

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΊΔΡΥΜΑ ΠΕΛΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ
ΠΙΘΑΝΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΠΙ ΤΩΝ
ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΟΥΖΑΝΑ ΤΟΔΡΗ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2017

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΊΔΡΥΜΑ ΠΕΛΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ
ΠΙΘΑΝΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΠΙ ΤΩΝ
ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΟΥΖΑΝΑ ΤΟΔΡΗ

Εξεταστική επιτροπή

Βαμβακάς Σωτήρης (επιβλέπων καθηγητής)

Καπόλος Ιωάννης

Βαρζάκας Θεόδωρος

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή κρασιού είναι μια από τις παλαιότερες βιοτεχνολογικές διαδικασίες. Στην παρούσα εργασία εξετάζουμε την μικροβιολογία που λαμβάνει χώρα στην παραγωγή οίνου, με τους μικροοργανισμούς που συνεισφέρουν σε αυτόν θετικά χαρακτηριστικά, αλλά και αυτούς που πιθανώς προκαλούν αλλοιώσεις. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο κυρίαρχος μικροοργανισμός της βιο-μετατροπής του μούστου σε κρασί, μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Παρόλα αυτά, ο συνδυασμός του με ζύμες που δεν ανήκουν σε αυτό το είδος, και είναι γηγενής στο σταφύλι, αποτελεί μια μέθοδο για την βελτίωση της ζύμωσης και την ανάδειξη του τελικού προϊόντος, κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες. Επιπλέον, η μηλογαλακτική ζύμωση, ως μια δευτερογενής ζύμωση που εκτελείτε σε μερικά μόνο κρασιά, συμβάλει στη δημιουργία πιο ήπιων, σε γευστικό και αρωματικό χαρακτήρα, κρασιών. Ο *Oenococcus oeni* είναι το πρωταρχικό είδος για την πραγματοποίησή της. Τέλος, θα γίνει αναφορά του πως αυτές οι μικροβιολογικές διαδικασίες επηρεάζουν τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του κρασιού, και ποιες οι δραστικές ουσίες.

ABSTRACT

Wine production is one of the oldest biotechnological processes. In the present study we examine the microbiology that takes place in the production of wine, with microorganisms that contribute to its positive characteristics, but also those that are likely to cause spoilage. *Saccharomyces cerevisiae* is the dominant microorganism of the bio-conversion of grape juice into wine, through alcoholic fermentation. However, its combination with yeasts that do not belong to this species and are indigenous to the grape will be mentioned as it is a method for improving fermentation and the promotion of the final product, under the appropriate conditions. In addition, malolactic fermentation, as a secondary fermentation that takes place in only a few wines, helps to create a milder taste and aroma wine. *Oenococcus oeni* is the primary species for its accomplishment. Finally, we will report how these microbiological processes affect the organoleptic nature of wine, and what the active substances are.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Ζύμες και αλκοολική ζύμωση.....	6
1. Εισαγωγή.....	6
2. Ταξινόμηση των ζυμών οινοποίησης.....	7
3. Η επικράτηση του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
4. Ο ρόλος των ζυμών μη σακχαρομύκητα στην οινοποίηση.....	9
5. Ζυμωτική ικανότητα σακχαρομύκητα και μη ζυμών.....	11
➤ Ισχύς ζύμωσης: πρόσληψη ζάχαρης και διαθεσιμότητα οξυγόνου.....	12
6. Αυθόρμητες και εμβολιασμένες ζυμώσεις.....	14
➤ Επιλογές ζύμωσης.....	17
➤ Αλκοολική ζύμωση με ακινητοποιημένα κύτταρα ζυμών.....	18
➤ Πολλαπλής εκκίνησης ζύμωση στην οινοποίηση.....	19
7. Συνθήκες περιβάλλοντος και επιβίωση των ζυμών.....	22
8. Αλληλεπιδράσεις ζυμών σε μεικτές καλλιέργειες.....	24
➤ Συνεργατικές αλληλεπιδράσεις.....	24
➤ Ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Η μηλογαλακτική ζύμωση και τα σημαντικά βακτήρια της οινοποίησης.....	28
1. Η μηλογαλακτική ζύμωση.....	28
➤ Συνθήκες για την ομαλή πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης.....	30
➤ Κύκλος ανάπτυξης κατά την οινοποίηση.....	30
2. Σημαντικά βακτήρια κατά την οινοποίηση.....	31
A. <i>OENOCOCCUS</i>	32
Ταξινόμια, Εμφάνιση, Ανάπτυξη και Μεταβολισμός στο κρασί.....	32
Ο <i>O.oeni</i> στη μηλογαλακτική ζύμωση.....	32
Παραγωγή αρώματος και γεύσης.....	33
B. <i>ACETOBACTER KAI GLUCONOBACTER</i>	34
Ταξινόμια, Εμφάνιση, Ανάπτυξη και Μεταβολισμός στο κρασί.....	34
Αλλοίωση στο κρασί.....	35
C. <i>LACTOBACILLUS</i>	36
Ταξινόμια, Εμφάνιση, Ανάπτυξη και Μεταβολισμός στο κρασί.....	36
Αλλοίωση στο κρασί.....	36
D. <i>PEDIOCOCCUS</i>	37
Ταξινόμια, Εμφάνιση, Ανάπτυξη και Μεταβολισμός στο κρασί.....	37
Αλλοίωση στο κρασί.....	38
3. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών.....	38

➤	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηρίων	38
➤	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και Saccharomyces.....	39
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κρασιού.....	41
1.	Πως η ποικιλία επηρεάζει το άρωμα και την γεύση του κρασιού.	42
2.	Οι ζύμες επηρεάζουν τον χαρακτήρα του κρασιού με διάφορους μηχανισμούς	44
3.	Ενώσεις αρώματος και γεύσης συνδεδεμένων με την αλκοολική ζύμωση.....	46
4.	Ενώσεις γεύσης και αρώματος συνδεδεμένες με τον μεταβολισμό των αμινοξέων.....	48
5.	Άλλες ενώσεις αρώματος και γεύσης	49
6.	Ενώσεις γεύσης και αρώματος σχηματισμένες από την μηλογαλακτική ζύμωση	50
7.	Ενώσεις γεύσης και αρώματος σχηματισμένες κατά την ωρίμανση και παλαίωση	53
	Συμπεράσματα	55
	Βιβλιογραφία.....	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Ζύμες και αλκοολική ζύμωση

1. Εισαγωγή

Η ζύμωση του χυμού του σταφυλιού είναι μια σύνθετη βιοχημική διαδικασία, στην οποία οι ζύμες οινοποίησης παίζουν θεμελιώδη ρόλο κατά την διάρκεια της μεταβολής του μούστου σε αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και εκατοντάδες ακόμα δευτερογενή προϊόντα. Η ποιότητα του κρασιού εξαρτάτε από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των πρακτικών στο αμπέλι, των τεχνικών οινοποίησης και των στελεχών ζύμης που χρησιμοποιούνται. Την ίδια στιγμή, οι μικροοργανισμοί μπορούν να επηρεάζουν την ποιότητα των σταφυλιών πριν την συγκομιδή, κατά την ζύμωση και κατά την παλαίωση ή/και την συντήρηση του κρασιού. Στο παρόν είναι γνωστό ότι η οικολογία των ζυμών της ζυμωτικής διαδικασίας είναι πιο περίπλοκη από ότι πιστεύαμε στο παρελθόν, και τα είδη μη σακχαρομύκητα ζυμών παίζουν σχετικό ρόλο στο μεταβολικό αντίκτυπο και την πολυπλοκότητα του αρώματος στο τελικό προϊόν (Ciani et al.2010).

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει μια αυξημένη ζήτηση σε καινούργια και βελτιωμένα στελέχη οινολογικών ζυμών, τα οποία έχουν υιοθετήσει διαφορετικούς τύπους και στυλ κρασιών (Pretorius, 2000). Οπότε, για την βελτίωση της χημικής σύστασης και των αισθητήριων ιδιοτήτων του κρασιού, η ενσωμάτωση μη σακχαρομύκητα ζυμών, μαζί με στελέχη σακχαρομύκητα ως μέρος μιας ανάμικτης και πολλαπλής εκκίνησης ζύμωσης, έχει προταθεί ως ένα εργαλείο που πλεονεκτεί έναντι της αυθόρμητης ζύμωσης, καθώς αποφεύγει τα ρίσκα μιας ‘αυθόρμητης ζύμωσης’ (Bisson & Kunkee, 1993, Heard, 1999, Rojas et al., 2003, Romano et al., 2003a, Ciani et al., 2006, Jolly et al., 2006).

Οινολογικές μελέτες έχουν βρει ότι ζύμες που ανήκουν στο γένος *Hanseniaspora* είναι επικρατέστερες στην επιφάνεια των σταφυλιών, με ποσοστό 50 με 75% στον συνολικό πληθυσμό ζυμών (Fleet and Heard 1993, Romano et al 2006), ενώ τα γένη *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula* και *Torulaspota* είναι παρόντα σε χαμηλότερα ποσοστά (Fleet and Heard, 1993). Παραδόξως τα ζυμωτικά είδη του *Saccharomyces* υπάρχουν σε ακραία μικρά ποσοστά στην επιφάνεια υγείων, μη τραυματισμένων σταφυλιών, ή ακόμα και στο έδαφος του αμπελιού (Martini et al. 1996).

Αν και μία μεγάλη ποικιλία μικροβιολογικών ειδών μπορούν να συμμετάσχουν στην αλκοολική ζύμωση και να συνεισφέρουν στις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού, ο *S. cerevisiae* πάντα κυριαρχεί στα τελικά στάδια της ζύμωσης (Albergaria & Arneborg 2016).

2. Ταξινόμηση των ζυμών οινοποίησης

Η ταξινόμηση αποτελεί ένα διαρκώς εξελισσόμενο θέμα. Οι ζύμες αποτελούν μια ευρεία ομάδα μονοκύτταρων μυκήτων. Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί ετερότροφοι οργανισμοί μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι. Οι μύκητες δεν κατατάσσονται ούτε στο ζωικό ούτε στο φυτικό βασίλειο, αλλά ανήκουν σε ένα ξεχωριστό βασίλειο, αυτό των Πρωτίστων, μαζί με τα βακτήρια, τα φύκη και τα πρωτόζωα. Η ταξινόμηση των μυκήτων γίνεται σε 4 κλάσεις, που μπορούν να παράγουν σπόρια, τους Μυξομύκητες, Φυκομύκητες, Βασιδιομύκητες, και Ασκομύκητες, ενώ μια επιπλέον 5^η κλάση αποτελούν οι ατελείς μύκητες στους οποίους περιλαμβάνονται αυτοί που δεν μπορούν να παράγουν σπόρια. Στην κλάση των Ασκομυκήτων ανήκει η υποκλάση Πρωτοασκομύκητες. Στην υποκλάση αυτή ανήκει η οικογένεια *Saccharomycetaceae*, στην οποία ανήκει και το γένος *Saccharomyces* και, με τη σειρά τους, διάφορα είδη όπως ο *S. cerevisiae*. Η βάση της ταξινόμησης είναι το είδος, το οποίο μπορεί να οριστεί ως μια συλλογή από στελέχη που έχουν ένα κοινό αριθμό μορφολογικών, φυσιολογικών και γενετικών χαρακτηριστικών. Κάθε είδος εμπεριέχει διάφορα στελέχη, ορισμένα από τα οποία εμφανίζουν εμπορικό ή ερευνητικό ενδιαφέρον και φέρουν διάφορες αυθαίρετες κωδικές ονομασίες. Η ταξινόμηση μπορεί να βασιστεί στην ομοιότητα των ενζυμικών συστημάτων, τη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης και την ομοιότητα του γενετικού υλικού (Τσακίρης, 2014).

Στην οινολογία χρησιμοποιούμε τους όρους ζύμες ή ζυμομύκητες, που δεν αποτελούν όρους της συστηματικής κατάταξης, προκειμένου να αναφερθούμε σε μύκητες με οινολογικό ενδιαφέρον, δηλαδή ικανούς να ζυμώσουν ορισμένα ζάχαρα και να παράγουν αιθανόλη. Με παρόμοιο τρόπο, ο όρος χρησιμοποιείται στην ζυθοποιία και αρτοποιία (Τσακίρης, 2014).

3. Η επικράτηση του *Saccharomyces cerevisiae*

Παρά την μεγάλη ποικιλία των μικροοργανισμών σχετικών με την οινοποίηση και άλλες ζυμωτικές διαδικασίες, ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι πάντα το κυρίαρχο είδος.

Είναι αναγνωρισμένο το γεγονός ότι (Beltran et al. 2002, Fleet and Heard 1993, Torija et al. 2001, Xufre et al. 2006) η δυναμική του πληθυσμού ζυμών κατά την ζύμωση ακολουθεί ένα σταθερό μοτίβο ανάπτυξης, στο οποίο οι ζύμες μη σακχαρομύκητα αρχικά είναι παρούσες στον μούστο σε υψηλά νούμερα, που κυμαίνονται από 10^3 με 10^5 κύτταρα/ml, στα πρώτα στάδια ανάπτυξης (μέχρι 4-5% v/v αιθανόλη). Σύντομα όμως κυριαρχούνται από τα έντονα ζυμωτικά στελέχη του *S. cerevisiae*, που ολοκληρώνουν την ζυμωτική διαδικασία (Albergaria & Arneborg 2016).

Αναμφιβόλως, ο *S. cerevisiae* είναι ένα από τα πιο έντονα ζυμωτικά μικροβιολογικά είδη, παράγοντας αιθανόλη ακόμα και παρουσία περίσσιας οξυγόνου (φαινόμενο Crabtree), και παρουσιάζει γρήγορους ρυθμούς κατανάλωσης ζάχαρης και παραγωγής αιθανόλης (Visser et al. 1990). Εκτός από αυτά, το είδος μπορεί να αντέξει υψηλά επίπεδα αιθανόλης και οργανικών οξέων, και είναι ικανό να αναπτυχθεί και να ζυμώσει ζάχαρη σε χαμηλές τιμές pH (3.0-3.5) (Bisson 1999, Viegas et al. 1989). Ο *S. cerevisiae* είναι επιπλέον ένα από τα λίγα είδη που μπορεί να αναπτυχθεί κάτω από αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, έχοντας χαμηλές απαιτήσεις σε άζωτο (Visser et al. 1990). Αυτά τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά εξηγούν την σπουδαία κλίση του μικροοργανισμού για αλκοολική ζύμωση και είναι, έως κάποιο βαθμό, υπεύθυνα για τα ανταγωνιστικά του πλεονεκτήματα έναντι των άλλων ειδών.

Για αρκετό καιρό, η πρόωρη εξαφάνιση των ζυμών μη σακχαρομύκητα, όπως *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida zemplinina*, *Lachancea thermotolerans* και *Torulaspota delbrueckii*, από την ζύμωση του μούστου θεωρήθηκε ότι οφείλεται κυρίως στην χαμηλή τους ικανότητα να αντέχουν τους επιλεκτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος οινοποίησης (Bauer and Pretorius 2000). Όμως, πολλές μελέτες (Albergaria et al. 2010, Branco et al. 2014, Kemsawasd et al. 2015a, Nissen and Arneborg 2003, Nissen et al. 2003, Pérez-Nevado et al. 2006, Renault et al. 2013, Taillandier et al. 2014, Wang et al. 2015) έχουν συγκεντρώσει στοιχεία που δείχνουν ότι οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στον πρόωρο θάνατο των ζυμών μη σακχαρομύκητα, και συνεπώς στην

επικράτηση του *S. cerevisiae* κατά την διάρκεια των μικτών ζυμώσεων. Από την μία, βρέθηκε ότι ορισμένες ζύμες μη σακχαρομύκητα, ήταν ικανές να επιβιώσουν και να ζυμώσουν ζάχαρη για πολύ περισσότερο, όταν βρίσκονταν σε καθαρές καλλιέργειες ζύμωσης, από ότι σε μικτής καλλιέργειας ζύμωσης με τον *S. cerevisiae* (Albergaria 2007, Nissen and Arneborg 2003, Pérez-Nevedo et al. 2006). Από την άλλη, στις μικτές καλλιέργειες έχει γίνει η πρόταση ότι υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που σκοτώνουν τις άγριες ζύμες, περιλαμβανομένης της επαφής κύτταρο με κύτταρο (Nissen and Arneborg 2003, Nissen et al. 2003) ή της έκκρισης φονικών ουσιών (Albergaria et al. 2010, Pérez-Nevedo et al. 2006).

Ο *S. cerevisiae* έχει υπάρξει η πρωταρχική επιλογή για την παραγωγή στελεχών οινοποίησης. Κατά την ζύμωση, ο *S. cerevisiae* παράγει μια πληθώρα αρωματικά ενεργών δευτερογενών μεταβολιτών και απελευθερώνει πολλές αρωματικές ενώσεις από ανενεργούς πρόδρομους τους, το οποίο επιδρά σπουδαία στις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού (Swiegers & Pretorius, 2007). Παρόλα αυτά, ζύμες μη σακχαρομύκητα μπορούν να βελτιώσουν την αρωματική πολυπλοκότητα του κρασιού, καθώς κάποια είδη παράγουν υψηλότερα ποσοστά πτητικών ουσιών. Οπότε, μια καινούργια τάση έχει προκύψει στην παραγωγή κρασιού, που περιλαμβάνει την χρήση καλλιεργειών εκκίνησης που αποτελούνται από ζύμες μη σακχαρομύκητα, είτε σε μίγμα με τον *S. cerevisiae* ή μόνες τους σε συνεχείς ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae* (Albergaria & Arneborg 2016).

4. Ο ρόλος των ζυμών μη σακχαρομύκητα στην οινοποίηση

Σαν ένα μη αποστειρωμένο περιβάλλον, το γλεύκος του σταφυλιού περιέχει πολλούς μικροοργανισμούς, που μπορούν να αναπτυχθούν και να μετατρέψουν το αρχικό περιεχόμενο ζάχαρης σε αιθανόλη, CO₂, και άλλα παραπροϊόντα, μολονότι είναι γνωστό ότι ο πιο σημαντικός μικροοργανισμός είναι ο *S. cerevisiae*. Προηγούμενες μελέτες θεωρούσαν τις μη σακχαρομύκητα ζύμες ως ‘άγριες’ ή ‘αλλοιώσης’ που χάλαγαν το κρασί, γιατί συχνά απομονώνονται από ‘φρακαρισμένες’ ή αργές ζυμώσεις, ή από κρασιά με ανώμαλα αναλυτικά και αισθητήρια προφίλ (Castelli, 1954, Amerine & Cruess, 1960, Ribereau-Gayon & Reynaud, 1960).

Καθαρής καλλιέργειας ζυμώσεις με μη σακχαρομύκητα οινολογικές ζύμες έχουν δείξει δεκάδες αρνητικά μεταβολικά και ζυμωτικά χαρακτηριστικά, που γενικά

η χρήση τους δεν προορίζεται για καλλιέργειες εκκίνησης. Οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες αλλοίωσης που παράγονται από ζύμες μη σακχαρομύκητα είναι τα οξικό οξύ, ακεταλδεΐδη, αιθυλομεθυλοκαρβινόλη, μαζί με άλλες ανεπιθύμητες οσμές όπως βινυλική και αιθυλική φαινόλη, που είναι συνδεδεμένες με την ανάπτυξη των ειδών *Brettanomyces* και *Dekkera* (Chatonnet et al., 1995). Επίσης, τα περισσότερα είδη ζύμης μη σακχαρομύκητα, που σχετίζονται με το κρασί, εμφανίζουν περιορισμένη ζυμωτική ικανότητα, όπως χαμηλή δύναμη ζύμωσης (παραγωγή μέγιστης ποσότητας αιθανόλης σε παρουσία πλεονάζουσας ζάχαρης), χαμηλό ρυθμό ζύμωσης, και χαμηλή αντίσταση στο SO₂. Ωστόσο, σε μεικτές ζυμώσεις, όπως είναι οι φυσικές, μερικά αρνητικά οινολογικά χαρακτηριστικά αυτών των ειδών, μπορεί να μην εκδηλωθούν ή να τροποποιηθούν από τις καλλιέργειες *S. cerevisiae*.

Πειραματικά στοιχεία έχουν τονίσει τον θετικό ρόλο των ζυμών μη σακχαρομύκητα για την αναλυτική σύσταση του κρασιού (Cabrera et al., 1988; Herraiz et al., 1990; Moreno et al., 1991; Lema et al., 1996). Μερικά είδη αυτών μπορούν να βελτιώσουν την ζυμωτική συμπεριφορά των καλλιεργειών εκκίνησης και το αναλυτικό περιεχόμενο του κρασιού, ή να οδηγήσουν σε ένα πιο περίπλοκο άρωμα. Συνεπώς, έχει γίνει μια επανεκτίμηση του ρόλου των μη σακχαρομύκητα ζυμών στην παραγωγή κρασιού. (Fleet & Heard, 1993, Ciani, 1997, Esteve-Zarzoso et al., 1998, Heard, 1999, Fleet, 2008)

Οι ενζυμικές δραστηριότητες αυτών των ζυμών μπορούν να επηρεάσουν το προφίλ του κρασιού. Έρευνες για την παραγωγή πολυγαλακτορουνάσης και b-D-ξυλοσιδάσης από ζύμες μη σακχαρομύκητα που εμπλέκονται με την παραγωγή κρασιού, έδειξαν ότι αυτά τα ένζυμα είναι παρόντα σε αυτές τις ζύμες και μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα του οίνου (Manzanares et al., 1999, Fernandez et al., 2000, Strauss et al., 2001).

Ακόμα μία βιοκαταλυτική δραστηριότητα ευρέως συνδεδεμένη με οινολογικές ζύμες μη σακχαρομύκητα είναι η δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης. Η β-γλυκοσιδάση υδρολύει τις τερπενό-γλυκοσιδάσες, και μπορεί να ενισχύσει το άρωμα του κρασιού. Σε αντίθεση με την γλυκοσιδάση του κρασιού, η β-γλυκοσιδάση παράγεται από τις ζύμες, δεν αναστέλλεται από την γλυκόζη και σχετίζεται με την απελευθέρωση τερπενίων κατά την ζύμωση. Αυτή η δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης έχει βρεθεί σε πολλά είδη ζυμών που σχετίζονται με την παραγωγή κρασιού, ειδικότερα με είδη μη σακχαρομύκητα (Vasserot et al., 1989, Gunata et al., 1990, Rosi et al., 1994, Manzanares et al., 1999, Ferreira et al., 2001, Rodriguez et al.,

2004, Fia et al., 2005, Gonzalez-Pombo et al., 2008). Η εξάπλωση αυτής της δράσης έχει επιβεβαιώσει τον ρόλο των ζυμών μη σακχαρομύκητα στην ανάδειξη του αρώματος του κρασιού (Manzanares et al., 1999, Fernandez et al., 2000, Ferreira et al., 2001, Strauss et al., 2001, Gonz´alez-Pombo et al., 2008).

Επιπροσθέτως της ενζυμικής δραστηριότητας, στελέχη μη σακχαρομύκητα μπορούν να επιλεχτούν με βάση την ιδιότητα τους να παράγουν ευνοϊκά προϊόντα, που συμβάλουν στο ορισμό του τελικού μπουκέτου του κρασιού. Μια γρήγορη μέθοδος για την εκτίμηση της απόδοσης των οινολογικών ζυμών, βασισμένη στην ικανότητα τους να παράγουν επίπεδα μεταβολιτών που συμβάλουν στην βελτίωση της ποιότητας του κρασιού, έχει προταθεί. (Romano et al. 2003b) Συγκεκριμένα μέσω του καθορισμού της 2,3-βουτανοδιόλης και των στερεοοίσομερών αιθυλομεθυλοκαρβινόλης, τα οποία έχουν δείξει να είναι χαρακτηριστικά των *S. cerevisiae* και *K. apiculata* ζυμών, επιβεβαιώθηκε ότι ο *S. cerevisiae* παράγει περισσότερη 2,3-βουτανοδιόλη σε σύγκριση με τον *K. apiculata*. Οι Moreira et al. (2008) ερευνήσε τον ρόλο των *H. guilliermondii* και *Hanseniaspora uvarum* σε καθарές και μεικτές καλλιέργειες εκκίνησης με *S. cerevisiae*, για την παραγωγή βαρέων ενώσεων θείου και εστέρα. Τα αποτελέσματα τόνισαν ότι αυτές οι γηγενής ζύμες αυξάνουν την παραγωγή επιθυμητών ενώσεων, όπως οι εστέρες, χωρίς να αυξάνουν τις ανεπιθύμητες ενώσεις θείου.

5. Ζυμωτική ικανότητα σακχαρομύκητα και μη ζυμών

Κατά την ζύμωση του κρασιού οι ζύμες πρέπει να καταναλώνουν την ζάχαρη, που βρίσκεται αρχικά σε συγκέντρωση 140-260 g/L, ώστε να υπάρχει κατάλοιπο ζάχαρης σε ποσοστό χαμηλότερο του 2g/L. Επιπλέον πρέπει να παράγουν ικανοποιητικά επίπεδα αιθανόλης (10-14% v/v) και άλλους ζυμωτικούς μεταβολίτες (Boulton et al. 1996). Οι ζυμωτικοί ρυθμοί είναι επίσης τεράστιας σημασίας στην οινοποίηση, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Αυτές οι προϋποθέσεις δεν ικανοποιούνται από όλες τις ζύμες. Σαν γενικός κανόνας, τα είδη μη σακχαρομύκητα όπως *H. uvarum*, *H. guilliermondii* και *C. zemplinina* έχουν θεωρηθεί χαμηλής ζυμωτικής ικανότητας και χαμηλής ανθεκτικότητας έναντι της αιθανόλης. Από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν με αυτά τα είδη κάτω από οινολογικές συνθήκες, μια κοινή ζυμωτική συμπεριφορά βρέθηκε : αποτυχία στην αφομοίωση όλης της ζάχαρης του μούστου, που οδήγησε σε υψηλά ποσοστά

κατάλοιπου ζάχαρης (30-100 g/L) και χαμηλά επίπεδα αιθανόλης (5-8 %v/v) (Ciani and Maccarelli 1998, Albergaria 2007, Ciani and Picciotti 1995). Μετά από διεξοδική έρευνα, με πολλά στελέχη των προηγουμένως αναφερόμενων ειδών ζύμης (12 με 90 στελέχη του κάθε γένους) έγινε κατάταξη αυτών των ειδών σύμφωνα με τα επίπεδα αιθανόλης που παράγουν (σε %v/v): *S. cerevisiae*, 12–16 %, *Sd. ludwigii*, 10–12 %, *T. delbrueckii*, 6–10 %, *C. zemplinina*, 4–6 %, *H. uvarum*, 4–6 %, *K. apiculata*, 2–4 % (Ciani και Maccarelli, 1998)

Εκτός από την ικανότητα τους να ζυμώνουν ζάχαρα με έναν γρήγορο και ολοκληρωτικό τρόπο, η καταλληλότητα των ζυμών για ζυμώσεις κρασιού εξαρτάται από την ικανότητα τους να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν κάτω από τις δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες την οινοποίησης, όπως α) υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις ζάχαρης (140-260g/L), β) χαμηλές τιμές pH (3,0-3,5), γ) χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου, δ) υψηλά επίπεδα αιθανόλης (10–14 %v/v), ε) χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου (150–200 mg/L), ε) οργανικά οξέα και άλλοι ζυμωτικοί μεταβολίτες (Albergaria & Arneborg 2016).

