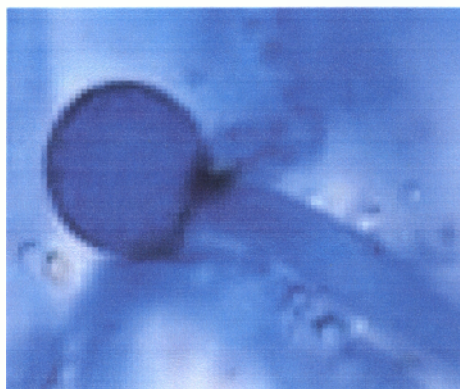


ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ: Ο ΡΟΛΟΣ ΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΙΝΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ.



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΜΑΝΤΟΥΒΑΛΟΥ ΠΑΣΧΑΛΙΑ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΠΕΛΑΓΙΑ ΚΑΤΣΟΥ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Τ Ε Ι Κ Α Λ Α Μ Α Τ Α Σ
Τ Μ Η Μ Α
ΕΚΔΟΣΕΩΝ & ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΙ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ	
1.1 Περιγραφή και θέση των ζυμών στους ζώντες οργανισμούς.....	7
1.2 Η προέλευση των ζυμών.....	8
1.3 Ο πολλαπλασιασμός των ζυμών.....	9
1.4 Η ταξινόμηση των ζυμών.....	11
1.4.1 Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	11
1.4.2 Τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά.....	12
1.5 Η διατροφή των ζυμών.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ	
2.1 Γενικά.....	19
2.2 Εξέλιξη των γενικών αρχών της ταξινόμησης των ζυμών και οριοθέτηση των ειδών.....	20
2.3 Γενικές αρχές ταυτοποίησης των ζυμών.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΖΥΜΕΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	
3.1 Η αλκοολική ζύμωση.....	23
3.2 Οι ζύμες οινοποίησης.....	24
3.3 Η οικολογία των ζυμών σε σταφύλι και κρασί.....	25
3.4 Το φαινόμενο Killer.....	27
3.4.1.Ο ρόλος του φαινομένου Killer στην παραγωγή κρασιού.....	28
3.5 Η ζύμωση των θειωμένων γλευκών.....	29
3.6 Περιγραφή των κυριότερων ζυμών του γλεύκους.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΖΥΜΕΣ ΜΕ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ	
4.1 Οι ζύμες ασθενειών ή επαναζυμώσεων.....	33
4.2 Οι ζύμες επιμολύνσεων ή ζύμες των οινοποιείων.....	34
4.3 Χρήση επιλεγμένων ζυμών.....	35
4.3.1 Παραγωγή επιλεγμένων καλλιεργειών.....	36
4.3.2 Εφαρμογές επιλεγμένων καλλιεργειών.....	36
4.4 Σύγχρονες μελέτες της οικολογίας του <i>S.cerevisiae</i>	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Η ΘΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ	
5.1 Η μηλογαλακτική ζύμωση.....	38
5.2 Τα βακτήρια της μηλογαλακτικής ζύμωσης.....	39
5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων της μηλογαλακτικής ζύμωσης στο κρασί.....	39
5.4 Η επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στη σύσταση του οίνου και οι επιπτώσεις στη ποιότητα του κρασιού.....	40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Η ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

6.1 Γενικά.....	42
6.2 Ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά βακτήρια.....	43
6.3 Η γαλακτική ζύμωση της γλυκερόλης ή πίκραση.....	43
6.4 Η γαλακτική ζύμωση του τρυγικού οξέος ή εκτροπή.....	44
6.5 Η ασθένεια της πάχυνσης.....	45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΤΑ ΟΞΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

7.1 Τα οξικά βακτήρια.....	47
7.2 Η οξική ζύμωση του οίνου.....	47

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....51

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της φοίτησης μου στο Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, στο τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, κατά το χρονικό διάστημα 2002-2008, παρακολουθώντας με ζήλο κάθε κύκλο μαθημάτων, εκείνο που με εντυπωσίασε και κίνησε κάθε ενδιαφέρον μου αναφέρεται στο μάθημα της Οινολογίας διότι αναφέρεται στη έρευνα και εφαρμοσμένη επιστήμη ταυτοχρόνως. Η ευκαιρία που μου δόθηκε να γνωρίσω την επιστήμη της Οινολογίας μέσω του μαθήματος στάθηκε η κινητήριος δύναμη ώστε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία με τίτλο: Ο ΡΟΛΟΣ ΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΙΝΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ.

Με την παρότρυνση, ενθάρρυνση και κατάλληλη καθοδήγηση της υπεύθυνης καθηγητριάς μου για την πτυχιακή κ. Κάτσου Πελαγίας αποφασίσαμε απο κοινού να προχωρήσω στη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας με το συγκεκριμένο θέμα.

Στη προσπάθεια μου αυτή για την μελέτη της μικροβιολογίας των οίνων, αρχικά παραθέτονται κάποια ιστορικά σημεία για την επιστήμη της οινολογίας και την εκκίνηση της κατά τον 19ο αιώνα που συνοδεύεται με την πρόοδο της χημείας και το μεγαλύτερο βήμα της μικροβιολογίας με τις ανακαλύψεις του Pasteur. Την μικροβιολογία των κρασιών όπου μελετά τη συστηματική των μυκήτων και των βακτηρίων, τον προσδιορισμό τους, τους βιοχημικούς και ενζυματικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν. Αναφέρεται στους ζυμομύκητες στην οινολογία, στη προέλευση και πολλαπλασιασμό των ζυμών και ολοκληρώνεται με την ταξινόμηση και διατροφή των ζυμών.

Ακολουθεί αναφορά στη ταξινόμηση και ταυτοποίηση των ζυμών, η εξέλιξη των γενικών αρχών της ταξινόμησης των ζυμών και οριοθέτηση των ειδών.

Αναφέρονται οι ζύμες οينوποίησης. Σημειώνεται η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης και τα στάδια της. Στη συνέχεια γίνεται περιγραφή των κυριότερων ζυμών του οίνου. Παρουσιάζεται η επιτυχία των σταφυλιών και των ζυμών του κρασιού. Τέλος, αναφέρεται στα γαλακτικά βακτήρια και τις αλλοιώσεις που προκαλούν στο κρασί, όπως επίσης και στην επίδραση που των οξικών βακτηρίων.

Το κρασί τόσο κατά το στάδιο της βιομηχανικής του παραγωγής, όσο και μετά το πέρας αυτής, είναι ένα πλήρες, περισσότερο ή λιγότερο, θρεπτικό υπόστρωμα, ικανό να υποστηρίξει την ανάπτυξη ενός πλήθους μικροοργανισμών που ανήκουν στους μύκητες, στις ζύμες και στα βακτήρια.

Διάφορα είδη ζυμών αναπτύσσονται άνετα, ιδίως στο γλεύκος, γιατί είναι ικανά να συνθέτουν τα ίδια αμινοξέα και πρωτεΐνες. Τα βακτήρια όμως που αναπτύσσονται στο γλεύκος και στο κρασί βασίζονται για την ανάπτυξη τους σε πρωτεϊνικές ουσίες. Εκείνα όμως τα βακτήρια που μπορούν να αναπτυχθούν στο γλεύκος και στο κρασί είναι αρκετά να αλλοιώσουν πλήρως το προϊόν, εάν μείνουν ανενόχλητα.

Τα κρασιά ποιότητας είναι επιρρεπή στις αλλοιώσεις κάθε μορφής(μικροβιακής ή όχι)και οφείλουν τους εκλεκτούς οργανοληπτικούς χαρακτήρες στα ελάχιστα υπολείμματα του ζαχάρου, στη μικρή πτητική οξύτητα, στη σχετικά υψηλή τιμή του Ph και στη μικρή περιεκτικότητα τους σε θειώδες οξύ. Ακόμα θα πρέπει να επισημάνουμε ότι οι περισσότερες αλλοιώσεις έχουν την αρχή τους στη διακοπή της ομαλής πορείας της αλκοολικής ζυμώσεως.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι και οι ευγενείς ζύμες είναι δυνατόν να δημιουργήσουν, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, προβλήματα κατά την εμφιάλωση και εμπορία κρασιών ποιότητας οι οποίες είναι ανθεκτικές στην αλκοόλη και στο θειώδες οξύ και μολύνουν όλους τους χώρους του εργοστασίου.

Υπάρχουν και οι τυπικοί μικροοργανισμοί που προξενούν γνωστές ασθένειες του κρασιού. Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαίρονται σε δύο κατηγορίες : στους αερόβιους και στους αναερόβιους ή μικροαερόφιλους. Οι πρώτοι αναπτύσσονται μόνο υπό παρουσία αέρος, ενώ οι δεύτεροι υπό τέλεια απουσία αέρος, είτε υπό παρουσία μικρών ποσοτήτων διαλυμένων ή εγκλωβισμένων στη μάζα του ζυμουμένου οινογλεύκους.

Τέλος στην κατηγορία των αναερόβιων τάσσονται διάφορα είδη Γαλακτοβακτηρίων. Οι ασθένειες τις οποίες προξενούν είναι η εκτροπή, πίκραση, πάχυνση, γαλακτική και μαννιτική ζύμωση και μηλικογαλακτική ζύμωση, που όμως δεν θεωρείται ως τυπική ασθένεια τουλάχιστον για κρασιά με αυξημένη ολική οξύτητα και αυξημένη συγκέντρωση σε μηλικό οξύ.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να δηλώσω και εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στη κ. Κάτσου Πελαγία όπου με την πολύτιμη βοήθειά της οδήγησε στην πραγμάτωση της πτυχιακής τούτης εργασίας, καθώς επίσης και την οικογένειά μου, όπως επίσης και τους φίλους μου για την αμέριστη κατανόηση και βοήθεια τους.

ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η επίδραση των μικροοργανισμών στην ανθρώπινη κοινωνία είναι τεράστια και δεν υπάρχει καμία αμφιβολία πλέον γι' αυτό. Ένας κλασσικός ορισμός των μικροοργανισμών είναι ότι αποτελούν οντότητες τόσο μικρές σε μέγεθος ώστε να είναι αόρατες με το γυμνό μάτι. Έχουν διάμετρο κυττάρου πολύ μικρότερη του ενός χιλιοστού και εξετάζονται μόνο κάτω από το όργανο που καλείται μικροσκόπιο.

Πάνω στους ζωικούς ιστούς υπάρχουν τεράστιοι αριθμοί μικροβίων. Στους μικροοργανισμούς ανήκουν τα βακτήρια, πολλά φύκη, πολλοί μύκητες, τα πρωτόζωα και οι ιοί. Έχουν βρεθεί δύο είδη κυττάρων: εκείνα που λέγονται προκαρυωτικά και εκείνα που λέγονται ευκαρυωτικά τα οποία έχουν πυρήνα περιβαλλόμενο από μεμβράνη και συνήθως είναι μεγαλύτερα των προκαρυωτικών. Οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιμότητα του εδάφους και παραγωγικότητα των ζώων. Πολλές βιοχημικές πορείες βασίζονται στους μικροοργανισμούς και οδηγούν στην επιστήμη της Βιοτεχνολογίας.

Όπως αναφερθηκε και παραπάνω ο κόσμος μας είναι γεμάτος μικροοργανισμούς και το ανθρώπινο σώμα συνυπάρχει με πλήθος μικροοργανισμών τα οποία αποτελούν τη φυσική μικροχλωρίδα του. Αν και η φυσική μικροχλωρίδα δεν είναι επιβλαβής για τον άνθρωπο και σε μερικές περιπτώσεις τον ωφελεί, κάτω από κάποιες συνθήκες δημιουργεί μολύνσεις και αρρωσταίνει το ανθρώπινο σώμα. Μερικές φορές η φυσική άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού υποβοηθείται από αντιβιοτικά και άλλα φάρμακα. Όπως φαίνεται λοιπόν υπάρχει έλεγχος των μολυσματικών ασθενειών που οφείλεται στη μεγαλύτερη κατανόηση του τρόπου δράσης των παθογόνων μικροοργανισμών.

Επίσης οι μικροοργανισμοί επιδρούν σημαντικά και στη γεωργία. Ιδιαίτερης σημασίας είναι και οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τις πορείες της πέψης των μηρυκαστικών ζώων. Χωρίς αυτούς δεν θα είχαμε παραγωγή κρέατος και γάλακτος. Ακόμα παίζουν σημαντικό ρόλο στους κύκλους θρέψης των φυτών και ειδικότερα του άνθρακα και του θείου. Είναι απαραίτητο όμως να σημειωθεί ότι οι μικροοργανισμοί προκαλούν και ασθένειες στα φυτά και τα ζώα με σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις.

Σε έναν άλλον τομέα όπου οι μικροοργανισμοί παίζουν σπουδαίο ρόλο είναι στη βιομηχανία τροφίμων. Μεγάλες ποσότητες τροφής φθείρονται από τους μικροοργανισμούς και αυτό συνεπάγεται οικονομικές απώλειες. Οι βιομηχανίες κονσερβών, κατεψυγμένων τροφίμων και ξηράς τροφής υπάρχουν για να προετοιμάσουν την τροφή με τέτοιο τρόπο ώστε να μην φθαρεί. Ωστόσο τα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως γιαούρτι, τυρί και βούτυρο δημιουργούνται εξαιτίας της ωφέλιμης δραστηριότητας των μικροβίων. Είδη τουρσιού, λουκάνικα και άλλα τρόφιμα οφείλουν την ύπαρξη τους στη μικροβιακή δραστηριότητα. Είναι αναγκαίο να σημειωθεί και η συνεισφορά των μικροοργανισμών στα ανθρακούχα μη-αλκοολούχα ποτά και στα μη αλκοολούχα ποτά διαίτης. Στην πρώτη κατηγορία το σάκχαρο που χρησιμοποιείται είναι η φρουκτόζη, η οποία παράγεται από το άμυλο του καλαμποκιού διαμέσου μικροβιακής δραστηριότητας.

Στην δεύτερη κατηγορία περιέχεται η ασπαρτάμη που είναι συνδυασμός δύο αμινοξέων τα οποία παράγονται μικροβιακά.

Τέλος, το κιτρικό οξύ που προστίθεται σε πολλά μη αλκοολούχα ποτά παράγεται βιομηχανικά χρησιμοποιώντας κάποιο μύκητα (*A.niger*). Επίσης, οι επιστήμες άρχισαν να χρησιμοποιούν τους μικροοργανισμούς για την αποικοδόμηση τοξικών αποβλήτων και ρυπαντικών ουσιών με σκοπό ένα πιο υγιές περιβάλλον. Για παράδειγμα μερικοί μικροοργανισμοί διασπούν ρυπαντές με σκοπό. Επίσης, οι επιστήμες άρχισαν να χρησιμοποιούν τους μικροοργανισμούς για την αποικοδόμηση τοξικών αποβλήτων και ρυπαντικών ουσιών με σκοπό ένα πιο υγιές περιβάλλον. Για παράδειγμα μερικοί μικροοργανισμοί διασπούν ρυπαντές με σκοπό να τους χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας, ή παράγουν ένζυμα τα οποία διασπούν τοξικές ουσίες.

Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας. Το φυσικό αέριο μεθάνιο είναι προϊόν βακτηριακής δράσης όπως και το πετρέλαιο. Έτσι η άντληση του πετρελαίου, η αποθήκευση και η μεταφορά του πρέπει να γίνουν σε συνθήκες που θα ελαχιστοποιούν την καταστροφή της μικροβιακής χλωρίδας. Το ακατέργαστο πετρέλαιο ευνοεί την ανάπτυξη κάποιων μικροοργανισμών οι οποίοι το αποικοδομούν προς όφελός τους. Αυτή η μικροβιακή διαδικασία είναι χρήσιμη στις περιπτώσεις μόλυνσης του υδάτινου ή εδαφικού οικοσυστήματος από πετρελαιοκυλίδες. Οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί δεσμεύουν το φως για να παράγουν βιομάζα, με αποτέλεσμα να αποθηκεύεται ενέργεια μέσα στους ζώντες οργανισμούς η οποία ίσως να μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για άλλους σκοπούς. Η μικροβιακή βιομάζα είναι γνωστό ότι μπορεί να μετατραπεί από άλλους μικροοργανισμούς σε «βιοκαύσιμα» όπως το μεθάνιο και η αιθανόλη.

Ένας πολύ ενδιαφέρον τομέας της Μικροβιολογίας είναι η Βιοτεχνολογία, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη Γενετική Μηχανική. Γενετική Μηχανική είναι εκείνη η επιστήμη που με μη φυσικά μέσα διαχειρίζεται τα γονίδια και τα προϊόντα τους. Για παράδειγμα, σήμερα η ανθρώπινη ινσουλίνη, μια ορμόνη που βρέθηκε σε αφύσικα χαμηλές ποσότητες στους ανθρώπους που πάσχουν από διαβήτη, παράγεται μικροβιακά. Πολλά εμβόλια έχουν παραχθεί μέσω γενετικά τροποποιημένου DNA όπως για παράδειγμα της υπατίτιδας Β, ελονοσίας και γρίπης.

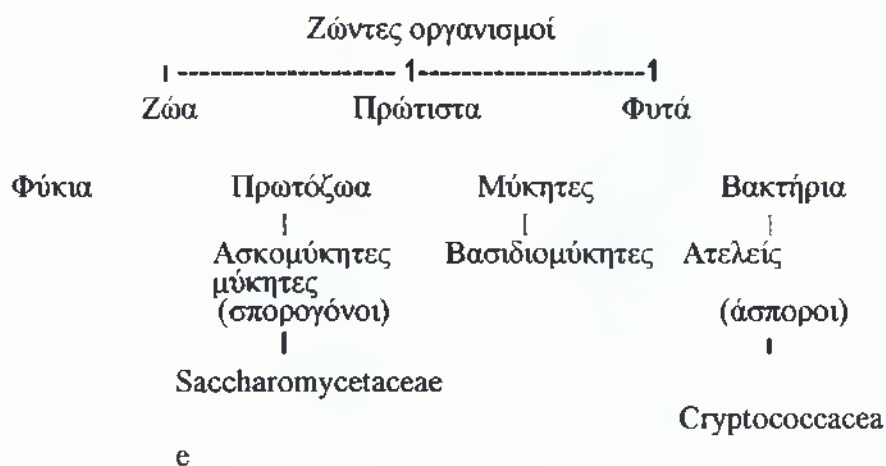
Συμπεραίνουμε λοιπόν πως οι μικροοργανισμοί έχουν τόσο θετικές. Όσο και αρνητικές επιπτώσεις όχι μόνο στα τρόφιμα αλλά και σε άλλους τομείς. Όπως είτε και ο Louis Pasteur «ο ρόλος του απείρως μικρού στη φύση είναι άπειρα μεγάλος».

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΙ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

1.1 Περιγραφή και θέση των ζυμών στους ζώντες οργανισμούς.

Είναι γνωστό ότι οι ζύμες είναι μονοκύτταροι οργανισμοί διαστάσεων μερικών μικρών και το κύτταρο τους αποτελείται σε γενικές γραμμές από την κυτταρική μεμβράνη, τον πυρήνα, το κυτοπλάσμα, το βακίολο, τα μιτοχόνδρια και άλλους οργανίτες.

Οι ζύμες, ως μονοκύτταροι οργανισμοί, ανήκουν σε μια ξεχωριστή ομάδα, τα πρωτίστα, μαζί με τα βακτήρια και μερικές άλλες κατηγορίες οργανισμών. Η θέση, που παίρνουν οι ζυμομύκητες στους ζώντες οργανισμούς, φαίνεται καλύτερα στο παρακάτω σχεδιάγραμμα:



Οι ασκομύκητες και οι ατελείς μύκητες (Fungi imperfecti) αποτελούν τις δύο ομάδες μυκήτων στις οποίες ανήκουν οι ζύμες της οينوποιίας.

Οι μικροσκοπικοί αυτοί οργανισμοί παρατηρήθηκαν και περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1680 από τον ANTONY LEEUWENHOEK, έναν απλό έμπορο ξηρών καρπών, θυρωρό στο Δημαρχείο της ολλανδικής πόλης DELF. Ο LEEUWENHOEK, κατόρθωσε να συνδέσει το όνομα του με τη μικροβιολογία, αν και ο ίδιος στην πραγματικότητα δεν είχε καμιά σχέση μ' αυτή.

Η μελέτη, όμως, των αόρατων με γυμνό μάτι ζυμών, έγινε πιο συστηματική με την τελειοποίηση των μεγεθυντικών φακών και των σύνθετων μικροσκοπίων. Κατά το δεύτερο μισό του 19ου αιώνα, ο PASTEUR, απέδειξε ότι η αλκοολική ζύμωση είναι αποτέλεσμα της ζωής και της δράσης των ζυμών.

Λίγο αργότερα, γύρω στο 1897, η άποψη αυτή του PASTEUR φάνηκε να κλονίζεται, όταν ο BUCHNER με τη χρήση λειοτριβημένης ζύμης απέδειξε ότι δεν ήταν απαραίτητη η παρουσία των κυττάρων των ζυμών για την αλκοολική ζύμωση, αλλά μόνο τα περιεχόμενα σ' αυτά ένζυμα.

