



**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**

**"Μελέτη του μικροβιώματος της ποικιλίας Αγιωργίτικο από την Π.Ο.Π.  
ζώνη της Νεμέας μέσω της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης"**

**Του**

**Μάντζος Αλέξανδρος**

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

**Επιβλέπων:** Κάζου Μαρία

ΑΘΗΝΑ, 2022



**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  
"Study of the microbiome of the variety Agiorgitiko from the  
P.D.O zone of Nemea through classical microbiological analysis"**

**By**

**Mantzou Alexandros**

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:** Kazou Maria

Athens, 2022

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «Μελέτη του μικροβιώματος της ποικιλίας Αγιωργίτικο από την Π.Ο.Π. ζώνη της Νεμέας μέσω της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης» που παρουσιάστηκε από τον ΜΑΝΤΖΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis titled “**Study of the microbiome of the variety Agiorgitiko from the P.D.O zone of Nemea through classical microbiological analysis**” presented by **Mantzios Alexandros** and we affirm that it is accepted.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 1ου Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 1<sup>st</sup> Commission Member):**



.....  
**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 2<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 2<sup>nd</sup> Commission Member):**

.....  
**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 3<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 3<sup>rd</sup> Commission Member):**

.....  
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.

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.

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Μάντζος Αλέξανδρος του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 19209 φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Επιστήμη Οίνου και Ζύθου του Τμήματος Επιστημών Οίνου Αμπέλου και Ποτών της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

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

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Ο/Η Δηλών/ούσα

Μάντζος Αλέξανδρος



**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή Υποψηφίου**  
**(Surname and first name of the candidate):**

Μάντζος Αλέξανδρος (Mantzou Alexandros)



Πνευματική ιδιοκτησία © 2022 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2022 University of West Attica  
All rights reserved

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αναφέρεται στη μελέτη του μικροβιώματος σταφυλής και οίνου ποικιλίας Αγιωργίτικο από τις Αρχαίες Κλεωνές της Νεμέας. Το Αγιωργίτικο είναι η μοναδική ποικιλία σταφυλής από την οποία παράγεται οίνος Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) στη Νεμέα. Η αμπελουργική ζώνη της Νεμέας είναι η μεγαλύτερη σε έκταση ΠΟΠ ζώνη της Ελλάδας και διακρίνεται ανεπίσημα σε τρεις υποζώνες με βάση το υψόμετρο που κυμαίνεται από 200-850 μέτρα. Σε καθεμία από τις υποζώνες εντοπίζονται σημαντικές μικροκλιματικές διαφορές. Για τη διερεύνηση του μικροβιώματος του Αγιωργίτικου χρησιμοποιήθηκε η κλασική μικροβιολογική ανάλυση. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκε από τις Αρχαίες Κλεωνές δείγμα χώματος την χρονική στιγμή του τρυγητού του καρπού, δείγμα ραγών σε καίρια χρονικά σημεία κατά την ωρίμανση και δείγμα οίνου κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης και κατευθυνόμενης αλκοολικής ζύμωσης των σταφυλών προς παραγωγή ερυθρού ξηρού οίνου. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν με τη χρήση της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης χρησιμοποιώντας επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και συνθήκες ανάπτυξης για την καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των οξικών βακτηρίων και των ζυμών. Η μελέτη αυτή έγινε στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Χωροχρονικό Παρατηρητήριο Αξιολόγησης Αμπελουργικού και Οινικού Δυναμικού ΟΠΑΠ Νεμέας» και κωδικό έργου Τ1ΕΔΚ-04202 της Δράσης «ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ». Το έργο αυτό αποτελεί την πρώτη ολοκληρωμένη καταγραφή της μικροβιακής ποικιλότητας του Αγιωργίτικου από την ΠΟΠ ζώνη της Νεμέας χρησιμοποιώντας συνδυαστικά κλασικές και σύγχρονες προσεγγίσεις..

## **ABSTRACT**

### **Study of the microbiome of the variety Agiorgitiko from the P.D.O zone of Nemea through classical microbiological analysis**

Mantzios Alexandros  
Department of Wine, Vine & Beverage Sciences,  
University of West Attica, 2022

Microbial biogeography, the study of microbial biodiversity over time and space, uncovers important links between environmental conditions, microbial communities and macroscopic phenomena. Wine was among the first matrices in terms of microbial biogeography approach. In Greece, Agiorgitiko is the most popular indigenous grape variety grown in the Protected Designation of Origin (PDO) Nemea zone, at altitudes varying between 200 m and 850 m that divide the area into three sub-zones, which have slight but vital microclimatic differences. The present study focuses on the fingerprinting of the microbiota of Agiorgitiko grapes, the produced wine throughout spontaneous and controlled fermentation process and soil samples from the area Arxaies Kleones (year 2020), the exploration of the microbiota was performed using classical microbiological analysis. This study was carried out in the framework of the research program entitled "Spatio-temporal Observatory for the Evaluation of Viticultural and Wine Potential P Nemea" and project code T1EDK-04202 of the Action "RESEARCH-CREATE-INNOVATE". This project is the first complete recording of the microbial diversity of Agiorgitiko from the PDO zone of Nemea using a combination of classical and modern approaches.

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Κάζου Μαρία για την καθοδήγηση και τις συμβουλές της κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας καθώς και κατά τη συγγραφή, για όλο το χρόνο που μου αφιέρωσε, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσε στο εργαστήριο. Η συμβολή της ήταν καθοριστική καθώς ανά πάσα στιγμή ήταν διαθέσιμη για όποια απορία ή δυσκολία αντιμετώπιζα, μεταδίδοντάς μου απλόχερα τις γνώσεις της..

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Καθ. Έφη Τσακαλίδου που με δέχτηκε στην ομάδα της για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου μελέτης δίνοντάς μου πρόσβαση σε όλα τα όργανα του εργαστηρίου που χρειάστηκα καλύπτοντας παράλληλα και τα αναλώσιμα καθώς και στα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συνεργασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την κυρία Νίκη Προξενιά καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Οινολογίας του ΓΠΑ για την πρόσβαση στον εξοπλισμό του Εργαστηρίου και τις συμβουλές κατά τη διάρκεια των μικρο-οινοποιήσεων.

Τέλος, θα ήθελα ευχαριστήσω την κυρία Λένα Παγιάτη, για τις συμβουλές της, την υπομονή της και την ομαλή συνεργασία που είχαμε. Η συνεργασία μαζί της έπαιξε τον κυριότερο ρόλο στο να αντιληφθώ τη σημασία της προσοχής στη λεπτομέρεια και να καταλάβω σε βάθος όλα τα σκέλη των εργαστηριακών μετρήσεων και αναλύσεων. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ από καρδιάς στην οικογένεια μου και τους φίλους για τη στήριξη, τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου προσέφεραν στη διάρκεια των σπουδών μου.



# Βιβλιογραφικό CV

**Μάντζος Αλέξανδρος**

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

Τίτλος: Μελέτη του μικροβιώματος της ποικιλίας  
Αγιωργίτικο από την Π.Ο.Π. ζώνη της Νεμέας μέσω  
της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης

Επιστημονικό Πεδίο: Μικροβιολογία Οίνου - Οινολογία

Βιογραφικά Στοιχεία:

Προσωπικά Στοιχεία:

Εκπαίδευση: (προηγούμενα ΑΠΘ Τμήμα Γεωπονίας  
πτυχία ή διπλώματα)

Εκπλήρωσε τις απαιτήσεις για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών Επιστήμη Οίνου &  
Ζύθου με κατεύθυνση: Οίνος στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Επιστημών  
Οίνου, Αμπέλου & Ποτών, τον Ιούνιο του 2022.

ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ: Κάζου Μαρία

## Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Γραφικές παραστάσεις .....	11
Πίνακες .....	12
1. Εισαγωγή .....	13
1.1. Αμπέλι και σταφύλι.....	15
1.1.1. Μορφή του πρέμνου .....	15
1.1.2. Δομή της σταφυλής - ράγας.....	16
1.1.3. Βλαστικά στάδια αμπέλου και ωρίμανση.....	17
1.1.4. Σύσταση της ράγας .....	20
1.1.5. Ποικιλία Αγιωργίτικο .....	23
1.1.6. Ζώνη ΠΟΠ Νεμέας.....	24
1.2. Κρασί και οινοποίηση .....	26
1.2.1. Σύσταση κρασιού.....	26
1.2.2. Ερυθρή οινοποίηση.....	38
1.3. Μικροβιολογία οίνου .....	42
1.3.1. Ζυμομύκητες.....	42
1.3.2. Βακτήρια.....	44
1.4. Terroir – Μικροβιακό Terroir .....	46
2. Σκοπός του πειράματος.....	48
3. Υλικά και μέθοδοι.....	48
3.1. Διαδικασία μικροοινοποιήσεων .....	48
3.2. Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	50
3.3. Κλασική μικροβιολογική ανάλυση.....	56
3.3.1 Υποστρώματα και μικροβιακές ομάδες.....	56

3.3.2.	Αραιώσεις, εμβολιασμός και καταμέτρηση.....	57
3.3.3.	Απομόνωση και καθαρισμός αποικιών.....	57
3.2.4.	Χρώσεις Gram .....	58
4.	Αποτελέσματα και συζήτηση.....	59
4.1.	Δειγματοληψίες κατά την ωρίμανση.....	59
4.2.	Οινοποιήσεις .....	60
4.3.	Κλασική μικροβιολογική ανάλυση .....	61
	Συμπεράσματα .....	67
	Βιβλιογραφία	

## **Γραφικές παραστάσεις**

Γράφημα 1. Πορεία αυθόρμητης αλκοολικής ζύμωσης

Γράφημα 2. Πορεία κατευθυνόμενης αλκοολικής ζύμωσης

Γράφημα 3. Καταμέτρηση πληθυσμών μικροβιακών ομάδων ΚΖ

Γράφημα 4. Καταμέτρηση πληθυσμών μικροβιακών ομάδων ΑΖ

Γράφημα 5. Καταμέτρηση πληθυσμών μικροβιακών ομάδων στο χόμα

## Πίνακες

Πίνακας 1. Παραγωγή οίνου στις χώρες της ΕΕ

Πίνακας 2. Σημεία δειγματοληψίας.

Πίνακας 3. Υποστρώματα και μικροβιακές ομάδες

Πίνακας 4. Μετρήσεις pH

Πίνακας 5. Φυσικοχημικά αποτελέσματα οινοποιήσεων

Πίνακας 6. Υποστρώματα και αποικίες που απομονώθηκαν.

## 1. Εισαγωγή

Η καλλιέργεια της αμπέλου και η τέχνη της οινοποίησης αποτελούν συστατικά στοιχεία των σπουδαιότερων αρχαίων πολιτισμών της ανατολικής λεκάνης της Μεσογείου. Από τους πολιτισμούς της ανατολής μεταφέρθηκε στον Ελλαδικό χώρο, από εκεί στις Ελληνικές αποικίες της δύσης (κάτω Ιταλία νότια παράλια δυτικής Ευρώπης), καθώς και σε αυτές των Φοινίκων. Σήμερα η αμπελοκαλλιέργεια έχει επεκταθεί σε όλο τον κόσμο όπου σαν φυτό μπορεί να επιβιώσει και να ολοκληρώσει τον βιολογικό του κύκλο (Νικολάου, 2011).

Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, η άμπελος ανακαλύφθηκε ως αναρριχόμενος θάμνος σε δασώδεις και παραποτάμιες περιοχές και ήταν βασικό στοιχείο της διατροφής. Η πρώτη στοιχειωδώς οργανωμένη καλλιέργεια τοποθετείται στη Νεολιθική περίοδο 6.000-5.000 π.Χ. (Σταυρακάκης, 2013). Μετά την έναρξη της τρίτης χιλιετίας π.Χ. και την εποχή του Χαλκού οι Αιγύπτιοι και οι Σουμέριοι καλλιεργούσαν συστηματικά την άμπελο, μάλιστα αρχαιολογικά ευρήματα και παραστάσεις μαρτυρούν πως οι Σουμέριοι καλλιεργούσαν από το 4.000 π.Χ.. Νεότερα ευρήματα από τις περιοχές του βορείου Ιράν ανάγουν τη χρήση προϊόντων αμπέλου στην έκτη χιλιετία, ενώ γραπτά κείμενα για την άμπελο και τα προϊόντα της χρονολογούνται στο 2.400 π.Χ. έχουν βρεθεί στην Αίγυπτο (Νικολάου, 2011).

Στον Ελλαδικό χώρο η καλλιέργεια της αμπέλου εισήχθη από την ανατολή και υπάρχουν πολυάριθμα ευρήματα κυρίως γιγάρτων που αφορούν την Πρωτοελλαδική περίοδο (5<sup>η</sup> χιλιετία) και μαρτυρούν την παρουσία αυτοφυούς αμπέλου στην περιοχή (Νικολάου, 2011). Η πρώτη καλλιέργεια στον Ελλαδικό χώρο κατά τη επικρατέστερη άποψη πραγματοποιήθηκε στη Μινωική Κρήτη (3.000-2.800 π.Χ.) (Σταυρακάκης, 2013). Στο Μινωικό ανάκτορο του Βαθυπέτρου (1580 π.Χ.) βρέθηκε πέτρινο πατητήρι το οποίο αποτελούσε κάτι αντίστοιχο με τα σημερινά πατητήρια τα οποία χρησιμοποιούνταν μέχρι πρόσφατα στη χωρική οινοποίηση σε πολλές περιοχές της Ελλάδας για σύνθλιψη των σταφυλιών και την εξαγωγή του γλεύκους. Εκτός του Μινωικού πολιτισμού ευρήματα βρέθηκαν και στα ανάκτορα της Φαιστού (1950 π.Χ.) αλλά και στον Μυκηναϊκό πολιτισμό ο οποίος δέχτηκε έντονη επίδραση από τους Κρήτες κατά το 1600 π.Χ.. Η ανάπτυξη του Μυκηναϊκού πολιτισμού μαζί με την επέκτασή του στη νησιωτική Ελλάδα καθώς και την Κύπρο προώθησαν την ανάπτυξη

της αμπελοκαλλιέργειας σε διάφορες περιοχές, καθώς το κρασί ήταν ένα από τα βασικά προϊόντα εμπορίου μαζί με το λάδι (Νικολάου, 2011).

Η άμπελος ανήκει στην κλάση *Dicotyledones*, τάξη *Ramiales*, οικογένεια *Vitaceae* και γένος *Vitis*, όλες οι ποικιλίες παραγωγής που καλλιεργούνται για την παραγωγή διάφορων προϊόντων ανήκουν στο είδος *Vitisvinifera* (άμπελος η οиноφόρος).

Στην αμπελοκαλλιέργεια η χρήση υποκειμένων στις περιοχές όπου έχει εισβάλλει η φυλλοξήρα είναι υποχρεωτική αφού δεν υπάρχει άλλος τρόπος αντιμετώπισης της, η αφίδα αυτή μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένες ζημιές στο ριζικό σύστημα των φυτών μέχρι και ολοκληρωτική καταστροφή των φυτών.

Το αμπέλι σήμερα καλλιεργείται παγκόσμια και η βιομηχανία οίνου παράγει πολλά δισεκατομμύρια. Το κρασί εκτός από ένα απλό ποτό που μπορεί να πίνει ο καθένας σαν συνοδεία του φαγητού μπορεί να είναι και ένα πολύ premium προϊόν το οποίο πωλείται σε πολύ ακριβή τιμή, από τις κορυφαίες χώρες σε παραγωγή κρασιού είναι η Ιταλία, η Γαλλία και η Ισπανία στην Ευρώπη. Εκτός Ευρώπης οι κυριότερες χώρες παραγωγοί είναι, οι ΗΠΑ, η Αργεντινή, η Χιλή, η Νότια Αφρική, η Αυστραλία και η Κίνα. Ακόμη το κρασί αποτελεί και ένα πολύ σημαντικό προϊόν εξαγωγών

**Πίνακας 1. Παραγωγή οίνου στις χώρες της ΕΕ σε χιλιάδες εκατόλιτρα (2015-2020).(ΠΗΓΗ ΟΙΥ 2020)**

ΧΩΡΑ	2015	2016	2017	2018	2019	2020
ΙΤΑΛΙΑ	50000	50900	42500	54800	47500	47200
ΓΑΛΛΙΑ	47000	45400	36400	49200	42100	43900
ΙΣΠΑΝΙΑ	37700	39700	32500	44900	33700	37500
ΓΕΡΜΑΝΙΑ	8800	9000	7500	10300	8200	8900
ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ	7000	6000	6700	6100	6500	6500
ΡΟΥΜΑΝΙΑ	3600	3300	4300	5100	3800	3600
ΟΥΓΓΑΡΙΑ	2600	2500	2500	3600	2400	2900
ΑΥΣΤΡΙΑ	2300	2000	2500	2800	2500	2700
ΕΛΛΑΔΑ	2500	2500	2600	2200	2000	2000
ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	1400	1200	1200	1100	900	900
ΚΡΟΑΤΙΑ	1000	800	700	1000	700	700
ΣΛΟΒΕΝΙΑ	600	500	500	900	800	600
ΤΣΕΧΙΑ	800	600	600	700	500	600
ΣΛΟΒΑΚΙΑ	300	300	300	400	300	300
ΚΥΠΡΟΣ	100	100	100	100	100	100
ΛΟΥΞΕΜΒΟΥΡΓΟ	100	100	100	100	100	100
ΜΑΛΤΑ	0	0	0	0	0	0
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>165800</b>	<b>164900</b>	<b>141000</b>	<b>183300</b>	<b>152100</b>	<b>158500</b>

## 1.1. Αμπέλι και σταφύλι

### 1.1.1. Μορφή του πρέμνου

Η άμπελος είναι ένα θαμνώδες φυτό με ασθενικό κορμό και χρειάζεται υποστήριξη, φυσική ή τεχνητή. Τα καλλιεργούμενα φυτά που διαμορφώνονται σε χαμηλά σχήματα (κύπελλο) δεν χρειάζονται στήριξη αφού ο κορμός τους είναι μικρού ύψους και ανθεκτικός σε αντίθεση με τα φυτά που διαμορφώνονται σε πιο εκτεταμένα σχήματα (γραμμικό) και χρειάζονται οπωσδήποτε τεχνητή υποστήριξη (Νικολάου, 2011).

Το κλήμα δεν εμφανίζει δραστηριότητα κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ενώ στις αρχές της άνοιξης ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες και τη ποικιλία, αρχίζει η βλάστηση και εμφανίζονται τα πρώτα φύλλα. Κατά τη βλαστική περίοδο σταδιακά αναπτύσσεται το φύλλωμα, το φυτό ανθίζει και δένει καρπό, στο επιθυμητό επίπεδο ωρίμανσης γίνεται ο τρύγος και σταδιακά τα φύλλα πέφτουν και καθώς η θερμοκρασία μειώνεται το φυτό σταματά και πάλι τη δραστηριότητά του (Τσακίρης, 2011).

#### *Υπέργειο τμήμα*

Το μέρος του φυτού που βρίσκεται πάνω από την επιφάνεια του εδάφους, αποτελείται από τον κορμό και τους βραχίονες στους οποίους βρίσκονται οι κεφαλές ενώ πάνω τους σχηματίζονται οι βλαστοί. Τα φυτά της αμπέλου που καλλιεργούνται συστηματικά, τα πρώτα χρόνια με το κλάδεμα διαμόρφωσης παίρνουν το επιθυμητό σχήμα, έπειτα κάθε χειμώνα δέχονται το κλάδεμα καρποφορίας, κατά το οποίο αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος της ετήσιας βλάστησης, στα τμήματα της βλάστησης που παρέμειναν στο φυτό υπάρχουν οι οφθαλμοί που την ερχόμενη άνοιξη θα βλαστάνουν και καθώς αυξάνει το μήκος του βλαστού εμφανίζονται τα διάφορα όργανα όπως ταξιανθίες, έλικες, φύλλα.



### ***Υπόγειο τμήμα***

Το μέρος του φυτού που είναι κάτω από την επιφάνεια του εδάφους και δεν φαίνεται είναι το ριζικό του σύστημα. Εκτός του ότι στηρίζουν το φυτό οι ρίζες προσλαμβάνουν από το έδαφος τις αναγκαίες ποσότητες θρεπτικών στοιχείων και νερού που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του φυτού και τη καρποφορία του (Τσακίρης, 2011). Το μήκος των ριζών ποικίλει από 1 ως 3 m., αν και σε ορισμένες περιπτώσεις φυτών μεγάλης ηλικίας ή και αυτόριζων πρέμων μπορεί να ξεπεράσει και τα 20 m. Το ριζικό σύστημα διαμορφώνεται πιο έντονα στη πρώτη δεκαετία ζωής του φυτού.

#### **1.1.2. Δομή της σταφυλής - ράγας**

Η ράγα προκύπτει από τη γονιμοποίηση του άνθους και εξελίσσεται σε σταφυλή (τσαμπί), το οποίο ανάλογα την ποικιλία μπορεί να έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά. Η ράγα αποτελεί το 90% του βάρους της σταφυλής, στην αρχή είναι πράσινη, πλούσια σε οξέα και έχει πολύ μικρή συγκέντρωση σε σάκχαρα, το μέγεθος της αυξάνει σιγά-σιγά και παράλληλα μειώνονται τα οργανικά οξέα ενώ αυξάνουν τα σάκχαρα. Μέχρι να αρχίσει η ωρίμανση της ράγας το χρώμα της είναι πράσινο και κατά τον περκασμό(γυάλισμα) ξεκίνα και παίρνει το χρώμα της ποικιλίας ενώ σταδιακά παύει να είναι σκληρή και αποκτά ελαστικότητα.

Στη ράγα διακρίνονται οι εξής περιοχές από το εξωτερικό προς το εσωτερικό της: φλοιός, σάρκα, γίγαρτα. Ο φλοιός αποτελείται από την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα ενώ εδώ απαντούν κυρίως οι χρωστικές ουσίες και πολλές αρωματικές ενώσεις. Η σάρκα περιλαμβάνει στοιβάδες κυττάρων με πολύ λεπτά κυτταρικά τοιχώματα, τα οποία κατά την ανάπτυξη της ράγας αυξάνουν σε μέγεθος και γεμίζουν κυτταρικό χυμό, στο κέντρο της σάρκας υπάρχει το ενδοκάρπιο και περιλαμβάνει τα γίγαρτα.