➤ **Ισχύς ζύμωσης: πρόσληψη ζάχαρης και διαθεσιμότητα οξυγόνου**

Το οξυγόνο είναι ένας παράγοντας κλειδί για την ρύθμιση του μεταβολισμού της ζάχαρης από τις ζύμες. Σύμφωνα με τον ρόλο του οξυγόνου στον μεταβολισμό τους, οι ζύμες μπορούν να ταξινομηθούν ως: 1^{ov} αυστηρά αερόβιες, εμφανίζουν μόνο αναπνευστικό μεταβολισμό, 2^{ov} προαιρετικά ζυμωτικές, εμφανίζουν αναπνευστικό και ζυμωτικό μεταβολισμό, 3^{ov} υποχρεωτικά ζυμωτικές (αναερόβιες) (Jolly et al. 2014). Αν και η πλειοψηφία των ειδών ζύμης που περιγράφηκαν ως τώρα είναι ικανές να ζυμώσουν ζάχαρη σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (van Dijken et al. 1986), οι περισσότερες προαιρετικά ζυμωτικές ζύμες δεν αναπτύσσονται καλά κάτω από αυστηρά αναερόβιο περιβάλλον (Visser et al. 1990).

Οι ζυμώσεις του κρασιού εκτελούνται κάτω από συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου, και η ποσότητα του διαθέσιμου οξυγόνου είναι μια κρίσιμη παράμετρος για την ανάπτυξη και την επιβίωση πολλών ειδών ζύμης, κατά την διαδικασία ζύμωσης (Hanl et al., 2005, Hansen et al., 2001). Καθώς αρχικά είναι διαθέσιμο στο μούστο, το μοριακό οξυγόνο καταναλώνεται γρήγορα από τους μικροοργανισμούς που ξεκινάνε την ζύμωση.

Η φυσιολογική συμπεριφορά του *S. cerevisiae* είναι κάπως ασυνήθιστη μεταξύ των ειδών ζύμης, καθώς είναι ένας από τους λίγους τύπους ζύμης που είναι ικανή να αναπτυχθεί κάτω από αυστηρώς αναερόβιες συνθήκες (Visser et al. 1990). Στην παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ζάχαρης, όπως στον μούστο, αυτή η ζύμη παράγει αιθανόλη ακόμη και στην παρουσία περίσσιας οξυγόνου, το λεγόμενο φαινόμενο Crabtree (Fiechter et al. 1981). Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης, τυπικές θετικές Crabtree ζύμες παρουσιάζουν υψηλούς ρυθμούς παραγωγής αιθανόλης (22 mmol/g h) και χαμηλή απόδοση βιομάζας (0.13 g/g). Άλλες ζύμες όπως ο *T. delbrueckii* παρουσιάζουν ένα λιγότερο έντονο φαινόμενο Crabtree, με χαμηλότερο ρυθμό παραγωγής αιθανόλης (6.13 mmol/g h) και υψηλότερη απόδοση βιομάζας (0.27 g/g) (Merico et al. 2007). Αντιθέτως, οι ζύμες που είναι αρνητικές στο φαινόμενο αυτό, όπως ο *Kluyveromyces marxianus*, σε παρόμοιες συνθήκες ανάπτυξης, καταναλώνουν γλυκόζη αποκλειστικά μέσω της αναπνευστικής οδού (van Dijken et al. 1986). Συνεπώς, οι θετικές Crabtree ζύμες είναι πιο πιθανό να εκτελέσουν αλκοολική ζύμωση, από τις αρνητικές Crabtree ζύμες, σε οποιοσδήποτε συνθήκες (van Dijken et al. 1993).

Επιπλέον, στην οινοποίηση, είναι συνηθισμένο να αερίζεται ο μούστος πριν από την ζύμωση για να προάγεται η αρχική ανάπτυξη των ζυμών, και να γίνει επιτάχυνση της παραγωγής αιθανόλης (Boulton et al. 1996). Αυτή η διαδικασία ωφελεί αυτές τις ζύμες που είναι ικανές να ζυμώσουν ζάχαρα με την παρουσία οξυγόνου (Crabtree θετικές), επιτρέποντας τους να επικρατήσουν στην ζυμωτική διαδικασία. Επιπλέον, εκτός των σακχαρομυκήτων, αυτό το φυσιολογικό χαρακτηριστικό, έχει ελάχιστα ερευνηθεί μεταξύ των υπόλοιπων ζυμών συνδεδεμένων με την οινοποίηση. Παραδείγματα ζυμών οινοποίησης ταξινομημένων σύμφωνα με το φαινόμενο Crabtree μπορούν να βρεθούν στα επόμενα είδη : ο *H. uvarum* (Venturin et al., 1995) και ο *K. marxianus* (van Dijken et al., 1986) ταξινομήθηκαν ως αρνητικοί Crabtree, ενώ ο *H. guilliermondii* (Albergaria et al., 2003), ο *Saccharomyces bayanus* (Serra et al., 2003), ο *C. zemplinina* (Ciani et al., 2000) και ο αλλοιωγόνος *Zygosaccharomyces bailii* (Merico et al. 2003) ταξινομήθηκαν ως Crabtree θετικοί.

Κάτω από συνθήκες σχετικές με το κρασί, δηλαδή συγκεκριμένα σε συνθετικό χυμό σταφυλιού, που μιμίτε τον λευκό μούστο με pH 3,3, φάνηκε ότι ο *T. delbrueckii* είναι ικανός να αναπτυχθεί αποτελεσματικά και να τελειώσει την αλκοολική ζύμωση, με μηδενική παροχή οξυγόνου, αν και σε ένα χαμηλότερο ρυθμό από τον *S. cerevisiae* (Brandam et al, 2013 και Taillandier et al, 2014). Επίσης έχει φανεί ότι ο

ρυθμός πρόσληψης γλυκόζης από τον *S. cerevisiae* είναι υψηλότερος από αυτούς των *L. thermotolerans* και *T. Delbrueckii*, σε όλες τις συγκεντρώσεις καταλοίπων γλυκόζης κατά την αλκοολική ζύμωση, υποδεικνύοντας ότι ο *S. cerevisiae* είναι πιο ικανός στην πρόσληψη γλυκόζης, κάτω από συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου, συγκριτικά με τις άλλες δύο ζύμες μη σακχαρομύκητα (Nissen et al, 2004). Παρά την μεγάλη μικροβιακή ποικιλομορφία του μούστου, ο *S. cerevisiae* είναι συνήθως υπεύθυνος για την κατανάλωση τουλάχιστον του 50% των ολικών σακχάρων, ακόμα και σε αυθόρμητες ζυμώσεις κρασιού (Bisson, 1993).

Επιπλέον, βρήκαν ότι το οξυγόνο αυξάνει την αποδοτικότητα των μη σακχαρομύκητα ζυμών για κατανάλωση σακχάρων, συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*, αρχικά επειδή η τιμή q_s (glucose uptake rate- ρυθμός πρόσληψης γλυκόζης) του *S. cerevisiae* μειώνεται πιο πολύ με αυξημένη διαθεσιμότητα οξυγόνου, σε σχέση με αυτή των μη σακχαρομύκητα ζυμών. Σε μία υψηλότερη διαθεσιμότητα οξυγόνου, όμως, ο *S. cerevisiae* ακόμη καταναλώνει γλυκόζη γρηγορότερα από τους *L. thermotolerans* και *T. Delbrueckii*, καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Οπότε φαίνεται ότι ο *S. cerevisiae* είναι ικανός να αναπτυχθεί και να ζυμώσει πιο αποτελεσματικά, κάτω από τις συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου, παρούσες κατά την ζύμωση του κρασιού (Nissen et al., 2004).

6. Αυθόρμητες και εμβολιασμένες ζυμώσεις

Ο μούστος σταφυλιών είναι ένα μη αποστειρωμένο υπόστρωμα το οποίο περιέχει διάφορους τύπους μικροοργανισμών και μπορεί να υπάρξει ανάπτυξη διαφόρων ζυμών, που μπορούν να ζυμώσουν το υπόστρωμα. Σαν αποτέλεσμα, η φυσική ζύμωση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μίας αλληλουχίας διαφόρων ζυμωτικών ειδών. Πράγματι, μια σειρά από μικροβιολογικές αναλύσεις ζυμωτικής γλωρίδας, συνδεδεμένης με φυσικές ζυμώσεις μούστου, αποκάλυψε ότι στις περισσότερες οινολογικές περιοχές, υπάρχει μια ακολουθία στην χρήση του υποστρώματος: αρχικά οι γηγενής ζύμες είναι οι πιο επικρατείς (*Hanseniaspora/Kloeckera*). Μετά όμως από 3 με 4 μέρες ο *Saccharomyces cerevisiae* τις αντικαθιστά (Martini, 1993, Pretorius, 2000). Επιπροσθέτως, κατά την διάρκεια διαφόρων σταδίων της ζύμωσης, είναι δυνατόν να απομονωθούν και άλλα γένη όπως *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*,

Kluyveromyces and *Metschnikowia* (Fleet et al., 1984, Heard & Fleet, 1985, 1986, Pardo et al., 1989).

Η ανάπτυξη μη σακχαρομύκητα ζυμών που ανήκουν στα γένη *Kloeckera/Hanseniaspora* και *Candida* είναι γενικά περιορισμένη τις πρώτες μέρες ζύμωσης, λόγω της μικρής τους αντοχής έναντι στην αιθανόλη. Παρόλα αυτά, ποσοτικές μελέτες πάνω στην ζύμωση του μούστου έχουν δείξει ότι οι *Kloeckera apiculata* και *Candida stellata* μπορούν να επιβιώσουν σε σπουδαία επίπεδα (106-107 cfu/ml) κατά την διάρκεια της ζύμωσης, και για μεγαλύτερες περιόδους από ότι πιστεύαμε προηγουμένως (Fleet et al. 1984, Heard & Fleet, 1985, Pardo et al., 1989).

Η παρουσία και η μονιμότητα αυτών των μη σακχαρομύκητα ζυμών, κατά την διάρκεια της ζύμωσης, επηρεάζεται από πολλούς φυσικό-χημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες. Οι *Kloeckera apiculata* και *Candida stellata* έχουν αυξημένη αντοχή στην αιθανόλη σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (10-15⁰C) (Gao & Fleet, 1988). Αυτή η συμπεριφορά έχει επίσης επιβεβαιωθεί σε μικτές καλλιέργειες με χρήση *K. apiculata* και *S. cerevisiae* (Erten, 2002). Τέτοιες αυξήσεις της αντοχής στην αιθανόλη μη-σακχαρομύκητα ζυμών, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, φαίνεται να είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την συμβολή τους σε ζυμώσεις χαμηλής θερμοκρασίας.

Πιο πρόσφατες έρευνες έχουν τονίσει τον σημαντικό ρόλο της συγκέντρωσης του οξυγόνου στην επιβίωση κάποιων μη σακχαρομύκητα ζυμών κατά την ζύμωση, όπως οι *Torulaspora delbrueckii* και *Kluyveromyces thermotolerans* (Hansen et al., 2001) Επιπλέον, έχει φανεί ότι οι αλληλεπιδράσεις κύτταρο με κύτταρο εμπλέκονται στην αναστολή της ανάπτυξης αυτών των δύο μικροοργανισμών. Έτσι, στην παρουσία υψηλότερης συγκέντρωσης ζωντανών κυττάρων *S. cerevisiae*, η ανάπτυξη των *T. delbrueckii* και *K. Thermotolerans* αναστέλλεται. (Nissen & Arneborg, 2003; Nissen et al., 2003).

Έχει επίσης γίνει η υπόθεση ότι η παραγωγή τοξικών ενώσεων από τον *S. cerevisiae* να είναι ο λόγος του πρόωρου θανάτου του *Hanseniaspora guilliermondii* σε μικτές καλλιέργειες (Perez-Nevado et al., 2006). Όντως πολλές ενώσεις που παράγονται από τις ζύμες κατά την ζύμωση του μούστου μπορεί να αποτελέσουν ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη άλλων ζυμοτικών ειδών ή στελεχών. Επιπροσθέτως της αιθανόλης, το οξικό οξύ, τα λιπαρά οξέα, η ακεταλδεύδη και η συνεργατική δράση των συνδυασμών τους μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό αναστολής που μπορεί να λάβει χώρα κατά την

ζύμωση του κρασιού (Edwards et al., 1990, Bisson, 1999, Ludovico et al., 2001, Fleet, 2003).

Η χρήση επιλεγμένων καλλιιεργειών εκκίνησης του *S. cerevisiae* μπορεί οπότε να παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην καταπίεση των άγριων ζυμών. Οι εμβολιασμένες καλλιιεργειες του *Saccharomyces* αναμένονται να καταπιέσουν τις γηγενής μη σακχαρομύκητα ζύμες και στελέχη σακχαρομύκητα, ή να επικρατήσουν στην ζύμωση. Επιπλέον η χρήση αντισηπτικών παραγόντων, όπως SO_2 , στο οποίο οι περισσότερες μη σακχαρομύκητα ζύμες είναι μετά βίας ανθεκτικές, θα πρέπει να εγγυάται την επικράτηση των εμβολιασμένων στελεχών (Ciani et al.2010)

Παρόλα αυτά, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη των *K.apiculata* και *C.stellata* δεν καταπιέζεται σε εμβολιασμένες καλλιιεργειες με επιλεγμένες καλλιιεργειες του *S.cerevisiae* (Heard & Fleet, 1985, Martinez et al., 1989, Mora et al., 1990),και άλλες μελέτες έχουν φανερώσει την ποσοτική και σημαντική παρουσία τους σε διάφορα στάδια της ζύμωσης εμβολιασμένης με στελέχη *S. cerevisiae*. (Bouix et al., 1981, Martinez et al., 1989, Ciani & Rosini, 1993, Mannazzu et al., 2007).

Οπότε, η επικράτηση των εμβολιασμένων στελεχών δεν είναι πάντα δεδομένη, και εξαρτάτε από συγκεκριμένες προϋποθέσεις, όπως: α) το ποσό και την βιωσιμότητα του εναιωρήματος, και την σωστή του χρήση, β) τα φυσιολογικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά της επιλεγμένης καλλιιεργειας ζύμης, γ) της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται στην οινοποίηση π.χ. διεργασίες διάλυσης, θερμοκρασία της ζύμωσης και προσθήκη SO_2 . (Amerine & Cruess, 1960, Benda, 1982, Reed & Nagodawithana, 1988, Ciani & Rosini, 1993).

Με την εμπορική διαθεσιμότητα ενεργής ξηρής καλλιιεργειας *S. cerevisiae*, ο εμβολιασμός του μούστου έχει γίνει ελκυστικός και πρακτικός (Kraus et al., 1983, Barre & Veziñhet, 1984). Η προσθήκη ξηρών κυττάρων επιλεγμένης ζύμης είναι μια συνηθισμένη διαδικασία με πολλά πλεονεκτήματα. Σκοπό έχει την γρήγορη έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, την αδρανοποίηση των ιθαγενών ζυμών, την πλήρη αποζύμωση και την παραγωγή επιθυμητών οσφρητικών ενώσεων (Τσακίρης, Οινολογία). Στο παρόν η χρήση επιλεγμένων καλλιιεργειών ζύμης είναι εκτεταμένη στις καινούργιες χώρες παραγωγής κρασιού, όπως οι ΗΠΑ, η Νότιος Αφρική και η Αυστραλία, αλλά και στις χώρες που παραδοσιακά παράγουν κρασί όπως η Ιταλία, η Γερμανία και η Γαλλία. Στο πλαίσιο αυτό, η εκτεταμένη χρήση των καλλιιεργειών

εκκίνησης σε όλες τις περιοχές κρασιού παγκοσμίως, συμβολίζει την σημαντική ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας κρασιού (Ciani et al., 2010).

Στην σύγχρονη οινοποίηση, οι ζυμώσεις κατευθύνονται κυρίως από καθαρής καλλιέργειας εμβολιασμούς. Καθαρής καλλιέργειας επιλεγμένα στελέχη προστίθενται στο μούστο όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την σύνθλιψη. Αυτό εξασφαλίζει μεγαλύτερο έλεγχο της οινοποίησης, οδηγεί σε περισσότερο προβλέψιμα αποτελέσματα και μειώνει το ρίσκο της αλλοίωσης από άλλους μικροοργανισμούς (Lambrechts & Pretorius, 2000, Swiegers et al, 2005). Ωστόσο, η γενικευμένη χρήση καλλιεργείων εκκίνησης είναι μια απλοποίηση των κοινοτήτων της μικροβιολογίας ζυμώσεων που προωθεί την τυποποίηση των αναλυτικών και αισθητήριων ιδιοτήτων των κρασιών (Ciani et al., 2010). Έχει υπάρξει μια αυξανόμενη αναγνώριση του ότι τα κρασιά καλλιέργειας εκκίνησης μπορεί να στερούνται πολυπλοκότητα αρώματος και είναι πολύ σταθερά και συνηθισμένα σε χαρακτήρα (Rainieri & Pretorius, 2000, Mannazzu et al., 2002).

➤ Επιλογές ζύμωσης

Οι μικροβιακές ζυμώσεις μπορούν να εκτελεστούν ως ασυνεχείς ή συνεχείς ζυμώσεις. Τα περισσότερα κρασιά παράγονται με ασυνεχής ζύμωση, όπου ο μούστος τοποθετείτε σε δεξαμενές και όλη η παρτίδα παραμένει εκεί μέχρι να ολοκληρωθεί η ζύμωση, μετά από 5 με 10 μέρες. Με τις ασυνεχείς ζυμώσεις υπάρχουν δύο επιλογές στην παραγωγή κρασιού: 1) φυσική αυθόρμητη ζύμωση και 2) ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης (Fleet, 2008).

Η συνεχής ζύμωση είναι πολύ πιο γρήγορη και αποδοτική διαδικασία. Η συνεχής ζύμωση είναι μια τεχνική οινοποίησης που εφαρμόζεται για την οινοποίηση μεγάλων ποσοτήτων. Η τεχνική αυτή θεωρείτε ζύμωση επαναλαμβανόμενου ημιδαλείποντος έργου, αφού ποσότητες θρεπτικού υλικού και μικροοργανισμών αφαιρούνται από το βιοαντιδραστήρα και ίσες ποσότητες προστίθενται σε ορισμένα χρονικά διαστήματα. Σε ένα τέτοιο σύστημα δεν υπάρχει φάση αναμονής στην ανάπτυξη των ζυμών και οι ζύμες βρίσκονται διαρκώς σε φάση πολλαπλασιασμού (Τσακίρης, Οινολογία).

➤ **Αλκοολική ζύμωση με ακινητοποιημένα κύτταρα ζυμών**

Η τεχνική ακινητοποίησης κυττάρων παρουσιάζει ενδιαφέρον, ως μέθοδος για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών. Ως σύστημα ακινητοποιημένων κυττάρων θα μπορούσε να οριστεί κάθε σύστημα στο οποίο τα κύτταρα συγκρατούνται ή περιορίζονται σε συγκεκριμένο χώρο, διατηρώντας τη βιολογική τους δραστηριότητα. Ένα τέτοιο σύστημα διαφέρει από αυτό της κλασσικής οινοποίησης, όπου οι ζύμες είναι ελεύθερες και διασκορπισμένες σε όλη τη μάζα του γλεύκους. Για να χρησιμοποιηθεί ένα μέσο ως φορέας ακινητοποίησης, πρέπει να είναι δυνατή η διατήρηση της ζωτικότητας των ακινητοποιημένων κυττάρων και η βασική βιολογική δράση τους να μην μεταβάλλεται με την ακινητοποίηση (Τσακίρης, Οινολογία). Οι μέθοδοι ακινητοποίησης μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες:

A. Προσκόλληση στην επιφάνεια

Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται οι μέθοδοι ακινητοποίησης που αποσκοπούν στην ακινητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια του φορέα. Η ακινητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια γίνεται είτε με φυσική προσρόφηση λόγω δυνάμεων ηλεκτροστατικής φύσεως, δεσμών υδρογόνου, δυνάμεων Van der Waals, είτε με συγκράτηση λόγω ομοιοπολικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ της επιφάνειας του κυττάρου και του φορέα.

B. Παγίδευση σε πορώδες υλικό

Μια άλλη κατηγορία ακινητοποίησης είναι η παγίδευση σε πορώδες υλικό. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο ακινητοποίησης, τα κύτταρα, είτε αφήνονται να διεισδύσουν στο πορώδες υπόστρωμα, μέχρις ότου η κινητικότητά τους να παρεμποδισθεί από την παρουσία άλλων κυττάρων, είτε το πορώδες υλικό σχηματίζεται επί τόπου μέσα στην καλλιέργεια των κυττάρων που πρόκειται να ακινητοποιηθούν. Στη πρώτη περίπτωση, τα κύτταρα ακινητοποιούνται μέσα στο πορώδες υλικό και έτσι παρεμποδίζεται τυχόν αποκόλληση τους. Έχει βρεθεί ότι η ακινητοποίηση μικρού αριθμού κυττάρων και ο πολλαπλασιασμός τους στη συνέχεια, μέσα στο πολυμερές, βελτιώνει την ποιότητα του βιοκαταλύτη.

C. Δημιουργία συσσωματωμάτων από τα κύτταρα

Η δημιουργία συσσωματωμάτων από τα κύτταρα μπορεί να θεωρηθεί και αυτή ως ακινητοποίηση. Η μάζα του συσσωματώματος δίνει τη δυνατότητα για αντιδράσεις που έχουν σχεδιαστεί για ακινητοποιημένα κύτταρα. Η δημιουργία

συσσωματωμάτων από τα κύτταρα της ζύμης είναι ιδιότητα ορισμένων μόνο στελεχών

D. Μηχανική συγκράτηση

Η μηχανική συγκράτηση των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί, είτε με τη χρήση μεμβράνης, είτε με τον εγκλωβισμό των κυττάρων με μικροκάψουλα, είτε με την ακινητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης δύο μη αναμίξιμων υγρών. Ο τρόπος αυτός ακινητοποίησης είναι ιδανικός, όταν απαιτείται τελικό προϊόν απαλλαγμένο από κύτταρα ή από κάποιες μεγάλου μοριακού βάρους ενώσεις (Τσακίρης, Οινολογία).

➤ **Πολλαπλής εκκίνησης ζύμωση στην οινοποίηση**

Έχει υπάρξει μια αντιπαράθεση όσον αφορά την χρήση αυθόρμητης και εμβολιασμένης ζύμωσης με χρήση επιλεγμένων στελεχών, ιδιαίτερα με σεβασμό για την οργανοληπτική ποιότητα του τελικού κρασιού. Συνεπώς, με βάση την αισθητήρια δοκιμή του κρασιού, μερικοί συγγραφείς έχουν υποστηρίξει τα πλεονεκτήματα είτε της αυθόρμητης είτε της εμβολιασμένης ζύμωσης. Στην περίπτωση της αυθόρμητης ζύμωσης, η επίπτωση των διαφορετικών ειδών ζύμης στο άρωμα και την γεύση του κρασιού μπορεί να στερείται σταθερότητας, καθώς οι αυθόρμητες ζυμώσεις είναι μία μη ελεγχόμενη διαδικασία. Από την άλλη πλευρά, η ολική καταπίεση των γηγενών ειδών μη σακχαρομύκητα μπορεί να περιορίσει την πολυπλοκότητα του αρώματος στο τελικό προϊόν. Πράγματι, το εναιώρημα με επιλεγμένα στελέχη *S. cerevisiae* μπορεί όχι μόνο να καταστείλει τις ζύμες που πιθανόν δημιουργούν αλλοιώσεις, αλλά και άλλες ζύμες, η παρουσία των οποίων στην ζυμωτική διαδικασία, με καθορισμένη ποσότητα και διάρκεια, μπορεί να συντελέσει θετικά στο άρωμα του κρασιού. Παρόλα αυτά, οι φυσικές καλλιέργειες πολλαπλής εκκίνησης παραμένουν μια μη ελεγχόμενη διαδικασία, και οι καλλιέργειες πολύ- εκκίνησης πρέπει να χρησιμοποιούνται κάτω από καλύτερα ορισμένους κανόνες. Παρομοίως, η συνδυασμένη ή η διαδοχική χρήση διαφορετικών ειδών ζύμης εκκίνησης για την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών ζύμωσης χρειάζεται παρακολούθηση (Ciani et al, 2010).