Πολλές όμως μελέτες, που ακολούθησαν, απέδειξαν ότι και οι δύο ε-ρευνητές είχαν δίκαιο. Είναι αλήθεια ότι υπεύθυνα για το φαινόμενο της αλκοολικής ζύμωσης είναι τα ένζυμα, αλλά η δράση τους περιορίζεται μέσα στα κύτταρα των ζυμών. Πράγματι, τα ένζυμα δεν εξέρχονται από τα κύτταρα στο γλεύκος, για να διασπάσουν τα ζάχαρα, αλλά τα ζάχαρα του γλεύκους εισέρχονται στα κύτταρα μέσω της εκλεκτικής διαπερατής μεμβράνης τους.

1.2 Η προέλευση των ζυμών.

Η ζυμοχλωρίδα του γλεύκους προέρχεται από τα ώριμα σταφύλια, στα οποία βρίσκεται εντοπισμένη στην κηρώδη ουσία που περιβάλλει τις ράγες. Η εγκατάσταση των ζυμών στο εξωτερικό της ράγας αποδείχτηκε μ' ένα στοιχειώδη πειραματισμό του PASTEUR. Ο ερευνητής, χρησιμοποιώντας το ονομαζόμενο αργότερα σιφώνιο PASTEUR, κατόρθωσε να παραλάβει με ασηπτικό τρόπο σταφυλοχυμό από το εσωτερικό των ραγών. Ο χυμός, που προέκυψε με τον τρόπο αυτό, παρατηρήθηκε ότι δεν ήταν ζυ-μώσιμος, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η ζύμωση οφείλεται στην ύπαρξη των κυττάρων των ζυμών και ότι αυτά βρίσκονται στην επιφάνεια της ράγας.

Η εγκατάσταση των ζυμών στις ράγες, όπως προέκυψε από πειραματικά δεδομένα, γίνεται όταν οι ράγες είναι ώριμες και όχι νωρίτερα. Ο PASTEUR κλείνοντας ένα σταφύλι σε αποστειρωμένη φιάλη, από το στάδιο ακόμη της πράσινης ράγας, διαπίστωσε ότι ενώ η ωρίμανση εξελισσόταν σχεδόν κανονικά, το γλεύκος που προέκυψε από την έκθλιψη του σταφυλιού με ασηπτικές συνθήκες δεν ήταν ζυμώσιμο. Τούτο εξηγείται από το γεγονός ότι κατά το στάδιο της ωριμότητας των ραγών, δεν ήταν δυνατή η εγκατάσταση των ζυμών στην επιφάνεια αυτών.



Εικ. 1.2. "Ασηπτική" ωρίμανση

Νεώτερα πειράματα, εξάλλου, απέδειξαν ότι η μετακίνηση και η εγκατάσταση των ζυμών στα σταφύλια γίνεται με τη βοήθεια των εντόμων και κυρίως της δροσόφιλα. Έτσι, η κάλυψη αμπελώνων με πλέγματα, που επιτρέπουν το πέρασμα του αέρα και της σκόνης αλλά όχι των εντόμων, απέδειξε ότι το γλεύκος που προκύπτει από τα σταφύλια αυτά δεν είναι ζυμώσιμο. Το πείραμα αυτό αναιρεί παλαιότερη θεωρία σύμφωνα με την οποία η μεταφορά των ζυμών γινόταν με τη σκόνη.

Μελέτη, σχετικά με την προέλευση των ζυμών, έδειξε ότι οι ζυμομύκητες διαχειμάζουν στο έδαφος των αμπελώνων, όπου μεταφέρονται με το πέσιμο των ραγών. Από εκεί, κατά την άνοιξη, οι μικροοργανισμοί αυτοί επαναφέρονται στους βότρες με τη βοήθεια των εντόμων.

1.3 Ο πολλαπλασιασμός των ζυμών.

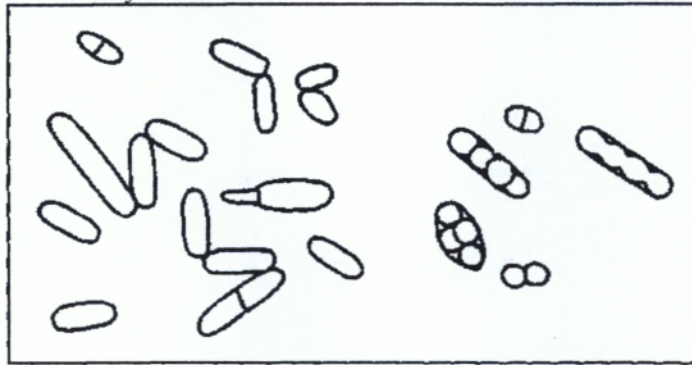
Οι ζύμες, ανάλογα με τον τρόπο αναπαραγωγής τους, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στις άσπορες και στις σπορογόνες.

Οι πρώτες πολλαπλασιάζονται αγενώς, δηλαδή με εκβλαστήσεις, ενώ οι δεύτερες πολλαπλασιάζονται τόσο με εκβλαστήσεις (αγενώς) όσο και με σπόρια (εγγενώς).

α) Η βλαστική ή αγενής αναπαραγωγή των ζυμών γίνεται με κυττα-ροδιαίρεση (σχάση), με εκβλάστηση ή με συνδυασμό των δύο αυτών τρόπων.

Στην αναπαραγωγή με σχάση (εικ. 1.3) γίνεται αναδιπλασιασμός του κυττάρου με σχηματισμό εγκάρσιου τοιχώματος στο εσωτερικό αυτού, το οποίο το διχοτομεί κάθετα προς τον επιμήκη άξονα του. Τα δύο που προκύπτουν είναι θυγατρικά κύτταρα και αναπτύσσονται κανονικά και το καθένα απ' αυτά ξαναδίνει γένεση, με τον ίδιο παραπάνω τρόπο, σε δύο άλλα νέα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται διαδοχικά.

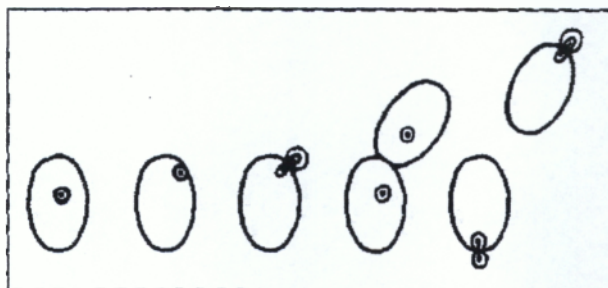
Η αναπαραγωγή με σχάση είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των ζυμών εκείνων που ανήκουν στους *Endomycetaceae* και στους *Schizosaccharomy-coideae*.



Lodder, 1970

Εικ. 1.3. Αναπαραγωγή με σχάση

Η αναπαραγωγή με εκβλάστηση (εικ. 1.4) συνδέεται με το σχηματισμό μικρής έκφυσης (evagination) ή οφθαλμού σ' ένα σημείο της επιφάνειας του κυττάρου. Κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης, το μητρικό κύτταρο παραμένει σταθερό σε μέγεθος, ενώ το εκβλάστημα αυξάνει μέχρι να δώσει ένα νέο, ισομεγέθες προς το μητρικό, κύτταρο, το οποίο τελικά θ' αποχωριστεί από το μητρικό του.



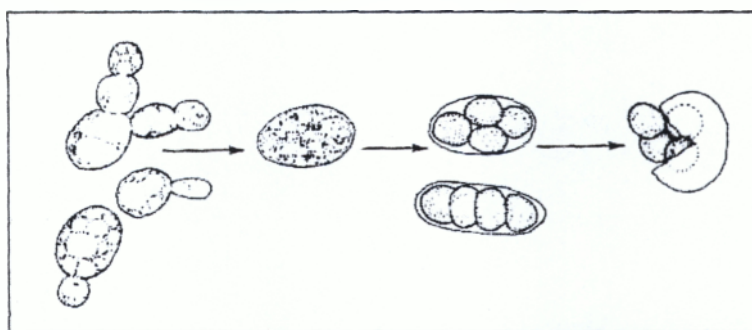
Ribereau-Gayon

et al., 1975 Εικ. 1.4. Αναπαραγωγή με
εκβλάστηση

Ανάλογα με το αν αυτά είναι ένα ή δύο ή περισσότερα και εμφανίζονται στον ένα ή στους δύο πόλους ή και σ' ολόκληρη την περιφέρεια, η εκβλάστηση διακρίνεται σε μονοπολική, διπολική και πολύπλευρη αντίστοιχα.

β) Οι σπορογόνες ζύμες αναπαράγονται τόσο με εκβλαστήσεις όσο και με σπόρια. Όταν το υλικό, στο οποίο αναπτύσσονται οι ζύμες, γίνεται δυσμενές, τότε οι σπορογόνες ζύμες σταματούν τον πολλαπλασιασμό τους με εκβλάστηση και μετατρέπονται σε ασκούς, που περιέχουν ασκοσπόρια.

Ο πυρήνας των κυττάρων διαιρείται μειωτικά στο εσωτερικό της ίδιας κυτταρικής μεμβράνης και κάθε νέος πυρήνας περιβάλλεται με κυτόπλασμα (κυτταρόπλασμα), σχηματίζοντας έτσι ένα νέο κύτταρο μέσα στην παλιά μεμβράνη (εικ. 1.5).



Ribereau-Gayon et al.,
1975

Εικ. 1.5. Μετατροπή των κυττάρων σε ασκοσπόρια

Η μεμβράνη αυτή γίνεται πιο παχιά και πιο ανθεκτική και αποτελεί τον ασκό μέσα στον οποίο περικλείονται συνήθως 1-4 ασκοσπόρια. Η μετατροπή των κυττάρων σε ασκούς αποτελεί μια μορφή επιβίωσης με μεγάλη ανθεκτικότητα.

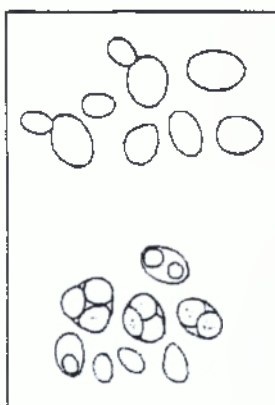
Για τη σποροποίηση των ζυμών απαιτούνται, εκτός από το φτωχό θρεπτικό υπόστρωμα, ικανή ποσότητα υγρασίας και οξυγόνου και θερμοκρασία 25°C. Αν τα ασκοσπόρια βρεθούν σε ευνοϊκές συνθήκες βλαστάνουν και δίνουν γένεση σ' ένα νέο βλαστικό κύτταρο. Ένας σημαντικός παράγοντας στη σποροποίηση των ζυμών είναι το θρεπτικό υλικό. Ανάλογα μ' αυτό, άλλες ζύμες σποροποιούν και άλλες όχι. Θα ήταν ίσως δυνατό, ακόμη και μερικά απ' αυτά τα γένη ή είδη ζυμών που θεωρούνται άσπορα, να σποροποιήσουν όταν βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα. Παράδειγμα αποτελούν οι οξυκόρυφες ζύμες, που, μέχρι πριν το 1970, πιστευόταν ότι ήταν ολότελα άσπορες και συμπεριλαμβάνονταν στο γένος

Kloeckera. Αργότερα, όμως, διαπιστώθηκε ότι μερικές ζύμες απ' αυτές που περιλαμβάνονταν στο παραπάνω είδος, όταν βρέθηκαν στο κατάλληλο υπόστρωμα σποροποίησαν και εντάχθηκαν στο γένος *Hanseniaspora*. Απαραίτητη προϋπόθεση πάντως για τη σποροποίηση αποτελεί η καλλιέργεια των ζυμών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

Ανάλογα με το αν σποροποιούν ή όχι, οι ζύμες - που απομονώθηκαν σ' όλο τον κόσμο μέχρι το 1975, αποκλειστικά από σταφύλια, γλεύκη, οίνους ή από τις εγκαταστάσεις των οινοποιείων - μπορούν να ταξινομηθούν τουλάχιστον σε 36 σπορογόνα είδη κατανεμημένα σε 8 γένη και σε 31 άσπορα είδη που ανήκουν σε 7 διαφορετικά γένη.

1.4 Η ταξινόμηση των ζυμών.

Οι παλαιότερες ταξινομήσεις των ζυμών, σχετικά με την οινολογία, περιορίζονταν για μεγάλο χρονικό διάστημα στη διάκριση δύο κατηγοριών, τις ελλειπτικές και τις οξυκόρυφες. Η διαφορά, ανάμεσα στις δύο αυτές κατηγορίες ζυμών, είναι στο σχήμα και στο μέγεθος. Οι ελλειπτικές ζύμες ήταν γνωστές με το όνομα *Saccharomyces cerevisiae* v. *ellipsoideus* ή ελλειψοειδής ζαχαρομύκητας (εικ. 1.4), ενώ οι οξυκόρυφες ήταν γνωστές με το όνομα *Saccharomyces apiculata* ή οξυκόρυφος ζαχαρομύκητας (εικ. 1.5).



Domercq,
1956

Εικ. 1.4. Ελλειπτικές ζύμες

Εικ. 1.5. Οξυκόρυφες ζύμες

Με το πέρασμα όμως του χρόνου, έγινε γρήγορα αντιληπτό ότι, ανάμεσα στις ζύμες του οίνου, υπήρχαν περισσότερα είδη και γένη. Τα θεμέλια για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των ζυμών μπαίνουν τη δεκαετία 1950-1960, όταν έγινε για πρώτη φορά ταξινόμηση των ζυμών. Πιο συγκεκριμένα, το 1952 δύο Ολλανδές μικροβιολόγοι LODDER και KREGER VAN RIJ εκδίδουν μία ολοκληρωμένη μονογραφία ταξινόμησης και ταυτοποίησης των ζυμών.

Η κατάταξη των ζυμών σε γένη και σε είδη γίνεται με διάφορα κριτήρια, που στηρίζονται στα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, στα χαρακτηριστικά των καλλιεργειών και στον τρόπο αναπαραγωγής τους. Πρόσφατες μελέτες στηρίζουν την ταξινόμηση των ζυμών στη μελέτη του DNA του μικροοργανισμού.

1.4.1 Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι τα εξής:

1. Σχήμα και μέγεθος: Το σχήμα χρησιμοποιείται ως κριτήριο για την ταξινόμηση των ζυμών τόσο από μόνο του όσο και από τον τρόπο αναπαραγωγής τους.

Τα κύτταρα μπορούν να είναι σφαιροειδή, στρόγγυλα, ωοειδή, ελλειψοειδή, κυλινδρικά, επιμήκη και αψιδωτά.

Όταν το σχήμα των κυττάρων δεν δίνει αρκετές πληροφορίες από μόνο του, τότε χρησιμοποιείται και το μέγεθος ως κριτήριο ταξινόμησης.

Το σχήμα, το μέγεθος και ο τρόπος αναπαραγωγής εξετάζονται σε υγρό υπόστρωμα, ενώ η παραγωγή ασκοσπορίων εξετάζεται σε στερεό.

2. Χαρακτηριστικά των καλλιεργειών: Όλες οι ζύμες μπορούν να καλλιεργηθούν τόσο σε υγρό, όσο και σε στερεό υπόστρωμα. Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι τα χαρακτηριστικά των καλλιεργειών δεν είναι αξιόπιστο κριτήριο για την ταξινόμηση των ζυμών.

Όταν οι ζύμες καλλιεργούνται σε υγρό υπόστρωμα σχηματίζουν ίζημα, δακτύλιο ή υμένιο και ο σχηματισμός του υμενίου αποδεικνύει ότι οι ζύμες έχουν ανάγκη από οξυγόνο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο σχηματισμός μυκηλίου από τη ζύμη *Hansenula anomala*.

Από την άλλη, όταν καλλιεργούνται σε στερεό υπόστρωμα παρατηρείται μια μυκοειδής, βουτυρώδης, εύθραυστη υφή, όπως επίσης μπορεί να υπάρξουν και αλλαγές στο χρώμα και στην επιφάνεια της καλλιέργειας.

Τα περισσότερα γένη παράγουν καλλιέργειες με χρώμα από άσπρο μέχρι κρεμ ή φωτεινό καφέ. Εξαιρέση αποτελούν τα γένη *Rhodotulula* (με χρώμα κίτρινο, πορτοκαλί ή καροτονοειδές) και η *Metschnikowia pulcherrima* (με χρώμα ερυθρό-μπορντώ).

3. Σχηματισμός σπορίων: Το χαρακτηριστικό αυτό αποτελεί βασική προϋπόθεση για το διαχωρισμό των σπορογόνων ζυμών ή *Saccharomycetaceae* από τις άσπορες ή *Cryptococcaceae*.

1.4.2. Τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά

Η χρησιμοποίηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών είναι συχνή και εύκολη για τον προσδιορισμό των μεγάλων κατηγοριών, ωστόσο δεν είναι τόσο αποτελεσματική για την πλήρη ταξινόμηση τους.

Τα χαρακτηριστικά, που αποδείχτηκαν ως τα πιο χρήσιμα στην ταξινόμηση των ζυμών, είναι συνδεδεμένα με τη χρησιμοποίηση διαφόρων πηγών άνθρακα και αζώτου, με την ευαισθησία στις συνθήκες αερισμού και θερμοκρασίας, με τις απαιτήσεις στους ειδικούς "αυξητικούς παράγοντες" και με την ανθεκτικότητα στις "ανασταλτικές ουσίες". Αυτά είναι:

1. Χρησιμοποίηση ενώσεων άνθρακα: Οι ζύμες, ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες βρίσκονται, μπορούν να ζυμώσουν τα ζάχαρα ή να τα χρησιμοποιήσουν οξειδωτικά (αφομοίωση).

Η αλκοολική ζύμωση, είναι η μη οξειδωτική διαδικασία η οποία πραγματοποιείται στο εσωτερικό των κυττάρων και σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες.

Η ζύμωση αποδίδεται με την εξής απλοποιημένη εξίσωση:



Η αλκοολική ζύμωση δεν προσφέρεται για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, γιατί η ενέργεια που εκλύεται και η αλκοόλη που παράγεται ενεργεί ως παρεμποδιστής στην ανάπτυξη των ζυμών. Αυτό όμως δεν ισχύει πάντοτε, σύμφωνα με μελέτες που έχουν διεξαχθεί.

Για παράδειγμα, το γένος *Brettanomyces*, όπου η ζυμωτική ικανότητα ενισχύεται με την παρουσία μοριακού οξυγόνου.

Η οξειδωτική χρησιμοποίηση των ζαχάρων αποτελεί την κυρίως δοκιμή για την πιστοποίηση της ύπαρξης των ενζυματικών συστημάτων και είναι μάλιστα πολύ πιο ευαίσθητη από τη δοκιμή της αλκοολικής ζύμωσης.

Σύμφωνα με διάφορους ερευνητές, όπως οι BARNETT και KORNBERG (1960) και οι MACQUILLAN και HALVORSON (1962), η ικανότητα ή η ανικανότητα της οξειδωτικής χρησιμοποίησης των ενώσεων άνθρακα εξαρτάται:

- Από τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης στην προς δοκιμή ένωση του άνθρακα και

- Από την παρουσία του ενζυματικού συστήματος, που είναι κατάλ-

ληλο για την οξειδωτική αποικοδόμηση της συγκεκριμένης ουσίας.

2. Χρησιμοποίηση αζωτούχων ενώσεων: Για την ταξινόμηση των ζυμών εφαρμόζεται, επίσης, η δοκιμή χρησιμοποίησης ή μη των διαφόρων πηγών αζώτου. Η αφομοίωση των νιτρικών αλάτων, αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την ταξινόμηση των ζυμών. Με τη δοκιμή αυτή μπορούν να διακριθούν διάφορα γένη μεταξύ τους, όπως το γένος *Hansenula*, που αφομοιώνει τα νιτρικά άλατα, από το γένος *Pichia*, που δεν τα αφομοιώνει.

3. Χρησιμοποίηση αιθανόλης: Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για πολύ σπάνια είδη ζυμών

4. Χρησιμοποίηση αυξητικών παραγόντων: Ορισμένες ζύμες αντιδρούν θετικά στην προσθήκη αυξητικών παραγόντων με αποτέλεσμα την καλύτερη ανάπτυξη τους. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι βιταμίνες, όπως η βιοτίνη, η πυριδοξίνη, η θειαμίνη κ.α.

Η παρακολούθηση της επίδρασης των αυξητικών παραγόντων γίνεται με τη νεφελομετρία, όπου παρακολουθείται ο αριθμός των κυττάρων των ζυμών.

Έτσι διαχωρίζονται οι εξώτροφες ζύμες (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*), δηλαδή οι ζύμες που δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν όταν δεν υπάρχουν βιταμίνες, από τις αυτότροφες ζύμες.

5. Ανθεκτικότητα στην ακτιδιόνη: Η αντοχή των ζυμών στην ακτιδιόνη κυμαίνεται ανάλογα με το είδος αυτών. Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση ορισμένων ειδών, κυρίως ειδών του γένους *Saccharomyces*. Η αντοχή των ζυμών στην ακτιδιόνη κυμαίνεται ανάλογα με το είδος αυτών. Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση ορισμένων ειδών, κυρίως ειδών του γένους *Saccharomyces*.

6. Ανθεκτικότητα στο θειώδη ανυδρίτη: Ανάλογα με την ανθεκτικότητα των ζυμών στο θειώδη ανυδρίτη, μπορούμε να διακρίνουμε τρεις ομάδες απ' αυτές, ως εξής:

α) Ζύμες που αντέχουν μέχρι 100 mg/l θειώδη ανυδρίτη, όπως οι *Saccharomyces rosei*, *Kloeckera* και *Hanseniaspora*.

β) Ζύμες που μπορούν να επιβιώσουν μέχρι 150 mg/l SO₂, όπως οι *Saccharomyces ellipsoideus* και *Torulopsis stellata*.

