



ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών:

Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και
Τροφίμων

**«Απομόνωση και χαρακτηρισμός ζυμομυκήτων από
σταφυλόμαζα»**

Μεταπτυχιακή εργασία της:

Γεωργαντζή Χρυσούλας

A.M. : 1311

Επιβλέπων: Καθηγητής Ιωάννης Ρούσσης

Συνεπιβλέπων: Καθηγητής Σπυρίδων Ντούγιας

Ιωάννινα, 2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας κλείνει ένας όμορφος αλλά και ιδιαίτερα απαιτητικός κύκλος και νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου, Καθηγητή κ. Ιωάννη Ρούσση για την αμέριστη εμπιστοσύνη και στήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας καθώς και της συγγραφής της. Τον ευχαριστώ για τις γνώσεις, τη σημαντική βοήθεια του και την επιστημονική καθοδήγηση που μου προσέφερε.

Επίσης, οφείλω να εκφράσω ένα βαθύ και ειλικρινές ευχαριστώ στο Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης και συγκεκριμένα στον συνεπιβλέποντα μου, Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Ντούγια που δέχτηκε να πραγματοποιήσω όλη την πειραματική διαδικασία στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Διαχείρισης και Τεχνολογίας Υγρών Αποβλήτων. Τον ευχαριστώ για την ουσιαστική συμβολή του, την άριστη καθοδήγησή του και την υπομονή του.

Επιπλέον, νιώθω ιδιαίτερα τυχερή που γνώρισα και συνεργάστηκα με την υποψήφια διδάκτορα κα Αικατερίνη Γρόπαλη. Το ενδιαφέρον που έδειξε καθώς και η συνεχής βοήθεια και υποστήριξή της συνέβαλαν στην βελτίωση του ερευνητικού αυτού έργου. Είναι ένας υπέροχος άνθρωπος και την ευχαριστώ θερμά.

Ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες οφείλω και σε όλους τους συναδέλφους που είχα τη χαρά να γνωρίσω και να εργαστώ μαζί τους στο Εργαστήριο Διαχείρισης και Τεχνολογίας Υγρών Αποβλήτων.

Φυσικά ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στο οινοποιείο «Κτήμα Βουρβουκέλη» που βρίσκεται στα Άβδηρα Ξάνθης, που μου προσέφερε τα σταφύλια που χρησιμοποίησα ως πρώτη ύλη για τα πειράματά μου.

Τέλος, δεν θα γινόταν να παραλείψω να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου σε όλη την οικογένειά μου, τις φίλες μου και τον σύντροφό μου των οποίων η βοήθεια και η πίστη στις δυνατότητες μου συνετέλεσαν ώστε να ολοκληρώσω με επιτυχία τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	6
1.1. Διαδικασία οινοποίησης.....	6
1.2. Είδη οινοποίησης.....	10
1.2.1. Ερυθρή οινοποίηση	11
1.2.2. Λευκή οινοποίηση	12
1.2.3. Ροζέ οινοποίηση.....	13
1.2.4. Παρασκευή τσίπουρου.....	14
1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την οινοποίηση	16
1.4. Αυτόχθονα είδη ζυμωτικών μικροοργανισμών στην οινοποίηση	21
1.5. Βιοποικιλότητα κατά τη ζύμωση.....	25
1.6. Κίνδυνοι και επιμολύνσεις κατά την οινοποίηση	29
1.6.1. Μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοίωση.....	29
1.6.2. Οξείδωση	35
1.6.3. Διοξείδιο του θείου.....	36
1.6.4. Υπολείμματα φυτοφαρμάκων	37
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	40
2.1. Υλικά	40
2.1.1. Όργανα και Συσκευές	40
2.1.2. Αντιδραστήρια.....	41
2.1.3. Σταφύλια.....	42
2.2. Μεθοδολογία και μέθοδοι ανάλυσης	42
2.2.1. Παρασκευή σταφυλοπολτού και ζύμωση.....	42

2.2.2. Απομόνωση στελεχών ζυμομυκήτων	44
2.2.3. Ταυτοποίηση στελεχών ζυμομυκήτων.....	47
2.2.4. Ανάπτυξη στελεχών ζυμομυκήτων	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
3.1. Απομόνωση στελεχών ζυμομυκήτων	49
3.2 Ταυτοποίηση στελεχών ζυμομυκήτων.....	49
.....	54
.....	55
.....	57
.....	58
3.3. Ανάπτυξη στελεχών ζυμομυκήτων	58
3.3.1. Καμπύλες ανάπτυξης στελεχών ζυμομυκήτων	58
3.3.2. Χρόνος διπλασιασμού και ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στελεχών ζυμομυκήτων.....	62
3.3.3. Κλίση ανάπτυξης στελεχών	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ	68
ΕΛΛΗΝΟΓΛΩΣΣΗ.....	72

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εξετάζει την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό αυτόχθονων στελεχών ζυμομυκήτων που προέρχονται από σταφυλόμαζα της ερυθρής ποικιλίας Merlot. Ο κύριος στόχος είναι η διερεύνηση των φυσιολογικών χαρακτηριστικών αυτών των στελεχών για ενδεχόμενη χρήση τους στη ζύμωση τσίπουρων.

Από το προς εξέταση δείγμα σταφυλόμαζας, πραγματοποιήθηκε απομόνωση 49 στελεχών τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε σταφυλόμαζα. Επιπλέον, μελετήθηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης 10 επιλεγμένων στελεχών για τον προσδιορισμό των ρυθμών ανάπτυξης τους. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την ταχεία ανάπτυξη των στελεχών, με τα 10 επιλεγμένα στελέχη να βρίσκονται ήδη στην εκθετική φάση τους στις 9 ώρες και στην φάση στασιμότητας στις 21 ώρες.

Τέλος, με την εφαρμογή συγκεκριμένων τεχνικών πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή DNA και η τελική ταυτοποίηση των ζυμομυκήτων. Έτσι, αποδείχθηκε ότι τα 10 επιλεγμένα αυτόχθονα στελέχη ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν ήταν όλα *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

This thesis examines the isolation and characterization of indigenous yeast strains from grape marc of the red Merlot variety. The main objective is to investigate the physiological characteristics of these strains for their potential use in the fermentation of tsipouro.

From the sample of grape marc to be examined, 49 strains were isolated and grown in nutrient medium containing grape marc. In addition, the growth curves of 10 selected strains were studied to determine their growth rates. The results indicated the rapid growth of the strains, with the 10 selected strains already in their exponential phase at 9 hours and in their stagnation phase at 21 hours.

Finally, by applying specific techniques, DNA extraction and final identification of the yeasts was carried out. Thus, it was shown that the 10 selected indigenous yeast strains isolated were all *Saccharomyces cerevisiae*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Διαδικασία οινοποίησης

Σύμφωνα με τον ΟΙV (Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου), οίνος είναι το ποτό που προκύπτει αποκλειστικά από τη μερική ή πλήρη αλκοολική ζύμωση φρέσκων σταφυλιών, συμπιεσμένων ή μη, ή γλεύκους σταφυλιών. Η πραγματική περιεκτικότητά του σε αλκοόλη δεν πρέπει να είναι μικρότερη από 8,5% vol. Επιπλέον, με τον ορισμό αυτό του οίνου, οι λέξεις "αλκοολική ζύμωση" παρέχουν νόμιμη αναγνώριση όλων των οινολογικών πρακτικών και διεργασιών που έχουν ως στόχο να εξασφαλίσουν την αλκοολική ζύμωση και να αποτρέψουν την αλλοίωση του οίνου.

Η οινοποίηση είναι η διαδικασία μετατροπής των σταφυλιών σε κρασί. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει συνήθως διάφορα στάδια, τα οποία μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με τις προτιμήσεις των οινοποιείων και το στυλ του παραγόμενου κρασιού (La Placa et al., 2023). Ωστόσο, τα βασικά στάδια της διαδικασίας της οινοποίησης περιλαμβάνουν:

Συγκομιδή/Τρύγος

Το πρώτο βήμα στη διαδικασία είναι ο τρύγος των σταφυλιών ο οποίος γενικά πραγματοποιείται τους μήνες Αύγουστο-Σεπτέμβριο. Η συγκομιδή των σταφυλιών γίνεται συνήθως με το χέρι ή με ειδικό μηχάνημα, ανάλογα με τον αμπελώνα και τις προτιμήσεις του οινοποιού. Η συγκομιδή γίνεται όταν τα σταφύλια είναι πλήρως ώριμα, τα επίπεδα σακχάρου τους είναι υψηλά ενώ τα επίπεδα οξέων τους είναι χαμηλά (Grainger, 2013; Μιχαλοπούλου & Ανδριανοπούλου, 2008; Χρυσίνας, 2013).

Τα σταφύλια πρέπει να είναι καθαρά από προσβολές, χωρίς υπολείμματα φυτοφαρμάκων, λιπασμάτων και βαρέων μετάλλων. Η φυτοπροστασία σταματά σαράντα ημέρες πριν τον τρύγο και λαμβάνονται προληπτικά μέτρα εναντίον των ασθενειών και των επιβλαβών εντόμων. Ο τρύγος καλό είναι να μην ξεκινάει με βροχερό καιρό γιατί υποβαθμίζονται τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των σταφυλιών. Μετά από αρκετή βροχή μπορεί να υπάρξει σκίσιμο της φλούδας και μόλυνση με παθογόνα (Κόκκινου, 2016).

Μεταφορά και διαλογή

Αφού συγκομιστούν τα σταφύλια, μεταφέρονται στο οινοποιείο. Η σωστή μεταφορά έχει μεγάλη σημασία, ώστε η πρώτη ύλη να φτάσει ανέπαφη, για να αποφευχθούν φαινόμενα οξείδωσης και αλλοιώσεων. Έπειτα, εισέρχονται σε μια κινούμενη ζώνη γνωστή ως τραπέζι διαλογής όπου εκπαιδευμένοι άνθρωποι ξεχωρίζουν τα καλά σταφύλια από τα κακά/σάπια (Grainger, 2013; Μιχαλοπούλου & Ανδριανοπούλου, 2008).

Αποβοστρύχωση

Σε αυτό το στάδιο διαχωρίζονται οι βόστρυχοι (κοτσάνια) από τις ρώγες με ειδικά μηχανήματα, τους αποβοστρυχωτές ή απορραγιστήρια. Όμως, καθώς οι βόστρυχοι είναι πλούσιοι σε τανίνες μπορούν (αν το επιλέξει ο οινοποιός) να μην αφαιρεθούν και έτσι να χρησιμοποιηθούν με σκοπό την αύξηση των επιπέδων τανινών στο κρασί (Grainger, 2013).

Θραύση

Τα σταφύλια οδηγούνται στον θραυστήρα, ένα μηχανήμα το οποίο συνθλίβει τις ρώγες και απελευθερώνει τον χυμό που βρίσκεται μέσα τους. Η μέθοδος σύνθλιψης ποικίλλει ανάλογα με το επιθυμητό στυλ κρασιού και μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ποιότητα και τη γεύση του κρασιού που θα παραχθεί. Για παράδειγμα, η πολύ ισχυρή σύνθλιψη των σταφυλιών μπορεί να απελευθερώσει πικρές τανίνες από τα κουκούτσια, οι οποίες μπορεί να έχουν αρνητικό αντίκτυπο στη γεύση του κρασιού. Έτσι, είναι σημαντικό για τους οινοποιούς να ελέγχουν προσεκτικά τη διαδικασία (Grainger, 2013; Μιχαλοπούλου & Ανδριανοπούλου, 2008; Χρυσίνας, 2013).

Ζύμωση

Η ζύμωση είναι ένα κρίσιμο στάδιο στην οινοποίηση. Διαρκεί αρκετές ημέρες και διεξάγεται σε δεξαμενές ανοξείδωτου χάλυβα σε ελεγχόμενη θερμοκρασία. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ζύμωσης που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση: η αλκοολική ζύμωση που είναι η κύρια και πρωτογενής ζύμωση και η μηλογαλακτική ζύμωση που είναι η δευτερογενής ζύμωση (Buja, 2022).

Η **αλκοολική ζύμωση** είναι η αναερόβια διαδικασία κατά την οποία κυρίως οι ζύμες του είδους *Saccharomyces cerevisiae* καταναλώνουν τα σάκχαρα του χυμού σταφυλιών (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη) και παράγουν αλκοόλη, διοξείδιο του άνθρακα και άλλα υποπροϊόντα. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαρκέσει από μερικές ημέρες έως αρκετές εβδομάδες, ανάλογα με το είδος του παραγόμενου κρασιού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Buja, 2022; Zamora et al., 2009; Moreno-Arribas & Polo, 2005).

Η **μηλογαλακτική ζύμωση**, από την άλλη πλευρά, είναι μια δευτερογενής ζύμωση στην οποία υποβάλλονται ορισμένα κρασιά (τα περισσότερα ερυθρά κρασιά και ορισμένα λευκά κρασιά). Το μηλικό οξύ προσδίδει μια έντονη όξινη αίσθηση στο στόμα και, όταν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα του κρασιού. Η μηλογαλακτική ζύμωση παίζει καθοριστικό ρόλο στη μείωση της οξύτητας του οίνου και στη διατήρηση της μικροβιολογικής σταθερότητας του τελικού προϊόντος. Αυτή η διαδικασία ζύμωσης λαμβάνει χώρα αυθόρμητα ή με εμβολιασμό εμπορικών στελεχών γαλακτικών βακτηρίων, συνήθως *Oenococcus oeni*, ή μερικές φορές στελέχη από τα γένη *Lactobacillus* και *Pediococcus*. Η μηλογαλακτική ζύμωση περιλαμβάνει μια ενζυμική μετατροπή όπου το L-μηλικό οξύ, ένα δικαρβοξυλικό οξύ, μετατρέπεται σε L-γαλακτικό οξύ, ένα μονοκαρβοξυλικό οξύ. Αυτός ο βιοχημικός μετασχηματισμός αυξάνει το pH του κρασιού, μειώνει την οξύτητά του, ενισχύει τη μικροβιολογική του σταθερότητα και συμβάλλει σε μια εμπλουτισμένη σειρά αρωμάτων και γεύσεων. Αυτή η διαδικασία ζύμωσης αρχίζει συνήθως περίπου 1-3 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης και μπορεί να διαρκέσει από 2-12 εβδομάδες, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, τη σύνθεση του οίνου και τη ποσότητα του μηλικού οξέος που απαιτεί μετατροπή και λαμβάνει χώρα γενικά 2-3 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Ένα κρασί που έχει υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση έχει μια πιο απαλή και κρεμώδη υφή. Η μηλογαλακτική ζύμωση παράγει επίσης διακετύλιο, το οποίο έχει μια χαρακτηριστική γεύση βουτύρου. Συνήθως, το διακετύλιο εξαλείφεται αφήνοντας το κρασί να παραμείνει σε βαρέλι για αρκετές ημέρες πριν από την προσθήκη διοξειδίου του θείου ως αντιμικροβιακό παράγοντα (Buja, 2022; Caboni & Cabras, 2010; James et al., 2023).

Ο οينوποιός πρέπει να παρακολουθεί προσεκτικά τη θερμοκρασία και άλλες περιβαλλοντικές παραμέτρους κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης, ώστε να

διασφαλίσει ότι η ζύμωση εξελίσσεται σύμφωνα με τον προγραμματισμό. Για παράδειγμα, εάν η θερμοκρασία είναι πολύ υψηλή, η ζύμη μπορεί να γίνει υπερβολικά ενεργή και να παράγει αλλοιωμένα αρώματα στο κρασί (Buja, 2022).

Πίεση

Το γλεύκος οδηγείται στο πιεστήριο με σκοπό να διαχωριστεί το υγρό από τα στερεά (όπως οι φλούδες και τα κουκούτσια) που έχουν απομείνει από τη διαδικασία της ζύμωσης στην περίπτωση της ερυθρής οινοποίησης. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται πριν τη ζύμωση στην περίπτωση της λευκής οινοποίησης (Gil-Serna et al., 2018).

Παλαίωση/ωρίμανση

Ορισμένα κρασιά παλαιώνονται σε βαρέλια, δεξαμενές ή φιάλες για να ωριμάσουν και να αναπτύξουν τη γεύση και το άρωμά τους. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαρκέσει από μερικούς μήνες έως αρκετά χρόνια, ανάλογα με τον τύπο του παραγόμενου κρασιού (Καραδημήτρη, 2015).

Διαύγαση και σταθεροποίηση

Με τη διαύγαση διασφαλίζεται η παραγωγή ενός καθαρού και σταθερού προϊόντος καθώς απομακρύνονται τυχόν εναπομείναντα στερεά ή ακαθαρσίες. Για να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, όπως η διήθηση, η φυγοκέντρηση και ο εξευγενισμός. Η διήθηση περιλαμβάνει τη διέλευση του κρασιού μέσω ενός μέσου φιλτραρίσματος για την εξαγωγή τυχόν σωματιδίων ή προσμίξεων (π.χ. κύτταρα ζύμης και βακτηριακά κύτταρα). Η φυγοκέντρηση αξιοποιεί τη φυγόκεντρο δύναμη για τον διαχωρισμό των στερεών από το υγρό. Ο εξευγενισμός περιλαμβάνει την προσθήκη εξευγενιστικών παραγόντων (με κύρια χρήση του βεντονίτη κ.α.) στο κρασί, οι οποίοι προκαλούν τη συσσωμάτωση των σωματιδίων και την καθίζηση τους στον πυθμένα του δοχείου, επιτρέποντας την εύκολη απομάκρυνσή τους (Gil-Serna et al., 2018; La Placa et al., 2023; Καραδημήτρη, 2015; Χρυσίνας, 2013).

Η σταθεροποίηση είναι η διαδικασία αποτροπής οποιασδήποτε πρόσθετης αλλαγής στη γεύση, το χρώμα ή το άρωμα του κρασιού. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με την τροποποίηση του pH ή με την ενσωμάτωση σταθεροποιητικών ουσιών, όπως το διοξείδιο του θείου ή το σορβικό κάλιο. Το σορβικό κάλιο χρησιμοποιείται για να

εμποδίζει την ανάπτυξη ζυμομυκήτων (Χρυσίνας, 2013). Το διοξείδιο του θείου (SO_2) είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο χημικό πρόσθετο στην βιομηχανία κρασιού. Εκτιμάται ιδιαίτερα από τους οινοπαραγωγούς λόγω της προσιτής τιμής του και της ικανότητάς του να δρα ως αντιοξειδωτικός και αντιμικροβιακός παράγοντας κατά ενός ευρέος φάσματος μικροοργανισμών. Κατά συνέπεια, η παρουσία του τόσο κατά τη ζύμωση όσο και κατά την αποθήκευση των κρασιών είναι επιθυμητή για την πρόληψη αλλοιώσεων. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι υπερβολικές ποσότητες SO_2 μπορούν να προκαλέσουν κινδύνους για την υγεία των ευαίσθητων ατόμων, γεγονός που ώθησε τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) να ενθαρρύνει τη διερεύνηση εναλλακτικών μεθόδων που μπορούν να μειώσουν ή να εξαλείψουν τη χρήση του στην παραγωγή οίνου. Κατά συνέπεια, έχουν διερευνηθεί διάφορες εναλλακτικές τεχνολογίες για τον έλεγχο των μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των υπερήχων, της υπεριώδους ακτινοβολίας, των παλλόμενων ηλεκτρικών πεδίων, του ηλεκτρολυμένου νερού, των επεξεργασιών με υψηλή υδροστατική πίεση και της προσθήκης ουσιών όπως η λυσοζύμη, το σορβικό οξύ, ο δικαρβονικός διμεθυλεστέρας και η χιτοζάνη. Παρά τις προσπάθειες αυτές, δεν έχει βρεθεί ακόμη ένα οριστικό υποκατάστατο του SO_2 , ιδίως για τους οίνους που υποβάλλονται σε μακροχρόνια αποθήκευση (Gianvito et al., 2022).

Εμφιάλωση

Τέλος, το κρασί εμφιαλώνεται, φελλώνεται και επισημαίνεται, έτοιμο για διανομή και κατανάλωση (Grainger, 2013; La Placa et al., 2023).

Συνολικά, η διαδικασία οινοποίησης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί πολλές δεξιότητες, γνώσεις και υπομονή.

Αξιοποίηση στέμφυλων

Τα στέμφυλα (δηλαδή φλούδες, κουκούτσια, κοτσάνια) που απομένουν από την οινοποίηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή τσίπουρου, που αναλύεται στο 1.2.5.

1.2. Είδη οινοποίησης

Το κρασί είναι ένα ποτό που ποικίλλει πολύ και μπορεί να κατηγοριοποιηθεί με βάση διαφορετικά χαρακτηριστικά. Αυτά περιλαμβάνουν το χρώμα τους, όπως κόκκινο, λευκό ή ροζέ, την περιεκτικότητα σε αλκοόλ, η οποία συνήθως κυμαίνεται

από 9 έως 15 % για τα επιτραπέζια κρασιά, το επίπεδο γλυκύτητας, την ηλικία τους (αν είναι νεαρά ή παλαιωμένα) και αν είναι ήσυχα ή αφρώδη. Επιπλέον, σε ορισμένα κρασιά έχει προστεθεί αλκοόλη κατά τη διαδικασία οινοποίησης, όπως συμβαίνει με τα επιδόρπια κρασιά, όπως το πόρτο και το σέρι (Bujá, 2022).

Τα πιο βασικά είδη οινοποίησης αναλύονται παρακάτω.

1.2.1. Ερυθρή οινοποίηση

Κατά την ερυθρή οινοποίηση, η διαδικασία ξεκινά με την αποβοστρύχωση και τη σύνθλιψη των σταφυλιών, όπου απελευθερώνεται ο χυμός και αποκαλύπτονται οι φλούδες και τα κουκούτσια. Αυτό το βήμα επιτρέπει την εκτεταμένη επαφή μεταξύ των στερεών μερών των σταφυλιών και του γλεύκους που ζυμώνεται, το οποίο περιλαμβάνει το χυμό, τις φλούδες και τα κουκούτσια. Η επαφή αυτή διευκολύνει την εκχύλιση των χρωστικών ουσιών, των τανινών και των διαφόρων γευστικών ενώσεων που υπάρχουν στις φλούδες (Boulton et al., 2013; OIV).

Η ζύμωση των ερυθρών οίνων πραγματοποιείται με τις φλούδες των σταφυλιών να βρίσκονται ακόμη στο γλεύκος. Αυτό επιτρέπει την εκχύλιση των χρωστικών ουσιών (ανθοκυανίνες) από τις φλούδες των σταφυλιών, με αποτέλεσμα τις χαρακτηριστικές βαθύτερες αποχρώσεις των ερυθρών οίνων. Επιπλέον, οι τανίνες από τις φλούδες και τα κουκούτσια συμβάλλουν στη δομή του κρασιού, στην αίσθηση που αφήνει στο στόμα και τη δυνατότητα παλαίωσης. Άλλες γευστικές ενώσεις, όπως οι φαινόλες και οι αρωματικές ενώσεις, εξάγονται επίσης κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, προσθέτοντας πολυπλοκότητα και βάθος στον τελικό οίνο (Boulton et al., 2013; Χρυσίνας, 2013).

Η εκχύλιση, η οποία αναφέρεται στην παρατεταμένη επαφή μεταξύ των φλοιών των σταφυλιών και του μούστου, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην οινοποίηση των ερυθρών οίνων. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την περαιτέρω εκχύλιση του χρώματος, των τανινών και των αρωματικών ενώσεων από τα στέμφυλα. Οι οινοποιοί διαχειρίζονται προσεκτικά τη διάρκεια της εκχύλισης με βάση το επιθυμητό στυλ και τα χαρακτηριστικά που επιδιώκουν να επιτύχουν στο κρασί. Ο χρόνος μπορεί να ποικίλλει και να κυμαίνεται από λίγες ημέρες έως αρκετές εβδομάδες (Boulton et al., 2013; Χρυσίνας, 2013).