Μερικά είδη μη σακχαρομύκητα, σχετικά με την παραγωγή κρασιού, έχουν προταθεί ως καλλιέργειες εκκίνησης εδώ και καιρό, χάρις σε συγκεκριμένα μεταβολικά χαρακτηριστικά τους. Άρα, είναι πιθανό, να προαχθεί η δραστηριότητα

ζυμών μη σακχαρομύκητα για την παραγωγή κρασιού, με περιορισμό ή καθυστέρηση της χρήσης επιλεγμένων καλλιεργείων εκκίνησης *S. cerevisiae* (Ciani et al, 2010).

Η χρήση επιλεγμένων πολύ- εκκινητών (ελεγχόμενες μικτές καλλιέργειες) έχει προταθεί πολλά χρόνια πριν. Μελέτες έχουν ερευνήσει την χρήση ελεγχόμενων μικτών καλλιεργείων για την μείωση της πτητικής οξύτητας, και την βελτίωση του οργανοληπτικού προφίλ του κρασιού. Η επίδραση της μικτής και διαδοχικής καλλιέργειας *T. delbrueckii*-*S. cerevisiae*, σε ζυμώσεις με υψηλή συγκέντρωση ζάχαρης έχει αξιολογηθεί, για να καθοριστεί το αν μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα του κρασιού, και να μειώσει το περιεχόμενο σε οξικό οξύ (Bely et al., 2008). Μικτή καλλιέργεια *T. delbrueckii*-*S. cerevisiae* σε αναλογία 20:1, είχε ως αποτέλεσμα 53% και 60% μείωση στην πτητική οξύτητα και την ακεταλδεύδη, αντίστοιχα, την ώρα που οι διαδοχικές καλλιέργειες έδειξαν χαμηλότερα αποτελέσματα στην μείωση των μεταβολιτών αυτών.

Μια από τις πιο μελετημένες χρήσεις των μικτών καλλιεργείων στην παραγωγή κρασιού, σχετίζεται με την βιολογική μείωση της οξύτητας του μούστου ή/και του κρασιού. Οι Snow και Gallender (1979) πρότειναν τον διαδοχικό εμβολιασμό των *S. pombe* και *S. cerevisiae* για την βελτίωση του ανταγωνισμού μεταξύ των ειδών, και την μείωση ή την εξάλειψη των αρνητικών αισθητήριων χαρακτηριστικών λόγω του *S. pombe*. Μια πιο ελεγχόμενη βιολογική μείωση της οξύτητας είχε αποκτηθεί χρησιμοποιώντας τον *S. cerevisiae* και ακινητοποιημένα κύτταρα *S. pombe* (Magyar & Panyik, 1989; Yokotsuka et al., 1993; Ciani, 1995). Σε αυτήν την διαδικασία ο *S. cerevisiae* έφερε εις πέρας την ζύμωση χρησιμοποιώντας σχεδόν όλη την διαθέσιμη ζάχαρη, ενώ τα κύτταρα *S. pombe* χρησιμοποίησαν το μηλικό οξύ. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οι ανεπιθύμητες επιδράσεις του *S. pombe*, στην ποιότητα του κρασιού, περιορίστηκαν ή εξαφανίστηκαν. Πρόσφατα, ξηρά ακινητοποιημένα κύτταρα του *S. pombe* για κατανάλωση μηλικού οξέος στην παραγωγή κρασιού προτάθηκαν (Silva et al., 2003), και ένα εμπορικό στέλεχος του *S. pombe* είναι τώρα διαθέσιμο σε ακινητοποιημένη μορφή για την μείωση του περιεχομένου μηλικού οξέος στο κρασί (ProMalics, Proenol)

Επιπλέον του *S. pombe*, ένα στέλεχος του *Issatchenkia orientalis* μπορεί να μειώσει το μηλικό οξύ ταχέως (Seo et al., 2007), και έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να μειώσει το περιεχόμενο κρασιών σε μηλικό οξύ, ως μικτή καλλιέργεια με τον *S. cerevisiae* (Kim et al., 2008)

Επειδή ο *K. thermotolerans* δείχνει θετικά οινολογικά χαρακτηριστικά, όπως χαμηλή παραγωγή πτητικής οξύτητας και υψηλή παραγωγή σταθερής οξύτητας, ο Mora et al. (1990) εξέτασε την χρήση του στην ζύμωση του κρασιού, για να βελτιώσει τα αναλυτικά και αισθητήρια χαρακτηριστικά του κρασιού. Με στόχο να διατηρηθεί η βιολογική οξύτητα του κρασιού, μια μικτή καλλιέργεια με *K. thermotolerans* and *S. cerevisiae* εξετάστηκε, η οποία έδωσε 70% αύξηση στην ολική οξύτητα και έπειτα μείωση 0.3 μονάδες pH (Kapsoroulou et al., 2005, 2007).

Μελέτες για την επιρροή των *H. uvarum* και *H. Guilliermondii* στις ενώσεις θείου, στις υψηλές αλκοόλες και στην παραγωγή εστέρων, σε μικτές ζυμώσεις με *S. cerevisiae*, ανέφεραν μια ενίσχυση της παραγωγής επιθυμητών ενώσεων (Moreira, 2005; Moreira et al., 2008).

Η συνδυασμένη χρήση των *S. cerevisiae* και ζυμών μη σακχαρομύκητα, έχει επίσης προταθεί για την ενίσχυση της γλυκερίνης στο κρασί (Ciani & Ferraro, 1996). Ένα στέλεχος *C. stellata*, το οποίο πρόσφατα επαναταξινομήθηκε ως *Starmerella bombicola* (Sipiczki et al., 2005), χρησιμοποιήθηκε ως βιοκαταλύτης σε ακινητοποιημένη μορφή. Η ζύμωση του μούστου που ήρθε εις πέρας από τον συνδυασμό κυττάρων *C. stellata* και *S. cerevisiae* βελτίωσε την αναλυτική σύνθεση του τελικού κρασιού (Ciani & Ferraro, 1998).

Ακόμα ένα ζυμωτικό είδος του περιβάλλοντος του κρασιού, η *Candida cantarellii*, έχει επίσης προταθεί για μικτές ζυμώσεις, για να ενισχυθεί η γλυκερίνη και να αναπτυχθούν κρασιά με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Toro & Vazquez, 2002).

Συνεπώς, οι οινολογικές ζύμες μη σακχαρομύκητα έχουν κάποια οινολογικά χαρακτηριστικά που δεν είναι παρόν στα είδη *S. cerevisiae*, και μπορούν να έχουν πρόσθετα αποτελέσματα στο κρασί. Ελεγχόμενη μικτή καλλιέργεια *S. cerevisiae* και ζυμών μη σακχαρομύκητα μπορεί να βελτιώσει το αναλυτικό και αρωματικό προφίλ του κρασιού, μέσα από μεταβολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών ζύμης (Languet et al., 2005; Salmon et al. 2007). Στο πλαίσιο αυτό, η χρήση τεχνικών ακινητοποίησης σε μικτές καλλιέργειες επιτρέπουν τον προσεκτικό έλεγχο της διαδικασίας πολύ-εκκίνησης, και πολλές μελέτες έχουν προτείνει την χρήσης της.

7. Συνθήκες περιβάλλοντος και επιβίωση των ζυμών

Η χαμηλή ζυμωτική ισχύς των ειδών μη σακχαρομύκητα, συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*, δεν εξηγεί γιατί αυτές οι ζύμες αρχίζουν να αφανίζονται μετά από τις πρώτες μέρες της ζύμωσης (4–5 %v/v αιθανόλης). Αυτό το φαινόμενο συχνά αναφέρεται να οφείλεται στην ανικανότητα των ζυμών αυτών να επιβιώνουν κάτω από υψηλά επίπεδα αιθανόλης και οργανικών οξέων, χαμηλές τιμές pH, λιγοστή διαθεσιμότητα οξυγόνου, εξάντληση οξυγόνου και άλλων θρεπτικών ουσιών (Bauer και Pretorius 2000, Bisson 1999), όπως επίσης και σε εξωγενής παράγοντες, όπως στην προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (Henick-Kling et al. 1998) και τις υψηλές θερμοκρασίες (Charoenchai et al. 1998).

Η αιθανόλη είναι γνωστή ως αναστολέας μικροβιολογικής ανάπτυξης (van Uden 1989), και ο *S. cerevisiae* ως ένα είδος υψηλά ανθεκτικό στην αιθανόλη (Arroyo-López et al. 2010; Pina et al. 2004). Οπότε, έχει γίνει δεκτό ότι ο *S. cerevisiae* υπερνικά τις ζύμες μη σακχαρομύκητα, κατά την διάρκεια της ζύμωσης λόγω της υψηλής αντοχής του έναντι της αιθανόλης (Fleet 2003; Fleet and Heard 1993)

Παρόλα αυτά, πιο πρόσφατες μελέτες που υλοποιήθηκαν με καθαρές καλλιέργειες μη σακχαρομύκητα ζυμών, έδειξαν ότι πολλές από αυτές τις ζύμες, ειδικότερα οι *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *T. delbrueckii* και *C. zemplinina*, μπορούν να αντέξουν πολύ υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης από ότι προηγουμένως πιστεύαμε (Pérez-Nevado et al. 2006 Pina et al. 2004). Ακόμη, άλλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η αιθανόλη δεν είναι ο κύριος λόγος θανάτου των μη σακχαρομύκητα ζυμών, κατά την διάρκεια μικτών καλλιιεργειών ζυμώσεων με τον *S. cerevisiae* (Nissen and Arneborg 2003, Pérez- Nevado et al. 2006).

Οι περιορισμοί θρεπτικών υλικών μπορούν επίσης να διαμορφώσουν την οικολογία των ζυμών στις ζυμώσεις οινοποίησης, καθώς ένα είδος ζύμης ή στέλεχος μπορεί να παράγει ή να χρησιμοποιήσει μία θρεπτική ουσία σχετική με ένα άλλο είδος ή στέλεχος. Το αφομοιώσιμο άζωτο και οι βιταμίνες μπορεί σύντομα να μειωθούν, κατά την διάρκεια της ζύμωσης, λόγω χαμηλής αρχικής συγκέντρωσης στον μούστο του κρασιού (Constantí et al., 1998, Henick-Kling et al., 1998). Σε αυθόρμητες ζυμώσεις κρασιού, όπου η αρχική μικροχλωρίδα αποτελείται κυρίως από είδη μη σακχαρομύκητα, η κατανάλωση αμινοξέων και βιταμινών κατά την διάρκεια των πρώτων ημερών ζύμωσης μπορεί να καθυστερήσει πολύ την επακόλουθη

ανάπτυξη των στελεχών *S. cerevisiae* (Fleet 2003). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι σε διαδοχική ζύμωση, εκτελεσμένη σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 176 mg/L αρχικού αφομοιώσιμου αζώτου, ο *S. cerevisiae* δεν ήταν ικανός να αναπτυχθεί λόγω της εξάντλησης του αζώτου από τον *T. Delbrueckii*, που αναπτυσσόταν κατά την διάρκεια των πρώτων 48 ωρών, οδηγώντας έτσι σε νωθρή ζύμωση (Taillandier et al., 2014). Υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι ο *K. apiculata* μπορεί να μειώσει την θειαμίνη και άλλα μικρο- θρεπτικά στοιχεία του μούστου, οδηγώντας σε ελλιπή ανάπτυξη του *S. cerevisiae* (Bisson 1999). Από την άλλη, μερικές ζύμες μη σακχαρομύκητα όπως οι *K. apiculata* και *M. Pulcherrima* είναι σημαντικά πρωτεολυτικοί, παράγοντας αμινοξέα που μπορούν να προωθήσουν την ανάπτυξη άλλων ειδών (Charoenchai et al. 1997).

Παρά το γεγονός ότι οι θρεπτικές απαιτήσεις μπορεί να παίζουν έναν σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια της οινοποίησης, οι ειδικές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά των ζυμών κρασιού μη σακχαρομύκητα δεν είναι καλά χαρακτηρισμένες. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με τους *H. uvarum*, *H. guilliermondii* και *C. zemplinina*, βρέθηκε ότι η χαμηλή ισχύς ζύμωσης αυτών των ζυμών ξεπεράστηκε μερικώς, με την προσθήκη πολύπλοκων θρεπτικών υλικών στο υπόστρωμα, όπως πεπτόνη ή yeast extract (Albergaria, 2007).

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ συντελεστών, μπορούν επίσης να συμβάλουν στην επικράτηση του *S. cerevisiae*. Σε πρόσφατη έρευνα (Salvadó et al. 2011) έγινε εκτίμηση της επίδρασης της αύξησης της συγκέντρωσης αιθανόλης (0-25%) και της θερμοκρασίας (4-46°C) στον ανταγωνισμό μεταξύ των *S. cerevisiae* και ζυμών μη σακχαρομύκητα, συγκεκριμένα των *H. uvarum*, *T. delbrueckii*, *C. zemplinina*, *Pichia fermentans* και *K. marxianus*, στην οινοποίηση. Επιβεβαίωσαν ότι η παραγωγή αιθανόλης δεν παρέχει καθαρό οικολογικό πλεονέκτημα στον *S. cerevisiae*, τουλάχιστον όχι μέχρι το 9 %v/v, ενώ μια αύξηση της θερμοκρασίας, πάνω από τους 15°C, δίνει στον *S. cerevisiae* ένα αξιόλογο προβάδισμα. Πράγματι, η επιμονή ή ακόμα και η επικράτηση ειδών μη σακχαρομύκητα έναντι του *S. cerevisiae*, συγκεκριμένα ειδών *Candida* και *Hanseniaspora*, κατά την διάρκεια ζυμώσεων που εκτελούνται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 20°C, έχει αναγνωριστεί από πολλούς συγγραφείς (Charoenchai et al., 1998, Ciani and Comitini 2006, Fleet et al., 1989, Gao and Fleet, 1988).

8. Αλληλεπιδράσεις ζυμών σε μεικτές καλλιέργειες

➤ Συνεργατικές αλληλεπιδράσεις

Έρευνες για τις ζυμώσεις πολύ-εκκίνησης απαιτούν την αποσαφήνιση των φυσιολογικών και μεταβολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των *S. cerevisiae* και οινολογικών μη σακχαρομύκητα ζυμών. Πράγματι, στοιχεία έχουν δείξει ότι όταν μερικές ζύμες αναπτύσσονται μαζί κάτω από ζυμωτικές συνθήκες, δεν συνυπάρχουν παθητικά, αλλά αλληλεπιδρούν και παράγουν απρόβλεπτες ενώσεις και/ή διαφορετικά επίπεδα προϊόντων ζύμωσης, που μπορούν να επηρεάσουν την χημική και αρωματική σύσταση του κρασιού (Howell et al., 2006; Anfang et al., 2009).

Πιθανές συνεργατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ζυμών μπορούν να παρουσιάσουν ένα εργαλείο για καινούργιες τεχνολογίες ζύμωσης. Κατά την διάρκεια μικτής καλλιέργειας, η παραγωγή βιομάζας από σακχαρομύκητες και ζύμες μη σακχαρομύκητα είναι χαμηλότερη από αυτή που παράγεται από τα είδη σε καθарές καλλιέργειες (Mendoza et al. 2007). Όμως, η παρουσία σακχαρομύκητα και ζυμών μη σακχαρομύκητα προάγει μια αύξηση στην ανθεκτικότητα των ζυμών μη σακχαρομύκητα κατά την διάρκεια την ζυμωτικής διαδικασίας, αλλά επηρεάζει και την συμπεριφορά των στελεχών του *S. cerevisiae* (Ciani et al., 2006; Mendoza et al., 2007). Αυτό μπορούμε να το δούμε από τις μεταβολές στον βαθμό κροκίδωσης σε μικτές καλλιέργειες με *K. apiculata* και *S. cerevisiae*. Σε μικτές καλλιέργειες, το κροκιδωμένο στέλεχος του *K. apiculata* αλληλεπιδρά με το μη κροκιδωμένο στέλεχος του *S. cerevisiae* επιφέροντας συνεργατική κροκίδωση των δύο ζυμών (Sosa et al., 2008).. Έρευνες για την εκτίμηση την επίδρασης κύτταρο με κύτταρο επαφής σε μικτές καλλιέργειες *T. delbrueckii* με *K. thermotolerans* και *S. cerevisiae* υποδεικνύουν μία μικρότερη ικανότητα των ζυμών μη σακχαρομύκητα να ανταγωνιστούν για χώρο συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*. Τα αίτια αυτής της συμπεριφοράς δεν είναι ακόμα ξεκάθαρα. (Nissen & Arneborg, 2003, Nissen et al., 2003).

Η χρήση διαδοχικής, συνεχής ζύμωσης και ακινητοποιημένων κυττάρων ζύμης, έχει επισημάνει την ανταλλαγή ακεταλδεύδης μεταξύ δύο ειδών. Συγκεκριμένα η υπερβολική παραγωγή ακεταλδεύδης από τον *S. bombicola*, λόγω της χαμηλής δραστηριότητας της αλκοολικής αφυδρογονάσης (Ciani et al., 2000), μεταβολίζεται σύντομα από τον *S. cerevisiae*, ο οποίος είναι ένα πιο ενεργό είδος της αλκοολικής

ζύμωσης (Ciani & Ferraro, 1998). Ακόμα μια ένωση που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο ειδών είναι η ακετυλομεθυλοκαρβινόλη (ή ακετοΐνη). Αυτή παράγεται σε μεγάλο βαθμό από τον *S. bombicola* σε καθαρές καλλιέργειες, και μεταβολίζεται πλήρως από τον *S. cerevisiae* σε μικτές ζυμώσεις (Ciani & Ferraro, 1998).

Θετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ καλλιεργειών εκκίνησης άγριων ζυμών και *S. cerevisiae* για την παραγωγή πτητικών ουσιών έχει αναφερθεί, όπου μια βελτίωση της συγκέντρωσης εστέρων, σε σχέση με καθαρές καλλιέργειες παρατηρήθηκε (Garde-Cerdan & Ancin-Azpilicueta, 2006). Οι *H. guilliermondii* και *S. cerevisiae*, επιβεβαίωσαν την βελτίωση στην παραγωγή εστέρων και μείωση του αιθυλεστέρα σε μικτές καλλιέργειες, συγκριτικά με καθαρές καλλιέργειες (Moreira et al. 2008).

➤ Ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις

Απόδειξη ότι άμεση μικροβιολογική αλληλεπίδραση, όπως φυσική επαφή, έχει σχέση με τον πρόωρο θάνατο ζυμών μη σακχαρομύκητα έχει αναφερθεί (Nissen και Arneborg, 2003, και Nissen et al., 2003). Οι ίδιοι συγγραφείς έδειξαν ότι ο θάνατος των *L. thermotolerans* και *T. Delbrueckii*, σε μικτής καλλιέργειας ζυμώσεις με *S. cerevisiae* δεν προκλήθηκε από την αιθανόλη ή άλλες τοξικές ουσίες, αλλά από μηχανισμό κύτταρο με κύτταρο επαφής. Επακόλουθη μελέτη υποστήριξε την προηγούμενη υπόθεση του ότι ο θάνατος του *T. Delbrueckii* μεσολάβησε από τον μηχανισμό κύτταρο με κύτταρο επαφής (Renault et al. 2013).

Σε παράλληλη δουλειά (Pérez-Nevado et al., 2006), ερευνήθηκαν οι παράγοντες που οφείλονται για τον πρόωρο θάνατο δύο *Hanseniaspora* ειδών, των *H. uvarum* και *H. guilliermondii*, συγκρίνοντας την ανάπτυξη και το ζυμωτικό τους προφίλ, σε καθαρή και μικτή καλλιέργεια ζύμωσης με τον *S. cerevisiae*. Παρατήρησαν ότι και τα δύο είδη ήταν ικανά να διατηρήσουν την κυτταρική τους βιωσιμότητα σε υψηλά επίπεδα, συγκεκριμένα 107-108 κύτταρα/mL, για πολύ περισσότερο (15 με 20 μέρες), κατά την διάρκεια ζυμώσεων καθαρής καλλιέργειας, συγκριτικά με μικτή καλλιέργεια, όπου αρχίζουν να αφανίζονται μετά από την πρώτη μέρα της ζύμωσης, και πεθαίνουν τελείως μετά από 3 με 7 μέρες. Κατέληξαν στο ότι ο πρόωρος θάνατος των ζυμών μη σακχαρομύκητα δεν προκλήθηκε από την αιθανόλη ή άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, αλλά περισσότερο από άγνωστες τοξίνες παραγόμενες από τον *S. cerevisiae*. Αργότερα βρέθηκε ότι αυτές οι τοξίνες αντιστοιχούν σε αντι-

μικροβιακές πεπτίδες (AMPs), που εκκρίνονται από τον *S. cerevisiae* (στέλεχος CCM1 885), αναστέλλοντας την ανάπτυξη πολλών ειδών μη σακχαρομύκητα, ειδικότερα των *K. marxianus*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* και *H. guilliermondii* (Albergaria et al., 2010). Οι AMPs αργότερα ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκε ότι προέρχονται από το γλυκολυτικό ένζυμο αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) (Branco et al., 2014).

Πρόσφατα, αποκλείστηκε επίσης η επαφή κύτταρο με κύτταρο ως ο κύριος λόγος του πρόωρου θανάτου του *T. delbrueckii* σε μικτής καλλιέργειας ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae*, και προτάθηκε ότι ο θάνατος προκλήθηκε από άγνωστους μεταβολίτες παραγόμενους από τον *S. cerevisiae* (Taillandier et al., 2014). Παρομοίως, παρατηρήθηκε ότι η πρόωρη εξαφάνιση του *H. uvarum* από τον μούστο, δεν προκλήθηκε από επαφή κύτταρο με κύτταρο με τον *S. cerevisiae*, αλλά από άγνωστους μεταβολίτες, που απεκκρίθηκαν στο υπόστρωμα (Wang et al., 2015).

Τα προηγουμένως αναφερόμενα αποτελέσματα όμως, φαίνεται να είναι αντίθετα με προηγούμενες αναφορές (Nissen και Arneborg, 2003). Βρέθηκε ότι το στέλεχος S101 *S. cerevisiae* προκαλούσε θανάτωση των *L. thermotolerans* και *T. delbrueckii* με επαφή κύτταρο με κύτταρο, και όχι από κάποια τοξική ουσία. Όμως, σε πρόσφατη συνεργασία των δύο ερευνητικών ομάδων, βρέθηκε ότι τα δύο φαινόμενα, δηλαδή η επαφή κύτταρο με κύτταρο και η έκκριση AMPs, παίζουν έναν συνδυαστικό ρόλο στον πρόωρο θάνατο του *L. thermotolerans* κατά την διάρκεια μικτής καλλιέργειας ζυμώσεων με *S. cerevisiae* (Kemsawasd et al. 2015a).

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο *S. cerevisiae* είναι ικανός να σκοτώσει άλλους μικροβιακούς ανταγωνιστές κατά την διάρκεια της ζύμωσης του κρασιού είναι ακόμα άγνωστος. Όπως έχει φανεί, οι AMPs που εκκρίνονται από τον *S. cerevisiae*, προκαλούν θάνατο του *H. guilliermondii*, με καταστροφή της ακεραιότητας των μεμβρανών των κυττάρων και της ενδοκυτταρικής ομοιοστάσης του pH (Branco et al., 2015), όμως ο μηχανισμός που κρύβεται κάτω από τον θάνατο από κύτταρο με κύτταρο επαφή παραμένει ασαφής.

Υπάρχει όμως ισχυρή απόδειξη ότι αυτοί οι μηχανισμοί θανάτωσης εξαρτούνται από την κυτταρική πυκνότητα. Έχει βρεθεί ότι ο θάνατος ζυμών μη σακχαρομύκητα σε μικτής καλλιέργειας ζυμώσεις με *S. cerevisiae*, πυροδοτείται όταν οι καλλιέργειες φτάνουν σε υψηλή κυτταρική πυκνότητα (10⁷ κύτταρα/mL) (Nissen και Arneborg, 2003, Pérez-Nevado et al., 2006).

Περιέργως, σε πρόσφατη έρευνα, βρέθηκε ότι ο ανταγωνισμός ασκούμενος από ένα εμπορικό στέλεχος *S. cerevisiae* (EC1118, Lalvin, Lallemand Inc.) εναντίον του *L. thermotolerans* (strain 101) ήταν σχεδόν απών σε μικτής καλλιέργειας ζύμωση εκτελούμενη στους 20 °C, ενώ στους 25 °C (βιομηχανική ζύμωση) και στους 30 °C ήταν ξεκάθαρα παρών (Gobbi et al., 2013). Αν και ο μούστος είχε εμβολιαστεί με *L. thermotolerans*, σε αρχική κυτταρική πυκνότητα (10^7 κύτταρα/mL) 10 φορές υψηλότερη από αυτή του *S. cerevisiae* (10^6 κύτταρα/mL), τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θερμοκρασία έπαιξε καθοριστικό ρόλο στο ανταγωνιστικό πλεονέκτημα του *S. cerevisiae*. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η θερμοκρασία είναι με κάποιον τρόπο συνδεδεμένη με τις ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις του *S. cerevisiae* εναντίον άλλων ζυμών μη σακχαρομύκητα, και άρα η επίδραση της θερμοκρασίας στους μηχανισμούς θανάτωσης, που συζητήθηκαν προηγουμένως, πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Η μηλογαλακτική ζύμωση και τα σημαντικά βακτήρια της οινοποίησης

1. Η μηλογαλακτική ζύμωση

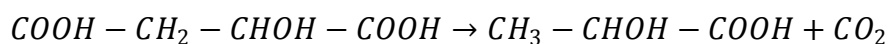
Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι η μετατροπή του μηλικού οξέος από τα οξυγαλακτικά βακτήρια σε γαλακτικό οξύ (Τσακίρης,2014). Αυτή η διαδικασία, επίσης καλούμενη βιολογική μείωση της οξύτητας, συντελείται από την αποκαρβοξυλίωση του L(+) μηλικού οξέος σε L(-)γαλακτικό οξύ και CO₂, με 1g μηλικού οξέος να μετατρέπεται σε 0,67g γαλακτικού οξέος και 0,33g (165ml) CO₂. Το μηλικό οξύ, μαζί με το τρυγικό οξύ, είναι τα βασικά στοιχεία που καθορίζουν την ολική οξύτητα του κρασιού. Και τα δύο αυτά οξέα αποτελούν πάνω από το 90% των ολικών οξέων που βρίσκονται στο κρασί. Η συγκέντρωση του μηλικού οξέος σε σταφύλια από περιοχές με κρύο κλίμα μπορεί να φτάνει τα 9g/L, και άρα, είναι σημαντικό να μειωθεί το περιεχόμενό του. Επιπλέον το μηλικό οξύ, που είναι δικαρβονικό και πιο οξύ στη γεύση (όπως, για παράδειγμα, η χαρακτηριστική οξύτητα στα μήλα), μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ, που είναι μονοκαρβονικό και πιο ήπιο στη γεύση (όπως, για παράδειγμα, τα γαλακτοκομικά ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση). Ως αποτέλεσμα αυτής της βίο-μετατροπής, μια μικρότερη ποσότητα του ήπιου οξέος σχηματίζεται και το κρασί επιπλέον είναι κορεσμένο με CO₂ (Małgorzata, 2013, Versari et al.,1999, Maicas, 2001, Lopez et al., 2007, Costello et al.,1983, Henick-Kling, 1995) . Προς το παρόν, ο *Oenococcus oeni* έχει επιλεγεί ως ο πιο αποτελεσματικός και ειδικός για την πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης μικροοργανισμός (Małgorzata,2013, Małgorzata, 2013, Versari et al.,1999, Maicas, 2001, Lopez et al., 2007, Costello et al.,1983) .