γ) Ζύμες που είναι ικανές ν' αναπτυχθούν σε υψηλές δόσεις SO₂, όπως οι *Saccharomyces oniformis*, *Saccharomyces bailii* και *Saccharomycodes ludwigii*.

7. Ανάπτυξη σε υπόστρωμα υψηλής οσμωτικής πίεσης: Για τη διαφοροποίηση ορισμένων ειδών του γένους *Saccharomyces*, όπως εκείνα του *Saccharomyces heterogenicus* και του *Saccharomyces rouxii*, δοκιμάζεται η ανάπτυξη τους πάνω σε υπόστρωμα υψηλής οσμωτικής πίεσης, που περιέχει 60% κατά βάρος γλυκόζη. Από τα δύο αυτά είδη, μόνο ο *Saccharomyces rouxii* μπορεί ν' αναπτυχθεί σε τέτοιες συνθήκες.

Για τη διαφοροποίηση ορισμένων ειδών του γένους *Saccharomyces*, όπως εκείνα του *Saccharomyces heterogenicus* και του *Saccharomyces rouxii*, δοκιμάζεται η ανάπτυξη τους πάνω σε υπόστρωμα υψηλής οσμωτικής πίεσης, που περιέχει 60% κατά βάρος γλυκόζη. Από τα δύο αυτά είδη, μόνο ο *Saccharomyces rouxii* μπορεί ν' αναπτυχθεί σε τέτοιες συνθήκες.

8. Άλλες δοκιμές: Για τη διάκριση του *Saccharomyces rosei* από το *Saccharomyces capensis* χρησιμοποιείται επιπλέον και η ζύμωση της ινουλίνης ενώ για τη διαφοροποίηση των διαφόρων ειδών του γένους *Torulopsis* (*T. apicola*, *T. lactis-condensis* και *T. stellata*) χρησιμοποιείται εκτός από τις άλλες δοκιμές και η αφομοίωση.

Για τη διάκριση του *Saccharomyces rosei* από το *Saccharomyces capensis* χρησιμοποιείται επιπλέον και η ζύμωση της ινουλίνης ενώ για τη διαφοροποίηση των διαφόρων ειδών του γένους *Torulopsis* (*T. apicola*, *T. lactis-condensis* και *T. stellata*) χρησιμοποιείται εκτός από τις άλλες δοκιμές και η αφομοίωση.

Άλλα φυσιολογικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση και ταξινόμηση των ζυμών είναι:

- Η ανάπτυξη τους σε υψηλές θερμοκρασίες.
- Η παραγωγή οξέων.
- Η παραγωγή εξωκυτταρικών αμυλούχων ενώσεων.
- Η υδρόλυση της ουρίας.
- Η διάσπαση των λιπών.
- Ο σχηματισμός χρωστικών.
- Η παραγωγή εστέρων.
- Η ρευστοποίηση της ζελατίνης κλπ.

Για να εφαρμόσουμε όμως τις παραπάνω δοκιμές είναι αναγκαίο να γίνουν τα ακόλουθα στάδια:

α) Δειγματοληψία του θρεπτικού υποστρώματος πάνω στο οποίο βρίσκονται οι ζύμες (σταφύλι, γλεύκος, οίνος κλπ.), όπου γίνεται τόσο στον αμπελώνα, όσο και στο οινοποιείο.

β) Απομόνωση και διατήρηση των διαφόρων στελεχών για την απόκτηση καθαρών καλλιεργειών και γίνεται συνήθως με τη χρησιμοποίηση εκλεκτικών υποστρωμάτων.

γ) Ανανέωση ή αναζωογόνηση των καθαρών καλλιεργειών με τη βοήθεια πρόσφατων καλλιεργειών, όπου γίνεται με εμβολιασμό ενός αποστειρωμένου θρεπτικού υποστρώματος με καθαρή καλλιέργεια ζύμης που προέκυψε μετά το στάδιο της απομόνωσης.

1.5 Η διατροφή των ζυμών

Σε γενικές γραμμές, οι ζύμες αντλούν όλα τα θρεπτικά τους συστατικά από το γλεύκος. Προς το τέλος όμως της ζύμωσης εξαντλούνται ορισμένα χρήσιμα στοιχεία για τη συνέχιση του έργου των ζυμών και έτσι επιβάλλεται η προσθήκη τους. Τα θρεπτικά συστατικά των ζυμών συνοψίζονται στις παρακάτω ομάδες:

1. Πηγές άνθρακα: Οι ζύμες είναι ετερότροφοι οργανισμοί και δεν μπορούν ν' αφομιώσουν το CO_2 , όπως τα πράσινα φυτά. Συνήθως, στο γλεύκος οι ζύμες παραλαμβάνουν τον άνθρακα από τα ζάχαρα και οι απαιτήσεις των ζυμών εξαρτώνται από την παρουσία ή την απουσία αέρα.

- Σε αερόβιο περιβάλλον η ζύμη αναπνέει. Σε τέτοιες συνθήκες μπορεί να χρησιμοποιήσει την ύλη και την ενέργεια από ένα μεγάλο αριθμό μορίων, όπως είναι τα ζάχαρα, η γλυκερόλη, τα αμινοξέα κλπ. Τα μόρια των ενώσεων αυτών δίνουν τελικά CO_2 και H_2O και όχι αλκοόλη. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί την αναπνοή των ζυμών.
- Σε αναερόβιο περιβάλλον, η ζύμη δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει παρά μόνο μερικά ζάχαρα και κυρίως τις εξόξες: D-γλυκόζη, D-μαννόζη και D-φρουκτόζη. Μερικές μπορούν να χρησιμοποιήσουν επίσης και τη D-γαλακτόζη. Στο αναερόβιο περιβάλλον, από τις ενώσεις του άνθρακα, οι ζύμες παράγουν αλκοόλη, CO_2 και άλλα δευτερεύοντα προϊόντα. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί την αλκοολική ζύμωση.

2. Πηγές αζώτου: Οι ζύμες για να σχηματίσουν τα αμινοξέα τους έχουν ανάγκη από αμμωνιακό άζωτο. Για να πολλαπλασιαστούν οι ζύμες καταναλίσκουν πολύ γρήγορα μια μεγάλη ποσότητα των αζωτούχων συστατικών του γλεύκους. Από τα αμινοξέα οι ζύμες πασκευάζουν τις δικές τους πρωτεΐνες. Η ζύμη μπορεί να παραλάβει το αμμωνιακό άζωτο από τα αμινοξέα όπου η προσθήκη τους δραστηριοποιεί την αλκοολική ζύμωση. Όσο περισσότερο άζωτο έχουν στην διάθεσή τους οι ζύμες, τόσο πιο έντονη είναι η ζυμωτική τους ικανότητα. Έχει αποδειχθεί ότι όσο πιο ώριμα είναι τα σταφύλια, τόσο πιο μικρή είναι η περιεκτικότητά τους σε αμμωνιακό άζωτο.

Το άζωτο έχει ως σκοπό να επιβληθεί τον πολλαπλασιασμό της ζύμης. Η έλλειψη του αζώτου γίνεται πιο έντονη στη λευκή οينوποίηση, όπου η ζύμηση πραγματοποιείται χωρίς στέμφυλα. Η αξιοποίηση του αμμωνιακού αζώτου θα είναι επομένως καλύτερη, όταν η προσθήκη του γίνει πριν από την έναρξη της ζύμωσης, γιατί τότε ακριβώς η ζύμη χρειάζεται άζωτο για το πολλαπλασιασμό της. Αν η προσθήκη γίνει αργότερα, ο οίνος περιέχει υπολείμματα της πιο αφομοιώσιμης μορφής αζώτου και δημιουργείται κίνδυνος να ευνοηθεί η ανάπτυξη και η δράση των βακτηρίων.

Σχετικά με την μορφή που πρέπει να προστίθεται το άζωτο στο γλεύκος, η ελληνική νομοθεσία (Ν. 396/1976) αναφέρει τα τρυγικά, τα θειικά ή φωσφορικά άλατα του αμμωνίου, σε ποσότητα όχι μεγαλύτερη των 25g/hl.

Από τα άλατα αυτά το φωσφορικό αμμώνιο, δημιουργεί στους οίνους ορισμένους κινδύνους όπου πρόκειται για το λευκό θόλωμα που οφείλεται στο σχηματισμό του φωσφορικού σιδήρου. Υπάρχει λοιπόν περίσσεια σιδήρου και θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση του φωσφορικού αμμωνίου και να προστίθενται οι δύο άλλες μορφές των αμμωνιακών αλάτων.

3. Ανόργανα συστατικά: Ο PASTEUR καλλιεργούσε τις ζύμες σε θρεπτικό υπόστρωμα με την ακόλουθη σχέση:

Νερό	100ml
Ζάχαρα	100g
Τρυγικό αμμώνιο	1g
Τέφρα ζύμης	10g

Όπου στην τέφρα των ζυμών υπάρχουν και πολλά άλλα ιχνοστοιχεία (Al, Br, Cr, Pb, Mn, Ag, Sr, Zn, Sn κλπ.), τα οποία δεν είναι δυνατόν ν' ανιχνευτούν με τις αναλύσεις και είναι απαραίτητα έστω και σε ίχνη.

4. Παράγοντες ανάπτυξης ζυμών: Τα ανόργανα συστατικά και τα ιχνοστοιχεία, στην πραγματικότητα δεν επαρκούν για να εξασφαλίσουν μια καλή ανάπτυξη των ζυμών. Ως παράγοντες ανάπτυξης αναφέρονται οι στερόλες, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και άλλα συστατικά που σχηματίζει η ζύμη και που είναι απαραίτητα στην ανάπτυξη και δραστηριοποίηση των κυττάρων της. Διαπιστώθηκε ακόμη ότι η καλλιέργεια των ζυμών, όταν χρησιμοποιείται σε μεγάλες ποσότητες προσφέρει ένα στοιχείο απαραίτητο για τη ζωή τους. Το στοιχείο αυτό ονομάστηκε "βίος" και αποτελείται από μια "μεγάλη ποικιλία βιταμινών".

Αν και το γλεύκος περιέχει επαρκείς ποσότητες βιταμινών, ωστόσο συμβαίνει κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και μάλιστα όταν πρόκειται για ζυμώσεις με δυσκολίες να παρατηρείται έλλειψη θειαμίνης. Στις περιπτώσεις αυτές επιβάλλεται προσθήκη της βιταμίνης αυτής σε ποσότητα 0,5-1 mg/l. Ο κύριος λόγος πάντως της χρησιμοποίησης της θειαμίνης είναι η επίδρασή της στον σχηματισμό των δευτερευόντων προϊόντων ζύμωσης. Η προσθήκη επομένως της θειαμίνης, έχει ως αποτέλεσμα να σχηματιστούν κατά τη ζύμωση λιγότερες ουσίες, ικανές να δεσμεύσουν το θειώδη ανυδρίτη, όπως είναι π.χ. τα κετονικά οξέα.

Όσο περισσότερος ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης υπάρχει στον οίνο, τόσο καλύτερα προστατεύεται η σταθερότητα του οίνου, όπου η δραστική του μορφή είναι το ελεύθερο SO₂. Μεγάλες ποσότητες ολικού θειώδη ανυδρίτη έχει βλαβερά αποτελέσματα στην υγεία, υποβαθμίζοντας ακόμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Όταν όμως για λόγους υγείας ή ποιότητας, αποφεύγεται η προσθήκη της ποσότητας του ολικού θειώδη ανυδρίτη, τότε ο οίνος περιέχει λιγότερο ελεύθερο SO₂ και μένει έτσι εκτεθειμένος στις διάφορες αλλοιώσεις. Για να επιτευχθούν όμως, τα ικανοποιητικά αποτελέσματα η πιο κατάλληλη στιγμή για την προσθήκη της θειαμίνης θεωρείται εκείνη που ακολουθεί τη ζωηρή έναρξη της ζύμωσης.

5. Άλλοι παράγοντες: Εκτός από τα οργανικά και ανόργανα συστατικά, που έχουν σχέση με τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των κυττάρων των ζυμών καθώς και με την αύξηση της ζυμωτικής τους ικανότητας, και άλλοι φυσικοχημικοί παράγοντες έχουν σχέση με τα φαινόμενα αυτά.

Ανάμεσα στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται η θερμοκρασία, το αερόβιο ή μη περιβάλλον, το Ph του θρεπτικού υποστρώματος και άλλοι.

- Το οξυγόνο: Όπως γνωρίζουμε, η ζύμωση διεξάγεται σε αναερόβιο περιβάλλον. Για να υπάρξει, όμως, ζύμωση απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων ζυμομυκήτων. Ο πληθυσμός αυτός πετυχαίνεται με το αερόβιο περιβάλλον. Η παρουσία του οξυγόνου σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, συντελεί στον πολλαπλασιασμό του κυτταρικού πληθυσμού των ζυμών. Οι ζυμομύκητες δηλαδή, ανάλογα με τις ποσότητες οξυγόνου που έχουν στη διάθεσή τους, αναπτύσσουν δύο διαφορετικές δραστηριότητες: τη ζύμωση και την αναπνοή. Στην πρώτη περίπτωση (σε αναερόβιο περιβάλλον), τα ζάχαρα μεταβολίζονται σε αλκοόλη, σε CO₂ και σε άλλα δευτερεύοντα προϊόντα με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας 40Kcal, ενώ στη δεύτερη περίπτωση(παρουσία O₂) τα ζάχαρα αποσυντίθενται σε CO₂ και H₂O και εκλύεται για κάθε μόριό τους 20πλάσια ποσότητα θερμότητας(686Kcal). Όταν η ένταση της αναπνοής είναι χαμηλή, η ένταση της ζύμωσης είναι υψηλή και αντίθετα.
- Η θερμοκρασία: Οι ζυμομύκητες είναι οργανισμοί ψυχρόφιλοι και μεσόφιλοι. Μπορούν να αναπτυχθούν και να ασκήσουν τις δραστηριότητές τους, είτε σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 20°C είτε σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 20-45°C, ανάλογα με την κατηγορία στην οποία ανήκουν.
Όσο η θερμοκρασία είναι πιο υψηλή, τόσο πιο γρήγορα, εξελίσσεται η ζύμωση παρουσιάζοντας ένα άριστο από τους 30-39°C ανάλογα με το είδος τους. Πέρα όμως από ορισμένα όρια, όσο πιο υψηλή είναι η θερμοκρασία τόσο πιο περιορισμένη είναι η ζύμωση, δηλαδή τόσο πιο λίγα ζάχαρα ζυμώνονται και κατά συνέπεια όλο και πιο μικρό ποσοστό αλκοόλης αποκτάται.

Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας ασκεί σημαντική επίδραση στο σχηματισμό διαφόρων αρωματικών στοιχείων που συμμετέχουν σημαντικά στη διαμόρφωση της ποιότητας του οίνου. Παρατηρήσεις άλλων ερευνητώνέδειξαν ότι η παραγωγή τέτοιων ενώσεων είναι υψηλότερη στους 20°C παρά στους 30°C.

- Το pH: Η οξύτητα του θρεπτικού υλικού, μέσα στο οποίο βρίσκεται ο πληθυσμός των ζυμομυκήτων, ασκεί επίσης σημαντική επίδραση στον πολλαπλασιασμό τους και στις διάφορες δραστηριότητες.
Για την ανάπτυξη των ζυμών θεωρείται ότι το άριστο pH κυμαίνεται από 4 έως 6. Στα γλεύκη όμως, συνήθως μεταβάλλεται από 2,8 έως 3,8. Άρα, η καλύτερη ανάπτυξη των ζυμών εξασφαλίζεται στα υψηλότερα επίπεδα του pH των γλευκών. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί, ότι με την αύξηση του pH ευνοείται και η ανάπτυξη των βακτηρίων, γεγονός που επιβάλλει την λήψη των απαραίτητων μέτρων αντιμετώπισής της.
- Συνδυασμός θερμοκρασίας και pH: Από πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι ο συνδυασμός θερμοκρασίας 20°C και pH 3,4 αυξάνουν τις ανώτερες αλκοόλες κατά 35% και τους ανώτερους εστέρες κατά 100%, σε σχέση με το συνδυασμό θερμοκρασίας 30°C και pH 2,9.
- Συγκέντρωση σε ζάχαρα: Οι πολύ υψηλές και οι πολύ χαμηλές ποσότητες ζαχάρων δεν ευνοούν ούτε την ανάπτυξη των ζυμών, αλλά ούτε και την ταχύτητα της ζύμωσης. Συχνά δε στις συγκεντρώσεις αυτές παρατηρείται διακοπή της ζύμωσης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ **ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ**

2.1. Γενικά

Η πρώτη ταξινόμηση του Hansen ξεχωρίζει μόνο τις σποριογόνες και ασποριογόνες ζύμες. Μέχρι τότε είχε υποκινηθεί σημαντική έρευνα για την ταξινόμηση της ζύμης. Αυτή η έρευνα έχει ανασυνταχθεί διαδοχικά και προοδευτικά δημιουργώντας την ταξινόμηση που ξέρουμε σήμερα.

Το τελευταίο διεθνές σύμφωνο της οινολογίας του Πανεπιστημίου του Bordeaux (Ribe'reau-Gayon et.al., 1975) βασίστηκε στην ταξινόμηση του Lodder(1970). Ανάμεσα σ' αυτή την μονογραφία και την προηγούμενη ταξινόμηση (Lodder και Kregger-Van Rij, 1952) η περιγραφή και η ταξινόμηση της ζύμης έχει ήδη αλλάξει βαθιά. Αυτές οι δύο ταξινομήσεις από τον Kregger Van-Rij(1984) και τον Barnett et.al.(1990) δεν έχουν ενδιαφέρον Σύμφωνα με την τρέχων ταξινόμηση οι ζύμες που υπάρχουν στους Ασκομύκητες, Βασιομύκητες και στους Ατελείς μύκητες (Δευτερομύκητες) αποκλίνουν σε 81 γένη, όπου 590 είδη ανήκουν. Παίρνοντας υπόψιν τα συνώνυμα και φυσιολογικά γένη(ποικιλίες ίδιων ειδών), λιγότερο από 4000 ονόματα για τη ζύμη έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τον 19^ο αιώνα. Ευτυχώς μόνο 15 είδη ζυμών υπάρχουν στα σταφύλια όπου εμπλέκονται στην αλκοολική ζύμωση και είναι υπεύθυνες για τις αλλοιώσεις των κρασιών.

Πίνακας 2.1.1 Ταξινόμηση σποριογόνων και ασποριογόνων ζυμών του κρασιού (Kregger-Van Rij, 1984)

<u>Saccharomycetaceae family</u> <u>(σποριογόννα)</u>		<u>Spermophthoraceae family</u> <u>(ασποριογόννα)</u>
Sub-family <i>Schizosaccharomycetoideae</i> <i>Schizosaccharomyces</i>	Genus	
Sub-family <i>Nadsonioideae</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Saccharomycodes</i>	Genus	Genus <i>Metschnikowia</i>
Sub-family <i>Saccharomycetoideae</i>	Genus <i>Saccharomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Hansenula</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Zygosaccharomyces</i> <i>Torulaspora</i>	<u>Cryptococcaceae family</u> <u>(ασποριογόννα)</u> Genus <i>Candida</i> <i>Kloeckera</i> <i>Rhodotorula</i>

2.2 Εξέλιξη των γενικών αρχών της ταξινόμησης των ζυμών και οριοθέτηση των ειδών.

Η ταξινόμηση των ζυμών και η ταξινόμηση άλλων μικροοργανισμών, περιλαμβάνουν την κατηγοριοποίηση και την ταυτοποίηση. Κατηγοριοποίηση οργανισμών σε κατηγορίες, σύμφωνα με τις ομοιότητες και την συγγένειά τους μ'έναν κοινό πρόγονο. Ένα γένος μπορεί να καθορίζεται ως μια συλλογή ειδών έχοντας έναν ορισμένο αριθμό μορφολογικών, φυσιολογικών και γενετικών χαρακτηριστικών.

Αυτή η ομάδα των χαρακτηριστικών συνιστούν την ακριβή περιγραφή των ειδών. Η ταυτοποίηση συγκρίνει έναν άγνωστο οργανισμό σε ήδη ξεχωριστούς ομαδοποιημένους οργανισμούς, οι οποίοι έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά.

Οι ταξινομιστές οριοθετούν πρώτα τα είδη ζύμης χρησιμοποιώντας μορφολογικά και φυσιολογικά κριτήρια. Οι πρώτες ταξινομήσεις βασίστηκαν στις φαινοτυπικές διαφορές της ζύμης: σχήμα και μέγεθος κυττάρου, σχηματισμός σπορίου, χαρακτηριστικά καλλιέργειών, ζύμωση και αφομοίωση διαφορετικών ζαχάρων, αφομοίωση νιτρικών αλάτων, χρήση αυξητικού παράγοντα.

Το διεθνές σύμφωνο στην οινολογία από τον Rib'ereau-Gayon et al. (1975) περιέγραψε τη χρήση αυτών των μεθόδων στη ζύμη του κρασιού λεπτομερώς. Μέχρι τότε, αρκετά ατομικά είδη προτέθηκαν να υπολογίσουν τη ζύμη και να δώσουν απάντηση σε διαφορετικά φυσιολογικά τεστ. Ο Lofon-Lafourcade και ο Joyeux (1979), ο Cuinier και ο Leveau (1979) σχεδίασαν το API 20C σύστημα για την ταυτοποίηση της οινολογικής ζύμης. Περιλαμβάνει 8 τεστ ζύμωσης, 10 τεστ αφομοίωσης και 1 τεστ αντίδρασης.