Μετά τη ζύμωση και την εκχύλιση, οι ερυθροί οίνοι υποβάλλονται συχνά σε παλαίωση, η οποία μπορεί να λάβει χώρα σε δρύινα βαρέλια, σε δεξαμενές από

ανοξειδωτο χάλυβα ή σε συνδυασμό και των δύο. Η παλαίωση στη δρυ, ειδικότερα, μπορεί να προσδώσει πρόσθετες γεύσεις, αρώματα και στοιχεία υφής στο κρασί. Ο τύπος της δρυός, η ηλικία των βαρελιών και η διάρκεια της παλαίωσης επηρεάζουν το προφίλ του τελικού κρασιού. Αυτή η περίοδος παλαίωσης επιτρέπει στο κρασί να ενσωματώσει τις γεύσεις, να μαλακώσει τις τανίνες και να αναπτύξει περαιτέρω πολυπλοκότητα και βάθος (Boulton et al., 2013; Χρυσίνας, 2013).

Η επιλογή των δρύινων βαρελιών έναντι των δεξαμενών από ανοξειδωτο χάλυβα, καθώς και η διάρκεια της παλαίωσης, εξαρτάται από το όραμα του οينوποιού για το κρασί και το επιθυμητό στυλ. Κάθε απόφαση που λαμβάνεται κατά τη διαδικασία οиноποίησης των ερυθρών οίνων συμβάλλει στα τελικά χαρακτηριστικά του κρασιού, συμπεριλαμβανομένου του χρώματος, της δομής, των επιπέδων τανίνης και των δυνατοτήτων παλαίωσης (Boulton et al., 2013; Χρυσίνας, 2013).

1.2.2. Λευκή οиноποίηση

Κατά την λευκή οиноποίηση, η διαδικασία ξεκινά με τον εκραγισμό για να διαχωριστεί ο χυμός από τις φλούδες και τα κουκούτσια. Αυτό το απαλό πάτημα ελαχιστοποιεί την επαφή με τις φλούδες των σταφυλιών, με αποτέλεσμα έναν χυμό με πιο ανοιχτό χρώμα. Με τον αποκλεισμό των φλοιών, οι λευκοί οίνοι αποκτούν το χαρακτηριστικό ανοιχτό κίτρινο έως αχρύνιο χρώμα τους (Boulton et al., 2013).

Η ζύμωση για τους λευκούς οίνους γίνεται συνήθως χωρίς τις φλούδες των σταφυλιών. Ο χυμός μεταφέρεται σε δοχεία ζύμωσης, όπως ανοξειδωτες δεξαμενές ή μερικές φορές δρύινα βαρέλια, όπου προστίθενται οι ζύμες για να ξεκινήσει η ζύμωση. Χωρίς την παρουσία των φλοιών σταφυλιών, οι λευκοί οίνοι παρουσιάζουν ελάχιστη εκχύλιση χρώματος, χαμηλότερα επίπεδα τανίνης και ελαφρύτερο σώμα σε σύγκριση με τους ερυθρούς οίνους. Αυτό επιτρέπει την έκφραση των εγγενών γεύσεων και αρωμάτων του σταφυλιού με πιο καθαρό και λεπτό τρόπο (Boulton et al., 2013; Χρυσίνας, 2013).

Σε αντίθεση με τους ερυθρούς οίνους, οι λευκοί οίνοι υποβάλλονται γενικά σε ελάχιστη ή καθόλου εκχύλιση. Η εκχύλιση περιλαμβάνει εκτεταμένη επαφή μεταξύ των φλοιών των σταφυλιών και του χυμού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αλλά για τα λευκά κρασιά, η διαδικασία αυτή ελαχιστοποιείται σκόπιμα για να αποφευχθεί η εξαγωγή χρώματος και τανίνης από τους φλοιούς. Αυτό συμβάλλει στη διατήρηση

του φρέσκου, ζωηρού και τραγανού χαρακτήρα των λευκών κρασιών (Boulton et al., 2013; Χρυσίνας, 2013).

Οι πρακτικές παλαίωσης για τα λευκά κρασιά ποικίλλουν. Ορισμένοι λευκοί οίνοι παλαιώνονται σε δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα, οι οποίες διατηρούν τα έντονα αρώματα φρούτων του κρασιού και διατηρούν τη φυσική τους οξύτητα. Άλλα μπορεί να ωριμάζουν σε δρύινα βαρέλια, αν και συνήθως για μικρότερη διάρκεια σε σύγκριση με τα κόκκινα κρασιά. Η παλαίωση στη δρυ μπορεί να συνεισφέρει λεπτές γεύσεις, όπως βανίλια, μπαχαρικά ή κρεμώδεις νότες, καθώς και να προσθέσει υφή και πολυπλοκότητα στο κρασί. Η επιλογή της παλαίωσης δρυός εξαρτάται από το επιθυμητό στυλ του κρασιού και την προτίμηση του οίνοποιου (Boulton et al., 2013; Χρυσίνας, 2013).

1.2.3. Ροζέ οινοποίηση

Κατά την οινοποίηση των ροζέ κρασιών, υπάρχουν διαφορετικές προσεγγίσεις για την επίτευξη των επιθυμητών χαρακτηριστικών. Μια κοινή μέθοδος είναι η περιορισμένη εκχύλιση, όπου οι φλούδες των σταφυλιών έρχονται σε σύντομη επαφή με τον χυμό για μικρό χρονικό διάστημα, που συνήθως κυμαίνεται από λίγες ώρες έως λίγες ημέρες. Αυτή η περιορισμένη επαφή των φλοιών προσδίδει ένα διακριτικό χρώμα και μια απαλή γεύση στο κρασί. Μια άλλη τεχνική είναι η μέθοδος αφαίμαξης-saignée, η οποία περιλαμβάνει την αφαίμαξη ενός μέρους του χυμού από τη ζύμωση του κόκκινου κρασιού νωρίς στη διαδικασία. Αυτός ο αφαιμαγμένος χυμός μετατρέπεται στη συνέχεια σε ροζέ οίνο, με το χρώμα και τη δομή να προκύπτουν από την περιορισμένη επαφή με το φλοιό. Οι ροζέ οίνοι της μεθόδου Saignée είναι συνήθως πιο περίπλοκοι και πληρέστεροι από άλλα στυλ. Αυτός ο χυμός χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την παραγωγή ροζέ οίνου ξεχωριστά (Boulton et al., 2013; Χρυσίνας, 2013).

Η ζύμωση για τους ροζέ οίνους ακολουθεί παρόμοια διαδικασία με τους λευκούς οίνους, όπου ο χυμός ζυμώνεται χωρίς παρατεταμένη επαφή με τις φλούδες των σταφυλιών. Αυτή η προσέγγιση έχει ως αποτέλεσμα ροζέ κρασιά με πιο ανοιχτό χρώμα, χαμηλότερες τανίνες και μέτριο σώμα. Με την αποφυγή της παρατεταμένης επαφής με τους φλοιούς, τα ροζέ κρασιά παρουσιάζουν λιγότερη εκχύλιση φαινολικών ενώσεων και έχουν πιο ντελικάτο και δροσιστικό χαρακτήρα (Boulton et al., 2013).

Όσον αφορά την εκχύλιση, η περίοδος για τους ροζέ οίνους είναι συνήθως μικρότερη σε σύγκριση με τους ερυθρούς οίνους. Τα ερυθρά κρασιά υποβάλλονται σε παρατεταμένη περίοδο εκχύλισης για την εξαγωγή βαθύτερου χρώματος και ισχυρών αρωμάτων από τους φλοιούς των σταφυλιών. Αντίθετα, οι ροζέ οίνοι έχουν μικρότερο χρόνο εκχύλισης, γεγονός που συμβάλλει στο ανοιχτότερο χρώμα τους, που κυμαίνεται από απαλό ροζ έως ζωνηρό σομόν, και στα πιο διακριτικά γευστικά προφίλ τους (Boulton et al., 2013).

Οι πρακτικές παλαίωσης των ροζέ κρασιών ποικίλλουν, αλλά γενικά δεν παλαιώνονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Οι περισσότεροι ροζέ οίνοι προορίζονται να απολαμβάνονται νέοι και κυκλοφορούν σχετικά σύντομα μετά την παραγωγή. Αυτή η προσέγγιση συμβάλλει στη διατήρηση των φρέσκων και φρουτώδων χαρακτηριστικών τους, διασφαλίζοντας ότι το κρασί αναδεικνύει τη έντονη οξύτητα, τα ζωνηρά αρώματα και τις χαρακτηριστικές γεύσεις φρούτων (Boulton et al., 2013).

1.2.4. Παρασκευή τσίπουρου

Η πρώτη ύλη για την παραγωγή τσίπουρου είναι τα στέμφυλα, δηλαδή η μάζα που απομένει μετά την συμπίεση του σταφυλοπολτού κατά την παραγωγή κρασιού. Αυτή η μάζα αποτελείται από τους φλοιούς των σταφυλιών, τα γίγαρτα (κουκούτσια) ενώ περικλείει και κάποιο ποσοστό αζύμωτου γλεύκους, γλεύκους σε ζύμωση ή και πλήρους ζυμωμένου γλεύκους (κρασιού). Γενικά, τα γίγαρτα αποτελούν το 3-6%, η φλούδα το 6-9% και η σάρκα το 75-85% αυτής της μάζας. Για να παραχθεί αλκοολούχο απόσταγμα από τα στέμφυλα, θα πρέπει αφενός να μην έχουν αποστραγγιστεί εντελώς και αφετέρου να έχουν υποστεί αλκοολική ζύμωση, ώστε τα σάκχαρα του εναπομένου μούστου να μετατραπούν σε αλκοόλη (Γρηγορίου, 2011; Οικονομάκος, 2011).

Το τσίπουρο μπορεί να παραχθεί από ερυθρά σταφύλια τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ροζέ/λευκού κρασιού με απευθείας συμπίεση. Ακόμα χρησιμοποιούνται στέμφυλα που είμαι ζυμωμένα και προέρχονται από ερυθρή οينوποίηση με μικρότερη ή μεγαλύτερη ποσότητα κρασιού. Συνήθως όμως χρησιμοποιούνται στέμφυλα αζύμωτα προερχόμενα από σταφύλια λευκών ποικιλιών. Επίσης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ολόκληρα τα σταφύλια, οπότε σε αυτήν την περίπτωση η απόδοση είναι μεγαλύτερη (Γρηγορίου, 2011; Οικονομάκος, 2011).

Πρώτο στάδιο για την παραγωγή αποστάγματος από λευκά αζύμωτα στέμφυλα είναι η ζύμωσή τους η οποία διαρκεί περίπου 30-40 μέρες όταν τα στέμφυλα ζυμώνονται μόνα τους, χρόνος ο οποίος μειώνεται όταν τα στέμφυλα ζυμώνονται μαζί με το γλεύκος. Η αλκοολική ζύμωση πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία μικρότερη από 25°C γιατί παράγονται περισσότερες αρωματικές ουσίες στο τσίπουρο και να ελέγχεται το τέλος της ώστε να έχουν ζυμωθεί όλα τα σάκχαρα. Σε περίπτωση που δεν έχει ολοκληρωθεί η ζύμωση πρέπει αναμένεται να τελειώσει πριν γίνει απόσταξη (Κόκκινου, 2016).

Η απόσταξη πραγματοποιείται σε χάλκινο άμβυκα απόσταξης (καζάνι). Αρχικά τοποθετούνται τα στέμφυλα τα οποία έχουν ζυμωθεί και ποσότητα νερού ανάλογα με την τέχνη του κάθε παραγωγού. Κατά την απόσταξη γίνεται διαχωρισμός του αποστάγματος από τα στέμφυλα μέσα στον άμβυκα του αποστακτήρα, στον οποίο βράζουν. Με την επίδραση της θερμότητας η αλκοόλη ατμοποιείται και στην συνέχεια οδηγείται στον ψύκτη του αποστακτήρα για να υγροποιηθεί ξανά και να παραχθεί το τσίπουρο (Παούρη, 2016; Κόκκινου, 2016).

Η διαδικασία της απόσταξης μπορεί να χωριστεί σε 3 στάδια:

Πρώτο στάδιο: Κεφαλή

Ονομάζεται η αρχική ποσότητα του αποστάγματος που βγαίνει από το ψυκτήρα στα πρώτα δέκα λεπτά της απόσταξης. Έχει τους υψηλότερους αλκοολικούς βαθμούς αλλά περιέχει και ανεπιθύμητες ουσίες όπως η ακεταλδεϋδη και διάφορα αρώματα που υποβαθμίζουν την ποιότητα. Το απόσταγμα αυτό συγκεντρώνεται χωριστά και επαναποστάζεται στην επόμενη καζανιά (Γρηγορίου, 2011; Κόκκινου, 2016).

Δεύτερο στάδιο: Καρδιά

Αποτελεί το μεσαίο τμήμα της απόσταξης και είναι το απόσταγμα που λαμβάνεται μετά το δέκατο λεπτό και μέχρι οι αλκοολικοί βαθμοί να πέσουν από τους 76°C στους 40°C. Αποτελεί το μεγαλύτερο χρονικά και ποσοτικά στάδιο της απόσταξης. Από το στάδιο αυτό καθορίζεται και η ποιότητα του αποστάγματος, καθώς περιέχει τα πολύτιμα πτητικά συστατικά του γλεύκους που χαρακτηρίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αποστάγματος. Σταδιακά, όσο προχωράει η διαδικασία, ελαττώνεται με αργό ρυθμό η περιεκτικότητα σε αλκοόλη οπότε γίνεται η μετάβαση στο τρίτο στάδιο (Γρηγορίου, 2011; Κόκκινου, 2016).

Τρίτο στάδιο : Ουρά

Αποτελεί το τελευταίο στάδιο κατά το οποίο η απόσταξη συνεχίζεται μέχρι οι αλκοολικοί βαθμοί να πέσουν από τους 40°C στους 30°C και όταν αυτό επιτευχθεί τότε η απόσταξη σταματάει. Αυτό το στάδιο περιέχει την επικίνδυνη μεθανόλη και έλαια με δυσάρεστες οσμές. Συνήθως ελέγχεται με γραδόμετρο και είτε απορρίπτεται είτε επαναποστάζεται στην επόμενη καζανιά (Γρηγορίου, 2011; Κόκκινου, 2016).

Μετά τη διαδικασία της πρώτης απόσταξης λαμβάνεται ένα απόσταγμα το οποίο αποτελεί το 15-20% του αρχικού όγκου. Μετά το τέλος της απόσταξης το υπόλειμμα απορρίπτεται και ο άμβυκας καθαρίζεται. Πολλές φορές το προϊόν της πρώτης απόσταξης αφού υποστεί αραίωση με νερό καταναλώνεται ως έχει. Συνήθως όμως ακολουθεί δεύτερη απόσταξη η οποία συμβάλλει στην ποιοτική βελτίωση του τσίπουρου. Επειδή στη δεύτερη απόσταξη η πρώτη ύλη είναι ένα καθαρό μίγμα οινοπνεύματος και νερού, τα τελικά αποτελέσματα είναι τσίπουρο υψηλότερων αλκοολικών βαθμών από αυτό της πρώτης απόσταξης. Η δεύτερη απόσταξη ενδείκνυται όταν το γλεύκος δεν είναι υψηλής ποιότητας, ενώ επιβάλλεται για την παραλαβή πολύ δυνατού αποστάγματος. Το διπλά αποσταγμένο τσίπουρο είναι καθαρότερο και λεπτότερο σε άρωμα και γεύση (Γρηγορίου, 2011; Οικονομάκος, 2011).

Ο σύγχρονος τρόπος παρασκευής τσίπουρου από βιομηχανικές μονάδες γίνεται με τη μέθοδο της κλασματικής απόσταξης -ασυνεχούς απόσταξης κυρίως-, όπου χρησιμοποιούνται υψηλής ποιότητας κατασκευής ατμοκάζανα, πλήρως ηλεκτρονικά ρυθμιζόμενα και ελεγχόμενα. Αυτό επιτρέπει την παρασκευή ενός πολλαπλά αποσταγμένου προϊόντος υψηλής ποιότητας, μειώνοντας τις ανεπιθύμητες ουσίες της απόσταξης στο ελάχιστο και επιτρέποντας στον παραγωγό να κάνει την επιθυμητή ανάμειξη μεταξύ κεφαλών, καρδιάς και ουρών (Παούρη, 2016).

1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την οινοποίηση

- **Ποικιλία σταφυλιών**

Η ποικιλία των σταφυλιών είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία οινοποίησης και τα χαρακτηριστικά του τελικού κρασιού. Οι διάφορες ποικιλίες σταφυλιών έχουν ξεχωριστά γευστικά προφίλ, που κυμαίνονται

από φρουτώδη και λουλουδάτα έως πικάντικα ή γήινα, τα οποία επηρεάζονται από τις φυσικές ενώσεις του σταφυλιού, συμπεριλαμβανομένων των αρωματικών και φαινολικών ενώσεων, όπως οι τανίνες. Επίσης, οι ποικιλίες σταφυλιών συνδέονται στενά με συγκεκριμένες οινοποιητικές περιοχές, αποτελώντας ουσιαστικό μέρος της ταυτότητας της περιοχής. Επιπλέον, οι ποικιλίες σταφυλιών διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητά τους σε σάκχαρα, επηρεάζοντας άμεσα το πιθανό επίπεδο αλκοόλης στο κρασί που προκύπτει. Η οξύτητα είναι μια άλλη κρίσιμη πτυχή που καθορίζεται από την ποικιλία σταφυλιού, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στη φρεσκάδα, την τραγανότητα και την ισορροπία του κρασιού. Τα σταφύλια με υψηλότερη οξύτητα συχνά δίνουν κρασιά με ζωνρό και ζωντανό χαρακτήρα. Επίσης, οι διαφορετικές αρωματικές ενώσεις που υπάρχουν στις ποικιλίες σταφυλιών συμβάλλουν στο άρωμα του κρασιού και ορισμένες ποικιλίες είναι γνωστές για τα έντονα και ξεχωριστά αρώματά τους (Mane et al., 2017; Grainger, 2013).

Διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών έχουν διαφορετικά επίπεδα προσαρμοστικότητας σε διαφορετικά κλίματα, ευδοκιμώντας σε ψυχρότερες ή θερμότερες περιοχές, επηρεάζοντας τα είδη των κρασιών που παράγονται σε κάθε περιοχή. Οι οινοποιοί μπορούν επίσης να αναμειγνύουν διαφορετικές ποικιλίες για να επιτύχουν ένα συγκεκριμένο γευστικό προφίλ. Η κατανόηση των μοναδικών χαρακτηριστικών της κάθε ποικιλίας σταφυλιών επιτρέπει στους οινοποιούς να λαμβάνουν τεκμηριωμένες αποφάσεις καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια ποικίλη και συναρπαστική σειρά κρασιών που μπορούν να απολαύσουν οι καταναλωτές (Mane et al., 2017; Grainger, 2013).

- **Ωριμότητα σταφυλιών**

Η ωριμότητα των σταφυλιών είναι ένας κρίσιμος παράγοντας που καθορίζει την ποιότητα και το στυλ του κρασιού που παράγεται. Αναφέρεται στο στάδιο ανάπτυξης στο οποίο συγκομίζονται τα σταφύλια και επηρεάζει διάφορες πτυχές της οινοποίησης και του παραγόμενου κρασιού. Καθώς τα σταφύλια ωριμάζουν, τα επίπεδα των σακχάρων τους αυξάνονται. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα είναι ζωτικής σημασίας, διότι καθορίζει το δυνητικό επίπεδο αλκοόλης στο κρασί μετά τη ζύμωση. Οι οινοποιοί παρακολουθούν τα επίπεδα σακχάρων για να αποφασίσουν την ιδανική περίοδο συγκομιδής για ένα συγκεκριμένο στυλ κρασιού. Επίσης, κατά την ωρίμανση

των σταφυλιών, τα επίπεδα των οξέων μειώνονται. Η ισορροπημένη οξύτητα είναι απαραίτητη για τη φρεσκάδα και τη δομή ενός κρασιού. Ο πολύ πρώιμος τρύγος μπορεί να οδηγήσει σε κρασιά με υψηλή οξύτητα και έλλειψη βάθους, ενώ ο πολύ αργός τρύγος μπορεί να δώσει κρασιά με χαμηλή οξύτητα και άτονη γεύση (Bisson et al., 2017; Grainger, 2013).

Οι φαινολικές ενώσεις, όπως οι τανίνες και οι χρωστικές ενώσεις, αλλάζουν επίσης κατά την ωρίμανση των σταφυλιών. Οι τανίνες γίνονται πιο μαλακές, συμβάλλοντας στην υφή και την δυνατότητα παλαίωσης του κρασιού. Επιπλέον, καθώς τα σταφύλια ωριμάζουν, το γευστικό τους προφίλ εξελίσσεται. Τα άγουρα σταφύλια μπορεί να έχουν γεύση πράσινη ή υπανάπτυκτη, ενώ τα ώριμα σταφύλια προσφέρουν πιο σύνθετες και έντονες γεύσεις. Η ανάπτυξη της γεύσης είναι απαραίτητη για την επίτευξη της επιθυμητής γεύσης και των αρωμάτων στο τελικό κρασί. Οι αρωματικές ενώσεις στα σταφύλια αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης, συμβάλλοντας στο αρωματικό προφίλ του κρασιού. Τα ώριμα σταφύλια παρουσιάζουν συχνά πιο εκφραστικά χαρακτηριστικά, ενισχύοντας τη συνολική ελκυστικότητα του κρασιού. Τέλος, η συγκομιδή των σταφυλιών στο κατάλληλο επίπεδο ωριμότητας εξασφαλίζει καλύτερη μικροβιακή σταθερότητα κατά τη ζύμωση. Τα υπερώριμα ή άγουρα σταφύλια μπορεί να οδηγήσουν σε μη ισορροπημένη ζύμωση ή σε αυξημένους κινδύνους αλλοίωσης. Η επιλογή της βέλτιστης ημερομηνίας συγκομιδής είναι μια κρίσιμη απόφαση για τους οινοποιούς. Πρέπει να εξισορροπήσουν το επιθυμητό στυλ κρασιού, τα επίπεδα σακχάρων, την οξύτητα, τις τανίνες και την ανάπτυξη της γεύσης για να επιτύχουν τα καλύτερα αποτελέσματα στο τελικό κρασί (Bisson et al., 2017; Grainger, 2013).

- **Κλίμα και terroir**

Το κλίμα και το terroir είναι δύο θεμελιώδεις παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την καλλιέργεια των σταφυλιών και την οινοποίηση, διαμορφώνοντας τα μοναδικά χαρακτηριστικά και την ποιότητα των κρασιών που παράγονται σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Οι κλιματολογικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, της βροχόπτωσης, των ωρών ηλιοφάνειας και των ανέμων, επηρεάζουν βαθιά την ανάπτυξη των αμπελιών και την ωρίμανση των σταφυλιών. Τα θερμά κλίματα οδηγούν σε ταχύτερη ωρίμανση με υψηλότερα επίπεδα σακχάρων και δυνητικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλ, με αποτέλεσμα να παράγονται

κρασιά με γεμάτο σώμα και φρουτώδη χαρακτήρα, ενώ τα ψυχρότερα κλίματα οδηγούν σε βραδύτερη ωρίμανση, υψηλότερη οξύτητα και λεπτές γεύσεις, παράγοντας τραγανά και δροσιστικά κρασιά. Τα μικροκλίματα εντός των περιοχών συμβάλλουν επίσης στην ποικιλομορφία των κρασιών (Bisson et al., 2017; Wang et al., 2015).

Το *terroir*, από την άλλη πλευρά, περιλαμβάνει τον συνδυασμό κλίματος, εδάφους, τοπογραφίας και ανθρώπινης επιρροής σε έναν συγκεκριμένο αμπελώνα ή οινοποιητική περιοχή, δημιουργώντας μια ξεχωριστή αίσθηση του τύπου στους παραγόμενους οίνους. Οι τύποι εδάφους, η τοπογραφία και η μικροβιακή ζωή του αμπελώνα αλληλοεπιδρούν με τα αμπέλια, επηρεάζοντας την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και τελικά επηρεάζοντας τις γεύσεις και την πολυπλοκότητα του κρασιού. Η ανθρώπινη επιρροή και οι πρακτικές οινοποίησης προσθέτουν στον μοναδικό χαρακτήρα του *terroir*, δημιουργώντας τοπικές ταυτότητες και ονομασίες που αναδεικνύουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των κρασιών από τη συγκεκριμένη περιοχή (Bisson et al., 2017; Wang et al., 2015).

