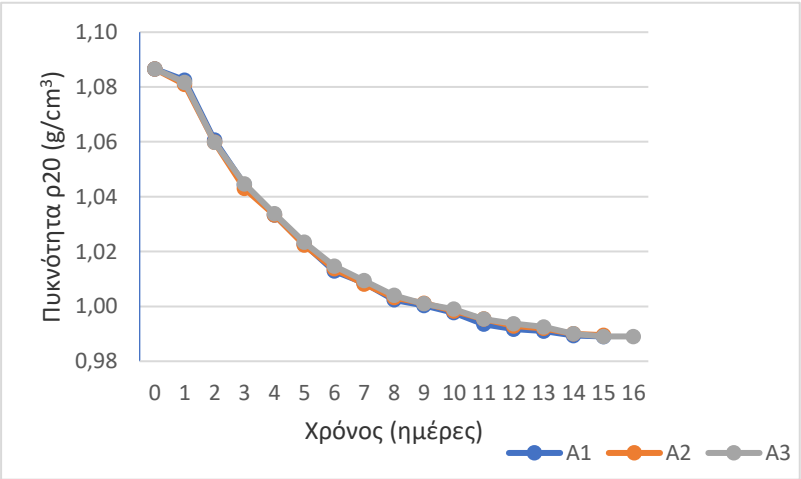
Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των οινολογικών αναλύσεων και του οργανοληπτικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος One Way ANOVA Tukey's test (*Minitab 19*).

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

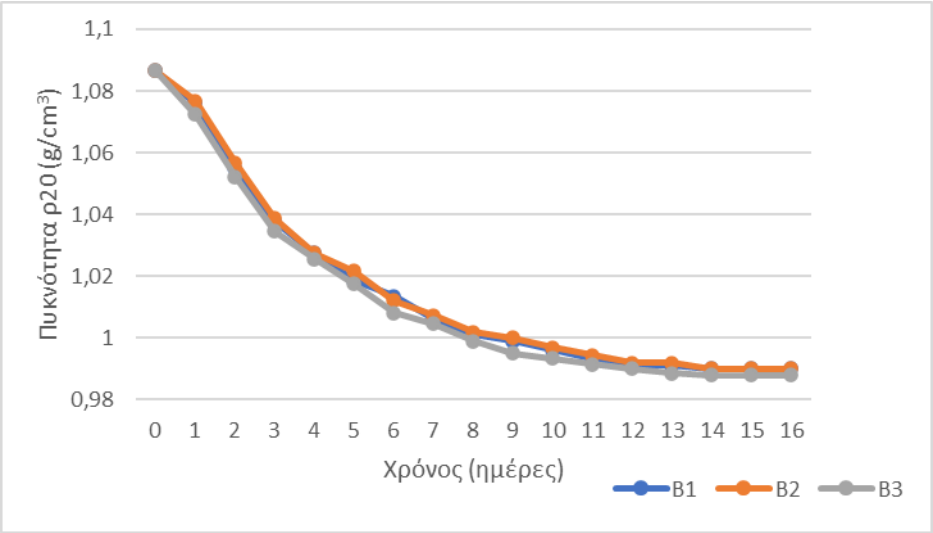
4.1.1 Μεταβολές κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Στο πλαίσιο του πειράματος παρακολουθούταν η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης σε καθημερινή βάση, μέσω μέτρησης της πυκνότητας (ρ20), των σακχάρων με αραιόμετρο Baume (βαθμονομημένο στους 20 ^{o}C) και της θερμοκρασίας για κάθε δείγμα (Συνθήκη A: δείγματα A1, A2, A3; Συνθήκη B: δείγματα B1, B2, B3; Συνθήκη C: δείγματα C1, C2, C3). Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιήθηκε στους 18-20°C. Παρακάτω φαίνονται τα διαγράμματα της πυκνότητας συναρτήσει των ημερών ζύμωσης για κάθε συνθήκη εμβολιασμού και ένα συγκριτικό διάγραμμα κινητικών ζύμωσης ανά συνθήκη εμβολιασμού. Στο τέλος των ζυμώσεων, πριν τις μεταζυμωτικές διεργασίες και την εμφιάλωση, μετρήθηκε η υπολειπόμενη ποσότητα γλυκόζης και φρουκτόζης σε κάθε δείγμα με την χρήση του ενζυμικού αναλυτή.



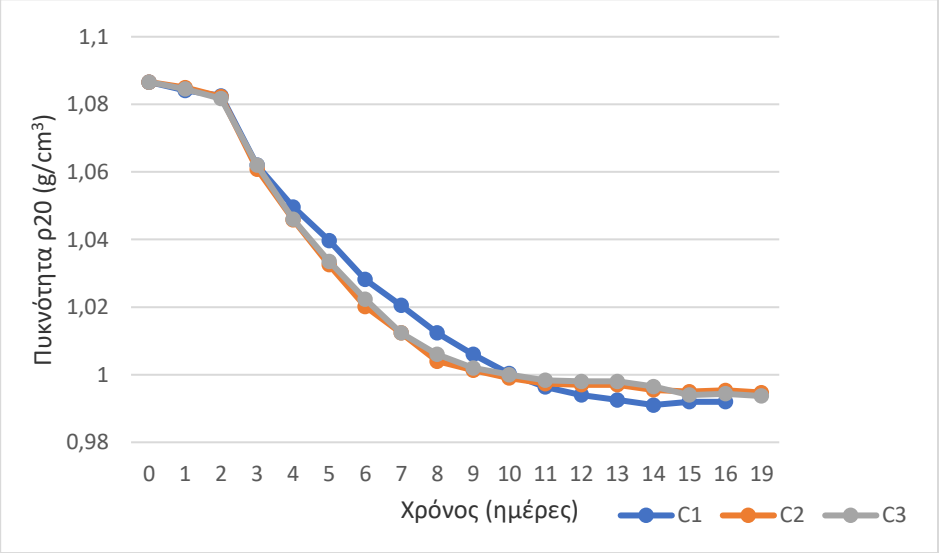
Γράφημα 1 Καμπύλη ζύμωσης των δειγμάτων της A συνθήκης εμβολιασμού (*S. cerevisiae*).

Στο γράφημα 1 φαίνεται η κινητική ζύμωσης των δειγμάτων A1, A2, A3 της συνθήκης εμβολιασμού A. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 15 ημέρες για τα δείγματα A1 και A2, ενώ για το δείγμα A3 ήταν 16 ημέρες.



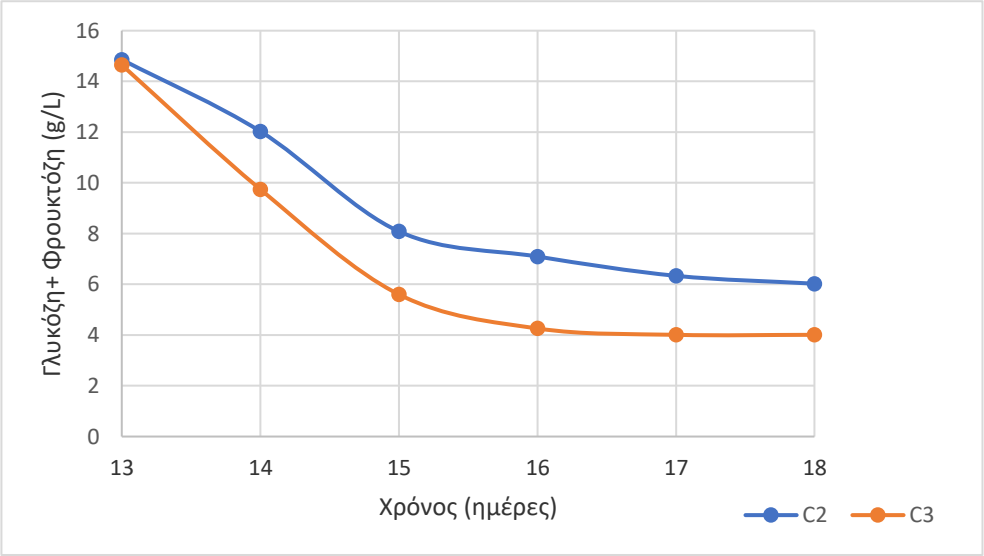
Γράφημα 2 Καμπύλη ζύμωσης των δειγμάτων της B συνθήκης εμβολιασμού (συνεμβολιασμός *S. cerevisiae* + *L. thermotolerans*).

Στο γράφημα 2 φαίνεται η κινητική ζύμωσης των δειγμάτων B1, B2, B3 της συνθήκης εμβολιασμού B. Στη συνθήκη εμβολιασμού B τα δείγματα συνεμβολιαστήκαν ταυτοχρόνως με τα δύο είδη ζυμών. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 15 ημέρες για το δείγμα B1, ενώ για τα δείγματα B2 και B3 ήταν 16 ημέρες.



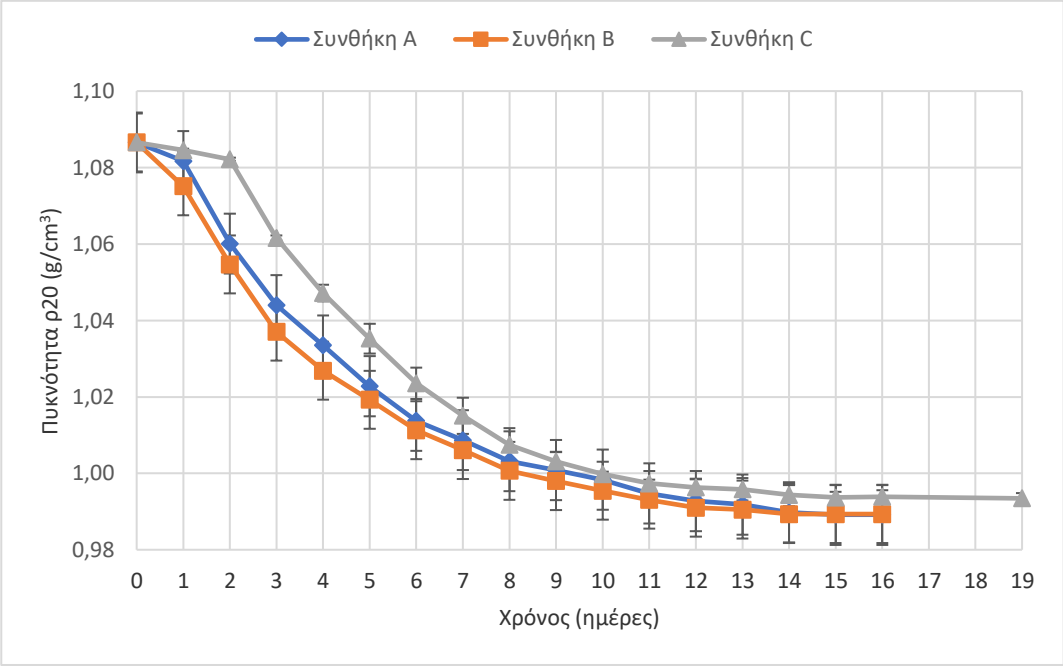
Γράφημα 3 Καμπύλη ζύμωσης των δειγμάτων της C συνθήκης εμβολιασμού (*L. thermotolerans* + μετά από 48 ώρες *S. cerevisiae*).

Στο γράφημα 3 φαίνεται η κινητική ζύμωσης των δειγμάτων C1, C2, C3 της συνθήκης εμβολιασμού C. Στη συνθήκη εμβολιασμού C τα δείγματα εμβολιαστήκαν αρχικά με *L. thermotolerans* και ακολούθησε εμβολιασμός τους με *S. cerevisiae* μετά από 48 ώρες. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης του δείγματος C1 παρατηρήθηκε μια δυσκολία ζύμωσης μετά την 4^{η} ημέρα ζύμωσης και ένας πιο αργός ρυθμός ζύμωσης έως την 9^{η} μέρα σε σύγκριση με τα δείγματα C2, C3. Για αυτό τον λόγο προστεθήκαν ποσότητες θρεπτικών στη νταμιτζάνα του δείγματος C1 την 5^{η} και την 8^{η} μέρα της ζύμωσης. Το δείγμα C1 αποζύμωσε επιτυχώς μετά από 16 ημέρες ζύμωσης.



Γράφημα 4 Γλυκόζη και Φρουκτόζη των δειγμάτων C2, C3 μετά τον εμβολιασμό με *S. cerevisiae* την 13η μέρα της ζύμωσης. (Μέτρηση με ενζυμικό αναλυτή Hyperlab Smart, Steroglass)

Στα δείγματα C2 και C3 παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού ζύμωσης μετά την 8η μέρα, ενώ από την 9η μέρα ο ρυθμός σχεδόν μηδενίστηκε. Για αυτόν το λόγο την 13η ημέρα ζύμωσης έγινε εμβολιασμός των δειγμάτων C2 και C3 με *S. cerevisiae* και προσθήκη θρεπτικών 2 ημέρες μετά. Μετά τον εμβολιασμό μειωθήκαν περεταίρω τα σάκχαρα των δειγμάτων αυτών (Γράφημα 4). Παρόλα αυτά τα δείγματα C2 και C3 δεν κατάφεραν να αποζυμώσουν. Η νταμιτζάνα με το δείγμα C2 τοποθετήθηκε στο ψυγείο με σάκχαρα 6,02 g/L έπειτα από 23 ημέρες ζύμωσης και το δείγμα C3 τοποθετήθηκε στο ψυγείο με σάκχαρα 4,01 g/L έπειτα από 22 ημέρες ζύμωσης. Οι τελικές ποσότητες σακχάρων των δυο δειγμάτων μετρήθηκαν με τον ενζυμικό αναλυτή Hyperlab Smart, Steroglass. Η δυσκολία ζύμωσης και αποζύμωσης των δειγμάτων C2 και C3 ενδέχεται να οφείλεται στην παρουσία του *L. thermotolerans* στη ζύμωση καθώς σύμφωνα με τους Ciani *et al* (2006), η χρήση του *L. thermotolerans* σε διαδοχικές ή μικτές ζυμώσεις έχει κάποια τάση να παράγει υποτονικές ζυμώσεις με περισσότερες δυσκολίες στη ζύμωση του κλάσματος φρουκτόζης των σακχάρων του σταφυλιού (Ciani *et al.*, 2006). Είναι σύνηθες, κατά την αλκοολική ζύμωση να καταναλώνεται πρώτα η γλυκόζη και έπειτα η φρουκτόζη (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006a).



