

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων – Τμήμα φυτικής παραγωγής

ΔΠΜΣ Αμπελουργία - Οινολογία

Ταυτοποίηση ζυμών και προσδιορισμός φαινολικών
συστατικών κατά την ερυθρή οινοποίηση γλεύκους οιναμπέλου
«Αγιωργήτικο»

Χρυσάνθη Πατεράκη

Επιβλέπων καθηγητής:

Ελευθέριος Δροσινός

Εξεταστική επιτροπή:

Γεώργιος Κοτσερίδης

Αικατερίνη Μπινιάρη

Αθήνα 2012

Ευχαριστίες

Η μεταπτυχιακή αυτή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ποιοτικού ελέγχου, στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και στο εργαστήριο Οινολογίας του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2011-2012.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ελευθέριο Δροσινό για την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλλε καθώς και την πολύτιμη επιστημονική του καθοδήγηση.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο κ. Γεώργιο Κοτσερίδη για την εμπιστοσύνη του και τη βοήθεια που μου προσέφερε καθώς και την Επίκουρο κ. Αικατερίνη Μπινιάρη και την Επίκουρο κ. Σταματίνα Καλλίθρακα για τη βοήθεια που μου προσέφεραν στην εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης, στον κ. Σπυρίδων Παραμυθιώτη εκφράζω τις ευχαριστίες μου για την καθοδήγηση και την αμέριστη συνεισφορά του σε όλη τη διαδικασία του πειράματος

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη των εργαστηρίων για την βοήθεια τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Περιεχόμενα

1.1. Περίληψη	σελ.6
1.2. Abstract	σελ.7
2. Εισαγωγή	σελ.8
2.1. Αγιωργήτικο	σελ.8
2.2. Οινοποίηση	σελ.9
2.3. Ερυθρή οινοποίηση	σελ.9
2.4. Χρήση του θειώδη του ανυδρίτη στην οινοποίηση	σελ.11

Κεφάλαιο 1: Φαινολικά συστατικά του οίνου

1. Εισαγωγή	σελ.12
1.1. Κατάταξη φαινολικών συστατικών	σελ.13
1.2. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις σταφυλιών	σελ.13
1.2.1. Ανθοκυάνες	σελ.13
1.2.2. Φλαβονόλες, φλαβονόλες	σελ.15
1.2.3. Υδροξυβενζοϊκά οξέα	σελ.16
1.2.4. Υδροξυκινναμωμικά οξέα	σελ.16
1.3. Επιπτώσεις της κατανάλωσης ερυθρού οίνου στην υγεία του ανθρώπου ...	σελ.17
2. Υλικά και Μέθοδοι	σελ.18
2.1. Διαδικασία ζύμωσης	σελ.18
2.2. Φυσικοχημικές αναλύσεις	σελ.18
2.2.1. Μέτρηση ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη	σελ.19
2.2.2. Μέτρηση ολικού θειώδους ανυδρίτη	σελ.19
2.2.3. Μέτρηση ολικής οξύτητας (με δείκτη φαινολοφθαλεΐνης)	σελ.20
2.2.4. Μέτρηση αλκοολικού βαθμού	σελ.20
2.3. Προσδιορισμός χρώματος	σελ.21
2.3.1. Ένταση / Απόχρωση (420, 520, 620nm)	σελ.21
2.3.2. Δείκτης Ολικών Φαινολικών (Δ.Φ.Ο)	σελ.21
2.4. Folin-Ciocalteu (765nm)	σελ.22
2.5. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH	σελ.23
2.6. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του οίνου με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)	σελ.24
2.7. Προσδιορισμός ανθοκυανών του οίνου με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)	σελ.24
2.8. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών στις ράγες με φασματοφωτομετρικές μεθόδους	σελ.25
2.8.1. Μέθοδος Illand	σελ.25
2.8.2. Μέθοδος Methyl cellulose	σελ.26
2.9. Προσδιορισμός ανθοκυανών των ραγών με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)	σελ.28
3. Αποτελέσματα και συζήτηση	σελ.30

3.1. Φυσικοχημικές αναλύσεις	σελ.30
3.1.1. Θειώδης ανυδρίτης και αλκοολικός βαθμός.....	σελ.32
3.2. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών με φασματοφωτομετρία	σελ.32
3.3. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης	σελ.35
3.4. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του οίνου με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)	σελ.36
3.4.1. Προσδιορισμός γαλλικού οξέος	σελ.36
3.4.2. Προσδιορισμός φλαβονολών	σελ.37
3.4.2.1. Προκυανιδίνη B1	σελ.37
3.4.2.2. Κατεχίνη	σελ.38
3.4.2.3. Προκυανιδίνη B2	σελ.38
3.4.2.4. Επικατεχίνη	σελ.39
3.4.2.5. Σύνολο φλαβονολών	σελ.40
3.4.3. Προσδιορισμός εστέρων και υδροξυκινναμωμικών οξέων	σελ.40
3.4.3.1. Τρυγικός εστέρας του καφεϊκού οξέος	σελ.40
3.4.3.2. Τρυγικός εστέρας του κουμαρικού οξέος	σελ.41
3.4.3.3. Καφεϊκό οξύ	σελ.41
3.4.3.4. Κουμαρικό οξύ.....	σελ.42
3.4.3.5. Φερουλικό οξύ	σελ.43
3.4.3.6. Σύνολο υδροξυκινναμωμικών οξέων	σελ.44
3.4.4. Προσδιορισμός φλαβονολών	σελ.44
3.4.4.1 Ρουτίνη	σελ.44
3.4.4.2 Μυρικετίνη	σελ.45
3.4.4.3 Κερκετίνη	σελ.45
3.4.4.4 Σύνολο φλαβονολών	σελ.46
3.5. Προσδιορισμός ανθοκυανών του οίνου με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)	σελ.47
3.5.1. Δελφινιδίνη	σελ.47
3.5.2. Κυανιδίνη	σελ.47
3.5.3. Πετουνιδίνη	σελ.48
3.5.4. Πεονιδίνη	σελ.48
3.5.5. Μαλβιδίνη	σελ.49
3.5.6. Οξικός εστέρας της μαλβιδίνης	σελ.50
3.5.7. Κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης	σελ.50
3.5.8. Σύνολο ανθοκυανών	σελ.51
3.5.9. Σύνολο εστέρων	σελ.52
3.6. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών στη ράγα με φασματοφωτομετρικές μεθόδους	σελ.53
4. Βιβλιογραφία.....	σελ.57

Κεφάλαιο 2: Μικροβιολογία Οίνου

1. Εισαγωγή	σελ.58
1.1. Αλκοολική ζύμωση	σελ.59

1.2. Αύξηση πληθυσμού ζυμομυκήτων	σελ.60
1.3. Ρόλος των ζυμομυκήτων	σελ.61
1.4. Ταυτοποίηση των ζυμομυκήτων	σελ.62
2. Υλικά και Μέθοδοι	σελ.64
2.1. Αρίθμηση ανάπτυξης πληθυσμού	σελ.64
2.2. Διαχωρισμός στελέχους	σελ.65
2.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	σελ.66
2.3.1. Προετοιμασία δείγματος	σελ.66
2.3.2. Ηλεκτοφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου δωδεκανοθειϊκού νατρίου: SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)	σελ.66
2.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	σελ.69
2.4.1. Προετοιμασία δείγματος	σελ.69
2.4.2. DNA extraction	σελ.69
2.4.3. Ενίσχυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.....	σελ.70
2.4.3.1. Ενίσχυση αλληλουχίας 26S ριβοσωμικού DNA	σελ.70
2.4.3.2. Τυχαία ενίσχυση πολυμορφισμών του γενετικού υλικού - RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)	σελ.71
2.4.3.3. Ενίσχυση επαναλαμβανόμενων στοιχείων του γενετικού υλικού – Rep-PCR	σελ.72
2.4.4. Ηλεκτοφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	σελ.73
2.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	σελ.74
2.5.1. Διαδικασία	σελ.74
2.6. Διαλύματα	σελ.76
2.6.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	σελ.76
2.6.2. DNA extraction.....	σελ.77
2.6.3. DGGE.....	σελ.78
3. Αποτελέσματα και συζήτηση	σελ.79
3.1. Ανάπτυξη πληθυσμού	σελ.80
3.2. Απομόνωση και διαχωρισμός	σελ.80
3.3. Ταξινομική κατάταξη των ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν σε σχέση με τυπικά στελέχη «type strains»	σελ.84
3.4. Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου βαθμιδωτής διάταξης αποδιατακτικών παραγόντων (PCR-DGGE)	σελ.85
3.5. Βιοποικιλότητα ζυμομυκήτων	σελ.86
3.5.1. Μικροοινοποίηση χωρίς προσθήκη SO ₂	σελ.87
3.5.2. Μικροοινοποίηση με την προσθήκη SO ₂	σελ.87
3.5.3. Σύγκριση με άλλες μελέτες	σελ.88
3.6. Βιοποικιλότητα του είδους <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	σελ.89
3.6.1. Μικροοινοποίηση χωρίς προσθήκη SO ₂	σελ.90
3.6.2. Μικροοινοποίηση με την προσθήκη SO ₂	σελ.90
4. Βιβλιογραφία.....	σελ.92

1.1. Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση του θειώδους ανυδρίτη στην αυθόρμητη ερυθρή οينوποίηση με την χρήση σταφυλιών της ποικιλίας Αγιωργήτικο. Το γλεύκος κατανεμήθηκε σε 6 δοχεία 12 λίτρων και ακολούθησε η προσθήκη 80 mg/L μεταδιθειώδους καλίου στα 3 εξ' αυτών. Η εξέλιξη της ζύμωσης μελετήθηκε μέσω της μεταβολής της πυκνότητας, του ελεύθερου και ολικού θειώδους ανυδρίτη. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές για την αρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού αλλά και τεχνικές που δε βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών (DGGE). Η ταυτοποίηση της επικρατούσας μικροχλωρίδας πραγματοποιήθηκε αρχικά με ομαδοποίηση με SDS-PAGE των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών, RAPD-PCR και *rep*-PCR και στη συνέχεια με αλληλούχιση του 26S ριβοσωμικού DNA αντιπροσωπευτικού αριθμού στελεχών. Η τιμή του pH και η θερμοκρασία παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης στα επίπεδα του 3.4 και των 22°C, αντίστοιχα. Ο ελεύθερος και ο ολικός θειώδης ανυδρίτης ήταν 11,5 ppm και 29,4 ppm στην αρχή και 16,6 ppm και 38,4 ppm στο τέλος της ζύμωσης, αντίστοιχα. Η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κυμάνθηκε από 6 έως 9 (g τρυγικού οξέως ανά λίτρο οίνου). Όπως προέκυψε από τις αναλύσεις που στηρίχθηκαν σε τεχνικές με προηγούμενη καλλιέργεια των μικροοργανισμών, απουσία του θειώδους ανυδρίτη συμμετείχαν στη ζύμωση τα είδη *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* και *Lanchancea thermotolerans* με τελική επικράτηση του είδους *S. cerevisiae*. Παρουσία του θειώδους ανυδρίτη non-*Saccharomyces* είδη παρατηρήθηκαν μόνο την πρώτη μέρα της ζύμωσης, ενώ από τη μέση έως το τέλος επικράτησε το είδος *S. cerevisiae*. Όσον αφορά στην ποικιλομορφία των στελεχών του είδους *S. cerevisiae*, ήταν μεγαλύτερη απουσία του θειώδους ανυδρίτη. Παράλληλα, με την PCR-DGGE διαπιστώθηκε η ύπαρξη μόνο των ειδών *S. cerevisiae* και *H. uvarum* απουσία θειώδους ανυδρίτη καθώς επίσης και την πρώτη μέρα της ζύμωσης παρουσία θειώδους ανυδρίτη και του είδους *S. cerevisiae* στις υπόλοιπες φάσεις της ζύμωσης.

Λέξεις κλειδιά: Αυθόρμητη ερυθρή οينوποίηση, Θειώδης ανυδρίτης, *Saccharomyces cerevisiae*

1.2. Abstract

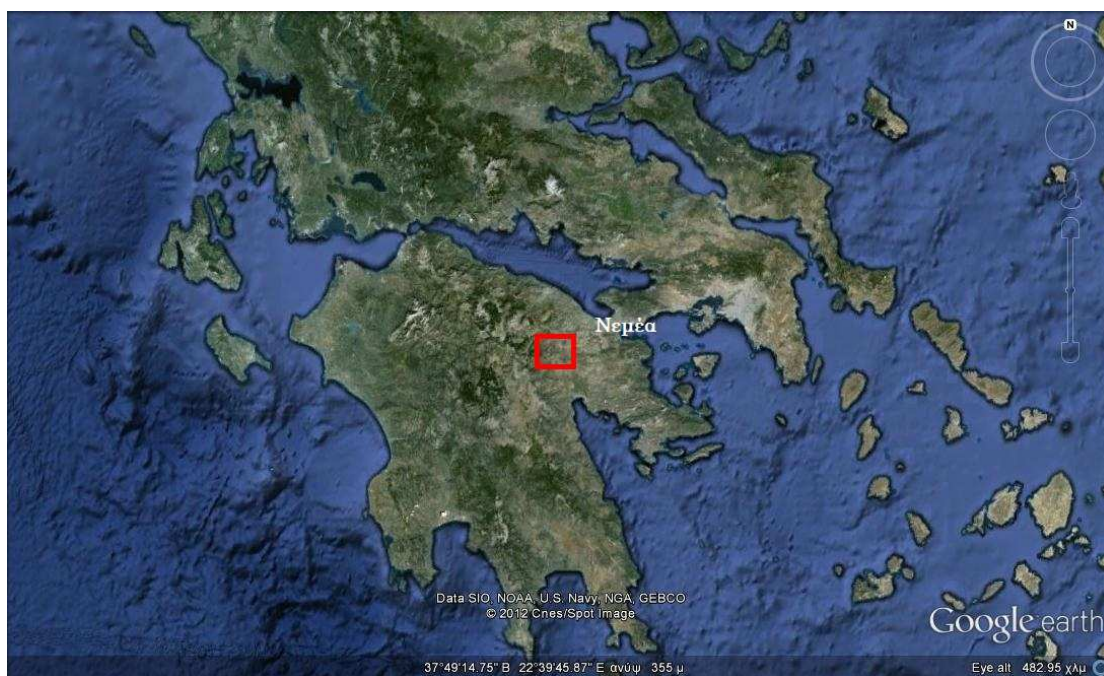
In the present study the effect of sulfur dioxide in the microbial population dynamics during spontaneous red wine fermentation from the Greek cultivar Agiorgitiko was monitored. Fermentation was carried out in 12 liter bottles without and with 80 mg/L metabisulfite, in triplicate. Fermentation was monitored by measuring density, total and free sulfur dioxide, as well as by qualitative and quantitative assessment of the microbiota. The latter was performed by classical microbiological techniques as well as culture-independent ones (DGGE). In addition, clustering of the isolates was performed by SDS-PAGE of whole cell proteins, RAPD-PCR and rep-PCR and identification by sequencing of the 26S-rRNA gene. Initial pH and temperature remained stable at 3.4 and 22 °C, respectively. Total and free sulfur dioxide was 11,5 ppm and 29,4 ppm in the beginning and 16,6 ppm and 38,4 ppm at the end of fermentation, respectively. Total titratable acidity (TTA) was observed between 6 and 9 (g tartaric acid/liter). In the absence of SO₂ *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lanchancea thermotolerans* were detected during fermentation with *S. cerevisiae* dominating the yeast population. In SO₂ presence, non-*Saccharomyces* species were observed in the first day of fermentation, while *S. cerevisiae* dominated at last. Genotypic diversity of *S. cerevisiae* was larger in the absence of SO₂. PCR-DGGE demonstrated only *S. cerevisiae* and *H. uvarum* in the absence of SO₂ and also in the first day of the fermentation with SO₂, while *S. cerevisiae* prevailed in the rest sampling points of the fermentation with SO₂.

Keywords: Red wine spontaneous fermentation, Sulfur dioxide, *Saccharomyces cerevisiae*

2. Εισαγωγή

2.1. Αγιωργήτικο

Μια από τις σημαντικότερες ελληνικές ποικιλίες για την παραγωγή οίνου είναι η ποικιλία Αγιωργήτικο. Καλλιεργείται κυρίως στη Νεμέα (εικόνα 1). Η ζώνη παραγωγής οίνων ΟΠΑΠ οριοθετήθηκε το 1971 με το Β.Δ 539/71 και αναγνωρίστηκε ως ονομασία προέλευσης για τους ξηρούς και γλυκούς οίνους της ποικιλίας Αγιωργήτικο.



Εικόνα 1 : Φωτογραφία από το Google earth

Η περιοχή χαρακτηρίζεται από έντονο πολυμορφισμό, το έδαφος είναι αργιλοπηλώδες, με καλή στράγγιση και γονιμότητα. Έχει έντονη υψομετρική διακύμανση και η μέση ετήσια θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 16 °C. και 18 °C.

Η ποικιλία Αγιωργήτικο είναι πολύ πλούσια σε φαινολικά συστατικά, που συντελούν στο βαθύ κόκκινο χρώμα του οίνου. Από την ποικιλία αυτή μπορούν να παραχθούν οίνοι με αρμονική γεύση, έντονο αρωματικό χαρακτήρα και υψηλό αλκοολικό τίτλο.

2.2. Οινοποίηση

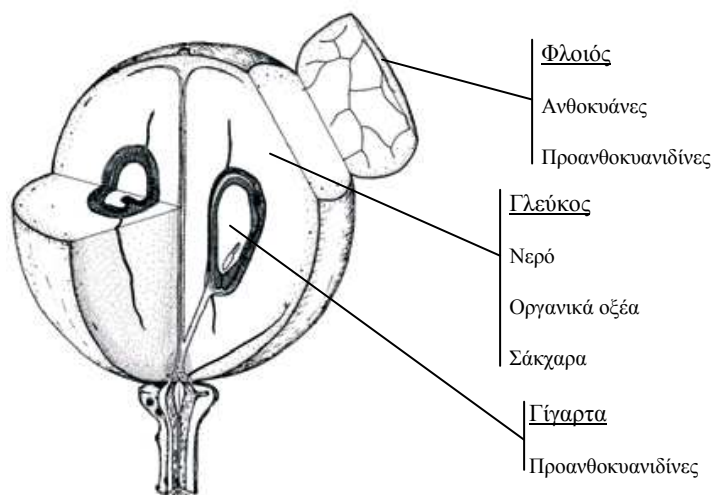
Εξωτερικά, στον φλοιό των σταφυλιών υπάρχουν μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να μετατρέψουν τα σάκχαρα σε αλκοόλη. Η οινοποίηση μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, είτε αυθόρμητα, είτε με την προσθήκη εξωγενών ζυμομυκήτων που πωλούνται στο εμπόριο. Σε αντίθεση με τις περισσότερες ζυμώσεις, όπου το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται πριν τον εμβολιασμό, στην οινοποίηση ο μούστος δεν αποστειρώνεται. Στην Ευρώπη συνήθως πρακτική σε πολλά οινοποιεία είναι η αυθόρμητη ζύμωση με αυτόχθονες ζύμες, που υπάρχουν εξωτερικά στην επιφάνεια των σταφυλιών και στο περιβάλλον του οινοποιείου και δεν είναι προβλέψιμη (Pretorius, 2000). Τα τελευταία χρόνια η οινοποίηση πραγματοποιείται με εμπορικά σκευάσματα επιλεγμένων στελεχών (Barre and Vezinhet, 1984) με σκοπό να εξασφαλιστεί σταθερότητα στο παραγόμενο προϊόν.

Πριν τον εμβολιασμό, προστίθεται διοξείδιο του θείου, που έχει αντιμικροβιακή δράση, με σκοπό την μείωση του ενδογενούς πληθυσμού. Η επίδραση δεν είναι πλήρως αποτελεσματική (Martinez et al., 1989; Henick-Kling et al., 1998). Τα εμπορικά σκευάσματα ζυμομυκήτων ενοφθαλμίζονται στον μούστο μετά την διαδικασία της πίεσης των σταφυλιών. Το αποτέλεσμα είναι η γρήγορη παραγωγή ενός επαναλήψιμου προϊόντος. (Rankine and Lloyd, 1963; Querol et al., 1992b; Degre, 1993; Pretorius, 2000; Mannazzu et al., 2002; Romano et al., 2003b). Όσον αφορά την ποιότητα του οίνου, υπάρχει διαφωνία όσον αφορά τη χρήση ή όχι εμπορικών σκευασμάτων ζυμών και το πώς οι αυτόχθονες ζύμες μπορούν να δώσουν έναν ιδιαίτερο χαρακτήρα (Fleet and Heard, 1993).

2.3. Ερυθρή οινοποίηση

Στην ερυθρή οινοποίηση σημαντικό ρόλο έχει και η διαδικασία της εκχύλισης, από το σταφύλι, των φαινολικών συστατικών και ιδιαίτερα των ανθοκυανών και των ταννινών που συμβάλλουν στο κόκκινο χρώμα του οίνου. Το στάδιο ωριμότητας του σταφυλιού είναι κρίσιμο για την περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά και κατ' επέκταση για τη διαμόρφωση του οίνου. Εξαρτάται από το αμπέλι, το κλίμα, τη

σύσταση του εδάφους και των φυσιολογικών και βιοχημικών διεργασιών, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ωρίμανση (Peynaud and Ribereau-Gayon, 1971; Ribereau-Gayon *et al.*, 1975; Champagnol, 1984; Huglin, 1986; Kanellis and Roubelakis-Angelakis, 1993; Flanzky, 2000; Roubelakis-Angelakis, 2001).



Εικόνα 2 : Κατανομή ανθοκυανών, σακχάρων και οργανικών οξέων στα μέρη της ράγας σταφυλιού, (Coombe, 1987).

Όπως σε όλους τους οίνους, έτσι και στην ερυθρή οινοποίηση, η πρώτη ύλη καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το παραγόμενο προϊόν. Το σταφύλι περιέχει φαινολικά συστατικά τόσο στους φλοιούς όσο και στα γίγαρτα (εικόνα 2). Η εκχύλισή τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η μέθοδος οινοποίησης, ο χρόνος εκχύλισης, η θερμοκρασία, η προσθήκη θειώδους ανυδρίτη, η δράση πηκτινολυτικών ενζύμων. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου και η ρύθμιση των υπόλοιπων παραμέτρων θα πρέπει να γίνει ανάλογα με την ποικιλία της πρώτης ύλης και με την ποιότητα του οίνου που είναι επιθυμητό να παραχθεί.

2.4. Χρήση του θειώδη ανυδρίτη στην οινοποίηση

Το διοξείδιο του θείου χρησιμοποιείται ευρέως στην οινοποίηση, έχει αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και προστατεύει τον οίνο από την προσβολή από μη επιθυμητούς μικροοργανισμούς τόσο στην αρχή της ζύμωσης, όσο και κατά την εμφιάλωση. Συνήθης οινολογική πρακτική είναι η προσθήκη διοξειδίου του θείου πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Η ποσότητα, που πρόκειται να προστεθεί στο μούστο εξαρτάται από την υγεία των σταφυλιών και τη θερμοκρασία που λαμβάνει χώρα η εκχύλιση. Η προσθήκη αυτή προσφέρει τον έλεγχο της ανάπτυξης ενδογενών μικροοργανισμών, ενώ παράλληλα προστατεύει το μούστο από οξειδώσεις. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται ο πληθυσμός των αυτοχθόνων μικροοργανισμών που υπάρχουν στο μούστο.

Μετά την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη προστίθενται οι εξωγενείς ζύμες για να ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση. Ένα ακόμη στάδιο της οινοποίησης που προστίθεται θειώδης ανυδρίτης είναι στη λήξη της αλκοολικής ζύμωσης. Προσφέρει προστασία από την προσβολή από βακτήρια, που μπορεί να αλλοιώσουν την ποιότητα του οίνου. Η επίδραση του θειώδους ανυδρίτη στους μικροοργανισμούς εξαρτάται από το είδος και το στέλεχος του μικροοργανισμού. Προκαλεί την καταστολή της ανάπτυξης τόσο των ζυμών που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*, όσο και αυτών που ανήκουν σε αυτό το γένος (Suzzi and Romano, 1982). Βέβαια, η προσθήκη εξωγενών ζυμών μπορεί από μόνη της να αναστείλει την ανάπτυξη άλλων ζυμομυκήτων (Henick-Kling et al., 1998). και επιταχύνει την επικράτηση αναερόβιων συνθηκών. Αν και οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στην επιφάνεια των σταφυλιών και στο περιβάλλον του οινοποιείου μπορεί να συμμετέχουν στη ζύμωση (Bouix et al., 1981), τα εμβολιασμένα στελέχη είναι αυτά που επικρατούν και ολοκληρώνουν τη ζύμωση.

Εκτός από τις αντιμικροβιακές ιδιότητες, το διοξείδιο του θείου διευκολύνει την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από τους φλοιούς και τα γίγαρτα. Με αυτόν τον τρόπο συμβάλει στην αύξηση της έντασης και της σταθεροποίησης του χρώματος. Αυξάνει την εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών από τους φλοιούς και επιδρά στις ανθοκυάνες οι οποίες μεταπίπτουν στην άχρωμη μορφή, αν και αυτή η επίδραση είναι αναστρέψιμη. Επιδρά επίσης στα φλαβονοειδή και καθυστερεί τη δημιουργία σταθερών συμπλόκων μεταξύ ανθοκυανών και ταννινών.

Κεφάλαιο 1: Φαινολικά συστατικά του οίνου

1. Εισαγωγή

Τα φαινολικά συστατικά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ερυθρή οينوποίηση συμμετέχοντας κυρίως στο χρώμα και τη γεύση του οίνου. Έχουν αντιβακτηριδιακή και αντιοξειδωτική δράση καθώς οι ομάδες υδροξυλίου στα μόρια των πολυφαινολών μπορούν να δεχτούν ένα ηλεκτρόνιο και να σχηματίσουν σταθερές ρίζες. Παρέχουν προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις στους καταναλωτές κυρίως του ερυθρού οίνου. Προέρχονται από διαφορετικά μέρη της σταφυλής και εκχylίζονται κατά τη διάρκεια της οينوποίησης. Η δομή τους αλλάζει κατά την παλαίωση και την παραμονή του οίνου σε βαρέλι ή στη φιάλη. Στο κρασί κατηγοριοποιούνται στα φλαβονοειδή και στα μη φλαβονοειδή.

Η περιεκτικότητα του οίνου σε φλαβονοειδή εξαρτάται από την συγκέντρωσή τους στο σταφύλι, από τη διαδικασία εκχύλισης καθώς και από την επίδραση χημικών πρόσθετων όπως το διοξείδιο του θείου. Στην ερυθρή οينوποίηση τα φλαβονοειδή προέρχονται από τους φλοιούς, τα γίγαρτα, τους βόστρυχες ή/και τα φύλλα αν υπάρχουν στη δεξαμενή. Η εκχύλιση διαρκεί μέχρι τα στέμφυλα να απομακρυνθούν από τη δεξαμενή. Επίσης η εκχύλιση τους εξαρτάται από τη διαλυτότητα των ουσιών, από το στάδιο ωρίμανσης του σταφυλιού, από τη συγκέντρωση της αλκοόλης και από τη θερμοκρασία.

Το χρώμα των ερυθρών οίνων οφείλεται κυρίως στο περιεχόμενο των ανθοκυανών. Ο πολυμερισμός των ελεύθερων ανθοκυανών είναι ουσιώδης για τη σταθερότητα του χρώματος καθώς η ελεύθερη μορφή των ανθοκυανών είναι ασταθής.

1.1. Κατάταξη φαινολικών συστατικών

Τα φαινολικά συστατικά διακρίνονται στα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή.

- Φλαβονοειδή: φλαβανόλες, φλαβονόλες, προκυανιδίνες, ταννίνες, ανθοκυάνες
- Μη φλαβονοειδή: βενζοϊκά οξέα, υδροξυκινναμωμικά οξέα

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα ανθρακικό σκελετό C₆ - C₃ - C₆ που αποτελείται από δύο φαινολικούς δακτυλίους (Α και Β) ενωμένους με έναν κεντρικό πυρανικό (περιέχει οξυγόνο) δακτύλιο (C). Περιέχουν μία ή περισσότερες υδροξυομάδες στον δακτύλιο. Αν και εμπεριέχουν ομάδες αλκοολών δεν έχουν ιδιότητες όμοιες με των αλιφατικών αλκοολών.

Τα κυριότερα φλαβονοειδή στο κρασί είναι οι κατεχίνες (φλαβαν-3-όλες) και οι ανθοκυάνες. Συναντώνται ελεύθερα ή δεσμευμένα σε άλλες φλαβονοειδείς ενώσεις, σε σάκχαρα, και σε μη φλαβονοειδείς ενώσεις ή σε συνδυασμό των παραπάνω. Η βιολογική τους δράση στον καρπό τόσο των σταφυλιών όσο και άλλων φυτών είναι η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε παθογόνα μικρόβια, έντομα και φυτοφάγα ζώα.