- **Ζύμωση**

Η ζύμωση είναι άλλος ένας κρίσιμος παράγοντας στην οινοποίηση. Η επιλογή ζυμομυκήτων είναι απαραίτητη, επιλέγοντας συγκεκριμένα στελέχη για τη ζύμωση, είτε αυτόχθονα είτε εμπορικά, καθένα από τα οποία συνεισφέρει μοναδικά χαρακτηριστικά στο κρασί. Η άγρια ζύμωση επιτρέπει στις αυτόχθονες ζύμες να ξεκινήσουν τη διαδικασία, δημιουργώντας κρασιά με ξεχωριστά τοπικά χαρακτηριστικά. Η αλκοολική ζύμωση, η πρωταρχική διαδικασία, περιλαμβάνει τις ζύμες που καταναλώνουν τα σάκχαρα του χυμού σταφυλιών, μετατρέποντάς τα σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα και παράγοντας διάφορες ενώσεις γεύσης και αρώματος. Η θερμοκρασία επηρεάζει την ταχύτητα που οι μικροοργανισμοί του κρασιού, κυρίως η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αλκοόλ και διοξείδιο του άνθρακα. Υψηλότερες θερμοκρασίες συνήθως οδηγούν σε πιο γρήγορη ζύμωση, ενώ χαμηλότερες θερμοκρασίες επιβραδύνουν τη διαδικασία. Η θερμοκρασία επηρεάζει επίσης την παραγωγή και την απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Υψηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να οδηγήσουν σε περισσότερες ενώσεις με φρουτώδη και λουλουδάτα χαρακτηριστικά, ενώ χαμηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να διατηρήσουν πιο διακριτικά αρώματα. Οι

χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης είναι θερμοεξαρτώμενες. Οπότε ορισμένες αντιδράσεις μπορεί να επιταχύνονται ή να επιβραδύνονται ανάλογα με τη θερμοκρασία. Ωστόσο, η υψηλή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μπορεί να οδηγήσει σε μη επιθυμητές αντιδράσεις και παραπροϊόντα, που μπορεί να επηρεάσουν τη σταθερότητα του κρασιού με την πάροδο του χρόνου (Bisson et al., 2017; Grainger, 2013).

Το οξυγόνο έχει επίσης διάφορες επιδράσεις στην ζύμωση και στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Κατά την αρχική φάση της ζύμωσης, οι μικροοργανισμοί απαιτούν οξυγόνο για την αναπαραγωγή και την εξέλιξή τους. Η παρουσία οξυγόνου στην αρχή μπορεί να επιταχύνει την αρχική ανάπτυξη των ζυμών. Ωστόσο, το οξυγόνο μπορεί να προκαλέσει οξείδωση των αρωματικών ενώσεων του κρασιού, με αποτέλεσμα τη μείωση της ποιότητας του. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια φρεσκάδας, αρωμάτων και χρωμάτων. Συνολικά, ο ρόλος του οξυγόνου στην ζύμωση εξαρτάται από τις συνθήκες και τους στόχους του οινοποιού. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η παρουσία του οξυγόνου μπορεί να είναι επιθυμητή για την καλύτερη ανάπτυξη των ζυμών, ενώ σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα και τη σταθερότητα του κρασιού (Bisson et al., 2017; Grainger, 2013).

Επιπρόσθετα, οι χημικές προσθήκες στην οινοποίηση μπορούν να έχουν διάφορες επιπτώσεις στο κρασί, επηρεάζοντας τα χαρακτηριστικά, την ποιότητα και την ασφάλεια του. Οι επιπτώσεις αυτές εξαρτώνται από τον τύπο της χημικής προσθήκης και τον σκοπό για τον οποίο χρησιμοποιείται. Οι χημικές προσθήκες όπως το διοξείδιο του θείου (SO_2) μπορούν να προστατεύσουν το κρασί από την οξείδωση, την αλλοίωση και να βοηθήσουν στον έλεγχο της μικροβιακής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της ωρίμανσης. Αυτό βοηθά στη διατήρηση της φρεσκάδας, των αρωμάτων και των χρωμάτων του κρασιού. Επιπλέον, οι χημικές προσθήκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη ρύθμιση της οξύτητας του κρασιού, επηρεάζοντας την ισορροπία των οξέων και το pH. Αυτό μπορεί να επηρεάσει τη γεύση, τη δομή και την αίσθηση του κρασιού στο στόμα. Ορισμένες χημικές προσθήκες μπορούν να βοηθήσουν στην ενίσχυση των αρωμάτων και των χρωμάτων του κρασιού. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω της προσθήκης ενζύμων ή άλλων ουσιών που ενισχύουν τα αρωματικά στοιχεία. Είναι σημαντικό η χρήση χημικών προσθέτων να γίνεται με φροντίδα και σε συμμόρφωση με τους κανονισμούς, προκειμένου να

διατηρηθεί η ισορροπία μεταξύ της χημείας και της φυσικότητας του κρασιού (Bisson et al., 2017; Grainger, 2013).

Ορισμένοι οίνοι υποβάλλονται σε μηλογαλακτική ζύμωση, μειώνοντας την οξύτητα και ενισχύοντας την πολυπλοκότητα. Η παλαίωση σε οινολάσπη προσθέτει υφή και πολυπλοκότητα, ενώ η ανθρακική εκχύλιση παράγει ζωνρή φρουτώδη γεύση και χαμηλές τανίνες. Τα δοχεία ζύμωσης, όπως οι δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα ή τα δρύινα βαρέλια, επηρεάζουν την τελική γεύση και υφή του κρασιού. Συνολικά, η ζύμωση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που επηρεάζει σημαντικά τη γεύση, το άρωμα και τη δομή ενός κρασιού, ενώ οι αποφάσεις του οινοποιού παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάδειξη των δυνατοτήτων του σταφυλιού και των μοναδικών χαρακτηριστικών του αμπελώνα (Bisson et al., 2017; Englezos et al., 2022).

1.4. Αυτόχθονα είδη ζυμωτικών μικροοργανισμών στην οινοποίηση

Η πρωταρχική φυσική πηγή των αυτόχθονων ζυμομυκήτων του κρασιού είναι τα τσαμπιά των σταφυλιών. Οι ζύμες κατανέμονται στα τσαμπιά των σταφυλιών καθώς και στις μεμονωμένες ρώγες σταφυλιών. Η βιβλιογραφία έχει καταγράψει συνολικά 93 διαφορετικά είδη ζυμομυκήτων, τα οποία ανήκουν σε 30 διαφορετικά γένη, απομονωμένα από 49 ποικιλίες σταφυλιών που καλλιεργούνται σε 22 χώρες. Χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση πηκτής με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE), σε συνδυασμό με τη δοκιμή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR), οι ερευνητές εντόπισαν 47 είδη ζυμομυκήτων από 22 γένη. Αυτά τα γένη περιλαμβάνουν τα εξής: *Aureobasidium*, *Auriculibuller*, *Brettanomyces*, *Bulleromyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Torulaspora*, *Yarrowia*, *Zygoascus* και *Zygosaccharomyces*. Αυτά τα είδη ζυμομυκήτων ελήφθησαν από την εξωτερική επιφάνεια των ρωγών σταφυλιών από έξι διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών (Liu et al., 2017; Renouf et al., 2005).

Ενώ μια σημαντική ποικιλία ειδών ζυμομυκήτων μπορεί να εντοπιστεί στις ρώγες των σταφυλιών, οι πληθυσμιακές πυκνότητές τους είναι γενικά χαμηλές. Συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί ζυμομυκήτων στα άγουρα σταφύλια είναι αρχικά

χαμηλοί (10^1 - 10^3 CFU/g), αλλά τείνουν να αυξάνονται (10^3 - 10^6 CFU/g) καθώς τα σταφύλια πλησιάζουν στην εποχή του τρύγου. Οι αλλαγές στον πληθυσμό των ζυμομυκήτων μπορούν να επηρεαστούν από δύο παράγοντες: την αυξημένη επιφάνεια κάθε ρώγας και τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Καθώς τα σταφύλια ωριμάζουν, γίνονται μεγαλύτερα, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερη επιφάνεια όπου μπορούν να βρεθούν θρεπτικά συστατικά. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η συγκέντρωση σακχάρων στα σταφύλια αυξάνεται, ενώ η οξύτητα μειώνεται, παρέχοντας ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων (Liu et al., 2017).

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα την ισορροπία των ειδών ζύμης επηρεάζοντας την ακεραιότητα των φλοιών των σταφυλιών. Πολυάριθμες μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ της ποικιλότητας των ζυμομυκήτων και των κλιματικών ή μικροκλιματικών συνθηκών, αλλά τα ευρήματα ήταν αντιφατικά. Ορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει υψηλότερο αριθμό ζυμομυκήτων σε εσοδείες με υψηλές βροχοπτώσεις, πιθανότατα λόγω αυξημένου πολλαπλασιασμού των μυκήτων. Ωστόσο, άλλες μελέτες, ιδίως εκείνες που διεξήχθησαν σε μεγαλύτερη κλίμακα, δεν διαπίστωσαν καμία σημαντική σχέση μεταξύ των κλιματικών συνθηκών και της βιοποικιλότητας των ζυμομυκήτων. Παράγοντες που σχετίζονται με τον αμπελώνα, όπως η ποικιλία και το χρώμα των σταφυλιών, αναφέρονται συχνά ως παράγοντες επιρροής. Για παράδειγμα, σε παρόμοιες εδαφικές και κλιματικές συνθήκες, το γένος *Cryptococcus* ήταν το πιο συχνά απομονωμένο γένος (αποτελώντας το 90% όλων των απομονώσεων) από σταφύλια Grenache, ενώ το γένος *Hanseniaspora* ήταν το πιο συχνά απομονωμένο γένος από σταφύλια Carignan (αποτελώντας το 75% των απομονώσεων) (Combina et al., 2005).

Η συμβατική ζύμωση του γλεύκους καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης περιλαμβάνει την προοδευτική ανάπτυξη ειδών ζύμης που προέρχονται από τα σταφύλια και τον εξοπλισμό του οινοποιείου. Αυτές οι ζύμες μεταβολίζουν τα στοιχεία του χυμού σταφυλιών, επηρεάζοντας τα γευστικά χαρακτηριστικά του κρασιού. Ωστόσο, η χρήση εμπορικών καλλιιεργειών εκκίνησης έχει γίνει συνήθης πρακτική σε όλο τον κόσμο, προκειμένου να βελτιωθούν οι διαδικασίες ζύμωσης και η ποιότητα των κρασιών. Οι οίνοι που ζυμώνονται εξ ολοκλήρου με εμπορικά στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*, από την άλλη πλευρά, μπορεί να στερούνται των

διαφορετικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που συνδέονται με συγκεκριμένες περιοχές. Η χρήση αυτόχθονων ζυμών ως εκκινητών καλλιέργειας είναι κρίσιμη για τη διατήρηση των μοναδικών χαρακτηριστικών και των γεωγραφικών αρωμάτων των οίνων. Όλες οι ζύμες είναι δυνητικά ικανές να μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και άλλα μεταβολικά προϊόντα, τα οποία συμβάλλουν στο γευστικό προφίλ του οίνου. Η έννοια του «μικροβιακού *terroir*» αναδεικνύεται σε βασικό στοιχείο της σύγχρονης οινοποίησης, αναφερόμενη στον μικροβιακό χαρακτήρα του οίνου που καθορίζει την προέλευση ενός συγκεκριμένου οίνου, ο οποίος περιλαμβάνει τις αυτόχθονες ζύμες καθώς και τα γαλακτικά και οξικά βακτήρια. Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι η διατήρηση των αυτόχθονων μικροοργανισμών που συνδέονται με ένα συγκεκριμένο «*terroir*» αποτελεί σημαντική πτυχή της αυθεντικότητας της οινοποίησης και της παραγωγής οίνων με συνεκτικό γευστικό προφίλ (Lappa, 2020; Mendoza, 2019).

Όσον αφορά τα βακτήρια, εξετάστηκε η παρουσία αυτόχθονων βακτηριακών ειδών στις ρώγες των σταφυλιών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Μεταξύ των ταυτοποιημένων ειδών, οι δύο κύριες ομάδες είναι τα *Firmicutes* και τα *Proteobacteria*. Η ομάδα *Firmicutes* περιλαμβάνει τα θετικά κατά Gram *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus* και *Pediococcus*), *Leuconostocaceae* (*Leuconostoc*, *Weiseilla* και *Oenococcus*), *Bacillaceae* (*Bacillus*) και *Enterococcaceae* (*Enterococcus faecium*, *E. durans*, *E. avium* και *E. hermaniensis*). Τα *Pediococcus damnosus*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus* και *P. acidilactici* απαντώνται συχνά στα σταφύλια και σε γλεύκος, ενώ τα αρνητικά κατά Gram *Proteobacteria*, όπως τα β-*Proteobacteria* και τα γ-*Proteobacteria*, είναι λιγότερο συχνά. Από την άλλη πλευρά, τα α-*Proteobacteria* (*Acetobacter* spp., *Gluconobacter oxydans*, *Gl. cerinus*, *Gl. hansenii*, *Gl. saccharivorans*, *Gl. Intermedius* και *Asaia krungthepensis*) ανιχνεύονται συχνά και είναι γνωστά ως οξικά βακτήρια (Barata et al., 2012).

Μελέτες έχουν δείξει αλλαγές στις βακτηριακές κοινότητες κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των σταφυλιών, με τους θετικούς κατά Gram βακτηριακούς πληθυσμούς να αυξάνονται όσο προχωρά η εποχή της ωρίμανσης και τους αρνητικούς κατά Gram να μειώνονται. Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως οι καλλιεργητικές πρακτικές και οι συγκεντρώσεις χαλκού, μπορούν να επηρεάσουν τη δομή των βακτηριακών κοινοτήτων. Τα γαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus* spp. και *Pediococcus* spp.) ανιχνεύονται συχνά σε υγιή σταφύλια με μέγιστους πληθυσμούς

γύρω στα 10^2 CFU/g ενώ και τα σταφύλια που είναι προσβεβλημένα από τον μύκητα *Botrytis cinerea* μπορούν να λειτουργήσουν ως πηγές ανάπτυξης για τα γαλακτικά βακτήρια. Οι εξωπολυσακχαρίτες που παράγονται από ορισμένα βακτηριακά είδη (π.χ. γαλακτικά βακτήρια, *P. parvulus* L. *sanfranciscensis*, *Leuconostoc mesenteroides* και *Burkholderia vietnamiensis*) μπορούν να σχηματίσουν βιοϋμένια που προστατεύουν τα βακτηριακά κύτταρα και επιτρέπουν στα αναερόβια βακτήρια να επιβιώσουν στην επιφάνεια των σταφυλίων. Η εφαρμογή αντιμυκητιακών θεραπειών σε αμπελώνες, με χρήση προϊόντων με βάση το θείο και τον χαλκό, μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό βιοϋμενίων (Liu et al., 2017; Barata et al., 2012).

Τα οξικά βακτήρια και συνήθως το *Gluconobacter spp.* ανιχνεύονται συχνά σε υγιή σταφύλια, ενώ οι πληθυσμοί τους αυξάνονται σε περίπου 10^6 CFU/g σε κατεστραμμένα ή σάπια σταφύλια. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της οиноποίησης, οι πληθυσμοί οξικών βακτηρίων μειώνονται λόγω της αλκοολικής ζύμωσης. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια μειώνονται επίσης κατά την αλκοολική ζύμωση, πιθανώς λόγω της ευαισθησίας τους στην οξύτητα. Συνολικά, η παρουσία και η συμπεριφορά αυτών των αυτόχθονων μικροοργανισμών έχει επιπτώσεις στην ποιότητα των σταφυλίων και του κρασιού και οι αλληλεπιδράσεις τους με το περιβάλλον και τις πρακτικές οиноποίησης συνεχίζουν να αποτελούν αντικείμενο έρευνας (Liu et al., 2017; Ultee et al., 2013).

Άλλοι μικροβιακοί πληθυσμοί που μπορεί να βρίσκονται στα σταφύλια περιλαμβάνουν διάφορους μικροοργανισμούς που είναι γνωστό ότι προκαλούν αλλοίωση. Αυτοί οι μικροοργανισμοί αποτελούνται από νηματοειδείς μύκητες που ανήκουν στα γένη *Aspergillus* και *Penicillium*, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τις υγιεινές πτυχές και την οργανοληπτική ποιότητα του οίνου. Μπορεί να παράγουν μυκοτοξίνες όπως οι αφλατοξίνες και η ωχρατοξίνη Α ή να παράγουν ανεπιθύμητα αρώματα όπως η γεωσμίνη, η IPMP και η 2-MIB. Επιπλέον, άλλοι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στα σταφύλια μπορεί να είναι υπεύθυνοι για ασθένειες όπως τον περονόσπορο (*Plasmopara viticola*), το ωίδιο της αμπέλου (*Erysiphe necator*) και η γκρίζα μούχλα (*Botrytis cinerea*), οι οποίες επίσης συμβάλλουν στην ανάπτυξη ανεπιθύμητων αρωμάτων στον οίνο (Steel et al., 2013).

1.5. Βιοποικιλότητα κατά τη ζύμωση

Τα σταφύλια και το γλεύκος σταφυλιών περιέχουν φυσικά ένα μείγμα μυκήτων, ζυμομυκήτων, βακτηρίων, μυκοΐων και βακτηριοφάγων. Το γλεύκος σταφυλιών είναι σχετικά πλήρες σε θρεπτικά συστατικά, ωστόσο, μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη περιορισμένου μόνο αριθμού μικροβιακών ειδών. Το είδος και ο αριθμός των αυτόχθονων μικροοργανισμών εξαρτώνται από παράγοντες όπως η μέθοδος συγκομιδής των σταφυλιών (χειροσυλλογή ή μηχανική), η θερμοκρασία των σταφυλιών, η μεταφορά από τον αμπελώνα στο οινοποιείο (απόσταση/χρόνος, αρχική θερμοκρασία σταφυλιών, θερμοκρασία αέρα, προσθήκη θειωδών), η κατάσταση των σταφυλιών (χρόνος, θερμοκρασία, προσθήκη θειωδών) και η προ-επεξεργασία του γλεύκους (υγιεινή της κάβας, αερισμός, ενζυμική επεξεργασία, προσθήκη θειωδών, μέθοδος διαύγασης, θερμοκρασία, εμβολιασμός με καλλιέργειες ζυμομυκήτων) (Pretorius, 2016).

Σε πολλές χώρες, η παραδοσιακή μέθοδος οινοποίησης περιλαμβάνει την αυθόρμητη ζύμωση του γλεύκους των σταφυλιών, χρησιμοποιώντας τις αυτόχθονες ζύμες που βρίσκονται στα σταφύλια ή στο περιβάλλον του οινοποιείου. Αρχικά, οι ζυμομύκητες *Apiculate* ξεκινούν τη διαδικασία της ζύμωσης, αλλά σύντομα αντικαθίστανται από το *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος κυριαρχεί και ολοκληρώνει τη ζύμωση. Έρευνες υποδεικνύουν ότι αυτοί οι ζυμομύκητες *Apiculate* μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη σύνθεση του οίνου, καθώς και την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό του *S. cerevisiae*. Ειδικά επιλεγμένα στελέχη του *S. cerevisiae* χρησιμοποιούνται ευρέως στην οινοποίηση με μεγάλη επιτυχία. Επιπλέον, τα αυτόχθονα στελέχη του *S. cerevisiae* που υπάρχουν στα φυσικά εμβολιασμένα γλεύκη σταφυλιών διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη ζύμωση και συμβάλλουν σημαντικά στο άρωμα του τελικού οίνου (Papathanasiou et al., 2006).

Η παρουσία χαμηλού pH στο γλεύκος και τον οίνο, σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και αλκοόλης, δημιουργεί συνθήκες που ευνοούν την επιβίωση λίγων μόνο επιλεγμένων μικροοργανισμών, οι οποίοι αποτελούνται κυρίως από συγκεκριμένες ζύμες και βακτήρια. Κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, το γλεύκος υφίσταται μια σταδιακή μετατροπή που επηρεάζεται από διάφορα είδη ζυμών, καθένα από τα οποία συμβάλλει σε ξεχωριστές ιδιότητες στο κρασί που προκύπτει. Αυτές οι ζύμες προσδίδουν χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την προέλευση του σταφυλιού, τη γεύση, το άρωμα, την περιεκτικότητα σε αλκοόλ, την

οξύτητα και το χρώμα. Ενώ η συνολική μικροβιακή κοινότητα επηρεάζει επίσης τη σύνθεση του κρασιού, οι ζύμες είναι κυρίως υπεύθυνες για την αλκοολική ζύμωση. Παρ' όλα αυτά, ορισμένα είδη ζυμών, όπως η *Pichia manshurica*, παράγουν ενώσεις που επηρεάζουν αρνητικά το κρασί, οδηγώντας σε ανεπιθύμητες γεύσεις και οσμές (Jolly et al., 2014).

Ορισμένες ζύμες που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* κυριαρχούν στα πρώτα στάδια της ζύμωσης μέχρι να αναλάβει η *S. cerevisiae* όταν τα επίπεδα αιθανόλης αυξηθούν. Αρχικά, η ζύμωση αρχίζει με τον πολλαπλασιασμό των λιγότερο ισχυρών ζυμομυκήτων όπως οι *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* και *Pichia*. Αυτές οι ζύμες δεν μπορούν να αντέξουν την αυξανόμενη συγκέντρωση αλκοόλης, την εξάντληση του οξυγόνου και την έλλειψη θρεπτικών συστατικών και τελικά πεθαίνουν (Ciani et al., 2010).

Καθώς η ζύμωση εξελίσσεται, ισχυρότερα ζυμωτικά είδη όπως η *Torulaspora delbrueckii* και η *Lachancea thermotolerans* γίνονται κυρίαρχα μέχρι να εξαντληθεί το οξυγόνο, ανοίγοντας το δρόμο για να αναλάβει η *S. cerevisiae*. Ως αποτέλεσμα, η *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται συνήθως ως εμπορική καλλιέργεια εκκίνησης για την αλκοολική ζύμωση, εξασφαλίζοντας την παραγωγή επιθυμητών μεταβολιτών του οίνου. Ωστόσο, η στήριξη αποκλειστικά σε καθαρές καλλιέργειες *S. cerevisiae* μπορεί να οδηγήσει σε οίνους με τυποποιημένα χαρακτηριστικά. Για την αποφυγή αργών ή κολλημένων ζυμώσεων και για την παραγωγή οίνων που μοιάζουν περισσότερο με την αυθόρμητη ζύμωση, προτάθηκε μια προσέγγιση μεικτής καλλιέργειας με ζύμες του γένους *Saccharomyces* αλλά και ζύμες που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*. Αυτό επιτρέπει στους οινοποιούς να παράγουν οίνους με πιο ποικίλα και μοναδικά χαρακτηριστικά (Bagheri et al., 2020).

Αρκετά είδη ζυμομυκήτων που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*, συμπεριλαμβανομένων των *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Hanseniaspora spp.*, *Hansenula spp.*, *Metschnikowia spp.*, *Pichia spp.*, *Rhodotorula spp.* και *Zygosaccharomyces*, έχουν αποδείξει την ικανότητά τους να επιβιώνουν στη ζύμωση σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλκοόλης. Κάποιες άλλες ζύμες διαθέτουν αξιοσημείωτη αντοχή στην αιθανόλη και μπορούν να αντέξουν τη διαδικασία ζύμωσης για παρατεταμένες περιόδους. Αξιοσημείωτα παραδείγματα ανθεκτικών στην αιθανόλη ζυμών περιλαμβάνουν τις *Schizosaccharomyces pombe*, *T. delbrueckii*, *Starmerella*

bacillaris και *Zygosaccharomyces bailii*, οι οποίες μπορούν να αντέξουν κατά την αλκοολική ζύμωση λόγω της ανθεκτικότητάς τους στην αιθανόλη (James et al., 2023; Liu et al., 2017).

Έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 22 είδη ζυμομυκήτων που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* που έχουν άμεσο αντίκτυπο στην ποιότητα του οίνου. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι *Aureobasidium pullulans*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida inconspicua*, *Candida stellata*, *Candida vini*, *Cryptococcus magnus*, *Cyberlindnera jadinii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *P. manshurica*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia occidentalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomycodes ludwigii*, *S. bacillaris*, *T. delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* και *Z. bailii*. Λόγω της σημασίας τους στην παραγωγή οίνου, ορισμένα στελέχη των *Lachancea thermotolerans*, *Kluyveromyces wickerhamii*, *Metschnikowia fructicola*, *M. pulcherrima*, *Pichia kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. bacillaris* και *T. delbrueckii* χρησιμοποιούνται εμπορικά σε διαδικασίες οινοποίησης (Kačániová et al., 2020).

Κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, τα βακτήρια, κυρίως τα γαλακτικά βακτήρια (LAB), έχουν συσχετιστεί με την αλλοίωση του κρασιού, συμβάλλοντας σε προβλήματα με το τρυγικό οξύ και τη γαλακτική κακοσμία. Αυτά τα βακτήρια είναι παρόντα σε όλα τα στάδια της οινοποίησης και έχουν τη δυνατότητα να βελτιώσουν αλλά και να υποβαθμίσουν τη συνολική ποιότητα του κρασιού. Διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη μηλογαλακτική ζύμωση και επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού οίνου. Τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων που μπορούν να βρεθούν στους οίνους περιλαμβάνουν τα *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* και *Pediococcus*. Μεταξύ αυτών, το *Oenococcus oeni* είναι αξιοσημείωτο για τη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης και την ευδοκίμησή του σε δύσκολες συνθήκες οινοποίησης που χαρακτηρίζονται από χαμηλό pH, περιορισμένα θρεπτικά συστατικά και περίπου 15% αιθανόλη. Κατά συνέπεια, εάν επέλθει αλκοολική ζύμωση από ζύμες (*Saccharomyces cerevisiae*), η ανάπτυξη των βακτηρίων μπορεί να διαχειριστεί. Ωστόσο, όταν η αλκοολική ζύμωση καθυστερεί, διάφορα γαλακτικά και οξικά βακτήρια ενδέχεται να πολλαπλασιαστούν, εμποδίζοντας την ανάπτυξη των ζυμών και οδηγώντας σε αργή ζύμωση ή σε παύση της ζύμωσης. Μόλις το μηλικό οξύ μετατραπεί πλήρως, τα βακτήρια *O. oeni* παύουν

να υπάρχουν, οδηγώντας στην αναστολή της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, εξασφαλίζοντας τη μικροβιακή σταθερότητα. Ωστόσο, η πιθανή παρουσία *Pediococcus* και *Lactobacillus* μπορεί να αντιμετωπιστεί με την εισαγωγή θειώδους μετά την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αντίθετα, ορισμένα στελέχη ζύμης, όπως το *S. pombe*, έχουν αποδείξει την ικανότητα να διασπούν το μηλικό οξύ που υπάρχει στο γλεύκος, μειώνοντας δυνητικά ή ακόμη και παρακάμπτοντας εντελώς την ανάγκη για τη φάση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Στις πρακτικές οινοποίησης, οι οινοποιοί έχουν την ικανότητα να ελέγχουν τη βακτηριακή δραστηριότητα και να χρησιμοποιούν την επιρροή τους στην ποιότητα του κρασιού για να επιτύχουν ένα ισορροπημένο pH και την επιθυμητή οξύτητα. Η διατήρηση των κατάλληλων επιπέδων οξύτητας είναι ζωτικής σημασίας για τη διαχείριση διαφόρων πτυχών των εργασιών του οινοποιείου, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου του pH του οίνου, της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες, της έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης και της διασφάλισης της μικροβιολογικής και οργανοληπτικής σταθερότητας (James et al., 2023).

Ενδeleχείς έρευνες αποκάλυψαν ότι κατά τις αρχικές φάσεις της αλκοολικής ζύμωσης η διάρκεια επιβίωσης και οι παράγοντες που οδηγούν στην εξαφάνιση των ζυμών και βακτηρίων που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* περιλαμβάνουν διάφορες μορφές ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών των μικροοργανισμών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε ως παθητικές είτε ως ενεργητικές. Οι παθητικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο και χώρο. Οι ενεργητικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν την απελευθέρωση αντιμικροβιακών ενώσεων, πτητικών οργανικών ενώσεων, οργανικών οξέων και την άμεση επαφή μεταξύ των κυττάρων. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα στελέχη ζυμομυκήτων που απαντώνται συνήθως στο κρασί, όπως τα *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea thermotolerans* και *Torulaspora delbrueckii*, έχουν αναπτύξει υψηλό επίπεδο προσαρμογής στη διαδικασία ζύμωσης του κρασιού λόγω ενός γεγονότος εξημέρωσης, επιτρέποντάς τους να επιβιώνουν μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνουν θετικές αλληλεπιδράσεις στο περιβάλλον του κρασιού μέσω του σχηματισμού βιοϋμενίων μικτών ειδών, της συσσωμάτωσης και της διασταυρούμενης διατροφής, όπου τα υποπροϊόντα του μεταβολισμού ενός στελέχους χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά συστατικά από ένα άλλο στέλεχος. Αυτές

οι αλληλεπιδραστικές συμπεριφορές έχουν παρατηρηθεί μεταξύ του *S. cerevisiae* και του *Lactobacillus* sp., καθώς και μεταξύ διαφορετικών ειδών ζύμης, όπως *Hanseniaspora vineae*, *Saccharomyces uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* και *Torulaspora delbrueckii* (Englezos et al., 2022).

1.6. Κίνδυνοι και επιμολύνσεις κατά την οиноποίηση

1.6.1. Μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοίωση

Ενώ οι ζυμομύκητες *Saccharomyces*, είτε εισάγονται σκόπιμα είτε είναι αυτόχθονοι, είναι οι κυρίαρχοι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της ζύμωσης του οίνου, διάφοροι άλλοι μικροοργανισμοί, όπως μύκητες, βακτήρια και αυτόχθονες ζύμες, μπορούν επίσης να διεισδύσουν στη ζύμωση, οδηγώντας ενίοτε σε ακανόνιστες διαδικασίες ζύμωσης και ασυνήθιστα γευστικά χαρακτηριστικά. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορεί να εισέλθουν στη διαδικασία ζύμωσης λόγω μόλυνσης στην αρχική καλλιέργεια ζύμης, της φυσικής τους παρουσίας στις φλούδες των σταφυλιών, της εισαγωγής τους από έντομα ή λόγω του πρωταρχικού τους ενδιαίτηματος στο περιβάλλον του οινοποιείου. Μπορούν να παραμείνουν σε επιφάνειες του οινοποιείου, όπως τοίχοι, δεξαμενές ζύμωσης ή ακόμη και στο ξύλο των βαρελιών παλαίωσης (Steensels et al., 2015).

❖ Γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) μπορούν να διαδραματίσουν τόσο θετικό όσο και αρνητικό ρόλο στην οиноποίηση. Ενώ ορισμένα στελέχη LAB χρησιμοποιούνται σκόπιμα για τη διενέργεια μηλογαλακτικής ζύμωσης, η οποία μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα του οίνου μειώνοντας την οξύτητα και συμβάλλοντας στην πολυπλοκότητα της γεύσης, άλλα στελέχη LAB μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση εάν δεν ελεγχθεί η ανάπτυξή τους. Η μη ελεγχόμενη ή ακούσια μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη στελεχών LAB που παράγουν ανεπιθύμητα αρώματα και γεύσεις. Ορισμένα LAB μπορούν να παράγουν ενώσεις όπως το διακετύλιο, το οποίο προσδίδει ένα βουτυρώδες άρωμα. Ενώ το διακετύλιο μπορεί να είναι επιθυμητό σε ορισμένους οίνους, τα υπερβολικά επίπεδα μπορεί να οδηγήσουν σε αρνητικό άρωμα (Bisson et al., 2017).

Επίσης, ορισμένα στελέχη LAB μπορούν να παράγουν καρβαμικό αιθυλεστέρα (ουρεθάνη), μια ένωση που έχει ταξινομηθεί ως δυνητικά καρκινογόνος. Η ένωση αυτή σχηματίζεται μέσω της αντίδρασης αιθανόλης και κυανιδίου, το οποίο μπορεί να

υπάρχει σε ίχνη στα σταφύλια. Ο καρβαμικός αιθυλεστέρας αποτελεί ανησυχία στους οίνους που υποβάλλονται σε μηλογαλακτική ζύμωση, ιδίως σε συνθήκες υψηλού pH. Κάποια άλλα στελέχη LAB μπορούν να παράγουν πτητικές φαινόλες, όπως η 4-αιθυλοφαινόλη και η 4-αιθυλογουαϊακόλη, οι οποίες συχνά συνδέονται με ανεπιθύμητα αρώματα "βαρελίσια", "καπνιστά" ή "επιδέσμου". Επιπλέον, ορισμένα LAB μπορούν να παράγουν βιογενείς αμίνες όπως η ισταμίνη και η τυραμίνη, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις και να επηρεάσουν αρνητικά την ποιότητα του κρασιού. Η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των LAB μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική κατανάλωση μηλικού οξέος και παραγωγή γαλακτικού οξέος. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπερ-οξίνιση του κρασιού, επηρεάζοντας την ισορροπία και το συνολικό γευστικό προφίλ του. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των LAB μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση του οίνου και στην παραγωγή ανεπιθύμητων αρωμάτων (Bisson et al., 2017).

❖ Οξικά βακτήρια

Τα οξικοποιητικά βακτήρια (Acetic Acid Bacteria) είναι μικροοργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση στο κρασί μετατρέποντας την αιθανόλη (αλκοόλη) σε οξικό οξύ (ξύδι) μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως οξικοποίηση. Ενώ τα οξικοποιητικά βακτήρια διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή οξικού οξέος, η παρουσία και η δραστηριότητά τους στο κρασί μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες γεύσεις και αρώματα (Bisson et al., 2017).

Η κύρια αλλοίωση που προκαλούν τα οξικά βακτήρια στον οίνο είναι η αύξηση της πτητικής οξύτητας, η οποία αναφέρεται στην παρουσία πτητικών οξέων όπως το οξικό οξύ. Ενώ μια μικρή ποσότητα πτητικής οξύτητας μπορεί να συμβάλει στην πολυπλοκότητα του κρασιού, τα υψηλά επίπεδα θεωρούνται ελάττωμα και μπορούν να κάνουν το κρασί να μυρίζει και να έχει γεύση ξιδιού. Αυτή η παράξενη γεύση περιγράφεται συχνά ως αιχμηρή ή ξινή. Τα οξικά βακτήρια ευδοκιμούν παρουσία οξυγόνου. Εάν το κρασί εκτίθεται σε υπερβολικές ποσότητες οξυγόνου λόγω ελαττωματικού κλεισίματος, κακής σφράγισης ή άλλων λαθών χειρισμού, τα οξικά βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν και να μετατρέψουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ. Η είσοδος οξυγόνου μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια διαφόρων σταδίων της οινοποίησης, όπως κατά τη ζύμωση, την αποθήκευση και την εμφιάλωση. Εκτός από το οξικό οξύ, τα οξικά βακτήρια μπορούν επίσης να παράγουν οξικό αιθυλεστέρα,

μια ένωση που είναι υπεύθυνη για τα φρουτώδη αρώματα. Ενώ τα χαμηλά επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα είναι αποδεκτά και συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα του κρασιού, οι υπερβολικές ποσότητες μπορούν να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητες γεύσεις (Bisson et al., 2017).

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη οξικών βακτηρίων και στην επακόλουθη παραγωγή οξικού οξέος στον οίνο. Τα άγρια στελέχη ζύμης που είναι ανθεκτικά στην αλκοόλη μπορούν να προωθήσουν την ανάπτυξη οξικών βακτηρίων, ιδίως εάν η ζύμωση είναι ατελής ή σταματά. Επίσης, οι υψηλότερες θερμοκρασίες μπορούν να επιταχύνουν τη μικροβιακή δραστηριότητα, συμπεριλαμβανομένης της δραστηριότητας των οξικών βακτηρίων, οδηγώντας σε ταχύτερη οξοποίηση. Τέλος, τα οξικά βακτήρια χρειάζονται αιθανόλη για την παραγωγή οξικού οξέος. Τα κρασιά με υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλη είναι πιο ευαίσθητα στην οξοποίηση (Bisson et al., 2017).

❖ Αλλοιογόνες ζύμες

Οι αρνητικές συνέπειες που προκαλούνται από τις ζύμες είναι τα πιο συχνά προβλήματα μικροβιακής προέλευσης που σχετίζονται με την ποιότητα του οίνου. Τα πιο συνηθισμένα αναγνωρισμένα συμπτώματα της αλλοίωσης από ζύμες είναι ο σχηματισμός υμενίων στους χύμα οίνους, η θολερότητα, ο σχηματισμός ιζήματος και η παραγωγή αερίων στους εμφιαλωμένους οίνους, καθώς και η παραγωγή ανεπιθύμητων αρωμάτων κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων επεξεργασίας και αποθήκευσης (Malfeito-Ferreira & Silva, 2019).

1. *Candida*:

Οι ζύμες *Candida* είναι γνωστές για την ικανότητά τους να παράγουν οξικό οξύ, που οδηγεί σε πτητική οξύτητα και ανεπιθύμητες γεύσεις ξιδιού στο κρασί. Ορισμένα είδη *Candida* μπορούν επίσης να παράγουν οξικό αιθυλεστέρα. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης χύμα κρασιού, μπορεί να σχηματίσει υμένια στην επιφάνεια του κρασιού και να αλλοιώσει το κρασί με την παραγωγή οσμογόνων ενώσεων. Επίσης, ευδοκιμούν σε περιβάλλοντα πλούσια σε οξυγόνο, γεγονός που τους καθιστά πιο πιθανό να προκαλέσουν αλλοίωση στους οίνους που εκτίθενται στον αέρα (Bisson et al., 2017; Malfeito-Ferreira & Silva, 2019).

2. *Brettanomyces/Dekkera*:

Επί του παρόντος, οι ζύμες *Brettanomyces* και πιο συγκεκριμένα το είδος *Brettanomyces bruxellensis* (ή *Dekkera bruxellensis*) θεωρείται ως η κύρια απειλή που συνιστούν οι ζύμες για την ποιότητα του οίνου. Είναι διαβόητο για την παραγωγή πτητικών φαινολών όπως η 4-αιθυλοφαινόλη και η 4-αιθυλογουαϊκόλη, οι οποίες δημιουργούν ανεπιθύμητα αρώματα. Αυτές οι ενώσεις παράγονται συνήθως σε ίχνη, αλλά μπορούν να ανιχνευθούν ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, οδηγώντας σε ανεπιθύμητες γεύσεις. Ορισμένα στυλ κρασιού, όπως κάποια κόκκινα κρασιά, χρησιμοποιούν σκόπιμα ελεγχόμενα επίπεδα *Brettanomyces* για να προσδώσουν πολυπλοκότητα στη γεύση, αλλά η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη τους μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση (Bisson et al., 2017; Malfeito-Ferreira & Silva, 2019).

3. *Hanseniaspora* (ή *Kloeckera*):

Οι ζύμες *Hanseniaspora* μπορούν να παράγουν υψηλά επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα, ο οποίος είναι υπεύθυνος για αρώματα που μοιάζουν με ξεβαφτικό βερνικιού νυχιών. Ενώ τα χαμηλά επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα μπορεί να είναι αποδεκτά και να συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα του κρασιού, οι υπερβολικές ποσότητες οδηγούν σε αλλοίωση (Bisson et al., 2017).

4. *Pichia*:

Οι ζύμες *Pichia* σχετίζονται με την παραγωγή πτητικών ενώσεων θείου, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα θειούχα αρώματα. Αυτές οι ενώσεις μπορεί να είναι ιδιαίτερα προβληματικές στους λευκούς οίνους, όπου επηρεάζουν αρνητικά το προφίλ αρώματος και γεύσης. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης χύμα κρασιού, μπορεί να σχηματίσει υμένια στην επιφάνεια του κρασιού και να αλλοιώσει το κρασί με την παραγωγή οσμογόνων ενώσεων. (Bisson et al., 2017; Malfeito-Ferreira & Silva, 2019).

5. *Zygosaccharomyces*:

Οι ζύμες *Zygosaccharomyces* είναι ικανές να παράγουν υψηλά επίπεδα οξικού οξέος και οξικού αιθυλεστέρα. Αυτές οι ενώσεις συμβάλλουν σε αρώματα που μοιάζουν με ξύδι και φρουτώδη αρώματα, αντίστοιχα. Όπως και άλλες αλλοιογόνες ζύμες, η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη του *Zygosaccharomyces* μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα ποιότητας του οίνου. Το πιο προβληματικό είδος στους οίνους είναι το *Zygosaccharomyces bailli*. Η δραστηριότητά του περιλαμβάνει τον ορατό

σχηματισμό ιζήματος, θολερότητα στους ξηρούς οίνους και αναζύμωση στους γλυκούς οίνους. Δεδομένης της οπτικής φύσης του φαινομένου της αλλοίωσης αποτελεί μεγαλύτερη ανησυχία στους λευκούς οίνους. Μπορεί επίσης να παράγει ανεπιθύμητους οσμογόνους μεταβολίτες (Bisson et al., 2017; Malfeito-Ferreira & Silva, 2019).

6. *Schizosaccharomyces*:

Ορισμένα στελέχη ζυμών *Schizosaccharomyces* μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση με την παραγωγή υπερβολικών ποσοτήτων οξικού οξέος, οδηγώντας σε υψηλή πτητική οξύτητα. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μια έντονη και δυσάρεστη γεύση ξυδιού στο κρασί. Συγκεκριμένα το είδος *Schizosaccharomyces pombe* παρουσιάζει υψηλή αντοχή σε συνθήκες στρες (Bisson et al., 2017; Malfeito-Ferreira & Silva, 2019).

7. *Saccharomycodes*:

Οι ζύμες *Saccharomycodes* είναι ικανές να παράγουν πτητικά οξέα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη πτητική οξύτητα και ανεπιθύμητες γεύσεις στον οίνο. Τα υψηλά επίπεδα πτητικών οξέων επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα και την ισορροπία του κρασιού. Συγκεκριμένα το πιο γνωστό είδος είναι το *Saccharomycodes ludwigii* το οποίο παρουσιάζει υψηλή αντοχή σε συνθήκες στρες και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στο διοξείδιο του θείου, πιθανώς λόγω της ικανότητάς του να παράγει μεγάλες ποσότητες ακεταλδεϋδης (Bisson et al., 2017; Malfeito-Ferreira & Silva, 2019).

8. *Torulaspora*:

Ορισμένες ζύμες *Torulaspora* μπορούν να παράγουν ανεπιθύμητα αρώματα, συμπεριλαμβανομένων του οξικού οξέος και του οξικού αιθυλεστέρα. Αυτές οι ενώσεις συμβάλλουν στην αλλοίωση και επηρεάζουν το οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. Συγκεκριμένα οι αυξήσεις της οξύτητας λόγω του μεταβολισμού του *Torulaspora delbrueckii* είναι αποτέλεσμα της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος. Ωστόσο, δεδομένου ότι το ηλεκτρικό οξύ είναι πιο σκληρό οξύ από το γαλακτικό οξύ και έχει γεύση "αλατιού-πικρού οξέος", τα υπερβολικά επίπεδα θα μπορούσαν να είναι επιζήμια για την ποιότητα του κρασιού (Bisson et al., 2017; Englezos et al., 2022).

❖ Ασθένειες της αμπέλου

Οι επικρατέστερες ασθένειες της αμπέλου είναι ο περονόσπορος (*Plasmopara viticola*), το ωίδιο της αμπέλου (*Erysiphe necator*) και ο βοτρυτής της αμπέλου (*Botrytis cinerea*). Αυτές είναι οι πιο ζημιογόνες ασθένειες των καλλιεργούμενων σταφυλιών παγκοσμίως, οι οποίες προκαλούν σοβαρές βλάβες και έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές εμπορικές απώλειες.

1. Περονόσπορος:

Ο περονόσπορος, που προκαλείται από το παθογόνο μύκητα *Plasmopara viticola*, αποτελεί την πρώτη πιο σοβαρή απειλή για τα αμπέλια. Η ασθένεια προσβάλλει όλα τα πράσινα μέρη της αμπέλου, ιδίως τα φύλλα, τα άνθη και τα νεαρά σταφύλια. Εμφανίζεται κυρίως ως κιτρίνισμα και μαύρισμα των φύλλων, συχνά συνοδευόμενο από μια χαρακτηριστική λευκή έως γκριζωπή χνουδωτή ανάπτυξη μούχλας στην κάτω πλευρά των προσβεβλημένων φύλλων. Τα μολυσμένα σταφύλια μπορεί να εμφανίσουν κοκκινωπό-καφέ αποχρωματισμό. Η ασθένεια αυτή εξαπλώνεται γρήγορα σε θερμά κλίματα και σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και βροχοπτώσεων και μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη αποφύλλωση και μείωση της φωτοσύνθεσης. Εάν τα μολυσμένα σταφύλια συγκομιστούν και υποστούν επεξεργασία, το κρασί που προκύπτει μπορεί να έχει ανεπιθύμητα αρώματα και γεύσεις, όπως νότες γρασιδιού ή φυτών. Ο περονόσπορος μπορεί να εμποδίσει τη σωστή ωρίμανση των σταφυλιών, οδηγώντας σε μη ισορροπημένη οξύτητα, μειωμένη περιεκτικότητα σε σάκχαρα και αλλοιωμένο γευστικό προφίλ στο κρασί (Kassemeyer, 2017).

2. Ωίδιο της αμπέλου:

Το ωίδιο, που προκαλείται από τον μύκητα *Erysiphe necator*, είναι άλλη μία κοινή ασθένεια της αμπέλου που προσβάλλει τα φύλλα, τους βλαστούς και τα σταφύλια. Οι θερμές θερμοκρασίες και η υψηλή υγρασία παρέχουν ευνοϊκές συνθήκες για την εξάπλωση της ασθένειας, αλλά μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε ξηρότερες συνθήκες. Τα νέα φύλλα, τα άνθη και τα νεαρά σταφύλια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην ασθένεια αλλά ακόμη και τα παλαιότερα φύλλα και σταφύλια μπορούν να μολυνθούν. Τα νεαρά φύλλα και σταφύλια μπορεί να καλύπτονται εξ ολοκλήρου από λευκές κονιορτοειδείς κηλίδες, ενώ τα παλαιότερα φύλλα έχουν μικρές αποικίες στην επάνω πλευρά. Τα μολυσμένα φύλλα παραμένουν πράσινα για

μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, αλλά η αποτελεσματικότητα της φωτοσύνθεσης μειώνεται. Τα μολυσμένα άνθη κατασρώνουν και πεθαίνουν, οι βλαστοί γίνονται καχεκτικοί και τα φύλλα κιτρινίζουν. Το παθογόνο επηρεάζει την επιφάνεια των σταφυλίων, προκαλώντας ρωγμές και σχισμές, οι οποίες γίνονται σημεία εισόδου για δευτερογενείς εισβολείς όπως ζύμες και βακτήρια που παράγουν οξικό οξύ. Το ωίδιο μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των σταφυλίων μειώνοντας την περιεκτικότητα σε σάκχαρα, μεταβάλλοντας την οξύτητα και δημιουργώντας ανεπιθύμητες γεύσεις και οσμές μούχλας (Kassemeyer, 2017).