Για μια ακόμη ολοκληρωμένη ταυτοποίηση το API 50CH σύστημα περιλαμβάνει 50 υποστρώματα για ζύμωση και αφομοιωτικά τεστ. Ο Heard και Fleet (1990) ανέπτυξαν ένα σύστημα, το οποίο χρησιμοποιεί διαφορετικά τεστ όπου περιλαμβάνονται στη δουλειά του Barnett et al. (1990).

Ορισμένα είδη ζυμών μπορούν να εξακριβωθούν παρατηρώντας την ανάπτυξη των κυττάρων με τη χρήση μικροσκοπίου. Μικρά κύτταρα που έχουν δημιουργήσει αποικίες έχουν μικρά λεμονοειδή σχήματα, που καθορίζουν τα είδη *Hanseniaspora uvarum* και την ατελή τους μορφή *Kloeckera apiculata*. Οι *Saccharomycodes ludwigii* χαρακτηρίζονται από πολύ μακρύτερα αποικιοακά κύτταρα (10-20 μm). Οι περισσότερες ζύμες πολλαπλασιάζονται με σχάση και το γένος *Schizosaccharomyces* μπορεί να ανγνωριστεί εξαιτίας της βλαστικής αναπαραγωγής από διάσπαση ζεύγους του ατόμου. Σε νεότερη ταξινόμηση αυτό το γένος περιλαμβάνει μόνο το είδος *Schizosacch. pombe*. Τελικά η σχάση του *Candida stellata* παίρνει σχήμα αστεριού.

Σύμφωνα με τον Barnett et al. (1990), τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ξεχωρίσουν το κύριο σταφύλι και τη ζύμη του κρασιού. Μέχρι στιγμής, μερικά από αυτά τα χαρακτηριστικά ποικίλουν εντός των ειδών και είναι ακόμη ασαφής στο να δώσουν ένα είδος κατά τη διάρκεια της βλάστησης και της αύξησης του πληθυσμού. Συνέστησαν λοιπόν, την οριοθέτηση όπου βρέθηκε στην βιολογική και γενετική σαφήνεια των ειδών.

Στην θεωρία, κάποια είδη μπορούν να προσδιοριστούν ως παρεμποδιστικά είδη, όπου τα υβρίδια τους από μόνα τους είναι γόνιμα και ικανά να παράγουν βιώσιμα σπόρια. Αυτό δημιουργεί αρκετά προβλήματα όταν απευθύνεται στις ζύμες. Πρώτα απ' όλα οι Δευτερομύκητες για παράδειγμα δεν είναι ικανά να αναπαράγουν. Δεύτερον, τα τεστ υβριδοποίησης είναι ιδιαίτερος ιδιότροπος και δύσκολα για μια ταυτοποίηση. Τελικά, ορισμένα είδη ζυμών έχουν λίγη ή καθόλου ικανότητα δημιουργίας σπορίων, όπου κάνουν ακόμη πιο δύσκολη την κριτική στείριότητα του είδους.

Για να αντιμετωπίσουμε αυτές τις δυσκολίες, οι ερευνητές ανέπτυξαν μια ταξινόμηση μορίων τα τελευταία 15 χρόνια βασιζόμενοι στα ακόλουθα τεστ: Ανασυνδυασμός DNA, ομοιότητα της σύστασης του DNA, ομοιότητα των ενζύμων, υφή των υπερμικροσκοπικών σωματιδίων και σύσταση κυτταρικού τοιχώματος.

Τα ανασυνδυασμένα τεστ DNA απέδειξαν ότι είναι αποτελεσματικά στο να οριοθετήσει τα είδη των ζυμών. Ένα μεγάλο ποσοστό ανάμεσα σε δύο είδη (80-100%) δείχνει ότι ανήκουν στο ίδιο είδος, ενώ ένα χαμηλό ποσοστό (λιγότερο από 20%) δηλώνει ότι τα είδη ανήκουν σε διαφορετικά είδη.

2.3 Γενικές αρχές ταυτοποίησης των ζυμών

Ο *S.cerevisiae* εμπλέκεται στη ζύμωση του κρασιού, ο οποίος περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό ειδών με μεγάλη ποικιλία τεχνολογικών ιδιοτήτων. Τα είδη ζυμών, τα οποία εμπλέκονται κατά την διάρκεια παραγωγής κρασιού επηρεάζουν τη ταχύτητα της ζύμωσης, τη φύση και την ποσότητα των δευτερογενών προϊόντων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και των αρωματικών χαρακτηριστικών του κρασιού.

Ο Bouix et al. (1981) διεξάγει αρχική έρευνα των διαφορών εντός του *S.cerevisiae*. Επιχείρησε να ξεχωρίσει τα είδη με ηλεκτροφορική ανάλυση των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών και αργότερα (1987) χρησιμοποίησε τον διαχωρισμό των εσωκυτταρικών πρωτεϊνών. Άλλες ομάδες πρότειναν να ταυτοποιούνται τα είδη με αέρια χρωματογραφία (Tredoux et al., 1987, Augustyn et al., 1991, Bendova et al., 1991, Roses et al., 1992).

Στα τέλη του 1980, εξαιτίας της ανάπτυξης της γενετικής μερικές τεχνικές στην μοριακή βιολογία εφαρμόστηκαν επιτυχώς στο να χαρακτηρίσει τα είδη ζυμών του κρασιού. Βασίστηκαν στον πολυμορφικό κλώνο των μιτοχονδρίων και στο DNA του *S.cerevisiae*. Αυτές οι γενετικές μέθοδοι εξαρτώνται από την φυσιολογική κατάσταση των ζυμών, αντίθετα από τις προηγούμενες τεχνικές οι οποίες βασίζονται στην ανάλυση του μεταβολισμού των υποπροϊόντων. Αυτές οι τεχνικές είναι:

- Η ανάλυση μιτοχονδριακού DNA: Μας επιτρέπει την ταυτοποίηση στελεχών που προέρχονται από τον ίδιο κλώνο. Η μέθοδος χρησιμοποιεί τη σύγκριση του DNA των μιτοχονδρίων των ζυμών.
- Η ανάλυση του καρυοτύπου: Ως μέθοδος περιλαμβάνει την αποτύπωση των χρωμοσωμάτων. Μας επιτρέπει την εύρεση αλλαγών στον αριθμό ή τη δομή των χρωμοσωμάτων.
- Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης: Είναι μια μέθοδος πολλαπλασιασμού του δείγματος DNA, με σκοπό την ανάλυσή του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΖΥΜΕΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

3.1 Αλκοολική ζύμωση και τα στάδιά της

Η αλκοολική ζύμωση παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε γλεύκος το οποίο αφού αφέθηκε στην τύχη του για μικρό χρονικό διάστημα παρουσίασε ένα φαινόμενο αντίδρασης που εκδηλώθηκε με έντονο αναβρασμό. Μέσα στην αλκοολική ζύμωση υπάρχει ένα βιολογικό φαινόμενο (πολλαπλασιασμός και ανάπτυξη των ζυμών) και ένα χημικό φαινόμενο (μετατροπή των ζαχάρων σε αλκοόλη), που οφείλονται στα ένζυμα που περιέχουν τα κύτταρα των ζυμών.

Κατά την αλκοολική ζύμωση σχηματίζονται δύο μόρια ATP και άρα συνολικά 25,4Kcal ελευθερώνονται υπό μορφή ενέργειας προκαλώντας αύξηση θερμοκρασίας του γλεύκους σε ζύμωση. Η επανοξείδωση του NADH_2 με κατανάλωση οξυγόνου και η οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος με τον κύκλο του Krebs επιτρέπουν μεγαλύτερη συλλογή ενέργειας που αντιστοιχεί σε σχηματισμό δεσμών 38 μορίων ATP για κάθε μόριο σακχάρου.

Τα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης είναι τα εξής:

1. Η μετατροπή των εξοζών σε τριόζες: Ο μηχανισμός της αλκοολικής ζύμωσης αρχίζει με την φωσφοριλίωση των εξοζών για τον σχηματισμό φωσφορικών εστέρων, απ' όπου τα ζώντα κύτταρα μπορούν ν' αντλήσουν ενέργεια. Από τους φωσφορικούς εστέρες των εξοζών, προκύπτουν οι διυδροξυακετόνη-P και γλυκεραλδεϋδη-3-P.
Από τις δύο αυτές φωσφοτριόζες, η φωσφογλυκεραλδεϋδη χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό του πυροσταφυλικού οξέος, ενώ ένα μέρος της φωσφορικής διυδροξυακετόνης χρησιμοποιείται στη σύνθεση της γλυκερόλης.
2. Η μετατροπή της φωσφοτριόζης σε πυροσταφυλικό οξύ: Και ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει μια σειρά από ενδιάμεσα στάδια όπως: η οξείδωση της 3-φωσφογλυκεραλδεϋδης, η ισομερίωση του παραγόμενου φωσφογλυκερικού οξέος, η αφυδάτωση μιας αλκοολικής ομάδας σε αλκένιο και τέλος η αποφωσφοριλίωση που οδηγεί στον σχηματισμό του πυροβικού οξέος.
3. Η αποκαρβοξυλίωση του πυροβικού οξέος σε ακεταλδεϋδη:
Γίνεται με την παρουσία των ενζύμων αποκαρβοξυλάση.
4. Η αναγωγή της ακεταλδεϋδης σε αιθυλική αλκοόλη: Η ακεταλδεϋδη ανάγεται σε αιθυλική αλκοόλη παρουσία NADH_2 , τα οποία ελευθερώθηκαν από την οξείδωση της 3-φωσφογλυκεραλδεϋδης σε φωσφογλυκερικό οξύ. Αν όμως η χρησιμοποίηση του NADH_2 και η επανοξείδωσή του σε NAD είναι αδύνατη, τότε αναστέλλεται η σύνθεση της αλκοόλης και παράγονται γλυκερόλη και άλλα δευτερεύοντα προϊόντα. Η ακεταλδεϋδη ανάγεται σε αιθυλική αλκοόλη παρουσία NADH_2 , τα οποία ελευθερώθηκαν από την

οξειδωση της 3-φωσφογλυκεραλδεϋδης σε φωσφογλυκερικό οξύ. Αν όμως η χρησιμοποίηση του NADH_2 και η επανοξείδωσή του σε NAD είναι αδύνατη, τότε αναστέλλεται η σύνθεση της αλκοόλης και παράγονται γλυκερόλη και άλλα δευτερεύοντα προϊόντα.

3.2 Οι ζύμες οينوποίησης

Οι ζύμες αυτές βρίσκονται στα σταφύλια και στο γλεύκος και επιτελούν τη ζύμωση του κύριου όγκου των ζαχάρων.

Ανάμεσα στις ζύμες που προέρχονται από τα σταφύλια, οι επικρατέστερες είναι εκείνες που ανήκουν στο γένος *Hanseniaspora* ή *Kloeckera*. Οι ζύμες αυτές ακολουθούνται από το γένος *Torulopsis*, το δεύτερο σε πληθυσμό, το οποίο ευνοείται κατά τη διάρκεια υγρών και σχετικά ψυχρών καλοκαιριών. Με πολύ μεγάλη διαφορά ακολουθούν οι ζύμες που ανήκουν στο γένος *Saccharomyces cerevisiae*. Τα τρία αυτά γένη αποτελούν συχνά το 90% ολόκληρου του πληθυσμού της ζυμοχλωρίδας.

Αμέσως μετά την έναρξη της ζύμωσης του γλεύκους, ο πληθυσμός των ζυμών αρχίζει να μεταβάλλεται με αύξηση των *Saccharomyces* και κυρίως του *Saccharomyces cerevisiae*. Πάντως το ξεκίνημα της αλκοολικής ζύμωσης γίνεται, κυρίως, από τις οξυκόρυφες ζύμες *Hanseniaspora* ή *Kloeckera* και από τις *Torulopsis*. Η συμμετοχή των *Saccharomyces* αρχικά είναι μικρή. Μ' αυτήν τη σύνθεση της ζυμοχλωρίδας παράγονται συνήθως οι πρώτες ποσότητες αλκοόλης, ίσες με 3-4% vol. Συχνά το γένος *Torulopsis* μπορεί να συμμετάσχει στη ζύμωση μέχρις ότου η αλκοόλη φθάσει στο 6-8% vol.

Συνήθως, όμως, η συνέχεια της αλκοολικής ζύμωσης γίνεται με τη μαζική παρουσία του *Saccharomyces cerevisiae* (90%), ο οποίος μπορεί να φθάσει την περιεκτικότητα της αλκοόλης μέχρι το 13-14% vol. Η ζύμη αυτή προέρχεται από τα μηχανήματα και το χώρο του οινοποιείου κυρίως. Ταυτόχρονα, βέβαια, με το *Saccharomyces cerevisiae* συναντώνται και άλλα είδη των *Saccharomyces* όπως οι *S. chevalieri*, *S. rosei*, *S. pretoriensis* κλπ.

Προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, και μάλιστα σε γλεύκη πλούσια σε ζάχαρα, κάνει την εμφάνισή του και ο *Saccharomyces bayanus*. Το είδος αυτό θεωρείται ως το πιο ανθεκτικό στην αλκοόλη, το οποίο μπορεί να παράγει ποσότητες μέχρι 16-18 % vol.

Οι παραπάνω αυτές παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι επιβάλλεται να παρθούν τα κατάλληλα μέτρα ώστε ν' ανακοπεί η δράση των ζυμών αυτών το συντομότερο δυνατό. Γι' αυτό λοιπόν χρησιμοποιούμε θειώδη ανυδρίτη αμέσως μετά τη μεταποίηση.

3.3 Η οικολογία των ζυμών σε σταφύλι και κρασί

Μέχρι πρόσφατα, ένα μεγάλο ποσοστό έρευνας εστίαζε στην περιγραφή και στην οικολογία των ζυμών του κρασιού. Αφορούσε την κατανομή και την διαδοχή των ειδών που βρέθηκαν στο σταφύλι (ρώγα) και έπειτα στο κρασί κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της συντήρησης. (Ribe'reau - Gayon et al. 1975, Lafon – Lafourcade 1983).

Η οικολογική μελέτη των σταφυλιών και των ειδών της ζύμης του κρασιού παρουσιάζει ένα σημαντικό σύνολο της έρευνας. Ο De Rossi ξεκίνησε την έρευνά του το 1930 (De Rossi, 1935). Ο Castelli (1995, 1967) συνέχισε την οικολογία της ζύμης σε αμπέλια της Ιταλίας. Ο Peynaud και ο Domergue (1953, 1956) έκδοσαν τα πρώτα αποτελέσματα της οινολογίας των ζυμών στην Γαλλία. Περιέγραψαν όχι μόνο τα είδη που βρήκαν πάνω στο σταφύλι και κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης αλλά και τις αρρώστειες των ζυμών.

Μεταξύ πολλών δημοσιευμάτων πάνω σ' αυτό το θέμα μέχρι τη δεκαετία του 1960, αυτά που αξίζουν είναι: Brechot et al. (1962), Minrik (1971), Barnett et al. (1972), Park (1975), Cuinier and Guerineau (1976), Soufleros (1978), Belin (1979, 1981), Poulard et al (1980), Poulard and Lecocq (1981), Bureau et al. (1982), Rossini et al. (1982).

Οι ζύμες είναι πλατιά διαδεδομένες στη φύση και έχουν βρεθεί στο έδαφος, στην επιφάνεια των λαχανικών και στο πεπτικό σύστημα των ζώων. Διασκορπίζονται άτακτα στην επιφάνεια του σταφυλιού και έχει βρεθεί σε μικρές ποσότητες στα φύλλα, στο μλίσχο και στα άγουρα σταφύλια. Παρατηρητές με τη χρήση ηλεκτρονικής ανίχνευσης (μικροσκόπιο) έχουν προσδιορίσει τη θέση των ζυμών στο σταφύλι. Ο *Botrytis cinerea*, το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ και τα σπόρια βακτηρίων εμφανίζουν –αναπτύσσουν την αμεσότητα αυτών των περιστασιακών σπασμάτων.

Ο αριθμός των ζυμών στο σταφύλι μόλις πριν τη συγκομιδή είναι 10^3 και 10^5 , εξαρτώμενη από τη γεωγραφική θέση του αμπελιού, τις κλιματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, της υγιεινής κατάστασης της σοδειάς και τις παρασιτοκτόνες μεταχειρήσεις που γίνονται στη κλήμα. Μετά τη συγκομιδή, τη μεταφορά και τη σύνθλιψη της καλλιέργειας, ο αριθμός των κυττάρων είναι ικανά να σχηματίσουν αποικίες σε άγαρ που φτάνει γενικά 10^6 κυτ./ml μούστου.

Αυστηρά οξειδωτικές μεταβολισμένες ζύμες οι οποίες ανήκουν στο είδος *Rhodotorula* και μερικά ευαίσθητα αλκοολικά είδη έχουν κατά βάση βρεθεί εκεί. Αυτά που είναι πιο κοινά είναι τα *apiculated* είδη, τα οποία περιλαμβάνουν πάνω από 99% των ζυμών απομονωμένα σε ορισμένα δείγματα σταφυλιών.

Αυτά που βρέθηκαν είναι τα ακόλουθα αλλά σε μικρότερη αναλογία: *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida famata*, *Candida stellata*, *Pichia fermentans*, *Hansenula anomala*. Όλη η έρευνα επιβεβαιώνει την σπανιότητα του *S.cerevisiae* και του *S.bayanus* (εκτός του *uvatum*).

Κατά το μέσο της ζύμωσης ο *S.cerevisiae* παρουσιάζει σχεδόν όλες τις ζύμες απομονωμένες. Τα είδη *S.bayanus* (εκτός του *uvatum*) δεν βρέθηκαν ποτέ ανεξάρτητα σε ζυμώσεις του εργαστηρίου. Αλλά κατά τη διάρκεια παρόμοιων πειραμάτων όπου μεταφέρθηκαν σε ορισμένα σταφύλια από την κοιλάδα Loire, αυτά τα είδη απεδείχθησαν επικρατέστερα κατά το μέσο της ζύμωσης. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι επίσης περιορισμένες σε αριθμό για να καθορίσουν την ύπαρξη του *S.bayanus* σε ορισμένα αμπέλια.

Οι κατασκευαστές κρασιού ωστόσο πιστεύουν πως ότι οι ανεξάρτητες ζυμώσεις είναι πιο δύσκολο να τεθούν σε εφαρμογή σε νέα δοχεία απ' ότι σε δοχεία τα οποία είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί. Αυτή η εμπειρική παρατήρηση οδηγεί στην εικασία ότι ο *S.cerevisiae* μπορεί να επιζήσει μεταξύ δύο σοδειών. Υπάρχει ένα μεγάλο ποσοστό αποικιακών ζυμών και του *M.pulcherrima*.

Κατά τη παραγωγή κόκκινου κρασιού στην περιοχή Bordeaux αμέσως μόλις οι σταγόνες της πυκνότητας του μούστου πέσουν από 1.070-1.060 τα δείγματα απλώνονται σε αραιωμένο μούστο σε υγρό περιβάλλον και γενικά απομονώνεται αποκλειστικά τον *S.cerevisiae* (10^7 μέχρι 10^8 κυτ./μλ). Αυτό το είδος παίζει βασικό ρόλο στην διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης. Οι συνθήκες περιβάλλοντος επηρεάζουν τη ποικιλία τους. Αυτή η επιλογή εκθέτει 4 παραμέτρους: αναεροβίωση, θείωση μούστου και σταφυλιού, συγκέντρωση ζαχάρων και αυξανόμενη παρουσία αιθανόλης.

Κατά τη διάρκεια παραγωγής ξηρού λευκού, όπου γίνεται και ο διαχωρισμός των στέμφυλων μετά από πίεση, μειώνεται ο πληθυσμός των ζυμών. Μερικές μέρες μετά τη συγκομιδή η αλκοολική ζύμωση *S.cerevisiae* μολύνει τις πρώτες ύλες, τον μηχανικό εξοπλισμό και το πιεστήριο του κρασιού. Οι ζυμώσεις τέθηκαν πιο γρήγορα σε λειτουργία στην πορεία εξαιτίας του αυξημένου ποσοστού του *S. cerevisiae*.

Κατά τη διάρκεια του τελικού μέρους της αλκοολικής ζύμωσης ο πληθυσμός του *S.cerevisiae* μειώνεται συστηματικά. Σε διαθέσιμες συνθήκες χαρακτηρίζεται από μια γρήγορη και ολοκληρωτική καταπόνηση ζαχάρων και κανένα άλλο είδος ζύμης εμφανίζεται κατά το τέλος της ζύμωσης. Σε φτωχές συνθήκες, καταστροφικές ζύμες μπορούν να μολύνουν το κρασί. Μια από τις πιο συχνές και επικύνδυνες μολύνσεις είναι η ανάπτυξη του *Brettanomyces intermedius*, το οποίο είναι υπεύθυνο για σοβαρά οσφρητικά ελαττώματα.

Κατά το πέρας της των εβδομάδων στην ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης οι εφικτοί πληθυσμοί του *S.cerevisiae* πέφτουν γοργά σε μερικές χιλιάδες κυτ./ml. Σε πολλές περιπτώσεις άλλα είδη ζυμών μπορούν να ανπτυχθούν στο κρασί κατά τη διάρκεια της γήρανσης ή της αποθήκευσης.