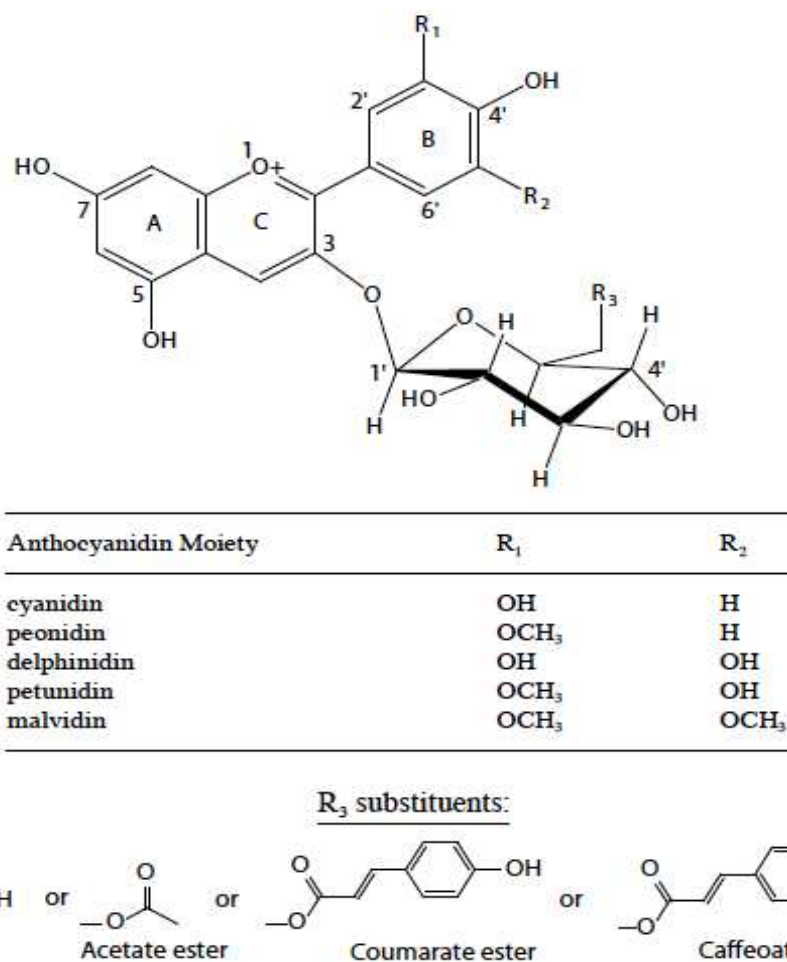
Τα μη φλαβονοειδή συστατικά του οίνου κατηγοριοποιούνται στα υδροξυβενζοϊκά και τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, της πτητικές φαινόλες, τα στιλβένια και κάποια άλλα χημικά στοιχεία (κουμαρίνες). Παρόλο που δεν είναι έγχρωμες ενώσεις, συμβάλλουν στην ένταση και τη σταθερότητα του χρώματος με αντιδράσεις μεταξύ τους ή με άλλες χημικές ενώσεις.

1.2. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις σταφυλιών

1.2.1. Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες συναντώνται στους φλοιούς των σταφυλιών και στα *Vitis vinifera* βρίσκονται με τη μορφή 3-O-μονογλυκοζιτών των πέντε κυριότερων ανθοκυανιδινών: δελφινιδίνης, κυανιδίνης, πετουνιδίνης, πεονιδίνης και μαλβιδίνης. Διαφέρουν μεταξύ τους στη θέση των υδροξυλίων και των μεθοξυ-ομάδων του Β δακτυλίου (εικόνα 3). Η αλκυλίωση γίνεται στο έκτο άτομο άνθρακα του μορίου της

γλυκόζης με εστεροποίηση με οξικό, κουμαρικό και καφεϊκό οξύ (Mazza and Miniati, 1993). Πρόσφατα βρέθηκε και η ύπαρξη αλκυλιωμένων ανθοκυανών με γαλακτικό οξύ (Alcalde-Eon et al. 2006).



Εικόνα 3 : Χημικός σκελετός και διαφοροποίηση ανθοκυανών.

Το περιεχόμενο των ανθοκυανών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση βασισμένη σε χημικά κριτήρια κάποιων ποικιλιών. Η σχέση που υπάρχει μεταξύ του συνόλου των ανθοκυανών και της συγκέντρωσης της κάθε ένωσης ξεχωριστά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό μιας ποικιλίας (Roggero et al. 1986b; Ortega Meder et al. 1994; Baldi et al. 1993; Roggero et al. 1988; Mattivi et al. 2006).

Η περιεκτικότητα της κάθε ποικιλίας σε ανθοκυάνες εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: την ποικιλία, την ωριμότητα των πρέμων, το κλίμα και την περιοχή όπου καλλιεργούνται και από την απόδοση (Roggero et al. 1986a; Gonzalez-San Jose et al. 1990; Vivas et al. 2001). Όσον αφορά τη σύσταση του οίνου σε ανθοκυάνες, εξαρτάται από την εκχύλιση και τις οινοποιητικές τεχνικές. Η εκχύλιση των

ανθοκυανών από τους φλοιούς μπορεί να λάβει μέρος πριν ή κατά τη διάρκεια της οينوποίησης.

Οι ανθοκυάνες μεταπίπτουν σε τέσσερις διαφορετικές μορφές, τη μορφή του φλαβυλίου (κόκκινο), τη μορφή της κινόνης (μπλε), τη μορφή της ημιακετάλης (άχρωμη) και τη μορφή της χαλκόνης (άχρωμη) (Brouillard, 1982). Στο κρασί που το pH κυμαίνεται κοντά στο 3,5 η ισορροπία τείνει προς τη μορφή της ημιακετάλης. Όσο προχωράει η εκχύλιση, το περιεχόμενο των ελεύθερων ανθοκυανών μειώνεται αλλά η σταθερότητα του χρώματος αυξάνεται καθώς οι ανθοκυάνες πολυμερίζονται με τις προκυανιδίνες. Στην αρχή, η εκχύλιση των φλαβονοειδών από τους φλοιούς δεν εξαρτάται από το περιεχόμενο της αλκοόλης. Στην τελική συγκέντρωση όμως, όταν αυξάνεται η αλκοόλη γίνεται πιο εύκολη η εκχύλιση των φλαβονοειδών τόσο στους φλοιούς όσο και στα γίγαρτα (Canals et al. 2005)..

1.2.2. Φλαβανόλες, φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες και οι φλαβανόλες επίσης ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών ενώσεων. Οι φλαβανόλες (φλαβαν-3-όλες), είναι υδροξυλιωμένες στην 3^η θέση και συναντώνται ως μονομερή, ολιγομερή και πολυμερή. Οι κύριες ενώσεις αυτής της ομάδας είναι η (+) κατεχίνη και το ισομερές της, η (-) επικατεχίνη (Su and Singleton 1969).

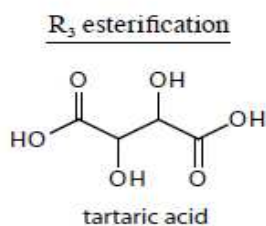
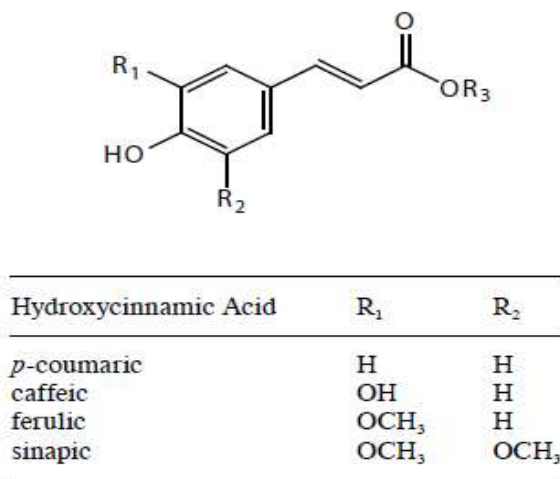
Τα ολιγομερή και τα πολυμερή των φλαβανολών που αλλιώς ονομάζονται συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και να τις καταβυθίζουν. Οι φλαβονόλες έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι στη UV ακτινοβολία, και βρίσκονται στο φλοιό των σταφυλιών και στα φύλλα. Κάποιες φλαβονόλες μπορούν να βρεθούν στο γλεύκος (Pereira et al. 2006), αλλά όχι στα γίγαρτα. (Rodriguez Montealegre et al. 2006). Η κυριότερη ομάδα είναι οι 3-γλυκοζίτες της κερκετίνης που είναι δι-υδροξυλιωμένη στον Β δακτύλιο.

1.2.3. Υδροξυβενζοϊκά οξέα

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα χαρακτηρίζονται από έναν C6-C1 σκελετό. Στον οίνο συναντώνται κυρίως στην ελεύθερη τους μορφή (Drawert et al. 1974; Fernandez de Simon et al. 1992; Garcia-Viguera and Bridle 1995; Guntert et al. 1986; Monagas et al. 2005a,b; PenaNeira et al. 2000; Pozo-Bayon et al. 2003; Salagoity-Auguste and Bertrand 1984; Vanhoenacker et al. 2001). Το γαλλικό οξύ βρίσκεται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις ανάμεσα στα υδροξυβενζοϊκά οξέα και προέρχεται από το σταφύλι αλλά και από την υδρόλυση ταννινών. Η συγκέντρωσή του μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία του αμπελιού και τις συνθήκες ανάπτυξης

1.2.4. Υδροξυκινναμωμικά οξέα

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα χαρακτηρίζονται από έναν C6-C3 σκελετό (εικόνα 4). Το καφταρικό οξύ κυριαρχεί σε σχέση με τα υπόλοιπα υδροξυκινναμωμικά οξέα σε ποσοστό περίπου 50%



Εικόνα 4 : Χημικός σκελετός υδροξυκινναμωμικών οξέων.

Η συγκέντρωση των υδροξυκινναμωμικών οξέων εξαρτάται από την ποικιλία της αμπέλου, τις συνθήκες ανάπτυξης, το κλίμα. Και αυτή η ομάδα εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία στη συγκέντρωση. έχουν αναφερθεί συγκεντρώσεις 100 mg/L.

1.3. Επιπτώσεις της κατανάλωσης ερυθρού οίνου στην υγεία του ανθρώπου

Η κατανάλωση οίνου και ιδιαίτερα ερυθρού που έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά έχει τρομερές επιπτώσεις στην αρτηριοσκλήρωση και στη στεφανιαία νόσο. Ιδιαίτερα στον δυτικό κόσμο, όπου οι ασθένειες της καρδιάς είναι υπαίτιες για μεγάλη θνησιμότητα, η κατανάλωση ερυθρού οίνου έχει συσχετιστεί με τη μείωση των καρδιακών νοσημάτων (Wine Institute, 1997). Η κατεχίνη και η κερκετίνη, που είναι φυσικά αντιοξειδωτικά φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη μείωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η ρεσβερατρόλη θεωρείται ότι έχει ισχυρή αντικαρκινική δράση. Επίσης η κερκετίνη και η trans ρεσβερατρόλη έχουν βρεθεί να μειώνουν τα καρκινικά κύτταρα στο μαστό. Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού απορροφώνται από τον οργανισμό και αυξάνουν τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών στο αίμα.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Διαδικασία ζύμωσης

Τα σταφύλια προήλθαν από την περιοχή του Ασπρόκαμπου Νεμέας με υψόμετρο 807 μέτρα. Ο τρύγος πραγματοποιήθηκε στις 15 Οκτώβρη 2012, όταν τα σταφύλια είχαν φτάσει στη φαινολική ωριμότητα. Πραγματοποιήθηκε σπάσιμο των ραγών στο οινοποιείο. Ο μούστος μαζί με τα στέμφυλα ισομοιράστηκε σε 6 δοχεία 12 λίτρων. Στα 3 από αυτά, προστέθηκε 80mg/L μετα-διθειώδες κάλιο, στο καθένα. Έπειτα μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και αφέθηκαν για ζύμωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η οποία δεν ξεπέρασε τους 22°C μέσα στα βαρέλια. Την πρώτη και την τρίτη μέρα της ζύμωσης προστέθηκαν 100mg/L και 200mg/L θρεπτικά υλικά, αντίστοιχα. Καθ όλη τη διάρκεια της οινοποίησης γινόταν ανάδευση του μούστου με τα στέμφυλα 2 φορές την ημέρα (ανά 12 ώρες) με ανακίνηση του βαρελιού. Την 11^η μέρα, όταν η πυκνότητα (density) έφτασε στο 1000, τα στέμφυλα απομακρύνθηκαν. Την τελευταία μέρα της ζύμωσης προστέθηκε 80mg/L μετα-διθειώδες κάλιο στο κάθε βαρέλι για να σταματήσει η ζύμωση.

2.2. Φυσικοχημικές αναλύσεις

Σε κάθε δειγματοληψία για την παρατήρηση της πληθυσμιακής αύξησης (ανά 12 ώρες) γινόταν προσδιορισμός της θερμοκρασίας, της πυκνότητας, του pH και της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας. Την 1^η και την 14^η (τελευταία) μέρα έγινε ποσοτικός προσδιορισμός ολικού και ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη. Την 14^η (τελευταία) μέρα της ζύμωσης προσδιορίστηκε ο αλκοολικός βαθμός με τη μέθοδο της απόσταξης.

2.2.1. Μέτρηση ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη

- σε κωνική φιάλη των 250 mL προστίθενται
- 50 mL οίνου
- 5 mL διαλύματος H₂SO₄ 25%
- 1 mL δείκτη αμύλου
- αναδέυση
- τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα ιωδίου 0.02 N (εμφάνιση μπλε χροιάς σταθερής για 20-30 sec)

Έστω A τα mL του διαλύματος ιωδίου που καταναλώθηκαν.

$$\text{Ελεύθερος SO}_2 \text{ (mg/L)} = 12.8 * A$$

* Ο προσδιορισμός πρέπει να γίνεται αμέσως μετά το άνοιγμα της φιάλης γιατί ο θειώδης ανυδρίτης οξειδώνεται από τον αέρα.

2.2.2. Μέτρηση ολικού θειώδους ανυδρίτη

- σε κωνική φιάλη των 250 mL προστίθενται
- 50 mL οίνου
- 25 mL διαλύματος KOH 1N
- ανακίνηση και παραμονή για 10 min
- προσθήκη 10 mL διαλύματος H₂SO₄ 25%
- 1 mL δείκτη αμύλου
- αναδέυση
- τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα ιωδίου 0.02 N (εμφάνιση μπλε χροιάς σταθερής για 20-30 sec)

Έστω B τα mL του διαλύματος ιωδίου που καταναλώθηκαν.

$$\text{Ολικός SO}_2 \text{ (mg/L)} = 12.8 * B$$

2.2.3. Μέτρηση ολικής οξύτητας (με δείκτη φαινολοφθαλεΐνης)

Σε κωνική φιάλη μεταφέρονται:

- 10 mL δείγματος (απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα με αντλία κενού)
- 40 mL αποσταγμένο νερό
- 3-4 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης
- ανάδευση
- τιτλοδότηση με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH 0,1 N)
- εμφάνιση ρόδινης χροιάς σταθερής για 30 sec

Έστω n τα mL του διαλύματος ιωδίου που καταναλώθηκαν.

$$\text{Ολική οξύτητα (g/L τρυγικού οξέος)} = 0.75 * n$$

2.2.4. Μέτρηση αλκοολικού βαθμού

- Προσθήκη 200mL οίνου σε ογκομετρική φιάλη
- Μέτρηση θερμοκρασίας
- Μετάγγιση δείγματος στη σφαιρική φιάλη της αποστακτικής συσκευής
- Ξέπλυμα 4 φορές με 5mL νερού κάθε φορά
- Προσθήκη 10mL εναιωρήματος CaOH
- Προσθήκη μερικών τεμαχίων πορώδους ανενεργού υλικού (ελαφρόπετρα)
- Σύνδεση σφαιρικής φιάλης στην αποστακτική συσκευή
- Συγκέντρωση αποστάγματος στην ογκομετρική των 200mL
- Συλλογή $\frac{3}{4}$ του αρχικού όγκου του αποστάγματος
- Συμπλήρωση έως τα 200mL με απιονισμένο νερό
- Μεταφορά σε ογκομετρικό κύλινδρο
- Μέτρηση αλκοολικού βαθμού με αλκοολόμετρο
- Μέτρηση θερμοκρασίας
- Διόρθωση αλκοολικού βαθμού με τη βοήθεια του παρακάτω πίνακα

*η θερμοκρασία του αποστάγματος δεν πρέπει να αποκλίνει από την αρχική θερμοκρασία πάνω από ± 2 °C και του αραιωμένου από στάγματος, από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος πάνω από ± 5 °C.

2.3. Προσδιορισμός χρώματος

2.3.1. Ένταση / Απόχρωση (420, 520, 620nm)

Στους ερυθρούς οίνους το μέγιστο απορρόφησης παρουσιάζεται στα 520 nm (ερυθρό). Με την πάροδο του χρόνου, παλαίωση, η απορρόφηση στα 520 nm μειώνεται και αυξάνεται η απορρόφηση στα 420 nm (κίτρινο). Για την αξιολόγηση αυτών των χρωμάτων, λαμβάνεται υπόψη η απορρόφηση στα 620 nm (κυανό), που αποδίδεται στις μορφές της βάσης, της κινόνης, των ελευθέρων και των ενωμένων ανθοκυανών. Η ένταση του χρώματος στον οίνο αντικατοπτρίζεται από την αναλογία των απορροφήσεων A_{420} , A_{520} και A_{620} (Glogies 1984) και το άθροισμα της A_{420} και A_{520} (Sudraud 1958). Η απόχρωση υπολογίζεται από την αναλογία των απορροφήσεων A_{420} και A_{520} (Glogies 1984, Sudraud 1958).

- Φυγοκέντρηση οίνου ή γλεύκους σε 4000rpm για 5 λεπτά
- Μέτρηση απορρόφησης στα 420nm, 520nm και 620nm με κυψελίδες γυαλιού 10mm ή 1mm
- Ένταση = $A_{420} + A_{520} + A_{620}$
- Απόχρωση = A_{420} / A_{520}

*Πολλαπλασιασμός αποτελεσμάτων *10 αν η μέτρηση γίνει με κυψελίδες 1mm

2.3.2. Δείκτης Ολικών Φαινολικών (Δ.Φ.Ο)

Η μέθοδος βασίζεται στην στο γεγονός ότι οι αρωματικοί δακτύλιοι παρουσιάζουν ισχυρή απορρόφηση στο υπεριώδες φως. Το μέγιστο της απορρόφησης παρατηρείται στα 280nm. Μετρά την περιεκτικότητα των φλαβονοειδών (ανθοκυάνες, ταννίνες), των μη φλαβονοειδών φαινολών (φαινολικά οξέα) και κάποιων μη φαινολικών ουσιών. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι ορισμένες ενώσεις, (κινναμωμικά οξέα και χαλκόνες) δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης

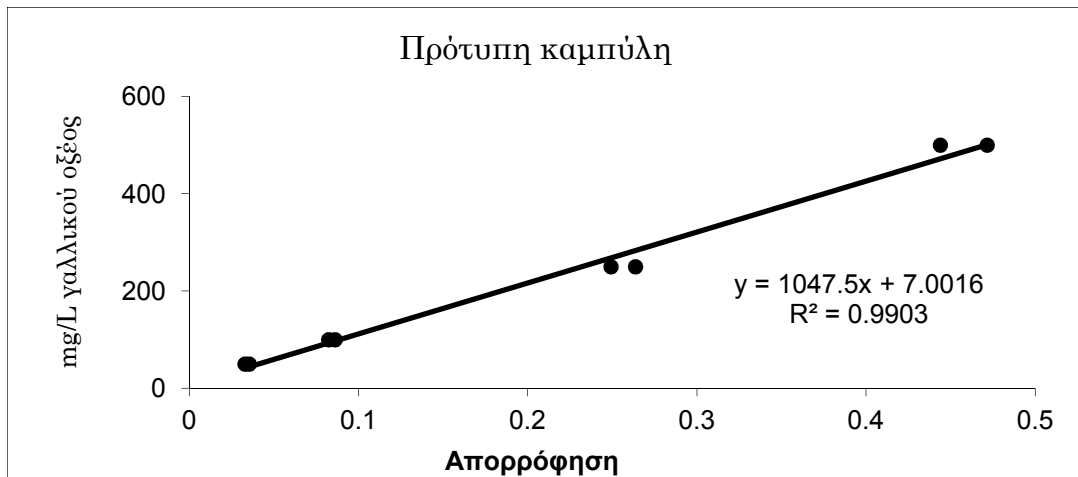
στα 280nm, ότι στην απορρόφηση παρεμβάλλονται και ενώσεις που περιέχουν αρωματικό δακτύλιο στο μόριό τους (πεπτίδια) και ότι δεν προσφέρει πληροφορίες για το είδος των φαινολών που συμμετέχουν. Τα σφάλματα αυτά δεν θεωρούνται σημαντικά καθώς η περιεκτικότητα των παραπάνω ουσιών στα σταφύλια και στους οίνους είναι χαμηλή. (Am. J. Enol. Vitic. 57(3):280-288. 2006)

- Φυγοκέντρηση οίνου ή γλεύκους σε 4000rpm για 5 λεπτά
- Αραίωση 1:100 σε ογκομετρική φιάλη των 100mL
- Μέτρηση απορρόφησης στα 280nm με κυψελίδες χαλαζία 1cm
- Δ.Φ.Ο. = OD * αραίωση δείγματος

2.4. Folin-Ciocalteu (765nm)

Η μέθοδος βασίζεται στον ιονισμό των φαινολών σε αλκαλικό περιβάλλον, στο οποίο μπορούν να οξειδωθούν εύκολα με την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Η οξείδωση μετατρέπει το κίτρινο χρώμα σε μπλε με την πάροδο του χρόνου. Η αλλαγή αυτή παρατηρείται σε φασματοφωτόμετρο στα 765nm.

- Φυγοκέντρηση οίνου ή γλεύκους σε 4000rpm για 5 λεπτά
- Αραίωση οίνου 1:10 σε ογκομετρική φιάλη των 10mL
- Σε ογκομετρική φιάλη των 20mL προστίθενται:
 - 10mL απιονισμένο H₂O
 - 200μL αραιωμένου οίνου
 - 1mL αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
 - Φυγοκέντρηση και παραμονή για 1 με 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
 - Προσθήκη 3mL άνυδρου ανθρακικού νατρίου 20% (Na₂CO₃)
 - Προσθήκη απιονισμένου H₂O μέχρι τα 20mL
- Μέτρηση απορρόφησης στα 765nm με πλαστική κυψελίδα 1cm σε λάμπα αλογόνου
- Παραμονή για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Μέτρηση απορρόφησης στα 765nm με πλαστική κυψελίδα 1cm σε λάμπα αλογόνου
- Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

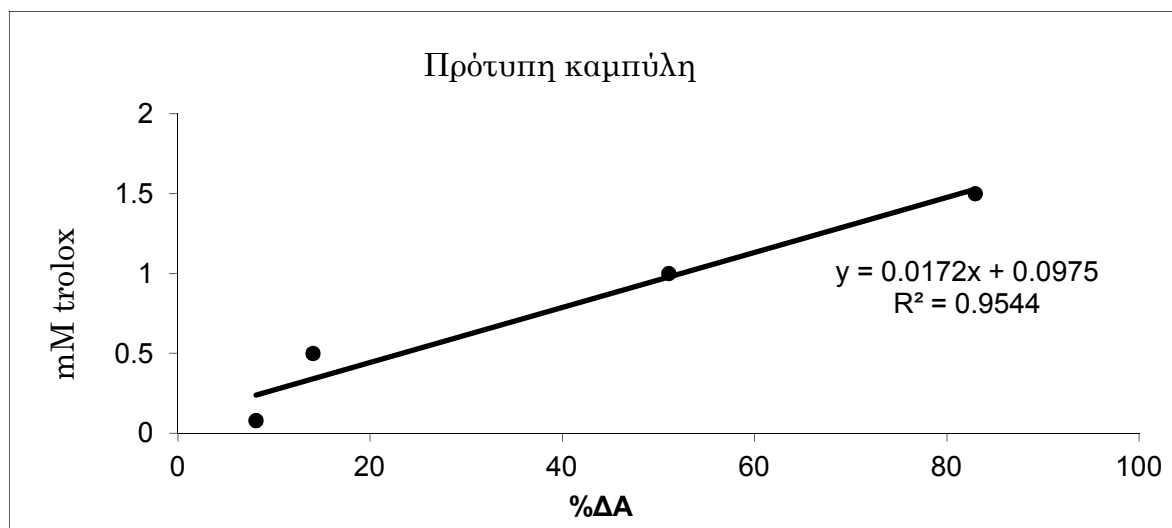


2.5. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του οίνου.

- Διήθηση σε φίλτρο 0,45μL
- Σε erendorf προστίθενται:

- 25μL αραιωμένου οίνου (1:10)
 - 975μL διαλύματος DPPH
- Vortex για 1 λεπτό
- Μέτρηση απορρόφησης στα 515nm με πλαστική κυψελίδα στένωσης σε λάμπα αλογόνου (blank: H₂O)
- Παραμονή για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Μέτρηση απορρόφησης στα 515nm με πλαστική κυψελίδα στένωσης σε λάμπα αλογόνου
- $\% \Delta A = (A_{\text{αρχική}} - A_{\text{τελική}}) * 100 / A_{\text{αρχική}}$
- Πρότυπη καμπύλη trolox



2.6. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του οίνου με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

Στήλη: LiCrosphere (250mm * 4mm * 5μm) RP18

Διαλύτης A: 1mL/L Ορθοφωσφορικό οξύ

Διαλύτης B: Ακετονιτρίλιο και Διαλύτης A σε αναλογία, 4:6

Φιλτράρισμα με διάμετρο πόρων 0,2μm

2.7. Προσδιορισμός ανθοκυανών του οίνου με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

Στήλη: LiCrosphere (250mm * 4mm * 5μm) RP18

Διαλύτης A: 10% Μυρμηγκικό οξύ

Διαλύτης B: Μεθανόλη

Φιλτράρισμα με διάμετρο πόρων 0,2μm

2.8. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών στις ράγες με φασματοφωτομετρικές μεθόδους

2.8.1. Μέθοδος Pland

Διαδικασία

- Μέτρηση βάρους 50 ραγών
- Ομογενοποίηση με ultra turex στις 24.000 rpm για (περίπου) 30 sec
- Μεταφορά 1gr ομογενοποιημένων ραγών σε σωλήνα φυγοκέντρησης
- Προσθήκη 10mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης 50% v/v, PH2
- Ανάδευση για 1ώρα με parafilm και αλουμινόχαρτο
- Φυγοκέντρηση σε 4000rpm για 10 λεπτά
- Μεταφορά 0,5mL εκχυλίσματος σε δοκιμαστικό σωλήνα
- Προσθήκη 10mL διαλύματος HCl (1M).
- Ανάδευση με vortex
- Παραμονή για 3 ώρες σε σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου
- Φωτομέτρηση σε 520nm και 700nm, (πλαστική κυψελίδα, λάμπα αλογόνου) και στα 280nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου).

Μετρήσεις

Στα **700nm**: Η τιμή πρέπει να είναι <0.01.

Ανθοκυάνες (mg) ανά ράγα =

$$\frac{A_{520}}{500} * \text{συντελεστής αραίωσης} * \frac{\text{ολικός όγκος εκχυλίσματος}}{100} * \frac{\text{βάρος 30 ραγών (gr)}}{\text{βάρος ομογενοποιημένου για εκχύλιση (gr)}} * \frac{1000}{30}$$

$$\text{Ανθοκυάνες (mg) / gr ράγας} = \frac{\text{Ανθοκυάνες (mg) ανά ράγα}}{\text{μέσο βάρος ράγας}}$$

Ολικά φαινολικά ανά ράγα =

$$A_{280} * \text{συντελεστής αραίωσης} * \frac{\text{ολικός όγκος εκχυλίσματος}}{100} * \frac{\text{βάρος 30 ραγών (gr)}}{\text{βάρος ομογενοποιημένου για εκχύλιση (gr)}} * \frac{1}{30}$$

$$\text{Ολικά φαινολικά / gr ράγας} = \frac{\text{Ολικά φαινολικά ανά ράγα}}{\text{μέσο βάρος ράγας}}$$

2.8.2. Μέθοδος Methyl cellulose

Διαδικασία

1. Μέτρηση βάρους 50 ραγών
2. Ομογενοποίηση με ultra turex στις 24.000 rpm για (περίπου) 30 sec
3. Μεταφορά 1g του ομογενοποιημένου δείγματος σε σωλήνα φυγοκέντρησης
4. Προσθήκη 10mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης 50% (όχι οξινισμένης).
5. Ανάδευση για 1h με parafilm και αλουμινόχαρτο
6. Φυγοκέντρηση για 10min σε 4000rpm.
7. Παίρνουμε 2 πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου (control και sample):

a. control:

1mL εκχυλίσματος (ή 250μL οίνου) + 2mL ammonium sulfate + H₂O (τελ. V = 10mL)

b. treatment:

1mL εκχυλίσματος (ή 250μL οίνου) + 3mL methyl cellulose

ανάδευση σε vortex και παραμονή για 2-3 λεπτά

+ 2mL ammonium sulfate + H₂O (τελ. V = 10mL)

8. Φυγοκέντρωση για 5min σε 4000rpm

9. Φωτομέτρηση στα 280nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου).

