



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΟΙ ΖΥΜΕΣ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΟΤΟΠΟΙΙΑ

Όνοματεπώνυμο
ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΚΟΥΜΠΟΥΡΑΣ
A.M.: 171041

Επιβλέπων καθηγητής:
ΣΕΧΑΝΤΕ ΑΝΤΝΑΝ



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

BACHELOR THESIS

Title

YEASTS IN OENOLOGY AND DISTILLERY

ANTONIS KOUMPOURAS

I.D.: 171041

Supervisor: SHEHADEH ADNAN



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

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει την πτυχιακή εργασία με τίτλο:
ΟΙ ΖΥΜΕΣ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΟΤΟΠΟΙΑ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1ου Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2ου Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3ου Μέλους Επιτροπής)	

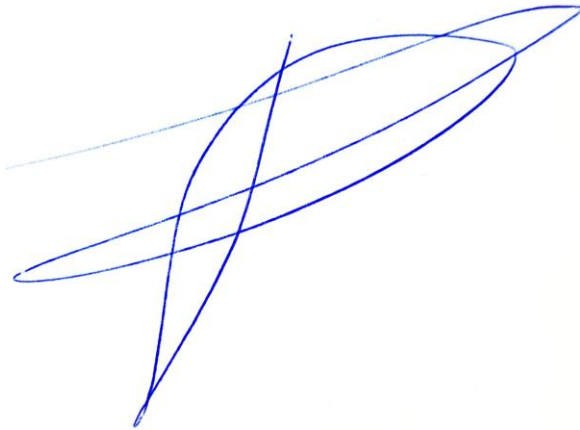
ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογράφοντας Αντώνης Κουμπούρας του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 171041, φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and curves, positioned below the text 'Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας'.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αλκοολική ζύμωση είναι ίσως ο αρχαιότερος βιοτεχνολογικός μετασχηματισμός στην ανθρώπινη ιστορία. Οι χημικές αναλύσεις αρχαιολογικών δειγμάτων στην Κίνα, το Ιράν, την Αίγυπτο ή τη Γεωργία εντοπίζουν την παραγωγή οίνου και άλλων ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση. Η σύγχρονη κατανόησή μας για τη διαδικασία ζύμωσης προέρχεται από το έργο του Γάλλου χημικού Louis Pasteur. Ο Παστέρ ήταν ο πρώτος που απέδειξε πειραματικά ότι τα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση προέρχονται από τη δράση της ζωντανής ζύμης που μετατρέπει τη γλυκόζη σε αιθανόλη.

Η πτυχιακή αυτή αποτελεί μια βιβλιογραφική ανασκόπηση περί των ζυμών όπου γίνεται αναφορά σε:

- Ιστορική αναδρομή για την ανακάλυψη των ζυμών ως μικροοργανισμοί.
- Ταξινόμηση των ζυμών και κατάταξή τους στα είδη και στα γένη.
- Ζωή των ζυμών- συνθήκες ανάπτυξης, - χημική σύσταση, κύκλος ζωής, διατροφή.
- Το γένος *Saccharomyces* και τα στελέχη του.
- Ρόλο των ζυμομυκήτων στις διαδικασίες ζύμωσης.
- Ζύμες Οινοποίησης.
- Εκκινητές ζύμη οίνου *Saccharomyces*.
- Non- *Saccharomyces* Ζυμομύκητες στην παραγωγή οίνου.
- Επίδραση των ζυμών non-*Saccharomyces* στο άρωμα του οίνου.
- Τριπλές μικτές καλλιέργειες ζυμών.
- Ζύμες σε ζυμώσεις αλκοολούχων ποτών.
- Ζύμες στην παραγωγή οινοπνευματωδών ποτών με βάση τα δημητριακά.

Λέξεις κλειδιά: Ζύμες, Οινοποίηση, *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces*, άρωμα του οίνου, αλκοολούχα ποτά, Ταξινόμηση ζυμών, Εκκινητές ζύμωσης

ABSTRACT

Alcoholic fermentation is perhaps the oldest biotechnological transformation in human history. Chemical analyzes of archaeological samples in China, Iran, Egypt or Georgia trace the production of wine and other fermented beverages. Our modern understanding of the fermentation process comes from the work of the French chemist Louis Pasteur. Pasteur was the first to demonstrate experimentally that fermented beverages come from the action of living yeast converting glucose to ethanol.

This thesis is a bibliographic review on yeasts where reference is made to:

- Historical review of the discovery of yeasts as microorganisms.
- Classification of yeasts and their classification into species and genera.
- Life of yeasts - growth conditions, chemical composition, life cycle, nutrition.
- The genus *Saccharomyces* and its strains.
- Role of yeasts in fermentation processes.
- Wine making yeasts.
- *Saccharomyces* wine yeast starters.
- Non-*Saccharomyces* Yeasts in wine production.
- Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on wine aroma.
- Triple mixed yeast cultures.
- Doughs in fermentation of alcoholic beverages.
- Yeasts in the production of grain-based alcoholic beverages.

Key words: Yeasts, Winemaking, *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces*, wine aroma, alcoholic beverages, Classification of yeasts, Fermentation initiators

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής στο Τμήμα Επιστημών Οίνου Αμπέλου και Ποτών της Σχολής Επιστημών τροφίμων

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Σεχάντε Αντνάν υπό την επίβλεψη του οποίου ολοκληρώθηκε η παρούσα μελέτη, για την ανάθεση του αξιόλογου θέματος και την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την υποστήριξη, την αγάπη τους και την εμπιστοσύνη τους στις επιλογές μου.

Αφιέρωση

Τη παρούσα εργασία την αφιερώνω στους γονείς μου.

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 2.1. Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός ζυμομύκητα <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
Σχήμα 2.2 Κεντρικός μεταβολισμός της ζύμωσης σε ζυμομύκητες	30
Σχήμα 3.1 Χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων <i>Saccharomyces</i> και μη <i>Saccharomyces</i> στην οινοποίηση	43
Σχήμα 3.2 Απελευθέρωση πρωτογενών αρωματικών ενώσεων από ζυμομύκητες	46
Σχήμα 4. 1	74

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 3.1. Non <i>Saccharomyces</i> ζύμες και που είναι διαθέσιμες	44
Πίνακας 3.2 non- <i>Saccharomyces</i> είδη ζύμης που περιγράφονται ως παραγωγοί ενζύμων που εμπλέκονται στην απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων από πρόδρομες ουσίες σταφυλιού	47
Πίνακας 3.3 Δευτερεύουσες αρωματικές ενώσεις που παράγονται από ζύμες οίνου non- <i>Saccharomyces</i> .	55
Πίνακας 3.4 Μικτοί εκκινητές σχεδιασμένα να βελτιώνουν το πρωτογενές και το δευτερεύον άρωμα του οίνου.	61
Πίνακας 4.1 Οι κύριοι τύποι ζύμης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή επιλεγμένων αλκοολούχων ποτών.	75
Πίνακας 4.2 Μερικά μέσα ζύμωσης για αλκοολούχα ποτά	79

Table of Contents

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
Ευχαριστίες.....	7
Αφιέρωση.....	8
Κατάλογος Σχημάτων	9
Κατάλογος Πινάκων	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	12
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	12
1.2 Οι ζύμες (μαγιά) είναι μικροοργανισμοί.....	14
1.3 Ο Παστέρ επιδεικνύει τον ρόλο της μαγιάς στη ζύμωση	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	17
ΖΥΜΕΣ- ΖΥΜΩΜΗΚΕΤΕΣ	17
2.1 Εισαγωγή	17
2.2 Ταξινόμηση των ζυμών	18
2.2.1 Τα Μορφολογικά χαρακτηριστικά	18
2.2.2 Φυσιολογικά Χαρακτηριστικά	19
2.3 Η ζωή των ζυμών	21
2.4 Το γένος <i>Saccharomyces</i>	25
2.4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.5 Ο ρόλος των ζυμομυκήτων στις διαδικασίες ζύμωσης.....	30
2.5.1 Διαδικασίες ζύμωσης των ζυμών	31
2.6 Ζύμες Οينوποίησης.....	34
2.6.1 Οικολογία της ζύμης αυθόρμητης ζύμωσης οίνου	36
2.7 Εκκινητές ζύμη οίνου <i>Saccharomyces</i>	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	39
Non- <i>Saccharomyces</i> Ζυμομύκητες	39
3.1 Εισαγωγή	39
3.2 Non- <i>Saccharomyces</i> ζύμες στην παραγωγή οίνου	40
3.3 Επίδραση των ζυμών non- <i>Saccharomyces</i> στο άρωμα του οίνου	44
3.3.1 Επίδραση στο πρωτογενές άρωμα	45
3.3.2 Επίδραση στο δευτερεύον άρωμα	54

3.4 Μικτοί Εκκινητές	59
3.4.1 Πρωτογενές άρωμα	62
3.4.2. Δευτερεύον άρωμα.....	64
3.5 Τριπλές μικτές καλλιέργειες.....	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	73
Ζύμες αλκοολούχων ποτών	73
4.1 Ζύμες σε ζυμώσεις αλκοολούχων ποτών	73
4.2 Ζύμες στην παραγωγή οινοπνευματωδών ποτών με βάση τα δημητριακά.....	76
4.3 Θρεπτική Σύνθεση Μέσων Ζύμωσης	78
4.4 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές.....	79
Βιβλιογραφία.....	81

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας, και χρησιμοποιώντας ένα σύστημα δοκιμής, λάθους και προσεκτικής παρατήρησης, διαφορετικοί πολιτισμοί άρχισαν να παράγουν ποτά που είχαν υποστεί ζύμωση. Το υδρόμελο, ή κρασί από μέλι, παρήχθη στην Ασία κατά τη Βεδική περίοδο (περίπου 1700–1100 π.Χ.), και οι Έλληνες, οι Κέλτες, οι Σάξονες και οι Βίκινγκς παρήγαγαν επίσης αυτό το ρόφημα. Στην Αίγυπτο, τη Βαβυλώνα, τη Ρώμη και την Κίνα, οι άνθρωποι παρήγαγαν κρασί από σταφύλια και μύρα από βυνοποιημένο κριθάρι. Στη Νότια Αμερική, οι άνθρωποι παρήγαγαν chicha από δημητριακά ή φρούτα, κυρίως καλαμπόκι. ενώ στη Βόρεια Αμερική, οι άνθρωποι έφτιαχναν octli (τόρα γνωστό ως "pulque") από αγαύη, ένα είδος κάκτου (Godoy et al. 2003).

Εκείνη την εποχή, οι άνθρωποι γνώριζαν ότι αφήνοντας φρούτα και δημητριακά σε σκεπασμένα δοχεία για μεγάλο χρονικό διάστημα παρήγαγε οίνο και μύρα, αλλά κανείς δεν κατάλαβε πλήρως για την λειτουργία της συνταγής. Η διαδικασία ονομάστηκε ζύμωση, από τη λατινική λέξη *fervere*, που σημαίνει «βράζω». Το όνομα προήλθε από την παρατήρηση ότι τα μείγματα θρυμματισμένων σταφυλιών που φυλάσσονταν σε μεγάλα δοχεία παρήγαγαν φυσαλίδες, σαν να έβραζαν. Η παραγωγή ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση ήταν δύσκολη. Εάν το μείγμα δεν έμεινε αρκετό καιρό, το προϊόν δεν περιείχε αλκοόλη, αλλά αν μείνει για πολύ, το μείγμα σάπισε. Μέσω της εμπειρικής παρατήρησης, οι άνθρωποι έμαθαν ότι η θερμοκρασία και η έκθεση στον αέρα είναι το κλειδί για τη διαδικασία ζύμωσης.

Η αλκοολική ζύμωση είναι ίσως ο αρχαιότερος βιοτεχνολογικός μετασχηματισμός στην ανθρώπινη ιστορία. Οι χημικές αναλύσεις αρχαιολογικών δειγμάτων στην Κίνα, το Ιράν, την Αίγυπτο ή τη Γεωργία εντοπίζουν την παραγωγή οίνου και άλλων ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση στην προέλευση της γεωργίας (McGovern et al., 1996, 2004, 2017). Ωστόσο, ενώ θα

μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η εξημέρωση των αμπελιών και άλλων καλλιεργειών ήταν σκόπιμη, η εξημέρωση των παραγόντων που ευθύνονται για τη ζύμωση του οίνου ήταν σε μεγάλο βαθμό ασυνείδητη. Η συμμετοχή των ζυμομυκήτων στην αλκοολική ζύμωση δεν ήταν γενικά αποδεκτή μέχρι τον XIX αιώνα (Barnett, 2003). Η κυριαρχία των διαδικασιών ζύμωσης χρησιμοποιώντας επιλεγμένες καλλιέργειες εκκίνησης είναι μια ακόμη νεότερη καινοτομία στην ιστορία της οινοποίησης (Kraus et al., 1983). και δεν έγινε ευρέως διαδεδομένη πρακτική μέχρι τη δεκαετία του 1970. Μέχρι σήμερα, σχεδόν όλα τα βιομηχανικά ορεκτικά που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*.

Οι οινοπαραγωγοί παραδοσιακά χρησιμοποιούσαν τα πόδια τους για να μαλακώσουν και να αλέσουν τα σταφύλια πριν αφήσουν το μείγμα να σταθεί σε κουβάδες. Με αυτόν τον τρόπο, μετέφεραν μικροοργανισμούς από τα πόδια τους στο μείγμα. Εκείνη την εποχή, κανείς δεν γνώριζε ότι η αλκοόλη που παρήχθη κατά τη ζύμωση παρήχθη εξαιτίας ενός από αυτούς τους μικροοργανισμούς - έναν μικροσκοπικό, μονοκύτταρο ευκαρυωτικό μύκητα που είναι άορατος με γυμνό μάτι (τη ζύμη). Χρειάστηκαν αρκετές εκατοντάδες χρόνια πριν οι ποιοτικοί φακοί και τα μικροσκόπια φέρουν επανάσταση στην επιστήμη και επιτρέψουν στους ερευνητές να παρατηρήσουν αυτούς τους μικροοργανισμούς.

Τον δέκατο έβδομο αιώνα, ένας Ολλανδός έμπορος ονόματι Antoni van Leeuwenhoek ανέπτυξε φακούς υψηλής ποιότητας και μπόρεσε να παρατηρήσει τη ζύμη για πρώτη φορά. Ο Leeuwenhoek ανακάλυψε ότι η μαγιά αποτελείται από σφαιρίδια που επιπλέουν σε ένα ρευστό, αλλά σκέφτηκε ότι ήταν απλώς τα αμυλούχα σωματίδια του κόκκου από τα οποία παρασκευάστηκε το γλεύκος (Huxley 1894). Αργότερα, το 1755, η μαγιά ορίστηκε στο Λεξικό της Αγγλικής Γλώσσας από τον Σάμιουελ Τζόνσον ως «η ζύμη που μπαίνει στο ποτό για να λειτουργήσει, και στο ψωμί για να ελαφρύνει και να διογκώνεται». Εκείνη την εποχή, κανείς δεν πίστευε ότι η ζύμη ήταν ζωντανή, θεωρήθηκαν απλώς οργανικοί χημικοί παράγοντες που απαιτούνται για τη ζύμωση.

Τον δέκατο όγδοο και τον δέκατο ένατο αιώνα, οι χημικοί εργάστηκαν σκληρά για να αποκρυπτογραφήσουν τη φύση της αλκοολικής ζύμωσης μέσω της αναλυτικής χημείας. Το 1789, ο Γάλλος χημικός Antoine Lavoisier εργαζόταν πάνω σε βασικά θεωρητικά ερωτήματα σχετικά με τους μετασχηματισμούς των ουσιών. Στην αναζήτησή του, αποφάσισε να χρησιμοποιήσει σάκχαρα για τα πειράματά του και απέκτησε νέες γνώσεις σχετικά με τις δομές

και τις χημικές αντιδράσεις τους. Ο Λαβουαζιέ ενδιαφέρθηκε επίσης να αναλύσει τον μηχανισμό με τον οποίο το ζαχαροκάλαμο μετατρέπεται σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα κατά τη ζύμωση. Εκτίμησε τις αναλογίες σακχάρων και νερού στην αρχή της χημικής αντίδρασης και τις συνέκρινε με τις αναλογίες αλκοόλης και διοξειδίου του άνθρακα που ελήφθησαν στο τέλος. Για να προχωρήσει η αλκοολική αντίδραση, πρόσθεσε επίσης πάστα μαγιάς (ή «ζύμη», όπως λεγόταν). Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα σάκχαρα διασπώνται μέσω δύο χημικών οδών: Τα δύο τρίτα των σακχάρων ανήχθησαν για να σχηματίσουν αλκοόλη και το άλλο τρίτο οξειδώθηκε για να σχηματίσει διοξείδιο του άνθρακα (η πηγή των φυσαλίδων που παρατηρήθηκαν κατά τη ζύμωση). Ο Λαβουαζιέ προέβλεψε (σύμφωνα με την περίφημη αρχή του για τη διατήρηση της μάζας) ότι εάν ήταν δυνατός ο συνδυασμός αλκοόλης και διοξειδίου του άνθρακα στις σωστές αναλογίες, το προκύπτον προϊόν θα ήταν ζάχαρη. Το πείραμα παρείχε μια σαφή εικόνα για τις βασικές χημικές αντιδράσεις που απαιτούνται για την παραγωγή αλκοόλης. Ωστόσο, υπήρχε ένα πρόβλημα: Πού χωρούσε η ζύμη στην αντίδραση; Οι χημικοί υπέθεσαν ότι η ζύμη ξεκίνησε την αλκοολική ζύμωση αλλά δεν συμμετείχε στην αντίδραση. Υπέθεσαν ότι η ζύμη παρέμεινε αμετάβλητη καθ' όλη τη διάρκεια των χημικών αντιδράσεων

1.2 Οι ζύμες (μαγιά) είναι μικροοργανισμοί

Το 1815 ο Γάλλος χημικός Joseph-Louis Gay-Lussac έκανε μερικές ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις σχετικά με τη μαγιά. Ο Gay-Lussac πειραματιζόταν με μια μέθοδο που ανέπτυξε ο Nicolas Appert, ζαχαροπλάστης και μάγειρας, για την πρόληψη της σήψης των ευπαθών τροφίμων. Ο Gay-Lussac ενδιαφερόταν να χρησιμοποιήσει τη μέθοδο για να διατηρήσει το ζυθογλεύκος, του χυμού σταφυλιού σε μη ζυμωμένη κατάσταση για αόριστο χρόνο. Η μέθοδος συνίστατο στο βράσιμο του μούστου σε ένα δοχείο και στη συνέχεια στο κλείσιμο του δοχείου που περιέχει το βραστό υγρό για να αποφευχθεί η έκθεση στον αέρα. Με αυτή τη μέθοδο, ο χυμός του σταφυλιού παρέμενε χωρίς ζύμωση για μεγάλα χρονικά διαστήματα όσο το δοχείο κρατούνταν κλειστό. Ωστόσο, εάν εισήχθη μαγιά (ζύμη) στο γλεύκος μετά την ψύξη του υγρού, το μούστο θα άρχιζε να ζυμώνεται. Δεν υπήρχε πλέον καμία αμφιβολία ότι η μαγιά ήταν απαραίτητη για την αλκοολική ζύμωση. Τι ρόλο έπαιξαν όμως στη διαδικασία; Όταν αναπτύχθηκαν πιο ισχυρά μικροσκόπια, η φύση της ζύμης έγινε καλύτερα κατανοητή. Το 1835, ο Charles Cagniard de la Tour, ένας Γάλλος εφευρέτης, παρατήρησε ότι κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης η μαγιά πολλαπλασιάζεται με βλάστηση. Η παρατήρησή του

επιβεβαίωσε ότι η ζύμη είναι μονοκύτταροι οργανισμοί και πρότεινε ότι σχετίζονται στενά με τη διαδικασία της ζύμωσης. Περίπου την ίδια εποχή, ο Theodor Schwann, ο Friedrich Kützing και ο Christian Erxleben κατέληξαν ανεξάρτητα στο συμπέρασμα ότι «τα σφαιρικά, ή ωοειδή, σωμάτια που επιπλέουν τόσο πυκνά στη μαγιά [ζύμη] ήταν ζωντανοί οργανισμοί (Barnett 1998). Η αναγνώριση ότι η μαγιά είναι ζωντανές οντότητες και όχι απλώς οργανικά υπολείμματα άλλαξε την επικρατούσα ιδέα ότι η ζύμωση ήταν μόνο μια χημική διαδικασία. Αυτή η ανακάλυψη άνοιξε το δρόμο για την κατανόηση του ρόλου των ζυμών στη ζύμωση.

1.3 Ο Παστέρ επιδεικνύει τον ρόλο της μαγιάς στη ζύμωση

Η σύγχρονη κατανόησή μας για τη διαδικασία ζύμωσης προέρχεται από το έργο του Γάλλου χημικού Louis Pasteur. Ο Παστέρ ήταν ο πρώτος που απέδειξε πειραματικά ότι τα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση προέρχονται από τη δράση της ζωντανής ζύμης που μετατρέπει τη γλυκόζη σε αιθανόλη. Επιπλέον, ο Παστέρ έδειξε ότι μόνο οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αλκοόλη από το χυμό σταφυλιού και ότι η διαδικασία λαμβάνει χώρα απουσία οξυγόνου. Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ζύμωση είναι μια ζωτική διαδικασία και την όρισε ως αναπνοή χωρίς αέρα (Barnett 2000; Pasteur 1876).

Ο Παστέρ πραγματοποίησε προσεκτικά πειράματα και έδειξε ότι τα τελικά προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης είναι πιο πολυάριθμα και πολύπλοκα από εκείνα που αναφέρθηκαν αρχικά από τον Λαβουαζιέ. Μαζί με την αλκοόλη και το διοξείδιο του άνθρακα, υπήρχαν επίσης σημαντικές ποσότητες γλυκερίνης, ηλεκτρικού οξέος και αμυλικής αλκοόλης. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η ζύμωση ήταν μια οργανική διαδικασία. Για να επιβεβαιώσει την υπόθεσή του, ο Παστέρ αναπαρήγαγε τη ζύμη υπό πειραματικές συνθήκες και τα αποτελέσματά του έδειξαν ότι η ζύμωση και ο πολλαπλασιασμός της ζύμης συμβαίνουν παράλληλα. Συνειδητοποίησε ότι η ζύμωση είναι συνέπεια του πολλαπλασιασμού της ζύμης και ότι η ζύμη πρέπει να είναι ζωντανή για να παραχθεί αλκοόλη. Ο Παστέρ δημοσίευσε τα θεμελιώδη αποτελέσματά του σε μια προκαταρκτική εργασία το 1857 και σε μια τελική έκδοση το 1860, η οποία είχε τον τίτλο (Απομνημονεύματα για την αλκοολική ζύμωση) "Mémoire sur la fermentation alcoolique" (Παστέρ 1857).

Το 1856, ένας άνδρας ονόματι Μπίγκο ζήτησε τη βοήθεια του Παστέρ επειδή αντιμετώπιζε προβλήματα στο αποστακτήριο του, το οποίο παρήγαγε αλκοόλη από ζύμωση ζαχαρότευτλων. Το περιεχόμενο των δοχείων ζύμωσης του ήταν πικρό και αντί για αλκοόλ έπαιρνε μια ουσία

παρόμοια με το ξινόγαλο. Ο Παστέρ ανέλυσε το χημικό περιεχόμενο της ξινής ουσίας και διαπίστωσε ότι περιείχε σημαντική ποσότητα γαλακτικού οξέος αντί για αλκοόλη. Όταν συνέκρινε τα ιζήματα από διαφορετικά δοχεία κάτω από το μικροσκόπιο, παρατήρησε ότι μεγάλες ποσότητες ζύμης ήταν ορατές σε δείγματα από τα δοχεία στα οποία είχε συμβεί αλκοολική ζύμωση. Αντίθετα, στα μολυσμένα δοχεία, αυτά που περιείχαν γαλακτικό οξύ, παρατήρησε «πολύ μικρότερα κύτταρα από τη ζύμη». Το εύρημα του Παστέρ έδειξε ότι υπάρχουν δύο τύποι ζύμωσης: η αλκοολική και η γαλακτική. Η αλκοολική ζύμωση συμβαίνει με τη δράση της μαγιάς, και η γαλακτική με τη δράση βακτηρίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΖΥΜΕΣ- ΖΥΜΩΜΗΚΕΤΕΣ

2.1 Εισαγωγή

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που ταξινομούνται ως μέλη του βασιλείου των μυκήτων και ζουν σε μια μεγάλη ποικιλία οικολογικών κόγχων, κυρίως στο νερό, το έδαφος, τον αέρα και στις επιφάνειες των φυτών και των καρπών. Ίσως το πιο ενδιαφέρον ενδιαίτημα σε αυτό το σημείο είναι το τελευταίο, αφού επεμβαίνουν άμεσα στην αποσύνθεση των ώριμων καρπών και συμμετέχουν στη διαδικασία της ζύμωσης. Σε αυτό το φυσικό περιβάλλον, οι ζυμομύκητες μπορούν να πραγματοποιήσουν ικανοποιητικά τη δραστηριότητα του μεταβολισμού και της ζύμωσης καθώς διαθέτουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και υποστρώματα (Walker et. al. 2016).

Οι ζύμες είναι μία ομάδα μονοκύτταρων μυκήτων με πολύ μικρές διαστάσεις και διάμετρο από 4 έως 10 μm που ποικίλουν στην φυσιολογία και στην δομή. Αποτελούν την πιο σημαντική και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία μικροοργανισμών στον κλάδο τροφίμων και ποτών . Πολλαπλασιάζονται ταχύτατα κάτω από αερόβιες συνθήκες, ενώ απουσία οξυγόνου μετατρέπουν τη γλυκόζη σε αιθυλική αλκοόλη.

Σε διατροφικό επίπεδο, οι ζύμες δεν είναι ιδιαίτερα απαιτητικές σε σύγκριση με άλλους μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια γαλακτικού οξέος. Ωστόσο, η ανάπτυξή τους υποστηρίζεται από την ύπαρξη βασικών ενώσεων όπως ζυμώσιμα σάκχαρα, αμινοξέα, βιταμίνες, μέταλλα και επίσης οξυγόνο. Από μορφολογική άποψη, οι ζυμομύκητες παρουσιάζουν υψηλή μορφολογική απόκλιση, με τα στρογγυλά, ελλειψοειδή και οβάλ σχήματα να είναι τα πιο συνηθισμένα. Στις διαδικασίες ταυτοποίησης, η μικροσκοπική αξιολόγηση είναι η πρώτη πηγή που ακολουθείται από άλλες πιο διακριτικές δοκιμές, όπως μικροβιολογικές και βιοχημικές.

Αποτελούνται από την κυτταρική μεμβράνη, τον πυρήνα, το κυτόπλασμα, το βακίλιο, και τα μιτοχόνδρια. Επειδή είναι μονοκύτταροι οργανισμοί δεν είναι ξεκάθαρο που ανήκουν. Δεν μπορούν να καταταγούν ούτε στο ζωικό βασίλειο ούτε όμως και στο φυτικό βασίλειο. Ανήκουν

σε μία ξεχωριστή ομάδα που ονομάζεται πρώτιστα. Σ' αυτή την ομάδα κατατάσσονται τα βακτήρια και μερικές άλλες κατηγορίες μικροοργανισμών.

2.2 Ταξινόμηση των ζυμών

Οι ζύμες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής τους, στις σπορογόνες και στις άσπορες. Οι σπορογόνες πολλαπλασιάζονται με σπόρια (εγγενώς), και με εκβλαστήσεις (αγενώς), ενώ οι άσπορες παράγονται μόνο με εκβλαστήσεις. Η αγενής αναπαραγωγή των ζυμών γίνεται με εκβλάστηση, με κυτταρική διαίρεση, ή με τον συνδυασμό και των δύο. Οι σπορογόνες ζύμες (εγγενείς) αναπαράγονται τόσο με σπόρια όσο και με εκβλαστήσεις.

Οι ζύμες παλαιότερα ταξινομήθηκαν σε δύο κατηγορίες:

- Η πρώτη κατηγορία αποτελούσε αυτή των ελλειπτικών ζυμών όπου ήταν γνωστή και με τα ονόματα *Saccharomyces cerevisiae*, v. *Ellipsoideus* ή ελλειψοειδής σακχαρομύκητας.
- Η δεύτερη κατηγορία ήταν αυτή των οξοκορυφών και ήταν γνωστή και με τα ονόματα *Saccharomyces apiculata* ή οξυκόρυφος σακχαρομύκητας.

Όμως με το πέρασμα του χρόνου γρήγορα έγινε γνωστό ότι υπήρχαν περισσότερα είδη και γένη. Η κατάταξη των ζυμών στα είδη και στα γένη γίνονται με διάφορα κριτήρια τα οποία στηρίζονται σε:

- Μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων.
- Στα χαρακτηριστικά των καλλιιεργειών
- Στον τρόπο αναπαραγωγής

2.2.1 Τα Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Σχήμα – Μέγεθος

Το σχήμα ενός ζυμομύκητα σε κάποιες περιπτώσεις είναι τόσο χαρακτηριστικό που δεν χρειάζεται να εξεταστεί κανένα άλλο από τα χαρακτηριστικά του. Τα κύτταρα των ζυμών χαρακτηρίζονται ως ωοειδή, σφαιροειδή, στρογγυλά, – ελλειψοειδή, κυλινδρικά, επιμήκη, οξυκόρυφα, αψιδωτά. Παραδείγματα ζυμών αποτελούν τα οξυκόρυφα κύτταρα των *Saccharomycodes*, *Nadsonia*, *Hanseniasspora*, τα τριγωνικά κύτταρα του *Trigonopsis* και τα φιαλόμορφα κύτταρα των *Pityosporum*. Υπάρχουν όμως και αρκετές περιπτώσεις που το σχήμα από μόνο του δεν αρκεί για να δώσει τις κατάλληλες πληροφορίες για μία ζύμη. Με αποτέλεσμα

να εξεταστεί και ο τρόπος που παράγεται η συγκεκριμένη ζύμη. Εξετάζεται λοιπόν ο τρόπος αναπαραγωγής των ζυμών **σε υγρό υπόστρωμα**, και ο τρόπος παραγωγής των ασκοσπορίων σε **στερεό υπόστρωμα**. Ως υγρό υπόστρωμα χρησιμοποιείται σταθεροποιημένο με παστερίωση γλεύκος των σταφυλιών. Εκτός από το γλεύκος μπορούν να χρησιμοποιηθούν και συνθετικά υποστρώματα ανάλογα πάντα με τις επικρατούσες συνθήκες. Μερικά υποστρώματα γι' αυτή την χρήση είναι η σακχαρόζη, το κιτρικό οξύ, εκχυλίσματα ζυμών, και φυσικά το νερό.

Χαρακτηριστικά Καλλιεργειών

Ως υγρά υποστρώματα χρησιμοποιούνται κυρίως εκχύλισμα από βύνη ή μίγμα γλυκόζης. Στο υγρό υπόστρωμα η ταυτοποίηση των ζυμών γίνεται όταν σχηματίζονται ίζημα, δακτύλιος ή υμένια. Η ύπαρξη ζυμών αποδεικνύεται όταν σχηματίζεται ένα υμένιο το οποίο είναι ενδεικτικό της ανάγκης των ζυμών σε οξυγόνο. Εμφανίζεται περίπου μετά από 2 – 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό στην επιφάνεια του υγρού.

Η ανάπτυξη των ζυμών σε στερεό υπόστρωμα είναι μία μυκοειδής ανάπτυξη και συνδέεται με την ύπαρξη κάψουλας στα κύτταρα. Η μυκοειδής αυτή ανάπτυξη είναι αποτέλεσμα παραγωγής εξωκυττάρων πολυσακχαριτών και χαρακτηρίζεται από την μυκοειδή, βουτυρώδη και εύθραυστη υφή της. Άλλα χαρακτηριστικά ζυμών σε στερεό υπόστρωμα είναι το χρώμα, τα περισσότερα γένη έχουν χρώμα άσπρο, κρεμ ή ανοικτό καφέ εξαίρεση αποτελούν τα γένη *Rhodotorula* και *Metschnikowia pulcherrima* τα οποία παράγουν χρώματα κίτρινο, πορτοκαλί και καροτινοειδές το πρώτο και ερυθρό το δεύτερο. Συνήθως η ανάπτυξη των καλλιεργειών σε στερεό υπόστρωμα γίνεται μετά από 2 – 3 ημέρες. Υπάρχουν όμως και ζύμες οι καλλιέργειες των οποίων δίνουν αποτελέσματα μετά από 8 ημέρες και είναι αναγκαίο να γίνει και επανάληψη αυτών μετά από περίπου 6 εβδομάδες.

Σχηματισμός Σπορίων: Το κριτήριο αυτό αποτελεί βασική προϋπόθεση για να διαχωριστούν οι σπορογόνες ζύμες (*Saccharomycetaceae*) από τις άσπορες ζύμες (*Cryptococcaceae*).