Η ζύμωση αρχίζει να πραγματοποιείται τη στιγμή που τα βακτήρια φτάνουν σε ορισμένο πληθυσμό. Κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, η ολική οξύτητα ελαττώνεται απότομα για να μείνει τελικά σταθερή. Η πτητική οξύτητα αυξάνεται λίγο. Αυτή η δευτερεύουσα ζύμωση συμβάλλει στη βιολογική σταθεροποίηση του κρασιού. Μετά τη ζύμωση των σακχάρων από τις ζύμες και σε μερικές περιπτώσεις πριν από την ολοκλήρωσή της, τα γαλακτικά βακτήρια προσβάλλουν αρχικά το μηλικό οξύ που είναι βιολογικά σχετικά ασταθές. Για το λόγο αυτό πρέπει να φροντίσουμε για την εξαφάνισή του. Σε περιπτώσεις που δεν απομακρυνθούν τα βακτήρια, μετά την εξαφάνιση του μηλικού οξέος, μετατρέπονται

σε επιβλαβή βακτήρια ικανά να αποικοδομήσουν τις πεντόζες, τη γλυκερόλη, το τρυγικό οξύ και φυσικά σάκχαρα που έχουν μείνει αζύμωτα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών του κρασιού. Όμως, πρόωρη απομάκρυνση των βακτηρίων, δηλαδή πριν τη μηλογαλακτική ζύμωση, δεν εξασφαλίζει την βιολογική σταθερότητα (Τσακίρης, 2014).

Σημαντικό σημείο ελέγχου για τα ερυθρά κρασιά που επιθυμούμε να υποστούν μηλογαλακτική ζύμωση με την επίδραση των βακτηρίων, είναι η στιγμή της προσθήκης θειώδους ανυδρίτη. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να γίνει μετά το τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Σε αντίθετη περίπτωση, η βιαστική προσθήκη είναι δυνατόν να καθυστερήσει ή και να διακόψει την μηλογαλακτική ζύμωση (Τσακίρης, 2014).

Η χημική εξίσωση την μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι :



Ο πολλαπλασιασμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν γίνεται με αποικοδόμηση του μηλικού οξέος, του οποίου η αποσύνθεση δεν απελευθερώνει ενέργεια, αλλά με την αποικοδόμηση λίγων σακχάρων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι Gram θετικά (Τσακίρης, 2014).

Το χρώμα των ερυθρών οίνων μειώνεται με την μηλογαλακτική ζύμωση λόγω της αύξησης του pH. Από γευστική άποψη έχουμε σημαντικές αλλαγές που οφείλονται στη μείωση της οξύτητας. Κατά την μηλογαλακτική ζύμωση, στο κρασί αναπτύσσονται νέα αρώματα, που επιταχύνουν το σχηματισμό του αρωματικού μπουκέτου του κρασιού. Η μετατροπή αυτή εκτός από ποιοτικές μεταβολές, έχει το πλεονέκτημα να κάνει το κρασί πιο βιολογικά σταθερό, γιατί το γαλακτικό οξύ είναι βιολογικά πιο σταθερό από το μηλικό οξύ.

Η παρακολούθηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης μπορεί να γίνει με ενζυμική μέτρηση του μηλικού και γαλακτικού οξέος. Επίσης με χρωματογραφία επί χάρτου (Τσακίρης, 2014).

Για τη βιομηχανική παραγωγή γίνεται κατ' αρχάς επιλογή του στελέχους που θα χρησιμοποιηθεί. Στη συνέχεια, γίνεται πολλαπλασιασμός σε ένα ζυμωτήρα, διαχωρισμός και λυοφίλιση. Για να χρησιμοποιηθούν τα λυοφιλημένα βακτήρια χρειάζονται ενυδάτωση (Τσακίρης, 2014).

➤ Συνθήκες για την ομαλή πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης

Είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση σε κρασί που δεν έχει αεριστεί (Τσακίρης,2014). Συνθήκες για την ομαλή πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης περιλαμβάνουν αρχική θερμοκρασία στους 20-25°C (το οποίο είναι συχνά πρόβλημα, αφού στην ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, η θερμοκρασία των νέων κρασιών είναι αρκετά πιο χαμηλή), και κατά την μηλογαλακτική ζύμωση θερμοκρασία 18-20°C, το περιεχόμενο του ελεύθερου SO₂ πρέπει να είναι χαμηλότερο του 10mg/L, το ολικό SO₂ σε συγκέντρωση κάτω του 30mg/L, και το pH στο 3,2-3,4 (Versari et al.,1999, Maicas, 2001, Lopez et al., 2007, Costello et al.,1983, Henick-Kling, 1995). Η αύξηση των γαλακτικών βακτηρίων σταματά σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 45°C. Το κατώτερο όριο πραγματοποίησης της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι το pH 3, με αποτέλεσμα η μηλογαλακτική ζύμωση να είναι δυσκολότερη στα κρασιά που το έχουν μεγαλύτερη ανάγκη (Τσακίρης,2014).

Σημαντικό ρόλο παίζουν τα θρεπτικά συστατικά όπως τα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη), τα οργανικά οξέα (μηλικό και κιτρικό οξύ), το οργανικό άζωτο (αμινοξέα, πεπτίδια), οι βιταμίνες (B, παντοθενικό οξύ), και τα ιχνοστοιχεία (Mn, Mg, K, Na). Στην περίπτωση της ολικής κατανάλωσης των θρεπτικών συστατικών από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση, είναι απαραίτητο να προστεθούν στα νέα κρασιά πηγές C,N και P, στοιχεία σημαντικά για τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ακόμα μια πρακτική είναι να μείνει το κρασί πάνω στο ίζημα (κατακάθι από τα κύτταρα ζύμης) μέχρι την αυτόλυση. Όμως, αυτό δημιουργεί το ρίσκο της σύνθεσης ανεπιθύμητων μεταβολιτών. Σαν αποτέλεσμα μίας σωστά εκτελεσμένης μηλογαλακτικής ζύμωσης, το μηλικό οξύ μπορεί να μειωθεί έως και 90% (Davis et al., 1985, Davis et al., 1986a,b, Henick-Kling, 1993, Versari et al., 1999, Campo et all., 2008).

➤ Κύκλος ανάπτυξης κατά την οινοποίηση

Κατά τη διάρκεια της συλλογής των σταφυλιών, ο πληθυσμός των βακτηρίων είναι σταθερός. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια μεταφέρονται από την φλούδα του σταφυλιού στο γλεύκος και εκεί αναπτύσσονται γρήγορα τις πρώτες ώρες που ακολουθούν, παράλληλα με την ανάπτυξη των ζυμών οι οποίες είναι ανταγωνιστικές προς τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Στο ξεκίνημα της αλκοολικής ζύμωσης υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των βακτηρίων και ζυμών (Τσακίρης,2014).

Με την εμφάνιση της αιθανόλης στο γλεύκος σε ζύμωση, ο πληθυσμός τους μειώνεται για να μηδενιστεί πρακτικά. Μόνο τα πιο ανθεκτικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων καταφέρνουν να επιζήσουν στις αντίξοες συνθήκες που έχουν δημιουργηθεί. Πρόκειται για ορισμένα είδη που, μετά από μια περίοδο αναμονής, προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης αναπτύσσονται εξασφαλίζοντας την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, όταν αυτοί φτάσουν σε πληθυσμό της τάξης του 10^6 κύτταρα/mL. Η περίοδος αναμονής διαρκεί μερικές μέρες, μέχρι βδομάδες. Η μηλογαλακτική ζύμωση δεν ξεκινά με πληθυσμό μικρότερο από 10^6 κύτταρα/mL. Ο πληθυσμός αυτός δεν γίνεται ποτέ μεγαλύτερος του 10^7 κύτταρα/mL (Τσακίρης,2014).

2. Σημαντικά βακτήρια κατά την οινοποίηση

Εκτός του γένους *Saccharomyces*, διαφορετικά βακτηριακά είδη αυξάνουν ή μειώνουν την ποιότητα του κρασιού, πράγμα που εξαρτάται από τους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται. Επειδή ο μούστος και το κρασί είναι εχθρικά περιβάλλοντα για μικροβιακή ανάπτυξη λόγω του χαμηλού pH, του χαμηλού επιπέδου οξυγόνου, της παρουσίας αιθανόλης, και της υψηλής ωσμωτικής πίεσης, μόνο λίγα βακτηριακά είδη είναι ικανά να αναπτυχθούν. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Oenococcus*, και *Pediococcus* βρίσκονται συχνά στο κρασί, λόγω της αντοχής τους σε αυτούς του παράγοντες (Henick-Kling, 1993, Amerine et al., 1980, Dicks et al., 1995, Fleet, 2003, Lonvaud-Funel, 1999). Άλλα βακτήρια όπως τα *Acetobacter* και *Gluconobacter* είναι παρόν στον μούστο, δημιουργώντας ένα προβληματισμό για την ποιότητα του κρασιού.

Πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια που βρίσκονται στο κρασί, μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα του κρασιού, μεταβολίζοντας το μηλικό οξύ σε γαλακτικό οξύ, μέσω διαδικασίας που ονομάζεται μηλογαλακτική ζύμωση (Osborne and Edwards, 2005)

Παρόλα αυτά, μερικά οξυγαλακτικά μπορούν να συνδεθούν με προβλήματα αλλοίωσης, περιλαμβανομένης της 'φρακαρισμένης' ζύμωσης (Edwards et al., 1999, Huang et al., 1996) της παραγωγής ανεπιθύμητων γεύσεων και οσμών (Costello and Henschke, 2002, Drysdale and Fleet, 1989a, Sponholz, 1993) της υπερβολικής πτητικής οξύτητας (Huang et al., 1996, Drysdale and Fleet, 1989a), και άλλα ελαττώματα.

A. *OENOCOCCUS*

Ταξινόμια, Εμφάνιση, Ανάπτυξη και Μεταβολισμός στο κρασί

Τα στελέχη του *O. oeni* περιγράφονται ως θετικά Gram, δεν κινούνται, είναι προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά στην καταλάση, ελλειψοειδή έως σφαιρικά κύτταρα που συνήθως συναντούνται σε ζεύγη ή αλυσίδα (Dicks et al., 1995, Garvie, 1967a). Ο *O. Oeni* έχει απαίτηση πλούσιου υποστρώματος σε σύνθετους παράγοντες ανάπτυξης και σε αμινοξέα. Οι *Oenococcus* είναι ετεροζυμωτικοί και μετατρέπουν την γλυκόζη σε ίσα ποσοστά γαλακτικού οξέος, CO₂, και αιθανόλη ή οξικό οξύ μέσω του μονοπατιού της φωσφοκετολάσης (Cocaign-Bousquet 1996, Cogan and Jordan, 1994, Krieger et al., 1993)

Ο O.oeni στη μηλογαλακτική ζύμωση

Από τους Pilone και Kunkee (1972) παρατηρήθηκε ότι η μηλογαλακτική ζύμωση επιταχύνει τον ρυθμό ανάπτυξης του *O. Oeni* και διατύπωσαν ότι η αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης διεγείρει την αξιοποίηση των πηγών άνθρακα από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η μηλογαλακτική ζύμωση συνήθως λαμβάνει χώρα μετά την αλκοολική ζύμωση, αλλά μπορεί να συμβεί και ταυτόχρονα με την αρχική ζύμωση. Επειδή, η φυσική μικροχλωρίδα είναι απρόβλεπτη και δύσκολο να ελεγχτεί, έχουν αναπτυχτεί καλλιέργειες εκκίνησης καθαρής καλλιέργειας βακτηρίων (Henick-Kling, 1993, Krieger et al., 1993, Nielsen et al., 1996, Pilone, 1995). Αν και επιλεγμένα στελέχη *Lactobacillus* μπορούν να εμβολιαστούν, ο *O. oeni* είναι το πρωταρχικό είδος που εκτελεί την μηλογαλακτική ζύμωση, λόγω της αντοχής στην αιθανόλη και του παραγόμενου αρωματικού προφίλ (Krieger et al., 1993, Guzzo et al., 1994)

Ακριβώς το πότε πρέπει να γίνει ο εμβολιασμός του *O. oeni* κατά την οινοποίηση είναι ένα σημείο διαμάχης για τους ερευνητές και τους οιολόγους. Οι Semon et al. (2001) κατέληξαν στο ότι ο βέλτιστος χρόνος για εμβολιασμό βακτηρίων, που θα εκτελέσουν την μηλογαλακτική ζύμωση, εξαρτάτε από τα συγκεκριμένα στελέχη ζύμης και βακτηρίων που χρησιμοποιούνται. Αυτοί οι συγγραφείς διατύπωσαν ότι τα προβλήματα που συνδέονται με τον εμβολιασμό βακτηρίων πριν την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, όπως η υπερβολική αλκοολική ζύμωση ή/και η 'φρακαρισμένη' αλκοολική ζύμωση, οφείλονται κυρίως σε ασυμβατότητες μεταξύ των συγκεκριμένων στελεχών ζύμης ή βακτηρίων.

Παραγωγή αρώματος και γεύσης

Αν και η ακριβής συμβολή της μηλογαλακτικής ζύμωσης στη γεύση του κρασιού είναι αμφιλεγόμενη, ο *O. oeni* είναι γνωστός για την παραγωγή ενώσεων αρώματος και γεύσης του κρασιού. Από τις σημαντικότερες είναι η 2,3-βουτανοδιόλη και το διακετύλιο (Martineau and Henick-Kling, 1995a,b, Nielsen and Richelieu, 1999,). Το διακετύλιο έχει ένα ξεχωριστό 'βουτυρένιο' άρωμα και συντίθεται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, (Martineau and Henick-Kling, 1995a). Οι τιμές του αισθητήριου ορίου κυμαίνονται από 0,2mg/L στο Chardonnay, από 0,9mg/L στο Pinot Noir και από 2,8mg/L στο Cabernet Sauvignon (Martineau et al., 1995), με την τελική συγκέντρωση στο κρασί να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως το βακτηριακό στέλεχος, τον τύπο του κρασιού και το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Martineau and Henick-Kling, 1995a,b, Nielsen and Richelieu, 1999). Αν και η παρουσία του διακετυλίου σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1-3 mg/L) περιγράφεται οργανοληπτικά ως 'βουτυρένιο' ή θυμίζει άρωμα ξηρού καρπού, η ένωση θα επισκιάσει το άρωμα του κρασιού σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (5-7 mg/L), με αποτέλεσμα την αλλοίωση (Rankine et al., 1969).

Επιπλέον του διακετυλίου, ο *O. oeni* παράγει εστέρες, ενώσεις επίσης σημαντικές για το άρωμα και την γεύση. Οι εστέρες αρχικά παράγονται από τους σακχαρομύκητες κατά την αλκοολική ζύμωση (Mason and Dufour, 2000) αν και στοιχεία δείχνουν ότι εστέρες όπως ο οξικός αιθυλεστέρας, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, ο εξανικός αιθυλεστέρας και ο οκτανικός αιθυλεστέρας μπορούν να συντεθούν από τον *O. oeni* (De Revel et al., 1999, Delaquis-Pascal et al., 2000, Edwards and Peterson, 1994, Maicas et al., 1999). Για παράδειγμα έχει αναφερθεί ότι στελέχη του *O. oeni* συνθέτουν σχετικά μεγάλα ποσά γαλακτικού αιθυλεστέρα (183–1280 mg/L) κατά την ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό (Edwards and Peterson, 1994). Σύμφωνα με αυτό, οι Maicas et al. (1999) ανέφεραν ότι 50mg/L γαλακτικού αιθυλεστέρα είχαν παραχθεί σε κρασιά ζυμωμένα με τον *O. oeni*, όπως και αμυλικός αιθυλεστέρας και καπροϊκός αιθυλεστέρας, ενώσεις σημαντικές για μια ευχάριστη φρουτώδη νότα στο κρασί (Gil et al., 1996, Mason and Dufour, 2000).

Ο *O. oeni* μπορεί επίσης να επηρεάζει την γεύση του κρασιού μέσω της απελευθέρωσης μονοτερπενίων. Αυτές οι ενώσεις είναι συχνά παρόν στο σταφύλι και το κρασί ως μη πτητικές άγευστες ενώσεις (Ebeler, 2001). Η απελευθέρωση των μονοτερπενίων είναι σημαντική για την ανάπτυξη συγκεκριμένων αρωμάτων του κρασιού. Όμως, η υδρόλυση των μονογλυκοζιτών απαιτεί την ενέργεια μιας b-

γλυκοσιδάσης. Είναι γνωστό ότι οι ζύμες του κρασιού, συγκεκριμένα οι ζύμες μη σακχαρομύκητα, έχουν γλυκοζιδικές δράσεις (Charoenchai et al., 1997, Delcroix et al., 1994, Maicas et al., 1999,). Στοιχεία δείχνουν ότι μερικά στελέχη του *O. oeni* επίσης έχουν b-γλυκοσιδάσης δράσεις και άρα ίσων τροποποιούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού (Grimaldi et al., 2000, Ugliano et al., 2003).

Ο *O. oeni* επίσης, ίσως επηρεάζει τις συγκεντρώσεις αλδευδών, όπως της ακεταλδεύδης. Η ακεταλδεύδη είναι η πιο άφθονη αλδεύδη που βρίσκεται στο κρασί και επηρεάζει το άρωμα, την ωρίμανση και την σταθερότητα του χρώματος (Liu and Pilone, 2000). Έχει βρεθεί ότι ο *O. oeni* μπορεί να μεταβολίσει την ακεταλδεύδη, με αποτέλεσμα την παραγωγή αιθανόλης και οξικού οξέος. Η αποδόμηση της ακεταλδεύδης μπορεί να είναι επιθυμητή σε κάποιες περιπτώσεις, διότι η υπερβολική ακεταλδεύδη προκαλεί ανεπιθύμητο άρωμα στο κρασί (Kotseridis and Baumes, 2000, Liu and Pilone, 2000), αλλά ανεπιθύμητη σε άλλες περιπτώσεις γιατί παίζει ρόλο στην εξέλιξη του χρώματος στα κόκκινα κρασιά (Somers and Wescombe, 1987, Timberlake and Bridle, 1976).

Εκτός από την επίδραση στο άρωμα και την γεύση, η μηλογαλακτική ζύμωση ίσως αυξάνει το σώμα του κρασιού και την αίσθηση στο στόμα, πιθανών λόγω της παραγωγής πολυολών, όπως γλυκερόνη και ερυθριτόλη (Somers and Wescombe, 1987, Timberlake and Bridle, 1976).

B. ACETOBACTER ΚΑΙ GLUCONOBACTER

Ταξινόμια, Εμφάνιση, Ανάπτυξη και Μεταβολισμός στο κρασί

Τα βακτήρια του οξικού οξέος (BOO) είναι Gram αρνητικά, θετικοί στην δοκιμή της καταλάσης ράβδοι που ανήκουν στην οικογένεια των *Acetobacteraceae*. Από την οικογένεια αυτή, την οινολογία ενδιαφέρουν τα γένη *Acetobacter* και *Gluconobacter*, που έχουν απομονωθεί από λουλούδια, φρούτα, κρασί και μπύρα, και είναι βασικοί μικροοργανισμοί της οξοποιίας (Osborne and Edwards, 2005).

Οι *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconacetobacter liquefaciens*, και *Gluconacetobacter hansenii* είναι συνδεδεμένοι με το σταφύλι και το κρασί (Drysdale and Fleet, 1988, Du Toit and Lambrechts, 2002, Joyeux et al., 1984a). Τα είδη *Gluconobacter* είναι ευρέως απομονωμένα από το σταφύλι και το κρασί αλλά εξαφανίζονται καθώς η αλκοολική ζύμωση ξεκινάει, ίσως λόγω της χαμηλής τους αντοχής έναντι της αιθανόλης ή της έλλειψη οξυγόνου

(Joyeux et al., 1984a). Τα είδη *Acetobacter* είναι πιο ανθεκτικά στην αιθανόλη από τα *Gluconobacter*, και ίσως επιβιώσουν την αλκοολική ζύμωση (Drysdale and Fleet, 1984, 1988, Joyeux et al., 1984a).

Λόγω της αεροβικής τους φύσης, αναστέλλεται η ανάπτυξη των BOO στο αναερόβιο περιβάλλον της αλκοολικής ζύμωσης (Joyeux et al., 1984b). Όμως, τα είδη *A. pasteurianus* και *A. aceti* απομονώνονται συχνά από κρασιά αποθηκευμένα σε βαρέλια ή σε άλλα δοχεία στο οινοποιείο, κάτω από ημί-αερόβιες συνθήκες (Joyeux et al., 1984a). Η επιβίωση των BOO στο κρασί μπορεί να οφείλεται στην έκθεση του κρασιού σε αέρα, κατά την διάρκεια της άντλησης του και των διαδικασιών μεταφοράς.

Τα BOO παράγουν οξικό οξύ μέσω της οξειδωσης της αιθανόλης, από 2 ένζυμα: την αλκοολική αφυδρογονάση και την αλδεϋδική αφυδρογονάση. Η αλκοολική αφυδρογονάση οξειδώνει την αιθανόλη σε ακεταλδεϋδη, η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται σε οξικό οξύ από την αλδεϋδική αφυδρογονάση (Saeki et al., 1997). Κάποια είδη BOO μπορούν να παράγουν περισσότερο από 50g/L από την αιθανόλη, κάνοντας τα σημαντικά στην παραγωγή ξυδιού (Lu et al., 1999).

Αλλοίωση στο κρασί

Μία κύρια αιτία της αλλοίωσης του κρασιού, από τα βακτήρια του οξικού οξέος, είναι η παραγωγή υπερβολικού οξικού οξέος. Το νόμιμο όριο οξικού οξέος στο κρασί είναι 1.2-1.4 g/L, συγκεντρώσεις που επίσης σημαντικά μειώνουν την ποιότητα του κρασιού (Drysdale and Fleet, 1989a, Sponholz, 1993). Το 50-60% της αιθανόλης του κρασιού μπορεί να οξειδωθεί από αυτά τα βακτήρια με την παραγωγή 1,5-3,75 g/L οξικού οξέος (Drysdale and Fleet, 1989a).

Ακόμα ένα σημαντικό παραπροϊόν που επηρεάζει την ποιότητα του κρασιού είναι ο οξικός αιθυλεστέρας. Αυτή η ένωση είναι πολύ ανεπιθύμητη. Τα BOO έχουν δείξει να παράγουν συγκεντρώσεις οξικού αιθυλεστέρα πάνω από 140mg/L στο κρασί και 30mg/L στον μούστο (Drysdale and Fleet, 1989a).

Εκτός από το οξικό οξύ και τον οξικό αιθυλεστέρα, τα BOO παράγουν και άλλες ουσίες επιβλαβείς για την ποιότητα του κρασιού, συμπεριλαμβανομένων της ακεταλδεϋδης, της ακετοΐνης, και της δεϋδροξυακετόνης. Έχουν αναφερθεί αυξημένες συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης σε κρασί στο οποίο έχουν αναπτυχθεί BOO (Drysdale and Fleet, 1989a). Συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης πάνω από το αισθητήριο όριο στο κρασί (100-125mg/L) είναι ανεπιθύμητες λόγω του 'πράσινου',

‘χορτώδους’, ‘φυτικού’ αρώματος (Kotseridis and Baumes, 2000, Liu and Piloni, 2000). Δεϋδροξυακετόνη ίσως παράγεται από τους *A. acetii* και *G. Oxydans*, μέσω του μεταβολισμού της γλυκερόλης κάτω από αερόβιες συνθήκες (Drysdale and Fleet, 1989a, Fugelsang, 1997).