Μετρήσεις

$$A_{280} = A_{\text{control}} - A_{\text{treatment}}$$

Μετατροπή σε mg/L κατεχίνης με καμπύλη αναφοράς κατεχίνης (C_{tannin})

Συγκέντρωση ταννινών = $C_{\text{tannin}} * 10$ (mg/L κατεχίνης)

Συγκέντρωση ταννινών σε πολτό (mg/g) = $C_{\text{tannin}} * 10 * V_e / W_h$

V_e : τελικός όγκος εκχυλίσματος (L)

W_h : βάρος ομογενοποιημένου δείγματος (g)

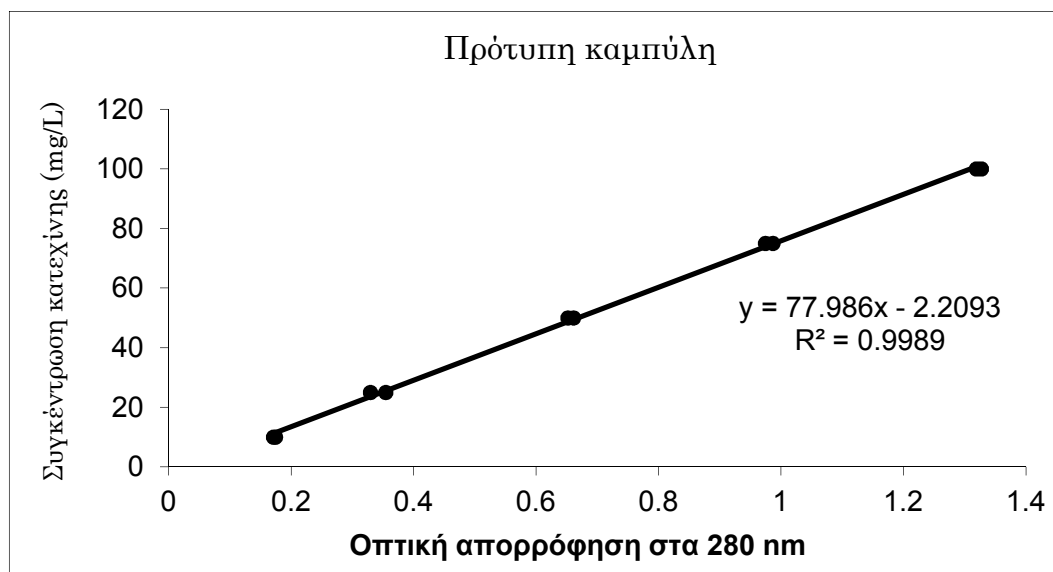
Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης

Η καμπύλη αναφοράς κυμαίνεται από 10 έως 200 mg/L κατεχίνη.

Συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 150, 200 mg/L

Προσθήκη 100μL, 500μL, 1mL, 1,5mL και 2mL κατεχίνης σε τελικό όγκο 10 mL H₂O.

Φωτομέτρηση στα 280 nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου)



2.9. Προσδιορισμός ανθοκυανών των ραγών με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

Διαδικασία

- Μέτρηση βάρους 100 ραγών
- Ξεφλούδισμα 100 ραγών
- Αναμονή μέχρι να απομακρυνθεί η υγρασία
- Μέτρηση βάρους φλοιών
- Συσκευασία φλοιών και μέτρηση βάρους μαζί με τη συσκευασία
- Αποθήκευση στους -2°C ,
- Λυοφυλίωση
- Μέτρηση βάρους μαζί με τη συσκευασία
- Δημιουργία σκόνης φλοιών
- Προσθήκη σε falcon 0,5gr σκόνης φλοιών + 20mL οξινισμένης μεθανόλης
- Ανάδευση σε shaker στις 60rpm για 4 ώρες στους 20°C
- Φυγοκέντρηση στις 9000rpm για 15 λεπτά στους 20°C
- Αποθήκευση υπερκειμένου στους -2°C ,
- Προσθήκη στο ίζημα 10mL οξινισμένης μεθανόλης
- Ανάδευση σε shaker στις 60rpm για 18 ώρες στους 20°C
- Φυγοκέντρηση στις 9000rpm για 15 λεπτά στους 20°C

- Αποθήκευση υπερκειμένου στους -2°C
- Προσθήκη στο ίζημα 10mL οξινισμένης μεθανόλης
- Ανάδευση σε shaker στις 60rpm για 24 ώρες στους 20°C
- Φυγοκέντρωση στις 9000rpm για 15 λεπτά στους 20°C
- Αποθήκευση υπερκειμένου στους -2°C
- Φιλτράρισμα με διάμετρο πόρων $0,2\mu\text{m}$

Στήλη: LiCrosphere (250mm * 4mm * $5\mu\text{m}$) RP18

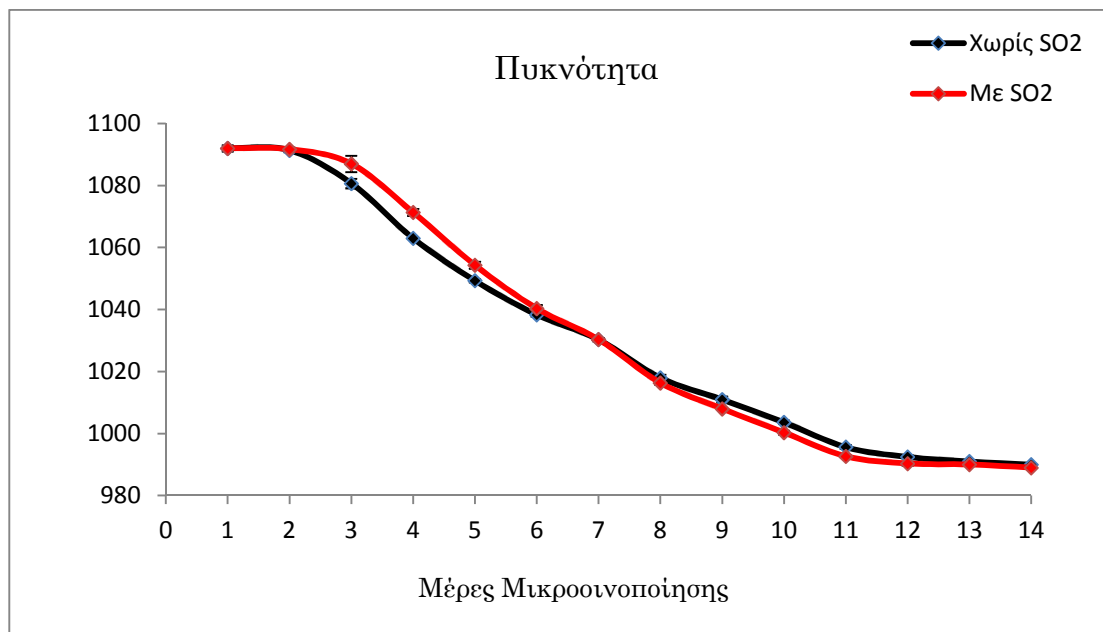
Διαλύτης A: 10% Μυρμηγκικό οξύ

Διαλύτης B: Μεθανόλη

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

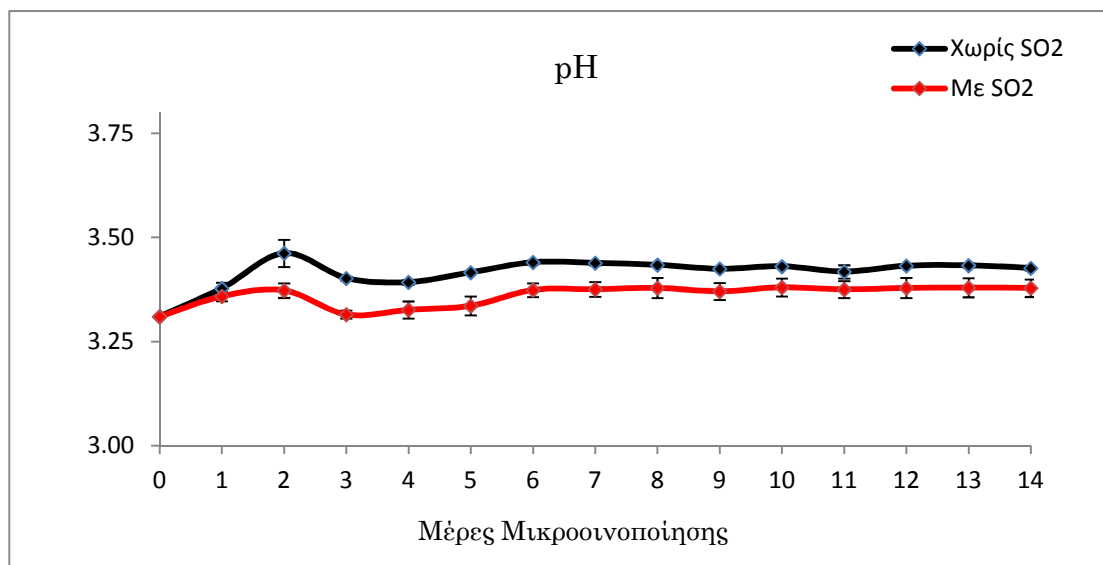
3.1. Φυσικοχημικές αναλύσεις

Η εξέλιξη της ζύμωσης, όπως παρατηρήθηκε από τη μεταβολή της πυκνότητας ήταν ομαλή.



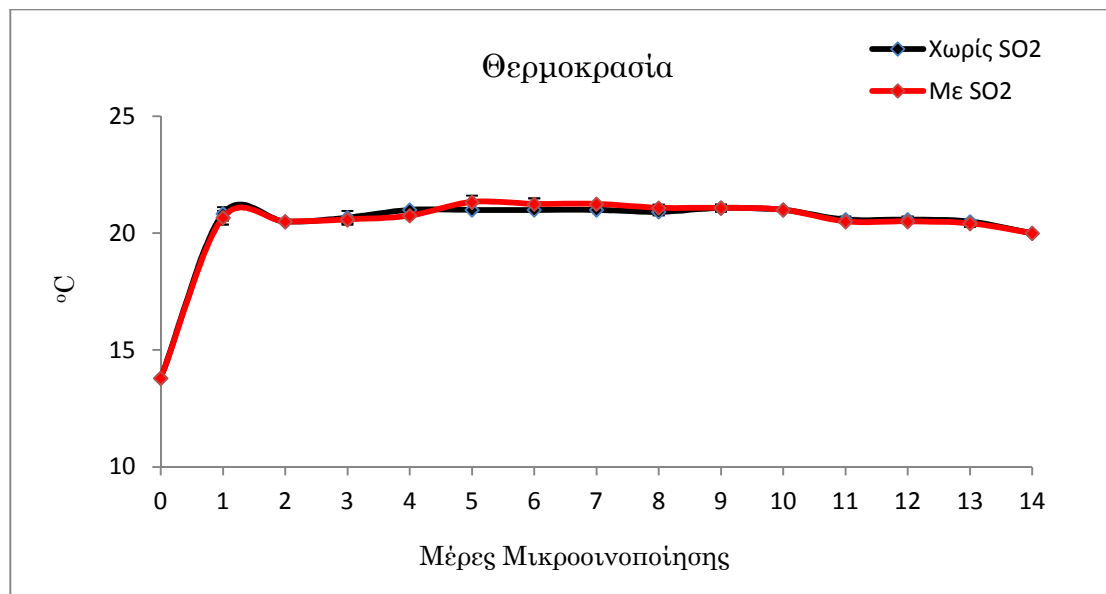
Σχήμα 1: Εξέλιξη ζύμωσης μέσω της μεταβολής της πυκνότητας.

Το pH παρέμεινε σταθερό (μεταξύ του 3,3 και 3,4) καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης.



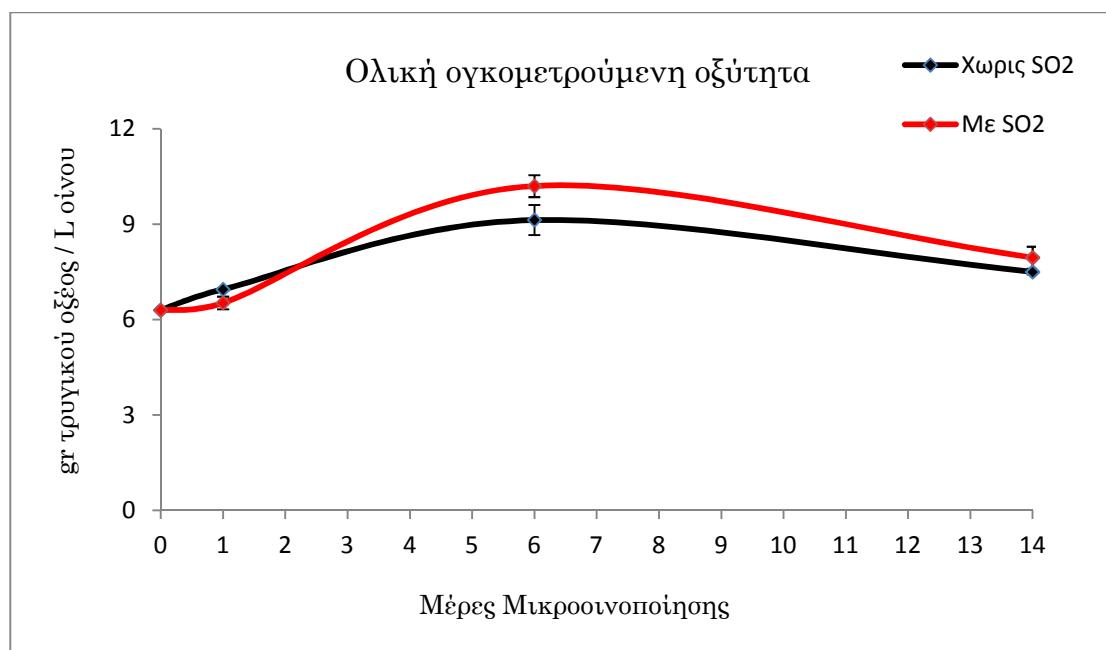
Σχήμα 2: Μεταβολή του pH.

Η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 20 έως 22 °C σε όλη τη διάρκεια της μικροοινοποίησης.



Σχήμα 3: Μεταβολή της θερμοκρασίας.

Η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κυμάνθηκε από 6 έως 9 gr τρυγικού οξέος ανά λίτρο οίνου.



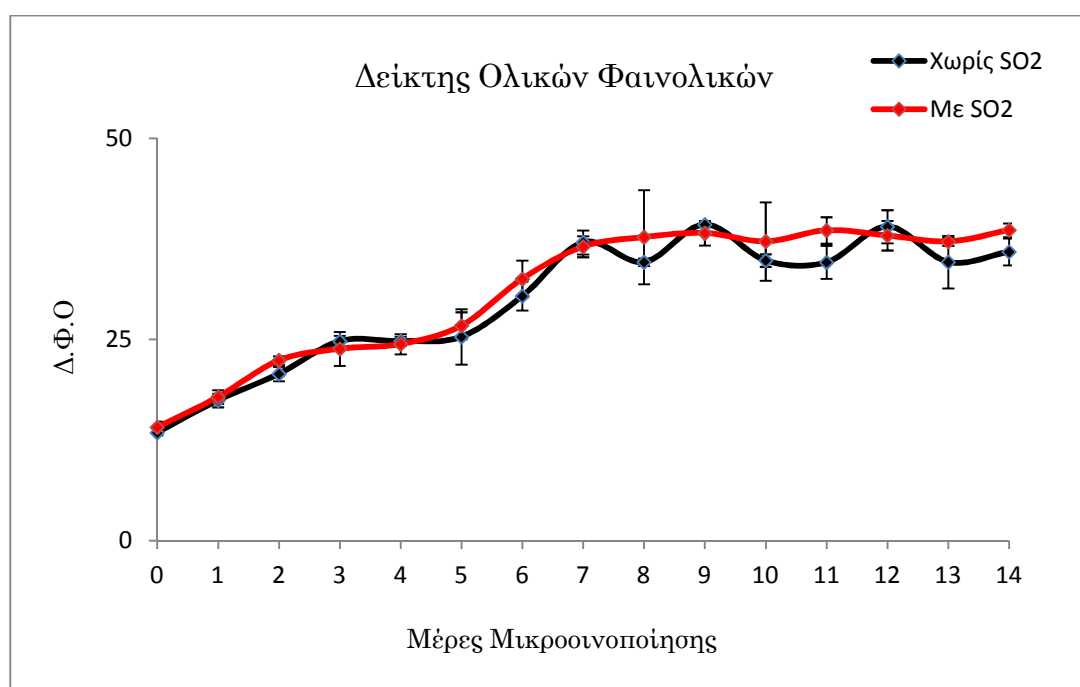
Σχήμα 4: Μεταβολή της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας.

3.1.1. Θειώδης ανυδρίτης και αλκοολικός βαθμός

Ο ελεύθερος και ο ολικός θειώδης ανυδρίτης ήταν 11,5 mg/L στη μικροοινοποίηση χωρίς την προσθήκη SO₂ και 29,4 mg/L στη μικροοινοποίηση μετά την προσθήκη SO₂ και 16,6 mg/L στη μικροοινοποίηση χωρίς την προσθήκη SO₂ και 38,4 mg/L στη μικροοινοποίηση μετά την προσθήκη SO₂, την πρώτη και την τελευταία μέρα της ζύμωσης, αντίστοιχα. Ο αλκοολικός βαθμός στο τέλος της ζύμωσης ήταν 13% v/v.

3.2. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών

Στο σχήμα 5 φαίνεται η πορεία της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Ο Δείκτης Ολικών Φαινολικών (Δ.Φ.Ο) δίνει μια ένδειξη για την περιεκτικότητα του οίνου σε των φλαβονοειδή (ανθοκυάνες, ταννίνες), σε μη φλαβονοειδείς φαινόλες (φαινολικά οξέα) και κάποιες μη φαινολικές ουσίες.

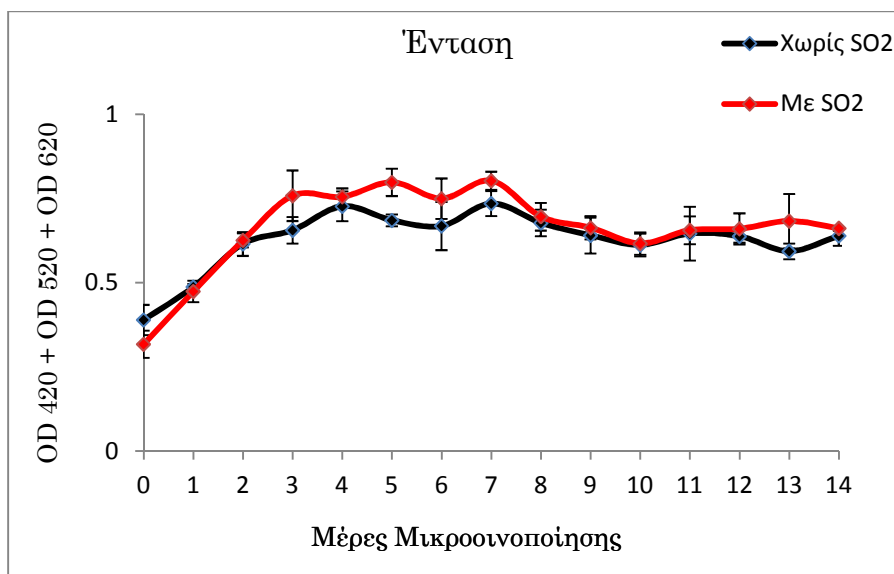


Σχήμα 5: Περιεκτικότητα ολικών φαινολικών στο οίνο απουσία και παρουσία SO₂.

Παρατηρείται αύξηση στην περιεκτικότητα των φαινολικών στον οίνο και στις δύο επεμβάσεις, ενώ στο τέλος της οινοποίησης τα φαινολικά συστατικά είναι

περισσότερα στην οινοποίηση παρουσία SO₂, δεν έχουν όμως στατιστικά σημαντική διαφορά από την οινοποίηση που πραγματοποιήθηκε χωρίς την προσθήκη SO₂. Αυτό οφείλεται στην αύξηση της αλκοόλης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης που βοηθά την εκχύλιση των φαινολικών ουσιών.

Στο σχήμα 6 φαίνεται η ένταση του χρώματος του οίνου που εκφράζεται από το σύνολο των ανθοκυανών, είτε στη μορφή της άνυδρης βάσης (620nm), είτε στην ελεύθερη μορφή τους (520nm), είτε όταν δεσμεύονται με ταννίνες (420nm).

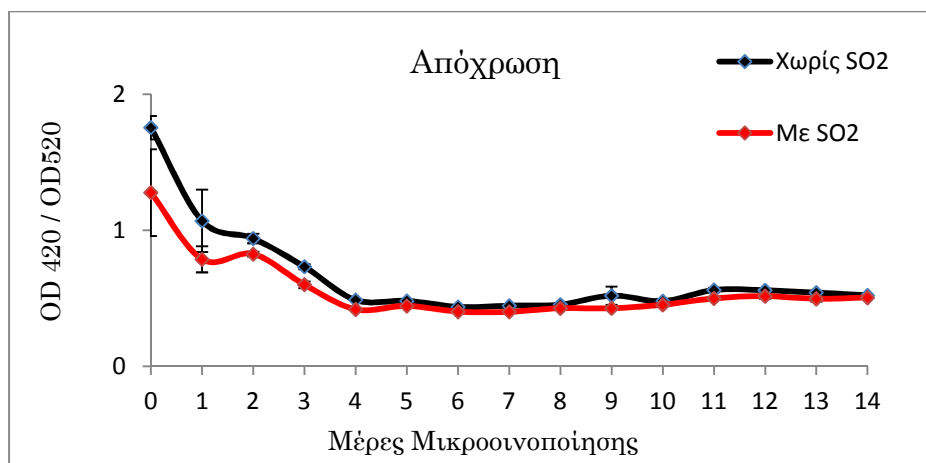


Σχήμα 6: Ένταση του χρώματος κατά την πορεία της οινοποίησης απουσία και παρουσία SO₂.

Τις πρώτες μέρες της οινοποίησης αυξάνεται με ταχύ ρυθμό η ένταση του χρώματος και στις δύο επεμβάσεις. Από την 3^η έως την 8^η μέρα παραμένει σε σταθερά υψηλά επίπεδα ενώ παρατηρείται αυξημένη ένταση στην οινοποίηση παρουσία SO₂ με στατιστικά σημαντική διαφορά από την οινοποίηση απουσία SO₂. Από την 8^η μέρα και μέχρι το τέλος η ένταση μειώνεται.

Η αύξηση της έντασης στην αρχή της οινοποίησης οφείλεται στην εκχύλιση των ανθοκυανών και στην παραμονή τους για μερικές μέρες στην ελεύθερη τους μορφή. Η επίδραση του διοξειδίου του θείου βοηθά στην εκχύλιση περισσότερων ανθοκυανών παρόλο που τις αποχρωματίζει. Από την 8^η μέρα και έπειτα αρχίζει η δέσμευση των ανθοκυανών από άλλα μόρια, κυρίως ταννίνες. Αποτέλεσμα αυτού είναι η μείωση της έντασης του χρώματος.

Στο σχήμα 7 φαίνεται η απόχρωση του οίνου που ουσιαστικά εκφράζεται από την αναλογία ανθοκυανών δεσμευμένων με ταννίνες προς ελεύθερες ανθοκυανές.

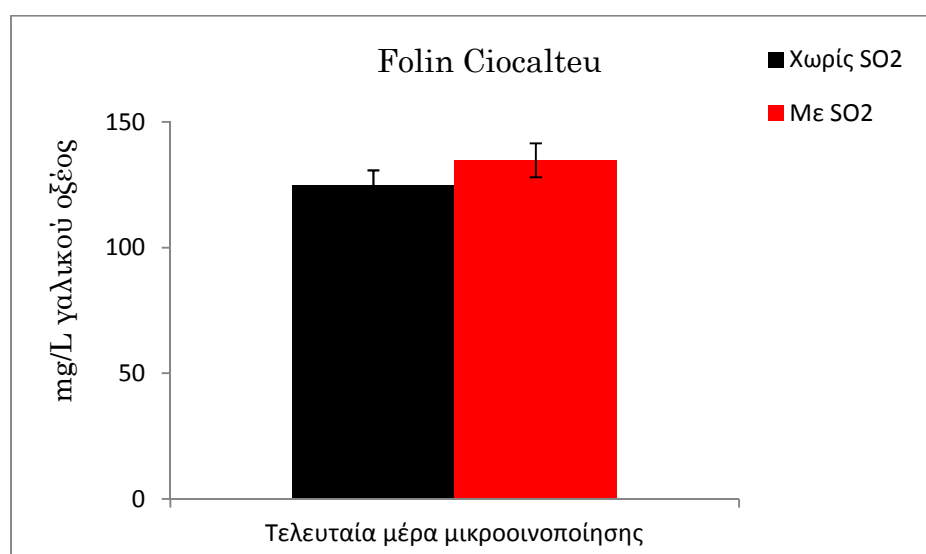


Σχήμα 7: Απόχρωση κατά τη διάρκεια της οινοποίησης απουσία και παρουσία SO₂.

Τις πρώτες μέρες της οινοποίησης η απόχρωση στην επέμβαση παρουσία SO₂ μειώνεται περισσότερο από ότι απουσία του SO₂. Μετά την 4^η μέρα της οινοποίησης η απόχρωση παραμένει σταθερή και στις δύο επεμβάσεις. Οι διαφορές τους δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Στην αρχή της οινοποίησης εκχυλίζονται περισσότερες ανθοκυάνες με την ελεύθερη μορφή τους, οι οποίες όμως είναι ασταθείς. Από τη 5^η μέρα και έπειτα η δέσμευσή τους με ταννίνες βοηθά στη σταθερότητα του χρώματος.

Στο σχήμα 8 φαίνεται η συγκέντρωση των φαινολικών εκφρασμένων σε mg γαλλικού οξέος ανά λίτρο οίνου, στην τελευταία μέρα της οινοποίησης.

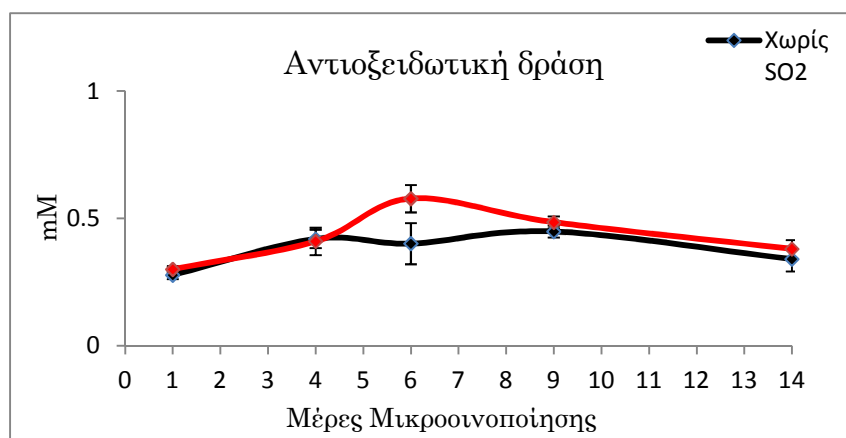


Σχήμα 8: Συγκέντρωση φαινολικών εκφρασμένων σε mg/L γαλλικού οξέος απουσία και παρουσία SO₂.

Με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση στην οينوποίηση παρουσία SO_2 αλλά δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από την οينوποίηση απουσία SO_2 .

3.3. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης

Στο σχήμα 9 φαίνεται η αντιοξειδωτική δράση εκφρασμένη σε mM trolox



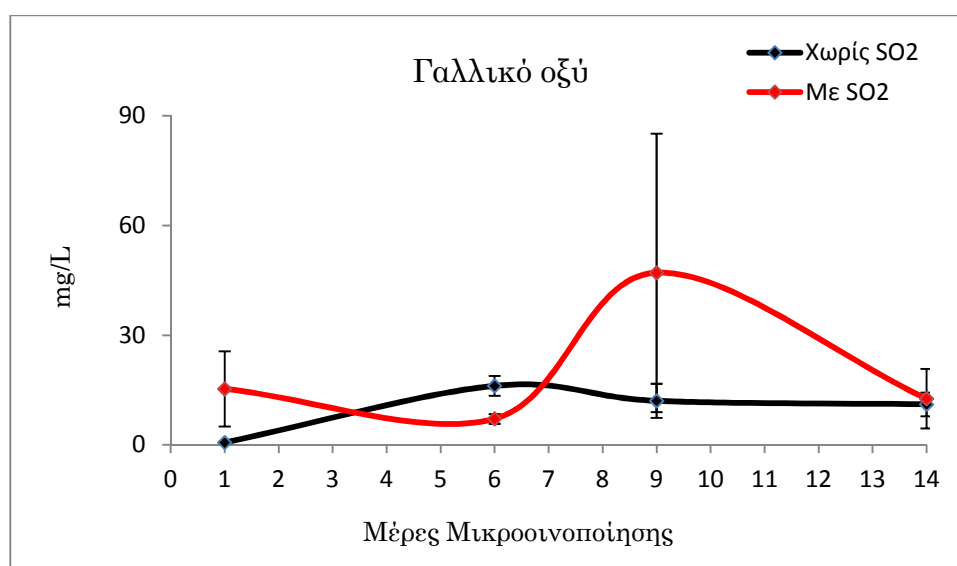
Σχήμα 9: Αντιοξειδωτική δράση απουσία και παρουσία SO_2 .

Η αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει ένα μέγιστο στη μέση της οينوποίησης ενώ σταδιακά μειώνεται και στις δύο επεμβάσεις. Η επίδραση του διοξειδίου του θείου φαίνεται να αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση. Ιδιαίτερα στη μέση της οينوποίησης παρατηρείται έντονη και στατισκά σημαντική διαφορά στην αντιοξειδωτική δράση στην οينوποίηση με την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη. Προς το τέλος της οينوποίησης η αντιοξειδωτική δράση μειώνεται και η διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων δεν είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με την οينوποίηση χωρίς διοξείδιο του θείου.

3.4. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του οίνου με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

3.4.1. Προσδιορισμός γαλλικού οξέος

Στο σχήμα 10 φαίνεται η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.