### 1.1.3. Βλαστικά στάδια αμπέλου και ωρίμανση

Η χρονιά για τα αμπέλια ξεκινά με το κλάδεμα που συνήθως γίνεται στην αρχή της Άνοιξης, με αυτή τη διαδικασία διακόπτεται ο χειμερινός λήθαργος και ενεργοποιείται το φυτό για την αρχή της καλλιεργητικής περιόδου.

Το πρώτο φαινολογικό στάδιο είναι η εκβλάστηση, δηλαδή το φούσκωμα και έπειτα σκάσιμο των οφθαλμών με την εμφάνιση των πρώτων φύλλων, μετά έρχεται η ανάπτυξη των πρώτων φύλλων που επιτρέπει στο φυτό να αρχίσει να φωτοσυνθέτει και να διαπνέει έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί το ριζικό σύστημα και να αρχίσει η απορρόφηση θρεπτικών από το υδατικό διάλυμα. Επόμενο στάδιο είναι η άνθηση και σταδιακά ξεκινά η καρπόδεση, οι ράγες ξεκινούν από πολύ μικρές και σταδιακά μεγαλώνουν μέχρι να κλείσει το τσαμπί για να ξεκινήσει η ωρίμανση. Το τελευταίο στάδιο είναι μετά την ωρίμανση και τον τρύγο, στα μέσα Φθινοπώρου αρχίζουν να αποχρωματίζονται τα φύλλα μέχρι που ξεραίνονται και πέφτουν από το φυτό για ξεκινήσει ο λήθαργος (D.H.Lorenz, Growth stages of the grapevine 1995).



Εικόνα 1. Πρέμνο στην εκβλάστηση



Εικόνα 2. Ανθοφορία αμπέλου

### **Ωρίμανση**

Κατά το αρχικό στάδιο της πράσινης ράγας παρατηρείται έντονη αύξηση σε μέγεθος λόγω των έντονων κυτταροδιαίρέσεων οι οποίες εσωτερικά συνεχίζονται για περίπου δυο εβδομάδες και στον φλοιό για περίπου το διπλάσιο, το στάδιο αυτό διαρκεί 40-60 μέρες και τότε σχηματίζονται και ωριμάζουν τα γίγαρτα. Στο στάδιο αυτό η περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα(τρυγικό, μηλικό οξύ) αρχίζει να αυξάνεται, όπως και να δημιουργούνται οι ταννίνες και άλλες φαινολικές ενώσεις και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις. στο τέλος της φάσης αυτής ξεκινάει ο περκασμός ή γυάλισμα (veraison), στον περκασμό αρχίζει η συσσώρευση των σακχάρων(γλυκόζη, φρουκτόζη), η ράγα γίνεται πιο μαλακή και ελαστική και παίρνει το χρώμα της ποικιλίας, δηλαδή στις κόκκινες ποικιλίες δημιουργούνται οι ανθοκυάνες που δίνουν το χρώμα, ενώ ταυτόχρονα με τα παραπάνω μειώνεται η συγκέντρωση των οξέων.

Το δεύτερο στάδιο πράσινης ράγας είναι ένα σύντομο στάδιο πριν την ωρίμανση όπου παρατηρείται μια μείωση του ρυθμού αύξησης των ραγών. Το στάδιο αυτό διαρκεί λίγο (10-15 μέρες) και καταλήγει σε μια εμφανή αλλαγή της υφής της ράγας η οποία στο τέλος του σταδίου από σκληρή και πράσινη μετατρέπεται σε ελαστική (Νικολάου, 2011).

Το στάδιο της ωρίμανσης ξεκινά με την αλλαγή του χρώματος των ραγών των ερυθρών και μαύρων ποικιλιών (δημιουργία ανθοκυανών), στο στάδιο αυτό γίνεται και η συσσώρευση των σακχάρων με τις εξόζες να δημιουργούνται από τη σακχαρόζη μέσω των ενζύμων (ιμπερτάσες) (Robinsonetal, 2000), η φάση αυτή ονομάζεται περκασμός ή γυάλισμα (veraison) (Zocatellietal, 2013).Στον περκασμό εκτός από τη συσσώρευση των σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη) και ανθοκυανών η ράγα γίνεται πιο μαλακή και αποκτά μεγαλύτερη ελαστικότηταόσο παίρνει όσο αλλάζει χρώμα, δηλαδή στις κόκκινες ποικιλίες δημιουργούνται οι ανθοκυάνες που δίνουν το χρώμα, ενώ ταυτόχρονα με τα παραπάνω μειώνεται η συγκέντρωση των οξέων, οι λευκές ποικιλίες παίρνουν ένα γυαλιστερό υποκίτρινο ή ανοιχτοπράσινο χρώμα που υποδηλώνει την απώλεια χλωροφύλλης. Το στάδιο αυτό στις περισσότερες ποικιλίες διαρκεί 5-8 εβδομάδες και κατά το τέλος του η αναλογία γλυκόζης φρουκτόζης είναι ίση και τα συνολικά σάκχαρα έχουν φτάσει σχεδόν στη μέγιστη τιμή τους σε αντίθεση με τα οξέα που έχουν μειωθεί κατά πολύ (Condeetal, 2017).



Εικόνα 3. Σταφύλια στο στάδιο της άγουρης ράγας, περκασμού και ωρίμανσης(ΠΗΓΗ:evineyardapp.com).

#### 1.1.4. Σύσταση της ράγας

##### *Υδατάνθρακες*

Η συγκέντρωση σε σάκχαρα στις ράγες εξαρτάται από τη ποικιλία και επηρεάζεται από τις καιρικές συνθήκες και τον τρόπο καλλιέργειας (Daietal, 2011), είναι και ένας από τους δείκτες ωριμότητας βάσει του οποίου μπορεί να γίνει ο τρύγος, οι δυο κύριες εξόζες που υπάρχουν στα κύτταρα της ράγας είναι η γλυκόζη(45,86%) και η φρουκτόζη (47,64%) (Liuetal, 2006), κατά την ωρίμανση όπως είπαμε και πιο πάνω ο λόγος τους είναι περίπου ίσος με τη μονάδα. Στο γλεύκος η συγκέντρωσή τους φτάνει τα 150-250 g/L ή και περισσότερο. Η περιεκτικότητα των ραγών σε σάκχαρα δεν είναι σταθερή αλλά επηρεάζεται από παράγοντες κλιματικούς, εδαφικούς, υποκείμενο και καλλιεργητικές πρακτικές όπως λίπανση, άρδευση, διαμόρφωση φυτών και κλάδεμα (Fernanda Cosme et al).

Άλλα σάκχαρα που έχουν βρεθεί στο γλεύκος είναι πεντόζες όπως αραβινόζη και ξυλόζη σε ποσότητες 0,3-2 g/L, οι πεντόζες δεν ζυμώνονται από όλους τους ζυμομύκητες και συναντώνται περισσότερο σε ερυθρές ποικιλίες παρά σε λευκές. Η σακχαρόζη είναι ο πιο σπουδαίος δισακχαρίτης και συναντάται σε ποσότητες 2-5 g/L.

##### *Οργανικά οξέα*

Το πιο σπουδαίο οξύ στις ράγες είναι το τρυγικό, προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού των σακχάρων, το τρυγικό οξύ δεν απαντάται ευρέως στη φύση αλλά χαρακτηρίζει τους καρπούς της αμπέλου δεδομένου ότι η άμπελος είναι το μοναδικό είδος που συσσωρεύει στους καρπούς σημαντικές ποσότητες από αυτό το οργανικό οξύ (Νικολάου, 2011), είναι το πιο ισχυρό από τα οξέα του σταφυλιού και αυτό ευθύνεται περισσότερο για το pH του οίνου. Το μηλικό οξύ απαντάται σε πολλά φρούτα, βρίσκεται σε αφθονία στα μήλα αλλά απαντάται και στις ράγες των σταφυλιών.

Τα οξέα τρυγικό και μηλικό συνεισφέρουν περίπου το 90% του συνόλου των οξέων στα ώριμα σταφύλια, παρόλο που τα δυο αυτά οξέα έχουν παρόμοια δομή η σύνθεσή τους ακολουθεί διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια, το τρυγικό οξύ δημιουργείται

μέσω του ασκορβικού κατά την ανάπτυξη των ραγών ενώ το μηλικό από το πυρουβικό και της καρβοξυλίωσης του. Η περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα αυξάνεται μέχρι το γυάλισμα και μετά αρχίζει και μειώνεται με την ωρίμανση των καρπών, η βιοσύνθεση των οξέων στα σταφύλια εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ποικιλία, περιβαλλοντολογικές συνθήκες και πρακτικές καλλιέργειας. Η θερμοκρασία είναι κλειδί για το ρυθμό με τον οποίο θα μειωθεί το μηλικό οξύ, με τον ρυθμό να είναι εντονότερος σε αυξημένη θερμοκρασία αντίθετα το τρυγικό είναι σταθερότερο όταν ο αμπελώνας εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες (Kanelisetal, 1993).

Αλλά οξέα που βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στις ράγες του σταφυλιού είναι το κιτρικό οξύ, σουκινικό, γαλακτικό, οξικό οξύ και τα φαινολικά οξέα τα οποία συχνά βρίσκονται εστεροποιημένα, το μηλικό οξύ είναι πιο αυξημένο στην Ευρωπαϊκή άμπελο και γενικά οι οινοποιήσιμες ποικιλίες εμφανίζουν μεγαλύτερες οξύτητες σε σχέση με τα επιτραπέζια σταφύλια (Liuetal, 2016).

### *Αζωτούχες ενώσεις*

Στα σταφύλια οι αζωτούχες ενώσεις που εντοπίζονται είναι τα αμμωνιακά κατιόντα και αζωτούχες οργανικές ενώσεις όπως αμινοξέα, πεπτίδια, νουκλειικά οξέα και πρωτεΐνες, σύνθεση τους στις ράγες συμβαίνει κυρίως κατά τις τελευταίες 6-8 εβδομάδες της ωρίμανσης. Τα αμινοξέα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στα σταφύλια είναι οι προλίνη και αργινίνη και σε μικρότερη ποσότητα υπάρχουν αλανίνη, γλουταμικό οξύ και ασπαρτικό οξύ. Η συσσώρευση της προλίνης γίνεται κυρίως στο τέλος της ωρίμανσης, σε αντίθεση με την αργινίνη η οποία υπάρχει και πριν το στάδιο του γυαλίσματος. Όσον αφορά τη ποσότητα των αμινοξέων και τη ποικιλία τους, εξαρτώνται από τη ποικιλία, τις αμπελουργικές τεχνικές και το κλίμα(Stinesetal).

Κατά την ωρίμανση έχει εντοπιστεί μεγάλος αριθμός αμινοξέων, σε αυτό το στάδιο τα αμινοξέα είναι η πιο συνηθισμένη μορφή αζώτου και οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται από 1-4 g/L γλεύκους και κατά την εξέλιξη της ωρίμανσης η συγκέντρωση των κυριότερων αμινοξέων αυξάνει ως το 30-40 του ολικού αζώτου

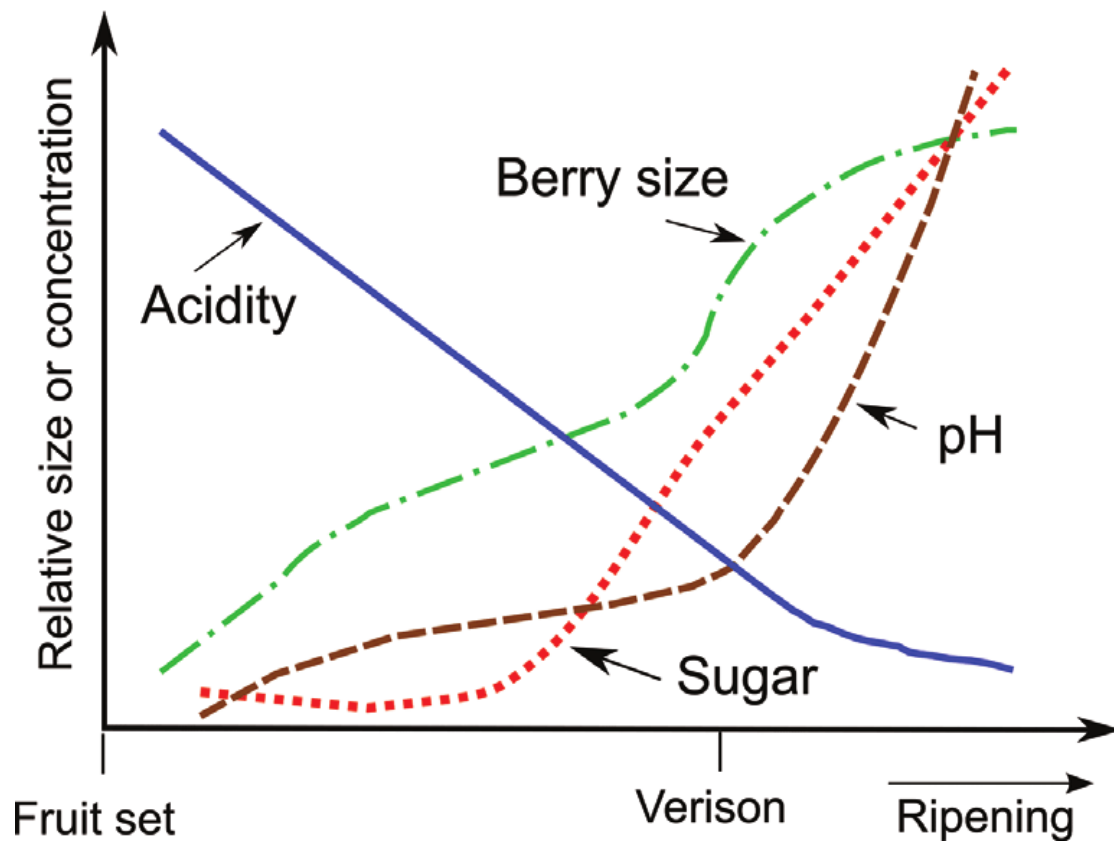
(Millery, 1988). Το ολικό άζωτο στο γλεύκος περιλαμβάνει ανόργανες μορφές και πολλές ενώσεις οργανικού αζώτου οι οποίες θα ανφερθούν.

Σχετικά με τις πρωτεΐνες, υπάρχει μεγάλη αύξηση στο σύνολο τους αμέσως μετά το στάδιο του γυαλίσματος, ενώ κατά το τελικό στάδιο ωρίμανσης παράγεται πολύ μικρή ποσότητα σε υγιή σταφύλια. Στη περίπτωση προσβεβλημένων καρπών από μυκητολογικές ασθένειες υπάρχουν πρωτεΐνες που παράγονται στο στάδιο της ωρίμανσης (Anelli G, 1977).

### *Φαινολικές ενώσεις*

Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα των αμπελοοινικών προϊόντων αλλά έχουν και σημαντικές ιδιότητες υγιεινής για τον άνθρωπο λόγω της αντιοξειδωτικής και βακτηριοστατικής τους δράσης καθώς και προστασίας του καρδιαγγειακού συστήματος. Προέρχονται από διάφορα μέρη της ράγας και εκχυλίζονται κατά την οινοποίηση, χωρίζονται σε διάφορες οικογένειες όπως ταννίνες, στιλμπένια, ανθοκυάνες, φλαβονοειδή.

Η ποιότητα του κρασιού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα φαινολικά αφού πολλά για οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ευθύνονται φαινολικές ενώσεις, όπως για τη στυπτικότητα και το χρώμα. Στην ίδια ομάδα ενώσεων ανήκουν κάποιοι σημαντικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που εντοπίζονται στους φλοιούς τα γίγαρτα και τους βόστρυγες (LorrainBetal, 2011).



Εικόνα 4. Βιοχημικά φαινόμενα κατά την ωρίμανση.(ΠΗΓΗ: Machine Vision Systems - A Tool for Automatic Color Analysis in Agriculture, Ernesto M. Sandoval, researchgate.com)

### 1.1.5. Ποικιλία Αγιωργίτικο

Το Αγιωργίτικο είναι η πιο πολύφυτεμένη ερυθρή Ελληνική ποικιλία και καλλιεργείται κυρίως στη ζώνη ΠΟΠ της Νεμέας σε έκταση πάνω από 20.000 στρέμματα, αλλά απαντάται σποραδικά και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας όπως Κορινθία, Αργολίδα, Μεσσηνία, Αττική, Καβάλα, Δράμα, αλλά και Στερεά Ελλάδα, Θεσσαλία και Εύβοια. Το όνομα προέρχεται από τον Αϊ-Γιώργη που ήταν το όνομα της περιοχής και η καταγωγή της ποικιλίας είναι η ανατολική Πελοπόννησος (Ν. Αργολίδας, Ν. Κορινθίας).

Είναι μια ξεχωριστή ποικιλία με έντονο χρώμα και πολλές ανθοκύανες που δεν διακρίνεται για την πολυπλοκότητά της αλλά έχει ιδιαίτερη ισορροπία καθώς το φρούτο της, η οξύτητα, οι ταννίνες και η αλκοόλη δένουν πολύ αρμονικά και μπορεί να δώσει κόκκινα ξηρά κρασιά φρουτώδη με καλή δομή και ικανότητα παλαίωσης



τουλάχιστον 3 χρόνια. Τα χαρακτηριστικότερα παραδείγματα προέρχονται από τη Νεμέα αλλά υπάρχουν αξιοσημείωτα παραδείγματα στη Δράμα, Καβάλα και ορεινή Αιγιάλεια (Καρακάσης MW, Κουνδουράς).

Από την ποικιλία Αγιωργίτικο παράγεται ο ερυθρός ξηρός οίνος και ο γλυκός ερυθρός οι οποίοι φέρουν την ονομασία Νεμέα, η στρεμματική απόδοση δεν πρέπει να ξεπερνά τα 800kg/στρέμμα και η φυσική περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα πρέπει να ανέρχεται τουλάχιστον σε 188g/L για τον ξηρό και 221g/L για τον γλυκό οίνο, υποχρεωτική είναι και η ωρίμανση του κρασιού σε δρύινο βαρέλι (Σουφλερός, 2015), ακόμη από παράγονται κρασιά ροζέ όπως και λίγα αφρώδη. Τα κρασιά που παράγονται από Αγιωργίτικο χαρακτηρίζονται από μια απαλότητα όσον αφορά τις ταννίνες και όχι πολύ έντονη στυπτικότητα (Koussisietal, 2003, Kalithrakaetal, 2011).

### **Στο αμπέλι**

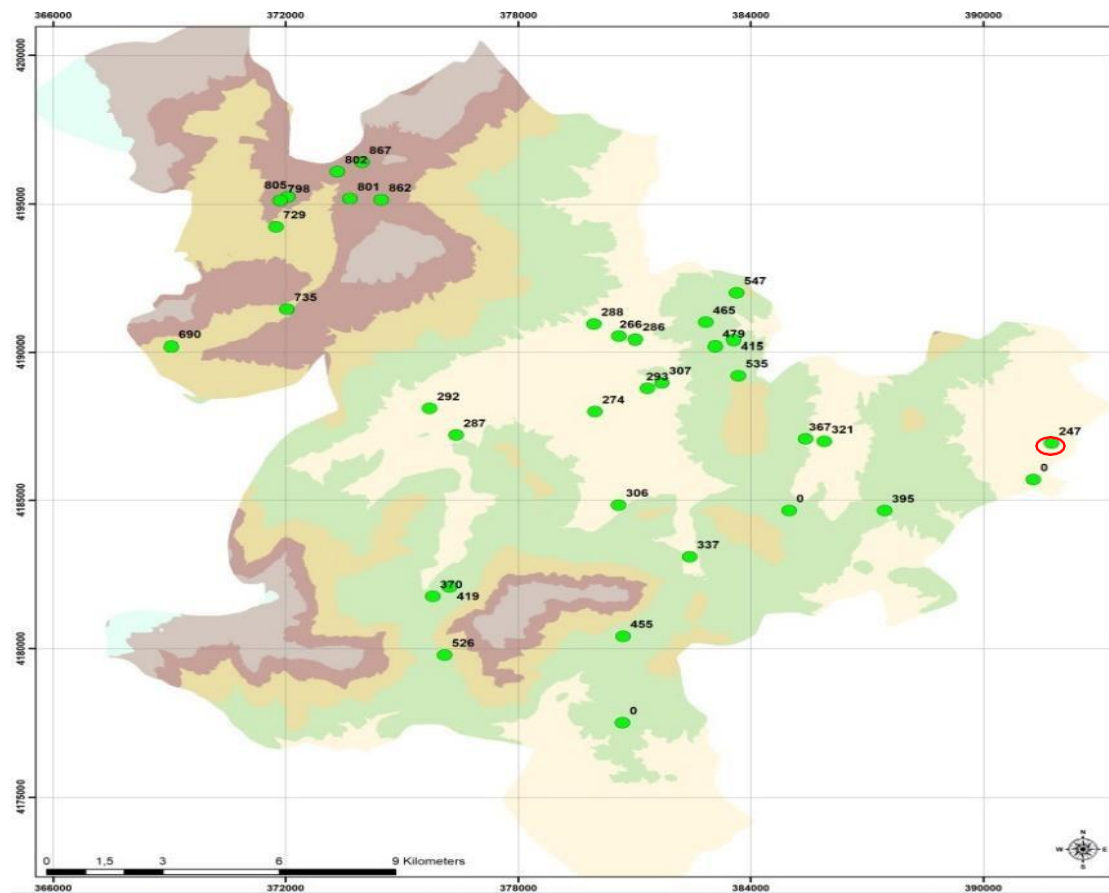
Το Αγιωργίτικο ή Μαυρούδι ή Μαύρο Νεμέας είναι μια όψιμη ποικιλία που ωριμάζει στα μέσα Σεπτεμβρη στη Νεμέα και αργότερα στα βορειότερα μέρη της Ελλάδας, είναι ποικιλία ευαίσθητη σε μυκητολογικές προσβολές και ειδικά στο Ωίδιο (*Uncinulanecator*), λιγότερο στον περονόσπορο (*Plasmoparaviticola*) και τον βοτρυτή (*Botrytis cinerea*). Είναι μια από τις πλουσιότερες σε χρώμα ερυθρές ποικιλίες, έχει μέτρια ζωηρότητα και ευρωστία αλλά είναι γόνιμη και παράγει μέτρια προς μεγάλα τσαμπιά, πυκνόραγα με μεσαίου μεγέθους ράγες και παχύ φλοιό κυανομέλανου χρώματος. Η ζωηρότητα της ποικιλίας εξισορροπείται καλά σε εδάφη μεσαίας γονιμότητας και ιδανικά μέτριας μηχανικής σύστασης με καλή στράγγιση.