3. Βοτρύτης της αμπέλου

Ο βοτρύτης της αμπέλου (*Botrytis cinerea*), έχει διττή φύση με ευεργετικά και επιβλαβή αποτελέσματα. Σε ελεγχόμενα περιβάλλοντα, ο *Botrytis cinerea* μπορεί να προκαλέσει "ευγενή σήψη", η οποία αφυδατώνει μερικώς τα σταφύλια και συγκεντρώνει τα σάκχαρα και τις γεύσεις, συμβάλλοντας στην παραγωγή περιζήτητων γλυκών κρασιών. Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη σήψη οδηγεί σε μαλακά, ζαρωμένα σταφύλια που καλύπτονται από γκρίζα, χνουδωτή μούχλα. Αυτά τα μολυσμένα σταφύλια μπορεί να αναπτύξουν ανεπιθύμητες γεύσεις και αρώματα, όπως μούχλας και αποσύνθεσης. Στα μολυσμένα σταφύλια, το *B. cinerea* παράγει μεγάλες ποσότητες λακκάσης που οξειδώνουν τις ανθοκυάνες και τα φλαβονοειδή σε καφέ προϊόντα οξείδωσης. Οι λακκάσες είναι πολύ σταθερές και μπορούν να περάσουν στο γλεύκος και στον οίνο, με αποτέλεσμα ο οίνος να παίρνει καφέ χρώμα και ιδιαίτερα οι ερυθροί οίνοι να χάνουν το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα τους. Η ασθένεια εξαπλώνεται γρήγορα σε συνθήκες υψηλής υγρασίας, ιδιαίτερα σε αμπελώνες με πυκνά στέγαστρα και κακή κυκλοφορία του αέρα (Kassemeyer, 2017).

1.6.2. Οξείδωση

Η αλλοίωση από οξείδωση στο πλαίσιο της οινοποίησης αναφέρεται στην υποβάθμιση της ποιότητας του οίνου λόγω υπερβολικής έκθεσης στο οξυγόνο. Όταν το κρασί έρχεται σε επαφή με το οξυγόνο, μπορεί να υποστεί χημικές αντιδράσεις που οδηγούν σε ανεπιθύμητες αλλαγές στο χρώμα, το άρωμα, τη γεύση και τη συνολική σταθερότητα. Ενώ η ελεγχόμενη ποσότητα έκθεσης σε οξυγόνο κατά τη διάρκεια ορισμένων σταδίων της οινοποίησης είναι απαραίτητη, η ανεξέλεγκτη ή παρατεταμένη έκθεση μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση (Bisson et al., 2017).

Το οξυγόνο μπορεί να προκαλέσει την υποβάθμιση των πτητικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για τα ευχάριστα αρώματα και τις γεύσεις του κρασιού. Ως αποτέλεσμα, τα κρασιά μπορεί να χάσουν τα φρουτώδη, λουλουδάτα και φρέσκα χαρακτηριστικά τους, με αποτέλεσμα να γίνονται θαμπά και μη ελκυστικά. Επίσης, η οξείδωση μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό ενώσεων που προκαλούν ανεπιθύμητες γεύσεις στο κρασί. Για παράδειγμα, τα κρασιά μπορεί να αποκτήσουν αρώματα και γεύσεις που μοιάζουν με καρύδια ή χαρτόνι και θεωρούνται αρνητικά (Bisson et al., 2017).

Επιπλέον, η οξείδωση μπορεί να προκαλέσει το σκούρο χρώμα των λευκών κρασιών και την απώλεια της ζωντάνιας των ερυθρών κρασιών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση καφέ ή πορτοκαλί χρώματος. Αυτή η αλλαγή στο χρώμα μπορεί να είναι αντιαισθητική για τους καταναλωτές και να υποδηλώνει έλλειψη φρεσκάδας. Τα οξειδωμένα κρασιά μπορεί να χάσουν την ισορροπία και τη δομή τους. Για τους ερυθρούς οίνους, αυτό μπορεί να εκδηλωθεί ως αποδυνάμωση των τανινών, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε έλλειψη πολυπλοκότητας (Bisson et al., 2017).

Περιβάλλοντα πλούσια σε οξυγόνο μπορούν να ενθαρρύνουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών αλλοίωσης, συμπεριλαμβανομένων των οξικών βακτηρίων, τα οποία ευδοκιμούν παρουσία οξυγόνου. Τέλος, η οξείδωση μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία παλαίωσης του κρασιού, με αποτέλεσμα να χάνει πρόωρα τις νεανικές του ιδιότητες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε κρασιά με γεύση παλαιότερη και λιγότερο ζωντανή από την προβλεπόμενη (Bisson et al., 2017).

1.6.3. Διοξείδιο του θείου

Το διοξείδιο του θείου (SO_2) χρησιμοποιείται συνήθως στην οινοποίηση ως αντιοξειδωτικό, συντηρητικό καθώς και αντιμικροβιακός παράγοντας. Συμβάλλει στην πρόληψη της οξείδωσης, στην αναστολή της ανάπτυξης μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση και στη διατήρηση της ποιότητας και της σταθερότητας του κρασιού. Ωστόσο, εάν το SO_2 χρησιμοποιείται ακατάλληλα ή υπερβολικά, μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά προβλημάτων και να συμβάλει στην αλλοίωση του κρασιού (Bisson et al., 2017).

Η υπερβολική χρήση SO_2 στην οινοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε κρασιά με αυξημένα επίπεδα διοξειδίου του θείου. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ένα δριμύ, θειώδες άρωμα που συνήθως περιγράφεται ως οσμή "καμένου σπύριτου". Αυτά τα

ενοχλητικά αρώματα μπορούν να καλύψουν τα φυσικά χαρακτηριστικά του κρασιού και να καταστείλουν τα φρέσκα και ζωντανά αρώματα και γεύσεις του κρασιού. Αντί να ενισχύει τις ιδιότητες του κρασιού, το υπερβολικό SO₂ μπορεί να οδηγήσει σε ένα επίπεδο ή υποτονικό προφίλ. Επιπρόσθετα, η ακατάλληλη χρήση SO₂ μπορεί να επηρεάσει την ισορροπία ενός κρασιού, επηρεάζοντας την οξύτητα και τη συνολική δομή του. Το κρασί μπορεί να έχει υπερβολικά ξινή ή υπερβολικά μαλακή γεύση λόγω της αλληλεπίδρασης που συμβαίνει μεταξύ του SO₂ και άλλων συστατικών (Bisson et al., 2017).

Επίσης, ορισμένα άτομα είναι ευαίσθητα ή αλλεργικά στο διοξείδιο του θείου. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ακόμη και χαμηλά επίπεδα SO₂ στο κρασί μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητες αντιδράσεις, όπως πονοκεφάλους, δυσκολίες στην αναπνοή και ερεθισμό του δέρματος. Τα κρασιά με υψηλή περιεκτικότητα σε SO₂ μπορεί να επιδεινώσουν αυτά τα προβλήματα (Bisson et al., 2017).

Ενώ το SO₂ μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της οξείδωσης και της ανάπτυξης μικροβίων, η υπερβολική χρήση μπορεί να καλύψει υποκείμενα ελαττώματα ή ατέλειες στο κρασί. Οι οινοποιοί μπορεί να καλύψουν ακούσια προβλήματα που θα έπρεπε να αντιμετωπιστούν. Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις, τα υπερβολικά υψηλά επίπεδα SO₂ μπορούν να καθυστερήσουν τη φυσική διαδικασία παλαίωσης του κρασιού. Αν και αυτό μπορεί να είναι επιθυμητό για ορισμένα στυλ κρασιών, μπορεί να εμποδίσει τα κρασιά να αναπτύξουν την πολυπλοκότητα και τον χαρακτήρα που θα μπορούσαν να αποκτήσουν υπό πιο ισορροπημένες συνθήκες (Bisson et al., 2017).

1.6.4. Υπολείμματα φυτοφαρμάκων

Η αμπελουργική βιομηχανία χρησιμοποιεί διάφορα μυκητοκτόνα για την καταπολέμηση των ασθενειών της αμπέλου, με στόχο τη διατήρηση των οργανικών υπολειμμάτων εντός των νόμιμων ορίων κατά τη διαδικασία οινοποίησης. Ωστόσο, η λανθασμένη εφαρμογή μυκητοκτόνων χωρίς την τήρηση των συστάσεων του προμηθευτή έχει συχνά ως αποτέλεσμα την υπέρβαση αυτών των ορίων υπολειμμάτων στο γλεύκος και τον οίνο. Δυστυχώς, αυτά τα χημικά μυκητοκτόνα στερούνται εξειδίκευσης, επηρεάζοντας όχι μόνο τα στοχευμένα παθογόνα αλλά και άλλους μικροοργανισμούς που είναι ζωτικής σημασίας για διάφορες βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχετίζονται με τις ζυμώσεις τροφίμων. Για παράδειγμα, έρευνες έχουν δείξει ότι τα υπολείμματα μυκητοκτόνων

μπορούν να προκαλέσουν δομικές τροποποιήσεις στις κυτταρικές μεμβράνες και να διαταράξουν τον μεταβολισμό των ζυμομυκήτων, επηρεάζοντας κατά συνέπεια τον ρόλο τους στη ζύμωση (Russo et al., 2019).

Οι συγκεντρώσεις φυτοφαρμάκων στα συγκομισμένα σταφύλια διαφέρουν ανάλογα με τα χημικά χαρακτηριστικά των δραστικών συστατικών. Η παραμονή των φυτοφαρμάκων στα σταφύλια επηρεάζεται από παράγοντες όπως η φωτοαποδόμηση, η θερμοαποδόμηση, ο αποσταγματισμός και η ενζυμική αποδόμηση. Αυτά τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων στα σταφύλια μπορούν να μεταφερθούν στο γλεύκος, επηρεάζοντας ενδεχομένως την επιλογή και την ανάπτυξη των στελεχών ζύμης που είναι υπεύθυνα για τη ζύμωση. Επιπλέον, οι ζύμες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τα επίπεδα των φυτοφαρμάκων στον οίνο μειώνοντας ή προσροφώντας αυτές τις ενώσεις στις οινολάσπες, συμβάλλοντας σε ζητήματα ποιότητας και ασφάλειας του οίνου (Caboni & Cabras, 2010).

Τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του οίνου, μεταβάλλοντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τις γεύσεις, τα αρώματα και τα γενικά χαρακτηριστικά του οίνου. Επιπρόσθετα, τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων στο κρασί προκαλούν ανησυχίες για την υγεία, ιδίως εάν υπερβαίνουν τα καθορισμένα όρια. Τα υπολείμματα μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, συμπεριλαμβανομένων πιθανών κινδύνων τοξικότητας και αλλεργιών. Οι ρυθμιστικοί οργανισμοί καθορίζουν τα μέγιστα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (MRLs) για τα φυτοφάρμακα στον οίνο για να διασφαλίσουν ότι τα επίπεδα αυτών των ενώσεων παραμένουν εντός ασφαλών ορίων για τους καταναλωτές (Caboni & Cabras, 2010).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός αυτόχθονων στελεχών ζυμομυκήτων που προήλθαν από σταφυλόμαζα της ερυθρής ποικιλίας Merlot για πιθανή χρήση τους στην ζύμωση τσίπουρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Υλικά

2.1.1. Όργανα και Συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία είναι τα εξής:

- Αυτόκαυστο χωρητικότητας 17,5 lt. Autoclave 760, ASAL (Μιλάνο, Ιταλία)
- Απαγωγός BIO Class II Type A2, Telstar Azbil (Τόκιο, Ιαπωνία)
- Αναλυτικός ζυγός A200S ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, Sartorius (Γκέτινγκεν, Γερμανία)
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, U-1500, Hitachi (Τόκιο, Ιαπωνία)
- Αυτόματες πιπέτες, Nichipet EXII, Nichiryo Co. Ltd. (Τόκιο, Ιαπωνία)
- Φυγόκεντρος για Eppendorf, Model 3500, KUBOTA (Τόκιο, Ιαπωνία)
- Φυγόκεντρος για Falcon των 50mL, CL10, Thermo Fisher Scientific Inc (Τόκιο, Ιαπωνία)
- Σύριγγες 3mL και 5mL, Farmatexa, Farmac-Zabban S.P.A. (Μπολόνια, Ιταλία)
- Σύστημα εξαγωγής DNA «DNA Nucleospin tissue», Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Ντίσελντορφ, Γερμανία)
- Σύστημα PCR Thermal Cycler Dice, TP600, Takara (Σίγκα, Ιαπωνία)
- Σύστημα ηλεκτροφόρησης, SUB20C, Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Στέινφουρτ, Γερμανία)
- Γυάλινη κυψελίδα 1x1, Starna Scientific Ltd (Εσσεξ, Αγγλία)

- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Digimage System, DI-01, Major Science (Ταογιουάν, Ταϊβάν)

2.1.2. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία είναι τα εξής:

- Απιονισμένο νερό 4L, Alfa Products (Κορινθία, Ελλάδα)
- Βακτηριολογικό άγαρ 1000g, BIOLAB Inc. (Βουδαπέστη, Ουγγαρία)
- Βουτανόλη (1-Butanol) 2,5L, Panreac Quimica SA (Βαρκελώνη, Ισπανία)
- Υδροχλωρικό οξύ (Hydrochloric Acid) 37% 2,5L, Panreac Quimica SA (Βαρκελώνη, Ισπανία)
- Θεικό οξύ (sulfuric acid, H_2SO_4) 2,5L, Honeywell Fluka (Αννόβερο, Γερμανία)
- Αγαρόζη 500g, NIPPON Genetics EUROPE GmbH (Ντύρεν, Γερμανία)
- Taq DNA πολυμεράση, Kapa Biosystems Inc (Μασαχουσέτη, ΗΠΑ)
- Άλας μαγνησίου ($MgCl_2$) 2.5 mM, Kapa Biosystems Inc (Μασαχουσέτη, ΗΠΑ)
- dNTPs Mix 100 mM, Kapa Biosystems Inc (Μασαχουσέτη, ΗΠΑ)
- Ειδικοί εκκινητές, MWG Biotech GmbH (Εμπερσμπεργκ, Γερμανία)
- Tris-hydrochloride (ultrapure) 99,9% 1kg, Duchefa Biochemie B.V. (Χάαρλεμ, Ολλανδία)
- EDTA (αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ, ethylene diamine tetra acetic acid) 99% 250g, Duchefa Biochemie B.V. (Χάαρλεμ, Ολλανδία)
- Οξικό οξύ (Acetic acid glacial, CH_3COOH) 99,7% 2,5L, VWR Chemicals (Πενσυλβάνια, ΗΠΑ)
- Κυανόλη του ξυλενίου (Xylene Cyanol FF) 10g, Sigma-Aldrich (Μισούρι, ΗΠΑ)
- Κυανό της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue) 5g, Merck KGaA (Ντάρμστατ, Γερμανία)
- Θεικό μαγνήσιο (Magnesium sulfate, $MgSO_4$) 1kg, Merck KGaA (Ντάρμστατ, Γερμανία)

- Βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide) 5mL, Sigma-Aldrich (Μισούρι, ΗΠΑ)

2.1.3. Σταφύλια

Για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκε ποσότητα σταφυλιών περίπου 15 κιλά από το κτήμα Βουρβουκέλη, στα Άβδηρα Ξάνθης. Η ποικιλία σταφυλιών ήταν η ερυθρή ποικιλία Merlot. Η εσοδεία του 2021 χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση στελεχών ζυμομυκήτων και παρασκευή υποστρώματος.



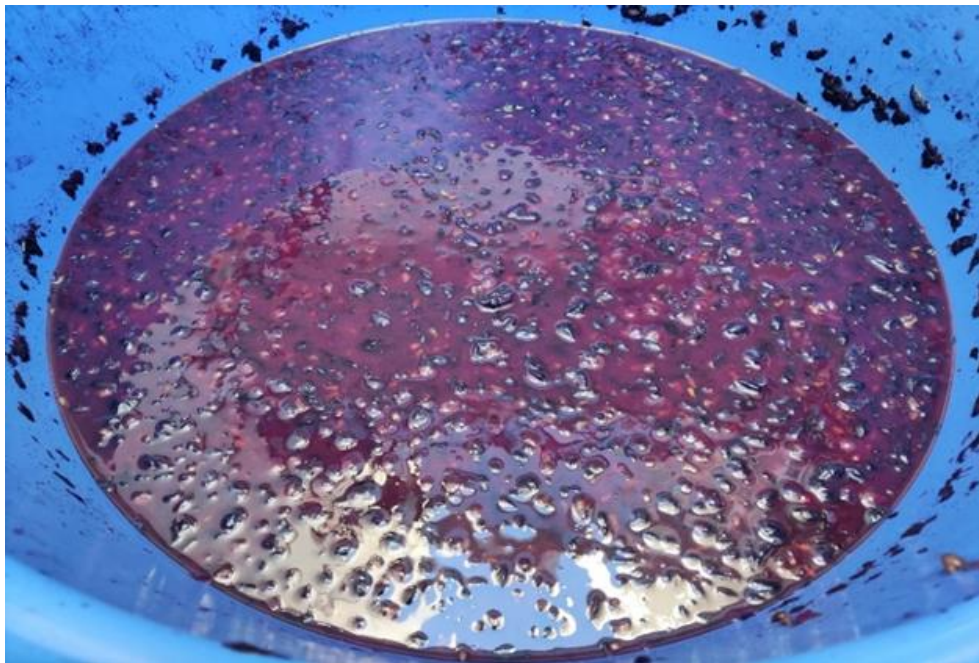
Εικόνα 1: Τα σταφύλια την ημέρα της παραλαβής.

2.2. Μεθοδολογία και μέθοδοι ανάλυσης

2.2.1. Παρασκευή σταφυλοπολτού και ζύμωση

Μετά την παραλαβή 15 κιλών σταφυλιών έγινε η αποβοστρύχωση δηλαδή η αφαίρεση των βοστρύχων (κοτσανιών) και η διαλογή των καλής ποιότητας ρωγών. Οι

ρώγες τοποθετήθηκαν σε καθαρή πλαστική λεκάνη και έπειτα πατήθηκαν με καθαρά πόδια για να πραγματοποιηθεί θραύση των ρωγών. Στη συνέχεια, ο σταφυλοπολτός μεταφέρθηκε σε καθαρό πλαστικό κυλινδρικό δοχείο χωρητικότητας 20 L χωρίς να αφαιρεθούν οι φλοιοί και τα γίγαρτα (κουκούτσια). Το δοχείο, το οποίο ήταν με το καπάκι αλλά δεν ήταν σφραγισμένο, αφέθηκε σε θερμοκρασία περίπου 20°C για να πραγματοποιηθεί η ζύμωση. Μετά από 24 μέρες ζύμωσης λήφθηκαν δείγματα με σκοπό την απομόνωση στελεχών ζυμομυκήτων. Δεν έγινε προσθήκη διοξειδίου του θείου αλλά ούτε και κάποια άλλη προσθήκη.



Εικόνα 2: Ο σταφυλοπολτός μετά την θραύση των ρωγών.



Εικόνα 3: Το κυλινδρικό δοχείο εξωτερικά (αριστερά) και με το γλεύκος σε ζύμωση (δεξιά).

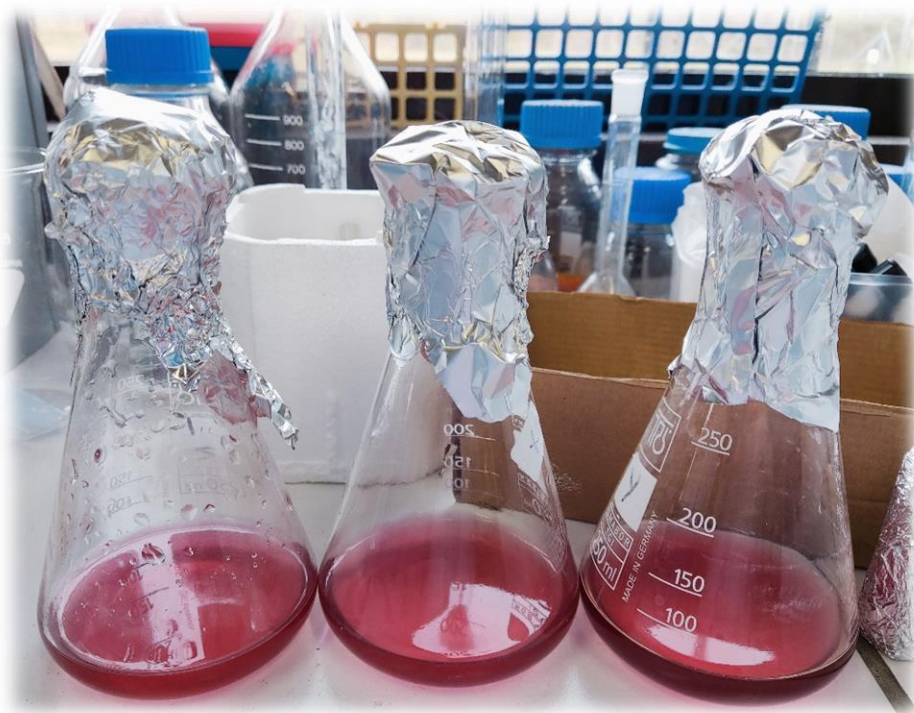
2.2.2. Απομόνωση στελεχών ζυμομυκήτων

2.2.2.1 Προκατεργασία στέμφυλων για απομόνωση ζυμομυκήτων

Μετά από 17 μέρες ζύμωσης του σταφυλοπολτού μέσα στο κυλινδρικό δοχείο λήφθηκε μια ποσότητα γλεύκους (αφού ανακινήθηκε το δοχείο) χωρίς τα στέμφυλα. Φτιάχτηκε διάλυμα περιεκτικότητας γλεύκους 10% v/v (1:10 γλεύκος προς απιονισμένο νερό). Τοποθετήθηκαν 45 mL του διαλύματος αυτού σε κωνικές φιάλες των 250 mL (Α, Β και Γ) και 9 mL σε 30 πλαστικά κωνικά σωληνάρια Falcon των 15 mL (10 για την κάθε κωνική φιάλη). Στις κωνικές φιάλες τοποθετήθηκε υδρόφοβο βαμβάκι ως καπάκι και καλύφθηκε με αλουμινοχαρτό. Έπειτα οι κωνικές φιάλες και όλα τα Falcon αποστειρώθηκαν σε θερμοκρασία 121°C για διάστημα 20 λεπτών.

Μετά από 24 μέρες ζύμωσης του σταφυλοπολτού μέσα στο κυλινδρικό δοχείο λήφθηκαν μόνο στέμφυλα βάρους 5 g κατά προσέγγιση (τα οποία λήφθηκαν σε 3 διαφορετικές χρονικές στιγμές αλλά την ίδια μέρα), τοποθετήθηκαν στην κάθε μία από τις 3 αποστειρωμένες κωνικές φιάλες και αφέθηκαν σε ανάδευση για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθώντας την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων λήφθηκε 1 mL από την κάθε κωνική φιάλη και μεταφέρθηκε στο 1^ο αποστειρωμένο Falcon που

περιείχε 9 mL υγρού θρεπτικού μέσου. Έτσι, έγινε αραίωση του αρχικού πληθυσμού κατά 10 φορές (10^{-1}). Από το αραιωμένο δείγμα 10^{-1} , ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και 1 mL τοποθετήθηκε στο επόμενο αποστειρωμένο Falcon. Μετά από το 2^ο στο 3^ο και ούτω καθεξής μέχρι να επιτευχθεί η αραίωση 10^{-10} . Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Έπειτα, με αυτόματη πιπέτα λήφθηκαν 200 μ L από την κάθε αραίωση (10^{-1} έως 10^{-10}) και επιστρώθηκαν στην επιφάνεια του στερεοποιημένου θρεπτικού μέσου μέσα σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm και πραγματοποιήθηκε ομοιόμορφη διασπορά του δείγματος με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας Pasteur (μέθοδος διασποράς ή spread-plate method). Τα τρυβλία αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε θερμοκρασία περίπου 20°C.



Εικόνα 4: Διαλύματα γλεύκους 10% v/v.



Εικόνα 5: Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.

2.2.2.2. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος με γλεύκος

Αρχικά για να ληφθεί το γλεύκος αποψύχθηκε μια ποσότητα αζύμωτου σταφυλοπολτού που είχε αποθηκευτεί στην κατάψυξη από την εσοδεία του 2021. Με ένα μικρό σουρωτήρι λήφθηκε μόνο ο χυμός (χωρίς τα στέμφυλα). Όμως, επειδή ο χυμός είχε αρκετά αιωρούμενα στερεά τοποθετήθηκε σε πλαστικά κωνικά σωληνάρια Falcon των 50 mL τα οποία φυγοκεντρήθηκαν στα $10.000 \times g$ για 2 min για να γίνει καθίζηση. Έπειτα, ο φυγοκεντρημένος χυμός με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού και χωνιού διήθησης υπέστη διπλή διήθηση για ακόμη μεγαλύτερη απομάκρυνση στερεών.