Γράφημα 5 Κινητικές ζύμωσης ανά συνθήκη εμβολιασμού (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). Συνθήκη A (εμβολιασμός με *S. cerevisiae*), Συνθήκη B (συνεμβολιασμός *S. cerevisiae* με *L. thermotolerans*), Συνθήκη C (εμβολιασμός με *L. thermotolerans* + μετά από 48 ώρες εμβολιασμός με *S. cerevisiae*).

Στη συνθήκη ζύμωσης C παρατηρήθηκε αρκετά πιο αργός ρυθμός ζύμωσης κατά τις πρώτες 2 ημέρες ζύμωσης σε σύγκριση με τα δείγματα των συνθηκών A και B. Ενώ μετά τον εμβολιασμό με *S. cerevisiae*, 48 ώρες μετά το πρώτο εμβόλιο στην συνθήκη C, παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού ζύμωσης. Στην έρευνα των Fairbairn *et al* (2021), παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός ζύμωσης στις ζυμώσεις με *S. cerevisiae* ήταν μεγαλύτερος, από ότι στις ζυμώσεις με συνεμβολιασμό ή διαδοχικό εμβολιασμό *L. thermotolerans* με *S. cerevisiae*, αποτέλεσμα το οποίο ανάμεναν να λάβουν οι ερευνητές. Στην έρευνα των Escribano-Viana *et al* (2018a) παρατηρήθηκε πως τρεις ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό, είχαν σχηματιστεί τρεις βαθμοί αλκοόλης στις δεξαμενές που είχαν αρχικά εμβολιαστεί μόνο με *S. cerevisiae*. Στις άλλες δεξαμενές, όπου είχαν εμβολιαστεί, ξεχωριστά ανά δεξαμενή, με *L. thermotolerans* και άλλες non-*Saccharomyces* ζύμες, είχε επιτευχθεί μόλις ένας βαθμός αλκοόλης (Escribano-Viana *et al*., 2018a).

4.1.2 Οινολογικές Αναλύσεις

Στους τελικούς οίνους πραγματοποιήθηκαν οι βασικές χημικές αναλύσεις για καθένα από τα 9 δείγματα (pH, ελεύθερο και δεσμευμένο θειώδες, η τιτλοδοτούμενη οξύτητα εκφρασμένη σε g/L τρυγικού οξέος, ανάγοντα σάκχαρα, γαλακτικό οξύ, η πτητική οξύτητα εκφρασμένη σε g/L οξικού οξέος και η περιεκτικότητα σε αλκοόλη % vol). Στον Πίνακα 2 φαίνονται τα αποτελέσματα ομαδοποιημένα με βάση την κάθε συνθήκη εμβολιασμού. Επίσης στον Πίνακα 2 εμπεριέχονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στο γλεύκος και τα αποτελέσματα της μέτρησης της γλυκόζης και φρουκτόζης που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ενζυμικού αναλυτή, όταν τελείωσε η αλκοολική ζύμωση, πριν τοποθετηθούν οι νταμιτζάνες στο ψυγείο.

Πίνακας 2 Αποτελέσματα οινολογικών αναλύσεων (One Way ANOVA, *Tukey's* test $P_{value}<0.05$, $*P_{value}>0.05$, Minitab 19.)

	Μούστος (Mean±s.d)	**Συνθήκη Α (*S. cerevisiae*)** (Mean ±s.d)	**Συνθήκη Β (*S. cerevisiae* + *L. thermotolerans* συνεμβολιασμός)** (Mean±s.d)	**Συνθήκη C (*L. thermotolerans* + μετά από 48 ώρες *S. cerevisiae* διαδοχικός εμβολιασμός)** (Mean±s.d)
pH	3,24±0,02	$3.21±0.02^{a*}$	$3.22±0.02^{a*}$	$3.24±0.07^{a*}$
Σάκχαρα (Baume)	11,20±0,20			
Ελεύθερο Θειώδες(mg/L)		$6.72±0.73^{a*}$	$7.74±0.59^{a*}$	$7.15±0.90^{a*}$
Ολικό Θειώδες(mg/L)	47,47±6,47	$51,46±1,58^{b}$	$55,45±2,93^{b}$	$69,07±7,73^{a}$
Τιτλοδοτούμενη Οξύτητα(g/L τρυγικού οξέος)		$7.02±0.09^{b}$	$7.03±0.07^{b}$	$7.41±0.21^{a}$
Ανάγοντα Σάκχαρα (g/L)		$1.28±0.08^{a*}$	$1.30±0.14^{a*}$	$4,29±2,29^{a*}$
Γλυκόζη+Φρουκτόζη (g/L)		$0.50±0.30^{a}$	$0.54±0.45^{a}$	$3,85±2,26^{a}$

Πτητική Οξύτητα (g/L οξικού οξέος)		0.36±0.03[a]	0.38±0.03[a]	0.61±0.17[a]
Γαλακτικό Οξύ (g/L)		0.013±0.006[a*]	0.013±0.006[a*]	0.15±0.24[a*]
% vol		12.59±0.06[a]	12.31±0.14[a]	11.48±0.39[b]

Για τις περισσότερες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών εμβολιασμού. Εξαίρεση αποτελούν η περιεκτικότητα σε αιθανόλη, η τιτλοδοτούμενη οξύτητα και η ποσότητα του ολικού θειώδους. Η ποσότητα του ολικού θειώδους παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στην συνθήκη C.

Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε αιθανόλη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της αιθανόλης στη συνθήκη C σε σύγκριση με τις A και B. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι παρέμειναν υπολειμματικά σάκχαρα στα δείγματα C2 και C3, τα οποία δεν μετατραπήκαν σε αιθανόλη, σε συνδυασμό με τη συνθήκη του εμβολιασμού. Καθώς, στην έρευνα των Sgouros *et al* (2020) παρατηρήθηκε πως η περιεκτικότητα σε αιθανόλη ήταν σημαντικά χαμηλότερη στον διαδοχικό εμβολιασμό *L. thermotolerans* με *S. cerevisiae* σε σύγκριση με άλλα σχήματα εμβολιασμού (ταυτόχρονος εμβολιασμός *L. thermotolerans* και *S. cerevisiae*, εμβολιασμός μόνο με *S. cerevisiae*). Στα δείγματα της συνθήκης B, (ταυτόχρονος εμβολιασμός των *L. thermotolerans* και *S. cerevisiae*) σε σύγκριση με τα δείγματα της συνθήκης A, (*S. cerevisiae*) δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο της στατιστικά σημαντικής μείωσης της αλκοολοπεριεκτικότητας. Ένας πιθανός λόγος είναι ότι, σύμφωνα με τους Gobbi *et al* (2013) και Kapsopoulou *et al* (2007), σε γενικές γραμμές, η έκταση της επιρροής που μπορεί να ασκήσει ο *L. thermotolerans* σε μια δεδομένη ζύμωση είναι σχετική με το χρονικό διάστημα που περνά μόνος του σε επαφή με το γλεύκος. Επιπρόσθετα, παρόλο που δεν υπάρχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές στην παραγωγή της αιθανόλης και στα ανάγοντα σάκχαρα μεταξύ των συνθηκών εμβολιασμού A και B, παρατηρείται πως η συνθήκη A έχει ελάχιστα μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης, όπως και στην έρευνα των Fairbairn *et al* (2021). Όπως επίσης, η συνθήκη A παρουσίασε μικρότερη ποσότητα

αναγόντων σακχάρων. Αντίστοιχα αποτελέσματα ως προς την παραγωγή της αιθανόλης και τα ανάγοντα σάκχαρα προέκυψαν και στην έρευνα των Vicente *et al* (2023). Οι Vicente *et al* (2023) παρατήρησαν ότι οι αμιγείς ζυμώσεις *S. cerevisiae* παρουσίασαν τη χαμηλότερη τελική συγκέντρωση σακχάρων 1,24 g/L, η οποία συσχετίστηκε με την υψηλότερη παραγωγή αιθανόλης.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να επισημανθεί πως στο παρόν πείραμα, τα ανάγοντα σάκχαρα του δείγματος C1 (το μόνο δείγμα που αποζύμωσε από την συνθήκη C), ήταν 1,9072 g/L και η περιεκτικότητα σε αιθανόλη 12,0 % vol. Στην έρευνα των Vicente *et al* (2023), η διαδοχική ζύμωση μεταξύ *L. thermotolerans* και *S. cerevisiae* έδειξε επίσης χαμηλή τελική συγκέντρωση σακχάρων και καμία στατιστική διαφορά όσον αφορά την παραγωγή αιθανόλης. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι, οι διαδοχικές ζυμώσεις του *L. thermotolerans* παρουσιάζουν ενίοτε ελαφρώς υψηλότερες συγκεντρώσεις υπολειμματικών σακχάρων συγκριτικά με αμιγείς ζυμώσεις του *S. cerevisiae*. Αυτό συμβαίνει λόγω της έλλειψης θρεπτικών συστατικών που παρατηρείται μετά τον εμβολιασμό του δεύτερου στελέχους, αρκετές ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό (Vicente *et al*., 2021). Η κατάσταση αυτή επηρεάζει και τη συγκέντρωση αιθανόλης, η οποία μειώνεται από 0,2 % σε 1 % σε σύγκριση με τον μάρτυρα *S. cerevisiae* (Benito et al., 2018; Vicente *et al*., 2021).

Η τιτλοδοτούμενη οξύτητα μεταξύ των συνθηκών A και B παρατηρήθηκε να μην έχει στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στατιστικά σημαντική αύξηση της τιτλοδοτούμενης οξύτητας παρουσίασε η συνθήκη C. Στην περίπτωση του διαδοχικού εμβολιασμού η κυριαρχία του *L. thermotolerans* είναι εμφανέστερη καθώς δεν συναγωνίζεται με το εμβολιασμένο στέλεχος του *S. cerevisiae* (περίπτωση συνεμβολιασμού) και συνεπώς η παραγωγή οξέων μέσω του μεταβολισμού των σακχάρων είναι μεγαλύτερη (Benito *et al*., 2018).

Η πτητική οξύτητα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συνθήκων εμβολιασμού, αποτέλεσμα κοινό με την έρευνα των Sgouros *et al* (2020). Σύμφωνα με τους Vicente *et al* (2023), η χρήση ζύμης non-*Saccharomyces* περιορίζεται μερικές φορές από την αύξηση της πτητικής οξύτητας. Συνήθως, οι αμιγείς ζυμώσεις με *S. cerevisiae* παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές πτητικής οξύτητας σε σύγκριση με τις ζυμώσεις που περιλαμβάνουν μη συμβατική ζύμη. Κατά συνέπεια, στο πείραμα των Vicente *et al* (2023) παρατηρήθηκε, όπως και στο παρόν πείραμα, ότι οι αμιγείς ζυμώσεις με *S. cerevisiae* παρουσίασαν τη χαμηλότερη τιμή πτητικής οξύτητας, ενώ οι διαδοχικές ζυμώσεις παρήγαγαν ελαφρώς υψηλότερες συγκεντρώσεις έως και

0,2 g/L. Ωστόσο, υπήρξαν χαμηλότερες από το ελαττωματικό όριο του οξικού οξέος γύρω στα 0,9 g/L (Ruiz *et al*., 2019).

Όσον αφορά το γαλακτικό οξύ αξίζει να σημειωθεί πως τα δείγματα της συνθήκης C παρουσίασαν αρκετά διαφορετικά αποτελέσματα, οδηγώντας την τυπική απόκλιση των τριών αυτών δειγμάτων να είναι μεγαλύτερη από τον μέσο όρο τους. Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγή γαλακτικού οξέος στο δείγμα C1 ήταν 0,43 g/L, στο δείγμα C2 0,01 g/L και στο δείγμα C3 0,01 g/L αντίστοιχα. Η παραγωγή γαλακτικού οξέος εξαρτάται από τη συγκέντρωση των κυττάρων ζύμης (Comitini *et al*., 2011). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι ο *L. thermotolerans* παρουσιάζει περιορισμένο μέγιστο πληθυσμό όταν υπάρχει χαμηλό οξυγόνο (Gobbi *et al*., 2013). Μεταξύ των συνθηκών A και B δεν υπήρξαν διαφορές στη παραγωγή γαλακτικού οξέος. Αντίθετα, σε διαδοχικό εμβολιασμό παρατηρήθηκε αυξημένη ποσότητα γαλακτικού οξέος (Sgouros *et al*., 2020). Ο *S. cerevisiae* δεν είναι σε θέση να παράγει γαλακτικό οξύ (Sauer *et al*., 2010) ή, ανάλογα με το στέλεχος, μπορεί να το παράγει μόνο σε ίχνη (Sgouros *et al*., 2020). Η τελική ποσότητα αυτού του οξέος μπορεί να σχετίζεται άμεσα με τη δυναμική του πληθυσμού, και συγκεκριμένα με τον πληθυσμό *L. thermotolerans* (Joran *et al*., 2022). Επομένως, η παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης ευνοείται έμμεσα από ορισμένες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, οι συνθήκες αυτές, είτε ευνοούν την ανάπτυξη του *L. thermotolerans* σε σύγκριση με το *S. cerevisiae*, είτε αναστέλλουν τις ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις του *S. cerevisiae* που περιορίζουν την ανάπτυξη ή την ανθεκτικότητα του *L. thermotolerans* (Joran *et al*., 2022). Ο συνεμβολιασμός έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά, ιδίως αζώτου (Ciani *et al*., 2006), και ανακατεύθυνση του καταβολισμού του άνθρακα του *L. thermotolerans* από τη γλυκόλυση στην οδό της φωσφορικής πεντόζης. Αυτό έχει ως συνέπεια τη μείωση της παραγωγής γαλακτικού οξέος (Vicente *et al*., 2021).