2.2.2 Φυσιολογικά Χαρακτηριστικά

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά δίνουν τη δυνατότητα να αναγνωρισης του είδους της κάθε ζύμης γρήγορα και με μεγάλη ευκολία. Όμως υπάρχουν κάποια γένη ζυμών

τα οποία δεν μπορούν να αναγνωριστούν μ' αυτόν τον τρόπο. Έτσι χρησιμοποιούνται διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου, με ευαισθησία στις συνθήκες αερισμού και θερμοκρασίας αλλά με ιδιαίτερες απαιτήσεις στους αυξητικούς παράγοντες και με ανθεκτικότητα στις ανασταλτικές ουσίες, για να γίνει τελικά η ταυτοποίηση του γένους:

- **πηγή ενώσεων άνθρακα**

Από μελέτες που έχουν γίνει έχει αποδεχτεί ότι το πιο διαδεδομένο χαρακτηριστικό για να διακριθούν οι οικογένειες των ζυμών μεταξύ τους είναι η ικανότητα ή η ανικανότητα μιας ζύμης να ζυμώνει τα σάκχαρα σχηματίζοντας αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Η κύρια δοκιμή λοιπόν για να πιστοποιηθεί η ύπαρξη ενζυματικών συστημάτων είναι η οξειδωτική χρησιμοποίηση των σακχάρων. Είναι μία δοκιμή πολύ ευαίσθητη (περισσότερο από την αλκοολική ζύμωση), η οποία δίνει την δυνατότητα να μην χρησιμοποιηθεί κιόλας μεγάλος αριθμός ενώσεων άνθρακα για την λειτουργία της. Η διαδικασία αυτή εξαρτάται από την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης προς την επιλεγόμενη ουσία του άνθρακα και από την παρουσία του ενζυματικού συστήματος. Για να αναγνωριστεί και να ταξινομηθεί η προς εξέταση ζύμη δημιουργείται μία καθαρή καλλιέργεια αυτής της ζύμης, στην συνέχεια εμβολιάζεται σε κατάλληλο συνθετικό υπόστρωμα στο οποίο είναι ενσωματωμένη η ουσία αναγνώρισης.

- **Πηγή αζωτούχων ενώσεων**

Μια άλλη κατηγορία ταυτοποίησης των ζυμών είναι αυτή που βασίζεται στις πηγές των αζωτούχων ενώσεων και κυρίως των αζωτούχων αλάτων. Οι περισσότερες ζύμες όμως δεν χρησιμοποιούν τα νιτρικά άλατα, μόνο δύο γένη ταυτοποιούνται από την πηγή αζωτούχων ενώσεων. Το πρώτο γένος είναι το γένος *Hansenula* που τα αφομοιώνει και το δεύτερο γένος είναι το γένος *Pichia* που δεν τα αφομοιώνει. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται περιέχει γλυκόζη, όξινο φωσφορικό κάλιο, θειικό μαγνήσιο, νιτρικό κάλιο, χλωριούχο ασβέστιο και χλωριούχο μαγνήσιο.

- **Χρήση αυξητικών παραγόντων**

Ορισμένες ζύμες ταυτοποιούνται με την χρήση αυξητικών παραγόντων με αποτέλεσμα όχι μόνο να αντιδρούν θετικά αλλά και να αναπτύσσονται με την παρουσία τους. Η μέθοδος για την παρακολούθηση και κατ' επέκταση την ταυτοποίηση τους είναι η μέθοδος της νεφελομετρίας στην οποία παρακολουθείται ο αριθμός των κυττάρων των ζυμών που παράγονται. Οι αυξητικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι οι βιταμίνες θειαμίνη, βιοτίνη, πυροδοξίνη, παντοθενικό

οξύ και νικοτιναμίδη. Με τη μέθοδο αυτή ταυτοποιούνται οι εξώτροφες ζύμες δηλαδή οι ζύμες που αναπτύσσονται μόνο με τις βιταμίνες.

- Χρήση θειώδη ανυδρίτη

Η ταυτοποίηση με την δοκιμή αυτή γίνεται ανάλογα με την ανθεκτικότητα των ζυμών στον θειώδη ανυδρίτη. Ανάλογα με την ανθεκτικότητά τους χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- Ζύμες που αναπτύσσονται σε υψηλά επίπεδα θειώδη ανυδρίτη που κυμαίνονται από 250 mg/L έως 400 mg/L για παράδειγμα οι *Saccharomyces oniformis*, *Saccharomyces bailii*, *Saccharomycodes ludwigii*
- Ζύμες που αντέχουν μέχρι 150 mg/L θειώδη ανυδρίτη για παράδειγμα οι *Saccharomyces ellipsoideus*, *Torulopsis stellata*
- Ζύμες που αντέχουν μέχρι 100 mg/L θειώδη ανυδρίτη για παράδειγμα οι *Saccharomyces rosei*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*

2.3 Η ζωή των ζυμών

- Συνθήκες ανάπτυξης ζυμών

Η ανάπτυξη και αύξηση των ζυμών επηρεάζεται άμεσα από τις συνθήκες που επικρατούν στο θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύσσονται. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τις συνθήκες αυτές είναι η παρουσία ή απουσία οξυγόνου, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, η πηγή άνθρακα, η πηγή αζώτου, η θερμοκρασία, το pH, η ύπαρξη ανταγωνιστών κ.ά.

Ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία οξυγόνου, οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί, όπως είναι και οι ζύμες, μπορούν να ακολουθήσουν δύο διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια για την ενέργεια που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους. **Το πρώτο** είναι το μονοπάτι της αναπνοής, που ξεκινά με την γλυκόλυση και καταλήγει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, και **το δεύτερο** είναι το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης, που ξεκινά με την γλυκόλυση και καταλήγει στην αλκοολική ζύμωση (Sarris & Papanikolaou, 2016).

Η πηγή άνθρακα είναι αυτή που ενεργοποιεί τον μεταβολισμό των ζυμών. Η πιο σημαντική πηγή άνθρακα για τις ζύμες είναι τα σάκχαρα. Στην παραγωγή του οίνου, τα σάκχαρα φτάνουν τα 150 έως 250 g/l γλεύκους, ανάλογα με την ποικιλία, τον βαθμό ωρίμανσης, τις κλιματολογικές και εδαφικές συνθήκες, τις καλλιεργητικές τεχνικές κ.ά (Σουλής, 1992; Τσακίρης, 1988). Η πηγή αζώτου είναι εξίσου σημαντική για τους μικροοργανισμούς και παρόλο που το γλεύκος είναι

πλούσιο σε άζωτο, πολλές φορές οι οινοποιοί επιλέγουν να προσθέσουν αμμωνιακά άλατα, καθώς τα ιόντα αμμωνίου αποτελούν την πιο άμεσα αφομοιώσιμη μορφή αζώτου, ή θειαμίνη, η οποία επιδρά και στην μείωση της δέσμευσης του θειώδη ανυδρίτη.

Όσον αφορά την θερμοκρασία, είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την ανάπτυξη των ζυμών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από το εύρος στο οποίο μπορούν να αναπτυχθούν σε ψυχρόφιλες, μεσόφιλες, και θερμόφιλες (Walker, 1998). Εκτός αυτού του εύρους θερμοκρασιών, σε πολλούς μικροοργανισμούς μπορεί να επέλθει και κυτταρικός θάνατος. Οι περισσότερες ζύμες ανήκουν στην κατηγορία των μεσόφιλων με εύρος θερμοκρασιών 5-48 οC, με βέλτιστη μικροβιακή αύξηση στις θερμοκρασίες μεταξύ 30-40 οC. Βιομηχανικά στην οινοποίηση, συνήθως οι ζύμες ενεργοποιούνται σε θερμοκρασία περίπου 35-37 οC, ενώ η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται ανάλογα με το είδος του οίνου σε θερμοκρασίες 12-18 οC.

Όσον αφορά το pH, γενικότερα οι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται από διαφορετικές τιμές για την ανάπτυξή τους. Συγκεκριμένα, οι ζύμες κυμαίνονται σε βέλτιστες τιμές pH μεταξύ 4,5-6,0 με μέγιστες δυνατές τιμές 8,0-8,5 και ελάχιστες 1,5- 3,5. Στην παραγωγή του οίνου, το pH του γλεύκους έχει τιμές μεταξύ 3,2-3,5 το οποίο έχει μικρή επίδραση στην δράση των ζυμομυκήτων (Adams & Moss, 2008; Jay, 2000; Νυχάς, 2014; Jackson, 2008).

- Χημική σύσταση ζυμών

Η χημική σύσταση των ζυμών διαφέρει ανάλογα με το είδος τους και το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο καλλιεργούνται. Οι ζύμες περιέχουν νερό σε ποσοστό 75% και ξηρή ουσία σε ποσοστό 25%. Η ξηρή ουσία αποτελείται από:

- Υδατάνθρακες (25 – 50 %)
- Πρωτεΐνες (30 – 75%)
- Ανόργανες ουσίες (5 – 10%)
- Λιπίδια (2 – 5%)
- Ένζυμα
- Βιταμίνες

- Ο κύκλος ζωής των ζυμών

Ο κύκλος ζωής των ζυμών περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

i. Λανθάνουσα φάση: Η φάση προσαρμογής των κυττάρων στις καινούριες συνθήκες όπου δεν συμβαίνει καμία κυτταροδιαίρεση. Καθυστερεί για μικρό χρόνο η έναρξη του πολλαπλασιασμού τους.

ii. Φάση επιτάχυνσης: Στη φάση αυτή αρχίζει σιγά – σιγά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.

iii. Λογαριθμική φάση: Η φάση αυτή αντιπροσωπεύει εξ' ολοκλήρου τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η θνησιμότητα είναι μηδενική.

iv. Φάση στασιμότητας: Στη φάση αυτή δεν παρατηρείται καμία ανάπτυξη των κυττάρων αλλά ούτε και μείωση.

v. Φάση μείωσης: Ο πληθυσμός των κυττάρων αρχίζει να μειώνεται. Γίνεται αυτόλυση των κυττάρων και ελευθερώνουν τα συστατικά τους.

- Η διατροφή των ζυμών

Οι ζύμες παίρνουν όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται από το γλεύκος. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης ορισμένα από τα θρεπτικά αυτά στοιχεία εξαντλούνται και είναι απαραίτητο να προστεθούν ξανά ώστε η ζύμη να ολοκληρώσει το έργο της. Τα κυριότερα θρεπτικά συστατικά είναι:

Πηγές άνθρακα

Οι ζύμες όπως είναι γνωστό είναι ετερότροφοι οργανισμοί και δεν αφομοιώνουν το διοξείδιο του άνθρακα όπως τα φυτά.

Είναι αναγκαίο οι ενώσεις του άνθρακα να είναι διαθέσιμες στο υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται οι ζύμες. Οι απαιτήσεις των ζυμών εξαρτώνται από την παρουσία ή την απουσία οξυγόνου. Σε αερόβιο περιβάλλον όπου η ζύμη αναπνέει έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιήσει την ενέργεια και την ύλη από ένα αρκετά μεγάλο αριθμό μορίων, όπως είναι τα σάκχαρα, τα αμινοξέα, η αλκοόλη. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί την αναπνοή των ζυμών.

Σε αναερόβιο περιβάλλον η ζύμη χρησιμοποιεί μόνο κάποια σάκχαρα. Τα σάκχαρα τα οποία χρησιμοποιούνται είναι κυρίως οι εξόζες και πιο συγκεκριμένα η D - γλυκόζη, η D - φρουκτόζη και η D – μαννόζη και παράγουν αλκοόλη, διοξείδιο του άνθρακα και δευτερεύοντα προϊόντα, αυτό το φαινόμενο αποτελεί την αλκοολική ζύμωση.

Πηγές αζώτου

Οι ζύμες για να πολλαπλασιαστούν καταναλώνουν πολύ μεγάλη ποσότητα αζωτούχων συστατικών προερχόμενη από το γλεύκος με αποτέλεσμα το αμμωνιακό άζωτο να είναι πρώτο σε κατανάλωση και να εξαντλείται ήδη από την πρώτη μέρα που λαμβάνει χώρα η ζύμωση.

Ο σκοπός του αζώτου είναι να βοηθήσει τις ζύμες στον πολλαπλασιασμό τους γι' αυτό το λόγο κιάλας όσο περισσότερο άζωτο έχουν οι ζύμες στην διάθεση τους τόσο πιο έντονη είναι η ζυμωτική τους ικανότητα. Συνήθως η προσθήκη του αζώτου γίνεται πριν αρχίσει η ζύμωση γιατί το άζωτο εξαντλείται από την πρώτη κιάλας ημέρα.

Ανόργανα συστατικά

Εκτός από τα ανόργανα άλατα υπάρχουν και πολλά ιχνοστοιχεία που λαμβάνουν μέρος έστω και σε πολύ μικρές ποσότητες για την ανάπτυξη των ζυμών.

Η τέφρα περιέχει κάποια όμως ιχνοστοιχεία όπως αργίλιο, βρώμιο, χρώμιο, χαλκός, ψευδάργυρος τα οποία τελικά συμβάλουν έστω και σε πάρα πολύ μικρές ποσότητες για τον πολλαπλασιασμό των ζυμών.

Οξυγόνο

Η ζύμη για να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί έχει την ανάγκη του οξυγόνου αλλά απαιτείται και ένας μεγάλος αριθμός ζυμομυκήτων. Ο πληθυσμός αυτός επιτυγχάνεται με το αερόβιο περιβάλλον.

Είναι απαραίτητο να τονιστεί ότι κατά την αλκοολική ζύμωση δεν υπάρχει απόλυτος διαχωρισμός ανάμεσα στην αναπνοή και στη ζύμωση ή ανάμεσα στο αερόβιο ή στο αναερόβιο περιβάλλον.

Θερμοκρασία

Οι ζυμομυκήτες είναι οργανισμοί μεσόφιλοι και ψυχρόφιλοι και μπορούν να αναπτυχθούν ή σε χαμηλές θερμοκρασίες (20° C) ή σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται ανάμεσα στο 20 – 45⁰ C ανάλογα πάντα στο γένος που ανήκουν. Επομένως, είναι αναγκαίο να επιλέγετε η κατάλληλη θερμοκρασία έτσι ώστε να μπορέσει να αποφευχθεί η διακοπή της ζύμωσης.

pH

Η οξύτητα του θρεπτικού υλικού μέσα στην οποία βρίσκεται ο πληθυσμός των ζυμομυκήτων είναι μία σημαντική παράμετρος για τον πολλαπλασιασμό και τις διάφορες δραστηριότητες τους. Το άριστο pH για να αναπτυχθούν οι ζύμες

κυμαίνεται μεταξύ του 4 έως του 6.

Συνδυασμός pH και θερμοκρασίας

Ο σωστός συνδυασμός μεταξύ του pH και της θερμοκρασίας της ζύμωσης του γλεύκους τότε ασκεί σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των ζυμομυκήτων αλλά και στην ποιότητα του οίνου που θα παραχθεί.

Συγκέντρωση σακχάρων

Άλλος ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των ζυμών είναι η συγκέντρωση των σακχάρων στο γλεύκος. Οι πολύ υψηλές ή πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σακχάρων δεν είναι ευνοϊκές ούτε για την ανάπτυξη των ζυμών αλλά ούτε και για την ταχύτητα της ζύμωσης και πολλές φορές παρατηρείται διακοπή της ζύμωσης.

2.4 Το γένος *Saccharomyces*

Το *Saccharomyces* είναι ένα γένος στο βασίλειο των μυκήτων που περιλαμβάνει πολλά είδη ζυμομυκήτων . Το *Saccharomyces* είναι από τα λατινικά που σημαίνει μύκητες ζάχαρης. Πολλά μέλη αυτού του γένους θεωρούνται πολύ σημαντικά στην παραγωγή τροφίμων. Ένα παράδειγμα είναι το *Saccharomyces cerevisiae*, το οποίο χρησιμοποιείται στην παρασκευή οίνου, ψωμιού και ζύθου.

Επιστημονική ταξινόμηση

Βασίλειο: Μύκητας **Φύλο:** Ασκομύκητα **Υπόφυλο:** Σακχαρομυκοτίνη

Κατηγορία: Σακχαρομύκητες **Σειρά:** Σακχαρομυκετάλες

Οικογένεια: *Saccharomycetaceae* **Γένος:** *Saccharomyces*

Είδη

- *Saccharomyces arboricolus* *Saccharomyces bayanus*
- *Saccharomyces bulderi* *Saccharomyces cariocanus*
- *Saccharomyces cariocus* *Saccharomyces cerevisiae*
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* *Saccharomyces chevalieri*
- *Saccharomyces dairenensis* *Saccharomyces ellipsoideus*
- *Saccharomyces eubayanus* *Saccharomyces exiguus*

Ωστόσο, υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των χαρακτηριστικών των στελεχών που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο και στη βιομηχανία, καθώς και στις συνθήκες ανάπτυξης που απαντώνται συνήθως και στα δύο περιβάλλοντα. Επομένως, αν και η βιοτεχνολογία της ζύμης οίνου μπορεί να επωφεληθεί από τα περισσότερα προηγμένα εργαλεία που αναπτύχθηκαν σε άλλους κλάδους, η μεταφορά γνώσης δεν είναι πάντα απλή.

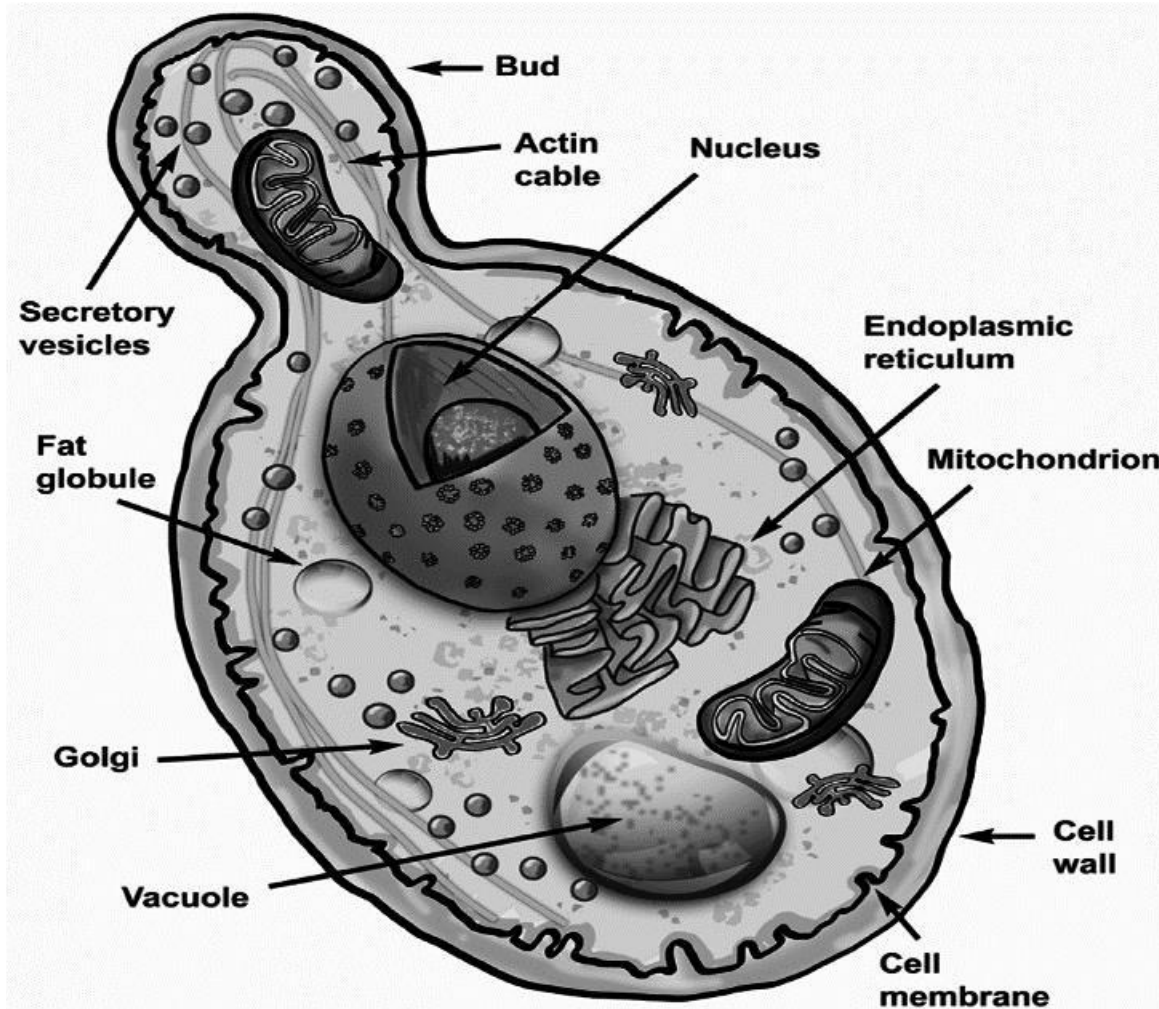
Επιπλέον, επί του παρόντος αναγνωρίζεται ότι άλλα είδη ζύμης (γνωστά ως non-Saccharomyces στο πεδίο) μπορεί να είναι πολύ σημαντικά για την παραγωγή της αλκοολικής ζύμωσης του οίνου (Ciani et al., 2010). Μόλις πρόσφατα αυτό το εύρημα άρχισε να αξιοποιείται βιομηχανικά.

Γενετικά και γονιδιωματικά χαρακτηριστικά των στελεχών *S. cerevisiae* οίνου.

Το απλοειδές γονιδίωμα του *S. cerevisiae* σχήμα 1 περιέχει περίπου 12 Mbp και κατανέμεται σε 16 χρωμοσώματα.

Ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνη είναι περίπου 6000 (Goffeau et al., 1996). Το τρέχον γονιδίωμα του *S. cerevisiae* (και ένα μικρό σύνολο ειδών ζυμομύκητα γνωστό ως post-WGD) είναι το αποτέλεσμα ενός γεγονότος διπλασιασμού γονιδιώματος (WGD για διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος) σε ένα προγονικό είδος, το οποίο οδήγησε σε ένα τετραπλοειδές κύτταρο (Wolfe and Shields, 1997). Το μεγαλύτερο μέρος του πλεονάζοντος γονιδίου χάθηκε στη συνέχεια, αλλά ακόμα περίπου το 13% των πρωτεϊνών αυτού του είδους αποτελούν ζεύγη που προέρχονται από αυτόν τον αρχαίο διπλασιασμό (Wolfe and Shields, 1997). Σε πολλές περιπτώσεις, αυτό το γεγονός φαίνεται να επέτρεψε την εξειδίκευση τουλάχιστον ενός από τα αντίγραφα (Kellis et al., 2004). Αυτός ο διπλασιασμός φαίνεται επίσης να αποτελεί τη βάση μιας αύξησης της γλυκολυτικής ροής, η οποία τελικά θα οδηγήσει στο φαινόμενο Crabtree (Conant and Wolfe, 2007· Hagman et al., 2013).

Στο σχήμα 2.1 φαίνονται τα κύρια χαρακτηριστικά ενός ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.



Σχήμα 2.1. Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Walker, 1998; Walker, 2011)

Πρόσφατα ευρήματα υποδηλώνουν ότι όλα τα είδη *Saccharomyces* προέρχονται από την Ασία, με ένα μόνο συμβάν εκτός Κίνας ως προέλευση όλων των μη κινεζικών στελεχών *S. cerevisiae* (Peter et al., 2018). Υπάρχει μια ισχυρή γενετική σχέση μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών οίνου, τα οποία εμπίπτουν σε ένα κλάδο Οίνου/Ευρωπαϊκού στη μία πλευρά του φυλογενετικού δέντρου *S. cerevisiae*. Η συγκριτική γονιδιωματική υποδεικνύει επίσης ότι τα σημερινά απομονωμένα στελέχη οίνου είναι μονοφυλετικά λόγω της συμφόρησης του πληθυσμού κατά τη διαδικασία εξημέρωσης (Borneman et al., 2016; Peter et al., 2018).

Αν και το είδος μπορεί να παρουσιάσει διακύμανση στην πλοειδία καθώς και στις ανευπλοειδίες, τα περισσότερα προϊόντα απομόνωσης ζύμης οίνου είναι καθαρά διπλοειδή. Υπάρχουν επίσης μερικά απλοειδή στελέχη, με πολύ λίγα παραδείγματα υψηλότερης πλειδίας.

Όλα αυτά τα απλοειδή στελέχη διαγράφονται για τον τόπο ΗΟ. Οι συγγραφείς βρήκαν επίσης πολλά ανευπλοειδή στελέχη (περίπου το 15% των απομονώσεων οίνου), τα περισσότερα από τα οποία έφεραν ένα επιπλέον αντίγραφο ενός μόνο χρωμοσώματος (Peter et al., 2018).

Κύκλος ζωής *S.cerevisiae*

Το *S. cerevisiae* αναφέρεται συχνά ως "η εκκολαπτόμενη ζύμη", παρόλο που αυτός είναι ο τρόπος βλαστικής ανάπτυξης για πολλά άλλα είδη ζύμης. Η αναπαραγωγή με εκβλάστηση καθιστά δυνατή τη διάκριση των μητρικών κυττάρων από τα θυγατρικά κύτταρα. Τα μητρικά κύτταρα έχουν μια πεπερασμένη αντιγραφική διάρκεια ζωής η οποία εξαρτάται από τον γονότυπο και το περιβάλλον, αλλά η οποία είναι τυπικά μόνο μερικές δεκάδες διαιρέσεις (Austriaco, 1996). Τα κύτταρα *S. cerevisiae* μπορούν να πολλαπλασιαστούν βλαστικά τόσο σε απλοειδή όσο και σε διπλοειδή μορφή. Ωστόσο, η κυρίαρχη μορφή στη φύση είναι διπλοειδής και δεν υπάρχουν εμπορικά απλοειδή οινολογικά στελέχη. Η εκβλάστηση ρυθμίζεται γενετικά και η επιλογή της θέσης εκβλάστησης εξαρτάται από το ιστορικό και τον γονότυπο του ζευγαρώματος του κυττάρου (Madden and Snyder, 1998). Εκτός από τη γνωστή μονοκύτταρη ελλειψοειδή μορφή, *S. Cerevisiae* μπορεί να αναπτύξει άλλες μορφολογίες (Voordeckers et al., 2012). Οι προσκολλητίνες ή οι φλοκουλίνες, που κωδικοποιούνται από την οικογένεια γονιδίων FLO παίζουν καθοριστικό ρόλο στα μοτίβα ανάπτυξης του *S. cerevisiae*, καθώς και σε τεχνολογικά σχετικούς φαινοτύπους συσσωμάτωσης, όπως ο σχηματισμός φλοιού κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του οίνου σέρι (Fidalgo et al., 2006) ή η κροκίδωση. (Govender et al., 2010). Κάτω από κατάλληλες συνθήκες, που συνήθως περιλαμβάνουν λιμοκτονία, τα διπλοειδή κύτταρα μπορεί να εμφανίσουν μείωση, προκαλώντας έναν ασκό με μια τετράδα ασκοσπορίων, δύο από αυτά με ένα α και δύο με έναν τύπο άλφα ζευγαρώματος. Στα ομοθαλικά στελέχη, τα οποία είναι τα πιο κοινά στη φύση, ένα απλοειδές μητρικό κύτταρο υφίσταται μια αλλαγή τύπου ζευγαρώματος (ξεκινώντας από τη δεύτερη κυτταρική διαίρεση) μετά από κάθε μιτωτική διαίρεση (Haber, 2012).

Έτσι, σχεδόν αμέσως μετά τη βλάστηση, δημιουργείται ένα νέο ομόζυγο διπλοειδές στέλεχος από τη σύντηξη δύο γενετικά πανομοιότυπων κυττάρων. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως

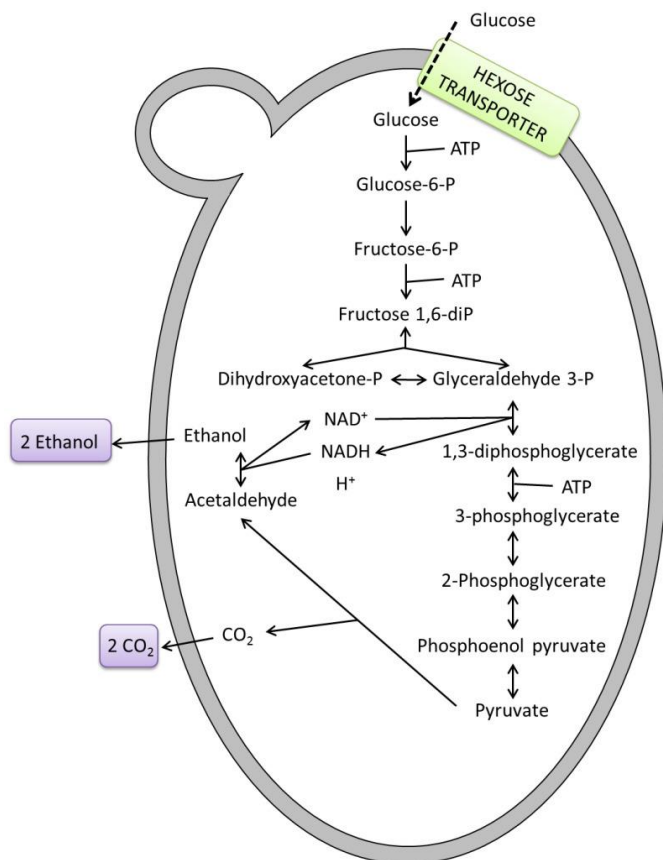
απλο-εαυτός. Επιπλέον, τα κύτταρα μπορούν να επανέλθουν στη διπλοειδή κατάσταση με αυτομίξη ή υβριδισμό μεταξύ των σπορίων εντός του ασκού. και αμφίμιξη, ή υβριδισμός μεταξύ άσχετων απλοειδών κυττάρων (Knop, 2006). Η εναλλαγή τύπου ζευγαρώματος προωθείται από ένα σπάσιμο διπλού κλώνου DNA που καταλύεται από την ενδονουκλεάση HO στον ενεργό τόπο ζευγαρώματος (MAT), που βρίσκεται στο χρωμόσωμα III.

Μετά από κάθε μιτωτική διαίρεση, μια διαφορετική σιωπηλή κασέτα τύπου ζευγαρώματος (HMR ή HML), που βρίσκεται κοντά σε μία από τις δύο άκρες του ίδιου χρωμοσώματος, χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη δημιουργία του εναλλακτικού τύπου ζευγαρώματος (Haber, 2012). Πολλά εργαστηριακά στελέχη είναι ετεροθαλικά, δηλαδή μπορούν να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον ως απλοειδή, λόγω μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας στο γονίδιο ho. Ορισμένα στελέχη οίνου είναι ετερόζυγα για τον τόπο HO/ho και αυτό έχει παράσχει εργαλεία για τη δημιουργία απλοειδών παραγώγων ζύμης οίνου ως ερευνητικά εργαλεία (Mangado et al., 2018).

2.5 Ο ρόλος των ζυμομυκήτων στις διαδικασίες ζύμωσης

Οι διαδικασίες ζύμωσης για την παραγωγή οίνων, μύρας και μηλίτη πραγματοποιούνται παραδοσιακά με τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*, την πιο κοινή και εμπορικά διαθέσιμη ζύμη. Είναι ευρέως γνωστά για τη ζυμωτική συμπεριφορά και τα τεχνολογικά τους χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την απόκτηση προϊόντων ομοιόμορφης και τυπικής ποιότητας. Πολλά άλλα σημαντικά βιομηχανικά προϊόντα είναι αποτέλεσμα ζύμωσης, όπως το γιαούρτι, το τυρί, το ψωμί, ο καφές. Οι ζύμες διαδραματίζουν επίσης βασικό ρόλο στην επεξεργασία λυμάτων ή στην παραγωγή βιοκαυσίμων.

Από βιοχημική άποψη, η ζύμωση πραγματοποιείται από ζυμομύκητες (και ορισμένα βακτήρια) όταν το πυροσταφυλικό που παράγεται από το μεταβολισμό της γλυκόζης διασπάται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (σχήμα 2.2).



Σχήμα 2.2 Κεντρικός μεταβολισμός της ζύμωσης σε ζυμομύκητες

2.5.1 Διαδικασίες ζύμωσης των ζυμών

2.5.1.1 Αλκοολικές Ζυμώσεις

Η παραγωγή αλκοολούχων ποτών από ζυμώσιμες πηγές άνθρακα από ζύμη είναι η παλαιότερη και πιο σημαντική από οικονομική άποψη από όλες τις βιοτεχνολογίες. Η ζύμη παίζει ζωτικό ρόλο στην παραγωγή όλων των αλκοολούχων ποτών. Η ζύμη διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην παραγωγή όλων των αλκοολούχων ποτών και η επιλογή των κατάλληλων στελεχών ζύμης είναι απαραίτητη όχι μόνο για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης αλκοόλης, αλλά και για τη διατήρηση της αισθητικής ποιότητας του ποτού .

Ζύμωση Οίνου

Στη ζύμωση οίνου, χρειάζονται στελέχη με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, για παράδειγμα, παραγωγοί υψηλά επίπεδα αιθανόλης για να φτάσουν σε τιμές 11–13% v/v, που συνήθως βρίσκονται σε αυτό το ποτό.

Από την άλλη πλευρά, οι μύρες και οι μηλίτες περιέχουν λιγότερες ποσότητες αιθανόλης με ένα ισορροπημένο και διακριτικό αισθητηριακό προφίλ χαρακτηριστικό του καθενός. Τα τελευταία χρόνια έχουν εμφανιστεί νέες καταναλωτικές τάσεις και απαιτήσεις για νέα και καινοτόμα προϊόντα. Αυτή η κατάσταση οδήγησε στην επανεξέταση των υπαρχόντων ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση και στην ικανοποίηση των απαιτήσεων των καταναλωτών. Οι ζύμες είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για την πολυπλοκότητα και την αισθητηριακή ποιότητα των ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση.