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος με γλεύκος σε δοχείο Duran όγκου 500 mL με χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου 500 mL προστέθηκαν 450 mL απιονισμένο νερό, 50 mL διηθημένο αζύμωτο γλεύκος και 8,5 g βακτηριολογικό άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C για διάστημα 20 λεπτών. Κατόπιν, στον απαγωγό μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm , όπου και αφέθηκε προς στερεοποίηση.

2.2.2.3. Απομονώσεις αποικιών

Αφού επώαστηκαν τα τρυβλία για 7 ημέρες και σε θερμοκρασία περίπου 20°C , σχηματίστηκαν ορατές αποικίες. Για την απομόνωση των μικροοργανισμών επιλέχθηκαν οι αραιώσεις 10^{-4} και 10^{-5} της Γ επανάληψης καθώς οι αποικίες που

είχαν δημιουργηθεί σε αυτό ήταν εμφανείς και μετρήσιμες και οι μικροοργανισμοί μπορούσαν να απομονωθούν με ευχέρεια. Για τη διαδικασία της απομόνωσης, με το ρύγχος της αυτόματης πιπέτας επιλέχθηκαν κύτταρα από την κάθε μεμονωμένη αποικία που είχε σχηματιστεί στο τρυβλίο, και επιστρώθηκαν σε νέο τρυβλίο Petri διαμέτρου 9cm με το ίδιο στερεό υπόστρωμα (όπως περιγράφηκε παραπάνω) με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών (Streaking). Η ονομασία τους αποτελούνταν από τα γράμματα GC ακολουθούμενα από αριθμούς. Τα στελέχη διατηρούνταν σε τρυβλία με το παραπάνω θρεπτικό υλικό σε θερμοκρασία 20°C υπο αερόβιες συνθήκες.

2.2.3. Ταυτοποίηση στελεχών ζυμομυκήτων

2.2.3.1. Εξαγωγή γενωμικού DNA απομονωμένων στελεχών

Η εξαγωγή γενωμικού DNA των απομονωμένων στελεχών έλαβε χώρα με τη χρήση εμπορικού συστήματος «DNA Nucleospin tissue». Αρχικά, συλλέχθηκαν κύτταρα από τα απομονωμένα στελέχη και αφού τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους μικροσωλήνες, η διαδικασία εξαγωγής γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.3.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, αρχικά πραγματοποιήθηκε η αποδιάταξη του DNA με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή με συνδυασμούς χρόνου και θερμοκρασίας, έπειτα η υβριδοποίηση των εκκινητών και τέλος η επιμήκυνση της νουκλεοτιδικής αλυσίδας. Χρησιμοποιήθηκε μείγμα αντιδραστηρίων το οποίο περιείχε επίσης ειδικούς εκκινητές, ρυθμιστικό διάλυμα, dNTPs, άλας μαγνησίου (MgCl₂), θερμοανθεκτική πολυμεράση (Taq DNA πολυμεράση) και το γενωμικό DNA. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 35 φορές.

2.2.3.3. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη Αγαρόζης

Το γενωμικό DNA των απομονωμένων στελεχών στην συνέχεια υποβλήθηκε σε ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα για τη διαπίστωση της ύπαρξης επαρκούς ποσότητας DNA. Τα δείγματα DNA των στελεχών ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1% w/v. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε 1xTAE (Tris-HCl, CH₃COOH, EDTA, pH 8). Πριν την ηλεκτροφόρηση στα δείγματα DNA προστέθηκε διάλυμα χρωστικής. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120 V για περίπου 30 λεπτά. Μετά το

τέλος της διαδικασίας, η γέλη αγαρόζης εμβαπτίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και ακολούθησε έκλυση σε αραιό διάλυμα MgSO_4 για 20 λεπτά. Τέλος, κάτω από υπεριώδες φως και με την χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής υψηλής ανάλυσης, καταγράφηκαν τα αποτελέσματα από την εξαγωγή του DNA. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και για το προϊόν της PCR, το οποίο καθαρίστηκε με τη χρήση εμπορικού συστήματος (PCR clean-up Gel extraction, Macherey-Nagel) και αναλύθηκε περαιτέρω για την εύρεση των αλληλουχιών βάσεων των απομονωμένων στελεχών.

2.2.3.4. Φυλογενετικός χαρακτηρισμός

Η εύρεση των αλληλουχιών βάσεων των απομονωμένων στελεχών, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger. Η φυλογενετική ανάλυση έλαβε χώρα μέσω της σύγκρισης/ταυτοποίησης των αλληλουχιών που προέκυψαν με γνωστές αλληλουχίες αναφοράς μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας BLAST.

2.2.4. Ανάπτυξη στελεχών ζυμομυκήτων

Επιλέχθηκαν 10 από τα απομονωμένα στελέχη σε θρεπτικό υλικό με γλεύκος τα οποία παρουσίαζαν μορφολογικές διαφορές από τα υπόλοιπα με σκοπό την διερεύνηση της καμπύλης ανάπτυξης.

Από τα απομονωμένα στελέχη επιλέχθηκαν τα εξής: GC-22, GC-25, GC-32, GC-4, GC-5, GC-12, GC-19, GC-40, GC-44 και GC-45. Αρχικά παρασκευάστηκαν υγρά θρεπτικά υποστρώματα με γλεύκος. Σε δοχείο Duran όγκου 500 mL, με χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου 500 mL, προστέθηκαν 450 mL απιονισμένο νερό και 50 mL διηθημένο αζύμωτο γλεύκος. Τοποθετήθηκαν από 40mL σε πλαστικά κωνικά σωληνάρια Falcon των 50 mL και αποστειρώθηκαν στο αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C για διάστημα 20 λεπτών. Κατόπιν, στον απαγωγό υπό ασηπτικές συνθήκες με μια μικρή ποσότητα κυττάρων από το καθένα από τα 10 τρυβλία εμβολιάστηκαν τα αντίστοιχα Falcon και αφέθηκαν για 36-40 ώρες για να δημιουργηθούν υγρές προκαλλιέργειες.

Έπειτα, με αυτόματη πιπέτα ακολούθησε εμβολιασμός 200μL από την κάθε υγρή προ-καλλιέργεια στα αντίστοιχα Falcon (εις τριπλούν για το κάθε στέλεχος) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε θερμοκρασία 20°C. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν μάρτυρες που δεν περιείχαν τα εμβολιασθέντα στελέχη. Υπό ασηπτικές συνθήκες και με συχνότητα μισής ή μίας ώρας πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες και η ανάπτυξη των στελεχών εκτιμήθηκε φωτομετρικά στο φασματοφωτόμετρο στα 600 nm. Υπολογίστηκε ο χρόνος διπλασιασμού (g) καθώς και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ) για το κάθε στέλεχος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Απομόνωση στελεχών ζυμομυκήτων

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, αφού εφαρμόστηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και πραγματοποιήθηκε επίστρωση στα τρυβλία, τα τρυβλία αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε θερμοκρασία περίπου 20°C. Μετά από 7 ημέρες η ανάπτυξη ήταν εμφανής και έτσι έγινε η καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία με τις αραιώσεις που ήταν δυνατόν να καταμετρηθούν. Παρακάτω αποτυπώνεται ο αριθμός των αποικιών για το θρεπτικό υλικό με γλεύκος, για συγκεκριμένες αραιώσεις και στις 3 επαναλήψεις (Α,Β και Γ).

Πίνακας 1: Καταμέτρηση αποικιών στα τρυβλία με γλεύκος.

	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
A	5	39	335
B	9	36	266
Γ	3	46	320

3.2 Ταυτοποίηση στελεχών ζυμομυκήτων

Επιλέχθηκαν 10 από τα απομονωμένα στελέχη τα οποία παρουσίαζαν μορφολογικές διαφορές από τα υπόλοιπα και αναλύθηκαν με σκοπό την ταυτοποίησή τους. Η φυλογενετική ανάλυση έλαβε χώρα μέσω της σύγκρισης/ταυτοποίησης των αλληλουχιών που προέκυψαν με γνωστές αλληλουχίες αναφοράς.

Όλα τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν είχαν την ίδια αλληλουχία βάσεων όπως αυτή παρουσιάζεται ακολούθως:

Saccharomyces cerevisiae culture CBS:5378 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (Sequence ID: [KY105046](#))

Κατά την εισαγωγή της αλληλουχίας βάσεων στην διαδικτυακή πλατφόρμα BLAST διαπιστώθηκε η συσχέτιση με το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*.

Πίνακας 2: Ταυτοποίηση απομονωμένων στελεχών.

Στέλεχος	Μικροοργανισμός
GC 4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GC 5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GC 12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GC 19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GC 22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GC 25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GC 32	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GC 40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GC 44	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GC 45	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Οι μελέτες πάνω στο γένος *Saccharomyces* χρονολογούνται από το έτος 1838, όπου το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* ήτα το πρώτο από τα τότε πέντε στελέχη που περιγράφηκε (Marsit & Dequin, 2015). Το σύμπλεγμα *Saccharomyces sensu stricto* αποτελείται σήμερα από τουλάχιστον επτά διαφορετικά είδη με προέλευση που φτάνει έως τα 20 εκατομμύρια χρόνια (10-20 MYA) (Borneman & Pretorius, 2015, Marsit & Dequin, 2015, Pronk et al., 1996, Rainieri, et al., 2003). Το είδος *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί ένα ιδιαίτερο μέλος αυτής της ομάδας λόγω της ιστορικά στενής σύνδεσής του με ανθρώπινες δραστηριότητες όπως η ζυθοποιία, η αρτοποιία και η οينوποίηση. Είναι ένας μονοκύτταρος μύκητας, που διαθέτει πυρηνικό γονιδιωματικό DNA 12068 χιλιάδων (kb) οργανωμένο σε 16 χρωμοσώματα. Το γονιδιώμα του έχει αλληλουχηθεί πλήρως από τους Goffeau et al. 1996 και βρέθηκε ότι περιέχει περίπου 6000 γονίδια, με πλέον του 90% αυτών να κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Επιπλέον, αποτελεί ένα πολύτιμο είδος για ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές εξαιτίας του γεγονότος ότι, ακόμη και υπό αερόβιες συνθήκες, δεν χρησιμοποιεί τον αναπνευστικό μηχανισμό για να μεταβολίσει τους

σακχαρίτες και να επιτύχει την ανάπτυξη της βιομάζας, αλλά, αντίθετα, παράγει αιθανόλη και άλλες ενώσεις δύο ανθράκων, μέσω του πυροσταφυλικού (Borneman & Pretorius, 2015, Pronk et al., 1996, Wood et al., 2001). Κατά συνέπεια παράγει και συσσωρεύει αιθανόλη -η οποία είναι τοξική ή αναστέλλει την ανάπτυξη για τα περισσότερα άλλα μικροβιακά είδη που είναι σε θέση να ανταγωνιστούν μαζί του για τις ενώσεις σακχάρων- και έτσι εξαλείφει τον ανταγωνισμό. Έτσι, είναι σε θέση να προχωρά στην κατανάλωση της παραγόμενης αιθανόλης, εξασφαλίζοντας με τον τρόπο αυτό τη δική του ανάπτυξη. Εκτός από τον βιομηχανικό του ρόλο, της ευκολίας του πολλαπλασιασμού και της καλά καθορισμένης γενετικής του, ο *S. cerevisiae* αποτελεί ένα από τα πιο εντατικά μελετημένα στελέχη μικροοργανισμών και τον πρώτο ευκαρυωτικό μικροοργανισμό για τον οποίο ήταν διαθέσιμη μια πλήρως χαρακτηρισμένη γονιδιωματική αλληλουχία. Η βιοτεχνολογική χρησιμότητα του *S. cerevisiae* έγκειται στα μοναδικά βιολογικά χαρακτηριστικά του, δηλαδή στην ικανότητα ζύμωσης που συνοδεύεται από την παραγωγή αλκοόλης και διοξειδίου του άνθρακα και στην ανθεκτικότητά του σε δυσμενείς συνθήκες οσμωτικότητας και χαμηλού pH. Μεταξύ των σημαντικότερων εφαρμογών που περιλαμβάνουν τη χρήση του είναι αυτές στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών -ιδίως κρασιού- και παραγωγής βιοκαυσίμων (Bauer & Pretorius, 2000, Marsit & Dequin, 2015, Matallana & Aranda, 2016).

Από την αρχή, το περιβάλλον οινοποίησης εκθέτει τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο γλεύκος σταφυλιών σε πολλούς διαφορετικούς τύπους επιλεκτικής πίεσης. Στην πλειονότητα των βιομηχανικών ζυμώσεων προστίθενται επίσης υψηλές συγκεντρώσεις του αντιοξειδωτικού και αντιμικροβιακού συντηρητικού διοξειδίου του θείου που εντείνουν τις συνθήκες πίεσης για τους παρόντες μικροοργανισμούς, ενώ, καθώς η ζύμωση προχωρά, το στρες πολλαπλασιάζεται εξαιτίας των αναερόβιων συνθηκών, της εξάντλησης των αποθεμάτων θρεπτικών ουσιών (άζωτο, λιπίδια και βιταμίνες), των αυξημένων συγκεντρώσεων οξέων, της τοξικότητας της αιθανόλης και των διακυμάνσεις στη θερμοκρασία. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η παρουσία του *S. cerevisiae* σε αμπελώνες ή σταφύλια είναι περιορισμένη, εντούτοις επικρατεί στη ζύμωση κυριαρχώντας έναντι των άλλων ειδών ζύμης που αφθονούν στο φυσικό γλεύκος, καθώς είναι σε θέση να ξεπεράσει όλες τις ιδιαιτερότητες της ζύμωσης (Cordente et al., 2012, Marsit & Dequin, 2015, Matallana & Aranda, 2016, Swiegers et al., 2016).

Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο και αποτελεί το κύριο εργαλείο της οиноβιομηχανίας παγκοσμίως, ενώ ένα άλλο σύνολο κριτηρίων για την επιτυχή επιλογή μιας καλλιέργειας εκκίνησης στη βιομηχανία είναι τα επίπεδα παραγωγής μεταβολιτών που σχηματίζουν το "μπουκέτο της ζύμωσης" και καθορίζουν τον σύνθετο χαρακτήρα του παραγόμενου οίνου, όπου η συγκεκριμένη ζύμη θεωρείται υπεύθυνη για τον σχηματισμό πέραν της αλκοόλης, εστέρων και αλδεϋδών εντός του σώματος του οίνου (Bauer & Pretorius, 2000, Swiegers et al., 2016). Συγκεκριμένα, οι εστέρες θεωρούνται μια από τις πλέον επιθυμητές ομάδες μεταξύ των υπόλοιπων συστατικών του κρασιού, αφού προσδίδουν το ιδιαίτερο άρωμα της εκάστοτε ποικιλίας. Ο *S. cerevisiae* συνθέτει δύο κύριες ομάδες εστέρων κατά τη ζύμωση, δηλαδή τους οξικούς εστέρες των ανώτερων αλκοολών (οξικός αιθυλεστέρας, οξικός ισοαμυλεστέρας, οξικός ισοβουτυλεστέρας, ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας) και τους αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας, όπως ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας, ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας και ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (Eldarov et al., 2016, Mina & Tsaltas, 2017) .

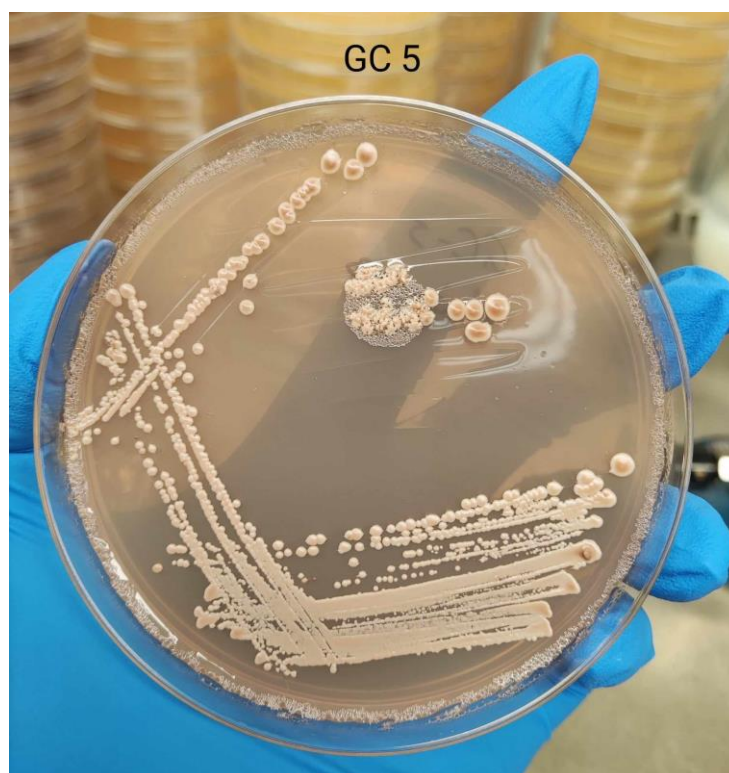
Παρακάτω φαίνονται τα 10 επιλεγμένα απομονωμένα στελέχη κατά την ανάπτυξή τους σε τρυβλία.



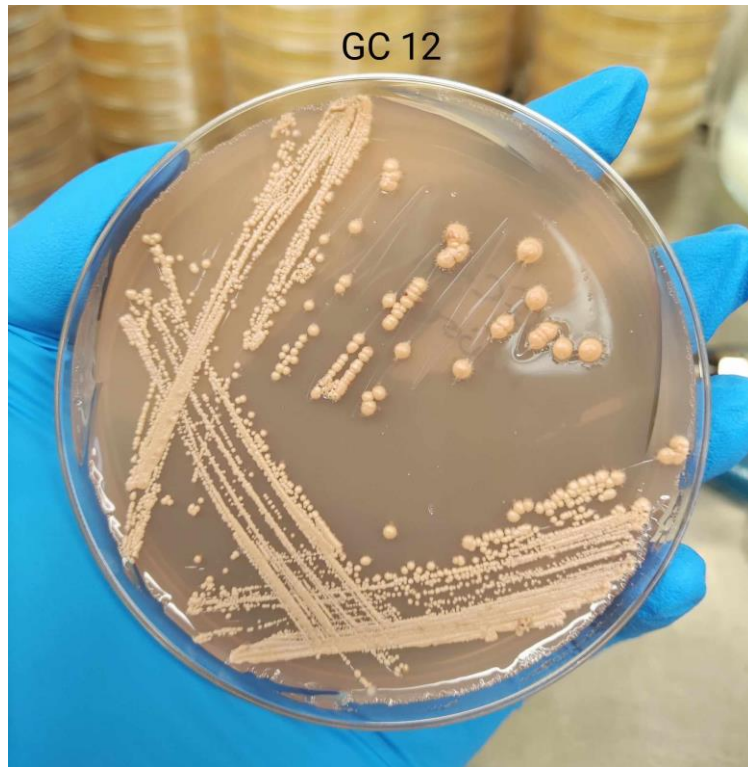
Εικόνα 6: Ανάπτυξη του GC 4 σε τρυβλίο.



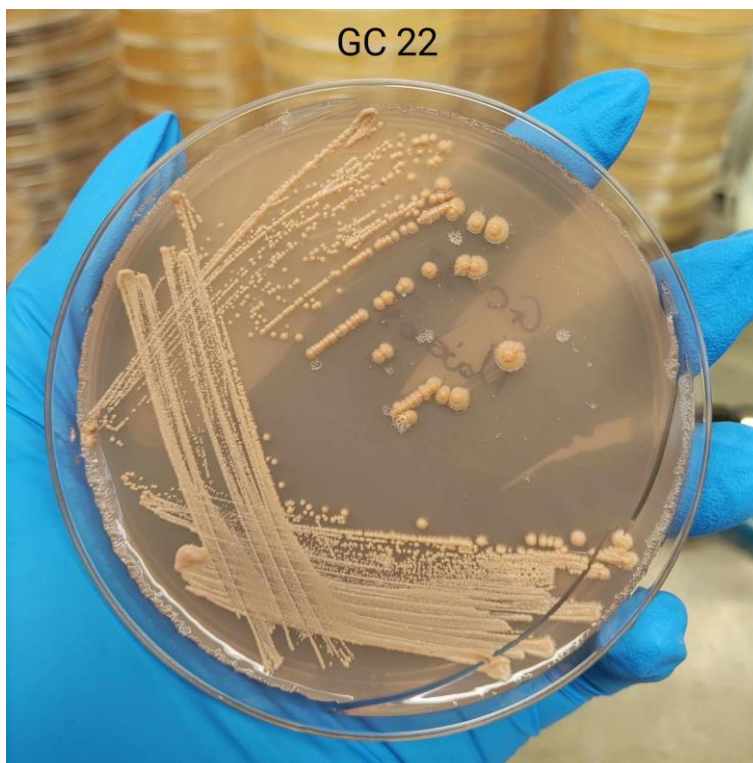
Εικόνα 7: Ανάπτυξη του GC 25 σε τρυβλίο.



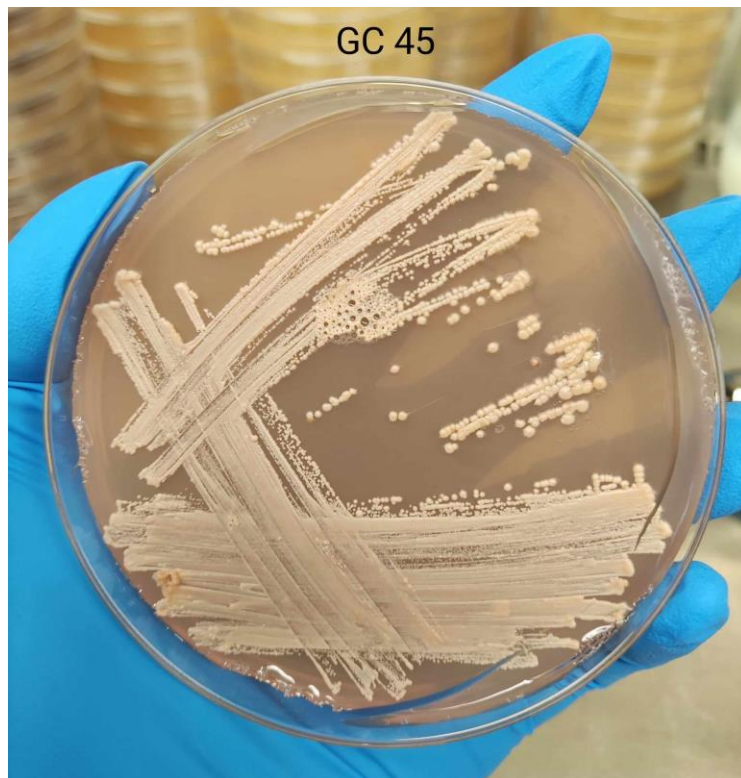
Εικόνα 8: Ανάπτυξη του GC 5 σε τρυβλίο.



Εικόνα 9: Ανάπτυξη του GC 12 σε τρυβλίο.



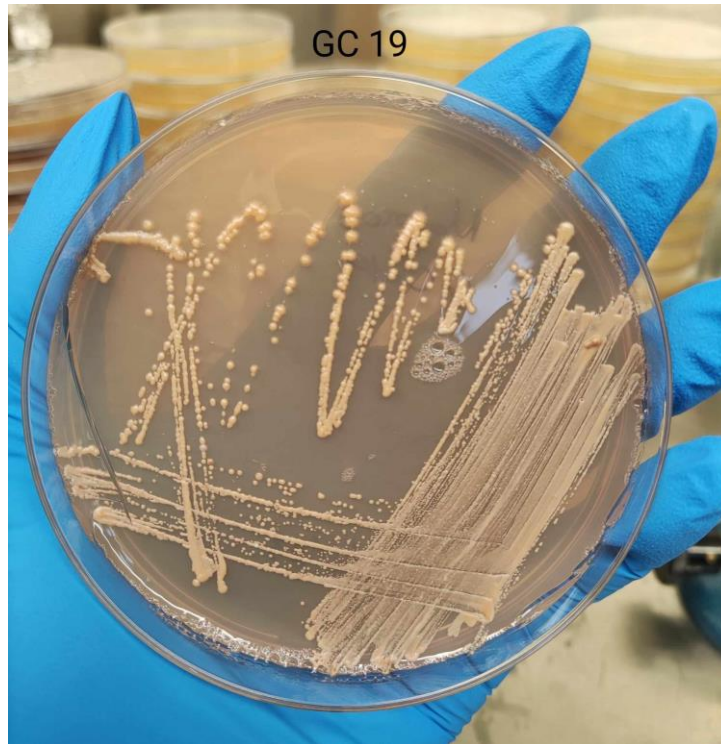
Εικόνα 10: Ανάπτυξη του GC 22 σε τρυβλίο.