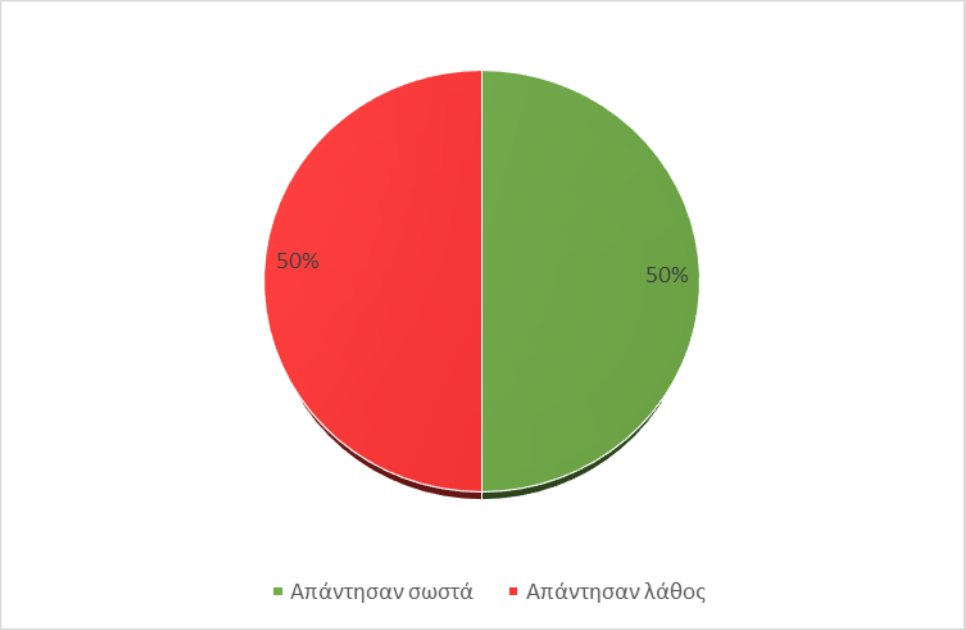
Όσον αφορά την τιμή του pH, στο δείγμα C1 ήταν 3,14. Αυτή η μείωση του pH σε σύγκρισή με το pH του μούστου θα μπορούσε να συνδεθεί τουλάχιστον εν μέρει με την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Joran *et al*., 2022). Ακόμη, ένας λόγος μείωσης του pH του δείγματος C1, και των δειγμάτων των συνθηκών A και B σε σύγκριση με το pH του μούστου είναι η τρυγική σταθεροποίηση. Αυτή έλαβε χώρα κατά την παραμονή των δειγμάτων στο ψυγείο (10°C) πριν την εμφιάλωση των παραγόμενων οίνων. Σε οίνους με pH<3,65 μέρος του τρυγικού οξέος μετατρέπεται σε όξινο τρυγικό ανιόν σύμφωνα με την αντίδραση $H_2T \leftrightarrow H^+ + HT^-$ (pKa=2.97). Το όξινο τρυγικό ανιόν που παράγεται σχηματίζει άλας με τα κατιόντα (κυρίως καλίου) που υπάρχουν στον οίνο. Τα άλατα

που σχηματίζονται καθιζάνουν με την μορφή κρυστάλλων. Για αυτό το λόγο παρατηρείται κάποια μείωση στα pH των τελικών οίνων.

4.2 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε από panel 10 ατόμων εξετάστηκαν οι παραγόμενοι οίνοι μέσω τριγωνικής δοκιμής και περιγραφικής μεθόδου. Οι δοκιμές έγιναν ανά συνθήκη εμβολιασμού, και για αυτό το λόγο αναμίχθηκαν ισόποσες ποσότητες από τα τρία δείγματα της κάθε συνθήκης. Με τον οργανοληπτικό έλεγχο αξιολογήθηκε η επίδραση των τριών διαφορετικών συνθηκών εμβολιασμού στα χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Οι τρείς διαφορετικές συνθήκες εμβολιασμού ήταν η συνθήκη A (*S. cerevisiae*), συνθήκη B (*L. thermotolerans* και *S. cerevisiae* ταυτόχρονος εμβολιασμός) και η συνθήκη C (εμβολιασμός με *L. thermotolerans* και μετά από 48 ώρες εμβολιασμός με *S. cerevisiae*).

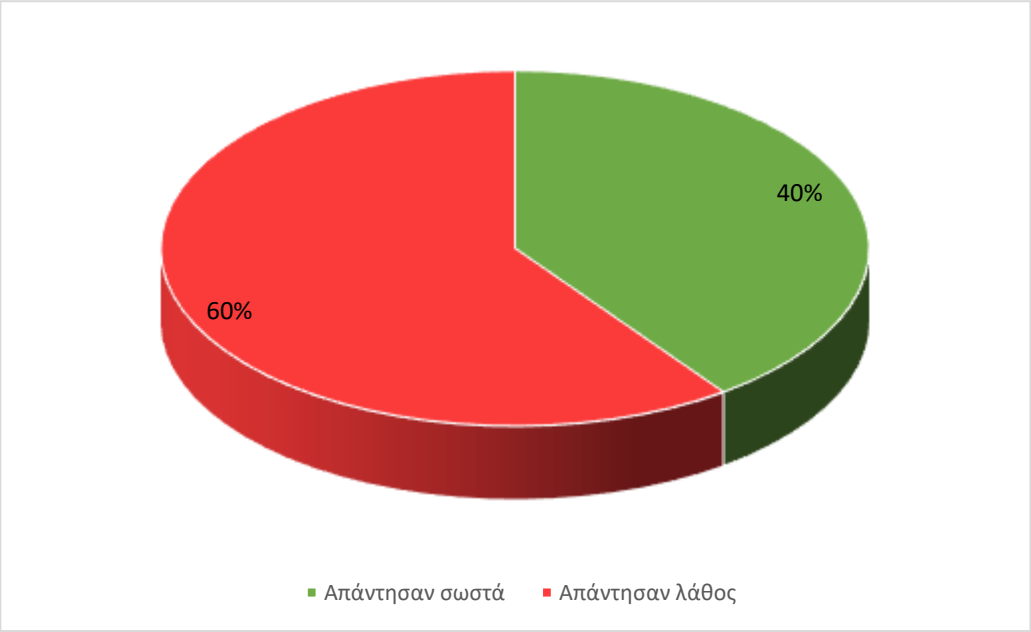
Αρχικά με την τριγωνική δοκιμή εξετάστηκε αν μπορεί να εντοπιστεί το διαφορετικό δείγμα. Και στις δύο τριγωνικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, το διαφορετικό δείγμα ήταν δείγμα της συνθήκης C, ενώ τα ίδια δείγματα ήταν της συνθήκης A και B αντίστοιχα. Στα Γραφήματα 6 και 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα τεστ μεταξύ των συνθηκών A και C, και B και C αντίστοιχα.



Γράφημα 6 Τριγωνική δοκιμή μεταξύ δειγμάτων οίνων των συνθηκών εμβολιασμού Α (*S. cerevisiae*) και C (*L. thermotolerans* + μετά από 48 ώρες *S. cerevisiae*). Τα δύο ίδια δείγματα του τεστ ήταν ο οίνος της συνθήκης Α, και το διαφορετικό δείγμα του τεστ ήταν ο οίνος της συνθήκης C. Ερώτηση του τεστ: Ποιο δείγμα είναι το διαφορετικό;

Στο Γράφημα 6 παρατηρείται ότι ήταν ίδιος ο αριθμός των δοκιμαστών που απάντησαν σωστά με αυτούς που απάντησαν λάθος. Από αυτό συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των οίνων των συνθηκών Α και C και ότι είναι δύσκολο να διακριθούν οι δύο οίνοι μεταξύ τους με βάση κάποιο χαρακτηριστικό.

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την τριγωνική δοκιμή στους οίνους των συνθηκών Β και C (Γράφημα 7), όπου το 60 % των δοκιμαστών απάντησε λάθος και μόνο το 40 % διέκρινε το δείγμα της συνθήκης C ως το διαφορετικό. Έτσι, προκύπτει πως δεν υπάρχει κάποιο άρωμα ή κάποια ένταση αρώματος χαρακτηριστικά διαφορετική στους οίνους της συνθήκης C σε σύγκριση με αυτούς της συνθήκης Β.



Γράφημα 7 Τριγωνική δοκιμή μεταξύ δειγμάτων οίνων των συνθηκών εμβολιασμού B (*S. cerevisiae* + *L. thermotolerans* συνεμβολιασμός) και C (*L. thermotolerans* + μετά από 48 ώρες *S. cerevisiae*). Τα δύο ίδια δείγματα του τεστ ήταν ο οίνος της συνθήκης B, και το διαφορετικό δείγμα του τεστ ήταν ο οίνος της συνθήκης C. Ερώτηση του τεστ: Ποιο δείγμα είναι το διαφορετικό;

Και από τα δύο τριγωνικά τεστ προκύπτει ότι η χρήση του *L. thermotolerans* δεν είχε μεγάλη επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, δεν προσέθεσε πολυπλοκότητα στους οίνους και δεν βελτίωσε σημαντικά την ποιότητα τους. Παρόλα αυτά, παρατηρείται η τάση να είναι πιο εύκολο να διακριθεί ο οίνος που εμβολιάστηκε διαδοχικά με *L. thermotolerans* και *S. cerevisiae* από τον οίνο που πραγματοποιήθηκε από μονοκαλλιέργεια *S. cerevisiae*, αφού το ποσοστό επιτυχόντων απαντήσεων ήταν 50%. Αντίθετα ήταν πιο δύσκολο να διακριθούν οι δύο οίνοι που εμβολιάστηκαν και με τους δύο μικροοργανισμούς σε διαφορετικά σχήματα εμβολιασμού, καθώς το ποσοστό των λάθος απαντήσεων ήταν μεγαλύτερο από αυτό των σωστών. Στην ποικιλία Emir δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων που προέκυψαν από ταυτόχρονο εμβολιασμό *S. cerevisiae* με *L. thermotolerans* και από διαδοχικό εμβολιασμό του *L. thermotolerans* 24 ώρες πριν τον εμβολιασμό με *S. cerevisiae* (Bakilci *et al*., 2016). Στο πείραμα των Muñoz-Castells *et al* (2023), δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στην οσμή, την γεύση και τη συνολική ποιότητα, μεταξύ των οίνων Pedro Ximenez που εμβολιάστηκαν με μονοκαλλιέργεια στελέχους *S. cerevisiae* υψηλής παραγωγής γλουταθειόνης, σε

σύγκριση με αυτούς που προέκυψαν από μονοκαλλιέργεια *L. thermotolerans* (Muñoz-Castells *et al*., 2023).

Η περιγραφική οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με χρήση ελεύθερης κλίμακας επιλογής (ελάχιστο: 0, μέγιστο: 10). Τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν, αναλύθηκαν με κλίμακα βαθμονόμησης σε εκατοστά και έπειτα έγινε στατιστική επεξεργασία αυτών. Στα γραφήματα 8 και 9 φαίνονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Από την στατιστική επεξεργασία που έγινε στα αποτελέσματα προέκυψε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις τρείς διαφορετικές συνθήκες εμβολιασμού όσον αφορά τα χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν κατά την περιγραφική οργανοληπτική αξιολόγηση. Ένας πιθανός λόγος είναι ότι πριν από την αξιολόγηση το πάνελ των δοκιμαστών δεν είχε εκπαιδευτεί μαζί στην αναγνώριση των αρωμάτων και των γευστικών χαρακτηριστικών στους οίνους, πρακτική που έχει πραγματοποιηθεί στο πείραμα των Crespo *et al* (2023), αλλά και σε άλλα πειράματα. Αυτό προκύπτει από τις μεγάλες τυπικές αποκλίσεις στους μέσους όρους σε καθένα από τα χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν (Γράφημα 9).

Παρόλα αυτά στο Γράφημα 8 παρατηρείται τάση αύξησης της αρωματικής έντασης των οίνων που προέκυψαν από τον διαδοχικό εμβολιασμό με *L. thermotolerans* και *S. cerevisiae*. Αντίστοιχο αποτέλεσμα προέκυψε από την έρευνα των Wang *et al* (2022) σε Icewine από την ποικιλία Semillon. Η αρωματική ένταση φάνηκε να αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στους οίνους που προέκυψαν από τον διαδοχικό εμβολιασμό *S. cerevisiae* 6 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με *L. thermotolerans*, σε σύγκριση με τους οίνους που δημιουργήθηκαν από μονοκαλλιέργειες *S. cerevisiae* και *L. thermotolerans* αντίστοιχα (Wang *et al*., 2022). Η αρωματική ένταση και η αρωματική αρέσκεια αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά και στην έρευνα των Vaquero *et al* (2021) κατά τον διαδοχικό εμβολιασμό.