#### **1.1.6. Ζώνη ΠΟΠ Νεμέας**

Η μεγαλύτερη σε έκταση ΠΟΠ ζώνη της Ελλάδας, αυτή της Νεμέας, με 30.000 στρέμματα αμπελώνες περιλαμβάνει αγροτικές περιοχές δεκαέξι κοινοτήτων των νομών Αργολίδας και Κορινθίας (Κόρκας, 2011) με σημαντικότερες να είναι οι Νεμέα, Αρχαία Νεμέα, Αρχαίες Κλεωνές, Λεόντιο-Γυμνό, Ασπρόκαμπος – Ψάρι, Κεφαλάρι, Μαλανδρένι, Ξηρόκαμπος.

Εντός της ζώνης συναντούμε αμπελώνες από τα 300m μέχρι και τα 850m στον Ασπρόκαμπο, η θερμοκρασία διαφέρει αρκετά ακόμα και σε κοντινές αποστάσεις λόγω της διαφοράς σε υψόμετρο, ενώ η βροχή κατά μέσο όρο είναι 750mm ετησίως κυρίως τους χειμερινούς μήνες χωρίς να λείπουν ορισμένες χρονιές και οι φθινοπωρινές βροχοπτώσεις που επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα της παραγωγής (Καρακάσης MW, Κουνδουράς).

Το μέγεθος της ζώνης έχει ως αποτέλεσμα μεγάλες διαφορές στις αμπελουργικές περιοχές όσον αφορά ηλιοφάνεια, έκθεση, υψόμετρο και έδαφος. Στα χαμηλότερα υψόμετρα η γονιμότητα των εδαφών είναι μεγαλύτερη και τα εδάφη αργιλοπηλώδη με ασβεστόλιθο στα βαθύτερα στρώματα, ενώ ανεβαίνοντας το έδαφος γίνεται πιο ρηχό και πετρώδες με τα ιδανικότερα παραδείγματα να βρίσκονται στις πλαγιές όπου υπάρχει καλύτερη στράγγιση.



Εικόνα 5. Η αμπελουργική ζώνη της Νεμέας με τη τοποθεσία του πειράματος

## 1.2. Κρασί και οινοποίηση

### 1.2.1. Σύσταση κρασιού

Το γλεύκος προκύπτει από την θραύση των ζώντων κυττάρων του σταφυλιού και μετατρέπεται μετά από παρέμβαση των ζωντανών κυττάρων των ζυμομυκήτων και των βακτηρίων σε κρασί μέσα από πολύπλοκες βιοχημικές μετατροπές. Από γενική φυσικοχημική άποψη ο οίνος είναι ένα υδροαλκοολικό διάλυμα οργανικών οξέων, το νερό είναι το πρώτο σε ποσότητα συστατικό του κρασιού και ανέρχεται σε ποσότητα 80-85% ενώ προέρχεται από τονκαρπό.

Πέρα από το νερό στο κρασί περιλαμβάνονται διάφορες ομάδες συστατικών όπως οργανικά οξέα, αλκοόλες, φαινολικές ενώσεις, εστέρες, ζάχαρα και άλλα που αποτελούν τα οργανικά του συστατικά αλλά και ιόντα που αποτελούν τα ανόργανα συστατικά τα οποία αναλύθηκαν παραπάνω.

#### *Οργανικά οξέα*

Τα οργανικά οξέα είναι αποτελούν μια σημαντική ομάδα συστατικών των οίνων και είναι υπεύθυνα όχι μόνο για την όξινη γεύση αλλά παίζουν ρόλο και στις μικροβιολογικές και χημικές προσβολές, γίνονται ρυθμιστές τόσο της ολικής οξύτητας ή ογκομετρούμενης οξύτητας όσο και της της ενεργού οξύτητας δηλαδή pH. Ακόμη σχετίζονται με την μικροβιολογία του οίνου αφού η υψηλή οξύτητα ή το χαμηλό pH είναι περιοριστικός παράγοντας της ανάπτυξης μικροοργανισμών στους οποίους οφείλονται αλλοιώσεις της ποιότητας των οίνων, τέλος το χαμηλό pH επιδρά ευνοϊκά στη ζωηρότητα του χρώματος. Τα οργανικά οξέα που περιέχονται στον οίνο μπορεί να προέρχονται από το σταφύλι ή να δημιουργούνται κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων και μικροβιολογικών προσβολών, τα πιο σημαντικά από αυτά θα αναλυθούν παρακάτω.

### Οξέα σταφυλιού

Το τρυγικό οξύ είναι το σπουδαιότερο από τα οξέα του οίνου, είναι πιο ισχυρό και επηρεάζει σημαντικά την ενεργό οξύτητα του κρασιού. Από τα τρία πιο σημαντικά οξέα του οίνου (τρυγικό, μηλικό, κιτρικό) αυτό είναι το ανθεκτικότερο στις βακτηριακές προσβολές (Σουφλερός, 2015), το τρυγικό είναι και το οξύ που χρησιμοποιείται για την αύξηση της οξύτητας της σταφυλομάζας. Η αύξηση της αλκοόλης κατά την αλκοολική ζύμωση μειώνει τη διαλυτότητά του με αποτέλεσμα την καθίζηση των τρυγικών αλάτων του K και Ca(τρυγίες), ανάλογα αποτελέσματα έχει και η ψύξη της σταφυλομάζας. Σπάνια συμβαίνει να προσβάλουν γαλακτικά βακτήρια το τρυγικό οξύ ρίχνοντας την περιεκτικότητά του στο μηδέν, η ασθένεια αυτή ονομάζεται εκτροπίαση.

Το μηλικό οξύ είναι πολύ διαδεδομένο στη φύση σε αντίθεση με το τρυγικό και συναντάται στα φύλλα και τους καρπούς των φυτών και η περιεκτικότητά του μειώνεται κατά την ωρίμανση των σταφυλιών. Είναι περισσότερο ασταθές απέναντι σε μικροβιακές προσβολές σε σχέση με το τρυγικό και ασκεί μεγάλη επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού καθώς προσδίδει χορτώδη γεύση και φρεσκάδα τόσο στη μύτη όσο και στο στόμα. Στο κρασί και ιδίως στο κόκκινο πολλές φορές πραγματοποιείται μηλογαλακτική ζύμωση μετά την αλκοολική, κατά αυτή τη δεύτερη ζύμωση το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό και CO<sub>2</sub>, η μετατροπή αυτή γίνεται από ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια. Σκοπός της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι η αντικατάσταση του μηλικού από ένα σταθερότερο οξύ, η οργανοληπτική πολυπλοκότητα που επιτυγχάνεται από τη δημιουργία αρωμάτων όπως του βουτύρου και η μείωση της σταθερής οξύτητας αφού το γαλακτικό είναι ασθενέστερο οξύ και έχει μία καρβοξυλομάδα ενώ το μηλικό δυο.

Στο σταφύλι βρίσκεται και κιτρικό οξύ αλλά όχι στις ποσότητες που βρίσκονται το τρυγικό και το μηλικό (0,5g/L), είναι το χαρακτηριστικό οξύ των εσπεριδοειδών. Ορισμένοι οίνοι που παράγονται από σταφύλια που έχουν προσβληθεί από ευγενή σήψη (*Botrytis Cinerea*) περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες κιτρικού οξέος ως και 1g/L (Σουφλερός, 2015).

Στο κρασί βρίσκουμε και τα ουρονικά οξέα γαλακτουρονικό και γλυκουρονικ τα οποία προκύπτουν από χημικές ή ενζυμικές αντιδράσεις. Το γλυκονικόοξύ που προκύπτει από οξείδωση της γλυκόζης και το οξαλικό οξύ.

Στο γλεύκος περιέχεται περίπου 50-100mg/Lασκορβικού οξέοςή βιταμίνης C το οποίο όμως καταναλώνεται από τις ζύμες και δεν περιέχεται συνήθως στο κρασί. Ωστόσο επιτρέπεται η προσθήκη του σε συγκεκριμένη συγκέντρωση για την προστασία του οίνου από οξειδώσεις (RedWineCompositionucdavis.edu, 2021, Sirenh, etal, 2015).

### **Οξέα Ζυμώσεων**

Τοηλεκτρικό οξύ παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση (Pasteur, 1852), είναι πολύ ανθεκτικό στις βακτηριακές προσβολές και ασκεί επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού αφού συνδυάζει τις γεύσεις ξινό, αλμυρό και πικρό. Η συγκέντρωση του στο κρασί είναι από 0,1 ως 1,5g/L.

Ένα οξύ που το συναντάμε μόνο στον οίνο και όχι στα γλεύκη είναι το γαλακτικό, μπορεί να προέρχεται από ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση και από βακτήρια κατά την μηλογαλακτική ζύμωση ή από βακτήρια που προσβάλουν σάκχαρα πραγματοποιώντας γαλακτική ζύμωση. Η συγκέντρωση του μπορεί να φτάσει τα 3g.L, σε περιπτώσεις που η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη πρόκειται για προσβολή των σακχάρων από οξυγαλακτικά βακτήρια (Σουφλερός, 2015).

Το κιτρομηλικό οξύβρίσκεται στον οίνο σε συγκέντρωση εξαιρετικά χαμηλή αλλά παρουσιάζει ενδιαφέρον στη διάκριση ανάμεσα σε γλυκούς οίνους και σε οίνους που προέρχονται από ανάμειξη κρασιού και αζύμωτου γλεύκους.

Εκτός από την σταθερή οξύτητα του κρασιού υπάρχει και η πτητική οξύτητα που οφείλεται κυρίως στο οξικό οξύ αλλά δευτερευόντως στα βουτυρικό, ισοβουτυρικό, μυρμηγκικό και προπιονικό. Το οξικό οξύ παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από βακτηριακές προσβολές και η παρουσία του στον οίνο μετά από κάποια ποσότητα υποβαθμίζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του δίνοντας δυσάρεστη οσμή και γεύση ξυδιού.

Τα λιπαρά οξέα και οι εστέρες τους είναι συστατικά των κρασιών και γενικότερα των αλκοολούχων ποτών. Τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας (π.χ. βουτυρικό, ισοβαλερικό) παράγονται από ζύμες ως ενδιάμεσα παράγωγα της αλκοολικής ζύμωσης στην πορεία παραγωγής λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας που αποτελούν δομικό συστατικό της μεμβράνης των ζυμών και είναι πρόδρομες ενώσεις αρωματικών ουσιών (SumbbyK.Metal, 2010, TotterP.J, 2001). Ακόμα τα λιπαρά οξέα είναι σημαντικός παράγοντας θρέψης σε αναερόβιες συνθήκες (CalderbankJetal, 1985), μερικά από τα λιπαρά οξέα που συναντώνται στο κρασί είναι το λινολεϊκό οξύ και το ολεϊκό οξύ (PeiTongLiuetal, 2019)

### *Αλκοόλες*

Η αιθυλική αλκοόλη ή αιθανόλη είναι το σημαντικότερο συστατικό του κρασιού και αποτελεί το 10-16% του όγκου του, μετά το νερό δηλαδή έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο κρασί. Είναι το κύριο συστατικό του μεταβολισμού των σακχάρων από τους ζυμομύκητες, εφόσον τα αρχικά σάκχαρα του γλεύκους το επιτρέπουν η αλκοόλη μπορεί να φτάσει και στο 16-18% αλλά σπάνια, ο περιορισμός αυτός οφείλεται στην αδυναμία των ζυμομυκήτων να παραμείνουν ενεργοί και να συνεχίσουν την αλκοολική ζύμωση σε μεγαλύτερες περιεκτικότητες αλκοόλης, μόνο ορισμένα στελέχη ζυμών μπορούν να το καταφέρουν αυτό (πχ. *Sacharomyces bayanus*) (Σουφλερός, 2015).

Η μεθυλική αλκοόλη ή μεθανόλη περιέχεται σε όλους του οίνους σε χαμηλές ποσότητες και προέρχεται από την υδρόλυση των πηκτινών του σταφυλιού κατά το σπάσιμο των σταφυλιών, στην αντίδραση σημαντικό ρόλο παίζει το ένζυμο πηκτινο-μέθυλο-εστεράση. Η σημασία της μεθανόλης έγκειται στο ότι είναι τοξική και σε συγκεκριμένες ποσότητες μπορεί να προκαλέσει από τύφλωση μέχρι και θάνατο (100ml).

### Ανώτερες αλκοόλες

Οι περισσότερες ανώτερες αλκοόλες είναι δευτερογενή προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης, ο σχηματισμός τους εξαρτάται από τη σύσταση του γλεύκου (pH), τις συνθήκες οινοποίησης (θερμοκρασία, αερισμός) και το είδος των ζυμών που πραγματοποιούν την αλκοολική ζύμωση, είναι λιγότερο πτητικές από την αιθανόλη και στο μόριο τους περιέχουν περισσότερα από δυο άτομα άνθρακα.

Οι ανώτερες αλκοόλες έχουν συμμετοχή στο αρωματικό προφίλ του κρασιού με θετικό ή και αρνητικό τρόπο. Μερικά παραδείγματα είναι, εξανόλη που προέρχεται από τα σταφύλια και έχει άρωμα φρουτώδες και φαινύλ-αιθύλ-αλκοόλη που είναι το χαρακτηριστικό άρωμα του τριαντάφυλλου κ.α. (RedWineCompositionucdavis.edu, 2021, ZoekleinBetal, 1995, CordenteA.Getal, 2021).

### Πολυαλκοόλες, διόλες

Γλυκερόλη, η πιο σημαντική πολυαλκοόλη του κρασιού. Στα ξηρά κρασιά είναι η ουσία με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μετά το νερό και τη αιθανόλη(16), έχει ελαφρώς γλυκιά γεύση και μπορεί να γίνει αντιληπτή σε ξηρό κρασί όταν η συγκέντρωση της ξεπερνά τα 5g/L και συμβάλλει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά δίνοντας σώμα. Σταφύλια που έχουν προσβληθεί από *Botrytis cinerea* παράγουν κρασί με περισσότερη γλυκερόλη και κατά τη ζύμωση η παραγωγή της εξαρτάται από το γένος ζυμομύκητα, θερμοκρασία, διοξείδιο του θείου.

Ακόμη σημαντική διόλη στο κρασί είναι η 2,3 βουτανοδιόλη, σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και η οξείδωση της δίνει το διακετύλιο που είναι αρωματικό στοιχείο του οίνου. Τεχνολογικά έχει ενδιαφέρον λόγω της γλυκόπικρης γεύσης της και στο γεγονός ότι δεν προσβάλλεται από βακτήρια.

## *Αρωματικές ενώσεις*

### **Εστέρες**

Οι εστέρες στο κρασί προέρχονται κυρίως από τον μεταβολισμό της αλκοολικής ζύμωσης αλλά κάποιοι από αυτούς υπάρχουν και στις ράγες σε μικρότερες συγκεντρώσεις αλλά και πάλι ικανές να επηρεάσουν το αρωματικό προφίλ, αρώματα ανθικά όπως τριαντάφυλλου ή φρουτώδη σαν του ανανά και μπανάνας οφείλονται στις συγκεκριμένες ενώσεις (Perestreloetal. 2005, Swiegersetal. 2005).

Εστέρες προκύπτουν από αντίδραση οξέων με αλκοόλες, έχουν φρουτώδη οσμή και είναι σημαντικοί για τα αρώματα των φρέσκων οίνων. Στο κρασί χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, σε αυτούς οι οποίοι δημιουργούνται από την ενζυμική οδό (ουδέτεροι, πτητικοί εστέρες) και σε αυτούς που δημιουργούνται μέσα από μια αργή διαδικασία χημικής αντίδρασης εστεροποίησης (όξινοι, μη πτητικοί εστέρες). Ακόμη οι εστέρες προέρχονται από το σταφύλι σε χαμηλό ποσοστό(ουδέτεροι), από την αλκοολική ζύμωση και από την διαδικασία της ωρίμανσης(όξινοι).

Οι πτητικοί εστέρες δίνουν φρουτώδες άρωμα στο κρασί και η συγκέντρωσή τους είναι αυξημένη στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης για να μειωθούν μετά μέσω της υδρόλυσης.

Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι εστέρας του οξικού οξέος με την αιθυλική αλκοόλη και συντίθεται και κατά την αλκοολική ζύμωση (ζύμες, οξικά βακτήρια) και κατά την ωρίμανση αλλά σε πολύ χαμηλότερο βαθμό. Η παρουσία του εξαρτάται από είδος των ζυμών, την παρουσία οξικών βακτηρίων, συνθήκες ζύμωσης(θερμοκρασία, pH), αποτελεί ελάττωμα για το κρασί αφού συμβάλλει με μία χαρακτηριστική υπόξινη γεύση και γίνεται αντιληπτός πολύ ευκολότερα από το οξικό οξύ (GutierrezEscobar, etal, 2021).



### **Τερπένια**

Τα τερπένια είναι μια μεγάλη ομάδα αρωματικών ενώσεων που έχουν μεγάλη διάδοση, χαρακτηρίζουν πρωτογενή αρώματα σε συγκεκριμένες ποικιλίες και είναι από τα κύρια στοιχεία που επιδρούν στο άρωμα του κρασιού.

Στον οίνο έχουν βρεθεί πάνω από πενήντα κύριες μονοτερπενικές ενώσεις, δηλαδή τερπένια με δέκα άτομα άνθρακα, οι σημαντικότερες από αυτές τις ενώσεις λόγω των αρωμάτων τους είναι μονοτερπενικές αλκοόλες (νερόλη, λιναλοόλη, γερανιόλη, σιτρονερόλη) ενώ θυμίζουν εσπεριδοειδή και λουλούδια, με τα όρια αντίληψης των παραπάνω ενώσεων να είναι πολύ χαμηλά (10-100 μg/L) (Crespan M, 2003), τα ελεύθερα πτητικά τερπένια συμβάλουν περισσότερο οργανοληπτικά ενώ τα δεσμευμένα πρέπει πρώτα να υδρολυθούν από οξέα ή ένζυμα (Schreier P et al, 2002).

Οι μονοτερπενικές αλκοόλες παίζουν αξιολογικό ρόλο στο άρωμα κρασιών από Μοσχάτες ποικιλίες, τόσο όταν το κρασί προέρχεται εξ ολοκλήρου από Μοσχάτο σταφύλι αλλά και σε μίξεις με άλλες ποικιλίες όπως η Torrontes της Αργεντινής (Lacombe T. et al, 2007). Άλλες ποικιλίες στις οποίες τα μονοτερπένια έχουν αρκετά σημαντική επίδραση είναι η Gewurtztraminer, Albarino, Axerois, Riesling, Syrah, Cabernet Sauvignon (Luan F. et al, 2006).

Η βιοσύνθεση των τερπενοειδών συμβαίνει κατά την περίοδο της ωρίμανσης και εντοπίζονται στους φλοιούς των ραγών. Όσον αφορά στη συσσώρευση κατά το τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης, υπάρχουν δυο απόψεις, η μία μιλά για συνεχή συσσώρευση και η μία για μείωση του ρυθμού μετά το γυάλισμα (Wilson B. et al, 1984). Τέλος κατά την αλκοολική ζύμωση συμβαίνουν μετατροπές στη σύνθεση των τερπενικών ενώσεων μέσω των μικροοργανισμών και διαφόρων χημικών αντιδράσεων ανάλογα με τους ζυμομύκητες που δραστηριοποιούνται και τη σύσταση του γλεύκους (Garcia M. et al, 2003)

### **Πυραζίνες**

Ανάλογα με τον τρόπο σχηματισμού οι πυραζίνες μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες, αυτές που σχηματίζονται μέσω θερμικής επεξεργασίας, σε αυτές που σχηματίζονται από μικροοργανισμούς και σε αυτές που απαντούν στη φύση και τα φυτά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι μεθοξυπυραζίνες οι οποίες έχουν

συνδεθεί με το άρωμα ποικιλιών όπως CabernetSauvignon, CabernetFranc, SauvignonBlanc, Merlot κ.α., είναι αζωτούχες ετεροκυκλικές ενώσεις που ανήκουν στις πυραζίνες, οι αλκυλιωμένες μορφές τους είναι πολύ πτητικές και έχουν πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης Τα αρώματα των ενώσεων αυτών θυμίζουν λαχανικά, πράσινη πιπεριά, μπιζέλι αλλά και γήινα αρώματα όπως πατάτα και καρότο (MurrayKEetal., 1975).

Οι μεθοξυπυραζίνες εμφανίζονται λίγο μετά την άνθηση και η συσσώρευση τους συνεχίζεται μέχρι και λίγες ευδομάδες πριν το γυάλισμα ενώ από εκεί και έπειτα η συγκέντρωσή τους μειώνεται, στα ώριμα σταφύλια οι πυραζίνες είναι παρούσες στους φλοιούς και τα γίγαρτα. Η ποσότητα πυραζινών στις ράγες εξαρτάται εκτός από τη ποικιλία από την ποσότητα της παραγωγής, την επάρκεια σε νερό και σε άζωτο, επίσης στα σταφύλια που ωριμάζουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες παρατηρείται χαμηλότερη ποσότητα από μεθοξυπυραζίνες (AllenMSetal., 1993).

### **Θειόλες**

Οι θειόλες είναι ενώσεις θείου με τη χαρακτηριστική ομάδα SH σε σύνδεση με ένα άτομο άνθρακα, αρκετές πτητικές θειόλες έχουν ανιχνευθεί σε κρασί όπως στις ποικιλίες Gewurtztraminer, Riesling, Semillon, Merlot, όπως και στη ποικιλία SauvignonBlanc της οποίας τα χαρακτηριστικά αρώματα του γκρέιπφρουτ και passionfruit. Άλλα αρώματα που οφείλονται σε αρωματικές θειόλες είναι του βασιλικού, φύλλα ντομάτας, φραγκοστάφυλο, παπάγια και λίτσι(TominagaTetal., 1998).