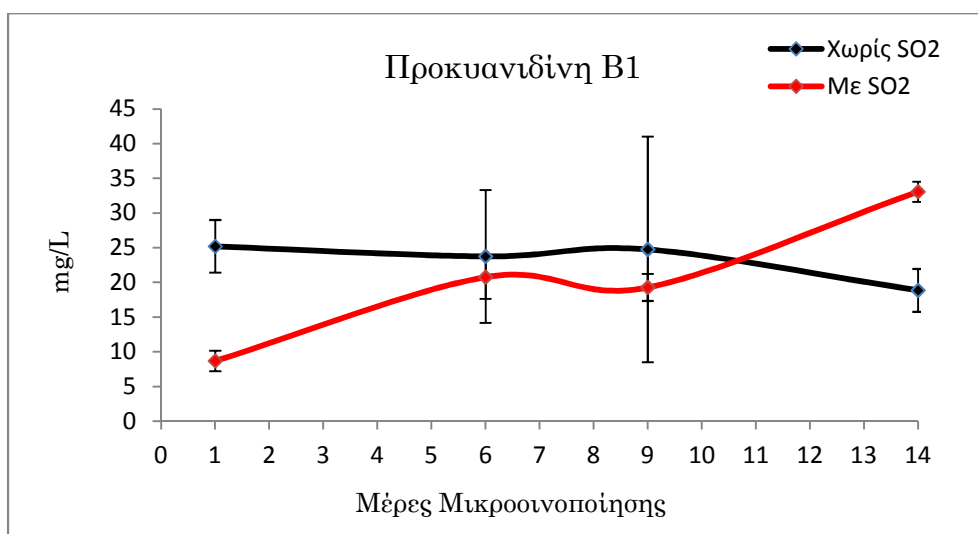
Σχήμα 10: Μεταβολή της συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος απουσία SO₂ ακολουθεί μια μικρή αύξηση και σταθερή πορεία κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Αντίθετα παρουσία SO₂, η συγκέντρωση έχει αρκετές διακυμάνσεις. Στο τέλος όμως της οινοποίησης τα επίπεδα 11,08 mg/L απουσία SO₂ και 12,61 mg/L παρουσία SO₂ της συγκέντρωσης είναι σχεδόν όμοια. Οι Pozo-Bayon et al. (2003) έχουν αναφέρει συγκέντρωση από 0.3 έως 1.3 mg/L του γαλλικού οξέος σε λευκούς και ερυθρούς ισπανικούς αφρώδεις οίνους, αντίστοιχα.

Οι Pena-Neira et al. (2000) έχουν αναφέρει συγκέντρωση μέχρι 2,29 mg/L σε οίνους από την περιοχή La Rioja ενώ οι Sladkovsky et al. (2004) σε 4.8 mg/L. και οι Hernandez et al. (2007) μέχρι 46,6 mg/L. Βέβαια σε σύγκριση με τα υδροξυκιναμωμικά οξέα οι συγκεντρώσεις των υδροξυβενζοϊκών οξέων είναι σε χαμηλά επίπεδα.

3.4.2. Προσδιορισμός φλαβονολών

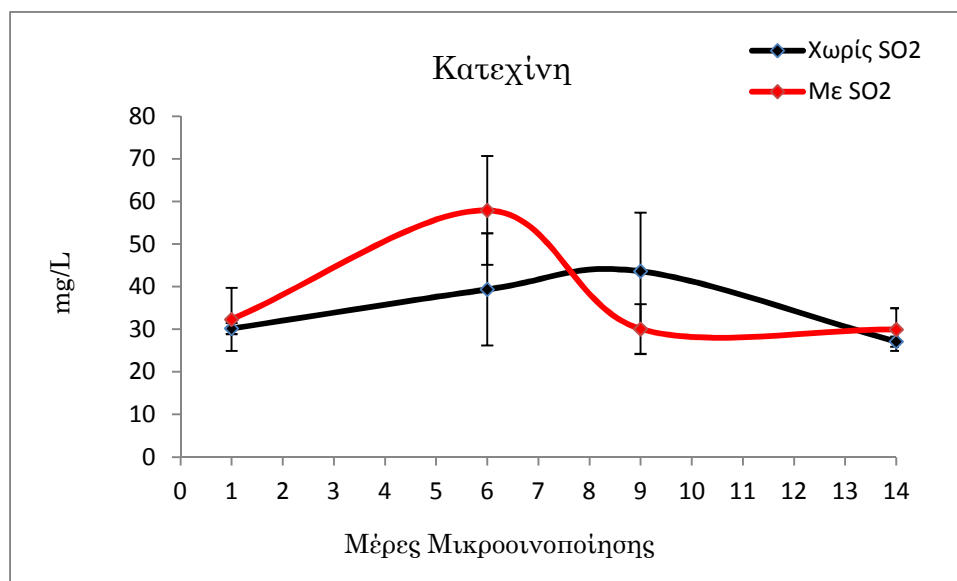
3.4.2.1. Προκυανιδίνη B1



Σχήμα 11: Μεταβολή της προκυανιδίνης B1 κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Παρατηρείται αύξηση της προκυανιδίνης B1 στην οινοποίηση με την επίδραση θειώδους ανυδρίτη. Ενώ στην αρχή βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα στην επέμβαση με SO₂, μετά τη ν 11^η μέρα της οινοποίησης αυξάνεται σημαντικά, ενώ στην επέμβαση χωρίς SO₂ μειώνεται λίγο. Και στο τελικό κρασί έχουμε μεγαλύτερα ποσά προκυανιδίνης στην επέμβαση με το SO₂, της τάξης των 33 mg/L από την επέμβαση χωρίς SO₂ που πέφτει στα 18,8 mg/L.

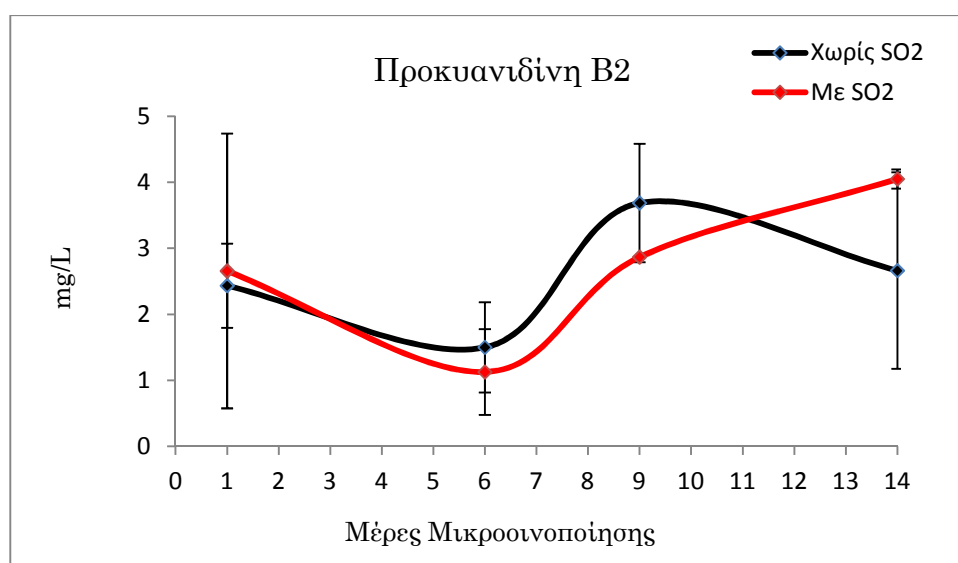
3.4.2.2. Κατεχίνη



Σχήμα 12: Μεταβολή της κατεχίνης κατά τη διάρκεια της οиноποίησης

Ενώ παρατηρούνται διακυμάνσεις στα επίπεδα της κατεχίνης κατά τη διάρκεια της οиноποίησης και στις δύο επεμβάσεις, στο τέλος τα τείνουν προς τα αρχικά με ελάχιστη διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων. Στο τελικό κρασί έχουμε 27,1 mg/L κατεχίνης στην επέμβαση χωρίς το SO₂, και 29,9 mg/L στην επέμβαση με SO₂.

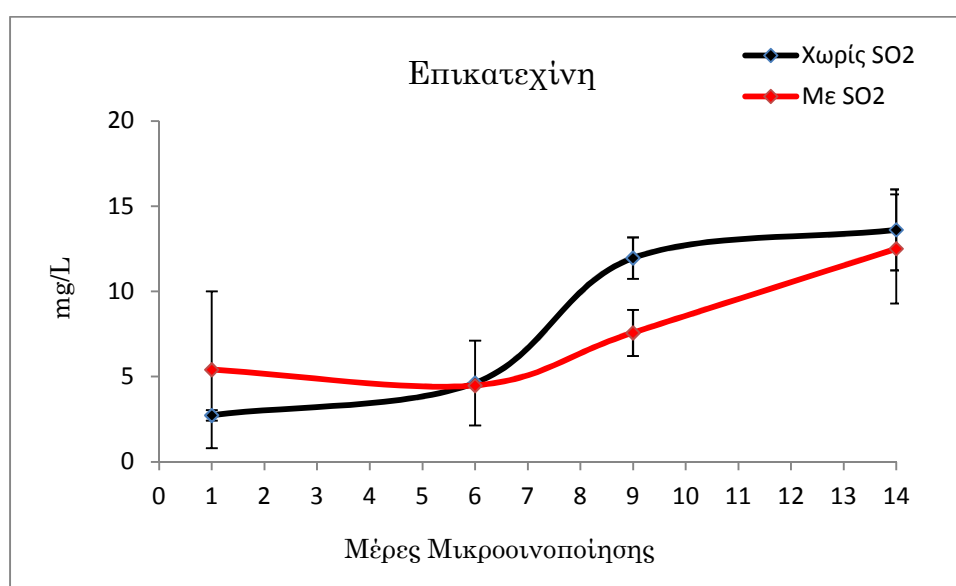
3.4.2.3. Προκυανιδίνη B2.



Σχήμα 13: Μεταβολή της προκυανιδίνης B2 κατά τη διάρκεια της οиноποίησης.

Παρατηρείται αρχικά μείωση και μετά αύξηση της προκυανιδίνης B2 στην οينوποίηση με την επίδραση θειώδους ανυδρίτη. Στην επέμβαση χωρίς SO₂ υπάρχουν διακυμάνσεις στην διάρκεια της οينوποίησης όμως στο τελικό προϊόν τα επίπεδα τείνουν στα αρχικά. Στο τελικό κρασί έχουμε μεγαλύτερα ποσά προκυανιδίνης B2 στην επέμβαση με το SO₂, της τάξης των 4 mg/L από την επέμβαση χωρίς SO₂ της τάξης των 2,6 mg/L.

3.4.2.4. Επικατεχίνη

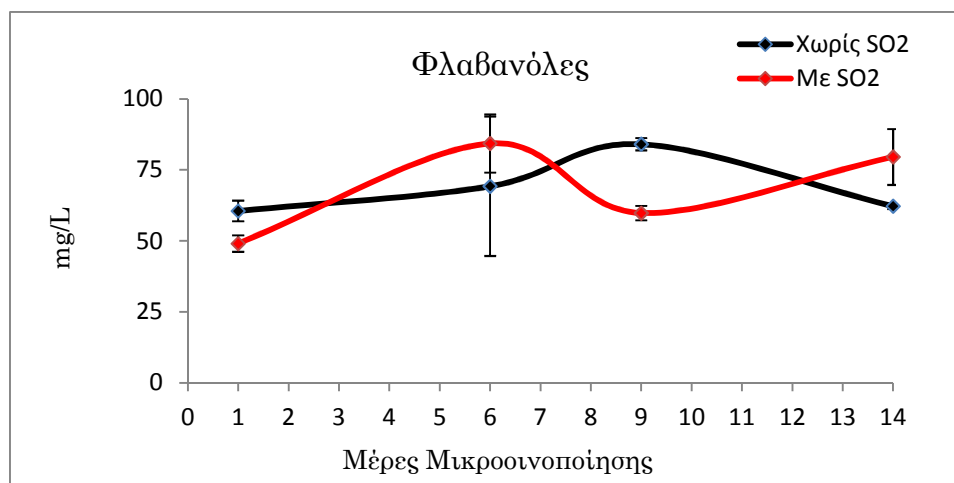


Σχήμα 14: Μεταβολή της επικατεχίνης κατά τη διάρκεια της οينوποίησης.

Στα επίπεδα της επικατεχίνης παρατηρείται αύξηση καθ' όλη τη διάρκεια της οينوποίησης και στις δύο επεμβάσεις. Στο τελικό κρασί έχουμε 13,6 mg/L επικατεχίνης στην επέμβαση χωρίς το SO₂, και 12,5 mg/L στην επέμβαση με SO₂.

Σε μια έρευνα που έγινε (Stephane Carando et al, 1999) για ερυθρούς οίνους που παράγονται στη Γαλλία τα επίπεδα των φλαβανολών προσδιορίστηκαν με HPLC. Τα επίπεδα της κατεχίνης σε 95 οίνους κυμάνθηκαν από 8 έως 209.8 mg/L (μέσος όρος 114.5 mg/L) και της επικατεχίνης από 7,8 έως 39,1 mg/L (μέσος όρος 25,4 mg/L). Η συγκέντρωση της κατεχίνης και της επικατεχίνης του Αγιωργήτικου είναι σε χαμηλά επίπεδα σε σχέση με τους μέσους όρους των γαλλικών κρασιών που μελετήθηκαν.

3.4.2.5. Σύνολο φλαβανολών

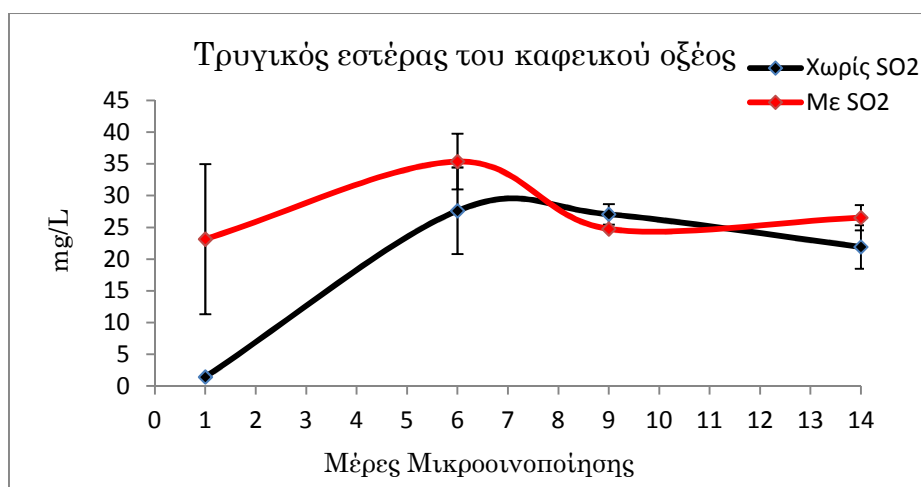


Σχήμα 15: Φλαβανόλες: Προκυανιδίνη B1, κατεχίνη, προκυανιδίνη B2, επικατεχίνη

Το σύνολο των φλαβανολών επηρεάζεται από την συγκέντρωση κυρίως της προκυανιδίνης B1 και της κατεχίνης αφού έχουν μεγάλες διαφορές σε σχέση με τις υπόλοιπες φλαβανόλες. Στο τελικό προϊόν η συγκέντρωση των φλαβανολών είναι μεγαλύτερη στην επέμβαση με την προσθήκη SO₂ και έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά από την οινοποίηση χωρίς την προσθήκη SO₂.

3.4.3. Προσδιορισμός εστέρων και υδροξυκιναμωμικών οξέων

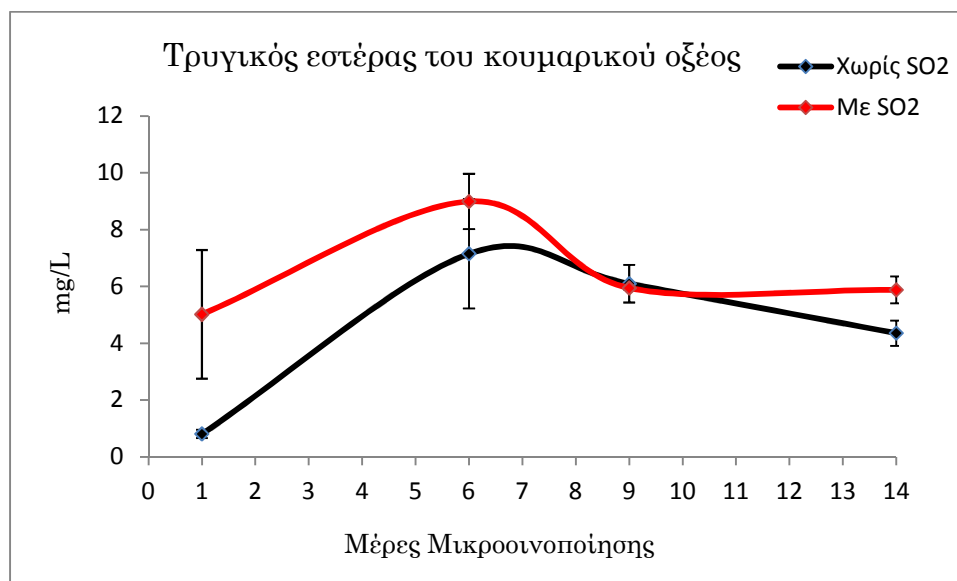
3.4.3.1. Τρυγικός εστέρας του καφεϊκού οξέος



Σχήμα 16: Μεταβολή του τρυγικού εστέρα του καφεϊκού οξέος κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Ο τρυγικός εστέρας του καφεϊκού οξέος (caftaric acid) εκχυλίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό με την παρουσία SO₂ από την αρχή της οινοποίησης, ενώ στο τέλος της οινοποίησης δεν έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά από την οινοποίηση χωρίς SO₂. Και στο τέλος παρατηρείται συγκέντρωση 21,9 mg/L απουσία SO₂ και 26,5 mg/L παρουσία SO₂.

3.4.3.2. Τρυγικός εστέρας του κουμαρικού οξέος

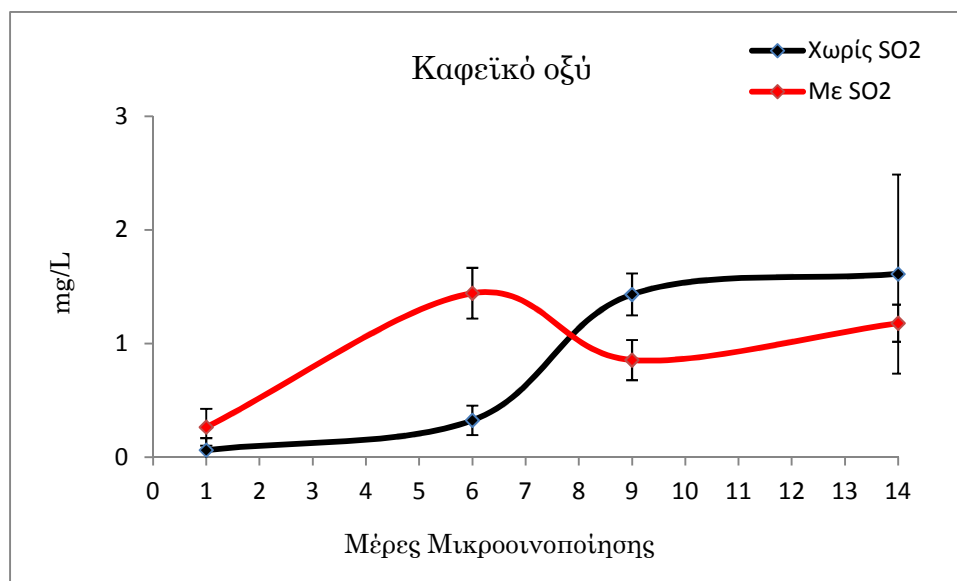


Σχήμα 17: Μεταβολή του τρυγικού εστέρα του καφεϊκού οξέος κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Ο τρυγικός εστέρας του κουμαρικού οξέος (coumaric acid) συναντάται σε μεγαλύτερο βαθμό με την παρουσία SO₂ από την αρχή της οινοποίησης, ενώ και στο τέλος της οινοποίησης έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά από την οινοποίηση χωρίς SO₂. Στο τέλος παρατηρείται συγκέντρωση 4,3 mg/L απουσία SO₂ και 5,8 mg/L παρουσία SO₂. Το κουμαρικό σε συγκέντρωση 55 mg/L (Andres-Lacueva et al. 1996; Baldi et al. 1993; Boursiquot et al. 1986; Cheynier et al. 1989; Herrick and Nagel 1985; Herrmann 1989; Lao et al. 1996; Lee and Jaworski 1989; Okamura and Watanabe 1981; Ricardo-da-Silva et al. 1993; Singleton et al. 1978; Singleton et al. 1986) Wurdig and Woller 1989).

Τόσο στον τρυγικό εστέρα του καφεϊκού οξέος όσο και στον τρυγικό εστέρα του κουμαρικού οξέος παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσής τους από την 7^η μέρα της οινοποίησης. Αυτό οφείλεται στην υδρόλυση των εστέρων.

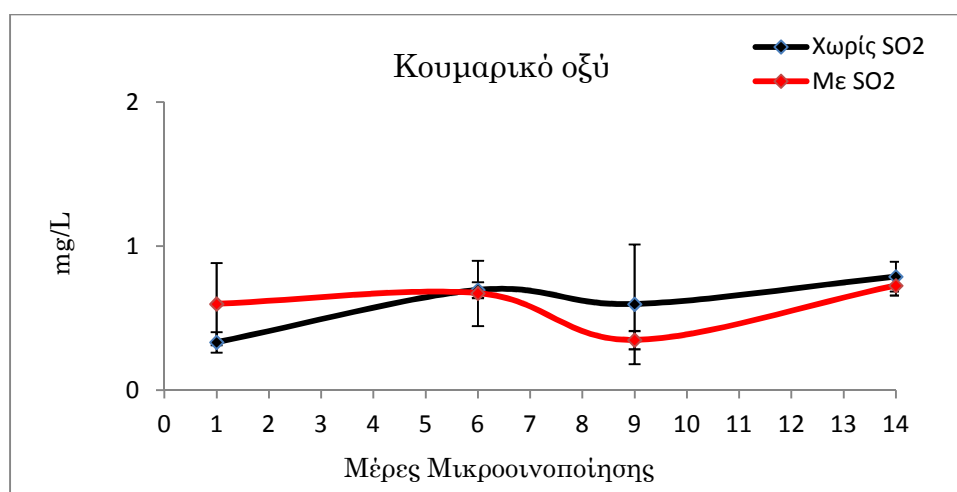
3.4.3.3. Καφεϊκό οξύ



Σχήμα 18: Μεταβολή του καφεϊκού οξέος κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος, παρατηρούνται διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της οινοποίησης απουσία SO₂ ενώ παρουσία SO₂ παρατηρείται συνεχής αύξηση του καφεϊκού οξέος ιδιαίτερα από την 7^η μέχρι τη 10^η μέρα της οινοποίησης. Τα επίπεδα του καφεϊκού οξέος στο τέλος της οινοποίησης είναι υψηλότερα χωρίς την επίδραση του SO₂ (0,9 mg/L) από ότι με την επίδραση SO₂ (1,8 mg/L) αλλά δεν διαφέρουν στατιστικά.

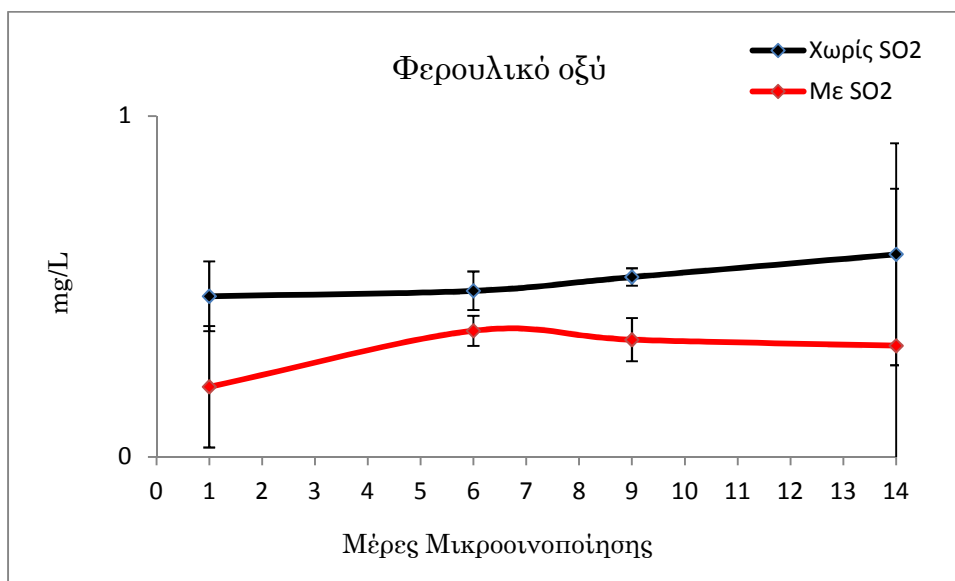
3.4.3.4. Κουμαρικό οξύ



Σχήμα 18: Μεταβολή του κουμαρικού οξέος κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Όσον αφορά το κουμαρικό οξύ, φαίνεται να μην έχει μεγάλες διαφορές κατά τη διάρκεια της οινοποίησης και η διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στο τέλος της οινοποίησης παρατηρείται συγκέντρωση 0,8 mg/L απουσία SO₂ και 0,7 mg/L παρουσία SO₂.

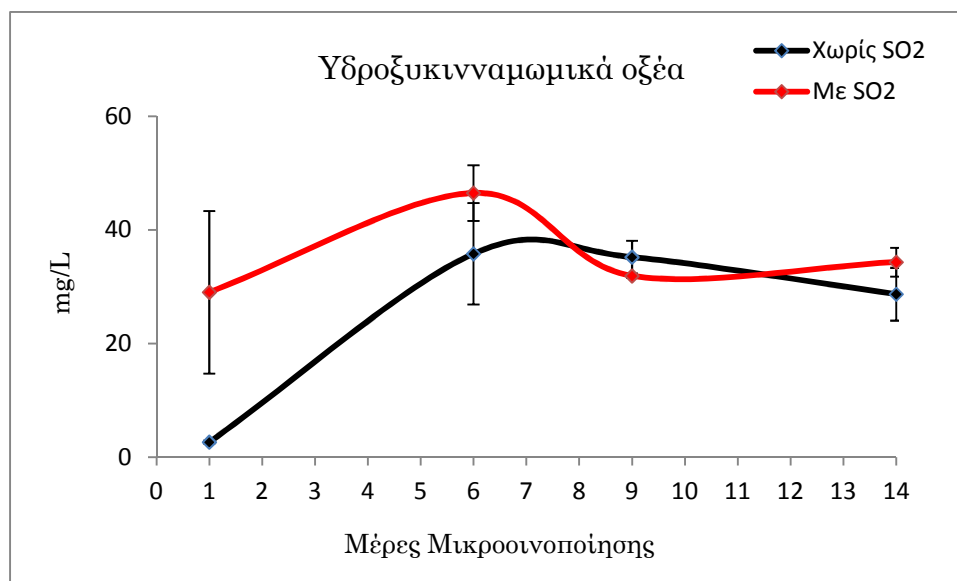
3.4.3.5. Φερουλικό οξύ



Σχήμα 19: Μεταβολή του φερουλικού οξέος κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Το φερουλικό οξύ, είναι σε υψηλότερα επίπεδα απουσία SO₂ και η διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων είναι στατιστικά σημαντική καθ' όλη τη διάρκεια της οινοποίησης. Στο τέλος της οινοποίησης παρατηρείται συγκέντρωση 0,6 mg/L απουσία SO₂ και 0,3 mg/L παρουσία SO₂.

3.4.3.6. Σύνολο υδροξυκιναμωμικών οξέων

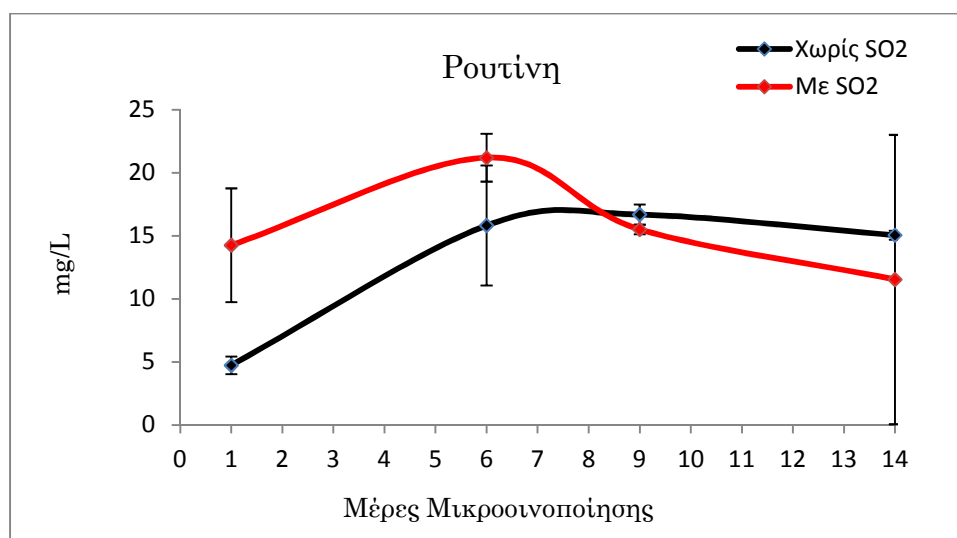


Σχήμα 20: Μεταβολή του συνόλου των υδροξυκιναμωμικών οξέων κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Συνολικά παρουσία SO₂ η συγκέντρωση των υδροξυκιναμωμικών οξέων είναι μεγαλύτερη από ότι χωρίς την προσθήκη SO₂. Το καφταρικό οξύ είναι αυτό που κυριαρχεί στο σύνολό τους σε ποσοστό περίπου 76% και στις δύο επεμβάσεις.