Με βάση αυτό, οι τρέχουσες μελέτες επικεντρώνονται κυρίως στην αναζήτηση νέου τύπου ζυμομυκήτων με τεχνολογική εφαρμογή. Οι ζυμομύκητες non-Saccharomyces θεωρούνταν πάντα μολυσματικοί παράγοντες στην παρασκευή οίνου και μύρας. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιούνται τακτικά διαδικασίες για την εξάλειψή τους, όπως η παστερίωση μούστου, η προσθήκη θειώδους και η απολύμανση του εξοπλισμού και των αιθουσών επεξεργασίας.

Ζύμωση μύρας

Η μύρα είναι το πιο καταναλωτικό αλκοολούχο ποτό παγκοσμίως. Παραδοσιακά παρασκευάζεται από τέσσερα βασικά συστατικά: βυνοποιημένα δημητριακά (κριθάρι ή άλλα), νερό, λυκίσκο και ζύμη. Κάθε ένα από αυτά τα συστατικά συμβάλλει στην τελική γεύση και άρωμα της μύρας. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, τα κύτταρα ζύμης μετατρέπουν τα σάκχαρα που προέρχονται από δημητριακά σε αιθανόλη και CO₂. Ταυτόχρονα, παράγονται εκατοντάδες δευτερογενείς μεταβολίτες που επηρεάζουν το άρωμα και τη γεύση της μύρας. Η παραλλαγή σε αυτούς τους μεταβολίτες σε διαφορετικά στελέχη ζύμης είναι αυτό που επιτρέπει στη ζύμη να επηρεάζει τόσο μοναδικά τη γεύση της μύρας (Dzialo et.al 2017). Αν και τα περισσότερα ζυθοποιεία χρησιμοποιούν καθαρές καλλιέργειες ζύμης για ζύμωση, η αυθόρμητη ή μικτή ζύμωση χρησιμοποιείται σήμερα για ορισμένες ειδικές μύρες. Αυτές οι διαδικασίες ζύμωσης περιλαμβάνουν ένα μείγμα διαφορετικών ειδών ζύμης (και βακτηρίων επίσης) που συμβάλλουν στο τελικό προϊόν διαδοχικά, δίνοντας στην μύρα υψηλό βαθμό πολυπλοκότητας. Συνήθως, οι

ζυθοποιίες έχουν το δικό τους απόθεμα επιλεγμένων ζυμών για τις συγκεκριμένες μπύρες τους. Όπως είναι γνωστό, δύο τύποι ζύμης χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία: η *S. cerevisiae* ως ζύμη που ζυμώνει από την κορυφή για την παρασκευή μπίρας, ενώ η *S. pastorianus* είναι μια μαγιά ζύμωσης βυθού που χρησιμοποιείται στις διαδικασίες ζυθοποιίας lager (Libkind, et.al 2011).

Τα τελευταία χρόνια, η αρνητική αντίληψη για τις ζύμες non-Saccharomyces έχει αλλάξει λόγω του γεγονότος ότι αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τις αυθόρμητες ζυμώσεις οίνου, αυτές οι ζύμες παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της αισθητηριακής ποιότητας του τελικού προϊόντος. Με βάση αυτά τα στοιχεία, η ζυμωτική συμπεριφορά ορισμένων ζυμών non-Saccharomyces μελετάται σε βάθος με σκοπό την εύρεση των καταλληλότερων συνθηκών και του καταλληλότερου στελέχους που θα χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση.

Ζύμωση μηλίτη

Ο μηλίτης είναι ένα άλλο αλκοολούχο ποτό που προέρχεται από τη βιομηχανία φρούτων μήλων, πολύ δημοφιλές σε διάφορες χώρες του κόσμου, κυρίως στην Ευρώπη, τη Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία (Cousin et al 2017). Αν και οι παραδοσιακοί μηλίτες παράγονται από αυθόρμητη ζύμωση χυμού που πραγματοποιείται από αυτόχθονες ζύμες, επιλεγμένα στελέχη *S. cerevisiae* χρησιμοποιούνται επίσης συνήθως για τη διεξαγωγή αλκοολικής ζύμωσης. Αυτό εξασφαλίζει σταθερή ποιότητα των τελικών προϊόντων (Lorenzini et.al 2019). Μερικά άλλα είδη ζύμης non-Saccharomyces εμπλέκονται στην αυθόρμητη ζύμωση του χυμού μήλου για την παραγωγή μηλίτη.

Ωστόσο, αυτές οι ζύμες συνεισφέρουν σε μικρότερο βαθμό από το *Saccharomyces* και μπορούν να παραγάγουν δυσάρεστες γεύσεις (Pando.et.al 2010). Τα ερευνητικά άρθρα για αυτό το είδος προϊόντος είναι σπάνια σε σύγκριση με τον οίνο, ειδικά σε φαινόμενα που σχετίζονται με μικροβιακές δραστηριότητες. Το μικροβίωμα της ζύμωσης του οίνου και η δυναμική της, η οργανοληπτική βελτίωση υγιεινών και ευχάριστων προϊόντων και η ανάπτυξη ορεκτικών μελετώνται τώρα εκτενώς.

Αν και τα δύο ποτά φαίνονται κοντά ως προς το μικροβίωμα και τη διαδικασία (με αλκοολικές και μηλογαλακτική ζύμωση), οι εγγενείς ιδιότητες των πρώτων υλών και οι διαφορετικές παραμέτρους παραγωγής και περιβάλλοντος καθιστούν αξιόλογη έρευνα για τις ιδιαιτερότητες

της ζύμωσης μήλων. Μια εξαιρετική ανασκόπηση των μικροβιακών επιπτώσεων που σχετίζονται με την παραγωγή μηλίτη, από τις εκτιμήσεις του κοσμοσυστήματος έως τις σχετικές δραστηριότητες και την επίδραση των παραμέτρων της διαδικασίας (Cousin et al 2017).

Εκτός από αυτά τα τρία παγκοσμίως γνωστά ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση, υπάρχουν πολλά άλλα που παρασκευάζονται από φρούτα σε διάφορες χώρες της Αφρικής, της Ασίας και της Λατινικής Αμερικής. Αν και η κατανάλωσή του είναι τοπική ή περιφερειακή, σε ορισμένες χώρες τα ποτά που παρασκευάζονται με φρούτα όπως μπανάνες ή σταφύλια ως πρώτες ύλες είναι πολύ δημοφιλή. Το πιο διαδεδομένο αλκοολούχο ποτό φρούτων στην Ανατολική Αφρική είναι η μπύρα μπανάνας, η οποία εκτός από το γαστρονομικό ενδιαφέρον είναι ιδιαίτερα πολιτιστική. Η μπύρα μπανάνας είναι ένα ανάμεικτο ρόφημα που παρασκευάζεται από μπανάνες και αλεύρι δημητριακών (συνήα αλεύρι από σόργο) (Gensi et. Al 2000). Οι χουρμάδες στη Βόρεια Αφρική, οι ανανάδες και τα φρούτα κάσιους στη Λατινική Αμερική και τα φρούτα jack στην Ασία είναι άλλα από τα πιο σχετικά προϊόντα.

2.6 Ζύμες Οινοποίησης

Οι ζύμες αυτές βρίσκονται στα στέμφυλα και στο γλεύκος και επιτελούν την ζύμωση του κύριου όγκου των σακχάρων. Στην κατηγορία των σακχαρομυκήτων (εκτός από τον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*) υπάγονται σε ελλειμοειδή ο σακχαρομύκητας (*Ellipsoideus*), ο *Apiculatus*, ο *Pasterianus*, ο *Bayanus* και πολύ άλλοι σακχαρομύκητες. Το σχήμα τους είναι διαφόρων ειδών: κυκλικό, ωοειδές, ελλειπτικό και επίμηκες. Οι σακχαρομύκητες αυτοί αποτελούν τον πληθυσμό των ιθαγενών ζυμομυκήτων. Οι κυριότεροι σακχαρομύκητες είναι οι:

***Saccharomyces cerevisiae*:**

Συμμετέχει από την αρχή της ζύμωσης αλλά σε μικρά ποσοστά. Στην συνέχεια αυξάνεται η συμμετοχή του σε ποσοστό μέχρι και 90% στο σύνολο των ζυμών. Δεν έχει την δυνατότητα ζύμωσης της γαλακτόζης και κατά την διάρκεια της ζύμωσης αυξάνεται σε μικρά ποσοστά η πτητική οξύτητα. Επιπλέον, έχει ζυμωτική ικανότητα μέχρι 13 – 14 % vol.

***Saccharomyces chevalieri*:**

Έχει παρόμοια δράση με τον *Saccharomyces cerevisiae* μόνο που δεν έχει την

δυνατότητα ζύμωσης της μαλτόζης.

Saccharomyces bayanus:

Η περιεκτικότητά του στο σταφύλι είναι περιορισμένη έχει όμως την ικανότητα αναζύμωσης περίπου το 40%. Συνεχίζει την διαδικασία της ζύμωσης μετά τον *Saccharomyces cerevisiae*. Επίσης, έχει ζυμωτική ικανότητα σε ποσοστό περίπου 16 – 18 % vol και είναι ανθεκτικό στο θειώδες.

Schizosaccharomyces pombe:

Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Βρίσκεται σπάνια στα γλεύκη και στο κρασί και έχει την ικανότητα να μετατρέπει το μηλικό οξύ σε αλκοόλη. Επιπλέον, προσβάλλει τα αζύμωτα σάκχαρα στα θειωμένα γλεύκη. Η δυνατότητα αυτή του δίνεται γιατί παρουσιάζει ανθεκτικότητα στις μεγάλες συγκεντρώσεις του θειώδους ανυδρίτη.

Saccharomyces bailli:

Ο ζυμομύκητας αυτός δεν συναντάται πολύ συχνά στα σταφύλια και παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στον θειώδη ανυδρίτη. Επιπλέον είναι υπεύθυνος για τις αναζυμώσεις που συμβαίνουν στα γλυκά κρασιά.

Hanseniaspora uvarum - Kloeckera apiculata:

Έχουν μικρή ζυμωτική ικανότητα περίπου 3 – 4 % vol αλλά η παρουσία τους πάνω στο σταφύλι είναι μεγάλη.

Saccharomycodes ludwigii:

Είναι ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη και προκαλεί αναζυμώσεις στα κρασιά που εμφιαλώνονται. Επίσης, παράγει μεγάλη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και η ικανότητα ζύμωσης ανέρχεται σε ποσοστό 17 % vol.

Torulopsis basillaris:

Ο μύκητας αυτός είναι ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη και συμμετέχει στην ζύμωση σε ποσοστό 6 – 8 % vol.

Candida:

Βρίσκεται σε μεγάλα ποσοστά στο σταφύλι και δεν έχει ζυμωτική ικανότητα αλλά αναπνευστική. Προκαλεί την ασθένεια της άνθησης σχηματίζοντας στην επιφάνεια του οίνου μυκήλιο λευκού ή υποκίτρινου χρώματος. Τέλος, για να μπορέσει να αναπτυχθεί καταναλώνει αιθυλική αλκοόλη.

Brettanomyces:

Όπως και στο γένος *Candida* έτσι και σ' αυτό σχηματίζεται μυκήλιο λευκού ή υποκίτρινου χρώματος. Η ανάπτυξή του δεν είναι πολλές φορές επιθυμητή διότι σχηματίζεται από τον πολλαπλασιασμό του οξικός αιθυλεστέρας και ακεταμίδιο. __

2.6.1 Οικολογία της ζύμης αυθόρμητης ζύμωσης οίνου

Η ζύμωση οίνου είναι ένα πολύ ανταγωνιστικό σενάριο για τους μικροοργανισμούς. Παρά την κυρίαρχη κατάσταση του *S. cerevisiae*, υπάρχουν πολλοί άλλοι μικροοργανισμοί και δυνητικά συμβάλλουν στην ανάπτυξη των αισθητηριακών χαρακτηριστικών των οίνων. Συχνά παραμελημένοι ως μικροοργανισμοί αλλοίωσης ή, το πολύ, άσχετα είδη, η ανάπτυξη ειδών μη *Saccharomyces* κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης είναι γνωστή για περισσότερα από εκατό χρόνια.

Η τρέχουσα άποψη για τη διαδοχή των ειδών ζύμης από το αμπέλι στον οίνο υποστηρίζεται από δεκαετίες προσπαθειών παρατήρησης και απομόνωσης ζύμης από πολλούς μικροβιολόγους, που εμπλουτίστηκαν πρόσφατα με τη βοήθεια μεταταξονομικών μελετών ([Setati et al., 2012](#); [Bokulich et al., 2013](#); [Bokulich et al., 2014](#); [Pinto et al., 2015](#)). Η κυρίαρχη μικροχλωρίδα ζύμης στα υγιή σταφύλια κατά τη συγκομιδή αποτελείται από είδη που δεν επιβιώνουν τις πρώτες ώρες της ζύμωσης, συμπεριλαμβανομένων των βασιδιομυκητωδών γενών όπως ο *Cryptococcus* ή η *Rhodotorula* και το ασκομύκητο είδος *Aureobasidium pullulans*. Άλλα ασκομύκητα γένη, όπως *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, ή

Η *Starmarella*, μεταξύ άλλων, μπορεί να επιβιώσει περισσότερο και να κυριαρχήσει από κοινού στη διαδικασία για αρκετές ώρες έως ότου η *S. cerevisiae* αναλάβει την αλκοολική ζύμωση. Πράγματι, αυτά τα είδη υπερτερούν σε μεγάλο βαθμό των κυττάρων *S. cerevisiae* στην επιφάνεια των καρπών σταφυλιού.

Μετά την αρχική επαφή με τα σάκχαρα του σταφυλιού, πυροδοτούν την αλκοολική ζύμωση.

Ωστόσο, το *S. cerevisiae* (αρχικά σε χαμηλούς αριθμούς) εκμεταλλεύεται τα ειδικά προσαρμοστικά του χαρακτηριστικά για να αναπτυχθεί γρήγορα και να γίνει το κύριο είδος ζύμης από τη μέση, ταραχώδη φάση της ζύμωσης. Τις περισσότερες φορές, μόνο το *S. cerevisiae* μπορεί να απομονωθεί εύκολα στα τελικά στάδια της ζύμωσης. Ορισμένες φυσιολογικές

προσαρμογές που επιτρέπουν στα στελέχη *S. cerevisiae* να ευδοκιμήσουν κατά τη ζύμωση του οίνου είναι η προτίμησή τους για ζυμωτικό μεταβολισμό, η ικανότητά τους να αναπτύσσονται αυστηρά αναερόβια και η υψηλή τους ανοχή στο διοξείδιο του θείου. Επιπλέον, το *S. cerevisiae* είναι περισσότερο ανθεκτικό στο θερμικό στρες από άλλα είδη ζύμης οίνου. Για ορισμένους συγγραφείς, αυτό θα μπορούσε επίσης να συμβάλει στην κυριαρχία του *S. cerevisiae* σε αυτό το περιβάλλον (Goddard, 2008).

2.7 Εκκινητές ζύμη οίνου *Saccharomyces*

Για ολόκληρη σχεδόν την ιστορία της οινολογίας, η αυθόρμητη ζύμωση ήταν ο μόνος τρόπος για να μετατραπεί το γλεύκος σε οίνο, ρυθμιζόμενος μόνο από την τελική παρασκευή ενός "ried-de-cuve". Αυτή η πρακτική συνίσταται στην προσθήκη αναλογικά μικρού όγκου ζυμωμένου χυμού σε μια δεξαμενή φρέσκου γλεύκους σταφυλιών. Η αυθόρμητη ζύμωση είναι μια τεχνικά και εννοιολογικά πολύ απλή διαδικασία, η οποία συχνά καταλήγει σε καλής ποιότητας οίνους. Ο μικροβιολογικός έλεγχος της διεργασίας ανατέθηκε στο διοξείδιο του θείου (που δρα εξίσου ως αντιοξειδωτικό), σε συγκεντρώσεις που αναστέλλουν την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων και των ζυμομυκήτων που δεν είναι *Saccharomyces*. Ωστόσο, αυτό δεν αρκεί για να αποτρέψει τη ζύμωση από το να πάει άσχημα μερικές φορές, οδηγώντας σε αργή ή κολλημένη ζύμωση, υπερβολική οξύτητα ή άλλα αισθητικά ελαττώματα. Από την άλλη πλευρά, η μεταβλητότητα της μικροχλωρίδας στον αμπελώνα και το κελάρι εισάγει έναν παράγοντα απρόβλεπτου στα αισθητηριακά χαρακτηριστικά των οίνων που παράγονται κάθε εποχή. Οι δυνατότητες που άνοιξε η ανακάλυψη των ζυμών ως παραγόντων μετασχηματισμού, η ανάπτυξη καθαρών καλλιεργείων και, αργότερα, η ανάπτυξη τεχνικών παραγωγής βιομηχανικής ζύμης (ειδικά για χρήση σε αρτοποιεία και ζυθοποιία), δεν άρχισαν να αξιοποιούνται από την οينوποιία παρά μόνο χρόνια αργότερα (Gonzalez et al., 2011).

Ωστόσο, μέχρι το τέλος του 20ου αιώνα, ο εμβολιασμός των εκκινητών *S. cerevisiae* ήταν μια ευρέως διαδεδομένη πρακτική, με δεκάδες διαφορετικά στελέχη ζύμης στην αγορά. Ενώ στην αυθόρμητη ζύμωση λαμβάνει χώρα μια διαδοχή διαφορετικών ζυμομυκήτων, η χρήση καλλιεργείων εκκίνησης *S. cerevisiae* συνήθως οδηγεί σε μια διαδικασία που κυριαρχείται σχεδόν από την έναρξη από το εμβολιασμένο στέλεχος (Querol et al., 1992). Κάθε στέλεχος *S. cerevisiae* μπορεί να συμβάλει διαφορετικά στα αισθητηριακά χαρακτηριστικά του οίνου και δεν

είναι όλα καλά προσαρμοσμένα σε όλα τα στυλ ζύμωσης. Αντίστοιχα, η επιλογή ζύμης γίνεται ένα πρόσθετο εργαλείο στα χέρια των οινοπαραγωγών για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των προϊόντων τους. Αλλά η ευρέως διαδεδομένη υπόθεση ότι οι καλύτερες καλλιέργειες εκκίνησης για μια περιοχή παραγωγής είναι αυτές που έχουν απομονωθεί από μια τέτοια περιοχή στερείται ισχυρής επιστημονικής υποστήριξης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Non- Saccharomyces Ζυμομύκητες

3.1 Εισαγωγή

Η ζύμωση του οίνου είναι μια πολύπλοκη μικροβιολογική διαδικασία στην οποία οι ζύμες διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο. Αν και ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο κύριος μικροοργανισμός που εμπλέκεται στην αλκοολική ζύμωση του γλεύκους σταφυλιών, η οينوποίηση είναι μια μη στείρα διαδικασία. Πολλά άλλα είδη ζυμομυκήτων που ανήκουν σε διάφορα γένη μη *Saccharomyces* εμφανίζονται στο χυμό σταφυλιού και συμβάλλουν στα πρώτα στάδια της ζύμωσης και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού κρασιού (Fleet, 2008). Στο παρελθόν, οι ζύμες μη *Saccharomyces* θεωρούνταν ότι να είναι δευτερεύουσας σημασίας ή ανεπιθύμητες ζύμες αλλοιωμένες. Σήμερα είναι ευρέως αποδεκτό ότι επιλεγμένα στελέχη μέσω των κατάλληλων επιλογών μπορούν να επηρεάσουν θετικά τη διαδικασία οينوποίησης. Έτσι, η αυξανόμενη ζήτηση για νέα και βελτιωμένα είδη ζύμης οίνου προσαρμοσμένα σε διαφορετικούς τύπους και στυλ οίνων μπορεί να καλυφθεί από ζυμομύκητες οίνου non-*Saccharomyces*. Δεδομένου ότι αυτοί οι ζυμομύκητες είναι γενικά φτωχοί ζυμοτές, ο σχεδιασμός μικτών εκκινήτων συμπεριλαμβανομένων επιλεγμένων μη *Saccharomyces* με βελτιστοποιημένα βιοτεχνολογικά χαρακτηριστικά και *S. cerevisiae* για την εξασφάλιση πλήρους ζύμωσης έχει γίνει μια από τις κύριες προκλήσεις των ερευνητών και των οινολόγων. Επιπλέον, η κατάλληλη διαχείριση εκκίνησης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης θα επιτρέψει στους οينوπαραγωγούς να προσαρμόσουν τους οίνους στις μεταβαλλόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών. Η παραγωγή οίνων με ιδιαίτερα γευστικά προφίλ ήταν ένας από τους κύριους λόγους για τη συμπερίληψη των ζυμών non-*Saccharomyces* σε μικτούς εκκινήτες. Ωστόσο, διερευνώνται πολλά υποσχόμενες προσεγγίσεις για τη μείωση της περιεκτικότητας σε αλκοόλη των οίνων, για τον έλεγχο της μόλυνσης των οίνων ή για τη βελτίωση των οινολογικών ιδιοτήτων, και αναμφίβολα αντιπροσωπεύουν νέες ευκαιρίες για εκμετάλλευση στην παραγωγή οίνου.

Οι ζυμομύκητες non-*Saccharomyces* είναι μια ομάδα μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται σε πολυάριθμες διαδικασίες ζύμωσης, καθώς οι υψηλές μεταβολικές τους διαφορές επιτρέπουν τη σύνθεση διαφορετικών τελικών προϊόντων.

Γενικά, πολλές από αυτές τις ζύμες που μπορούν να τροποποιήσουν την αισθητηριακή ποιότητα των οίνων θεωρούνται ως μολυσματικές ουσίες, επομένως η εξάλειψή τους ή η διατήρησή τους σε χαμηλά επίπεδα ήταν βασικός στόχος στο παρελθόν

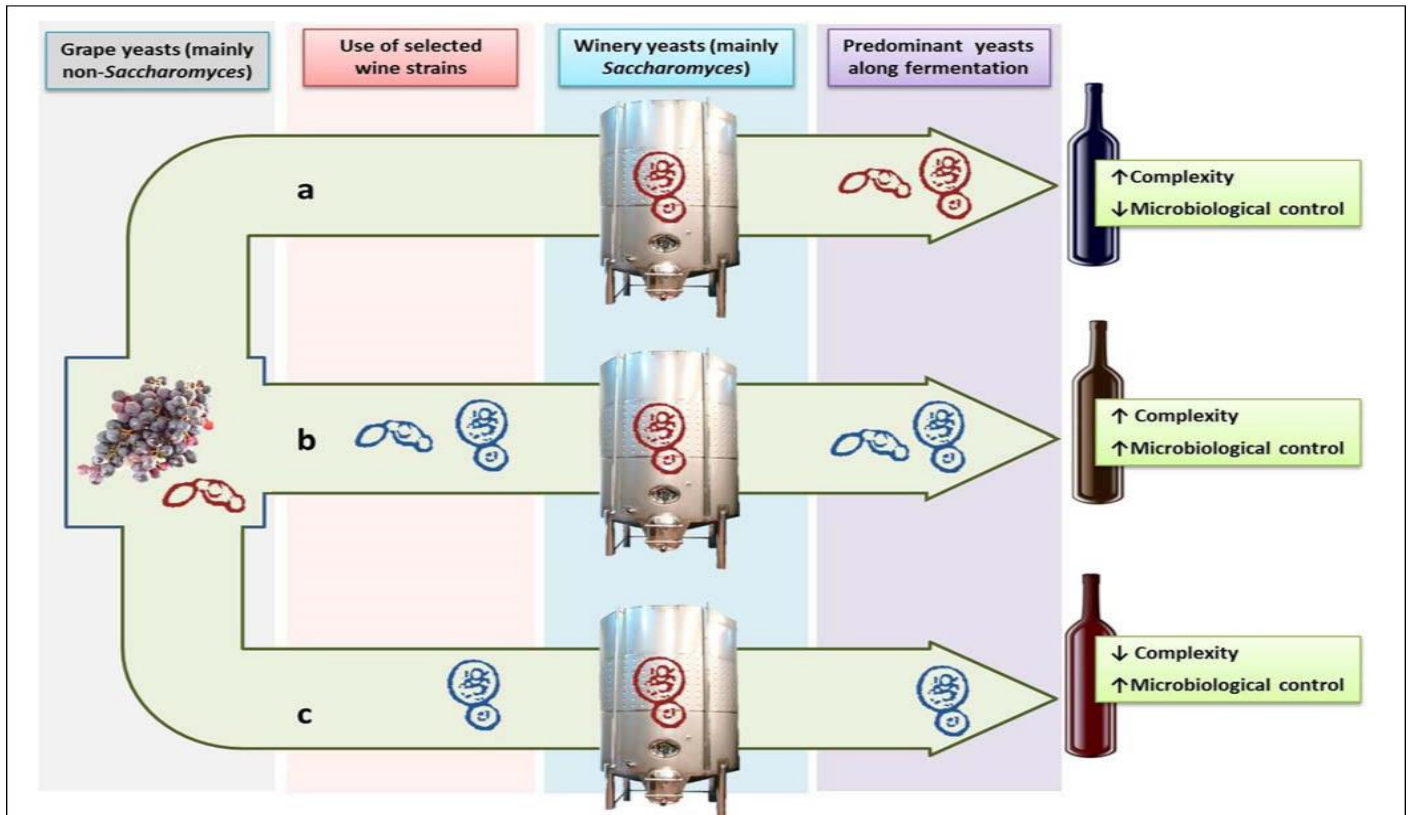
3.2 Non- Saccharomyces ζύμες στην παραγωγή οίνου

Στο δεύτερο μισό του 19ου αιώνα, ο Louis Pasteur αποκάλυψε το ρόλο των ζυμών κατά τη διαδικασία ζύμωσης του οίνου, δείχνοντας ότι η μαγιά είναι ο κύριος καταλύτης που ευθύνεται για τη μετατροπή των σακχάρων σταφυλιών σε αλκοόλη και CO₂. Παρατήρησε ότι κατά τη ζύμωση γλεύκους σταφυλιών συνυπήρχε μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων διαφορετικών τύπων ζυμομυκήτων. Τα σχέδιά του, βασισμένα σε μικροσκοπικές παρατηρήσεις, έδειχναν δύο είδη ζυμομυκήτων. Το πρώτο, το οποίο ήταν άφθονο στα αρχικά στάδια της διαδικασίας, ήταν το μικρό, κορυφαίο, λεμονόσχημα *Saccharomyces apiculatus* (τώρα *Hanseniaspora uvarum*). Το δεύτερο που έγινε το πιο άφθονο καθώς προχωρούσε η αλκοολική ζύμωση, ήταν μια μεγαλύτερη ζύμη με στρογγυλά κύτταρα, την οποία ο Παστέρ ονόμασε είτε *Saccharomyces pastorianus* είτε *Saccharomyces ellipsoideus* (πιθανώς το σημερινό *S. cerevisiae*) (Barnett, 2000). Παρά την περίπλοκη μικροβιακή οικολογία του οίνου, το *S. cerevisiae* έγινε η κατ' εξοχήν μαγιά οίνου με βάση κυρίως τη συμπεριφορά ζύμωσής του (Reed and Pepler, 1973; Bely et al., 1990; Fleet, 1993), αλλά και στον σημαντικό ρόλο του στην απελευθέρωση προδρόμων αρωμάτων (Dubourdieu, 1996; Úbeda and Briones, 2000; Ugliano et al., 2006) και στον σχηματισμό δευτερογενούς αρώματος (Fleet, 1993; Pretorius, 2003). Τα άλλα είδη ζύμης που απαντώνται σε γλεύκους και κρασιά θεωρήθηκαν ως πηγή πιθανών προβλημάτων αλλοίωσης κατά την παραγωγή οίνου. Στην πραγματικότητα, η παρουσία ή η υπερανάπτυξη ορισμένων από αυτά τα είδη σχετιζόταν συχνά με κολλημένες ή αργές ζυμώσεις ή με την παραγωγή επιζήμιων ενώσεων για τις αισθητηριακές ιδιότητες του οίνου (du Toit and Pretorius, 2000). Στο πλαίσιο αυτής της απλοϊκής θεώρησης της διαδικασίας ζύμωσης του οίνου, όπου ο πιο σημαντικός στόχος ήταν ο εμβολιασμός και η κυριαρχία του *S. cerevisiae*, ο όρος ζυμομύκητες «non-Saccharomyces» αναφερόταν στη μεγάλη ποικιλία γενών ζύμης, συμπεριλαμβανομένων περισσότερων από 20 σε τόσο το Ascomycota όσο και το Basidiomycota phyla, που υπάρχουν στον χυμό σταφυλιών. Οι ζύμες που εμφανίζονται στα γλεύκη σταφυλιών στα αρχικά στάδια της ζύμωσης προέρχονται από δύο κύριες πηγές, τον αμπελώνα και τα σταφύλια, και τις επιφάνειες

επαφής και τον εξοπλισμό του οινοποιείου (Pretorius et al., 1999). Το τελευταίο παίζει μικρό ρόλο ως πηγή ζυμομυκήτων non- Saccharomyces, ενώ το *S. cerevisiae* είναι η κυρίαρχη ζύμη σε τέτοιες επιφάνειες (Peynaud and Domercq, 1959; Rosini, 1984; Lonvaud-Funel, 1996; Pretorius, 2000). Ωστόσο, πρόσφατα αναφέρθηκε για πρώτη φορά η εμφύτευση στο γλεύκος σταφυλιών των ειδών *Hanseniaspora* που υπάρχουν στο οινοποιείο (Grangeteau et al., 2015) ανοίγοντας την πιθανότητα, ακόμη ανεξερεύνητη, ότι ορισμένα από τα είδη που δεν είναι *Saccharomyces* θα μπορούσαν να επιμείνουν από 1 χρόνο στο άλλο στο οινοποιείο και γίνονται κυρίαρχοι κατά τη ζύμωση, όπως συνήθως περιγράφεται για το *S. cerevisiae* (Santamaría et al., 2005; Le Jeune et al., 2006; Mercado et al., 2007). Η μεγάλη ποσοτική και ποιοτική μεταβλητότητα των ειδών μη *Saccharomyces* που βρέθηκαν στα πρώιμα στάδια της ζύμωσης μπορεί να εξηγηθεί από τον μεγάλο αριθμό παραγόντων που επηρεάζουν τη μικροχλωρίδα του σταφυλιού, όπως ο εντοπισμός (τόπος), οι κλιματικές συνθήκες, η ποικιλία, η εφαρμογή φυτοφαρμάκων και άλλες αγρονομικές πρακτικές, στάδιο της ωρίμανσης, της υγείας των σταφυλιών, των διαδικασιών συγκομιδής και των ειδικών καιρικών συνθηκών σε κάθε χρόνο τρύγου (Martini et al., 1980; Rosini et al., 1982; Querol et al., 1990; Rgueiro et al., 1993; Epifanio et al., 1980. al., 1999· Jolly et al., 2006· Brillì et al., 2015). Παρά αυτή τη μεγάλη μεταβλητότητα των ειδών ζυμομύκητα, κατά τις πρώτες 3-4 ημέρες μιας αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους σταφυλιών, ο πληθυσμός της ζύμης κυριαρχείται αριθμητικά από ζυμομύκητες, *Hanseniaspora* / *Kloeckera* και είδη *Candida*, ακολουθούμενα από αρκετά είδη που ανήκουν στα γένη *Metschnikowia* και *Pichia*, και περιστασιακά σε *Brettanomyces*, *Kluveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Rhodotorula*, *Zygosaccharomyces* και *Cryptococcus* genera (Goto, 1980; Benda, 1982; Fleet et al., Heard195, 1985; ; Martínez et al., 1989· Herraiz et al., 1990· Frezier and Dubourdieu, 1992· Schütz and Gafner, 1993· Granchi et al., 1998· Combina et al., 2005· Fleet, 2008). Αυτό το σενάριο, με αφθονία ζυμομυκήτων την 1η ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης και ποικίλες ποσότητες άλλων ζυμών εκτός *Saccharomyces*, ακολουθούμενη από την προοδευτική κυριαρχία του *S. cerevisiae* είναι κοινός παρονομαστής στη διαδικασία επεξεργασίας όλων των οίνων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που παράγονται με εμβολιασμό με επιλεγμένα στελέχη μαγιάς οίνου (Heard and Fleet, 1985). Οι βιομηχανικές ζυμώσεις οίνου διεξάγονται επί του παρόντος με εκκινητές επιλεγμένων στελεχών ζύμης οίνου *S. cerevisiae*. Η πρώτη αναφερόμενη χρήση μιας επιλεγμένης μαγιάς για την παραγωγή κρασιού χρονολογείται από το 1890, όταν ο Müller-Thurgau εισήγαγε αυτήν την τεχνολογία προσαρμόζοντας τις τεχνικές που ανέπτυξε ο Christian Hansen για τη ζυθοποιία Carlsberg

(Pretorius, 2000; Barnett and Lichtenthaler, 2001). Σήμερα, η χρήση ενεργών ξηρών ζυμών είναι μια από τις πιο κοινές πρακτικές στην οινοποίηση και η αγορά προσφέρει μια μεγάλη ποικιλία στελεχών ζύμης ως αφυδατωμένες καλλιέργειες που υπόσχονται καλή εμφύτευση, ειδικές δεξιότητες για διαφορετικούς τύπους οίνων και μια μεγάλη λίστα άλλων χαρακτηριστικών όπως όπως η ικανότητα ενίσχυσης των ποικιλιακών και ζυμωτικών αρωμάτων, της παραγωγής γλυκερίνης, της ανοχής στην αλκοόλη ή συγκεκριμένων ενζυματικών δραστηριοτήτων. Ωστόσο, ο κύριος λόγος των επιλεγμένων εκκινητών είναι η επίτευξη οίνων με ομοιόμορφη ποιότητα κατά τη διάρκεια διαφορετικών ετών αποφεύγοντας τη μεταβλητότητα που σχετίζεται με τις αυθόρμητες ζυμώσεις και τον κίνδυνο αλλοίωσης (Beltran et al., 2002; Santamaría et al., 2005). Σε τέτοιες περιπτώσεις, απαιτείται κυρίαρχη ανάπτυξη του ενοφθαλμισμένου στελέχους. Ωστόσο, πολλοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την εμφύτευση/εμμόνη μεμονωμένων στελεχών εντός του συνολικού πληθυσμού (Fleet, 2008; Blanco et al., 2012), συμπεριλαμβανομένης της μεταβλητότητας που υπάρχει από τη μία σοδειά στην άλλη σε ένα δεδομένο οινοποιείο (Lange et al., 2014). Παρά τα πλεονεκτήματα της χρήσης καθαρών καλλιεργειών *S. cerevisiae* σε σχέση με τον εύκολο έλεγχο και την ομοιογένεια των ζυμώσεων, ο οίνος που παράγεται με μονοκαλλιέργειες καθαρής μαγιάς στερείται την πολυπλοκότητα της γεύσης, τη στιλιστική διάκριση και την vintage μεταβλητότητα που προκαλείται από τις αυτόχθονες ζύμες (Lambrechts and Pretorius, 2000 Romano et al., 2003). Αυτό το γεγονός είναι μια ατελείωτη συζήτηση μεταξύ ερευνητών και οινολόγων, και η ανάπτυξη ζυμών non-*Saccharomyces* μπορεί ακόμα να θεωρηθεί ως ένας ανεξέλεγκτος κίνδυνος ή ως μια ευκαιρία βελτίωσης της ποιότητας του κρασιού. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι οι καλύτεροι ποιοτικοί οίνοι στον κόσμο παράγονται μετά από μια διαδικασία ζύμωσης στην οποία, σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, διάφορα είδη ζυμών εκτός *Saccharomyces* έχουν παίξει ρόλο στη διαδικασία οινοποίησης και, ως εκ τούτου, έχουν συμβάλει στην το τελικό αποτέλεσμα. Σε αυτό το πλαίσιο, προτάθηκε η συμπερίληψη των ειδών ζύμης οίνου non-*Saccharomyces* ως μέρος των μικτών εκκινητών μαζί με το *S. cerevisiae* για τη βελτίωση της ποιότητας του οίνου ως τρόπο αξιοποίησης των αυθόρμητων ζυμώσεων χωρίς να διατρέχουν τον κίνδυνο κολλημένης ζύμωσης ή αλλοίωσης του οίνου. (Jolly et al., 2003; Rojas et al., 2003; Romano et al., 2003; Ciani et al., 2006). Ωστόσο, αυτή η πρακτική συνδέεται με νέες προκλήσεις για τους ερευνητές και τους οινολόγους, όπως η επιλογή κατάλληλων στελεχών non-*Saccharomyces*, ο κατάλληλος τρόπος και χρόνος εμβολιασμού, η αναλογία ζυμομυκήτων στην καλλιέργεια και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών, μεταξύ άλλων. Το Σχήμα 3.1

δείχνει ένα σχηματικό περίγραμμα της αυθόρμητης έναντι της εμβολιασμένης ζύμωσης και τη χρήση μικτών εκκινητών επιλεγμένων ζυμομυκήτων μη *Saccharomyces* με στελέχη *S. cerevisiae* ως εναλλακτική λύση και στις δύο προσεγγίσεις



Σχήμα 3.1 Χρήση επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων *Saccharomyces* και μη *Saccharomyces* στην οινοποίηση.