### ***Σάκχαρα***

Ο σταφυλοχυμός από τα ώριμα σταφύλια είναι πλούσιος σε σάκχαρα, ανάλογα τη ποικιλία και το χρόνο του τρύγου η ποσότητα μπορεί να διαφέρει (Amerineetal, 1980).

### **Ζυμώσιμα σάκχαρα**

Τα ζυμώσιμα σάκχαρα είναι οι εξόζες, οι κυριότερες που απαντούν στο γλεύκος είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη και συνολικά μπορεί να φτάσουν τα 150-300g/L στο γλεύκος. Η σακχαρόζη είναι ο πιο σπουδαίος δισακχαρίτης και συναντάται σε ποσότητες 2-5 g/L, στο γλεύκος υδρολύεται σε γλυκόζη και φρουκτόζη και έπειτα μεταβολίζεται από τους ζυμομύκητες. Η γλυκόζη προτιμάται από του ζυμομύκητες και ζυμώνεται πρώτη και σε εντονότερο ρυθμό σε σχέση με τη φρουκτόζη. Στη ποσότητα φρουκτόζης πολλές φορές οφείλονται οι κολλημένες ζυμώσεις (GafnerandSchutz, 1996, Guillaumeetal, 2007).

### **Μη ζυμώσιμα σάκχαρα**

Τα μη ζυμώσιμα σάκχαρα του γλεύκους και του κρασιού αποτελούνται από κυρίως από πεντόζες και υπάρχουν σε μικρές ποσότητες μέχρι 2g.L. Γενικά οι ερυθροί οίνοι είναι πλουσιότεροι σε πεντόζες σε σχέση με τους λευκούς, αυτό συμβαίνει επειδή οι πεντόζες υπάρχουν σε μεγαλύτερη αναλογία σε βόστρυχες και τους φλοιούς. Μερικές πεντόζες είναι, η αραβινόζη, ξυλόζη (0,3-2 g/L), ριβόζη και ραμνόζη.

### **Φαινολικές ενώσεις**

#### **Φαινολικά οξέα**

Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε δυο κατηγορίες τα βεζοϊκά και τα υδροξυκινναμικά, στο κρασί περιέχονται οξέα και από τις δυο κατηγορίες και εντοπίζονται σε συγκεντρώσεις (60-566mg/L), είναι οι πιο σημαντικές πολυφαινόλες του κρασιού (9-22). Η σπουδαιότητα των φαινολοξέων οφείλεται στο γεγονός ότι κάποια έχουν την ιδιότητα να οξειδώνονται σε κινόνες, οι κινόνες έχουν φαιά απόχρωση και θεωρείται ότι παίζουν ρόλο στην οξειδωτική μετατροπή του χρώματος των λευκών οίνων αλλά και στο άρωμα (6-24). Ακόμη ενδέχεται να παίζουν κάποιο ρόλο στη μικροβιολογική κατάσταση του οίνου αφού έχουν αντισηπτικές και αντιβιοτικές ιδιότητες (Σουφλερός, 2015).

Μερικά τα φαινολικά οξέα που βρίσκονται και σε λευκούς και σε ερυθρούς οίνους είναι βανιλικό, συρινγικό, καφεικό, κουμαρικό κ.α (Rentzschetal, 2009, Coumetetal, 2006).

### Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι οι κυριότερες κυανές και ερυθρές χρωστικές του σταφυλιού, βρίσκονται στο φλοιό των ραγών εκτός από κάποιες εξαιρέσεις που μπορεί να τις βρούμε και στη σάρκα, είναι υδατοδιαλυτές και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ένταση του χρώματος, την απόχρωση και τη σταθεροποίηση. Η μαλβιδίνη είναι αυτή που υπάρχει σε μεγαλύτερη ποσότητα και για αυτό λέγεται και οινιδίνη, άλλες ανθοκυάνες που συναντάμε στο κρασί είναι κυανιδίνη, δελφινιδίνη, πετουνιδίνη και πεονιδίνη. Η σύνθεση και το είδος των ανθοκυανών διαφέρουν ανάλογα την ποικιλία, στο Αγιωργίτικο όπως και στα Ξινόμαυρο, Μανδηλαριά, Μαυροτράγανο η κυρίαρχη ανθοκυάνη είναι η μαλβιδίνη (mlv-3-o-glu) ενώ στις ποικιλίες Nebbiolo, Alvarinho, MoscatoRosa και Κοτσιφάλι είναι η πεονιδίνη (Kalithrakaetal. 2005, Monagasetal. 2003), ενώ η σταθερότητά τους εξαρτάται από το pH και τις συνθήκες αποθήκευσης (BerenteBetal, 2000, Castillo – MunozNetal, 2007).

Φυσικοχημικά οι ανθοκυάνες έχουν ενδιαφέρον και ειδικά η μαλβιδίνη, υπάρχει μια εξάρτησημεταξύ μαλβιδίνης καιpH με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται το χρώμα του κρασιού ανάλογα με την οξύτητα, σε ισχυρά όξινο περιβάλλον το χρώμα της είναι ερυθρό ενώ σε λιγότερο όξινο περιβάλλον γίνεται άχρωμη, αν το pH ανεβεί και άλλο εμφανίζεται κυανός χρωματισμός (Σουφλερός, 2015). Επίσης οι ανθοκυάνες μπορούν να αποχρωματιστούν με αναγωγή και λαμβάνουν μέρος σε θολώματα σιδήρου που δημιουργούνται από σύμπλοκα του σιδήρου με ανθοκυάνες και ταννίνες.

Στον αμπελώνα η βιοσύνθεση ανθοκυανών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η ηλιοφάνεια, η θερμοκρασία αλλά και το πότισμα το οποίο έχει μελετηθεί περισσότερο. Αρκετές έρευνες δείχνουν ότι μια ελεγχόμενη έλλειψη νερού κατά την ωρίμανση επηρεάζει την συσσώρευση των ανθοκυανών (Cassasa et al. 2013, Zarouk et al. 2012), παρόλα αυτά έχουν σημειωθεί και τα αντίθετα αποτελέσματα σε εντονότερη και πιο παρατεταμένη έλλειψη νερού στις χώρες της Μεσογείου.

### Ταννίνες

Μια ακόμη ομάδα ενώσεων που περιέχονται στις φαινολικές ενώσεις είναι οι ταννίνες, προκύπτουν από την διαδικασία πολυμερισμού των απλών φαινολών. Οι ταννίνες έχουν την ιδιότητα να συνενώνονται με πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή όπως οι πολυσακχαρίτες σχηματίζοντας αδιάλυτες ενώσεις, ακόμη παίρνουν μέρος στο κολλάρισμα των οίνων δημιουργώντας σύμπλοκα με πρωτεϊνούχες κόλλες τα οποία λόγω βάρους καθιζάνουν παρασύροντας άλλα αιωρήματα. Οι ταννίνες των σταφυλιών βρίσκονται κυρίως στα γίγαρτα, τους βόστρυχες και τους φλοιούς και παραλαμβάνονται κατά την εκχύλιση και τη συμπίεση.

Τα ποσοστά των ταννινών αυξάνονται κατά την παλαίωση και εμφανίζουν εντονότερη στυπτικότητα, αυτό συμβαίνει λόγω πολυμερισμού και αντιδράσεων με άλλα μόρια. Το κρασί όπως και τα σταφύλια περιέχουν μια ποσότητα υδρολυόμενων ταννινών σημαντικά μεγαλύτερη στις ερυθρές ποικιλίες (Cordente A. Getal, 2021, Wen Metal, 2014).

Οι ταννίνες προκαλούν μια αίσθηση στυπτικότητας στη γλώσσα και το στόμα, η αίσθηση αυτή περιγράφεται ως μια τραχύτητα ή στέγνωμα και οφείλεται στην αλληλεπίδραση ουσιών όπως οι πολυμερισμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες με τις πρωτεΐνες του στόματος και της γλώσσας (McRae et al, 2010). Η παραπάνω αίσθηση έχει σημαντική σημασία στον οργανοληπτικό έλεγχο του κρασιού και η ένταση της εξαρτάται από τις ολικές ταννίνες του κρασιού, τον βαθμό πολυμερισμού τους αλλά και το είδος των ταννινών που έχουν εκχυλιστεί, άρα και από τη ποικιλία και την μεταχείρισή της στο οινοποιείο, (πχ. η ουσία επιγαλλοκατεχίνη ή EGC που προέρχεται από τους φλοιούς των σταφυλιών περιορίζει την αίσθηση της στυπτικότητας,) (Chira et al, 2012). Γενικά οι ταννίνες των γιγάρτων εμφανίζουν διαφορές σε σχέση με αυτές των φλοιών, αυτές που προέρχονται από τα γίγαρτα έχουν μικρότερο βαθμό πολυμερισμού (Souquet et al, 1996, Vidal et al, 2003) ενώ εκχυλίζονται και δυσκολότερα, αντίθετα οι ταννίνες του φλοιού είναι περισσότερο πολυμερισμένες και εκχυλίζονται ευκολότερα (Prieur et al, 2012) (Adams and Scholtz, 2007).

Στην ποικιλία Αγιωργίτικο ο χαμηλός βαθμός πολυμερισμού σε συνδυασμό με την αφθονία EGC οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ποικιλία είναι χαμηλής στυπτικότητας (Petropoulos, Paraskevopoulos, Kotseridis, Kallithraka, 2017).

### *Αζωτούχες ενώσεις*

Το άζωτο περιέχεται στο κρασί με μορφή διάφορων ενώσεων, η περιεκτικότητα των οποίων είναι συνολικά 0,5-4g/L. Όλες οι κατηγορίες αζωτούχων ενώσεων προέρχονται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού, για αυτό το λόγο η περιεκτικότητά τους στους ερυθρούς οίνους είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τους λευκούς και οι οίνοι πιέσεων σε σχέση με αυτούς του προρρώγου (σταφυλοχυμός που προκύπτει απλά από έκθλιψη των ραγών και όχι πιέσεις). Κατά την αλκοολική ζύμωση το ολικό άζωτο όπως και το αφομοιώσιμο μειώνονται αφού αποτελεί θρεπτικό συστατικών των ζυμών και των βακτηρίων.

### **Αμινοξέα**

Στο γλεύκος υπάρχουν πολυάριθμα αμινοξέα και η ποσότητά τους εξαρτάται από το χρόνο για τον οποίο έγινε εκχύλιση στα σταφύλια, την ποικιλία, τη θερμοκρασία ζύμωσης κτλ. Τα αμινοξέα παρουσιάζουν ενδιαφέρον αφού αποτελούν σημαντική πηγή αζώτου για τους ζυμομύκητες και τα χρειάζονται για τον πολλαπλασιασμό τους (Σουφλερός, 2015), οι αζωτούχες ενώσεις προέρχονται από τα νιτρικά, την αμωνία και την ουρία που μετατρέπονται σε αμινοξέα για τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών, το κύριο αμινοξύ που εντοπίζεται είναι η προλίνη, υπάρχουν επίσης αργινίνη, αλανίνη γλουταμίνη και γλουταμικό οξύ (RedWineComposition.ucdavi.edu, 2021, PekkaL, 1996).

### **Πρωτεΐνες**

Το πρωτεϊνικό άζωτο είναι ένα σημαντικό μέρος (3-10%) του ολικού αζώτου και σε αυτό οφείλεται ο σχηματισμός ιζημάτων και θολωμάτων που παρατηρούνται σε εμφιαλωμένα κρασιά. Τα θολώματα αυτά οφείλονται στο κολλοειδή χαρακτήρα των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να δημιουργούν συσσωματώματα και να καθιζάνουν σε συγκεκριμένες συνθήκες, οι πρωτεΐνες του κρασιού είναι υδατοδιαλυτές και εξαρτώνται από το pH, τον αλκοολικό βαθμό και τη θερμοκρασία (ZoeckleinBetal, 1995).

## 1.2.2. Ερυθρή οινοποίηση

### *Επεξεργασία σταφυλιών και σταφυλοπολτού*

Οι χειρισμοί των σταφυλιών, του γλεύκους και του κρασιού διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του κρασιού που θέλουμε να παράγουμε. Στη περίπτωση του κόκκινου κρασιού μετά τα στάδια της απομάκρυνσης των βοστρύχων (απορραγισμός ή αποβοστρύγωση) και της έκθλιψης των ραγών πρέπει τα στέμφυλα να παραμείνουν σε επαφή με τον σταφυλοχυμό ένα χρονικό διάστημα το οποίο επιλέγουμε ανάλογα με την εκχύλιση που θέλουμε να κάνουμε έτσι ώστε να αποκτήσει το γλεύκος το ερυθρό χρώμα που επιθυμούμε. Η εκχύλιση με αυτό τον τρόπο εφαρμόζεται μόνο στην ερυθρή οινοποίηση και είναι μια πολύ βασική διαφορά ανάμεσα στην ερυθρή και τη λευκή οινοποίηση. Παρακάτω αναλύονται τα κυριότερα βήματα της ερυθρής οινοποίησης με χρονολογική σειρά.

### **Απορράγιση ή αποβοστρύγωση**

Η απορράγιση συνίσταται στην αφαίρεση και απομάκρυνση των βοστρύχων με αποτέλεσμα να διατηρήσουμε για οινοποίηση μόνο τις ράγες και το χυμό, που προκύπτει από τη μηχανική επεξεργασία του σταφυλιού (Σουφλερός, 2015). Σήμερα η διαδικασία αυτή γίνεται αποκλειστικά με μηχανήματα.

Η εφαρμογή της απορράγισης συνεπάγεται κάποια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, στα θετικά συμπεριλαμβάνονται η μείωση του όγκου των στεμφύλων που θα επεξεργαστούμε(πιεστήρια, οινοποιητές), η βελτίωση της γεύσης λόγω των πολλών ταννίνων που απομακρύνονται μέσω των βοστρύχων, καλύτερος χρωματισμός του γλεύκους και τέλος κερδίζουμε ένα ποσοστό αλκοόλης που θα

απορροφούσαν οι βόστρυχες (Σουφλερός, 2015). Τα αρνητικά είναι ότι χάνουμε κάποιες αζωτούχες ενώσεις που υπάρχουν στους βόστρυχες, δυσκολεύει η πίεση και η εκροή χυμού λόγω της μη δημιουργίας κάποιων καναλιών που θα δημιουργούσαν οι βόστρυχες στη σταφυλομάζα ενώ αυξάνεται και η θερμοκρασία της σταφυλομάζας αφού οι βόστρυχες θα απορροφούσαν ένα μέρος της.

### **Έκθλιψη των ραγών**

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει το σπάσιμο των ραγών έτσι ώστε να απελευθερωθεί ένα μέρος του σταφυλοχυμού, ιδανικά η θραύση πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο που να αποφεύγεται το λιώσιμο του φλοιού και ο κατακερματισμός των γιγάρτων, καθώς στα γίγαρτα περιέχεται μεγάλη ποσότητα ταννινών. Η έκθλιψη πραγματοποιείται με μηχανήματα τα οποία παρουσιάζονται σε διάφορους τύπους.

### **Χημική επεξεργασία σταφυλομάζας**

Το γλεύκος μπορεί να μην έχει την επιθυμητή σύσταση ως προς την οξύτητα ή τα σάκχαρα, σε αυτές τις περιπτώσεις επιτρέπονται διάφορες προσθήκες.

Μετά την απορράγιση και την έκθλιψη, εκτός από την εφαρμογή των παραπάνω εφόσον είναι αναγκαία η διόρθωση στη σταφυλομάζα, γίνεται και η θείωση της σταφυλομάζας μαζί με τη μεταφορά του γλεύκους στη δεξαμενή ζύμωσης όπου θα γίνει και η εκχύλιση. Η προσθήκη του θειώδους ανυδρίτη επιδρά στο γλεύκος με πολλούς τρόπους, όπως:

- Προστατεύει τη σταφυλομάζα, το γλεύκος ή τον οίνο από οξειδώσεις δεσμεύοντας οξυγόνο.
- Καταστρέφει ή αδρανοποιεί τα οξειδωτικά ένζυμα, τα οποία δρουν ως καταλύτες στις οξειδωτικές αντιδράσεις.
- Παρεμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών, δρα απέναντι στα βακτήρια και τους μύκητες.
- Ανάλογα τη δόση στην οποία χρησιμοποιείται μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη ενός επιθυμητού ζυμομύκητα και να καταστείλει κάποιον ανεπιθύμητο.



- Επιτρέπει τη μακρόχρονη ωρίμανση του οίνου σε δρύινα βαρέλια.
- Δεσμεύει την ακεταλδεύδη.

Ο θειώδης ανυδρίτης συναντάται στο γλεύκος κυρίως σε δύο μορφές τον ελεύθερο και τον δεσμευμένο, βρίσκεται ελεύθερος ως τη μοριακή του μορφή SO<sub>2</sub> που είναι και η μορφή η οποία δίνει και τις προστατευτικές ιδιότητες. Παρεμφερή χρήση με το θειώδες έχει και το ασκορβικό οξύ αλλά δρα μόνο ως αντιοξειδωτικό και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το θείο.

Στο κόκκινο αλλά και το λευκό κρασί γίνεται χρήση πηκτηνολυτικών ενζύμων κατά την παραμονή των στεμφύλων με το γλεύκος. Σκοπός της χρήσης είναι η διάσπαση των κυττάρων των πηκτινών με αποτέλεσμα τη γρηγορότερη απελευθέρωση των χρωστικών και αρωματικών προδρόμων, αυτά τα ένζυμα είναι παράγωγα μυκήτων όπως *Aspergillus*, *Trichoderma* κ.α.

#### **Διαχωρισμός οίνου και στεμφύλων**

Η ενέργεια αυτή περιλαμβάνει δυο φάσεις, η πρώτη είναι κατά την παραλαβή της υγρής φάσης (γλεύκος-οίνος) με ελεύθερη ροή του γλεύκους για μεταφορά στη δεξαμενή ζύμωσης όπου και θα παραμείνει για να ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση. Με τη φάση αυτή που καλείται και πρώτη μετάγγιση ή τράβηγμα του οίνου περιλαμβάνεται το 85% περίπου όλου του όγκου που υπάρχει σε υγρή μορφή.

Μετά την απομάκρυνση του οίνου εκροής, το υπόλοιπο που κατακρατείται από τα στέμφυλα παραλαμβάνεται με την πίεση τους, αυτός ο οίνος καλείται οίνος πίεσης και είναι ποιοτικά κατώτερος. Η παραλαβή του οίνου πίεσης γίνεται με πιεστήρια διαφόρων ειδών και υπάρχουν διαφορές στη ποιότητα του προϊόντος που προκύπτει από αυτά. Από άποψη σύστασης οι οίνος πίεσης είναι πλουσιότερος σε όλα τα συστατικά εκτός από την αλκοόλη, ανάλογα με την ποιότητα των στεμφύλων και την ποικιλία ο οίνος της πρώτης πίεσης μπορεί να είναι πλούσιος σε αρώματα και ευγενή ταννίνη(οίνος πολύ χρήσιμος σε αναμίξεις), αντίθετα με τον οίνο δεύτερης και τρίτης πίεσης που συνήθως δεν αξιοποιείται για κρασί ποιότητας (Σουφλερός, 2015).

### *Αλκοολική ζύμωση*

Η ζύμωση του σταφυλοχυμούς σε κρασί γίνεται από ζυμομύκητες, οι πληθυσμοί και η ποικιλία των μικροοργανισμών που συμμετέχουν είναι κάτι πολύπλοκο και γενικά συμμετέχει ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών και μπορεί να προέρχονται από το αμπέλι ή να είναι πρόσθετο εμβόλιο με σκοπό την κατευθυνόμενη ζύμωση(Fleet, 2003).

Η αλκοολική ζύμωση είναι ένα μια διαδικασία η οποία για πολλά χρόνια χώριζε τους επιστήμονες σε δύο στρατόπεδα, η πρώτη θεωρία περιγράφει τη διαδικασία ως χημικό φαινόμενο(Liebig, 1845), ενώ η άλλη άποψη υποστήριζε ότι η ζύμωση σχετίζεται με τη ζωή και την ανάπτυξη των ζυμών(Pasteur, 1850), αργότερα φάνηκε ότι εν μέρη ήταν σωστές και οι δυο απόψεις. Μπορούμε να πούμε πως από τη μία πλευρά υπάρχει ένα βιολογικό φαινόμενο (πολλαπλασιασμός και ανάπτυξη ζυμών) και από την άλλη υπάρχει και ένα χημικό (μετατροπή σακχάρων σε αλκοόλη), με τα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης να μην είναι μόνο αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα(CO<sub>2</sub>)όπως είχε αρχικά παρατηρηθεί (Pasteur, Gay-Lussac) αλλά υπάρχουν και πολλά δευτερογενή προϊόντα όπως ηλεκτρικό οξύ, οξικό οξύ, γλυκερόλη, ακεταλδεύδη, ανώτερες αλκοόλες, εστέρες κτλ.

Η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα την άνοδο των στεμφύλων στην επιφάνεια και το σχηματισμό του λεγόμενου καπέλου, δεδομένου ότι στόχος είναι η εκχύλιση από τον φλοιό της ράγας, αναγκαίο είναι το σπάσιμο του καπέλου συνήθως με ανακύκλωση γλεύκους με χρήση αντλίας. Η αλκοολική ζύμωση είναι εξώθερμη διαδικασίαάρα είναι αναπόφευκτη η άνοδος της θερμοκρασίας, η άνοδος όμως πάνω από ένα όριο ίσως διακόψει την ζύμωση ή να δημιουργήσει δυσμενή αποτελέσματα στη ποιότητα του οίνου, για τον έλεγχο της θερμοκρασίας υπάρχει ειδικός εξοπλισμός (εναλλάκτες, ψύκτες) αλλά υπάρχουν και άλλοι τρόποι για τη μείωση της όπως ξηρός πάγος, πάγος, αερισμός.

Κατά την οινοποίηση η αλκοολική ζύμωση γίνεται μέσα σε δεξαμενές ή οινοποιητές που μπορεί να είναι από ξύλο, τσιμέντο ή ανοξείδωτες και η πορεία της παρατηρείται με μετρήσεις στη πυκνότητα των σακχάρων και στη θερμοκρασία, η πυκνότητα των σακχάρων παρακολουθείται με αραιόμετρο, πυκνόμετρο ή διαθλασίμετρο έτσι ώστε να υπάρχει ολοκληρωμένη εικόνα της αλκοολικής ζύμωσης.