3.4.4. Προσδιορισμός φλαβονολών

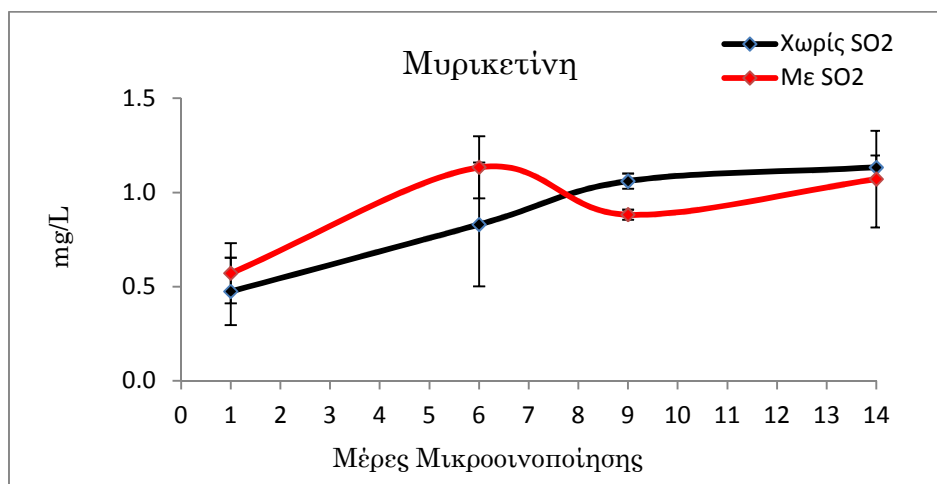
3.4.4.1. Ρουτίνη



Σχήμα 21: Μεταβολή της ρουτίνης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Παρουσία SO₂ η συγκέντρωση της ρουτίνης είναι μεγαλύτερη στην αρχή της οινοποίησης και μειώνεται όσο προχωρούν οι μέρες. Αντίθετα απουσία SO₂ αυξάνεται και φτάνει σε επίπεδα υψηλότερα από ότι χωρίς την προσθήκη SO₂. Στο τέλος της οινοποίησης παρατηρείται συγκέντρωση 15 mg/L απουσία SO₂ και 11,5 mg/L παρουσία SO₂.

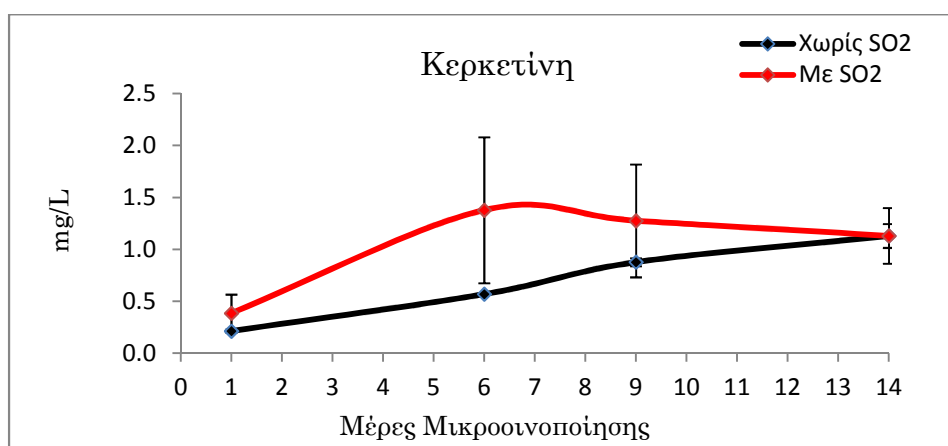
3.4.4.2. Μυρικετίνη



Σχήμα 22: Μεταβολή της μυρικετίνης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Η μυρικετίνη ακολουθεί περίπου το ίδιο πρότυπο με αυτό της ρουτίνης με τη διαφορά ότι παρατηρούνται περισσότερες διακυμάνσεις με την επίδραση του SO₂. οξέων είναι μεγαλύτερη από ότι χωρίς την προσθήκη SO₂. Στο τέλος της οινοποίησης παρατηρείται συγκέντρωση 1,13 mg/L απουσία SO₂ και 1,07 mg/L παρουσία SO₂.

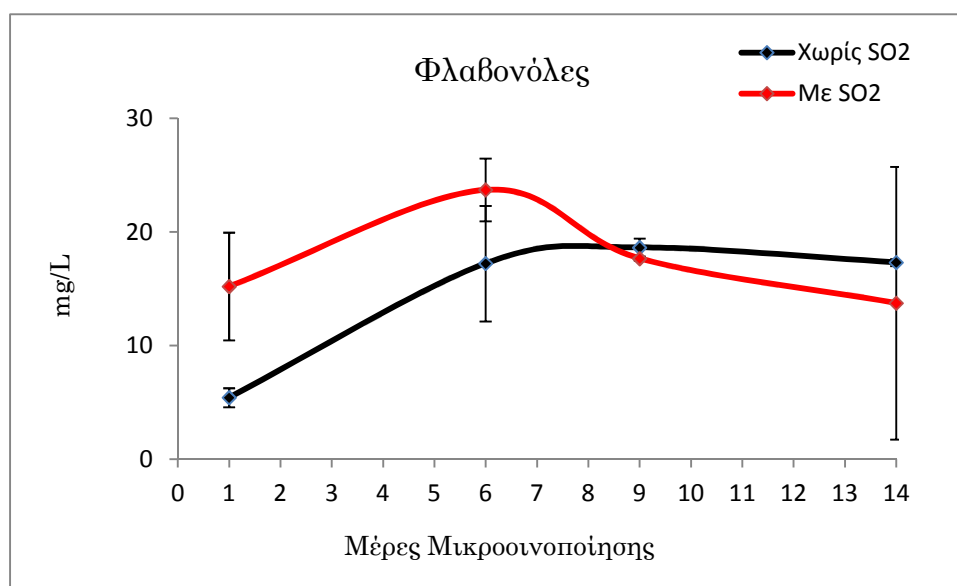
3.4.4.3. Κερκετίνη



Σχήμα 23: Μεταβολή της κερκετίνης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Η κερκετίνη παρουσιάζει μια έντονη αύξηση παρουσία SO₂ στην αρχή της ενώ απουσία SO₂ αυξάνεται συνεχώς με σταθερότερο ρυθμό. Στο τέλος της οινοποίησης φτάνουν ακριβώς στα ίδια επίπεδα, 1,13 mg/L αμφότερα.

3.4.4.4. Σύνολο φλαβονολών



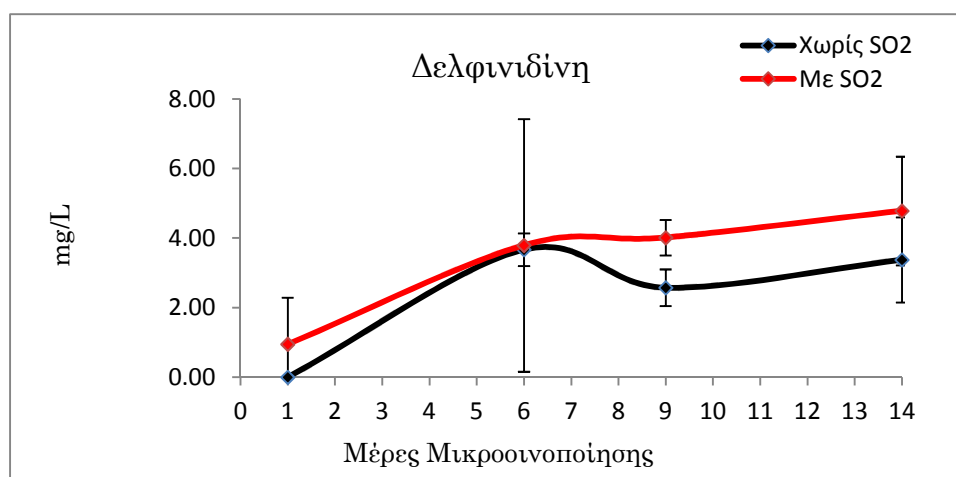
Σχήμα 24: Μεταβολή του συνόλου των φλαβονολών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση του συνόλου των φλαβονολών αυτές επηρεάζονται κυρίως από τη συγκέντρωση της ρουτίνης που αποτελεί περίπου το 85% των ολικών φλαβονολών. Παρατηρείται αύξηση στην αρχή της οινοποίησης απουσία SO₂ ενώ παρουσία SO₂ παρατηρείται αύξηση στην αρχή της οινοποίησης και από τη μέση έως το τέλος μείωση σε επίπεδα χαμηλότερα από την οινοποίηση απουσία SO₂. Τα επίπεδα των ολικών φλαβονολών στο τέλος της οινοποίησης είναι υψηλότερα χωρίς την επίδραση του SO₂ (17,3 mg/L) από ότι με την επίδραση SO₂ (13,7 mg/L) αλλά δεν διαφέρουν στατιστικά.

3.5. Προσδιορισμός ανθοκυανών του οίνου με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

Οι ανθοκυάνες αποτελούν τις χημικές ενώσεις που επηρεάζουν κατά κύριο λόγο το χρώμα του οίνου.

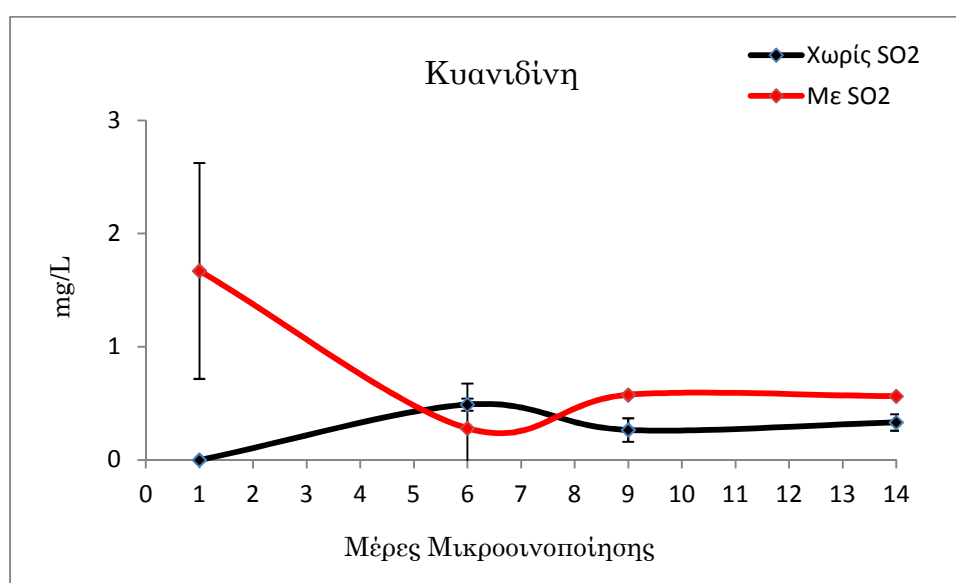
3.5.1. Δελφινιδίνη



Σχήμα 25: Μεταβολή της δελφινιδίνης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Η δελφινιδίνη παρουσιάζει συνεχή αύξηση καθ' όλη τη διάρκεια της οινοποίησης και ιδιαίτερα τις πρώτες ημέρες και στις δύο επεμβάσεις. Την τελευταία ημέρα η συγκέντρωση φτάνει σε 4,7 mg/L παρουσία SO₂ και 3,3 mg/L απουσία SO₂.

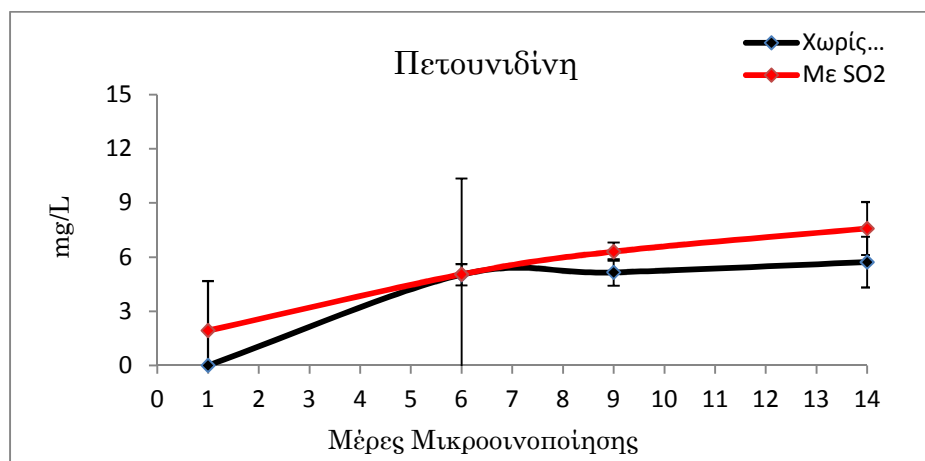
3.5.2. Κυανιδίνη



Σχήμα 26: Μεταβολή της κυανιδίνης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Η κυανιδίνη παρουσιάζει μείωση τις πρώτες ημέρες της οиноποίησης παρουσία SO₂ ενώ απουσία SO₂ αυξάνεται ελαφρά τις πρώτες ημέρες. Αντίθετα από τη μέση της οиноποίησης παρατηρείται μια μικρή αύξηση παρουσία SO₂ και μείωση απουσία SO₂. Την τελευταία ημέρα η συγκέντρωση φτάνει σε 0,56 mg/L παρουσία SO₂ και 0,33 mg/L απουσία SO₂.

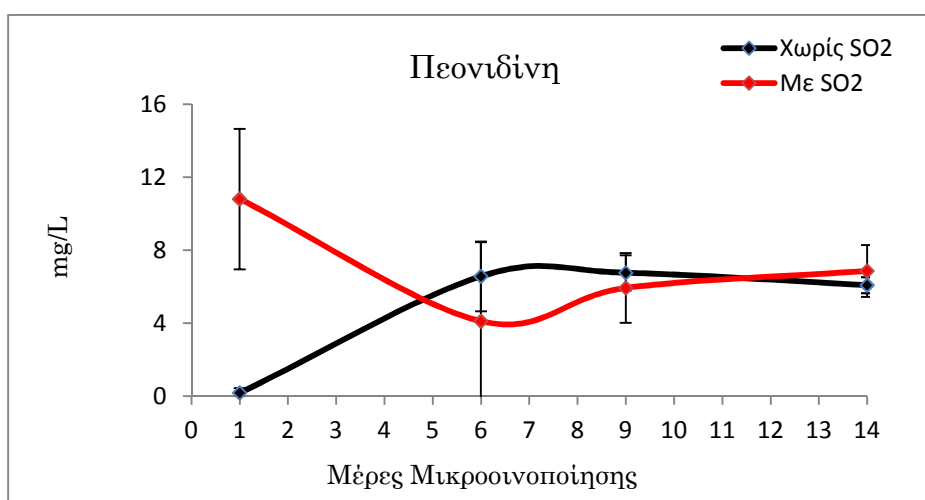
3.5.3. Πετουνιδίνη



Σχήμα 27: Μεταβολή της πετουνιδίνης κατά τη διάρκεια της οινόποιησης.

Η πετουνιδίνη παρουσιάζει συνεχή αύξηση καθ' όλη τη διάρκεια της οινόποιησης και στις δύο επεμβάσεις. Την τελευταία ημέρα η συγκέντρωση φτάνει σε 5,7 mg/L απουσία SO₂ και 7,5 mg/L παρουσία SO₂.

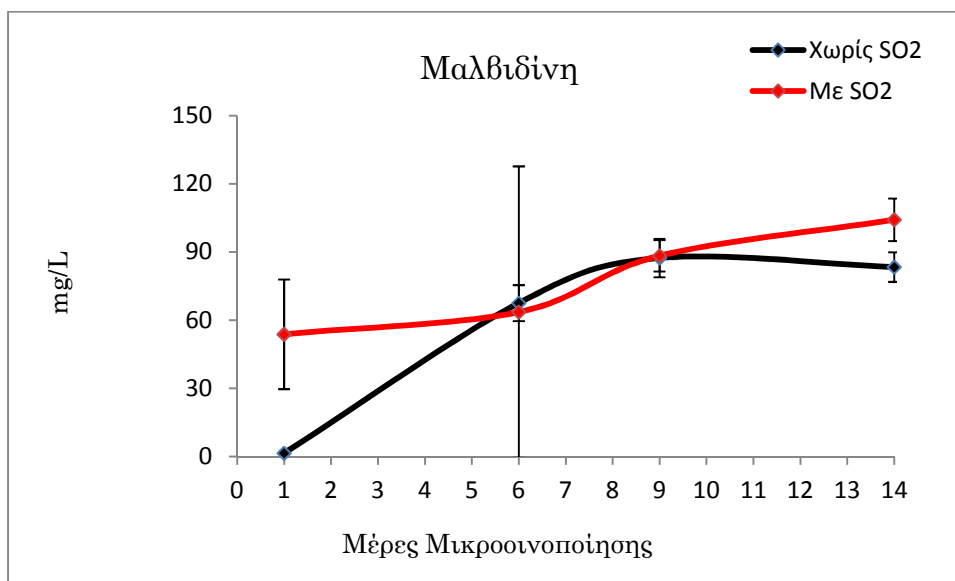
3.5.4. Πεονιδίνη



Σχήμα 28: Μεταβολή της πεονιδίνης κατά τη διάρκεια της οινόποιησης.

Η πεονιδίνη παρουσιάζει συνεχή αύξηση καθ' όλη τη διάρκεια της οиноποίησης απουσία SO₂ ενώ παρουσία SO₂ αρχικά μειώνεται και από τη μέση της οиноποίησης αυξάνεται. Την τελευταία ημέρα η συγκέντρωση φτάνει σε 6 mg/L απουσία SO₂ και 6,8 mg/L παρουσία SO₂.

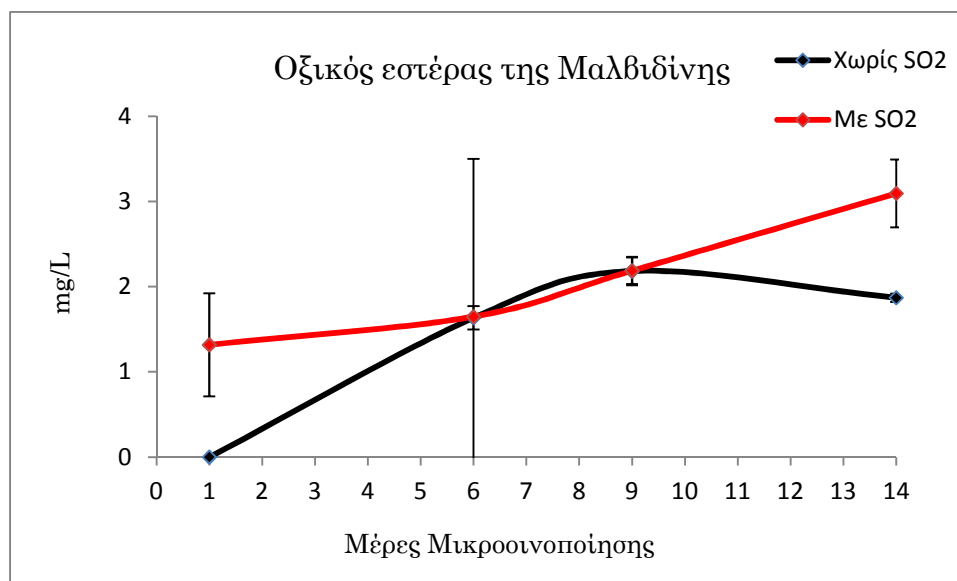
3.5.5. Μαλβιδίνη



Σχήμα 29: Μεταβολή της μαλβιδίνης κατά τη διάρκεια της οиноποίησης.

Η μαλβιδίνη είναι βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ανθοκυάνες παρουσιάζει συνεχή αύξηση καθ' όλη τη διάρκεια της οиноποίησης. Την τελευταία ημέρα η συγκέντρωση φτάνει σε 83,3 mg/L απουσία SO₂ και 104,2 mg/L παρουσία SO₂.

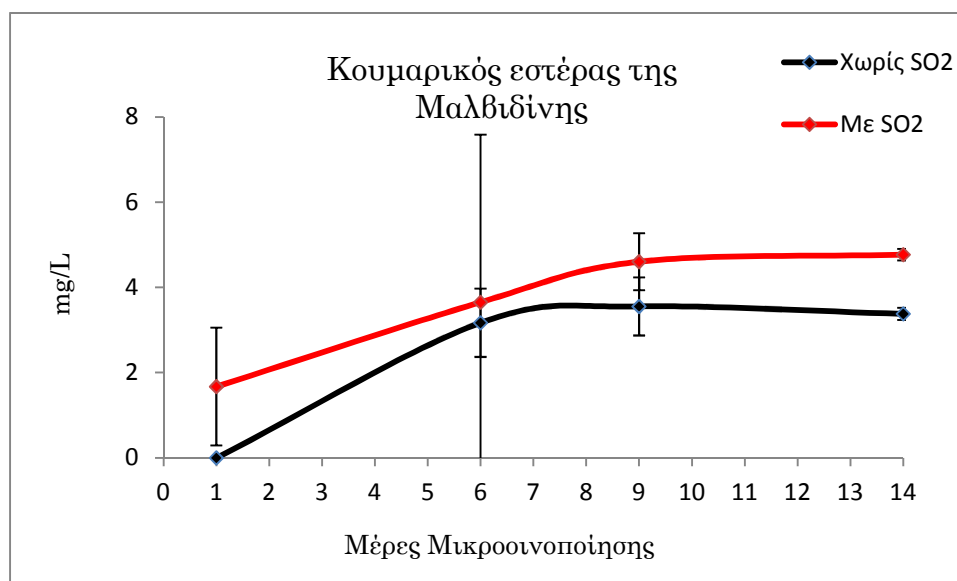
3.5.6. Οξικός εστέρας της μαλβιδίνης



Σχήμα 30: Μεταβολή του οξικού εστέρα της μαλβιδίνης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης παρουσιάζει αύξηση τις πρώτες ημέρες της οινοποίησης και στις δύο επεμβάσεις ενώ από τη μέση της οινοποίησης μειώνεται απουσία SO₂ και συνεχίζει να αυξάνεται παρουσία SO₂. Την τελευταία ημέρα η συγκέντρωση φτάνει σε 1,87 mg/L απουσία SO₂ και 3,09 mg/L παρουσία SO₂.

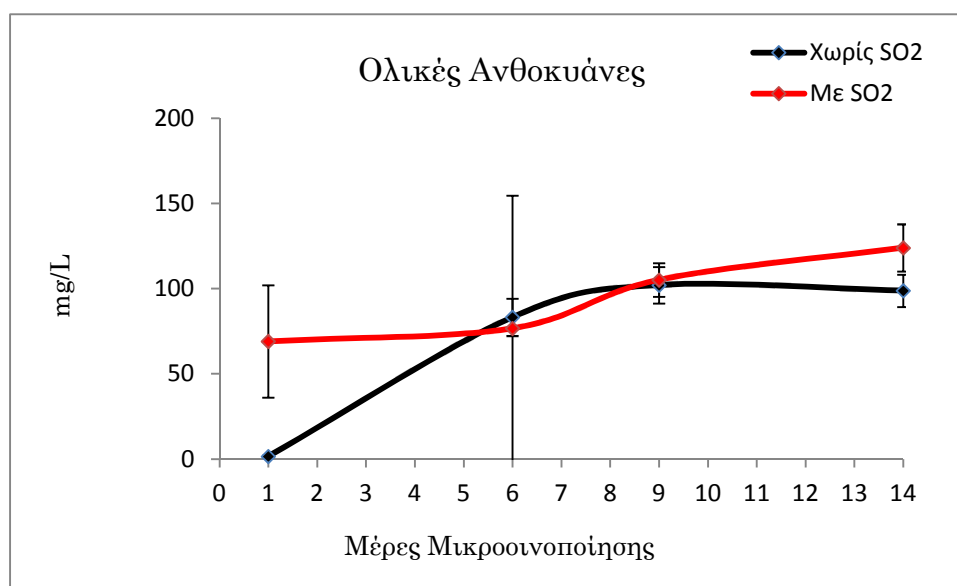
3.5.7. Κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης



Σχήμα 31: Μεταβολή του κουμαρικού εστέρα της μαλβιδίνης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης παρουσιάζει το ίδιο πρότυπο αύξησης και στις δύο επεμβάσεις ενώ την τελευταία ημέρα η συγκέντρωση φτάνει σε 3,38 mg/L απουσία SO₂ και 4,77 mg/L παρουσία SO₂.

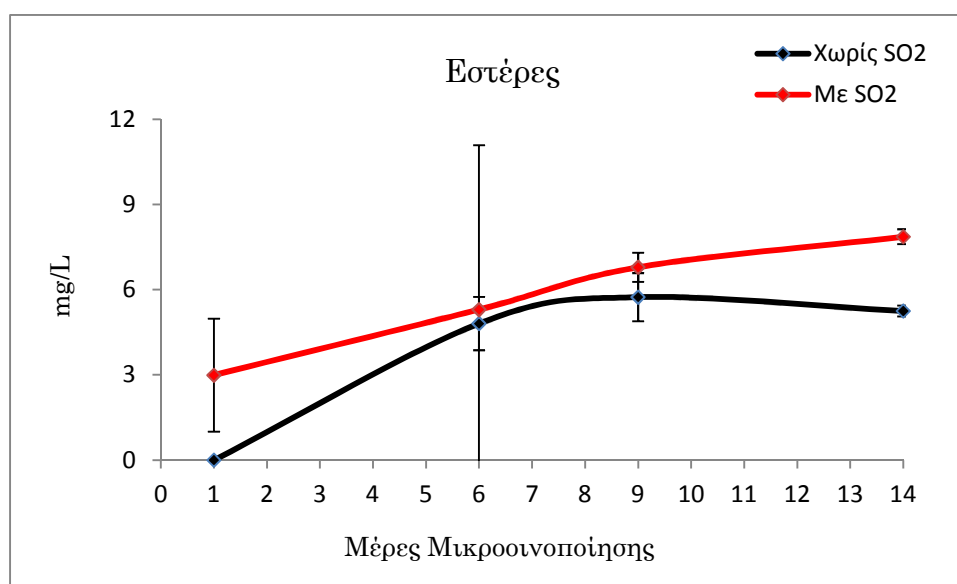
3.5.8. Σύνολο ανθοκυανών



Σχήμα 32: Μεταβολή του συνόλου των ανθοκυανών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Η συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών διαμορφώνεται κυρίως από τη συγκέντρωση της μαλβιδίνης που αποτελεί περίπου το 84% του συνόλου τους. Παρατηρείται αύξηση στην αρχή της οινοποίησης απουσία SO₂ ενώ παρουσία SO₂ παρατηρείται αύξηση από τη μέση της οινοποίησης. Τα επίπεδα των ολικών ανθοκυανών στο τέλος της οινοποίησης είναι υψηλότερα με την επίδραση του SO₂ (124 mg/L) από ότι χωρίς την επίδραση SO₂ (98,8 mg/L) αλλά δεν διαφέρουν στατιστικά.

3.5.9. Σύνολο εστέρων



Σχήμα 33: Μεταβολή του συνόλου των εστέρων κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Το σύνολο των εστέρων είναι υψηλότερο στην επέμβαση παρουσία SO_2 . Τα επίπεδα των ολικών εστέρων στο τέλος της οινοποίησης είναι υψηλότερα με την επίδραση του SO_2 (7,87 mg/L) από ότι χωρίς την επίδραση SO_2 (5,25 mg/L) και διαφέρουν στατιστικά.

3.6. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών στη ράγα με φασματοφωτομετρικές μεθόδους

Παράλληλα με τις αναλύσεις στον οίνο πραγματοποιήθηκαν κάποιες αναλύσεις στο σταφύλι που χρησιμοποιήθηκε για την οινοποίηση. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η περιεκτικότητα των φαινολικών στην πρώτη ύλη, το σταφύλι.

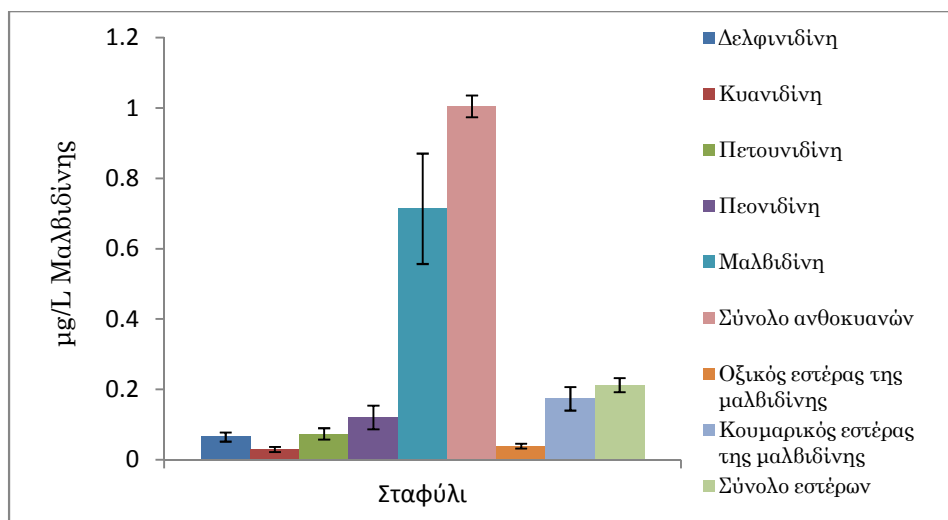
Αποτελέσματα Hland	
Ολικά φαινολικά /ράγα	0,7383903
Ολικά φαινολικά / gr ράγας	0,4169655
Ανθοκυάνες (mg)/ράγα	0,5898141
Ανθοκυάνες (mg) / gr ράγας	0,3330653

Αποτελέσματα Methyl cellulose	
Συγκέντρωση ταννινών (mg/L κατεχίνης)	254,48435
Συγκέντρωση ταννινών στον πολτό (mg/g)	2544,8435

Πίνακας 1: Περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στη ράγα, σύμφωνα με φασματοφωτομετρικές μεθόδους.

Σύμφωνα με τη μέθοδο του Hland τα ολικά φαινολικά ανά ράγα ήταν 0,74 mg. Τα ολικά φαινολικά ανά γραμμάριο ράγας 0,42 mg. Οι ανθοκυάνες ανά ράγα 0,59 mg και 0,33 mg/gr ράγας. Σύμφωνα με τη μέθοδο Methyl cellulose η συγκέντρωση των ταννινών ήταν 254,48 mg/L κατεχίνης. Η συγκέντρωση ταννινών στον πολτό 2544,84 mg/gr.

Στο σχήμα 34 φαίνεται η περιεκτικότητα των ανθοκυανών και των εστέρων της μαλβιδίνης σε $\mu\text{g/L}$ που εκχυλίστηκαν με μεθανόλη από 1gr λυοφιλωμένου φλοιού.