Η αυθόρμητη ζύμωση (α) επιτρέπει την ανάπτυξη γηγενών ζυμών από σταφύλια (κυρίως non-*Saccharomyces*) και οινοποιεί (κυρίως *Saccharomyces*) που οδηγεί σε οίνους με μεγαλύτερη αρωματική πολυπλοκότητα αλλά με λιγότερο μικροβιολογικό έλεγχο. Ο εμβολιασμός με επιλεγμένο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* (c) οδηγεί σε μεγαλύτερο μικροβιολογικό έλεγχο αλλά μπορεί να μειώσει την αρωματική πολυπλοκότητα του οίνου. Η χρήση μικτών καλλιιεργειών επιλεγμένων στελεχών *S. cerevisiae* και μη *Saccharomyces* (b) επιτρέπει τη λήψη οίνων τόσο με μεγαλύτερη αρωματική πολυπλοκότητα όσο και με μικροβιολογικό έλεγχο της διαδικασίας. Οι αυτόχθονες και οι εμβολιασμένες επιλεγμένες ζύμες αντιπροσωπεύονται με κόκκινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα.

Στον παρακάτω πίνακα 3.1 απεικονίζονται τα διάφορα στελέχη ζυμών non *Saccharomyces* και οι εταιρίες που διαθέτουν το κάθε στέλεχος.

Πίνακας 3.1. Non Saccharomyces ζύμες και που είναι διαθέσιμες . (Vejarano et al., 2021).

Yeast Species	Commercial Brand	Providing Company (Country)	Format ¹
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Biodiva TD291	Lallemand (Canada)	ADY
	Prelude	CHR Hansen (Denmark)	ADY
	Zymaflore Alpha	Laffort (France)	ADY
	Viniferm NSTD	Agrovin (Spain)	ADY
	EnartisFerm Qt	Enartis (Italy)	ADY
	EnartisFerm Qt Liquido	Enartis (Italy)	CRY
	Oenovin Torulaspora BIO	Oeno (Italy)	ADY
	Torulaspora delbrueckii Torulaspora delbrueckii 12.2	Probiotec (Italy) Probiotec (Italy)	FLY FLY
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Laktia	Lallemand (Canada)	ADY
	Concerto	CHR Hansen (Denmark)	ADY
	Octave	CHR Hansen (Denmark)	ADY
	EnartisFerm Q&	Enartis (Italy)	CRY
	Excellence X'Fresh	Lamothe-Abiet (France)	ADY
	LEVULIA Alcomeno	AEB Group (Italy)	ADY
	Kluyveromyces thermotolerans	Probiotec (Italy)	FLY
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Flavia MP346	Lallemand (Canada)	ADY
	Oenoferm MProtect	Erbslöh (Germany)	ADY
	AWRI Obsession	AB Biotek (United Kingdom)	ADY
	LEVULIA Pulcherrima	AEB Group (Italy)	ADY
	Primaflora VB BIO	AEB Group (Italy)	ADY
	Excellence B-Nature	Lamothe-Abiet (France)	ADY
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Levia Nature	Oeno (Italy)	ADY
	Gaïa	Lallemand (Canada)	ADY
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Atecrem 12H	BioEnologia (Italy)	CRY
	Promalic	Proenol (Portugal)	ENCY
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Anti Brett 1	Probiotec (Italy)	FLY
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	Anti Brett 2	Probiotec (Italy)	FLY
<i>Starmerella bacillaris</i>	Atecrem 11H	BioEnologia (Italy)	CRY
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Fructoferm W3 ²	Lallemand (Canada)	ADY
<i>Zygosaccharomyces parvibailii</i>	Hardened Spaniard	Mainiacal Yeast (United States)	FLY
<i>Pichia kluyveri</i>	Frootzen	CHR Hansen (Denmark)	AFY
	Pichia kluyveri MIP-001	Propagate Lab (United States)	FLY
<i>Pichia kluyveri</i> + <i>Kazachastania servazzii</i>	Trillyeast	BioEnologia (Italy)	CRY
<i>Torulaspora delbrueckii</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oenoferm Wild & Pure	Erbslöh (Germany)	ADY

3.3 Επίδραση των ζυμών non-Saccharomyces στο άρωμα του οίνου

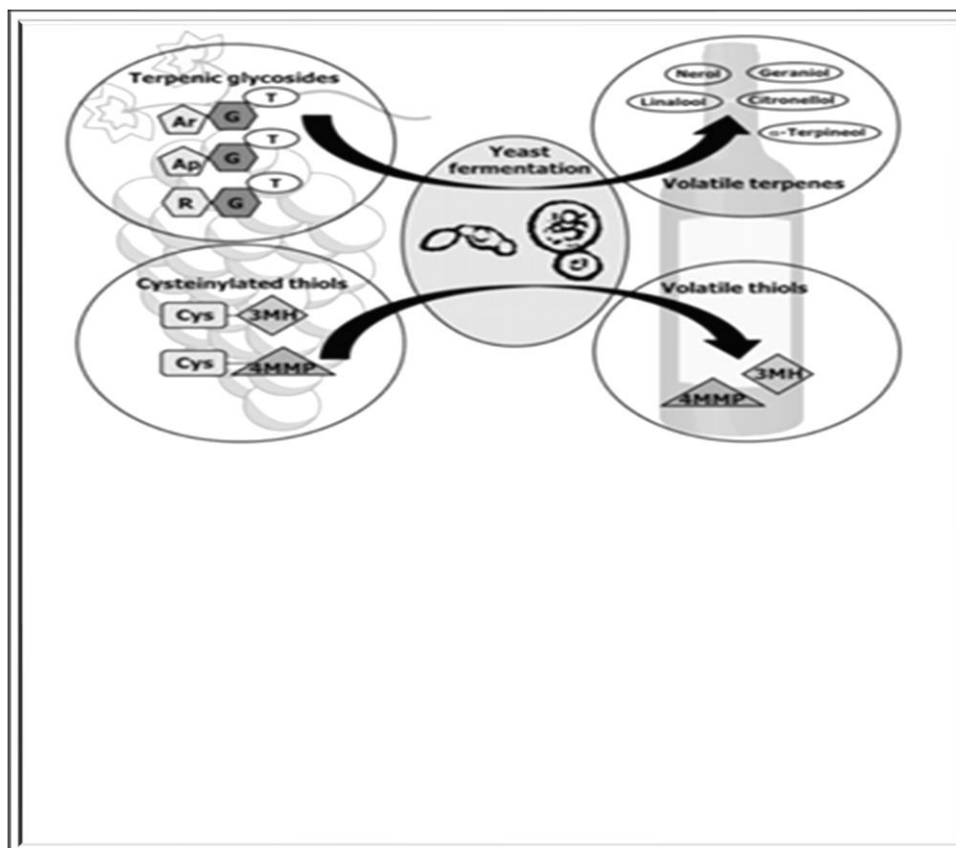
Αναμφίβολα, το άρωμα είναι ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην ποιότητα του οίνου. Όπως σε πολλά τρόφιμα, το άρωμα του οίνου αποτελείται από 100 και πλέον διαφορετικών ενώσεων με συγκεντρώσεις που μπορεί να ποικίλλουν μεταξύ 10^{-1} και 10^{-10} g/kg (Rapp and Mandery, 1986). Η ισορροπία και η αλληλεπίδραση όλων καθορίζουν την αρωματική ποιότητα του οίνου. Το άρωμα του οίνου μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τρεις ομάδες: το

ποικιλιακό ή το πρωτογενές άρωμα, που καθορίζεται από την ποικιλία σταφυλιού, της ζύμωσης ή το δευτερεύον άρωμα και το μπουκέτο ή το τριτογενές άρωμα που προκύπτει από τη μεταμόρφωση των αρωμάτων κατά την παλαίωση. Οι ζύμες non- *Saccharomyces* μπορούν να επηρεάσουν τόσο το πρωτογενές όσο και το δευτερεύον άρωμα μέσω της παραγωγής ενζύμων και μεταβολιτών, αντίστοιχα.

3.3.1 Επίδραση στο πρωτογενές άρωμα

Το πρωτογενές ή ποικιλιακό άρωμα σχηματίζεται κατά την ωρίμανση των σταφυλιών και η συμβολή του στο τελικό άρωμα του οίνου θεωρείται εκτιμώμενο χαρακτηριστικό. Η παραγωγή ενεργών ενώσεων με πρωτογενή οσμή οίνου λαμβάνει χώρα στον εξωκάρπιο της ρόγας του σταφυλιού και η τελική του συγκέντρωση στον οίνο επηρεάζεται κυρίως από την ποικιλία αμπέλου και δευτερευόντως από την κατάσταση ωρίμανσης και τις αγρονομικές και οινολογικές πρακτικές (Ewart et al., 1985· Spayd et al., 2002· Hernández-Orte et al., 2008, 2015). Οι ενώσεις που σχηματίζουν πρωτεύον άρωμα ανήκουν σε περιορισμένο αριθμό χημικών οικογενειών, συμπεριλαμβανομένων των μεθοξυπυραζινών, των C13-νορισοπρενοειδών, των πτητικών ενώσεων θείου και των τερπενίων (Ebeler and Thorngate, 2009). Οι μεθοξυπυραζίνες είναι προϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων και έχουν συσχετιστεί με φυτικά, πράσινα και ποώδη αρώματα σε ορισμένες ποικιλίες αμπέλου (ανασκόπηση στο Sidhu et al., 2015). Τα C13-νορισοπρενοειδή προέρχονται από καροτενοειδή και ιδιαίτερα η β-ιονόνη και η β-δαμασκενόνη θεωρούνται πτητικά κρούσης μη ανθικών σταφυλιών (Fang and Qian, 2006; Bindon et al., 2007; Pineau et al., 2007; Ristic et al., 2010, Fang and Qian, 2016). Ορισμένες οργανικές πτητικές ενώσεις θείου, όπως οι αρωματικέςθειόλες, συμβάλλουν σημαντικά στο άρωμα του Sauvignon Blanc και των ερυθρών ποικιλιών (Darriet et al., 1995; Tominaga et al., 1996, 1998a; Bouchilloux et al., 1998), ενώ τα τερπενοειδή, αν και υπάρχουν στα σταφύλια όλων των ποικιλιών αμπέλου, εμφανίζονται σε αρωματικές ποικιλίες όπως το Μοσχάτο, το Gewürztraminer και το Rhine Riesling στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (King and Dickinson, 2000). Στις ρόγες σταφυλιού και στους αντίστοιχους οίνους, έχουν εντοπιστεί περίπου εβδομήντα τερπενοειδή ενώσεις (Mateo and Jiménez, 2000). Μεταξύ αυτών, πέντε μονοτερπενοειδή αλκοόλες, δηλαδή η λιναλοόλη, η γερανιόλη, η νερόλη, η κιτρονελλόλη και η α-τερπινεόλη είναι οι πιο άφθονες και οι ισχυρότεροι συνεισφέροντες στο άρωμα του οίνου (Rapp, 1998, Mateo and Jiménez, 2000, Carrau et al., 205). Αυτές οι ενώσεις παρέχουν

λουλουδένιες νότες και έχουν χαμηλά όρια οσμής (Zalacain et al., 2007). Είναι ενδιαφέρον ότι οι περισσότερες από τις πρωτογενείς αρωματικές ενώσεις βρίσκονται σε ελεύθερες ή δεσμευμένες μορφές. Οι τελευταίες δεν είναι αρωματικές ενώσεις των οποίων η υδρόλυση μπορεί να συμβεί κατά τη ζύμωση μέσω της δράσης των ζυμών του κρασιού (σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2 Απελευθέρωση πρωτογενών αρωματικών ενώσεων από ζυμομύκητες.

Τα μονοτερπένια και οι πτητικές θειόλες εμφανίζονται στο σταφύλι ως άοσμες πρόδρομες ουσίες που μπορούν να απελευθερωθούν από τις ενζυμικές δραστηριότητες των ζυμομυκήτων *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Οι μονοτερπενικοί γλυκοσίδες είναι κυρίως γλυκοσίδες και διγλυκοσίδες, στις οποίες το τμήμα γλυκόζης (G) έχει περαιτέρω υποκατασταθεί κυρίως με αραβινόζη (Ar), απιόζη (Ap) ή ραμνόζη (R). Μια αντίδραση δύο σταδίων που καταλύεται από ένζυμα είναι ο κύριος μηχανισμός που προτείνεται για την ενζυματική υδρόλυση των διγλυκοσιδών και την επακόλουθη απελευθέρωση του ελεύθερου πτητικού τερπενίου (T) στο οίνο. Πρώτα μια ειδική γλυκοσιδάση διασπά τη σύνδεση μεταξύ των δύο σακχάρων και σε ένα δεύτερο στάδιο ο απελευθερωμένος γλυκοσίδης υδρολύεται από μια β-D-γλυκοσιδάση, απελευθερώνοντας γλυκόζη και το αντίστοιχο τερπένιο. Οι πτητικές θειόλες παράγονται από τις άοσμες κυστεϊνυλιωμένες πρόδρομες ενώσεις κυστεϊνη-3-μερκαπτοεξαν-1-όλη (Cys-3MH) και κυστεϊνη-4-μερκαπτο-4-μεθυλπενταν-2-όνη (Cys-4MMP) με τη δράση άνθρακα-θειού- λύσες.

Ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι πρόδρομες ουσίες αρώματος που συνδέονται με μόρια σακχάρου, κυρίως η τερπενόλη και οι C13-νορισοπρενοειδείς γλυκοσίδες, και οι μη πτητικές πρόδρομες

μορφές πτητικών θειολών συζευγμένων με κυστεΐνη ή γλουταθειόνη. Τα κύρια ένζυμα ζυμομύκητα που εμπλέκονται στην απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων από άοσμους πρόδρομους σταφυλιού είναι οι γλυκοσιδάσες που υδρολύουν τους μη πτητικούς γλυκοσιδικούς πρόδρομους (Gunata et al., 1988) και οι λυάσες άνθρακα-θείου που απελευθερώνουν πτητικές θειόλες από αδρανές άρωμα-βούντα κυστεΐνη συζυγή (Tominaga et al., 1998b). Παρακάτω επικεντρωνόμαστε στην παραγωγή αυτών των ενζύμων οινολογικής σημασίας από ζυμομύκητες οίνου που δεν είναι *Saccharomyces*. Ο Πίνακας 3.2 συνοψίζει τα είδη ζύμης που περιγράφονται ως παραγωγοί γλυκοσιδασών και λυασών άνθρακα-θείου.

Πίνακας 3.2 | non-Saccharomyces είδη ζύμης που περιγράφονται ως παραγωγοί ενζύμων που εμπλέκονται στην απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων από πρόδρομες ουσίες σταφυλιού

Yeast species	Enzym ¹					Reference
	BGL	ARA	RHA	XYL	CSL	
<i>A. pullulans</i>	x	x	x			McMahon et al., 1999
<i>B. anomalus</i>	x					Fia et al., 2005
<i>Brettanomyces</i> spp.	x					Cordero-Otero et al., 2003; Arévalo-Villena et al., 2007
<i>C. guilliermondii</i>	x		x	x		McMahon et al., 1999; Cordero-Otero et al., 2003; Rodríguez et al., 2004
<i>C. molischiana</i>	x					Fernández-González et al., 2003; Genovés et al., 2003
<i>C. stellata</i>	x		x	x		Rosi et al., 1994; Strauss et al., 2001; Cordero-Otero et al., 2003
<i>C. utilis</i>				x		Yanai and Sato, 2001
<i>C. zemplinina</i>					x	Anfang et al., 2009
<i>D. castellii</i>	x					Rosi et al., 1994
<i>D. hansenii</i>	x					Rosi et al., 1994; Yanai and Sato, 1999; Fernández-González et al., 2003
<i>D. polymorphus</i>	x					Rosi et al., 1994; Cordero-Otero et al., 2003; Arévalo-Villena et al., 2007
<i>D. pseudopolymorphus</i>	x					Cordero-Otero et al., 2003; Arévalo-Villena et al., 2006, 2007
<i>D. vanriji</i>	x					García et al., 2002
<i>Hanseniaspora</i> sp.	x			x		Swangkeaw et al., 2011
<i>H. guilliermondii</i>	x					Manzanares et al., 2000
<i>H. osmophila</i>	x			x		Manzanares et al., 1999, 2000
<i>H. vineae</i>	x	x	x	x		Mateo et al., 2011; Maturano et al., 2012; López et al., 2015
<i>H. uvarum</i>	x	x	x	x		Rosi et al., 1994; Charoenchai et al., 1997; Manzanares et al.,

					1999, 2000; Strauss et al., 2001; Fernández-González et al., 2003;
					Rodríguez et al., 2004; Arévalo-Villena et al., 2007; Mateo et al., 2011; López et al., 2015
<i>I. terricola</i>	x				González-Pombo et al., 2011
<i>K. thermotolerans</i>	x			x	Rosi et al., 1994; Zott et al., 2011
<i>M. pulcherrima/C. pulcherrima</i>	x		x	x	Rosi et al., 1994; Fernández-González et al., 2003; Rodríguez et al., 2004, 2010a; González-Pombo et al., 2008; Zott et al., 2011
<i>P. angusta</i>			x		Yanai and Sato, 2000a
<i>P. anomala</i>	x	x	x	x	Rosi et al., 1994; Charoenchai et al., 1997; Manzanares et al., 1999, 2000; Spagna et al., 2002; Mateo et al., 2011; Swangkeaw et al., 2011
<i>P. capsulate</i>		x			Yanai and Sato, 2000b
<i>P. guilliermondii</i>			x		Rodríguez et al., 2004, 2010b
<i>P. kluyvery</i>				x	Anfang et al., 2009
<i>P. membranifaciens</i>	x			x	López et al., 2015
<i>S. ludwigii</i>	x				Rosi et al., 1994
<i>S. pombe</i>	x				Rosi et al., 1994
<i>S. pararoseus</i>	x				Baffi et al., 2013
<i>T. delbrueckii</i>	x			x	Hernández-Orte et al., 2008; Zott et al., 2011; Maturano et al., 2012; Cordero-Bueso et al., 2013; Cus [^] and Jenko, 2013.
<i>T. asahii</i>	x				Wang et al., 2011
<i>W. anomalus</i>	x	x		x	Sabel et al., 2014; López et al., 2015
<i>Z. bailii</i>	x				Rosi et al., 1994; Cordero-Otero et al., 2003

1 BGL, β-D-γλυκοσιδάση; ARA, α-L-αραβινοφουρανοσιδάση; RHA, α-L-ραμνοσιδάση; XYL, β-D-ξυλοσιδάση; CSL, λυάση άνθρακα-θείου 2012; Cordero-Bueso et al., 2013; Cus[^] and Jenko, 2013.

Γλυκοζιδάσες

Από την απόδειξη ότι τα αρωματικά συστατικά ορισμένων ποικιλιών σταφυλιού υπάρχουν στην ρόγα σταφυλιού τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και συνδεδεμένα με σάκχαρα ως γλυκοζίτες (Cordonnier and Bayonove, 1974· Williams et al., 1982), υπήρξε συνεχής έρευνα για την εύρεση γλυκοσιδάσες ικανές να απελευθερώνουν ποικιλιακά αρώματα από πρόδρομες ουσίες. Το δεσμευμένο αρωματικό κλάσμα περιλαμβάνει γλυκοσίδες και διγλυκοσίδες και ενώσεις όπως τερπενόλες, τερπενοδιόλες, 2-φαινυλαιθυλική αλκοόλη, βενζυλική αλκοόλη και C13-νορισοπρενοειδή έχουν αποδειχθεί ότι είναι αγλυκόνια τέτοιων γλυκοσιδών (Winterhalter and Skouroumounis, 1999). Οι διγλυκοσίδες περιλαμβάνουν κυρίως 6-O-α-L-αραβινοφουρανοσυλ-

β-D-γλυκοπυρανοσίδες, 6-O-α-L-ραμνοπυραν-οσυλ-β-D-γλυκοπυρανοσίδες και 6-O-β-D-απιοφουρανόσυλ-β-D-γλυκοπυρανοσίδες. Λόγω του σημαντικού ρόλου των μονοτερπενίων στον προσδιορισμό του αρώματος των σταφυλιών και των οίνων, η υδρόλυση των τερπενικών γλυκοσιδίων υπήρξε το κύριο επίκεντρο της έρευνας. Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι η ενζυματική υδρόλυση λαμβάνει χώρα σε δύο βήματα (Gunata et al., 1988). Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου και ανάλογα με το σύζευγμα, ο γλυκοσιδικός δεσμός διασπάται είτε από α-L-αραβινοφουρανοσιδάση, α-L-ραμνοσιδάση ή β-D-απιοσιδάση και απελευθερώνονται οι αντίστοιχοι μονοτερπενυλ-β-D-γλυκοσίδες. Στο δεύτερο στάδιο, τα μονοτερπένια απελευθερώνονται με τη δράση μιας β-D-γλυκοσιδάσης. Αν και οι οινολογικές ζύμες μπορεί να παράγουν γλυκοσιδάσες, η πιθανή αποτελεσματικότητα των ενζύμων μπορεί να παρεμποδιστεί από όξινες συνθήκες οίνου ή υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Ένας άλλος περιορισμός αυτών των ενζύμων είναι η ασθενής δραστηριότητά τους παρουσία γλυκόζης στο γλεύκος ή ο οίνος, καθιστώντας ιδιαίτερα απαραίτητη την ανάλυση της αναστολής τους από αυτά τα συστατικά του κρασιού. Η πιθανή αποτελεσματικότητα των γλυκοσιδασών που προέρχονται από ζυμομύκητες μειώνεται ακόμη περισσότερο στις περισσότερες περιπτώσεις από το γεγονός ότι ορισμένα από τα ένζυμα είναι ενδοκυτταρικά και απελευθερώνονται μόνο σε πολύ μικρές ποσότητες στο μέσο καλλιέργειας. Ο βαθμός στον οποίο αυτοί οι παράγοντες αναστέλλουν την παραγωγή και τη δραστηριότητα της γλυκοσιδάσης εξαρτάται από τα είδη και τα στελέχη των οργανισμών που εμπλέκονται, υποδεικνύοντας την ανάγκη για ενζυμικές εξετάσεις.

Εκτεταμένη εμφάνιση δραστηριότητας β-D-γλυκοσιδάσης σε ζυμομύκητες μη *Saccharomyces* έχει αποκαλυφθεί σε αρκετές εξετάσεις. Οι (Rosi et al. 1994) έδειξαν ότι ζυμομύκητες των γενών *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Kluveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* και *Zygosaccharomyces* μπορούν να παράγουν β-D-γλυκοσιδάσες. Αργότερα αυτή η ικανότητα επιβεβαιώθηκε από άλλους συγγραφείς (Charoenchai et al., 1997; McMahon et al., 1999; Manzanares et al., 2000; Strauss et al., 2001; Spagna et al., 2002; Cordero-Otero., 2003· Fernández-González et al., 2003· Rodríguez et al., 2004· González-Pombo et al., 2008· Sabel et al., 2014· López et al., 2015) και επεκτάθηκε επίσης στο genera) *Torulasporea* (Hernández-Orte et al., 2008; Cordero-Bueso et al., 2013), *Brettanomyces* (Cordero-Otero et al., 2003; Fia et al., 2005; Arévalo-Villena et al., 2007). *Trichosporon* (Wang et al., 2011). Μερικά από αυτά τα ένζυμα, που επιλέχθηκαν ως αποτέλεσμα της δραστηριότητάς τους με τεχνητά υποστρώματα, αποδείχθηκαν επίσης αποτελεσματικά στην υδρόλυση είτε ενός

εκχυλίσματος γλυκοζίτη σταφυλιού είτε στην απελευθέρωση τερπενολών μετά την προσθήκη σε γλεύκος ή οίνος. Οι *Debaryomyces hansenii* και *H. uvarum* β-D-γλυκοσιδάσες υδρόλυσαν τερπενικούς γλυκοσίδες που απομονώθηκαν από γλεύκος σταφυλιού (Rosi et al., 1994· Fernández-González et al., 2003). Παρατηρήθηκε επίσης απελευθέρωση τερπενίου σε μούστο και οίνος που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με β-D-γλυκοσιδάσες από *Hanseniaspora* sp. και *Pichia anomala* (Swangkeaw et al., 2011). Επιπλέον, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το ένζυμο από *Hanseniaspora* sp. ήταν πιο αποτελεσματική στην απελευθέρωση των επιθυμητών αρωμάτων κατά τη διάρκεια ενός πρώιμου σταδίου αλκοολικής ζύμωσης ενώ η β-D-γλυκοσιδάση από το *P. anomala* ήταν κατάλληλη στο τελικό στάδιο. Αρκετές β-D-γλυκοσιδάσες ζυμομύκητες έχουν καθαριστεί και χαρακτηριστεί. Έχουν αναφερθεί δύο β-D-γλυκοσιδάσες *Debaryomyces* κατάλληλες για την ενίσχυση του αρώματος του οίνου. Μια ενδοκυτταρική β-D-γλυκοσιδάση *D.hansenii*, ανεκτική στην αιθανόλη και τη γλυκόζη, απελευθερώνει αποτελεσματικά μονοτερπενόλες από τις γλυκοσίδες που εξάγονται από το γλεύκος σταφυλιών Μοσχάτο. Επιπλέον, όταν το ένζυμο προστέθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του Μοσχάτου, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση κυρίως της νερόλης και της λιναλοόλης (Yanai and Sato, 1999). Αντίθετα, ένα στέλεχος *Debaryomyces pseudopolymorphus* (Cordero-Otero et al., 2003) παρήγαγε μια εξωκυτταρική β-D-γλυκοσιδάση με όξινο βέλτιστο pH και δεν αναστέλλεται από τη γλυκόζη ή την αιθανόλη (Arévalo-Villena et al., 2006). του καθαρισμένου ενζύμου στην οινοποίηση δεν δοκιμάστηκε. Η ενζυματική επεξεργασία του κρασιού με μια καθαρισμένη ανεκτική σε αιθανόλη β-D-γλυκοσιδάση από το *Sporidiobolus pararoseus*, μέλος των οινολογικών οικοσυστημάτων στη νοτιοανατολική περιοχή της Βραζιλίας, αύξησε σημαντικά την ποσότητα των ελεύθερων τερπενίων (Baffi et al., 2011, 2013). Έχουν περιγραφεί διάφορες στρατηγικές είτε για τη βελτίωση της σταθερότητας της β-D-γλυκοσιδάσης είτε για την απόδοση του ενζύμου. Μια εξωκυτταρική β-D-γλυκοσιδάση από την *Issatchenkia terricola*, ενεργή παρουσία γλυκόζης, αιθανόλης και metabisulfite ακινητοποιήθηκε για τη βελτίωση της σταθερότητας του όξινου pH. Αυτή η στρατηγική αύξησε την ποσότητα των μονοτερπενίων και των νοριζοπρενοειδών, δείχνοντας τη δυνατότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου για την ανάπτυξη αρώματος στους οίνους (González-Pombo et al., 2011). Όσον αφορά τη βελτίωση της απόδοσης, αναφέρθηκε η χρησιμότητα της μεθοδολογίας της επιφάνειας απόκρισης για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής μιας β-D-γλυκοσιδάσης *Trichosporon asahii* (Wang et al., 2012). Η β-D-γλυκοσιδάση *T. asahii* παρουσίασε καλύτερη ικανότητα από τα μυκητιακά και φυτικά

εμπορικά ένζυμα στην υδρόλυση αρωματικών προδρόμων σε νεαρό οίνο. Επίσης, μια ανασυνδυασμένη ζύμη κρασιού *S. cerevisiae* που εκφράζει το γονίδιο *Candida molischiana* *bgln* που κωδικοποιεί μια β-D-γλυκοσιδάση ικανή να απελευθερώνει τερπενόλες και αλκοόλες από ένα εκχύλισμα γλυκοσιδίου έχει χρησιμοποιηθεί για να διευκολύνει τον καθαρισμό της πρωτεΐνης (Genovés et al., 2003). Από περισσότερα από 300 στελέχη ζύμης οίνου, μόνο ένα στέλεχος *P. anomala* έδειξε δράση α-L-αραβινοφουρανοσιδάσης ενώ κανένα από αυτά δεν ήταν θετικό για παραγωγή α-L-ραμνοσιδάσης (Spagna et al., 2002). Επίσης, έχει συζητηθεί η δυνατότητα ορισμένων ζυμών οίνου από τα γένη *Candida*, *Hanseniaspora* και *Pichia* να παράγουν δραστηριότητα β-D-ξυλοσιδάσης που είναι ενεργή σε συνθήκες οινοποίησης (Manzanares et al., 1999; Yanai and Sato, 2001; Rodríguez et al., 2004; López et al., 2015). Είναι ενδιαφέρον ότι έχουν αναφερθεί στελέχη ζυμομύκητα ικανά να εμφανίζουν διάφορες δραστηριότητες γλυκοσιδάσης : ένα στέλεχος *Aureobasidium pullulans* ικανό να υδρολύει γλυκοσίδες σταφυλιού εμφάνισε β-D-γλυκοσιδάση, α-L-αραβινοφουρανοσιδάση και α-L-ραμνοσιδάση, ενώ η *Candida guilliermondii* παρήγαγε και τις δύο δραστηριότητες D-γλυκοσιδάση και α-L-ραμνοσιδάση (McMahon et al., 1999). Δύο στελέχη *H. uvarum*, ένα *Hanseniaspora vineae* και ένα *P. anomala* περιγράφηκαν ως παραγωγοί των τεσσάρων δραστηριοτήτων γλυκοσιδάσης (Mateo et al., 2011), ενώ ένα στέλεχος *Wickerhamomyces anomalus* (εναλλακτικές ονομασίες *Hansenula anomala*, *P. anomala* και *Candida pelliculosa*) που παράγει β-D-γλυκοσιδάση, εμφάνισε επίσης δραστηριότητες α-L-αραβινοφουρανοσιδάσης και β-D-ξυλοσιδάσης (Sabel et al., 2014). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των καθαρισμένων γλυκοσιδασών για την απελευθέρωση τερπενίων από πρόδρομες ουσίες έχει αναφερθεί μόνο για τις ενδοκυτταρικές α-L-ραμνοσιδάσες από *Pichia angusta* (Yanai and Sato, 2000a) και *Pichia guilliermondii* (Rodríguez et al. -L-αραβινοφουρανοσιδάση από την *Pichia capsulata* (Yanai and Sato, 2000b) και μια β-D-ξυλοσιδάση από την *Candida utilis* (Yanai and Sato, 2001). Το τελευταίο αύξησε επίσης τη συγκέντρωση τερπενίων μετά την προσθήκη στο γλεύκος σταφυλιών Moscatel κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Yanai and Sato, 2001). Ο ρόλος των εξω-γλυκανασών στην απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων από γλυκοσιδικά συνδεδεμένους πρόδρομους σε ένα μόνο ενζυματικό στάδιο έχει συζητηθεί (Gil et al., 2005). Από αυτή την άποψη, ένα προϊόν απομόνωσης ζυμομύκητα AS1, που ταυτοποιήθηκε ως στέλεχος *W. anomalus* επιλέχθηκε λόγω της ικανότητάς του να υδρολύει αρκετούς συνθετικούς και φυσικούς γλυκοσίτες υπό οινολογικές συνθήκες (Sabel et al., 2014). Αργότερα, το ένζυμο που είναι

υπεύθυνο για την υδρόλυση επιλεγμένων γλυκοσιδών καθαρίστηκε από το υπερκείμενο καλλιέργειας του AS1 και χαρακτηρίστηκε ως πολυλειτουργική εξω-β-1,3-γλυκανάση δραστική υπό τυπικές συνθήκες που σχετίζονται με τον οίνο (Schwentke et al., 2014). Η σκοπιμότητα χρήσης ζυμομυκήτων που παράγουν β-D-γλυκοσιδάση στη ζύμωση αντί της προσθήκης καθαρισμένων ενζύμων αντιπροσωπεύει μια ενδιαφέρουσα επιλογή. Είτε μόνος είτε σε μικτό εκκινητή με *S. cerevisiae*, έχει αξιολογηθεί η ικανότητα των ζυμών που δεν είναι *Saccharomyces* να συμβάλλουν στο προφίλ του αρωματικού οίνου. Διαφορετικά στελέχη *Torulaspora delbrueckii* συνέβαλαν στο προφίλ του αρώματος με λουλουδάτο και φρουτώδες άρωμα (Maturano et al., 2012; Cordero-Bueso et al., 2013). Οι εκκρινόμενες β-D-γλυκοσιδάσες *H. vineae* και *T. delbrueckii* ανιχνεύθηκαν σε όλη τη διαδικασία ζύμωσης, αν και η δραστηριότητα μειώθηκε με την αύξηση του χρόνου ζύμωσης, υποδηλώνοντας την αρνητική επίδραση της αιθανόλης (Maturano et al., 2012). Επίσης, απομονώσεις *Pichia membranifaciens*, *H. vineae*, *H. unarum* και *W. anomalus* που έδειξαν δραστηριότητα β-D-γλυκοσιδάσης προκάλεσαν μια μέτρια συνολική αύξηση των τερπενίων όταν εμβολιάστηκαν σε τελικούς οίνους (López et al., 2015). Οι πρώτοι μικτές εκκινητές που βασίζονται σε ζυμομύκητες που δεν είναι *Saccharomyces* ικανοί να παράγουν δραστηριότητα β-D-γλυκοσιδάσης περιγράφηκαν για *Debaryomyces hansenii* και *D. pseudopolymorphus* (García et al., 2002; Cordero-Otero et al., 2003) και αργότερα για *Candida pulcherrima* (εναλλακτική ονομασία *Metschnikowia pulcherrima*) (Rodríguez et al., 2010a) και *T. delbrueckii* (Cus and Jenko, 2013). Λεπτομερείς πληροφορίες για αυτές τις μικτές εκκινητές θα βρείτε στις επόμενες ενότητες.