Μερικές ζύμες έχουν οξειδωτικό μεταβολισμό στην αιθανόλη και μορφή πέπλου στην επιφάνεια του κρασιού όπως ο *Pichia* ή ο *Candida* ή ακόμη και μερικά είδη του *S.cerevisiae*. Κάποιες άλλες ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν αναερόβια και κυριαρχεί ποσότητα ιχνών από ζάχαρη τα οποία ήταν ελλιπή ή δεν είχαν ζυμωθεί από τον *S.cerevisiae*. Ο πληθυσμός τους μπορεί να πετύχει ποσοστό 10^4 μέχρι 10^5 κυτ./ml σε μολυσμένο κόκκινο κρασί όπου στην αλκοολική ζύμωση ολοκληρώνεται φυσιολογικά. Αυτές οι μολύνσεις συμβαίνουν και στο μπουκάλι (αποθήκευση).

Αναζυμωμένες ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν σε γλυκό ή γλυκά κρασιά με βοτρυτή κατά τη διάρκεια της γήρανσης ή αποθήκευσης. Τα κυριότερα είδη που βρέθηκαν είναι οι *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomycodes bailii* και μερικά είδη του *S.cerevisiae* τα οποία είναι ανθεκτικά στην αιθανόλη στο διοξείδιο του σουλφιδίου.

3.4 Το φαινόμενο Killer

Ορισμένα είδη ζυμών είναι γνωστά ως είδη Killer(k), οι οποίες εκκρίνουν πρωτεϊνούχες τοξίνες μέσα στο περιβάλλον και είναι ικανές να σκοτώσουν άλλα ευαίσθητα είδη (S). Αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους BEVAN & MAKOWER το 1963.

Γενικά διακρίνονται τέσσερις φαινότυποι ή ομάδες killer:

Killer(K): Παράγουν θανατηφόρες τοξίνες για τις άλλες ζύμες.

Sensitive(S): Δεν παράγουν τοξίνες και είναι ευαίσθητες σε αυτές.

Neutral(N): Δεν παράγουν τοξίνες και δεν είναι ευαίσθητες σε αυτές.

Killer (K)-Sensitive(S): Παράγουν τοξίνες και μπορεί ωστόσο να είναι ευαίσθητες στις τοξίνες άλλων killer ζυμών.

Τα ουδέτερα είδη (N) δεν παράγουν τοξίνη, αλλά είναι ανθεκτικά. Η δράση ενός είδους killer σ' ένα ευαίσθητο είδος μπορεί εύκολα να αποδειχθεί στο εργαστήριο με καλλιέργειες άγαρ και pH 4,2-4,7 στους 20°C. Το φαινόμενο killer ανακαλύφθηκε σαν *S.cerevisiae*, αλλά μπορεί να υπάρχει και σε άλλα γένη όπως τα *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Kluyveromyces* και *Debaryomyces*.

Τα killer έχουν ταξινομηθεί σε 11 ομάδες (K1-K11) σύμφωνα με την δράση στα είδη, όπως επίσης και στην φύση και τις ιδιότητες των τοξικών που εμπλέκονται. Από αυτές μόνο οι K2 και K3 είναι επικίνδυνες. Ο παράγοντας killer είναι ένα κυτταρικό μοντέλο, το οποίο επιτυγχάνεται από την έκκριση των πρωτεϊνούχων τοξινών.

Έχουν βγει αρκετές θεμελιώδεις πηγές (TIPPER AND Bostian 1984, Young 1987), Barre (1984,1992), Raddler (1988) and Van Vuuren and Jacobs (1992) έχουν περιγράψει τις τεχνολογικές επιπτώσεις του φαινομένου των ζυμών του κρασιού και την διαδικασία ζύμωσης.

3.4.1 Ο ρόλος του φαινομένου killer στην παραγωγή κρασιού

Η συχνότητα του killer είναι διαφορετική κατά την διαδικασία παραγωγής κρασιού, όταν τα είδη απομονώνονται στα σταφύλια – ρώγες ή στον ζυμωμένο μούστο. Σε μια εργασία του Barre (1978) όπου μελέτησε 908 άγρια είδη, τα 504 έδειξαν καθαρά τον K2 killer, όπου τα 299 ήταν ευαίσθητα και τα 95 ουδέτερα. Οι Cuinier και Gros (1983) ανέφεραν μια υψηλή συχνότητα της τάξεως (65-90%) είδη K2 στην Μεσόγειο και ο Beaujolais σε περιοχή με αμπέλια. Στην περιοχή Bordeaux ο K2 killer είναι υπερβολικά διαδεδομένος.

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 1989 και το 1990 πάνω στην οικολογία από ιθαγενή είδη του *S.cerevisiae*, όλα τα απομονωμένα είδη έδειξαν καθαρά την δράση του K2 killer. Μερικά είδη K2 killer απομονώθηκαν και στο νότιο ημισφαίριο (Αυστραλία, Νότια Αφρική και Βραζιλία). Από την άλλη τα περισσότερα είδη απομονώθηκαν στην Ιαπωνία παρουσιάζοντας τα χαρακτηριστικά του K1. Οι περισσότερες έρευνες του χαρακτήρα killer της ζύμης του κρασιού ενδιαφέρουν τα γένη *S.cerevisiae*.

Ο Heard και ο Fleet (1987) επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις του Barre (1980) και δεν στήριζαν την ύπαρξη της επίδρασης του killer στα *Candida*, *Hanseniaspora*, *Hansenula* και *Torulaspora*. Ωστόσο μερικά είδη killer του *Hanseniaspora uvarum* και του *Pichia kluyveri* έχουν αναγνωρισθεί από τον Zorg et al. (1988).

Ο Barre (1992) μελέτησε την δράση και την σταθερότητα της τοξίνης του K2 killer σε συνθήκες οινολογίας. Η τοξίνη killer δηλώνει καθαρά τη δράση στα κύτταρα στην ενεργητική φάση, όπου στη σταθερή φάση ήταν σχετικά ανεπηρέαστα. Η ισοδυναμία από αιθανόλη ή SO_2 στο κρασί δεν έχει πρακτικά καμία επίδραση στη δράση της τοξίνης του killer. Από την άλλη, μπορεί γρήγορα να καταστραφεί από τη θερμότητα στους 32°C για 30 λεπτά περίπου. Μπορεί επίσης να αδρανοποιηθεί εύκολα με την παρουσία φαιολικών ανώσεων και εύκολα μπορεί να προσροφηθεί από μπετονίτη.

Επιστημονικά έντυπα αναφέρονται σε μια ποικιλία πορισμάτων – διαπιστώσεων στο ρόλο του παράγοντα killer στον ανταγωνισμό που υπάρχει μεταξύ των ειδών του ζυμωμένου μούστου. Ένα παράδειγμα δόθηκε από τον Barre (1992), όπου τα κύτταρα killer, τα οποία είναι εμβολιασμένα 2% μπορούν ολοκληρωτικά να αντικαταστήσουν τα ευαίσθητα είδη κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του μούστου. Με άλλα λόγια, τα ευαίσθητα είδη killer, κάποιου ποσοστού, μπορούν να επηρεάσουν την εμφύτευση των ευαίσθητων ειδών στη δημιουργία του κρασιού μεταξύ 1/1000 και 100/1 και αυτό εξαρτάται από τον κάθε συγγραφέα.

Αυτή η σημαντική αντίφαση πιθανόν αποδίδεται στο εμφύτευμα και στην ταχύτητα της ζύμωσης που παρουσιάζουν τα είδη.

Το φαινόμενο killer είναι πιο σημαντικό όταν το μικροβιακό στέλεχος killer εμφυτεύεται από μόνο του γρήγορα και το ευαίσθητο είδος αργά. Το περιβάλλον το οποίο περιέχει την τοξίνη ασκεί επιλεκτική πίεση στο οινολογικό είδος. Σταθερές παραλλαγές διασώζουν αυτή την επιλεκτική πίεση και μπορεί να επικρατήσει μ' αυτόν τον τρόπο (Bapte 1984). Αυτή είναι η πιο απλή στρατηγική για να επικρατήσει ένα οινολογικό είδος killer. Ωστόσο η ανάπτυξη της μοριακής γενετικής και της βιοτεχνολογίας επιτρέπει στους επιστήμονες να φτιάχνουν τροποποιημένα οινολογικά είδη όπου περιέχουν ένα ή περισσότερα killer χαρακτήρες.

Απύρνηνα κύτταρα μπορούν να επιτύχουν αυτές τις τροποποιήσεις. Αυτή η μέθοδος παρουσιάζει κυττοπλασματικές διαφορές (μιτοχόνδρια, πλασμίδια) εξερχόμενες από το είδος killer μέσα σ' ένα ευαίσθητο οινολογικό είδος. Ο Seki et al. (1985) χρησιμοποίησε αυτή την μέθοδο για να φτιάξει το 522M είδος K2 killer. Με μια άλλη στρατηγική νέα ζύμη μπορεί να κατασκευαστεί με την ολοκλήρωση του τοξικού γονιδίου μέσα στα χρωμοσώματά τους. Ο Booue et al. (1990) ήταν ικανός να εισάγει τον χαρακτήρα K1 στον K2.

Ευαίσθητα επιλεγμένα είδη και θεραπευμένα K2killer μπορούν να εμφυτευτούν χωρίς πρόβλημα. Από την άλλη, η διάδοση αυτών των νέων επικρατέστερων ειδών killer στη φύση μπορούν να παρουσιάσουν ένα όχι και τόσο αμελητέο ρίσκο. Αυτά τα είδη μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς την φυσική των άγριων ζυμών παρόλο που έχουμε μόλις ξεκινήσει την απογραφή της ποικιλίας και εκμεταλλευόμαστε τα τεχνολογικά ενδεχόμενα. Θα ήταν επιζήμιο να μην ήμασταν διαθέσιμοι πλέον να επιλέξουμε άγριες ζύμες επειδή θα έχουν αντικατασταθεί στο φυσιολογικό τους περιβάλλον από γενετικά τροποποιημένα είδη, μια μετατροπή, η οποία δεν έχει κανένα οινολογικό ενδιαφέρον.

3.5 Η ζύμωση των θειωμένων γλευκών

Η αντοχή των ζυμών στο θειώδη ανυδρίτη δεν είναι ίδια για όλα τα γένη, είδη ή στελέχη, αλλά κυμαίνεται από 100 mg/l μέχρι 500 mg/l SO₂.

Με τη μικρότερη αντοχή στο SO₂ φαίνεται να είναι οι ζύμες του γένους *Kloeckera*, ενώ με τη μεγαλύτερη είναι οι ζύμες του γένους *Saccharomyces*.

Η προσθήκη του θειώδη ανυδρίτη σε δόσεις υψηλότερες από τα 500 mg/l κάνει την ανάπτυξη των ζυμών προβληματική. Σ' αυτήν ακριβώς την αδυναμία των ζυμών βασίστηκε η διατήρηση των "θειωμένων γλευκών".

Σύμφωνα με την ελληνική οινική νομοθεσία (Νόμος 396/1976 άρθρο 1, § 3 και άρθρο 7, § 17) για την παρεμπόδιση της αλκοολικής ζύμωσης των γλευκών, με σκοπό την παραγωγή των λεγόμενων "θειωμένων γλευκών", προβλέπεται η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη σε ποσότητα μέχρι 200 g/hl.

Παρ' όλα αυτά, έχει τύχει μερικές φορές να σπάσουν κλειστές δεξαμενές με θειωμένο γλεύκος, στο οποίο εκδηλώθηκε ζωήρη ζύμωση, αν και το γλεύκος περιείχε 200 g/hl SO₂.

Το φαινόμενο αυτό έχει διπλή εξήγηση:

- Στην περίπτωση των οίνων που περιέχουν αζύμωτα ζάχαρα, η παρεμπόδιση της αλκοολικής ζύμωσης δεν οφείλεται μόνο στην προσθήκη του SO_2 , αλλά και στην ύπαρξη της αλκοόλης, η οποία παρεμποδίζει την ανάπτυξη των κυττάρων και μειώνει ή αναστέλλει τη ζυμωτική δράση αυτών.

- Σ' όλες τις περιπτώσεις ζύμωσης "θειωμένων γλευκών" απομονώθηκαν ζύμες που ανήκουν σ' ένα μόνο γένος και είδος, το *Schizosaccharomyces pombe*. Το είδος αυτό αποτελεί μια ζύμη με σπάνια ανθεκτικότητα σε τόσο μεγάλη συγκέντρωση θειώδη ανυδρίτη και που δεν πολλαπλασιάζεται με εκβλάστηση, αλλά με κυτταρική διαίρεση (με σχάση). Η αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού δεν είναι εύκολη. Η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας SO_2 στα γλεύκη προσκρούει τόσο στην οινική νομοθεσία, όσο και στην τεχνολογία του οίνου (δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, δυσκολία επαναζύμωσης κλπ.).

Για το λόγο αυτό η παραπάνω ζύμη θα μπορούσε να θεωρηθεί σαν μια "ασθένεια" των θειωμένων γλευκών.

Η αποφυγή της επανάληψης της ίδιας αυτής "ασθένειας" επιβάλλει την απολύμανση των σκευών, που χρησιμοποιήθηκαν για την αποθήκευση ή τη μεταφορά του "προσβεβλημένου" γλεύκους.

3.6 Περιγραφή των κυριότερων ζυμών του γλεύκους

Schizosaccharomyces pombe: Υπάρχει σπάνια στο γλεύκος και στο κρασί. Εξαιρέση αποτελούν τα γλεύκη που έχουν υποστεί θέρμανση γιατί είναι ανθεκτικός στη θέρμανση. Είναι υπεύθυνη για τις περιπτώσεις ζύμωσης θειωμένων γλευκών, λόγω μεγαλύτερης αντοχής στο θειώδη ανυδρίτη. Έχει τη δυνατότητα να ζυμώσει το μηλικό οξύ με αργό ρυθμό κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Saccharomyces cerevisiae: Αποτελεί το 80% του πληθυσμού του γλεύκους σε ζύμωση. Αυξάνεται γρήγορα και έχει δυνατότητα να ζυμώσει μέχρι 12-14%vol. Έχει μεγάλη ευαισθησία στην ακτιδιόνη. Μπορεί να μετατρέψει τον θειώδη ανυδρίτη σε θειικά ιόντα γεγονός που μπορεί να την κάνει επικίνδυνη. Έχει μέση ζυμωτική ικανότητα, δεν μπορεί να ζυμώσει την γαλακτόζη και αυξάνει λίγο την πτητική οξύτητα.

Saccharomyces chevalieri: Έχει δράση παρόμοια με την *cerevisiae* και δεν μπορεί να ζυμώσει τη μαλτόζη.

Saccharomyces bayanus (oviformis): Υπάρχει σε μικρή μόνο ποσότητα στο σταφύλι και είναι ανθεκτική στο θειώδη ανυδρίτη. Είναι η ζύμη που συνεχίζει τη ζύμωση μετά τον *cerevisiae* και έχει δυνατότητες ζύμωσης μέχρι 18%vol. Το 50% των αναζυμώσεων οφείλεται σε αυτήν.

Saccharomyces bailli: Υπάρχει σπάνια στο σταφύλι, συνίσταται στα γλυκά κρασιά και είναι υπεύθυνη για τις αναζυμώσεις.

Pichia etchellsii: Έχει την ικανότητα σχηματισμού ψευδομυκηλίων και αναπτύσσεται στην επιφάνεια των κρασιών δημιουργώντας μένιο. Έχει μικρή ζυμωτική ικανότητα και δημιουργεί αυξημένη πτητική οξύτητα και οξικό αιθυλεστερα. Θεωρείται ανεπιθύμητη ζύμη.

Hansenula anomala: Έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει αλυσίδες με συνένωση των κυττάρων και υμένιο στην επιφάνεια των κρασιών. Η διαφορά με την *Pichia* είναι ότι μπορεί να αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας νιτρικά ιόντα. Δημιουργεί αυξημένη πτητική οξύτητα και ιδιαίτερα αυξημένη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα. Θεωρείται ιδιαίτερα ανεπιθύμητη.

Debaryomyces phaffii: Μπορεί να αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας νιτρικά ιόντα και έχει μικρή ζυμωτική ικανότητα.

Hanseniaspora uvarum και η ατελής της μορφή *Kloeckera apiculata*:

Αποτελεί το 90% του πληθυσμού των ζυμών πάνω στο σταφύλι και έχει μικρή ζυμωτική ικανότητα 2-4%νοι. Δημιουργεί αυξημένη πτητική οξύτητα και οξικό αιθυλεστέρα. Είναι πολύ ευαίσθητη στο θειώδη ανυδρίτη και γι' αυτό παύει να δρα πολύ γρήγορα, ιδιαίτερα στα λευκά κρασιά λόγω αυξημένης θείωσης. Θεωρείται ιδιαίτερα ανεπιθύμητη.

Saccharomyces ludwigii: Έχει σχήμα λεμονιού και σχετικά μεγάλο μέγεθος και είναι ανθεκτική στο θειώδη ανυδρίτη. Έχει ικανότητα ζύμωσης μέχρι τους 17%νοι και προκαλεί αναζυμώσεις στα εμφιαλωμένα κρασιά προκαλώντας νιφάδες. Δημιουργεί μεγάλη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και είναι ιδιαίτερα ανεπιθύμητη.

Metschnikowia pulcherrima: Υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό πάνω στο σταφύλι αλλά γρήγορα εξαφανίζεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Torulopsis stellata ή *bacillaris*: Ζυμώνει κατά προτίμηση τη φρουκτόζη σε σχέση με τη γλυκόζη. Είναι ανθεκτική στο θειώδη ανυδρίτη και ζυμώνει μέχρι τους 12%νοι.

Bettanomyces: Σχηματίζει μικρές αλυσίδες και δημιουργεί υμένιο. Η αύξησή του επιδιώκεται στην παραγωγή ορισμένων τύπων κρασιών και σχηματίζει ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και ακεταμίδιου.

Candida: Υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό στο σταφύλι όπου σχηματίζει χοντρό υμένιο στην επιφάνεια του κρασιού δημιουργώντας την άνθηση στα άσχημα συντηρημένα κρασιά και αναπτύσσεται καταναλώνοντας αιθανόλη.

Rhodotorula: Υπάρχει μόνο πάνω στο σταφύλι όπου σχηματίζει αποικίες χρώματος ροζ. Δεν έχει δυνατότητα παραγωγής αιθανόλης και μπορεί να σχηματίσει ψευδομυκήλιο.

Από τους σακχαρομύκητες, οι οποίοι έχουν διαφορετική ικανότητα ζύμωσης επικρατεί ο *Saccharomyces cerevisiae* και ο *Saccharomyces bayanus*, ο οποίος και αποτελείώνει τη ζύμωση στα πλούσια σε σάκχαρα γλεύκη.

- Η θερμοκρασία: Οι ζυμομύκητες είναι οργανισμοί ψυχρόφιλοι και μεσόφιλοι. Μπορούν να αναπτυχθούν και να ασκήσουν τις δραστηριότητές τους, είτε σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 20°C είτε σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 20-45°C, ανάλογα με την κατηγορία στην οποία ανήκουν.

Όσο η θερμοκρασία είναι πιο υψηλή, τόσο πιο γρήγορα, εξελίσσεται η ζύμωση παρουσιάζοντας ένα άριστο από τους 30-39°C ανάλογα με το είδος τους. Πέρα όμως από ορισμένα όρια, όσο πιο υψηλή είναι η θερμοκρασία τόσο πιο περιορισμένη είναι η ζύμωση, δηλαδή τόσο πιο λίγα ζάχαρα ζυμώνονται και κατά συνέπεια όλο και πιο μικρό ποσοστό αλκοόλης αποκτάται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΖΥΜΕΣ ΜΕ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ

4.1 Οι ζύμες ασθενειών ή επαναζυμώσεων

Μερικές φορές, κατά τη διάρκεια της διατήρησης οίνων με αζύμωτα ζάχαρα, παρατηρείται ανάπτυξη των περιεχόμενων σ' αυτούς ζυμών με αποτέλεσμα το θόλωμα των οίνων, το σχηματισμό ιζήματος και τη δημιουργία CO₂. Τα ατυχήματα αυτά μπορεί να συμβούν τόσο στις δεξαμενές και τα βαρέλια όσο και στις φιάλες, όπου το πρόβλημα είναι σοβαρότερο.

Σε τέτοιου είδους ατυχήματα, τη μεγαλύτερη συχνότητα παρουσιάζει ο *Saccharomyces oviformis*. Υπεύθυνος για τα προβλήματα των επαναζυμώσεων φαίνεται ότι είναι ο *Saccharomyces bayanus*. Είναι η ζύμη που συναντάται, επίσης, στις καλλιέργειες που αναπτύσσονται στην ελεύθερη επιφάνεια του οίνου και συμμετέχει στο σχηματισμό μυκοδερμικού υμενίου στους τυπικούς οίνους του Jura και του Xeres.

Δεύτερος σε συχνότητα, στις περιπτώσεις των επαναζυμώσεων, έρχεται ο *Saccharomyces bailii* με ποσοστό συμμετοχής 26%. Πρόκειται για ένα είδος αρκετά ανθεκτικό στο θειώδη ανυδρίτη.

Αμέτοχος δεν είναι επίσης ο *Saccharomyces ellipsoideus* (ή *S. cerevisiae* με τη νέα ονοματολογία), ο οποίος συναντάται στο 15% παρόμοιων περιπτώσεων.