Σχήμα 34: Συγκέντρωση ανθοκυανών στον φλοιό του σταφυλιού.

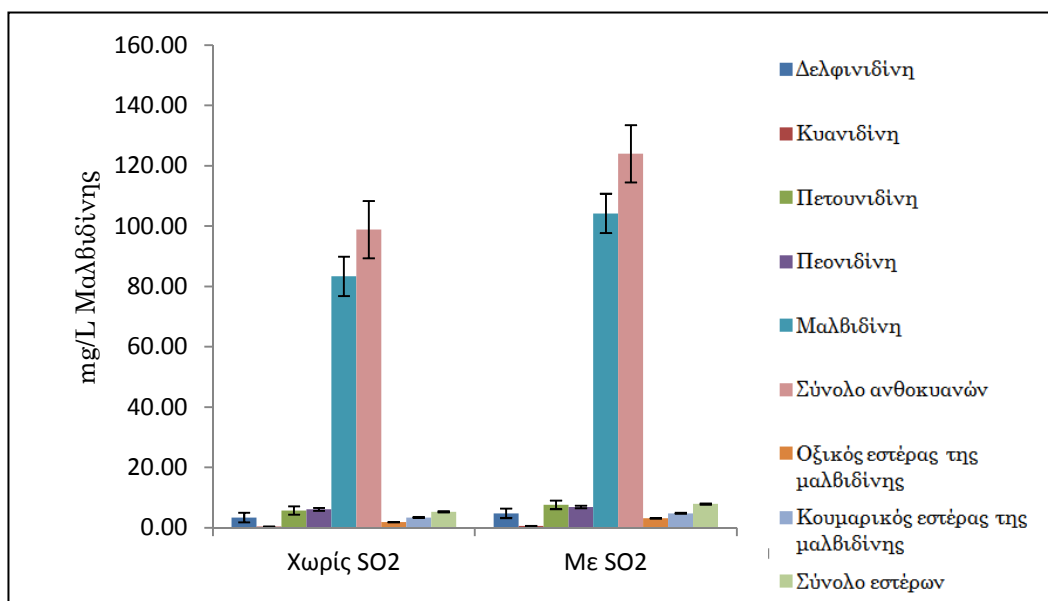
Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών που μελετήθηκαν στο φλοιό των ραγών, σε $\mu\text{g/L}$ μαλβιδίνης

$\mu\text{g/L}$ Μαλβιδίνης	
Δελφινιδίνη	0,065
Κυανιδίνη	0,029
Πετουνιδίνη	0,074
Πεονιδίνη	0,121
Μαλβιδίνη	0,713
Ολικές ανθοκυάνες	0,200
Οξικός εστέρας της Μαλβιδίνης	0,039
Κουμαρικός εστέρας της Μαλβιδίνης	0,173
Ολικοί εστέρες	0,106

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα ανθοκυανών στο φλοιό της ράγας, σύμφωνα με την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.

Η περιεκτικότητα των ανθοκυανών και των εστέρων στο σταφύλι μπορεί να δώσει ενδεικτικά την περιεκτικότητα των στοιχείων αυτών στον οίνο που θα παραχθεί.

Στο σχήμα 35 φαίνεται η περιεκτικότητα των ανθοκυανών και των εστέρων της μαλβιδίνης σε mg/L την τελευταία μέρα της οινοποίησης παρουσία και όχι διοξειδίου του θείου.



Σχήμα 35: Συγκέντρωση ανθοκυανών την τελευταία μέρα της οινοποίησης απουσία και παρουσία διοξειδίου του θείου.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών από την τελευταία μέρα της οινοποίησης, σε mg/L μαλβιδίνης.

mg/L Μαλβιδίνης		
	Χωρίς SO2	Με SO2
Δελφινιδίνη	3,38	4,78
Κυανιδίνη	0,33	0,56
Πετουνιδίνη	5,72	7,58
Πεονιδίνη	6,08	6,87
Μαλβιδίνη	83,34	104,20
Ολικές ανθοκυάνες	98,85	124,00
Οξικός εστέρας της Μαλβιδίνης	1,87	3,09
Κουμαρικός εστέρας της Μαλβιδίνης	3,38	4,77
Ολικοί εστέρες	5,25	7,87

Πίνακας 3: Μεταβολή του συνόλου της ρουτίνης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Στην ερυθρή οινοποίηση το ενδιαφέρον εστιάζεται κυρίως στη φάση της εκχύλισης όπου λαμβάνει χώρα η εκχύλιση των ανθοκυανών και των ταννινών. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι με τους οποίους επιτυγχάνεται η εκχύλιση (κρυοεκχύλιση, θερμοεκχύλιση). και η πρακτική που επιλέγεται εξαρτάται από την πρώτη υλη, την περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης, οι ανθοκυάνες είναι οι πρώτες που εκχυλίζονται καθώς είναι περισσότερο διαλυτές από τις ταννίνες. Το περιεχόμενο ανθοκυανών φτάνει σε μέγιστο στην αρχή της οινοποίησης (Nagel and Wulf, 1979). Καθώς προχωρά η οινοποίηση και η παραγωγή αιθανόλης αυξάνεται, τόσο αυξάνεται η διαλυτότητα αυτών των μορίων. Περίπου την 5^η μέρα της οινοποίησης, οι περισσότερες φλαβονοειδείς ενώσεις βρίσκονται στην πιο διαλυτή μορφή τους. Επίσης αυξάνεται και η διαπερατότητα της μεμβράνης των φλοιών. Η εκχύλιση των ταννινών οφείλεται κατά μεγάλο βαθμό στην παρουσία αιθανόλης. Αντίθετα με τις ανθοκυάνες, η εκχύλιση των ταννινών συνεχίζεται σε όλη τη διάρκεια της επαφής με τα στέμφυλα (Singleton and Draper 1964). Η εκχύλιση των φλαβονολών και των προκυανιδινών από τους φλοιούς είναι σχεδόν ανάλογες με την εκχύλιση των ανθοκυανών, ενώ από τα γίγαρτα οι φλαβανόλες εκχυλίζονται με πιο αργό ρυθμό. (Cheynier et al. 1997b; Morel-Salmi et al. 2006).

Αφού φτάσουν σε ένα μέγιστο μερικές μέρες μετά την οινοποίηση, η συγκέντρωση των ανθοκυανών μειώνεται ως επακόλουθο της απορρόφησης από τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμομυκήτων, εξαιτίας της κατακρήμνισης μαζί με τρυγικά άλατα και εξαιτίας της διαύγασης και του φιλτραρίσματος. Το περιεχόμενο των ανθοκυανών στο κρασί εξαρτάται και από την αντίδρασή τους με άλλες φαινόλες κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Η σταθερότητα μπορεί να προκύψει είτε με την δημιουργία συμπλόκων που είναι παροδική, είτε με τον πολυμερισμό με φλαβαν-3-όλες και προκυανιδίνες, είτε με τη δημιουργία νέων ενώσεων τις πυρανθοκυανιδίνες. Οι τελευταίες μπορούν να συμπυκνωθούν και με ταννίνες.

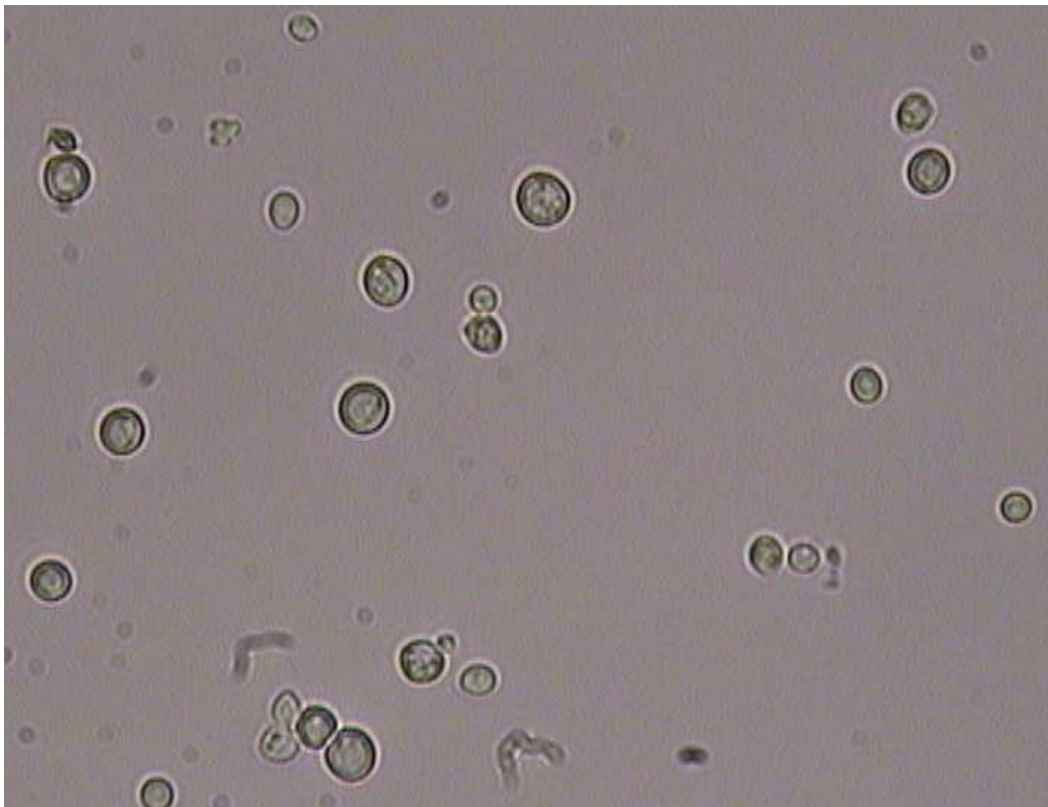
4. Βιβλιογραφία

1. Alcalde - Eon, C., Escribano - Bailon, M. T., Santos-Buelga, C., and Rivas-Gonzalo, J. C. (2006) Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta.* 563, 238–254.
2. Bureau, G. M., Charpentier-Massonal, M., and Parsee, M. (1974) Etude des goûts anormaux apportés par le bouchon sur le vin de Champagne. *Rev. Fr. Oenol.* 56, 22–24.
3. Schreier, P., and Drawert, F. (1974) Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe des Weines, V. Alkohole, Hydroxy-Ester, Lactone und andere polare Komponenten des Weinaromas. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 3, 154–160.
4. Fernandez de Simon, B., Hernandez, T., Estrella, I., and GomezCordoves, C. (1992) Variation in phenol content in grapes during ripening: Low-molecular-weight phenols. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 194, 351–354.
5. Rapp, A., and Guntert, M. (1986) Changes in aroma substances during the storage of white wines in bottles. In: *The Shelf Life of Foods and Beverages* (G. Charalambous, ed.), pp. 141–167. Elsevier, Amsterdam
6. Glories, Y. (1984) La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interpretation. *Connaiss. Vigne Vin* 18, 253–271.
7. Ribereau-Gayon, J., and Peynaud, E. (1971) *Traite d'Ampelologie. Sciences et Techniques du Vin*, Vols 1 2. Dunod, Paris. Ribereau Gayon, J., Ribereau-Gayon, P., and Seguin, G. (1980) Botrytis cinerea in enology. In: *The Biology of Botrytis* (J. R. ColeySmith et al., eds.), pp. 251–274. Academic Press, London.
8. Roggero, J. P., Coen, S., and Ragonnet, B. (1986) High performance of liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 77–83.
9. Singleton, V. L. (1972) Effects on red wine quality of removing juice before fermentation to stimulate variation in berry size. *Am. J. Enol. Vitic.* 23, 106–113.
10. Singleton, V. L., and Trousdale, E. (1992) Anthocyanin–tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 63–70.
11. Bouix, M., Leveau, J. Y., and Cuinier, C. (1981) Applications de l'electrophorese des fractions exocellulaires de levures au controle de l'efficacite d'un levurage en vinification. In: *Current Developments in Yeast*
12. Perez-Magarino, S., Sanchez-Iglesias, M., Ortega-Heras, M., Gonzalez-Huerta, C., and Gonzalez-Sanjose, M. L. (2007) Colour stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation. *Food Chem.* 10, 881–893. *Research* (G. G. Stewart and I. Russel, eds.), pp. 87–92. Pergamon, New York.

Κεφάλαιο 2: Μικροβιολογία Οίνου

1. Εισαγωγή

Οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί και κατηγοριοποιούνται στις κλάσεις των Ασκομυκήτων, των Βασιδιομηκύτων και των Δευτερομυκήτων, ανάλογα με τον τρόπο αναπαραγωγής τους. Στο κρασί συναντάμε μόνο δύο κλάσεις, των Ασκομυκήτων και των Δευτερομυκήτων. Έχουν σχήμα οβάλ, διάμετρο από 2 έως 8 μm και μήκος από 3 έως 25 μm (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Φωτογραφία από οπτικό μικροσκόπιο κυττάρων ζυμομύκητα. Μεγέθυνση (x40)

1.1. Αλκοολική ζύμωση

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης οι σακχαρομύκητες μετατρέπουν τα σάκχαρα που υπάρχουν στο μούστο σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενέργειας υπό τη μορφή θερμότητας. Σύμφωνα με την εξίσωση Gay Lussac, 1 mole σακχάρου μετατρέπεται σε 2 moles αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα.



Σύμφωνα με τους νόμους της θερμοδυναμικής, η ενέργεια ενός υποστρώματος μετατρέπεται μερικώς σε έργο (ελεύθερη ενέργεια) και η υπόλοιπη εκλύεται με τη μορφή θερμότητας. Στην αλκοολική ζύμωση το υπόστρωμα (γλυκόζη) έχει το ρόλο του αρχικού δότη ηλεκτρονίων και το προϊόν (αιθανόλη) το ρόλο του τελικού δέκτη. Είναι οργανικά μόρια και δεν απαιτείται η παρουσία μοριακού οξυγόνου (ως δέκτης), όπως συμβαίνει στην αναπνοή.

Μέρος της ελεύθερης ενέργειας χρησιμοποιείται για μεταβολικές διεργασίες (κίνηση, βιοσύνθεση). Η ενέργεια παράγεται μέσω αντιδράσεων καταβολισμού και χρησιμοποιείται για την βιοσύνθεση χρήσιμων προϊόντων μέσω αντιδράσεων αναβολισμού. Το μόριο μέσω του οποίου η ενέργεια μεταφέρεται είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και η υδρόλυσή του σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση 7,3kcal/mol. Περίπου το 6-8% της ενέργειας που εμπεριέχεται στο μόριο της γλυκόζης μετατρέπεται σε άμεσα διαθέσιμη μορφή ενέργειας (ATP). Μεγάλο μέρος παραμένει δεσμευμένο στο μόριο της αιθανόλης.

1.2. Αύξηση πληθυσμού ζυμομυκήτων

Η αύξηση του πληθυσμού μιας ζύμωσης ακολουθεί ένα πρότυπο ανάπτυξης που μπορεί να περιγραφεί με τέσσερις φάσεις:

Φάση προσαρμογής

Στην πρώτη φάση τα κύτταρα προσαρμόζονται στο περιβάλλον. Ο αριθμός των κυττάρων που γεννιούνται πλησιάζει τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν αφού μερικά κύτταρα αποτυγχάνουν να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον.

Λογαριθμική φάση

Όταν ολοκληρωθεί η προσαρμογή των κυττάρων τα περισσότερα κύτταρα διαιρούνται με έναν σταθερό ρυθμό. Σε αυτή τη φάση ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων φτάνει στη μέγιστη τιμή.

Στατική φάση

Όσο τα θρεπτικά συστατικά καταναλώνονται, τα μεταβολικά προϊόντα γίνονται τοξικά. Έτσι ο πληθυσμός μεταπίπτει σε μια νέα φάση κατά την οποία ο ρυθμός διαίρεσης των κυττάρων είναι ίδιο με το ρυθμό θανάτου τους.

Φάση θανάτου

Όσο συνεχίζει η μείωση των θρεπτικών συστατικών και τα παραπροϊόντα γίνονται ακόμη πιο τοξικά, περισσότερα κύτταρα πεθαίνουν από το να διαιρούνται. Έτσι ο πληθυσμός μειώνεται με σταθερό ρυθμό και τελικά πεθαίνει.

1.3. Ρόλος των ζυμομυκήτων

Οι ζύμες που επιδρούν στη διαμόρφωση του οίνου, προέρχονται από το αμπέλι (αυθόρμητη ζύμωση), καθώς βρίσκονται στην επιφάνεια των σταφυλιών, από το περιβάλλον του οινοποιείου (Fleet et al. 2002). Επίσης μπορούν να προέλθουν από τον ενοφθαλμισμό του μούστου με έτοιμο παρασκεύασμα ζύμης (Boulton et al. 1996).

Η εξάπλωση των ζυμών που βρίσκονται στην επιφάνεια των σταφυλιών έχει μελετηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο (Barnett et al. 1972; Bureau et al. 1982; Combina et al. 2005; Davenport 1974; Goto and Yokotsuka 1977; Martini et al. 1996; Nisiotou and Nychas 2007; Parish and Carroll 1985; Prakitchaiwattana et al. 2004; Raspor et al. 2006; Renouf et al. 2007; Rosini et al. 1982; Sapis-Domercq et al. 1977; Yanagida et al. 1992). Το μέγεθος του πληθυσμού που εκτιμάται ότι βρίσκεται στην επιφάνεια των σταφυλιών είναι $3 \cdot 10^5$ ανά τετραγωνικό εκατοστό (cm^2) (Rosini et al. 1982) και μπορεί να ποικίλει από 10^4 έως 10^6 κύτταρα ανά τετραγωνικό εκατοστό (Fleet et al. 2002).

Η παρουσία, η ανάπτυξη και η επιβίωση των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η γεωγραφική περιοχή (Amerine and Kunkee, 1968), το κλίμα (Fleet et al., 1984; Parrish and Carroll, 1985), η ηλικία του αμπελιού, η ποικιλία αμπέλου, η υγεία και η ακεραιότητα του πρέμνου, οι καλλιεργητικές τεχνικές (Cuinier, 1976; Martini et al., 1980; Rosini et al., 1982), η χρήση τεχνολογίας για την παραγωγή του οίνου. Οι αναερόβιες συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, το χαμηλό pH και η υψηλή περιεκτικότητα του μούστου σε σάκχαρα συμβάλλουν στη δημιουργία ενός ιδιαίτερου περιβάλλοντος για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Όσον αφορά στην επιβίωση σε αυτές τις συνθήκες, οι ζυμομύκητες έχουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι άλλων μικροοργανισμών.

Στις αυθόρμητες ζυμώσεις λαμβάνει μέρος πλήθος διαφορετικών ειδών ζυμών (Heard and Fleet, 1988) που εξαιτίας του μεταβολισμού τους, συμμετέχουν στη διαμόρφωση του αρώματος και της γεύσης του οίνου (Lambrechts and Pretorius, 2000; Fleet, 2003, Gil et al. 1996; Lema et al. 1996; Romano et al. 2003). Η θερμοκρασία επηρεάζει την ανάπτυξη, και σε χαμηλές θερμοκρασίες (15-20 °C) τα

γέννη *Hanseniaspora* και *Candida* επιβιώνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα καθ' όσον αποκτούν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη. Συνεπικρατούν με τον *Saccharomyces cerevisiae* μέχρι το τέλος της ζύμωσης και μπορούν να επιδράσουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (Heard and Fleet, 1988; Erten, 2002).

1.4. Ταυτοποίηση των ζυμομυκήτων

Για να μελετηθεί ο πληθυσμός των ζυμών χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές. Οι περισσότερες από αυτές απαιτούν πρώτα την καλλιέργειά τους σε τρυβλίο και την ανάπτυξη τους σε κάποιο θρεπτικό μέσο και έπειτα γίνεται η ταυτοποίησή τους με μοριακές τεχνικές. Στις τεχνικές που προηγείται ανάπτυξη σε τρυβλίο υπάρχει κίνδυνος αποτυχίας ανίχνευσης κάποιων ειδών που βρίσκονται σε ισχνές ποσότητες. Επίσης η ανάπτυξη των πληθυσμών σε θρεπτικό μέσο χωρίς κάποιον παράγοντα εκλεκτικότητας, μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών γιατί αναπτύσσονται γρηγορότερα και ανταγωνίζονται τους υπόλοιπους με αποτέλεσμα οι τελευταίοι να μην μπορούν να ανιχνευθούν. Η προσθήκη στο θρεπτικό μέσο κάποιου παράγοντα αναστολής της ανάπτυξης των γρήγορα αναπτυσσόμενων ζυμών, μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και κάποιων άλλων.

Και στις αυθόρμητες ζυμώσεις και στις ζυμώσεις μετά από ενοφθαλμισμό, ο μούστος περιέχει μεγάλες ποσότητες αυτοχθόνων μικροοργανισμών (Clemente-Jimenez et al. 2004; Fleet et al. 2002; Schuller et al. 2005). Το χρονικό διάστημα που επιβιώνουν οι ζύμες που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* εξαρτάται από τις οινοποιητικές τεχνικές και από τα επίπεδα που συναντώνται οι μικροοργανισμοί.

Με τη χρήση μοριακών τεχνικών ανάλυσης της αλληλουχίας του μιτοχονδριακού DNA (Dubourdieu et al., 1987) και τη χρήση μοριακών δεικτών (Petering et al., 1991), είναι εφικτή η ταυτοποίηση όχι μόνο του είδους των ζυμών που συμμετέχουν στη ζύμωση, αλλά και των στελεχών που απαντώνται στη ζύμωση.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές για να ταυτοποιήσουν τους απομονωμένους πληθυσμούς των οποίων η ανάπτυξη είχε προηγηθεί σε τρυβλίο. Οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί ως τώρα για την ταυτοποίηση του είδους των μικροοργανισμών, είναι: 1) PCR του 26S ριβοσωμικού DNA (Kurtzman and Robnett

1998) και ταυτοποίηση της αλληλουχίας του, 2) PCR και χρήση περιοριστικών ενζύμων στους εσωτερικούς μεταγραφικούς παράγοντες περιορισμού (ITS) του 5,8 S ριβοσωμικού DNA (Guillamon et al. 1998)

Για να αποφευχθούν τα προβλήματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν μοριακές τεχνικές που δεν απαιτούν την προηγούμενη ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε τρυβλίο και η ταυτοποίηση μπορεί να γίνει απευθείας από το περιβάλλον που αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός (Prakitchaiwattana et al. 2004), αρκεί να υπάρχει ικανή ποσότητα βιομάζας. Τέτοιου είδους τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τόσο για την παρακολούθηση του αυτόχθονα πληθυσμού, όσο και για την ανίχνευση προσβολής από κάποιον ανεπιθύμητο μικροοργανισμό (συνήθως *Brettanomyces*). Αυτές είναι: 1) Συνδυασμός PCR και DGGE (Cocolin et al. 2000), 2) ποσοτική PCR (q-PCR) (Phister and Mills 2003). Τα προβλήματα αυτών των τεχνικών είναι ότι δεν μπορούν να διαχωρίσουν ζωντανά από νεκρά κύτταρα και συνήθως εντοπίζουν τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο στον συνολικό πληθυσμό.

Οι τεχνικές που βασίζονται στην PCR μπορούν να διαχωρίσουν τους μικροοργανισμούς σε είδη ή/και γένη χρησιμοποιώντας κάποιους εκκινητές. Αν οι εκκινητές είναι ειδικοί (specific) υπάρχει κίνδυνος να μην ανιχνευθούν είδη τα οποία δεν είναι αναμενόμενα ότι υπάρχουν στο συγκεκριμένο περιβάλλον.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Αρίθμηση ανάπτυξης πληθυσμού

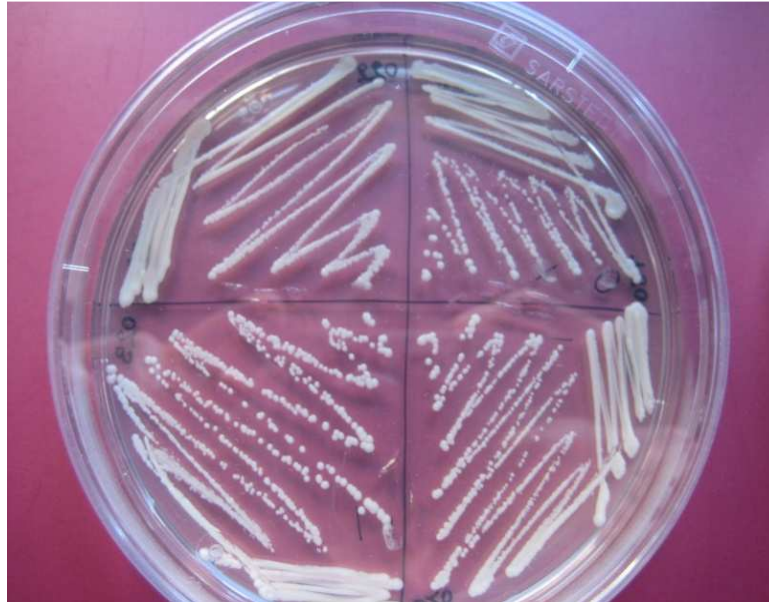
- Λήψη 1 mL δείγματος απευθείας από το κρασί
- Δεκαδικές αραιώσεις σε ρυθμιστικό διάλυμα (NaCl-ddH₂O)
- Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό YGC (Yeast Glucose Chloramphenicol agar, Merck, 116000)
- Επώαση στους 25°C για 5 μέρες
- Αρίθμηση αποικιών την πέμπτη μέρα της ανάπτυξης σε Plate Count agar (LabM, LAB149)



Εικόνα 2: Αποικίες της τελευταίας δεκαδικής αραιώσης που επιλέχθηκαν για γραμμική εξάπλωση.

2.2. Διαχωρισμός στελέχους

- Επιλογή όλων των αποικιών της μεγαλύτερης αραιώσης για γραμμική εξάπλωση
- Μεταφορά κάθε αποικίας με διαδοχικές γραμμικές εξαπλώσεις (streaking) στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα για την εξασφάλιση μονοκλωνικής αποικίας



Εικόνα 3: Γραμμική εξάπλωση.