Εικόνα 11: Ανάπτυξη του GC 45 σε τρυβλίο.



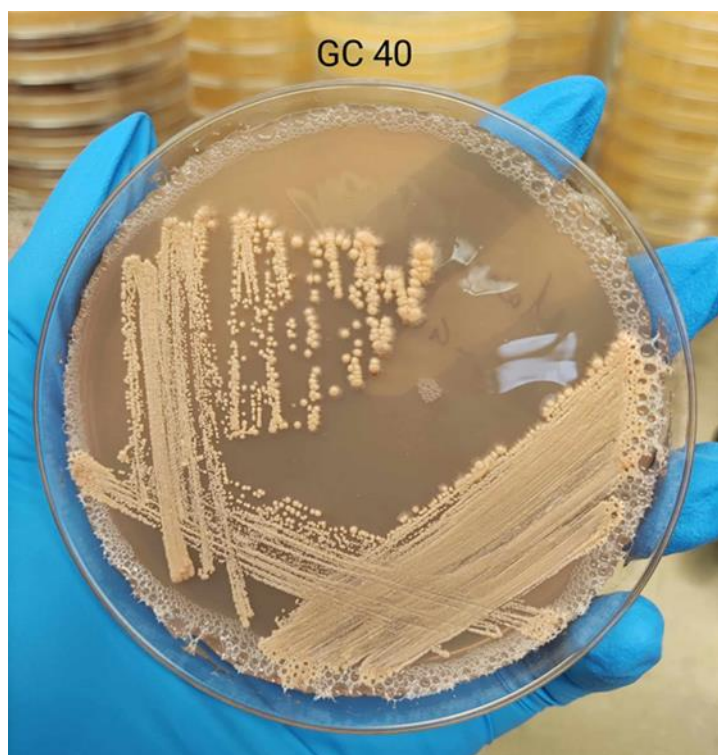
Εικόνα 12: Ανάπτυξη του GC 32 σε τρυβλίο.



Εικόνα 13: Ανάπτυξη του GC 19 σε τρυβλίο.



Εικόνα 14: Ανάπτυξη του GC 44 σε τρυβλίο.

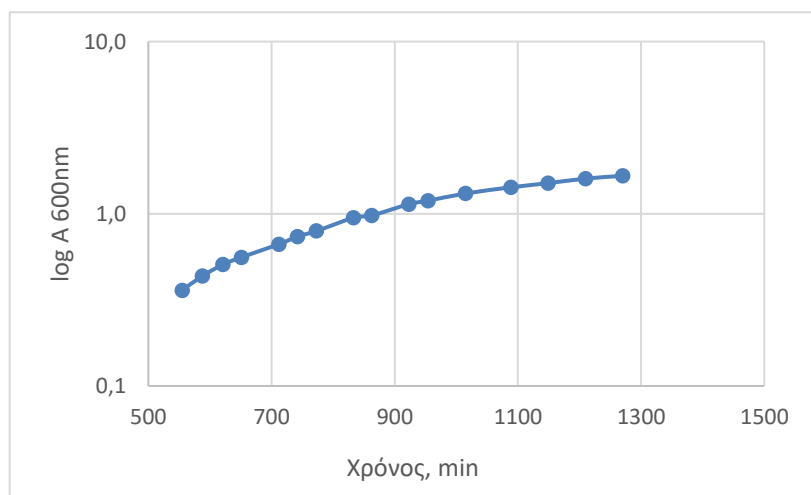
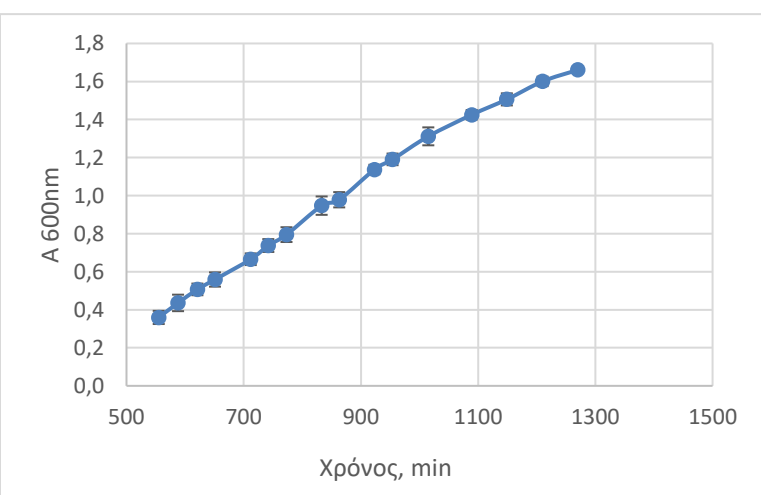


Εικόνα 15: Ανάπτυξη του GC 40 σε τρυβλίο.

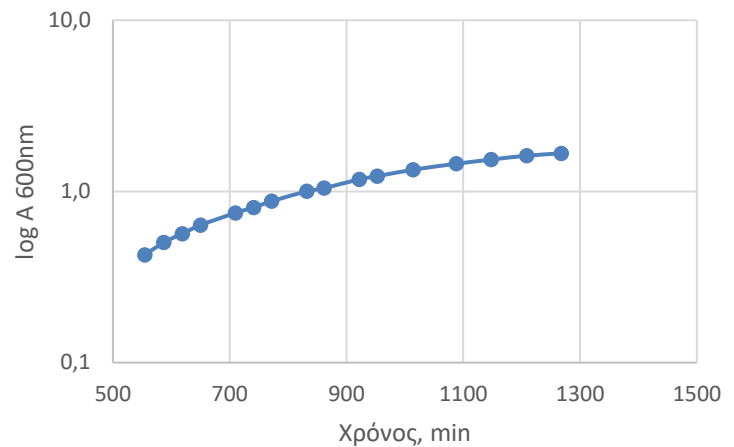
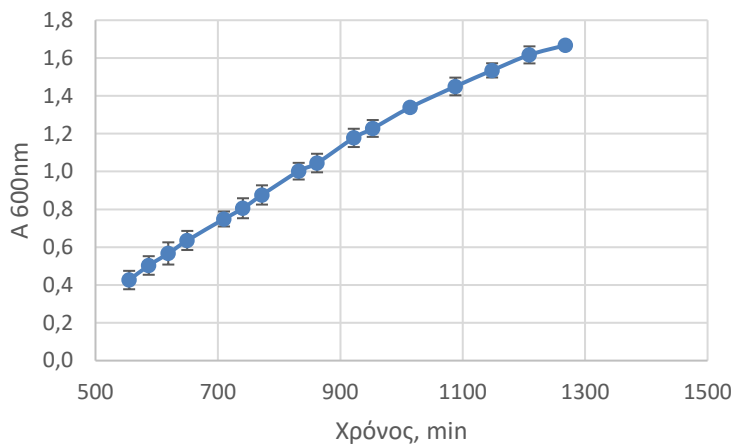
3.3. Ανάπτυξη στελεχών ζυμομυκήτων

3.3.1. Καμπύλες ανάπτυξης στελεχών ζυμομυκήτων

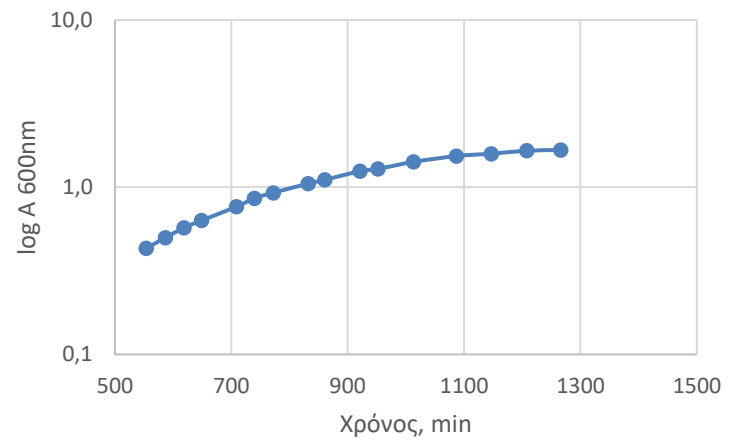
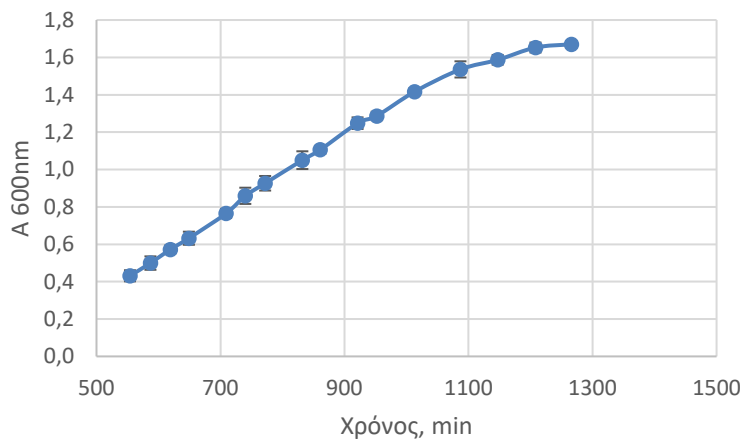
Επιλέχθηκαν 10 από τα απομονωμένα στελέχη τα οποία παρουσίαζαν μορφολογικές διαφορές από τα υπόλοιπα με σκοπό την διερεύνηση της καμπύλης ανάπτυξης. Για την εύρεση των καμπυλών ανάπτυξης των στελεχών εκτιμήθηκε φωτομετρικά η ανάπτυξη τους στα 600nm. Για το κάθε στέλεχος πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Παρακάτω φαίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης για το κάθε στέλεχος στις οποίες παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις.



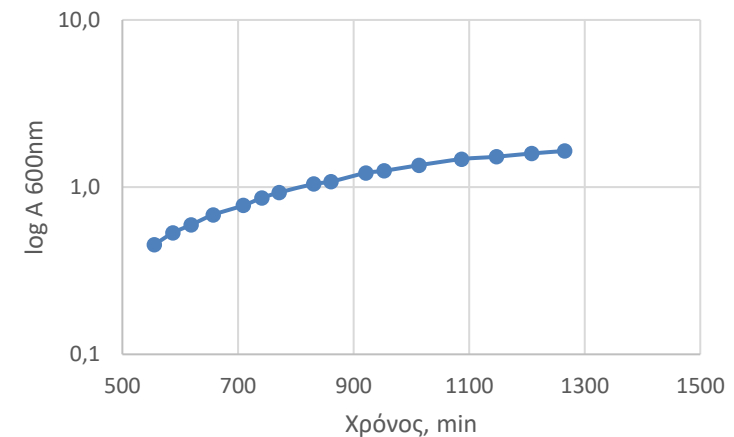
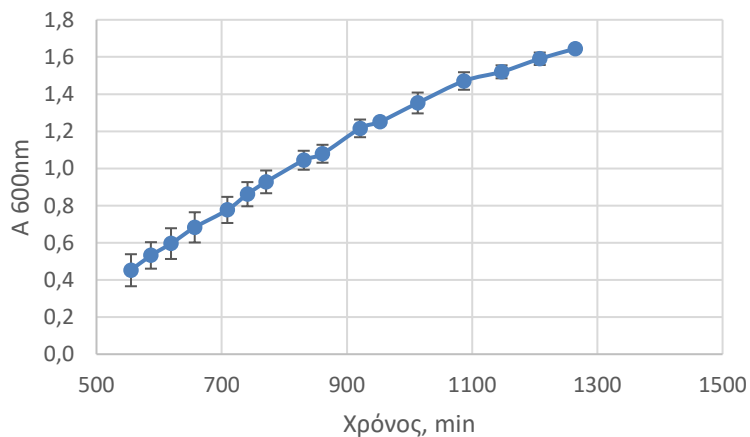
Γράφημα 1: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae* GC 22. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων (και στα δύο) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις (μόνο αριστερά).



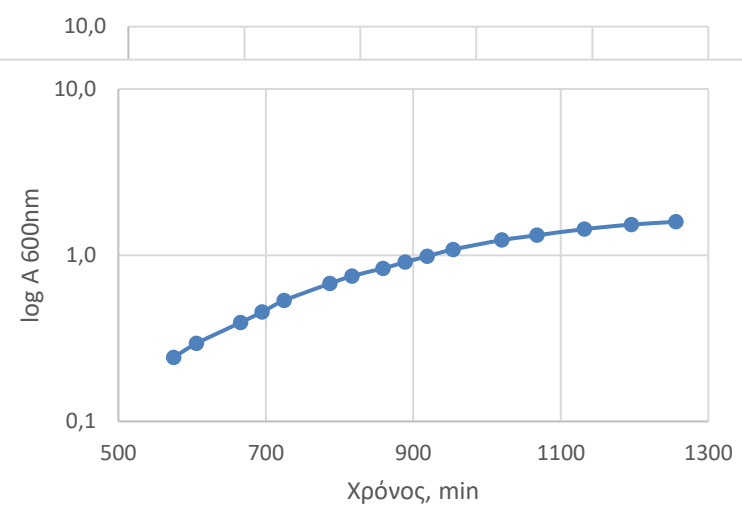
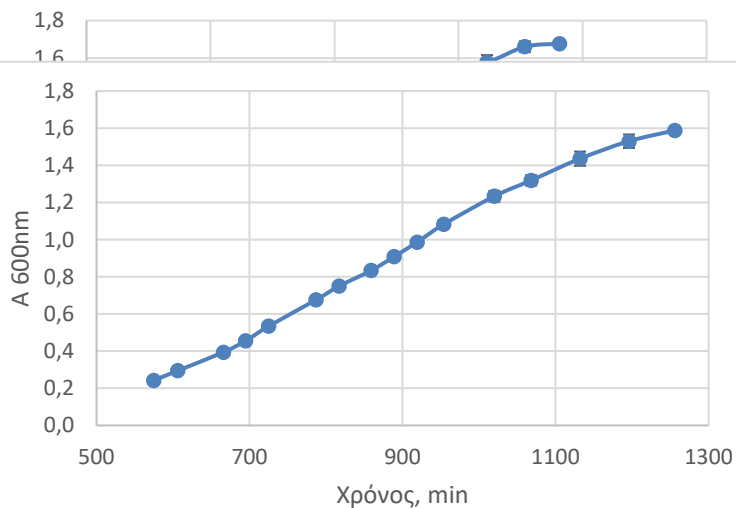
Γράφημα 2: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae* GC 25. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων (και στα δύο) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις (μόνο αριστερά).



Γράφημα 3: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae* GC 32. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων (και στα δύο) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις (μόνο αριστερά).

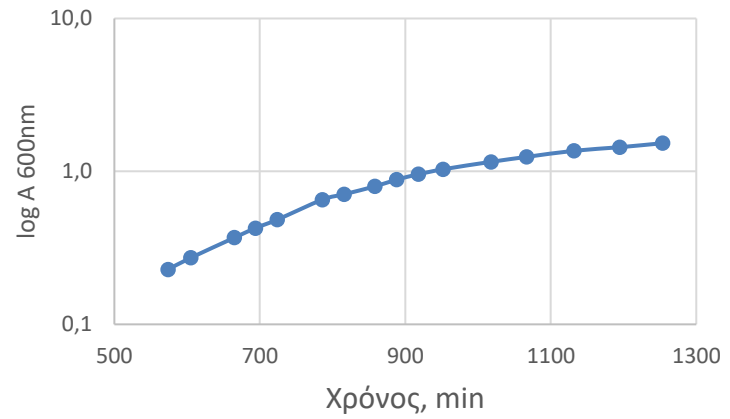
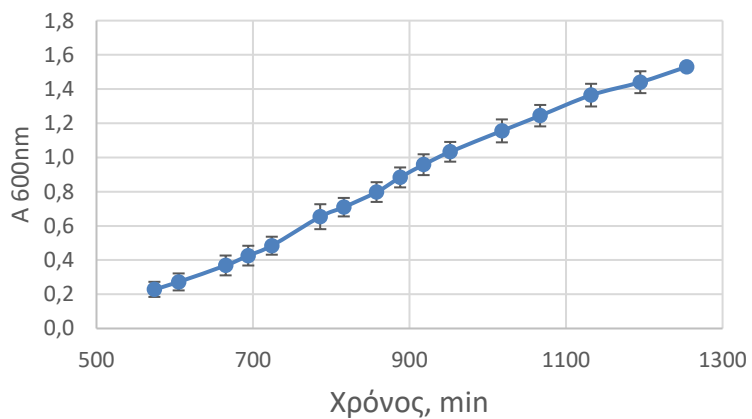


Γράφημα 4: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae* GC 4. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων (και στα δύο) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις (μόνο αριστερά).

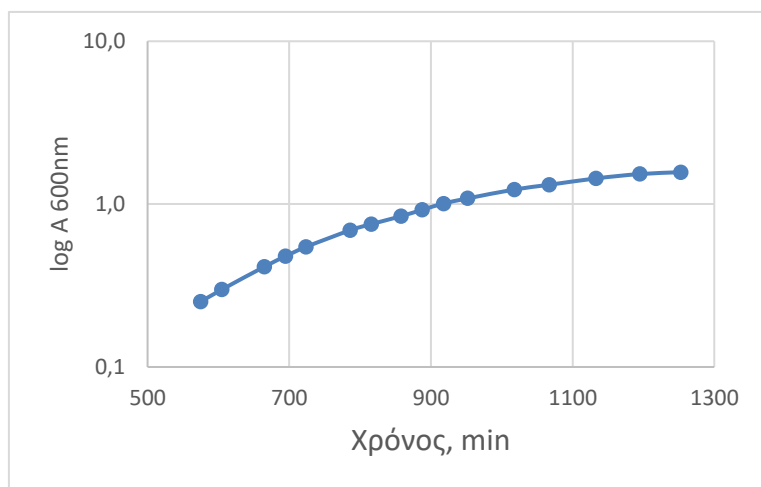
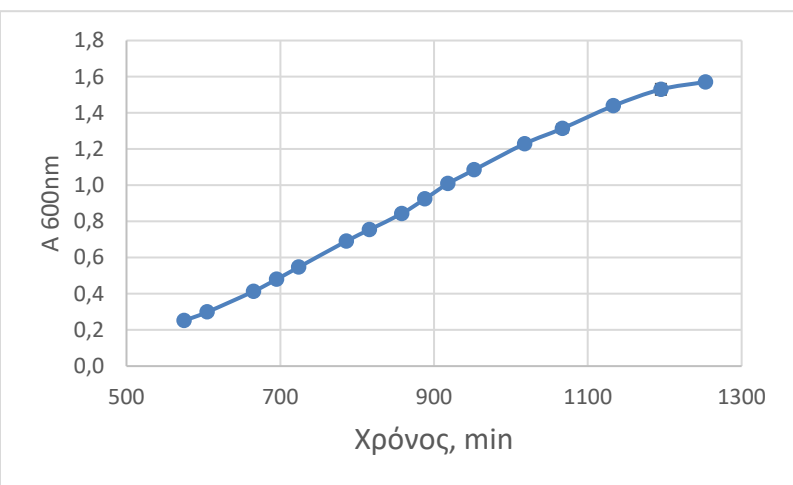


Γράφημα 5: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae* GC 5. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων (και στα δύο) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις (μόνο αριστερά).

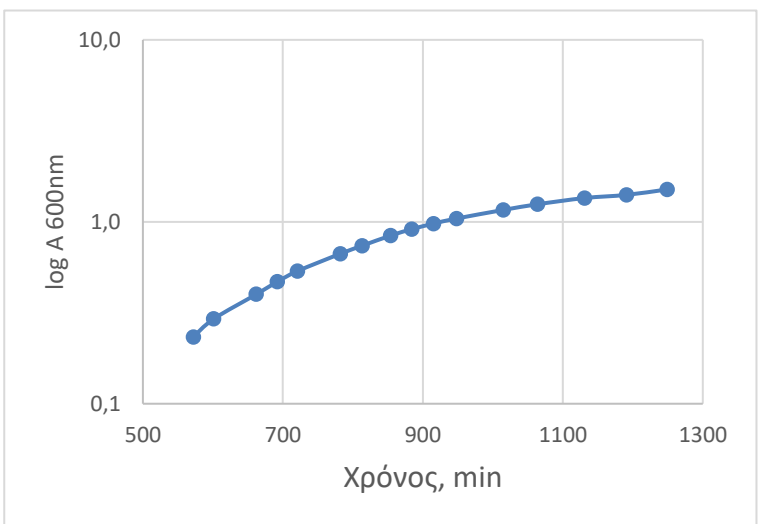
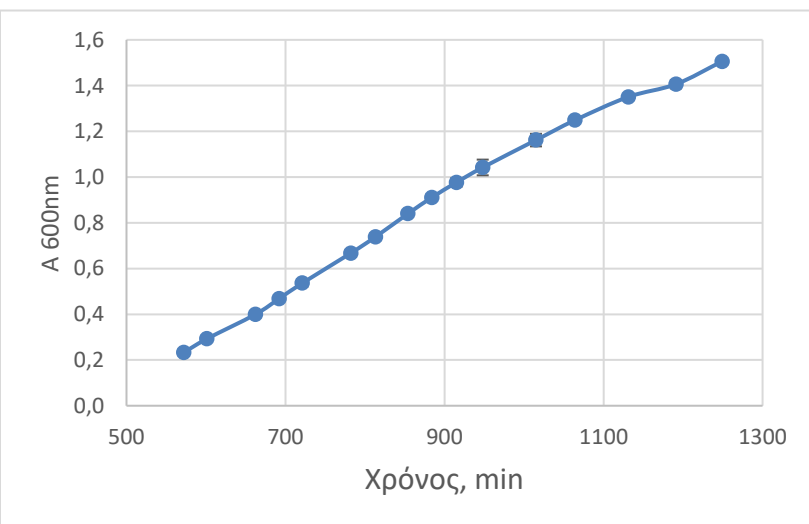
Γράφημα 6: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae* GC 12. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων (και στα δύο) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις (μόνο αριστερά).



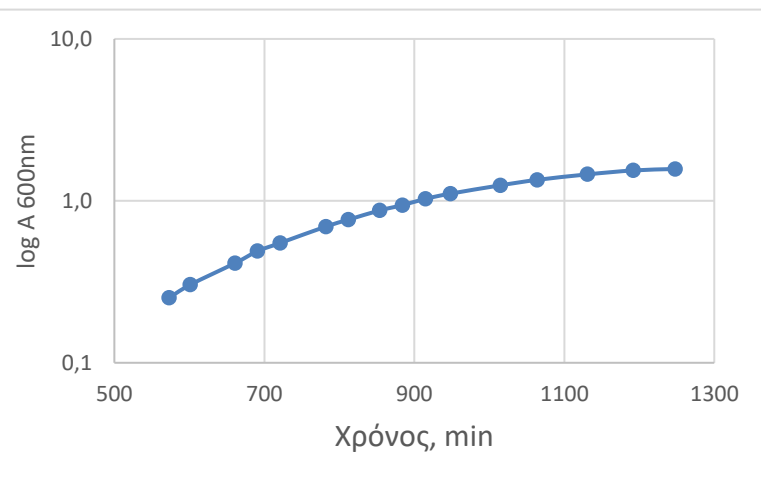
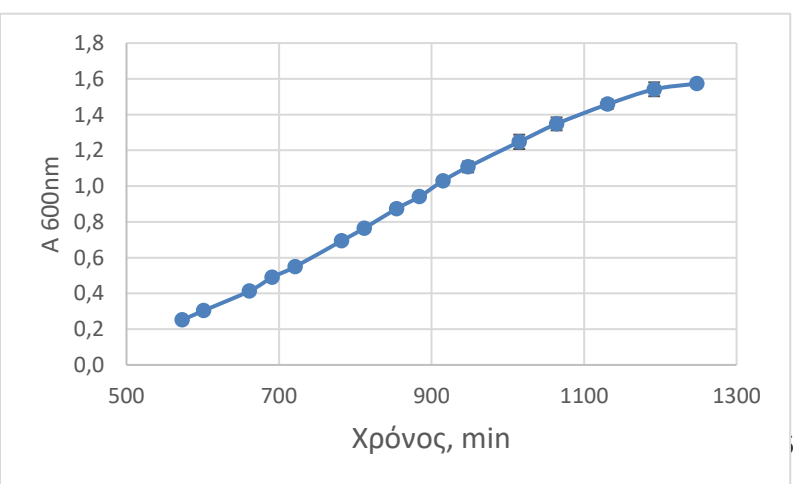
Γράφημα 7: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae* GC 19. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων (και στα δύο) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις (μόνο αριστερά).