C. LACTOBACILLUS

Ταξινόμια, Εμφάνιση, Ανάπτυξη και Μεταβολισμός στο κρασί

Οι *Lactobacillus* αντιπροσωπεύουν μία ομάδα ειδών με υψηλή ποικιλομορφία, τα οποία είναι Gram θετικά, μικροαερόφιλα βακτήρια, που ποικίλουν από μακριά ή κοντά ράβδια, ή ακόμα και κοκκοβακίλους (Kandler and Weiss, 1986). Οι *Lactobacillus* έχουν σύνθετες απαιτήσεις διατροφής από αμινοξέα, παράγωγα νουκλεϊκών οξέων, βιταμίνες, λιπαρά οξέα έως και ζυμώσιμους υδατάνθρακες (Kandler and Weiss, 1986). Τα είδη *Lactobacillus* είναι ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά. Είδη *Lactobacillus* απομονωμένα από σταφύλι και κρασί παγκοσμίως περιλαμβάνουν τους *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. homohiochii*, *L. jensenii*, *L. leichmannii*, *L. plantarum*, *L. sake*, και *L. trichodes* (Kandler and Weiss, 1986, Davis et al., 1986a,b, Chalfan et al., 1977)

Η παρουσία και επιβίωση των ειδών στο κρασί εξαρτάται σημαντικά από το pH και την αιθανόλη (Davis et al., 1986a). Σε κρασιά με υψηλό pH (>3,5) τα είδη *Lactobacillus* είναι συνήθως επικρατέστερα, ενώ σε χαμηλότερα pH άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια επικρατούν, όπως ο *O. oeni* (Davis et al., 1986b, Henick-Kling, 1993). Η αντοχή στην αιθανόλη ποικίλει ανάμεσα στους *Lactobacillus*. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη του *L. plantarum* σταματά σε συγκεντρώσεις αιθανόλης 5-6% v/v, ενώ οι πιο ανθεκτικοί στην αιθανόλη *L. casei* και *L. brevis* έχουν επιτυχώς διεξάγει την μηλογαλακτική ζύμωση (Kosseva et al., 1998, Wibowo et al., 1985). Τελικώς, ο *L. fructivorans* είναι υπερβολικά ανθεκτικός στην αιθανόλη, και έχει απομονωθεί από υψηλής συγκέντρωσης αλκοόλ (>20%) κρασιά επιδορπίου (Amerine and Kunkee, 1968; Fornachon et al., 1949).

Αλλοίωση στο κρασί

Οι *Lactobacillus* θεωρούνται γενικώς ανεπιθύμητοι στο κρασί γιατί η μη ελεγχόμενη ανάπτυξη τους μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της πτητικής οξύτητας, ή σχηματισμό άλλων ανεπιθύμητων οσμών και γεύσεων. Μερικά είδη παράγουν

υπερβολικά ποσοστά οξικού οξέος (Davis et al., 1986b, Edwards et al., 1999, Huang et al., 1996). Ως απόδειξη, ο *L. kunkeei* μπορεί να παράγει 3 με 5 g/L οξικού οξέος σε κρασιά (Edwards et al., 1999; Huang et al., 1996).

Επιπροσθέτως της αισθητήριας επίδρασης τους στο κρασί, τα είδη *Lactobacillus* φαίνεται να εμπλέκονται στην πρόκληση ‘κολλημένης’ ή ‘αργής’ ζύμωσης. Μερικοί οινοπαραγωγοί έχουν παρατηρήσει γρήγορη αλλοίωση του κρασιού από μικροοργανισμούς, χαρακτηρίζοντας τους ως ‘βίαιους’ *Lactobacillus*. Αυτή η αλλοίωση έχει χαρακτηριστεί ως πολύ γρήγορη, με άφθονη βακτηριακή ανάπτυξη κατά την διάρκεια των πρώτων σταδίων της οινοποίησης (Boulton et al., 1996). Η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη συγκεκριμένων οξυγαλακτικών βακτηρίων, περιλαμβανομένου του *L. kunkeei*, μπορεί να προκαλέσουν ‘αργόσυρτη’ ζύμωση (Huang et al., 1996). Μερικά στελέχη του *L. hilgardii* έχουν επίσης φανεί να εμπλέκονται με αλλοίωση (Mills, 2001). Σε πολλές περιπτώσεις στις οποίες οι ‘βίαιοι’ *Lactobacillus* προκάλεσαν αλλοίωση, οι οινοπαραγωγοί δεν είχαν χρησιμοποιήσει SO₂, και το αρχικό pH των κρασιών ήταν πάνω από το 3.5, συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη τους (Huang et al., 1996).

D. PEDIOCOCCUS

Ταξινόμια, Εμφάνιση, Ανάπτυξη και Μεταβολισμός στο κρασί

Οι *Pediococcus* χαρακτηρίζονται ως σφαιρικοί, Gram θετικοί, μη κινούμενοι, αρνητικοί στην καταλάση, αερόβιοι έως μικροαερόφιλοι μικροοργανισμοί (Carr et al., 2002; Garvie, 1986). Οι *Pediococcus* είναι ομοζυμωτικοί, και έχουν σύνθετους συντελεστές ανάπτυξης και απαιτήσεις σε αμινοξέα. Όλα τα είδη απαιτούν νικοτινικό οξύ, παντοθενικό οξύ και βιοτίνη, αλλά κανένα δεν απαιτεί θειαμίνη, π-αμινοβενζοϊκό οξύ ή βιταμίνη B12 (Garvie, 1986). Οι αναπτυσσόμενες καλλιέργειες έχουν επίσης την ικανότητα να σχηματίζουν L(+) γαλακτικό οξύ από το μηλικό οξύ (Edwards and Jensen, 1992, Raccach, 1987). Μπορεί να εισβάλουν στο κρασί λόγω της παρουσίας τους στο έδαφος, το σταφύλι ή τον εξοπλισμό του οινοποιείου, αλλά η επιβίωση τους ευνοείται όταν το pH είναι μεγαλύτερο από 3.5 (Davis et al., 1986a, Wibowo et al., 1985). Είδη του *Pediococcus* απομονωμένα από το κρασί είναι οι *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. pentosaceus*, και *P. parvulus* (Davis et al., 1986b, Edwards and Jensen, 1992).

Αλλοίωση στο κρασί

Η ανάπτυξη των ειδών *Pediococcus* στο κρασί έχει θεωρηθεί ανεπιθύμητη λόγω της παραγωγής ανεπιθύμητων αρωμάτων και γεύσεων. Οι *Pediococcus* είναι ικανοί να παράγουν υπερβολική ακετόνη και διακετύλιο, τα οποία δίνουν ανεπιθύμητα αρώματα και γεύση σε υψηλές συγκεντρώσεις (Sponholz, 1993). Επιπλέον, μερικά είδη *Pediococcus* είναι ικανά να αποικοδομούν την γλυκερίνη σε ακρολεΐνη, μια ένωση που αντιδρά με την φαινολική ομάδα των ανθοκυανίνων, παράγοντας μια πικρή μόλυνση στο κρασί (Davis et al., 1988; Du Toit and Pretorius, 2000).

Αν και η ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών *Pediococcus* στο κρασί είναι μη επιθυμητή, έχει αναφερθεί ότι πολλά κρασιά, από τα οποία απομονώθηκαν *Pediococcus* δεν ήταν αλλοιωμένα (Edwards and Jensen, 1992). Αναφορά έχει γίνει και για τον *P. parvulus*, ο οποίος τροποποίησε το μπουκέτο κρασιού Cabernet Sauvignon, που δεν είχε υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση, χωρίς να θεωρείται αλλοιωμένο (Edwards et al., 1994). Οπότε η ανάπτυξη των *Pediococcus* στο κρασί μπορεί να προσθέτει επιθυμητά χαρακτηριστικά, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

3. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών

➤ Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηρίων

Κατά την οινοποίηση, ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις προκύπτουν μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων, που είναι παρόν στο κρασί. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι στελέχη του *P. parvulus* αναπτύχθηκαν καλά σε κρασιά που δεν είχαν υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση, ενώ η βιωσιμότητα όλων των στελεχών του *P. parvulus* ελαττώθηκε σύντομα μετά τον εμβολιασμό σε κρασί που είχε υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση, η οποία είχε πραγματοποιηθεί με τον *O. oeni*. Διατυπώθηκε ότι η αναστολή του *P. parvulus* μπορεί να είναι σχετική με την σύνθεση μίας άγνωστης ανασταλτικής ουσίας (Edwards et al., 1994). Επίσης, αναφορά έχει γίνει για ένα άλλο είδος *Pediococcus*, τον *P. pentosaceus*, που αναστέλλει τον *O. oeni*, λόγω της αύξησης μικρών ευαίσθητων στην πρωτεόλυση ενώσεων. Στηριγμένοι σε αυτά τα αποτελέσματα, οι συγγραφείς κατέληξαν στο ότι η ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών *Pediococcus* στο κρασί, πριν την μηλογαλακτική ζύμωση, μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα στη δευτερογενή ζύμωση (Lonvaud-Funel and Joyeux, 1993).

Αν και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι συχνά πολύπλοκες, πολλά είδη παράγουν αντιβακτηριακές πρωτεϊνούχες ενώσεις, που ονομάζονται βακτηριωσίνες και έχουν περιορισμένο φάσμα δράσης εναντίον στενά συγγενικών ειδών. Οι Strasser de Saad και Manca de Nadra (1993) απομόνωσαν δύο στελέχη του *P. pentasaceus*, που παρήγαγαν μια ανασταλτική ουσία, εναντίον των ειδών *Lactobacillus*, *Oenococcus*, και *Pediococcus*. Η πρωτεϊνική φύση της και η επιλεκτική δράση της ως αναστολέας υπόδειξαν ότι είναι βακτηριοσίνη.

Λόγω της αυξανόμενης αντίστασης των καταναλωτών στην υπερβολική χρήση του διοξειδίου του θείου και άλλων χημικών συντηρητικών στο κρασί, η χρήση βακτηριωσίνων ως συντηρητικών έχει δημιουργήσει ενδιαφέρον μεταξύ των ερευνητών. Σε έρευνα από τους Schoeman et al. (1999), αναπτύχθηκαν βακτηριοκτόνα στελέχη ζύμης, με την άντληση γονιδίου από τον *P. acidilactici* στον *S. cerevisiae*. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η ανάπτυξη τέτοιων βακτηριοκτόνων στελεχών μπορεί να οδηγήσει στην χρήση στελεχών *S. cerevisiae* ικανών να λειτουργούν ωφέλιμα για την αναστολή της ανάπτυξης αλλοιωγόνων βακτηρίων. Θα πρέπει να αναφερθεί όμως, ότι η τρέχων αποστροφή των καταναλωτών για την χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στα τρόφιμα σημαίνει ότι η χρήση των γενετικά τροποποιημένων ζυμών κρασιού δεν είναι επιλογή.

➤ Αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και *Saccharomyces*

Οι οινοπαραγωγοί έχουν βιώσει ‘αργή’ ή ‘φρακαρισμένη’ αλκοολική ζύμωση, προβλήματα που ίσως αποδίδονται σε ανεπαρκή θρεπτικά στοιχεία, για να υποστηρίξουν την ανάπτυξη ζυμών ή ακατάλληλες συνθήκες ζύμωσης. Επιπλέον, η ανάπτυξη λακτοβακίλλων έχει παρατηρηθεί σε μερικές από αυτές τις προβληματικές ζυμώσεις, οδηγώντας στην υπόθεση ότι η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών μπορεί να οδηγεί σε ‘φρακαρισμένη’ ζύμωση (Boulton et al., 1996). Οι Boulton et al. (1996) υπόδειξαν ότι η γρήγορη ανάπτυξη ειδών *Lactobacillus*, γνωστών και ως ‘βίαιοι’ λακτοβάκιλλοι, μπορούν να παράγουν αρκετό οξικό οξύ σε 2 με 3 μέρες ώστε να αναστείλουν τον μεταβολισμό των ζυμών.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ειδών *Saccharomyces* και του *O. oeni*, κατά την διάρκεια της οινοποίησης μπορεί να είναι διεγερτικές για τα βακτήρια ή ανασταλτικές. Ανασταλτικές αλληλεπιδράσεις έχουν αναφερθεί, όπου η βιωσιμότητα του *O. oeni* μειώθηκε από 10^5 με 10^7 cfu/mL σε μη εντοπίσιμους πληθυσμούς

σύντομα μετά τον εμβολιασμό στο κρασί (Beelman et al., 1982, Fornachon, 1968, King and Beelman, 1986, Liu and Gallander, 1983, Semon et al., 2001, Wibowo et al., 1988).

Δύο θεωρίες έχουν προταθεί για να εξηγήσουν αυτό το φαινόμενο. Πρώτον, οι πιο γρήγοροι στην ανάπτυξη *Saccharomyces* μπορεί να απορροφήσουν τις θρεπτικές ουσίες από τον μούστο (Beelman et al., 1982, Fornachon, 1968, Kunkee, 1967), διότι τα βακτήρια της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι πιο εκλεκτικά σε θρεπτικές ουσίες με πιο περίπλοκες απαιτήσεις. Απόδειξη για αυτό είναι η ταχεία πρόσληψη στερολών, αμινοξέων και βιταμινών από τις ζύμες στον μούστο (Beelman, 1982, Beelman et al., 1982, King and Beelman, 1986). Υπέρ αυτού, οι Beelman et al. (1982) απόδειξαν ότι κατά την διάρκεια της ανάπτυξης σε συνθετικό μέσο, οι ζύμες εξάντλησαν συγκεκριμένα αμινοξέα σε συγκεντρώσεις που πιθανώς δεν είναι επαρκής για την ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι καθώς οι ζύμες εισέρχονται σε φάση στασιμότητας/θανάτου, η ελευθέρωση θρεπτικών ουσιών στο κρασί θα επέτρεπε την ανάκαμψη του *O. oeni*. Επιπροσθέτως, έχει αποδειχτεί ότι η αυτόλυση των ζυμών του οίνου κατά την ωρίμανση στο ίζημα μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις αμινοξέων, πεπτιδίων, και πρωτεϊνών στο κρασί (Alexandre et al., 2001, Martinez-Rodriguez et al., 2001).

Άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι η απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών από τις ζύμες δεν εξηγεί πάντα την παρατηρούμενη αναστολή του *O. oeni*. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη συμπληρωματικών θρεπτικών ουσιών σε κρασί ζυμωμένο από τον *S. cerevisiae* στέλεχος V1116 δεν μετριάζει την παρατηρούμενη βακτηριακή αναστολή (Larsen et al., 2003). Οι Patynowski et al. (2002) κατέληξαν στο ότι η μείωση των θρεπτικών ουσιών από τον *S. cerevisiae* δεν είναι υπεύθυνη για την αναστολή ανάπτυξης των βακτηρίων. Επίσης, η έρευνα αυτή έδειξε ότι οι ζύμες παρήγαγαν έναν άγνωστο ανασταλτικό παράγοντα που σταδιακά χάνεται κατά την ωρίμανση. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η δεύτερη προτεινόμενη θεωρία, δηλαδή η παραγωγή τοξικών μεταβολιτών από τις ζύμες, μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αναστολή του *O. oeni*.

Οι *Saccharomyces* είναι γνωστοί για την παραγωγή ουσιών κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, οι οποίες λειτουργούν ανασταλτικά για τους *Oenococcus*. Αυτές περιλαμβάνουν την αιθανόλη, το SO₂ (Dott et al., 1976, Eschenbruch, 1974, Eschenbruch and Bonish, 1976, Henick-Kling and Park, 1994, Romano and Suzzi, 1993), λιπαρά οξέα και αντιβακτηριακές πρωτεΐνες και πεπτίδια (Dick et al., 1992).

Από όλες αυτές τις ουσίες, το SO₂ είναι πιο συχνά υπονοούμενο στην πρόκληση βακτηριακής αναστολής (Henick-Kling and Park, 1994, Larsen et al., 2003). Το SO₂ είναι δραστικός παράγοντας αναστολής των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Amerine et al., 1980, Liu and Gallander, 1983, Ough and Crowell, 1987).

Εκτός του ότι εσκεμμένα προστίθεται στον μούστο/κρασί από τους οινοπαραγωγούς, το SO₂ παράγεται από είδη *Saccharomyces*, κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Η παραγωγή SO₂ από τις ζύμες, συνδυαστικά με το προστιθέμενο στο κρασί/μούστο, έχει προταθεί να είναι ο κύριος μηχανισμός βακτηριακής αναστολής κατά την αλκοολική ζύμωση (Henick-Kling and Park, 1994, Larsen et al., 2003).

Οι Wibowo et al. (1988) πρότειναν ότι ο *S. cerevisiae* μπορεί να αναστέλλει το *O. oeni* μέσω της παραγωγής αντιβακτηριακών πρωτεϊνών/πεπτιδίων, και όχι μέσω της παραγωγής SO₂ και αιθανόλης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κρασιού

Η τελική οργανοληπτική ποιότητα του κρασιού είναι αποτέλεσμα ενός πλήθους αλληλεπιδράσεων μεταξύ όλων των χημικών ουσιών που υπάρχουν στο κρασί, και συγκεκριμένων περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία του κρασιού. Οι οινολογικές πρακτικές στοχεύουν αρχικά στην παραγωγή ποιοτικών σταφυλιών, που θα αντανάκλουν τα αρώματα και τις γεύσεις της ποικιλίας και/ή τα τυπικά χαρακτηριστικά μιας συγκεκριμένης περιοχής. Μετά την συγκομιδή, συγκεκριμένες τεχνικές επεξεργασίας και ζυμωτικές στρατηγικές που χρησιμοποιούνται θα καθορίσουν επιπλέον την αρωματική και γευστική ανάπτυξη του κρασιού. Η σύσταση της μικροβιακής χλωρίδας, παρούσας στον μούστο, και συγκεκριμένα τα στελέχη ζύμης και η επιλεκτική εφαρμογή της μηλογαλακτικής ζύμωσης έχουν σημαντική επίδραση (Antonelli et al., 1999, Delfini et al., 1999, Estevez et al. 2004, Regodon Mateos et al., 2006). Το τελικό άρωμα και γευστικό προφίλ είναι επιπλέον έντονα εξαρτώμενα από τις μετά-ζυμωτικές μεταχειρίσεις, όπως το φιλτράρισμα και τις στρατηγικές παλαίωσης, περιλαμβανομένης της ωρίμανσης σε ξύλινους περιέκτες.

Απαξ και το προϊόν έχει ολοκληρωθεί, η εκτίμηση του κρασιού απαιτεί διάφορες αισθήσεις: πρώτον η παρατήρηση του αρώματος και της εμφάνισης, δεύτερων η εκτίμηση του μπουκέτου, τρίτων η δοκιμή του ίδιου του κρασιού, και

τέταρτων αίσθηση στο στόμα και η επίγευση (Polaskova et al., 2008). Καταρχάς, το κρασί περιέχει έναν πολύ μεγάλο αριθμό ενεργών ενώσεων γεύσης και αρώματος. Τερπένια, εστέρες, μεθοξυπυραζίνες, και αλδεΐδες μεταδίδουν ιδιαίτερο άρωμα στο κρασί, όπως λουλουδάτο, φρουτώδες, πιπεράτο και ξυλώδες (Bloem et al., 2007, Bloem et al., 2008, Hernanz et al., 2009, Obreque-Slier et al., 2010, Park et al., 2009, Regodon Mateos et al., 2006, Ter Schure et al., 1998). Η γεύση του κρασιού μπορεί να περιγραφτεί ως γλυκιά, ξινή, αλμυρή και πικρή, και γενικά αυτές οι ιδιότητες είναι αποτέλεσμα της παρουσίας ζάχαρης, πολυόλης, άλατος, πολυφαινόλης, και φλαβονοειδών ουσιών (Ferreira et al., 2006, Mazauric & Salmon, 2005, Mendes-Ferreira et al., 2010, Obreque-Slier et al., 2010). Ενώσεις όπως η γλυκερίνη, οι πολυσακχαρίτες, και οι μαννοπρωτεΐνες συνεισφέρουν στο ιξώδες και την αίσθηση στο στόμα του κρασιού (Mateo & Jimenez, 2000, Mendes-Ferreira et al., 2010, Moreno-Arribas & Polo, 2005), οι ανθοκυανίνες στο χρώμα (Butzke & Park, 2011). Η μοναδική και μη γραμμική αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των πολυάριθμων χημικών ενώσεων καθορίζει την τελική γεύση, το άρωμα και την εκτίμηση του κρασιού (Grosch, 2001, Le Berre et al., 2007).

1. Πως η ποικιλία επηρεάζει το άρωμα και την γεύση του κρασιού.

Αν και η ολική σύσταση των περισσότερων ποικιλιών του κρασιού είναι πολύ παρόμοια, υπάρχουν καθαρές και διακριτές διαφορές στο άρωμα και την γεύση μεταξύ των περισσότερων ποικιλιών. Αυτές οι διαφορές μπορούν να αποδοθούν στις σχετικά μικρές μεταβολές της αναλογίας των ενώσεων που συνιστούν το αρωματικό προφίλ του κρασιού.

Το μονοποικιλιακό άρωμα από σταφύλια συγγενικά του μοσχάτου, για παράδειγμα, προέρχεται κυρίως λόγω της παρουσίας διάφορων ισοπρενοιδών μονοτερπενίων στο σταφύλι, με τα πιο σημαντικά να είναι η λιναλοόλη, η γερανιόλη, το νερολί, η κιτρονελλόλη (Iriti & Faoro, 2006). Τα μονοτερπένια μπορούν να βρεθούν σε ελεύθερους και άοσμους γλυκοζιτικούς δεσμούς στο σταφύλι. Η αναλογία σε ελεύθερη και δεσμευμένη μορφή αλλάζει κατά την διάρκεια ωρίμανσης, με τους ώριμους καρπούς να έχουν περισσότερες δεσμευμένες μορφές αυτών των

στοιχείων από ότι ελεύθερες μορφές (Fenoll et al., 2009, Sanchez Paloma et al., 2007).

Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, οι ζύμες μπορούν να απελευθερώσουν γλυκοσιδάσες, και αυτά τα ένζυμα μπορούν να υδρολύσουν τους γλυκοζιδικούς δεσμούς των άοσμων μορφών μονοτερπενίων, απελευθερώνοντας ενώσεις που συμβάλουν περισσότερο στο άρωμα του κρασιού (Hernandez-Orte et al., 2008, Mateo et al., 1997, Mateo & Jimenez, 2000). Μελέτες έχουν δείξει επίσης, πως η μεταχείριση 'skin contact' μπορεί σημαντικά να αυξήσει τις συγκεντρώσεις ελεύθερων και δεσμευμένων ενώσεων αρώματος (Selli et al., 2006). Έχει βρεθεί, όμως, ότι ο σχηματισμός μερικών αρωμάτων συνδεδεμένων με χαρακτήρα ποικιλίας μπορεί να είναι αναπόσπαστο κομμάτι του μεταβολισμού ζυμών, και όχι μια απλή διαδικασία υδρόλυσης (Loscos et al., 2007). Μελέτες, για παράδειγμα, δείχνουν ότι ζύμες μπορούν να συνθέσουν μερικά μονοτερπένια, στην απουσία πρόδρομων προερχόμενων από το κρασί (Carrau et al., 2005). Επιπλέον, το ζυμωτικό στέλεχος έχει δείξει να παίζει σημαντικό ρόλο στα επίπεδα των περισσότερων ενώσεων αρώματος ποικιλίας, επηρεάζοντας όλες τις οικογένειες σχηματισμένες από πρόδρομα μόρια, συμπεριλαμβανομένων των μονοτερπενίων και των C13-νορισοπρενοειδών (Hernandez-Orte et al., 2008).

Άλλο ένα σύνολο ενώσεων ποικιλιακού αρώματος, απελευθερωμένων από άοσμους πρόδρομους, είναι οι πτητικές θειόλες που δίνουν στα κρασιά Sauvignon Blanc το χαρακτηριστικό τους μπουκέτο, συγκεκριμένα οι 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one και 3-mercapto-1-hexanol. Αυτές οι ενώσεις δεν είναι παρούσες στο χυμό του κρασιού στην ενεργή τους μορφή, αλλά προκύπτουν στο μούστο ως άοσμα, μη πτητικά, δεμένα με κυστεΐνη σύμπλοκα. Οι ζύμες είναι υπεύθυνες για την αποδέσμευση της θειόλης από τον πρόδρομο τους κατά την αλκοολική ζύμωση (Swiegers & Pretorius, 2007). Ο 'τροπικός φρουτώδης' χαρακτήρας που προέρχεται από τα 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one και 3-mercapto-1-hexanol φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό εξαρτώμενος από το ζυμωτικό στέλεχος που χρησιμοποιείτε κατά την ζύμωση και την ικανότητα του να διαχωρίζει την θειόλη από τα σύμπλοκα κυστεΐνης με το ένζυμο λυάση άνθρακα-θείου (Swiegers et al., 2009).

Ακόμα μία ένωση που πρόσφατα ανακαλύφτηκε, η οποία μεταδίδει ένα χαρακτηριστικό πιπεράτο ποικιλιακό άρωμα στα Syrah κρασιά είναι το σεσκιτερπένιο rotundone. Οι ερευνητές ταυτοποίησαν την άγνωστη πιπεράτη ένωση στο άσπρο και

μαύρο πιπέρι, και βρήκαν ότι η ίδια ένωση είναι υπεύθυνη για το παρόμοιο άρωμα και γεύση σε σταφύλι και κρασί Syrah. Αυτό διάψευσε την προηγούμενη υπόθεση ότι αυτό το ποικιλιακό πιπεράτο άρωμα οφείλετε στις πολύπλοκές αλληλεπιδράσεις πολλών αρωματικών ουσιών, ή στην πιπερίνη και συγγενικά αλκαλοειδή, τα οποία μεταδίδουν μία ‘ζέστη’ στο στόμα (Siebert et al., 2008, Wood et al., 2008). Παρόλα αυτά, πολλές από τις αρωματικές και γευστικές ενώσεις που βρίσκονται στο τελικό κρασί δεν προέρχονται από το σταφύλι, αλλά περισσότερο από ουσίες που σχηματίζονται κατά τον βασικό ή δευτερογενή μεταβολισμό των ζυμών του κρασιού, κατά την αλκοολική ζύμωση.

2. Οι ζύμες επηρεάζουν τον χαρακτήρα του κρασιού με διάφορους μηχανισμούς

Οι ζύμες επηρεάζουν τις ιδιότητες του αρώματος, γεύσης και χρώματος του κρασιού με μηχανισμούς οι οποίοι εκκίνονται πέρα του απλού μεταβολισμού γλυκόλυσης των σακχάρων του μούστου, και μπορούν να θεωρηθούν οι εξής:

- Μεταβολισμός των σακχάρων του μούστου και των στοιχείων αζώτου
- Ενζυμική υδρόλυση των στοιχείων του σταφυλιού για να επιδράσουν στο άρωμα, την γεύση, το χρώμα και την διαύγεια
- Αυτόλυση
- Βίο-προσρόφηση

Ο μεταβολισμός των σακχάρων του μούστου και των αμινοξέων σε αιθανόλη και μια τεράστια ποικιλία άλλων ουσιών που επιδρούν στο άρωμα, όπως τα οργανικά οξέα, η γλυκερίνη, οι υψηλές αλκοόλες, οι εστέρες, οι αλδεΐδες, οι κετόνες, τα πτητικά θείου και αμίνης, είναι γνωστός ως η κύρια αντίδραση με την οποία οι ζύμες επιδρούν στον χαρακτήρα του κρασιού (Lambrechts & Pretorius, 2000, Swiegers et al., 2005).