Επίσης στους οίνους της συνθήκης του διαδοχικού εμβολιασμού παρατηρήθηκε η τάση για μείωση του αρώματος των πυρηνόκαρπων-γιγαρτόκαρπων φρούτων, για αύξηση των τροπικών φρούτων, αύξηση της βοτανικότητας, και αύξηση της επίγευσης. Επίσης παρατηρήθηκε η τάση αύξησης της γλυκιάς γεύσης, αποτέλεσμα αναμενόμενο, καθώς τα δείγματα C2 και C3 της συνθήκης εμβολιασμού C, δεν αποζύμωσαν και περιείχαν υπολειμματικά σάκχαρα. Η χρήση του *L. thermotolerans,* στα πειράματα των Beckner Whitener *et al* (2016) και Snyder *et al* (2021), φάνηκε να προσδίδει στους οίνους από Sauvignon Blanc μεγαλύτερη αρωματική ένταση, με θειολικό χαρακτήρα (Vicente *et al*., 2021). Οι πτητικές θειόλες, συγκεκριμένα η 4-μερκαπτο-4-μεθυλοπεντάνιο-2-όνη, η

3-μερκαπτοεξάν-1-όλη και το οξικό 3-μερκαπτοεξύλιο, είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων που συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην αντίληψη του τροπικού αρώματος στους οίνους Sauvignon Blanc (Coetzee & du Toit, 2012). Όσον αφορά την βοτανικότητα, στο πείραμα των Vaquero *et al* (2021) όπου οινοποιήθηκαν σταφύλια της ποικιλίας Airen, παρατηρήθηκε η τάση αύξησης της βοτανικότητας στους οίνους που εμβολιάστηκαν διαδοχικά με *S. cerevisiae* 8 ημέρες μετά από τον εμβολιασμό με *L. thermotolerans*, σε σύγκριση με αυτούς που εμβολιάστηκαν με μονοκαλλιέργεια *S. cerevisiae* (Vaquero *et al*., 2021). Παρόλα αυτά, όπως και στο παρόν πείραμα, η αύξηση της βοτανικότητας δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Τέλος, οι οίνοι της συνθήκης C είχαν την τάση να προτιμώνται με βάση την αρέσκεια των δοκιμαστών. Στο πείραμα των Balikci *et al* (2016) εξετάστηκε η επίδραση της χρήσης του *L. thermotolerans* στην οινοποίηση της ποικιλίας Emir. Εκεί προέκυψε ότι οι δοκιμαστές προτίμησαν τους οίνους που παράχθηκαν από εμβολιασμό διαδοχικά με *L. thermotolerans* και μετά από 24 ώρες εμβολιασμό με *S. cerevisiae*, έναντι των οίνων που παράχθηκαν με ταυτόχρονο εμβολιασμό των δύο ζυμομυκήτων, χωρίς όμως τα αποτελέσματα να διαφέρουν στατιστικά. Στατιστική μείωση της αρέσκειας των δοκιμαστών παρατηρήθηκε στους οίνους που παράχθηκαν από διαδοχικό εμβολιασμό με *L. thermotolerans* 48 ώρες πριν τον εμβολιασμό με *S. cerevisiae*. Αυτή συνθήκη εμβολιασμού είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων όλων των εστέρων και των ανώτερων αλκοολών (εκτός της n-προπανόλης). Η συνθήκη εμβολιασμού που προτιμήθηκε στατιστικά λιγότερο σε σύγκριση με όλες τις προαναφερθείσες συνθήκες εμβολιασμού ήταν οι οίνοι που προέκυψαν από μονοκαλλιέργειες *S. cerevisiae* (Bakilci *et al*., 2016). Επίσης, στο πείραμα των Vaquero *et al* (2021), αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά η αρέσκεια των οίνων, από την ποικιλία Airen, που προέκυψαν από τον διαδοχικό εμβολιασμό *L. thermotolerans* 8 μέρες πριν τον εμβολιασμό με *S. cerevisiae* σε σύγκριση με τους οίνους που εμβολιάστηκαν μόνο με *S. cerevisiae* (Vaquero *et al*., 2021).

Όσον αφορά τους οίνους που πραγματοποιήθηκαν με ταυτόχρονο εμβολιασμό των δύο ζυμομυκήτων (Συνθήκη B), φαίνεται η τάση αύξησης των φρέσκων αρωμάτων, και μείωσης των φρουτώδων αρωμάτων, των αρωμάτων τροπικών φρούτων, των αρωμάτων τριαντάφυλλου και της επίγευσης. Οι οίνοι που παράχθηκαν από εμβολιασμό μόνο με *S. cerevisiae* (Συνθήκη A) φαίνεται να είχαν την τάση παραγωγής οίνων με πιο έντονο το άρωμα των πυρηνόκαρπων-γιγαρτόκαρπων φρούτων, της ανθικότητας, του τριαντάφυλλου και των ανθών πορτοκαλιάς. Επίσης φάνηκε να

γίνεται περισσότερο αντιληπτή η αίσθηση της οξύτητας και λιγότερο αντιληπτή η γλυκιά γεύση στους οίνους της συνθήκης Α, χωρίς όμως να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τους οίνους των άλλων συνθηκών. Παρόλο που η τιτλοδοτούμενη οξύτητα αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στους οίνους της συνθήκης C, δεν παρατηρήθηκε η αντίστοιχη αύξηση της οξύτητας στους οίνους αυτής της συνθήκης κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση. Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι η ξινή γεύση που σχετίζεται με το χαρακτηριστικό της οξύτητας στους οίνους συσχετίζεται κυρίως με μεμονωμένες χημικές ενώσεις του οίνου και όχι τόσο με την τιτλοδοτούμενη οξύτητα (Ferrero-del-Teso *et al*., 2024).

Η ένταση του αρώματος των εσπεριδοειδών και τα μικροβιολογικά αρώματα (γαλακτικό) φαίνεται να μην επηρεάστηκαν από τις διαφορετικές συνθήκες εμβολιασμού. Κοινό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στο πείραμα των Tzamourani *et al* (2024a), όπου παρόλη την παραγωγή 1 g/L γαλακτικού οξέος (μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος από ότι παράχθηκε στο παρόν πείραμα) από τον διαδοχικό εμβολιασμό *S. cerevisiae* μετά από εμβολιασμό με *L. thermotolerans* στην οινοποίηση της ποικιλίας Ασύρτικο, δεν είχε σημαντική επίδραση στην αντίληψη του γαλακτικού οξέος ή της οξύτητας (Tzamourani *et al*., 2024a). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν σύμφωνο με μια προηγούμενη μελέτη σχετικά με τον ρόλο των αλληλεπιδράσεων των ενώσεων στην αντίληψη της γεύσης του κόκκινου κρασιού, όπου μια συγκέντρωση γαλακτικού οξέος άνω των 1,4 g/L μπορεί να συμβάλει στην ξινή γεύση του κρασιού (Gabler *et al*., 2023; Tzamourani *et al*., 2024a).

Όσον αφορά την χρήση του *L. thermotolerans* ανεξαρτήτως σχήματος εμβολιασμού, φαίνεται να είχε την τάση να παράγει λιγότερο ανθικούς οίνους. Στην έρευνα των Vaquero *et al* (2021) δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά στην ανθικότητα και τα φρουτώδη αρώματα στους οίνους από Airen, μεταξύ των οίνων διαδοχικού εμβολιασμού *L. thermotolerans* με *S. cerevisiae* και εμβολιασμού με μονοκαλλιέργεια *S. cerevisiae*. Σύμφωνα με την έρευνα των Porter *et al* (2019a), οι διαδοχικές ζυμώσεις των ειδών *Lachancea* με *S. cerevisiae* παράγουν χαμηλότερα επίπεδα μονοτερπενίων στο συνθετικό μούστο και στο γλεύκος του Μοσχάτου Αλεξανδρείας σε σύγκριση με εκείνα του *S. cerevisiae* (Porter *et al*., 2019a). Αυτό συνδέεται με την έλλειψη ενζύμων που προηγούνται της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης και εμποδίζουν την απελευθέρωσή των μονοτερπενίων από σύνθετες μορφές (Gunata *et al*., 1988). Επιπλέον, η πρώιμη λύση των κυττάρων του *L. thermotolerans* κατά τη διαδοχική ζύμωση απελευθερώνει ένζυμα που οδηγούν στην υδρόλυση των μονοτερπενίων σε

μονοτερπενικά οξείδια και διόλες (Porter *et al*., 2019a; Mucalo *et al*., 2023). Τα τερπένια που βρίσκονται στα σταφύλια από Μοσχάτο Αλεξανδρείας είναι εκείνα που προσδίδουν κυρίως τα λουλουδάτα αρώματα (Marinaki *et al*., 2023). (Λιναλοόλη: εσπεριδοειδή, ανθικά, γλυκά, αρώματα που μοιάζουν με σταφύλι, α-Τερπινεόλη: πασχαλιά, ανθικά, γλυκά αρώματα, Νερόλη: ανθικά, φρέσκα-πράσινα αρώματα, γρασίδι, Γερανιόλη: εσπεριδοειδή, ανθικά, άνθη πορτοκαλιάς, τριαντάφυλλο, γεράνι) (Wu *et al*., 2016).

Σε αρκετές έρευνες παρατηρήθηκαν αποτελέσματα που δεν συμφωνούσαν με αυτά του παρόντος πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε γενική αύξηση της 2-φαινυλαιθανόλης στις μικτές ζυμώσεις *L. thermotolerans* με *S. cerevisiae,* σε σύγκριση με τις ζυμώσεις μονοκαλλιέργειας *S. cerevisiae*. (Beckner Whitener *et al*., 2015; Benito, *et al.,* 2016a; Comitini *et al*., 2011; Gobbi *et al*., 2013; Porter et al., 2019a; Porter *et al*., 2019b). Οι Gobbi *et al* (2013) παρατήρησαν ότι η αύξηση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με τη συνεργιστική δράση των δύο διαφορετικών ειδών, καθώς σε καθαρές καλλιέργειες (*L. thermotolerans, S. cerevisiae*) και οι δύο αυτές ζύμες είναι χαμηλοί παραγωγοί 2-φαινυλαιθανόλης (Gobbi *et al*., 2013). Οι συγκεντρώσεις αυτής της ένωσης αναφέρθηκαν πάνω από τα όρια αισθητηριακής ανίχνευσης και επομένως, θα μπορούσαν να προσδώσουν στον οίνο αρώματα λουλουδιών και γύρης. (Beckner Whitener *et al*., 2015; Porter *et al*.,2019b). Οι Beckner Whitener *et al* (2016) παρατήρησαν ότι ο *L. thermotolerans* είχε γενική επίδραση στο αρωματικό προφίλ μέσω της παραγωγής διαφόρων οξικών εστέρων και ορισμένων τερπενίων σε οίνους Sauvignon Blanc. Η οργανοληπτική ανάλυση σε Icewines από Semillon αποκάλυψε επίσης ότι οι οίνοι που έχουν υποστεί διαδοχική ζύμωση *L. thermotolerans* με *S. cerevisiae* είχαν περισσότερες φρουτώδεις και λουλουδένιες οσμές. Αυτό σχετιζόταν με τους εστέρες και τις αρωματικές αλκοόλες με φρουτώδη αρώματα, όπως ο γαλακτικός αιθυλεστέρας και η φαινυλαιθανόλη, που απελευθερώνονται κατά τον διαδοχικό εμβολιασμό, καθώς και με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις τερπενίων, αλδεϋδών και κετονών που προσδίδουν πλούσια ανθικά και φρουτώδη αρώματα και μοναδικότητα στους οίνους (Wang *et al*., 2022). Οι Nisiotou *et al* (2019) διαπίστωσαν ότι ο *L. thermotolerans* μπορεί να ενισχύσει τον ποικιλιακό χαρακτήρα και να αυξήσει τη χημική πολυπλοκότητα των οίνων από Μοσχοφίλερο. Ο οίνος που δημιουργήθηκε με διαδοχικό εμβολιασμό χαρακτηρίστηκε από την υψηλότερη ένταση ανθικού αρώματος και επίγευσης, ακολουθούμενος από τον αυτόν που δημιουργήθηκε με ταυτόχρονο εμβολιασμό *L. thermotolerans* με *S. cerevisiae*. Σε σύγκριση με τους οίνους που

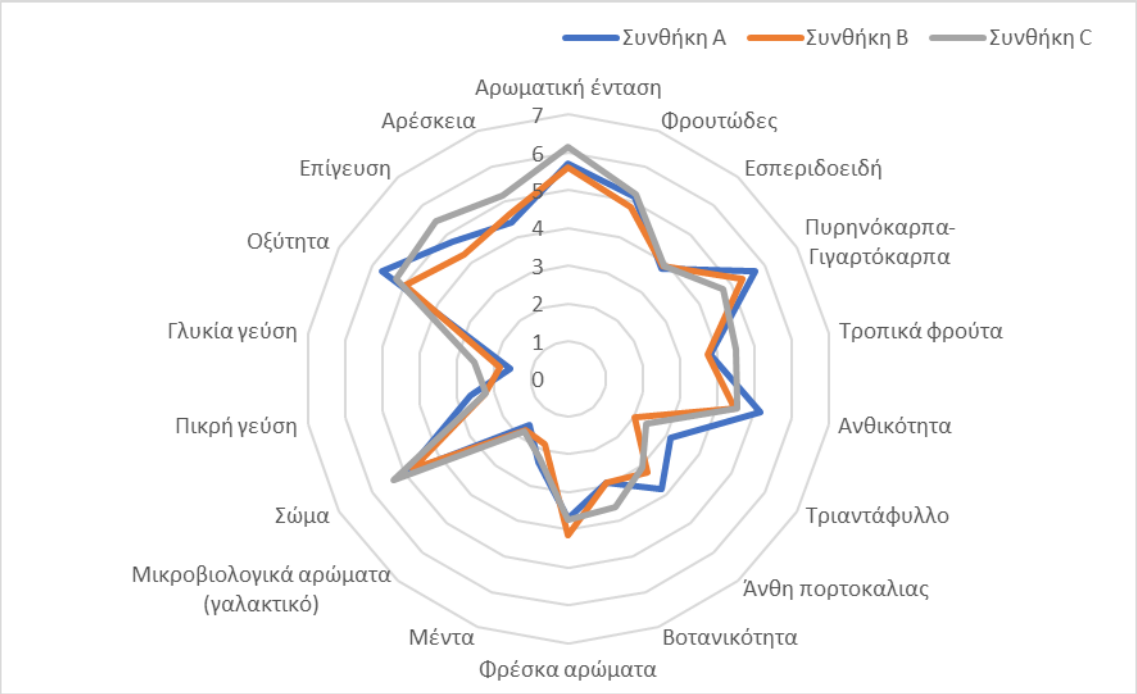
προέκυψαν από μονοκαλλιέργεια *S. cerevisiae*, οι οίνοι από διαδοχικό εμβολιασμό εμφάνισαν σημαντικά εντονότερο άρωμα εσπεριδοειδών. Επιπλέον, οι οίνοι που εμβολιάστηκαν διαδοχικά είχαν αυξημένη οξύτητα και πολυπλοκότητα στον ουρανίσκο (σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τους οίνους μονοκαλλιέργειας *S. cerevisiae*), αλλά χαμηλότερη ισορροπία σε σύγκριση με τους άλλους οίνους (Vaquero *et al*., 2021). Επίσης, η αύξηση της ολικής οξύτητας των οίνων που παρήχθησαν με μικτή ζύμωση σε βιομηχανική κλίμακα έγινε αντιληπτή από τους συμμετέχοντες στην οργανοληπτική αξιολόγηση (Gobbi *et al*., 2013).

