



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

**Παθογόνοι και αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί**

**στον οίνο και το αμπέλι**

**Σύγχρονες μεθοδολογίες ανίχνευσης**

Δήμητρα Γκιμπή

Επιβλέπων καθηγητής: Μαργαρίτης Αυγέρης

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

**Παθογόνοι και αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί  
στον οίνο και το αμπέλι  
Σύγχρονες μεθοδολογίες ανίχνευσης**

Δήμητρα Γκιμπή

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Μαργαρίτης Αυγέρης

Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας

Ιατρική σχολή ΕΚΠΑ

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Γιώργος Λαγουμιντζής

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας – Μοριακής  
Βιολογίας

Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα  
Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Πάτρα, Ιούνιος 2024

*«Στους γονείς μου,  
για την στήριξη και την υπομονή τους».*

*Ιδιαίτερος, ευχαριστώ τον καθηγητή μου κ. Μαργαρίτη Αυγέρη  
για την συμβολή του στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας,  
καθώς και για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξή του.*

## Περίληψη

Η άμπελος είναι γνωστή στην ιστορία ως ένα από τα παλαιότερα φυτά που έκαναν την εμφάνισή τους στη γη. Η μελέτη, διαχρονικά, για την παρουσία και την καλλιέργεια της αμπέλου στην Ελλάδα, επιβεβαιώνει τη σημαντική συμβολή της στους τομείς της οικονομίας, του πολιτισμού, της κοινωνικής ανάπτυξης και της διαμόρφωσης του κάλλους του τοπίου. Ο βρώσιμος καρπός του αμπελιού είναι τα σταφύλια, τα οποία είναι φυσικές πηγές παραγωγής φαινολικών ενώσεων, αποτελούν την κύρια πρώτη ύλη για την παραγωγή κρασιού, μέσω της δράσης πληθώρας πολύπλοκων αντιδράσεων μεταξύ ζυμών και βακτηρίων, και επιδρούν σημαντικά στην ποικιλία και την ποιότητά του, η οποία εξαρτάται και από τον τρόπο και τη διαδικασία οινοποίησης.

Η αντιμετώπιση, ορθολογικά, των ασθενειών αλλά και των εχθρών της αμπέλου είναι ένα περίπλοκο πρόβλημα, καθώς απαιτεί έγκαιρη αναγνώριση των παθήσεων και τη λήψη των μέτρων που ενδείκνυνται. Κίνδυνοι μικροβιακής προέλευσης από το στάδιο του τρύγου έως και το στάδιο της εμφιάλωσης του οίνου, απειλούν την οινοποιητική διαδικασία. Σήμερα, η γνώση της βιολογίας των παθογόνων μικροβιακής προέλευσης και των παραγόντων της γένεσης των ιών, η κατανόηση της μικροβιακής δυναμικής εντός των ζυμωτικών διεργασιών, η πρόοδος της μοριακής βιολογίας, των τεχνολογιών της γονιδιωματικής και της μεταγονιδιωματικής και της βιοπληροφορικής, είναι σημαντική για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση μικροβίων στη διάρκεια της οινοποιητικής διαδικασίας, και την ανάπτυξη νέων μεθόδων και στρατηγικών πρόληψης και καταπολέμησής τους.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μία βιβλιογραφική ανασκόπηση των προαναφερόμενων, και επισημαίνει την ανάγκη ανάπτυξης κατάλληλων μεθοδολογιών και εκπαίδευσης των οινοποιών, προκειμένου, μέσω της βαθύτερης γνώσης των οικοσυστημάτων που επικρατούν στους αμπελώνες και τα οινοποιεία, να έχουν την ικανότητα να τις αξιοποιούν με πρακτικούς τρόπους για την αντιμετώπιση των μολυσματικών ζυμομυκήτων και την αποφυγή αλλοίωσης, ώστε να προκύψουν νέοι ορίζοντες για την ποιοτική αναβάθμιση των παραγόμενων οίνων, και την παραγωγή καινοτόμων προϊόντων.

### Λέξεις – Κλειδιά

Αμπέλι, Οίνος, Παθογόνοι μικροοργανισμοί, Αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, Σακχαρομύκητες, Μοριακές Μέθοδοι ανίχνευσης

## Abstract

The vine is known in history as one of the oldest plants to appear on earth. The study of the presence and cultivation of the vine in Greece over time confirms its important contribution to the economy, culture, social development and the shaping of the beauty of the landscape. The edible fruit of the vine is the grapes, which are natural sources of phenolic compounds, are the main raw material for the production of wine, through the action of a multitude of complex reactions between yeasts and bacteria, and have a significant influence on its variety and quality, which also depends on the method and process of vinification.

The rational management of both diseases and vine pests is a complex problem, as it requires early identification of the diseases and the appropriate measures to be taken. Dangers of microbial origin from the harvesting stage to the bottling stage threaten the wine-making process. Today, the knowledge of the biology of pathogens of microbial origin and the factors of virus genesis, the understanding of microbial dynamics within the fermentation processes, the advances in molecular biology, genomics and post-genomics technologies and bioinformatics, are important for the detection and identification of microbes during the winemaking process, and the development of new methods and strategies for their prevention and control.

This thesis is a literature review of the above mentioned, and highlights the need to develop appropriate methodologies and training of winemakers, in order to, through a deeper knowledge of the ecosystems prevailing in vineyards and wineries, to be able to use them in practical ways to deal with infectious yeasts and avoid spoilage, so as to open up new horizons for improving the quality of the wines produced and producing innovative products.

## Keywords

Grapevine, Wine, Pathogenic microorganisms, Alloying microorganisms, Saccharomyces, Molecular detection methods

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη .....	v
Abstract.....	vi
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	vii
<b>Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων</b> .....	xi
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΜΠΕΛΙ</b> .....	1
1.1    Ιστορική αναδρομή .....	1
1.2    Σταφύλι .....	3
1.3    Βόστρυχας.....	4
1.4    Ράγα .....	4
1.4.1    Ο φλοιός.....	5
1.4.2    Η σάρκα .....	6
1.4.3    Τα γίγαρτα.....	6
1.5    Η ωρίμανση των σταφυλιών .....	7
1.5.1    Στάδιο αύξησης μετά την καρπόδεση .....	7
1.5.2    Στάδιο περκασμού.....	8
1.5.3    Στάδιο της ωρίμανσης.....	8
1.5.4    Στάδιο Υπερωρίμανσης.....	9
1.6    Βιοχημική ανάλυση ωρίμανσης .....	11
1.6.1    Εξέλιξη των σακχάρων .....	11
1.6.2    Εξέλιξη των οργανικών οξέων.....	11
1.6.3    Εξέλιξη των ανόργανων συστατικών.....	12
1.6.4    Εξέλιξη των φαινολικών συστατικών .....	12
1.6.5    Εξέλιξη των αρωματικών συστατικών.....	13
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΟΙΝΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ</b> .....	14
2.1    Συγκομιδή σταφυλιών.....	14
2.2    Θραύση σταφυλιών.....	16
2.3    Έκθλιψη σταφυλιών και παραγωγή γλεύκους .....	17
2.4    Αλκοολική ζύμωση .....	19
2.5    Επεξεργασία μετά τη ζύμωση - Ωρίμανση .....	23
2.6    Μηλογαλακτική Ζύμωση.....	24
2.7    Μεταγγίσεις.....	25
2.8    Διαχωρισμός.....	27
2.8.1    Εξευγενισμός.....	28
2.8.2    Φιλτράρισμα-Δήθηση .....	28

2.8.3	Φυγοκέντρωση .....	29
2.8.4	Ψύξη.....	29
2.8.5	Ιοντική ανταλλαγή .....	30
2.8.6	Θέρμανση.....	30
2.8.7	Παστερίωση .....	30
2.9	Λευκή οينوποίηση.....	31
2.10	Ερυθρή οينوποίηση.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΟΙΝΟΣ .....		34
3.1	Εισαγωγή στον οίνο .....	34
3.2	Συστατικά του οίνου .....	34
3.2.1	Το νερό.....	35
3.2.2	Οργανικά οξέα .....	35
3.2.3	Αλκοόλες.....	37
3.2.4	Αρωματικές ενώσεις .....	37
3.2.5	Σάκχαρα .....	38
3.2.6	Πολυσακχαρίτες.....	39
3.2.7	Φαινολικές ενώσεις.....	39
3.2.8	Αζωτούχες ενώσεις .....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΧΘΡΟΙ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.....		45
4.1	Εισαγωγή.....	45
4.2	Μολυσματικός εκφυλισμός.....	46
4.3	Κίτρινο Μωσαικό.....	47
4.3.1	Παθογόνο αίτιο .....	47
4.4	Ίκτερος.....	48
4.5	Βοθρίωση του κορμού .....	48
4.6	Συστροφή του φύλλου .....	49
4.7	Κηλίδωση.....	50
4.8	Νέκρωση των νεύρων .....	50
4.9	Νεοπλασίες .....	50
4.10	Φελλώδης φλοιός.....	51
4.11	Μεταχρωματισμός των φύλλων του Ροδίτη .....	51
4.12	Φυλλορροή της αμπέλου.....	51
4.13	Κίτρινη διάστιξη της αμπέλου .....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΚΑΙ ΤΟ ΑΜΠΕΛΙ.....		53
5.1	Εισαγωγή.....	53



5.2	Μυκητολογικές ασθένειες.....	53
5.2.1	Περυνόσπορος .....	53
5.2.2	Ωίδιο.....	55
5.2.3	Βοτρύτης.....	57
5.2.4	Ευτυπίωση.....	59
5.2.5	Φόμονη.....	60
5.2.6	Βοτρυοσφαιρία.....	61
5.2.7	Ίσκα.....	62
5.2.8	Βερτισιλλίωση.....	63
5.2.9	Σηψιρριζία.....	64
5.2.10	Μαύρη σήψη .....	65
5.2.11	Λευκή σήψη .....	66
5.2.12	Ανθράκνωση .....	67
5.2.13	Φυτοφθορά.....	67
5.2.14	Ψευδοπεζίζα .....	68
5.2.15	Παρακμή νέων αμπελώνων.....	69
5.2.16	Μελανή νέκρωση των βραχιόνων.....	70
5.2.17	Μελανή νέκρωση της βάσης του υποκειμένου .....	71
5.2.18	Σήψεις σταφυλών από μύκητες του γένους <i>Aspergillus</i> .....	72
5.3	Βακτηριολογικές ασθένειες .....	72
5.3.1	Καρκίνος της αμπέλου- βακτηρίωση .....	73
5.3.2	Βακτηριακή νέκρωση (τσιλίκ μαράζι) της αμπέλου .....	74
5.3.3	Όξινη σήψη (σακχαρομύκητες και βακτήρια) .....	75
5.3.4	Ασθένεια του pierce.....	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΛΛΟΙΩΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΚΑΙ ΤΟ ΑΜΠΕΛΙ.....		79
6.1	Εισαγωγή.....	79
6.2	Βακτήρια οξικού οξέος .....	80
6.2.1	Ταξινομική και μεταβολισμός των βακτηρίων του οξικού οξέος .....	80
6.2.2	Αλλοίωση του οίνου από βακτήρια του οξικού οξέος.....	81
6.2.3	Τα βακτήρια του οξικού οξέος στην εμφιάλωση .....	82
6.3	Βακτήρια του γαλακτικού οξέος.....	83
6.3.1	Ανάπτυξη και εξέλιξη των γαλακτικών βακτηρίων κατά την διάρκεια παραγωγής του οίνου	84
6.3.2	Ο μεταβολισμός των γαλακτικών βακτηρίων και οι εκτροπές του οίνου .....	85
6.4	Αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών των οίνων .....	86

6.4.1	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών και των γαλακτικών βακτηρίων.....	87
6.4.2	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων .....	88
6.4.3	Βακτηριοφάγοι.....	89
6.4.4	Επίδραση του θειώδους.....	90
6.5	Μύκητες και ζύμες.....	90
6.6	Μικροβιακή οικολογία της οινοποίησης.....	92
6.6.1	Μικροοργανισμοί στον τρύγο .....	92
6.6.2	Οι μικροοργανισμοί στη φάση της οινοποίησης.....	93
6.7	Αίτια προβληματικών οινοποιήσεων .....	94
6.8	Οίνοι και αλλοιώσεις τους κατά τη μεταζυμωτική φάση.....	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : Σύγχρονες μεθοδολογίες ανίχνευσης .....		99
7.1	Μέθοδοι προσδιορισμού της νοθείας του κρασιού.....	99
7.1.1	Χρωματογραφικές Μέθοδοι.....	99
7.1.2	Φασματοσκοπικές Μέθοδοι .....	100
7.2	Μεθοδολογίες ανίχνευσης οίνου.....	101
7.3	Μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση μικροβίων που σχετίζονται με τον οίνο .....	105
7.3.1	Μέθοδοι υβριδισμού .....	105
7.3.2	Κυτταρομετρία ροής .....	109
7.3.3	Πλήρης υβριδισμός του γονιδιώματος.....	111
7.3.4	Μέθοδοι αλληλούχισης.....	112
7.3.5	Τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών εστιών (MLST).....	113
7.3.6	Μέθοδοι δακτυλικών αποτυπωμάτων .....	114
7.3.7	Ανάλυση περιορισμού του ριβοσωμικού DNA (ARDRA) .....	114
7.3.8	Ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου (PFGE) .....	116
7.3.9	Ανάλυση περιορισμού του μιτοχονδριακού DNA (MT-RFLP) .....	117
7.3.10	Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένου θραύσματος (AFLP).....	118
7.3.11	Μέθοδοι δακτυλικής εκτύπωσης με βάση την PCR .....	119
7.3.12	Ηλεκτροφόρηση πηκτής διαβάθμισης με μετουσίωση (DGGE) .....	120
7.3.13	Ανίχνευση PCR.....	121
7.3.14	PCR σε πραγματικό χρόνο .....	122
7.4	Παραδείγματα μεθόδων ανίχνευσης .....	124
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....		130
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....		133

## Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1 Ανατομία Ράγας .....	5
Εικόνα 2 Εγκάρσια διατομή γιγάρτων .....	7
Εικόνα 3 Δειγματοληψία πριν τον τρύγο .....	14
Εικόνα 4 Τρύγος .....	16
Εικόνα 5 Θραυστήρας (διάτρητος κύλινδρος) .....	16
Εικόνα 6 Σχεδιάγραμμα λευκής οينوποίησης .....	32
Εικόνα 7 Σχεδιάγραμμα ερυθρής οينوποίησης .....	33
Εικόνα 8 Διαφοροποίηση διαδικασίας ερυθρής και λευκής οينوποίησης .....	33
Εικόνα 9 Αρώματα φρούτων ή λουλουδιών .....	38
Εικόνα 10 Κύριες ασθένειες αμπέλου .....	45
Εικόνα 11 Μολυσματικός εκφυλισμός .....	47
Εικόνα 12 Βοθρίωση του κορμού .....	49
Εικόνα 13 Περονόσπορος .....	55
Εικόνα 14 Ωίδιο .....	57
Εικόνα 15 Βοτρύτης .....	59
Εικόνα 16 Τσιλίκ μαράζι .....	75
Εικόνα 17 Όξινη σήψη .....	77
Εικόνα 18 Παράδειγμα άμεσης έναντι έμμεσης μικροβιακής ανάλυσης .....	103
Εικόνα 19 Πραγματοποίηση RT - PCR ποσοτικοποίησης των γονιδίων του DNA .....	104
Εικόνα 20 Εξέταση φαινομένου στην ακριβή θέση εμφάνισής του (FISH) .....	107
Εικόνα 21 Real time PCR (εκπομπή φθορισμού κατά τη διάρκεια της qPCR) .....	124

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΜΠΕΛΙ

### 1.1 Ιστορική αναδρομή

Η άμπελος είναι γνωστή στην ιστορία ως ένα από τα παλαιότερα φυτά που έκαναν την εμφάνισή τους στη γη. Ορισμένοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η ηλικία της φτάνει σε βάθος 140 εκατομμυρίων ετών (Σουφλερός, 2015).

Ιστορικά, η άμπελος η γνωστή ως οиноφόρος (*Vitis Vinifera* L.) είναι ευρασιατικό είδος, μοναδικό από το γένος *vitis* που ανήκει στην οικογένεια των Αμπελιδών (*Vitaceae*). Θεωρείται ότι, το συγκεκριμένο είδος έκανε την εμφάνισή του στα τέλη της τριτογενούς γεωλογικής περιόδου, σύμφωνα με απολιθώματα που βρέθηκαν σε αρκετές περιοχές στην Ευρώπη, στην Ανατολική Μεσόγειο και στη Δυτική Ασία. Στη διάρκεια της περιόδου των παγετώνων (μεταξύ 2.000.000 – 10.000 π.Χ., γνωστή ως Διλούβιο), η άμπελος αναπτύχθηκε σε περιοχές δασώδεις παραμεσόγειες αλλά και παραποτάμιες, καθώς και στην περιοχή ανάμεσα στη Μαύρη και την Κασπία θάλασσα (Καύκασος). Οι ποικιλίες της αμπέλου, που καλλιεργήθηκαν (*Vitis vinifera sativa* DE CADOLLE), έχουν την προέλευσή τους από την καυκασιανή οиноφόρο άμπελο. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν μέσω της Ευρώπης και σε όλο τον κόσμο. Όπως αναφέρει ο Levadoux (1956), η οиноφόρος άμπελος έχει τρία στάδια που εξελίσσεται. Αυτά είναι η αυτοφυής άγρια μορφή, οι αρχαϊκού τύπου καλλιεργούμενες μορφές αυτοφυούς χαρακτήρα, και οι καλλιεργούμενες μορφές. Τα στοιχεία που υπάρχουν έως σήμερα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, ο προϊστορικός άνθρωπος - συλλέκτης εντόπισε την οиноφόρο άμπελο στις διαφορετικές της μορφές σε περιοχές δασώδεις και παραποτάμιες ως αναρριχώμενο θάμνο. Οι μικρές σταφυλές αλλά και οι ράγες, είτε μικρές μελανές, είτε υπόζινες, οι οποίες είχαν μεγάλα γίγαρτα αποτελούσαν σημαντικό διατροφικό στοιχείο για τον προϊστορικό άνθρωπο. Θεωρείται ότι η μεγάλη περίοδος καλλιέργειας – εξημέρωσης της άγριας αμπέλου, ξεκίνησε ανάμεσα στα έτη 8.000 – 6.000 π.Χ., και η πρώτη στοιχειώδης οργανωμένη καλλιέργεια ανάμεσα στα έτη 6.000 – 5.000 π.Χ. (Σταυρακάκης, 2016).

Η καλλιέργεια της αμπέλου στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι ξεκίνησε περίπου στα 2.400π.Χ. και έπειτα. Δεν είναι γνωστή η περιοχή από την οποία ξεκίνησε, αλλά μερικοί θεωρούν ότι άρχισε στην Κρήτη και μέσω αυτής διαδόθηκε στη Νάξο, στη Χίο και ακόλουθα στην υπόλοιπη χώρα. Κάποιοι θεωρούν την Αιτωλία ως την περιοχή έναρξης της καλλιέργειας της αμπέλου και άλλοι τη Θράκη, ως την περιοχή από την οποία οι Έλληνες, κατά τον Τρωϊκό

πόλεμο, προμηθεύονταν τον οίνο. Εκεί γινόταν η παραγωγή του ονομαστού οίνου Ίσμαρου, με τον οποίο, όπως λέγεται, μέθυσε τον Πολύφημο ο Οδυσσέας, καθώς και του Βίβλινου, ο οποίος αναφέρεται στα γραπτά του Ησίοδου (Σουφλερός, 2015).

Νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη πρωτοκαλλιέργειας της αμπέλου στην Κρήτη και αποδέχονται την ανατολική της προέλευση (Σταυρακάκης, 2016).

Σε αντίθεση με την χρονολογική εμφάνιση της αμπέλου στη γη, η παραγωγή του οίνου από τα σταφύλια ξεκίνησε πολύ αργότερα. Πιστεύεται ότι πριν από περίπου δέκα χιλιάδες χρόνια κατάφερε ο άνθρωπος να παράγει γλεύκος μέσω της πίεσης των σταφυλιών. Βέβαιο είναι, μέσω παραστάσεων και κειμένων, ότι η διαδικασία παραγωγής του οίνου ξεκίνησε από τα 3.000 χρόνια π.Χ. (Σουφλερός, 2015).

Εξαιρετικά σημαντικές πληροφορίες, χρήσιμες για την ποιότητα των ποικιλιών, το πλήθος τους, τις τεχνικές καλλιεργειών της αμπέλου, για τον τρόπο ξήρανσης των σταφυλιών και της παραγωγής σταφίδων, της διαδικασίας οινοποίησης και συντήρησης των οίνων, μας δίνουν μέσω των κειμένων τους οι Όμηρος, Ησίοδος, Δημόκριτος, Ηρόδοτος, Ξενοφών, Αριστοτέλης, Θεόφραστος (από το 800π.Χ. έως και το 287π.Χ.), καθώς και πλήθος άλλων συγγραφέων, φιλοσόφων και ποιητών. Επίσης, η άμπελος και ο οίνος είχαν σημαντική επιρροή στην τέχνη, όπως αποδεικνύεται από τις παραστάσεις υψηλής αισθητικής που κοσμούσαν τα αγγεία ποτού που ανακαλύφθηκαν (Σταυρακάκης, 2016).

Η καλλιέργεια της αμπέλου, και η εν συνεχεία παραγωγή του οίνου, φαίνεται ότι ήταν σημαντικές για τον ελληνικό πληθυσμό. Αυτό αποδεικνύεται και από τις γιορτές που είχαν καθιερωθεί στην αρχαία Ελλάδα, με αντικείμενο τον οίνο (Ανθεστήρια, Διονύσια, Λήναια). Το ίδιο μαρτυρούν λαϊκές και θρησκευτικές παραδόσεις. Άλλωστε, η αμπελοκαλλιέργεια διαδόθηκε από την Ελλάδα σε χώρες όπως η Γαλλία και η Ιταλία, που κυριαρχούν σήμερα στον τομέα της αμπελοοινικής παραγωγής, μέσω της Μασσαλίας στη Γαλλία, και μέσω της Σικελίας στην Ιταλία (Σουφλερός, 2015).

Η μελέτη, διαχρονικά, για την παρουσία και την καλλιέργεια της αμπέλου στην Ελλάδα, επιβεβαιώνει τη σημαντική συμβολή της στους τομείς της οικονομίας, του πολιτισμού, της κοινωνικής ανάπτυξης και της διαμόρφωσης του κάλλους του τοπίου, μέσω της αισθητικής αναβάθμισης των αγροτικών περιοχών μικρών αλλά και μεγάλων νησιών, καθώς και περιοχών που χαρακτηρίζονται ορεινές και ημιορεινές. Οι αμπελώνες μαζί με τους ελαιώνες, τις αρχαιότητες και τα μνημεία θεωρούνται τα κυρίαρχα στοιχεία της ελληνικής εξοχής. Η

προσαρμογή και ο εγκλιματισμός του φυτού της αμπέλου επιτεύχθηκε μέσω της αξιοποίησης των ξηροθερμικών νησιωτικών περιοχών και των φτωχών εδαφών των ημιορεινών και ορεινών περιοχών της Ελλάδας. Προκύπτει ότι, τα προβληματικά ή ακατάλληλα εδαφοκλιματικά περιβάλλοντα για τα υπόλοιπα καλλιεργούμενα φυτά ευνοούν την αμπελοκαλλιέργεια, μέσω ανάπτυξης κατάλληλων καλλιεργητικών τεχνικών, και την παραγωγή υψηλής ποιότητας, αμπελουργικών προϊόντων (Σταυρακάκης, 2016).

## 1.2 Σταφύλι

Ιδανικό θεωρείται το αμπέλι που παράγει καλά ώριμα σταφύλια σε μικρή ποσότητα. Σημαντική είναι η επιλογή της κατάλληλης περιοχής και των ποικιλιών που θα φυτευτούν. Ακολουθώντας, η εφαρμογή των κατάλληλων πρακτικών για την προστασία του φυτού από διάφορες ασθένειες, η λίπανση και το πότισμα. Σημαντική είναι η διαδικασία του κλαδέματος για την παραγωγή μικρής σχετικά ποσότητας σταφυλιών κατάλληλων για την παραγωγή οίνου με ποιοτικά χαρακτηριστικά. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, όταν σκοπός είναι να αυξηθεί η ποσότητα, με αμφίβολα αποτελέσματα στην ποιότητα, προτιμούνται τα πλούσια εδάφη, η εντατική λίπανση και το περισσότερο πότισμά τους, με κλάδεμα χωρίς αυστηρούς περιορισμούς. Ο παραγωγός είναι αυτός που θα επιλέξει μεταξύ των δύο (Τσακίρης, 2017).

Ο βρώσιμος καρπός του αμπελιού είναι τα σταφύλια, τα οποία αποτελούν την κύρια πρώτη ύλη για την παραγωγή κρασιού, και επιδρούν σημαντικά στην ποικιλία και την ποιότητά του. Ο βαθμός επίδρασής τους στο κρασί δεν εξαρτάται μόνο από την ποιότητά τους, αλλά και από τον τρόπο και τη διαδικασία οινοποίησης (Νικολάου, 2008).

Τα σταφύλια κατατάσσονται στις παραγωγικότερες οπωροφόρες καλλιέργειες παγκοσμίως. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων καλλιεργειών αμπέλου, χωρίς όμως εφαρμογές οι οποίες να είναι οικονομικά επικερδείς. Παρ' όλα αυτά οι καρποί της αμπέλου είναι φυσικές πηγές παραγωγής φαινολικών ενώσεων με σημαντικά οφέλη για την υγεία και άλλες πιθανές καινοτόμες, φιλόδοξες εφαρμογές. Ζητούμενο είναι η επαναχρησιμοποίησή τους, ώστε μέσω βιώσιμων διαδικασιών να παράγονται λειτουργικά προϊόντα και συγχρόνως να μετριάζεται η δημιουργία αποβλήτων (Dorosh, et al., 2022).

### 1.3 Βόστρυχας

Ο βότρυς των σταφυλιών αποτελείται από δύο κύρια μέρη. Τα μέρη αυτά αποτελούνται από μικρότερα μέρη, τον βόστρυχα που είναι το ξυλώδες μέρος και τη ράγα που είναι το εδώδιμο μέρος, το οποίο χρησιμοποιείται για την οινοποίηση. Η αναλογία τους, επί τοις εκατό, στον βότρυ ποικίλλει, αναλόγως των κλιματολογικών συνθηκών, του εδάφους, του χρόνου που γίνεται ο τρύγος, της ποικιλίας και της πιθανότητας προσβολής τους από ασθένειες. Επισημαίνεται ότι, στις ποικιλίες που είναι οινοποιήσιμες, συγκριτικά με αυτές των επιτραπέζιων σταφυλιών, το μέγεθος των βοτρυών παρουσιάζει μεγαλύτερη διακύμανση. Η αναλογία βόστρυχα - ραγών, επί τοις εκατό, είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους του βότρυ. Οι ράγες αποτελούν κατά μέσο όρο ποσοστό 93 με 97% κατά βάρος και ποσοστό 70% κατά όγκο περίπου του σταφυλιού (Σουφλερός, 2015).

Η χημική σύνθεση του βοστρύχου είναι φτωχή σε σάκχαρα και παρόμοια με τη χημική σύνθεση των φύλλων. Ο βόστρυχος ή αλλιώς τσάμπουρο είναι πλούσιος σε πολυφαινόλες (Τσακίρης, 2017).

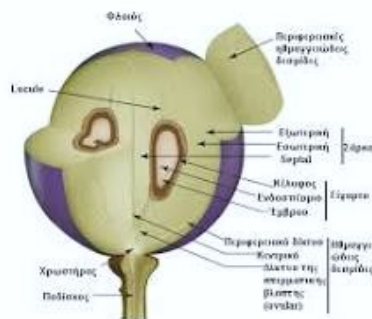
Το συστατικό που υπάρχει στον βόστρυχα, στα αρχικά στάδια, σε αναλογία που φτάνει μέχρι και το 90 τοις εκατό κατά βάρος, είναι το νερό. Ωστόσο, κατά τη μετατροπή των ιστών του βόστρυχα σε ξύλο και επειδή αυξάνεται η ξηρά ουσία, σε ποσοστό 25 με 30% κατά βάρος, παρατηρείται αντίστοιχη μείωση του ποσοστού του νερού. Η ξηρή ουσία στο μεγαλύτερο μέρος της αποτελείται από ξυλώδεις ουσίες και στο υπόλοιπο από ταννίνες, ρητίνες, αζωτούχες ενώσεις, ανόργανα συστατικά, οργανικά οξέα, σάκχαρα σε ποσοστά, 2 έως 4 %, 1 %, 1 έως 2 %, 2 έως 3 %, 1 έως 2 % και 1 % κατά βάρος, αντίστοιχα (Σουφλερός, 2015).