Η βιοχημική μετατροπή γευστικά ανενεργών συστατικών του μούστου σε γευστικά ενεργά συστατικά έχει αναδειχτεί, τα τελευταία χρόνια, ως ένας σημαντικός, πρόσθετος μηχανισμός μέσω του οποίου οι ζύμες ουσιαστικά επηρεάζουν το άρωμα και τη γεύση του κρασιού, και διευκολύνουν την μεγαλύτερη έκφραση του ποικιλιακού χαρακτήρα του κρασιού. Από αυτές τις αντιδράσεις η απελευθέρωση των τερπενίων είναι η περισσότερο μελετημένη. Οι αλκοόλες μονοτερπενίων, όπως οι

κιτρονελλόλη, γερανιόλη, λιναλοόλη, και νερόλι προκύπτουν φυσικά στα σταφύλια, και κυρίως τις λευκές ποικιλίες, δίνοντας χαρακτηριστικά φρουτώδη, πικάντικα και φυτικά αρώματα. Όμως, μια μεγάλη αναλογία αυτών των τερπανίων του σταφυλιού είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με την γλυκόζη ή τους δισακχαρίτες γλυκόζης και άλλα σάκχαρα, όπου η δεσμευμένη μορφή δεν έχει επίδραση στη γεύση. Οι γλυκοσιδάσες, που παράγονται από τις ζύμες, σπάνε το δεσμό για να απελευθερώσουν τα πτητικά τερπένια που επιδρούν σημαντικά στον χαρακτήρα του κρασιού. Η παραγωγή γλυκοσιδασών ποικίλει ανάλογα το είδος και το στέλεχος ζύμης, αλλά υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία που προτείνουν ότι ζύμες μη σακχαρομύκητα, όπως τα είδη *Hanseniaspora*, *Debaryomyces* και *Dekkera* είναι πιο δυνατοί παραγωγοί αυτών των ενζύμων από ότι ο *S. cerevisiae* και, άρα, έχουν πιθανός σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση αρωμάτων τερπενίων (Fia et al., 2005, Maicas & Mateo, 2005, Swiegers et al., 2005, Villena et al., 2007).

Έχει καταγραφεί ότι η αυτόλυση ζυμών προσφέρει έναν μοναδικό χαρακτήρα και τιμή στις σαμπάνιες και άλλα αφρώδη κρασιά (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006), και η δυνατότητα αυτόλυσης θεωρείται σημαντική στην επιλογή στελεχών *S. cerevisiae* για την δευτερογενή ζύμωση τέτοιων κρασιών (Martinez-Rodriguez et al., 2001). Κατά την αλκοολική ζύμωση οι ζύμες αναπτύσσονται για να παράγουν σημαντικά επίπεδα κυτταρικής βιομάζας, που αποτελεί ένα μείγμα νεκρών και ζωντανών κυττάρων διαφορετικών ειδών και στελεχών. Αυτά τα κύτταρα που αποτελούνται από ζύμες σακχαρομύκητα και μη, κατακάθονται κοντά στο τέλος της ζύμωσης, για να αποτελέσουν το μεγαλύτερο μέρος του ιζήματος. Αυτή η βιομάζα δεν είναι αδρανής. Τα νεκρά κύτταρα ζύμης αυτολύονται, το οποίο είναι χαρακτηριστικό της ενζυμικής αποδόμησης των κυτταρικών πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων και της απελευθέρωσης διαλυτών μαννοπρωτεϊνών από το κυτταρικό τοίχωμα (Hernawan & Fleet, 1995, Zhao & Fleet, 2005, Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). Τα περισσότερα από αυτά τα προϊόντα έχουν επίδραση στη γεύση ή την ενισχύουν (Charpentier et al., 2004, 2005, Comuzzo et al., 2006) πράγμα που εξαρτάτε από το χρόνο επαφής του κρασιού με το κατακάθι. Οι μαννοπρωτεΐνες πιθανώς διαμορφώνουν την αντίληψη των μεταβολικών γεύσης και της ταννίτης (Feuillat, 2003, Caridi, 2007, Chalier et al., 2007). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι πεπτίδια που απελευθερώνονται κατά την αυτόλυση των ζυμών έχουν αντιοξειδωτικές και βιοενεργές ιδιότητες (Alcaide- Hidalgo et al., 2007).

Τα κύτταρα ζύμης περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα το οποίο μπορεί να αντιπροσωπεύει έως και το 30% του κυτταρικού ξηρού βάρους. Αυτό το τοίχος αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες γλυκάνης και μαννοπρωτεΐνες (Klis et al., 2006), που έχουν την ικανότητα να τροποποιήσουν την γεύση του κρασιού μέσω της βίο-προσρόφησης συστατικών του κρασιού, περιλαμβανομένων των μυκοτοξινών και μικροβιακών μεταβολιτών (Feuillat, 2003; Moruno et al., 2005, Chalier et al., 2007). Οι βίο-προσροφητικές ικανότητες των μαννοπρωτεϊνών φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικές και συμβάλουν στην κολοειδή σταθερότητα του κρασιού, μέσω της αλληλεπίδρασης με το τρυγικό οξύ και τις πρωτεΐνες του κρασιού (Caridi, 2007, Perez-Serradilla & Luque de Castro, 2008).

3. Ενώσεις αρώματος και γεύσης συνδεδεμένων με την αλκοολική ζύμωση

Το άρωμα του κρασιού είναι μια περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ πολυάριθμων πτητικών χημικών ουσιών και αυτές οι ουσίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με πολλούς τρόπους για να πετύχουν το τελικό άρωμα και γεύση. Ποσοτικά, οι μεταβολίτες που είναι άμεσα προϊόντα ή παρά-προϊόντα της γλυκόλυσης βρίσκονται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Αυτές οι ενώσεις περιλαμβάνουν την αιθανόλη, γλυκερόλη και το οξικό οξύ. Αν και συνήθως παρουσιάζουν χαμηλές τιμές ενεργότητας οσμών, η υψηλή τους συγκέντρωση τις κάνει σημαντικής επίδρασης ενώσεις. Μελέτη έχει δείξει ότι η μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης σε πρότυπο κρασί από 10% σε 9% δεν είχε επίδραση στο γευστικό και αρωματικό προφίλ. Όταν η συγκέντρωση αιθανόλης μειώθηκε περαιτέρω στο 7%, μία αισθητή αύξηση στην ένταση του φρουτώδους, λουλουδάτου και οξέος αρώματος και γεύσης παρατηρήθηκε. Όμως, όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης έπεσε στο 3% το πρότυπο κρασί δεν έμοιαζε με κρασί πια (Grosch, 2001).

Οι παγκόσμιες κλιματικές αλλαγές επηρεάζουν την άμπελο και την σύσταση του σταφυλιού, και στην τελική τα κρασιά που παράγονται. Μια από τις πιο σημαντικές επιδράσεις που παρατηρείτε στα μοντέρνα κρασιά είναι η αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης ζαχάρων στο σταφύλι (de Orduna, 2010). Αυτές οι υψηλές συγκεντρώσεις ζάχαρης δεν αυξάνουν μόνο το οσμωτικό στρες που οι ζύμες πρέπει να ανεχτούν κατά τα αρχικά στάδια της

ζύμωσης, αλλά και τα επακόλουθα επίπεδα αιθανόλης, γλυκερόλης, οξικού οξέος και των παραπροϊόντων (Bauer & Pretorius, 2000, de Orduna, 2010). Αυτά τα υψηλά επίπεδα αιθανόλης όχι μόνο επηρεάζουν δυσμενώς την αντίληψη του αρώματος και της γεύσης, π.χ. υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης βρέθηκε να αυξάνουν την αντίληψη ενός κρασιού από φρουτώδες σε ποώδες (Goldner et al., 2009), και μπορούν επίσης να αυξήσουν την αντιληπτή δριμύτητα των τανινών και την πικράδα, σκληρότητα και θερμότητα του κρασιού (Jones et al., 2008, Obrique-Slier et al., 2010), αλλά μπορούν επίσης να επηρεάσουν τον μεταβολισμό των κυττάρων ζύμης, προκαλώντας διάφορες αντιδράσεις στρες, επηρεάζοντας την παγκόσμια έκφραση γονιδίων, και αλλάζοντας την δομή της κυτταρικής μεμβράνης (Alexandre et al., 2001, Hallsworth, 1998, Jimenez & Benitez, 1987).

Η γλυκερόλη είναι το πιο σύνηθες υγρό ζυμωτικό προϊόν μετά την αιθανόλη, και αυτή η ένωση ιστορικά θεωρούντο να είναι ο κύριος συντελεστής στην ολική αίσθηση στο στόμα του κρασιού. Υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης θεωρούντο να βελτιώνουν την επιθυμητή πολυπλοκότητα στο κρασί. Συνήθως να ξηρά κρασιά περιέχουν 5 g/L γλυκερόλη (Ribereau-Gayon et al., 1998). Παρόλα αυτά, λίγη προσοχή έχει δοθεί στην αλληλεπίδραση της γλυκερόλης με διάφορες γευστικές ενώσεις και στον ρόλο που παίζει η γλυκερόλη στην δημιουργία του αρωματικού προφίλ. Προηγούμενη έρευνα με αισθητήρια ανάλυση έδειξε ότι το αντιληπτό ολικό γευστικό προφίλ πρότυπου κρασιού και λευκού κρασιού δεν άλλαξε από την προσθήκη γλυκερόλης, υποδεικνύοντας ότι η γλυκερόλη δεν παίζει ρόλο στον καθορισμό του μπουκέτου του κρασιού (Nieuwoudt et al., 2002). Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα προτείνουν ότι παρότι στατιστική συσχέτιση δεν υπάρχει μεταξύ της συγκέντρωσης της γλυκερόλης και της ποιότητας κόκκινου οίνου, η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της γλυκερόλης και της αντιληπτής ποιότητας όλων των στυλ λευκού κρασιού είναι στατιστικά σημαντική (Nieuwoudt et al., 2002).

Η ακεταλδεΐδη είναι επίσης μια σημαντική αρωματική ένωση σχηματιζόμενη από το πυροσταφυλικό κατά την οινοποίηση και συνιστά περισσότερο από το 90% του ολικού περιεχομένου του κρασιού σε αλδεΐδη (Nykanin, 1986). Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα ακεταλδεΐδης φτάνουν στο μέγιστο όταν ο ρυθμός της ζύμωσης είναι στο ταχύτερο σημείο του, και μειώνεται προς το τέλος της ζύμωσης, μόνο για να αυξηθεί λίγο ξανά αργότερα (Lambrechts & Pretorius, 2000). Σε χαμηλά επίπεδα αυτή η ένωση μεταδίδει ένα ευχάριστο φρουτώδες άρωμα στο κρασί και άλλα ποτά, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μετατρέπεται σε ένα διαπεραστικό ενοχλητικό άρωμα που

θυμίζει πράσινο γρασίδι ή μήλο (Liu & Pilone, 2000). Η ακεταλδεΐδη είναι επίσης έντονα αντιδραστική και εύκολα δένεται με πρωτεΐνες ή μεμονωμένα αμινοξέα για να παράγει ένα μεγάλο εύρος αρωματικών και γευστικών ενώσεων (Lachenmeier & Sohnius, 2008).

Μια σημαντική ουσία που σχηματίζεται από την ακεταλδεΐδη είναι το διακετύλιο. Το διακετύλιο σχηματίζεται κυρίως από το οξυγαλακτικά βακτήρια κατά την μηλογαλακτική ζύμωση, αλλά και οι ζύμες είναι ικανές να συνθέσουν αυτή την ένωση κατά την αλκοολική ζύμωση. Όμως, το περισσότερο διακετύλιο μεταβολίζεται περαιτέρω σε ακετυλομεθυλοκαρβινόλη και 2,3-βουτανοδιόλη (Bartowsky & Henschke, 2004). Το διακετύλιο σε χαμηλές συγκεντρώσεις (οριακή τιμή 8mg/L) προσθέτει άρωμα ζύμης, καρπών και ψησίματος στο κρασί, αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις έχει ένα χαρακτηριστικό βουτυράτο άρωμα (Bartowsky & Henschke, 2004, Romano & Suzzi, 1996]. Αυτή η ένωση είναι έντονα αντιδραστική και έχει βρεθεί να αντιδρά με κυστεΐνη, σχηματίζοντας θειώδης ενώσεις που μπορούν να επηρεάσουν το άρωμα του κρασιού (Almy & De Revel, 2008). Η ακετυλομεθυλοκαρβινόλη και 2,3-βουτανοδιόλη δεν έχουν δυνατό άρωμα, με το κατώφλι αντίληψης τους στο κρασί να είναι περίπου 150 mg/L (Romano & Suzzi, 1996).

4. Ενώσεις γέυσης και αρώματος συνδεδεμένες με τον μεταβολισμό των αμινοξέων

Κατά την αλκοολική ζύμωση, οι ζύμες μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα αμινοξέα με πολλούς τρόπους, ιδιαίτερα για την σύνθεση πρωτεϊνών, ή άλλες μεταβολικές διαδικασίες (Bauer & Pretorius, 2000). Έρευνες έχουν δείξει ότι οι περισσότεροι μούστοι περιέχουν ανεπαρκή ποσά θρεπτικών ουσιών για τις ζύμες, ειδικά αφομοιώσιμο άζωτο. Τέτοιες ανεπάρκειες θεωρούνται οι κύριες αιτίες ‘φρακαρισμένης’ και αργής ζύμωσης, και η παροχή αζώτου στον μούστο έχει γίνει μια κοινή πρακτική (Vilanova et al., 2007).

Η σύσταση του αζώτου στο μούστο επηρεάζει όχι μόνο την κινητική της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά και την παραγωγή αρωματικών ενώσεων, αιθανόλης και γλυκερόλης (Hernandez-Orte et al., 2005). Έχει υποδειχτεί ότι το ποικιλιακό άρωμα συγκεκριμένων ποικιλιών μπορεί μερικώς να εξηγηθεί από την σύσταση των

αμινοξέων του μούστου (Hernandez-Orte et al., 2002). Οι δύο κύριες πηγές αφομοιώσιμου αζώτου από τις ζύμες είναι τα βασικά αμινοξέα και το αμμώνιο (Hernandez-Orte et al., 2005). Αν και τα στελέχη ζυμών διαφέρουν σημαντικά στην ικανότητα τους να χρησιμοποιούν το άζωτο και τα αμινοξέα (Carrau et al., 2008), μελέτες έχουν δείξει ότι η παροχή αζώτου σε αφομοιώσιμη μορφή και αμινοξέων επηρεάζει το πτητικό αρωματικό προφίλ του κρασιού (Garde-Cerdan & Ancin-Azpilicueta, 2008, Hernandez-Orte et al., 2006, Jimenez-Marti et al., 2007, Vilanova et al., 2007).

Οι πιο σημαντικές αρωματικές και γευστικές ενώσεις που σχηματίζονται από αμινοξέα είναι οι ανώτερες αλκοόλες και οι συνδεδεμένοι με αυτές εστέρες και πτητικά οξέα. Οι σημαντικές αυτές ουσίες παράγονται από την βάλινη, την λευκίνη και την ισολευκίνη (Gustav Styger et al., 2011).

Ακόμα ένα αμινοξύ, η κυστεΐνη, μπορεί να σχηματίσει διάφορες ενώσεις που επιδρούν στο άρωμα, μέσω την αντίδρασης Maillard, στην οποία μια χημική αντίδραση μεταξύ των αμινοξέων και καρβονυλίων λαμβάνει χώρα και σχηματίζονται καινούργιες ενώσεις (Gustav Styger et al., 2011).

5. Άλλες ενώσεις αρώματος και γεύσης

Οι πτητικοί εστέρες αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες αρωματικών ενώσεων και είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για το φρουτώδες άρωμα συνδεδεμένο με το κρασί και άλλα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση (Lilly et al., 2000). Η ελεύθερη ενζύμων δημιουργία εστέρων είναι μια αντίδραση ισορροπίας μεταξύ μιας αλκοόλης και ενός οξέος. Παρόλα αυτά, αυτός ο τρόπος δημιουργίας εστέρων είναι πολύ αργός για να εξηγήσει τα μεγάλα ποσά εστέρων που βρίσκονται συνήθως στο κρασί (Lambrechts & Pretorius, 2000). Συνεπώς, ο ενζυμικός σχηματισμός εστέρων αναγνωρίστηκε ως η αρχική ενεργοποίηση του οξέος, με τον συνδυασμό του με το συνένζυμο A (CoA), πριν την αντίδραση με την αλκοόλη για τον σχηματισμό ενός εστέρα (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Τα πτητικά λιπαρά οξέα επίσης συμβάλουν στο άρωμα και την γεύση του κρασιού. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης πολλά μέτριας και μακράς αλύσου λιπαρά οξέα σχηματίζονται μέσω του μονοπατιού σύνθεσης λιπαρών οξέων από το ακετυλό-CoA (Nykanin, 1986).

Κατά την ζύμωση ο *S. cerevisiae* δεν είναι ο μόνος μικροοργανισμός που μπορεί να συμβάλει στο άρωμα και την γεύση του κρασιού. Οι αυθόρμητες ζυμώσεις περιλαμβάνουν πολλά είδη μη σακχαρομύκητα και μερικά μπορούν να προσδώσουν νέα αρώματα στο κρασί λόγω της παραγωγής ενζύμων, που είτε είναι απών από τον *S. cerevisiae* είτε παράγονται σε πολύ χαμηλά ποσοστά (Mendes Ferreira et al., 2001). Μερικά από τα σημαντικότερα είδη μη σακχαρομύκητα, που συμβάλουν στην ζύμωση του κρασιού, περιλαμβάνουν αυτά από τα ακόλουθα γένη: *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Brettanomyces*, *Saccharomycodes*, *Pichia*, και *Williopsis* (Jolly et al., 2005). Έρευνες έχουν δείξει ότι μικρής κλίμακας ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με αποκλειστικά ένα στέλεχος των *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Candida pulcherrima*, και *Candida colliculosa* δεν ήταν ικανά να ολοκληρώσουν την ζύμωση. Μεγάλα ποσοστά κατάλοιπου ζάχαρης υπήρξαν και αυτά τα κρασιά ήταν σημαντικά διαφορετικά από αυτά που παράγονται από βιομηχανικά στελέχη ζύμης (Jolly et al., 2003). Αυτές οι ζύμες μη σακχαρομύκητα μπορεί επίσης να παράγουν ενώσεις που επιδρούν αρνητικά στο άρωμα και την γεύση του κρασιού. Οι τετραϋδροπυριδίνες και η 4-αιθυλόφαινόλη μπορούν να σχηματιστούν από τα είδη *Brettanomyces* και να προσδώσουν ένα μη ευχάριστο χαρακτηριστικό στο κρασί που θυμίζει φάρμακο (Jolly et al., 2005). Παρόλα αυτά, υπάρχει τελευταία μία τάση για την χρήση των αποκαλούμενων μικτής καλλιέργειας εκκινήτων, που περιλαμβάνουν μία ή περισσότερες ζύμες μη σακχαρομύκητα, όπως και μία καθιερωμένη βιομηχανική ζύμη *S. cerevisiae*. Αυτή η μικτή χρήση διαφορετικών ειδών δεν οδηγεί μόνο στον σχηματισμό νέων αρωματικών και γευστικών ενώσεων, αλλά οι ζύμες μπορούν να δρουν συνεργατικά η μια με την άλλη, προσθέτοντας άλλο επίπεδο πολυπλοκότητας (Ciani et al., 2010, Viana et al., 2008).

6. Ενώσεις γεύσεις και αρώματος σχηματισμένες από την μηλογαλακτική ζύμωση

Μετά την αλκοολική ζύμωση, μερικά κρασιά μπορούν να υποβληθούν στη μηλογαλακτική ζύμωση. Αυτή η βιολογική διαδικασία είναι ιδιαίτερα επιθυμητή σε υψηλής οξύτητας κρασιά παραγόμενα σε περιοχές κρύου κλίματος, καθώς η μηλογαλακτική ζύμωση περιλαμβάνει την μείωση της οξύτητας του κρασιού. Αυτή η

διαδικασία φυσιολογικά πραγματοποιείται από οξυγαλακτικά βακτήρια που απομονώνονται από το κρασί (Liu, 2002). Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι επίσης σημαντική σε μερικά κρασιά από πιο θερμές περιοχές γιατί αλλάζει την σύσταση του κρασιού και βελτιώνει την οργανοληπτική του ποιότητα. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η βακτηριακή δραστηριότητα παίζει ρόλο στην σταθεροποίηση του κρασιού και εξασφαλίζει μια ενίσχυση της αρωματικής του σύστασης (Moreno-Arribas & Polo, 2005).

Κατά την μηλογαλακτική ζύμωση τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να επηρεάσουν το άρωμα και την γεύση του κρασιού παράγοντας πτητικούς μεταβολίτες και τροποποιώντας τις αρωματικές ενώσεις που προέρχονται από το σταφύλι και τις ζύμες. Παρόμοια με τον ρόλο που παίζουν οι ζύμες στον σχηματισμό αρωμάτων, η επίδραση αυτών των βακτηρίων εξαρτάται από το στέλεχος και μπορεί να ποικίλει σημαντικά (Boido et al., 2009). Γενικά έχει βρεθεί ότι η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να ενισχύσει το φρουτώδες άρωμα και την βουτυράτη νότα, αλλά να μειώσει το φυτικό, πράσινο/ χορτώδες άρωμα. Επιπλέον, αρωματικά χαρακτηριστικά που καταλογίζονται σε κρασιά που έχουν υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση περιλαμβάνουν λουλουδάτο, καρπώδες, δρύινο, πικάντικο, ψημένο, ή άρωμα που θυμίζει βανίλια, καπνό, γήινο και μέλι. Εκτός του αρώματος, η μηλογαλακτική ζύμωση πιστεύεται να αυξάνει το σώμα και την αίσθηση του κρασιού στο στόμα και να δίνει μια μεγαλύτερη επίγευση (Liu, 2002).

Πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν καταλυτικά ένζυμα ικανά να απελευθερώσουν αρωματικές ενώσεις, που προέρχονται από το σταφύλι, από την φυσική μη αρωματική γλυκοζυλιωμένη τους κατάσταση (Grimaldi et al., 2005). Μερικά από αυτά τα ένζυμα είναι β- γλυκοσιδάσες, πρωτεάσες, εστεράσες, κιτρικές λυάσες, και φαινολικού οξέος αποκαρβοξυλάσες. Όλες αυτές οι ομάδες ενζύμων μπορούν πιθανώς να υδρολύσουν αρωματικούς πρόδρομους και άρα να επηρεάσουν το άρωμα του κρασιού (Ben-Yosef et al., 1998, Mtshali et al., 2010, Ugliano et al., 2003).

Πτητικές ενώσεις του ξύλου είναι πιο συγκεντρωμένες στο κρασί μετά την μηλογαλακτική ζύμωση από ότι σε κρασί στο οποίο δεν έχει υπάρξει βακτηριακή ανάπτυξη (de Revel et al., 1999). Μία από τις ενώσεις υπεύθυνες για την διαφορά αυτή είναι η βανιλίνη, η οποία δίνει στο κρασί ένα ισχυρό χαρακτηριστικό άρωμα. Αυτό δείχνει ότι πρόδρομος της βανιλίνης απελευθερωμένος στο κρασί σε επαφή με

το ξύλο μπορεί να τροποποιείτε από την δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων (de Revel et al., 2005).

Η μετατροπή απλών φαινολικών ενώσεων (φελουρικό οξύ, ευγενόλη, ισοευγενόλη και βανιλλικό οξύ) σε βανιλίνη χαρακτηρίζει ευρέως τους μικροοργανισμούς (Priefert et al., 2001). Κατά την μηλογαλακτική ζύμωση με παρουσία του *O. oeni*, αυτοί οι φαινολικοί πρόδρομοι παράγουν βανιλίνη σε μικρά ποσοστά, τα οποία δεν μπορούν να εξηγήσουν την συγκέντρωση της μετά την ζύμωση (Bloem et al., 2005). Η ικανότητα του *O. oeni* να υδρολύει γλυκοζυλιωμένες ενώσεις σε δρύινο ξύλο φάνηκε. Αυτό εξηγεί την δραματική αύξηση σε άρωμα, ειδικά βανιλίνης, όταν η μηλογαλακτική ζύμωση διεξάγεται σε δρύινα βαρέλια. Σχεδόν όλα τα στελέχη έχουν ενζυμικά υλικά για να υδρολύσουν αυτούς τους δεσμούς, αλλά οι δράσεις φαίνεται να εξαρτώνται από τα στελέχη. Αυτά τα ευρήματα επαναλαμβάνουν την σημαντικότητα της επιλογής στελεχών όταν εξετάζεται η επιρροή του *O. oeni* στην έκφραση 'ξύλδους' προφίλ στα κρασιά (Audrey et al., 2008)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν επίσης να παράγουν ή να μειώσουν τις αρωματικές επίδρασης ενώσεις, μέσω του δικού τους μεταβολισμού. Πιστεύεται ότι το ενισχυμένο φρουτώδες άρωμα κρασιών που έχουν υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση οφείλεται στο σχηματισμό εστέρων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Liu, 2002). Στοιχεία υποδεικνύουν ότι αιθυλεστέρες, όπως οι οξεικός αιθυλεστέρας, γαλακτικός αιθυλεστέρας, εξανικός αιθυλεστέρας και οκτανικός αιθυλεστέρας σχηματίζονται κατά την μηλογαλακτική ζύμωση (de Revel et al., 1999). Κατά την αποθήκευση του κρασιού, έχει παρατηρηθεί ότι οι συγκεντρώσεις συγκεκριμένων εστέρων αυξάνονται, ενώ αυτές άλλων μειώνονται. Αυτό πιστεύεται να οφείλεται στην όξινη υδρόλυση και την χημική εστεροποίηση (Liu, 2002). Η συγκέντρωση της ακεταλδεύδης, η οποία είναι σημαντική όσον αφορά το άρωμα, μπορεί να επηρεαστεί από τον μεταβολισμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Έχει αποδειχτεί ότι μερικά είδη, ειδικά ο *O. oeni*, μπορούν να καταβολίσουν αυτή την ένωση, έχοντας ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό αιθανόλης και οξικού οξέος, με μια επακόλουθη μείωση του φυτικού, πράσινου/ χορτώδους αρώματος σε μερικά κρασιά (Liu, 2002).