### **Μηλογαλακτική ζύμωση**

Όταν η αλκοολική ζύμωση ολοκληρωθεί η και ταυτόχρονα με αυτή σε κάποιες περιπτώσεις γίνεται η μηλογαλακτική ζύμωση, σχεδόν σε όλα τα κόκκινα συμβαίνει αυτό, σε κάποια λευκά αλλά και σε αφρώδη. Κατά τη διαδικασία αυτή οξυγαλακτικά βακτήρια μετατρέπουν το μηλικό οξύ σε γαλακτικό, το αποτέλεσμα είναι ένα πιο μαλακό κρασί λόγω της μείωσης του μηλικού οξέος που είναι πιο επιθετικό σε σχέση με το μηλικό. Εκτός από το οργανοληπτικό, υπάρχει και το ζήτημα της σταθερότητας, το κρασί που προκύπτει μετά από τη ζύμωση αυτή είναι σταθερότερο σε μικροβιακές αλλοιώσεις (Rieberau Gayon et al, 2006, Lonvaud et al, 1999).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ολοκλήρωση της διαδικασίας είναι, η ποσότητα της αιθανόλης, το pH, η θερμοκρασία, το θειώδες και τα γένη βακτηρίων που χρησιμοποιούνται για τη μηλογαλακτική ζύμωση είναι τα *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Pediococcus* (Lerm et al, 2010).

## **1.3. Μικροβιολογία οίνου**

### **1.3.1. Ζυμομύκητες**

Η μελέτη των ζυμομυκήτων επιβάλλεται λόγω της σπουδαιότητας που έχουν όσον αφορά την οινοποίηση, εκπροσωπούν την πιο σημαντική ομάδα μικροοργανισμών αφού χωρίς τους μικροοργανισμούς του γένους *Saccharomyces* δεν μπορεί να παραχθεί κρασί υψηλής ποιότητας. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε κάποιες ζυμώσεις έχουν παρατηρηθεί μέχρι και πάνω από εκατό στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* (Pramateftaki et al, 2000, Torija et al, 2003). Στο γλεύκος υπάρχουν διάφορα γένη και είδη μικροοργανισμών και ανάλογα με τις συνθήκες μπορεί να επηρεάσουν τη ποιότητα του οίνου θετικά ή αρνητικά (Fugelsang et al., 1993), πέρα από την αλκοολική ζύμωση σε μικροοργανισμούς οφείλονται και μια σειρά από προβλήματα που έχουν να κάνουν με ανεπιθύμητες ζυμώσεις, αλλοιώσεις, διατήρηση οίνων και θολώματα μετά την εμφιάλωση.

Οι ζυμομύκητες είναι μικροσκοπικοί μονοκύτταροι οργανισμοί και μπορεί να προέρχονται από τον αμπελώνα, τις ράγες, τα μηχανήματα το οινοποιείο ή να

προστεθούν από τον παραγωγό στο γλεύκος σαν καλλιέργεια όπως και γίνεται συνήθως στις κατευθυνόμενες ζυμώσεις. Αντίθετα στη περίπτωση της αυθόρμητης ζύμωσης η ζύμωση γίνεται με τη μικροχλωρίδα που έχει εγκατασταθεί στις ράγες του σταφυλιού κατά την ωρίμανση του, σε αυτή τη διαδικασία συνεισφέρουν τα έντομα και ιδιαίτερα η δροσόφιλα. Οι ζυμομύκητες διαχειμάζουν στο έδαφος όπου μεταφέρονται μετά το πέσιμο των ραγών, από εκεί κατά τη βλαστική περίοδο επαναφέρονται στους βότρους με τη βοήθεια των εντόμων (Σουφλερός, 2015).

Η επίδραση των ζυμομυκήτων στο άρωμα και τη γεύση του κρασιού καθορίζεται από τις πτητικές ενώσεις που θα παραχθούν από τον μεταβολισμό των συστατικών του κρασιού κατά την αλκοολική ζύμωση και η ποικιλία των συγκεκριμένων ενώσεων εξαρτάται από τα γένη των ζυμομυκήτων που συνέβαλαν για την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης (Berry and Watson, 1987, Dumont and Dulau, 1997, Lambrechts and Pretorius 2000). Είναι ευρέως αποδεκτό ότι ανεξάρτητα το αν η αλκοολική ζύμωση είναι κατευθυνόμενη η αυθόρμητη ο παραγόμενος οίνος είναι προϊόν ζύμωσης από πολλά γένη και είδη ζυμομυκήτων (Fleet, 2003).

### *Non-Saccharomyces*

Οι non- *Saccharomyces* είναι ζυμομύκητες που συμμετέχουν περισσότερο στα αρχικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης και ειδικά σε αυθόρμητες ζυμώσεις, από τη πρώτη στιγμή της έκθλιψης των σταφυλιών αυτοί οι είναι οι ζυμομύκητες που πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα. Ο λόγος που δεν συμμετέχουν τόσο μετά το μέσον της αλκοολικής ζύμωσης (5-8% vol) είναι η μικρότερη αντοχή τους στην αλκοόλη σε σχέση με αυτούς του γένους *Saccharomyces* αλλά και η περιορισμένη αντοχή τους στην αυξημένη θερμοκρασία της ζύμωσης (Erten, 2002). Όσο αυξάνεται το ποσοστό αιθανόλης οι non-*Saccharomyces* ζυμομύκητες σιγά σιγά πεθαίνουν (Fleet and Heard, 1993, 1984). Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η συνεισφορά των non-*Saccharomyces* θα ήταν μεγαλύτερη αν η αλκοολική ζύμωση γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Heard and Fleet, 1988). Επίσης, το κρασί που ζυμώνει στις παραπάνω συνθήκες είναι πιο αρωματικό σε σχέση με αυτό που ζυμώθηκε από *Saccharomyces* (Egli et al, 1998). Οι non-*Saccharomyces* ζύμες που συναντώνται περισσότερο στις ζυμώσεις είναι *Hanseniaspora* (4-6% vol) και *Candida* (8% vol).

## *Saccharomyces*

Οι *Saccharomyces* ζύμες κυριαρχούν όταν αρχίσει και ανεβαίνει το ποσοστό της αιθανόλης στο γλεύκος και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως μειώνεται ο πληθυσμός των non-*Saccharomyces*. Αυτό μπορεί να συμβεί ακόμα και σε περιπτώσεις που γίνεται εμβολιασμός με καλλιέργεια πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Στο μεγαλύτερο μέρος η αλκοολική ζύμωση μετά από κάποιο σημείο ολοκληρώνεται με τον *Saccharomyces cerevisiae* (13-14%), ο οποίος είναι και ο ζυμομύκητας που χρησιμοποιείται περισσότερο στην οινοποίηση συνολικά λόγω του συνδυασμού αντοχής στην αλκοόλη και καλών οργανοληπτικών αποτελεσμάτων. Η κυριαρχία του συγκεκριμένου ζυμομύκητα έχει οδηγήσει στο να αναγνωρίζεται σαν η ζύμη του κρασιού και τα στελέχη του είναι αυτά που συναντώνται σε εμπορικά σκευάσματα ζυμομυκήτων για χρήση ως εμβόλια στην παραγωγή κρασιού (Fleet, 2003). Στοτέλοςσε γλεύκη πλούσια σε σάκχαρα κάνει την εμφάνιση του και το είδος *Saccharomyces bayanus* (16-18%) καθώς αυτό θεωρείται το ανθεκτικότερο στην αλκοόλη.

### **1.3.2. Βακτήρια**

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί και οινολογικά παρουσιάζουν ενδιαφέρον αφού σε ένα υπόστρωμα όπως το γλεύκος υπάρχουν εκτός από ζυμομύκητες, οξικά και οξυγαλακτικά βακτήρια ενώ αν δεν ληφθούν τα απαιτούμενα μέτρα τα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις και ανεπιθύμητες ζυμώσεις.

### *Οξικά βακτήρια*

Τα οξικά βακτήρια είναι υποχρεωτικά αερόβιοι οργανισμοί, αρνητικοί κατά (Gram-) και σχετίζονται με την μετατροπή του οίνου σε ξύδι. Η μετατροπή της αλκοόλης σε

οξικό οξύ απαιτεί αερόβιο περιβάλλον και συνεχή παροχή οξυγόνου, δηλαδή δεν ευνοείται σε συνθήκες αλκοολικής ζύμωσης. Τα οξικά βακτήρια σχετίζονται με αλλοιώσεις σε αποθηκευμένα κρασιά σε βαρέλια, αυτό μπορεί να συμβεί σε βαρέλια που δεν είναι καλά γεμισμένα, όταν διατηρούνται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 15 βαθμών (Rieberau – Gayonetal, 1983).

### *Οξυγαλακτικά βακτήρια*

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι υπεύθυνα για τη μηλογαλακτική ζύμωση που συνήθως ακολουθεί την αλκοολική που γίνεται από τους ζυμομύκητες, σας ομάδες μικροοργανισμών και οι δυο είναι παρούσες και στα σταφύλια και στο οινοποιείο αλλά οι ζύμες προσαρμόζονται γρηγορότερα και αναπτύσσονται στο περιβάλλον του του μούστου οπότε ξεκινά νωρίτερα η αλκοολική ζύμωση. Στον μούστο εντοπίζονται πολλά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconoctoc*, *Oenococcus* με κυρίαρχο είδος το *Oenococcusoeni*

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί θετικοί κατά (Gram+), διακρίνονται σε κόκκους και βακίλους ενώ έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν διάφορες μεταβολές στα συστατικά του οίνου, επιθυμητές και ανεπιθύμητες. Η σημαντικότερη συμβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης κατά την οποία το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό, η οποία πραγματοποιείται κυρίως από στελέχη του είδους *Oenococcusoeni*. Η μηλογαλακτική ζύμωση αν και συνηθίζεται στους ερυθρούς οίνους δεν είναι πάντα επιθυμητή και μπορούμε να την επιβάλουμε με εμβολιασμό ή να την αποτρέψουμε με θείωση.

Η μηλογαλακτική ζύμωση εκτός από τη μείωση της οξύτητας συμβάλλει και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού καθώς κατά αυτή τη δεύτερη ζύμωση μπορεί να αυξηθεί η συγκέντρωση ουσιών όπως για παράδειγμα της ακετοΐνης, του διακετυλίου, ανώτερων αλκοολών και εστέρων, και μπορεί να προσφέρει κάποια αρωματικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι επιθυμητά πέρα από τη μικροβιακή σταθερότητα που αποκτά το κρασί. Κατά την μηλογαλακτική ζύμωση ή κατά το διάστημα που μεσολαβεί από το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης μέχρι τη αρχή της δεύτερης ζύμωσης μπορεί να παραχθούν ανεπιθύμητες ουσίες, όπως και να

πραγματοποιηθούν ανεπιθύμητες ζυμώσεις από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Αυτές είναι παραγωγή βιογενών αμινών από το μεταβολισμό των αμινοξέων, η δημιουργία ακρολεΐνης μέσω της γλυκερόλης (ασθένεια της πίκρανσης), ο μεταβολισμός φρουκτόζης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (μαννιτική ζύμωση) και η αποσύνθεση του τρυγικού οξέος από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (εκτροπίαση) (Matthewsetal, 2004, Sumbly et al, 2010, Bartowsky and Boreman, 2011, Michlmayr et al, 2012, Capello et al, 2017, Takase et al, 2018). Εκτός από τα παραπάνω τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να μεταβολίσουν υπολειπόμενα σάκχαρα και κιτρικό οξύ προς παραγωγή ενέργειας και άνθρακα.

Ο μεταβολισμός και τα παράγωγα των οξυγαλακτικών βακτηρίων παίζει σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου, τα αποτελέσματα μπορεί να μην είναι τα επιθυμητά αν δεν ελέγχεται η μηλογαλακτική ζύμωση και η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

#### **1.4. Terroir – Μικροβιακό Terroir**

Η έννοια του terroir περιλαμβάνει το έδαφος, τοπογραφία, χαρακτηριστικά κλίματος και βιοποικιλότητα, οπότε βάσει των παραπάνω μπορεί να οριστεί σαν ένα οικοσύστημα μέσα στο οποίο αλληλοεπιδρά το αμπέλι με το έδαφος και τους μικροοργανισμοί μαζί με το κλίμα μιας συγκεκριμένης περιοχής (Seguin, 1988). Επειδή όμως στην παραγωγή κρασιού εκτός από το φυσιολογικό και το βιολογικό περιβάλλον παίζουν ρόλο και οι οινολογικές και αμπελουργικές τεχνικές που εφαρμόζονται ανάλογα την περιοχή και δίνουν ένα προϊόν με διακριτά και ξεχωριστά χαρακτηριστικά, στον όρο terroir πολλές φορές λαμβάνεται υπόψη και ο ανθρώπινος παράγοντας αφού μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη παραγωγή ενός κρασιού με ξεχωριστό στυλ που αντανάκλα την περιοχή το κλίμα το έδαφος αλλά και τις αμπέλο οινικές τεχνικές (VanLeeuwen, 2006).

#### **Μικροβιακό terroir**

Έρευνες δείχνουν πως οι μικροοργανισμοί του αμπελώνα επηρεάζουν τον χαρακτήρα του κρασιού, ο συνδυασμός αυτών σε κάθε αμπελώνα είναι μοναδικός και

επηρεάζουν το κρασί με διάφορους τρόπους δίνοντας ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στο κρασί και εκφράζοντας συγκεκριμένες περιοχές και αμπελοτόπια (AlexRussan, 2020).

Το πανεπιστήμιο του U.C. Davies διεξήγαγε έρευνα στις κοιλάδες Napa και Sonoma στις ποικιλίες Cabernet Sauvignon και Chardonnay σχετικά με το μικροβίωμα του σταφυλιού και του κρασιού, μετά τη ταυτοποίηση των μικροοργανισμών κατέληξαν ότι ανά περιοχή οι μεταβολίτες που σχετίζονται με το άρωμα του κρασιού είναι διαφορετικοί, οπότε έφτασαν στο συμπέρασμα πως ανάλογα τη μικροβιακή σύσταση του γλεύκους θα ακολουθηθούν διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια με αποτέλεσμα κρασιά με διαφορετικά χαρακτηριστικά (NikolasBokulich, 2016). Αντίθετα με τη συνήθη μέθοδο παραγωγής «φυσικού» κρασιού κατά την οποία η ζύμωση είναι αυθόρμητη, στο παραπάνω πείραμα οι ζυμώσεις ήταν κατευθυνόμενες αφού έγινε εμβολιασμός με εμπορική ζύμη και χρήση διοξειδίου του θείου πριν την έναρξη της ζύμωσης, παρόλα αυτά το αποτύπωμα των μικροοργανισμών ήταν εμφανές στη σύσταση του τελειωμένου οίνου. Το γεγονός ότι η χρήση εμπορικών σκευασμάτων δεν κατέστειλε την επίδραση των γηγενών μικροοργανισμών αποτελεί απόδειξη ότι ο εμβολιασμός δεν εξαφανίζει το terroir αν και οργανοληπτικά δεν ήταν τόσο εμφανή τα αποτελέσματα όσο χημικά (Nikolas Bokulich, 2016).

Οι μύκητες του αμπελώνα μπορεί να επηρεάσουν πολύ σημαντικά τα χαρακτηριστικά του κρασιού, μέσω της αναπλήρωσης συγκεκριμένων στοιχείων του εδάφους, μέσω της υγείας και της σωστής ανάπτυξης του καρπού αλλά και της αλκοολικής ζύμωσης κατά την οποία εκτός από μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη παράγεται και σημαντική ποσότητα δευτερογενών μεταβολιτών αλλά απελευθερώνονται αρωματικές ενώσεις και από πρόδρομες ουσίες όπως πτητικές ενώσεις που συμβάλουν στο άρωμα του οίνου. Εκτός από τους μύκητες στο μικροβίωμα του κρασιού υπάρχουν και σημαντικά βακτήρια τα οποία μπορεί να έχουν θετική ή και αρνητική επίδραση κατά την οινοποίηση.

Το κρασί ίσως είναι το προϊόν με την ισχυρότερη γεωγραφική υπογραφή από όλα τα γεωργικά προϊόντα οπότε είναι το ιδανικό παράδειγμα για να μελετηθεί το terroir από μικροβιακή σκοπιά.



## **2. Σκοπός του πειράματος**

Στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης εξετάστηκε το μικροβίωμα της ποικιλίας Αγιωργίτικο από την Π.Ο.Π. ζώνη της Νεμέας την καλλιεργητική περίοδο 2020. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκε ένα αντιπροσωπευτικό αμπελοτόπι από την περιοχή Αρχαίες Κλεωνές, από το οποίο έγινε συλλογή δειγματος ραγών και χώματος σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία. Το βασικό ερώτημα που προσπάθησε να απαντηθεί μέσα από την συγκεκριμένη μελέτη ήταν κατά πόσο επιδρά το μικροκλίμα στη διαμόρφωση του μικροβιώματος στο χώμα, στις ράγες και κατά την ωρίμανση καθώς και η επίδραση των γηγενών μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης αλκοολικής ζύμωσης σε σχέση με τη κατευθυνόμενη.

## **3. Υλικά και μέθοδοι**

Στο πλαίσιο εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής μελετήθηκε η ποικιλία Αγιωργίτικο Π.Ο.Π στη ζώνη της Νεμέας. Για τις ανάγκες του πειράματος λαμβάνονται υπόψη τρεις δειγματοληψίες από ένα αμπελοτόπι, οι δειγματοληψίες ραγών έγιναν στα στάδια:

- Πριν τον περκασμό (άγουρη ράγα)
- Περκασμός (γυάλισμα)
- Ωριμη ράγα (τρύγος)

Ακόμη στον τρύγο πραγματοποιήθηκε και δειγματοληψία χώματος από το επιλεγμένο αμπελοτόπι.

### **3.1. Διαδικασία μικροϊνοποιήσεων**

Οι ζυμώσεις χωρίστηκαν σε δυο τύπους, αυθόρμητη και κατευθυνόμενη ενώ για κάθε τύπο έγιναν δυο επαναλήψεις για πιο ασφαλή αποτελέσματα. Για τη διαδικασία μικροϊνοποιήσεων υπήρχε αυστηρό πρωτόκολλο και εφαρμόστηκε με τον παρακάτω τρόπο όλες τις φορές:

1. Αποβοστρύχωση και σπάσιμο των ραγών με τα χέρια, σε όσο το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες για την αποφυγή επιμολύνσεων.
2. Μεταφορά σταφυλομάζας 4kg σε βαρελάκι 5L.
3. Προσθήκη θειώδους ανυδρίτη 5g/hl ή 0,2g/βαρέλι (potassium metabisulfite E224-MBS, Dolmar, Spain), με σκοπό την αποφυγή ανάπτυξης αυτόχθονων ζυμών.
4. Προσθήκη εκχυλιστικών ενζύμων 3g/hl ή 0,12g/βαρέλι (Safizym® Col Plus, Fermentis, France) διαλυμένα σε dH<sub>2</sub>O σε συγκέντρωση 3 g/hl), για την επιτάχυνση της εκχύλισης των χρωστικών ουσιών.

Τα παραπάνω ισχύουν ως έχουν για την αυθόρμητη ζύμωση ενώ για την κατευθυνόμενη ακολουθούν μερικά επιπλέον στάδια παρακάτω:

- ❖ Μία ώρα μετά την προσθήκη των εκχυλιστικών ενζύμων έγινε εμβολιασμός με εμπορική καλλιέργεια ζύμης στην ποσότητα γλεύκους (*Saccharomyces cerevisiae/Saccharomyces bayanus*, Safoeno™ HD S 135, Fermentis, France), σε συγκέντρωση 25g/hl ή 1g/βαρέλι.
- ❖ 4-5 ώρες αργότερα ακολούθησε η προσθήκη οργανικού και ανόργανου αζώτου(1/1) διαλυμένα σε dH<sub>2</sub>O (Springferm, Fermentis, France) σε συγκέντρωση 25 g/hl ή 1g/βαρέλι.
- ❖ Στη μέση της ζύμωσης (1/2 °Brix) πραγματοποιήθηκε εκ νέου θρέψη αζώτου στην ίδια συγκέντρωση.

Τα δοχεία όλων των ζυμώσεων τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής ζύμωσης (23°C). Σε όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης υπήρχε παρακολούθηση των σακχάρων και της θερμοκρασίας ενώ γινόταν και ανακάτεμα για τη διάσπαση του καπέλου που δημιουργούν τα στέμφυλα στην επιφάνεια εξαιτίας της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα από την ζύμωση. Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης έγινε διαχωρισμός του γλεύκους από τα στέμφυλα και απολάσπωση, μετάγγιση και απογέμισμα σε μπουκάλια, ενώ έγινε και θείωση με 10g/hl αφού το κρασί δεν θα πήγαινε σε μηλογαλακτική ζύμωση.

Κατά τη μεταζυμωτική περίοδο το κρασί αφήνεται μια εβδομάδα και μετά το πέρας αυτής γίνεται μια ακόμα θείωση μετά από μέτρηση του ελεύθερου θειώδους με σκοπό να πάμε στα 30mg/hl ελεύθερο, η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και μετά από ένα μήνα και μετά τη τελευταία θείωση, μέτρηση ολικού και ελεύθερου θειώδους το

κρασί εμφιαλώνεται. Με σκοπό την εξέλιξη του οίνου και δημιουργία του οργανοληπτικού του προφίλ θα μείνει στη φιάλη για περίπου τέσσερις μήνες.

Σε όλη τη διάρκεια της οινοποίησης έγιναν κάποιες δειγματοληψίες και στις δυο οινοποιήσεις και τα επιμέρους βαρέλια τους με σκοπό μικροβιολογικές αναλύσεις, καταμέτρηση αποικιών και απομόνωση μικροοργανισμών.

**Πίνακας 2. Σημεία δειγματοληψίας**

Σημείο δειγματοληψίας	Κατευθυνόμενη ζύμωση	Αυθόρμητη ζύμωση
T0a	Μούστος	Μούστος
T0b	30 λεπτά μετά τη θείωση	30 λεπτά μετά τη θείωση
T1	Εμβολιασμός ζύμης	2 μέρες μετά την έναρξη AZ
T2	Μέσο ζύμωσης	Μέσο ζύμωσης
T3	Τέλος ζύμωσης	Τέλος ζύμωσης
T4	Πριν την εμφιάλωση	Πριν τη εμφιάλωση
T5	Φιάλη(4 μήνες)	Φιάλη(4 μήνες)

### 3.2. Φυσικοχημικές αναλύσεις

Στο κεφάλαιο αυτό αναλύονται οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα σταφυλιού, χόματος αλλά και οι αναλύσεις που έγιναν σε όλη τη διάρκεια των ζυμώνσεων για τη παρακολούθηση του κρασιού.