Με το ίδιο ποσοστό συχνότητας συμμετέχει και η μεγάλη οξυκόρυφη ζύμη *Saccharomycodes ludwigii*, η οποία παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ίσως ανθεκτικότητα στο θειώδη ανυδρίτη, μετά το γένος *Schizosaccharomyces*.

Με πολύ μικρότερο ποσοστό συμμετέχουν στις επαναζυμώσεις και διάφορα άλλα είδη του γένους *Saccharomyces*, όπως οι *S. chevalieri*, *S. uvarum*, *S. heterogenicus* και *S. intermedius*.

Οι επαναζυμώσεις προκαλούνται συνήθως από ένα μόνο είδος ζυμών, το πιο ανθεκτικό, που μπόρεσε να προσαρμοστεί καλύτερα στις δυσμενείς συνθήκες διατήρησης του οίνου.

Με τα ατυχήματα αυτά προέκυψε μια νέα διάσταση στη θεωρία του PASTEUR που έλεγε ότι : "οι ζύμες φτιάχνουν τον οίνο και τα βακτήρια τον χαλάνε". Με τα σημερινά δεδομένα βλέπουμε ότι και οι ζύμες μπορούν ν' αλλοιώσουν την ποιότητα του οίνου κάτω από ορισμένες συνθήκες (περίπτωση γλυκών οίνων), ενώ αντίθετα μερικά βακτήρια μπορούν να τη βελτιώσουν (περίπτωση μηλογαλακτικής ζύμωσης).

4.2 Ζύμες επιμολύνσεων ή ζύμες οινοποιείων

Ερευνες έδειξαν ότι σε διάφορους χώρους των οινοποιείων, στις δεξαμενές, στα βαρέλια ή στα διάφορα μηχανήματα, συναντιούνται αξιόλογες εστίες ζυμών, οι οποίες μπορούν να επιμολύνουν τον οίνο που διατηρείται σ' αυτά ή έρχεται σε επαφή μ' αυτά.

Στην κατηγορία αυτή των ζυμών ανήκουν, κυρίως, οι μυκοδερμικές ζύμες, οι οποίες προκαλούν την "άνθηση" των οίνων. Αναπτύσσονται συνήθως στις ελεύθερες επιφάνειες των βαρελιών, των πλαστικών σωλήνων, στα επιφανειακά στρώματα του δαπέδου κλπ.

Οι ζύμες αυτές δε ζυμώνουν αλλά μόνο αναπνέουν. Είναι πάθηση (αλλοίωση) που οφείλεται σε ανάπτυξη στην επιφάνεια κυρίως των οξειδωτικών ζυμών, που σχηματίζουν αρχικά λεπτή και στη συνέχεια παχιά μεμβράνη χρώματος λευκού ως υποκίτρινου. Το μυκήλιο αυτό, σε προχωρημένο στάδιο, μετατρέπεται σε παχύ κοκκώδες στρώμα γνωστό ως "ανθος του οίνου". Οι ζύμες αυτές κατατάσσονται στο είδος *Candida mycoderma*, που πολλαπλασιάζονται με εκβλαστήσεις, ενώ συχνά συνυπάρχουν και τα γένη *Pichia*, *Hansenula* και *Brettanomyces*. Είναι ασθένεια του κρασιού ελάχιστα επικίνδυνη αλλά ενοχλητική.

Το είδος *Candida mycoderma* είναι οξειδωτικό, σχηματίζει κύτταρα επιμήκη με χαρακτηριστικές τις δύο σταγόνες λαδιού κατά τους πόλους και επιπλέον το ψευδομυκήλιο. Χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακος για την ανάπτυξή του είτε την αλκοόλη του κρασιού, είτε τα οξέα του. Μικροσκοπικά, οι ζύμες αυτές αναγνωρίζονται από τις διακλαδώσεις που σχηματίζουν και από τις δυο γυαλιστερές κηλίδες που φαίνονται στο κάθε κύτταρο.

Η αλκοόλη οξειδώνεται προς αλδεϋδη με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση της αλκοόλης, της ολικής και της πτητικής οξύτητας. Ταυτόχρονα σχηματίζεται μια παχιά μεμβράνη, η οποία καθίζει προς τον πυθμένα και θολώνει το κρασί. Το είδος *Candida mycoderma* είναι συνήθως ανθεκτικό στο θειώδες. Ακόμα η προσβολή είναι συχνότερη στα νέα κρασιά που είναι πλούσια σε εκχυλισματικές ύλες και πολύ σπάνια στα παλιά και ξηρά. Γενικά η άνθηση είναι ασθένεια των κρασιών που δεν δέχονται τις ενδεδειγμένες φροντίδες και περιποιήσεις και επιπλέον παραμένουν μέσα σε μισογεμάτα βαρέλια ή κάδους.

Η άνθηση συμβαίνει σε οίνους με μικρή περιεκτικότητα σε αλκοόλη (9 και 10 % vol), που έρχονται σε επαφή με τον αέρα και δεν είναι ικανοποιητικά θειωμένοι. Για την πρόληψη της ασθένειας, απαιτούνται τουλάχιστον 30 mg/l ελεύθερου SO₂ και απογέμισμα των οινοδοχείων. Η παστερίωση του οίνου στους 65°C, συνιστά τρόπο θεραπείας σε μη προχωρημένες καταστάσεις.

Γενικά, καμιά από τις ζύμες, που συναντούνται στα τοιχώματα των οινοποιείων και των μηχανημάτων, δεν είναι αβλαβής. Πρέπει πάντοτε να παίρνονται οι απαραίτητες προφυλάξεις, ώστε ν' αποφεύγονται οι ανεπιθύμητες επιπτώσεις.

4.3 Χρήση επιλεγμένων ζυμών

Ο ρόλος του γένους ή του είδους των ζυμών, αλλά και του στελέχους στην παραγωγή του οίνου είναι γνωστός εδώ και αρκετά χρόνια. Οι διακυμάνσεις, που παρατηρούνται στην ποιότητα του οίνου από την μια χρονιά στην άλλη, οφείλονται κατά ένα μέρος στη διαφορετική σύνθεση της φυσικής ζυμοχλωρίδας.

Είναι γνωστό ότι κατά την αλκοολική ζύμωση, εκτός από την αλκοόλη και το CO₂, παράγονται και αρκετά δευτερογενή πτητικά προϊόντα (ανώτερες αλκοόλες, ανώτεροι εστέρες κλπ.) υπεύθυνα για το δευτερεύον άρωμα του οίνου. Οι ποσότητες των αρωματικών αυτών συστατικών κυμαίνονται ανάλογα:

- Με την πρώτη ύλη
- Με το στέλεχος ή τα στελέχη ζυμών που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση.
- Με τις συνθήκες πραγματοποίησης αυτής
- Με τις τεχνικές οινοποίησης κλπ.

Προσωπικές μελέτες σχετικές με τη ζυμοχλωρίδα των οίνων, που έγιναν το 1973-78, έδειξαν ότι και ο ρόλος του στελέχους των ζυμών, πέραν εκείνου του γένους και του είδους, είναι εμφανής και ουσιαστικός.

Η δυνατότητα ασφαλούς διαφοροποίησης ή ταύτισης των στελεχών μεταξύ τους με τη μελέτη του DNA των μιτοχονδρίων ή των χρωμοσώμων του κυττάρου δημιούργησε τις προϋποθέσεις για την πλήρη αξιοποίηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών κάθε στελέχους και την εφαρμογή στο χώρο της οινολογίας της τεχνικής των επιλεγμένων καλλιέργειών των μικροοργανισμών (ζύμες, βακτήρια).

Οι επιλεγμένες καλλιέργειες ζυμών είναι στελέχη που διαθέτουν:

1. Τα βασικά χαρακτηριστικά όπως:
 - Δυνατότητα ζύμωσης 170-240 g/l ζάχαρης
 - Ταχύτητα ζύμωσης και αποζύμωσης
 - Δυνατότητα συνέχισης της αλκοολικής ζύμωσης σε περιβάλλον 10-14% vol αλκοόλης
 - Ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά
2. Τα εξειδικευμένα χαρακτηριστικά ανάλογα με:
 - τις συνθήκες οινοποίησης
 - τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κλπ.
3. Το χαρακτηριστικό killer:

Ορισμένες ζύμες εκκρίνουν πρωτεϊνούχες τοξίνες οι οποίες μπορούν να θανατώσουν άλλες ζύμες. Υπάρχουν 11 τουλάχιστον ομάδες killer (K₁-K₁₁) από τις οποίες μόνο οι K₂ και K₃ είναι επικίνδυνες. Ο τύπος killer βρέθηκε σε διάφορα γενή και είδη και κυρίως στον *Saccharomyces*.

Για την επιλογή ζυμών προτιμάται ο χαρακτήρας killer(K), γιατί κατά τον εμβολιασμό οι ζύμες αυτές μπορούν να υπερσχύσουν των άλλων και να φτάσουν μέχρι το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Οι ζύμες Neutral (N) μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν για επιλεγμένες καλλιέργειες, ως ανθεκτικές στον παράγοντα killer.

4.3.1 Παραγωγή επιλεγμένων καλλιιεργειών

Διακρίνουμε δύο είδη επιλεγμένων καλλιιεργειών:

1. Υγρές καλλιιεργειες: Οι καλλιιεργειες αυτές προέρχονται από επιλεγμένες αποικίες, που φυλάσσονται στο εργαστήριο σε στερεό υπόστρωμα(άγαρ-άγαρ) και σε θερμοκρασία 0°C ή -80°C ή -180°C (υγρό N₂). Πολλαπλασιάζονται σε θρεπτικά υποστρώματα, λίγο πριν τη χρησιμοποίησή τους.

2. Ξηρές καλλιιεργειες ενεργές: Η παραγωγή τους περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- **Πολλαπλασιασμός**: Τα επιλεγμένα στελέχη καλλιιεργούνται σε ζαχαρούχο υπόστρωμα(π.χ. μελάσα) εμπλουτισμένο με NH₄, PO₄, ανόργανα άλατα, ιχνοστοιχεία κλπ., με σκοπό την απόκτηση υψηλού αριθμού κυττάρων.
- **Φυγοκέντρωση, διήθηση**: Με τη διαδικασία αυτή αποκτούμε μάζα με υγρασία 70% περίπου.
- **Μορφοποίηση**: Με τη βοήθεια εξωθητή η μάζα των μικροοργανισμών μορφοποιείται σε νηματόμορφα σχήματα πάχους 2-4mm.
- **Αποξήρανση**: Πραγματοποιείται με διάφορες διαδικασίες σε θερμοκρασίες όχι υψηλότερες από 40 , για 3-5 ώρες, μέχρις ότου το νερό που απομένει να είναι 4-8%. Σ' αυτό το μικρό ποσοστό υγρασίας οφείλεται η σταθερότητα και η δραστηριοποίηση των καλλιιεργειών.
- **Αποθήκευση**: Επιβάλλεται να γίνεται σε αναερόβιο περιβάλλον, σε αεροσταγείς συσκευασίες και σε χαμηλές θερμοκρασίες.

4.3.2 Εφαρμογές των επιλεγμένων καλλιιεργειών

Η επιλεγμένη καλλιιεργεια μπορεί να προστεθεί απευθείας στο γλεύκος. Για μια γρήγορη εκκίνηση της αλκοολικής ζύμωσης, χωρίς υπερβολική άνοδο της θερμοκρασίας και χωρίς σημαντική ποσότητα αφρού, απαιτούνται 10g ξηρής καλλιιεργειας/hl οίνου (2×10^6 κύτταρα/ml) ή σύμφωνα με άλλους ερευνητές απαιτούνται 50g/hl.

Οικονομικότερος τρόπος χρησιμοποίησης επιλεγμένων ζυμών είναι η προετοιμασία μιας καλλιιεργειας εκκίνησης. Για το σκοπό αυτό 25-50g ξηρής καλλιιεργειας προστίθενται σε 100 λίτρα γλεύκους. Οι τέτοιου είδους καλλιιεργειες πρέπει να ανανεώνονται κάθε εβδομάδα, για ν' αποφεύγονται επιμολύνσεις από ανεπιθύμητα στελέχη.

Ο εμβολιασμός με επιλεγμένες καλλιιεργειες πρέπει να γίνεται μετά από αποδυνάμωση του "αυτόχθονα" πληθυσμού με: φυγοκέντρωση, διήθηση, μετάγγιση, προσθήκη SO₂, παστερίωση κλπ.

Επιλεγμένες καλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης και για την επαναδραστηριοποίηση ζυμώσεων που έχουν διακοπεί.

Η μοριακή βιολογία σε συνδυασμό με την επιστήμη της οινολογίας πέτυχαν την παρασκευή επιλεγμένων καλλιεργειών για ένα μεγάλο αριθμό εφαρμογών, όπως είναι:

- Η αποικοδόμηση του μηλικού οξέος σε αιθυλική αλκοόλη.
- Η παραγωγή αφρού και η παραγωγή συμπαγούς ιζήματος για τους οίνους Champagne και για τους αφρώδεις οίνους που παρασκευάζονται με τη μέθοδο της Καμπανίας. Οι ζύμες αυτές διαθέτουν την ικανότητα να ξεκινήσουν τη 2η αλκοολική ζύμωση σε περιβάλλον με αλκοόλη 11-11,5% vol.
- Η παραγωγή ημιαφρώδη οίνου με μικρό αλκοολομετρικό τίτλο
- Η παραγωγή αποσταγμάτων οίνου

Η ανάπτυξη ορισμένων προδρόμων ουσιών του αρώματος της σταφυλής με αποτέλεσμα την αύξηση του ποικιλιακού αρώματος.

4.4 Σύγχρονες μελέτες της Οικολογίας του *S.cerevisiae*

Η οικολογική μελέτη του *S.cerevisiae* κατά τη διάρκεια παραγωγής κρασιού ήτων αδιανόητο για πολύ καιρό εξαιτίας της έλλειψης κατανόησης, να ξεχωρίσουν τα είδη ζυμών από ένα άλλο. Τέτοια έρευνα έγινε κατάλληλη με την ανάπτυξη μοριακού είδους ζύμης ταυτοποιήσιμων μεθόδων. Αυτό το τμήμα συγκεντρώνει πρόσφατες προόδους σ' αυτόν τον χώρο.

Η αλκοολική ζύμωση των σταυλιών ή του μούστου πραγματοποιείται μόνο από το είδος ζύμης *S.cerevisiae*. Η ανάλυση αυτού του τμήματος του *S.cerevisiae* σε πρακικές συνθήκες οινοπαραγωγής σκοπεύει να απαντήσει στις ακόλουθες ερωτήσεις:

- Μια αυθόρμητη ζύμωση πραγματοποιείται από επικρατέστερα είδη, έναν μικρό αριθμό ή έναν μεγάλο αριθμό ειδών;
- Μπορεί η διαδοχική εμφάνιση διαφορετικών ειδών ν' αποδειχθεί κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης;
- Κατά τη διάρκεια της οινοπαραγωγής από τον έναν χρόνο στον άλλον, στο ίδιο αμπέλι, η αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται από τα ίδια είδη;
- Πώς επηρεάζονται οι άγριες ζύμες από την παρουσία εμβολίων στο αμπέλι;

Επιπλέον κατά την ανάμειξη εμβολίων στο εργαστήριο, όπου το καθένα έχει 8% αιθανόλη, αυτά τα είδη γίνονται γρήγορα επικρατέστερα όταν τοποθετούνται παρουσία άλλων άγριων μη επικρατέστερων ειδών του *S.cerevisiae* απομονωμένοι στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης. Χωρίς αμφιβολία, θα ήταν ενδιαφέρον να συγκρίνουμε τα γενετικά χαρακτηριστικά των ειδών που επικρατούν

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Η ΘΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

5.1 Μηλογαλακτική ζύμωση

Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι ωφέλιμη ως προς το κρασί, βάσει της οποίας το μηλικό οξύ μετατρέπεται προς γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα από βακτήρια της ομάδας των γαλακτοβακτηρίων. Λαμβάνει χώρα μετά την αλκοολική ζύμωση των ερυθρών οίνων και θεωρείται ως η τελική φάση όλης της βιολογικής διεργασίας κατά την οινοποίηση. Στις περιπτώσεις που και οι δύο ζυμώσεις συμπορεύονται, η ποιότητα του τελικού προϊόντος υποβαθμίζεται. Η μηλογαλακτική ζύμωση απαλύνει τη γεύση του κρασιού, βελτιώνει το άρωμα (bouquet) και ζωηρεύει το χρώμα.

Αντίθετα, αν το μηλικό οξύ δεν έχει ζυμωθεί τότε οι διαδικασίες για την σταθεροποίηση της ποιότητας του κρασιού (διαύγαση, διήθηση, εμφιάλωση) σχεδόν πάντοτε απογοητεύουν, ακριβώς επειδή η μηλικογαλακτική ζύμωση θολώνει εκ νέου το προϊόν. Αποτελεί την απαρχή των επιβλαβών ασθeneιών του κρασιού, ιδιαίτερα αν αυτή δεν συμπληρωθεί αμέσως μετά την αποζύμωσή του. Γενικά η παρουσία του γαλακτικού οξέος στα λευκά κρασιά δεν βελτιώνει τους οργανοληπτικούς τους χαρακτήρες και για τον λόγο αυτό η μηλογαλακτική ζύμωση προλαμβάνεται με θείωση του γλεύκους, αλλά και του αποζυμωμένου κρασιού.

Ομοίως παρεμποδίζεται με θείωση και στα γλυκά κρασιά, ενώ στα ελαφρά χρωματισμένα (ροζέ), άλλοτε ενθαρρύνεται και άλλοτε παρεμποδίζεται. Πάντως τα λευκά κρασιά καθώς και τα ροζέ, με παρεμπόδιση της μηλογαλακτικής ζύμωσης διατηρούν το φρουτώδες άρωμα του σταφυλιού και την δροσερότητα του νωπού προϊόντος στη γεύση.

Τα βακτήρια της μηλογαλακτικής ζύμωσης προσβάλλουν κατά προτίμηση το μηλικό οξύ και αφήνουν πρακτικά ανέπαφα τα ζάχαρα σε χαμηλή τιμή του Ph, ενώ σχηματίζουν πάντοτε μικροποσότητες πτητικών οξέων. Αντίθετα, τα βακτήρια των ασθeneιών του κρασιού προσβάλλουν σε μεγαλύτερη τιμή του Ph τα ζάχαρα και τα άλλα ουσιώδες συστατικά του κρασιού και αυξάνουν την πτητική του οξύτητα.

Τα βακτήρια της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι δύο τύπων, οι κόκκοι και οι βάκιλλοι. Οι κόκκοι προσφέρονται περισσότερο για ζύμωση από ότι οι βάκιλλοι, επειδή διασπούν το μηλικό οξύ σε τιμή pH χαμηλότερη από ότι τα ζάχαρα. Έτσι είναι δυνατό, χρησιμοποιώντας κόκκους της μηλογαλακτικής ζύμωσης να επιτύχουμε εκλεκτική ζύμωση του μηλικού οξέως με ταυτόχρονη προστασία των υπολειμμάτων του ζαχάρου.

Με την μηλογαλακτική ζύμωση σημειώνεται πάντοτε αύξηση της περιεκτικότητας σε οξικό οξύ ιδιαίτερα όταν ζυμθούν και πεντόζες. Αύξηση στο διπλάσιο ή στο τριπλάσιο σημειώνεται στο διακετύλιο και στην ακετοΐνη.

Γενικά όμως η σύνθεση ακετοΐνης και διακετυλίου είναι συνδεδεμένα και με το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος του γλεύκους ή του κρασιού από βακτήρια της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Η ακετοΐνη και το διακετύλιο επηρεάζουν την ποιότητα του κρασιού ειδικά όταν το διακετύλιο βρίσκεται σε αυξημένη συγκέντρωση στο κρασί προσδίδει σε αυτό γεύση βουτύρου αρκετά δυσάρεστη και απαράδεκτη.

5.2 Τα βακτήρια της μηλογαλακτικής ζύμωσης

Τα είδη βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για τη μηλογαλακτική ζύμωση είναι: 1) *Pediococcus cerevisiae*

2) *Leuconostoc gracile*

3) *Leuconostoc oenos*

4) *Lactobacillus plantarum*

5) *Lactobacillus casei*

6) *Lactobacillus fructivorans*

7) *Lactobacillus desidiosus*

8) *Lactobacillus hilgardii*

9) *Lactobacillus brevis*

Επικρατέστερα είναι τα: *Leuconostoc gracile* και *Leuconostoc oenos*.

1) *Leuconostoc oenos*

Τα κύτταρα του είναι σφαιρικά ή σχήματος φακής και απαντούν σε ζεύγη ή σε αλυσίδες και έχουν διαστάσεις 0,5-1,0 X 0,7-1,5 μm. Αναπτύσσεται ελάχιστα στην επιφάνεια των θρεπτικών υλικών ακόμα και υπό αναερόβιες συνθήκες. Αναπτύσσεται καλύτερα σε pH 4,2-4,8 και σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν τοματοχυμό και η ανάπτυξή του είναι πάντοτε βραδεία. Όλα τα στελέχη ζυμώνουν την γλυκόζη, την φρουκτόζη και την τρεαλόζη. Η ικανότητα να ζυμώνει την αραβινόζη, την ξυλόζη και άλλους μονοσακχαρίτες ή δυσσακχαρίτες ποικίλλει από στέλεχος σε στέλεχος. Δεν ζυμώνει τη ζαχαρώδη, ενώ ζυμώνει το μηλικό οξύ και έχει πολύπλοκες ανάγκες σε αμινοξέα και σε αυξητικούς παράγοντες. Αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασίας 10°C έως 30°C, είναι ετεροζυμωτικό είδος και παράγει από την γλυκόζη D(-) γαλακτικό οξύ.