Όμως, η πιο σημαντική επίδραση που έχει η μηλογαλακτική ζύμωση στο κρασί είναι το αυξημένο βουτυράτο άρωμα σε μερικά κρασιά. Αυτό είναι κυρίως το αποτέλεσμα της παραγωγής ενώσεων καρβονυλίου και ακετόνης, περιλαμβανομένου του διακετυλίου, της ακετυλομεθυλόκαρβινόλης, και της 2,3-βουτανοδιόλης, από τον

μεταβολισμό του κιτρικού οξέος (Moreno-Arribas & Polo, 2005). Ακόμα μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι ο *O. oeni* μπορεί να μεταβολίσει το αμινοξί μεθειονίνη, έχοντας ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενώσεων επίδρασης στο άρωμα και τη γεύση που περιέχουν θείο, όπως οι μεθανοθειόλη, διθειούχο μεθύλιο και μεθειονικό 3-προπιονικό οξύ (Moreno-Arribas & Polo, 2005).

7. Ενώσεις γεύσης και αρώματος σχηματισμένες κατά την ωρίμανση και παλαίωση

Το κρασί είναι ένα δυναμικό προϊόν το οποίο υποβάλλεται σε μια περίοδο ωρίμανσης ή παλαίωσης, όταν βρίσκεται σε μπουκάλι ή δρύινα βαρέλια. Γενικά, η ωρίμανση του κρασιού οδηγεί σε απώλεια των χαρακτηριστικών αρωμάτων συνδεδεμένων με την ποικιλία του σταφυλιού και την ζύμωση, και στην δημιουργία νέων αρωμάτων παλαιωμένων κρασιών ή αρωμάτων συνδεδεμένων με την υποβάθμιση του κρασιού (Hernanz et al., 2009, Lambropoulus & Roussis, 2007). Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις των αιθυλεστέρων και των διακλαδισμένης αλύσου λιπαρών οξέων αλλάζουν κατά την ωρίμανση (Diaz-Maroto et al., 2005), και η ωρίμανση των κρασιών πάνω σε προϊόντα καθίζησης (κυρίως κατάλοιπα των κυττάρων ζύμης) βρέθηκε να μειώνει τις συγκεντρώσεις πτητικών ενώσεων, που μεταδίδουν φρουτώδες άρωμα, και αυξάνουν τις μακράς αλύσου αλκοόλες και τα πτητικά λιπαρά οξέα (Perez-Seradilla et al., 2008). Περιέργως, βρέθηκε ότι τα προϊόντα καθίζησης μπορούν να απομακρύνουν μερικές ανεπιθύμητες πτητικές φαινόλες του κρασιού, λόγω της φυσικής τους ικανότητας προσρόφησης (Chassagne et al., 2005, Mazauric & Salmon, 2005).

Για να σχηματιστούν κατάλοιπα καθίζησης, πρέπει πρώτα τα κύτταρα της ζύμης να υποβληθούν στη διαδικασία της αυτόλυσης. Αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως η υδρόλυση ενδοκυτταρικών μορίων σε μικρότερου μοριακού βάρους στοιχεία, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (Martinez-Rodriguez et al., 2001). Η αυτόλυση είναι μια αργή, πολύπλοκη διαδικασία που μπορεί να προκληθεί από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η ενεργοποίηση ενζύμων λύσης κυττάρου. Σε μεγάλο βαθμό αυτή η διαδικασία φαίνεται να εξαρτάται από το στέλεχος (Martinez-Rodriguez & Polo, 2000). Η αυτόλυση είναι σημαντική στην οινοποίηση, διότι όταν τα κύτταρα λύνονται απελευθερώνουν διάφορα κυτταρικά στοιχεία στο κρασί. Κάποια

από αυτά τα στοιχεία μπορεί να περιέχουν άζωτο, αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες (Martinez-Rodriguez et al., 2002, Martinez-Rodriguez et al., 2001). Μία ενδιαφέρουσα μορφή των στοιχείων αυτών είναι οι μαννοπρωτεΐνες. Αυτές είναι πρωτεΐνες συνδεδεμένες με το κυτταρικό τοίχωμα, οι οποίες όταν απελευθερώνονται στο κρασί παίζουν ρόλο στην προστασία εναντίον του σχηματισμού θολώματος, όπως και στην σταθεροποίηση του χρώματος (Comuzzo et al., 2006, Dupin et al., 2000). Λιπίδια επίσης απελευθερώνονται κατά την αυτόλυση, και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα τους αυξάνουν τα πτητικά στοιχεία όπως οι εστέρες, οι αλδεΐδες και οι κετόνες, οπότε επιδρούν στο άρωμα και τη γεύση του κρασιού (Pueyo et al., 2000).

Επιπλέον, τα δομικά χαρακτηριστικά του ξύλου, συγκεκριμένα οι ίνες, το πορώδες, η διαπερατότητα και η χημική του σύσταση, περιλαμβανομένων των πολυφαινόλων, των ταννινών και των πτητικών ενώσεων, μπορούν να επηρεάσουν την περίπλοκη βιοχημική διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά την οξειδωτική ωρίμανση του κρασιού σε βαρέλια, αλλάζοντας την σύσταση του κρασιού και προσθέτοντας σταθερότητα. Η απλή εκχύλιση αρωματικών ενώσεων (πτητικά και πολυφαινόλες) και ταννινών από το ξύλο μπορεί να προσθέσει ένταση και πολυπλοκότητα στη γεύση και το άρωμα του κρασιού (Cadahia et al., 2009, Ferreira et al., 2006, Jarauta et al., 2005).

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά να αναφερθεί ότι η παραγωγή κρασιού συμβαίνει κάτω από μη αποστειρωμένες συνθήκες και άρα περιλαμβάνει την δραστηριότητα πολλών και διαφορετικών μικροβιακών ειδών, οι οποίοι κατά κύριο λόγο ακολουθούν έναν κύκλο ανάπτυξης. Ξεκινώντας, στις πρώτες μέρες της ζύμωσης, έχουμε τις γηγενής ζύμες, οι οποίες έχουν κατηγορηθεί ότι προκαλούν αλλοιώσεις. Όμως, μελέτες έχουν αναφέρει την ικανότητα τους να συμβάλουν θετικά στο κρασί, με την παραγωγή επιθυμητών ουσιών, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες και συνδυαστικά με τον *Saccharomyces cerevisiae*. Ο *S. cerevisiae* είναι ο κυρίαρχος της αλκοολικής ζύμωσης και αυτός που την φέρνει εις πέρας, καθώς είναι ανθεκτικός στις αντίξοες συνθήκες που επικρατούν στην οινοποίηση. Παρόλα αυτά, οι αλληλεπιδράσεις των ζυμών μη σακχαρομύκητα με τον *S. cerevisiae* δεν είναι ξεκάθαρες και εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία.

Ο κύκλος ανάπτυξης συνεχίζει με τα βακτηριακά είδη που τυχόν υπάρχουν στο κρασί, και έχουν καταφέρει να επιζήσουν την αλκοολική ζύμωση. Πολλά από αυτά είναι ανεπιθύμητα, λόγω ουσιών που παράγουν, αλλοιώνοντας το κρασί (π.χ. βακτήρια του οξικού οξέος). Άλλα όμως, όπως ο *O.oeni*, παίζουν σημαντικό ρόλο για την εκτέλεση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αυτή η ζύμωση συμβάλει στην μείωση της οξύτητας, την ανάδειξη αρωμάτων στο κρασί κ.α. Αυτός ο κύκλος ανάπτυξης των μικροοργανισμών στην οινοποίηση παίζει καθοριστικό ρόλο στο τελικό προϊόν, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του.

Βιβλιογραφία

1. Albergaria & Arneborg, 2016, Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions, *Appl Microbiol Biotechnol*, 100:2035–2046
2. Albergaria H (2007) Physiological studies of non-*Saccharomyces* wine related strains in single and mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D. thesis, Catholic University of Portugal
3. Albergaria H, Francisco D, Gori K, Arneborg N, Gírio F (2010) *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related
4. Albergaria H, Torrão AR, Hogg T, Gírio FM (2003) Physiological behavior of *Hanseniaspora guilliermondii* in aerobic glucose-limited continuous cultures. *FEMS Yeast Res* 3:211–216.
5. Alcaide-Hidalgo JM, Pueyo E, Polo MC & Martinez- Rodriguez AJ (2007) Bioactive peptides released from *Saccharomyces cerevisiae* under accelerated autolysis in a wine model system. *J Food Sci* 72: M276–M279.
6. Alexandre H & Guilloux-Benatier M (2006) Yeast autolysis in sparkling wine – a review. *Aust J Grape Wine Res* 12: 119–217
7. Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, Blondin B (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 498:98–103
8. Alexandre, H., Heintz, D., Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Charpentier, C., and Feuillat, M. 2001. Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 26, 235–240.
9. Aline Lonvaud-Funel, Gilles de Revel (2008) Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*, *Food Microbiology* 25, 99–104
10. Almy J, De Revel G (2008) Approaches to wine aroma: C1 transfer during the reaction between diacetyl and cysteine. *Ann NY Acad Sci* 1126:216–219
11. Amerine MA & Cruess WV (1960) *The Technology of Winemaking*. The AVI Publishing Company Inc., Connecticut.
12. Amerine, M.A. and Kunkee, R.E. 1968. *Microbiology of winemaking*. *Annu. Rev. Microbiol.* 22, 323–358.
13. Amerine, M.A., Berg, H.W., Kunkee, R.E., Ough, C.S., Singleton, V.L., και Webb, A.D. 1980. “*Technology of Wine Making*”. AVI Publishing, CT.
14. Anfang N, Brajkovich M & Goddard MR (2009) Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Savignon Blanc. *Aust J Grape Wine R* 15: 1–8.
15. Antonelli A, Castellari L, Zambonelli C, Carnacini A (1999) Yeast influence on volatile composition of wines. *J Agric Food Chem* 47:1139–1144
16. Arroyo-López F, Salvadó Z, Tronchoni J, Guillamón JM, Barrio E, Querol A (2010) Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast* 27:1005–1015.
17. Barre P & Vezinhet F (1984) Evaluation towards fermentation with pure culture of yeasts in winemaking. *Microbiol Sci* 1: 159–163.
18. Bartowsky E, Henschke P (2004) The ‘buttery’ attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. *Int J Food Microbiol* 96:235–252
19. Bauer FF, Pretorius IS (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine. *S Afr J Enol Vitic* 21:27–51
20. Beelman, R.B. 1982. Development and utilization of starter cultures to induce malolactic fermentation in red table wines. In “*Proceedings of the U.C.D Grape and Wine Centennial*” (A.D. Webb, ed.), pp. 109–117. University of California, Davis, CA.
21. Beelman, R.B., Keen, R.M., Banner, M.J., and King, S.W. 1982. Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Develop. Indust. Microbiol.* 23, 107–121.

22. Beltran G, Torija MJ, Novo M, Ferrer N, Poblet M, Guillamon JM, Rozes N, Mas A (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst Appl Microbiol* 25: 287–293.
23. Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarede I & Dubourdieu D (2008) Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* 122: 312–320.
24. Benda I (1982) Wine and brandy. Prescott Dunn's Industrial Microbiology, 4th edn (Reed G, ed), pp. 293–402. AVI Publishing Co., Connecticut
25. Ben-Yosef T, Eden A, Benvenisty N (1998) Characterization of murine BCAT genes: Bcat1, a c-Myc target, and its homolog, Bcat2. *Mamm Genome* 9:595–597
26. Bisson LF & Kunkee RE (1993) Microbial interactions during wine production. *Mixed Cultures in Biotechnology* (Zeikus JG & Johnson EA, eds), pp. 37–68. McGraw-Hill, New York, NY.
27. Bisson LF (1993) Yeasts—metabolism of sugars. In: Fleet GH (ed) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp 55–77
28. Bisson LF (1999) Stuck and sluggish fermentations. *Am J Enol Vitic* 50: 107–119
29. Bloem A, Bertrand A, Lonvaud-Funel A, de Revel G (2007) Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol* 44:62–67
30. Bloem A, Lonvaud-Funel A, de Revel G (2008) Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol* 25:99–104
31. Bloem, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., de Revel, G., 2005. Vanillin production from simple phenols by wine associated lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 22 (6), 569–575.
32. Boido E, Medina K, Farina L, Carrau F, Versini G, Dellacassa E (2009) The effect of bacterial strain and aging on the secondary volatile metabolites produced during malolactic fermentation of Tannat red wine. *J Agric Food Chem* 57:6271–6278
33. Bouix M, Leveau YJ & Cuinier C (1981) Determination de l'origine des levures de vinification, par une methode de differentiation fine des souches. *Conn Vigne Vin* 16: 15–32.
34. Boulton B, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE (1996) Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In: Boulton B, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE (eds) *Principles and practices of winemaking*. Chapman and Hall, New York, pp 102–192
35. Branco P, Francisco D, Chambon C, Hébraud M, Arneborg N, Almeida MG, Caldeira J, Albergaria H (2014) Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:843–853.
36. Branco P, Viana T, Albergaria H, Arneborg N (2015) Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *Int J Food Microbiol* 205:112–118.
37. Brandam C, Lai QP, Julien-Ortiz A, Taillandier P (2013) Influence of oxygen on alcoholic fermentation by a wine strain of *Torulaspora delbrueckii*: kinetics and carbon mass balance. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:1848–1853.
38. Butzke C, Park SK (2011) Impact of fermentation rate changes on potential hydrogen sulfide concentrations in wine. *J Microbiol Biotech* 21:519–524
39. Cabrera MI, Moreno J, Ortega JM & Medina G (1988) Formation of ethanol, higher alcohols, esters and terpenes by five yeast strains in musts of Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *Am J Enol Viticult* 39: 283–289.
40. Cadahia E, Fernandez de Simon B, Sanz M, Poveda P, Colio J (2009) Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from DO Navarra aged in Spanish and French oak barrels. *Food Chem* 115:639–649
41. Campo G, Berregi I, Santos JI, Duenas M, Irastorza A, 2008, Development of alcoholic and malolactic fermentations in highly acidic and phenolic apple musts. *Bioresour Technol*, 2857–2863
42. Caridi A (2007) New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption capacity. *Int J Food Microbiol* 120: 167–172.
43. Carr, F.J., Chill, D., and Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 281–370.
44. Carrau F, Medina K, Boido E, Farina L, Gaggero C, Dellacassa E, Versini G, Henschke P (2005) De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 243:107–115
45. Carrau F, Medina K, Farina L, Boido E, Henschke P, Dellacassa E (2008) Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res* 8:1196–1207

46. Castelli T (1954) Les agents de la fermentation vinaire. *Arch Mikrobiol* 23: 323–342.
47. Chalfan, Y., Goldberg, I., and Mateles, R.I. (1977) Isolation and characterization of malo-lactic bacteria from Israeli red wines. *J. Food Sci.* 42, 939–943.
48. Chalier P, Angot B, Delteil D, Doco T & Gunata Z (2007) Interactions between aroma compounds and whole mannoproteins isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem* 100: 22–30.
49. Chambers & Pretorius (2010), *Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research*, EMBO reports VOL 11, NO 12
50. Charoenchai C, Fleet GH, Henschke PA (1998) Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *Am J Enol Vitic* 49:283–288
51. Charoenchai C, Fleet GH, Henschke PA, Todd BEN (1997) Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust J Grape Wine Res* 3:2–8.
52. Charpentier C, Aussenac J, Charpentier M, Prome JC, Duteurtre B & Feuillat M (2005) Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. *J Agric Food Chem* 53: 3000–3007.
53. Charpentier C, Dos Santos AM & Feuillat M (2004) Release of macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* during ageing of French flor sherry wine “vin jaune”. *Int J Food Microbiol* 96: 253–262.
54. Chassagne D, Guilloux-Benatier M, Alexandre H, Voilley A (2005) Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chem* 91:39–44
55. Chatonnet P, Duboudieu D & Boidron JN (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am J Enol Viticult* 46: 463–468.
56. Ciani M & Ferraro L (1996) Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl Environ Microb* 62: 128–132.
57. Ciani M & Ferraro L (1998) Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J Appl Microbiol* 85: 247–254.
58. Ciani M & Rosini G (1993) Vinificazioni industriali in ‘purezza microbiologica’: Partecipazione della coltura starter al processo fermentativo. *Industrie delle bevande* 22: 202–206.
59. Ciani M (1997) Role, enological properties and potential biotechnological use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Recent Research Developments in Microbiology*, Vol. 1. (Pandalai SG, ed), pp. 317–331. Research Signpost, Trivandrum, India.
60. Ciani M, Beco L & Comitini F (2006) Fermentation behavior and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int J Food Microbiol* 108: 239–245.
61. Ciani M, Comitini F (2006) Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behaviour of *Candida stellata* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* 22:619–623
62. Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* 10:123–133
63. Ciani M, Ferraro L, Fatichenti F (2000) Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme Microb Technol* 27:698–703.
64. Ciani M, Francesca Comitini, Ilaria Mannazzu & Paola Domizio (2010), Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking, *FEMS Yeast Res* 10, 123–133
65. Ciani M, Maccarelli F (1998) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J Microbiol Biotechnol* 14:199–203.
66. Ciani M, Picciotti G (1995) The growth-kinetics and fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnol Lett* 17:1247–1250
67. Cöcaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubiere, P., and Lindley, N.D. 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Ant. van Leeuwen.* 70, 253–267.
68. Cogan, T.M. and Jordan, K.N. 1994. Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J. Dairy Sci.*, 2704–2717.
69. Comuzzo P, Tat L, Tonizzo A, Battistutta F (2006) Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chem* 99:217–230
70. Constantí M, Reguant C, Poblet M, Zamora F, Mas A, Guillamón JM (1998) Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int J Food Microbiol* 41:169–175.
71. Costello PJ, Morrison RH, Lee RH, Fleet GH, 1983, Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification, *Food Technol Aust*, 14–18

72. Costello, P.J. and Henschke, P.A. 2002. Mousy off-flavor of wine: Precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176, *J. Agric. Food Chem.*, 7079–7087.
73. Davis CR, Wibowo D, Eschenbruch R, Lee TH, Fleet GH, 1985, Practical implications of malolactic fermentation in wine, *J Appl Bacteriol*, 513–521
74. Davis CR, Wibowo DJ, Lee TH, Fleet GH, 1986a, Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH, *Appl Environ Microbiol*, 539–545
75. Davis, C.R., Wibowo, D., Fleet, G.H., and Lee, T.H. 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: Their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 137–142.
76. Davis, C.R., Wibowo, D.J., Lee, T.H., and Fleet, G.H. 1986b. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 38, 35–40.
77. de Orduna RM (2010) Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res Int* 43:1844–1855
78. de Revel G, Martin N, Pripis-Nicolau L, Lonvaud-Funel A, Bertrand A (1999) Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J Agric Food Chem* 47:4003–4008
79. de Revel, G., Bloem, A., Augustin, M., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A., 2005. Interaction of *Oenococcus oeni* and oak wood compounds. *Food Microbiol.* 22, 569–575.
80. Delaquis, P., CliV, M., King, M., Girard, B., Hall, J., and Reynolds, A. 2000. Effect of two commercial malolactic cultures on the chemical and sensory properties of chancellor wines vinified with different yeasts and fermentation temperatures. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 42–48.
81. Delcroix, A., Gunata, Z., Sapis, J.C., Salmon, J.M., and Bayonove, C. 1994. Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: Effect on the terpenol content of Muscat wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 291–296.
82. Delfini C, Cocito C, Bonino M, Schellino R, Gaia P, Baiocchi C (2001) Definitive evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of neutral precursors of grape aromas. *J Agric Food Chem* 49:5397–5408
83. Diaz-Maroto M, Schneider R, Baumes R (2005) Formation pathways of ethyl esters of branched short-chain fatty acids during wine aging. *J Agric Food Chem* 53:3503–3509
84. Dick, K.J., Molan, P.C., and Eschenbruch, R. 1992. The isolation from *Saccharomyces cerevisiae* of two antibacterial cationic proteins that inhibit malolactic bacteria. *Vitis* 31, 105–116.
85. Dicks, L.M.T., Dellaglio, F., and Collins, M.D, 1995, Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 395–397.
86. Dott, W., Heinzl, M., and Trüper, H.G. 1976. Sulfite formation by wine yeasts. I. Relationships between growth, fermentation and sulfite formation. *Arch. Microbiol.* 107, 289–292.
87. Drysdale, G.S. and Fleet, G.H. 1984. Acetic acid bacteria in some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 37, 17–20.
88. Drysdale, G.S. and Fleet, G.H. 1988. Acetic acid in winemaking: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 143–154.
89. Drysdale, G.S. and Fleet, G.H. 1989a. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.*, 471–481.
90. Du Toit, M. and Pretorius, I.S. 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: Using weapons from nature's own arsenal—a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 74–96
91. Du Toit, W.J. and Lambrechts, M.G. 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 57–64.
92. Dupin IVS, McKinnon BM, Ryan C, Boulay M, Markides AJ, Jones GP, Williams PJ, Waters EJ (2000) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *J Agric Food Chem* 48:3098–3105
93. Ebeler, S.E. 2001. Analytical chemistry: Unlocking the secrets of wine flavor. *Food Rev. Int.* 17, 45–64.
94. Edwards CG, Beelman RB, Bartley CE & McConnell AL (1990) Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *Am J Enol Viticult* 41: 48–56.
95. Edwards, C.G. and Jensen, K.A. 1992. Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington State wines: *Pediococcus* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 233–238.
96. Edwards, C.G. and Peterson, J.C. 1994. Sorbent extraction and analysis of volatile metabolites synthesized by lactic acid bacteria isolated from wines. *J. Food Sci.* 59, 192–196.
97. Edwards, C.G., Peterson, J.C., Boylston, T.D., and Vasile, T.D. 1994. Interactions between *Leuconostoc oenos* and *Pediococcus* spp. during vinification of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 49–55.

98. Edwards, C.G., Reynolds, A.G., Rodriguez, A.V., Semon, M.J., and Mills, J.M. 1999, Implication of acetic acid in the induction of slow/stuck grape juice fermentations and inhibition of yeast by *Lactobacillus* sp., *Am. J. Enol. Vitic.*, 204–210.
99. Erten H (2002) Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 373–378.
100. Eschenbruch, R. 1974. Sulfite and sulfide formation during wine making. A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 25, 157–161.
101. Eschenbruch, R. and Bonish, P. 1976. Production of sulphite and sulphide by low and high-sulphite forming wine yeasts. *Arch. Microbiol.* 107, 299–302.
102. Estevez P, Gil M, Falque E (2004) Effects of seven yeast strains on the volatile composition of Palomino wines. *Int J Food Sci Technol* 39:61–69
103. Esteve-Zarzoso B, Manzanales P, Ramón D & Querol A (1998) The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int Microbiol* 1: 143–148.
104. Fenoll J, Manso A, Hellin P, Ruiz L, Flores P (2009) Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening. *Food Chem* 114:420–428
105. Fernandez M, Ubeda JF & Briones AI (2000) Typing of non- *Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *Int J Food Microbiol* 59: 29–36.
106. Ferreira AM, Climaco MC & Faia AM (2001) The role of non- *Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components – a preliminary study. *J Appl Microbiol* 91: 67–71.
107. Ferreira V, Jarauta I, Cacho J (2006) Physicochemical model to interpret the kinetics of aroma extraction during wine aging in wood. Model limitations suggest the necessary existence of biochemical processes. *J Agric Food Chem* 54:3047–3054
108. Feuillat M (2003) Yeast macromolecules: origin, composition and enological interest. *Am J Enol Vitic* 54: 211–213
109. Fia G, Giovani G & Rosi I (2005) Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *J Appl Microbiol* 99: 509–517.
110. Fiechter A, Fuhrmann GF, Kappeli O (1981) Regulation of glucose metabolism in growing yeast-cells. *Adv Microb Physiol* 22:123– 183.
111. Fleet GH & Heard GM (1993) Yeast growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet GH, ed), pp. 27–54. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland
112. Fleet GH (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* 86: 11–22.
113. Fleet GH (2008) Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res* 8: 979–995.
114. Fleet GH, Heard GM, Gao C (1989) The effect of temperature on the growth and ethanol tolerance of yeasts during wine fermentation. *Yeast* 5(special issue):S43–S46
115. Fleet GH, Lafon-Lafourcade S & Ribereau-Gayon P (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl Environ Microb* 48: 1034–1038.
116. Fornachon, J.C.M., Douglas, H.C., and Vaughn, R.H. 1949. *Lactobacillus trichodes* nov. spec., a bacterium causing spoilage in appetizer and dessert wines. *Hilgardia* 19, 129–132.
117. Fugelsang, K.C. 1997. “*Wine Microbiology*”. Chapman and Hall, NY.
118. Gao C & Fleet GH (1988) The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J Appl Bacteriol* 65: 405–410.
119. Garde-Cerdan T & Ancin-Azpilicueta C (2006) Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. *Eur Food Res Technol* 222: 15–25.
120. Garde-Cerdan T, Ancin-Azpilicueta C (2008) Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT* 41:501–510
121. Garvie, E.I. 1967a. *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 48, 431–438.
122. Garvie, E.I. 1986. Genus *Pediococcus*. In “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*” (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, eds), pp. 1075–1079. Williams & Wilkins, MD.
123. Gil, J.V., Mateo, J.J., Jimenez, M., Pastor, A., and Huerta, T. 1996. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *J. Food Sci.* 61, 1247–1266.
124. Gobbi M, Comitini F, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M (2013) *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol* 33:271–281.