Λυάσες άνθρακα-θείου

Ορισμένες ενώσεις που περιέχουν θείο, οι λεγόμενες πτητικές ή ποικιλιακές θειόλες, μπορούν να συμβάλουν σε θετικά αρώματα όπως τροπικά, φρούτα του πάθους και αποχρώσεις που μοιάζουν με γκουάβα. Αυτές οι ενώσεις που θεωρούνται ως πρόσκρουση αρωματικές ουσίες στα κρασιά Sauvignon Blanc είναι η 4-μερκαπτο-4-μεθυλπενταν-2-όνη (4MMP), που θυμίζει κουτί, φρούτο του πάθους, σκούπα και μαύρο ρεύμα. και 3-μερκαπτοεξαν-1-όλη (3MH) και 3-μερκαπτοεξυλοξικό (3MHA), υπεύθυνα για το άρωμα των φρούτων του πάθους, του γκρέιπφρουτ και των εσπεριδοειδών. Οι πτητικές θειόλες δεν είναι μοναδικές στα κρασιά Sauvignon Blanc. Έχει επίσης βρεθεί ότι συμβάλλουν σημαντικά στα προφίλ αρώματος κρασιών που παρασκευάζονται από άλλες ποικιλίες όπως Riesling, Colombard, Semillon, Cabernet

Sauvignon και Merlot (αναθεωρημένο στο [Coetzee and du Toit, 2012](#)). Οι πτητικές θειόλες είναι ως επί το πλείστον ανύπαρκτες στον χυμό σταφυλιού και παράγονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης από ζυμομύκητες από άοσμους, μη πτητικές πρόδρομες ουσίες που υπήρχαν αρχικά στο γλεύκος (αναθεωρήθηκε στο [Cordente et al., 2012](#)). Έχει αποδειχθεί ότι τα 4MMP και 3MH υπάρχουν στα σταφύλια στη μη πτητική πρόδρομη μορφή τους, συζευγμένη με κυστεΐνη ή γλουταθειόνη. Το ένζυμο κλειδί για τη διάσπαση των κυστεΐνυλιωμένων προδρόμων είναι η β-λυσάση IRC7 του *S. cerevisiae*, με προτίμηση υποστρώματος για το cys-4MMP έναντι του cys-3MH ([Roncoroni et al., 2011](#)). Ο μηχανισμός με τον οποίο αποκωδικοούνται οι πρόδρομες ουσίες της γλουταθειονωμένης θειόλης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά είναι πιθανό να περιλαμβάνει μια οδό πολλαπλών σταδίων με την παραγωγή της κυστεΐνυλιωμένης μορφής ως ενδιάμεσο ([Grant-Preece et al., 2010](#)). Δεν έχει εντοπιστεί πρόδρομος του 3MHA στα σταφύλια, αυτή η ένωση σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μέσω εστεροποίησης του 3MH από την αλκοολική ακετυλοτρανσφεράση ATF1 ([Swiegers et al., 2006](#)). Αναμφίβολα ο κύριος παράγοντας στην απελευθέρωση πτητικής θειόλης κατά την αλκοολική ζύμωση είναι το στέλεχος ζυμομύκητα ([Dubourdieu et al., 2006](#)). Διαπιστώθηκε ότι τα στελέχη του *S. cerevisiae* διέφεραν σημαντικά ως προς τις ικανότητές τους να παράγουν πτητικές θειόλες και να διαμορφώνουν τους ποικιλιακούς χαρακτήρες του κρασιού Sauvignon Blanc ([Swiegers et al., 2009](#)). Όσον αφορά τα είδη που δεν είναι *Saccharomyces*, μόνο δύο προβολές έχουν εξετάσει τη σκοπιμότητά τους να απελευθερώσουν πτητικές θειόλες. Η πρώτη προβολή από τους ([Anfang et al., 2009](#)) έδειξε ότι τα περισσότερα από τα έντεκα μη *Saccharomyces* απομονωμένα στελέχη που δοκιμάστηκαν ήταν σε θέση να παράγουν συγκεντρώσεις 3MH πάνω από το όριο αντίληψης, αλλά μόνο δύο απομονώσεις *Pichia kluyveri* και *Candida zemplinina* (εναλλακτικές ονομασίες *Candida stellata* και *Starmerella bacillaris*) παρήγαγαν συγκεντρώσεις και 3MH 3MHA συγκρίσιμο με εκείνα που παράγονται από *S. cerevisiae*. Σε αντίθεση με αυτό που βρέθηκε για το *S. cerevisiae*, τα αποτελέσματα έδειξαν μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων 3MH και 3MHA που παράγονται από τα προϊόντα απομόνωσης *P. kluyveri* και *C. zemplinina*, υποδηλώνοντας μειωμένη ικανότητα μετατροπής του 3MH σε 3MHA ή πιθανώς εναλλακτικών μεταβολικών οδών για ο σχηματισμός του ([Anfang et al., 2009](#)). Σε μια δεύτερη προβολή, αξιολογήθηκε η πιθανή επίδραση 15 στελεχών που δεν είναι *Saccharomyces* από επτά είδη στην απελευθέρωση 4MMP και 3MH σε πρότυπο μέσου και σε γλεύκος Sauvignon Blanc μετά από μερική ζύμωση ([Zott et al., 2011](#)). Γενικά, τα στελέχη non-*Saccharomyces* είχαν

μεγαλύτερη ικανότητα να απελευθερώνουν 3MH από 4MMP και στα δύο μέσα. Μόνο τα στελέχη *M. pulcherrima* και *H. uvarum* στο πρότυπο μέσου και *Kluyveromyces thermotolerans* στο γλεύκος μπόρεσαν να παράγουν σημαντικές ποσότητες 4MMP. Όσον αφορά την απελευθέρωση 3MH, τα στελέχη *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* απελευθέρωσαν μεγάλες ποσότητες αυτής της ένωσης στο πρότυπο μέσου ενώ τα *M. pulcherrima* και *K. thermotolerans* ξεχώρισαν ως καλοί παραγωγοί στο φυσικό γλεύκος.

3.3.2 Επίδραση στο δευτερεύον άρωμα

Οι περισσότερες από τις ενώσεις που καθορίζουν το άρωμα του οίνου προέρχονται από τη διαδικασία της ζύμωσης. Οι συγκεντρώσεις τους εξαρτώνται κυρίως από τις κυρίαρχες ζύμες και τις συνθήκες ζύμωσης (Egli et al., 1998; Henick-Kling et al., 1998; Steger and Lambrechts, 2000). Αν και η αιθανόλη, η γλυκερόλη και το CO₂ είναι ποσοτικά οι πιο άφθονες από αυτές τις ενώσεις, η συμβολή τους στο δευτερογενές άρωμα είναι σχετικά περιορισμένη. Τα πτητικά λιπαρά οξέα, οι ανώτερες αλκοόλες, οι εστέρες και, σε μικρότερο βαθμό, οι αλδεΐδες, έχουν μεγαλύτερη συμβολή στο δευτερογενές άρωμα (Rapp and Versini, 1991), αν και τα πτητικά που προέρχονται από λιπαρά οξέα και από ενώσεις που περιέχουν άζωτο ή θείο συμβάλλουν επίσης (Boulton et al., 1996). Η βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων έχει ανασκοπηθεί με περισσότερες λεπτομέρειες από τους (Lambrechts και Pretorius 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι η βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων εξαρτάται από το είδος και το στέλεχος, επιτρέποντας την επιλογή αυτών των βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος στελεχών. Επιπλέον, και ανάλογα με τη συγκέντρωση που επιτυγχάνεται στο κρασί, αυτές οι ενώσεις που προκύπτουν από το μεταβολισμό της ζύμης έχουν θετικό ή αρνητικό αντίκτυπο στο άρωμα και την ποιότητα του οίνου. Παρακάτω περιγράφουμε τη συμβολή των ειδών ζύμης non-Saccharomyces στο δευτερογενές άρωμα του οίνου. Ο Πίνακας 3.3 δείχνει τα είδη ζυμομύκητα που περιγράφονται ως υψηλού ή χαμηλού παραγωγού δευτερογενών αρωματικών ενώσεων.

Πίνακας 3.3 | Δευτερεύουσες αρωματικές ενώσεις που παράγονται από ζύμες οίνου non-Saccharomyces.

Compound	High producers	Low producers	Reference
Acetic acid	Hanseniaspora	T. delbrueckii	Gallander, 1977; Snow and Gallander, 1979;
	Zygosaccharomyces	K. thermotolerans	Ciani and Maccarelli, 1998; du Toit and Pretorius, 2000;

	<i>S. pombe</i>	<i>C. stellata/C.zemplinina</i>	Soden et al., 2000; Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003; Romano et al., 2003; Kapsopoulou et al., Gallander, 1977; Snow and Gallander, 1979; Ciani and Maccarelli, 1998; du Toit and Pretorius, 2000;
Higher alcohols	<i>M. pulcherrima</i>	<i>Hanseniaspora</i>	Romano and Suzzi, 1993; Rojas et al., 2003;
	<i>C. zemplinina</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>	Clemente-Jiménez et al., 2004; Moreira et al.,
	<i>L. thermotolerans</i>		2008; Viana et al., 2008; Andorrà et al., 2010;
Esters	<i>Candida</i>		Ough et al., 1968; Suomalainen and Lehtonen,
	<i>Hansenula</i>		1979; Nykänen, 1986; Mateo et al., 1991;
	<i>Pichia</i>		Sponholz, 1993; Romano et al., 1997; Rojas et al.,
	<i>Hanseniaspora</i>		2001, 2003; Moreira et al., 2005; Viana et al., 2008;
Aldehydes			
Acetaldehyde		<i>K. apiculata</i>	Fleet and Heard, 1993; Romano et al., 2003
Volatile phenols	<i>Brettanomyces/Dekkera</i>	<i>Candida</i>	Lambrechts and Pretorius, 2000; Shinohara et al.,
	<i>P. guilliermondii</i>	<i>K. lactis</i>	2000; Dias et al., 2003; Viana et al., 2008; Renault
		<i>T. delbrueckii</i>	et al., 2009; Beckner Whitener et al., 2015
Sulfur compounds	<i>Candida</i>		Strauss et al., 2001; Moreira et al., 2008; Viana
	<i>Hanseniaspora</i>		et al., 2008; Renault et al., 2009; Beckner Whitener

Πτητικά λιπαρά οξέα

Το οξικό οξύ είναι υπεύθυνο για το 90% της πτητικής οξύτητας των οίνων ενώ τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, όπως το προπανοϊκό και το βουτανοϊκό οξύ, υπάρχουν σε μικρές ποσότητες (Radler, 1993). Η παραγωγή τους σχετίζεται επίσης με την ανάπτυξη βακτηρίων (Ribereau-Gayon et al., 1998). Το οξικό οξύ γίνεται δυσάρεστο σε συγκεντρώσεις κοντά στο όριο γεύσης του 0,7–1,1 g/L και συνήθως τιμές μεταξύ 0,2 και 0,7 g/L θεωρούνται βέλτιστες (Lambrechts and Pretorius, 2000). Μελέτες παραγωγής οξικού οξέος από ζυμομύκητες μη *Saccharomyces* έχουν δημιουργήσει εξαιρετικά ποικίλα αποτελέσματα. Ορισμένα μη *Saccharomyces* γένη όπως

τα *Hanseniaspora* και *Zygosaccharomyces* έχουν παραδοσιακά περιγραφεί ως παραγωγοί υπερβολικών ποσοτήτων οξικού οξέος (du Toit and Pretorius, 2000; Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003; Romano et al., 2003; Mendoza. 2007) και, για το λόγο αυτό, θεωρούνται εδώ και πολύ καιρό ως ζυμομύκητες αλλοίωσης. Το είδος *Schizosaccharomyces pombe* συνδέεται συνήθως με υψηλά επίπεδα οξικού οξέος (Gallander, 1977; Snow και Gallander, 1979). Ωστόσο, αυτή η ένωση παράγεται με σημαντική μεταβλητότητα στελεχών. Για παράδειγμα, επίπεδα οξικού οξέος που κυμαίνονται από περίπου 0,6 g/L έως περισσότερα από 3,4 g/L έχουν περιγραφεί για τα στελέχη *H. uvarum* (Romano et al., 2003) ενώ η εξέταση του *S. pombe* επέτρεψε την επιλογή των στελεχών που παράγουν λιγότερο από 0,4 g/L οξικού οξέος (Benito et al., 2014a). Αντίθετα, διαφορετικοί έλεγχοι στελεχών *T. delbrueckii* για επιθυμητές οινολογικές ιδιότητες κατέδειξαν διαφορές στη ζυμοτική ικανότητα αλλά πάντα χαμηλή παραγωγή πτητικής οξύτητας σε σύγκριση με το *S. cerevisiae* (Ciani and Maccarelli, 1998; Renault et al., Comitini 209 al., 2011). Αυτό το χαρακτηριστικό είναι επίσης χαρακτηριστικό της *Lachancea thermotolerans* (παλαιότερα γνωστή ως *K. thermotolerans*) μαζί με την υψηλή παραγωγή L-γαλακτικού οξέος (). Οι *C. stellata*/*C. zemplinina* παρουσιάζουν έντονο φρουκτόφιλο χαρακτήρα (Soden et al., 2000), το οποίο μπορεί να είναι πλεονέκτημα κατά τη ζύμωση γλυκών κρασιών, καθώς αυτό το είδος δεν παράγει υπερβολικά επίπεδα οξικού οξέος ως απόκριση στο οσμωτικό στρες σε σύγκριση με το *S. cerevisiae* (Rantsiou et al., 2012). Πρόσφατα επιβεβαιώθηκε ο ισχυρός φρουκτόφιλος χαρακτήρας του *C. zemplinina* και η ικανότητά του να παράγει χαμηλές ποσότητες αιθανόλης και οξικού οξέος και υψηλές ποσότητες γλυκερίνης (Englezos et al., 2015).

Ανώτερες Αλκοόλες

Είναι η μεγαλύτερη ομάδα αρωματικών ενώσεων (Amerine et al., 1980). Οι υψηλότερες αλκοόλες συμβάλλουν στην αρωματική πολυπλοκότητα του κρασιού σε συγκεντρώσεις κάτω των 300 mg/L. Ωστόσο, όταν οι συγκεντρώσεις τους υπερβαίνουν τα 400 mg/L, θεωρείται ότι έχουν αρνητική επίδραση στο άρωμα (Rapp and Mandery, 1986). Η σημασία των ανώτερων αλκοολών σχετίζεται επίσης με το ρόλο τους ως πρόδρομοι εστέρες (Soles et al., 1982). Γενικά, μελέτες για υψηλότερη παραγωγή αλκοόλης σε ζυμομύκητες non-*Saccharomyces* υπογραμμίζουν την επίδραση που μπορούν να έχουν αυτές οι ζύμες στη χημική σύνθεση και

ποιότητα του οίνου (Herraiz et al., 1990; Mateo et al., 1991; Gil et al., 1996). Στους γλεύκους που έχουν υποστεί ζύμωση, η συνολική παραγωγή υψηλότερων αλκοολών από καθαρές καλλιέργειες ειδών *Hanseniaspora* είναι χαμηλότερη από αυτή που βρέθηκε με το *S. cerevisiae* (Rojas et al., 2003; Moreira et al., 2008; Viana et al., 2008). Επίσης, στελέχη *Zygosaccharomyces* που απομονώθηκαν από γλεύκη σταφυλιών έχουν περιγραφεί ως παραγωγοί χαμηλών ποσοτήτων υψηλότερων αλκοολών (Romano και Suzzi, 1993). Αντίθετα, οι οίνοι με τον *C. zemplinina* περιείχαν τεράστιες ποσότητες υψηλότερων αλκοολών, οι συγκεντρώσεις των οποίων ξεπερνούσαν σαφώς τα 400 mg/L (Andorrà et al., 2010). Όσον αφορά τις συγκεκριμένες αλκοόλες, η αυξημένη παραγωγή 2-φαινυλαιθυλικής αλκοόλης, ένωση που σχετίζεται με ευχάριστα αρώματα, έχει περιγραφεί ως χαρακτηριστικό του *M. pulcherrima* (Clemente-Jiménez et al., 2004), *L. thermotolerans* (Beckner Whitener et al., 2015), και *C. zemplinina* (Andorrà et al., 2010).

Εστέρες

Οι εστέρες είναι οι πιο άφθονες ενώσεις που βρίσκονται στον οίνο, με περίπου 160 να έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα. Αν και διάφοροι εστέρες μπορούν να σχηματιστούν κατά τη ζύμωση, οι πιο άφθονοι είναι αυτοί που προέρχονται από οξικό οξύ (οξικός αιθυλεστέρας, οξικός ισοαμυλεστέρας, οξικός ισοβουτυλεστέρας και οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας) και αιθυλεστέρες κορεσμένων λιπαρών οξέων (βουτανοϊκός αιθυλεστέρας, καπροϊκός αιθυλεστέρας, καπρυλικός αιθυλεστέρας και καπρικός αιθυλεστέρας). Ο κύριος εστέρας στον οίνο είναι ο οξικός αιθυλεστέρας και μπορεί να προσδώσει αλλιώτικο χαρακτήρα σε επίπεδα 150–200 mg/L (Lambrechts and Pretorius, 2000).

Οι ζύμες οίνου non-*Saccharomyces*, γνωστές ως καλοί παραγωγοί εστέρων, έχουν παραδοσιακά συσχετιστεί με τις αρνητικές επιδράσεις του σχηματισμού υψηλού οξικού αιθυλεστέρα, ενώ τα επίπεδα των αιθυλεστέρων που παράγονται από αυτές τις ζύμες είναι γενικά πολύ χαμηλότερα από εκείνα που ανιχνεύονται στους οίνους με τον *S. cerevisiae*. (Rojas et al., 2001, 2003).

Τα είδη που ανήκουν στα γένη *Candida*, *Hansenula* και *Pichia* περιγράφηκαν ότι έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να παράγουν οξικό αιθυλεστέρα από τα στελέχη οίνου του *S. cerevisiae* (Ough et al., 1968; Nykänen, 1986). Επίσης, σε μια μελέτη όπου η παραγωγή εστέρα ομαδοποιήθηκε ανά γένη ζυμομύκητα, τα *Hanseniaspora* και *Pichia* ξεχώρισαν από την παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα (Viana et al., 2008). Και τα δύο γένη παρήγαγαν παρόμοια

επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα, αλλά ο *Hanseniaspora* ήταν επίσης ισχυρός παραγωγός ειδικών οξικών εστέρων φρούτων όπως ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας και ο οξικός ισοαμυλεστέρας (Rojas et al., 2001; Moreira et al., 2005; Viana et al., 2008), ενώ τα γένη *Pichia* και *Rhodotorula* παρήγαγαν αξιοσημείωτα επίπεδα οξικού ισοαμυλεστέρα (Suomalainen and Lehtonen, 1979; Viana et al., 2008). Μεταξύ των ειδών *Hanseniaspora*, συγκεκριμένα το *H. uvarum* αναφέρεται ότι είναι καλός παραγωγός εστέρων γενικά (Mateo et al., 1991; Sponholz, 1993; Romano et al., 1997) ενώ οι *Hanseniaspora guilliermondii* και *Hanseniaspora* παράγουν ισχυρά οσμόφιλα οξικός φαινυλαιθυλεστέρας (Rojas et al., 2001, 2003; Viana et al., 2008).

Όσον αφορά τους αιθυλεστέρες, η παραγωγή καπρυλικού αιθυλεστέρα φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό του *T. delbrueckii* (Viana et al., 2008). Το προφίλ αρώματος της ζύμης *Kazachstania gamospora* που ανακαλύφθηκε πρόσφατα έδειξε ότι αυτό το είδος παρήγαγε περισσότερους εστέρες από το στέλεχος ελέγχου *S. cerevisiae*, αλλά ειδικά προπιονικό φαινυλαιθυλεστέρα, ένας εστέρας επιθυμητός στον οίνο λόγω του ανθικού αρώματος του (Beckner Whitener et al., 2015).

Αλδεΐδες

Αυτές οι ενώσεις με μυρωδιές που μοιάζουν με μήλα είναι σημαντικές για το άρωμα και το μπουκέτο οίνου λόγω των χαμηλών αισθητηριακών τιμών τους. Μεταξύ των αλδεΐδων, η ακεταλδεΐδη αποτελεί περισσότερο από το 90% της συνολικής περιεκτικότητας των οίνων και η ποσότητα της μπορεί να κυμαίνεται από 10 mg/L έως 300 mg/L (Lambrechts and Pretorius, 2000). Τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* παράγουν συνήθως υψηλότερα επίπεδα ακεταλδεΐδης (5–120 mg/L) από τα είδη non-*Saccharomyces* (έως 40 mg/L) όπως τα *Kloeckera apiculata*, *Candida krusei*, *C. stellata*, *H. anomala* και *M. pulcherrima* (Fleet and Heard, 1993). Μια μέση συγκέντρωση ακεταλδεΐδης περίπου 25 mg/L περιγράφηκε για τα στελέχη *H. uvarum*, αν και παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην παραγωγή μεταξύ των στελεχών (Romano et al., 2003).

Πτητικές φαινόλες και ενώσεις θείου

Από τις πτητικές φαινόλες, οι πιο σημαντικές είναι οι βινυλφαινόλες στους λευκούς οίνους και οι αιθυλφαινόλες στους κόκκινους οίνους. Η παρουσία τους είναι πάντα ανεπιθύμητη, αφού ακόμη και σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο αντίληψης αναφέρεται ότι συγκαλύπτουν τις

φρουτώδεις νότες των λευκών οίνων. Αυτές οι ενώσεις παράγονται από το μη πτητικό φερουλικό και π-κουμαρικό οξύ. Παραδοσιακά, οι παραγωγοί αιθυλφαινόλης έχουν αποδοθεί στο γένος *Brettanomyces/Dekkera* (Lambrechts and Pretorius, 2000).

Ωστόσο, αρκετές μελέτες εντόπισαν επίσης τα είδη *Candida*, τα στελέχη *Kluyveromyces lactis*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* και *P. guilliermondii* ως παραγωγούς πτητικής φαινόλης, αν και μόνο το *P. guilliermondii* εμφάνισε την ίδια ικανότητα μετατροπής με τα είδη *Dekkera* (Shinohara 2000, Dias et al., 2003; Renault et al., 2009; Beckner Whitener et al., 2015).

Αντίθετα, τα *H. guilliermondii*, *H. osmophila* και *P. membranifaciens* δεν ήταν σε θέση να αποκαρβοξυλιώσουν ούτε το φερουλικό ούτε το π-κουμαρικό οξύ (Viana et al., 2008).

Οι αισθητηριακές ιδιότητες των θειούχων ενώσεων ποικίλλουν εκτενώς και παρόλο που οι περισσότερες από αυτές συνδέονται με αρνητικούς αρωματικούς περιγραφείς, μπορούν να έχουν θετική συμβολή στο άρωμα του οίνου μέσω της εισαγωγής φρουτωδών νότων (ανασκόπηση στο Swiegers and Pretorius, 2005). Η κύρια ένωση αυτής της ομάδας είναι το υδρόθειο. Η παραγωγή από ζυμομύκητες μη *Saccharomyces* περιλαμβάνει είδη *Candida* και *Hanseniaspora* (Strauss et al., 2001; Viana et al., 2008) καθώς και *T. delbrueckii* (Renault et al., 2009). Η συνεισφορά των *H. uvarum* και *H. guilliermondii* στο προφίλ θειούχων ενώσεων των οίνων αξιολογήθηκε από τους (Moreira et al. 2008) και συνήχθη το συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη των ζυμομυκήτων μπορεί να μην έχει αρνητική επίδραση. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι τα στελέχη *T. delbrueckii* και *K. gamospora* είναι σε θέση να παράγουν την ένωση του θείου την 3-μεθυλθειο-1-προπανόλη σε υψηλότερη συγκέντρωση από το *S. cerevisiae*, αν και εξαρτιόταν από την ποικιλία του γλεύκους (Beckner Whitener et al., 2015). Ο σχηματισμός πτητικών θειολών από ζυμομύκητες non-*Saccharomyces* έχει περιγραφεί στην ενότητα του πρωτογενούς αρώματος.

3.4 Μικτοί Εκκινητές

Η χρήση μικτών εκκινητών επιλεγμένων ζυμών non- *Saccharomyces* για την εκμετάλλευση των θετικών τους ικανοτήτων σε συνδυασμό με το *S. cerevisiae* για την αποφυγή κολλημένων ζυμώσεων αντιπροσωπεύει μια εφικτή εναλλακτική λύση τόσο για τις αυθόρμητες όσο και για τις εμβολιασμένες ζυμώσεις.

Αυτοί οι συνδυασμοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή οίνων με μοναδικά αρωματικά χαρακτηριστικά. Με βάση την ικανότητά τους να παράγουν ένζυμα που ενισχύουν τη

γεύση ή να τροποποιούν τη συγκέντρωση δευτερογενών μεταβολιτών, έχουν σχεδιαστεί και προταθεί διαφορετικοί μικτοί εκκινητές ως εργαλείο για τη βελτίωση της ποιότητας του κρασιού (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4 Μικτοί εκκινητές σχεδιασμένα να βελτιώνουν το πρωτογενές και το δευτερεύον άρωμα του οίνου.

Mixed starter	Impact on wine aroma	Inoculation	Must	Reference
<i>C. zemplinina/S. cerevisiae</i>	3MH increase	Co-inoculation	Sauvignon Blanc	Anfang et al., 2009
	Acetic acid decrease	Co-inoculation, sequential	Erbaluce dried grape must, Pinot Grigio	Ciani and Ferraro, 1998; Rantsiou et al., 2012
<i>D. pseudopolymorphus/S. cerevisiae</i>	Geraniol, nerol and citronellol increase	Co-inoculation	Chardonnay	Cordero-Otero et al., 2003
<i>D. vanriji/S. cerevisiae</i>	Geraniol increase	Sequential	Muscat of Frontignan	García et al., 2002
<i>H. guilliermondii/S. cerevisiae</i>	Acetate ester increase	Co-inoculation	Bobal, natural must	Rojas et al., 2003; Moreira et al., 2008
	Sulfur compound increase	Co-inoculation	Natural must	Moreira et al., 2008
<i>H. uvarum/S. cerevisiae</i>	Acetate ester increase	Co-inoculation	Synthetic must, Macabeo, natural must	Moreira et al., 2008; Andorrà et al., 2010, 2012
	Acetate and ethyl ester Increase	Co-inoculation, sequential	Bobal, Chardonnay white, Tempranillo	Viana et al., 2009, 2011; Medina et al., 2013
<i>I. orientalis/S. cerevisiae</i>	Wine deacidification	Co-inoculation	Campbell's Early	Kim et al., 2008
<i>K. gamospora/S. cerevisiae</i>	Acetate and ethyl ester Increase	Sequential	Ribolla	Dashko et al., 2015
	Wine acidification	Co-inoculation, sequential	Pasteurized natural must, sterile grape must	Kapsopoulou et al., 2007; Comitini et al., 2011; Gobbi et al., 2013
<i>M. pulcherrima/S. cerevisiae</i>	α -Terpineol increase	Sequential	Muscat d'Alexandrie	Rodríguez et al., 2010a
	Acetic acid decrease	Co-inoculation	Pasteurized natural must	Comitini et al., 2011
	Ethyl ester increase	Co-inoculation, sequential	Emir, Muscat d'Alexandrie	Zohre and Erten, 2002; Rodríguez et al., 2010a

	Higher alcohol increase	Co-inoculation	Pasteurized natural must	Comitini et al., 2011
<i>P. fermentans/S. cerevisiae</i>	Acetic acid decrease	Sequential	Sterile must	Clemente-Jiménez et al., 2005
	Higher alcohol increase	Co-inoculation	Pasteurized natural must	Comitini et al., 2011
<i>P. kluyveri/S. cerevisiae</i>	3MHA increase	Co-inoculation	Sauvignon Blanc	Anfang et al., 2009
<i>S. pombe/S. cerevisiae</i>	Wine deacidification	Co-inoculation, sequential	Airen, Garnacha	Benito et al., 2013, 2014b ~
<i>T. delbrueckii/S. cerevisiae</i>	α -Terpineol and linalool Increase	Sequential	Gewürztraminer	Cus ^c and Jenko, 2013
	Acetic acid decrease	Co-inoculation	Botritized Semillon, pasteurized natural must	Bely et al., 2008; Comitini et al., 2011
	Acetate and ethyl ester Increase	Co-inoculation, sequential	Sauvignon Blanc, Syrah, Tempranillo	Loira et al., 2014, 2015; Renault et al., 2015
	Higher alcohol increase	Co-inoculation, sequential	Chardonnay, Corvina, Corvinone, Rondinella, pasteurized natural must, Soave, Vino Santo	Comitini et al., 2011; Azzolini et al., 2012, 2015
<i>W. anomalus/S. cerevisiae</i>	Acetate and ethyl ester Increase	Sequential	Mazuela	Izquierdo-Cañas et al., 2014
<i>W. saturnus/S. cerevisiae</i>	Acetate ester increase	Co-inoculation	Emir	Erten and Tanguler, 2010, Tanguler, 2012, 2013
<i>Z. bailii/S. cerevisiae</i>	Ethyl ester increase	Co-inoculation	Chardonnay	Garavaglia et al., 2015

Ορισμένοι από αυτούς σχεδιάστηκαν με στόχο την τροποποίηση ενός συγκεκριμένου στόχου, όπως το τερπενικό προφίλ ή οι συγκεντρώσεις τελικών εστέρων, ενώ άλλοι έχουν γενικό αντίκτυπο στην πολυπλοκότητα του αρώματος του οίνου. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση ζυμών που non-Saccharomyces στην οινοποίηση έχει οδηγήσει ακόμη και στην εμπορική παραγωγή πολλών ειδών συμπεριλαμβανομένων των *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *P. kluyveri* και *S. pombe*.