### 1.4 Ράγα

Η ράγα γνωστή και ως ρώγα αποτελεί τον βασικό καρπό που παράγεται από την άμπελο και όπως ήδη αναφέρθηκε αποτελεί το μέρος του σταφυλιού που συμμετέχει στην οινοποίηση. Αποτελείται από τον φλοιό, τη σάρκα και τα γίγαρτα (ανάλογα με τις ποικιλίες, όπως φαίνεται στην εικόνα 1), σε ποσοστά 10 έως 20 τοις εκατό, 74 έως 87 τοις εκατό και 3 έως 6 τοις εκατό, αντίστοιχα (βλέπε Εικόνα 1) (Σουφλερός, 2015). Αυτές οι αναλογίες εξαρτώνται από την ποικιλία σταφυλιών, τις συνθήκες εδάφους και κλίματος, καθώς και από το στάδιο ωρίμανσης, στο οποίο βρίσκονται. Σημειώνεται επιπλέον ότι, ανάλογος με τον αριθμό των κανονικά



γονιμοποιημένων άνθρων την εποχή της ταξιανθίας του αμπελιού, είναι και ο αριθμός των ραγών που αναπτύσσονται στον βότρυ των σταφυλιών (Αλεξάκης, 2000).



**Εικόνα 1. Ανατομία Πάγας (Kennedy,2008, όπως αναφέρεται στην Ξένια, 2018).**

Οι ράγες δημιουργούνται, καθώς, εξελίσσονται οι ωσθήκες μετά από τη γονιμοποίηση των άνθεων. Στην αρχή οι ράγες είναι πράσινες, έχουν σκληρή υφή, και είναι πλούσιες σε οξέα με χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Κατά την αύξηση του μεγέθους τους, συμβαίνει η αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή αυξάνεται η περιεκτικότητα σε σάκχαρα και μειώνεται η περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα. Κατά την διαδικασία ωρίμανσης ο φλοιός μαλακώνει και γυαλίζει (φαινόμενο του περκασμού), και οι ράγες αλλάζουν χρώμα. Προς το τέλος της διαδικασίας ωρίμανσης, η περιεκτικότητα σε σάκχαρα σταθεροποιείται στα υψηλότερα επίπεδα και η περιεκτικότητα σε οξέα στα χαμηλότερα (Πολίτης, 1997).

### 1.4.1 Ο φλοιός

Τρεις στρώσεις αποτελούν την φλούδα (φλοιό) της ράγας. Η πρώτη εξωτερική στρώση είναι η εφυμενίδα, με μεγάλη θρεπτική αξία για τους ζυμομύκητες, της οποίας η κάλυψη είναι κηρώδεις ουσίες, και η οποία παρεμποδίζει την υπερβολική εξάτμιση από τον χυμό της ράγας, συμβάλλει στην γρήγορη απομάκρυνση του βρόχινου νερού και συγκρατεί μικροοργανισμούς πολύτιμους για τη διαδικασία της ζύμωσης του γλεύκους και του κρασιού του χυμού, κατά την μεταφορά τους από τον αέρα (Σουφλερός, 2015).

Η επιδερμίδα αποτελεί τη δεύτερη στρώση και αποτελείται από λεπτά κύτταρα σε μορφή μίας με δύο στιβάδων, με ανθεκτικές μεμβράνες, όπου περιέχονται τα αρωματώδη έλαια, τα οποία αποτελούν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ποικιλιών των σταφυλιών (Τσακίρης, 2017).

Η τρίτη στρώση είναι το υπόδερμα, το οποίο έχει ως χαρακτηριστικό του την ύπαρξη έξι έως δέκα στιβάδων κυττάρων, από τις οποίες στις πρώτες δύο με τρεις περιέχονται οι ανθοκυάνες ή φλαβόνες, στις οποίες οφείλεται το χρώμα των ερυθρών σταφυλιών και των λευκών, αντίστοιχα. Εξάλλου, στον φλοιό βρίσκεται μέρος των ταννινών ή αλλιώς δεψικών ουσιών, οι



οποίες προσδίδουν τη στυφάδα στην γεύση, χαρακτηριστικό κυρίως των ερυθρών οίνων (Σουφλερός, 2015).

Στο μεγαλύτερο μέρος του ο φλοιός, αποτελείται από νερό σε ποσοστό 75 - 80 %, και στο υπόλοιπο από ταννίνες, όξινες, ανόργανες και αζωτούχες ενώσεις και λοιπές ουσίες σε ποσοστά, 1 έως 2%, 1 έως 1,5%, 1,5 έως 2%, 1,5 έως 2%, και 10 έως 15% κατά βάρος, αντίστοιχα (Σουφλερός, 2015).

Ο φλοιός περιέχει ελάχιστα σάκχαρα, όμως είναι πλούσιος σε αδιάλυτες ουσίες όπως είναι η πηκτίνη, οι πρωτεΐνες, τα αρωματικά συστατικά και η κυτταρίνη. Ως εκ τούτου, ο οινοποιητικός του ρόλος είναι σημαντικός, καθώς, η επεξεργασία του επηρεάζει τον τύπο του παραγόμενου κρασιού κατά την διαδικασία εκχύλισης των ουσιών που περιέχει. (Τσέτουρας, 2003).

#### 1.4.2 Η σάρκα

Στην σάρκα περιλαμβάνονται το ενδοκάρπιο και το μεσοκάρπιο, αποτελούμενα από 20 έως 25 στιβάδες, από κύτταρα με εξαιρετικά εύθραυστα και λεπτά τοιχώματα. Υπάρχουν δέσμες αγγείων που διακρίνονται στις περιφερειακές και στις κεντρικές ή αξονικές, των οποίων ο ρόλος είναι σημαντικός στη διαδικασία μεταφοράς των σακχάρων, η σύνθεση των οποίων γίνεται στα φύλλα, αλλά και των ανόργανων συστατικών που αντλούνται από τις ρίζες των αμπελιών (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

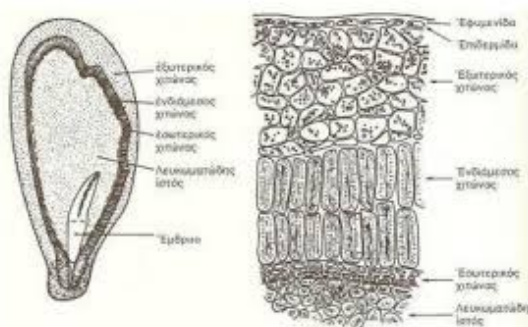
Τα κυριότερα συστατικά της σάρκας, η οποία καθορίζει και στο μεγαλύτερο μέρος της τη μετέπειτα σύσταση του γλεύκους, είναι τα ακόλουθα:

Η σάρκα, ως καθοριστικός παράγοντας της σύστασης του γλεύκους, αποτελείται από νερό σε ποσοστό 65 με 80 % κατά βάρος, από σάκχαρα σε ποσοστό 10 με 30 % κατά βάρος, και άλλες ουσίες σε ποσοστό 5-6 % κατά βάρος. Τις ουσίες αυτές τις αποτελούν κυρίως ανόργανα συστατικά, οργανικά οξέα, ενώσεις αζώτου, πηκτινικές ύλες, καθώς και αυτές που προσδίδουν στο κρασί άρωμα, χρώμα και ταννίνες (Σουφλερός, 2015).

#### 1.4.3 Τα γίγαρτα

Όπως φαίνεται στην εικόνα 2, τα γίγαρτα ή αλλιώς κουκούτσια είναι τα αναπαραγωγικά όργανα του αμπελιού. Ως συνήθως οι ράγες περιέχουν τέσσερα γίγαρτα, όσα είναι και τα ωάρια που περιέχονται στην ωοθήκη των ανθών. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις ραγών, χωρίς γίγαρτα, οι οποίες είναι πολύ μικρού μεγέθους. (Νικολάου, 2008).

Αποτελούνται από δύο κυρίως τμήματα, το οξύ και το ωοειδές και η χημική τους σύσταση είναι νερό σε ποσοστό 25 - 45 % κατά βάρος, υδατάνθρακες σε ποσοστό 34 - 36 % κατά βάρος, ελαιώδεις ουσίες σε ποσοστό 13 - 20 % κατά βάρος, ταννίνες σε ποσοστό 4 - 6 % κατά βάρος, αζωτούχες ενώσεις σε ποσοστό 4 - 6.5 % κατά βάρος, ανόργανες ουσίες σε ποσοστό 2 - 4 % κατά βάρος και λιπαρά οξέα σε ποσοστό 1 % κατά βάρος (Σουφλερός, 2015).



**Εικόνα 2. Εγκάρσια διατομή γιγάρτων [Jackson, R. S. (2008)]**

Τα γίγαρτα επιδρούν σημαντικά στην οινοποίηση και ιδιαιτέρως στην ερυθρή, καθώς αποτελούν κύρια πηγή των ταννινών αλλά και των ελαιωδών ουσιών, οι οποίες περιέχονται μέσα στα γίγαρτα, και με ενδεχόμενη θραύση τους δρουν επιζήμια στον οίνο. Η θραύση μπορεί να αποφευχθεί με την έγκαιρη απομάκρυνση των γιγάρτων, κατά τη διαδικασία μηχανικής έκθλιψης του γλεύκους (Τσέτουρας, 2003).

## **1.5 Η ωρίμανση των σταφυλιών**

Η ποιότητα του κρασιού και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, μεταξύ των οποίων και το στάδιο ωρίμανσης των σταφυλιών. Στην ερυθρή οινοποίηση, η σωστή ωρίμανση των σταφυλιών, που επιτυγχάνεται με ζεστά και ξηρά καλοκαίρια, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Οίνοι διαφορετικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, παράγονται από σταφύλια λευκών ποικιλιών διαφορετικού βαθμού ωριμότητας. Η διαδικασία μέσω της οποίας ωριμάζουν τα σταφύλια χωρίζεται σε τέσσερα στάδια ή περιόδους που είναι η αύξηση, ο περκασμός, η ωρίμανση και η υπερωρίμανση (Σουφλερός, 2015).

### **1.5.1 Στάδιο αύξησης μετά την καρπόδεση**

Η πρώτη περίοδος/στάδιο αρχίζει να πραγματοποιείται καθώς σχηματίζεται ο καρπός με χαρακτηριστικά το πράσινο χρώμα της ράγας σε όλη την διάρκεια αυτής, εξαιτίας της

χλωροφύλλης που έχει και τη συνεκτική και σκληρή υφή της σάρκας. Αποτελεί την περίοδο, κατά την οποία η ράγα (καρπός) είναι μικρή, η συμπεριφορά της είναι παρόμοια με οργάνου, το οποίο αφομοιώνει και επεξεργάζεται άμυλο, και η λειτουργία της είναι παρόμοια με ένα είδος φύλλου. Παρατηρείται αύξηση του όγκου και του βάρους της, με περιεκτικότητα σε οξέα περίπου 20γρ. ανά 1000 γρ. σταφυλιού, ενώ η περιεκτικότητα σε σάκχαρα παραμένει σταθερή με ποσοστό παρόμοιο με αυτό των οξέων (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

### 1.5.2 Στάδιο περκασμού

Το γυάλισμα που παρατηρείται στον φλοιό της ράγας σηματοδοτεί την έναρξη του σταδίου του περκασμού. Στην περίοδο αυτή παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα της ράγας, διόγκωση και ελαστικότητά της. Ταυτόχρονα η όψη και η δομή των γιγάρτων διαφοροποιείται. Επίσης, κατά την περίοδο του περκασμού παρατηρείται απότομη εμφάνιση ερυθρών και λευκών χρωστικών, στις ερυθρές και λευκές ποικιλίες αντίστοιχα, με τον χρωματισμό της ράγας ακόμα και σε μια ημέρα. Επιπλέον, μειώνεται η οξύτητα και τα σάκχαρα, μέσω της συσσώρευσής τους, αυξάνονται απότομα (Αλεξάκης, 2000).

### 1.5.3 Στάδιο της ωρίμανσης

Ακόμη υπάρχει η ωρίμανση, που ορίζεται με βάση την περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών, καθώς και των αρωματικών που φτάνει στο μέγιστο σε διαφορετική χρονική στιγμή, διότι προέρχονται από διαφορετικούς βιολογικούς μηχανισμούς (Πολίτης, 1997).

Η περίοδος της ωρίμανσης είναι αυτή που έπεται της αλλαγής του χρώματος της ράγας και ολοκληρώνεται με την πλήρη ωρίμανσή της. Ακριβής ορισμός για την ωρίμανση δεν υπάρχει και αποδίδεται δύσκολα, όμως κάποιες βοηθητικές παράμετροι βοηθούν στην αποσαφήνισή του. Για παράδειγμα, ο όγκος της παραγωγής, δηλαδή το μέγιστο του μέσου όγκου των ραγών και ο χρόνος στον οποίο συμβαίνει αυτό. Άλλη παράμετρος είναι η χρονική στιγμή της μέγιστης περιεκτικότητας σε σάκχαρα. Σε περιοχές με θερμό κλίμα, όπου επιδίωξη είναι η υψηλή περιεκτικότητα οξέων μπορεί ο τρύγος να ξεκινήσει πρώιμα, δηλαδή προτού η περιεκτικότητα σε σάκχαρα φτάσει τη μέγιστη δυνατή. Σε αντίθεση με τις θερμές περιοχές, στις ψυχρές, μπορεί ο τρύγος να καθυστερήσει ώστε να συμπυκνωθούν ελαφρώς τα σάκχαρα, έπειτα από μερική εξάτμιση του νερού από τη ράγα και να μειωθεί η οξύτητα, έπειτα από μερική καύση του μηλικού οξέος. Μέσω των δύο προαναφερόμενων περιπτώσεων, ορίζεται η τεχνολογική ή βιομηχανική ωρίμανση. Αυτή, είναι ο χρόνος που θα επιλέξει ο εκάστοτε οινοποιός να πραγματοποιήσει την συγκομιδή-τρύγο, δηλαδή την συλλογή των σταφυλιών. Υπάρχει ακόμη η ωρίμανση κατά την οποία τα φαινολικά και αρωματικά συστατικά φτάνουν

στον μέγιστο βαθμό τους σε διαφορετικό χρόνο, επειδή προέρχονται από βιολογικούς μηχανισμούς που διαφέρουν μεταξύ τους (Πολίτης, 1997).

Η ωρίμανση δεν θεωρείται σταθερή διαδικασία, όμως τα είδη των ωριμάνσεων είναι πολλά. Ο προσδιορισμός και η πρόβλεψη της ημερομηνίας έναρξης του τρύγου, καθορίζονται έπειτα από ανάλυση και δειγματοληψία των σταφυλιών από την στιγμή που αλλάζουν χρώμα, προκειμένου να υπάρξει σύγκριση με δεδομένα από τα προηγούμενα χρόνια για την συγκεκριμένη περιοχή, είτε σε συνάρτηση των κλιματολογικών συνθηκών που επικρατούσαν. Η πραγματοποίηση της δειγματοληψίας γίνεται, με την συλλογή 250 ραγών από 250 κλήματα από σταφύλια διαφορετικού ύψους και από το έδαφος διαφορετικού προσανατολισμού. Η πορεία της οινοποίησης επηρεάζεται άμεσα από την κατάσταση της ωρίμανσης των σταφυλιών την στιγμή του τρύγου (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

Ο συνηθέστερος και απλούστερος δείκτης που καθορίζει το σημείο ωρίμανσης του σταφυλιού είναι η αναλογία μεταξύ σακχάρων και οξέων. Επίσης, δείκτη ωρίμανσης αποτελεί, το πηλίκο το οποίο δημιουργείται έχοντας αριθμητή την συγκέντρωση σε τρυγικό οξύ και παρονομαστή το άθροισμα της συγκέντρωσης σε μηλικό και τρυγικό οξύ, και πλησιάζει τον αριθμό ένα, καθώς, προχωράει η διαδικασία της ωρίμανσης. Η διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης είναι 40 έως 50 ημέρες, με χαρακτηριστικά τη συνεχή αύξηση του μεγέθους της ράγας και της περιεκτικότητας σε σάκχαρα, η οποία προσδιορίζεται στο 0.95 γλυκόζη/φρουκτόζη (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

#### 1.5.4 Στάδιο Υπερωρίμανσης

Η περίοδος της υπερωρίμανσης, έπεται της περιόδου της πλήρους ωρίμανσης, κατά την οποία δεν παρατηρούνται σημαντικές ανταλλαγές μεταξύ των συστατικών ράγας και του υπόλοιπου φυτού, ενώ μειώνεται αισθητά το νερό και συμπυκνώνεται ο χυμός. Υπάρχουν τρεις μορφές υπερωρίμανσης, η βιολογική, η φυσική και η τεχνητή (Θεοδοσίου, 1992).

##### **Φυσική Υπερωρίμανση**

Φυσική χαρακτηρίζεται η υπερωρίμανση, η οποία πραγματοποιείται μέσω της επίδρασης του ήλιου. Προκειμένου να συμβεί αυτό, πρέπει το σταφύλι να παραμείνει όσο το δυνατόν περισσότερο στο αμπέλι, και να εμποδιστεί η επικοινωνία του με το υπόλοιπο φυτό τσακίζοντας το κοτσάνι του. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε θερμές περιοχές, προκειμένου να αποφευχθεί η σήψη του σταφυλιού. Με αυτόν το τρόπο επιτυγχάνεται αύξηση σε σάκχαρα κατά 10 έως 15%. Σε αρκετές περιοχές, για την φυσική υπερωρίμανση, κόβονται

τα σταφύλια, απλώνονται σε χώρους με κατάλληλη διαμόρφωση και εκτίθενται στον ήλιο (Νικολάου, 2008).

### **Τεχνητή υπερωρίμανση**

Για την τεχνητή υπερωρίμανση απαιτείται θέρμανση σε διαφορετικές θερμοκρασίες χρησιμοποιώντας διαφορετικούς τύπους μηχανημάτων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται συνήθως στη βιομηχανία. Θέρμανση σε 60 °C, έχει ως αποτέλεσμα να αυξηθεί η περιεκτικότητα σε σάκχαρα και η οξύτητα, καθώς, δεν γίνεται αποικοδόμηση. Θέρμανση σε βαθμούς μικρότερους των 45 °C, έχει ως αποτέλεσμα την υπερωρίμανση, ενώ μεταξύ θερμοκρασιών 45°C και 50 °C πραγματοποιείται συμπίκνωση ταυτόχρονα με υπερωρίμανση. (Θεοδοσίου, 1992).

### **Βιολογική υπερωρίμανση**

Βιολογική χαρακτηρίζεται η υπερωρίμανση, η οποία προκαλείται μέσω της δράσης του *Botrytis cinerea* ο οποίος αναπτύσσεται, πάνω στην ράγα, κάτω υπό ορισμένες συνθήκες και κατά την ολοκλήρωση της περιόδου ωρίμανσης. Η δράση του *Botrytis cinerea* δημιουργεί στην αρχή, είτε μία είτε περισσότερες κηλίδες οι οποίες λειτουργούν σαν εστίες πολλαπλασιασμού. Οι μύκητες, μέσω των εστιών αυτών, διεισδύουν στο κάτω μέρος της φλούδας, με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται ένα ενδοκυτταρικό μυκήλιο στο πρώτο από τα στρώματα του κυττάρου. Στη συνέχεια, περιβάλλουν ολόκληρη την επιφάνεια της ράγας δίνοντάς της άλλο χρώμα (Τσακίρης, 2017).

Χαμηλά ποσοστά υγρασίας και υψηλές θερμοκρασίες, κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, έχουν σαν αποτέλεσμα την αποξήρανση των ραγών με συνέπεια τη σήψη τους. Η σήψη συμβαίνει σε λίγα μέρη παγκοσμίως, και συγκεκριμένα στις περιοχές που ευνοείται η ανάπτυξη του μύκητα, όπου η πρωινή ομίχλη είναι συχνή. Κατά το φαινόμενο της ευγενούς σήψης μεταβάλλεται η σύσταση της ράγας, δηλαδή μειώνεται ο όγκος παραγωγής, αυξάνονται τα σάκχαρα, μέχρι και τα 350 g/L, μεταβάλλεται η περιεκτικότητα σε οξέα, τροποποιείται η περιεκτικότητα σε ανόργανα ιόντα, μειώνεται το περιεχόμενο του αζώτου και επιπλέον σχηματίζεται η γλυκάνη, η οποία αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη. Αντιθέτως, σε υψηλά ποσοστά υγρασίας και χαμηλές θερμοκρασίες, αναπτύσσονται μυκήλια σε μεγάλο βαθμό, με συνέπεια να εμφανίζονται οι καρποφορίες του μύκητα στις επιφάνειες των ραγών, με χρώμα από λευκό μέχρι φαιό, και να προκαλείται η σήψη του σταφυλιού, γεγονός το οποίο επιδρά αρνητικά στην ποιότητα του παραγόμενου κρασιού (Τσακίρης, 2017).

## 1.6 Βιοχημική ανάλυση ωρίμανσης

### 1.6.1 Εξέλιξη των σακχάρων

Ανάλογα με την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης, η περιεκτικότητα των σακχάρων διαφοροποιείται. Αναφέρεται ότι, στην άμπελο, η πηγή προέλευσης της μεγαλύτερης ποσότητας σακχάρων, είναι τα φύλλα, ενώ μια πιο μικρή ποσότητα αυτών προέρχεται από τα ξυλώδη μέρη της. Η φρουκτόζη ( $C_6H_{12}O_6$ ) και η γλυκόζη, σε αρκετά μεγάλες ποσότητες, και σε πιο μικρές, η σακχαρόζη και η αραβινόζη, είναι τα πιο σημαντικά συστατικά για τη ζύμωση του γλεύκους. Στο αρχικό στάδιο της ωρίμανσης η περιεκτικότητα των σακχάρων φτάνει το ποσοστό των 10 με 15 g ανά 1000 g στα πράσινα σταφύλια, ενώ, καθώς, φτάνει στην απαιτούμενη ωρίμανση, αυξάνεται και φτάνει κατά προσέγγιση στα 200 g ανά 1000 g των σταφυλιών (Τσακίρης, 2017).

Η παραγόμενη ένταση από την φωτοσύνθεση κατά την διαδικασία ωρίμανσης, που έχει σχέση με την διάρκεια της ηλιοφάνειας στους μήνες μεταξύ Ιουλίου και Σεπτεμβρίου, έχει αποδειχθεί ότι είναι εξαιρετικά σημαντική και διαμορφώνει τη συγκέντρωση των σακχάρων. Η ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών και οι συνθήκες υψηλής εδαφικής υγρασίας, επηρεάζουν αρνητικά τη συγκέντρωση των σακχάρων, κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης (Σουφλερός, 2015).

### 1.6.2 Εξέλιξη των οργανικών οξέων

Τα βασικότερα οξέα των σταφυλιών είναι το μηλικό και το τρυγικό, με τύπους  $C_4H_6O_5$  και  $C_4H_6O_6$ , αντίστοιχα, και προκύπτουν από την ποσότητα της γλυκόζης στα φύλλα και στις ρίζες. Ο βαθμός με τον οποίο εξελίσσονται αυτά, επηρεάζεται άμεσα από τα αναπνευστικά φαινόμενα της ράγας, σε συνάρτηση με τις θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον. Η ποσότητα του τρυγικού οξέος παραμένει σταθερή, για θερμοκρασίες ανάμεσα στους  $20^{\circ}C$  έως και  $30^{\circ}C$ , σε αντίθεση με την ποσότητα του μηλικού οξέος που μειώνεται. Στις θερμοκρασίες που είναι μεγαλύτερες των  $30^{\circ}C$ , μειώνεται το τρυγικό οξύ και ταυτόχρονα και το μηλικό οξύ, του οποίου η μείωση συνεχίζεται σε όλη την διαδικασία της ωρίμανσης. Η ελάττωση αυτή συμβαίνει γρήγορα, στο αρχικό στάδιο της ωρίμανσης, όμως στην συνέχεια και φτάνοντας προς το τελικό της στάδιο γίνεται πιο αργή. Η μείωση του τρυγικού οξέος δεν γίνεται με ομοιόμορφο τρόπο, επειδή εξαρτάται από τις βροχοπτώσεις και την θερμοκρασία, άμεσα. Παρατηρήθηκε ότι η σχέση τρυγικού/μηλικού οξέος, κατά την περίοδο που συμβαίνει η αλλαγή χρώματος των ραγών, και κατά την περίοδο της ωρίμανσης διαφοροποιείται, και είναι μικρότερη της μονάδας και μεγαλύτερη της μονάδας, αντίστοιχα. Σημειώνεται επιπλέον,



ότι η περιεκτικότητα των ραγών σε κιτρικό οξύ δεν μεταβάλλεται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης (Τσακίρης, 2017).

### 1.6.3 Εξέλιξη των ανόργανων συστατικών

Η περιεκτικότητα των ανόργανων συστατικών που φτάνουν στη ράγα από το έδαφος αυξάνεται, κατά τη διάρκεια της περιόδου αλλαγής του χρώματός της, μέχρι την ολοκλήρωση της ωρίμανσης. Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητά τους και την εξέλιξή τους είναι η κυκλοφορία του νερού στο αμπέλι, και επομένως παράγοντες, οι οποίοι σχετίζονται με τη διαδικασία της διαπνοής (π.χ. κλιματολογικές συνθήκες). Επίσης, οι κλιματολογικές συνθήκες έχουν άμεση επιρροή στην αυξανόμενη περιεκτικότητα σε κάλιο, ενώ η περιεκτικότητα σε ασβέστιο και μαγνήσιο παραμένει σε σταθερά επίπεδα κατά τη διάρκεια της περιόδου αλλαγής του χρώματός της, μέχρι την ολοκλήρωση της ωρίμανσης (Τσέτουρας, 2003).

Είναι γνωστό ότι, η περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά του γλεύκους ή του οίνου που παράγεται δεν έχει αναλογική σχέση με την ποσότητά τους στο σταφύλι, καθώς, αυτά εκχυλίζονται σε ποσότητες διαφορετικές μεταξύ τους (Σουφλερός, 2015).

### 1.6.4 Εξέλιξη των φαινολικών συστατικών

Σημαντική είναι η διαδικασία της δημιουργίας των χρωστικών του σταφυλιού κατά την περίοδο ωρίμανσης. Οι χρωστικές ενώσεις αποτελούν φαινολικές ενώσεις των ραγών, των οποίων ο σχηματισμός επηρεάζεται από τη διάρκεια της ηλιοφάνειας και τη διακύμανση της θερμοκρασίας και εμφανίζονται με την αλλαγή του χρώματος στον φλοιό τους. Οι υψηλές θερμοκρασίες δεν έχουν ευνοϊκή επίδραση, θερμοκρασίες 35°C, οδηγούν στην αναστολή της παραγωγής των χρωστικών ουσιών και θερμοκρασίες 25°C, οδηγούν στην παραγωγή χρωστικών ουσιών και στον χρωματισμό των ραγών. Οι ταννίνες, επίσης είναι φαινολικές ενώσεις, που διατηρούν σταθερή την περιεκτικότητά τους στον φλοιό κατά τη διάρκεια της περιόδου αλλαγής του χρώματος των ραγών μέχρι την ολοκλήρωση της ωρίμανσής τους, όπως προαναφέρθηκε, ενώ η περιεκτικότητά τους αυξομειώνεται σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και την ηλιοφάνεια. Οι ταννίνες των γιγάρτων φτάνουν στο μέγιστό τους στη μέση της περιόδου που αλλάζει το χρώμα και μετά μειώνονται απότομα. Οι φλαβόνες είναι οι κύριες χρωστικές των λευκών ποικιλιών και οι ανθοκυάνες των ερυθρών, σχηματίζονται στις ράγες και εμφανίζουν το μέγιστο ποσοστό τους οκτώ ημέρες πριν την ολοκλήρωση της διαδικασίας ωρίμανσης των σταφυλιών (Τσακίρης, 2017).

#### 1.6.5 Εξέλιξη των αρωματικών συστατικών

Η διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης, επηρεάζει όχι μόνο την ποσότητα αλλά και την ποιότητα των αρωμάτων, μεταξύ αυτών τα αιθέρια ή αρωματικά έλαια της οικογένειας των τερπενίων. Είναι σύνηθες φαινόμενο η αύξηση των αρωμάτων καθώς προχωράει η διαδικασία ωρίμανσης, ωστόσο υπάρχουν και περιπτώσεις, όπως της γρήγορης ωρίμανσης ή της υπερωρίμανσης, που μειώνεται η ένταση και η λεπτότητά τους. Σε ανάλογες περιπτώσεις, η συγκομιδή των σταφυλιών πρέπει να γίνεται τη στιγμή που τα αρώματα είναι ποιοτικά και αγγίζουν την επιθυμητή τιμή (Dubois, 1994).

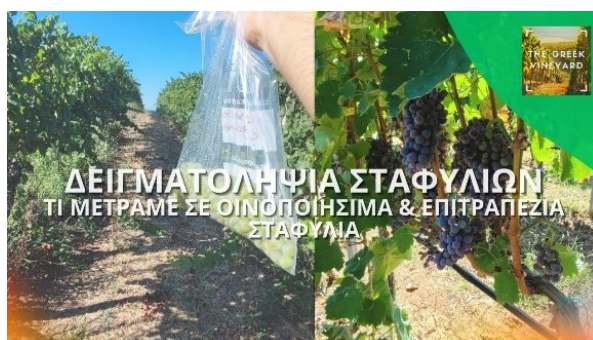


## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΟΙΝΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την μετάβαση από το σταφύλι στον οίνο ακολουθούνται κάποια κύρια στάδια που είναι, η συγκομιδή, η θραύση, η έκθλιψη των σταφυλιών, η παραγωγή του γλεύκους, η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, η επεξεργασία μετά την διαδικασία ζύμωσης και ωρίμανσης, η μηλογαλακτική ζύμωση, οι μεταγγίσσεις και ο διαχωρισμός (Σουφλερός, 2015).