#### Προσδιορισμός ενεργού οξύτητας (pH)

Ως pH ορίζεται η όξινη γεύση του οίνου και ρυθμίζεται από το σύνολο των καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση. Η μέτρηση της ενεργού οξύτητας στο χόμα το γλεύκος και το κρασί έγινε με χρήση ψηφιακού ρημετρου και απευθείας εμφύσηση του ηλεκτροδίου στο δείγμα.

#### Προσδιορισμός ογκομετρούμενης οξύτητας

Μετρήσεις ολικής η ογκομετρούμενης οξύτητας πραγματοποιήθηκαν σε οίνο και γλεύκος ενώ τελική μέτρηση εκφράστηκε σε γραμμάρια τρυγικού ως προς λίτρα(g τρυγικού/lτ γλεύκους ή οίνου). Ο προσδιορισμός έγινε με τιτλοδότηση σε 10ml

δείγματός με πρότυπο διάλυμα υδροξείδιο του νατρίου (NaOH 0,1M) και δείκτη βρωμοθυμόλης.

### **Μέτρηση θερμοκρασίας**

Η μέτρηση της θερμοκρασίας του κρασιού εν ζυμώσει πραγματοποιήθηκε με εμφύσηση του θερμομέτρου.

### **Μέτρηση σακχάρων**

#### Διαθλασιμετρία

Ο προσδιορισμός των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονικό διαθλασίμετρο, πιο συγκεκριμένα, στο πρίσμα του διαθλασιμέτρου τοποθετήθηκαν 1-2 σταγόνες γλεύκος και αφού τοποθετήθηκε το κάλυμμα του, πραγματοποιήθηκε η παρατήρηση, έχοντας τον αντικειμενικό φακό απέναντι από μια φωτεινή πηγή. Στο οπτικό πεδίο του οργάνου εμφανίστηκαν δύο τμήματα, ένα σκοτεινό και ένα φωτεινό, που διαχωρίζονταν από μια διαχωριστική γραμμή. Στόχο αποτέλεσε η ρύθμιση του οργάνου με τον περιστρεφόμενο κοχλία, έτσι ώστε η διαχωριστική αυτή γραμμή να συμπίπτει ακριβώς με το κέντρο του σχήματος X, που εμφανίζεται στον αντικειμενικό φακό. Στο συγκεκριμένο σημείο η ένδειξη του ηλεκτρονικού διαθλασίμετρου αντιστοιχούσε στο ποσοστό των διαλυτών σακχάρων, εκφρασμένη σε βαθμούς Brix ( $^{\circ}\text{Brix}$ : g σακχάρου/ 100g διαλύματος). Σημαντική είναι η ρύθμιση, ώστε η μέτρηση του οργάνου να αντιστοιχεί σε θερμοκρασία 20  $^{\circ}\text{C}$ .

Όταν η τιμή της μέτρησης σταθεροποιηθεί, φαινόμενο το οποίο παρατηρείται συνήθως σε τιμές κοντά στους 7 - 8  $^{\circ}\text{Brix}$ , η διαθλασιμετρία πλέον δεν ενδείκνυται και επιλέγεται η αραιομετρία, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ακρίβεια. Ο συνεχής μεταβολισμός των σακχάρων συνεπάγεται τη μείωση του ειδικού βάρους.

#### Αραιομετρία

Το γλεύκος είναι ένα πολύπλοκο διάλυμα που περιέχει διάφορες ουσίες όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, φαινολικά, χρωστικές κ.ά. που επηρεάζουν την πυκνότητα του. Τα σάκχαρα αποτελούν το βασικότερο συστατικό (12–30 %), συντίθενται και συσσωρεύονται στις ράγες όσο προχωρεί η ωρίμανση του καρπού, άρα ο

προσδιορισμός τους είναι ένδειξη ωριμότητας του καρπού για συγκομιδή αλλά και της οινικής του ποιότητας.

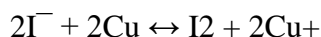
Ο προσδιορισμός έγινε με χρήση αραιομέτρου που μετράει το ειδικό βάρος ή τα ολικά διαλυτά στερεά, το αραιόμετρο δίνει ένδειξη της πυκνότητας του γλεύκους και εξαρτάται από τη θερμοκρασία, είναι βαθμονομημένο σε θερμοκρασία 20°C και οποιαδήποτε μέτρηση παρθεί σε διαφορετική θερμοκρασία ανάγεται και διορθώνεται σε αυτή. Σύμφωνα με τη μέθοδο προστέθηκαν 200ml οίνου σε ογκομετρικό κύλινδρο των 250ml, πραγματοποιήθηκε βύθιση του αραιομέτρου στον κατακόρυφο κύλινδρο και η λήψη της μέτρησης έγινε αφού το αραιόμετρο ισορρόπησε. Ταυτόχρονα, μετρήθηκε και η θερμοκρασία, ώστε σε περίπτωση απόκλισης από τους 20°C να διορθωθεί η μέτρηση του ειδικού βάρους.

#### Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων

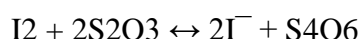
Το σύνολο των σακχάρων που διαθέτουν ελεύθερη αλδεϋδική ή κετονική ομάδα (οι εξόζες φρουκτόζη, γλυκόζη και οι πεντόζες) έχουν την ιδιότητα να ανάγουν τον δισθενή χαλκό σε μονοσθενή σε αλκαλικό περιβάλλον και κάνουν δυνατό τον προσδιορισμό τους με χημικές μεθόδους (ανάγοντα σάκχαρα). Κατά την αλκοολική ζύμωση, οι σακχαρομύκητες χρησιμοποιούν τα σάκχαρα σαν υπόστρωμα για την παραγωγή βιομάζας ή για την παραγωγή αλκοόλης και δευτερευόντων προϊόντων. Άρα η αρχική συγκέντρωση σακχάρων μειώνεται με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της αλκοόλης. Συνήθως καταναλώνεται πρώτη η γλυκόζη και ακολουθεί η φρουκτόζη. Βέβαια, στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων ποτέ δεν είναι μηδέν, πάντα παραμένει ένα μικρό ποσοστό μη ζυμώσιμων-αναγόντων σακχάρων. Τέτοια σάκχαρα είναι οι πεντόζες που δεν αποικοδομούνται από τους ζυμομύκητες. Αν η ζύμωση σταματήσει πριν την ολοκλήρωση της (πχ. για την παρασκευή ενός γλυκύτερου οίνου) παραμένουν αζύμωτες κι εξόζες.

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων με χρήση διαλυμάτων χαλκού γίνεται με διάφορους τρόπους. Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Lüff. Ακολουθεί αναλυτικά η μέθοδος.

Μια γνωστή ποσότητα οίνου αντιδράει με γνωστή ποσότητα αλκαλικού διαλύματος χαλκού. Η περίσσεια των ιόντων  $\text{Cu}^{++}$  που δεν αντέδρασαν με τα σάκχαρα προσδιορίζονται ιωδιομετρικά. Μετατρέπονται σε ιόντα  $\text{Cu}^+$  με προσθήκη ιωδιούχου καλίου (KI) το οποίο σε όξινο περιβάλλον δίνει  $\text{I}_2$ , όπως περιγράφεται στην αντίδραση:



Το σχηματιζόμενο  $\text{I}_2$  προσδιορίζεται με τιτλοδοτημένο διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



Το τέλος της αντίδρασης προσδιορίζεται με δείκτη αμύλου. Το άμυλο με το  $\text{I}_2$  δίνει ένα σύμπλοκο κυανού χρώματος το οποίο αποχρωματίζεται στο σημείο αλλαγής. Η έκφραση των αποτελεσμάτων γίνεται σε g αναγόντων σακχάρων/lit οίνου.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάλυση ενός οίνου είναι να έχει προηγηθεί διαύγαση, η διαδικασία αυτή γίνεται για την απομάκρυνση των ουσιών που έχουν αναγωγική δράση και επηρεάζουν τη μέτρηση όπως χρωστικές, ταννίνες κ.α. Παρακάτω, παρατίθεται το πρωτόκολλο της μεθόδου.

#### Διαύγαση δείγματος

1. Προσθήκη 50 ml δείγματος σε ογκομετρική φιάλη
2. Προσθήκη 0,5 g ανθρακικού ασβεστίου ( $\text{CaCO}_3$ ) και αναμονή για 15 min
3. Διήθηση του παραπάνω μείγματος, μέχρι παραλαβής 25 ml

#### Μέτρηση

1. Προσθήκη 25 ml αλκαλικού διαλύματος θειικού χαλκού
2. Τοποθέτηση του διαλύματος σε σφαιρική φιάλη και θέρμανση σε θερμαινόμενο μανδύα (). Χρονομέτρηση 10 min από την έναρξη του βρασμού
3. Ψύξη, με τοποθέτηση της σφαιρικής φιάλης υπό τρεχούμενο νερό βρύσης
4. Προσθήκη 10 ml ιωδιούχου καλίου (30%)
5. Προσθήκη 25 ml θειικού οξέος

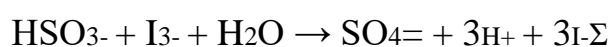
6. Τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1N, με προσθήκη δείκτη αμύλου. Στο τελικό σημείο της τιτλοδότησης παρατηρείται σκούρο πορτοκαλί χρώμα.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων απαιτείται συνδυασμός της ολικής οξύτητας με το αποτέλεσμα της τιτλοδότησης της παραπάνω διαδικασίας. Η έκφραση των αποτελεσμάτων γίνεται σε g αναγόντων σακχάρων/ l οίνου.

### **Μέτρηση θειώδους**

Η προσθήκη θείου στη σταφυλομάζα, στο γλεύκος ή στο κρασί έχει ως σκοπό την προστασία τους από ορισμένα ανεπιθύμητα βιολογικά και φυσικοχημικά φαινόμενα. Η ελεύθερη μορφή του θείου που προσθέτουμε είναι αυτή που προστατεύει το κρασί και το υπόλοιπο καλείται δεσμευμένο ενώ το σύνολο ολικό. Το συνολικό θείο που προστίθεται εξαρτάται από την υγεία των σταφυλιών, το pH, την οξύτητα και τη θερμοκρασία. Για ξηρούς οίνους η απαραίτητη ποσότητα για να εξασφαλιστεί διατήρηση είναι 20-30mg/L ανάλογα το pH του οίνου. Η περιεκτικότητα των οίνων σε ολικό θειώδη ανυδρίτη δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 150 mg/l, όπως ορίζεται από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1234/2007.

Ο προσδιορισμός του ελεύθερου και ολικού θειώδους ανυδρίτη πραγματοποιήθηκε αρχικά μετά το πέρας μίας εβδομάδας από το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, ώστε να ελεγχθεί η ποσότητα που καταναλώθηκε και να προστεθεί επιπλέον εάν κρίνεται απαραίτητο. Έλεγχος πραγματοποιήθηκε επίσης και μετά το πέρας ενός μήνα, δηλαδή στο σημείο πριν την εμφιάλωση. Για τον προσδιορισμό του ελεύθερου και ολικού θειώδους ανυδρίτη στον οίνο πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα ιωδίου (I<sub>2</sub>), βάσει αντίδρασης οξειδοαναγωγής:



Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου, η οξείδωση πρέπει να λαμβάνει χώρα σε ισχυρά όξινο περιβάλλον, διαφορετικά το ιώδιο αντιδρά με πολυφαινόλες, σάκχαρα,

αλδεΰδες και άλλους αναγωγικούς παράγοντες. Στο τελικό σημείο εμφανίζεται μπλε χρώμα, το οποίο αποδίδεται στην περίσσεια του ιωδίου, εξαιτίας της παρουσίας αμύλου. Μεταβάλλοντας το pH του οίνου σε ισχυρά αλκαλικό με προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου (NaOH), αποδεσμεύεται ο θειώδης ανυδρίτης από την ένωση με την ακεταλδεΰδη, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται ο προσδιορισμός και της δεσμευμένης μορφής. Το άθροισμα του ελεύθερου και του δεσμευμένου αποδίδει τον ολικό θειώδη ανυδρίτη. Οι τιτλοδοτήσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις παρακάτω μεθόδους.

#### Προσδιορισμός ελεύθερου θειώδους

- Μεταφέρουμε 20ml δείγματος σε ποτήρι ζέσεως 50ml
- Προσθέτουμε 2ml αραιωμένο κατά 1/3 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Τοποθετούμε το ποτήρι στη βάση τιτλοδότησης και πατάμε το **START**, ενεργοποιείται ο αναδευτήρας και περιμένουμε 5-6 δευτερόλεπτα.
- Στη συνέχεια πατούμε το κουμπί τιτλοδότησης και το διάλυμα τιτλοδότησης (ιώδιο) ξεκινάει να προστίθεται.
- Στο τέλος της αντίδρασης η κατανάλωση στη προχοίδα μου δείχνει πόσα mg/L έχω στο διάλυμα μου.

#### Προσδιορισμός ολικού θειώδους

- Μεταφέρουμε 20ml δείγματος σε ποτήρι ζέσεως 50ml
- Προσθέτουμε 2ml αραιωμένο κατά 1/3 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Προσθήκη 2 ml NaOH (5N)
- Ήπια ανάδευση και 10 min σε ηρεμία
- Τοποθετούμε το ποτήρι στη βάση τιτλοδότησης και πατάμε το **START**, ενεργοποιείται ο αναδευτήρας και περιμένουμε 5-6 δευτερόλεπτα.
- Στη συνέχεια πατούμε το κουμπί τιτλοδότησης και το διάλυμα τιτλοδότησης (ιώδιο) ξεκινάει να προστίθεται.
- Στο τέλος της αντίδρασης η κατανάλωση στη προχοίδα μου δείχνει πόσα mg/L έχω στο διάλυμα μου.



### 3.3. Κλασική μικροβιολογική ανάλυση

#### 3.3.1. Υποστρώματα και μικροβιακές ομάδες

Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες που έχουν αναφερθεί και παραπάνω(χώμα, γλεύκος, οίνος) με σκοπό την καλλιέργεια των μικροοργανισμών . Ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού μπορεί να υπήρχαν διαφορετικές θερμοκρασίες στον κλίβανο, χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων και αντιβιοτικών αλλά και άλλη μέθοδος επίστρωσης στο τρυβλίο (επίστρωση ή ενσωμάτωση λόγω αερόβιων ή αναερόβιων συνθηκών ανάπτυξης των μικροοργανισμών).

**Πίνακας 3. Μικροβιακή ανάλυση**

Μικροβιακή ομάδα	Υπόστρωμα	Θερμοκρασία (°C)	Ημέρες	Μέθοδος	Αντιβιοτικό
Ολική μεσόφιλη μικροχλωρίδα	NA	30	3	Επιφανειακή επίστρωση	
Ζύμες	YGC	25	3	Επιφανειακή επίστρωση	Ενσωματωμένη χλωραφενικόλη στο υπόστρωμα 0,1% w/v
Οξυγαλακτικά βακτήρια	MRS	30	3	Ενσωμάτωση	Κυκλοεξαμίδιο 1% w/v
Οξικά βακτήρια	AAM	30	3	Επιφανειακή επίστρωση	Κυκλοεξαμίδιο 1% w/v Πενικιλίνη 0,5% w/v

### 3.3.2. Αραιώσεις, εμβολιασμός και καταμέτρηση

Μετά τη λήψη του δείγματος ακολουθούν διαδοχικά συγκεκριμένα βήματα για τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου στα δείγματα. Πρώτα παραλαμβάνονται ασηπτικά 10g δείγματος ραγών ή χώματος και τοποθετούνται σε σακούλα Stomacher, ακολουθεί η πρόσθεση 90ml διαλύματος Ringer και γίνεται ομογενοποίηση στη συσκευή Stomacher για δύο λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα, αυτό είναι το πρώτο βήμα. Από τη παραπάνω διαδικασία προκύπτει ένα διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται σε δεκαδικές αραιώσεις για εμβολιασμό στα τρυβλία τα οποία θα επωαστούν ανάλογα με το υπόστρωμα στις ανάλογες συνθήκες και ημέρες με σκοπό να αναπτυχθούν αποικίες. Τέλος το τρίτο βήμα είναι η καταμέτρηση των αποικιών από τα επιλεγμένα τρυβλία, το αποτέλεσμα των μικροβιακών αποικιών εκφράστηκε σε μονάδες που δημιουργούν μια αποικία ανά γραμμάριο(χώμα) ή ml(οίνος, γλεύκος) δείγματος (colonyformingunits-cfu/ml ή gr ).

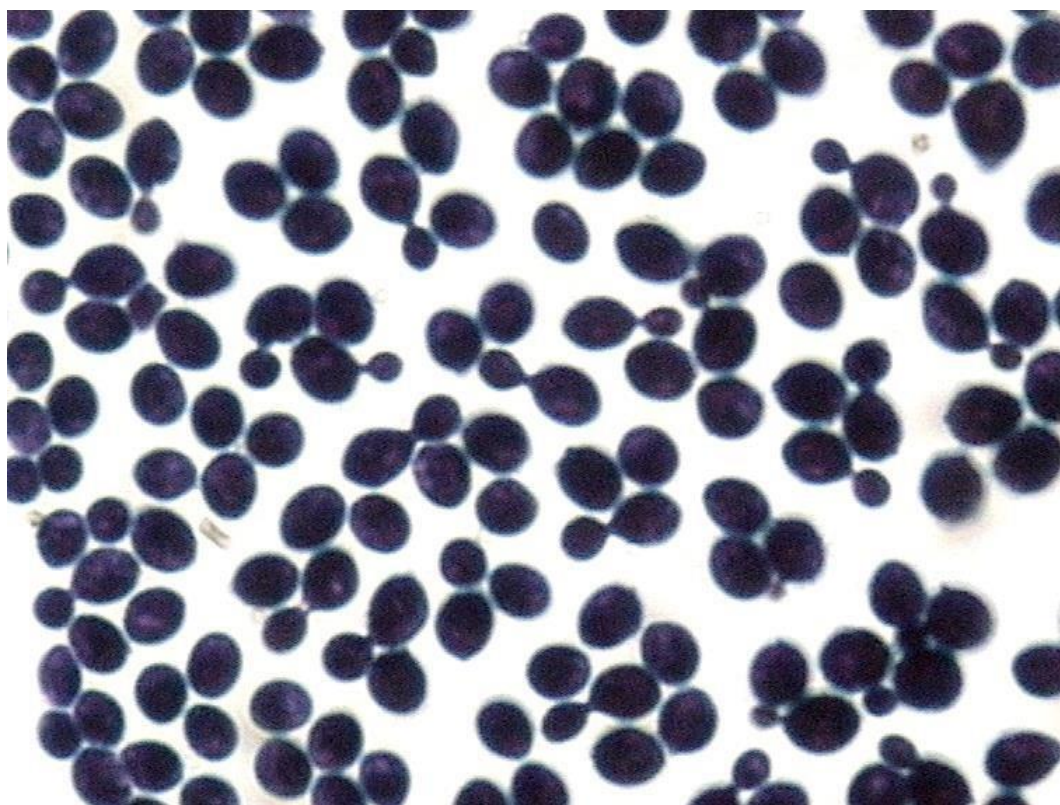
### 3.3.3. Απομόνωση και καθαρισμός αποικιών

Απομονώσεις αποικιών πραγματοποιούνται από τα υποστρώματα MRS και YGC, δηλαδή οξυγαλακτικά βακτήρια και ζυμομύκητες. Η επιλογή γίνεται βάση της παρατήρησης των μορφολογιών σε στερεοσκόπιο και λαμβάνονται υπόψη το μέγεθος, το χρώμα και το σχήμα ενώ η απομόνωση γίνεται σε ασηπτικές συνθήκες. Για τις ανάγκες του πειράματος οι πρώτες απομονώσεις τοποθετήθηκαν σε vials στους -80°C μαζί σε ένα διάλυμα γλυκερόλης για προστασία από τη κατάψυξη, οι φιάλες αυτές είναι το firststock και από αυτές θα γίνει ο καθαρισμός των αποικιών και θα προκύψει το finalstock.

Στη συνέχεια έγιναν οι ανανεώσεις και ο καθαρισμός των αποικιών, για την ανανέωση εμβολιάστηκαν 50μl από το vial της αποικίας(firststock) σε 5mlbroth (1000ml νερό, 20gglucose, 5gyeastextract) και έγινε επώαση. Έπειτα από τα παραπάνω broth εφαρμόστηκε η τεχνική του streaking στα κατάλληλα τρυβλία και ξαναέγινε επώαση, αν μετά την επώαση δεν προκύψουν καθαρές αποικίες μπορεί να γίνει δεύτερο και τρίτο streaking μέχρι να προκύψουν καθαρές αποικίες κατάλληλες για το finalstock έτσι ώστε να αποθηκευτούν σε νέα vials στους -80°C. Στο τελευταίο αυτό σημείο έγινε ακόμη παρατήρηση των αποικιών σε στερεοσκόπιο και καταγραφή των μορφολογιών τους.

### 3.3.4. Χρώσεις Gram

Η χρώση Gram (Hans Christian Joachim Gram, 1884) είναι μια πολύ χρήσιμη διαδικασία καθώς κατατάσσει τα βακτήρια σε δυο κατηγορίες τα Gram(+) και τα Gram(-), η διάκριση γίνεται μέσω του χρωματισμού από το κρυσταλλικό ιώδες και στην περίπτωση που τα βακτήρια κρατήσουν το χρώμα μετά τον αποχρωματισμό ανήκουν στη πρώτη κατηγορία αν αποχρωματιστούν ανήκουν στη δεύτερη. Η διαφορά οφείλεται στη χημική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και της ύπαρξης ή όχι ενός παχέος στρώματος πεπτιδογλυκάνης που είναι και η ουσία που συγκρατεί τον χρωματισμό (σύμπλοκο χρωστικής με σταθεροποιητή ή κρυσταλλικό ιώδες και ιώδιο).



Εικόνα 6. Κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* μετά τη χρώση.