Ενδιαφέροντα αποτελέσματα προέκυψαν από την έρευνα των Ana Hranilovic *et al* (2022). Στο πείραμα τους έγινε οινοποίηση της ποικιλίας Viogner. Ως μάρτυρας ήταν ο οίνος που εμβολιάστηκε με μονοκαλλιέργεια *S. cerevisiae*. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικά στελέχη *L. thermotolerans* (3 εμπορικά και 2 πειραματικά στελέχη), τα οποία συνεμβολιάστηκαν με τον *S. cerevisiae* σύμφωνα με δύο συνθήκες (ταυτόχρονος εμβολιασμός και εμβολιασμός του *S. cerevisiae* 48 ώρες μετά τον εμβολιασμό με *L. thermotolerans*). Παρά τις σημαντικές διαφοροποιήσεις στη σύνθεση των πτητικών ουσιών και την οξύτητα, η αρωματική έκφραση της ποικιλίας (δηλαδή το άρωμα/γεύση των πυρηνόκαρπων) παρέμεινε σταθερή μεταξύ των μεταχειρίσεων. Ωστόσο, παρά το παρόμοιο αρωματικό προφίλ τους, οι οίνοι διέφεραν σημαντικά σε δύο γευστικές ιδιότητες, δηλαδή στα αρώματα εσπεριδοειδών και μπανάνας. Επίσης υπήρξαν διαφορές στην ισορροπία, την οξύτητα, τη διάρκεια της οξύτητας και την γλυκιά γεύση μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών (Ana Hranilovic *et al*., 2022).

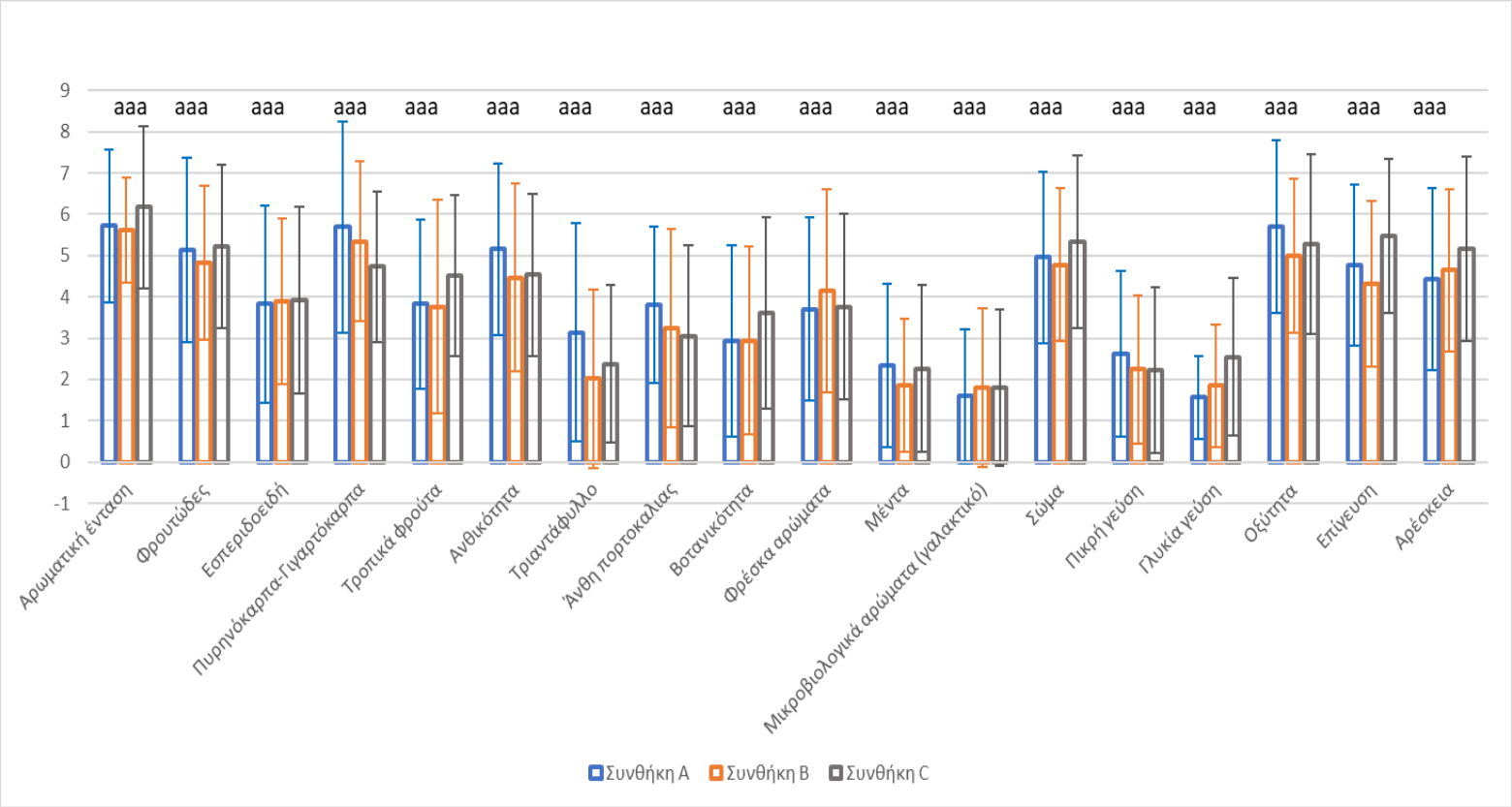
Σύμφωνα με τους Porter *et al* (2019b) όσον αφορά συνολικά τη χρήση του *L. thermotolerans*, φαίνεται να υπάρχει μεγαλύτερη ομοιότητα στην παραγωγή πρωτογενών μεταβολιτών από ότι στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, όπου παρατηρείται μεγαλύτερη εξάρτηση από το στέλεχος της ζύμης και τις συνθήκες ζύμωσης (Porter *et al*., 2019b).

Τέλος, στο πείραμα των Escibano-Viana *et al* (2018a) οινοποιήθηκαν σταφύλια από την ποικιλία Tempranillo με διαδοχικό εμβολιασμό *S. cerevisiae* 3 ημέρες μετά από εμβολιασμό με διαφορετικές non-*Saccharomyces* ζύμες (δύο εκ των οποίων ήταν διαφορετικά στελέχη *L. thermotolerans*). Η κάθε διαφορετική συνθήκη εμβολιασμού πραγματοποιήθηκε σε διαφορετική δεξαμενή. Μια δεξαμενή μάρτυρας εμβολιάστηκε μόνο με *S. cerevisiae.* Η παρακολούθηση του αρώματος καθ' όλη τη διάρκεια των διαδοχικών ζυμώσεων έδειξε ότι μετά από τρεις ημέρες ζύμωσης, η αρωματική διαφορά

ήταν μεταξύ των non-*Saccharomyces* και του *S. cerevisiae*. Ωστόσο, στο τέλος της ζύμωσης, οι περισσότεροι από τους συνεμβολιασμένους οίνους είχαν προφίλ παρόμοιο με εκείνο του *S. cerevisiae*. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι οι οίνοι που παρασκευάστηκαν με ζύμες non-*Saccharomyces* παρουσίασαν χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνους που παρασκευάστηκαν μόνο με *S. cerevisiae*, επειδή οι non-*Saccharomyces* μειώθηκαν γρήγορα στις δεξαμενές. Επομένως, ο διαδοχικός εμβολιασμός non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διαμόρφωση των χαρακτηριστικών των οίνων, αλλά μόνο με είδη που παραμένουν περισσότερο χρόνο στις δεξαμενές (Escibano-Viana *et al*., 2018a).

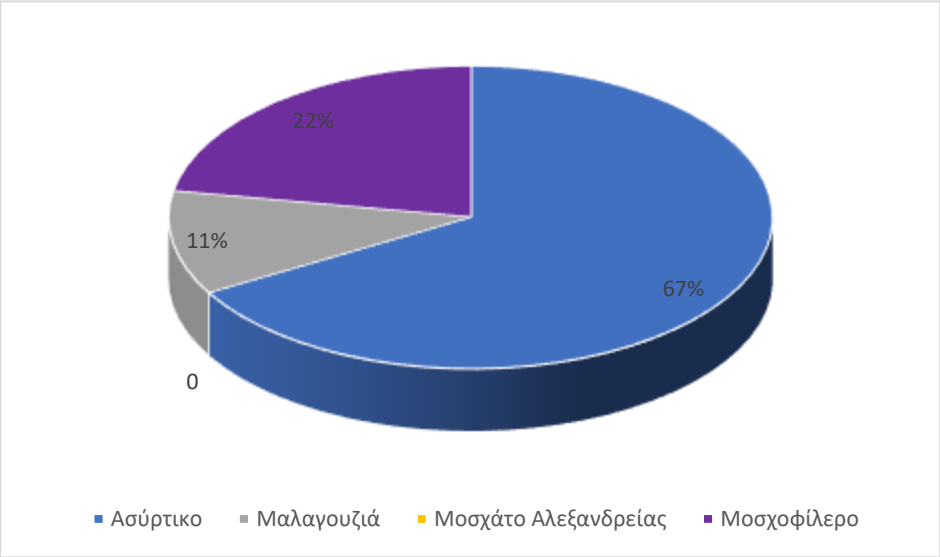


Γράφημα 8 Αποτελέσματα περιγραφικής οργανοληπτικής αξιολόγησης σε μορφή ιστογράμματος

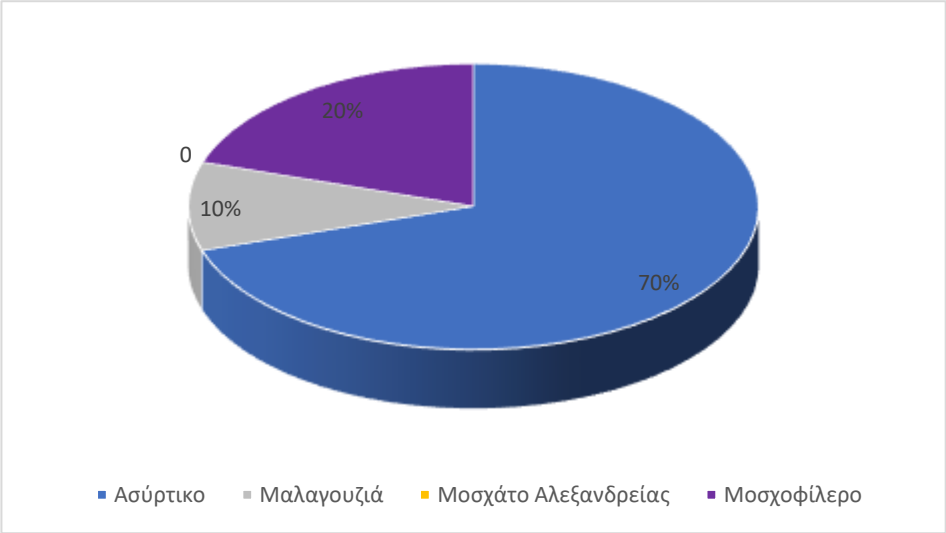


Γράφημα 9 Αποτελέσματα περιγραφικής οργανοληπτικής αξιολόγησης μετά από στατιστική επεξεργασία με One Way ANOVA.

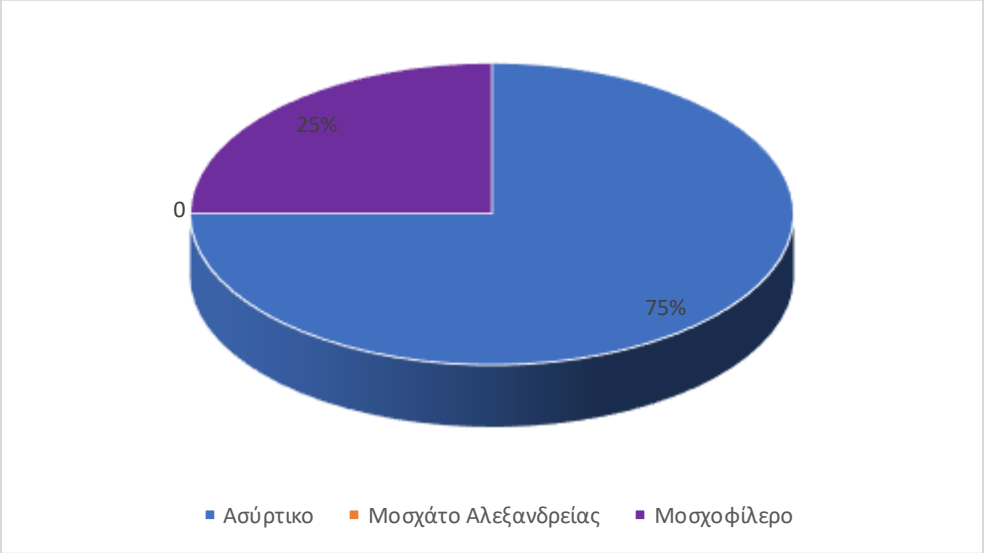
Όσον αφορά την εκτίμηση της ποικιλίας των οίνων από τους δοκιμαστές κατά την διάρκεια της οργανοληπτικής αξιολόγησης, τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στα γραφήματα 10,11,12.