### 2.1 Συγκομιδή σταφυλιών

Η ποιότητα του γλεύκους αλλά και η γευστική ισορροπία του, επηρεάζονται σημαντικά από την συγκομιδή των σταφυλιών και ιδιαίτερα από τον χρόνο πραγματοποίησής της. Ο τρύγος και ο χρόνος διεξαγωγής του, διαφέρει κατά την διάρκεια των χρόνων. Εξαρτάται άμεσα, από τις επικρατούσες κλιματολογικές συνθήκες κατά την περίοδο καλλιέργειας, τον τρόπο με τον οποίο καλλιεργείται το αμπέλι και τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες κατά την διάρκεια του τρύγου. Οι αμπελουργοί καθορίζουν την περίοδο της έναρξης του τρύγου με βάση την εμπειρία τους. Αξιολογούν το χρώμα, την υφή και την γεύση και συσχετίζουν την ωρίμανση των ποικιλιών μέσω παρατήρησής τους σε καθορισμένες ημερομηνίες (βλ. εικόνα 3). Κατά την βιομηχανική οινοποίηση, η έναρξη της συγκομιδής των σταφυλιών προσδιορίζεται κατόπιν συγκεκριμένων μετρήσεων των συστατικών του σταφυλιού. Είναι απαραίτητο, οι μετρήσεις που αφορούν την πορεία ωρίμανσης των σταφυλιών να ξεκινάνε από το στάδιο του περκασμού και να ολοκληρώνονται στο στάδιο της ωρίμανσης, με σκοπό ο οινολόγος να κρίνει την κατάλληλη χρονική στιγμή για την έναρξη οινοποίησης (Τσέτουρας, 2003).



Εικόνα 3. Δειγματοληψία πριν τον τρύγο (<https://www.youtube.com/watch?v=zA4exDXw2hw>)

Επομένως, για την επιλογή της περιόδου του τρύγου σημαντικό ρόλο παίζουν συνδυαστικά οι αλλαγές των χαρακτηριστικών της αμπέλου, όπως είναι το χρώμα των ραγών, η ελαστικότητα ή μη του φλοιού τους, ο βαθμός ξυλοποίησης του βόστρυχα, και τα μετρήσιμα χαρακτηριστικά

όπως η περιεκτικότητα σε αλκοόλη, η οξύτητα, σε επιθυμητά επίπεδα για τον παραγόμενο οίνο. Ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται, σύμφωνα με τα προαναφερόμενα, η σχέση μεταξύ των σακχάρων και της ολικής οξύτητας προκειμένου να παραχθεί ένας ισορροπημένος οίνος. Η σχέση αυτή αναφέρεται στον κλάδο της οινολογίας ως δείκτης ωρίμανσης, που κυμαίνεται ανάμεσα στις τιμές 20 και 35 την περίοδο ωρίμανσης των σταφυλιών (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

Σε περιπτώσεις πραγματοποίησης του τρύγου, πριν οι ράγες ωριμάσουν πλήρως, το γλεύκος έχει μικρή περιεκτικότητα σακχάρων και αυξημένη οξύτητα. Αντιθέτως, στην περίπτωση που τα σταφύλια ωριμάσουν σε μεγάλο βαθμό, αυξάνονται τα σάκχαρα και ελαχιστοποιείται η οξύτητα. Ο επιθυμητός συνδυασμός, είναι η αρμονία των σακχάρων και της οξύτητας, και η αναλογία τους να βρίσκεται στα επιθυμητά επίπεδα ανάλογα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου (Θεοδοσίου, 1992).

Τα σταφύλια που προτιμώνται, σαν πρώτη ύλη, για την διαδικασία της οινοποίησης, είναι αυτά που είναι φρέσκα και έχουν ωριμάσει πλήρως. Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα σταφύλια πριν ωριμάσουν πλήρως, είναι ανεπαρκή σε σάκχαρα, γεγονός που διορθώνεται, είτε μέσω της άμεσης προσθήκης σακχάρων, είτε μέσω της προσθήκης χυμού σταφυλιών σε συμπτυκνωμένη μορφή. Στις περιπτώσεις που τα σταφύλια παραμένουν στην άμπελο, με σκοπό να ωριμάσουν πλήρως, ή είναι ξηρά λόγω της έκθεσής τους στον ήλιο, παρουσιάζουν μετά την διαδικασία της συγκομιδής περιεκτικότητα υψηλή σε σάκχαρα, εξαιτίας της απώλειας υγρασίας με φυσικό τρόπο. Οι γλυκείς επιτραπέζιοι οίνοι παράγονται από τέτοιου είδους σταφύλια. Ένας μύκητας που χρησιμοποιείται για να επιταχυνθεί η απώλεια υγρασίας, είναι ο *Botrytis cinerea* (Σουφλερός, 2015).

Γενικώς, οι τιμές του pH του γλεύκους κυμαίνονται μεταξύ 3,2 και 3,5, και της περιεκτικότητας των σακχάρων, μεταξύ των 12 και 14 βαθμών Baume. Baume είναι μία κλίμακα που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο γλεύκος. Η ισοδυναμία Baume και γραμμαρίων σακχάρου ανά λίτρο νερού, είναι 1 προς με 17 έως 18 (Σουφλερός, 2015).



Εικόνα 4. Τρύγος (<https://paidis.com/2021/08/26>)

Η πραγματοποίηση του τρύγου γίνεται κατά κύριο λόγο το πρωί, ώστε να αποφεύγονται οι δύσκολες συνθήκες τις θερμές ώρες της ημέρας, όπως φαίνεται στην εικόνα 4. Η μεταφορά των σταφυλιών γίνεται απευθείας στο οινοποιείο, με σκοπό την αποφυγή προβλημάτων κατά την διαδικασία της οινοποίησης, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών (Τσέτουρας 2003).

## 2.2 Θραύση σταφυλιών

Στην σύγχρονη εποχή, που η διαδικασία της παραγωγής του οίνου γίνεται μηχανικά, η σύνθλιψη των σταφυλιών και η διαδικασία της απομάκρυνσης του βόστρυχα πραγματοποιείται με θραυστήρες. Το ποσοστό αναλογίας των βοστρύχων στην άμπελο είναι εξαιρετικά υψηλό, κάτι που δεν συμβαίνει σε άλλους καρπούς. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αίσθηση της πικρής ή στυφής γεύσης του παραγόμενου οίνου, στην περίπτωση που οι βόστρυχες δεν απομακρυνθούν πριν από την διαδικασία της ζύμωσης (Σουφλερός, 2015).



Εικόνα 5. Θραυστήρας (διάτρητος κύλινδρος) [Μακρής, 2023]

Κατασκευαστικά ο θραυστήρας έχει τη μορφή ενός διάτρητου κυλίνδρου, ο οποίος αποτελείται από πτερύγια που κινούνται με 600 έως 1,200 rpm, όπως φαίνεται στην εικόνα 5 (revolutions

per minute - στροφές ανά λεπτό). Κατά την σύνθλιψη τους, τα σταφύλια διέρχονται μέσω των οπών του κυλίνδρου, ενώ οι μίσχοι του, στο μεγαλύτερο ποσοστό τους, διέρχονται από το τέλος του. Κατά τη χρησιμοποίηση των κόκκινων σταφυλιών, με σκοπό να παραχθεί λευκό γλεύκος, ολοκληρώνεται η θραύση με την διαδικασία της συμπίεσης. Υπάρχουν περιπτώσεις που γίνεται εισαγωγή των κόκκινων σταφυλιών στις δεξαμενές, που στη συνέχεια μένουν κλειστές για μεγάλο χρονικό διάστημα, ώστε μέσω της αναπνοής να καταναλώνεται το οξυγόνο, να παράγεται CO<sub>2</sub> και να καταστρέφονται τα κύτταρα του φλοιού, με απώλεια της ημιδιαπερατότητάς του. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η εξαγωγή του χρώματος εύκολα (Σουφλερός, 2015).

### 2.3 Έκθλιψη σταφυλιών και παραγωγή γλεύκους

Μετά την διεξαγωγή του τρύγου και της μεταφοράς των σταφυλιών, άμεσα, για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, στον χώρο του οινοποιείου ξεκινάει η διαδικασία της παραγωγής του γλεύκους. Στην αρχή πραγματοποιείται η διαδικασία της έκθλιψης των σταφυλιών, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται το σπάσιμο των ραγών και η απελευθέρωση του χυμού τους. Κατά το στάδιο αυτό, έρχονται σε επαφή ο χυμός του σταφυλιού, και τα στερεά μέρη του με τα κύτταρα των ζυμών τα οποία υπάρχουν στις επιφάνειες των ραγών. Παραδοσιακά, τα σταφύλια συνθλίβονταν με τα πόδια. Σήμερα, οι σπαστήρες, που είναι τα ειδικά μηχανήματα που διαθέτουν τα σύγχρονα οινοποιεία, ολοκληρώνουν τη διαδικασία της έκθλιψης. Εκτός της έκθλιψης υπάρχουν και κάποιοι σπαστήρες που συνδυαστικά ολοκληρώνουν την έκθλιψη με αποβοστρύχωση. Στα μηχανήματα αυτά υπάρχουν δύο παράλληλοι κύλινδροι με αυλακώσεις, με αντίθετη περιστροφική κίνηση και με απόσταση μεταξύ τους κατάλληλη, προκειμένου να γίνεται η σύνθλιψη των σταφυλιών χωρίς αλλοίωση των γιγάρτων και των βοστρύχων (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

Μετά από την διαδικασία της έκθλιψης και αφού κριθεί αναγκαίος ο διαχωρισμός του γλεύκους από τους βόστρυχες, η απομάκρυνσή τους επιτυγχάνεται είτε με την εφαρμογή πρόχειρων μέσων, είτε μηχανικών. Στα πρόχειρα μέσα περιλαμβάνονται τσουγκράνες ή συρμάτινα πλέγματα. Στα μηχανικά μέσα περιλαμβάνονται διάτρητοι κύλινδροι, με άξονα και πτερύγια για την ώθηση της μάζας των βοστρύχων στην άκρη, ενώ τα στέμφυλα και το γλεύκος βγαίνουν από τις οπές. Η λειτουργία των στραγγιστηριών είναι παρόμοια, στα οποία το γλεύκος εξέρχεται από τις οπές και τα στέμφυλα εξέρχονται από τις άκρες των κυλίνδρων. Η

κατεργασία αυτή, πραγματοποιείται πριν από την διαδικασία της ζύμωσης, στην περίπτωση λευκής οινοποίησης από ερυθρά ή λευκά σταφύλια, όμως στην περίπτωση ερυθρής οινοποίησης πραγματοποιείται σε κάποιο χρόνο μετά από την διαδικασία έναρξης της ζύμωσης (Αλεξιάκης, 2000).

Κατά την διαδικασία της κλασικής ερυθρής οινοποίησης με την σύνθλιψη των σταφυλίων πραγματοποιείται και η διαδικασία του αποχωρισμού των βοστρύχων από το γλεύκος και τις ράγες, επειδή σε περίπτωση παραμονής των βοστρύχων στο γλεύκος, υποβαθμίζεται η ποιότητα του παραγόμενου οίνου, λόγω του ότι προσδίδεται χορτώδης χαρακτήρας στον οίνο. Η ζύμωση των ραγών που συνθλίβονται γίνεται χωρίς να αφαιρεθούν τα υπολείμματα, δηλαδή η ζύμωση του γλεύκους γίνεται μαζί με τον φλοιό, με συνέπεια την εκχύλιση των χρωστικών του φλοιού των σταφυλίων. Αρκετές φορές, η διευκόλυνση της εκχύλισης των χρωστικών επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης της θερμοκρασίας (Belitz, Grosch & Schieberle, 2012).

Κατά την διαδικασία της λευκής οινοποίησης χρησιμοποιούνται μηχανήματα που έχουν τη συνδυαστική λειτουργία των στραγγιστηριών και των θλιπτήρων. Μετά από την διαδικασία της έκθλιψης, γίνεται με τα στραγγιστήρια ο διαχωρισμός των βοστρύχων και των στέμφυλων από το γλεύκος. Στους βόστρυχες και στα στέμφυλα, μετά την διαδικασία της στράγγισης, περιέχονται αρκετά μεγάλες ποσότητες γλεύκους. Αυτό παραλαμβάνεται μέσω της συμπίεσης, που γίνεται στα πιεστήρια και χαρακτηρίζεται ως ποιοτικό και αρωματικό από τα αρχικά στάδια της πίεσης (Θεοδοσίου, 1992).

Αφού ολοκληρωθεί η έκθλιψη απομένει ένα υπόλειμμα ξηρής υφής. Αυτό οφείλεται στη ζύμωση είτε των λευκών είτε των κόκκινων σταφυλίων, έπειτα από την διαδικασία της εξαγωγής του χυμού. Το συγκεκριμένο υπόλειμμα χρησιμοποιείται για την παραγωγή του αποστάγματος που χρησιμοποιείται για άλλα αλκοολούχα ποτά. Η έκπλυση, η πίεση και η απόσταξη αυτού του ξηρού υπολείμματος, μπορούν να γίνουν άμεσα με τη χρήση ειδικών αποστακτήρων (Τσέτουρας, 2003).

Στις περιπτώσεις που η επεξεργασία των κόκκινων σταφυλίων γίνεται με παρόμοιο τρόπο όπως των λευκών, ή αναμιγνύονται ερυθρές και λευκές ποικιλίες, τότε ο παραγόμενος οίνος είναι το ροζέ κρασί (Τσέτουρας, 2003).

Προκειμένου να αποφευχθούν ο αποχρωματισμός που οφείλεται σε οξείδωση, αλλά και η ανάπτυξη μικροοργανισμών που είναι ανεπιθύμητοι, γίνεται θείωση του παραγόμενου νωπού γλεύκους. Επίσης, για να αποφευχθούν δυσάρεστες οσμές και γεύσεις, θολώματα και η μη

επιθυμητή οξύτητα, γίνονται διαδικασίες κατεργασίας με ενεργό άνθρακα, διαύγασης και παστερίωσης, αντίστοιχα. (Τσέτουρας, 2003).

## 2.4 Αλκοολική ζύμωση

Στα οινοποιεία, μετά την διαδικασία της έκθλιψης και της επεξεργασίας των σταφυλιών, πραγματοποιείται η διαδικασία της ζύμωσης του γλεύκους. Η ζύμωση γίνεται σε δεξαμενές κατάλληλες για την διαδικασία αυτή. Η αλκοολική ζύμωση ορίζεται ως ένα φαινόμενο βιοχημικό, στη διάρκεια του οποίου γίνεται η μετατροπή των σακχάρων, μέσω των ενζύμων των ζυμών, σε οινόπνευμα με την ταυτόχρονη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και θερμότητας, περίπου 24 kcal ανά μόριο γλυκόζης. (Τσακίρης, 2017).

Η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης ακολουθεί τέσσερα κύρια στάδια τα οποία είναι, η μετατροπή της γλυκόζης σε τριόζες, η αφυδρογόνωση των τριοζών σε πυροσταφυλικό οξύ, η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεΐδη και τέλος η αναγωγή της ακεταλδεΐδης σε αιθυλική αλκοόλη (Τσακίρης, 2017).

Σύμφωνα με τον Gay-Lussac η μετατροπή αυτή εκφράζεται με την εξίσωση  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$  (Τσακίρης, 2017)

Επίσης, σε ελάχιστες ποσότητες συμβαίνει ο σχηματισμός και άλλων παραπροϊόντων όπως για παράδειγμα η γλυκερίνη, οι αλδεΐδες, τα οξέα, οι εστέρες και τα ζυμέλαια που ανήκουν στην ομάδα των ανώτερων αλκοολών. Συνοπτικά, λόγω της αλκοολικής ζύμωσης παράγονται τα εξής: η αιθυλική αλκοόλη, το διοξείδιο του άνθρακα, η γλυκερίνη, οι ανώτερες αλκοόλες, τα οργανικά οξέα όπως είναι: το γαλακτικό, το ηλεκτρικό, το οξικό, το μυρμηκικό, το προπιονικό, το βουτυρικό, το κιτρομηλικό, το γλυκονικό, το γλυκαρικό κλπ, οι αλδεΐδες, οι εστέρες και τέλος άλλα προϊόντα σε ελάχιστη ποσότητα, όπως είναι η ισοβουτυλενογλυκόλη και η μεθυλική αλκοόλη (Τσακίρης, 2017).

Η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης είναι ένα φαινόμενο πολυδιάστατο, στην διάρκεια του οποίου πραγματοποιείται ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ενζυμικών αντιδράσεων. Η επίδραση της θερμοκρασίας, του οξυγόνου, της περιεκτικότητας σε σάκχαρα, της περιεκτικότητας σε αιθυλική αλκοόλη, της οξύτητας, των ανόργανων αλάτων και του διοξειδίου του θείου είναι σημαντική (Αλεξάκης, 2000).



Στην περίπτωση που το γλεύκος (σακχαρούχος χυμός) μένει σε συνθήκες που χαρακτηρίζονται κανονικές θερμοκρασιακά, θα παρουσιάσει σύντομα το φαινόμενο του βρασμού. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται ως ζωηρή αντίδραση, κατά την οποία παρατηρούνται διάφορες διεργασίες όπως της έκλυσης του διοξειδίου του άνθρακα, της απελευθέρωσης θερμότητας, της παραγωγής αλκοόλης και της σταδιακής μείωσης των σακχάρων. Επομένως, κατά την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, γίνεται η μετατροπή του χυμού του σταφυλιού σε κρασί, που αποτελεί προϊόν ανώτερης ποιότητας και το οποίο παρουσιάζει ποικιλομορφία ανάλογα με την έκφραση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του (Masneuf-Pomarède et al., 2006).

Είναι αναγκαίος ο προσεκτικός έλεγχος κατά την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, προκειμένου να παραχθούν κρασιά με υψηλή ποιότητα. Αναγκαίες προϋποθέσεις είναι να περιορίζεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που είναι ανεπιθύμητοι και να υπάρχει ικανός αριθμός ζυμών που είναι επιθυμητές. Επιπλέον, να υπάρχει το κατάλληλο υπόστρωμα, προκειμένου να αναπτυχθούν ικανοποιητικά οι ζύμες, να ρυθμίζεται η θερμοκρασία σε κανονικά επίπεδα, για να αποφεύγεται η υπερθέρμανση, να αποτρέπεται η οξείδωση και τέλος, θα πρέπει να γίνεται σωστή διαχείριση των φλοιών που επιπλέουν στα ερυθρά γλεύκη (Τσέτουρας, 2003).

Τα βασικότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης είναι τα εξής: Η TPP αποκαρβοξυλάση, που αποτελεί έναν πυροφωσφορικό εστέρα της βιταμίνης B1 ή της θειαμίνης, μέσω της οποίας καταλύονται οι αποκαρβοξυλιώσεις του πυρουβικού οξέος σε διοξείδιο του άνθρακα και ακεταλδεΐδη, η NAD (νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο) αφυδρογονάση, μέσω της οποίας καταλύονται οι αντιδράσεις της οξειδοαναγωγής, η ADP (διφωσφορική αδενοσίνη), που ο ρόλος της είναι πολύ σημαντικός στους μηχανισμούς εκείνους που μεταφέρουν ενέργεια μεταξύ των βιοχημικών αντιδράσεων και τέλος το CoA-SH (συνένζυμο A), που συμμετέχει κατά κύριο λόγο στον τρόπο σύνθεσης των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων (Σουφλερός, 2015).

Κατά την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης αυξάνεται, κατά 20 τοις εκατό, ο όγκος του γλεύκους, λόγω παραγωγής του CO<sub>2</sub> (διοξειδίου του άνθρακα) σε μεγάλες ποσότητες. Όταν είναι ανοιχτές οι δεξαμενές, διαλύεται ένα μικρό μέρος του CO<sub>2</sub> στο γλεύκος, ενώ αποβάλλεται το υπόλοιπο, πιο μεγάλο μέρος του, στο περιβάλλον. Η ποσότητα διαλυτότητας του CO<sub>2</sub> στα ερυθρά και τα λευκά κρασιά είναι από 0,1 έως 0,5 g ανά L και από 0,5 έως 1 g ανά L, αντίστοιχα (Τσέτουρας, 2003).

Κατά την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης μεταβάλλεται η γεύση του γλεύκους, λόγω της αποικοδόμησης των σακχάρων σε αιθυλική αλκοόλη και μειώνεται το ειδικό βάρος του (Τσέτουρας, 2003).

Η ζύμωση του γλεύκους διαρκεί περίπου 21 ημέρες με αργό ρυθμό, αλλά ο καθορισμός της διάρκειας της αλκοολικής ζύμωσης γίνεται κατά κύριο λόγο από τον αρμόδιο οινολόγο και επιπλέον από τον τύπο των οίνων που θέλει ο ίδιος να παραχθούν. Οι θερμοκρασίες της ζύμωσης που κρίνονται κατάλληλες για την ερυθρή και την λευκή οινοποίηση είναι, από 25°C έως 30 °C και από 15 °C έως 20 °C βαθμούς, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία της αλκοολικής ζύμωσης και η αύξησή της, εξαρτάται από τον αριθμό των σακχάρων, βαθμούς Baume, του γλεύκους. Προκειμένου να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη αύξηση της θερμοκρασίας χρησιμοποιούνται στα οινοποιεία, κατά κύριο λόγο, δοχεία οινοποίησης με διπλό τοίχωμα. Στα δοχεία αυτά πραγματοποιείται η κυκλοφορία του ψυκτικού υγρού, μέσω του οποίου ψύχεται το γλεύκος και επιπλέον ελέγχεται η θερμοκρασία του. Κατά την διαδικασία αυτή, γίνεται έλεγχος, κατά κύριο λόγο δύο φορές την ημέρα, πρωί και απόγευμα, της θερμοκρασίας και της πυκνότητας που έχει το παραγόμενο γλεύκος. Κατά τα αρχικά στάδια, η διαδικασία της ζύμωσης είναι έντονη και στην συνέχεια της, αυξάνεται ο αλκοολικός βαθμός και μετριάζεται ο βρασμός. Τελικά, η ζύμωση ολοκληρώνεται αργά, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η θερμοκρασία του παραγόμενου γλεύκους (Τσέτουρας, 2003).

Η παρουσία οξυγόνου ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των ζυμών. Έτσι, στις περιπτώσεις προβληματικής εξέλιξης της αλκοολικής ζύμωσης, προτείνεται η διαδικασία αερισμού του γλεύκους. Επιπλέον, σε πανομοιότυπες περιπτώσεις, μπορεί να γίνει προσθήκη στο γλεύκος ποσοτήτων θρεπτικών αλάτων, με σκοπό τον πολλαπλασιασμό των ζυμών. Η προσθήκη των θρεπτικών αλάτων γίνεται συνήθως πριν την διαδικασία έναρξης της ζύμωσης, και αποτελούν τροφή για τους ζυμομύκητες (Erasmus et al., 2003).

Η ζύμωση του γλεύκους γίνεται σε κλειστές ή ανοιχτές δεξαμενές. Όταν ο τρύγος γίνεται κατά τη διάρκεια υψηλών θερμοκρασιών, η περιεκτικότητα σε σάκχαρα είναι υψηλή, και επιλέγονται οι ανοιχτές δεξαμενές. Στις περιπτώσεις αυτές η ζύμωση ολοκληρώνεται κανονικά, τα σάκχαρα που παραμένουν αζύμωτα είναι ελάχιστα, και μπορεί να παραχθεί οίνος υψηλού αλκοολικού βαθμού. Όταν ο τρύγος γίνεται κατά τη διάρκεια ψυχρών ημερών, και επειδή στόχος είναι να περιορισθεί η εξάτμιση της αλκοόλης και να αποφευχθούν φαινόμενα οξειδώσεων, επιλέγονται οι κλειστές δεξαμενές. Αυτές διαθέτουν σύστημα, μέσω του οποίου εξασφαλίζεται η έξοδος του διοξειδίου του άνθρακα και εμποδίζεται η είσοδος αέρα. Κατά την



διαδικασία της ζύμωσης στις περιπτώσεις αυτές, δεν λαμβάνεται αρκετή ποσότητα οξυγόνου από τους ζυμομύκητες, και η δράση τους σταματάει, λόγω μεγάλης αύξησης της θερμοκρασίας ζύμωσης. Μερικές φορές, προτείνεται ο αερισμός με την βοήθεια μηχανικών μέσων στις δεξαμενές που είναι κλειστές, προκειμένου να τερματιστεί πιο γρήγορα η διαδικασία της ζύμωσης (Τσακίρης, 2017).

Τα αποτελέσματα της διαδικασίας αερισμού, διαφοροποιούνται κατά την εξέλιξη της ζύμωσης (αρχή, μέση, τέλος). Ο αερισμός πραγματοποιείται συνήθως στην αρχή της διαδικασίας της ζύμωσης, όταν τα σάκχαρα έχουν ζυμωθεί σε ποσοστό περίπου 30 με 40 g. Έχει παρατηρηθεί απώλεια αλκοόλης σε περιπτώσεις αερισμού κατά το τέλος της ζυμωτικής διαδικασίας. Αυτό συμβαίνει, επειδή παρατηρείται η απώλεια της αλκοόλης, στην περίπτωση που η διαδικασία του αερισμού πραγματοποιείται λίγο πριν το τέλος της διαδικασίας της ζύμωσης. Υπάρχουν όμως και οι περιπτώσεις που η διαδικασία του αερισμού κρίνεται απαραίτητη στη μέση της διαδικασίας της αλκοολικής ζύμωσης, όπως στην περίπτωση που κατά την κατανάλωση οξυγόνου από τις ζύμες μειώνεται το δυναμικό οξειδοαναγωγής, εντός τριών ημερών από 400 σε 120 mV. Τότε η διαδικασία του αερισμού του γλεύκος είναι απαραίτητη, για την επαναφορά του στα επίπεδα που ήταν αρχικά (Τσέτουρας, 2003).

Αν η εξέλιξη της ζύμωσης δεν είναι κανονική, παρά την διαδικασία του αερισμού και την προσθήκη θρεπτικών αλάτων, τότε οι τρόποι που υπάρχουν προκειμένου να μπορέσει να αναζυμωθεί το γλεύκος είναι δύο. Ένας είναι με την προσθήκη, από το εμπόριο, έτοιμης καλλιεργημένης ζύμης. Ο δεύτερος με την προσθήκη κατάλληλου γλεύκου. Ο δεύτερος τρόπος χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, προκειμένου να ξεκινάει με την ανάμιξη μικρών ποσοτήτων που στη συνέχεια παρουσιάζουν σταδιακή αύξηση (Erasmus et al., 2003).

Η πραγματοποίηση του εμβολιασμού γίνεται με τη χρήση καθαρών ζυμών, στους οποίους ανήκει και ο *Saccharomyces cerevisie*. (Τσέτουρας, 2003)

Η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης διακόπτεται λόγω υψηλών θερμοκρασιών, χαμηλών θερμοκρασιών, μόλυνσης του γλεύκου από μύκητες ή βακτήρια, έλλειψης οξυγόνου, προκειμένου οι ζύμες να πολλαπλασιαστούν, πολύ μεγάλης περιεκτικότητας σακχάρων και επομένως μεταβολισμού της ζύμης. Η δράση της ζύμης επηρεάζεται όταν αυξάνεται η αλκοόλη σε ποσοστό που ξεπερνάει το 10 τοις εκατό κατ' όγκο, στο ζυμούμενο γλεύκος. Λόγω αυτής της αύξησης η ενέργεια της ζύμης μειώνεται, και στην ειδικότερη περίπτωση που η

περιεκτικότητα αυξάνεται, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 15% κατ' όγκο, η δράση της ζύμης αναστέλλεται (Τσέτουρας, 2003).

Για να προσδιοριστεί η λήξη της διαδικασίας αλκοολικής ζύμωσης γίνεται μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων, δηλαδή όλων των σακχάρων του γλεύκους, και σύγκριση του ειδικού βάρους του ζυμούμενου γλεύκους σε συνάρτηση με τον υπολογιζόμενο αλκοολικό βαθμό. Το ειδικό βάρος των ξηρών κρασιών, μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, προσδιορίζεται σε τιμές μικρότερες του 0,998. Ειδικότερα, θεωρείται ότι για τα κόκκινα κρασιά ολοκληρώνεται η διαδικασία σε τιμές περιεκτικότητας σακχάρων μικρότερες των 2 γραμμαρίων ανά λίτρο, και στα λευκά μικρότερες των 1,5 γραμμαρίων ανά λίτρο. Τιμές που κυμαίνονται ανάμεσα σε 0 και 15 γραμμάρια ανά λίτρο δηλώνουν ότι ο κίνδυνος αναζύμωσης την εποχή της άνοιξης δεν υπάρχει (Τσέτουρας, 2003).