125. Goldner MC, Zamora M, Di Leo Lira P, Gianninoto H, Bandoni A (2009) Effect of ethanol level in the perception of aroma attributes and the detection of volatile compounds in red wine. *J Sens Stud* 24:243–257
126. Gonzalez-Pombo P, P´erez G, Carrau F, Guis´an JM, Batista-Viera F & Brena BM (2008) One-step purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol Lett* 30: 1469–1475.
127. Grimaldi A, Bartowsky E, Jiranek V (2005) A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* 105:233–244
128. Grimaldi, A., McLean, H., and Jiranek, V. 2000. Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 362–369.
129. Grosch W (2001) Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chem Senses* 26:533–545
130. Gunata Z, Dugelay I, Sapis IC, Baumes R & Bayonove C (1990) Role of enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in winemaking. *J Int Sci Vigne Vin* 24: 133–144.
131. Gustav Styger, Bernard Prior, Florian F. Bauer (2011) Wine flavor and aroma, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38:1145–1159
132. Guzzo, J., Cavin, J.F., and Divies, C. 1994. Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnol. Lett.* 16, 1189–1194.
133. Hallsworth JE (1998) Ethanol-induced water stress in yeast. *J Ferment Bioeng* 85:125–137
134. Hanl L, Sommer P, Arneborg N (2005) The effect of decreasing oxygen feed rates on growth and metabolism of *Torulaspora delbrueckii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:113–118.
135. Hansen EH, Nissen P, Sommer P, Nielsen JC & Arneborg N (2001) The effect of oxygen on the survival of non- *Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 91: 541–547.
136. Heard GM & Fleet GH (1985) Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl Environ Microb* 50: 727–728.
137. Heard GM & Fleet GH (1986) Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food Technol Aust* 38: 22–25.
138. Heard GM (1999) Novel yeasts in winemaking – looking to the future. *Food Aust* 51: 347–352.
139. Henick-Kling T, 1993, Malolactic fermentation. In: Fleet GH (ed) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Switzerland
140. Henick-Kling T, 1995, Control of malo-lactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods of starter cul–ture preparation, *J Appl Bacteriol Symp Suppl*, 29–37
141. Henick-Kling T, Edinger W, Daniel P, Monk P (1998) Selective effects of sulphur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J Appl Microbiol* 84:865–876.
142. Henick-Kling, T. and Park, Y.H. 1994. Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO₂ and timing of inoculation. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 464–469.
143. Hernandez-Orte P, Cacho J, Ferreira V (2002) Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *J Agric Food Chem* 50:2891–2899
144. Hernandez-Orte P, Cersosimo M, Loscos N, Cacho J, Garcia- Moruno E, Ferreira V (2008) The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chem* 107:1064–1077
145. Hernandez-Orte P, Ibarz M, Cacho J, Ferreira V (2005) Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chem* 89:163–174
146. Hernandez-Orte P, Ibarz M, Cacho J, Ferreira V (2006) Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety: effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation. *Food Chem* 98:300–310
147. Hernanz D, Gallo V, Recamales A, Melendez-Martinez A, Gonzalez-Miret M, Heredia F (2009) Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chem* 113:530–537
148. Hernawan T & Fleet GH (1995) Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *J Ind Microbiol* 14: 440–450.

149. Herraiz T, Reglero G, Herraiz M, Martín-Alvarez PJ & Cabezudo M (1990) The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulfur dioxide. *Am J Enol Viticult* 41: 313–318.
150. Howell KS, Cozzolino D, Bartowsky E, Fleet GH & Henschke PA (2006) Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Res* 6: 91–101.
151. Huang, Y.C., Edwards, C.G., Peterson, J.C., and Haag, K.M. 1996, Relationship between sluggish fermentations and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria, *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 1–10.
152. Iriti M, Faoro F (2006) Grape phytochemicals: a bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Med Hypoth* 67:833–838
153. Jarauta I, Cacho J, Ferreira V (2005) Concurrent phenomena contributing to the formation of the aroma of wine during aging in oak wood: an analytical study. *J Agric Food Chem* 53:4166–4177
154. Jimenez J, Benitez T (1987) Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. *Appl Environ Microbiol* 53:1196–1198
155. Jimenez-Marti E, Aranda A, Mendes-Ferreira A, Mendes-Faia A, Li del Olmo M (2007) The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie van Leeuwenhoek* 92:61–75
156. Jolly N, Augustyn O, Pretorius IS (2003) The effect of non- *Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *S Afr J Eno Vitic* 24:55–62
157. Jolly N, Augustyn O, Pretorius IS (2006) The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *S Afr J Eno Vitic* 27:15–39
158. Jolly NP, Varela C, Pretorius IS (2014) Not your ordinary yeast: non- *Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res* 14:215–237.
159. Jones PR, Gawel R, Francis I, Waters EJ (2008) The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Qual Prefer* 19:596–607
160. Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., and Ribéreau-Gayon, P. 1984a. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 153–156.
161. Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., and Ribéreau-Gayon, P. 1984b. Metabolism of acetic acid bacteria in grape must. Consequences on alcoholic and malolactic fermentation. *Sci. Aliments* 4, 247–255.
162. Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. In ‘‘Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’’ (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, eds), pp. 1209–1234. Williams & Wilkins, MD.
163. Kapsopoulou K, Kapaklis A & Spyropoulos H (2005) Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. *World J Microb Biot* 21: 8–9.
164. Kapsopoulou K, Mourtzini A, Anthoulas M & Nerantzis E (2007) Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microb Biot* 23: 735–739.
165. Kemsawasd V, Branco P, Almeida MG, Caldeira J, Albergaria H, Arneborg N (2015a) Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 362:fnv103.
166. Kim D-H, Hong Y-A & Park H-D (2008) Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic content in wine. *Biotechnol Lett* 30: 1633–1638.
167. King, S.W. and Beelman, R.B. 1986. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 53–60.
168. Klis FM, Boorsma A & de Groot PW (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 185–202.
169. Kosseva, M., Beschkov, V., Kennedy, J.F., and Lloyd, L.L. 1998. Malolactic fermentation in Chardonnay wine by immobilized *Lactobacillus casei* cells. *Process Biochem.* 33, 793–797.
170. Kotseridis, Y. and Baumes, R. 2000. Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juices, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. *J. Agric. Food Chem.* 48, 400–406.
171. Kraus JK, Reed G & Villettaz JK (1983) Levures seches actives de vinifications. *Conn Vigne Vin* 17: 93–103.
172. Krieger, S.A., Hammes, W.P., and Henick-Kling, T. 1993. How to use malolactic starter cultures in the winery. *Wine Ind. J.* 15, 3–160.
173. Kunkee, R.E. 1967. Malo-lactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 9, 235–279.

174. Lachenmeier D, Sohnius E-M (2008) The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: evidence from a large chemical survey. *Food Chem Tox* 46:2903–2911
175. Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Yeast and its importance to wine aroma—A review. *S Afr J Enol Vitic* 21: 97–129
176. Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Yeast and its importance to wine aroma. *S Afr J Enol Vitic* 21:97–129
177. Lambropoulos I, Roussis I (2007) Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by caffeic acid and gallic acid. *Food Res Int* 40:176–181
178. Languet P, Aguera E, Samson A, Ortiz-Julien A & Salmon JM (2005) Valorization aromatique des mouts par l'utilisation s'equentielle des levures d'esp'ecies non-Saccharomyces et Saccharomyces. *Rev Oenolog* 117: 31–33.
179. Larsen, J.T., Nielsen, J.C., Kramp, B., Richelieu, M., Riisager, M.J., Arneborg, N., and Edwards, C.G. 2003. Impact of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 246–251.
180. Le Berre E, Atanasova B, Langlois D, Etievant P, Thomas- Danguin T (2007) Impact of ethanol on the perception of wine odorant mixtures. *Food Qual Prefer* 18:901–908
181. Lema C, Garcia-Jares C, Orriols I & Angulo L (1996) Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some compounds of Albarino wine aroma. *Am J Enol Viticult* 47: 206–216.
182. Lilly M, Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol* 66:744–753
183. Liu S-Q (2002) Malolactic fermentation in wine—beyond deacidification. *J Appl Microbiol* 92:589–601
184. Liu S-Q, Pilone G (2000) An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int J Food Sci Technol* 35:49–61
185. Liu, J. and Gallander, J.F. 1983. Effect of pH and sulfur dioxide on the rate of malolactic fermentation in red table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 34, 44–46.
186. Lonvaud-Funel, A. 1999, Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine, *Ant. van Leeuwen.*, 317–331.
187. Lonvaud-Funel, A. and Joyeux, A. 1993. Antagonism between lactic acid bacteria of wines: Inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosacus*. *Food Microbiol.* 10, 411–419
188. Lopez I, Tenorio C, Zarazaga M, Dizy M, Torres C, Ruiz-Larrea F, 2007, Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentations, *Eur Food Res Technol*, 215–223
189. Loscos N, Hernandez-Orte P, Cacho J, Ferreira V (2007) Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from nonfloral grape odorless flavor precursors fractions. *J Agric Food Chem* 55:6674–6684
190. Lu, S.-F., Lee, F.-L., and Chen, H.-K. 1999. A thermotolerant and high acetic acid producing bacterium *Acetobacter* sp. I14–2. *J. Appl. Microbiol.* 86, 55–62.
191. Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leao C & Corte-Real M (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 147: 2409–2415.
192. Magyar I & Panyik I (1989) Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel. *Am J Enol Viticult* 40: 233–240.
193. Maicas S & Mateo JJ (2005) Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 322–335.
194. Maicas S, 2001, The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine, *Appl Microbiol Biotechnol*, 35–39
195. Maicas, S., Gil, J.V., Pardo, I., and Ferrer, S. 1999. Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Res. Int.* 32, 491–496
196. Małgorzata Lasik, 2013, The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: a review, *Eur Food Res Technol*, 843–850
197. Mannazzu I, Angelozzi D, Clementi F & Ciani M (2007) Dominanza di starter commerciali nel corso di fermentazioni inoculate: analisi di trentasei vinificazioni industriali. *Vignevini* 34: 61–64.
198. Mannazzu I, Clementi F & Ciani M (2002) Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts* (Ciani M, ed), pp. 19–34. Research Signpost, Trivandrum, India.

199. Manzanares P, Ramón D & Querol A (1999) Screening of non- *Saccharomyces* wine yeasts for the production of beta-Dxylosidase activity. *Int J Food Microbiol* 46: 105–112.
200. Martineau, B. and Henick-Kling, T. 1995a. Formation and degradation of diacetyl in wine during alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strain EC1118 and malolactic fermentation with *Leuconostoc oenos* strain MCW. *Am. J. Enol. Vitic.*, 442–448.
201. Martineau, B. and Henick-Kling, T. 1995b. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 526–536.
202. Martineau, B., Acree, T., and Henick-Kling, T. 1995. Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Res. Int.* 28, 139–143.
203. Martinez J, Millan C & Ortega JM (1989) Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from ‘Pedro Ximenez’ grapes. *S Afr J Enol Vitic* 10: 31–35.
204. Martinez-Rodriguez A, Carrascosa A, Martin-Alvarez P, Moreno- Arribas V, Polo M (2002) Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29:314–322
205. Martinez-Rodriguez AJ, Polo M (2000) Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *J Agric Food Chem* 48:1081–1085
206. Martinez-Rodriguez AJ, Polo M, Carrascosa AV (2001) Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int J Food Microbiol* 71:45–51
207. Martinez-Rodriguez, A.J., Carrascosa, A.V., and Polo, M.C. 2001. Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 155–160.
208. Martini A (1993) Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Wine Res* 4: 165–176.
209. Martini A, Ciani M, Scorzetti G (1996) Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am J Enol Vitic* 47:435–440
210. Mason, A.B. and Dufour, J.-P. 2000. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* 16, 1287–1298.
211. Mateo J, Gentilini N, Huerta T, Jimenez M, Di Stefano R (1997) Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *J Chromatogr A* 778:219–224
212. Mateo J, Jimenez M (2000) Monoterpenes in grape juice and wines. *J Chromatogr A* 881:557–567
213. Mazauric J-P, Salmon J-P (2005) Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. *J Agric Food Chem* 53:5647–5653
214. Mendes Ferreira A, Climaco M, Mendes Faia A (2001) The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components—a preliminary study. *J Appl Microbiol* 91:67–71
215. Mendes-Ferreira A, Barbosa C, Jimenez-Marti E, del Olmo M, Mendes Faia A (2010) The wine yeast strain-dependent expression of genes implicated in sulfide production in response to nitrogen availability. *J Microbiol Biotech* 20:1314–1321
216. Mendoza LM, Manca de Nadra MC & Farias ME (2007) Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnol Lett* 29: 1057–1063.
217. Merico A, Capitanio D, Vigentini I, Ranzi BM, Compagno C (2003) Aerobic sugar metabolism in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast Res* 4:277–283.
218. Merico A, Sulo P, Piskur J, Compagno C (2007) Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J* 274:976– 989.
219. Mills, J.M. 2001. “The Impact of Interactions between *Lactobacillus* and *Saccharomyces* spp. on Wine Fermentations”. MS Thesis, Washington State University, Pullman, WA
220. Mora J, Barbas JI & Mulet A (1990) Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Enol Viticult* 41: 156–159.
221. Moreira N (2005) Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *Int J Food Microbiol* 103: 285–290.
222. Moreira N, Mendes F, Guedes de Pinho P, Hogg T & Vasconcelos I (2008) Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as a pure and mixed cultures in grape must. *Int J Food Microbiol* 124: 231–238.
223. Moreno JJ, Millan C, Ortega JM & Medina M (1991) Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J Ind Microbiol* 7: 191–190.

224. Moreno-Arribas M, Polo M (2005) Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:265–286
225. Moruno EG, Sanlorenzo C, Boccaccino B & Stefano RD (2005) Treatment with yeast to reduce the concentration of Ochratoxin A in red wine. *Am J Enol Vitic* 56: 73–76.
226. Mtshali P, Divol B, Van Rensburg P, Du Toit M (2010) Genetic screening of wine-related enzymes in *Lactobacillus* species isolated from South African wines. *J Appl Microbiol* 108:1389–1397
227. Nielsen, J.C. and Richelieu, M. 1999. Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 740–745.
228. Nielsen, J.C., Prahl, C., and Lonvaud-Funel, A. 1996. Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 42–48.
229. Nieuwoudt H, Prior BA, Pretorius IS, Bauer FF (2002) Glycerol in South African table wines: an assessment of its relationship to wine quality. *S Afr J Enol Vitic* 23:22–30
230. Nissen P, Arneborg N (2003) Characterization of early deaths of non- *Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 180:257–263.
231. Nissen P, Nielsen D, Arneborg N (2003) Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact mediated mechanism. *Yeast* 20:331–341.
232. Nissen P, Nielsen D, Arneborg N (2004) The relative glucose uptake abilities of non-*Saccharomyces* yeasts play a role in their coexistence with *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:543–550.
233. Nykanin L (1986) Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am J Enol Vitic* 37:84–96
234. Obreque-Slier E, Pena-Neira A, Lopez-Solis R (2010) Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *J Agric Food Chem* 58: 3729–3735
235. Osborne James P. and Edwards Charles G., 2005, Bacteria important during winemaking, *Advances in food and nutrition research* vol 50, 139-177
236. Ough, C.S. and Crowell, E.A. 1987. Use of sulfur dioxide in winemaking. *J. Food Sci.* 52, 386–388.
237. Pardo I, Garcí a MJ, Zuniga M & Uruburu F (1989) Dynamics of microbial populations during fermentations of wines from the Utiel Requena region of Spain. *Appl Environ Microb* 55: 539–541.
238. Park Y, Horton Shaffer C, Bennett G (2009) Microbial formation of esters. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:13–25
239. Patynowski, R.J., Jiranek, V., and Markides, A.J. 2002. Yeast viability during fermentation and sur lie ageing of a defined medium and subsequent growth of *Oenococcus oeni*. *Aust. J. Grape Wine Res.* 8, 62–69.
240. Perez-Navado F, Albergaria H, Hogg T & Gírio F (2006) Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 108: 336–345.
241. Perez-Seradilla J, Luque de Castro M (2008) Role of lees in wine production: a review. *Food Chem* 111:447–456
242. Pilone, G.J. 1995. A New Zealand experience in direct-vat inoculation for malolactic fermentation., *Aust. NZ. Wine Ind. J.* 10, 169–173.
243. Pilone, G.J. and Kunkee, R.E. 1972. Characterization and energetics of *Leuconostoc oenos* ML 34. *Am. J. Enol. Vitic.* , 61–70.
244. Pina C, Santos C, Couto JA, Hogg T (2004) Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiol* 21:439–447.
245. Polaskova P, Herszage J, Ebeler S (2008) Wine flavor: chemistry in a glass. *Chem Soc Rev* 37:2478–2489
246. Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16:675–729.
247. Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbu^uchel, A., 2001. Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 296–314.
248. Pueyo E, Martinez-Rodriguez AJ, Polo M, Santa-Maria G, Bartolome B (2000) Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *J Agric Food Chem* 48:116–122
249. Raccach, M. 1987. *Pediococci and biotechnology.* CRC Crit. Rev. Microbiol. 14, 291–309.
250. Rainieri S & Pretorius IS (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Ann Microbiol* 50: 15–31.
251. Rankine, B.C., Fornachon, J.C.M., and Bridson, D.A. 1969. Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis* 8, 129–134.

252. Reed G & Nagodawithana TW (1988) Technology of yeast usage in wine making. *Am J Enol Viticult* 39: 83–90.
253. Regodon Mateos J, Perez-Nevado F, Ramirez Fernandez M (2006) Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme Microb Technol* 40:151–157
254. Renault PE, Albertin W, Bely M (2013) An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4105–4119.
255. Ribereau-Gayon J, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (1998) Handbook of enology. The microbiology of wine and vinifications, vol II, 1st edn. Wiley, New York
256. Ribereau-Gayon P & Peynaud E (1960) *Traite` d'Oenologie*. Paris et Lie`ge Librarie Polytechnique Ch. Be`ranger, Paris, pp. 293–298.
257. Rodriguez ME, Lopes CA, van Broock M, Valles S, Ram´on D & Caballero AC (2004) Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *J Appl Microbiol* 96: 84–95.
258. Rojas V, Gil JV, Piˆnaga F & Manzanares P (2003) Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratories fermentations. *Int J Food Microbiol* 86: 181–188.
259. Romano P, Capece A, Jespersen L (2006) Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In: Querol A, Fleet GH (eds) *Yeasts in food and beverages*. Springer, Berlin, pp 13–53
260. Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M & Capece A (2003a) Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol* 86: 169–180.
261. Romano P, Granchi L, Caruso M, Borra G, Palla G, Fiore C, Ganucci D, Caligini A & Brandolini V (2003b) The species specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. *Int J Food Microbiol* 86 63–168.
262. Romano P, Suzzi G (1996) Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl Environ Microbiol* 62:309–315
263. Romano, P. and Suzzi, G. 1993. Sulphur dioxide and wine microorganisms. In ‘‘Wine Microbiology and Biotechnology’’ (G.H. Fleet, ed.), pp. 373–393. Harwood Academic Publishers, Switzerland
264. Rosi I, Vinella M & Domizio P (1994) Characterization of betaglucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J Appl Bacteriol* 77: 519–527.
265. Saeki, A., Taniguchi, M., Matsushita, K., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, G., and Adachi, O. 1997. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 317–323.
266. Salmon JM, Languet P & Ortiz-Julien A (2007) Colture miste di lieviti e fermentazione alcolica. *Riv Viticolt Enolog* 3: 1–5.
267. Salvadó Z, Arroyo-López FN, Barrio E, Querol A, Guillamón JM (2011) Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* 28: 1155–1161.
268. Sanchez Paloma E, Diaz-Maroto M, Gonzalez Vinas M, Soriano- Perez A, Perez-Coello M (2007) Aroma profile of wines from Albillo and Muscat grape varieties at different stages of ripening. *Food Control* 18:398–403
269. Schoeman, H., Vivier, M., du Toit, M, Dicks, L.M.T., and Pretorius, I.S. 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 647–656
270. Selli S, Canbas A, Cabaroglu T, Erten H, Lepoutre J-P, Gunata Z (2006) Effect of skin contact on the free and bound aroma compounds of the white wine of *Vitis vinifera* L. cv Narince. *Food Control* 17:75–82
271. Semon, M.J., Edwards, C.G., Forsyth, D., and Dinn, C. 2001. Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of *Oenococcus oeni*. *Aust. J. Grape Wine Res*, 52–59.
272. Seo SH, Rhee CH & Park HD (2007) Degradation of malic acid by *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774 an acidophilic yeast strain isolated from Korean grape wine pomace. *J Microbiol* 45: 521–527.
273. Siebert T, Wood C, Elsey G, Pollnitz A (2008) Determination of Rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine. *J Agric Food Chem* 56:3745–3748
274. Silva S, Ramon Portugal F, Andrade P, Texeira M & Strehaiano P (2003) Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *Am J Enol Viticult* 54: 50–55.
275. Sipiczki M, Ciani M & Csoma H (2005) Taxonomic reclassification of *Candida stellata* DBVPG 3827. *Folia Microbiol* 50: 494–498.
276. Snow PG & Gallender GF (1979) Deacidification of white table wines through partial fermentation by *Schizosaccharomyces pombe*. *Am J Enol Viticult* 30: 45–48.

277. Somers, T.C. and Wescombe, L.G. 1987. Evolution of red wines. II. An assessment of the role of acetaldehyde. *Vitis* 26, 27–36.
278. Sosa OA, de Nadra MC & Far'ias ME (2008) Modification by glucose of the flocculent phenotype of a *Kloeckera apiculata* wine strain. *J Ind Microbiol Biot* 35: 851–857.
279. Sponholz, W.R. 1993. Wine spoilage by microorganisms. In “Wine Microbiology and Biotechnology” (G.H. Fleet, ed.), pp. 395–420. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
280. Strasser de Saad, A.M. and Manca de Nadra, M.C. 1993. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 406–410.
281. Strauss MLA, Jolly NP, Lambrechts MG & van Rensburg P (2001) Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *J Appl Microbiol* 91: 182–190.
282. Suarez-Lepe and A. Morata, (2012) New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology* 23, 39e50
283. Sumbly Krista M & Paul R. Grbin & Vladimir Jiranek, (2014), Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98:8111–8132
284. Swiegers J, Kievit R, Siebert T, Lattey K, Bramley B, Francis I, King E, Pretorius IS (2009) The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiol* 26:204–211
285. Swiegers J, Pretorius IS (2007) Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 954–960
286. Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PAPA, Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res* 11: 139–173
287. Taillandier P, Lai QP, Julien-Ortiz A, Brandam C (2014) Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J Microbiol Biotechnol* 30:1959–1967
288. Ter Schure EG, Flikweert MT, Van Dijken JP, Pronk JT, Verrips CT (1998) Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 64:1303–1307
289. Timberlake, C.F. and Bridle, P. 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 27, 97–105
290. Torija MJ, Rozes N, Poblet M, Guillamon JM, Mas A (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79:345–352.
291. Toro ME & Vazquez F (2002) Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World J Microb Biot* 18: 347–354.
292. Ugliano M, Genovese A, Moio L (2003) Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J Agric Food Chem* 51:5073–5078
293. Van Dijken JP, Van Den Bosh E, Hermans JJ, Rodrigues de Miranda L, Scheffer WA (1986) Alcoholic fermentation by ‘non-fermentative’ yeasts. *Yeast* 2:123–127.
294. Van Dijken JP, Weusthuis RA, Pronk JT (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 63:343–352
295. Van Uden N (1989) Effect of alcohols on the temperature relations of growth and death in yeasts. In: van Uden N (ed) *Alcohol toxicity in yeasts and bacteria*. CRC Press, Boca Raton, pp 77–88
296. Vasserot Y, Christiansen H, Chemardin P, Arnaud A & Galzy P (1989) Purification and properties of a BT-glucosidase of *Hanseniaspora vineae* Van der Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. *J Appl Bacteriol* 66: 271–279.
297. Venturin C, Boze H, Moulin G, Galzy P (1995) Influence of oxygen limitation on glucose-metabolism in *Hanseniaspora uvarum* K-5 grown in chemostat. *Biotechnol Lett* 17:537–542.
298. Versari A, Parpinello GP, Cattaneo M, 1999, *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 447–455
299. Viana F, Gil J, Genoves S, Valles S, Manzanares P (2008) Rational selection of non-Saccharomyces wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol* 25:778–785
300. Viegas CA, RosaMF, Sá-Correia I, Novais JM (1989) Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during alcoholic fermentation. *Appl Environ Microbiol* 55:21-28
301. Vilanova M, Ugliano M, Varela C, Siebert T, Pretorius IS, Henschke P (2007) Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:145–157

302. Villena MA, Iranzo JFU & Perez AIB (2007) B-Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. *Enz Microbial Technol* 40: 420–425.
303. Visser W, Baternburg-van der Vegte WH, van Dijken JP (1990) Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 56:3785–3792
304. Wang C, Mas A, Esteve-Zarzoso B (2015) Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int J Food Microbiol* 206:67–74.
305. Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H., and Lee, T.H. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 302–313.
306. Wibowo, D., Fleet, G.H., Lee, T.H., and Eschenbruch, R.E. 1988. Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 64, 421–428.
307. Wood C, Siebert T, Parker M, Capone D, Elsey G, Pollnitz A, Eggers M, Meier M, Vossing T, Widder S, Krammer G, Sefton M, Herderich M (2008) From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *J Agric Food Chem* 56:3738–3744
308. Xufre A, Albergaria H, Inácio J, Spencer-Martins I, Gírio F (2006) Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int J Food Microbiol* 108:376–384.
309. Yokotsuka K, Otaky A, Naitoh A & Tanaka H (1993) Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of high-acid grape must using two immobilized yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Enol Viticult* 44: 371–377.
310. Zhao J & Fleet GH (2005) Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 415–423.
311. Τσακίρης Αργύρης, Οινολογία - έρευνα και εφαρμογές, εκδόσεις ψυχάλου, Αθήνα
312. Τσακίρης Αργύρης, Οινολογία-από το σταφύλι στο κρασί, εκδόσεις Ψυχάλου, 4η έκδοση, 2014