Γράφημα 10 Απαντήσεις του πάνελ ως προς την ποικιλία του οίνου της συνθήκης Α



Γράφημα 11 Απαντήσεις του πάνελ ως προς την ποικιλία του οίνου της συνθήκης B



Γράφημα 12 Απαντήσεις του πάνελ ως προς την ποικιλία του οίνου της συνθήκης C

Αξιοσημείωτο ήταν το αποτέλεσμα ότι κανένας από τους δοκιμαστές δεν αντιλήφθηκε ότι η ποικιλία των παραγόμενων οίνων ήταν το Μοσχάτο Αλεξανδρείας. Παρόλα αυτά ποσοστό των δοκιμαστών θεώρησε πως η ποικιλία ήταν το Μοσχοφίλερο ή και η Μαλαγουζιά. Αξίζει να σημειωθεί πως το Μοσχοφίλερο είναι μια ποικιλία που χαρακτηρίζεται συνήθως από κρασιά με υψηλή οξύτητα και χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ, ενώ συνήθως δεν έχει σώμα (Dimopoulou *et al.*, 2022). Το αρωματικό προφίλ των οίνων του κυμαίνεται από μελίτωμα, φλούδα κόκκινου μήλου, αχλάδι και πεπόνι μέχρι ξύσμα γκρέιπφρουτ, λεμόνι και λάιμ. Έχει επίσης περιγραφεί ότι έχει λεπτό αλλά

έντονο άρωμα λουλουδιών, συγκεκριμένα άρωμα ροδοπέταλων (Lazarakis, 2018; Nanou *et al*., 2020). Η Μαλαγουζιά παράγει οίνους με αρωματικό προφίλ που κυμαίνεται από βότανα, μέντα, βασιλικό, πράσινη πιπεριά και εσπεριδοειδή μέχρι ροδάκινο και τροπικά φρούτα, καθώς και αρώματα λουλουδιών, όπως ανθών εσπεριδοειδών (Strati *et al*., 2021; Nanou *et al*., 2020). Στα υπερώριμα σταφύλια από Μαλαγουζιά, τα πρωτογενή συστατικά του αρώματος, όπως τα τερπένια, είναι συγκεντρωμένα και οι οίνοι τείνουν να έχουν χαρακτήρα Μοσχάτου. (Lazarakis, 2006; Kapaklis, 2014). Η ποικιλία Μοσχάτο Αλεξανδρείας δεν είναι μια ευρέως διαδεδομένη ποικιλία. Οι ποικιλίες Μαλαγουζιά και Μοσχοφίλερο μπορούν να θεωρηθούν ότι μοιράζονται κάποια κοινά αρωματικά χαρακτηριστικά με το Μοσχάτο Αλεξανδρείας, και ως εκ τούτου είναι εύκολο να συγχυστούν μεταξύ τους σε μια τυφλή γευσιγνωσία.

Από τα γραφήματα 10,11,12 παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των απαντήσεών «Ασύρτικο» ήταν σημαντικά μεγαλύτερο από τα ποσοστά των πιο αρωματικών ποικιλιών Μοσχοφίλερο και Μαλαγουζιά. Το Ασύρτικο είναι μια παγκοσμίως διάσημη ποικιλία, λόγω της παραγωγής οίνων με υψηλή οξύτητα και τυπικά ποικιλιακά αρώματα, ειδικά όταν καλλιεργείται στο ηφαιστειακό έδαφος της Σαντορίνης (Tzamourani *et al*., 2024b; Nanou *et al*., 2020). Οι οίνοι από Ασύρτικο χαρακτηρίζονται από αρώματα λάιμ, φρούτου του πάθους, κεριού μέλισσας, πυριτόλιθου και από «αλμυρά» αρώματα (Nanou *et al*., 2020).

Ένας πιθανός λόγος που θεωρήθηκε κατά πλειοψηφία ότι οι οίνοι έχουν προκύψει από την ποικιλία Ασύρτικο είναι ότι ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα είχε απομονωθεί από σταφύλια Ασύρτικου της Σαντορίνης για την έρευνα των Tzamourani *et al* (2023). Οι περισσότερες από τις ενώσεις που καθορίζουν το άρωμα του κρασιού προκύπτουν από τη διαδικασία της ζύμωσης. Οι συγκεντρώσεις τους εξαρτώνται κυρίως από τις επικρατούσες ζύμες και τις συνθήκες ζύμωσης (Padilla *et al*., 2016). Η βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων θεωρείται ότι εξαρτάται από το είδος και το στέλεχος (Escribano-Viana *et al*., 2018a). Σε συνδυασμό με την αρκετά υψηλή οξύτητα των παραγόμενων οίνων, η οποία οδήγησε τους αξιολογήτες να θεωρήσουν ως ποικιλία των οίνων το Ασύρτικο.

Επίσης, παρατηρείται ότι ο οίνος της συνθήκης Α θεωρήθηκε ως Ασύρτικο σε μικρότερο ποσοστό (67%), σε σύγκρισή με τους οίνους της συνθήκης Β (70%) και C (75%). Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί και με την περιγραφική οργανοληπτική αξιολόγηση, όπου ο οίνος της συνθήκης Α είχε την τάση να είναι πιο αρωματικός ως προς την ανθικότητα σε σύγκριση με τους οίνους των άλλων συνθηκών.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία είχε σκοπό να εξετάσει την επίδραση του *L. thermotolerans* και των διαφορετικών σχημάτων εμβολιασμού του σε συνδυασμό με το *S. cerevisiae* στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων από Μοσχάτο Αλεξανδρείας. Ο οίνος που εμβολιάστηκε μόνο με *S. cerevisiae* θεωρήθηκε ως μάρτυρας. Η χρήση του *L. thermotolerans* κατάφερε στον διαδοχικό εμβολιασμό με στέλεχος *S. cerevisiae,* να αυξήσει στατιστικά σημαντικά την τιτλοδοτούμενη οξύτητα. Παράλληλα οι οίνοι της συνθήκης διαδοχικού εμβολιασμού φάνηκαν να έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση σε αλκοόλη. Έτσι θα μπορούσε να προταθεί η χρήση του *L. thermotolerans* ως ένα χρήσιμο εργαλείο για την οινοποίηση σταφυλιών σε θερμότερες ζώνες, καθώς φαίνεται να είναι μια λύση στο πρόβλημα που δημιουργείται εξαιτίας της κλιματικής κρίσης.

Τα αποτελέσματα της τριγωνικής δοκιμής συμφώνησαν με αυτά της περιγραφικής οργανοληπτικής αξιολόγησης, όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικά στατιστικές διαφορές στα χαρακτηριστικά των οίνων που εξετάστηκαν, ανάμεσα στα τρία διαφορετικά σχήματα εμβολιασμού. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να προέκυψε από την έλλειψη εκπαίδευσης των δοκιμαστών ταυτόχρονα σε ίδια δείγματα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε η τάση παραγωγής λιγότερο ανθικών οίνων με την χρήση του *L. thermotolerans*. Στον οίνο που προέκυψε από τον διαδοχικό εμβολιασμό των δύο ζυμομυκήτων φάνηκε η τάση αύξησης των τροπικών αρωμάτων καθώς και της βοτανικότητας. Επίσης, τάση αύξησης σε αυτό τον οίνο παρουσίασαν η αρωματική ένταση και η επίγευση, χαρακτηριστικά που αυξάνουν τη ποιότητα του οίνου. Σύμφωνο αποτέλεσμα ήταν η αρέσκεια των δοκιμαστών, όπου φάνηκε να προτιμάται ο οίνος αυτής της συνθήκης εμβολιασμού.

Τέλος, η τάση μείωσης της έκφρασης των ανθικών αρωμάτων συνολικά στους οίνους όπου έγινε χρήση του *L. thermotolerans,* σε συνδυασμό με την υψηλή οξύτητα των οίνων, φάνηκε να οδηγεί την πλειονότητα των δοκιμαστών στο να θεωρήσουν το Ασύρτικο ως την ποικιλία που χρησιμοποιήθηκε στην οινοποίηση.

Τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου φάνηκε να μην είναι σε συμφωνία με αρκετές έρευνες. Πιθανός λόγος θα μπορούσε να είναι η επιλογή του στελέχους του *L. thermotolerans*, καθώς το στέλεχος φαίνεται να επηρεάζει την ανθεκτικότητα του ζυμομύκητα κατά την οινοποίηση και την παραγωγή ειδικά των δευτερογενών μεταβολιτών.

Συμπερασματικά, η χρήση του συγκεκριμένου στελέχους *L. thermotolerans* δεν φάνηκε να έχει μεγάλη επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, καθώς δεν προσέθεσε πολυπλοκότητα στους οίνους και δεν βελτίωσε σημαντικά την ποιότητα τους. Παρόλα αυτά, θα ήταν ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί ανάλυση των αρωματικών συστατικών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) στους παραγόμενους οίνους για πιο εκτενή αποτελέσματα της επίδρασης του στελέχους *L. thermotolerans* και των διαφορετικών σχημάτων εμβολιασμού σε αυτούς.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βλάχου, Μ., (2011). Τεχνολογικές επεμβάσεις κατά την οινοποίηση της ποικιλίας Όψιμος Εδέσσης. Μέρος 2ο : Επίδραση στο περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες και πολυσακχαρίτες. [Διπλωματική εργασία ΜΔΕ]. Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Κοτσερίδης Γ.,(2012). *Οινολογία Ι Εργαστηριακές ασκήσεις*. Εργαστήριο μηχανικής τροφίμων, επεξεργασίας & συντήρησης γεωργικών προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σουφλερός, Ε., (2015). *Οινολογία. Επιστήμη και Τεχνογνωσία. 3η Έκδοση*. Τσιαρτσιάνης Αθ. & Σια.

Almeida, C. M. R., and Vasconcelos, M. T. S. (2003). Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin. *J. Agric. Food Chem*. (51), 4788–4798.

Aponte, M., Blaiotta, G., (2016). Potential role of yeast strains isolated from grapes in the production of Taurasi DOCG. *Front. Microbiol* (7), 809.

Bagheri, B., Bauer, F., and Setati, M. (2015). The diversity and dynamics of indigenous yeast communities in grape must from vineyards employing different agronomic practices and their influence on wine fermentation. *South Afr. J. Enol. Vitic*. (36), 243–251.

Bagheri, B., Bauer, F.F., Cardinali, G., *et al*., (2020). Ecological interactions are a primary driver of population dynamics in wine yeast microbiota during fermentation, *Sci. Rep*. (10), 1-12.

Bagheri, B., Bauer, F.F., Setati, M.E. (2017). The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations. *Front. Microbiol*. 8.

Bakker, J.; Clarke, R.J., (2011). *Wine: Flavour Chemistry*. John Wiley & Sons: Hoboken.

Balikci, E.K., Tanguler, H., Jolly, N.P., Erten, H., (2016). Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast.* (33), 313–321.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol*. (153), 243–259.

Beckner Whitener, M. E., Carlin, S., Jacobson, D., Weighill, D., Divol, B., Conterno, L., Vrhovsek, U. (2015). Early fermentation volatile metabolite profile of non-

Saccharomyces yeasts in red and white grape must: A targeted approach. *LWT – Food Science and Technology*, (64), 412–422.

Beckner Whitener, M.E., Stanstrup, J., Panzeri, V., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., Vrhovsek, U. (2016). Untangling the wine metabolome by combining untargeted SPME–GCxGC-TOF-MS and sensory analysis to profile Sauvignon blanc co-fermented with seven different yeasts. Metabolomics. (12), 53.

Belda, I., Conchillo, L.B., Ruiz, J., *et al*., (2016). Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking, *Int. J. Food Microbiol.* (223), 1-8.

Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderón, F., Benito, S. (2016). Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast*, (33), 329–338.

Belda, I.; Navascués, E.; Marquina, D.; Santos, A.; Calderon, F.; Benito, S. Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. (2015**)** *Appl. Microbiol. Biotechnol*. (99), 1911–1922.

Benito, A., Calderón, F., Benito, S. (2016a). Combined use of *S. pombe* and *L. thermotolerans* in winemaking. Beneficial effects determined through the study of wines' analytical characteristics. *Molecules*. (21), 1744.

Benito, A.; Calderón, F.; Palomero, F.; Benito, S. (2016). Quality and composition of airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol*. (54), 135–144

Benito, S. (2018). The impacts of Lachancea thermotolerans yeast strains on winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. (102), 6775–6790.

Benito, S. (2020). Combined Use of *Lachancea thermotolerans* and *Schizosaccharomyces pombe* in Winemaking: A Review. *Microorganisms*. (8), 655.

Benito, S.; Hofmann, T.; Laier, M.; Lochühler, B.; Schüttler, A.; Ebert, K.; Fritsch, S.; Röcker, J.; Rauhut, D. (2015**).** Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol*. (241), 707–717.

Berbegal, C., Spano, G., Tristezza, M. *et al*., (2017). Microbial resources and innovation in the wine production sector, *South African J. Enol. Vitic*. (38), 156-166

Bertels, L.-K., Murillo, L.F., Heinisch, J. (2021). The Pentose Phosphate Pathway in Yeasts–More Than a Poor Cousin of Glycolysis. *Biomolecules*, (11), 725.

Blanco-Zubiaguirre, L.; Olivares, M.; Castro, K.; Carrero, J.A.; García-Benito, C.; García-Serrano, J.; Pérez-Pérez, J.; Pérez-Arantegui, J., (2019). Wine markers in

archeological potteries: Detection by GC-MS at ultratrace levels. Anal. Bioanal. *Chem*. (411), 6711–6722.

Bokulich, N. A., Swadener, M., Sakamoto, K., Mills, D. A., and Bisson, L. F. (2015). Sulfur dioxide treatment alters wine microbial diversity and fermentation progression in a dose-dependent fashion. *Am. J. Enol. Vitic*. (66), 73–79.

Bordiga, M.; Rinaldi, M.; Locatelli, M.; Piana, G.; Travaglia, F.; Coïsson, J.D.; Arlorio, M., (2013). Characterization of Muscat wines aroma evolution using comprehensive gas chromatography followed by a post-analytic approach to 2D contour plots comparison. *Food Chem*. (140), 57–67.

Börlin, M., Venet, P., Claisse, O., Salin, F., Legras, J.-L., and Masneuf-Pomarede, I. (2016). Cellar-associated *Saccharomyces cerevisiae* population structure revealed high diversity and perennial persistence in Sauternes wine estates. *Appl. Environ. Microbiol*. (82), 2909–2918.

Borren, E., Tian, B. (2020). The Important Contribution of Non-*Saccharomyces* Yeasts to the Aroma Complexity of Wine: A Review. *Foods*. (10), 13.