## **2.5 Επεξεργασία μετά τη ζύμωση - Ωρίμανση**

Μετά το τέλος της διαδικασίας αλκοολικής ζύμωσης συνεχίζονται μεταβολικές διαδικασίες μετατροπής του γλεύκους σε οίνο, οι οποίες διαμορφώνουν την τελική σύνθεση των συστατικών του, ιδιαιτέρως, αυτών της γεύσης και των αρωμάτων. Όπως ήδη αναφέρθηκε, μέσω της κατάλληλης σύνθεσης του γλεύκους, των ζυμών, της θερμοκρασίας και άλλων παραγόντων, σταματάει η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, όταν ελαχιστοποιείται το διαθέσιμο ποσοστό των σακχάρων προς ζύμωση. Το ποσοστό αυτό προσδιορίζεται σε 1% περίπου. Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν αυτή τη διαδικασία με αποτέλεσμα την μη ολοκλήρωση της ζύμωσης, είναι γλεύκη με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων, ζύμες δυσανεκτικές στην αλκοόλη, δυσμενείς συνθήκες θερμοκρασίας (πολύ χαμηλές ή υψηλές), και η διαδικασία υπό πίεση (Θεοδοσίου, 1992).

Η ολοκλήρωση της ζύμωσης για τους κανονικούς μούστους συμβαίνει σε διάστημα μεταξύ 10 και 30 ημερών. Τα υπολείμματα των ζυμωτικών κυττάρων θα κατακαθίσουν ως ίζημα και ο οίνος θα διαχωριστεί (racking). Μείωση του όγκου του οίνου, συμβαίνει αναλογικά με τη μείωση της θερμοκρασίας. Ακολουθεί η διαδικασία torring, δηλαδή η πλήρωση των δεξαμενών με κατάλληλα πρόσθετα για τη διαύγαση του οίνου, αρχικά ανά μία ή δύο ημέρες και αργότερα μηνιαία ή ανά δίμηνο, ώστε οι δεξαμενές να είναι πλήρεις (Θεοδοσίου, 1992).

Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης και την διαύγασή τους πολλοί οίνοι είναι κατάλληλοι για κατανάλωση. Παρ' όλα αυτά, και προκειμένου για οίνους υψηλής ποιότητας, ακολουθεί

την αλκοολική ζύμωση και η διαύγαση, η αποθήκευση και η διατήρησή τους, με σκοπό την πραγματοποίηση μεταβολών κατά την παλαίωσή τους και την βελτίωση και σταθεροποίηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά προσδίδονται στο κρασί όταν αυτό ωριμάζει λόγω επίδρασης του οξυγόνου του αέρα και λόγω των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των συστατικών του (Gómez – Míguez et al., 2007).

Αλλοιώσεις της σύνθεσης του οίνου, λόγω επίδρασης του οξυγόνου, εξελίσσονται αργά με αποτελέσματα που είναι ωφέλιμα για την ποιότητά του. Το χρονικό διάστημα που είναι απαραίτητο για την πλήρη ωρίμανση του οίνου, εξαρτάται άμεσα από την σύνθεσή του, από τις θερμοκρασιακές μεταβολές και από τις ιδιαίτερες κατεργασίες που πραγματοποιούνται σε κάθε οινοποιείο. Ο πρώτος διαχωρισμός ιζήματος – οίνου (racking), ολοκληρώνεται εντός δύο εβδομάδων από το πέρας της ζύμωσης (Θεοδοσίου, 1992). Αυτή η διαδικασία δεν υλοποιείται σε οίνους που χαρακτηρίζονται από υψηλή συνολική οξύτητα. Οι οίνοι αυτοί είναι προϊόν δροσερών κλιματολογικά περιοχών και ποικιλιών με υψηλή οξύτητα. Διατηρείται η επαφή τους με τμήμα του παραγόμενου ιζήματος έως και τέσσερις μήνες, με στόχο την αυτόλυση της ζύμης και την απελευθέρωση αμινοξέων, που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, απαραίτητων για την διαδικασία της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Θεοδοσίου, 1992).

## 2.6 Μηλογαλακτική Ζύμωση

Στα νέα παραγόμενα κρασιά συχνά παρατηρείται μια διαδικασία δευτεροβάθμιας παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα. Μερικές φορές, η διαδικασία αυτή ξεκινά αφού ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση. Οφείλεται στην μηλογαλακτική ζύμωση, κατά την οποία συμβαίνει αποικοδόμηση του μηλικού οξέος σε δύο προϊόντα, γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Κατά την συγκεκριμένη διαδικασία, παρατηρείται ελάττωση της ογκομετρούμενης οξύτητας, η οποία οφείλεται στην απόσπαση ενός καρβοξυλίου από το μηλικό οξύ. Η εξίσωση  $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH(OH)-COOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$ , περιγράφει την μετατροπή του μηλικού οξέος, μέσω της επίδρασης αναερόβιων βακτηρίων (Νικολάου, 2008).

Κατά την διαδικασία διάσπασης του μηλικού οξέος, η ποσότητα γαλακτικού και τρυγικού οξέος μπορεί να είναι ίση, ενώ η ποσότητα του μηλικού μειώνεται, ώσπου να εξαφανιστεί τελείως σε ορισμένες περιπτώσεις (Πολίτης, 1997).

Σε οίνους με υψηλή οξύτητα, η βαθμιαία αυτή ελάττωση της οξύτητας, κατά την γαλακτική ζύμωση, ταυτόχρονα με την πραγματοποίηση άλλων μεταβολών, συντελεί στην ανάπτυξη

βελτιωμένων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, ειδικά των οίνων που θεωρούνται εκλεκτής ποιότητας και οι οποίοι χαρακτηρίζονται από εκχυλισματικές ύλες και οξύτητα σε υψηλά ποσοστά. Αντιθέτως, η διαδικασία γαλακτικής ζύμωσης του μηλικού οξέος, για οίνους μικρής οξύτητας είναι πιθανό να έχει επιπτώσεις στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους, όσο και στην σωστή διατήρησή τους. Η διάσπαση του μηλικού οξέος παρεμποδίζεται από τα θειώδη οξέα. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο, σε οίνους που προστίθεται θειώδες οξύ, το μηλικό οξύ διασπάται ελάχιστα ή δεν πραγματοποιείται καθόλου η διάσπασή του. Η παραγωγή υποπροϊόντων γεύσης, που είναι άγνωστη η σύνθεσή τους, είναι αποτέλεσμα της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Η μηλογαλακτική ζύμωση σε νέα κρασιά που χαρακτηρίζονται από υψηλή συγκέντρωση σε μηλικό οξύ και όταν είναι επιθυμητή η ιδιαιτερότητα των γεύσεων, είναι απαραίτητη. Η μηλογαλακτική ζύμωση εξελίσσεται αργά ή και καθόλου, λόγω χαμηλών θερμοκρασιών (Τσακίρης, 2017).

Τα απαιτούμενα οξυγαλακτικά βακτήρια, προκειμένου να εκκινήσει η μετατροπή του μηλικού οξέος, μπορεί να μην αναπτυχθούν είτε λόγω ανεπάρκειας είτε λόγω πλήρους απουσίας αμινοξέων που είναι απαραίτητα. Επίσης, η ανάπτυξή τους στις περιπτώσεις παρουσίας 70 έως 100mg/L διοξειδίου του θείου παρεμποδίζεται. Λόγω υπερβολικής μηλογαλακτικής ζύμωσης, παράγονται οίνοι με πολύ χαμηλή οξύτητα και επομένως επίπεδοι γευστικά ή με αρώματα ανεπιθύμητα, όπως αυτά του ξινολάχανου. Τέτοιου είδους ελαττώματα αντιμετωπίζονται με racking νωρίτερα ή με διαδικασίες διήθησης και προσθήκης διοξειδίου του θείου (Σουφλερός, 2015).

## 2.7 Μεταγγίσεις

Όσο διαρκεί η αλκοολική ζύμωση παράγεται στρώμα λάσπης, το οποίο κατακάθεται ως ίζημα στον πυθμένα των δοχείων όπου πραγματοποιείται η ζύμωση. Αυτό το ίζημα είναι γνωστό ως οινολάσπη και περιέχει είτε σακχαρομύκητες νεκρούς είτε αδρανείς, διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μεταφέρονται από τα σταφύλια, υπολείμματα από ράγες και βόστρυχες, άλλα άλατα σε διάφορες ποσότητες, όπως είναι το τρυγικό και το φωσφορικό ασβέστιο, ο φωσφορικός σίδηρος, ύλες σε αδιάλυτη μορφή πρωτεϊνικής σύστασης, χρωστικές κ.λπ. Η περιεκτικότητα σε όξινο τρυγικό κάλιο είναι αρκετή, ώστε να χαρακτηρίζεται ως το σημαντικότερο συστατικό της οινολάσπης (Αλεξάκης, 2000).

Όσο περνάει ο χρόνος μπορεί να προκληθούν αλλοιώσεις στα συστατικά της κατώτερης στάθμης του οίνου, ειδικά στις ύλες πρωτεϊνικής σύστασης. Αυτό το πρόβλημα εντοπίζεται αρκετά συχνά, λόγω της παραμονής της οινολάσπης και της επαφής της με τον οίνο, και εκδηλώνεται με αλλοίωση στο άρωμα (οσμή υδρόθειου) και με θόλωμα. (Αλεξάκης, 2000).

Σημαντική είναι η διαδικασία των μεταγγίσεων, προκειμένου να διαχωριστεί ο οίνος από την οινολάσπη και το ίζημα που δημιουργείται στα κατώτερα επίπεδα των δοχείων της ζύμωσης, για να αποφευχθούν τα φαινόμενα που προαναφέρθηκαν αλλά και η ανάπτυξη των πιθανών ασθενειών στον οίνο (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Μέσω της διαδικασίας μετάγγισης, γίνεται απομάκρυνση των επιβλαβών συστατικών που περιέχονται στην οινολάσπη. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, πρέπει να επικρατούν συγκεκριμένες συνθήκες. Ευνοϊκές θεωρούνται οι συνθήκες ψυχρού και ξηρού κλίματος και υψηλής ατμοσφαιρικής πίεσης, ώστε να απομακρύνεται το διοξείδιο του άνθρακα. Αντιθέτως, συνθήκες που ευνοούν την έκλυσή του, οδηγούν στην ανάδευση των συστατικών της οινολάσπης (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Τα δοχεία στα οποία γίνεται η μεταφορά του οίνου (μετάγγιση) πρέπει να είναι αποστειρωμένα. Η μετάγγιση ξεκινάει λίγο καιρό μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας ζύμωσης, οπότε και η ποσότητα της οινολάσπης είναι σε υψηλά επίπεδα. Η κατάλληλη εποχή είναι τέλος φθινοπώρου και αρχές. Μετάγγιση, η οποία γίνεται νωρίτερα ίσως από την περίοδο που πρέπει, δεν προκαλεί φαινόμενα αλλοιώσεων, σε αντίθεση με μετάγγιση που θα καθυστερήσει, οπότε είναι πιθανή η έναρξη των αλλοιώσεων και της ποιότητας του οίνου. Στις αρχές της άνοιξης, προτού αυξηθεί πολύ η θερμοκρασία και εφόσον ο παραγόμενος οίνος δεν καταναλωθεί μέσα στον χρόνο παραγωγής του, γίνεται τρίτη μετάγγιση. Επίσης, αρχές καλοκαιριού, σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από ψυχρό κλίμα πραγματοποιείται και τέταρτη μετάγγιση. Η διαδικασία αυτή της μετάγγισης, επαναλαμβάνεται μία φορά το χρόνο για τα κρασιά που διατηρούνται χρόνια (Σουφλερός, 2015).

Η πραγματοποίηση της μετάγγισης με την παρουσία αέρα απαιτεί προσοχή, ειδικά στις περιπτώσεις που ο οίνος μπορεί να θολώσει εξαιτίας της επίδρασης του οξυγόνου του αέρα και να αποκτήσει κυανό, καστανό θόλωμα κ.λπ. Η απλή εξέταση του οίνου με την έκθεση μικρής ποσότητάς του στον αέρα, θα επιβεβαιώσει πιθανότητα θόλωσής του. Αν διαπιστωθεί, ότι ο αέρας θα επηρεάσει την ποιότητα του οίνου κατά την μετάγγιση αυτή θα πραγματοποιηθεί

απουσία του. Προκειμένου όμως, να προληφθεί ένα τέτοιο φαινόμενο, πραγματοποιείται μια σειρά αναγκαίων διορθώσεων στον οίνο (Ασημιάδης, 2002).

Για την εκτέλεση των μεταγγίσεων απαιτούνται αντλίες. Αν απαιτείται αερισμός του οίνου, τότε γίνεται μεταφορά του σε υπόγεια δεξαμενή και κατόπιν μέσω της αντλίας σε καινούργιο οινοδοχείο. Αν η επίδραση του αέρα είναι επιβλαβής, τότε γίνεται άντληση απευθείας από το παλιό οινοδοχείο στο καινούργιο. Οι οινολάσπες από τα διάφορα οινοδοχεία περιέχουν αρκετή ποσότητα οίνου, η οποία μπορεί να ληφθεί, μέσω διήθησης που πραγματοποιείται, συνήθως με ειδικές συσκευές, αφού έχουν συγκεντρωθεί σε ένα οινοδοχείο. Σε ορισμένες περιπτώσεις, για να γίνει η διαδικασία αυτή, το σύνολο της υγρής οινολάσπης παραμένει κάποιες ημέρες στο οινοδοχείο απ' όπου αποχωρίζεται αρκετή ποσότητα οίνου και στην συνέχεια πραγματοποιείται η διήθηση. Ο οίνος που παραλαμβάνεται μέσω της διήθησης, είτε επαναπροστίθεται στην αρχική ποσότητα, είτε διατηρείται αλλού, καθώς, η ποιότητά του είναι κατώτερη της αρχικής, εξαιτίας ιδιαίτερης γεύσης ή ύπαρξης μικροοργανισμών που είναι επιβλαβείς (Ασημιάδης, 2002).

## 2.8 Διαχωρισμός

Μερικές ποικιλίες κρασιών έχουν την ικανότητα άμεσα να αποβάλλουν μέρη τους και να φαίνονται διαυγή. Στα μέρη που αποβάλλουν περιλαμβάνονται κύτταρα των ζυμών, στέμφυλα κ.λπ. Στη διαδικασία αυτή, βοηθούν ιδιαίτερα βαρέλια ξύλινα και μεγάλα όπου η αναλογία μεταξύ της επιφάνειας και του όγκου είναι μεγαλύτερη, συγκριτικά με άλλα δοχεία. Η επιφάνεια των ξύλινων βαρελιών χαρακτηρίζεται από τραχύτητα κι έτσι εναποτίθεται ευκολότερα το αποβαλλόμενο υλικό. Κάποιες άλλες ποικιλίες κρασιών δεν έχουν αυτή την ικανότητα, ως συνήθως ποικιλίες θερμών περιοχών ή κρασιά που αποθηκεύονται σε δεξαμενές. Αυτά τα κρασιά διατηρούν τη θολότητά τους για αρκετό διάστημα (Τσακίρης, 2017).

Η διαδικασία με την οποία αφαιρούνται τα αποβαλλόμενα μέρη είναι γνωστή ως διαχωρισμός, κατά την οποία λαμβάνουν χώρα σειρά διαδικασιών, του εξευγενισμού, της διήθησης, της φυγοκέντρωσης, της ψύξης, της ιοντικής ανταλλαγής, της θέρμανσης και της παστερίωσης. (Σουφλερός, 2015).



### 2.8.1 Εξευγενισμός

Ο διαχωρισμός του κρασιού από άλλες ουσίες επιτυγχάνεται με την προσθήκη διάφορων παραγόντων, διαδικασία που είναι γνωστή ως εξευγενισμός, και η οποία γίνεται μέσω προσρόφησης χημικής αντίδρασης και φυσικής κίνησης (Κουράκου-Δραγώνα, 1998)

Μεταξύ των εξευγενιστικών παραγόντων συγκαταλέγεται ο μπεντονίτης, που είναι τύπος αργίλου. Αυτοί οι παράγοντες συμβάλλουν στην προσρόφηση των πρωτεϊνών και των κυττάρων των ζυμών. (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Ο μπεντονίτης, ως εξευγενιστικός παράγοντας, αντικατέστησε παρόμοιους παράγοντες (ζελατίνη, αλβουμίνη, νάιλον κ.α.), που χρησιμοποιούνται πλέον σε ειδικές περιπτώσεις, όπως π.χ. όταν πρέπει να αφαιρεθεί υπερβολική ταννίνη ή χρώμα. Σε περιπτώσεις εντοπισμού στον οίνο υψηλών ποσοστών σιδήρου ή και χαλκού, λόγω επαφής με μεταλλικές επιφάνειες, παρατηρείται έντονο θόλωμα. Το φαινόμενο αυτό αντιμετωπίζεται με την προσθήκη σιδηροκυανιούχου καλίου, το οποίο είναι εξευγενιστικός παράγοντας μπλε χρώματος. Στη σύγχρονη εποχή η υψηλή περιεκτικότητα σε μέταλλα δεν είναι συχνή, λόγω αντικατάστασης του μεταλλικού εξοπλισμού από εξοπλισμό ανοξείδωτου (Τσακίρης, 2017).

### 2.8.2 Φιλτράρισμα-Διήθηση

Η έννοια του φιλτραρίσματος ή διήθησης αναφέρεται στη χρήση ειδικών φίλτρων ή ηθμών, προκειμένου να απομακρυνθούν από τον οίνο σωματίδια ή επιβλαβείς παράγοντες. Μετά το φιλτράρισμα ο οίνος είναι διαυγής. (Βέκιος, Κούκης, & Τσακίρης, 1997).

Τα ειδικά αυτά φίλτρα είναι έτσι κατασκευασμένα, ώστε, είτε λόγω μεγέθους των πόρων τους να μπορούν να συγκρατήσουν διάφορα σωματίδια, είτε λόγω χημικής σύστασής τους να ευνοούν την προσκόλληση των σωματιδίων επάνω τους. Τα υλικά κατασκευής των ηθμών με την πάροδο των ετών άλλαξαν. Αρχικά ήταν υφασμάτινοι, ενώ αργότερα κατασκευάστηκαν από υλικά αμιάντου, πορσελάνης, διατομίτη και κυτταρίνης (Ασημιάδης, 2002).

Ο αμιάντος με τη χρήση του ως διηθητικό μέσο, παρ' όλο που ευνοεί τη διαύγαση των κρασιών που χαρακτηρίζονται από θολώματα έντονου βαθμού, δεν χρησιμοποιείται πλέον, εξαιτίας της γνωστής τοξικότητάς του. Ο διατομίτης έχει παρόμοια χρήση με αυτή του αμιάντου, και ως ορυκτό αποτελείται από ενώσεις του πυριτίου, που διαυγάζουν τον οίνο αποτελεσματικά. Η πορσελάνη επίσης, συμβάλλει στην εξαιρετική διαύγαση του κρασιού, αλλά λόγω κατασκευής των ηθμών πορσελάνης (μικρές διατομές), προτιμάται σε μικρές ποσότητες οίνου, καθώς η διήθηση γίνεται εξαιρετικά αργά. Οι ηθμοί κυτταρίνης αποτελούνται από πεπιεσμένα φύλλα

χαρτιού ανάμεσα σε πλαίσια ειδικής κατασκευής ή από πεπιεσμένη κυτταρίνη. Λόγω του ιδιαίτερου αρώματος χαρτιού, και προκειμένου αυτό να μην διαχυθεί στο κρασί, πρέπει να τοποθετηθεί πριν τη χρήση σε δοχείο με ζεστό νερό. Ίνες κυτταρίνης πορωδών υλικών και μεμβράνες φίλτρων τοποθετημένες σε σειρά, αποτελούμενες από πορώδη υλικά αποτελούν τα σύγχρονα ταμπόν των ηθμών, τα οποία στις περιπτώσεις μικρού μεγέθους συμβάλλουν ικανοποιητικά στην αφαίρεση κυττάρων ζύμης και βακτηριακών κυττάρων (Ασημιάδης, 2002).

### 2.8.3 Φυγοκέντρωση

Η φυγοκέντρωση, είναι μία διαδικασία η οποία χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις κρασιών που ο διαχωρισμός δεν μπορεί να επιτευχθεί με τους τρόπους που αναφέρθηκαν. Κατά την εφαρμογή της όμως απαιτείται προσοχή, προκειμένου να μην αναπτυχθούν οξειδωτικές αντιδράσεις και να μην υπάρξει απώλεια της περιεκτικότητας αλκοόλης (Σουφλερός, 2015)

### 2.8.4 Ψύξη

Η σταθεροποίηση του οίνου μπορεί να επιτευχθεί και με άλλη διεργασία, αυτή της ψύξης, μέσω της οποίας ολοκληρώνεται η διαδικασία του διαχωρισμού. Ως σημαντικός παράγοντας της παρουσίας θολώματος στο κρασί, κατά τη διαδικασία ωρίμανσής του, θεωρείται η καταβύθιση του τρυγικού καλίου με αργό ρυθμό. Στην κατεύθυνση αυτή και προκειμένου να επιταχυνθεί η διαδικασία καταβύθισης πραγματοποιείται ψύξη, δηλαδή τεχνητά πέφτει η θερμοκρασία από τους -7 έως τους -5 °C για διάρκεια μιας έως δύο εβδομάδων (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

Σύμφωνα με τον Πολίτη (1997), η διατήρηση του οίνου σε θερμοκρασίες μικρότερες των 0 °C ,έχει ευεργετική δράση ως προς την γρηγορότερη απομάκρυνση του τρυγικού καλίου, μέσω διήθησης λόγω της κρυσταλλικής του μορφής, ως προς τη δημιουργία αδιάλυτου ιζήματος χρωστικών του οίνου κολλοειδούς μορφής, ως προς την καθίζηση μέρους συμπλόκων ενώσεων των ταννινών με τον σίδηρο, και επομένως απομάκρυνση του κινδύνου έντονου θολώματος, ως προς την καθίζηση επιβλαβών για το κρασί μικροοργανισμών, που καθίστανται αδρανείς σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Μέσω της διαδικασίας ψύξης επιτυγχάνεται γρηγορότερα η παλαίωση του οίνου, λόγω της γρήγορης εξέλιξης διαδικασιών, που σε διαφορετικές συνθήκες θα ολοκληρωνόταν σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, όπως μεταβολικές διεργασίες. Επίσης, μειώνεται ο αριθμός μεταγίσεων και διηθήσεων που απαιτούνται για την απομάκρυνση του ιζήματος. Η



διαδικασία αυτή, βοηθά την άμεση εμφιάλωση του νέου οίνου απομακρύνοντας τους κινδύνους από την εμφάνιση ιζημάτων των τρυγικών αλάτων και των χρωστικών (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

#### 2.8.5 Ιοντική ανταλλαγή

Άλλος τρόπος σταθεροποίησης του οίνου, είναι με τη χρήση μιας συσκευής ιοντικής ανταλλαγής, που βασίζεται στην ανταλλαγή του καλίου με το νάτριο και τη δημιουργία τρυγικού, που είναι πιο διαλυτό, και επομένως δεν συνεχίζεται η καταβύθισή του. Λόγω αυτής της ανταλλαγής ιόντων, η μέθοδος θεωρείται παράνομη σε αρκετές χώρες (Αλεξάκης, 2000).

#### 2.8.6 Θέρμανση

Σε πολλές ποικιλίες οίνων υπάρχουν πρωτεΐνες που με την καταβύθισή τους ή αντιδρώντας με διάφορα μέταλλα δημιουργούν έντονα θολώματα. Μέσω της χρήσης του μπεντονίτη, μειώνεται η ποσότητα πρωτεϊνών και ειδικά σε υψηλές θερμοκρασίες, κατά τη διαδικασία εξευγενισμού του οίνου, και αυξάνεται η πρωτεϊνική προσρόφηση. Ειδικότερα, με τη διαδικασία παστερίωσης μεταξύ 70 έως 82 °C, η οποία δεν χρησιμοποιείται σήμερα, επιτυγχάνεται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (Αλεξάκης, 2000).

#### 2.8.7 Παστερίωση

Προκειμένου να καταστραφούν μικροοργανισμοί, οι οποίοι περιέχονται στο κρασί, ακολουθείται η διαδικασία της παστερίωσής του, με τη διατήρηση της θερμοκρασίας σε μέτρια επίπεδα και για συγκεκριμένο χρόνο. Η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται τόσο για προληπτικούς όσο και για θεραπευτικούς λόγους.

Οι προληπτικοί λόγοι αφορούν την προστασία των ευαίσθητων οίνων κατά την μεταφορά τους σε μεγάλες αποστάσεις. Οι θεραπευτικοί λόγοι αφορούν οίνους, που κινδυνεύει η ποιότητά τους, εξαιτίας προσβολής τους από παθογόνους μικροοργανισμούς, με σκοπό την διακοπή της δραστηριότητάς τους. Για την παστερίωση, χωρίς την παρουσία αέρα, δημιουργούνται συνθήκες θερμοκρασίας μεταξύ 55 έως 65 °C, για λίγα λεπτά της ώρας (Τσέτουρας, 2003).

Οι σακχαρομύκητες, ως ανθεκτικότεροι, επιζούν σε θερμοκρασίες τέτοιου επιπέδου. Η διαδικασία αυτή συμβάλλει και στην ταχύτερη διαδικασία ωρίμανσης του οίνου, ειδικά στην περίπτωση που ακολουθεί ψύξη. Οι υψηλές θερμοκρασίες εκκινούν την απομάκρυνση και καθίζηση των πρωτεϊνικών συστατικών του, διαδικασία που εξελίσσεται με τον ίδιο τρόπο και κατά τη φυσική ωρίμανση του οίνου (Βέκιος, Κούκης, & Τσακίρης, 1997).

Η θερμοκρασία παστερίωσης πρέπει να είναι χαμηλότερη των 70 °C, καθώς, σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες αλλοιώνονται τα γευστικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του οίνου (Τσέτουρας, 2003).

## 2.9 Λευκή οινοποίηση

Κατά την λευκή οινοποίηση απουσιάζει η διαδικασία εκχύλισης και χαρακτηριστικό της είναι ο διαχωρισμός του γλεύκους σε κλάσματα, όπως φαίνεται στην εικόνα 6. Πριν την ολοκλήρωση της διαδικασίας ωρίμανσης των σακχάρων, εμφανίζονται τα συστατικά που προσδίδουν τα αρώματα στο λευκό κρασί και βρίσκονται στην επιφάνεια του φλοιού και κάτω από αυτήν. Ειδικότερα, στις χώρες με θερμό κλίμα παράγονται πιο αρωματικά κρασιά, όταν η διαδικασία του τρύγου γίνει πρώιμα. Οι ταννίνες, που λειτουργούν προστατευτικά έναντι οξειδώσεων, δεν υπάρχουν στα λευκά γλεύκη, λόγος για τον οποίο απαιτείται η προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (Τσακίρης, 2017). Επίσης, απαιτείται ο διαχωρισμός γλεύκους και στέμφυλων πριν την έναρξη της ζυμωτικής διαδικασίας, για την ελαχιστοποίηση της εκχύλισης.

Περιπτώσεις, όπου είναι αναγκαία μερική εκχύλιση είναι αυτές της παραγωγής αρωματικών ποικιλιών οίνου. Η μερική εκχύλιση, υποβοηθά την παραλαβή των συστατικών αυτών από φλοιό της ράγας. Για την λευκή οινοποίηση κάθε στερεό συστατικό του γλεύκους, πρέπει να απομακρύνεται πριν από την διαδικασία της ζύμωσης, η οποία πρέπει να πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η διαδικασία της μηλογαλακτικής ζύμωσης αποφεύγεται στους λευκούς οίνους, προκειμένου η οξύτητα να προσδίδει τα απαιτούμενα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Τσέτουρας, 2003).

Στις περιπτώσεις παραγωγής ιδιαίτερα αρωματικών λευκών οίνων, όπου απαιτείται η ανάπτυξη φαινολικών ενώσεων, πραγματοποιείται η εκχύλιση των στέμφυλων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για την διαδικασία αυτή, μπορεί να προτιμηθεί η διαδικασία βαθιάς ψύξης, κατά την οποία τα σταφύλια ψύχονται σε βαθμούς κάτω του μηδενός, μέσω ενός ειδικού τούνελ, προτού προωθηθούν στο πιεστήριο. Η διαδικασία αυτή οδηγεί τα κύτταρα της ράγας των σταφυλιών σε διάρρηξή τους (Σουφλερός, 2015).



Εικόνα 6. Σχεδιάγραμμα λευκής οινοποίησης (Newwinesofgreece.com.)

## 2.10 Ερυθρή οινοποίηση

Για τους οίνους, που είναι απαραίτητη η διαδικασία παλαίωσης, χρησιμοποιούνται βαρέλια δρυός, στα οποία θα παραμείνουν για να ωριμάσουν για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Είναι γνωστό, ότι για τις περισσότερες ποικιλίες ερυθρών οίνων ισχύει αυτό, δηλαδή η παραμονή τους σε δρύινα βαρέλια βελτιώνει τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά.

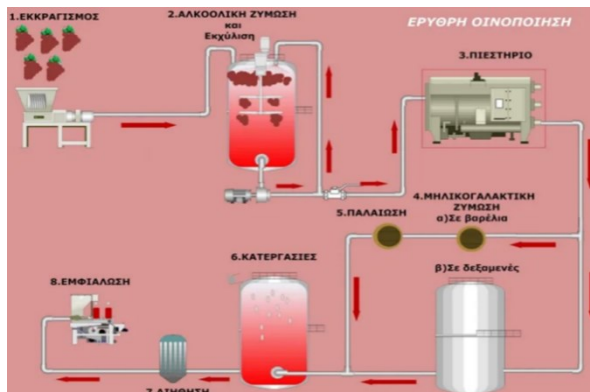
Οι συνθήκες στον ελλαδικό χώρο, ειδικά η μεγάλη διάρκεια ηλιοφάνειας, για το σταφύλι αυτό που στις ψυχρές χώρες εξασφαλίζεται με τη χρήση των βαρελιών (οξειδωτική φάση) (Θεοδοσίου, 1992).