Όταν χρησιμοποιούνται ζυμομύκητες non-Saccharomyces σε μικτούς εκκνητές, υπάρχουν δύο γενικές πρακτικές εμβολιασμού. Ο πρώτος, γνωστός ως συν-ενοφθαλμισμός, περιλαμβάνει τον

ενοφθαλμισμό των επιλεγμένων non-Saccharomyces ζυμών σε υψηλή κυτταρική συγκέντρωση μαζί με *S. cerevisiae*, ενώ ο δεύτερος, διαδοχικός εμβολιασμός, υποδηλώνει ότι οι επιλεγμένοι non-Saccharomyces ζυμομύκητες εμβολιάζονται πρώτα σε υψηλά επίπεδα, και αφήνονται να ζυμώσουν μόνοι τους για ένα δεδομένο χρονικό διάστημα πριν προστεθεί το *S. cerevisiae* για να αναλάβει τη ζύμωση. Και οι δύο είναι εφικτές πρακτικές, αν και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζυμομυκήτων θα μπορούσαν να καθορίσουν ποια στρατηγική εμβολιασμού είναι καταλληλότερη.

3.4.1 Πρωτογενές άρωμα

Επιρροή στα Τερπένια

Με στόχο τη λήψη οίνων εμπλουτισμένων σε τερπένια, τα στελέχη *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima*, *D. hansenii* και *D. pseudopolymorphus* συνδυάστηκαν με *S. cerevisiae* για να είναι ικανά να παράγουν δραστηριότητα β-D-γλυκοσιδάσης .

Υψηλότερες συγκεντρώσεις α-τερπινεόλης και λιναλοόλης βρέθηκαν στον οίνο Gewürztraminer που έχει υποστεί ζύμωση με τον συνδυασμό *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*, αν και ανιχνεύθηκαν περισσότερη νερόλη και γερανιόλη στη ζύμωση ελέγχου που διεξήχθη μόνο με *S. cerevisiae* (Cus and Jenko, 2013). Επιπλέον, αυτές οι χημικές αλλαγές ενίσχυσαν τη συνολική ποιότητα του κρασιού Gewürztraminer.

Ο *Metschnikowia pulcherrima* είναι γνωστό ότι παράγει δραστηριότητα β-D-γλυκοσιδάσης ικανή να αυξήσει τις συγκεντρώσεις α-τερπινεόλης, νερολών καθώς και γερανιόλης σε οίνους μονοκαλλιέργειας (Rodríguez et al., 2010a). Ωστόσο, στους οίνους που ελήφθησαν με μικτή ζύμωση, είτε σε ταυτόχρονο είτε σε διαδοχικό εμβολιασμό, οι συγκεντρώσεις νερολών και γερανιόλης ήταν σημαντικά χαμηλότερες από αυτές που παρατηρήθηκαν στο γλεύκος σταφυλιών και μόνο η συγκέντρωση α-τερπινεόλης ήταν υψηλότερη. Αυτό το γεγονός σχετιζόταν με την ικανότητα του *S. cerevisiae* να μετατρέπει τη νερόλη και τη γερανιόλη σε α-τερπινεόλη σε pH γλεύκους (Di Stefano et al., 1992· Mateo και Jiménez, 2000), επισημαίνοντας τη σημασία των αλληλεπιδράσεων της ζύμης.

Όσον αφορά το είδος *Debaryomyces*, ένα στέλεχος *D. vanrijii* που απομονώθηκε από τη χλωρίδα των ρογών σταφυλιού βρέθηκε να επηρεάζει τα πτητικά του οίνου του cv. Μοσχάτο Frontignan

όταν συγκαλλιεργείται με αυτοφυή ή επιλεγμένα στελέχη *S. cerevisiae*. Οι συγκεντρώσεις αρκετών πτητικών συμπεριλαμβανομένων των τερπενολών ήταν σημαντικά διαφορετικές μεταξύ του μάρτυρα και των οίνων που εμβολιάστηκαν με *D. vanrijii*. Η αύξηση της συγκέντρωσης γερανιόλης αποδόθηκε στην υδρόλυση του αντίστοιχου γλυκοσιδικού προδρόμου από τη β-γλυκοσιδάση του *D. vanrijii*, καθώς τα γλεύκη που εμβολιάστηκαν με τη ζύμη non-*Saccharomyces* εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ενζυματικής δράσης καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Επιπλέον, η συγκέντρωση δεσμευμένης γερανιόλης βρέθηκε να είναι χαμηλότερη στους εμβολιασμένους οίνους με *D. vanrijii* σε σύγκριση με τον έλεγχο (García et al., 2002). Οι υψηλές συγκεντρώσεις τερπενίων των οίνων που λαμβάνονται με μικτές καλλιέργειες *D. vanrijii/S. cerevisiae* επιβεβαιώθηκαν πρόσφατα και συσχετίστηκαν με την παραγωγή δραστηριοτήτων πηκτινάσης, αμυλάσης και ξυλανάσης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Maturano et al., 2015). Επίσης, ένα στέλεχος *D. pseudopolymorphus* που παράγει β-D-γλυκοσιδάση όταν συγκαλλιεργήθηκε με *S. cerevisiae* VIN13 αύξησε σημαντικά τις συγκεντρώσεις της κιτρονελλόλης, της νερόλης και της γερανιόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του χυμού Chardonnay (Cordero-Otero et al., 2003).

Επιρροή στις θειόλες

Για να επωφεληθούν από την ικανότητα του *C. zemplinina* να παράγει πτητικές θειόλες, χρησιμοποιήθηκαν μικτές εκκινητές εμπορικά διαθέσιμων στελεχών *S. cerevisiae* με απομονώσεις *C. zemplinina* σε ζυμώσεις Sauvignon Blanc. Ο ενοφθαλμισμός με ίσες ποσότητες ή με μια αναλογία που αρχικά ευνόησε τα προϊόντα απομόνωσης non-*Saccharomyces*, παρήγαγε οίνους με τη μεγαλύτερη αύξηση της πτητικής θειόλης 3MH σε σύγκριση με την απλή ζύμωση με *S. cerevisiae*. Ωστόσο, οι συν-ζυμώσεις με τις απομονώσεις *C. zemplinina* είχαν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις 3MHA (Anfang et al., 2009). Αντίθετα, μια αύξηση στην παραγωγή θειόλης, ειδικά 3MHA, βρέθηκε σε οίνους Sauvignon Blanc που συν-ζυμώθηκαν με απομονώσεις *P. kluyveri* και διαφορετικά στελέχη *S. cerevisiae* (Anfang et al., 2009). Παρόλο που και τα δύο είδη ήταν σε θέση να παράγουν 3MHA στη μονοκαλλιέργεια, η αύξηση της συγκέντρωσης 3MHA που παρατηρήθηκε σε κρασιά συν-ζυμωθέντων δεν μπορούσε να εξηγηθεί με απλές υποθέσεις προσθέτων που υποδηλώνουν αλληλεπίδραση μεταξύ των εταίρων συν-ζυμώσεως. Επιπλέον, η αύξηση στις θειόλες παρατηρήθηκε μόνο σε συν-ζυμώσεις με ορισμένα στελέχη *S. cerevisiae* υποδηλώνοντας ότι η φύση αυτής της συγκεκριμένης

αλληλεπίδρασης μπορεί να μην γενικευτεί στο επίπεδο του είδους. Ωστόσο, ο μηχανισμός πίσω από αυτή την αλληλεπίδραση είναι ακόμα άγνωστος. Στις μέρες μας κυκλοφορούν στην αγορά επιλεγμένα στελέχη non-Saccharomyces για τη βελτίωση του πρωτογενούς αρώματος του οίνου. Ένα στέλεχος *M. pulcherrima* που επιλέχθηκε για την ειδική του ιδιότητα να απελευθερώνει ένζυμα με δραστηριότητα α-L αραβινοφουρανοσιδάσης είναι τώρα διαθέσιμο. Το *M. pulcherrima*, με ένα κατάλληλα ζευγαρωμένο στέλεχος *S. cerevisiae* που έχει ενοφθαλμιστεί διαδοχικά, επηρεάζει την έκφραση των τερπενίων και των θειολών και συνιστάται για οίνους Riesling και Sauvignon Blanc. Επίσης, συνιστάται ένα εμπορικό προϊόν που βασίζεται σε επιλεγμένο στέλεχος *P. kluyveri* λόγω της ικανότητάς του να ενισχύει τις γεύσεις των φρούτων μέσω μιας πιο αποτελεσματικής μετατροπής των προδρόμων γεύσης σε πτητικές θειόλες.

3.4.2. Δευτερεύον άρωμα

Έλεγχος Οξύτητας Οίνου

Έχουν περιγραφεί διαφορετικές στρατηγικές που βασίζονται σε ζυμομύκητες non-Saccharomyces για τη μείωση της πτητικής οξύτητας ή είτε για την οξίνιση ή την αποοξίνιση οίνων.

Για την επίλυση του προβλήματος της υπερβολικής πτητικής οξύτητας λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων οξικού οξέος, οι ζύμες non-Saccharomyces όπως οι *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* και *C. stellata/C. zemplinina* μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Ο *T. delbrueckii*, που συχνά περιγράφεται ως παραγωγός χαμηλής περιεκτικότητας σε οξικό οξύ υπό πρότυπες συνθήκες, διατηρεί αυτή την ποιότητα ακόμη και ζυμωτικά μέσα υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα. Μια μικτή καλλιέργεια *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* αποδείχθηκε ότι είναι ο καλύτερος συνδυασμός για τη βελτίωση του αναλυτικού προφίλ οίνων που παράγονται από βοτρυτισμένους γλεύκους, ιδιαίτερα πτητική οξύτητα και παραγωγή ακεταλδεΐδης.

Συγκεκριμένα, η μικτή καλλιέργεια *T. delbrueckii/S. cerevisiae* παρήγαγε 53% λιγότερο σε πτητική οξύτητα και 60% λιγότερη ακεταλδεΐδη από μια καθαρή καλλιέργεια *S. cerevisiae* (Bely et al., 2008). Είναι ενδιαφέρον ότι η μικτή καλλιέργεια ήταν αποτελεσματική μόνο στον ταυτόχρονο ενοφθαλμισμό αφού η διαδοχική είχε ως αποτέλεσμα τη κολλημένη ζύμωση. Σημαντικές μειώσεις στην πτητική οξύτητα σε μικτές ζυμώσεις του *T. delbrueckii/S. cerevisiae* αναφέρθηκαν επίσης από άλλους συγγραφείς (Comitini et al., 2011), οι οποίοι παρατήρησαν το

ίδιο αποτέλεσμα κατά τη χρήση του *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* εκκινητές ανεξάρτητα από τις αναλογίες εμβολιασμού.

Η υψηλή ζυμωτική ικανότητα του *C. stellata*/*C. zemplinina* έχει διερευνηθεί σε μικτούς εκκινητές. Σε μια ζύμωση που διεξήχθη από ένα μείγμα *C. stellata* και *S. cerevisiae* σε γλεύκος Pinot Grigio (270 g σάκχαρο/L), τα κύτταρα ζυμομύκητα μπόρεσαν να καταναλώσουν πλήρως όλη τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη μειώνοντας παράλληλα τα επίπεδα οξικού οξέος (Ciani και Ferraro, 1998). Ομοίως, συγκεκριμένα στελέχη του *C. zemplinina* όταν συννεοφθαλμίστηκαν με *S. cerevisiae* ήταν σε θέση να μειώσουν την περιεκτικότητα σε οξικό οξύ διατηρώντας παράλληλα υψηλά επίπεδα γλυκερίνης και αιθανόλης (Rantsiou et al., 2012). Στο γλεύκος σταφυλιών, διαφορετικοί συνδυασμοί *Pichia fermentans* με *S. cerevisiae* παρήγαγαν λιγότερο οξικό οξύ από το *S. cerevisiae* σε μεμονωμένες καλλιέργειες. Επιπλέον, η μείωση του οξικού οξέος συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση σε αρωματικές ενώσεις όπως η ακεταλδεΐδη, ο οξικός αιθυλεστέρας, η 1-προπανόλη, η ν-βουτανόλη, η 1-εξανόλη, ο καπριλικός αιθυλεστέρας, η 2,3-βουτανодиόλη και η γλυκερόλη (Clemente-Jiménez et al., 2005).

Η ικανότητα των ζυμών non-Saccharomyces να δρουν ως οξινιστικοί παράγοντες παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον, καθώς η παγκόσμια κλιματική αλλαγή και οι παραλλαγές στις αμπελουργικές και οινολογικές πρακτικές έχουν οδηγήσει σε μια τάση προς τη μείωση της συνολικής οξύτητας των οίνων. Το στέλεχος *L. thermotolerans*, μέσω της παραγωγής L-γαλακτικού οξέος, είναι ένας δυναμικός οξινιστικός μικροοργανισμός κατά τη ζύμωση του γλεύκους που θα μπορούσε να αντισταθμίσει την ανεπαρκή οξύτητα συγκεκριμένων ποικιλιών σταφυλιού (Mora et al., 1990; Kapsopoulou et al., 2007). Το *L. thermotolerans*, τόσο σε ταυτόχρονους όσο και σε διαδοχικούς εμβολιασμούς με *S. cerevisiae*, παρείχε μια αποτελεσματική οξίνιση κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, αν και η παραγωγή του L-γαλακτικού οξέος εξαρτιόταν από το χρόνο εμβολιασμού του στελέχους *S. cerevisiae* (Kapsopoulou et al., 2007).

Επίσης η κοινοπραξία *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae* προκάλεσε μείωση του pH που σχετίζεται με σημαντική αύξηση της ολικής οξύτητας και μείωση της πτητικής οξύτητας, σε σύγκριση με καθαρές καλλιέργειες *S. cerevisiae* (Comitini et al., 2011). Οι μικτές ζυμώσεις χαρακτηρίστηκαν επίσης από αυξήσεις στη γλυκερίνη και τους κύριους εστέρες. Σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα, μειώσεις του pH και ενίσχυση της περιεκτικότητας σε γλυκερίνη και 2-

φαινυλαιθυλική αλκοόλη φάνηκαν σε οίνους που ζυμώθηκαν με τη συγκαλλιέργεια. Επιπλέον, οι δοκιμές αισθητηριακής ανάλυσης έδειξαν σημαντικές αυξήσεις στις πικάντικες νότες και ως προς τις αυξήσεις της συνολικής οξύτητας (Gobbi et al., 2013).

Επίσης, η ικανότητα αποξίνισης των *S. pombe* και *Issatchenkia orientalis* (εναλλακτική ονομασία *Pichia kudriavzevii*) λόγω της κατανάλωσης μηλικού οξέος έχει διερευνηθεί σε μικτούς εκκινητές. Ο συνδυασμός *S. pombe*/*S. cerevisiae* έχει αποδειχθεί επιτυχής στη βιολογική αποξίνιση λευκών και ερυθρών οίνων (Benito et al., 2013, 2014b). Σε όλους τους οίνους που ελήφθησαν με *S. pombe* είτε μόνο του είτε μαζί με *S. cerevisiae*, καταναλώθηκε σχεδόν όλο το μηλικό οξύ και σχηματίστηκαν μέτριες συγκεντρώσεις οξικού οξέος. . Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε ουρία αυτών των οίνων ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με εκείνα που παρασκευάζονταν μόνο με *S. cerevisiae*. Οι λευκοί οίνοι που ελήφθησαν με μικτές καλλιέργειες έλαβαν τις καλύτερες συνολικές βαθμολογίες μετά από αισθητηριακή αξιολόγηση (Benito et al., 2013), αλλά στις ζυμώσεις ερυθρού οίνου, η μέγιστη ένταση και ποιότητα αρώματος αντιστοιχούσε σε εκείνα που ελήφθησαν με το *S. pombe* στη μονοκαλλιέργεια (Benito et al., 2014b). Ομοίως, Οι οίνοι που συν-ζυμώθηκαν από *I. orientalis* και *S. cerevisiae* εμφάνισαν μειωμένες συγκεντρώσεις μηλικού οξέος και την υψηλότερη βαθμολογία στην αισθητηριακή αξιολόγηση. Η συνζύμωση μείωσε επίσης τις περιεκτικότητες σε ακεταλδεΐδη, 1-προπανόλη, 2-βουτανόλη και ισοαμυλική αλκοόλη αλλά αύξησε την περιεκτικότητα σε μεθανόλη (Kim et al., 2008). Πρόσφατα επιβεβαιώθηκε η ικανότητα του *P. kudriavzevii* να αποικοδομεί το μηλικό οξύ σε μικροοινοποιήσεις, αυξάνοντας το pH 0,2–0,3 μονάδες (del Mónaco et al., 2014).

Επιπλέον, η συνδυασμένη χρήση επιλεγμένων στελεχών *S. pombe* και *L. thermotolerans* έχει περιγραφεί ως μια εφικτή εναλλακτική λύση στην παραδοσιακή μηλογαλακτική ζύμωση (Benito et al., 2015). Με αυτήν την προσέγγιση, το μηλικό οξύ καταναλώνεται πλήρως από το *S. pombe*, ενώ το γαλακτικό οξύ που παράγεται από το *L. thermotolerans* διατηρεί ή αυξάνει την οξύτητα των οίνων που παράγονται από γλεύκη χαμηλής οξύτητας. Οι τελικοί οίνοι είχαν περισσότερο φρουτώδη χαρακτήρα και περιείχαν λιγότερο οξικό οξύ και βιογενείς αμίνες από τους παραδοσιακούς ελέγχους μηλογαλακτικής ζύμωσης (Benito et al., 2015).

Επιρροή στους εστέρες

Η αύξηση των οξικών εστέρων φρούτων ήταν ο κύριος στόχος των μικτών εκκινητών που σχεδιάστηκαν με είδη *Hanseniaspora*. Τα στελέχη *H. guilliermondii* και *H. uvarum* που καλλιεργούνται ως μικτές καλλιέργειες με *S. cerevisiae* στο γλεύκος σταφυλιών αύξησαν την περιεκτικότητα σε οξικό 2-φαινυλαιθυλεστέρα και οξικό ισοαμυλεστέρα των οίνων, αντίστοιχα (Rojas et al., 2003; Moreira et al., 2008). Ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα περιόρισε τη δυνατότητα εφαρμογής και των δύο μικτών εκκινητών. Ομοίως, αν και επιθυμητή αύξηση των οξικών εστέρων σε μικτές ζυμώσεις Macabeo και συνθετικού γλεύκους με *H. uvarum/S. cerevisiae* αναφέρθηκε, η υψηλή συγκέντρωση οξικού οξέος παρεμπόδισε τη βιομηχανική εφαρμογή του μικτού εκκινητή (Andorrà et al., 2010, 2012). Ωστόσο, δεδομένου ότι μια μεγάλη μεταβλητότητα του στελέχους σχετίζεται με την παραγωγή μεταβολιτών (Plata et al., 2003; Romano et al., 2003; Ciani et al., 2006), η υπερβολική συγκέντρωση τόσο του οξικού αιθυλεστέρα όσο και του οξικού οξέος μπορεί να αποφευχθεί με μέσα συγκεκριμένων ελέγχων. Από αυτή την άποψη, επιλέχθηκε ένα στέλεχος *H. vineae* που παρήγαγε υψηλά επίπεδα οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα ενώ παρήγαγε επίπεδα οξικού οξέος και οξικού αιθυλεστέρα εντός των βέλτιστων ορίων που περιγράφονται για το κρασί (Viana et al., 2008).

Επιπλέον, καταδείχθηκε η δυνατότητα χρήσης αυτού του επιλεγμένου στελέχους σε μικτό εκκινητή με *S. cerevisiae* για την αύξηση των επιπέδων του οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα στους οίνους χωρίς συμβιβασμούς στην ποιότητα (Viana et al., 2009). Επιπλέον, η αναλογία και των δύο στελεχών ζυμομυκήτων στη μικτή καλλιέργεια ρυθμίζει τις συγκεντρώσεις του εστέρα που οδηγεί σε οίνους με ένα ευρύ φάσμα γευστικών ενώσεων. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι το επιλεγμένο στέλεχος *H. vineae* που ενοφθαλμίστηκε ως μέρος ενός διαδοχικού μικτού εκκινητή ήταν σε θέση να ανταγωνιστεί τις φυσικές ζύμες που υπήρχαν σε ένα μη αποστειρωμένο γλεύκος και να τροποποιήσει τουαρωματικό προφίλ του οίνου, συγκεκριμένα τη συγκέντρωση οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα (Viana et al., 2011). Πρόσφατα, οίνοι που προέρχονται από βιομηχανικές οινοποιήσεις λευκού σταφυλιού Chardonnay που πραγματοποιήθηκαν με διαδοχικές *H. vineae/S. cerevisiae*. Ο εμβολιασμός *S. cerevisiae* έδειξε σημαντική αύξηση στην ένταση του φρούτου που περιγράφεται ως μπανάνα, αχλάδι, μήλο, κιτριλά φρούτα και γκουάβα, σε σύγκριση με τις αυθόρμητες και καθαρές ζυμώσεις *S. cerevisiae*. Η ένταση των φρούτων συσχετίστηκε κυρίως με υψηλότερες συγκεντρώσεις ακετυλ και αιθυλεστέρων και σχετικές μειώσεις σε αλκοόλες και λιπαρά οξέα (Medina et al., 2013).

Αύξηση της περιεκτικότητας σε οξικό ισοαμύλιο μπορεί επίσης να επιτευχθεί με ζύμωση

γλεύκους Emir με καλλιέργειες *Williopsis saturnus/S. cerevisiae*. Επιπλέον, η μικτή καλλιέργεια δεν παρήγαγε δυσάρεστες γεύσεις, αν και οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο αρωματικό προφίλ των μικτών οίνων ήταν εξαρτώμενες από το εμβόλιο και τη θερμοκρασία (Erten and Tanguler, 2010· Tanguler, 2012, 2013). Οι οίνοι που επεξεργάστηκαν με διαδοχική ζύμωση των *W. anomalus* και *S. cerevisiae* παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα οξικών και αιθυλεστέρων και γραμμικών αλκοολών, που συμβάλλουν στην αύξηση της αρωματικής ποιότητας με λουλουδένιες και φρουτώδεις νότες (Izquierdo-Cañas et al., 2014). Με στόχο τη λήψη λευκών οίνων με ενισχυμένη αρωματική πολυπλοκότητα, ένα στέλεχος *Zygosaccharomyces bailii* που χαρακτηρίζεται ως παραγωγός αρκετών εστέρων (Garavaglia et al., 2014) εμβολιάστηκε μαζί με *S. cerevisiae*. Σε όλες τις δοκιμές που περιείχαν τη ζύμη non-*Saccharomyces*, η παραγωγή αιθυλεστέρων αυξήθηκε σε σύγκριση με τον έλεγχο οινοποίησης (Garavaglia et al., 2015). Σε μικτές καλλιέργειες *T. delbrueckii/S. cerevisiae* ο σχηματισμός ειδικών εστέρων έχει αναφερθεί. Για παράδειγμα, η μικτή καλλιέργεια παρήγαγε οίνους Tempranillo με μεγαλύτερες ποσότητες οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα και γαλακτικού αιθυλεστέρα από τις απλές ζυμώσεις *S. cerevisiae* (Loira et al., 2014) ή μεγαλύτερες ποσότητες οξικού ισοαμυλεστέρα, οξικού εξυλεστέρα, εξανοϊκού αιθυλεστέρα και οκτανοϊκού αιθυλεστέρα, σε οίνους Syrah (Loira et al., 2015). Επίσης, οι συγκεντρώσεις προπανοϊκού αιθυλεστέρα, ισοβουτανοϊκού αιθυλεστέρα, διυδροκινναμικού αιθυλεστέρα, οξικού ισοβουτυλεστέρα και οξικού ισοαμυλεστέρα αυξήθηκαν σε οίνους που ελήφθησαν με μικτές ζυμώσεις *T. delbrueckii/S. cerevisiae*, είτε σε διαδοχικό είτε σε ταυτόχρονο εμβολιασμό (Renault et al., 2015). Η ευνοϊκή ανάπτυξη του *T. delbrueckii* κατά την εκτέλεση διαδοχικού εμβολιασμού ενίσχυσε τη συγκέντρωση των προαναφερθέντων αιθυλεστέρων, οι οποίοι συνδέθηκαν με τη δραστηριότητα του *T. delbrueckii*. Αντίθετα, ο ταυτόχρονος εμβολιασμός περιόρισε την ανάπτυξη του *T. delbrueckii*, περιορίζοντας την παραγωγή των δεικτών δραστηριότητάς του. Ωστόσο, ο ταυτόχρονος εμβολιασμός περιλάμβανε υψηλή παραγωγή πολυάριθμων εστέρων λόγω των πιο σημαντικών θετικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ειδών ζύμης. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης εστέρα μέσω αλληλεπιδράσεων κατά τη διάρκεια μικτών μορφών οφειλόταν στην παραγωγή από *S. cerevisiae* ως απόκριση στην παρουσία του *T. delbrueckii* (Renault et al., 2015). Μια καθαρή καλλιέργεια του *T. delbrueckii* που επιλέχθηκε για τις ιδιότητές του για την ενίσχυση της πολυπλοκότητας του αρωματικού και της αίσθησης στο στόμα του κρασιού είναι διαθέσιμη στην αγορά. Όταν χρησιμοποιείται σε διαδοχικό ενοφθαλμισμό με συμβατά

επιλεγμένα στελέχη *S. cerevisiae*, ευνοεί την αντίληψη ορισμένων εστέρων χωρίς να κατακλύζει τους οίνους. Τέλος, η αρωματική πολυπλοκότητα των κρασιών Ribolla μπορεί να βελτιωθεί με διαδοχική ζύμωση με *K. gamospora* και *S. cerevisiae* λόγω της ενισχυμένης παραγωγής εστέρων όπως ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας και ο προπιονικός αιθυλεστέρας και επίσης 2-φαινυλαιθυλική αλκοόλη (Dashko et al., 2015).

Επίδραση στις Ανώτερες Αλκοόλες

Η παρουσία του *T. delbrueckii* σε μικτές εκκινήτες έχει συσχετιστεί με αυξήσεις στην παραγωγή 2-φαινυλαιθυλικής αλκοόλης σε διάφορα είδη οίνου. Μικτοί εκκινήτες *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* προτάθηκαν για την παραγωγή του οίνου Amarone, ενός ξηρού κόκκινου οίνου υψηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλη που λαμβάνεται από μαραμένα σταφύλια. Οι πιο σημαντικές αλλαγές που προκαλούνται από την παρουσία του *T. delbrueckii* παρατηρήθηκαν μεταξύ των αλκοολών, συγκεκριμένα της βενζυλικής αλκοόλης και της 2-φαινυλαιθυλικής αλκοόλης, αλλά και στους ζυμωτικούς εστέρες, λιπαρά οξέα και λακτόνες, που είναι σημαντικά για τη γεύση του οίνου Amarone (Azzolini et al., 2012). Είναι ενδιαφέρον ότι η αύξηση στα επίπεδα της 2-φαινυλαιθυλικής αλκοόλης φάνηκε να σχετίζεται με τη δράση β-γλυκοσιδάσης του στελέχους *T. delbrueckii* που χρησιμοποιήθηκε, αν και άλλοι παράγοντες δεν μπορούσαν να απορριφθούν. Επίσης στη ζύμωση ξηρών και γλυκών οίνων, μικτές καλλιέργειες *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* επηρέασαν το περιεχόμενο πολλών σημαντικών πτητικών ενώσεων, όπως η 2-φαινυλαιθυλική αλκοόλη, ο οξικός ισοαμυλεστέρας, οι εστέρες λιπαρών οξέων, τα C4-C10 λιπαρά οξέα και οι βινυλοφαινόλες (Azzolini et al., 2015). Εκτός από τους μικτούς εκκινήτες *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae*, *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae*, και *K. gamospora*/*S. cerevisiae*. Οι ζυμώσεις *S. cerevisiae* οδήγησαν σε υψηλότερες παραγωγές 2-φαινυλαιθυλικής αλκοόλης (Comitini et al., 2011; Dashko et al., 2015)

3.5 Τριπλές μικτές καλλιέργειες

Τέλος, και με στόχο τη μίμηση της σύνθετης μικροχλωρίδας ζύμης που υπάρχει στους γλεύκους ζύμωσης, αναπτύχθηκαν επίσης μεικτές καλλιέργειες οίνων που αποτελούνται από περισσότερα από ένα είδη non-*Saccharomyces* σε συνδυασμό με *S. cerevisiae*. Ωστόσο, ο αριθμός των μελετών που επικεντρώνονται στην ανάπτυξη του αρώματος του οίνου είναι ακόμη χαμηλός και τα αποτελέσματα είναι κάπως αμφιλεγόμενα.

Από αυτή την άποψη, οι ζυμώσεις φυσικών γλευκών σταφυλιών με στέλεχος *Saccharomyces* μαζί με στελέχη *C. zemplinina* και/ή *H. uvarum* έδειξαν την προτιμησιακή χρήση ορισμένων ομάδων αμινοξέων (αλειφατικά, αρωματικά και θειούχα αμινοξέα) στις μικτές ζυμώσεις σε σύγκριση με τις καθαρές καλλιέργειες.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η παρουσία αρκετών ειδών ζύμης μπορεί να βελτιώσει την πρόσληψη ή την κατανάλωση ορισμένων αμινοξέων μέσω κάποιου είδους συνεργιστικού μηχανισμού (Andorrà et al., 2010). Ωστόσο, η προνομιακή χρήση αμινοξέων δεν είχε σαφή συνέπεια στην παραγωγή αρώματος, όπως θα ήταν αναμενόμενο: οι ζυμώσεις με την τριπλή μικτή καλλιέργεια ξεχώρισαν μόνο για την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα και σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο με την καθαρή ζύμωση *S. cerevisiae*, ενώ Οι ζυμώσεις συμπεριλαμβανομένων ενός ή δύο στελεχών που δεν ήταν *Saccharomyces* ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους. Επιπλέον, η ποσότητα του οξικού οξέος ήταν πολύ πάνω από τα επιτρεπτά επίπεδα και έτσι διακυβεύτηκε η άμεση εφαρμογή αυτών των μικτών καλλιεργειών (Andorrà et al., 2010). Αργότερα, οι ίδιοι συγγραφείς ανέφεραν σημαντικές διαφορές στα παραπάνω αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε συνθετικό γλεύκος σταφυλιών (Andorrà et al., 2012). Έχει προταθεί παραγωγή λευκού οίνου από *H. anomala*, *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* (Izquierdo-Cañas et al., 2011) Οι οίνοι που προέκυψαν ήταν χημικά διαφορετικά από αυτά που παράγονται μόνο από το *S. cerevisiae*, από το *H. anomala*/ *MIKPO. cerevisiae*, ή από *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*. Παραδόξως, οι δύο τελευταίοι συνδυασμοί παρήγαγαν οίνους με μεγαλύτερη πολυπλοκότητα από αυτό που περιλαμβάνει τα δύο είδη μη *Saccharomyces*, τα οποία στην πραγματικότητα ήταν συγκρίσιμα με την καθαρή ζύμωση *S. cerevisiae*. Σήμερα, ένα μείγμα τριών ζυμών, *S. cerevisiae*, *K. thermotolerans*, και *T. delbrueckii*, διατίθεται στο εμπόριο. Το μείγμα δίνει τροπική φρουτώδεις και μια συνολική αρωματική ένταση στους λευκούς οίνους και πιο έντονες φρουτώδεις και πικάντικες νότες στους κόκκινους οίνους.