Buesa, I.; Intrigliolo, D.S.; Castel, J.R.; Vilanova, M., (2021). Influence of water regime on grape aromatic composition of Muscat of Alexandria in a semiarid climate. *Sci. Hortic*. (290), 110525.

Cadež, N., Zupan, J., and Raspor, P. (2010). The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Res*. (10), 619–630.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., and Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agr* (62), 191–202.

Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, J.M., Morata, A., Tesfaye, W., Calderon, F., Suárez-Lepe, J.A., Han, S., Benito, S. (2018). Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiol*. (69), 51–63.

Chou, M.-Y., Heuvel, J. V., Bell, T. H., Panke-Buisse, K., and Kao-Kniffin, J. (2018). Vineyard under-vine floor management alters soil microbial composition, while the fruit microbiome shows no corresponding shifts. *Sci. Rep*. (8):11039.

Ciani, M., Beco, L., Comitini, F., (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol*. (108), 239–245.

Ciani, M., Comitini, F., (2011). Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann. Microbiol*. (61), 25–32.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., *et al*. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking, *FEMS Yeast Res*. (10), 123-133.

Ciani, M., Maccarelli, F., (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol*.(14), 199–203.

Ciani, M., Morales, P., Comitini, F.; Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J.A., Oro, L., Rodrigues Alda, J., Gonzalez, R., (2016). Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Front. Microbiol*. (7), 642.

Coetzee, C., du Toit, W.J. (2012). A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Research International*. (45), 287–298

Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol*. (99), 237–243.

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 Microbiol*. (28), 873–882.

Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M. D., *et al*. (2011). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *Int. J. FoodMicrobiol*. (145), 132–139.

Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiol*. (25), 422–427.

Crespo, J., García1, M., Arroyo1, T., Romero1, V., Cabellos, J.M. (2023). Influence of Native *Saccharomyces cerevisiae* Strains on Malvasia *aromatica* Wines. *Front. Biosci. (Elite Ed).* 15(3): 18.

Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res*. (14), 826–832.

Diez-Ozaeta, I.; Lavilla, M.; Amárita, F., (2021). Wine aroma profile modification by *Oenococcus oeni* strains from Rioja Alavesa region: Selection of potential malolactic starters. *Int. J. Food Microbiol*. (356), 109324.

Dimopoulou, M., Troianou, V., Paramithiotis, S., Proksenia, N., Kotseridis, Y. (2022). Evaluation of Malolactic Starters in White and Rosé Winemaking of Moschofilero Wines. *Appl. Sci*. (12), 5722

Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L.F., Barile, D. (2014). Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiol*. (43), 5–15.

Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., Ciani, M., (2011). Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* (147), 170–180.

Du Plessis, H.W., Maret Du Toit, Hoff, J. W., *et al*., (2017). Characterisation of non-*saccharomyces* yeasts using different methodologies and evaluation of their compatibility with malolactic fermentation, *South African J. Enol. Vitic*. (38) 46-63.

Dutraive, O., Benito, S., Fritsch, S., Beisert, B., Patz, C.-D., Rauhut, D. (2019). Effect of Sequential Inoculation with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation*. (5), 79.

Engan, S. (1974). Esters in beer. *Brew Dig* (40), 40–48.

Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Gutiérrez, A.R., Santamaría, P., (2017). Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Food Sci. Technol*. (54), 1555–1564.

Escribano, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R. (2018). Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones. *J. Appl. Microbiol*. (124), 1521–1531.

Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R. (2018a). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts. *Food Research International*. (112), 17–24

Escribano-Viana, R., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A. R., and González-Arenzana, L. (2018). Impact of chemical and biological fungicides applied to grapevine on grape biofilm, must, and wine microbial diversity. *Front. Microbiol*. (9) ,59.

Fairbairn, S., Engelbrecht, L., Setati, M.E., du Toit, M., Bauer, F.F., Divol, B., Rossouw, D. (2021). Combinatorial analysis of population dynamics, metabolite levels and malolactic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae/ Lachancea thermotolerans* mixed fermentations. *Food Microbiology*. (96), 103712

Ferreira, A.M., Mendes-Faia, A., (2020). The Role of Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Metabolism of Organic Acids during Winemaking. *Foods*. (9), 1231.

Ferrero-del-Teso, S., Arapitsas, P., Jeffery, D.W., Ferreira, C., Mattivi, F., Fernandez-Zurbano, P., Saenz-Navajas, M.-P. (2024). Exploring UPLC-QTOF-MS-based targeted and untargeted approaches for understanding wine mouthfeel: A sensometabolomic approach. *Food Chem*. (437), 137726.

Fierer, N., Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Zaneveld, J., Bradford, M. A., and Knight, R. (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME J*. (6), 1007–1017.

Fiori, S., Urgeghe, P.P., Hammami,W., Razzu, S., Jaoua, S., Migheli, Q., (2014). Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. Int. J. *Food Microbiol*. (189), 45–50.

Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavor. *Int. J. Food Microbiol*. (86), 11–22.

Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y., and Hamachi, M. (1994). Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyl transferase gene. *Appl. Environ. Microbiol* (60), 2786–2792.

Gabler, A.M., Ludwig, A., Frank, O., Dawid, C. (2023). NMR-based tastant polymer interaction studies and the influence on the taste perception of red wine. *J. Agric. Food Chem*. (71), 18454–18465.

Ganter, P.F. (2006). Yeast and invertebrate associations. In Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. *Rosa, C.A., Gabor, P., Eds.; Springer* pp. 303–370.

García, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J.M., Arroyo, T., (2017). Yeast monitoring of wine mixed or sequential fermentations made by native strains from D.O. “Vinos de Madrid” using Real-Time Quantitative PCR. *Front. Microbiol*. (8), 2520.

Gaspar, L.M., Machado, A., Coutinho, R. *et al*., (2019). Development of potential yeast protein extracts for red wine clarification and stabilization. *Front. Microbiol*. (10), 2310.

Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol*. (33), 271–281.

Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R. D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., *et al*. (2017). Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microb. Biotechnol*. (10), 354–370.

Gunata, Y.; Bayonove, C.; Baumes, R.; Cordonnier, R., (1985a). The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr. A* (331), 83–89.

Gunata, Y.Z., Bitteur, S., Brillouet, J.M., Bayonove, C.L., Cordonnier, R.E. (1988). Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohyd. Res*. (184), 139–149.

Gunata, Y.Z.; Bayonove, C.L.; Baumes, R.L.; Cordonnier, R.E., (1985b). The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.* (36), 857–862.

Guzzon, R., Labagnara, T., Toffanin, A., and Villegas, T. R. (2018). Oenological characterisation of indigenous strains of *S. cerevisiae* isolated in a biodynamic winery in the Cortona DOC area. *Ann. Microbiol*. (68), 963–967.

Hart R.S.; Jolly N.P.; Ndimba B.K., (2019). Characterisation of hybrid yeasts for the production of varietal Sauvignon blanc wine – A review. *Journal of Microbiological Methods*. (165), 105699.

Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P., (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol*. (84), 865–876.

Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chem*. 107 1064 1077

Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol*. (91), 541–547.

Hranilovic, A., Albertin, W., Capone, D., Gallo, A., Grbin, P., Danner, L., Bastian, S., Masneuf-Pomarede, I., Coulon, J., Bely, M., Jiranek, V. (2022). Impact of *Lachancea thermotolerans* on Chemical Composition and Sensory Profiles of Viognier Wines. *J. Fungi*. (8), 474.

Hranilovic, A., Albertin,W., Capone, D.L., Gallo, A., Grbin, P.R., Danner, L., Bastian, S.E.P., Masneuf-Pomarede, I., Coulon, J., Bely, M., *et al*. (2021). Impact of *Lachancea thermotolerans* on chemical composition and sensory profiles of Merlot wines. *Food Chem*. (349), 129015.

Hranilovic, A., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Jiranek, V., Albertin, W., (2017). The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. *PLoS ONE* **(**12), e0184652.

Hranilovic, A., Gambetta, J.M., Schmidtke, L., Boss, P.K., Grbin, P.R., Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Albertin, W., Jiranek, V. (2018). Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation. *Sci. Rep*. (8), 14812.

Hranilovic, A., Li, S., Boss, P.K., Bindon, K., Ristic, R., Grbin, P.R., Van der Westhuizen, T., Jiranek, V. (2018). Chemical and sensory profiling of Shiraz wines co-fermented with commercial non-*Saccharomyces* inocula. *Aust. J. Grape Wine Res*. (24), 166–180.

Iriti, M., Faoro, F. (2006). Grape phytochemicals: a bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Med Hypoth*. (03), 049

James, A., Yao, T., Ked, H., Wanga, Y. (2023). Microbiota for production of wine with enhanced functional components. *Food Science and Human Wellness.* (12), 1481-1492

Jolly, N.P. Varela, C., Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*saccharomyces* yeasts in wine production uncovered, *FEMS Yeast Res.* (14), 215-237.

Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., Alexandre, H. (2022). Multiparametric Approach to Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* during Fermentation. *Fermentation*. (8), 286.

Kačániová, M., Kunová, S., Sabo, J., *et al*., (2020). Identification of yeasts with mass spectrometry during wine production. *Fermentation* (6), 5.

Kapaklis,A. (2014). Impact of specific volatile thiols on varietal aroma of wines produced from Greek and some international grape varieties [Dagr dissertation]. Justus Leibig University Giessen- Institute for Phytopathology, Hochschule Geisenheim University- Department of Microbiology and Biochemistry.

Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., Spyropoulos, H., (2005). Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. *World J. Microbiol. Biotechnol*. (21), 1599–1602.

Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., Nerantzis, E., (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. (23), 735–739.

Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., Arneborg, N., (2015). Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. (99), 10191–10207.

Kment, P., Mihaljeviè, M., Ettler, V., Šebek, O., Strnad, L., and Rohlová, L. (2005). Differentiation of Czech wines using multielement composition–A comparison with vineyard soil. *Food Chem*. (91), 157–165.

Kovacevic Ganic, K., Staver, M., Persuric. D., Banovic, M., Komes, D., Gracin, L. (2003). Influence of Blending on the Aroma of Malvasia istriana Wine. *Food Technol. Biotechnol*. 41 (4) 305–314.

Kurtzman, C.P, (2003). Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vanderwaltozyma and Zygotorulaspora*. *FEMS Yeast Res*. (4), 233–245.

Lachance, M.A., Kurtzman, C.P. (2011). *Lachancea* Kurtzman. *Yeasts*. (2), 511–519.

Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma. *S. Afr. J. Enol. Vitic* (21), 97–129.

Lanaridis, P.; Salaha, M.-J.; Tzourou, I.; Tsoutsouras, E.; Karagiannis, S., (2002). Volatile compounds in grapes and wines from two Muscat varieties cultivated in Greek islands. *OENO One* (36), 39–47.

Lazarakis, K. (2018). *The Wines of Greece, 2nd ed.*; Infinite Ideas Limited: Durrington, UK.

Lazarakis, K., (2006). *The wines of Greece*. Psihalos publications: Athens

Licen, S.; Muzic, E.; Briguglio, S.; Tolloi, A.; Barbieri, P.; Giungato, P., (2021). Derivatized volatile organic compound characterization of Friulano wine from Collio (Italy–Slovenia) by HS-SPME-GC-MS and discrimination from other varieties by chemometrics. *Br. Food J*. (123), 2844–2855.

Liu, D., Zhang, P., Chen, D., Howell, K., (2019). From the Vineyard to the Winery: How Microbial Ecology Drives Regional Distinctiveness of Wine. *Frontiers in Microbiology*. (10), 2679.

Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., *et al*., (2017). Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. (57), 856-873.

Louw, C.; La Grange, D.; Pretorius, I.; van Rensburg, P., (2006). The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour. *J. Biotechnol*. **(**125), 447–461.

Luki´c, I.; Lotti, C.; Vrhovsek, U., (2017). Evolution of free and bound volatile aroma compounds and phenols during fermentation of Muscat blanc grape juice with and without skins. *Food Chem*. (232), 25–35.

Maicas S. Advances in Wine Fermentation. (2021). *Fermentation*. (7), 187.

Marinaki, M.; Mouskeftara, T.; Arapitsas, P.; Zinoviadou K.G; Theodoridis G., (2023). Metabolic Fingerprinting of Muscat of Alexandria Grape Musts during Industrial Alcoholic Fermentation Using HS-SPME and Liquid Injection with TMS Derivatization GC-MS Methods. *Molecules.* (28), 4653.

Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., *et al*. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeastlike fungi colonizing grape berries during the ripening process. *Int. J. Food Microbiol*. (177), 21–28.

Maturano, Y. P., Mestre, M. V., Esteve-Zarzoso, B., Nally, M. C., Lerena, M. C., Toro, M. E., *et al*. (2015). Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of cabernet sauvignon and malbec wines. *Int. J. Food Microbiol*. (199), 23–32.

Mezzasalma, V., Sandionigi, A., Bruni, I., Bruno, A., Lovicu, G., Casiraghi, M., *et al*. (2017). Grape microbiome as a reliable and persistent signature of field origin and environmental conditions in Cannonau wine production. *PLoS One* (12), e0184615.

Milanoviæ, V., Comitini, F., and Ciani, M. (2013). Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments. *Int. J. Food Microbiol*. (161), 240–246.

Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L., (2002). Yeast diversity and persistence in Botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol*. (68), 4884–4893.

Miura, T., Sánchez, R., Castañeda, L. E., Godoy, K., and Barbosa, O. (2017). Is microbial terroir related to geographic distance between vineyards? *Environ. Microbiol. Rep*. (9), 742–749.

Morata, A., Loira, A., Tesfaye, W., Bañuelos, M.A., González, C., Suárez Lepe., J.A., (2018). *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology. *Fermentation* (4), 53.

Morrison-Whittle, P., and Goddard, M. R. (2018). From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation. *Environ. Microbiol*. (20), 75–84.

Mucalo, A., Budi´c-Leto, I., Zduni´c, G. (2023). Effect of Sequential Fermentation with *Lachancea thermotolerans*/*S. cerevisiae* on Aromatic and Flavonoid Profiles of Plavac Mali Wine. *Foods*. (12), 1912.