Η ράγα των κόκκινων σταφυλιών είναι χρωματισμένη. Όπως ήδη αναφέρθηκε το χρώμα οφείλεται στις χρωστικές ουσίες που υπάρχουν στον φλοιό τους, ο σχηματισμός των οποίων συνδέεται άμεσα με τις συνθήκες ηλιοφάνειας και θερμοκρασίας (υψηλότερη σε σχέση με αυτήν που απαιτείται για να ωριμάσει το εσωτερικό της ράγας).

Σε αντίθεση με τα λευκά κρασιά, για την ερυθρή οινοποίηση σημαντικό ρόλο παίζει η διαδικασία της εκχύλισης, της παραλαβής δηλαδή, από τα στερεά μέρη του σταφυλιού, των συστατικών, γευστικών και αρωματικών, τα οποία καθορίζουν την ποιότητα του παραγόμενου οίνου. Μέσω του πιεστηρίου και της απολάσπωσης, παραλαμβάνονται μόνο τα επιθυμητά κλάσματα του γλεύκους και η ζύμωση πραγματοποιείται σε συνθήκες ψύξης.

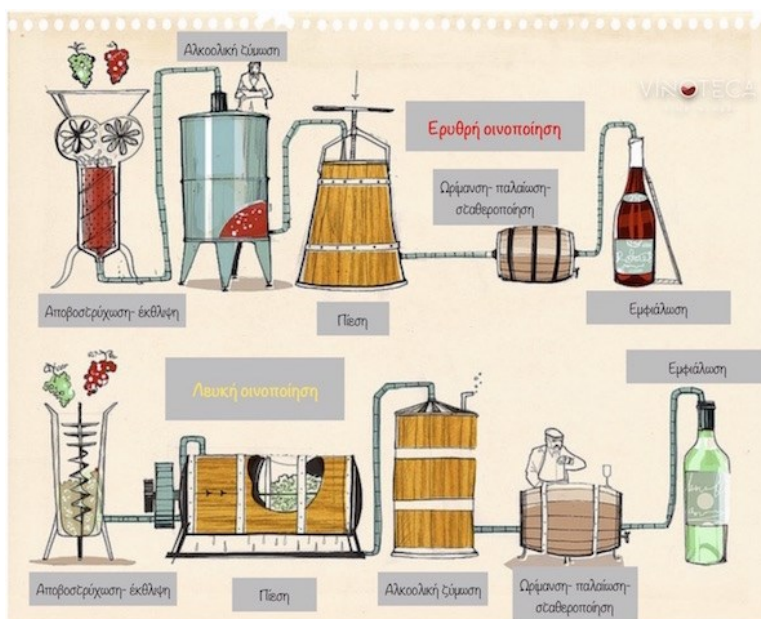
Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο ρόλος του φλοιού της ράγας είναι σημαντικός για την ποιότητα του παραγόμενου οίνου και εξαρτάται άμεσα από τις επικρατούσες κλιματολογικές συνθήκες (Σουφλερός, 2015).

Η πορεία ερυθρής οινοποιητικής διαδικασίας παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα 7.



Εικόνα 7. Σχεδιάγραμμα ερυθρής οινοποίησης (Newwinesofgreece.com.)

Η διαφοροποίηση της πορείας της διαδικασίας ερυθρής και λευκής οινοποίησης, παρατίθεται με απλό τρόπο στην παρακάτω εικόνα 8.



Εικόνα 8. Διαφοροποίηση διαδικασίας ερυθρής και λευκής οινοποίησης (Newwinesofgreece.com.)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΟΙΝΟΣ

### 3.1 Εισαγωγή στον οίνο

Ο οίνος είναι ένα ποτό που χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα, καθώς χιλιάδες είναι οι μεταβολίτες που αποτελούν τη σύστασή του, για την παραγωγή των οποίων δρα πληθώρα ζυμών και βακτηρίων κατά τη διαδικασία ζύμωσης του γλεύκους των σταφυλιών. Οι κοινότητες αυτές μικροβίων προέλευσης αμπελώνα και οινοποιείου, οι οποίες επηρεάζουν άμεσα τη γεύση αλλά και το άρωμα του οίνου, αντανακλούν πως επιδρούν διάφοροι παράγοντες στο παραγόμενο κρασί. Οι παράγοντες αυτοί είναι, οι ποικιλίες των σταφυλιών, η θέση (γεωγραφία, κλίμα), ο χρόνος και τρόπος των ψεκασμών και των τεχνολογικών πρακτικών, καθώς και τα στάδια επεξεργασίας, αλλά και η εποχή της προσυλλογής, συγκομιδής και μετασυλλογής. Μεγάλο είναι το ενδιαφέρον για αύξηση της ποικιλομορφίας της γεύσης του οίνου, με την παράλληλη ανάδειξη μικροβιακών πληθυσμών που ενισχύουν την τοπικότητα, μέσω της απομόνωσης και του χαρακτηρισμού των μικροβιακών κοινοτήτων ζυμών non-Saccharomyces (Varela & Borneman, 2017).

Ενδιαφέρει σημαντικά η ιδιότυπη έννοια της κομψότητας, ως χαρακτηριστικό που το χρησιμοποιούν επαγγελματίες και καταναλωτές του οίνου, και περιγράφει το αποσταγμένο ή αφρώδες κρασί ως ομαλό, ισορροπημένο, εκλεπτυσμένο και σύνθετο (Shepherd et al, 2023).

Πτητικές ενώσεις οργανικής σύστασης, αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για τα αρώματα του οίνου. Τέτοιου είδους ενώσεις είναι τα μονοτερπένια, τα σесκιτερπένια, τα C13-νορισοπρενοειδή, οι αλδεΐδες, οι εστέρες και οι θειόλες. Βρίσκονται σε μορφή ελεύθερων οσφρητικά ενεργών αρωματικών ενώσεων ή μη πτητικών γλυκοζυλιωμένων πρόδρομων ενώσεων (Lund and Bohlmann, 2006; Schwab and Wüst, 2015; Gutiérrez-Gamboa et al, 2019; Rienth et al., 2021, όπως αναφέρεται στους Lazazzara et al, 2021).

### 3.2 Συστατικά του οίνου

Ο οίνος χαρακτηρίζεται αλκοολούχο ποτό, το οποίο προκύπτει μέσω της διαδικασίας της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους. Το γλέυκος είναι το προϊόν των νωπών σταφυλιών. Το ποσοστό του νερού στο κρασί αγγίζει νούμερα μεταξύ του 80 έως 85%. Το ποσοστό των αλκοολών στο κρασί αγγίζει ποσοστά μεταξύ 9 και 15%. Εκτός νερού και αλκοολών, περιέχονται και άλλα συστατικά, όπως τα οργανικά (οργανικά οξέα, ενώσεις αρωματικές,

φαινολικές, αζωτούχες, σάκχαρα και πολυσακχαρίτες), τα ένζυμα (βιταμίνες και ανόργανα συστατικά), τα ανιόντα και τα κατιόντα. (π.χ.  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4$  κ.α.,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$  κ.λπ, αντίστοιχα) (Σουφλερός, 2015).

### 3.2.1 Το νερό

Η πυκνότητα του οίνου εξαρτάται άμεσα από το νερό που υπάρχει, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε μεγάλο ποσοστό. Η πυκνότητα της αλκοόλης είναι μικρή και εξισορροπείται από την πυκνότητα που έχουν τα βαρύτερα συστατικά του οίνου. Αποτέλεσμα αυτού του φαινομένου είναι η πυκνότητα του κρασιού να προσομοιάζει με την πυκνότητα του νερού (Σουφλερός, 2015).

### 3.2.2 Οργανικά οξέα

Ο ρόλος των οργανικών οξέων στα χαρακτηριστικά του οίνου χαρακτηρίζεται σημαντικός, καθώς από αυτά εξαρτώνται τα ιδιαίτερα γνωρίσματά του, όπως η αίσθηση της όξινης γεύσης και η ζωηρότητα στο χρώμα του, και η προστασία του από αλλοιώσεις, μικροβιολογικού και χημικού χαρακτήρα (Σουφλερός, 2015).

Στο γλεύκος περιέχονται οργανικά και ανόργανα οξέα, όπως και μεγάλη ποσότητα βάσεων. Η οξύτητα του οίνου οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία των ελεύθερων οργανικών οξέων που παραμένουν κατόπιν εξουδετέρωσης από τις βάσεις των ανόργανων οξέων και ποσότητας των οργανικών. Τα τελευταία ρυθμίζουν την ολική οξύτητα και το pH, επηρεάζοντας άμεσα την γευστική ισορροπία στους οίνους. Οι αλκοόλες, τα σάκχαρα, οι ταννίνες καθώς και άλλα συστατικά, πέρα από τα οξέα, επηρεάζουν την φαινομενική όξινη γεύση του οίνου (Σουφλερός, 2015).

Η ύπαρξη των οργανικών οξέων στον κρασί οφείλεται σε τρεις παράγοντες, αυτά που προέρχονται από το σταφύλι, αυτά που σχηματίζονται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και αυτά που υπάρχουν, λόγω μικροβιολογικών προσβολών του γλεύκους. Τα οξέα που προέρχονται από το σταφύλι είναι το τρυγικό, μηλικό, κιτρικό, γλυκονικό, οξαλικό, ασκορβικό κ.λπ. Από τις άλλες δύο περιπτώσεις παράγονται το ηλεκτρικό, το γαλακτικό, το κιτρομηλικό, το διμεθυλογλυκαρικό, το πυρουβικό, το ακετυλογλουταρικό, το οξικό, το μυρμηκικό, το προπιονικό, το ισοβουτυρικό, το βουτυρικό και άλλα (Castineira et al., 2002).

Από τα προαναφερόμενα οξέα, αυτά που είναι πολύ σημαντικά, για την ποιότητα του παραγόμενου οίνου είναι το κιτρικό το μηλικό και το τρυγικό οξύ. Για τον προσδιορισμό τους



χρησιμοποιούνται τεχνικές χρωματογραφίας, τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης συνδυαστικά με την φασματοφωτομετρία (Castineira et al., 2002).

Το τρυγικό οξύ, είναι χαρακτηριστικό του σταφυλίου καθώς δεν απαντάται συχνά στη φύση. Αναλογικά με άλλα οξέα, είναι ισχυρότερο και η ενεργή οξύτητα του οίνου είναι άμεσα, εξαρτώμενη από αυτό. Είναι ανθεκτικότερο του μηλικού και του κιτρικού οξέος, έναντι των μικροβιολογικών προσβολών, ενώ το ποσοστό του στο σταφύλι ακολουθεί καθοδική πορεία. Ο αλκοολομετρικός τίτλος του οίνου (% κατ' όγκο περιεκτικότητα σε αλκοόλη), η συγκέντρωση των ανόργανων ανιόντων, οι περιεκτικότητες μηλικού και γαλακτικού οξέος, οι θερμοκρασιακές συνθήκες στο περιβάλλον και η προσβολή του εξαιτίας οξυγαλακτικών βακτηρίων επηρεάζουν την εξέλιξη και την τελική συγκέντρωσή του. (Σουφλερός, 2015).

Στα βασικά μειονεκτήματα του τρυγικού οξέος, συγκαταλέγεται η παραγωγή τρυγικού ασβεστίου και τρυγικού καλίου, όταν συνδέεται με τα κατιόντα του οίνου, προκαλώντας έντονη θολότητα μετά την εμφιάλωση σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών. (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

Αντίθετα με το τρυγικό οξύ, το μηλικό βρίσκεται άφθονο στη φύση. Η αλκοολική και η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να έχουν επίδραση, μέσω της μεταβολής του στην ποιότητα του παραγόμενου οίνου. Η πραγματοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης, μέσω συνηθισμένων ζυμών, δεν επηρεάζει το μηλικό οξύ. Στην περίπτωση όμως π.χ. της ζύμης *Schizosaccharomyces pombe*, κατά την αλκοολική ζύμωση, μετατρέπεται το μηλικό οξύ σε αλκοόλη. Με την μηλογαλακτική ζύμωση μετατρέπεται το μηλικό οξύ σε γαλακτικό, φαινόμενο το οποίο συμβάλλει στην βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των ερυθρών οίνων υψηλής οξύτητας (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

Τα σταφύλια περιέχουν κιτρικό οξύ, το οποίο έχει ευεργετική επίδραση στην αποφυγή φαινομένων θολώματος, αλλά και στην βελτίωση της γευστικής ποιότητας του παραγόμενου οίνου και της ολικής του οξύτητας. Το συγκεκριμένο οξύ μπορεί να προστεθεί στο γλεύκος (Σουφλερός, 2015).

Όπως ήδη προαναφέρθηκε παρ' όλο που τα οξέα χαρακτηρίζονται από το δυσάρεστο άρωμά τους, συμβάλλουν στην αρωματική πολυπλοκότητα του παραγόμενου οίνου (Dubois, 1994).



### 3.2.3 Αλκοόλες

Οι αλκοόλες οι οποίες περιέχονται στον οίνο είναι οι απλές αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη), οι ανώτερες μονοαλκοόλες (προπανόλη, βουτανόλη κ.α.) και οι πολυαλκοόλες (γλυκερόλη, ινοσιτόλη και άλλες). Η σημαντικότερη από τις προαναφερόμενες αλκοόλες, είναι η αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη), η οποία αποτελεί το βασικό προϊόν που προκύπτει από τον μεταβολισμό των σακχάρων, και είναι σε περιεκτικότητα το επόμενο συστατικό μετά το νερό, ύψους 9 έως 15%. Με την περιεκτικότητα αυτή, ως κύριο οργανοληπτικό συστατικό του οίνου, επηρεάζει τη γεύση του, δίνοντας μια γλυκιά αίσθηση, εξισορροπώντας την όξινη γεύση που προσδίδουν τα οξέα. Επίσης χρησιμοποιείται με τη μορφή διαλύτη για τις αρωματικές ενώσεις. Το συστατικό του οίνου με την περισσότερη περιεκτικότητα είναι μετά το νερό η αιθυλική αλκοόλη, με ποσοστό από 9 έως 15 τοις εκατό. Επιπλέον, αυτή είναι το πιο σημαντικό οργανοληπτικό συστατικό, εφόσον δίνει την γλυκιά γεύση στον οίνο, που είναι αναγκαία, προκειμένου να εξισορροπήσει την όξινη γεύση που έχουν τα οξέα, ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιείται και σαν διαλύτης των αρωματικών ενώσεων. Η αλκοόλη, ως ποσοστό επί τοις εκατό κατ' όγκο, χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει την ποιότητα του παραγόμενου κρασιού και αναφέρεται με τον όρο «αλκοολικός τίτλος», ο οποίος επηρεάζει και τον τρόπο συντήρησής του (Τσακίρης, 2017).

Η μεθανόλη που είναι τοξική, παράγεται μέσω της διαδικασίας απομεθυλίωσης των πηκτινολυτικών και πτητικών ενζύμων. Η περιεκτικότητά της στον οίνο αυξάνεται, στη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης, παρουσία μονοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα και υψηλής θερμοκρασίας μεταξύ 30 έως και 35°C. Οι συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη της και τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της, εκτός της υψηλής θερμοκρασίας, είναι και σε τιμές pH σε τιμές από 4 έως 5, όπου δρουν τα πηκτινολυτικά ένζυμα. Ο οίνος, ο οποίος προέρχεται από υβρίδια, χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά περιεκτικότητας σε μεθανόλη. Στις περιπτώσεις χρήσης ενζύμων πηκτινολυτικού χαρακτήρα, ευνοείται η εμφάνιση της μεθανόλης. Η περιεκτικότητά της στα κρασιά διαφοροποιείται ανάλογα με το χρώμα τους. Κυμαίνεται μεταξύ 30 - 70 mg/L, 30 - 110 mg/L και 70 - 150 mg/L, στα λευκά κρασιά, τα ροζέ και τα ερυθρά, αντιστοίχως. Τα λευκά έχουν την μικρότερη ποσότητα, καθώς, απουσιάζει η διαδικασία της εκχύλισης (Τσακίρης, 2017).

### 3.2.4 Αρωματικές ενώσεις

Οι αρωματικές ουσίες και η περιεκτικότητά τους στον οίνο, είναι ελάχιστη, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η διαδικασία του προσδιορισμού τους. Αν και η συγκέντρωσή τους στον οίνο

είναι ελάχιστη, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του βαθμού του αρωματικού «μπουκέτου» του οίνου. Οι ανώτερες αλκοόλες και οι εστέρες είναι ο λόγος της ύπαρξης αυτών των αρωμάτων (Τσακίρης, 2017).

Παρ' όλο που οι ανώτερες αλκοόλες, όπως φαίνεται στην εικόνα 9, είναι υπεύθυνες για την ύπαρξη ανεπιθύμητων αρωμάτων στον οίνο είναι απαραίτητες, προκειμένου να επιτευχθεί η πολυπλοκότητα στο άρωμα των παραγόμενων οίνων, επειδή με την λειτουργία τους εξισορροπούνται τα ευχάριστα αρώματα άλλων συστατικών (Τσακίρης, 2017).

Επίσης σημαντική είναι η επίδραση και άλλων αρωματικών ενώσεων όπως αλδεΐδες, κετόνες, τερπένια, θειούχες ενώσεις, πτητικές φαινόλες, υδρογονάνθρακες, αρώματα της μηλογαλακτικής ζύμωσης κ.α. (Σουφλερός, 2015).

Οι εστέρες αποτελούν ενώσεις, μέσω των οποίων, αναπτύσσονται αρώματα φρούτων ή και λουλουδιών. Η συγκέντρωσή τους στον οίνο αυξάνεται και η συμβολή τους στον οργανοληπτικό χαρακτήρα των οίνων είναι πολύ σημαντική. Άλλες αρωματικές ενώσεις με εξίσου σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων είναι, οι αλδεΐδες, οι κετόνες, τα τερπένια, οι ενώσεις του θείου, οι πτητικές φαινόλες, οι υδρογονάνθρακες, τα αρώματα της μηλογαλακτικής ζύμωσης κ.λπ. (Σουφλερός, 2015).



Εικόνα 9. Αρώματα φρούτων ή λουλουδιών (Enologylab, 2015)

### 3.2.5 Σάκχαρα

Τα σάκχαρα είναι ενώσεις ετεροκυκλικού χαρακτήρα και θεωρούνται ως η πρώτη ύλη της διαδικασίας αλκοολικής ζύμωσης. Η περιεκτικότητά τους στους χυμούς που παράγονται από τα σταφύλια είναι σε μεγάλα ποσοστά. Το μεγαλύτερο ποσοστό τους μετατρέπεται μέσω της αλκοολικής ζύμωσης σε αλκοόλη. Τα σάκχαρα αποτελούνται από άτομα άνθρακα ασύμμετρης

μορφολογίας, διαφορετικών στερεοχημικών μορφών με αναλογία μεταξύ του 12 και 30% στο γλεύκος. Η αναλογία αυτή αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα για την εμπορική διάθεση του γλεύκους. Το γλεύκος αποτελείται από τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, ως βασικά σάκχαρά του, με αναλογία 1:1. (Τσέτουρας, 2003).

Η γλυκόζη χαρακτηρίζεται από λιγότερη σταθερότητα σε σχέση με τη φρουκτόζη. Αυτός είναι ο λόγος μεταβολισμού της από τις ζύμες. Στα κρασιά γλυκιάς γεύσης η γλυκόζη με τη φρουκτόζη έχουν αναλογία μικρότερη της μονάδας. Στις περιπτώσεις που η σχέση αυτή φτάνει στην μονάδα σημαίνει ότι προστέθηκε γλυκόζη (Τσέτουρας, 2003).

Τα σάκχαρα του οίνου είναι τα αναγωγικά και τα μη αναγωγικά. Στα αναγωγικά περιλαμβάνονται τα ζυμώσιμα και μη ζυμώσιμα, τα οποία είναι η γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη και η D-αραβινόζη, D-ξυλόζη, D-ριβόζη, L-ραμνóζη, αντίστοιχα. Στα μη αναγωγικά, μη ζυμώσιμα σάκχαρα ανήκουν η σακχαρόζη, η σταχυόζη και η ραφινόζη (Σουφλερός, 2015).

Άλλη διάκριση των σακχάρων γίνεται με βάση την περιεκτικότητά τους, οπότε χαρακτηρίζονται ξηρά, ημίξηρα, ημίγλυκα και γλυκά, με περιεκτικότητα ως εξής:  $\leq 2$  g/l, 2 - 18 g/l, 18 - 40 g/l,  $\geq 40$  g/l, αντίστοιχα (Πολίτης, 1997).

### 3.2.6 Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι ουσίες κολλοειδούς μορφής που υπάρχουν στον φλοιό των ραγών και παράγονται από τις ζύμες και τα βακτήρια. Οι ουσίες αυτές αποτελούνται από τις πηκτίνες και τα κόμμεα. Αυτά παράγονται λόγω του πολυμερισμού των πεντοζών (αραβινόζη, ραμνóζη, ξυλόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννóζη κ.α. Οι πολυσακχαρίτες, κατά τις διαδικασίες οινοποίησης και αλκοολικής ζύμωσης, διασπώνται σε ενζυματική μορφή και μετά την καθίζησή τους δημιουργούν ένα ίζημα ζελατινώδους υφής (Σουφλερός, 2015).

### 3.2.7 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν τα συστατικά εκείνα που ο οργανοληπτικός τους ρόλος είναι πολύ σημαντικός. Μέσω αυτών διαμορφώνεται το χρώμα του οίνου, καθώς και ο γευστικός του χαρακτήρας (στυφάδα, τραχύτητα) (Brouillard et al., 2003).

Παρά την ύπαρξη των σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών, δεν διευκρινίζεται απόλυτα η δομή τους. Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε φλαβονοειδείς και μη φλαβονοειδείς (φαινολικά οξέα). Στις φλαβονοειδείς ανήκουν οι ανθοκυάνες, οι φλαβονόλες, οι ταννίνες κ.λπ. (Τσακίρης, 2017).

Η ύπαρξη των φαινολικών συστατικών προσδίδει στον παραγόμενο ερυθρό οίνο το χρώμα, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του και το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της λιπαρότητας στη γεύση. Κατά το χρονικό διάστημα που πραγματοποιείται η παλαίωση, παρατηρείται μεταβολή του χρώματος, από την απόχρωση του ερυθροϊώδους στο ερυθρό. Η μεταβολή πραγματοποιείται με ταχύτητα η οποία εξαρτάται από τις συνθήκες με τις οποίες διατηρείται το κρασί και από το είδος του. Κατά τα πρώτα στάδια, γίνεται καθαρά ερυθρό και στο τελικό στάδιο γίνεται ερυθρό προς κεραμιδί. Η ταχύτητα αυτών των μεταβολών εξαρτάται, τόσο από το είδος του οίνου, όσο και από τις συνθήκες που συντηρείται. Ο χρόνος της διεξαγωγής του τρύγου, όπως και ο τρόπος της οινοποιητικής διαδικασίας των διάφορων ποικιλιών του οίνου, επηρεάζει τις ποσότητες των συστατικών αυτών. Το λευκό χρώμα στους οίνους οφείλεται στην παρουσία των πολυφαινολών, μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας οξείδωσής του (Τσακίρης, 2017).

Ο οίνος, ιδιαίτερα ο ερυθρός, λειτουργεί ευεργετικά στον οργανισμό γεγονός το οποίο αποδεδειγμένα αποδίδεται στις ενώσεις των πολυφαινολών. Οι αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των συστατικών αυτών βασίζονται στον αντιμικροβιακό, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτικό χαρακτήρα τους. Είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τις βιολογικές λειτουργίες και λειτουργούν προστατευτικά έναντι καρκινογένεσης, νεοπλασιών, γήρανσης των κυττάρων και καρδιακών διαταραχών (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Υποστηρίζεται, μέσω επιδημιολογικών μελετών, ότι μια ελάχιστη κατανάλωση οίνου καθημερινά, π.χ. ένα ποτήρι ημερησίως, συμβάλλει στην μείωση της θνησιμότητας εξαιτίας παθήσεων της καρδιάς (στεφανιαία νόσος) σε ικανό ποσοστό από 20 μέχρι 60 τοις εκατό, συγκριτικά με αυτούς τους ανθρώπους που δεν καταναλώνουν κρασί. Απόδειξη αυτού του φαινομένου, αποτελεί το ονομαζόμενο «γαλλικό παράδοξο». Ειδικότερα, οι κάτοικοι της νότιας Γαλλίας, ενώ καταναλώνουν αρκετά μεγάλες ποσότητες λιπαρών τροφών ταυτόχρονα με ερυθρό οίνο, δεν νοσούν συχνά λόγω καρδιαγγειακών παθήσεων, σε ποσοστό χαμηλότερο κατά 55% συγκριτικά με κατοίκους των ΗΠΑ που καταναλώνουν τροφές παρόμοιας σύστασης. (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

### **Μη φλαβονοειδείς φαινόλες**

Στην κατηγορία αυτήν περιλαμβάνονται τα φαινολικά οξέα ή αλλιώς φαινολοξέα τα οποία είναι μονομοριακά παράγωγα της φαινόλης και διακρίνονται στα στιλβένια, στα κινναμωμικά οξέα και στα βενζοϊκά οξέα (Σουφλερός, 2015).

Οι ουσίες αυτές απαντώνται στα χυμοτόπια, στα κύτταρα των φλοιών των ραγών και της σάρκας τους, με τη μορφή ετεροζιτών ή εστερών. Από ερευνητικές διαδικασίες προκύπτει ότι, το ποσοστό των μη φλαβονοειδών φαινολών είναι αυξημένο στη σάρκα των ραγών αντί στους φλοιούς τους. Η συγκέντρωση των φαινολών αυτών είναι αυξημένη στους οίνους ερυθρού χρώματος σε σχέση με τους λευκούς. Συγκεκριμένα, 100 - 200 mg/l στους ερυθρούς και 10 - 20 mg/l στους λευκούς (Σουφλερός, 2015).

Τα βενζοϊκά οξέα, δεν είναι σε ελεύθερη μορφή στη σταφυλή. Έχουν την μορφή χημικών ενώσεων σύνθετης σύστασης, όπου υπάρχουν οι ανθοκυάνες. Επίσης, αποτελούν τα βασικά συστατικά της δομής των ταννινών. Ειδικότερα, τα κινναμωμικά οξέα, όπως και τα βενζοϊκά δεν είναι σε ελεύθερη μορφή στη ράγα, αλλά έχουν τη μορφή ενώσεων μεταξύ ανθοκυανών και τρυγικού οξέος (Τσακίρης, 2017).

Τα στιλβένια, που αποτελούν την τρίτη κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολών, είναι ενώσεις στις οποίες υπάρχουν δύο βενζολικοί δακτύλιοι, που η σύνδεσή τους γίνεται, κατά κύριο λόγο, μέσω ενός αιθανίου ή πιθανότατα, μέσω μίας αιθυλενικής αλυσίδας. Την ρεσβερατόλη, η οποία αποτελεί ίσως την πιο σημαντική ένωση αυτής της κατηγορίας, την συναντάμε με την trans μορφή, παρόμοια με αυτή του παραγώγου της, της γλυκόζης. Είναι ευρέως αποδεκτό, ότι η ουσία αυτή έχει αντιθρομβωτικές, αντικαρκινικές και θεραπευτικές ιδιότητες, ενώ προφυλάσσει το σταφύλι από νόσους όπως ο *Botrytis cinerea* (Σουφλερός, 2015). Η αντιοξειδωτική της δράση αναστέλλει την πρωτεΐνη NF-κΒ, η οποία δρα προστατευτικά προς τα καρκινικά κύτταρα καταστρέφοντας τα θετικά της χημειοθεραπείας. Επίσης, προστατεύει από κυτταρικές φλεγμονές που οδηγούν σε αρθρίτιδες και άλλου είδους νόσους. Η ρεσβερατρόλη εκχυλίζεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης με συγκέντρωση, βάσει της ποικιλίας, από 1 έως 3 mg/l (Σουφλερός, 2015).

### **Φλαβονοειδείς φαινόλες**

Ο χαρακτηρισμός των φλαβονοειδών γίνεται, μέσω ενός βασικού σκελετού με δεκαπέντε άτομα άνθρακα. Στα φαινολικά συστατικά των σταφυλιών, ανήκουν οι φλαβονόλες οι φλαβανόνες, οι φλαβανονόλες, οι κατεχίνες, οι προκυανιδίνες, οι ανθοκυάνες και τέλος, οι ταννίνες που είναι τα παράγωγα του πολυμερισμού τους (Πολίτης, 1997).