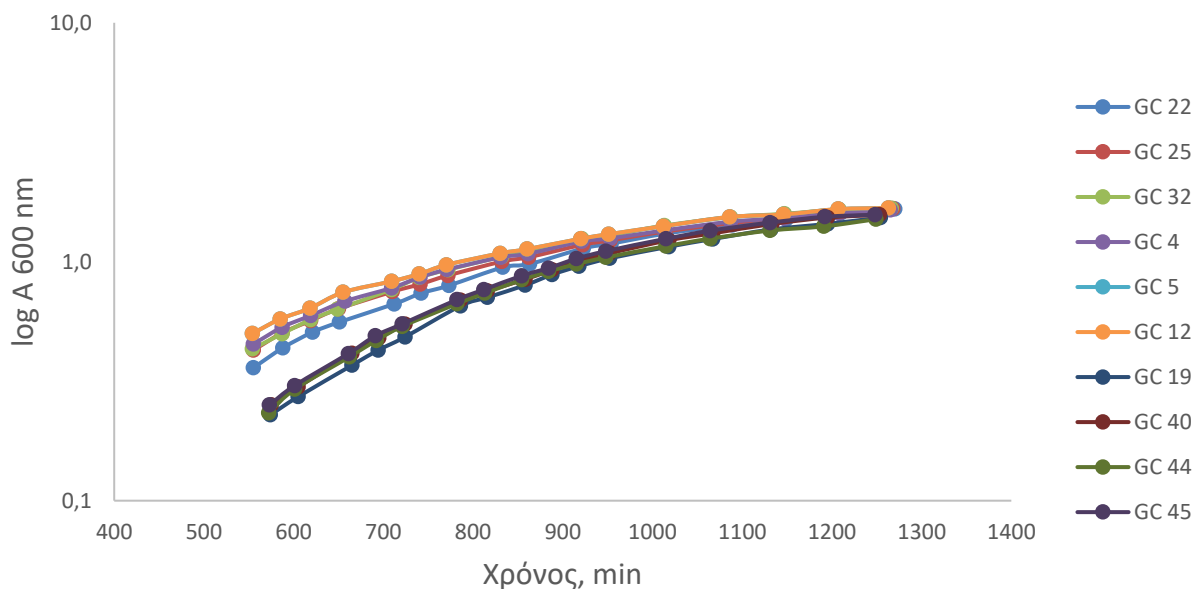
Γράφημα 8: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae* GC 40. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων (και στα δύο) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις (μόνο αριστερά).



Γράφημα 9: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae* GC 44. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων (και στα δύο) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις (μόνο αριστερά).



Γράφημα 10: Καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae* GC 45. Παρουσιάζονται οι μέσοι



όροι των 3 επαναλήψεων (και στα δύο) καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις (μόνο αριστερά).

Γράφημα 11: Καμπύλες ανάπτυξης των 10 επιλεγμένων στελεχών *S. cerevisiae*. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων.

Παρατηρήθηκε ότι τα απομονωμένα στελέχη έπειτα από 8 με 9 ώρες από τον εμβολιασμό τους βρίσκονταν στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους. Στα γραφήματα μπορούν να διακριθούν οι εκθετικές φάσεις για το κάθε στέλεχος. Γίνεται επίσης φανερό ότι περίπου 21 ώρες από την στιγμή του εμβολιασμού τους όλα τα στελέχη μετέβησαν στη φάση στασιμότητας.

3.3.2. Χρόνος διπλασιασμού και ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στελεχών ζυμομυκήτων

Από τα δεδομένα που προέκυψαν από τις καμπύλες ανάπτυξης υπολογίστηκαν ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ) καθώς και ο χρόνος διπλασιασμού (t_d) των 10 επιλεγμένων στελεχών ζυμομυκήτων.

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ) εκφράζει τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων ανά κύτταρο ανά μονάδα χρόνου. Αρχικά, από τις τιμές των απορροφήσεων των 3 επαναλήψεων για το κάθε στέλεχος, υπολογίστηκε η κλίση (slope). Για την κάθε επανάληψη επιλέχθηκαν τα δύο σημεία που αντιστοιχούν στην μέγιστη κλίση (max slope) διότι όσο μεγαλύτερη είναι η κλίση τόσο μεγαλύτερος είναι και ο ρυθμός ανάπτυξης κατά την εκθετική αύξηση.

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ) υπολογίστηκε μαθηματικά χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$\mu = \frac{2.303 (\log X - \log X_0)}{\Delta t}$$

όπου:

- ✓ Δt , ο χρόνος της ανάπτυξης που επιλέχθηκε
- ✓ X , η τελική τιμή της απορρόφησης που επιλέχθηκε
- ✓ X_0 , η αρχική τιμή της απορρόφησης που επιλέχθηκε (Madigan et al., 2021; Ντούγιας et al., 2012).

Ο χρόνος διπλασιασμού είναι ο χρόνος που απαιτείται για να διπλασιαστεί ένας μικροβιακός πληθυσμός και εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το είδος του μικροοργανισμού. Είναι αντιστρόφως ανάλογος του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ενός μικροβιακού πληθυσμού. Ο υπολογισμός του χρόνου διπλασιασμού (t_d) του πληθυσμού των στελεχών ζυμομυκήτων υπολογίστηκε από την εξίσωση:

- Ο χρόνος διπλασιασμού (t_d) υπολογίστηκε μαθηματικά χρησιμοποιώντας την εξίσωση $t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$
- ✓ όπου μ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (Madigan et al., 2021; Ντούγιας et al., 2012).

Πίνακας 3: Χρόνος διπλασιασμού και ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στελεχών ζυμομυκήτων. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις.

Στέλεχος	Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μ (min^{-1})	Χρόνος διπλασιασμού t_d (min)
GC 4	0,004 $\pm$ 0,0003 (a)	174 $\pm$ 14,4 (a)
GC 5	0,005 $\pm$ 0,0005 (a)	155,4 $\pm$ 16,8 (a)
GC 12	0,004 $\pm$ 0,001 (a)	204,6 $\pm$ 42 (a)

GC 19	0,004±0,0007 (a)	178,8±24 (a)
GC 22	0,003±0,0002 (a)	220,8±15 (a)
GC 25	0,004±0,0007 (a)	177±26,4 (a)
GC 32	0,004±0,0003 (a)	175,2±13,8 (a)
GC 40	0,003±0,0002 (a)	237,6±7,8 (a)
GC 44	0,004±0,0008 (a)	194,4±37,2 (a)
GC 45	0,003±0,0002 (a)	208,8±6,6 (a)

Απουσία κοινού γράμματος υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά για $p < 0,05$ κατά την εφαρμογή ANOVA (Duncan's multiple range test). Η ανάλυση έγινε με χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics V. 26 σε Windows 11.

Όπως γίνεται φανερό το στέλεχος GC 5 έχει τον μικρότερο χρόνο διπλασιασμού και τον μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης γεγονός που το καθιστά το γρηγορότερο στέλεχος. Αντιθέτως το GC 40 έχει τον μεγαλύτερο χρόνο διπλασιασμού γεγονός που το καθιστά το αργότερο στέλεχος. Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στα 10 στελέχη δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

3.3.3. Κλίση ανάπτυξης στελεχών

Όσον αφορά την εκθετική φάση ανάπτυξης, στις καμπύλες ανάπτυξης λήφθηκαν τα 4 πρώτα χρονικά σημεία (μετά από δοκιμές) από κάθε επανάληψη και για κάθε στέλεχος και προστέθηκε στα γραφήματα γραμμική γραμμή τάσης για να φανεί αν οι καμπύλες ακολουθούν εξίσωση ευθείας, με R-τετράγωνο σχεδόν 1. Έτσι, στο γράφημα της κάθε επανάληψης του κάθε στελέχους προέκυψε μια εξίσωση του τύπου $y = ax + \beta$ με R-τετράγωνο. Στην εξίσωση το a είναι η κλίση της ευθείας. Συνεπώς από τα γραφήματα της κάθε επανάληψης για όλα τα στελέχη προέκυψαν οι μέσοι όροι της κλίσης και του R-τετράγωνο καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις.

Πίνακας 4: Κλίση ανάπτυξης στελεχών κατά την εκθετική φάση. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις.

Στέλεχη	Μ. Ο. κλίσης	Μ. Ο. R-τετράγωνο
GC 4	0,0022±5,77E-05 (ef)	0,9942±0,0062
GC 5	0,0024±0,0002 (f)	0,9904±0,0118
GC 12	0,0018±5,77E-05 (ab)	0,9972±0,0005
GC 19	0,0016±0,0002 (a)	0,9964±0,0003
GC 22	0,0021±0 (cde)	0,9929±0,0086
GC 25	0,0022±0,0002 (def)	0,998±0,0009
GC 32	0,0021±0,0002 (cde)	0,993±0,0036
GC 40	0,0019±0 (bc)	0,9959±0,0021
GC 44	0,002±0,0002 (bcd)	0,9932±0,0043
GC 45	0,002±0,0001 (bcd)	0,9941±0,0048

Απουσία κοινού γράμματος υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά για $p < 0,05$ κατά την εφαρμογή ANOVA (Duncan's multiple range test). Η ανάλυση έγινε με χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics V. 26 σε Windows 11.

Όσον αφορά αυτά τα αρχικά σημεία, τα στελέχη βρίσκονται ήδη στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους και η μεγαλύτερη κλίση υποδηλώνει μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης. Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα την μεγαλύτερη κλίση την έχει το GC 5. Συνεπώς έχει τον μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης, γεγονός που συνάδει και με τα προηγούμενα δεδομένα αφού φάνηκε να έχει τον μικρότερο χρόνο διπλασιασμού και τον μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Αντιθέτως την μικρότερη κλίση την έχει το GC 19, άρα και τον μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης.

Όσον αφορά την φάση στασιμότητας, στις καμπύλες ανάπτυξης λήφθηκαν τα 2 τελευταία χρονικά σημεία (μετά από δοκιμές) από κάθε επανάληψη και για κάθε στέλεχος και προστέθηκε στα γραφήματα γραμμική γραμμή τάσης για να φανεί αν οι καμπύλες ακολουθούν εξίσωση ευθείας, με R-τετράγωνο σχεδόν 1. Έτσι, στο γράφημα της κάθε επανάληψης του κάθε στελέχους προέκυψε μια εξίσωση του τύπου $y = ax + \beta$ με R-τετράγωνο. Στην εξίσωση το a είναι η κλίση της ευθείας. Συνεπώς από τα γραφήματα της κάθε επανάληψης για όλα τα στελέχη προέκυψαν οι μέσοι όροι της κλίσης και του R-τετράγωνο καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ακολουθείται εξίσωση ευθείας με κλίση που τείνει στο μηδέν. Έτσι, όσον αφορά τα τελευταία σημεία η μικρότερη κλίση δείχνει ότι πιθανόν είναι στη φάση στασιμότητας. Ωστόσο κάποια στελέχη μπορεί να φτάνουν και νωρίτερα στη φάση στασιμότητας.

Πίνακας 5: Κλίση ανάπτυξης στελεχών κατά τη φάση στασιμότητας. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις.

Στελέχη	Μ. Ο. κλίσης	Μ. Ο. R-τετράγωνο
GC 4	0,0009±0,0003	1±0
GC 5	0,0003±0,0006	1±0
GC 12	0,001±0,0002	1±0
GC 19	0,0013±5,77E-05	0,9933±0,006
GC 22	0,001±0,0002	1±0
GC 25	0,0008±0,0002	1±0
GC 32	0,0003±0	1±0
GC 40	0,0007±0,0002	1±0
GC 44	0,001±0,0001	0,9677±0,025
GC 45	0,0006±0,0003	1±0

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα όλα τα στελέχη έχουν κλίση που τείνει στο μηδέν οπότε συμπεραίνεται ότι βρίσκονται στην φάση στασιμότητας σε αυτά τα 2 τελευταία χρονικά σημεία. Μάλιστα το GC 19 και το GC 44 φτάνουν νωρίτερα στη φάση στασιμότητας δηλαδή στο 3^ο από το τέλος χρονικό σημείο.

Τέλος, όσον αφορά τη φάση προσαρμογής οι τιμές της απορρόφησης του πρώτου χρονικού σημείου είναι ενδεικτικοί του πόσο γρήγορα ή αργά ξεκινάει η ανάπτυξη. Διαφορές στις τιμές αυτές μπορεί να σηματοδοτούν στελέχη που αναπτύσσονται πιο γρήγορα στην αρχή, δηλαδή έχουν μικρότερο χρόνο επώασης.

Πίνακας 6: Απορροφήσεις ανάπτυξης στελεχών στο αρχικό στάδιο. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 3 επαναλήψεων καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις.

Στέλεχος	Μ. Ο. αρχικής απορρόφησης
GC 4	0,452±0,078
GC 5	0,501±0,024
GC 12	0,242±0,011
GC 19	0,229±0,034
GC 22	0,360±0,032
GC 25	0,426±0,043
GC 32	0,431±0,020
GC 40	0,252±0,009
GC 44	0,233±0,030
GC 45	0,252±0,001

Όπως γίνεται αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα, την μεγαλύτερη τιμή αρχικής απορρόφησης την έχει το GC 5 γεγονός που συνάδει και με τα προηγούμενα δεδομένα αφού φάνηκε να έχει τον μικρότερο χρόνο διπλασιασμού και τον μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Σχετικά υψηλές αρχικές τιμές έχουν και τα GC 4, GC 25 και GC 32. Αυτά τα τέσσερα στελέχη φαίνεται να προσαρμόζονται πιο άμεσα και πιθανόν να αρχίζουν τη ζύμωση πιο γρήγορα και αυτό είναι σημαντικό καθώς έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να γίνουν κυρίαρχα στελέχη στη ζύμωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- 1) Πραγματοποιήθηκε αρχική απομόνωση 49 στελεχών. Με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών επιλέχθηκαν 10 για μελέτη της ανάπτυξής τους.
- 2) Επιπλέον, με την εφαρμογή συγκεκριμένων τεχνικών πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή DNA και η τελική ταυτοποίηση των ζυμομυκήτων. Έτσι, αποδείχθηκε ότι τα 10 επιλεγμένα αυτόχθονα στελέχη ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν ήταν όλα *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3) Τα 10 επιλεγμένα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με γλεύκος και μελετήθηκε η ανάπτυξή τους. Όλα βρίσκονταν σε εκθετική φάση στις 9 ώρες και σε φάση στασιμότητας στις 21 ώρες.
- 4) Τα ευρήματα αυτά επισημαίνουν το βιοτεχνολογικό δυναμικό αυτών των αυτόχθονων στελεχών ζυμομυκήτων από σταφυλόμαζα με πιθανή χρήση τους στην παραγωγή τσίπουρου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

1. Bagheri, B., Bauer, F. F., Cardinali, G., & Setati, M. E. (2020). Ecological interactions are a primary driver of population dynamics in wine yeast microbiota during fermentation. *Scientific reports*, 10(1), 4911.
2. Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2012a). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food. Microbiol.* 153:243–259.
3. Bauer, F. F., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1), 27–51.
4. Bisson, L.F., Joseph, C.M.L., Domizio, P. (2017). Yeasts. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (eds) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Cham.
5. Borneman, A. R., & Pretorius, I. S. (2015). Genomic Insights into the *Saccharomyces sensu stricto* Complex.
6. Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (2013). *Principles and practices of winemaking*. Springer Science & Business Media.
7. Buja, L. M. (2022), 'The history, science, and art of wine and the case for health benefits: perspectives of an oenophilic cardiovascular pathologist', *Cardiovascular Pathology* 60, 107446.
8. Buxaderas, S. and López-Tamames, E. (2012), Chapter 1 - Sparkling Wines: Features and Trends from Tradition, in Jeyakumar Henry, ed., *Academic*

Press, , pp. 1-45.

9. Caboni, P. and Cabras, P. (2010), Chapter 2 - Pesticides' Influence on Wine Fermentation, in Steve L. Taylor, ed., Academic Press, pp. 43-62.
10. Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS yeast research*, 10(2), 123-133.
11. 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', *International Journal of Food Microbiology* 99(3), 237-243.
12. Cordente, A. G., Curtin, C. D., Varela, C., & Pretorius, I. S. (n.d.). Flavour-active wine yeasts.
13. Eldarov MA, Kishkovskaia SA, Tanaschuk TN, Mardanov AV (2016). Genomics and Biochemistry of Saccharomyces cerevisiae Wine Yeast Strains. *Biochemistry (Mosc)*. Dec;81(13),1650-1668.
14. Englezos, V., Jolly, N. P., Di Gianvito, P., Rantsiou, K. and Cocolin, L. (2022), 'Microbial interactions in winemaking: Ecological aspects and effect on wine quality', *Trends in Food Science & Technology* 127, 99-113.
15. Gianvito, P. D., Englezos, V., Rantsiou, K. and Cocolin, L. (2022), 'Bioprotection strategies in winemaking', *International Journal of Food Microbiology* 364, 109532.
16. Gil-Serna, J., Vázquez, C., González-Jaén, M. T. and Patiño, B. (2018), 'Wine Contamination with Ochratoxins: A Review', *Beverages* 4(1).
17. Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546–567.
18. Grainger, K. (2013), 'Understanding wine technology – the science of wine explained, third edition', *Journal of Wine Research* 24(2), 156-160.
19. James, A., Yao, T., Ke, H. and Wang, Y. (2023), 'Microbiota for production of wine with enhanced functional components', *Food Science and Human Wellness* 12(5), 1481-1492.
20. Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS yeast*

- research*, 14(2), 215-237.
21. Kačániová, M., Kunová, S., Sabo, J., Ivanišová, E., Žiarovská, J., Felsöciová, S., & Terentjeva, M. (2020). Identification of yeasts with mass spectrometry during wine production. *Fermentation*, 6(1), 5.
 22. Kassemeyer, H. H. (2017). Fungi of grapes. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine*, 103-132.
 23. La Placa, L., Tsitsigiannis, D., Camardo Leggieri, M. and Battilani, P. (2023), 'From Grapes to Wine: Impact of the Vinification Process on Ochratoxin A Contamination', *Foods* 12(2).
 24. Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Pateraki, C., Koulougliotis, D., Eriotou, E. and Kopsahelis, N. (2020), 'Indigenous yeasts: emerging trends and challenges in winemaking', *Current Opinion in Food Science* 32, 133-143.
 25. Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P. and Alexandre, H. (2017), 'Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(4), 856-873.
 26. Madigan, M., Aiyer, J., Buckley, D., Sattley, W. and Stahl, D. (2021), *Brock Biology of Microorganisms, Global Edition*, Pearson Education.
 27. Malfeito-Ferreira, M., Silva, A.C. (2019). Spoilage Yeasts in Wine Production. In: Romano, P., Ciani, M., Fleet, G. (eds) *Yeasts in the Production of Wine*. Springer, New York, NY.
 28. Mane, S. S., Ghormade, V., Tupe, S. G. and Deshpande, M. V. Tulasi Satyanarayana and Gotthard Kunze, ed., (2017), *Diversity of Natural Yeast Flora of Grapes and Its Significance in Wine Making*, Springer Singapore, Singapore, pp. 1--27.
 29. Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, 15, 67.
 30. Matallana, E., & Aranda, A. (2016). Biotechnological impact of stress response on wine yeast.
 31. Mendoza, L. M., Vega-Lopez, G. A., Fernández de Ullivarri, M., & Raya, R. R. (2019). Population and oenological characteristics of non-*Saccharomyces* yeasts associated with grapes of Northwestern Argentina. *Archives of microbiology*, 201, 235-244.
 32. Mina M, Tsaltas D. (2017). Contribution of yeast in wine aroma and flavour.

Yeast - industrial applications.

33. Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 265-286.
34. Papathanasiou, I., Selvagini, R., Servili, M., Vaughan-Martini, A., & Roussis, I. G. (2006). Winemaking ability of wild yeast strains and comparative volatile profiles of wines fermented at 12° or 20° C. *Food science and technology research*, 12(3), 194-198.
35. Pretorius, I.S. (2016). Conducting Wine Symphonics with the Aid of Yeast Genomics. *Beverages*. 2(4):36.
36. Pronk, J. T., Yde, H., & Van Dijkent, J. P. (1996). Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. 12, 1607–1633.
37. Rainieri, S., Zambonelli, C., & Kaneko, Y. (2003). *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, Genetic Diversity and Evolution. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 96(1), 9.
38. Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. L. I. N. E. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 316-327.
39. Russo, P., Berbegal, C., De Ceglie, C., Grieco, F., Spano, G. and Capozzi, V. (2019), 'Pesticide Residues and Stuck Fermentation in Wine: New Evidences Indicate the Urgent Need of Tailored Regulations', *Fermentation* 5(1).
40. Steel, C. C., Blackman, J. W., & Schmidtke, L. M. (2013). Grapevine bunch rots: impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(22), 5189-5206.
41. Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H. and Verstrepen, K. J. (2015), 'Brettanomyces yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations', *International Journal of Food Microbiology* 206, 24-38.
42. Swiegers, J. H., Sauerens, S. M. G., & Pretorius, I. S. (2016). Novel yeast strains as tools for adjusting the flavor of fermented beverages to market specifications. *Biotechnology in Flavor Production*, 62–132.
43. Ultee, A., Wacker, A., Kunz, D., Löwenstein, R., & König, H. (2013).

- Microbial succession in spontaneously fermented grape must before, during and after stuck fermentation. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(1), 68-78.
44. Wang R, Sun Q, Chang Q (2015) Soil Types Effect on Grape and Wine Composition in Helan Mountain Area of Ningxia. *PLoS ONE* 10(2): e0116690.
 45. Wood, V., Rutherford, K. M., Ivens, A., Rajandream, M. A., & Barrell, B. (2001). A Re-Annotation of the *Saccharomyces Cerevisiae* Genome. *Comparative and Functional Genomics*, 2(3), 143.
 46. Zamora, F.M. Victoria Moreno-Arribas & M. Carmen Polo, ed. (2009). *Biochemistry of Alcoholic Fermentation*, Springer New York, New York, NY, pp. 3--26.

ΕΛΛΗΝΟΓΛΩΣΣΗ

1. Γρηγορίου, Π. (2011). Παραγωγή και επεξεργασία λευκών αποσταγμάτων κατά ISO 22000 για παραγωγή τσίπουρου και ούζου.
2. Καραδημήτρη, Φ. (2015). Διαδικασία παραγωγής οίνου: στάδια επεξεργασίας, μηχανολογικός εξοπλισμός και σύγχρονες τεχνικές.
3. Κόκκινου, Ε. (2016). Μελέτη της ιχνηλασιμότητας σε προϊόντα τσίπουρου.
4. Μιχαλοπούλου, Α., & Ανδριανοπούλου, Μ. (2008). Καλλιέργεια της αμπέλου και οινοποίηση.
5. Ντούγιας, Σ., Αϊβαζίδης, Α. & Μελίδης, Π. (2012). Περιβαλλοντική μικροβιολογία. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο
6. Οικονομάκος, Γ. (2011). Παρασκευή παλαιωμένου τσίπουρου.
7. Παούρη, Μ. (2016). Τεχνοοικονομική ανάλυση, παρούσα κατάσταση και προοπτικές της ελληνικής ποτοποιίας (τσίπουρο-ηδύποτα).
8. Χρυσίνας, Μ. (2013). Παραγωγή και οινοποίηση των σταφυλιών στην ανατολική Αττική.