2) *Pediococcus cerevisiae*

Στο κρασί απαντά το είδος *Pediococcus cerevisiae* που τελευταία ονομάζεται *Pediococcus damnosus*. Τα κύτταρα είναι σφαιρικά ενωμένα σε ζεύγη ή τετράδες και έχουν διάμετρο 0,6-1 μm. Υπό αναερόβιες συνθήκες σχηματίζει αποικίες επιφανειακά, διαμέτρου 2-3mm, χρώματος λευκού με τάση προς το κίτρινο. Ζυμώνει την γλυκόζη και τη φρουκτόζη, ενώ δεν ζυμώνει την σακχαρόζη και τις πεντόζες, είναι είδος ομοζυμωτικό και παράγει DL-γαλακτικό οξύ. Αναπτύσσεται σε εύρος pH μεταξύ 3,5 και 6,2 με optimum θερμοκρασίας στους 25°C.

5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων της μηλογαλακτικής ζύμωσης στο κρασί

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων της μηλογαλακτικής ζύμωσης στα κρασιά είναι:

- 1) Το pH του κρασιού
- 2) Το ποσοστό του θειώδους οξέως
- 3) Η θερμοκρασία

- 4) Ο αερισμός του γλεύκους
 - 5) Η περιεκτικότητά του σε αμινοξέα, βιταμίνες του συμπλόκου Β, τα ανόργανα άλατα
- 1) Η τιμή του pH: Διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην εγκατάσταση των βακτηρίων της μηλικογαλακτικής ζύμωσης στο κρασί. Το optimum pH για την ανάπτυξη των βακτηρίων της μηλικογαλακτικής ζύμωσης κυμαίνεται μεταξύ 3,4 και 4,0 για τους γαλακτοβάκιλλους και 3,0 με 3,5 για το γένος *Leuconostoc*. Τέλος σε τιμή κάτω του 2,9 η μηλικογαλακτική ζύμωση παρεμποδίζεται πλήρως, ενώ σε τιμές ελαφρώς υψηλότερες προχωρεί με πιο αργό ρυθμό, είναι όμως ασφαλής, γιατί τα υπεύθυνα βακτήρια ζυμώνουν το μηλικό οξύ και όχι τα ζάχαρα.
 - 2) Επίδραση της θερμοκρασίας: Η μηλικογαλακτική ζύμωση επηρεάζεται πολύ από την θερμοκρασία του κρασιού όταν αυτή κυμαίνεται μεταξύ 15°C και 30°C, ενώ πάνω από τους 30°C παρεμποδίζεται πλήρως. Η μηλικογαλακτική ζύμωση υπό χαμηλή θερμοκρασία είναι ακίνδυνη, ενώ υπό υψηλή μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της πτητικής οξύτητας και στην αλλοίωση του κρασιού.
 - 3) Αερισμός: Ο μέτριος αερισμός ευνοεί την μηλικογαλακτική ζύμωση, ενώ ο κορεσμός με οξυγόνο την παρεμποδίζει.
 - 4) Απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία: Τα βακτήρια της μηλικογαλακτικής ζύμωσης δεν συνθέτουν τα αμινοξέα και το κρασί είναι ανεπαρκώς εφοδιασμένο υποστρώματα με αμινοξέα και αζωτούχα συστατικά.
 - 5) Εμβολιασμός με καθαρή καλλιέργεια επιθυμητών βακτηρίων: Ο εμβολιασμός του γλεύκους με ζύμες και βακτήρια μηλικογαλακτικής ζύμωσης δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα, ακόμα και αν γίνει ταυτόχρονα, ακριβώς επειδή τα βακτήρια αναλαμβάνουν το έργο τους, μόλις αποζυμωθεί το ζάχαρο. Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιούνται κόκκοι ανθεκτικοί στην αλκοόλη και στα οξέα, οι οποίοι όμως δεν προσβάλλουν τα άλλα συστατικά του κρασιού. Γενικά η χρήση καθαρής καλλιέργειας βακτηρίων μηλικογαλακτικής ζύμωσης έχει δώσει καλά αποτελέσματα από ότι η καθαρή καλλιέργεια ζυμών.

5.4 Η επίδραση της μηλικογαλακτικής ζύμωσης στη σύσταση του οίνου

Είναι γνωστό ότι το φαινόμενο αυτό συνοδεύεται, από μία ελαφριά αύξηση της πτητικής οξύτητας της τάξης του 0,1-0,2g/l.

- Το άρωμα του οίνου μεταβάλλεται βαθιά. Η μεταβολή αυτή είναι τόσο μεγάλη όσο περισσότερο χρόνο ο οίνος παραμένει με τα ζωντανά βακτήρια.
- Το άρωμα που χαρακτηρίζει την πουκαλία των σταφυλίων εξασθενίζει και μπορεί να εξαφανισθεί τελείως. Γι' αυτό το λόγο σε μερικούς αρωματικούς λευκούς οίνους δεν ενδείκνυται η πραγματοποίηση της μηλικογαλακτικής ζύμωσης.

- Η οσμή του διακετυλίου (άρωμα του βουτύρου), που παράγεται στη διάρκεια της μηλικογαλακτικής ζύμωσης, ανάλογα με την περιεκτικότητά του στον οίνο μπορεί να θεωρηθεί πλεονέκτημα ή μειονέκτημα.
 - Τα ομοζυμωτικά βακτήρια σχηματίζουν ακεταδεύλδη, ακετοίνη, 2,3μέθυλο-1-βουτανόλη και ισοβουτανόλη.
 - Τα ετεροζυμωτικά σχηματίζουν ακόμα αιθανόλη, προπανόλη, ισοποπανόλη, οξικό αιθυλεστέρα, εξανόλη και οκτανόλη.
- Ο απόλυτος έλεγχος και η πλήρη διευθέτηση της μηλικογαλακτικής ζύμωσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή των ουσιών που έχουν θετική επίδραση στην ποιότητα του οίνου και ν' αποτρέψουν τις δυσμενείς επιδράσεις.
- Οι επιπτώσεις είναι οι ακόλουθες:

- Σημαντική μείωση της ολικής οξύτητας.
- Επακολούθη ανύψωση της τιμής του pH.
- Έκλυση διοξειδίου του άνθρακα σε ποιότητα αρκετή για τον σχηματισμό αφρού.
- Εμφάνιση θολώματος.
- Σχηματισμός γαλακτικού οξέος σε βάρος του απαλόγευστου μηλικού με παράλληλη σύνθεση οξεικού οξέος, διακετυλίου, ακετοίνης και διαφόρων εστέρων.

Η γεύση και το άρωμα του κρασιού μετά την μηλικογαλακτική ζύμωση αλλάζουν αισθητά με αποτέλεσμα να υπάρχει σαφώς βελτίωση και εκλέπτυνση της ποιότητας του κρασιού σε ορισμένες περιπτώσεις και σε άλλες σαφής υποβάθμιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Η ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

6.1 Γενικά

Οι ασθένειες του κρασιού που προκαλούνται από αναερόβια ή μικροαερόφιλα βακτήρια μελετήθηκαν για πρώτη φορά από τον Παστέρ. Οι παθήσεις είναι: η εκτροπή, η πίκρανση, η πάχυνση, η μαννιτική ζύμωση και το θόλωμα που οφείλεται στην έκλυση αερίου μέσα στη μάζα του κρασιού.

Τα γαλακτοβακτήρια χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακος όλες τις ανθρακούχες ουσίες του κρασιού, εκτός της αλκοόλης, όπως την γλυκόζη, την φρουκτόζη, την γλυκερίνη, τις πεντόζες, το κιτρικό οξύ, το τρυγικό, το μηλικό. Τα προϊόντα που σχηματίζονται από την διάσπαση των παραπάνω ουσιών διαφέρουν ανάλογα με το είδος του βακτηρίου και μπορεί να είναι γαλακτικό οξύ (γαλακτική ζύμωση), μαννίτης (μαννιτική ζύμωση), οξικό οξύ και τότε η πάθηση λέγεται πίκρανση, πολυσακχαρίτης (πάχυνση). Η διάσπαση του μηλικού οξέως προς γαλακτικό οξύ και διοξειδίο του άνθρακα δεν θεωρείται ως ασθένεια του κρασιού (ιδιαίτερα στην περίπτωση της ερυθρής οινοποίησης) αλλά σαν ζύμωση βελτιωτική στη γεύση και στο άρωμα του ώριμου κρασιού.

Το σύνδρομο των ασθενειών του γαλακτικού οξέος προσβάλλει τα εκλεκτά κρασιά παρόλο που δέχτηκαν όλες τις περιποιήσεις και φροντίδες κατά την διάρκεια της οινοποίησης και τα οποία διατηρούνται υπό αναερόβιες συνθήκες. Έτσι καθίστανται ξηρά και αδύνατα χωρίς κάτι το ιδιαίτερο στη γεύση και στο άρωμα και το χειρότερο κερδίζουν σε πτητική οξύτητα. Σε άλλες περιπτώσεις χάνουν μόνο την δροσερότητά τους και την λεπτή και απαλή τους γεύση. Άλλοτε πάλι γίνονται αφρώδη λόγω εκλύσεως διοξειδίου του άνθρακα χωρίς να διατηρούν τίποτα το εξαιρετικό στη γεύση με απαράδεκτο άρωμα άρρωστου κρασιού. Στις βαρύτερες μορφές των ασθενειών του γαλακτικού οξέως, το κρασί καθίσταται επίμονα θολό, δύσσομο και οργανοληπτικά απαράδεκτο.

Τα βακτήρια που προξενούν το σύνδρομο των ασθενειών του γαλακτικού οξέος στο κρασί τάσσονται στα Γαλακτοβακτήρια. Τα ακόλουθα γένη είναι τα εξής:

1. Streptococcus: Τα κύτταρα του οποίου είναι κόκοι απαλλαγμένοι από κάψα που απαντούν υπό μορφή μακρών αλυσίδων.
2. Leuconostoc : Τα κύτταρα του οποίου(κόκκοι) περικλείονται μέσα σε παχιά και γλοιώδη κάψα και εμφανίζονται σε μορφή αλυσίδων μικρού μήκους.
3. Pediococcus: Τα κύτταρα του οποίου είναι κόκκοι και εμφανίζονται υπό μορφή τετράδων.
4. Lactobacillus: Τα κύτταρα του οποίου είναι ραβδία με διάφορα μεγέθη και σχήματα. Τα ραβδία μπορεί να είναι μεμονωμένα ή σε ζεύγη, σε μακρές ή βραχείες αλυσίδες, ευθείες ή συνεστραμμένες ανάλογα με το είδος. Το γένος αυτό υποδιαιρείται σε τρία υπογένη, τα *Thermobacterium*, *Streptobacterium* και *Betabacterium*.

6.2 Ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά βακτήρια

Τα Γαλακτοβακτήρια διαιρούνται σε δύο ομάδες, τα ομοζυμωτικά και τα ετεροζυμωτικά. Τα πρώτα διασπούν τις εξόζες και σχηματίζουν γαλακτικό οξύ, ενώ τα δεύτερα διασπούν τις εξόζες και σχηματίζουν γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ ή αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

Χημική αντίδραση ομοζυμωτικών γαλακτοβακτηρίων



Χημική αντίδραση ετεροζυμωτικών γαλακτοβακτηρίων



Από το σύνολο των Γαλακτοβακτηρίων ομοζυμωτικά είναι τα γένη *Streptococcus* και *Pediococcus*, και τα δύο από τα τρία υπογένη του *Lactobacillus*, τα *Thermobacterium* και *Streptobacterium*. Τα υπόλοιπα είναι το γένος *Leuconostoc* και το υπογένος *Betabacterium* είναι ετεροζυμωτικά. Ορισμένα βακτήρια της ομάδας των γαλακτοβακτηρίων, τα οποία διασπούν το μηλικό οξύ θεωρούνται ως βελτιωτικά της γεύσεως και του αρώματος. Είναι δυνατόν όμως να ζημιώσουν ανεπανόρθωτα την ποιότητα του ώριμου κρασιού. Γενικά όμως, τα περισσότερα επικίνδυνα γαλακτοβακτήρια είναι όσα διασπούν το τρυγικό οξύ και τη γλυκερίνη.

Διάφορες μορφές του συνδρόμου των ασθενειών του γαλακτικού οξέος:

- 3) Η μηλικογαλακτική ζύμωση.
- 4) Η ζύμωση του τρυγικού οξέος (εκτροπή).
- 5) Η ζύμωση της γλυκερίνης με σχηματισμό μεταξύ των άλλων και της ακρολείνης (πίκραση).
- 6) Η γαλακτική ζύμωση αυξημένων ποσοτήτων σακχάρου με χαρακτηριστική την έντονα δηκτική γεύση του γαλακτικού οξέος.
- 7) Η γαλακτική ζύμωση μικροποσοτήτων σακχάρων και πεντοζών.
- 8) Η πάχυνση του κρασιού.

6.3 Η γαλακτική ζύμωση της γλυκερόλης ή πίκραση

Η ζύμωση της γλυκερίνης είναι βαριά πάθηση του κρασιού και οφείλεται στη δράση των βακτηρίων, μέσω της οποίας παράγονται γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και ακρολείνη. Αποτέλεσμα είναι η αύξηση της σταθερής αλάς και της πτητικής οξύτητας, οπότε το κρασί αποκτά ιδιάζουσα οσμή και στιφή ως πικρή γεύση και έτσι καθίσταται υπόξινο και άνοστο. Η πίκραση ή πίκριση είναι κατά κύριο λόγο αρρώστια των μαύρων κρασιών κυρίως των παλιών και σπάνια των λευκών. Εμφανίζεται συνήθως στα χρόνια της κακής εσοδείας και προσβάλλει κατά κύριο λόγο κρασιά πιεστηρίων ή κρασιά από οινολάσπη. Με την πρόοδο της ασθένειας το κρασί θολώνει και η πικρή γεύση καθιστά το κρασί μη πόσιμο.

Η ελαφριά διάσπαση της γλυκερίνης (κατά τους Ribereau-Gayon και Peynaud) γίνεται κατά την παλαίωση των κρασιών σε βαρέλια. Το κρασί τότε καθίσταται περισσότερο ξηρό, περισσότερο όξινο και περισσότερο λεπτό στη γεύση. Ταυτόχρονα εμφανίζει αύξηση της πτητικής οξύτητας με τον σχηματισμό του οξικού οξέος, αλλά και της σταθερής οξύτητας με σχηματισμό του γαλακτικού οξέος. Η διάσπαση της παραπάνω μορφής ναι μεν υποβαθμίζει ελαφρά την ποιότητα του κρασιού, αλλά δεν θεωρείται από την άλλη και τόσο σοβαρή ασθένεια.

Στις περιπτώσεις όμως βαριάς παθήσεως των κρασιών ορισμένα βακτήρια διασπούν το μόριο της γλυκερίνης και σχηματίζουν ακρολείνη μαζί με άλλα παράγωγα. Η διάσπαση αυτή έχει αποδοθεί (από τον Voisenet) στο βακτήριο *Bacillus amarae* (sic). Νεότερες όμως έρευνες (Sobolow και Smiley) απέδειξαν ότι ορισμένα γαλακτοβακτήρια διασπούν το μόριο της γλυκερίνης και σχηματίζουν ακρολείνη, β-υδροξύ - προπιονικό οξύ. Η πρόληψη της ασθένειας αυτής γίνεται με παστερίωση στους 65°C και απαιτεί συνθήκες υγιεινής. Θεραπεία με κολλαίωμα, με προσθήκη ενεργού άνθρακα για την απόσμιση και εκκρίανση, δε δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε προχωρημένα στάδια προσβολής.

6.4 Η γαλακτική ζύμωση του τρυγικού οξέος ή εκτροπή

Η εκτροπή είναι η σοβαρότερη ασθένεια των κρασιών μετά το ξίδισμα. Καλείται και συννέφιασμα, θόλωμα, κύλισμα, γύρισμα και τάγγισμα. Θεωρείται ως ασθένεια των γλεύκων και των κρασιών που προήλθαν από προσβεβλημένα σταφύλια, συγκομισμένα υπό βροχερό καιρό. Η εκτροπή είναι αρρώστια των κρασιών τα οποία δεν αποχωρίζονται έγκαιρα από την λάσπη τους, όπως συμβαίνει με τους ρητινίτες. Η διατήρηση της λάσπης στα βαρέλια αποτελεί αναγκαίο κακό, επειδή αν γίνει μετάγγιση αυτό οδηγεί σε οξειδωτικό τάγγισμα των αιθέριων ελαίων. Η λάσπη παρεμποδίζει απλώς την παλαίωση και προδιαθέτει το κρασί σε παθήσεις κάθε μορφής και ιδιαίτερα στην εκτροπή.

Το παθογόνο αίτιο της εκτροπής είναι βακτήριο της ομάδας των Γαλακτοβακτηρίων, το οποίο διασπά το τρυγικό οξύ κυρίως προς οξικό οξύ, ενδεχομένως προς γαλακτικό και επιπλέον προς διοξειδίο του άνθρακα. Το παθογόνο αυτό βακτήριο είχε ονομασθεί παλαιότερα *Bacterium tartarophthorum* αργότερα όμως έρευνες απέδειξαν ότι αυτό το βακτήριο είναι στέλεχος του είδους *Lactobacillus plantarum*.

Τα βακτήρια της εκτροπής στο μικροσκόπιο εμφανίζονται ως ραβδία που μοιάζουν με εκείνα της μηλικογαλακτικής ζύμωσης, με τη διαφορά ότι είναι περισσότερο επιμήκη και παχύτερα. Σε προχωρημένη μορφή της ασθένειας τα παθογόνα βακτήρια παρουσιάζονται ως νημάτια ελικοειδώς συνεστραμμένα, τα οποία αποτίθενται υπό μορφή ογκώδους ιζήματος.

Η εκτροπή είναι βαριά αρρώστια του κρασιού και καθίσταται μακροσκοπικά ορατή, χάρις στο λεπτότατο και χαρακτηριστικό θόλωμα που προκαλεί. Εκτροπιασμένα δε κρασιά μέσα σε ποτήρι, όταν τοποθετηθούν σε προσπίπτον φώς εμφανίζουν μια ελαφριά ανατάραξη με χαρακτηριστικούς κυματισμούς, όπως επίσης χαρακτηριστικές είναι και οι φυσαλίδες αερίου μέσα στη μάζα του κρασιού, οι οποίες οφείλονται στην έκλυση της διάσπασης του τρυγικού οξέος, των τρυγικών αλάτων και του διοξειδίου του άνθρακα.

Κατά την εκτροπή, η μεν χρωστική των λευκών κρασιών αμαυρώνεται ελαφρά ενώ των ερυθρών αλλοιώνεται ακόμη περισσότερο και αποκτά διαδοχικά αμαυρό, κίτρινό και τελικά καστανό. Η ερυθρή χρωστική μετά την αλλοίωση μπορεί να αποχωριστεί τελείως με διαύγαση.

Η ασθένεια αυτή προκαλεί όμως σημαντικότερες αλλοιώσεις στη γεύση και στο άρωμα του κρασιού, οι οποίες έχουν την αρχή τους στη μείωση της σταθερής οξύτητας του τρυγικού αλλά και του μηλικού οξέος και στην αύξηση της πτητικής, αλλά και στο σχηματισμό εκτός του τοξικού και του προπιονικού οξέος, ενδεχομένως του βουτυρικού, του βαλεριανικού και του γαλακτικού. Τα τελευταία οξέα σχηματίζονται μόνο όταν μαζί με το τρυγικό διασπάτε και η γλυκερίνη από τα ίδια ή από άλλα βακτήρια. Είναι πολύ πιθανό να συναναπτύσσονται και άλλα βακτήρια που ευνοούνται από τις δημιουργούμενες νέες συνθήκες.

Ως αποτέλεσμα είναι να χάσει το κρασί το λεπτό του άρωμα τη δροσερότητά του, την απαλή του γεύση και να καταστεί αρχικά άγευστο και άτονο. Με την πρόοδο όμως της ασθένειας το κρασί αλλοιώνεται περισσότερο, αποκτά οσμή περιττωμάτων ποντικών που θυμίζει οσμή ακεταμιδίου, όπως επίσης και αηδή επίμονη γεύση. Έτσι, το κρασί αχρηστεύεται τελείως και είναι ακατάλληλο για κατανάλωση ως οργανοληπτικά απαράδεκτο. Η ασθένεια της εκτροπίας μπορεί να προληφθεί με μια ελαφριά προσθήκη SO₂ και με σχολαστική καθαριότητα. Για τη θεραπεία συνίσταται παστερίωση στους 65°C, προσθήκη θειώδη ανυδρίτη και αναπλήρωση του τρυγικού οξέος.