Από τις καθαρές καλλιέργειες και τις αποικίες που θα πραγματοποιηθεί το finalstock έγινε χρώση Gram, παρατήρηση μορφολογιών στο μικροσκόπιο και πάρθηκαν ψηφιακές φωτογραφίες των κυττάρων.

## 4. Αποτελέσματα και συζήτηση

### 4.1. Δειγματοληψίες κατά την ωρίμανση

Τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών αναλύσεων παρουσιάζονται με τη μορφή πινάκων.

Ο αμπελώνας από τον οποίο έγιναν οι δειγματοληψίες κατά την ωρίμανση ήταν στις Αρχαίες Κλεωνές. Παρακάτω παρατίθεται σχετικός πίνακας με τις ενεργές οξύτητες (pH) στα δείγματα χώματος, καρπού και γλεύκους.

Πίνακας4. Μετρήσεις pH

pH	
Σημείο δειγματοληψίας	
Χώμα στον τρύγο	8,2
Άγουρος καρπός	2,6
Καρπός στον περκασμό	3,1
Καρπός στον τρύγο	3,6
Γλεύκος	6,5

Όσον αφορά τον καρπό, παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του pH κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Συγκεκριμένα, στον άγουρο καρπό, οι τιμές κυμαίνονται από 2,6 , στον περκασμό από 3,13 και στον τρυγητό 3,6. Το pH του γλεύκους μετρήθηκε στο6,525. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μείωση των οργανικών οξέων (κυρίως του μηλικού) σε συνδυασμό με την αύξηση των κατιόντων (κυρίως  $K^+$ ) κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του pH (Σταυρακάκης, 2013).

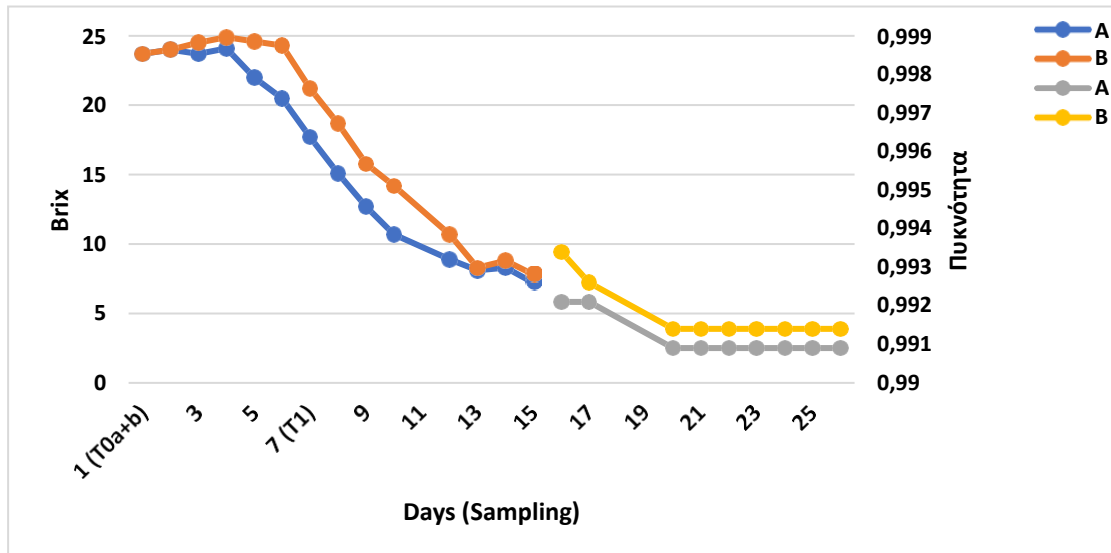
Στον **Πίνακα 5** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών αναλύσεων στα σημεία δειγματοληψίας στην κατευθυνόμενη και αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση. Συγκεκριμένα, παρατίθενται τα αποτελέσματα από τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης των διαλυτών στερεών ( $^{\circ}$ Brix), του ειδικού βάρους, των αναγόντων σακχάρων και της ολικής οξύτητας.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα φυσικοχημικών αναλύσεων σε κατευθυνόμενη και αυθόρμητη ζύμωση καλό είναι να μην έχεις το όνομα του οινοποιείου !!

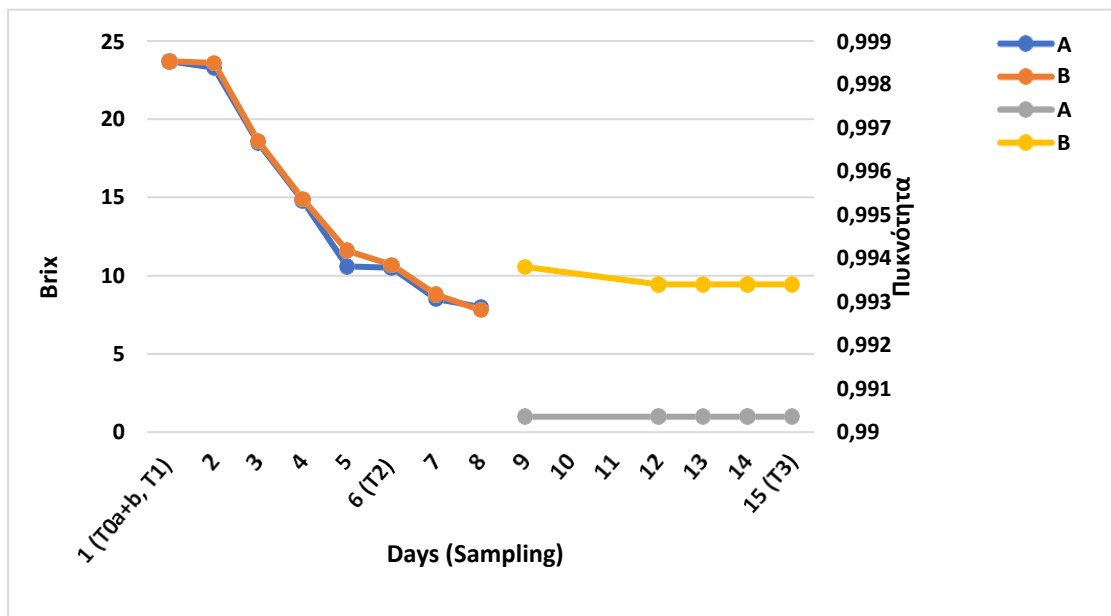
Κατευθυνόμενη Ζύμωση Α							Αυθόρμητη Ζύμωση Α						
Σημείο δειγματοληψίας	Θερμοκρασία	Brix	Ειδικό βάρος	Ανάγοντα σακχάρια	Ολική οξύτητα (g t.a /lt)	ph	Σημείο δειγματοληψίας	Θερμοκρασία	Brix	Ειδικό βάρος	Ανάγοντα σακχάρια	Ολική οξύτητα (g t.a /lt)	ph
To	23	23,7			6,525	3,2	To	23	23,7			6,525	3,2
Toθ	23	23,7					Toθ	22	23,7				
T1	23	23,7					T1	22	17,7				
T2	22	10,5					T2	22	8,9				
T3			0,9924	0,1	7,9	3,4	T3			0,9909	0,09	7,95	3,5
Κατευθυνόμενη Ζύμωση Β							Αυθόρμητη Ζύμωση Β						
Σημείο δειγματοληψίας	Θερμοκρασία	Brix	Ειδικό βάρος	Ανάγοντα σακχάρια	Ολική οξύτητα (g t.a /lt)	ph	Σημείο δειγματοληψίας	Θερμοκρασία	Brix	Ειδικό βάρος	Ανάγοντα σακχάρια	Ολική οξύτητα (g t.a /lt)	ph
To	23	23,7			6,525	3,2	To	23	23,7			6,525	3,2
Toθ	22	23,7					Toθ	23	23,7				
T1	22	17,7					T1	22	21,2				
T2	22	10,7					T2	23	10,7	0,9934	0,9		
T3			0,9934	0,09	8,7	3,3	T3			0,9914	0,09	8,13	3,44

## 4.2. Οινοποιήσεις

Στην συνέχεια παρατίθενται τα στοιχεία από τις δυο οινοποιήσεις και τις αλκοολικές ζυμώσεις στα **Γραφήματα 1 και 2**. Όπως φαίνεται και στα διαγράμματα η ζύμωση ήταν συντομότερη στις κατευθυνόμενες οινοποιήσεις όπως είναι φυσιολογικό, οι κατευθυνόμενες ολοκληρώθηκαν σε επτά ημέρες και οι αυθόρμητες σε περίπου διπλάσιες (δεκαπέντε), ενώ οι εμφιαλώσεις έγιναν πάνω από ένα μήνα μετά την ολοκλήρωση των ζυμώσεων (24/11/2020). Η οξύτητα στις κατευθυνόμενες ζυμώσεις ήταν 7,9 g / Lt(τρυγικό οξύ) και 8,7 g / Lt (τρυγικό οξύ) ενώ στις κατευθυνόμενες ζυμώσεις ήταν 7,95 g / Lt (τρυγικό οξύ) 8,13 g / Lt (τρυγικό οξύ).



Γράφημα 1. Πορεία αλκοολικής ζύμωσης στις δυο αυθόρμητες ζυμώσεις



Γράφημα 2. Πορεία αλκοολικής ζύμωσης στις δυο κατευθυνόμενες ζυμώσεις

### 4.3. Κλασική μικροβιολογική ανάλυση

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης ανά δειγματοληψία κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των σταφυλίων και έπειτα της αλκοολικής ζύμωσης αυθόρμητης και κατευθυνόμενης. Οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν ανήκουν στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα, τις ζύμες, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα οξικά βακτήρια. Επιπλέον, πραγματοποιείται

αποτύπωση της μικροβιακής χλωρίδας στο χόμα στο σημείο του τρυγητού. Σημειώνεται πως κάθε δείγμα προς ανάλυση προέκυψε από την ένωση των δειγμάτων που παρελήφθησαν από τις δύο επαναλήψεις Α και Β για το αντίστοιχο σημείο δειγματοληψίας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των **Γραφημάτων 3 και 4** στον άγουρο καρπό παρατηρήθηκε απουσία μικροβιακών πληθυσμών με εξαίρεση τον πληθυσμό των ζυμομυκήτων που ανήλθε στα  $1 \log \text{ cfu/g}$ , μικροοργανισμοί άρχισαν να ανιχνεύονται στο στάδιο του περκασμού και έπειτα. Από τα **Γραφήματα 3, 4** όπου αποτυπώνονται οι πληθυσμοί των επιλεγμένων μικροβιακών ομάδων που μετρήθηκαν στον καρπό, παρατηρήθηκε κυριαρχία των οξικών βακτηρίων και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε πληθυσμούς περίπου  $3 \log \text{ cfu/gr}$  όταν άρχισε να ωριμάζει το σταφύλι μέχρι και τον τρύγο όπου αυξήθηκαν ξανά οι ζυμομύκητες. Η παρουσία ζυμομυκήτων στον καρπό σε έρευνα του 2003 ήταν,  $3 \log \text{ cfu/gr}$  σε άγουρο καρπό και  $4-6 \log \text{ cfu/gr}$  σε ώριμες ράγες σταφυλιού, τα οξικά βακτήρια εντοπίστηκαν μέχρι σε  $6 \log \text{ cfu/gr}$  ενώ τα οξυγαλακτικά  $2 \log \text{ cfu/gr}$  (Fleet, 2003).

Κατά τη διάρκεια και των δύο ζυμώσεων (κατευθυνόμενη και αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση), οι ζύμες αποτέλεσαν την κυρίαρχη μικροβιακή ομάδα με πληθυσμούς που κυμάνθηκαν από 5 έως  $8 \log \text{ cfu/ml}$ . Ο αρχικός πληθυσμός τους στο γλεύκος (T0a) ήταν  $6,80 \log \text{ cfu/ml}$  και παρέμεινε πρακτικά σταθερός και μετά την θείωση (T0b). Στην κατευθυνόμενη αλκοολική ζύμωση παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού μετά όπως ήταν αναμενόμενο, αγγίζοντας τη μέγιστη τιμή των  $8 \log \text{ cfu/ml}$  στη μέση της ζύμωσης (T2) και ακολούθησε ελαφρά αύξηση φτάνοντας τους  $8,2 \log \text{ cfu/ml}$  στο τέλος αυτής (T3). Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα καταμετρήθηκε στο γλεύκος σε πληθυσμούς 3,5 τόσο πριν (T0a) όσο και μετά (T0b) τη θείωση αλλά και στην αρχή της κατευθυνόμενης ζύμωσης (T1). Αντίθετα, από τη μέση της ζύμωσης και μέχρι το τέλος αυτής (T2-T3) μειώθηκαν οι πληθυσμοί της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας και των οξικών βακτηρίων, οξυγαλακτικά βακτήρια δεν αναπτύχθηκαν σε κανένα σημείο της αλκοολικής ζύμωσης και ο πληθυσμός του ήταν μηδενικός για όλη τη διάρκεια της. Το μοτίβο ανάπτυξης των ζυμομυκήτων και ο πληθυσμός τους ήταν παρόμοιο σε έρευνα του 2014 (Pateraki et al., 2014), και πάλι στη ποικιλία Αγιωργίτικο σε δυο οινοποιήσεις αυθόρμητες με χρήση και όχι θείου ο πληθυσμός των ζυμομυκήτων μετά την τρίτημέρα ήταν  $6,5 \log \text{ cfu/ml}$  στη ζύμωση χωρίς θείωση ενώ ήταν μια μέρα πίσω η οινοποίηση με την εφαρμογή του θείου.

Τα οξικά βακτήρια εμφανίστηκαν στους καρπούς πριν τον περκασμό και ο μέγιστος πληθυσμός τους ανιχνεύθηκε στο σημείο (T0a) πριν τη θείωση με πληθυσμό 3,50 log cfu/ml, ο οποίος μειώθηκε κατά την εξέλιξη της ζύμωσης (T2) και μηδενίστηκε στο τέλος αυτής (T3). Τέλος, στο σημείο πριν την εμφιάλωση (T4) δεν καταμετρήθηκαν πληθυσμοί ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, οξυγαλακτικών και οξικών βακτηρίων.

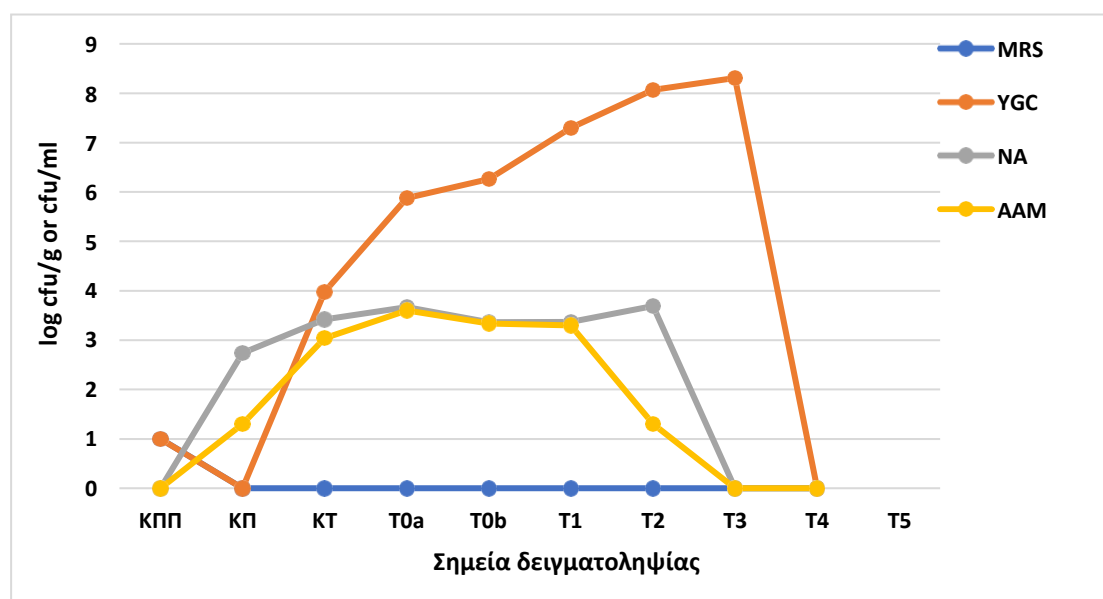
Όσον αφορά στην αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση και μετά τα αρχικά στάδια του γλεύκους που αποτέλεσαν κοινό σημείο με την κατευθυνόμενη ζύμωση, ο πληθυσμός των ζυμών αυξήθηκε, αποκτώντας μέγιστη τιμή, ίδια με αυτήν της κατευθυνόμενης ζύμωσης (8 log cfu/ml)- στο σημείο των 2 ημερών από την έναρξη της ζύμωσης (T1), στη διάρκεια της ζύμωσης σημείωσε πτώση της τάξης του 2 log cfu/ml (T3). Ο πληθυσμός των μεσόφιλων και θερμόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων επίσης αυξήθηκε αγγίζοντας τους 7 log cfu/ml στην έναρξη της ζύμωσης (T1) ενώ με την εξέλιξη αυτής (T2) μειώθηκε, φτάνοντας στο τέλος (T3) τους 4 log cfu/ml για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η στις πρώτες ημέρες της αλκοολικής ζύμωσης υπάρχει ένα μέγιστο πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων και έπειτα υπάρχει μείωση, από 4 log cfu/gr σε 2 log cfu/gr (Lonvaud-Funel, 1991). Η εξέλιξη στον πληθυσμό των οξικών βακτηρίων και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας ήταν παρόμοια παρουσιάζοντας τον ίδιο πληθυσμό (3,50 log cfu/ml) στο γλεύκος πριν (T0a) και μετά τη θείωση (T0b). Για την ολική μεσόφιλη υπήρξε αύξηση στους 5 log cfu/ml στην αρχή της ζύμωσης (T1) και εν συνεχεία περαιτέρω αύξηση (T2) καταλήγοντας στους 1,5 log cfu/ml (T3) (**Γράφημα 4**). Βάση βιβλιογραφίας ο πληθυσμός των οξικών βακτηρίων μειώνεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, σε υγιή σταφύλια ο πληθυσμός ήταν από 2 log cfu/gr μέχρι 4 log cfu/gr, οι δύο αυτές μετρήσεις αναφέρονται σε διαφορετικής προέλευσης χυμό σταφυλιού, στη πρώτη περίπτωση είναι λευκά (Semillon) και στη δεύτερη είναι ερυθρά (Cabernetsauvignon) (Lafon-Lafourcade, RieberauGayon, Joeyeux, 1984).

Τέλος, στο σημείο πριν την εμφιάλωση (T4) δεν καταμετρήθηκαν πληθυσμοί των επιλεγμένων μικροβιακών ομάδων.

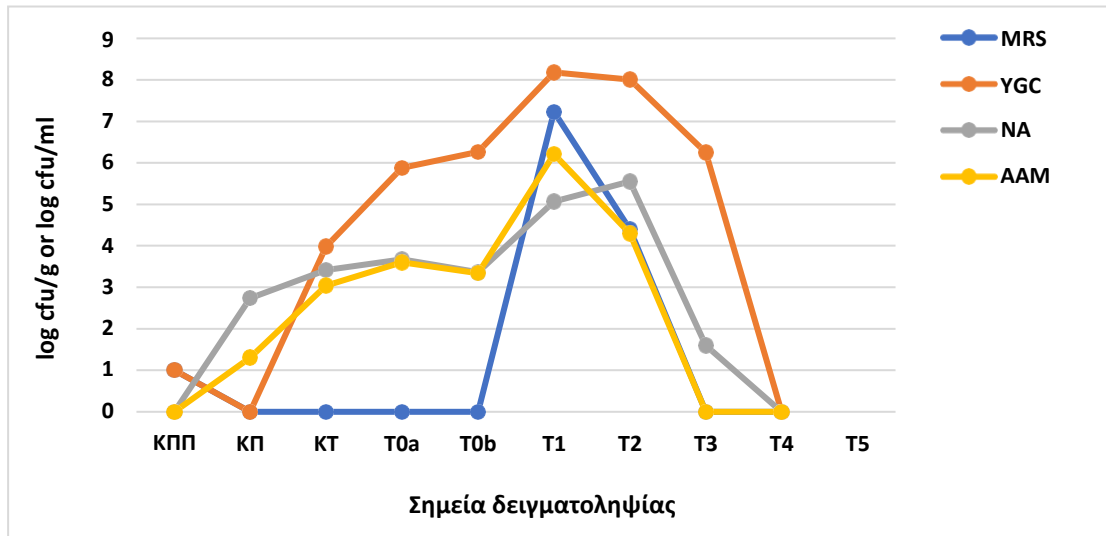
Ανακεφαλαιώνοντας, στο μικροβιακό οικοσύστημα παρατηρήθηκε ανάπτυξη των επιλεγμένων μικροβιακών ομάδων μετά το στάδιο του περκασμού, γεγονός που μπορεί να θεωρηθεί αποτέλεσμα της επίδρασης φυτοπροστατευτικών ουσιών ή/και αβιοτικών παραγόντων (βροχή).



Η βασική μικροβιακή ομάδα που καταμετρήθηκε κατά τη διάρκεια και των δύο τύπων ζύμωσης στα δείγματα γλεύκους και οίνου ήταν οι ζύμες. Ο πληθυσμός τους έφτασε τα 8 log cfu/ml στα πρώτα στάδια της ζύμωσης και ακολούθως μειώθηκε ή και μηδενίστηκε. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και σε μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας (Pateraki et al. 2014), όπου προσδιορίστηκε ο πληθυσμός των ζυμών στη διάρκεια αυθόρμητης αλκοολικής ζύμωσης σταφυλών της ποικιλίας Αγιωργίτικο από την περιοχή της Νεμέας, ανεξάρτητα από τη θείωση του γλεύκους οι ζυμομύκητες και συγκεκριμένα ο *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύσσονται πρώτοι και κυριαρχούν από την αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, ακόμα εντοπίζονται τα γένη των *Hanseniaspora* spp, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans* (Pateraki, 2014).