- Έλεγχος καθαρότητας των καλλιεργειών
- Επιλογή μονοκλωνικής αποικίας και ανάπτυξη σε 5mL Malt Extract για 48 ώρες υπό ανάδευση
- Φυγοκέντρηση και μεταφορά σε ependorf

- - Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
 - Ηλεκτροφόρηση DNA

2.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

2.3.1. Προετοιμασία δείγματος

- Προσθήκη (0,5mL) από το παρακάτω διάλυμα

Συστατικά	Ποσότητα
Γλυκερόλη (SERVA, 39788)	20,0 %
Δωδεκανοθειικό νάτριο (SDS) (SIGMA, L4522)	20,0 %
Υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris) (SERVA, 37186)	12,5 %
β-Μερκαπτοαιθανόλη (SERVA)	5,0 %
Απιονισμένο νερό	37,5 %

Πίνακας 1: Σύσταση διαλύματος

- Αποθήκευση στους -2°C (αν χρειάζεται)
- Βράσιμο για 10 λεπτά
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου δωδεκανοθειικού νατρίου

2.3.2. Ηλεκτοφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου δωδεκανοθειικού νατρίου: SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

1. Στήσιμο συσκευής ηλεκτροφόρησης με τα **κατάλληλα τζαμάκια** και τα **ανάλογα χτενάκια** (spacer) και στερέωση στη βάση με το αφρολέξ
2. Δημιουργία του ρυθμιστικού διαλύματος ροής (running buffer)

Συστατικά	Ποσότητα
Tris base (SERVA, 37186)	15,0 g/L
Γλυκίνη (SERVA, 23395)	72,0 g/L
Δωδεκανοθειικό νάτριο (SDS) (SIGMA, L4522)	5,0 g/L

Πίνακας 2: Ρυθμιστικό διάλυμα ροής (Running buffer) pH 8,3

3. Το APS παρασκευάζεται **κάθε φορά** πριν χρησιμοποιηθεί (1gr APS σε 1mL H₂O)
4. Δημιουργία πρώτα της πηκτής διαχωρισμού (separating gel) και έπειτα της πηκτής συσσώρευσης (stacking gel)

Πηκτή διαχωρισμού (separating gel) - 12 %	Ποσότητα
Απιονισμένο νερό	33,5 mL
1,5 Tris- HCl pH 8,8	25,0 mL
Δωδεκανοθειικό νάτριο (SDS) (SIGMA, L4522)	1,0 mL
Ακρυλαμίδιο – Δισακρυλαμίδιο 30 % (SERVA, 10688)	40,0 mL
Υπερθειικό αμμώνιο 10 % (APS) (SERVA, 13375)	0,5 mL
N,N,N,N'- Τετραμεθυλαινδιαμίνη (TEMED) (SERVA, 35930)	0,05 mL

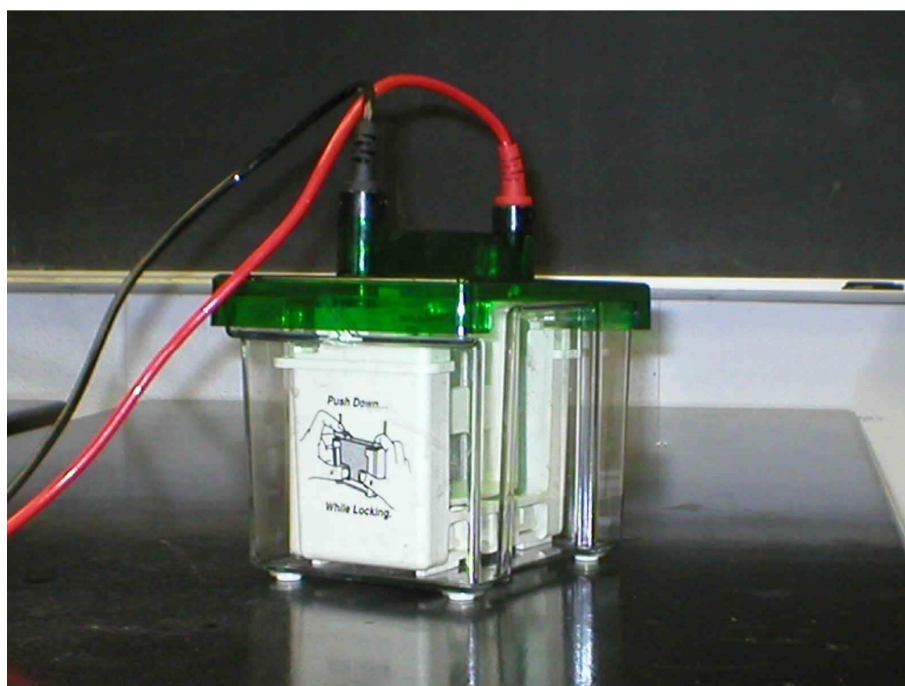
Πίνακας 3: Πηκτή διαχωρισμού (separating gel) - 12 %

Πηκτή συσσώρευσης (stacking gel) -4%	Ποσότητα
Απιονισμένο νερό	6,1 mL
1,5 Tris- HCl pH 6,8	5,0 mL
Δωδεκανοθειικό νάτριο (SDS) (SIGMA, L4522)	0,2 mL
Ακρυλαμίδιο – Δισακρυλαμίδιο 30 % (SERVA, 10688)	0,5 mL
Υπερθειικό αμμώνιο 10 % (APS) (SERVA, 13375)	0,1 mL
N,N,N',N'- Τετραμεθυλαινδιαμίνη (TEMED) (SERVA, 35930)	0,02 mL

Πίνακας 4: Πηκτή συσσώρευσης (stacking gel) - 4 %

* Το TEMED και το APS προστίθενται στο τέλος καθώς είναι οι παράγοντες πολυμερισμού

5. Προσθήκη 20mL διαλύματος του separating gel στο κάθε ένα από τα τζαμάκια
6. Προσθήκη ισοβουτανόλης
7. Αναμονή μέχρι να πολυμεριστεί το gel
8. **Πλήρης** απομάκρυνση της ισοβουτανόλης
9. Προσθήκη διαλύματος του stacking gel στο κάθε ένα από τα τζαμάκια
10. Τοποθέτηση του spacer με προσοχή για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων
11. Αναμονή μέχρι να πολυμεριστεί το gel
12. Αφαίρεση spacer
13. Τοποθέτηση λάστιχων στο core και βρέξιμο με ddH₂O ή με buffer
14. Τοποθέτηση του gel με τα τζαμάκια στο tank της ηλεκτροφόρησης
15. Προσθήκη του running buffer στο tank
16. Φόρτωμα δειγμάτων (20μL δείγματος)
17. Εφαρμογή 200V για 4 ώρες
18. Τοποθέτηση gel σε διάλυμα χρωστικής για όλο το βράδυ
19. Ξέπλυμα για 1 μέρα
20. Φωτογράφιση σε scanner ορατού φωτός



Εικόνα 4: Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

2.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

2.4.1. Προετοιμασία δείγματος

2.4.2. DNA extraction

1. Αιώρηση βιομάζας σε 1 mL δ/τος **1M sorbitol, 0,1M EDTA, PH:7.5**
2. **Υπέρηχοι**
3. **Φυγοκέντρηση** (15 min σε 13400 rpm) και **διάλυση ιζήματος** (vortex) σε 0,5 mL δ/τος **50mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, PH: 7.4**
4. **Προσθήκη 50 μL 10% SDS** και επώαση στους **65 °C για 30 min**
5. **Προσθήκη 0,2 mL οξικό κάλιο 5M** και **άμεση μεταφορά σε πάγο για 30 min**
6. **Φυγοκέντρηση** (15 min σε 13000 rpm και 4 °C) και **μεταφορά υπερκειμένου** σε καθαρό ependorf
7. **Προσθήκη 1 mL ισοπροπανόλης** και παραμονή σε **θερμοκρασία δωματίου για 5 min**
8. **Φυγοκέντρηση** (15 min σε 13000 rpm και 4 °C) και **επαναιώρηση** σε 0,5 mL **70% αιθανόλη**
9. **Φυγοκέντρηση** (15 min σε 13000 rpm και 4 °C) και **πλήρης απομάκρυνση** της αιθανόλης και αιώρηση σε **50μL dd H₂O**
10. **Αποθήκευση** στους **-20 °C**

2.3.4. Ενίσχυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

2.3.4.1. Ενίσχυση αλληλουχίας 26S ριβοσωμικού DNA

26S rDNA		
20μL	x1	concentration
10x buffer without MgCl ₂	25μL	
dATP (100mM)	0.5μL	0.2mM
dTTP (100mM)	0.5μL	0.2mM
dCTP (100mM)	0.5μL	0.2mM
dGTP (100mM)	0.5μL	0.2mM
MgCl ₂ (50mM)	7,5μL	2.5mM
primer NL1(10μM)	5μL	4μM
primer NL4(10μM)	5μL	4μM
Taq (50/μL)	2μL	1U
H ₂ O	203.5μL	
DNA	2μL	

PCR program		
94°C	5min	
94°C	1min	
52°C	1min	x36
72°C	2min	
72°C	5min	

Ηλεκτροφόρηση σε gel 1.5% αγαρόζης για 1 ώρα και 30 λεπτά στα 100V

Μεταφορά σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 10 λεπτά

Μεταφορά σε απιονισμένο νερό για 20 λεπτά

Φωτογράφιση σε υπεριώδες (UV)

2.4.3.2. Τυχαία ενίσχυση πολυμορφισμών του γενετικού υλικού - RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)

Εκκινητής M13

M13 (5'-GAG-GGT-GGC-GGT-TCT-3')		
20μL	x1	concentration
10x buffer without MgCl ₂	2μL	
dATP (100mM)	0.04μL	0.2mM
dTTP (100mM)	0.04μL	0.2mM
dCTP (100mM)	0.04μL	0.2mM
dGTP (100mM)	0.04μL	0.2mM
MgCl ₂ (50mM)	1μL	2.5mM
primer M13 (10μM)	8μL	4μM
Taq (50/μL)	0.2μL	1U
H ₂ O	6.64μL	
DNA	2μL	

PCR program	
95°C	2min
95°C	1min
38°C 1min ramp to 72°C at 0.6°C/sec	x35
72°C	2min
72°C	10min

Ηλεκτροφόρηση σε gel 1.5% αγαρόζης για 1 ώρα και 30 λεπτά στα 100V

Μεταφορά σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 10 λεπτά

Μεταφορά σε απιονισμένο νερό για 20 λεπτά

Φωτογράφιση σε υπεριώδες

2.4.3.3. Ενίσχυση επαναλαμβανόμενων στοιχείων του γενετικού υλικού – Rep-PCR

Εκκινητής GTG5

GTG5 (5' -GTG-GTG-GTG-GTG-GTG-3')		
20μL	x1	concentration
10x buffer without MgCl ₂	2μL	
dATP (100mM)	0.2μL	0.2mM
dTTP (100mM)	0.2μL	0.2mM
dCTP (100mM)	0.2μL	0.2mM
dGTP (100mM)	0.2μL	0.2mM
MgCl ₂ (50mM)	2.12μL	2.5mM
primer GTG5 (10μM)	0.8μL	4μM
Taq (50/μL)	0.2μL	1U
H ₂ O	12.48μL	
DNA	2μL	

PCR program		
95°C	5min	
95°C	45sec	
50°C	1min	x40
72°C	1min	
72°C	6min	

Ηλεκτροφόρηση σε gel 1.5% αγαρόζης για 1 ώρα και 30 λεπτά στα 100V

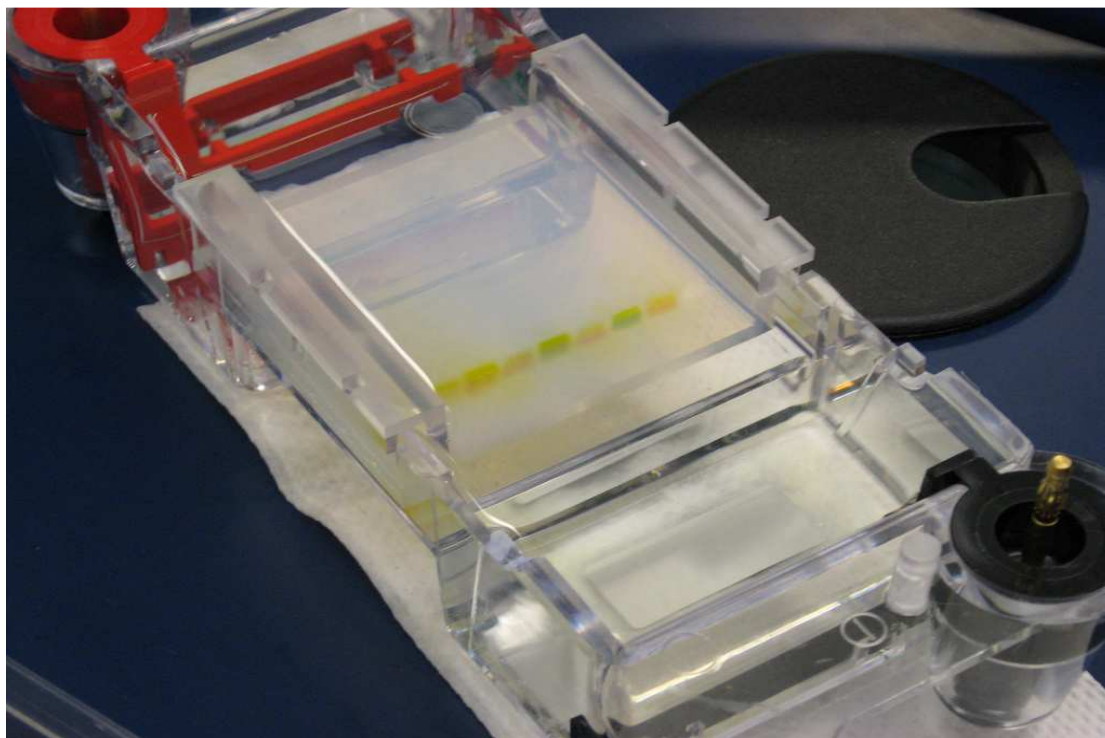
Μεταφορά σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 10 λεπτά

Μεταφορά σε απιονισμένο νερό για 20 λεπτά

Φωτογράφιση σε υπεριώδες

2.4.4. Ηλεκτοφόρηση σε πηκτική αгарόζης

1. Στήσιμο συσκευής ηλεκτροφόρησης
2. Δημιουργία της πηκτικής αгарόζης 1,5% (1,5gr αгарόζη, 100 mL TAE 1x)
3. Εισαγωγή 2μL loading dye + 7 μL ladder στο πρώτο πηγαδάκι και 2μL loading dye + 20μL DNA στα υπόλοιπα (15)
4. Ηλεκτροφόρηση στα 100 V για 1 ώρα και 30 λεπτά
5. Κλείσιμο συσκευής
6. Τοποθέτηση της πηκτικής σε BrEth για 10 λεπτά
7. Ξέπλυμα 20 λεπτά
8. Φωτογράφιση σε υπεριώδες



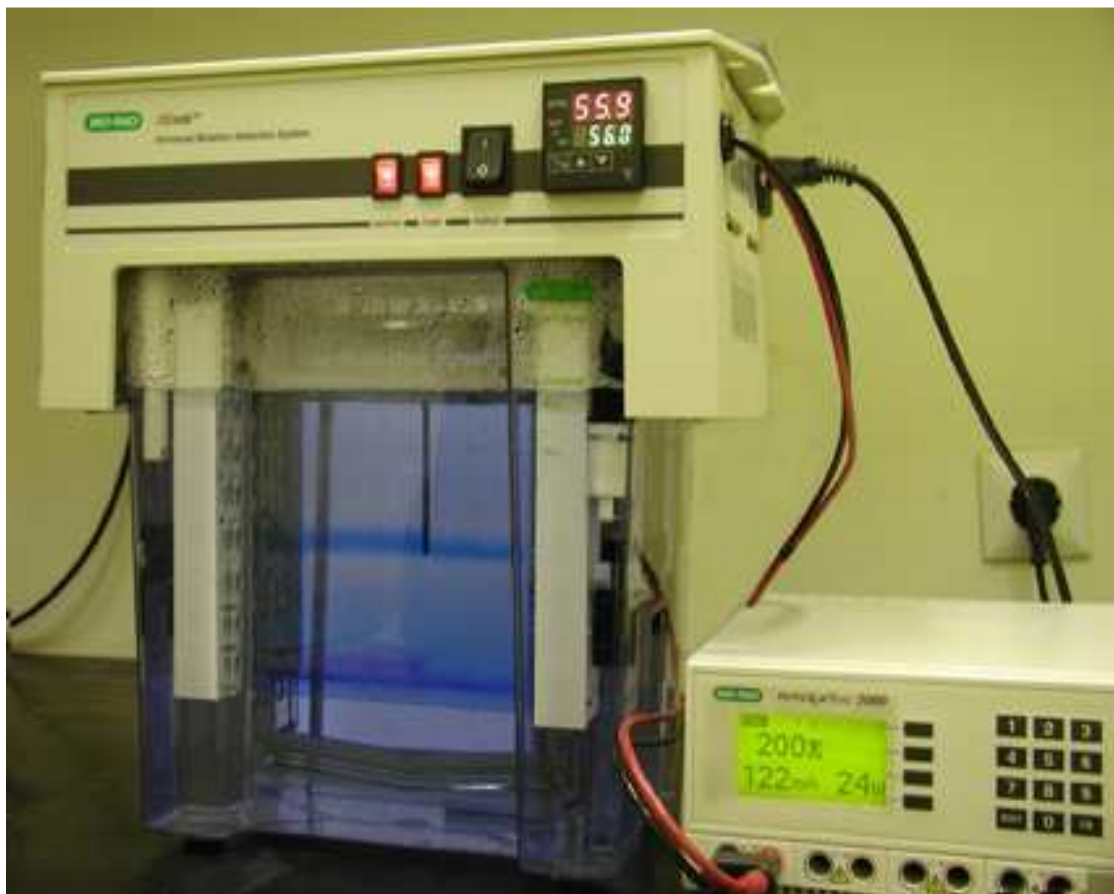
Εικόνα 5: Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτική αгарόζης.

2.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

2.5.1. Διαδικασία

1. Στήσιμο συσκευής
2. Δημιουργία 7L TAE 1x
3. Προσθήκη διαλύματος στη συσκευή και ρύθμιση θερμοκρασία στους 68 °C (για να τρέξει στους 60 °C)
4. Στήσιμο συσκευής ηλεκτροφόρησης με τα κατάλληλα τζαμάκια και τα ανάλογα χτενάκια (spacer)
5. Τοποθέτηση ρόδας (gradient delivery system) στην κατάλληλη απόσταση από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης
6. Προσθήκη 750mL διαλύματος για baseline από κάθε άκρη στα τζαμάκια
7. Αναμονή μέχρι να πολυμεριστεί και τοποθέτηση της βελόνας με ταινία στο πάνω μέρος στο τζαμάκι
8. Δημιουργία gel σε 2 ποτήρια ζέσεως
 - για spacer 1mm:
 - * Στο διάλυμα με την υψηλή συγκέντρωση, προσθέτουμε 150μL DCode Dye
 - διάλυμα 60% (+150μL DCode Dye) : 9mL 100%DS + 6mL0% DS
 - διάλυμα 30% : 4.5mL 100%DS + 10.5mL0% DS
 - Προσθήκη 135μL APS και 13.5μL TEMED σε κάθε ποτήρι ζέσεως
9. Προσθήκη διαλυμάτων στις σύριγγες και αφαίρεση του αέρα
10. Τοποθέτηση της σύριγγας με την πυκνή συγκέντρωση του διαλύματος στο πίσω μέρος της ρόδας και της σύριγγας με την αραιή συγκέντρωση στο μπροστινό μέρος της ρόδας
11. Ένωση των συριγγών στο Y fitting που είναι συνδεδεμένο με τη βελόνα
12. Κίνηση της ρόδας αργά και σταθερά
13. Αφαίρεση βελόνας
14. Τοποθέτηση του spacer με προσοχή για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων
15. Αναμονή μέχρι να πολυμεριστεί το gel

16. Αφαίρεση spacer
17. Τοποθέτηση λάστιχων στο core και βρέξιμο με λίγο ddH₂O ή με buffer
18. Τοποθέτηση του gel με τα τζαμάκια
19. Κλείσιμο συσκευής και αφαίρεση buffer
20. Φόρτωμα δειγμάτων (25μL δείγματος + 15μL Loading Dye 2x)
21. Εφαρμογή του Electrophoresis / Temperature Control Module
22. Ρύθμιση θερμοκρασίας στους 60 °C
23. Σύνδεση συσκευής με το τροφοδοτικό και εφαρμογή 50V για 5 λεπτά
24. Εφαρμογή 200V για 4 ώρες
25. Κλείσιμο συσκευής
26. Τοποθέτηση του gel με το τζαμάκι σε BrEth για 5 λεπτά
27. Ξέπλυμα 20 λεπτά
28. Φωτογράφιση σε υπεριώδεις



Εικόνα 6: Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου βαθμίδωσης αποδιατακτικών παραγόντων.

2.6. Διαλύματα

2.6.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

TBE 5x	1 L	54gr tris base 27,5 gr boric acid 20 mL 0,5 EDTA (PH=8)
EDTA 0,5M PH=8	1 L	186,1 gr Na ₂ EDTA 700 mL H ₂ O ρύθμιση στο PH=8 με NAOH (αλλιώς δεν διαλύεται)
Tris HCl 1M PH=7,5	1 L	157,60 gr Tris HCl ρύθμιση στο PH=8 με HCl
TBE 0.5M		1:10 από <u>TBE 5x</u>
TAE 50x	1 L	242gr tris base 57.1mL glacial acetic acid 100 mL EDTA 0.5M ρύθμιση PH στο 8

2.6.2. DNA extraction

1M sorbitol 0.1M EDTA PH 7.5	500mL	91.1 gr sorbitol 100mL EDTA 0.5mL H2O → 400mL ρύθμιση PH στο 7,5
50mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, PH: 7.4		
Tris HCl 1M PH=7,5	1L	157,60 gr Tris HCl ρύθμιση στο PH=8 με HCl
10% SDS * Ελαφριά θέρμανση, αν δημιουργηθούν κρύσταλλοι στο SDS, μέχρι να διαλυθούν		
Potassium acetate 5M	500mL	245gr potassium acetate σε 500mL????
Ισοπροπανόλη		
70% αιθανόλη		

2.6.3. DGGE

DCode Dye	10mL	0.05gr Bromophenol Blue 0.05gr Xylene cyanol 10mL TAE 1x
Gel Loading Dye 2x	10mL	0.25mL 2% Bromophenol Blue 0.25mL 2% Xylene cyanol 7mL 100% Glycerol 2.5mL ddH ₂ O
ADS 10%	1mL	0.1 gr Ammonium persulfate 1mL ddH ₂ O
Proteinase K	1mL	20mg 1mL ddH ₂ O
Loading Dye 6x	10mL	0.45mL 2% Bromophenol Blue 0.45mL 2% Xylene cyanol 6mL 100% Glycerol 1.2 mL 0.5M EDTA
0% DS	100mL	17.5mL Acrylamide / Bis 40% 2mL TAE 50x ddH ₂ O
100% DS	100mL	17.5mL Acrylamide / Bis 40% 2mL TAE 50x 40mL Formamide 42gr UREA 1mL ddH ₂ O Ρύθμιση όγκου
Διάλυμα για baseline	15 mL	1.5 mL 0%DS 13.5 mL APS 1.35μL TEMED

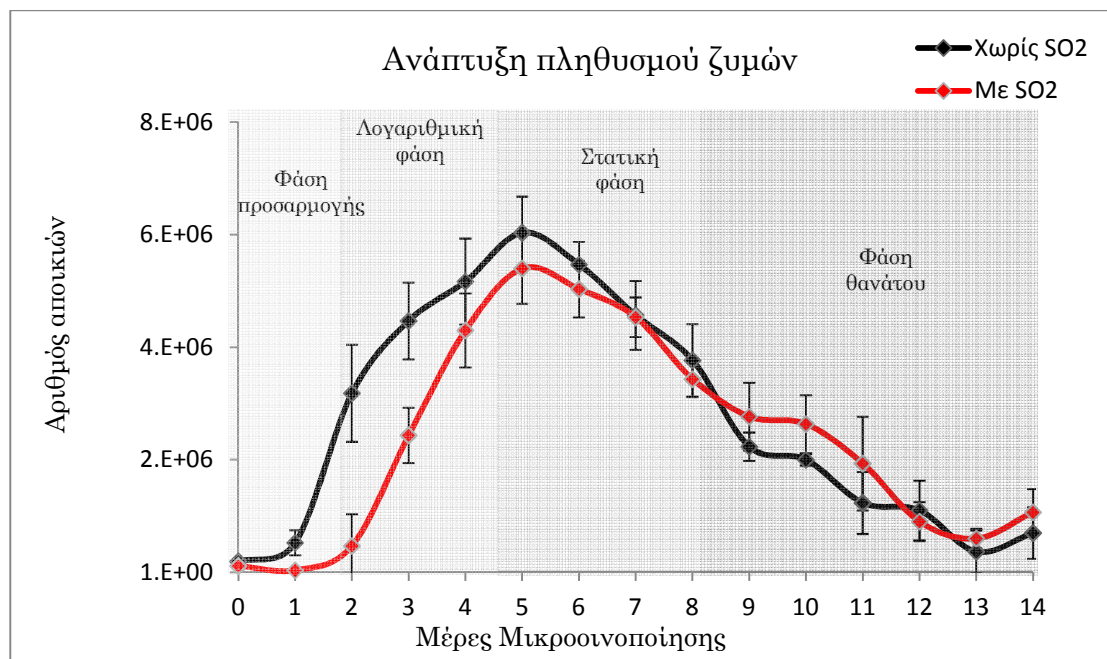
3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η βιοποικιλότητα των ζυμών τόσο ανάμεσα στα είδη, όσο και μέσα στο ίδιο είδος εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνεται η οينوποίηση (Cavaliere et al. 1998; Sabate et al. 1998; Schuller et al. 2005; Sipiczki 2002, 2006; Valero et al. 2007; Versavaud et al. 1995; Vezinhet et al. 1992). Τόσο στον μούστο όσο και κατά τις πρώτες μέρες της οينوποίησης, επικρατούν μικροοργανισμοί με χαμηλό μεταβολικό ρυθμό, όπως οι ζύμες που ανήκουν στα γένη *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida* και *Metschnikowia* (Longo et al., 1991), καθώς και στα γένη *Pichia*, *Issatchenkia* και *Kluyveromyces*. Είδη που ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* και ιδιαίτερα το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, καταναλώνουν γρήγορα τα σάκχαρα που εμπεριέχονται στο μούστο (Querol et al., 1990) και έχουν ανθεκτικότητα στην αιθανόλη. Τα είδη που επικρατούν στην διάρκεια της ζύμωσης και τελικά ολοκληρώνουν τη μεταβολική διαδικασία ανήκουν το γένος *Saccharomyces* (Fleet and Heard, 1993).

Η παραγωγή αιθανόλης από το *Saccharomyces cerevisiae* επιβραδύνει την ανάπτυξη των υπόλοιπων ζυμομυκήτων. Τα γένη *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* δεν επιβιώνουν σε περιβάλλον με τη συγκέντρωση αιθανόλης να ξεπερνάει το 5–7% (Heard and Fleet, 1988). Το είδος *Saccharomyces cerevisiae* σε αντίθεση με άλλους μικροοργανισμούς παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην όσμωση, όταν τα σάκχαρα βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση (υπο-οσμωτικό στρες) στον οίνο κατά την αποζύμωση του οίνου. Είναι σχετικά ανθεκτικός σε υψηλές οξύτητες και μπορεί να αναπαραχθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Ειδικά στους ερυθρούς οίνους, οι φαινολικές ουσίες που εκχυλίζονται κατά τη διάρκεια της οينوποίησης καθιστούν τους ζυμομύκητες περισσότερο ανταγωνιστικούς.

3.1. Ανάπτυξη πληθυσμού

Στο σχήμα 1 φαίνεται η εξέλιξη του πληθυσμού των ζυμών κατά την διάρκεια μικροοινοποίησης με και χωρίς προσθήκη SO₂



Σχήμα 1: Εξέλιξη του πληθυσμού των ζυμών κατά την μικροοινοποίηση με προσθήκη και χωρίς SO₂

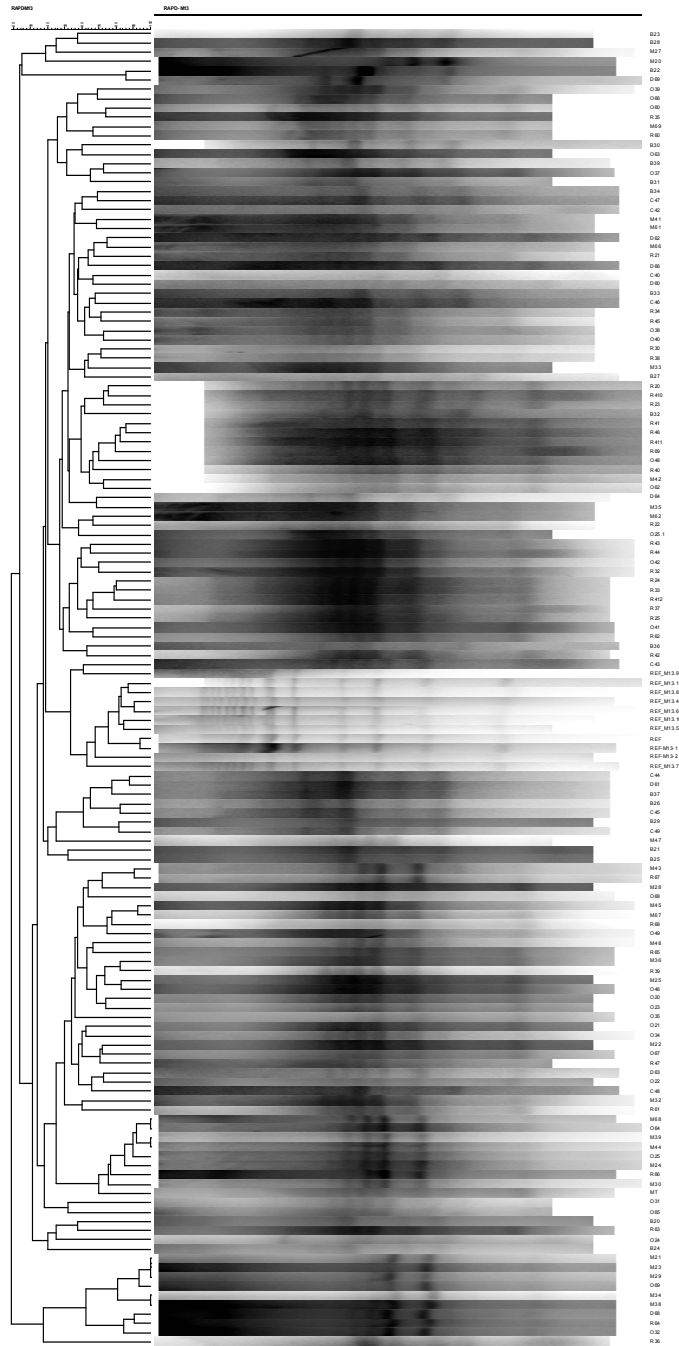
Η επίδραση του διοξειδίου του θείου (SO₂) είναι εμφανής στην φάση προσαρμογής των κυττάρων. Στην οينوποίηση με την προσθήκη SO₂ παρατηρείται παραμονή του πληθυσμού στη φάση προσαρμογής για μία ημέρα περισσότερο από ότι χωρίς την προσθήκη διοξειδίου του θείου.

3.2. Απομόνωση και διαχωρισμός

Καθ' όλη τη διάρκεια της μικροοινοποίησης και από τις δύο επεμβάσεις στις μικροοινοποιήσεις (παρουσία και απουσία SO₂) απομονώθηκαν 146 μονοκλωνικές αποικίες από την αρχή τη μέση και το τέλος της οينوποίησης, για να μελετηθεί η βιοποικιλότητα, τόσο σε επίπεδο είδους όσο και σε επίπεδο υποείδους.