Επισημάνσεις

Με βάση πολυάριθμες μελέτες που δείχνουν τη θετική επίδραση των ζυμομυκήτων non-*Saccharomyces* στην οινοποίηση, η οινοποιία έχει κατευθυνθεί προς τη χρήση ελεγχόμενων μικτών ζυμώσεων. Πράγματι, σχεδιασμένοι μικτοί εκκινητές με επιλεγμένα στελέχη non-*Saccharomyces* και *S. cerevisiae* μπορούν να ενισχύσουν, όπως επισημαίνεται σε μια ανασκόπηση, το πρωτογενές και δευτερογενές άρωμα του οίνου, αλλά επίσης εμπλέκονται σε

μειώσεις της περιεκτικότητας σε αιθανόλη του οίνου (González et al., 2013 Contreras et al., 2015; Morales et al., 2015), έλεγχος της αλλοιωμένης μικροχλωρίδας του οίνου (Oro et al., 2014), απελευθέρωση μαννοπρωτεϊνών (Domizio et al., 2014) ή σταθεροποίηση χρώματος οίνου (Morata et al., 2012; Loira et al., 2015). Επιπλέον, μπορούν να ασκήσουν θετική επίδραση στους οίνους βάσης για την παραγωγή αφρώδους οίνου βελτιώνοντας τις ιδιότητες αφρισμού (González-Royo et al., 2015). Αξιοσημείωτο είναι ότι μια νέα τεχνολογία ερυθράς οινοποίησης που βασίζεται στη συνδυασμένη χρήση δύο στελεχών ζύμης non-Saccharomyces έχει αναπτυχθεί ως εναλλακτική λύση στην παραδοσιακή μηλογαλακτική ζύμωση (Benito et al., 2015). Εκτός από την υποχρεωτική επιλογή στελεχών, τα οφέλη των μικτών καλλιιεργειών θα πρέπει να ελέγχονται σε διαφορετικά γλεύκη σταφυλιών, καθώς διαφορετικά διατροφικά χαρακτηριστικά και περιορισμοί ενδέχεται να τροποποιήσουν την επίδραση των επιμέρους συστατικών του εκκινητή στο τελικό οίνο. Επιπλέον, οι μικτές καλλιιεργειες θα πρέπει να ελέγχονται σε βιομηχανική ή ημιβιομηχανική κλίμακα, επειδή έχει αναφερθεί ότι η παραγωγή διαφορετικών μεταβολιτών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τον όγκο ζύμωσης και τις συνθήκες οξυγόνου (Beltran et al., 2008; Viana et al., 2009). . Σίγουρα η μελέτη της επίδρασης των κοινών οινολογικών πρακτικών στη δυναμική των ζυμομυκήτων non-Saccharomyces θα είναι επίσης χρήσιμη για την καλύτερη διαχείριση των μικτών ζυμώσεων (Albertin et al., 2014). Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο κύριος λόγος για την επανεκτίμηση των ζυμών non-Saccharomyces και για την εισαγωγή μικτών καλλιιεργειών στη διαδικασία οινοποίησης ήταν η λήψη διαφοροποιημένων οίνων που αντικατοπτρίζουν τα χαρακτηριστικά μιας δεδομένης αμπελοοινικής περιοχής, η εμπορική ποικιλία των καλλιιεργειών non-Saccharomyces εξακολουθεί να είναι μειωμένη. Σε αυτό το πλαίσιο, οι συνεχείς οικολογικές μελέτες καθώς και ο οινολογικός και αισθητηριακός χαρακτηρισμός αυτόχθων non-Saccharomyces, ακόμη και απομονώσεων *S. cerevisiae* θα παράσχουν κατάλληλους υποψήφιους για να συμπεριληφθούν ως μέρος εμπορικών μικτών καλλιιεργειών εκκίνησης για την παραγωγή τυπικών κρασιών (Canonico et al., 2015; Teixeira et al., 2015).

Τέλος, ο ορθολογικός σχεδιασμός μεικτών καλλιιεργειών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όχι μόνο τα αποτελέσματα από έξυπνους ελέγχους που επιτρέπουν την εκμετάλλευση των θετικών χαρακτηριστικών των ζυμομυκήτων non-Saccharomyces, αλλά και πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών. Ορισμένες αλληλεπιδράσεις ζυμομυκήτων που έχουν αναφερθεί ότι συμβαίνουν σε μικτούς εκκινητές έχουν συζητηθεί εν συντομία σε αυτήν την ανασκόπηση,

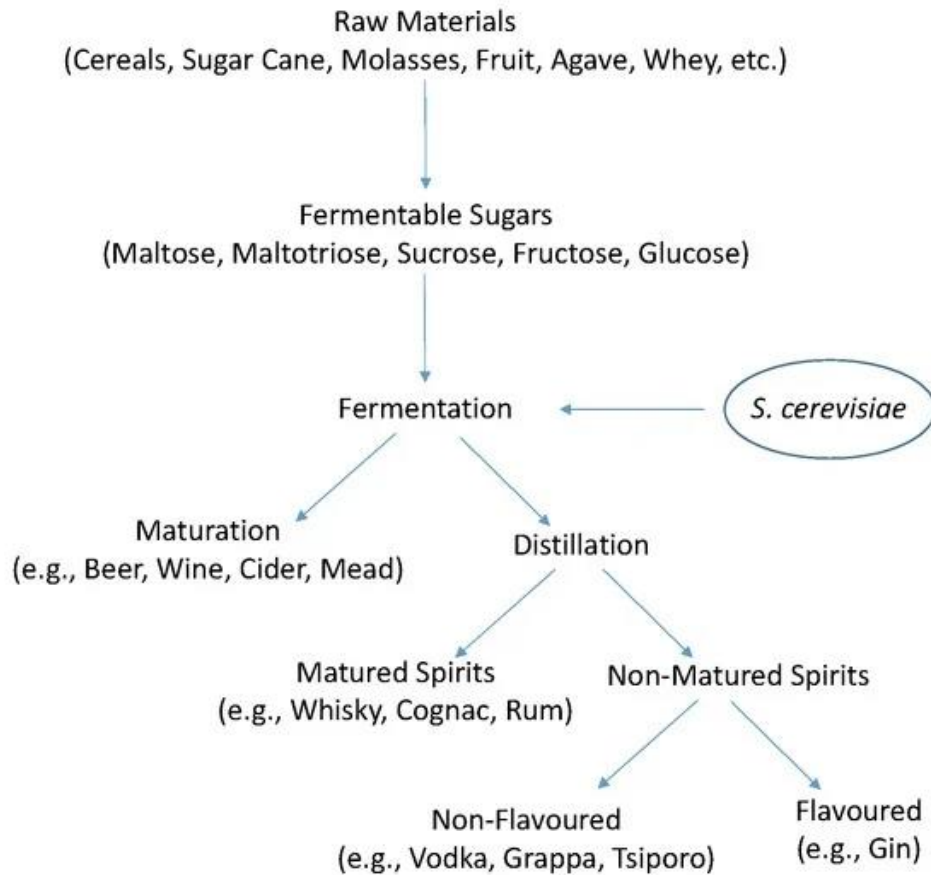
αλλά λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται. Στην πραγματικότητα, έχουν εντοπιστεί θετικές, αρνητικές και ουδέτερες αλληλεπιδράσεις σε μικτές ζυμώσεις ζυμομυκήτων non-Saccharomyces και Saccharomyces για τον σχηματισμό αρωματικών ενώσεων ([Sadoudi et al., 2012](#)). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις φαίνεται να εξαρτώνται από το στέλεχος τόσο για τα non-Saccharomyces όσο και για τα στελέχη *S. cerevisiae* ([Anfang et al., 2009](#); [Canonico et al., 2015](#)) και μπορεί να επηρεάσουν ολόκληρη τη μεταβολική οδό. Η τρέχουσα γνώση σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις της ζύμης οίνου έχει αναθεωρηθεί πρόσφατα ([Ciani και Comitini, 2015](#)), αλλά είναι ένας τομέας που απαιτεί εις βάθος μελέτες. Αναμφίβολα, η εφαρμογή τεχνικών υψηλής απόδοσης θα προσφέρει μια ισχυρή προσέγγιση για την αποκάλυψη μικροβιακών αλληλεπιδράσεων και έτσι θα επιτρέψει έναν καλύτερο σχεδιασμό μικτών καλλιέργειών και επίσης έναν αυξημένο έλεγχο της μεικτής καλλιέργειας ζύμωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ζύμες αλκοολούχων ποτών

4.1 Ζύμες σε ζυμώσεις αλκοολούχων ποτών

Η παραγωγή αλκοολούχων ποτών από ζυμώσιμες πηγές άνθρακα από ζύμες είναι η παλαιότερη και πιο σημαντική από οικονομική άποψη από όλες τις βιοτεχνολογίες. Η ζύμη παίζει ζωτικό ρόλο στην παραγωγή όλων των αλκοολούχων ποτών (βλ. σχήμα 4. 1) και η επιλογή των κατάλληλων στελεχών ζύμης είναι απαραίτητη όχι μόνο για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης αλκοόλης, αλλά και για τη διατήρηση της αισθητικής ποιότητας του ποτού.



Σχήμα 4. 1

Το είδος ζύμης που κυριαρχεί στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών παγκοσμίως είναι το *Saccharomyces cerevisiae* και τα συγκεκριμένα στελέχη αυτού του είδους που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση ασκούν βαθιά επίδραση στα χαρακτηριστικά γεύσης και αρώματος διαφορετικών ποτών. Για ζυμώσεις ποτών μεγάλης κλίμακας, όπως στη ζυθοποιία, την οινοποίηση και την παραγωγή αποσταγμένου οινοπνεύματος, χρησιμοποιούνται συνήθως καθαρές καλλιέργειες επιλεγμένων στελεχών *S. cerevisiae*. Αυτά τα στελέχη είτε προέρχονται από το σπίτι είτε προμηθεύονται από εταιρείες παραγωγής ζύμης. Σε μικρότερης κλίμακας (χειροτεχνικές) διεργασίες, μπορεί να επιτραπεί η πραγματοποίηση αυθόρμητων ζυμώσεων που βασίζονται στην γηγενή μικροβιολογική χλωρίδα (άγριες ζύμες και βακτήρια) που υπάρχει στην πρώτη ύλη και στις εγκαταστάσεις παραγωγής. Για παράδειγμα, αυτό θα ήταν χαρακτηριστικό σε μικρά αποστακτήρια στο Μεξικό (για την παραγωγή Tequila και Mezcal) και στη Βραζιλία (για την παραγωγή Cachaça).

Σε ορισμένους τύπους ζυμώσεων αλκοολούχων ποτών, Οι ζυμομύκητες non-*S. cerevisiae* μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως καλλιέργειες εκκίνησης είτε να εμφανίζονται φυσικά. Για παράδειγμα, στην οινοποίηση το στέλεχος ζυμομύκητα *S. cerevisiae* που χρησιμοποιείται για την έναρξη της ζύμωσης μπορεί να ξεπεραστεί από την γηγενή χλωρίδα ζύμης που σχετίζεται με τα σταφύλια.

Ο Πίνακας 4.1 συνοψίζει διαφορετικά είδη ζύμης που συναντώνται σε ζυμώσεις αλκοολούχων ποτών

Πίνακας 4.1 Οι κύριοι τύποι ζύμης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή επιλεγμένων αλκοολούχων ποτών.		
Ποτό	Ζύμη που εμπλέκεται	Σχόλια
Μπύρα	Μπύρα Lager: <i>Saccharomyces pastorianus</i> Μπύρα: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Μπύρα Lambic: <i>Brettanomyces bruxellensis</i> και άλλες ζύμες	. Οι ζυμομύκητες Lager είναι πιθανότατα ένα φυσικό υβρίδιο (<i>S. cerevisiae</i> & <i>S. eubayanus</i>). Σχετικά λίγα στελέχη που χρησιμοποιούνται σε ζυμώσεις lager. Τα στελέχη Lager χρησιμοποιούν μαλτοτριόζη πιο αποτελεσματικά από τα στελέχη ale και ζυμώνουν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Οι ζυμομύκητες της Ale είναι πολυπλοειδή στελέχη. Πολυάριθμα στελέχη που χρησιμοποιούνται στην ζυθοποιία ale. Οι ζύμες μπύρας ζυμώνονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες σε σύγκριση με τις ζύμες lager. Η μπύρα Lambic παράγεται παραδοσιακά μέσω αυθόρμητης ζύμωσης, αλλά ορισμένες μπύρες lambic και βελγικού τύπου χρησιμοποιούν καθαρές καλλιέργειες εκκίνησης <i>Brettanomyces spp</i>

Πίνακας 4.1 Οι κύριοι τύποι ζύμης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή επιλεγμένων αλκοολούχων ποτών.

Ποτό	Ζύμη που εμπλέκεται	Σχόλια
Οίνος	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces bayanus</i> (καθαρές καλλιέργειες) και φυσικές ζύμες	Η παραδοσιακή οινοποίηση χαρακτηρίζεται από αυθόρμητες ζυμώσεις γλεύκους σταφυλιών με φυσική μικροχλωρίδα (τα κύρια γένη ζυμομυκήτων που σχετίζονται με τα σταφύλια είναι: <i>Kloeckera</i> και <i>Hanseniaspora</i> , με μικρότερες αναπαραστάσεις <i>Candida</i> , <i>Metchnikowia</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Pichia</i> και <i>Kluyveromyces</i> και πολύ χαμηλούς πληθυσμούς <i>cerevisiae</i>). Τα σύγχρονα οινοποιεία μεγάλης κλίμακας χρησιμοποιούν ειδικά επιλεγμένες καλλιέργειες εκκίνησης στελεχών <i>S. cerevisiae</i> που διατίθενται σε αποξηραμένη μορφή (π.χ. ενεργή ξηρή ζύμη, ADY) από εξειδικευμένες εταιρείες προμήθειας ζύμης. Περιστασιακά, δευτερεύουσες εμπορικές καλλιέργειες εκκίνησης μη <i>Saccharomyces</i> (π.χ. <i>Candida stellata</i>) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδώσουν συγκεκριμένη γεύση και άρωμα στον οίνο
Ουίσκι	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Οι παραγωγοί σκωτσέζικου ουίσκι χρησιμοποιούν επί του παρόντος επιλεγμένα στελέχη απόσταξης <i>S. cerevisiae</i> σε τρεις κύριες μορφές, ζύμη κρέμας, συμπιεσμένη (κέικ) και αποξηραμένη ζύμη. Τα αποστακτήρια ουίσκι βύνης χρησιμοποιούν παραδοσιακά πετρευσμένη ζύμη, αλλά οι μεγαλύτεροι αποστακτήρες σιτηρών έχουν πλέον υιοθετήσει τη ζύμη κρέμας. Οι αποξηραμένες ζύμες δεν είναι τόσο διαδεδομένες όσο οι πετρευσμένες μορφές και οι μορφές κρέμας στις ζυμώσεις ουίσκι.
Ρούμι	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> και <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	α στελέχη του <i>S. cerevisiae</i> σε ζυμώσεις ρούμι αναπτύσσονται ως καλλιέργειες εκκίνησης και παρέχουν ταχύτερη ζύμωση με περισσότερες υψηλότερες αλκοόλες και λιπαρά οξέα, αλλά λιγότερες εστέρες με αποτέλεσμα πιο ελαφριά ρούμια. Το <i>Schiz. pombe</i> σε ζυμώσεις ρούμι παρέχει πιο αργές ζυμώσεις που οδηγούν σε λιγότερες υψηλότερες αλκοόλες και λιπαρά οξέα, αλλά περισσότερες εστέρες με αποτέλεσμα τα ρούμια με βαρύ, δυνατό άρωμα. Η ανάπτυξη του <i>Schiz. pombe</i> ευνοείται από χαμηλό pH, υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρου.
Τεκίλα, Mezcal, Bacanora	Φυσικές ζύμες σε βιοτεχνικές ζυμώσεις Αγαύης	Διάφοροι ζυμομύκητες έχουν απομονωθεί από τέτοιες διεργασίες: <i>S. cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia</i> spp., <i>Brettanomyces</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp., κ.λπ..
Μπράντι Τζιν, Βότκα κ.λπ.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Για μπράντι, κονιάκ κ.λπ. ο οίνος βάσης παράγεται από καθαρές καλλιέργειες εκκίνησης <i>S. cerevisiae</i> . Για τζιν, βότκα κ.λπ. θα χρησιμοποιηθούν επιλεγμένα στελέχη απόσταξης <i>S. cerevisiae</i> .
Cheese whey-	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Ζύμη ζύμωσης λακτόζης για παραγωγή αιθανόλης που προορίζεται για τζιν, βότκα, και κρέμα λικέρ κ.λπ

Πίνακας 4.1 Οι κύριοι τύποι ζύμης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή επιλεγμένων αλκοολούχων ποτών.

Ποτό	Ζύμη που εμπλέκεται	Σχόλια
derived beverages		

4.2 Ζύμες στην παραγωγή οινοπνευματωδών ποτών με βάση τα δημητριακά

Τα αποσταγμένα οινοπνευματωδών ποτών που χρησιμοποιούν δημητριακά ως πρώτες ύλες περιλαμβάνουν: ουίσκι (π.χ. σκωτσέζικο ουίσκι), ουίσκι (π.χ. ιρλανδικό και αμερικανικό), βότκα, τζιν και shochu (βλ. Πίνακα 4.1). Τα εν λόγω δημητριακά είναι κατά κύριο λόγο λίγα, σιτάρι, σίκαλη, καλαμπόκι, ρύζι και σόργο. Ο αρχικός υδατάνθρακας σε όλες τις περιπτώσεις είναι το άμυλο το οποίο δεν μπορεί να ζυμωθεί απευθείας από το *S. cerevisiae*. Αυτός ο πολυσακχαρίτης γλυκόζης απαιτεί προϋδρόλυση σε απλά σάκχαρα πριν από τη ζύμωση με ζύμη, και αυτό έρχεται σε αξιοσημείωτη αντίθεση με την οινοποίηση όπου ζυμώσιμα σάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη) είναι άμεσα διαθέσιμα στις ρόγες σταφυλιού και επομένως στο γλεύκος. Υπάρχουν και άλλες σημαντικές διαφορές μεταξύ του οίνου και των αποσταγμένων αποσταγμάτων δημητριακών. Για παράδειγμα, η περιεκτικότητα σε αλκοόλ των εμφιαλωμένων οινοπνευματωδών ποτών είναι περίπου 3-4 φορές μεγαλύτερη από εκείνη στους οίνους (π.χ. ένα τυπικό ουίσκι θα έχει συγκέντρωση αλκοόλης 40% v/v, ενώ ένας τυπικός επιτραπέζιος οίνος θα έχει 12% v/v).

Τα στελέχη ζύμης που χρησιμοποιούνται για τα αποστάγματα και για τον οίνο είναι επίσης διαφορετικά και η ακόλουθη συζήτηση καλύπτει πτυχές ζύμωσης των αποσταγμένων οινοπνευματωδών ποτών από δημητριακά, με ιδιαίτερη έμφαση στις διαδικασίες παραγωγής ουίσκι.

Οι αυθόρμητες ζυμώσεις δεν διεξάγονται πλέον σε σύγχρονα αποστακτήρια ουίσκι που χρησιμοποιούν πρόσφατα πολλαπλασιασμένα ή εμπορικά καθαρά καλλιεργημένα στελέχη *S. cerevisiae*. Αυτή η ζύμη μπορεί να διατίθεται σε συμπιεσμένη μορφή (κέικ), υγρή (κρέμα) ζύμη ή σε ξηρή μορφή (Walker and Hill 2016). Ο ρυθμός εμβολιασμού είναι γενικά $0,52 \times 10^7$ κύτταρα/mL. Σε αντίθεση με τα ζυθοποιεία ή τα οινοποιεία, οι ζυμώσεις ουίσκι συνήθως επιτρέπεται να συνεχιστούν για 2-3 ημέρες χωρίς ακριβή έλεγχο θερμοκρασίας. Το pH του

γλευκούς σε ένα ούισκι ζύμωση θα ξεκινήσει σε pH 5-5,5 και θα πέσει σε pH 4,2-4,5 στο τέλος της ζύμωσης. Η βιωσιμότητα της ζύμης στο τέλος της ζύμωσης είναι πολύ χαμηλή λόγω του συνδυασμού χαμηλού pH, θερμοκρασιών >30°C και υψηλών τελικών συγκεντρώσεων αιθανόλης.

Αυτοί οι παράγοντες ασκούν σημαντικό φυσιολογικό στρες στη ζύμη (Walker and van Dijck 2006).

Οι ποτοποιοί ούισκι (και οινολόγοι), σε αντίθεση με τους ζυθοποιούς, δεν ανακυκλώνουν την ζύμη. Το υγρό ζύμωσης συμπεριλαμβανομένο της ζύμης αποστάζεται με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη καταστροφή των κυττάρων ζύμης.

Αυτό απαιτεί την προμήθεια φρεσκοπολλαπλασιασμένης ζύμης από ξεχωριστούς εμπορικούς οργανισμούς ζύμης (Jones 1998). Οι προδιαγραφές για τα στελέχη ζύμης του σκωτσέζικου ούισκι περιλαμβάνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων ζύμης, τον αριθμό των βακτηρίων και την περιεκτικότητα σε υγρασία. (Korhola et al. 1989). Ορισμένα αποστακτήρια σκωτσέζικου ούισκι συμπλήρωναν στο παρελθόν τη ζύμη του οινοπνευματοποιού τους με μια μικρή αναλογία χρησιμοποιημένης ζύμης μύρας. Η παρουσία της ζύμης μύρας παρέχει οφέλη γεύσης όσον αφορά την ποιότητα του τελικού οινοπνεύματος (Korhola et al., 1989) και στον έλεγχο του pH της ζύμωσης λόγω της πρόσληψης πυροσταφυλικού οξέος (McGill 1990).

Εκτός από το επιλεγμένο στέλεχος ζύμης για την έναρξη της ζύμωσης, διάφορες άγριες ζύμες όπως μη αποστακτικά στελέχη *S. cerevisiae*, *Pichia membranefaciens*, *Torulaspora delbrueckii* και είδη *Candida* μπορεί επίσης να υπάρχουν σε ζυμώσεις ούισκι. Αν και τέτοιοι ζυμομύκητες είναι δυνητικά προβληματικοί ως προς την επίδραση της προόδου της ζύμωσης, τα επίπεδά τους διατηρούνται συνήθως χαμηλά λόγω της κυριαρχίας του κύριου στελέχους ζυμομύκητα παραγωγής του *S. cerevisiae*. Μια άλλη άγρια ζύμη, η *Dekkera bruxellensis* (ανάμορφη *Brettanomyces bruxellensis*), η οποία είναι μια κοινή ζύμη μόλυνσης στις ζυμώσεις οίνου, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στις ζυμώσεις δημητριακών για την παραγωγή αποσταγμένων αλκοολούχων ποτών. Για παράδειγμα, οι (Passoth et al. 2007) διαπίστωσε ότι το *D. bruxellensis* κυριάρχησε στις ζυμώσεις αποσταγμάτων με βάση το σιτάρι μετά τον εκτός ανταγωνισμού των αρχικών καλλιιεργειών *S.*

4.3 Θρεπτική Σύνθεση Μέσων Ζύμωσης

Οι πηγές σακχάρων για ζυμώσεις ποτών μπορούν είτε να εξαχθούν απευθείας από φυτά πλούσια σε ζάχαρη (για παράδειγμα, από ζαχαροκάλαμο στην περίπτωση της μελάσας ή από φρούτα στην περίπτωση του γλεύκους οίνου) είτε από φυτά πλούσια σε άμυλο (για παράδειγμα, μετά από προ-υδρόλυση άμυλα δημητριακών από κριθάρι, καλαμπόκι και σιτάρι). Κατά την υδρόλυση του αμύλου με ένζυμα αμυλάσης βύνης, απελευθερώνονται ανώτεροι σακχαρίτες όπως ολιγοσακχαρίτες (για παράδειγμα, μαλτοδεξτρίνες) που τυπικά δεν χρησιμοποιούνται από ζυμομύκητες *Saccharomyces* που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση.

Ο Πίνακας 4.2 παραθέτει τους κύριους τύπους μέσων ζύμωσης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών

Πίνακας 4.2 Μερικά μέσα ζύμωσης για αλκοολούχα ποτά.		
Μέσα	Ζυμώσιμα σάκχαρα	Ποτό
Βύνη κριθαριού	Γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη	Μπύρα Ale και lager. Σκοτσέζικο ουίσκι βύνης.
Γλεύκος δημητριακών με βάση τη βύνη κριθαριού και εξωγενή ένζυμα συν μη βυνοποιημένο άμυλο από σιτάρι, σίκαλη, καλαμπόκι, σόργο κ.λπ	Γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη	Μερικές μπύρες, σκωτσέζικο ουίσκι κόκκων, ουίσκι Bourbon και Tennessee, канаδικό ουίσκι σίκαλης, ιρλανδικό ουίσκι, ουδέτερο απόσταγμα κόκκων (για τζιν, βότκα κ.λπ.)
Υδρόλυμα ρυζιού (από ένζυμα Koji)	Γλυκόζη	Sakē, Sochu, Arrack, Awamori
Υδρόλυμα πατάτας (από αμυλολυτικά ένζυμα)	Γλυκόζη	Aquavit, vodka
Αγαύη	Φρουκτόζη	Τεκίλα, mezcal, pulque
Μελάσα από ζαχαροκάλαμο	Σακχαρόζη	Ρούμι
Χυμός ζαχαροκάλαμου	Σακχαρόζη	Cachaça (Brazil), Rhum Agricole
Γλεύκος σταφυλιού, χυμοί φρούτων, μέλι	Γλυκόζη, φρουκτόζη	Οίνος, κονιάκ, αρμανιάκ, μπράντυ, γκράππα, kirsch, slivovitch, μηλίτης, απίτη, υδρόμελο
Ορός γάλακτος τυριού	Λακτόζη	Τζιν, βότκα, λικέρ κρέμα

4.4 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Η ποικιλία των αποσταγμένων οινοπνευματωδών ποτών συνδέεται με τις ποικίλες πρώτες ύλες εκκίνησης και τα κύρια διαθέσιμα σάκχαρα για την ζύμη ζύμωσης, τα οποία είναι: μαλτόζη (για ούισκι), γλυκόζη και φρουκτόζη (για κονιάκ), σακχαρόζη (για ρούμι), λακτόζη (για αποστάγματα με βάση τον ορό γάλακτος), και φρουκτόζη (για την τεκίλα και το Mezcal). Η επιλογή του στελέχους της ζύμης για τέτοια οινοπνευματώδη ποτά πρέπει επομένως να αντικατοπτρίζει μια ειδική ζυμωσιμότητα σακχάρου. Για παράδειγμα, μια φρουκτόφιλη ζύμη δεν θα ήταν κατάλληλη για ζυμώσεις βύνης για ούισκι.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές εξελίξεις που στοχεύουν στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της μετατροπής του σακχάρου σε αλκοόλη και στην επιλογή νέων στελεχών *S. cerevisiae* για να προσδώσουν επιθυμητά αισθητικά χαρακτηριστικά στα αλκοολούχα ποτά. (Walker et al. 2012) έχουν εντοπίσει επιθυμητά χαρακτηριστικά για τα στελέχη ζύμης απόσταξης ούισκι Σκωτίας.

Αν και έχουν γίνει πρόσφατα επιστημονικές πρόοδοι στη γνώση της γενετικής και της μοριακής βιολογίας της ζύμης, όπως εφαρμόζονται στη ζυθοποιία και την οινοποίηση, αυτό έχει αποδειχθεί πολύ περιορισμένη πρακτική αξία για τον οινοπνευματοποιό. Ειδικότερα, η μηχανική στελεχών που χρησιμοποιεί τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA δεν έχει βρει εύνοια για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών, κυρίως λόγω ζητημάτων αντίληψης του κοινού. Με άλλα λόγια, οι περιορισμοί στη χρήση στελεχών γενετικά τροποποιημένης ζύμης σε αυτό το πεδίο είναι κυρίως κοινωνιολογικοί και όχι τεχνολογικοί.

Τα αυτοκλωνοποιημένα στελέχη ζύμης, που περιλαμβάνουν γενετική τροποποίηση ζύμης-ζύμης μπορεί να είναι πιο ελκυστικά για τους καταναλωτές από τον μετασχηματισμό ζυμομύκητα με γονίδια μη ζυμομύκητα και μπορεί επίσης να είναι πιο ευνοϊκά από κανονιστική άποψη (Argyros and Stonehouse 2017).

Εκεί που αξιοποιούνται επιτυχώς τέτοια στελέχη γενετικά τροποποιημένα (ΓΤ) είναι στον τομέα της αιθανόλης καυσίμου (βλ. Walker and Walker, 2018). Ωστόσο, ορισμένες μοριακές βιολογικές τεχνικές που εφαρμόζονται σε στελέχη ζύμης αλκοολούχων ποτών έχουν αποδειχθεί χρήσιμες. Για παράδειγμα, η πρωτεομική ανάλυση των στελεχών ζυμομύκητα ούισκι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης έχει παράσχει πληροφορίες για τις αντιδράσεις στρες της ζύμης κατά τη

διάρκεια της ζύμωσης βιομηχανικών πολτών δημητριακών (Hansen et al. 2006). Η μοριακή γενετική και η βιοπληροφορική που εφαρμόζονται σε βιομηχανικά στελέχη του *S. cerevisiae* αντιπροσωπεύουν ισχυρά εργαλεία για την παρακολούθηση και τον έλεγχο των ζυμώσεων για την παραγωγή μπύρας, οίνου και αλκοολούχων ποτών (Bond and Blomberg 2006). Η μελλοντική έρευνα στη φυσιολογία και τη γενετική ζυμομύκητα θα οδηγήσει σε μια βαθύτερη κατανόηση των στελεχών *S. cerevisiae* που αξιοποιούνται για ζυμώσεις αλκοολούχων ποτών. Με τη σειρά τους, νέα στελέχη ζύμης με ενδιαφέροντα νέα χαρακτηριστικά με βελτιωμένη απόδοση ζύμωσης και ποιότητα γεύσης είναι στον ορίζοντα.