Οι φλαβονόλες ή αλλιώς ανθοξανθίνες, εξαιτίας του κίτρινου ανοιχτού χρώματός τους, βρίσκονται μόνο στον φλοιό της ράγας, δηλαδή στις στιβάδες που έχει το υπόδερμα, με τη μορφή γλυκοζιτών, και στις ερυθρές και στις λευκές ποικιλίες σταφυλιών. Η περιεκτικότητα

σε φλαβονόλες είναι παρόμοια στις ερυθρές και στις λευκές ποικιλίες της αμπέλου, με σημαντικές διαφορές στην σύστασή τους, ποιοτικά. Επιπλέον, οι φλαβονόλες στις ερυθρές ποικιλίες των σταφυλιών είναι σε περιεκτικότητα από 10 έως 100 mg ανά kg στις ράγες, ενώ στην περίπτωση των λευκών οίνων, επειδή η διαδικασία οινοποίησης γίνεται απουσία των φλοιών, η περιεκτικότητά τους είναι από 1 έως 3 mg ανά L. (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

Οι φλαβονόλες είναι ενώσεις γλυκοζιτών και υπάρχουν στις λευκές ποικιλίες, και συγκεκριμένα στον φλοιό των ραγών και στους βοστρύχους. Τέτοιες ενώσεις, ανοιχτής κίτρινης απόχρωσης είναι η διυδροκερσετίνη και η διυδροκαμφερόλη. (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003).

Το 1910 επισημάνθηκε από τον Labode, η ύπαρξη άχρωων ουσιών και στα σταφύλια και στους οίνους. Οι ουσίες αυτές, μέσω διαδικασίας θέρμανσης, σε συνθήκες όξινου περιβάλλοντος, μετατρέπονται σε ανθοκυάνες. Η ταυτοποίηση της δομής τους οδήγησε στο συμπέρασμα, ότι είναι κατεχίνες, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους και παράγονται ενώσεις μεγαλύτερων μορίων, καθώς και προκυανιδίνες (Κουράκου -Δραγώνα, 1998). Αυτές αναπτύσσονται τόσο στους φλοιούς των ραγών όσο και στα γίγαρτά τους. Κατά την διαδικασία της ωρίμανσης και της παλαίωσης, ενώνονται μεταξύ τους και με άλλα μόρια, σχηματίζοντας πολυμερή που χαρακτηρίζονται από μεγάλο μοριακό βάρος. Αυτά τα πολυμερή είναι οι ταννίνες συμπυκνωμένης μορφής, οι οποίες διαφοροποιούνται από τις ανθοκυάνες ως προς τη μορφή τους, ενώ κατόπιν ένωσής τους με πολυσακχαρίτες των σταφυλιών, εκχυλίζονται με τη μορφή συμπλόκων κατά την διάρκεια της οινοποίησης. (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003)

Τα ποσοστά των κατεχινών και των προκυανιδίνων στα γίγαρτα των ραγών είναι μέσου όρου 65% και 56%, αντίστοιχα), ενώ στους βόστρυχες περίπου 20%. Ουσίες αυτής της σύστασης, δεν υπάρχουν στον παραγόμενο χυμό. Συμπέρασμα των προαναφερόμενων είναι ότι οι συμπυκνωμένες ενώσεις των ταννινών που δημιουργούνται αρχικά και είναι υπεύθυνες για τη δομή και την αντοχή των κόκκινων κρασιών, είναι στα γίγαρτα των ραγών (Proestos, 2004).

Οι ανθοκυάνες και οι ερυθρές χρωστικές, είναι η πιο σημαντική κατηγορία από τα φαινολικά συστατικά του αμπελιού. Στις ερυθρές χρωστικές οφείλονται οι αποχρώσεις του πορφυρού, ερυθρού, πορτοκαλί, κυανού ή ιώδους. Αυτά τα συστατικά συνδυασμένα με τις ταννίνες προσδίδουν στο κρασί διάφορες αποχρώσεις χρωμάτων (Rodriguez-Delgado et al., 2002).



Ο περκασμός είναι το στάδιο εμφάνισης των ανθοκυάνων. Με την εμφάνισή τους χάνεται η χλωροφύλλη των πράσινων καρπών και ξεκινά η διαδικασία χρωματισμού τους. Με την αύξηση της συγκέντρωσης των ανθοκυανών χρωματίζεται η σάρκα των ραγών με κατεύθυνση από τον φλοιό (επιδερμίδα) προς το εσωτερικό (Rodriguez-Delagdo et al., 2002).

Όταν πλησιάζει το πέρας της διαδικασίας ωρίμανσης οι ανθοκυάνες ακυλιωμένης μορφής αναπτύσσονται. Αυτή η μορφή ανθοκυανών είναι διαδεδομένη στη φύση. Στις ποικιλίες ερυθρής αμπέλου, τέτοιες μορφές είναι ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, ακυλιωμένος με οξικό οξύ και κυρίως το π-κουμαρικό οξύ. (Κουράκου- Δραγώνα, 1998).

Οι ταννίνες υπάρχουν σε διάφορα σημεία του σταφυλιού και σε διάφορα ποσοστά, με μεγαλύτερο ποσοστό στα γίγαρτα που αγγίζουν το 65%. Στους βόστρυχες, στους φλοιούς και στη σάρκα, αγγίζουν το 22 %, 12 % και 1 %, αντίστοιχα. Έχουν την ικανότητα να δίνουν ενώσεις, σταθερές, με τις πρωτεΐνες και με τους πολυσακχαρίτες, ενώ από χημικής απόψεως είναι μεγαλομόρια με φαινολικό δακτύλιο (Βέκιος, Κούκης, & Τσακίρης, 1997). Διαχωρίζονται οι ταννίνες γιγάρτων από αυτές του φλοιού, και διακρίνονται σε συμπυκνωμένες και υδρολυομένες. Αντίστοιχα παραδείγματα είναι οι ταννίνες της κατεχίνης και οι ταννίνες του γαλλικού οξέος. (Σουφλερός, 2015). Οι ταννίνες υδρολυομένης μορφής αποτελούνται από γλυκόζη και έχουν την ικανότητα προσκόλλησής τους στο γαλλικό και το ελλαγικό οξύ (φυσικές φαινόλες). Οι μορφές αυτές υπάρχουν ως εμπορικά συστατικά που χρησιμοποιούνται σε απαραίτητες διεργασίες και υπάρχουν σε αφθονία στο ξύλο δρυός. (Brouillard et al., 2003)

Οι ταννίνες είναι σε περιεκτικότητα στον ερυθρό οίνο, αναλόγως της ποικιλίας και των συνθηκών οινοποίησης από 1 έως και 4 g/L. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του οίνου σε ανθοκυάνες και ταννίνες είναι εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία, λόγω της διαφοροποίησης και της πολυπλοκότητάς τους (Brouillard et al., 2003).

Η έρευνα, κατόπιν επιδημιολογικών μελετών, αποκτά μεγάλο ενδιαφέρον για τα φλαβονοειδή των φυτικών πηγών, καθώς, τα οφέλη τους είναι ποικίλα για την υγεία των ανθρώπων και των φυτών και την μικροβιακή τους παραγωγή. Έχει αποδειχτεί η ωφέλειά τους, λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης τους, της ικανότητας απορρόφησης των ελευθέρων ριζών, της πρόληψης της στεφανιαίας νόσου, και της αντικαρκινικής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους (Kumar & Pandey, 2013).



### 3.2.8 Αζωτούχες ενώσεις

Το είκοσι τοις εκατό του ξηρού υπολείμματος του οίνου αποτελούν οι ενώσεις αζώτου. Οι αζωτούχες ενώσεις είναι οργανικές και ανόργανες. Οι οργανικές είναι οι πρωτεΐνες, τα πολυπεπίδια, τα αμινοξέα και τα αμίδια, ενώ οι ανόργανες βρίσκονται στο κρασί με την μορφή αλάτων αμμωνίας (Σουφλερός, 2015).

Η μορφή τους στον οίνο είναι σε ποσοστά 5% και 95% , ανόργανες και οργανικές, αντίστοιχα. Όσο διαρκεί η διαδικασία της ζύμωσης κάποια αμινοξέα μέσω μεταβολισμού τους μετατρέπονται σε ανώτερες αλκοόλες, χωρίς ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Σουφλερός, 2015).

Οι πρωτεΐνες που αποτελούν αζωτούχες ενώσεις, στα ερυθρά κρασιά, όταν ενώνονται με τις ταννίνες σχηματίζουν κροκίδες, οι οποίες στη συνέχεια καθιζάνουν με τη μορφή ιζήματος. Αντίθετα, στους λευκούς οίνους παραμένουν και προκαλούν έντονα θολώματα. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η αφαίρεσή τους με την προσθήκη μπεντονίτη (Νακοπούλου, 2005).

Κατά τη διαδικασία αλκοολικής ζύμωσης, το ανόργανο άζωτο χρησιμοποιείται από τις ζύμες. Αυτή η αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της περιεκτικότητάς του. Αντίστοιχα, τα βακτήρια χρησιμοποιούν το άζωτο που υπάρχει στα αμινοξέα. Όσο διαρκεί η μηλογαλακτική ζύμωση, παρατηρείται αύξηση της περιεκτικότητας σε ανόργανο άζωτο (Σουφλερός, 2015; Νακοπούλου, 2005).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΧΘΡΟΙ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ

### 4.1 Εισαγωγή

Η καλλιέργεια της αμπέλου στην Ελλάδα χρονολογείται από τα μέσα της 3<sup>ης</sup> χιλιετηρίδας π.Χ. Θεωρείται ότι είναι μία από τις δυναμικότερες καλλιέργειες στην ελληνική γεωργία. Οι συνθήκες που επικρατούν στη σημερινή εποχή της καλλιέργειάς της, είναι δύσκολες εξαιτίας διάφορων παραγόντων, μεταξύ αυτών η μικρή έκταση των αμπελοτεμαχίων, η περιορισμένη εκμηχάνιση και η ανησυχητική εξάπλωση των ασθενειών λόγω ιών (Ρούμπος, 2016).



Εικόνα 10. Κύριες ασθένειες αμπέλου (Λαμπρόπουλος, 2024)

Η αντιμετώπιση, ορθολογικά των ασθενειών αλλά και των εχθρών της αμπέλου είναι ένα περίπλοκο πρόβλημα, καθώς, απαιτεί έγκαιρη αναγνώριση των παθήσεων και τη λήψη των μέτρων που ενδείκνυνται, σωστά εφαρμοζόμενων, καθώς έχει και οικονομικό αντίκτυπο. Δυστυχώς, ο αυξανόμενος αριθμός των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, όπως τα μυκητοκτόνα, τα εντομοκτόνα, τα ακαρεοκτόνα, τα νηματωδοκτόνα κ.α. τα οποία κυκλοφορούν στο εμπόριο, δημιουργεί μεγαλύτερη αβεβαιότητα και σύγχυση, αναφορικά με την αποτελεσματική εφαρμογή των μέτρων (Ρούμπος, 2016).

Σήμερα, σε παγκόσμιο επίπεδο, έχει απομονωθεί μεγάλος αριθμός ιών της αμπέλου, περίπου 45. Επίσης, θεωρείται ότι και για άλλες δεκατρείς νόσους υπεύθυνος είναι παθογόνος ιός, ενώ κάποιες άλλες αποδίδονται σε ιοειδή και φυτοπλάσματα. Ο χαρακτηρισμός των ασθενειών, όπως φαίνεται στην εικόνα 10, γίνεται με τη χρησιμοποίηση διάφορων τεστ και με την αξιολόγηση των συμπτωμάτων, είτε στις καλλιεργούμενες ποικιλίες, είτε σε πιο ευαίσθητα φυτά, που αποτελούν δείκτες για την αξιολόγηση των ασθενειών αυτών (Ρούμπος, 2016).

Η εξάπλωση και μετάδοση των ιώσεων της αμπέλου γίνεται μέσω της χρήσης πολλαπλασιαστικού υλικού, εμβολιασμού, μετάδοσης από είδη νηματωδών, εντόμων, καθώς, και με άλλους τρόπους (Ρούμπος, 2016).

Η δυσκολία στην έγκαιρη διάγνωση των ιολογικών προσβολών της αμπέλου έχουν μεγάλη οικονομική επίπτωση. Π.χ. Λόγω μολυσματικού εκφυλισμού διαπιστώθηκαν απώλειες στους αμπελώνες της Ζακύνθου έως και 60 % (Ρούμπος, 2016).

Στις μεθόδους διάγνωσης των ασθενειών αναφέρονται τα εξωτερικά και εσωτερικά συμπτώματα, η μηχανική μετάδοση και ποώδη φυτά-δείκτες, ο εμβολιασμός σε φυτά-δείκτες αμπέλου, η ορολογική μέθοδος και μοριακές μέθοδοι (ανάλυση διπλόκλωνου RNA, νουκλεϊνικά διαγνωστικά, μέθοδος PCR, τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) (Ρούμπος, 2016).

## 4.2 Μολυσματικός εκφυλισμός

Από τις πιο διαδεδομένες ιολογικές ασθένειες της αμπέλου είναι ο μολυσματικός εκφυλισμός, που διαπιστώνεται σε αρκετές αμπελουργικές περιοχές της χώρας μας. Μέσω αυτής, προκαλείται μειωμένη παραγωγή και διάρκεια της ζωής της αμπέλου που θεωρείται αποδοτική. (Ρούμπος, 2016).

Διακρίνονται τρεις ιώσεις που εξαρτώνται από τη φυλή του ιού. Αυτές είναι, το ριπιδοειδές φύλλο (fanleaf), το κίτρινο μωσαϊκό (yellow mosaic) και ο περινεύριος μεταχρωματισμός (vein banding). Η πρώτη μορφή του ιού απαντάται σε ποσοστό περίπου 90 %, ενώ οι άλλες δύο μορφές, σε ποσοστό 10% των περιπτώσεων εμφάνισής της. (Ρούμπος, 2016).

Το παθογόνο αίτιο εμφάνισης της ασθένειας είναι το ριπιδωτό φύλλο (*grapevine fanleaf nepovirus-GFLV*), το οποίο ανήκει στην κατηγορία των NEPO ιών και διαθέτει χρωμογενείς και παραμορφωτικές φυλές. Παρόμοια συμπτώματα προκαλούνται και από άλλους ιούς της ίδιας κατηγορίας (Arabis mosaic, raspberry ring spot κ.α.). (Ρούμπος, 2016).

Στα συμπτώματα, περιλαμβάνεται η δημιουργία στις κληματίδες διπλών κόμβων, βραχυγονάτωσης (μεσογονάτια μικρά διαστήματα διάταξης ζικ-ζακ), ανισογονάτωσης (μεσογονάτια διαδοχικά μικρά και μεγάλα διαστήματα), δεσμίωσης και διχάλωσης. Επίσης, στα φύλλα παρατηρείται ασυμμετρία στο έλασμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 11, εμφάνιση μορφής ριπιδίου, αύξηση των νευρώσεων, μέχρι διπλασιασμού τους και άνοιγμα του μισχικού κόλπου. Στους βότρυς, παρατηρείται αραιορραγία, ανισορραγία, μικρορραγία, δεσμίωση του κεντρικού άξονα της ταξιανθίας και η εμφάνιση κορδονιών στους ξυλοποιημένους βλαστούς. (Ρούμπος, 2016).

Οι ποικιλίες που επηρεάζονται στη χώρα μας, με αυξανόμενη σειρά ευαισθησίας είναι ο σιδερίτης, το σαββατιανό, η κορινθιακή σταφίδα, το κέρινο, η σουλτανίνα και ροδίτης. (Ρούμπος, 2016).



Εικόνα 11. Μολυσματικός εκφυλισμός ([www.gaiapedia.gr](http://www.gaiapedia.gr)).

### 4.3 Κίτρινο Μωσαικό

Ειδικότερα, ο ιός του Arabis mosaic ευθύνεται ως νεοϊός, για την εμφάνιση της λοιμώδους εκφυλιστικής ασθένειας των αμπελιών στην Ευρώπη. Εμφανίστηκε αρχικά στην Ισπανία, το 2007, κατά την διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου, στην περιοχή Val de Salnés, και σε αμπέλια ηλικίας 25 ετών από την ποικιλία Albariño, τα οποία εμβολιάστηκαν σε άγνωστο υποκείμενο και εμφάνιζαν χαρακτηριστικό κιτρίνισμα στα φύλλα. Ακολούθησε δεύτερο εύρημα, την άνοιξη αυτή τη φορά, το έτος 2008 στην περιοχή Barriobusto της Rioja, σε αμπέλια ηλικίας 30 ετών της γνωστής ποικιλίας Tempranillo εμβολιασμένα σε 41B υποκείμενο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το φύλλωμα δεν παρουσίασε εμφανή συμπτώματα, όμως η καρπώδωση δεν επιτεύχθηκε σε ικανοποιητικό ποσοστό (Abelleira et al., 2010).

#### 4.3.1 Παθογόνο αίτιο

Κατά τη διάρκεια αναγνωριστικών μελετών το έτος 2007, πραγματοποιήθηκε τυχαία συλλογή μοσχευμάτων από αδρανές ξύλο και από μεμονωμένα αμπέλια ποικιλίας cv.Chardonnay, από δύο αμπελώνες ανατολικά της πολιτείας της Ουάσιγκτον και διαπιστώθηκε η ύπαρξη του προαναφερόμενου ιού. Από τα ξύσματα των καμβίων των συγκεκριμένων μοσχευμάτων εξετάστηκαν τα παραγόμενα εκχυλίσματα, για διαφορετικούς ιούς, με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (RT)-PCR σε σωλήνα, με τη χρήση ειδικών εκκινητών για τους ιούς. Από 31 αμπέλια ενός αμπελώνα βρέθηκαν θετικά για τον GLFV δύο (Mekuria, Martin & Naidu, 2008).

#### 4.4 Ίκτερος

Στη χώρα μας, ο ίκτερος παρατηρήθηκε πρώτη φορά το έτος 1971 σε περιοχή της Λάρισας. Αργότερα, παρατηρήθηκε σε αμπελώνες και άλλων περιοχών όπως η Μαγνησία, η Θεσσαλονίκη, τα Τρίκαλα, η Καβάλα, η Πελοπόννησος. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται ιδιόμορφη, καθώς, δεν εμφανίζεται κάθε χρόνο στα ίδια πρέμνα, λόγος για τον οποίο είναι δύσκολη η διάγνωσή της, ενώ θεωρείται βέβαιο ότι έχει εξαπλωθεί και σε άλλες περιοχές. Παρατηρήθηκε σε εύφορες αμπελοκαλλιέργειες, με σχολαστική εφαρμογή των ψεκαστικών προγραμμάτων για την καταπολέμηση των νόσων της αμπέλου. Δεν είναι γνωστός ο φορέας μετάδοσης και η ένταση εμφάνισης της ασθένειας διαφοροποιείται από χρονιά σε χρονιά (Ρούμπος, 2016).

Το παθογόνο αίτιο του ίκτερου είναι το φυτόπλασμα. Το φυτόπλασμα, είναι ένα σύνολο μικροοργανισμών που μοιάζουν με τα μυκοπλάσματα, τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για την εκδήλωση διάφορων ασθενειών στον άνθρωπο και στα ζώα. Το φυτόπλασμα, που είναι υπεύθυνο για την ασθένεια στη χώρα μας ανήκει στην ομάδα 16Sr-XIIA,F,G (Ρούμπος, 2016).

Τα συμπτώματα εμφανίζονται αρχικά στα φύλλα που βρίσκονται στη βάση της κληματίδας, τα οποία χάνουν το πράσινο χρώμα τους και εμφανίζουν μία λάμψη μεταλλική η οποία μεταβάλλεται σε χρυσοκίτρινη απόχρωση, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η ελλιπής ωρίμανση των κληματίδων στις οποίες εμφανίζονται μελανές φλύκταινες. Τα πρέμνα που έχουν προσβληθεί εμφανίζουν ελάχιστες ή καθόλου ταξιανθίες (Ρούμπος, 2016).

Σήμερα, η ασθένεια εξαπλώνεται περιορισμένα και οι επιπτώσεις της στην οικονομία χαρακτηρίζονται ασήμαντες, ενώ προσβάλλονται οι ποικιλίες ραζακί και ροδίτης (Ρούμπος, 2016).

#### 4.5 Βοθρίωση του κορμού

Σύμφωνα με τον Ρούμπο (2016), η βοθρίωση είναι ασθένεια η οποία έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως. Ειδικά στη χώρα μας, προσβάλλει τις ποικιλίες ραζακί, ροδίτης, σουλτανίνα. Η ασθένεια παρατηρείται σε φυτά νεαρά εμβολιασμένα, μεταξύ 4 έως 10 ετών, αλλά και μεγαλύτερα 25 έως 30 ετών. Η ασθένεια είναι σύμπλοκη και εμφανίζεται με τέσσερις διαφορετικές μορφές, της βοθρίωσης του κορμού *rupestris*, της αυλάκωσης του κορμού *Kober*,

της αυλάκωσης του κορμού LN33, του φελλώδους φλοιού, οι οποίες οφείλονται στους ιούς *grapevine rupestris stem pitting associated virus 1*, *grapevine virus A*, *LN33 stem grooving* και *grapevine virus B*.

Εκδηλώνεται με μειωμένη ανάπτυξη των πρέμνων, αδύνατες κληματίδες, ενώ είναι αρκετές οι περιπτώσεις που δεν αναπτύσσονται βότρυς. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της νόσου, είναι η εμφάνιση αυλακώσεων και βοθρίων στον φλοιό του ξύλου, εξωτερικά και εσωτερικά, όπως φαίνεται στην εικόνα 12. Η εκδήλωσή τους εξαρτάται από την ευαισθησία της ποικιλίας, τον συνδυασμό εμβολίου – υποκειμένου, κ.α. (Ρούμπος, 2016).



Εικόνα 12. Βοθρίωση του κορμού (Novagreen A.E., 2019)

#### 4.6 Συστροφή του φύλλου

Η ασθένεια της συστρόφης των φύλλων της αμπέλου, θεωρείται από τις πιο διαδεδομένες στις χώρες που είναι ανεπτυγμένη η αμπελοκαλλιέργεια. Έχει ως αποτελέσματα, τη μειωμένη παραγωγή και την υποβαθμισμένη ποιότητα. Τα πρέμνα που έχουν προσβληθεί, παρουσιάζουν ελαχιστοποίηση της δυναμικότητάς τους, η οποία εκδηλώνεται με αντίστοιχη μείωση στον αριθμό και στο μέγεθος των βοτρυών (Ρούμπος, 2016).

Η νόσος αυτή οφείλεται στους ιούς, που ανήκουν στην οικογένεια *Closteroviridae*, και οι οποίοι είναι τουλάχιστον δέκα. Στην ελληνική επικράτεια κυριαρχούν οι ιοί 1 και 3 του γένους *Ampelovirus*, και μεταδίδεται, μέσω του πολλαπλασιαστικού υλικού σε μεγάλες αποστάσεις. Τα συμπτώματά της υπάρχουν και σε άλλες ασθένειες και για το λόγο αυτό μπορεί να προκληθεί σύγχυση. Η εκδήλωσή τους επηρεάζεται από παράγοντες όπως της φυλής του ιού, της ποικιλίας της αμπέλου, του περιβάλλοντος και της εποχής του έτους. Στις λευκές ποικιλίες χαρακτηριστική είναι η ελαφριά χλώρωση μεταξύ των νευρώσεων, ενώ στις ερυθρές το χρώμα στην επιφάνεια του ελάσματος μεταβάλλεται σε σκοτεινό ερυθρωπό. Οι βότρυες είναι λίγοι



και μικρού μεγέθους, με μικρή περιεκτικότητα σακχάρων. Ειδικότερα στις ερυθρές ποικιλίες, χαρακτηριστικός είναι ο ανομοιόμορφος χρωματισμός των ραγών. (Ρούμπος, 2016).

#### 4.7 Κηλίδωση

Ως παράδειγμα της ασθένειας αυτής, αναφέρεται η περίπτωση αμπελιών στην Κίνα, όταν εμφανίσθηκε μία μυκητολογικού χαρακτήρα ασθένεια, με χαρακτηριστικές κηλίδες μαύρου χρώματος και μικρού μεγέθους. Προκλήθηκε ξήρανση της αμπέλου με ταχύ ρυθμό και επηρεάστηκε άμεσα η ποιότητα των καρπών της (Wang et al., 2023).

Πρόκειται για μία ασθένεια παγκοσμίως γνωστή. Παθογόνο αίτιο της ασθένειας είναι ο ιός που ονομάζεται κηλίδωση της αμπέλου. Η ασθένεια έχει ως επίπτωση τη μειωμένη ριζογένεση. Τα συμπτώματα είναι παρόμοια με αυτά του μολυσματικού εκφυλισμού. Εμφανίζονται κηλίδες σε φύλλα νεαρής και μέσης ηλικίας και στην περίπτωση μεγάλου αριθμού παρατηρείται συστροφή στα φύλλα με κατεύθυνση προς τα πάνω (Ρούμπος, 2016).

#### 4.8 Νέκρωση των νεύρων

Το παθογόνο της ασθένειας αυτής, πιθανώς, είναι ιός που όμως δεν έχει απομονωθεί και ενδέχεται να ανήκει στην κατηγορία των μυκοπλασμάτων. Η ασθένεια ανακαλύφθηκε στην Γαλλία, είναι γνωστή παγκοσμίως, και επιδρά αρνητικά στην απόδοση των αμπελιών με οικονομικές επιπτώσεις. Στην Ελλάδα, διαπιστώθηκε σε φυτώρια αμερικάνικων υποκείμενων και σε ποικιλίες ευρωπαϊκές (Ρούμπος, 2016).

#### 4.9 Νεοπλασίες

Ευρωπαϊκές και αμερικάνικες ποικιλίες προσβάλλονται από την ασθένεια αυτή, που όπως σε διάφορες χώρες, έτσι διαπιστώθηκε και στην χώρα μας. Διαπιστώνεται, σε ποικιλίες Ραζακί της Κρήτης, Μοσχάτο Αλεξανδρείας Λήμνου και Μαύρο Ναούσης στη Θεσσαλία. Τα φυτά που έχουν προσβληθεί βλαστάνουν με καθυστέρηση την άνοιξη και η ανάπτυξή τους είναι μειωμένη. Εμφανίζονται νεοπλασίες, διαφόρων σχημάτων, στην επιφάνεια κάτω από τα φύλλα στη βάση των κληματίδων. Επίσης, στη βάση των κληματίδων παρατηρούνται συμπτώματα (διπλοί κόμβοι, βραχεία μεσογονάτια διαστήματα), παρόμοια με αυτά του μολυσματικού



εκφυλισμού. Υποστηρίζεται από κάποιους συγγραφείς ότι για την ασθένεια ευθύνεται μία ειδική φυλή του μολυσματικού εκφυλισμού (Ρούμπος, 2016).

#### 4.10 Φελλώδης φλοιός

Για την διάγνωση αυτής της ασθένειας χρησιμοποιείται ο δείκτης LN-33. Στο υβρίδιο LN-33 παρατηρείται δημιουργία σπογγώδους φλοιού στη βάση των κληματίδων με επιμήκεις σχισμές. Έντονη βοθρίωση εμφανίζεται μετά την αφαίρεση του φλοιού. Ειδικότερα στις κόκκινες ποικιλίες, τα φύλλα αποκτούν ερυθρωπή απόχρωση το καλοκαίρι. Παρόμοια συμπτώματα εμφανίζονται και σε άλλες ιώσεις (Ρούμπος, 2016).

#### 4.11 Μεταχρωματισμός των φύλλων του Ροδίτη

Η ασθένεια αυτή παρατηρήθηκε μόνο στη συγκεκριμένη ποικιλία, από την οποία πήρε και το όνομά της. Τα σταφύλια που παράγονται έχουν χαρακτηριστικά μικρές ράγες με πολύ μικρή εμπορική αξία. Παρατηρήθηκε το 1981 στην χώρα μας, σε αμπελοκαλλιέργειες στην Νέα Αγχίαλο Βόλου. Παράγονται κληματίδες άριστης ποιότητας από τα ασθενή πρέμνα. Το γεγονός αυτό, ευνοεί την ασθένεια και την μετάδοσή της. Τα κύρια χαρακτηριστικά της είναι η ποικιλία μεταχρωματισμών στα φύλλα και η παραμόρφωση του σχήματός τους. Η έναρξη των συμπτωμάτων ξεκινά τους θερινούς μήνες και τους φθινοπωρινούς γίνονται ευδιάκριτα. Ο εντοπισμός γίνεται στα φύλλα νεαρής ηλικίας στην κορυφή των βλαστών ή των πλάγιων βλαστών (Ρούμπος, 2016).

Η ασθένεια σχετίζεται με τον ιό A της αμπέλου και τους ιούς 1 και 3, που είναι υπεύθυνοι για το καρούλιασμα των φύλλων. Μέσω σύγχρονων τεχνολογιών αλληλούχισης νέας γενιάς διαπιστώθηκε η παρουσία του ιού του γένους Badnavirus (Ρούμπος, 2016).

#### 4.12 Φυλλορροή της αμπέλου

Η φυλλορροή της αμπέλου (Grapevine leafroll disease, GLD), θεωρείται από τις ιώσεις της αμπέλου, που είναι επιζήμιες οικονομικά, και οφείλεται στους ιούς 1 και 3 *Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)*, και *Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)*, αντίστοιχα (Reynard et al., 2022).