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το δενδρόγραμμα που έχει προκύψει από την χρήση του εκκινητή M13 και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της

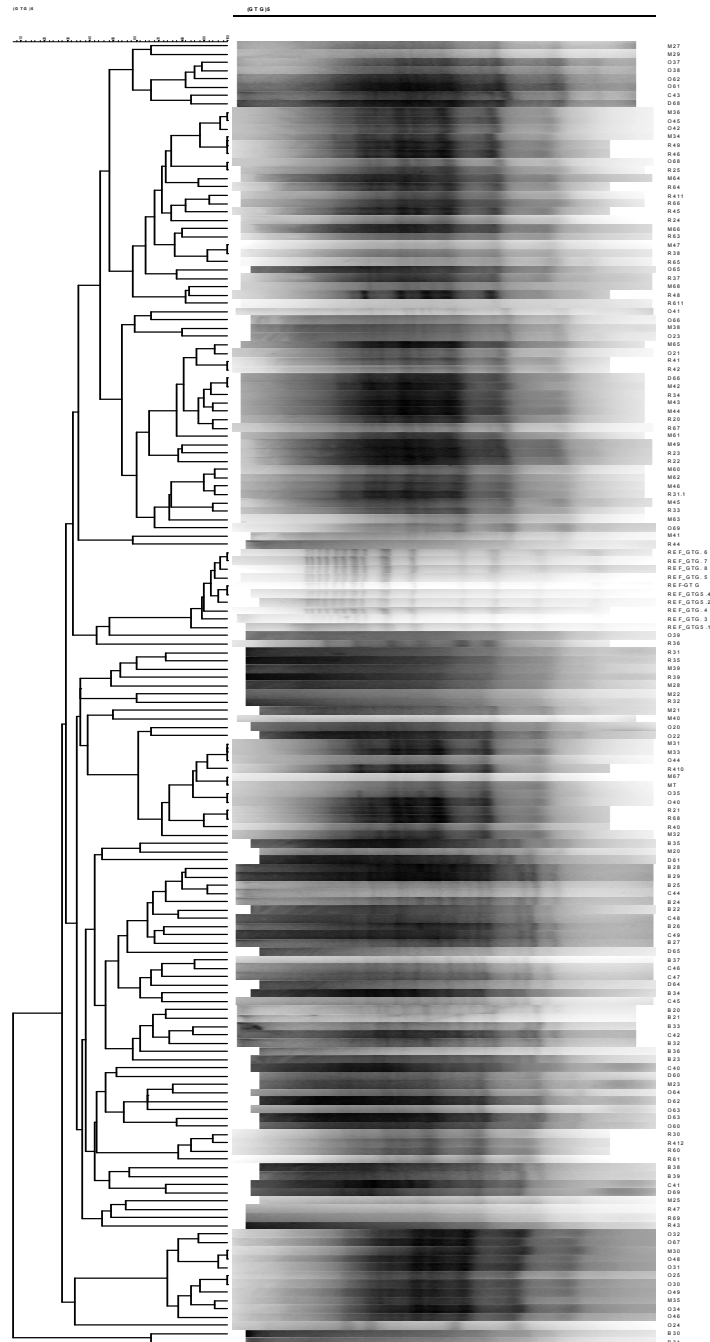
ηλεκτροφόρησης σε υπολογιστικό πρόγραμμα. Προέκυψαν 13 γενετικά προφίλ για το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, σε 5 γενετικά προφίλ για το είδος *Hanseniaspora uvarum*, 3 γενετικά προφίλ για το είδος *Metschnikowia pulcherrima* και 1 γενετικό προφίλ για το είδος *Lachancea thermotolerans*.



Εικόνα 7: Φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε με τον εκκινητή M13

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε με τη δεύτερη τεχνική repetitive elements PCR, όπου χρησιμοποιείται ο εκκινητής GTG5.

Οι αποικίες διαχωρίστηκαν σε 14 γενετικά προφίλ για το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, σε 5 γενετικά προφίλ για το είδος *Hanseniaspora uvarum*, 4 γενετικά προφίλ για το είδος *Metschnikowia pulcherrima* και 1 γενετικό προφίλ για το είδος *Lachancea thermotolerans*.

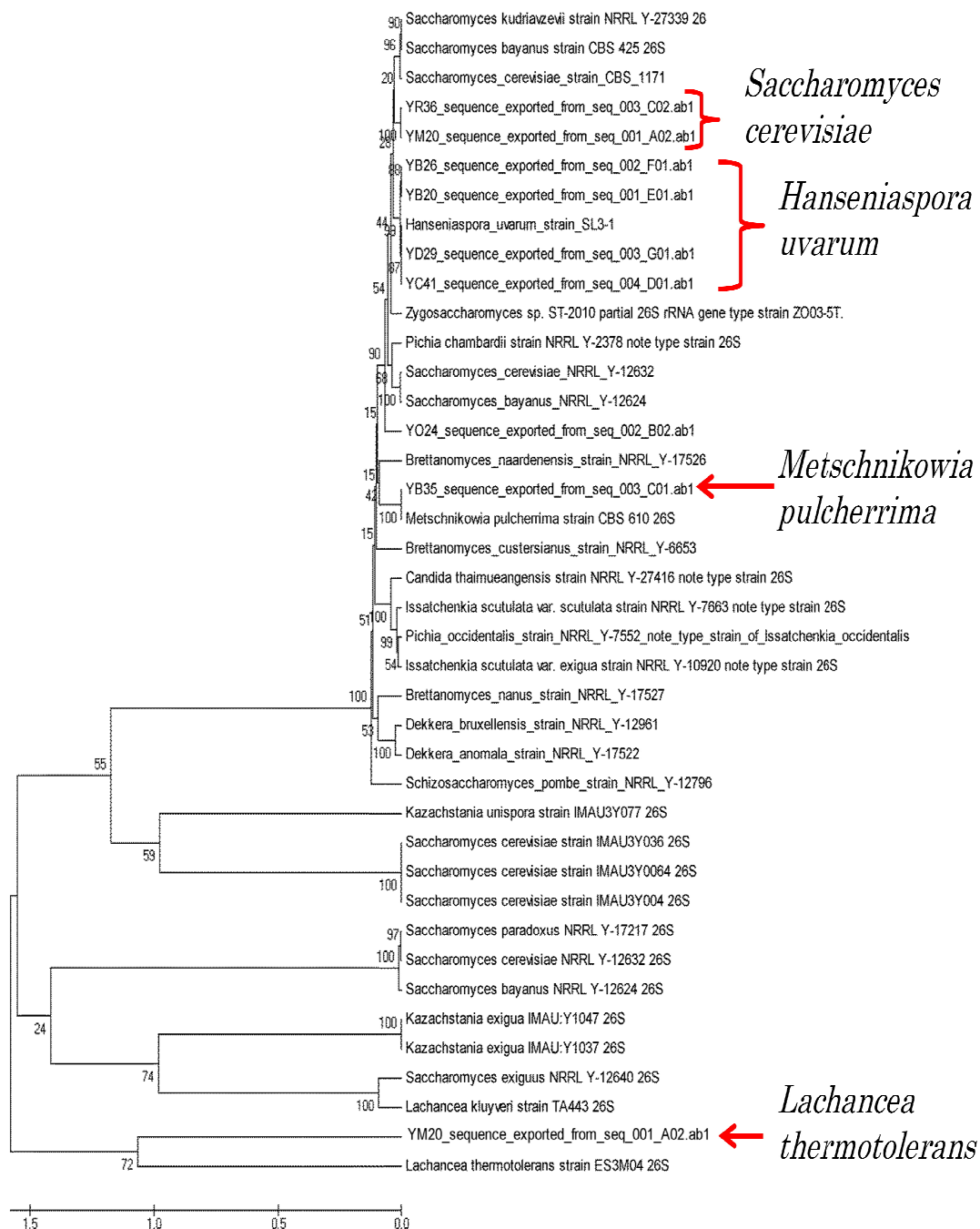


Εικόνα 8: Φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε με τον εκκινητή GTG5

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε με τη τεχνική ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDAS-PAGE),

3.3. Ταξινομική κατάταξη των ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν σε σχέση με τυπικά στελέχη «type strains»

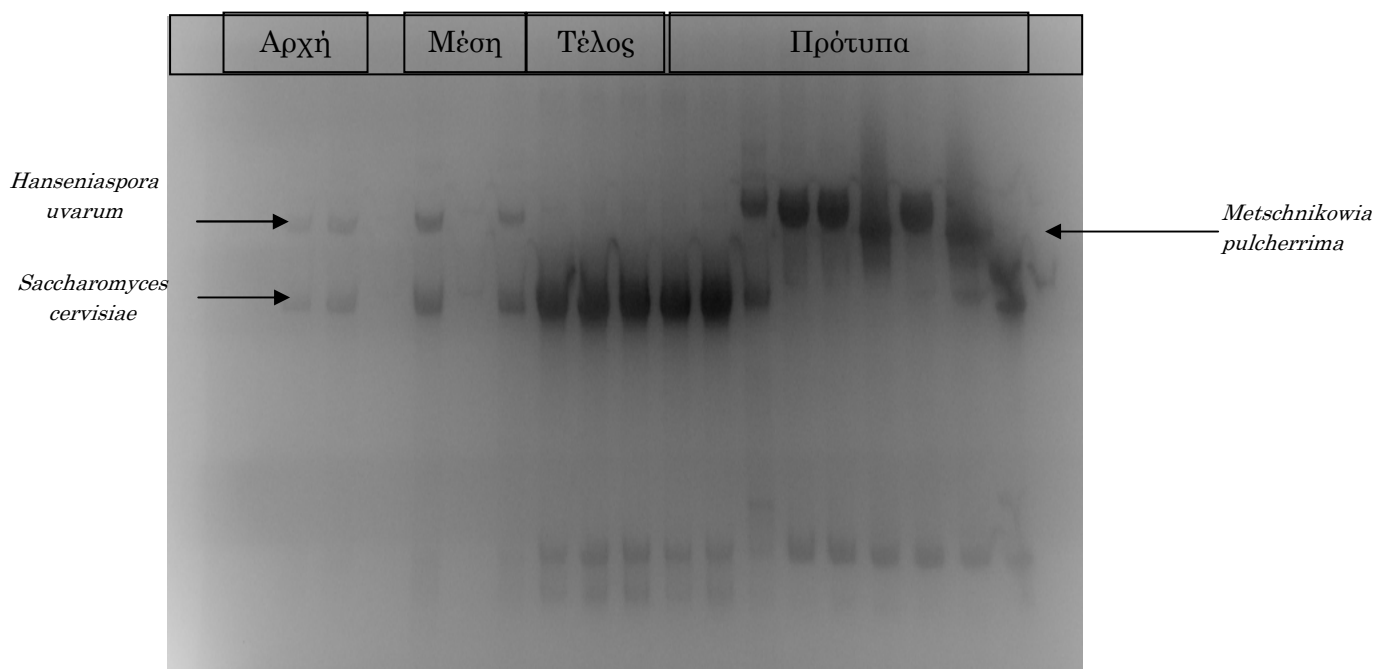
Στην εικόνα 10 φαίνεται η φυλογενετική σχέση των αποικιών που μελετήθηκαν σε σύγκριση με τυπικά στελέχη (type strains) που έχουν μελετηθεί από άλλους ερευνητές.



Εικόνα 10: Φυλογενετικό δέντρο των απομονωμένων ζυμομυκήτων.

3.4. Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου βαθμιδωτής διάταξης αποδιατακτικών παραγόντων (PCR-DGGE)

Στην εικόνα 11 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE) από δείγματα που πάρθηκαν απευθείας από το κρασί από την αρχή, τη μέση και το τέλος της οινοποίησης και δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί σε επίπεδο είδους, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα.

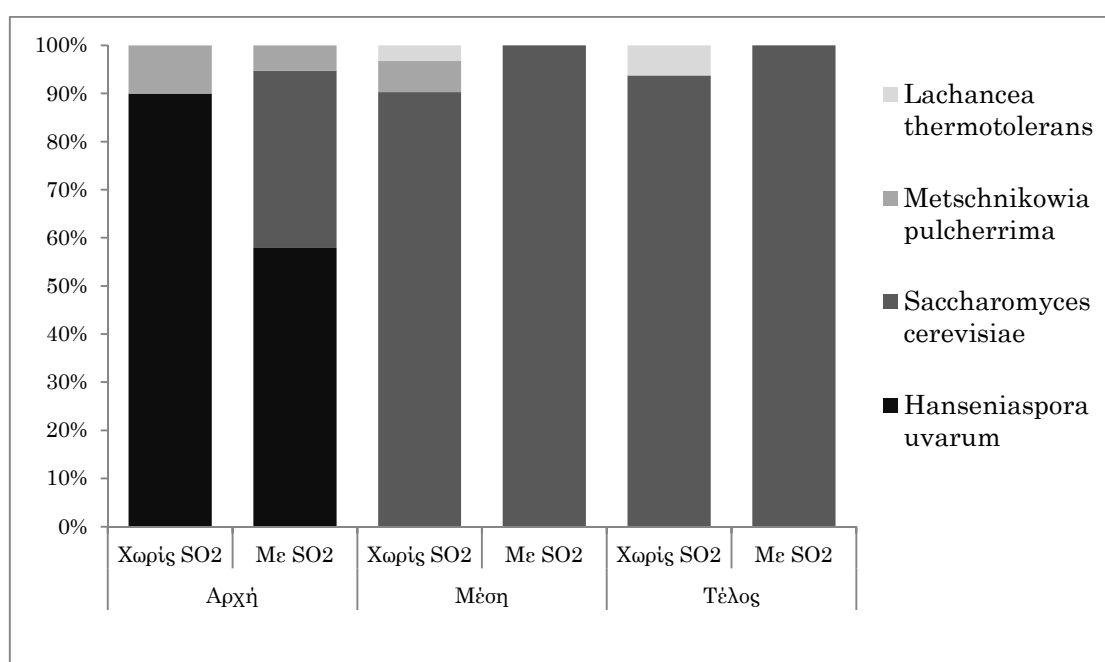


Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με βαθμιδωτή διάταξη αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE).

Στην αρχή και στη μέση της οινοποίησης παρατηρήθηκαν τα είδη *Hanseniaspora uvarum* και *Saccharomyces cerevisiae* ενώ στο τέλος μόνο ο *Saccharomyces cerevisiae*. Σε αυτή την τεχνική δεν ανιχνεύθηκαν τα είδη *Metschnikowia pulcherrima* και *Lachancea thermotolerans*, πιθανόν εξαιτίας της μικρής συγκέντρωσής τους σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη.

3.5. Βιοποικιλότητα ζυμομυκήτων

Αντιπροσωπευτικός αριθμός στελεχών από κάθε ομάδα που προέκυψε με τις προηγούμενες τεχνικές, χρησιμοποιήθηκε για ταυτοποίηση με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας (sequencing) του 26S ριβοσωμικού DNA. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται το ποσοστό συμμετοχής των ειδών που ανιχνεύθηκαν, στα στάδια της ζύμωσης που μελετήθηκαν.



Σχήμα 2: Ποσοστιαία κατανομή των ειδών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης με και χωρίς την επίδραση του θειώδη ανυδρίτη.

Συνολικά απομονώθηκαν 146 αποικίες, εκ των οποίων οι 67 προήλθαν από την οινοποίηση χωρίς την προσθήκη θειώδη ανυδρίτη και οι 79 από την οινοποίηση με την προσθήκη του θειώδους ανυδρίτη. Τις πρώτες ημέρες της οινοποίησης επικρατούν κυρίως ζύμες που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*. Στις οινοποιήσεις όπου προστέθηκε διοξείδιο του θείου παρατηρείται ακόμη και την πρώτη μέρα της ζύμωσης η παρουσία του *Saccharomyces cerevisiae*. Από την ένατη μέρα της οινοποίησης έως το τέλος επικρατεί ο *Saccharomyces cerevisiae*.

3.5.1. Μικροοινοποίηση χωρίς προσθήκη SO₂

Από τις 67 αποικίες που απομονώθηκαν, οι 43 ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*, οι 18 στο είδος *Hanseniaspora uvarum*, οι 4 στο είδος *Metschnikowia pulcherrima* και οι 2 στο είδος *Lachancea thermotolerans*. Την πρώτη μέρα της οινοποίησης δεν παρατηρήθηκε καθόλου το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ παρατηρήθηκαν 12 γενότυποι του είδους *Hanseniaspora uvarum* και 3 γενότυποι του είδους *Metschnikowia pulcherrima*. Στη μέση της οινοποίησης παρατηρήθηκαν 19 διαφορετικοί γενότυποι του είδους *Saccharomyces cerevisiae*, 2 του είδους *Metschnikowia pulcherrima* και 1 γενότυπος του είδους *Lachancea thermotolerans*. Στο τέλος της οινοποίησης παρατηρήθηκαν 9 διαφορετικοί γενότυποι του είδους *Saccharomyces cerevisiae* και 1 γενότυπος του είδους *Lachancea thermotolerans* ο οποίος ήταν διαφορετικός από τον γενότυπο που παρατηρήθηκε στη μέση της οινοποίησης.

3.5.2. Μικροοινοποίηση με την προσθήκη SO₂

Από τις 79 αποικίες που απομονώθηκαν, οι 67 ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*, οι 11 στο είδος *Hanseniaspora uvarum*, η 1 στο είδος *Metschnikowia pulcherrima*, ενώ δεν παρατηρήθηκε το είδος *Lachancea thermotolerans*. Την πρώτη μέρα της οινοποίησης παρατηρήθηκαν 3 διαφορετικοί γενότυποι του είδους *Saccharomyces cerevisiae*, 8 γενότυποι του είδους *Hanseniaspora uvarum* εκ των οποίων οι 6 ήταν κοινοί με την επέμβαση χωρίς SO₂ και 1 γενότυπος του είδους *Metschnikowia pulcherrima*. Στη μέση της οινοποίησης παρατηρήθηκαν 25 διαφορετικοί γενότυποι του είδους *Saccharomyces cerevisiae* εκ των οποίων οι 7 ήταν κοινοί με την επέμβαση χωρίς SO₂. Στο τέλος της οινοποίησης παρατηρήθηκαν 15 διαφορετικοί γενότυποι του είδους *Saccharomyces cerevisiae* εκ των οποίων οι 2 ήταν κοινοί με την επέμβαση χωρίς SO₂.

3.5.3. Σύγκριση με άλλες μελέτες

Την πρώτη μέρα της οινοποίησης στην επέμβαση χωρίς την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη δεν παρατηρήθηκε το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ με την προσθήκη διοξειδίου του θείου παρατηρήθηκαν 3 διαφορετικά γενετικά προφίλ. Είναι εμφανές ότι το διοξείδιο του θείου είναι αποτελεσματικότερο όσον αφορά την αντιμικροβιακή του ιδιότητα έναντι των non-*Saccharomyces* ειδών, ιδιαίτερα τις πρώτες ημέρες της οινοποίησης. Αντίθετα δεν έχει μεγάλη αποτελεσματικότητα στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*.

Στις αυθόρμητες ζυμώσεις, στην αρχή της οινοποίησης επικρατούν τα είδη που βρίσκονται στην επιφάνεια των σταφυλιών. Όπως έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες στην επιφάνεια των σταφυλιών επικρατούν συνήθως τα εξής τρία κύρια είδη: *Hanseniaspora uvarum* (anamorph: *Kloeckera apiculata*), *Metschnikowia pulcherrima* (anamorph: *Candida pulcherrima*) και *Candida stellata*. Το γένος *Hanseniaspora* είναι κυρίαρχο σε αρκετές μελέτες (Beltran et al. 2002; Combina et al. 2005; Hierro et al. 2006) και σε άλλες το γένος *Candida* (Clemente-Jimenez et al. 2004; Torija et al. 2001)

Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης ο πληθυσμός του γένους *Saccharomyces* αρχίζει να αυξάνεται με αποτέλεσμα τη μείωση των υπόλοιπων πληθυσμών (Fleet and Heard 1993). Στο τέλος της οινοποίησης επικρατεί κυρίως το γένος *Saccharomyces* και πολλές φορές μόνο αυτό. Όσον αφορά την αυθόρμητη ζύμωση χωρίς τη χρήση θειώδους ανυδρίτη, τα ευρήματα επαλήθευσαν την δυναμική που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες έρευνες.

Στην παρούσα έρευνα, στην αρχή της οινοποίησης δεν παρατηρήθηκε η παρουσία του *Sacharomyces cerevisiae* αλλά επικράτησε το είδος *Hanseniaspora uvarum* και παρατηρήθηκε το είδος *Metschnikowia pulcherrima* σε μικρότερη εξάπλωση. Στην αυθόρμητη ζύμωση με τη χρήση του θειώδους ανυδρίτη η εξάπλωση των non-*Saccharomyces* ζυμομυκήτων επηρεάστηκε αρνητικά, ενώ παρατηρήθηκε και η παρουσία του είδους *Saccharomyces*. Συνεπώς το διοξείδιο του θείου καταστέλλει την ανάπτυξη των non-*Saccharomyces* ενώ δεν επηρεάζει τον *Saccharomyces cerevisiae* προσφέροντάς του ανταγωνιστικό πλεονέκτημα από την

πρώτη μέρα της οινοποίησης. Σε αντίθεση με άλλες μελέτες που έχει αναφερθεί ότι οι ζύμες που ανήκουν στη οικογένεια των Βασιδιομηκύτων παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο διοξείδιο του θείου μέχρι και 90% (Rementeria et al. 2003), παρατηρήθηκε ότι το διοξείδιο του θείου καταστέλλει και την ανάπτυξη ζυμομυκήτων που ανήκουν στους Ασκομύκητες. Η προσθήκη θειώδους ανυδρίτη δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τον αυτόχθονα πληθυσμό (Henick-Kling et al. 1998). Παρατηρείται μια μείωση στο αριθμό των κυττάρων αλλά δεν έχει παρατηρηθεί διαφορά στο αρωματικό προφίλ του τελικού προϊόντος (Egli et al. 1998).

3.6. Βιοποικιλότητα του είδους *Saccharomyces cerevisiae*

Η επίδραση του θειώδη ανυδρίτη φαίνεται να ευνοεί την αύξηση της ποικιλομορφίας των μικροοργανισμών που ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae* σε επίπεδο υποείδους σε όλες τις φάσεις της οινοποίησης. Στο τέλος της οινοποίησης φαίνεται ότι επιβιώνουν περισσότερα στελέχη στην οινοποίηση που επέδρασε το διοξείδιο του θείου από την οινοποίηση χωρίς αυτό.

Συνήθως δύο κύρια είδη συναντώνται στη διάρκεια της οινοποίησης, το είδος *Saccharomyces cerevisiae* και το είδος *Saccharomyces bayanus* (προηγουμένως γνωστό ως *S. uvarum*) (Sipiczki 2002). Πολλές φορές έχει βρεθεί και το είδος *S. pastorianus* (Naumov 1996) καθώς και έχουν παρατηρηθεί υβρίδια του *S. cerevisiae* και του *S. bayanus* όπως και του *S. cerevisiae* και του *S. kudriavzevii* (Gonzalez 2006).

Για τον διαχωρισμό των γενετικών προφίλ μέσα στα είδη, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές ενίσχυσης του γενετικού υλικού με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και δύο διαφορετικών εκκινητών. Ο εκκινητής M13 χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική RAPD-PCR (τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA) και ο εκκινητής GTG5 χρησιμοποιήθηκε για την rep-PCR (ενίσχυση επαναλαμβανόμενων στοιχείων γενετικού υλικού). Με τη χρήση του εκκινητή M13 διαχωρίστηκαν 13 ομάδες μικροοργανισμών του είδους *Saccharomyces cerevisiae* που παρουσίασαν το ίδιο γενετικό πρότυπο. Χρησιμοποιώντας τον δεύτερο εκκινητή (GTG5), διαχωρίστηκαν 14 ομάδες με το ίδιο γενετικό πρότυπο στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*.

3.6.1. Μικροοινοποίηση χωρίς προσθήκη SO₂

Από τις 67 αποικίες που απομονώθηκαν, οι 43 ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae* και παρατηρήθηκαν 28 διαφορετικά γενετικά πρότυπα κατανεμημένα στη διάρκεια της οινοποίησης. Την πρώτη μέρα της οινοποίησης δεν παρατηρήθηκε καθόλου το είδος του *Saccharomyces cerevisiae* ως αποτέλεσμα της μη επίδρασης του διοξειδίου του θείου ως κατασταλτικός παράγοντας στην ανάπτυξη των άλλων ειδών. Στη μέση της οινοποίησης παρατηρήθηκαν 19 διαφορετικά γενετικά πρότυπα του εκ των οποίων 2 επιβίωσαν μέχρι το τέλος της οινοποίησης και 10 παρατηρήθηκαν και σε διάφορες φάσεις της οινοποίησης παρουσία SO₂. Στο τέλος της οινοποίησης παρατηρήθηκαν 9 διαφορετικά γενετικά πρότυπα από τα οποία τα 6 ήταν μοναδικά και δεν παρατηρήθηκαν σε άλλη φάση της πειραματικής διαδικασίας.

3.6.2. Μικροοινοποίηση με την προσθήκη SO₂

Από τις 79 αποικίες που απομονώθηκαν, οι 67 ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae* παρατηρήθηκαν 43 διαφορετικά γενετικά πρότυπα. Την πρώτη μέρα της οινοποίησης παρατηρήθηκαν 3 διαφορετικά γενετικά πρότυπα του *Saccharomyces cerevisiae* και μόνο ένα από αυτά επιβίωσε μέχρι το τέλος της οινοποίησης. Στη μέση της οινοποίησης παρατηρήθηκαν 25 διαφορετικά γενετικά πρότυπα εκ των οποίων τα 7 ήταν κοινά με την επέμβαση χωρίς την προσθήκη SO₂. Στο τέλος της οινοποίησης παρατηρήθηκαν 15 διαφορετικά γενετικά πρότυπα εκ των οποίων 9 παρατηρήθηκαν και στη μέση της ίδιας επέμβασης και 2 ήταν κοινά με την επέμβαση χωρίς SO₂.

Η χρήση του θειώδους ανυδρίτη όσον αφορά την βιοποικιλότητα μεταξύ των στελεχών του *Saccharomyces cerevisiae* επιδρά θετικά στη διαφοροποίηση των στελεχών αλλά όχι σε μεγάλο βαθμό. Η βιοποικιλότητα ανάμεσα στα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό (Khan et al. 2000; Lopes et al. 2002; Querol et al. 1994; Sabate et al. 1998; Schuller et al. 2005; Schutz and Gafner 1994; Valero et al. 2007; Van der Westhuizen et al. 2002a, b; Versavaud et al. 1995). Σε αντίστοιχες έρευνες μελέτης της βιοποικιλότητας του *Saccharomyces cerevisiae* σε επίπεδο στελέχους, η διαφοροποίηση και η επικράτηση των στελεχών διαφέρει και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Σε μια εκτενή μελέτη 1600 απομονωμένων αποικιών από 54 αυθόρμητες ζυμώσεις, βρέθηκαν 297 διαφορετικά στελέχη (Schuller et al. 2005). Σε μια ακόμη μελέτη με αρκετά αυξημένη την αναλογία μοναδικών στελεχών, βρέθηκαν 91 διαφορετικά στελέχη από 104 συνολικά

απομονωμένες αποικίες (Valero et al. 2007). Ο Sabate et al. 1998 συνέκριναν την βιοποικιλότητα στα στελέχη ανάμεσα σε δύο διαφορετικά αμπελοτόπια και βρέθηκαν 60 και 65 διαφορετικά στελέχη εκ των οποίων τα 21 ήταν κοινά. Στην Αργεντινή βρέθηκαν 9 μοναδικοί γενότυποι από τους 29 που μελετήθηκαν και 5 από αυτούς ήταν κοινοί με άλλα αμπελοτόπια (Lopes et al. 2002).

Σε άλλες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος των απομονώσεων εκφράζεται από ένα και μοναδικό γενετικό πρότυπο, είτε ότι μόνο ένα ή λίγα στελέχη είναι παρόντα κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (Versavaud et al. 1995). Αντίθετα ο Sabate et al. έχει διαπιστώσει διαφορετική ποικιλομορφία στις διαφορετικές φάσεις της οινοποίησης. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι αρκετά στελέχη επικρατούν σε σημαντικό ποσοστό κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (Torija et al. 2001; Vezinhet et al. 1992). Σε κάποιες περιπτώσεις που έχει διαπιστωθεί μόνο ένα στέλεχος, αυτό έχει και την ιδιότητα να παράγει κατασταλτικούς μηχανισμούς για την ανάπτυξη των άλλων ζυμομυκήτων (killer phenotype) (Schuller et al. 2005; Versavaud et al. 1995). Ακόμη και τα στελέχη που έχουν το ίδιο γενετικό πρότυπο μπορεί να δείξουν διαφορές σε οινολογικές παραμέτρους όπως η γεύση και η οσμή καθώς αυτές μπορεί να οφείλονται σε συγκεκριμένα γονίδια. Η βιοποικιλότητα του *Saccharomyces* πιθανόν οφείλεται τόσο στην φυσική επιλογή όσο και στη δημιουργία τυχαίων μεταλλάξεων και τη συσσώρευση αυτών. Οι «άγριες» ζύμες έχουν υψηλό ρυθμό δημιουργία μεταλλάξεων το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον έντονο βαθμό βιοποικιλότητας (Mortimer et al. 1994).

Βιβλιογραφία

1. Amerine, M. A., Berg, H. W., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L., and Webb, A. D. (1980) *The Technology of Wine Making*. Avi, Westport, CT.
2. Boulton, R. (1979) The heat transfer characteristics of wine fermentors. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 152–156.
3. Cavalieri, D., Townsend, J. P., and Hartl, D. L. (2000) Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc. Natl Acad. Sci.* 97, 12369–12374.
4. Egli, C. M., Edinger, W. D., Mitrakul, C. M., and Henick-Kling, T. (1998) Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779–789.
5. Fleet, G. H. (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22.
6. Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., and Ribereau-Gayon, P. (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034–1038.
7. Guillamon, J. M., Barrio, E., and Querol, A. (1996) Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: Relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Systematic Appl. Microbiol.* 19, 122–132.
8. Heard, G. M., and Fleet, G. H. (1985) Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 727–728.
9. Heard, G. M., and Fleet, G. H. (1988) The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 23–28.
10. Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., and Monk, P. (1998) Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.* 84, 865–876.
11. Khan, W., Augustyn, O. P. H., van der Westhuizen, T. J., Lambrechts, M. G., and Pretorius, I. S. (2000) Geographic distribution and evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the warmer, inland regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 17–31.
12. Petering, J. E., Henschke, P. A., and Langridge, P. (1991) The *Escherichia coli* β -glucuronidase gene as a marker for *Saccharomyces* yeast strain identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 6–12.
13. Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., and Ramon, D. (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948–2953.
14. Rosini, G. (1986) Wine-making by cell-recycle-batch fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 140–143.
15. Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M., and Dequin, S. (2005) Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Res.* 5, 959–969.

16. Mortimer, R. K. (2000) Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* 10, 403–409.
17. Kurtzman, C. P., and Fell, J. W. (eds.) (1998) *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th ed. Elsevier, Amsterdam.
18. Erten, H. (2002) Relations between elevated temperatures and fermentation behaviours of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 373–378.
19. Dubourdieu, D., Sokol, A., Zucca, J., Thalouarn, P., Dattee, A., and Aigle, M. (1987) Identification des souches de levures isolees de vins par l'analyse de leur AND mitochondrial. *Connaiss. Vigne Vin.* 21, 267–278.