Βιβλιογραφία

- Albertin, W., Miot-Sertier, C., Bely, M., Marullo, P., Coulon, J., Moine, V., et al. (2014). Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. *Int. J. Food Microbiol.* 178, 87–97. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.009
- Amerine, A. M., Berg, H. V., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L., and Webb, A. D. (1980). *The Technology of Winemaking*. Wesport, CT: AVI Technical Books Inc.
- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., and Guillamón, J. M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT Food Sci. Technol.* 49, 8–13. doi: 10.1016/j.lwt.2012.04.008
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M., and Esteve-Zarzoso, B. (2010). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 215–224. doi: 10.1007/s00217-010-1272-0
- Anfang, N., Brajkovich, M., and Goddard, M. R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 1–8. doi: 10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x
- Arévalo-Villena, M., Úbeda-Iranzo, J. F., and Briones-Pérez, A. I. (2007). β -Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 420–425. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.07.013
- Arévalo-Villena, M., Úbeda-Iranzo, J. F., Gundllapalli, S. B., Cordero-Otero, R. R., and Briones-Pérez, A. I. (2006). Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 229–234. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.018
- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., et al. (2012). Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *Eur. Food Res. Technol.* 235, 303–313. doi: 10.1007/s00217-012-1762-3
- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., and Zapparoli, G. (2015). Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 277–293. doi: 10.1007/s11274-014-1774-1

- Austriaco, N.R. Jr (1996) To bud until death: the genetics of ageing in the yeast, *Saccharomyces*. *Yeast* 12: 623–630.
- Baffi, M. A., Dos Santos Bezerra, C., Arévalo-Villena, M., Briones-Pérez, A. I., Gomes, E., and Da Silva, R. (2011). Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. *Ann. Microbiol.* 61, 75–78. doi: 10.1007/s13213-010-0099-z
- Baffi, M. A., Martin, N., Tobal, T. M., Ferrarezi, A. L., Ghilardi Lago, J. H., Boscolo, M., et al. (2013). Purification and characterization of an ethanol-tolerant β -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus* and its potential for hydrolysis of wine aroma precursors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 1681–1691. doi: 10.1007/s12010-013-0471-0
- Barnett, J. A. (2000). A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850 – 1880. *Yeast* 16, 755–771. doi: 10.1002/1097-0061(20000615)16:8<755::AID-YEA587>3.0.CO;2-4
- Barnett, J.A. (2003) Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology* 149: 557–567
- Barnett, J. A., and Lichtenthaler, F. W. (2001). A history of research on yeasts 3: emil Fischer Eduard Buchner and their contemporaries, 1880–1900. *Yeast* 18, 363–388. doi: 10.1002/1097-0061(20010315)18:4<363::AID-YEA677>3.0.CO;2-R Beckner
- Whitener, M. E., Carlin, S., Jacobson, D., Weighill, D., Divol, B., Conterno, L., et al. (2015). Early fermentation volatile metabolite profile of non-*Saccharomyces* yeasts in red and white grape must: a targeted approach. *LWT Food Sci. Technol.* 64, 412–422. doi: 10.1016/j.lwt.2015.05.018
- Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J. M., Mas, A., and Rozès, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 169–177. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.030
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., et al. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287–293. doi: 10.1078/0723-2020-00097
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., and Barre, P. (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 319–324.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., and Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 312–320. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023

- Benda, I. (1982). "Wine and Brandy," in *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, ed. G. Reed (Westport, CT: AVI Technical Books Inc), 293–402.
- Benito, A., Calderón, F., Palomero, F. E., and Benito, S. (2015). Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules* 20, 9510–9523. doi: 10.3390/molecules20069510
- Benito, S., Palomero, F., Calderón, F., Palmero, D., and Suárez-Lepe, J. A. (2014a). Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking. *Food Microbiol.* 42, 218–224. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.014
- Benito, S., Palomero, F., Gálvez, L., Morata, A., Calderón, F., Palmero, D., et al. (2014b). Quality and composition of red wine fermented with *Schizosaccharomyces pombe* as sole fermentative yeast, and in mixed and sequential fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 52, 376–382.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., Palmero, D., and Suárez-Lepe, J. A. (2013). Physiological features of *Schizosaccharomyces pombe* of interest in making of white wines. *Eur. Food Res. Technol.* 236, 29–36. doi: 10.1007/s00217-012-1836-2
- Bindon, K. A., Dry, P. R., and Loveys, B. R. (2007). Influence of plant water status on the production of C13-norisoprenoid precursors in *Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Sauvignon grape berries. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4493–4500. doi: 10.1021/jf063331p
- Blanco, P., Mirás-Avalos, J. M., and Orriols, I. (2012). Effect of must characteristics on the diversity of *Saccharomyces* strains and their prevalence in spontaneous fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 112, 936–944. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05278.x
- Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., and Mills, D.A. (2013) Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. *PLoS One* 8: e66437.
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., and Mills, D.A. (2014) Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage,
- Borneman, A., Forgan, A.H., Kolouchova, R., Fraser, J.A., and Schmidt, S.A. (2016) Whole genome comparison reveals high levels of inbreeding and strain redundancy across the spectrum of commercial wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3-Genes Genomes Genet* 6: 957–971
- Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruege, V., and Dubourdieu, D. (1998). Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3095–3099. doi: 10.1021/jf971027d

- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., and Kunkee, R. E. (1996). *Principles and Practices of Winemaking*. New York, NY: Chapman.
- Barnett, J. A. A history of research on yeast 1: Work by chemists and biologists, 1789–1850. *Yeast* **14**, 1439–1451 (1998)
- Barnett, J. A. A history of research on yeast 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850–1880. *Yeast* **16**, 755–771 (2000) Barnett, J. A. & Lichtenthaler, F. W. A history of research on yeast 3: Emil Fischer, Eduard
- Brilli, L., Buscioni, G., Moriondo, M., Bindi, M., and Vicenzini, M. (2015). Influence of interannual meteorological variability on yeast content and composition in Sangiovese grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **65**, 375–380. doi: 10.5344/ajev.2014.13116
- Buchner and their contemporaries, 1880–1900. *Yeast* **18**, 363–388 (2001)
- Canonico, L., Comitini, F., and Ciani, M. (2015). Influence of vintage and selected starter on *Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* sequential fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* **241**, 827–833. doi: 10.1007/s00217-015-2507-x
- Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., et al. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**, 107–115. doi: 10.1016/j.femsle.2004. 11.050
- Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A., and Todd, B. E. N. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* **3**, 2–8. doi: 10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x
- Ciani, M., Beco, L., and Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 239–245. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012
- Ciani, M., and Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Curr. Opin. Food Sci.* **1**, 1–6. doi: 10.1016/j.cofs.2014.07.001
- Ciani, M., and Ferraro, L. (1998). Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 247–254. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998. 00485.x
- Ciani, M., and Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 199– 203. doi: 10.1023/A:1008825928354

- Clemente-Jiménez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., and Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol.* 21, 149–155. doi: 10.1016/S0740-0020(03)00063-7
- Clemente-Jiménez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., and Rodríguez-Vico, F. (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 301–308. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.007
- Coetzee, C., and du Toit, W. J. (2012). A comprehensive review on Sauvignon Blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Res. Int.* 45, 287–298. doi: 10.1016/j.foodres.2011.09.017
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., and Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 237–243. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., et al. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–882. doi: 10.1016/j.fm.2010.12.001
- Conant, G.C., and Wolfe, K.H. (2007) Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol Syst Biol* 3: 129.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P. A., Curtin, C., and Varela, C. (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 7–15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027
- Cordente, A. G., Curtin, C. D., Varela, C., and Pretorius, I. S. (2012). Flavour-active wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 601–618. doi: 10.1007/s00253-012-4370-z
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., and Arroyo, T. (2013). Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* Cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* 236, 193–207. doi: 10.1007/s00217-012-18749
- Cordero-Otero, R. R., Úbeda-Iranzo, J. F., Briones-Pérez, A. I., Potgieter, N. M., Villena, A., Pretorius, I. S., et al. (2003). Characterization of the β -glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Food. Sci.* 68, 2564–2569. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb07062.x

- Cordonnier, C., and Bayonove, R. (1974). Mise en évidence dans le baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *C. R. Acad. Sci. Ser. D* 278, 3387–3390.
- Cousin, F.J.; Le Guellec, R.; Schlusshuber, M.; Dalmaso, M.; Laplace, J.M.; Cretenet, M. Microorganisms in fermented apple beverages: Current knowledge and future directions. *Microorganisms* 2017, 5, 39.
- Cus, F., and Jenko, M. (2013). The influence of yeast strains on the composition and sensory quality of Gewürztraminer wine. *Food Technol. Biotechnol.* 51, 547–553.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.-N., and Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. Var. Sauvignonwines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragr. J.* 10, 385–392. doi: 10.1002/ffj.2730100610
- Dashko, S., Zhou, N., Tinta, T., Sivilotti, P., Sternad Lemut, M., Trost, K., et al. (2015). Use of non-conventional yeast improves the wine aroma profile of Ribolla Gialla. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 997–1010. doi: 10.1007/s10295-015-1620-y
- del Mónaco, S. M., Barda, N. B., Rubio, N. C., and Caballero, A. C. (2014). Selection and characterization of a patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *J. Appl. Microbiol.* 117, 451–464. doi: 10.1111/jam. 12547
- Di Stefano, R., Maggiorotto, G., and Gianotti, S. (1992). Bioconversion of nerol and geraniol during fermentation. *Riv. Vitic. Enol.* 45, 43–49.
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., et al. (2003). Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiol.* 20, 567–574. doi: 10.1016/S0740-0020(02)00152-1
- Dzialo, M.C.; Park, R.; Steensels, J.; Lievens, B.; Verstrepen, K.J. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMSMicrobiol. Rev.* 2017, 41, S95–S128.
- Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F., and Barile, D. (2014). Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiol.* 43, 5–15. doi: 10.1016/j.fm.2014.04.005
- du Toit, M., and Pretorius, I. S. (2000). Microbial spoilage and preservations of wine: using weapons from nature's own arsenal-a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 74–96.
- Dubourdieu, D. (1996). The aroma of Sauvignon: improvement by winemaking. *Rev. Oenol. Tech. Vitivin. Oenol.* 79, 18–20. doi: 10.1111/j.1750-3841. 2012.02705.x

Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Peyrot des Gachons, C., and Murat, M. L. (2006). The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: the example of Sauvignon Blanc. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 81–88.

Ebeler, S. E., and Thorngate, J. H. (2009). Wine chemistry and flavor: looking into the crystal glass. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8098–8108. doi: 10.1021/jf9000555 Egli, C. M., Edinger, W. D., Mittrakul, C. M., and Henick-Kling, T. (1998).

Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779–789. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00521.

Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., and Cocolin, L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations. *Int. J. Food Microbiol.* 199, 33–40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.009

Epifanio, S. I., Gutiérrez, A. R., Santamaría, M. P., and López, R. (1999). The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 219–224.

Erten, H., and Tanguler, H. (2010). Influence of *Williopsis saturnus* yeasts in combination with *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 474–479. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02822.x

Ewart, A. J. W., Brien, C. J., Soderlund, R., and Smart, R. E. (1985). The effects of light pruning, irrigation and improved soil-management on wine quality of the *Vitis vinifera* CV Riesling. *Vitis J. Grapevine Res.* 24, 209–217.

Fang, Y., and Qian, M. C. (2006). Quantification of selected aroma-active compounds in Pinot Noir wines from different grape maturities. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8567–8573. doi: 10.1021/jf061396m

Fang, Y., and Qian, M. C. (2016). Development of C13-norisoprenoids, carotenoids and other volatile compounds in *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir grapes. *Food Chem.* 192, 633–641. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.07.050

Fernández-González, M., Di Stefano, R., and Briones, A. I. (2003). Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from Muscat must by different yeast species. *Food Microbiol.* 20, 35–41. doi: 10.1016/S0740-0020(02)00105-3

- Fia, G., Giovani, G., and Rosi, I. (2005). Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic aeration. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *J. Appl. Microbiol.* 99, 509–517. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02657.x
- Fidalgo, M., Barrales, R.R., Ibeas, J.I., and Jimenez, J. (2006) Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11228–11233.
- Fleet, G. H. (1993). “The microorganisms of winemaking-isolation enumeration and identification,” in *Wine Microbiology and Biotechnology*, ed. G. H. Fleet (Chur: Harwood Academic Publishers), 1–25.
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x
- Fleet, G. H., and Heard, G. M. (1993). “Yeast-growth during winemaking,” in *Wine Microbiology and Biotechnology*, ed. G. H. Fleet (Chur: Harwood Academic Publishers), 27–54.
- Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., and Ribereau-Gayon, P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034–1038.
- Frezier, V., and Dubourdieu, D. (1992). Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 4, 375–380.
- Gallander, J. F. (1977). Deacidification of eastern table wines with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 65–72.
- Garavaglia, J., Andressa, H., Rodrigues Bjerk, T., De Cassia de Souza Schneider, R., Welke, J. E., and Alcaraz Zini, C. (2014). A new method for rapid screening of ester-producing yeasts using in situ HS-SPME. *J. Microbiol. Methods* 103, 1–2. doi: 10.1016/j.mimet.2014.05.001
- Garavaglia, J., De Cassia De Souza Schneider, R., Camargo Mendes, S. D., Welke, J. E., Alcaraz Zini, C., Bastos Caramão, E., et al. (2015). Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production. *Microbiol. Res.* 173, 59–65. doi: 10.1016/j.micres.2015.02.002
- García, A., Carcel, C., Dulau, L., Samson, A., Aguera, E., Agosin, E., et al. (2002). Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. *J. Food Sci.* 67, 1138–1143. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09466.x

- Genovés, S., Gil, J. V., Manzanares, P., Aleixandre, J. L., and Vallés, S. (2003). Production by *Saccharomyces cerevisiae* and its application in winemaking. *J. Food Sci.* 68, 2096–2100. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb07025.x
- Gensi, R.; Kyamuhangire, W.; Carasco, J. Traditional production method and storage characteristics for banana beer (tonto) in Uganda. *Acta Hortic.* 2000, 540, 569–574.
- Gil, J. V., Manzanares, P., Genovés, S., Vallés, S., and González-Candelas, L. (2005). Overproduction of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 57–68. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.026
- Gil, J. V., Mateo, J. J., Jiménez, M., Pastor, A., and Huerta, T. (1996). Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *J. Food Sci.* 61, 1247–1250. doi: 10.1111/j.1365-2621.1996.tb10971.x
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., et al. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.004
- Goddard, M.R. (2008) Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology* 89: 2077–2082.
- Goffeau, A., Barrell, B.g., Bussey, H., Davis, R.w., Dujon, B., Feldmann, H., et al. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546–567.
- González, R., Quirós, M., and Morales, P. (2013). Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends Food Sci. Technol.* 29, 55–61. doi: 10.1016/j.tifs.2012.06.015
- González-Pombo, P., Farina, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., and Brena, B. M. (2011). A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochem.* 46, 385–389. doi: 10.1016/j.procbio.2010.07.016
- González-Pombo, P., Pérez, G., Carrau, F., Guisán, J. M., Batista-Viera, F., and Brena, B. M. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol. Lett.* 30, 1469–1475. doi: 10.1007/s10529-008-9708-3
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., et al. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts

- (*Torulasporea delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* 240, 999–1012. doi: 10.1007/s00217-014-2404-8
- Goto, S. (1980). Changes in the wild yeast flora of sulfited grape musts. *J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ.* 15, 29–32.
- Govender, P., Bester, M., and Bauer, F.F. (2010) FLO gene-dependent phenotypes in industrial wine yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 931–945.
- Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., Rosellini, D., and Vicenzini, M. (1998). Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentations for the production of Brunello de Montalcino wines. *Food Technol. Biotechnol.* 36, 313–318.
- Grangeteau, C., Gerhards, D., Rousseaux, S., von Wallbrunn, C., Alexandre, H., and Guilloux-Benatier, M. (2015). Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: what is their involvement in grape must fermentation? *Food Microbiol.* 50, 70–77. doi: 10.1016/j.fm.2015.03.009
- Grant-Preece, P. A., Pardon, K. H., Capone, D. L., Cordente, A. G., Sefton, M. A., Jeffery, D. W., et al. (2010). Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1383–1389. doi: 10.1021/jf9037198
- Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J. M., Bayonove, C., and Cordonnier, R. (1988). Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grapes. *Carbohydr. Res.* 184, 139–149. doi: 10.1016/0008-6215(88)80012-0
- Haber, J.E. (2012) Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191: 33–64.
- Hagman, A., Sall, T., Compagno, C., and Piskur, J. (2013) Yeast “make-accumulate-consume” life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLoS One* 8: e68734.
- Heard, G. M., and Fleet, G. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 727–728.
- Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., and Monk, P. (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.* 84, 865–876. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00423.x

- Hernández-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., García-Moruno, E., and Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chem.* 107, 1064–1077. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.09.032
- Hernández-Orte, P., Concejero, B., Astrain, J., Lacau, B., Cacho, J., and Ferreira, V. (2015). Influence of viticulture practices on grape aroma precursors and their relation with wine aroma. *J. Sci. Food Agric.* 95, 688–701. doi: 10.1002/jsfa.6748
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Jay, J.M. (2000). *Modern Food Microbiology*, 6th Edition, Aspen Publishers, Maryland, USA.
- Martín-Álvarez, P. J., and Cabezudo, M. D. (1990). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 313–318. Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Heras Manso, J. M., and Fernández-González, M. (2014). Influence of sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* in the quality of red wines. *Eur. Food Res. Technol.* 239, 279–286. doi: 10.1007/s00217-014-2220-1
- Izquierdo-Cañas, P. M., Palacios-García, A. T., and García-Romero, E. (2011). Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspora*) and *Saccharomyces* yeast starter. *Vitis J. Grapevine Res.* 50, 177–182.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. H. P., and Pretorius, I. S. (2003). The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 24, 55–62.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. H. P., and Pretorius, I. S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 15–39.
- Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., and Spyropoulos, H. (2005). Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1599–1602. doi: 10.1007/s11274-005-8220-3
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., and Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 735–739. doi: 10.1007/s11274-006-9283-5
- Kellis, M., Birren, B.W., and Lander, E.S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428: 617–624

- Kim, D. H., Hong, Y. A., and Park, H. D. (2008). Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnol. Lett.* 30, 1633–1638. doi: 10.1007/s10529-008-9726-1
- King, A., and Dickinson, J. R. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16, 499–506.
- Knop, M. (2006) Evolution of the hemiascomycete yeasts: on life styles and the importance of inbreeding. *BioEssays* 28: 696–708.
- Kraus, J.K., Reed, G., and Villettaz, J.C. (1983) Levures seches actives de vinification 1re partie: fabrication et caracteristiques. *Connaiss Vigne Vin* 17: 93–103.
- Lambrechts, M. G., and Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97–129.
- Lange, J. N., Faasse, E., Tantikachornkiat, M., Gustafsson, F. S., Halvorsen, L. C., Klufftinger, A., et al. (2014). Implantation and persistence of yeast inoculum in Pinot Noir fermentations at three Canadian wineries. *Int. J. Food Microbiol.* 180, 56–61. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.003
- Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C., and Lollier, M. (2006). Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiol.* 23, 709–716. doi: 10.1016/j.fm.2006.02.007
- Libkind, D.; Hittinger, C.T.; Valério, E.; Gonçalves, C.; Dover, J.; Johnston, M.; Gonçalves, P.; Sampaio, J.P. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 14539–14544.
- Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M. J., González, C., Calderón, F., et al. (2015). Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspora delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. *Food Res. Int.* 76, 325–333. doi: 10.1016/j.foodres.2015.06.030
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., et al. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT Food Sci. Technol.* 59, 915–922. doi: 10.1016/j.lwt.2014.06.019
- Lonvaud-Funel, A. (1996). Microorganisms of winemaking. *Cerevisia* 21, 55–58. López, M. C., Mateo, J. J., and Maicas, S. (2015). Screening of β -glucosidase and β -xylosidase activities in four non-*Saccharomyces* yeast isolates. *J. Food Sci.* 80, 1696–1704. doi: 10.1111/1750-3841.12954

- Lorenzini, M.; Simonato, B.; Slaghenaufi, D.; Ugliano, M.; Zapparoli, G. Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds. *LWT* 2019, 99, 224–230
- Loureiro, V., and Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23–50. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00246-0
- Madden, K., and Snyder, M. (1998) Cell polarity and morphogenesis in budding yeasts. *Annu Rev Microbiol* 52: 687–744
- Mangado, A., Morales, P., Gonzalez, R., and Tronchoni, J. (2018) Evolution of a yeast with industrial background under winemaking conditions leads to diploidization and chromosomal copy number variation. *Front Microbiol* 9: 1816
- Manzanares, P., Ramon, D., and Querol, A. (1999). Screening of non-*Saccharomyces* yeasts for the production of β -D-xylosidase activity. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 105–112. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00186-X
- Manzanares, P., Rojas, V., Genovés, S., and Vallés, S. (2000). A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeast. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 95–103. doi: 10.1046/j.1365-2621.2000.00364.x
- Martínez, J., Millán, C., and Ortega, J. M. (1989). Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from ‘Pedro Ximenez’ Grapes. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 10, 31–35.
- Martini, A., Frederici, F., and Rosini, G. (1980). A new approach to the study of yeast ecology of natural substances. *Can. J. Microbiol.* 26, 856–859. doi: 10.1139/m80-149
- Mateo, J. J., and Jiménez, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr. A* 881, 557–567. doi: 10.1016/S0021-9673(99)01342-4
- Mateo, J. J., Jiménez, M., Huerta, T., and Pastor, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from musts of Monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 153–160. doi: 10.1016/0168-1605(91)90102-U
- Mateo, J. J., Peris, L., Ibáñez, C., and Maicas, S. (2011). Characterization of glycolytic activities from non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Bobal musts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 347–354. doi: 10.1007/s10295-010-0780-z
- Maturano, Y. P., Assof, M., Fabani, M. P., Nally, M. C., Jofré, V., Rodríguez Assaf, L. A., et al. (2015). Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*

- cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108, 1239–1256. doi: 10.1007/s10482-015-0578-0
- Maturano, Y. P., Rodríguez Assaf, L. A., Toro, M. E., Nally, M. C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L. I., et al. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 43–50. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015
- McGovern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M.P., Smith, K.E., Hall, G.R., et al. (2017) Early neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E10309–E10318.
- McMahon, H., Zoeklein, B. W., Fugelsang, K., and Jasinski, Y. (1999). Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 198–203. doi: 10.1038/sj.jim.29.00720
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gómez, M. E., Barquet, M., et al. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem.* 141, 2513–2521. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.056
- Mendoza, L. M., De Nadra, M. C. M., and Fariás, M. E. (2007). Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnol. Lett.* 29, 1057–1063. doi: 10.1007/s10529-007-9355-0
- Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., and Combina, M. (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol.* 24, 403–412. doi: 10.1016/j.fm.2006.06.005
- Mora, J., Barbas, J. I., and Mulet, A. (1990). Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 156–159.
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., and González, R. (2015). The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3993–4003. doi: 10.1007/s00253-014-6321-3
- Morata, A., Benito, S., Loira, I., Palomero, F., González, M. C., and Suárez-Lepe, J. A. (2012). Formation of pyranoanthocyanins by *Schizosaccharomyces pombe* during the fermentation of red must. *Int. J. Food Microbiol.* 159, 47–53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.007

- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., and Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 231–238. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.025
- Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., and Vasconcelos, I. (2005). Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 285–294. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.029
- Nykänen, L. (1986). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 84–96.
- Oro, L., Ciani, M., and Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1209–1217. doi: 10.1111/jam.12446
- Ough, C. S., Cook, J. A., and Lider, L. A. (1968). Rootstock-scion interactions concerning wine making. II. Wine compositional and sensory changes attributed to rootstock and fertilizer differences. *Am. J. Enol. Vitic.* 19, 254–265.
- Pando Bedriñana, R.; Querol Simón, A.; Suárez Valles, B. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiol.* 2010, 27, 503–508
- Parish, M. E., and Carroll, D. E. (1985). Indigenous yeasts associated with Muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 165–169.
- Peynaud, E., and Domercq, S. (1959). A review of microbiological problems in winemaking in France. *Am. J. Enol. Vitic.* 10, 69–77.
- Pineau, B., Barbe, J. C., Van Leeuwen, C., and Dubordieu, D. (2007). Which impact for β -Damascenone on red wines aroma? *J. Agric. Food Chem.* 55, 4103–4108. doi: 10.1021/jf070120r
- Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custodio, V., Fernandes, J., Sousa, S., et al. (2015) Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Front Microbiol* 6: 905.
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. C., and Ortega, J. M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* 20, 217–224. doi: 10.1016/S0740-0020(02) 00101-6
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729. doi: 10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B

- Pretorius, I. S. (2003). "The genetic analysis and tailoring of wine yeasts," in *Functional Genetics of Industrial Yeasts*, Vol. 2, *Topics in Current Genetics*, ed. J. H. DeWinde (Berlin: Springer-Verlag), 99–142.
- Pretorius, I. S., Van Der Westhuizen, T. J., and Augustyn, O. P. H. (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry-A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 20, 61–75.
- Querol, A., Jiménez, M., and Huerta, T. (1990). Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape harvests in the region of Alicante. *J. Food Sci.* 55, 1603–1606. doi: 10.1111/j.1365-2621.1990.tb03580.x
- Querol, A., Barrio, E., and Ramon, D. (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *System Appl Microbiol* 15: 439–446
- Radler, F. (1993). "Yeasts-metabolism of organic acids," in *Wine Microbiology and Biotechnology*, ed. G. H. Fleet (Chur: Harwood Academic Publishers), 165–182.
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., et al. (2012). *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1987–1994. doi: 10.1128/AEM.06768-11
- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung* 42, 351–363. doi: 10.1002/(SICI)1521-3803(199812)42:06<351::AID-FOOD351>3.3.CO;2-U
- Rapp, A., and Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia* 42, 873–884. doi: 10.1007/BF01941764
- Rapp, A., and Versini, G. (1991). "Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine," in *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines*, ed. J. M. Rantz (Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture), 156–164.
- Reed, G., and Peppler, H. J. (1973). *Yeast Technology*. Westport, CT: The AVI Publishing Company, Inc.
- Regueiro, L. A., Costas, C. L., and Rubio, J. E. L. (1993). Influence of viticultural and enological practices on the development of yeast populations during winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 405–408.
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J. C., and Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. Cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int. J. Food Microbiol.* 207, 40–48. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., et al. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii*

- species: potential applications in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 201–210. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maugean, A., and Dubordieu, D. (1998). *Chimie Du Vin, Stabilisation et Traitements*. Paris: Dunod.
- Ristic, R., Bindon, K., Francis, L. I., Herderich, M. J., and Iland, P. G. (2010). Flavonoids and C13-norisoprenoids in *Vitis vinifera* L. Cv. Shiraz: relationships between grape and wine composition, wine colour and wine sensory properties. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16, 369–388. doi: 10.1111/j.1755-0238.2010.00099.x
- Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Barbagelata, R. J., Barda, N. B., and Caballero, A. C. (2010a). Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 19–25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.025
- Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Vallés, S., and Caballero, A. C. (2010b). Characterization of α -rhamnosidase activity from a Patagonian *Pichia guilliermondii* wine strain. *J. Appl. Microbiol.* 109, 2206–2213. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04854.x
- Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Van Broock, M., Vallés, S., Ramón, D., and Caballero, A. C. (2004). Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *J. Appl. Microbiol.* 96, 84–95. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02032.x
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., and Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 283–289. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00552-9
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., and Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 181–188. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00255-1
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., and Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169–180. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00290-3
- Romano, P., and Suzzi, G. (1993). Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 541–545. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb01592.x
- Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P., and Fatichenti, F. (1997). Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. Strain diversity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 239–242. doi: 10.1023/A:1000102006018
- Roncoroni, M., Santiago, M., Hooks, D. O., Moroney, S., Harsch, M. J., Lee, S. A., et al. (2011). The yeast IRC7 gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiol.* 28, 926–935. doi: 10.1016/j.fm.2011.01.002

- Rosi, I., Vinella, M., and Domizio, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 519–527. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb04396.x
- Rosini, G. (1984). Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30, 249–256. doi: 10.2323/jgam.30.249
- Rosini, G., Federici, F., and Martini, A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. *Microb. Ecol.* 8, 83–89. doi: 10.1007/BF02011464
- Sabel, A., Martens, S., Petri, A., König, H., and Claus, H. (2014). *Wickerhamomyces anomalus* ASI: a new strain with potential to improve wine aroma. *Ann. Microbiol.* 64, 483–491. doi: 10.1007/s13213-013-0678-x
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., et al. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol.* 32, 243–253. doi: 10.1016/j.fm.2012.06.006
- Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C., and Gutiérrez, A. R. (2005). Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 49–56. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.024
- Sarris, D., & Papanikolaou, S. (2016). Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Engineering in Life Sciences*, 16(4), 307–329.
- Schütz, M., and Gafner, J. (1993). Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 551–558. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb01594.x
- Schwentke, J., Sabel, A., Petri, A., König, H., and Claus, H. (2014). The yeast *Wickerhamomyces anomalus* ASI secretes a multifunctional exo- β -1,3-glucanase with implications for winemaking. *Yeast* 31, 349–359. doi:10.1002/yea.3029
- Setati, M.E., Jacobson, D., Andong, U.C., and Bauer, F. (2012) The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS One* 7: e52609
- Shinohara, T., Kubodera, S., and Yanagida, F. (2000). Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 90–97. doi: 10.1016/S1389-1723(00)80040-7
- Sidhu, D., Lund, J., Kotseridis, Y., and Saucier, C. (2015). Methoxypyrazine analysis and influence of viticultural and enological procedures on their levels in grapes, musts, and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 485–502. doi: 10.1080/10408398.2012.658587

- Snow, P. G., and Gallander, J. F. (1979). Deacidification of white table wines through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 45–48.
- Soden, A., Francis, I. L., Oakey, H., and Henschke, P. A. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21–30. doi: 10.1111/j.1755-0238.2000.tb00158.x
- Soles, R. M., Ough, C. S., and Kunkee, R. E. (1982). Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 33, 94–98.
- Spagna, G., Barbagallo, R. N., Palmeri, R., Restuccia, C., and Giudici, P. (2002). Properties of endogenous β -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 1030–1035. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00233-8
- Spayd, S. E., Tarara, J. M., Mee, D. L., and Ferguson, J. C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* Cv. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 171–182.
- Sponholz, W. R. (1993). “Wine spoilage by microorganisms,” in *Wine Microbiology and Biotechnology*, ed. G. H. Fleet (Chur: Harwood Academic Publishers), 395–420.
- Steger, C. L. C., and Lambrechts, M. G. (2000). The selection of yeast strains for the production of premium quality South African brandy base products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24, 431–440. doi: 10.1038/sj.jim.7000005
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., and Van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182–190. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x
- Suomalainen, H., and Lehtonen, M. (1979). The production of aroma compounds by yeast. *J. Inst. Brew.* 85, 149–156. doi: 10.1002/j.2050-0416.1979.tb06846.x
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Christian, E., Butzke, C. E., and Vichitphan, K. (2011). The characterisation of a novel *Pichia anomala* β -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. *Ann. Microbiol.* 59, 335–343. doi: 10.1007/BF03178336
- Swiegers, J. H., Kievit, R. L., Siebert, T., Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., et al. (2009). The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiol.* 26, 204–211. doi: 10.1016/j.fm.2008.08.004
- Swiegers, J. H., and Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Adv. Appl. Microbiol.* 57, 131–175. doi: 10.1016/S0065-2164(05)57005-9
- Swiegers, J. H., Willmott, R. L., Hill-Ling, A., Capone, D. L., Pardon, K. H., Elsey, G. M., et al. (2006). “Modulation of volatile thiol and ester aromas in wine by modified wine yeast,” in

- Developments in Food Science. Flavour Science Recent Advances and Trends, eds W. Bredie and M. Petersen (Amsterdam: Elsevier), 113–116.
- Tanguler, H. (2012). Evaluation of *Williopsis saturnus* inoculum level on fermentation and flavor compounds of white wines made from Emir (*Vitis Vinifera* L.) grown in Anatolia. *Food Biotechnol.* 26, 351–368. doi: 10.1080/08905436.2012.724038
- Tanguler, H. (2013). Influence of temperatures and fermentation behaviour of mixed cultures of *Williopsis saturnus* var. *saturnus* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking. *Food Sci. Technol. Res.* 19, 781–793. doi: 10.3136/fstr.19.781
- Teixeira, A., Caldeira, I., and Duarte, F. L. (2015). Molecular and oenological characterization of Touriga Nacional non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 118, 658–671. doi: 10.1111/jam.12727
- Tominaga, T., Darriet, P., and Dubourdieu, D. (1996). Identification de l'acétate de 3-mercaptophexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arome des vins de Sauvignon. *Vitis J. Grapevine Res.* 35, 207–210.
- Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., and Dubourdieu, D. (1998a). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. Var. Sauvignon Blanc wines. *Flavour Fragr. J.* 13, 159–162. doi: 10.1002/(SICI)1099-1026(199805/06)13:3<159::AID-FFJ709>3.0.CO;2-7
- Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., and Dubourdieu, D. (1998b). A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc: S-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5215–5219. doi: 10.1021/jf980481u
- Úbeda, J., and Briones, A. I. (2000). Characterization of differences in the formation of volatiles during fermentation within synthetic and grape musts by wild *Saccharomyces* strains. *LWT Food Sci. Technol.* 33, 408–414. doi: 10.1006/fstl.2000.0680
- Ugliano, M., Bartowsky, E. J., McCarthy, J., Moio, L., and Henschke, P. A. (2006). Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6322–6331. doi: 10.1021/jf0607718
- Viana, F., Belloch, C., Vallés, S., and Manzanares, P. (2011). Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 235–240. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.005
- Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S., and Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.* 25, 778–785. doi: 10.1016/j.fm.2008.04.015
- Viana, F., Gil, J. V., Vallés, S., and Manzanares, P. (2009). Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and

- Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 68–74. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.025
- Voordeckers, K., De Maeyer, D., van der Zande, E., Vincés, M.D., Meert, W., Cloots, L., et al. (2012) Identification of a complex genetic network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology. *Mol Microbiol* 86: 225–239. Wang, Y., Kang, W., Xu, Y., and Li, J. (2011). Effect of different indigenous yeast β -glucosidases on the liberation of bound aroma compounds. *J. Inst. Brew.* 117, 230–237. doi: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb0 0466.x
- Walker, G.M.; Stewart, G.G. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* 2016, 2, 30. [CrossRef]
- Walker 1998, *Yeast Physiology and Biotechnology*, εκδοτικός οίκος, τοποθεσία
- Wang, Y., Xu, Y., and Li, J. (2012). A novel extracellular β -Glucosidase from *Trichosporon asahii*: yield prediction, evaluation and application for aroma enhancement of Cabernet Sauvignon. *J. Food Sci.* 77, 505–515. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02705.x
- Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., and Massy-Westropp, R. A. (1982). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* 21, 2013–2020. doi: 10.1016/0031-9422(82) 83034-3
- Winterhalter, P., and Skouroumounis, G. K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 55, 73–105.
- Wolfe, K.H., and Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387: 708–713.
- Yanai, T., and Sato, M. (1999). Isolation and properties of β -glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 231–235.
- Yanai, T., and Sato, M. (2000a). Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 2179–2185. doi: 10.1271/bbb.64.2179
- Yanai, T., and Sato, M. (2000b). Purification and characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Pichia capsulata* X91. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1181–1188. doi: 10.1271/bbb.64.1181
- Yanai, T., and Sato, M. (2001). Purification and characterization of an β -D-xylosidase from *Candida utilis* IFO 0639. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 527–533. doi: 10.1271/bbb.65.527
- Zalacain, A., Marín, J., Alonso, G. L., and Salinas, M. R. (2007). Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta* 71, 1610–1615. doi: 10.1016/j.talanta.2006.07.051

Zohre, D. E., and Erten, H. (2002). The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochem.* 38, 319– 324. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00086-9

Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., and Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape must non-Saccharomyces microbial community: impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 210–215. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026

Σουλής Θ., Μαθήματα οινοποιίας, Μέρος Α' . Α.Π.Θ., Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο, Θεσσαλονίκη, 1992.

Τσακίρης Α., Οινολογία: Από το σταφύλι στο κρασί, Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα, 1988

Encyclopaedia Britannica's Guide to the Nobel Prizes (2010)

Godoy, A., Herrera, T. & Ulloa, M. *Más allá del pulque y el tepache: Las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México.* Mexico: UNAM, Instituto de Investigaciones Antropológicas, 2003

Gray, W. D. Studies on the alcohol tolerance of yeasts. *Journal of Bacteriology* **42**, 561–574 (1941)

Huxley, T. H. Popular Lectures and Addresses II. Chapter IV, Yeast (1871). Macmillan, 1894

Jacobs, J. Ethanol from sugar: What are the prospects for US sugar crops? *Rural Cooperatives* **73**(5) (2006)

McGovern, P. E. *Uncorking the Past: The Quest for Wine, Beer, and Other Alcoholic Beverages.* Berkeley: University of California Press, 2009

Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed. New York: Freeman, 2008

Pasteur, L. Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Comptes Rendus Séances de l'Academie des Sciences* **45**, 913–916, 1032–1036 (1857)

Pasteur, L. Studies on Fermentation. London: Macmillan, 1876

Voet, D. & Voet, J. *Biochemistry.* Vol. 1, *Biomolecules, Mechanisms of Enzyme Action, and Metabolism*, 3rd ed. New York: Wiley, 2004

Classic papers:

Meyerhof, O. & Junowicz-Kocholaty, R. The equilibria of isomerase and aldolase, and the problem of the phosphorylation of glyceraldehyde phosphate. *Journal of Biological Chemistry* **149**, 71–92 (1943)

Meyerhof, O. The origin of the reaction of harden and young in cell-free alcoholic fermentation. *Journal of Biological Chemistry* **157**, 105–120 (1945)

Meyerhof, O. & Oesper, P. The mechanism of the oxidative reaction in fermentation. *Journal of Biological Chemistry* **170**, 1–22 (1947)

Pasteur, L. Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Annales de Chimie et de Physique* 3e. sér. **52**, 404–418 (1858)