#### 4.13 Κίτρινη διάστιξη της αμπέλου

Παθογόνο αίτιο της ασθένειας είναι το ιοειδές. Τα ιοειδή, αποτελούνται από μία σειρά DNA μήκους 240 έως 376 νουκλεοτιδίων, και θεωρούνται παθογόνα διάφορων ασθενειών στα φυτά. Δύο από τα έξι ιοειδή της αμπέλου, είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση των συμπτωμάτων της κίτρινης διάστιξης. Βρίσκονται συχνά στον ξενιστή σε κατάσταση λανθάνουσα, γι' αυτό και δεν προκαλούν συμπτώματα. Η εκδήλωσή τους είναι συνάρτηση της ποικιλίας και των κλιματολογικών συνθηκών. Επηρεάζονται οι νευρώσεις, στις οποίες εμφανίζεται κιτρινωπός μεταχρωματισμός. Η μετάδοση της ασθένειας, γίνεται με εμβολιασμό και με τα μηχανικά εργαλεία, που χρησιμοποιούνται στο κλάδεμα (Ρούμπος, 2016).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΚΑΙ ΤΟ ΑΜΠΕΛΙ

### 5.1 Εισαγωγή

Η άμπελος, λόγω του εξαιρετικά μεγάλου αριθμού των ειδών και των ποικιλιών της, χαρακτηρίζεται γενετικά ποικιλόμορφη. Επίσης, υπάρχει πολύ μεγάλη διασπορά της, γεωγραφικά, σε συνθήκες διαφορετικών εδαφοκλιματικών περιβάλλοντων. Τα δεδομένα αυτά, σε συνάρτηση με την εντατικοποίηση της καλλιέργειας, δημιούργησαν περιβάλλον ευνοϊκό για την ανάπτυξη ασθενειών και την προσβολή της, από πλήθος παθογόνων. Σ' αυτούς, ανήκουν οι μύκητες, οι ιοί, τα έντομα, τα ακάρεα και οι νηματώδεις (Σταυρακάκης, 2016).

Τα παθογόνα επιφέρουν βιοτικές καταπονήσεις στην άμπελο, με άμεσες επιπτώσεις στην ανάπτυξη του φυτού, στην παραγωγή και την ποιότητα των καρπών. Οι καταπονήσεις αυτές, προέρχονται από τους μύκητες, τους ωομύκητες, τους προκαρυώτες, τα αρθρόποδα, τους νηματώδεις και τους ιούς (Ferrandino and Lovisolo, 2014; Armijo et al., 2016, όπως αναφέρεται στους Lazazzara et al., 2021).

Κάθε χρόνο σημειώνονται ζημιές στην αμπελοκαλλιέργεια, λόγω των μυκητολογικών ασθενειών, οι οποίες είναι σημαντικές, συγκριτικά με αυτές που προκαλούνται λόγω των ασθενειών και των εχθρών της αμπέλου (Ρούμπος, 2016).

Σήμερα στο εμπόριο υπάρχουν κατάλληλα μυκητοκτόνα σκευάσματα, που έχουν θεραπευτικές ιδιότητες, και μέσω της εφαρμογής εντατικών προγραμμάτων για την καταπολέμησή τους, περιόρισε σημαντικά τη σημασία τους.

Δυστυχώς όμως, για τον έλεγχο των παθογόνων στην άμπελο, χρησιμοποιούνται συχνά χημικά μυκητοκτόνα με άμεση επίπτωση στο περιβάλλον, δημιουργώντας συνθήκες τοξικότητάς του (Gessler et al., 2011; Buonassisi et al., 2017, όπως αναφέρεται στους Lazazzara et al., 2021).

### 5.2 Μυκητολογικές ασθένειες

#### 5.2.1 Περονόσπορος

Ο περονόσπορος, ως η πιο καταστρεπτική ασθένεια της αμπέλου, συνέδεσε το όνομά του με τεράστιες καταστροφές για τον ελληνικό αμπελώνα από το έτος 1881, οπότε και εντοπίστηκε στη Μεσσηνία για πρώτη φορά. Οφείλεται στον φυκομύκητα *Plasmopara viticola*, ο οποίος

εμφανίζει ουσιαστικές διαφορές συγκριτικά με τους πραγματικούς μύκητες, όπως το γεγονός ότι τα κυτταρικά τοιχώματά του αποτελούνται από κυτταρίνη, τα κύτταρά του έχουν διπλοειδείς πυρήνες και το μυκήλιο του είναι κοινοκύτταρο, λόγος για τον οποίο κατατάσσεται στους ωομύκητες (Σταυρακάκης, 2016).

Υπάρχουν δύο είδη αναπαραγωγικών οργάνων που σχηματίζονται από αυτό το παθογόνο, τα εγγενή και τα αγενή. Τα εγγενή σπόρια, σχηματίζονται στο εσωτερικό των ιστών των φύλλων του αμπελιού και ονομάζονται ωοσπόρια. Τα ωοσπόρια αποτελούν τα όργανα που συμβάλλουν στην διατήρηση του παθογόνου, κατά την περίοδο του χειμώνα. Κατά την διάρκεια της φυλλόπτωσης τα ωοσπόρια, που είναι ανθεκτικά, διατηρούνται στα υπολείμματά τους και στα εδάφη για περίοδο ενός έως τριών ετών. Σε νότιες περιοχές της χώρας μας, το παθογόνο αυτό δύναται να διατηρηθεί με τη μορφή του μυκηλίου στα φύλλα, που διατηρούν το πράσινο χρώμα τους, κατά τη χειμερινή περίοδο (Σταυρακάκης, 2016).

Τα πράσινα όργανα που υπάρχουν στο πρέμνο, στα φύλλα, στους βλαστούς, στις ταξιανθίες και στις σταφυλές προσβάλλονται από το συγκεκριμένο παθογόνο. Παρατηρούνται στα φύλλα κηλίδες κιτρινοπράσινου χρώματος γνωστές με το όνομα «κηλίδες ελαίου», οι οποίες όταν δεν αντιμετωπίζονται έγκαιρα, εξαπλώνονται στο σύνολο του ελάσματος. Κάτω από την επιφάνειά του, οι καρποφορίες του συγκεκριμένου παθογόνου έχουν τη μορφή λευκού επιχρίσματος. Οι κηλίδες με την πάροδο του χρόνου αποκτούν χρώμα καστανό και στη συνέχεια νεκρώνονται. Διαπιστώνεται, το φαινόμενο της έντονης και πρόωμης φυλλόπτωσης στις περιπτώσεις μεγάλων προσβολών. Το γεγονός αυτό έχει άμεση επίπτωση στην ταχύτητα της φωτοσύνθεσης. Επίσης, επηρεάζεται η θρέψη των σταφυλών και η ωρίμανσή τους, η οποία καθυστερεί. Παρατηρείται πλημμελής αποθησαυρισμός και αυξημένη ευπάθεια των κληματίδων, σε συνθήκες ψύχους, με προβλήματα εκβλάστησης την αμέσως επόμενη περίοδο (Σταυρακάκης, 2016).

Σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, μπορεί να προσβληθούν οι ταξιανθίες και οι σταφυλές. Ανάλογα με τον χρόνο που εμφανίζεται η προσβολή τους, πραγματοποιείται ανθόρροια ή το φαινόμενο της καρπόπτωσης. Όταν οι προσβολές είναι σημαντικού βαθμού, υπάρχει πλήρης καταστροφή της ταξιανθίας (Σταυρακάκης, 2016).

Μετά το στάδιο καρπόδεσης και έως την έναρξη της ωρίμανσης, οι ράγες είναι ευπαθείς στη δράση του παθογόνου. Σε αρχικά στάδια προσβολής, οι ράγες αποκτούν καφέ χρώμα, όπως

φαίνεται στην εικόνα 13, και συνδυαστικά με τις καρποφορίες του παθογόνου αποκτούν απόχρωση ανοιχτοκάστανη (Σταυρακάκης, 2016).

Ο περονόσπορος έχει αμερικανική προέλευση. Αυτός είναι ο λόγος που οι ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου προσβάλλονται εύκολα. Οι ελληνικές ποικιλίες που παρουσιάζουν υψηλή ευπάθεια στην ασθένεια είναι η Σουλτανίνα, η Μαλαγουζιά, το Αγιωργίτικο, το Ραζακί και το ξινόμαυρο. Το Σαββατιανό θεωρείται ανθεκτικό (Σταυρακάκης, 2016).

Για την καταπολέμησή του πραγματοποιούνται ψεκασμοί οι οποίοι σχετίζονται, άμεσα, με την περιοχή, τις μετεωρολογικές συνθήκες και τις καλλιεργούμενες ποικιλίες. Οι επεμβάσεις πρέπει να γίνουν σε κρίσιμα φαινολογικά στάδια, τα οποία είναι τέσσερα. Το πρώτο αφορά την εμφάνιση και την ανάπτυξη των έξι πρώτων φύλλων, το δεύτερο τον χρόνο εμφάνισης των ταξιανθιών, το τρίτο την περίοδο πριν την άνθιση και το τέταρτο μετά την καρπόδεση, Ε, F, Η, J, αντίστοιχα. Οι πρώτοι ψεκασμοί, θα πρέπει να γίνονται, χωρίς την χρήση χαλκούχων σκευασμάτων, καθώς, παρατηρείται ανάσχεση του ρυθμού της αύξησης των βλαστών και ανθόρροια (Σταυρακάκης, 2016).



Εικόνα 13. Περονόσπορος (<http://www.agro24.gr/agrotika>)

### 5.2.2 Ωίδιο

Για την ασθένεια αυτή, υπεύθυνος είναι ο μύκητας *Erysiphe necator* (*Uncinula necator*). Είναι ευρέως γνωστή και με άλλες ονομασίες, όπως η χολέρα και η θειαφασθένεια και μεταφέρθηκε από την Βόρεια Αμερική, το έτος 1845, στην Ευρώπη, έχοντας προκαλέσει από τότε καταστροφές σημαντικού βαθμού. Θεωρείται η πιο καταστροφική μυκητολογική ασθένεια, για την άμπελο, σε αρκετές περιοχές αμπελοκαλλιεργειών στη χώρα. Αυτό συμβαίνει, καθώς, για την ανάπτυξή της και την μόλυνση της αμπέλου αρκεί η ύπαρξη σχετικής υγρασίας, σε ποσοστό 40%, που υπάρχει στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, λόγω του φαινομένου της διαπνοής. Αυτό συμβαίνει, ακόμα και σε συνθήκες ξηρασίας (Pearson & Gohhen, 1988).

Συνθήκες ευνοϊκές, προκειμένου να αναπτυχθεί ο μύκητας και να μεγιστοποιηθεί η προσβολή της αμπέλου, είναι ποσοστό της τάξης του 80 – 85 % σχετική υγρασία και θερμοκρασία περιβάλλοντος περίπου 25 °C, καθώς οι μεγαλύτερες θερμοκρασίες είναι περιοριστικές. Επίσης, βροχοπτώσεις με ένταση παρασύροντας τα κονίδια της ασθένειας στο έδαφος, περιορίζουν την εξάπλωσή του (Σταυρακάκης, 2016).

Τα φύλλα, οι βλαστοί οι ταξιανθίες και οι σταφυλές, που αποτελούν τα πράσινα μέρη του πρέμνου, προσβάλλονται από τον μύκητα. Συμπτώματα στα φύλλα εμφανίζονται στο έλασμα και στις δύο επιφάνειές του, έχοντας τη μορφή σκόνης λευκής η γκρίζας απόχρωσης ή μορφή κηλίδων με ανοιχτό πράσινο χρώμα. Η διάκριση στα συμπτώματα γίνεται εύκολα, καθώς, στην περίπτωση της ασθένειας του ωίδιου στην κάτω επιφάνεια στο έλασμα, εμφανίζεται δίχτυ σαν τον ιστό της αράχνης (Σταυρακάκης, 2016).

Ακανόνιστες καστανομέλανες κηλίδες εμφανίζονται στους νεαρούς βλαστούς. Η προσβολή των ραγών είναι πιο καταστροφική από τις προσβολές που διαπιστώνονται προ της άνθισης και αμέσως μετά την διαδικασία της καρπόδεσης. Κατά το στάδιο της άνθησης και της καρπόδεσης, εμφανίζεται το φαινόμενο της ανθόρροιας και οι μικρές ράγες πέφτουν. Σε επόμενο στάδιο νεκρώνονται τα κύτταρα του φλοιού, ενώ τα κύτταρα της σάρκας συνεχίζουν τη διαίρεση και προκαλούνται πολλές σχισμές στον φλοιό. Από τα σημεία αυτά, εισέρχονται τα μυκήλια του βοτρυτή (Σταυρακάκης, 2016).

Οι ευρωπαϊκές ποικιλίες αμπέλου παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευπάθεια, σε σχέση με αυτές τις των αμερικανικών ποικιλιών. Από τις καλλιεργούμενες ποικιλίες, μεγάλη ευπάθεια παρουσιάζει η ποικιλία Μαλαγουζιά, Λευκό Μοσχάτο, Αγιωργίτικο, Ξινόμαυρο κ.α. Εξαιρετική ευπάθεια παρουσιάζεται στις ποικιλίες Chardonnay και Cabernet Sauvignon (Σταυρακάκης, 2016).

Το ωίδιο προκαλεί ζημιές, που χαρακτηρίζονται ποιοτικά και ποσοτικά σημαντικές, καθώς, η παραγωγή μειώνεται λόγω της ανθόρροιας, της καρπόπτωσης, της ξήρανσης στο ποσοστό της φυλλικής επιφάνειας. Ιδιαίτερα υποβάθμιση της ποιότητας παρατηρείται στις ερυθρές ποικιλίες, καθώς, οι ράγες δεν έχουν φυσιολογικό χρώμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 14, και κατά τη διαδικασία οινοποίησής τους, τα γλεύκη δεν ζυμώνονται με επιτυχία (Σταυρακάκης, 2016).

Οι τρόποι φυτοπροστασίας είναι προληπτικοί και θεραπευτικοί. Οι επεμβάσεις πρέπει να ξεκινούν νωρίς, όταν το μήκος του νεαρού βλαστού έχει μήκος περίπου 10 εκ., στη συνέχεια



κατά την άνθιση και ακολούθως ανά δέκα ή δεκαπέντε ημέρες, δύο με τρεις φορές, με τη χρήση κατάλληλων μυκητοκτόνων, σύμφωνα με την εξέλιξη της ασθένειας (Σταυρακάκης, 2016).

Η εφαρμογή εντατικών προγραμμάτων ψεκασμών είναι συχνή, προκειμένου να ελεγχθεί η ασθένεια (Kunova et al., 2021)

Για να προληφθεί η διάχυτη μόλυνση απαιτείται η επέκταση της μυκητοκτόνου προστασίας των φρούτων στη μόλυνση (Gadoury et al., 2007).

Δυστυχώς όμως, εμφανίζονται και εξαπλώνονται νέα στελέχη ωιδίου, τα οποία είναι εξαιρετικά ανθεκτικά σε διάφορα είδη μυκητοκτόνων (Kunova et al., 2021).



Εικόνα 14. Ωίδιο (Pearson, R. C., & Goheen, A. C. 1988).

### 5.2.3 Βοτρύτης

Μία από τις πιο καταστρεπτικές μυκητολογικές ασθένειες της αμπέλου, προκαλείται από τον μύκητα *Botrytis cinerea*. Η ασθένεια αυτή, είναι γνωστή με το όνομα τεφρά σήψη και προκαλεί ποιοτικές και ποσοτικές ζημιές στην παραγωγή. Η εμφάνισή της, οφείλεται και σε άλλα είδη μυκήτων με σημαντικότερο τον προαναφερόμενο. Τα κονίδια του επιβιώνουν και σε θερμοκρασίες  $-80^{\circ}\text{C}$ , μεταφέρονται με τον άνεμο πολύ μακριά, διατηρώντας την ικανότητα μόλυνσης σε εύρος θερμοκρασιών  $1$  έως  $30^{\circ}\text{C}$ , με σχετική υγρασία  $90\%$ . Προσβάλλονται οι νεαροί βλαστοί, οι ταξιανθίες, οι σταφυλές, τα φύλλα, δηλαδή όλα τα πράσινα μέρη του πρέμνου. Η ένταση της προσβολής συνδέεται άμεσα με το στάδιο ανάπτυξής τους (Σταυρακάκης, 2016).

Οι μεγαλύτερες ζημιές, παρατηρούνται στις ταξιανθίες και στις σταφυλές που είναι ώριμες, όπως φαίνεται στην εικόνα 15. Στις λευκές ποικιλίες οι ράγες που προσβάλλονται γίνονται



καστανές, ενώ στις ερυθρές παίρνουν ρόδινη απόχρωση. Με την επικράτηση υγρού καιρού η καρποφορίες του μύκητα καλύπτουν τις ράγες με τεφρό χρώμα (Σταυρακάκης, 2016).

Η εξέλιξη της μόλυνσης ευνοείται από υψηλή υγρασία και θερμοκρασίες 15 έως 25 °C. Μέσω σχισμών ή τραυματισμών του φλοιού, λόγω διάφορων λόγων εισέρχεται το παθογόνο, το οποίο έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί τα σάκχαρα ή και το τρυγικό οξύ, ως πηγή άνθρακα, και στην συνέχεια να μετατρέπει ποσοστό τους σε μηλικό και άλλα οξέα. Συμβάλει στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων των ραγών και τον σχηματισμό καστανών πολυμερών. Μέσω έκκρισης πολυσακχαριτών στο στάδιο της διαύγασης, η διαδικασία της οينوποίησης δυσχεραίνεται. Με αυτόν τον τρόπο, υποβαθμίζεται η ποιότητα των οίνων, και λόγω προσβολής από βακτήρια, υστερούν σε άρωμα και στη δυνατότητα παλαίωσης (Σταυρακάκης, 2016).

Υπάρχει περίπτωση, λόγω κλιματικών και καλλιεργητικών συνθηκών, προσβολής των ώριμων σταφυλιών από βοτρυτή, η οποία ονομάζεται ευγενής σήψη. Αποτέλεσμα είναι, επιδόρπιοι οίνοι υψηλής ποιότητας με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Ο μύκητας προσβάλλει το φλοιό των ραγών και λόγω της αφυδάτωσής τους, αυξάνει η συγκέντρωση της φρουκτόζης. Προκαλείται συγκέντρωση γλυκερόλης, κατά την διαδικασία αυτή, που αυξάνει την γλυκύτητα (Σταυρακάκης, 2016).

Στις βιοχημικές διεργασίες εμπλέκονται λειτουργικά γονίδια, χωρίς να είναι κατανοητή η δράση τους σχετικά με τους ωφέλιμους τύπους σήψης. Παράδειγμα τέτοιων οίνων, αποτελούν οι ουγγρικοί Tokay της Ουγγαρίας (Otto et al., 2022).

Ευπαθείς ποικιλίες στην ασθένεια αυτή είναι το Ξινόμαυρο, η Σουλτανίνα, η Μαλαγουζιά, Pinots, Syrah κ.τ.λ. Ανθεκτικές είναι οι ποικιλίες Merlot, Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon κ.α.

Η ασθένεια αντιμετωπίζεται προληπτικά με την εγκατάσταση του αμπελώνα, έτσι ώστε να δημιουργείται δυσμενές μικροκλίμα για την δράση του μύκητα. Η εγκατάσταση εξαρτάται από τον προσανατολισμό, την κατεύθυνση φύτευσης, το σύστημα άρδευσης κ.α. Μέσω καλλιεργητικών επεμβάσεων, με την αύξηση του φωτισμού και του αερισμού του φυλλώματος και των σταφυλών, μειώνονται τα ποσοστά μόλυνσης (Σταυρακάκης, 2016).

Στον περιορισμό της προσβολής συμβάλει το χλωρό κλάδεμα, το βλαστολόγημα και το ξεφύλλισμα. Καταπολεμάται με χημικά μέσα μυκητοκτόνα δραστικά και για τον βοτρυτή, κατά

την διάρκεια ψεκασμών, για τον περονόσπορο και το ωίδιο. Έτσι μειώνεται το κόστος φυτοπροστασίας (Σταυρακάκης, 2016).

Βάσει μελετών επιβεβαιώθηκαν οι πτητικές οργανικές ενώσεις (VOC), ως καλοί δείκτες για την ποσοτικοποίηση του μύκητα *Botrytis cinerea*. Επιλέχθηκαν οι 1,5-διμεθυλοτετραλίνη, 1,5-διμεθυλοναφθαλίνη, φαινυλαιθυλική αλκοόλη και 3-οκτανόλη, ενώ η 2-οκτεν-1-όλη θεωρήθηκε ικανός πρώιμος δείκτης για την ύπαρξη μόλυνσης (Jiang et al., 2023).



Εικόνα 15. Βοτρύτης (Agrobaseapp.com)

#### 5.2.4 Ευτυπίωση

Ο μύκητας που προκαλεί την ευτυπίωση εμφανίζεται με δύο μορφές την εγγενή (*Eutypa lata*) και την ατελή (*Libertella blerpharis*), προκαλώντας νέκρωση στις παραγωγικές μονάδες, στους βραχίονες, και τελικά σε ολόκληρο το πρέμνο. Η προσβολή γίνεται μέσω πληγών, κατά τη διαδικασία του κλαδέματος ή μέσω πληγών, τις οποίες έχουν προκαλέσει τα καλλιεργητικά μηχανήματα, σε πρέμνα με ηλικία τριών έως πέντε ετών (Σταυρακάκης, 2016).

Η εγκατάσταση του παθογόνου γίνεται στο ξύλο και υπάρχει προοδευτική επέκτασή του έως τον φλοιό, με τη δημιουργία χαρακτηριστικών ελκών περιμετρικά των τομών κλαδέματος, π.χ. στη διαδικασία ανανέωσης των βραχιόνων. Η προσβολή είναι περισσότερο εμφανής την άνοιξη, μετά την ολοκλήρωση της εκβλάστησης των λανθανόντων οφθαλμών. Στα πρέμνα που έχουν προσβληθεί από τον μύκητα διακρίνονται νεκροί βραχίονες και υπάρχει μεγάλο ποσοστό λανθανόντων οφθαλμών, το οποίο δεν βλαστάνει, ενώ λίγοι είναι οι βλαστοί οι οποίοι παρουσιάζονται ασθενικοί με μικρά χλωρωτικά φύλλα. Ακολουθεί αποφύλλωση των βλαστών, ενώ η εξέλιξη της ασθένειας γίνεται αργά. Τα πρέμνα έχουν εμφάνιση ξηρή, καθώς, περνούν πέντε έως δέκα έτη από την εγκατάσταση του παθογόνου μύκητα. Ο σχηματισμός των περιθηκίων και η βλάστηση των ασκοσπορίων, ευνοείται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος.

Για να αντιμετωπιστεί, χρησιμοποιούνται καλλιεργητικά μέτρα προληπτικά. Γίνεται σύσταση για την αφαίρεση και την καύση των τμημάτων του πρέμνου που έχουν προσβληθεί, την άνοιξη, καθώς, εκείνη τη χρονική περίοδο η υγρασία στον αέρα είναι χαμηλή και τα συμπτώματα είναι ευδιάκριτα. Το προσβεβλημένο ξύλο θα πρέπει να αφαιρείται προοδευτικά, έως ότου γίνει εμφανές το υγιές τμήμα του. Ταυτόχρονα, πρέπει να γίνει επάλειψη των πληγών, που προκλήθηκαν από το κλάδεμα, με κατάλληλο μυκητοκτόνο. Επίσης, πρέπει να αποφευχθούν οι μεγάλες τομές, να γίνει απολύμανση των εργαλείων κλαδέματος και να εκτελείται το χειμερινό κλάδεμα σε χρονική περίοδο που η δακρύρροια είναι άφθονη (Σταυρακάκης, 2016).

Η θνητότητα *Eutypa* και *Botryosphaeria* και ο αυξανόμενος επιπολασμός των ασθενειών του κορμού της αμπέλου αποδίδεται σε ένα ποσοστό στις αβιοτικές πιέσεις, οι οποίες επιβάλλονται παγκοσμίως στους αμπελώνες, λόγω εντατικοποίησης της παραγωγής. Βάσει της μελέτης των Sosnowski, Ayres & Scott (2021), αξιολογήθηκε η επίδραση από τις πρακτικές της άρδευσης, λόγω έλλειψης νερού, στην ανάπτυξη μολύνσεων από *Eutypa lata* και *Diplodia seriata*, μέσω των πληγών κατά τη διαδικασία του κλαδέματος, και στον ρυθμό αποικισμού τους. Πραγματοποιήθηκαν δύο δοκιμές σε αμπελώνα και σε δύο περιόδους διαδοχικές, μεταξύ τους, σε περιοχές της Νότιας Αυστραλίας. Συγκεκριμένα, στην περιοχή Riverland με την ποικιλία «Cabernet Sauvignon» και μέσω τεσσάρων θεραπειών άρδευσης, και στην κοιλάδα Barossa με ποικιλία «Shiraz» σε έξι ρίζες και υποκείμενα, τα οποία ήταν είτε αρδευόμενα και μη αρδευόμενα. Κατόπιν εκτιμήσεων του δυναμικού των φύλλων σε νερό διαπιστώθηκε καταπόνηση των αμπελιών λόγω μειωμένης άρδευσης και έλλειψης νερού. Παρατηρήθηκε παρόμοια συχνότητα της μόλυνσης και απόσταση αποικισμού για όλες τις επεξεργασίες άρδευσης και για τα δύο παθογόνα (Sosnowski, Ayres & Scott, 2021).

### 5.2.5 Φόμοψη

Η ασθένεια της φόμοψης προκαλείται από τον μύκητα *Phomopsis viticola*, προσβάλλοντας το πρέμνο, κυρίως όμως τους βλαστούς και σπανίως τις ράγες. Στους βλαστούς εμφανίζονται τα συμπτώματα στη θέση των κατώτερων μεσογονατίων υπό μορφή καστανόμαυρων νεκρωτικών κηλίδων που έχουν διάφορα σχήματα. Συνήθως είναι είτε κυκλικές, είτε επιμήκεις που στα αρχικά στάδια είναι υπερυψωμένες, ενώ αργότερα βυθίζονται μέσα στον φλοιό. Όταν συμβαίνουν προσβολές μεγάλης έκτασης παρατηρούνται σχισμές, οι οποίες οδηγούν τον βλαστό σε νέκρωση. Μετά την διαδικασία ξυλοποίησης των βλαστών οι κληματίδες, οι οποίες έχουν προσβληθεί, αλλάζουν χρώμα και γίνονται λευκές ή αποκτούν απόχρωση γκριζα λόγω

των καρποφοριών του μύκητα. Παρατηρείται ότι την άνοιξη που ακολουθεί, οι λανθάνοντες οφθαλμοί δεν εκβλαστάνουν καθιστώντας τις ζημιές πολύ σοβαρές. Κατά τη διαδικασία εκβλάστησης των οφθαλμών και στο αρχικό στάδιο ανάπτυξης των νεαρών βλαστών συνθήκες υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασία και βροχοπτώσεις ευνοούν την προσβολή τους, η οποία συντελεί στην έξοδο των πυκνιδοδοσπορίων από τα όργανα του μύκητα που είναι καρποφόρα (Σταυρακάκης, 2016).

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί προληπτικά ο μύκητας, συνιστώνται καλλιεργητικά μέτρα, μεταξύ των οποίων το υγιές πολλαπλασιαστικό υλικό, η καύση και η συλλογή των κληματίδων, που έχουν προσβληθεί κατά το κλάδεμα στους χειμερινούς μήνες, και η απομάκρυνση των βλαστών που έχουν προσβληθεί με βλαστολόγημα. Επίσης συνίσταται και η απολύμανση των εργαλείων που χρησιμοποιούνται στο κλάδεμα (Σταυρακάκης, 2016).

Μέσω ερευνών πεδίου στην περιοχή της Καλιφόρνιας, αλλά και σε αμπελοκαλλιέργειες άλλων περιοχών των ΗΠΑ, πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι ο *Phomopsis viticola* είναι μεταξύ των πιο διαδεδομένων μυκήτων, οι οποίοι απομονώνονται σε αμπέλια με φθίνουσα πορεία, λόγω πολυετών καρκίνων (Úrbez-Torres et al., 2013).

#### 5.2.6 Βοτρυοσφαιρία

Η βοτρυοσφαιρία είναι μία ασθένεια παρόμοια με της φόμοψης, όπου παρατηρείται κυρίως προσβολή των βλαστών και των ραγών. Για την ασφαλή της διάγνωση απαιτείται εργαστηριακή εξέταση. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων γίνεται κυρίως την άνοιξη με ελλειπτικές κηλίδες. Παρατηρείται συχνά συνένωσή τους και περιβάλλουν τη βάση του βλαστού. Αρκετές φορές υπάρχει υπερτροφία των προσβεβλημένων ιστών οι οποίοι σχηματίζουν επουλωτικά στρώματα. Οι κληματίδες, που έχουν προσβληθεί, καλύπτονται πολύ συχνά από τις καρποφορίες του μύκητα, γεγονός που οδηγεί στην αποξήρανσή τους. Ο μύκητας, σε περιοχές που χαρακτηρίζονται υγρές, συνεχίζει τη δράση του και την καλοκαιρινή περίοδο αλλά και τη φθινοπωρινή λόγω των βροχοπτώσεων. Εισέρχεται, μέσω μη καλά ξυλοποιημένων και αδύνατων κληματίδων, χρησιμοποιώντας τις πληγές ή τις τομές οι οποίες έγιναν κατά τη διαδικασία του κορφολογήματος. Το παράσιτο μπορεί να προκαλέσει την προσβολή τόσο της ράχης των σταφυλιών όσο και των ραγών τους. Ανάλογα με το σημείο προσβολής της ράχης παρατηρείται ξήρανση τμήματος (μικρού ή μεγαλύτερου) της σταφυλής. Αύξηση της ευαισθησίας των ραγών, λόγω της μόλυνσης, πραγματοποιείται κατά την περίοδο της ωρίμανσης. Δημιουργείται μία κηλίδα κυκλική και καστανομελανή στις πράσινες ράγες που έχουν προσβληθεί. Διακρίνεται η ασθένεια αυτή από τη φόμοψη, όπως ήδη

προαναφέρθηκε, στο εργαστήριο μέσω παρατήρησης των σπορίων του μύκητα. Η καταπολέμηση της ασθένειας είναι παρόμοια με αυτή της φόμοψης (Ρούμπος, 2016).