Muñoz-Castells, R., Moreno, J., García-Martínez, T., Mauricio, J.C., Moreno-García, J. (2023). Chemometric Differentiation of White Wines from a Low-Aromatic Grape Obtained by Spontaneous Fermentation, Enriched with Non-*Saccharomyces*, or with a High-Glutathione-Producing *Saccharomyces* Yeast. *Fermentation*. (9), 1023.

Nally, M.C., Ponsone, M.L., Pesce, V.M., Toro, M.E., Vazquez, F., Chulze, S., (2018). Evaluation of behaviour of *Lachancea thermotolerans* biocontrol agents on grape fermentations. *Lett. Appl. Microbiol* (67), 89–96.

Nanou, E., Mavridou, E., Milienos, F.S., Papadopoulos, G., Tempère, S., Kotseridis, Y. (2020). Odor Characterization of White Wines Produced from Indigenous Greek Grape Varieties Using the Frequency of Attribute Citation Method with Trained Assessors. *Foods*. (9), 1396

Nieuwoudt, H.H., Prior, B.A., Pretorius, I.S., Bauer, F.F., (2002). Glycerol in South African table wines: An assessment of its relationship to wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. (23), 22–30.

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

Noble, A., Arnold, R.A., Buechsenstein, J., Leach, E. J. (1987). Modification of a Standardized System of Wine Aroma Terminology. *American Journal of Enology and Viticulture*. (2), 38.

Oliveira, A.S.; Furtado, I.; Bastos, M.D.L.; de Pinho, P.G.; Pinto, J., (2020). The influence of different closures on volatile composition of a white wine. Food Packag. *Shelf Life* (23), 100465.

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

Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., Pertot, I., *et al*. (2012). Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera L*.) respond to crop management. *Appl. Environ. Microbiol*. (78), 4308–4317.

Peddie, H. A. B. (1990). Ester formation in brewery fermentations. *J. I. Brewing* (96), 327–331.

Pedrosa-López, M.D.C.; Aragón-García, F.; Ruíz-Rodríguez, A.; Piñeiro, Z.; Durán-Guerrero, E.; Palma, M., (2022). Effects from the Freezing of Either Whole or Crushed Grapes on the Volatile Compounds Contents in Muscat Wines. *Foods*. (11), 1782.

Peng, C., Andersen, B., Arshid, S., Larsen, M.R., Albergaria, H., Lametsch, R., Arneborg, N. (2019). Proteomics insights into the responses of *Saccharomyces cerevisiae* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Lachancea thermotolerans*. *FEMS Microbiol. Ecol*. (95), 95.

Perazzolli, M., Antonielli, L., Storari, M., Puopolo, G., Pancher, M., Giovannini, O., *et al*. (2014). Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. *Appl. Environ. Microbiol*. (80), 3585–3596.

Perpetuini, G., Tittarelli, F., Battistelli, N., *et al*. (2020). Contribution of *Pichia manshurica* strains to aroma profile of organic wines, *Eur. Food Res. Technol*. (246), 1405-1417.

Petruzzi, L., Capozzi, V., Berbegal, C., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Spano, G., Sinigaglia, M., (2017). Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. *Front. Microbiol*. (8), 995.

Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., and Gomes, A. C. (2014). Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS One* (9), e85622.

Porter, T.J., Divol, B., Setati, M.E. (2019b). *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food. Res. Int*. (119), 378–389.

Porter, T.J.; Divol, B.; Setati, M.E., (2019a). Investigating the biochemical and fermentation attributes of *Lachancea* species and strains: Deciphering the potential contribution to wine chemical composition. *Int. J. Food Microbiol*. (290), 273–287.

Rapp, A., Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia* (42), 873–884.

Ribereau-Gayon, P.; Dubourdieu D.; Don`eche B.; Lonvaud A. (2006a). Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition. *White winemaking.* John Wiley & Sons. pp 397-444

Ribereau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu D.; Rychlewski, C. (2006b). *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2nd Edition.* John Wiley & Sons.

Robles, A.D.; Fabjanowicz, M.; Płotka-Wasylka, J.; Konieczka, P., (2019). Organic Acids and Polyphenols Determination in Polish Wines by Ultrasound-Assisted Solvent Extraction of Porous Membrane-Packed Liquid Samples. *Molecules* (24), 4376.

Rojas, V.; Gil, J.; Piñaga, F.; Manzanares, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. (2001). *Int. J. Food Microbiol*. (70), 283–289.

Rollero, S., Zietsman, A.J.J., Buffetto, F., *et al*., (2018) *Kluyveromyces marxianus* secretes a pectinase in shiraz grape must that impacts technological properties and aroma profile of wine, *J. Agric. Food Chem*. (66), 11739- 11747.

Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., Maifreni, M., (1997). Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol* (82), 615–618.

Rosi, I., Vinella, M., Domizio, P., (1994). Characterization of β-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol* (77), 519–527.

Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., Capozzi, V. (2019). Non-*Saccharomyces* Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector. *Recent Pat. Food. Nutr. Agric*., (11), 27–39.

Ruiz, J., Kiene, F., Belda, I., *et al.* (2019). Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Appl Microbiol Biotechnol.* (103**)**,7425–50.

Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., Branduardi, P. (2010). 16 Years Research on Lactic Acid Production with Yeast–Ready for the Market? *Biotechnol. Genet. Eng. Rev*. (27), 229–256.

Schievano, E.; D'Ambrosio, M.; Mazzaretto, I.; Ferrarini, R.; Magno, F.; Mammi, S.; Favaro, G., (2013). Identification of wine aroma precursors in Moscato Giallo grape juice: A nuclear magnetic resonance and liquid chromatography–mass spectrometry tandem study. *Talanta* (116), 841–851.

Schmid, F., Moser, G., Müller, H., and Berg, G. (2011). Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents. *Appl. Environ. Microbiol*. (77), 2188–2191.

Schnierda, T., Bauer, F.F.; Divol, B., van Rensburg, E., Görgens, J.F., (2014). Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Lett. Appl. Microbiol*. (58), 478–485.

Schreier, P., Drawert, F., Junker, A. (1976). Identification of volatile constituents from grapes. *J. Agric. Food Chem* (24), 331–336.

Setati, M. E., Jacobson, D., and Bauer, F. F. (2015). Sequence-based analysis of the *Vitis vinifera L*. cv Cabernet Sauvignon grape must mycobiome in three South African vineyards employing distinct agronomic systems. *Front. Microbiol*. (6),1358.

Setati, M. E., Jacobson, D., Andong, U.-C., and Bauer, F. (2012). The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS One* (7), e52609.

Setkova, L.; Risticevic, S.; Pawliszyn, J., (2007). Rapid headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic–time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction: II: Classification of Canadian and Czech ice wines using statistical evaluation of the data. *J. Chromatogr. A*. (1147), 224–240.

Sgouros, G., Mallouchos, A., Filippousi, M.E., Banilas, G., Nisiotou, A. (2020). Molecular Characterization and Enological Potential of A High Lactic Acid-Producing *Lachancea thermotolerans* Vineyard Strain. *Foods*, (9), 595.

Shekhawat, K., Patterton, H., Bauer, F.F., Setati, M.E. (2019). RNA-seq based transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* in mixed-culture fermentations under anaerobic conditions. *BMC Genom*., (20), 145.

Shekhawat, K., Porter, T.J., Bauer, F.F., Setati, M.E., (2018). Employing oxygen pulses to modulate *Lachancea thermotolerans–Saccharomyces cerevisiae* Chardonnay fermentations. *Ann. Microbiol*. (68), 93–102.

Snyder, E.C., Jiranek, V., Hranilovic, A. (2021). Impact of *Lachancea thermotolerans* strain and lactic acid concentration on *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation in wine. *OENO One*. (55), 365–380.

Snyman, C., Mekoue Nguela, J., Sieczkowski, N., Marangon, M., Divol, B. (2021). Optimised Extraction and Preliminary Characterisation of Mannoproteins from Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts. *Foods*, (10), 924.

Soares, R.D.; Welke, J.E.; Nicolli, K.P.; Zanus, M.; Caramão, E.B.; Manfroi, V.; Zini, C.A., (2015). Monitoring the evolution of volatile compounds using gas chromatography during the stages of production of Moscatel sparkling wine. *Food Chem.* (183), 291–304.

Strati, I.F., Tataridis, P., Shehadeh, A., Chatzilazarou, A., Bartzis, V., Batrinou, A., Sinanoglou, V.J. (2021). Impact of tannin addition on the antioxidant activity and sensory character of Malagousia white wine. *Food Science.* (4), 937–945.

Styger, G., Prior, B., Bauer, F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. (38), 9: 1145

Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., (2005). Yeast Modulation of Wine Flavor. *Advances in Applied Microbiology* (57), 131-164.

Thurston, P.A., Taylor, R., Ahvenainen, J. (1981). Effects of linoleic-acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters, *J. I. Brewing* (87), 92–95.

Tzamourani, A., Taliadouros, V., Paraskevopoulos, I., Dimopoulou, M. (2023). Developing a novel selection method for alcoholic fermentation starters by exploring wine yeast microbiota from Greece. *Frontiers in Microbiology*. (14):1301325.

Tzamourani, A., Evangelou, A., Ntourtoglou, G., Lytra, G., Paraskevopoulos, I., Dimopoulou, M. (2024b). Effect of Non-*Saccharomyces* Species Monocultures on Alcoholic Fermentation Behavior and Aromatic Profile of Assyrtiko Wine. *Appl. Sci*. (14), 1522.

Tzamourani, A., Paramithiotis, S., Favier, M., Coulon, J., Moine, V., Paraskevopoulos, I., Dimopoulou, M. (2024a). New Insights into the Production of Assyrtiko Wines from the Volcanic Terroir of Santorini Island Using *Lachancea thermotolerans*. *Microorganisms*. (12), 786.

Urbina, A., Calderón, F., Benito, S. (2021). The Combined Use of *Lachancea thermotolerans* and *Lactiplantibacillus plantarum* (former *Lactobacillus plantarum*) in Wine Technology. *Foods*. (10), 1356.

Vaquero, C., Loira, I., Heras, J.M., Carrau, F., González, C., Morata, A. (2021). Biocompatibility in Ternary Fermentations with *Lachancea thermotolerans*, Other Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* to Control pH and Improve the Sensory Profile of Wines From Warm Areas. *Frontiers in Microbiology*. (12): 656262.

Vicente, J., Kelanne, N., Rodrigo-Burgos, L., Navascués, E., Calderón, F., Santos, A., Marquina1, D., Yang, B., Benito, S. (2023). Influence of different *Lachancea thermotolerans* strains in the wine profile in the era of climate challenge. *FEMS Yeast Research*, (23), 1–8.

Vicente, J., Navascués, E., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., Benito, S., (2021). An Integrative View of the Role of *Lachancea thermotolerans* in Wine Technology. *Foods*. (10), 2878.

Vilela, A. (2019). Use of Nonconventional Yeasts for Modulating Wine Acidity. *Fermentation*, (5), 27.

Wang, J., Yuwen Ma, Y., Sam, F.E., Gao, P., Liang, L., Peng, S., Li, M. (2022). The Impact of Indigenous Non-*Saccharomyces* Yeasts Inoculated Fermentations on ‘Semillon’ Icewine. *Fermentation*. (8), 413

Waterhouse, A.L.; Sacks, G.L.; Jeffery, D.W. (2016) *Understanding Wine Chemistry, 1st ed*.;Wiley: Hoboken.

Wu, Y., Duan, S., Zhao, L., Gao, Z., Luo, M., Song, S., Xu, W., Zhang, C., Ma, C., Wang, S. (2016). Aroma characterization based on aromatic series analysis in table grapes. *Scientific Reports*. (6): 31116.

Yan, G., Zhang, B., Joseph, L., *et al*., (2020). Effects of initial oxygenation on chemical and aromatic composition of wine in mixed starters of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol*. (90), 103460.

Zemni, H.; Souid, I.; Fathalli, N.; Ben Salem, A.; Hammami, M.; Ghorbel, A.; Hellali, R., (2007). Aromatic Composition of Two Muscat Grape Cultivars Cultivated in Two Different Regions of Tunisia. *Int. J. Fruit Sci*. (7), 97–112.

Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., Masneuf-Pomarede, I., (2011). The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol*. (151),210–215.

Διαδικτυακοί τόποι

-Alcoholic fermentation, Wine -- Mise en abyme (2015). Available online: Wine--Mise en abyme (accessed on 11 June 2024).

-Basic Definition, OIV. (2024). Available online: Basic definition-OIV, 1973 (accessed on 6 June 2024).

-Limnos, Wineplus. (n.d.). Available online: https://wineplus.gr/el/wine-school/Wine-Geography-Λήμνος.90/ (accessed on 31 March 2024).

-Muscat of Alexandria, Wines Greece. (n.d.). Available online: https://winesofgreece.org/varieties/muscat-of-alexandria/ (accessed on 31 March 2024).

-Muscat of Lemnos, Wines Greece. (n.d.). Available online: https://winesofgreece.org/articles/muscat-of-lemnos/ (accessed on 31 March 2024).

-PDO Λήμνου, Ministry of Rural Development and Food Hellenic Republic. (2007)

Available online: ΥΠΑΑΤ.gr-PDO Λήμνου (accessed on 31 March 2024)

-PDO Μοσχάτος Λήμνου, Ministry of Rural Development and Food Hellenic Republic.

(2007). Available online: ΥΠΑΑΤ.gr-PDO Μοσχάτος Λήμνου (accessed on 31 March

2024)

-White wine vinification, Info Wine. (n.d.). Available online: infowine.gr white wine vinification (accessed 21 December 2023).

Παράρτημα : Φύλλο αξιολόγησης οργανοληπτικού ελέγχου

Name:

Sample code:

Please evaluate the following samples by smelling and tasting using the following free scale:

NOSE

Aromatic intensity

Fruity

Citrus

Tree fruit

Tropical fruit

Floral

Rose

Orange Blossom

Herbaceous

Fresh

Mint

Microbiological (Lactic)

MOUTH

Mouthfeel

Bitterness

Sweetness

Acidity

Aftertaste

TOTAL

Preference

Which variety is the sample?