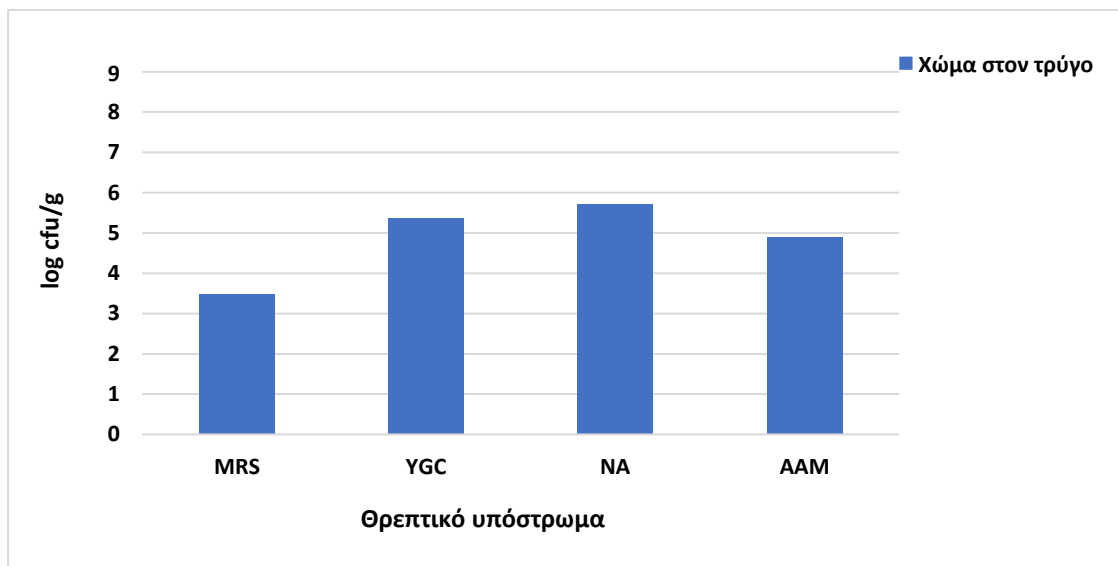


Γράφημα 4. Καταμέτρηση πληθυσμών των μικροβιακών ομάδων κατά την ωρίμανση της ράγας και την κατευθυνόμενη αλκοολική ζύμωση (ΚΠ: καρπός προ περκασμού, ΚΠ: περκασμός, ΚΤ: τρύγος, T0a: μούστος, T0b: θείωση, T1: θείωση, T2: μέσο ζύμωσης, T3: τέλος ζύμωσης, T4: πριν την εμφιάλωση, T4: εμφιάλωση)



Γράφημα 3. Καταμέτρηση πληθυσμών των μικροβιακών ομάδων κατά την ωρίμανση της ράγας και την αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση (ΚΠΠ: καρπός προ περκασμού, ΚΠ: περκασμός, ΚΤ: τρύγος, T0a: μούστος, T0b: θείωση, T1: 2 μέρες από την έναρξη της ζύμωσης, T2: μέσο ζύμωσης, T3: τέλος ζύμωσης, T4: πριν την εμφιάλωση, T4: εμφιάλωση)

Στο **Γράφημα 5** αποτυπώνονται οι πληθυσμοί των επιλεγμένων μικροβιακών ομάδων που μετρήθηκαν στο χόμα στο στάδιο του τρύγου. Παρατηρήθηκε κυριαρχία της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας 5,72 log cfu/g και των ζυμομυκήτων 5,37 log cfu/g, με πληθυσμούς 6 και 5,70 log cfu/g αντίστοιχα. Ακολούθησαν οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων 4,89 log cfu/g και των οξικών βακτηρίων οι οποίοι δεν ξεπέρασαν τους 3,48 log cfu/g.



Γράφημα 5. Καταμέτρηση πληθυσμών των επιλεγμένων μικροβιακών ομάδων στο χόμα

## Απομόνωση αποικιών

Συνολικά απομονώθηκαν 53 αποικίες από το θρεπτικό υπόστρωμα YGC και 41 αποικίες από το θρεπτικό υπόστρωμα MRS, για όλα τα δείγματα χόματος, ράγας και οίνου. Παρόλο που χρησιμοποιούνται επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και συνθήκες ανάπτυξης για συγκεκριμένες μικροβιακές ομάδες, δεν αποκλείεται και η ανάπτυξη άλλων μικροβιακών ομάδων, όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Μετά τη χρώση gram των καθαρών καλλιιεργειών και την παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, φάνηκε ότι από τις αρχικές 41 αποικίες που απομονώθηκαν από το θρεπτικό υπόστρωμα MRS, οι 25 ήταν ζύμες και οι 16 βακτήρια. Ενώ από τις 53 αποικίες στο YGC ήταν όλες ζύμες. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται περισσότερες πληροφορίες για τις αποικίες που απομονώθηκαν.

Εξαιτίας της πανδημίας SARS-CoV-2, δεν ολοκληρώθηκε η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με χρήση μοριακών τεχνικών, οπότε και δεν περιλαμβάνεται στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής μελέτης.

Πίνακας 4. Υποστρώματα και αποικίες που απομονώθηκαν

Θρεπτικό υπόστρωμα	Μικροβιακή ομάδα	Χώμα	Ράγα	Γλεύκος	Γλεύκος μετά τη θείωση	Κατευθυνόμενη αλκοολική ζύμωση	Αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση	Σύνολο
MRS	Ζύμες	3			22		22	25
	Βακτήρια	6			10	10		16
YGC	Ζύμες	4	4			11	34	53

## Συμπεράσματα

Στην παρούσα ενότητα θα αναλύσουμε τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα παραπάνω και τη σημασία των μικροοργανισμών που εντοπίζονται στα διάφορα μέρη του αμπελώνα.

Στην παραπάνω μελέτη των αλκοολικών ζυμώσεων παρατηρήθηκαν οι πληθυσμοί συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων με σκοπό τη δημιουργία ενός προφίλ σχετικά με τη μικροβιακή πανίδα της περιοχής «Αρχαίες Κλαιωνές» στην αμπελουργική ζώνη της Νεμέας, οι οινοποιήσεις έγιναν με σταφύλια της ποικιλίας Αγιωργίτικο ΠΟΠ Νεμέας.

Οι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται στον αμπελώνα έχουν μεγάλη σημασία και αξίζει να τους κατανοήσουμε καθώς πολλά προβλήματα και κατά τη πορεία ωρίμανσης των σταφυλιών, της υγείας των φυτών αλλά και κατά την οινοποίηση και παλαίωση οφείλονται διάφορες ομάδες αυτών, μύκητες και βακτήρια αλλά και σε άλλους μικροοργανισμούς που δεν αναφέρονται στη παρούσα εργασία. Ακόμη οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του εδάφους, των φυτών, τη θρέψη και τη παραγωγή, αφού μπορεί να βοηθούν στην άμυνα του φυτού έναντι παθογόνων ή στη θρέψη του μέσω της απορρόφησης θρεπτικών και διοχέτευσης μέσω του ριζικού συστήματος.

Τέλος η ποικιλία των μικροοργανισμών που εντοπίζονται σε έναν αμπελώνα ή μια καλλιέργεια εξαρτάται από το είδος ή την ποικιλία της καλλιέργειας, το κλίμα, τον τρόπο που γίνεται η καλλιέργεια (καλλιεργητικές τεχνικές, ψεκασμοί, ολοκληρωμένη διαχείριση, βιολογική γεωργία), τη γεωγραφική τοποθεσία και τα χαρακτηριστικά της περιοχής (ReidG. Griggs et al, 2021).

## Βιβλιογραφία.

1. Dai ZW, Ollat N, Gomès E, Decroocq S; Tandonnet J-P, Bordenave L, Pieri P, Hilbert G, Kappel C, Van Leeuwen C, Vivin P, Delrot S: Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2011, 62:413–425.
2. Liu HF, Wu BH, Fan PG, Li SH, Li LS: Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006, 86:1526–1536. Doi: 10.1002/jsfa.2541.
3. Robinson SP, Davies C: Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2000;6:175–188. Doi: 10.1111/j.1755-0238.2000.tb00177.x
4. Esteban MA, Villanueva MJ, Lissarrague JR: Relationships between different berry components in Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grapes from irrigated and non-irrigated vines during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002;82:1136 – 1146. Doi: 10.1002/jsfa.1149
5. Jordão AM, Ricardo-da-Silva JM, Laureano O: Influence of irrigation on phenolic composition of the French Touriga red wine grapes variety (*Vitis vinifera* L.). *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. 1998;2:60–73.
6. Van Leeuwen C, Tregoat O, Choné X, Bois B, Pernet D, Gaudillère J-P: Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. 2009;43:121–134. <http://prodinra.inra.fr/record/33055>.
7. Hawker JS: Effect of temperature on lipid, starch and enzymes of starch metabolism in grape, tomato and broad bean-leaves. *Phytochemistry*. 1982;21:33–36. Doi: 10.1016/0031-9422(82)80009-5.
8. Mira de Orduña R: Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*. 2010;43:1844–1855. Doi:10.1016/j.foodres.2010.05.001
9. Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA: Grape. In: *Biochemistry of Fruit Ripening*, Seymour G, Taylor J, Tucker G (Eds.). London: Chapman & Hall, 1993; pp. 189–234.
10. Lamikanra O, Inyang ID, Leong S: Distribution and Effect of Grape Maturity on Organic Acid Content of Red Muscadine Grapes.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1995;43(12):3026–3028. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/jf00060a007>.
11. Kliewer WM: Sugars and Organic Acids of *Vitis vinifera*. Plant Physiology. 1966;41:923–931.
  12. DeBolt S, Cook DR, Ford CM: L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. Proceedings of the National Academy
  13. Ruffner HP, Possner D, Brem S, Rast DM: The physiological role of malic enzyme in grape ripening. Planta. 1984;160:444–448. of Sciences USA. 2006;103:5608–5613.
  14. Jackson DI, Lombard PB: Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality—a review. American Journal of Enology and Viticulture. 1993;44:409–430.
  15. Hale CR: Relation between potassium and the malate and tartrate contents of grape berries. Vitis. 1977;16: 9–19.
  16. Saito K, Kasai Z: Conversion of labeled substrates to sugars, cell wall polysaccharides, and tartaric acid in grape berries. Plant Physiology. 1978;62(2):215–219.
  17. Lorrain B, Chira K, Teissedre P-L: Phenolic composition of Merlot and Cabernet–Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. Food Chemistry. 2011;126:1991–1999. Doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.062
  18. Jordão AM, Ricardo-da-Silva JM, Laureano O: Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (*Vitis vinifera* L.). Vitis. 2001;40:17–22.
  19. Wermelinger B: Nitrogen Dynamics in Grapevine. Physiology and Modeling. Proc. Int. Symp. Nitrogen in grape and wines, Seattle WA, USA (Ed J. M. Rantz) 1999; pp. 23–31.
  20. Feuillat M: The nitrogenous constituents of grapes and wines. Le Vigneron Champenois. 1974;5:201–210.
  21. Spayd SE, Andersen-Bagge J: Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. American Journal of Enology and Viticulture. 1996;47:389–402.
  22. Anelli G: The proteins of must. American Journal of Enology and Viticulture. 1977;28:200–203.
  23. Yokotsuka K, Yoshii M, Aihara T, Kushida T: Isolation and characterization of soluble glycoproteins in red wine. Journal of Fermentation Technology. 1977;55:510–515.
  24. Tattersall DB, Heeswijck R, Hoj PB: Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of

- sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology*. 1997;114:759–769.  
Doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.3.759>
25. Waters EJ, Hayasaka Y, Tattersall DB, Adams KS, Williams PJ: Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;46:4950–4957. Doi: 10.1021/jf980421o
  26. Robinson SP, Davies C: Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2000;6:175–188. Doi: 10.1111/j.1755-0238.2000.tb00177.x
  27. Perestrelo R, Fernandes A, Albuquerque FF, Marques JC, Camara JS: Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: identification of the main odorants compounds. *Analytica Chimica Acta*. 2006;563:154–164. Doi: 10.1016/j.aca.2005.10.023.
  28. Swiegers JH, Pretorius IS: Yeast modulation of wine flavour. *Advances in Applied Microbiology*. 2005;57:131–175. Doi: 10.1016/S0065-2164(05)57005-9.
  29. Lee SJ, Noble AC: Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC–olfactometry and GC–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51:8036–8044. Doi: 10.1021/jf034747v.
  30. Lambrechts MG, Pretorius IS: Yeast and its importance to wine aroma. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2000;21:97–129.
  31. Pardo E, Rico J, Gil, JV, Orejas M: De novo production of six key grape aroma monoterpenes by a geraniol synthase-engineered *S. cerevisiae* wine strain. *Microbial Cell Factories*. 2015;14:136. Doi: 10.1186/s12934-015-0306-5.
  32. Bartowsky E: *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation—moving into the molecular arena. *Australian Journal Grape and Wine Research*. 2005;11:174–187. Doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x.
  33. Liu S: A review: malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*. 2002;92:589–601. Doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01589.x.
  34. Arnink K, Henick-Kling T: Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on successful malolactic conversion in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2005;56:228–237.

35. Arena M, Manca de Nadra M: Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*. 2001; 90:158–162. Doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01223.x.
36. Lonvaud-Funel A: Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS MicrobiololyLetters*. 2001;199:9–13. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10643.x.
37. Pramateftaki P, Metafa M, Kallithraka S, Lanaridis P: Evolution of malolactic bacteria and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentations in a Greek winery. *Letters in Applied Microbiology*. 2006;43:155–160. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01937.x
38. Buttery RG, Seifert RM, Guadagni DG, Ling LC. Characterization of some volatile constituents of bell peppers. *J Agric Food Chem* 1969; 17: 1322-7.
39. Murray KE, Whitfield FB. The occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *J Sci Food Agric* 1975;26: 973-86.
40. Roujou de Boubée D. Recherche sur la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine dans les raisins et les vins. *Approches analytique, biologique et agronomique* 2000.
41. Dunlevy JD, Soole KL, Perkins MV, et al. Two O methyltransferases involved in the biosynthesis of methoxypyrazines: grape-derived aroma compounds important to wine flavour. *Plant Mol Biol* 2010; 74: 77-89.
42. Allen MS, Lacey MJ. Methoxypyrazine grape flavour : Influence of climate, cultivar and viticulture. *Wein-Wiss*1993; 48: 211-3.
43. Ribéreau-Gayon P, Boidron JN, Terrier A. The aroma of Muscat grape variety. *J Agric Food Chem* 1975; 23: 1042-7.
44. Crespan M. The parentage of Muscat of Hamburg. *Vitis* 2003; 42: 193-7.
45. Dugelay I, Gunata Z, Sapis JC, Baumes R, Bayonove C. Etude de l'origine du citronellol dans les vins. *J Int SciVigne Vin* 1992; 26: 177-84.
46. Marais J. Terpenes in the aroma of grapes: a review. *S Afric J Enol Vit* 1983; 1: 49-60.
47. Wilson B, Strauss CR, Williams PJ. The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice, and pulp fractions of some white grape varieties. *Am J Enol Vitic* 1986; 37: 107-11.



48. Park S, Morrison JC, Adams D, Noble AC. Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin of Muscat of Alexandrie grapes during development. *J Agric Food Chem* 1991; 39: 514-8.
49. Garcia Moruno E, Ribaldone M, Di Stefano R, Conterno L, Gandini A. Study of five strains of *Saccharomyces cerevisiae* with regard to their metabolism towards geraniol. *J Int Sci Vigne Vin* 2004; 36: 221-5.
50. Tominaga T, Darriet P, Dubourdieu D. Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis* 1996; 35(4): 207-10.
51. Darriet P, Tominaga T, Lavigne V, Boidron JN, Dubourdieu D. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Frag J* 1995; 10( 6): 385-92.
52. Chira, K., Jourdes, M., Teissedre, P.L., 2012. Cabernet Sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *Eur. Food Res. Technol.* 234, 253–261.
53. Mc Rae, J.M., Falkoner, R.J., Kennedy, J.A., 2010. Thermodynamics of grape and wine tannin interaction with polyproline: implications for red wine astringency. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12510–12518.
54. Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F., Moutounet, M., 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 43, 509–512.
55. Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M., 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36, 781–784.
56. Koussisi, E., Pateros, A., Piggot, J.R., 2003. Sensory flavour discrimination of Greek dry red wines. *J. Sci. Food Agric.* 83, 797–808.
57. Kallithraka, S., Kim, D., Tsakiris, A., Paraskevopoulos, I., Soleas, G., 2011. Sensory assessment and chemical measurement of astringency of Greek wines: correlations with analytical polyphenolic composition. *Food Chem.* 126, 1953–1958.
58. Adams, D.O., Scholz, R.C., 2007. Tannins – the problem of extraction. In: 13th Australian Wine Industry Technical Conference

- 160–164. Adelaide : The Australian wine industry technical conference Inc.
59. Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y., van Leeuwen, C., 2006. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv: agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5077–5086.
  60. Monagas, M., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B., Laureano, O., Ricardo Da Silva, J.M., 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. graciano, tempranillo, and cabernet sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6475–6481.
  61. Kyraleou, M., Kotseridis, Y., Koundouras, S., Chira, K., Teissedre, P.L., Kallithraka, S., 2016. Effect of irrigation regime on perceived astringency and proanthocyanidin composition of skins and seeds of *Vitis vinifera* L: cv. Syrah grapes under semiarid conditions. *Food Chem.* 203, 292–300.
  62. Zarrouk, O., Francisco, R., Pinto-Marijuan, M., Brossa, R., Santos, R.R., Pinheiro, C., Costa, J.M., Lopes, C., Chaves, M.M., 2012. Impact of irrigation regime on berry development and flavonoids composition in Aragonez (*Syn: tempranillo*) grapevine. *Agric. Water Manage.* 114, 18–29.
  63. Nuria Hierro, Angel Gonzales Albert Mas, Jose Guillamon Diversity and evolution of non-Saccharomyces yeast populations during wine fermentation effect on grape ripeness and cold maceration 2015.
  64. Bokulich NA, Hwang CF, Liu S, Boundy-Mills KL, Mills DA (2012) Profiling the yeast communities of wine fermentations using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Enol Vitic* 63:185–194
  65. Crysanthi Pateraki, Spiros Paramithiotis, Agapi Doulkeraki, Stamatina Kallithraka, Yorgos Kotseridis, Eleftherios Drosinos (2014). Effect of sulfur dioxide addition in wild yeast population dynamics and polyphenolic composition during spontaneous red wine fermentation from *Vitis vinifera* cultivar Agiorgitiko.
  66. Reid Griggs, Kerri Steenwerth, David Mills, Dario Cantu, Nikolas Bokulich (2021). Sources and Assembly of Microbial Communities in Vineyards as a Functional Component of Winegrowing.

67. A. Joyeux, S. Lafon Lafourcade, Riebarau- Gayon (1984), Evolution of acetic acid bacteria Durin Fermentation and Storage.
68. Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*
69. Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2012b). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.*
70. Aline Lonvaud-Funel (1999), Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine.
71. Berry DR & Watson DC (1987) Production of organoleptic compounds. *Yeast Biotechnol* (Berry DR, Russell I & Stewart GG, eds), pp. 345–368. Allen & Unwin, London.
72. Dumont A & Dulau L (1997) The role of yeasts in the formation of wine flavours. *ASVO Seminar Advances in Juice Clarification and Yeast Inoculation* (Allen M, Leske P & Baldwin G, eds), pp. 14–16. Wine titles, Adelaide, SA.
73. Lambrechts MG & Pretorius IS (2000) Yeast and its importance to wine aroma – a review. *S Afric J Enol Vitic* 21: 97–129.
74. Pramateftaki PV, Lanaridis P & Typas MA (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J Appl Microbiol* 89: 236–248.
75. Torija MJ, Rozes N, Poblet M, Guillamon JM & Mas A (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 345–352.
76. Ignacio Belda, Iratxe Zorraonaindia, Matthew Perisin, Antonio Palacios and Alberto Acedo (2017), From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept.
77. Calderbank, J.; Keenan, M.H.; Rose, A.H. Plasma-membrane phospholipid unsaturation affects expression of the general amino-acid permease in *Saccharomyces cerevisiae* Y185. *J. Gen. Microbiol.* 1985, 131, 57–65. [CrossRef] [PubMed]
78. Sumby, K.M.; Grbin, P.R.; Jiranek, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chem.* 2010, 121, 1–16. [CrossRef]
79. Trotter, P.J. The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 2001, 21, 97–119.

80. Wen, M.; Anque, G.; Yulin, Z.; Hua, W.; Ye, L.; Hua, L. A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends Food Sci. Technol.* 2014, 40, 6–9.
81. Red Wine Composition. Available online: <https://waterhouse.ucdavis.edu/whats-in-wine/red-wine-composition> (accessed on 22 November 2021).
82. Zoecklein, B.; Fugelsang, K.; Gump, B.; Nury, F. *Wine Analysis and Production*; Chapman & Hall: New York, NY, USA, 1995; pp. 101–104, 422.
83. Cordente, A.G.; Nandorfy, D.E.; Solomon, M.; Schulkin, A.; Kolouchova, R.; Francis, I.L.; Schmidt, S.A. Aromatic higher alcohols in wine: Implication on aroma and palate attributes during chardonnay aging. *Molecules* 2021, 26, 4979. [CrossRef] [PubMed]
85. Schreier, P.; Jennings, W.G. Flavor composition of wines: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1979, 12, 59–111. [CrossRef]
86. Berente, B.; De la Calle García, D.; Reichenbacher, M.; Danzer, K. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *J. Chromatogr. A* 2000, 871, 95–103. [CrossRef]
87. Rentzsch, M.; Wilkens, A.; Winterhalter, P. Non-flavonoid phenolic compounds. In *Wine Chemistry and Biochemistry*; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 509–527. ISBN 9780387741161.
- Counet, C.; Callemien, D.; Collin, S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chem.* 2006, 98, 649–657. [CrossRef]

## ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

1. Yiannis Karakasis MW  
<https://www.karakasis.mw/greek-varieties/agiorgitiko>  
<https://www.karakasis.mw/i-nemea-poy-den-xeroyme>  
<https://www.karakasis.mw/nemea-kai-terroir-mythos-i-pragmatikotita>
2. International Organisation of Vine and wine

<https://www.oiv.int/>

## **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Σταυρακάκης Μ. (2013), Αμπελουργία Εκδόσεις ΤΡΟΠΗ
2. Νικολάου Ν.Α, (2011), Αμπελουργία, Εκδόσεις ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΑΙΔΕΙΑ
3. Τσακίρης Α. (2014), Αμπελουργία, από το αμπέλι στο κρασί Εκδόσεις ΨΥΧΑΛΟΣ