6.5 Η ασθένεια της πάχυνσης

Η πάχυνση είναι μια ιδιόμορφη περίπτωση της μηλικογαλακτικής ζύμωσης. Στην πάθηση αυτή κόκκοι του γένους *Leuconostoc* (πιθανότατα το είδος *Leuconostoc mesenteroides*) μετατρέπουν μέρος του μηλικού οξέος αλλά και του αζύμωτου ζαχάρου προς γλοιώδη μάζα. Είναι ασθένεια των γλυκών κρασιών τα οποία αποκτούν βλενώδη σύσταση με αυξημένο ιξώδες και όταν μεταφέρονται από το ένα ποτήρι στο άλλο θυμίζουν ροή λαδιού. Οφείλεται στην δράση των ετεροζυμωτικών γαλακτοβακτηρίων του γένους *Leuconostoc* τα οποία συνθέτουν πολυμερές συστατικά και σχηματίζουν κάψουλα μέσα στην οποία εγκλωβίζονται. Συνέπεια του σχηματισμού της βλενώδους αυτής ουσίας το κρασί αποκτά παχύρρευστη και γλοιώδη σύσταση και κατά τη μετάγγιση χύνεται αθόρυβα ως ελαιώδες υγρό.

Η πάχυνση ως ασθένεια του κρασιού δεν είναι σοβαρή και τείνει να εξαλειφθεί. Προσβάλλει συνήθως τα άσπρα κρασιά, σε μερικές περιπτώσεις και τα κόκκινα τόσο στη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης όσο και μετά το πέρας αυτής. Για την εκδήλωση της ασθένειας είναι απαραίτητο να περιέχεται στο κρασί αζύμωτο ζάχαρο και να μην έχει προηγηθεί θείωση. Τα κρασιά που έχουν προσβληθεί από πάχυνση χάνουν την χαρακτηριστική τους γεύση, δεν εμφανίζουν όμως αύξηση της πτητικής τους οξύτητας (συνήθως δεν είναι μεγαλύτερη του 0.4‰ σε θειικό οξύ), ούτε υποβαθμίζεται το άρωμά του.

Η πάχυνση είναι ασθένεια του κρασιού ακίνδυνη και μπορεί να προληφθεί και να θεραπευτεί. Προσβάλλει τα αδύνατα κρασιά που έχουν λίγη οξύτητα και ταννίνη και επιπλέον περιέχουν και αζύμωτο ζάχαρο. Επίσης εμφανίζεται και στα εμφιαλωμένα κρασιά, όταν η εμπορία τους γίνεται πρόωρα, πριν ολοκληρωθεί η ωρί

Η πρόληψη της ασθένειας είναι σχετικά εύκολη και επιτυγχάνεται με λογική θείωση, ώστε να μην παρεμποδίζεται η μηλικογαλακτική ζύμωση και να μη σχηματίζεται βλέννα. Εκτός όμως από τη θείωση επιβάλλεται και η τήρηση των κανόνων της καλής οινοποίησης. Η θεραπεία του κρασιού που έχει προσβληθεί από πάχυνση είναι επίσης εύκολη όταν δεν έχει εκδηλωθεί γαλακτική ή οξική ζύμωση. Για το λόγο αυτό εισάγεται στο κρασί ταννίνη σε ποσότητα 20-30 γραμμαρίων κατά εκατόλιτρο και θειώδες οξύ σε ποσότητα 6-8 γραμμαρίων κατά εκατόλιτρο. Στη συνέχεια ακολουθεί μηχανική απόδοση του κρασιού για να χάσει τη βλεννώδη του υφή, διαύγαση, μετάγγιση και διοχέτευση στην κατανάλωση.

Αν υπάρχει αζύμωτο ζάχαρο λαμβάνονται μέτρα για τη ζύμωσή του, διαφορετικά το κρασί είναι ευαίσθητο σε αναζύμωση. Τέλος αν η ασθένεια έχει προχωρήσει αρκετά, επιβάλλεται η διόρθωση των κύριων συστατικών του πριν από την εμπορία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΤΑ ΟΞΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

7.1 Τα οξικά βακτήρια

Τα οξοβακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν στο οινόγλυκος, στο κρασί αλλά και στο έτοιμο προϊόν όταν συντρέξουν ορισμένες προϋποθέσεις. Είναι τα οξοβακτήρια οι περισσότεροι επικίνδυνοι και βλαπτικοί εχθροί του κρασιού όπως και έχει διαπιστωθεί ότι στο οινόγλυκος επικρατεί το γένος *Gluconobacter* και στο κρασί το γένος *Acetobacter*. Τα ίδια τα οξοβακτήρια απαντούν στους χώρους εναποθηκεύσεως των κρασιών, στην εσωτερική επιφάνεια των βαρελιών παλαιώσεως μέσα στο κρασί και ακόμα στο έδαφος των αμπελώνων.

Οξοβακτήρια του κρασιού εμφανίζονται στο μικροσκόπιο ως μικρά κύτταρα κυλινδρικά, πολύ βραχεία, σε μορφή αλυσίδας. Είναι αρνητικά ή παραλάσσοντα, ως προς τη χρώση του Gram και αναπτύσσονται γρήγορα πάνω στην επιφάνεια του εκτεθειμένου στον αέρα κρασιού, σχηματίζεται λεπτό υμένιο ή παχιά μεμβράνη. Η διάμετρος τους είναι 0,5-1 μm και το μήκος τους είναι 1-1,5 μm. Από ζινιτισμένο κρασί απομονώθηκαν τα είδη: *A. ascendens*, *A. paradoxus*, *A. ranscens*, *A. mesoxydans*, *A. suboxydans* και *A. xylinum*.

Το υμένιο διαφέρει ανάλογα με το είδος του Οξοβακτηρίου που το σχημάτισε και μπορεί να είναι πολύ λεπτό αναπτυσσόμενο ταχέως και προσκολλώμενο εύκολα στις παρειές του δοχείου. Άλλοτε πάλι είναι λιπώδες, παχύτερο, βραδέως σχηματιζόμενο και χρωματίζεται με την προοδευτική αύξηση του πάχους του. Άλλοτε πάλι έχει όψη ενός παχέους στρώματος με σύσταση ινώδη που αποκολλάται δύσκολα. Ο πρώτος τύπος υμενίου σχηματίζεται πάνω στην επιφάνεια του κρασιού, ενώ ο τελευταίος μόνο στις εξιδρώσεις των βαρελιών. Ο πρώτος τύπος του υμενίου οφείλεται στα είδη: *A. ranscens* και *A. ascendens*, ενώ ο δεύτερος στο είδος *A. xylinum*. Οι ομάδες των οξοβακτηρίων είναι τέσσερις (*Peroxydans*, *oxydans*, *mesoxydans* και *suboxydans*) και τα ακόλουθα δέκα είδη:

- Ομάδα υπεροξειδωτικών με είδη: *A. peroxydans*, *A. paradoxum*.
- Ομάδα οξειδωτικών με είδη: *A. lovaniense*, *A. ascendens* και *A. ranscens*.
- Ομάδα μεσοοξειδωτικών με είδη: *A. aceti*, *A. xylinum* και *A. mesoxydans*.
- Ομάδα υποοξειδωτικών με είδη: *A. suboxydans* και *A. melanogenum*.

Οι τρεις πρώτες ανήκουν στο γένος *Acetobacter* και η τέταρτη στο γένος *Gluconobacter*. Επιπλέον αναγνωρίστηκε το ιδιαίτερο γένος *Gluconobacter* για τα υπεροξειδωτικά Οξοβακτήρια (*Gluconobacter oxydans*).

7.2 Η οξική ζύμωση του οίνου

Η κυριότερη μεταβολιστική δραστηριότητα των οξοβακτηρίων είναι η οξείδωση της αιθυλικής αλκοόλης προς οξικό οξύ όπου αναλύσκονται υψηλές ποσότητες ενός μορίου αλκοόλης προς οξικό οξύ. Για τον λόγο αυτό τα οξοβακτήρια αναπτύσσονται μόνο όπου υπάρχει οξυγόνο. Εκτός από την αλκοόλη τα οξοβακτήρια οξειδώνουν και άλλες ενώσεις. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι τα υπεροξειδωτικά είδη οξειδώνουν περαιτέρω το οξικό οξύ προς CO_2 και νερό.

Τα οξοβακτήρια αυτά είναι ανεπιθύμητα στη βιομηχανία ξιδιού ιδιαίτερα στην περίπτωση της οξευκής ζυμώσεως του κρασιού. Είναι αυτός ο εστέρας που προσδίδει στο κρασί την ιδιόζουσα δηκτική, δυσάρεστη γεύση και όχι τόσο το ίδιο το οξεϊκό οξύ. Εννοείται ότι όσο μικρότερη είναι η πτητική οξύτητα του κρασιού, τόσο καλύτερη είναι η ποιότητά του και τόσο καλύτερη ήταν η οινοποίηση. Γενικά κρασί με περισσότερη πτητική οξύτητα από 2 γραμμάρια οξεϊκού οξέος κατά λίτρο είναι οργανοληπτικά απαράδεκτο και θα πρέπει ή να αποσταχθεί ή να μετατραπεί προς ξίδι. Εκτός από τις ζύμες, μικροποσότητες οξεϊκού οξέος σχηματίζουν και τα βακτήρια της γαλακτικής και της μηλικογαλακτικής ζυμώσεως.

Σημειώνεται ότι το κρασί δεν γίνεται ξίδι αν περιέχει μεταμπισουλφίτ. Η οξική ζύμωση είναι ο περισσότερο επικίνδυνος εχθρός του κρασιού και ύπουλος. Για το λόγο αυτό θα πρέπει σε όλα τα στάδια της παρασκευής και διατηρήσεως των κρασιών να καταβάλλονται προσπάθειες για να προλαμβάνεται η ανάπτυξη των οξοβακτηρίων. Κατά τη διάρκεια της έντονης αλκοολικής ζυμώσεως δημιουργούνται στους χώρους της ζυμώσεως αναερόβιες συνθήκες, οι οποίες παρεμποδίζουν την εκδήλωση της οξικής ζυμώσεως. Κάθε επαφή του κρασιού με τον αέρα πρέπει να αποφεύγεται αλλιώς τα αποτελέσματα θα είναι απογοητευτικά. Η πρόληψη της αλλοιώσεως μπορεί να γίνει με:

- 1) Η σχολαστική καθαριότητα στο χώρο του οινοποιείου.
- 2) Απογέμισμα των βαρελιών και των οινοδεξαμενών μετά το πέρας της ζυμώσεως, συνοδευόμενο από αεροστεγές κλείσιμο.
- 3) Τοποθέτηση θειωτήρων στα πώματα, ώστε να είναι εξασφαλισμένη η συνεχής ύπαρξη θειώδους οξέος.
- 4) Εξασφάλιση όσο το δυνατό χαμηλότερου pH στο κρασί, δεδομένου ότι σε pH 3,4 η ανάπτυξη των οξοβακτηρίων είναι εύκολη, σε pH 3,2 δύσκολη και σε pH 3,0 αδύνατη.
- 5) Διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας γύρω στους 20°C και κατά την διάρκεια της οινοποιήσεως και στο χώρο εναποθηκεύσεως των κρασιών.
- 6) Απολύμανση των βαρελιών και των κάδων.
- 7) Απομάκρυνση του ξιδιασμένου κρασιού από το χώρο του οινοποιείου το συντομότερο δυνατό. Άλλως η μύγα του ξιδιού (*Drosophila melanogaster*) εμβολιάζει με οξοβακτήρια το υγιές περιεχόμενο κάδων, βαρελιών κ.τ.λ.
- 8) Αύξηση του αλκοολικού βαθμού, αφού είναι γνωστό ότι τα δυνατά κρασιά είναι ανθεκτικά στα οξοβακτήρια, ενώ τα αδύνατα κρασιά είναι πολύ ευαίσθητα στο ξίδιασμα.

Θείωση και του οινογλεύκου και του κρασιού μετά την αποζύμωση. Θεραπεία της ασθενείας του κρασιού από τα οξοβακτήρια δεν υπάρχει. Η πάθηση είναι δυνατόν να διακοπεί η περαιτέρω πρόοδος με παστερίωση στους 60° C και με άμεση διάθεση του κρασιού. Προσωρινή διακοπή της οξίνισσεως μπορεί να γίνει και με ισχυρή θείωση, διαύγαση και διήθηση. Η εμφιάλωση ακολουθούμενη από παστερίωση προστατεύει το κρασί από περαιτέρω πρόοδο της παθήσεως λόγω εξασφαλίσεως αναερόβιων συνθηκών. Τα οξοβακτήρια δεν είναι σποριογόνα και έχουν αυξημένες απαιτήσεις για θρεπτικά συστατικά. Για το λόγο αυτό επιβιώνουν πολύ δύσκολα και δεν δημιουργούν ιδιαίτερα προβλήματα κατά την απολύμανση και το πλύσιμο ξιδιασμένων βαρελιών. Αν τα μέσα αυτά ζυμώσεως του γλεύκου ή εναποθηκεύσεως του κρασιού παραμείνουν στεγνά για ορισμένο χρονικό διάστημα τότε πρακτικά παύουν να είναι φορείς οξοβακτηρίων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη ζύμωση νέου μούστου. Τα οξοβακτήρια δεν μπορούν να παραμείνουν ζωντανά σε ξηρό περιβάλλον και απαντούν σε όλα τα στάδια της οινοποιήσεως αλλά και της εμπορίας.

Το γένος *Gluconobacter* αφθονεί στα σταφύλια, εξαφανίζεται όμως επειδή δεν αντέχει σε αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης. Το είδος *A. aceti* απαντά με μικρή συχνότητα στα υγιή σταφύλια, αλλά με μεγάλη στα προσβεβλημένα από το *Botrytis cinerea*. Τα *A. aceti* και *A. pasteurianus* είναι οι κύριοι εκπρόσωποι των οξοβακτηρίων στα κρασιά.

Η πορεία διαδοχής των οξοβακτηρίων στις διάφορες φάσεις φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Οι ζύμες δεν ανταγωνίζονται τα οξοβακτήρια με εξαίρεση ορισμένα στελέχη του είδους *Saccharomyces cerevisiae* που έχουν την ικανότητα να ανάγουν τα θειικά άλατα προς θειώδες οξύ. Τα οξοβακτήρια είναι υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια που δεν αναπτύσσονται απουσία αέρος. Ο μόνος τρόπος για αποφυγή της αναπτύξεως των οξοβακτηρίων κ της τροχοπέδησης της δράσεώς τους είναι η θείωση στα διάφορα στάδια της οινοποίησης και της διακινήσεως των οίνων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.2.1. Πορεία των οξοβακτηρίων στις διάφορες φάσεις της οινοποίησης.

Λευκό κρασί σε ζύμωση	Κύτταρα οξοβακτηρίων κατά ml (x 1000)	Είδη οξοβακτηρίων	%
Γλεύκος	2000	<i>G. oxydans</i>	80%
		<i>A. pasteurianus</i>	20%
5 ημέρες	80	<i>G. oxydans</i>	70%
		<i>A. pasteurianus</i>	30%
12 ημέρες	100	<i>A. pasteurianus</i>	50%
		<i>A. aceti</i>	50%
20 ημέρες	0,6	<i>A. pasteurianus</i>	50%
		<i>A. aceti</i>	50%
Έγχωμο γλεύκος (κρασί)	16	<i>G. oxydans</i>	100%
3 ημέρες	3	<i>G. oxydans</i>	75%
		<i>A. pasteurianus</i>	25%
	0,1	<i>G. oxydans</i>	55%
7 ημέρες		<i>A. pasteurianus</i>	45%
	0,02	<i>G. oxydans</i>	30%
10 ημέρες πριν την μετάγχιση		<i>A. pasteurianus</i>	70%
Μετά την μετάγχιση	30	<i>A. pasteurianus</i>	70%

Άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την εγκατάσταση στα προϊόντα της οινοβιομηχανίας είναι ο αλκοολικός βαθμός, το pH, και η θερμοκρασία. Όσο μικρότερη είναι η αλκοολοπεριεκτικότητα των οινικών προϊόντων τόσο μεγαλύτερη είναι η ευαισθησία τους στο ξίδισμα.

Επίσης τιμή pH κάτω του 3,2 παρεμποδίζει αισθητά την ανάπτυξη των οξοβακτηρίων. Όμως με συνδυασμό και των δύο παραμέτρων, του αλκοολικού βαθμού δηλαδή και της τιμής του Ph η παρεμπόδιση είναι μεγαλύτερη. Όσο αναφορά την θερμοκρασία όταν είναι 5°C είναι το προς τα κάτω όριο για ανάπτυξη και δράση του οξοβακτηρίου. Όταν όμως η θερμοκρασία είναι 10°C και κάτω προστατεύει τα κρασιά από την οξεική ζύμωση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.2.2 Επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των οξοβακτηρίων και στην παραγωγή του οξεικού οξέος υπό συνθήκες αερισμού (αποτελέσματα έρευνας του Joyeux 1984) .

Χρόνος (ημέρες)	Θερμοκρασία	pH του οίνου	Κύτταρα οξοβακτηρίων (αριθμός X 100)	Οξεικό οξύ mg/λίτρο
0	-	-	5	370
15	10°C	3,4	15	380
15	10°C	3,8	15	420
15	18°C	3,4	140	500
15	18°C	3,8	200	520

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εκπονώντας την συγγραφή της πτυχιακής μου εργασίας δεν μου ήταν εφάνταστω, πως η διαδικασία παραγωγής,κατεργασίας καθώς η συντήρηση των οίνων αποτελεί μια ολόκληρη επιστήμη και πιο συγκεκριμένα μια επιστήμη όπου περιγράφει μια φυσική διεργασία που συμβαίνει εδώ και χιλιάδες έτη. Δεν ήταν εύκολο να σκεφτώ την σύσταση των γλεύκων και ότι η μικροβιολογία των κρασιών μελετά την συστηματική των μηκύτων και των βακτηρίων, τον προσδιορισμό τους, την κατανομή τους στη φύση, την αύξηση τους και τους βιοχημικούς, ενζυματολογικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν.

Το αστείρευτο ενδιαφέρον μου για την σύσταση, θέση, λειτουργία αυτών των μικροοργανισμών και η θέση καθώς η επιρροή τους στη χημική και βιοχημική σύσταση των γλεύκων με οδήγησαν στην σύνταξη αυτής της πτυχιακής εργασίας. Η σπουδαιότητα αυτής εργασίας έγκειται στη πορεία της ανάπτυξης και αναδίπλωση των ζυμών στην οινολογία. Οι κατηγορίες ζυμών με τα ξεχωριστά και ιδιάζοντα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους αναπτύσσονται πλήρως διεξοδικά.

Γνωρίζοντας τις μεθόδους και παραμέτρους οινοποίησης καταγράφονται πλήρως τα αποτελέσματα τους μέσα στην οινοποίηση. Στο σημείο αυτό σημειώνεται ο ρόλος του φαινομένου killer στη παραγωγή κρασιού. Στη συνέχεια σημειώνεται η σημασία και διάσταση των επαναζυμώσεων όπου οδήγησε σε συμπέρασμα το οποίο στους περασμένους αιώνες κατά τον Pasteur "οι ζύμες φτιάχνουν τον οίνο και τα βακτήρια τον χαλάνε", με τα σημερινά δεδομένα συμπαιρένουμε πως και οι ζύμες είναι ικανές να υποβαθμίσουν σημαντικά την ποιότητα του οίνου υπο ορισμένες συνθήκες και τα βακτήρια είναι δυνατόν να την βελτιώσουν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ευάγγελος Ηρ. Σουφλερός "Οινολογία Επιστήμη και Τεχνογνωσία"
2. Αργύρη Ν. Τσακίρη "Από το σταφύλι στο κρασί", εκδ. Ψυχαλού, (1998)
3. Γεώργιος Μπαλατσούρας "Μικροβιολογία Τροφίμων", εκδ. Έμβρυο
4. Ribe´reau-Gayon, D.Dubourdieu, B. Done´che, A. Lonyaud Handbook of Enology "The Microbiology of Winea and Vinifications" , εκδ..Wiley
5. Ribe´reau-Gayon j., Peynaud e., Ribe´reau- Gayonp. et Sudraud P., (1975). Sciences et Technics du Vin. Dunod éd., Paris tome IV.
6. Barnett J.A., Delaney M.A., Jones E., Magson A.B. and Winch B. (1972) Arch. Microbiol.
7. Barnett J.A., Payne R.W. and Yarrow D. (1990) Yeasts: Characteristics and Identification.
8. Barre P. (1978) Killer factor activity under vinification conditions. Vth International Symposium on Yeasts, Montpellier
9. Barre P. (1992) Le facteur Killer. In Les acquisitions récentes de la microbiologie du vin (ed. B. Doneche), p.p. 63-69. Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- 10 Bendova O., Richter V., Janderova B. and Hausler J. (1991) Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 810-812.
11. Ribe´reau-Gayon J., Peynaud E., Ribe´reau-Gayon P. and Sudraud P. 91975) Traité d'Enologie. Sciences et techniques du vin, Vol 2. Dunod Paris.
- 12.Soufleros E., (1978) . Les levures de la région viticole de Naoussa(Grèce). Identification et classification, étyde des produits volatils formes au cours de la fermentation. Thèse de Docteyr-Ingénieur. Université de Bordeaux I I, Bordeaux, France.
13. Stadler-Szoke A., Nyeste L. and Holló J., (1980). Studies on the factors affecting gluconic acid formation by Acetobacter. Acta Alimentaria, 9-2, 155-172.
14. Olivje W. and Kok J.J., (1979). Analysis of growth of Gluconobacter oxydans in glucose containing media. Arch. Microbiol., vol.121, 283-290.
- 15.Αμαλία Καραγκούνη Κύρτσου "Γενική Μικροβιολογία", εκδ. Σταμούλης, (1999)