Η *Botryosphaeria dothidea* ανήκει στο συγκεκριμένο είδος των μυκήτων (*Botryosphaeriaceae*, *Botryosphaeriales*), και θεωρείται ως σημαντικό παθογόνο για τον καρκίνο και την αποβλάστηση της αμπέλου παγκόσμια. Ο συγκεκριμένος μύκητας είναι κοινό είδος σε πολλούς ξενιστές. Το προφίλ του παθογόνου που συνθέτει την κατανόηση του μύκητα αναφορικά με την κατανομή του, τις ενώσεις των ξενιστών, όσον αφορά την κατανομή, τις ενώσεις ξενιστών και τη δράση του ως παθογόνου στα φυσικά και μη ξυλώδη περιβάλλοντα, είναι δύσκολη. Λόγω της παρατεταμένης λανθάνουσας μόλυνσης ή της ενδοφυτικής φάσης ο μύκητας περνά συχνά απαρατήρητος. Δυστυχώς, διαπιστώνεται με την ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας κάτω από συνθήκες στρες του ξενιστή. Η έρευνα της δράσης του συγκεκριμένου παθογόνου είναι πολύ σημαντική, καθώς, η κλιματική αλλαγή έχει οδηγήσει σε πιέσεις τους ξυλώδεις ξενιστές, με σημαντικές επιπτώσεις στα φυτά. (Marsberg et al., 2017).

#### 5.2.7 Ίσκα

Η ίσκα συγκαταλέγεται μεταξύ των παλαιότερων και πιο διαδεδομένων ασθενειών σε χώρες με αμπελοκαλλιέργειες. Κατά κανόνα προσβάλλονται ενήλικα πρέμνα, από την ασθένεια αυτή, έχοντας ως χαρακτηριστικά τα συμπτώματα της λευκής σήψης του ξύλου. Η σήψη αυτή εμφανίζεται εσωτερικά και σταδιακά το σκληρό ξύλο μετατρέπεται σε σπογγώδη και μαλακή μάζα. Εμφανίζονται στα πρώτα φύλλα του κατώτερου σημείου του βλαστού «λωρίδες τίγρης», οι οποίες στη συνέχεια επεκτείνονται σε όλο το μήκος και το πλάτος του φυλλώματος. Σταδιακά προσβάλλονται τα φύλλα, οι βλαστοί, οι σταφυλές, οι κληματίδες, οι βραχίονες και ο κορμός, ενώ είναι πιθανόν στη συμπτωματολογία να υπάρχει συμμετοχή και άλλων παθογόνων ή και αβιοτικών παραγόντων (Σταυρακάκης, 2016).

Συγκεκριμένα, ο μύκητας αυτός λειτουργεί ως λευκοσάκος, που έχει την ικανότητα αποικοδόμησης όλων των πολυμερών της δομής του ξύλου (ημικυτταρίνες, κυτταρίνη και λιγνίνη). Μέσω της δράσης του μύκητα εκκρίνονται ειδικά ένζυμα αποικοδόμησης των προαναφερόμενων συστατικών. Εκτός των πολυμερών, στο ξύλο υπάρχει ένα σύνολο μεταβολιτών ποικίλης μορφής, ανάλογα με το είδος του ξύλου, με αντιμυκητιακή δράση. Οι αποικοδομητές του ξύλου έχουν την ικανότητα αποτοξικοποίησης των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων, η οποία αντανakλά την ικανότητα προσαρμογής των συγκεκριμένων μυκήτων στο περιβάλλον ανάπτυξής τους (Schilling et al., 2022).

Η ασθένεια εξελίσσεται σχετικά αργά, λόγος για τον οποίο η ολοκλήρωση της ξήρανσης των πρέμνων συμβαίνει πολλά χρόνια μετά την εμφάνιση των αρχικών συμπτωμάτων. Σε κάποιες από τις ποικιλίες, όπως για παράδειγμα στην ποικιλία της Σουλτανίνας, γίνεται η εμφάνιση της ασθένειας κατά τους θερινούς μήνες, υπό τη μορφή της αποπληξίας. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται ξήρανση του πρέμνου εντός λίγων ημερών (Σταυρακάκης, 2016). Για πολλά χρόνια θεωρούνταν ότι η ασθένεια οφείλεται σε δύο παθογόνα στους βασιδιομύκητες (*Phellinus ingiarius* και *Stereum hirsutum*). Μέσω νεότερων ερευνών διαπιστώθηκε ότι οι κυριότεροι μύκητες είναι ο *Fomitiporia mediterranea* που παρουσιάζεται στις θερμές περιοχές και ο *Fomitiporia punctata* ο οποίος εμφανίζεται στις βορειότερες περιοχές (Παναγόπουλος, 2007, όπως αναφέρεται στον Σταυρακάκη, 2016).

Επίσης, έχει παρατηρηθεί στο «σύνδρομο της παρακμής των νεαρών πρέμνων» σε αμπελώνες νεαρής ηλικίας. Η διαπίστωση αυτή γίνεται με συμπτώματα όμοια με της ίσκας στα φύλλα, αλλά υπάρχει μεταχρωματισμός του εσωτερικού του κορμού του ξύλου σε καστανή απόχρωση (Σταυρακάκης, 2016)

Η ίσκα αντιμετωπίζεται με παρόμοια μεθοδολογία με αυτή της ευτυπίωσης. Επίσης προτείνεται ο ψεκασμός κατά την χειμερινή περίοδο μέσω πυκνού βορδιγάλειου ή δινιτροορθοκρεζόλης (Σταυρακάκης, 2016).

#### 5.2.8 Βερτισιλλίωση

Η βερτισιλλίωση είναι μία ασθένεια η οποία οφείλεται στους μύκητες *Verticillium dahliae* Kleb και *V. albo-atrum* Reinke & Berthold. Η ασθένεια αυτή είναι σπάνια στο αμπέλι, ενώ τα συμπτώματά της παρομοιάζουν με αυτά της ίσκας ή της σηψιρριζίας. Είναι εμφανή συνήθως την θερινή περίοδο κατά τη διάρκεια που το φυτό απαιτεί αυξημένες ποσότητες νερού. Τα συμπτώματα έχουν τη μορφή της αποπληξίας (απότομος μαρασμός) ή της βραδείας αποξήρανσης (Ρούμπος, 2016).

Αυτή η ασθένεια έχει ως χαρακτηριστικό της την προσβολή μεγάλου αριθμού ετήσιων ή δενδρωδών καλλιεργειών. Στην περίπτωση αφαίρεσης του φλοιού, παρατηρούνται φαιές ραβδώσεις καστανής ή καστανομελανής απόχρωσης. Στην περίπτωση εγκάρσιας τομής του κορμού ο μεταχρωματισμός επεκτείνεται σε βάθος με μορφή στιγμάτων (Ρούμπος, 2016).

Ο υπεύθυνος μύκητας για την ασθένεια ζει σαπροφυτικά. Εμφανίζεται σε υπολείμματα διάφορων φυτών σχηματίζοντας τα όργανα αναπαραγωγής του. Επίσης, σχηματίζονται και τα



μικροσκληρώτια. Αυτά διατηρούνται για αρκετά χρόνια στα εδάφη. Η εισαγωγή των μυκήτων πραγματοποιείται από πληγές των ριζών ή της βάσης του κορμού (Ρούμπος, 2016).

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί η ασθένεια δεν υπάρχουν αποτελεσματικά μέτρα. Προτείνεται η εκρίζωση και η καύση των άρρωστων πρέμνων. Για να προληφθεί η ασθένεια ενδείκνυται η αποφυγή της εγκατάστασης των αμπελώνων σε εδάφη τα οποία προηγουμένως είχαν χρησιμοποιηθεί, προκειμένου να καλλιεργηθούν ευαίσθητα ετήσια πολυετή φυτά, όπως η ντομάτα, η πιπεριά, η μελιτζάνα κ.α. Σε περιπτώσεις που τα εδάφη είναι μολυσμένα ενδείκνυται, να προηγηθεί της εγκατάστασης του αμπελώνα, καλλιέργεια σιτηρών για τέσσερα έως πέντε χρόνια (Ρούμπος, 2016).

Το *Verticillium dahliae* Kleb. και το *Verticillium nonalfalfae* Inderb. et al. αποτελούν τους αιτιολογικούς παράγοντες μάρανσης θνησιμότητας και των δέντρων αϊλάνθου, με συμπτώματα την πρόωρη αποφύλλωση και τον κίτρινο αποχρωματισμό των αγγείων. Εντοπίστηκαν το 2007 στο Celrà στην Καταλονία της βορειοανατολικής Ισπανίας. Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας σε δασικά οικοσυστήματα δέντρων αϊλάνθου, το 2018 στη συγκεκριμένη περιοχή πλησίασε σε ποσοστό το 90%. (Moragrega et al., 2021).

### 5.2.9 Σηψιρριζία

Η σηψιρριζία είναι μία ασθένεια, η οποία διαπιστώνεται σε αμπελώνες που έχουν εγκατασταθεί σε ορεινές περιοχές, οι οποίες ήταν εκχερσωμένες δασικές εκτάσεις. Επίσης, σημαντικές ζημιές παρατηρούνται σε περιοχές αναμπέλωσης, στις οποίες δεν μεσολάβησε καλλιέργεια διετής με αγρωστώδη. Μεταξύ των συμπτωμάτων στα άρρωστα πρέμνα συμπεριλαμβάνονται, η αποξήρανση και η πτώση των φύλλων σταδιακά, η ξήρανση των κορυφών των βλαστών, και των κληματίδων, όπως επίσης παρατηρείται ξήρανση βραχιόνων και πρέμνων. Δυστυχώς, τα συμπτώματα αυτά δεν είναι χαρακτηριστικά μόνο αυτής της ασθένειας και πολλές φορές προκαλείται σύγχυσή τους με αυτά της ίσκας, της βερτιστιλλίωσης κ.λπ (Ρούμπος, 2016).

Ως χαρακτηριστικά συμπτώματά της, θεωρούνται αυτά που είναι εμφανή στο υπόγειο τμήμα του φυτού, συγκεκριμένα στο υποκείμενο και στις ρίζες. Κατά τη διάρκεια της εξέτασής τους, διαπιστώνεται φλοιός υγρής και σπογγώδους μορφής. Υπάρχει χαρακτηριστική οσμή μανιταριού. Στην περίπτωση αφαίρεσης του φλοιού, διαπιστώνονται με γυμνό οφθαλμό η ύπαρξη λευκών μυκηλιακών πλακών, ανάμεσα στον φλοιό και στο ξύλο. Κατά την εξέλιξη της ασθένειας, γίνεται επέκταση της σήψης από τον φλοιό έως και το εγκάρδιο ξύλο. Επίσης,



υπάρχει νέκρωση είτε τμήματος είτε ολόκληρου του ριζικού συστήματος. Εμφανή είναι καστανομελανά νήματα γνωστά ως ριζόμορφα. Αυτά τα νήματα απλώνονται, τόσο ανάμεσα στον φλοιό και το ξύλο, όσο και επάνω στις ρίζες και στα εδάφη σε αρκετή απόσταση, με αποτέλεσμα τη μετάδοση της ασθένειας στα γειτονικά πρέμνα (Ρούμπος, 2016).

Απαιτείται η λήψη κάποιων συγκεκριμένων μέτρων με την εμφάνιση της ασθένειας. Μεταξύ αυτών είναι η εκρίζωση και το κάψιμο των πρέμνων που έχουν προσβληθεί, η διάνοιξη λάκκων οι οποίοι πρέπει να διατηρηθούν για ένα έτος, στη διάρκεια του οποίου πρέπει να γίνεται ανασκαφή του χώματος. Είναι απαραίτητος ο αερισμός και η έκθεση στον ήλιο για την νέκρωση του παθογόνου (Ρούμπος, 2016).

Επίσης, συνιστάται η ελάττωση της υγρασίας, μέσω περιορισμού της διαδικασίας άρδευσης και της εφαρμογής συστήματος κατάλληλης αποστράγγισης. Επιπλέον, είναι απαραίτητη η απομόνωση των πρέμνων που έχουν προσβληθεί με την κατασκευή τάφρου, ώστε να παρεμποδίζεται η επέκταση της ασθένειας. Στις περιπτώσεις της αναμπέλωσης, είναι απαραίτητο το όργωμα για την αφαίρεση των πρέμνων και η αναμονή δύο ετών, κατά τη διάρκεια των οποίων διενεργούνται οργώματα στην καλοκαιρινή περίοδο, ή η καλλιέργεια της έκτασης για δύο έτη με αγροστόδια (Ρούμπος, 2016).

Το *Armillaria mellea* ως παρασιτικός μύκητας έχει την ικανότητα μόλυνσης έως και 300 γενών των φυτών, ενώ μέσω της βιολογικής δράσης του έχει ηρεμιστικά και αντισπασμωδικά χαρακτηριστικά (Huang et al., 2017).

Οι ιοί *Partitiviruses* της οικογένειας *Partitiviridae*, ανιχνεύονται στους μύκητες των φυτών, όπως και στον μύκητα *Rosellinia necatrix*. (Telengech et al., 2020).

#### 5.2.10 Μαύρη σήψη

Η ασθένεια της μαύρης σήψης, θεωρείται από τα σοβαρότερα προβλήματα σε αμπελουργικές περιοχές των Η.Π.Α. θερμές και υγρές. Στην Ελλάδα δεν έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη της ασθένειας αυτής. Το όνομά της το οφείλει στην εμφάνιση των ραγών, που έχουν προσβληθεί και έχουν μαύρη απόχρωση (Ρούμπος, 2016).

Μεταξύ των συμπτωμάτων, τα οποία περιλαμβάνουν όλα τα πράσινα μέρη του φυτού, είναι η εμφάνιση καστανόχρωμων κυκλικών κηλίδων επάνω στα φύλλα. Ακόμα, προσβάλλονται οι μίσχοι, με αποτέλεσμα την συχνή μαρανσή τους και οι νεαροί βλαστοί, με αποτέλεσμα το εύκολο σπάσιμό τους σε συνθήκες ανέμου. Οι βότρυς προσβάλλονται από το παθογόνο. Μεταξύ της εποχής του δεσίματος και της εποχής της έναρξης της διαδικασίας ωρίμανσής

τους, οι ράγες θεωρούνται ευαίσθητες στην μόλυνση. Η ράγα που έχει προσβληθεί, έχει αρχικά ανοιχτή καστανή απόχρωση, μετέπειτα σκούρα καστανή και τέλος, καλύπτεται από τις καρποφορίες του μύκητα, οι οποίες είναι μελανόχρωμες. Στη συνέχεια, παρατηρείται ζάρωσή της, σταφίδιασμα, μαύρισμα και μουμιοποίησή της (Ρούμπος, 2016).

Η καλή κυκλοφορία του αέρα μέσα στον αμπελώνα, ευνοεί την καλλιεργητική φροντίδα της αμπέλου και συντελεί στην μείωση της υγρασίας και επομένως στον περιορισμό της μόλυνσης. Μέσω της καλλιέργειας του εδάφους, επιτυγχάνεται καταστροφή των ραγών που προέρχονται από τις μολύνσεις στα αρχικά στάδια (Ρούμπος, 2016).

Η ασθένεια μπορεί να καταπολεμηθεί χημικά με παρόμοιους τρόπους με αυτούς της καταπολέμησης του περονόσπορου (Ρούμπος, 2016).

#### 5.2.11 Λευκή σήψη

Επίσης, η ασθένεια της λευκής σήψης δεν διαπιστώθηκε στην χώρα μας. Είναι γνωστή σε άλλες χώρες της Ευρωπαϊκής Ηπείρου, ειδικά για τις ζημιές που προκαλεί στους βότρυες κατόπιν χαλαζόπτωσης (Ρούμπος, 2016).

Η προσβολή παρατηρείται ειδικά στις ράγες, με την εκδήλωση κηλίδων χρώματος καστανού ανοιχτού. Οι ράγες που έχουν προσβληθεί είναι αφυδατωμένες, στην συνέχεια ρυτιδώνουν και ακόλουθα αποξηραίνονται. Στην επιφάνεια των ραγών σχηματίζονται οι καρποφορίες από τον μύκητα, που ονομάζονται πυκνίδια, και έχουν χρωματισμό πιο ανοιχτό, στον οποίο οφείλεται και το όνομα της συγκεκριμένης ασθένειας (Ρούμπος, 2016).

Η προσβολή των κληματίδων συμβαίνει συνήθως στο σημείο όπου, υπάρχει η πρόσφυση του ποδίσκου των βοτρυών και γίνεται η επέκτασή της κατά μήκος για αρκετά εκατοστά. Οι ιστοί που έχουν προσβληθεί, έχουν χρώμα τεφροκαστανό και επιπλέον σχίζονται υπό τη μορφή λωρίδων (Ρούμπος, 2016).

Το συγκεκριμένο παθογόνο διαχειμάζει στο έδαφος πάνω στις ράγες που έχουν προσβληθεί. Εισέρχεται μέσω πληγών, οι οποίες οφείλονται σε χαλαζόπτωση. Μεγαλύτερης επικινδυνότητας είναι οι όψιμες χαλαζοπτώσεις, οι οποίες συμβαίνουν κατά το στάδιο ωρίμανσης των ραγών (Ρούμπος, 2016).

Η σύσταση, για την καταπολέμηση της ασθένειας, απαιτεί την καταστροφή των βοτρυών που έχουν προσβληθεί, οι οποίοι έπεσαν στο έδαφος, μέσω της καλλιέργειας του εδάφους (Ρούμπος, 2016).

### 5.2.12 Ανθράκνωση

Η ανθράκνωση είναι μία ασθένεια της αμπέλου, η οποία οφείλεται στον μύκητα *Elsinoe ampelina* και διαπιστώνεται σε πολλές περιοχές της χώρας μας (Ρούμπος, 2016).

Με εντατικά προγράμματα ψεκασμών, τα οποία εφαρμόζονται και για την καταπολέμηση των ασθενειών της φόμοψης και του περονόσπορου, έχουν περιοριστεί κατά πολύ τα φαινόμενα εμφάνισής της (Ρούμπος, 2016).

Τα συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν, την εμφάνιση μικρών τεφρόλευκων κυκλικών ή πολυγωνικών κηλίδων στα φύλλα, οι οποίες με την νέκρωσή τους σχίζονται και αφήνουν σχισμές ή οπές που δίνουν την εντύπωση της ζημιάς από χαλάζι. Επίσης, υπάρχει σχηματισμός ανάλογων κηλίδων στις ώριμες ράγες, οι οποίες μπορεί πάλι να οδηγήσουν στο σχίσιμό τους και στην συνέχεια στη σήψη τους (Ρούμπος, 2016).

Η προσβολή των σταφυλιών, μπορεί επίσης να παρατηρηθεί στα πολύ αρχικά στάδια και να οδηγήσει απευθείας στην αποξήρανσή τους. Διαπιστώθηκε ότι το παθογόνο διαχειμάζει στα τμήματα που έχουν προσβληθεί, όπως είναι οι κληματίδες υπό τη μορφή σκληρωτών. Οι πρώτες μολύνσεις παρατηρούνται την περίοδο της άνοιξης με τον υγρό καιρό (Ρούμπος, 2016).

Η συγκεκριμένη ασθένεια, αντιμετωπίζεται μέσω ψεκασμών οι οποίοι πραγματοποιούνται κατά τα πρώτα στάδια έκπτυξης των ματιών για την ταυτόχρονη καταπολέμηση της φόμοψης και στην συνέχεια μέσω των ψεκασμών που γίνονται κατά την διαδικασία καταπολέμησης ή προκειμένου να καταπολεμηθεί ο περονόσπορος. Δηλαδή η ασθένεια αντιμετωπίζεται, μέσω ψεκασμών, οι οποίοι γίνονται αρχικά για την καταπολέμηση της φόμοψης και αργότερα για την καταπολέμηση της ασθένειας του περονόσπορου (Ρούμπος, 2016).

### 5.2.13 Φυτοφθορά

Η φυτοφθορά είναι μία ασθένεια, η οποία δεν έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στο τμήμα του πρέμνου το οποίο είναι υπέργειο. Ευνοείται από την ύπαρξη, περιμετρικά του λαιμού του φυτού, υπερβολικής υγρασίας (Ρούμπος, 2016).

Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση στα πρέμνα, που έχουν προσβληθεί, ασθενικής βλάστησης, φυλλόπτωσης και μεταχρωματισμών του φυλλώματος. Οι μεταχρωματισμοί του φυλλώματος είναι παρόμοιοι με αυτούς που παρατηρούνται αργά τη φθινοπωρινή περίοδο, ακριβώς όταν το φυτό εισέρχεται στην διαδικασία χειμερίας νάρκης. Κατόπιν αφαίρεσης του χόματος, περιμετρικά του λαιμού του προσβεβλημένου πρέμνου, και μέσω της απομάκρυνσης των εξωτερικών ιστών με μαχαίρι, παρατηρείται η σήψη του φλοιού και μεταχρωματισμός του

ξύλου κασταλής απόχρωσης στην περιοχή του λαιμού, ο οποίος επεκτείνεται με κατεύθυνση προς τις ρίζες. Η υπερβολική υγρασία στην περιοχή του λαιμού και στις ρίζες συμβάλει στην εξέλιξη της ασθένειας (Ρούμπος, 2016).

Το παθογόνο μεταφέρεται μέσω του χώματος και του νερού. Η συνεχής ύπαρξη νερού στον αμπελώνα, η οποία μπορεί να προέρχεται είτε από τις βροχοπτώσεις είτε από την άρδευση, συμβάλει στην εξάπλωση της συγκεκριμένης ασθένειας (Ρούμπος, 2016).

Για την καταπολέμησή της, συνιστάται ο περιορισμός της υγρασίας του εδάφους, η άρδευση (εντός λογικών πλαισίων) των αμπελώνων, η καταστροφή των ζιζανίων γύρω από το πρέμνο, το σημείο όπου ενώνονται το εμβόλιο με το υποκείμενο να είναι υπέργειο και η καταπολέμηση με μυκητοκτόνα (Ρούμπος, 2016).

#### 5.2.14 Ψευδοπεξίζα

Μεταξύ των σπουδαιότερων τεσσάρων ασθενειών της αμπέλου, είναι και η ψευδοπεξίζα, όπως ο περονόσπορος, το ωίδιο και ο βοτρύτης. Εμφανίζεται σε αμπελοκαλλιέργειες στην κεντρική Ευρώπη. Στην χώρα μας δεν έχει αποτελέσει σοβαρό πρόβλημα (Ρούμπος, 2016).

Τα φύλλα της αμπέλου προσβάλλονται από την ασθένεια, μειώνεται η αφομοιωτική τους επιφάνεια και επομένως, αντίστοιχα μειώνονται και τα προϊόντα της αφομοίωσης. Στην περίπτωση που συμβεί πρόωρη φυλλόπτωση, αυτό μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των βοτρύων και των ταξιανθιών. Κάνουν την εμφάνισή τους κιτρινοπράσινες κηλίδες, στα φύλλα που έχουν προσβληθεί, οι οποίες μοιάζουν με τις κηλίδες ελαίου που εμφανίζονται στον περονόσπορο. Υπάρχει όμως διαφοροποίηση, ως προς την κάτω επιφάνειά τους όπου δεν εμφανίζεται το επίχρισμα των καρποφοριών του περονόσπορου λευκής απόχρωσης κάτω από υγρές συνθήκες. Αυτό το γεγονός, διευκολύνει τη διάκριση ανάμεσα στις δύο ασθένειες (Ρούμπος, 2016).

Ο κύκλος της ασθένειας ξεκινά με τη διαχείμαση του παθογόνου στα φύλλα, τα οποία έπεσαν στο έδαφος του αμπελώνα. Εκεί σχηματίζονται τα όργανα αναπαραγωγής του. Τα σπόρια την περίοδο της άνοιξης, με την βοήθεια βροχόπτωσης και ανέμων, φτάνουν στην επιφάνεια των φύλλων, όπου εκεί βλαστάνουν και έτσι προκαλούν τη μόλυνση (Ρούμπος, 2016).

Ο μύκητας καταφέρνει να εισέλθει στο φύλλο, τόσο από την κάτω αλλά και την άνω επιφάνεια του, χωρίς την εξάρτησή του από την ύπαρξη στοματίων εισόδου, καθώς, διακρίνεται για την ικανότητα του να διατρυπά την επιδερμίδα και την εφυμενίδα (Ρούμπος, 2016).

Κατόπιν της εισόδου του, παρατηρείται ανάπτυξη του μέσα στα αγγεία του φύλλου προκαλώντας την έμφραξη τους και τη διακοπή της κυκλοφορίας των απαιτούμενων χυμών, με αποτέλεσμα την ξήρανση τμήματός του ή ολόκληρης της επιφάνειάς του (Ρούμπος, 2016).

Έρευνες από ξένους ερευνητές, έδειξαν ότι ο μύκητας μπορεί να παράγει μία νέα γενιά ασκοσπορίων κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Ρούμπος, 2016).

Για την καταπολέμηση της ασθένειας χρησιμοποιούνται τα μυκητοκτόνα και πραγματοποιούνται επεμβάσεις, ανάλογες με αυτές που χρησιμοποιούνται, προκειμένου να αντιμετωπιστεί η ασθένεια του περονόσπορου (Ρούμπος, 2016).

#### 5.2.15 Παρακμή νέων αμπελώνων

Η παρακμή νέων αμπελώνων είναι μία νέα ασθένεια της αμπέλου. Η διάδοσή της σχετίζεται άμεσα με το πολλαπλασιαστικό υλικό. Τα συμπτώματα τα οποία προκαλεί η ασθένεια είναι παρόμοια με αυτά της ασθένειας της Ίσκας. Διαφέρει ωστόσο στα συμπτώματα, τα οποία παρουσιάζονται στο εσωτερικό του ξύλου, καθώς, και στο γεγονός ότι κάνει την εμφάνισή της σε αμπελώνες νεαρής ηλικίας. Μεταφέρεται, μέσω ασθενούς πολλαπλασιαστικού υλικού, προκαλώντας τη νέκρωση των φυτών ακόμα και την ίδια χρονιά που εγκαθίσταται ο αμπελώνας. Είναι αρκετές οι περιπτώσεις, στις οποίες παρατηρούνται μεγάλες απώλειες, με αποτέλεσμα οι αμπελουργοί να πρέπει να προβούν σε διαδικασία εκρίζωσης και επαναφύτευσης του αμπελώνα. Αυτό το γεγονός έχει μεγάλες οικονομικές επιπτώσεις (Ρούμπος, 2016).

Στη χώρα μας, την περίοδο 1998 έως 2002, ήρθαν αντιμέτωποι με αυτό το φαινόμενο αρκετοί αμπελουργοί των περιοχών Τυρνάβου, Πάτρας, Ηλείας και Χαλκιδικής. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων συνδέεται άμεσα με κάποιους παράγοντες. Στους παράγοντες αυτούς συγκαταλέγονται το είδος του παθογόνου, η κατάσταση ευρωστίας του συγκεκριμένου φυτού, η ποικιλία του, το υποκείμενο που χρησιμοποιείται, καθώς, και άλλοι εξωτερικοί παράγοντες όπως είναι το έδαφος, η θερμοκρασία, το νερό κ.α. (Ρούμπος, 2016).

Παρουσιάζονται μεταχρωματισμοί του ξύλου καστανής απόχρωσης και χλώρωση των φύλλων, μεσονεύρια και περιφερειακά, η οποία οδηγεί στην νέκρωση. Μειώνεται η διάμετρος του υποκειμένου έναντι του εμβολίου, διογκώνονται οι ιστοί στο σημείο που ενώνεται το εμβόλιο με το υποκείμενο, αποτυγχάνει η συνένωση εμβολίου υποκειμένου και επίσης μπορεί να παρατηρηθεί και το σύμπτωμα της ξαφνικής ξήρανσης των φυτών (αποπληξία). Επίσης, φυτά που χαρακτηρίζονται από ασθενική βλάστηση παρουσιάζουν χαρακτηριστικά μειωμένη

ανάπτυξη στους βλαστούς τους. Η μόλυνση μπορεί να οφείλεται στο ίδιο μητρικό φυτό ή να πραγματοποιείται στο φυτώριο κατά τη διάρκεια εργασιών, ή μετά την εγκατάσταση των φυτών στον αμπελώνα (Ρούμπος, 2016).

Τα διαθέσιμα στοιχεία για την επιδημιολογία και τη βιολογία των παθογόνων είναι ελάχιστα. Πρόσφατα διεξήχθησαν έρευνες, οι οποίες έδειξαν ότι ο μύκητας *Phaeomoniella chlamydospora* οδηγεί στην παραγωγή φυτοτοξικών μεταβολιτών και πεκτινολυτικών ενζύμων (Ρούμπος, 2016).

Τα *Phaeoacremonium* spp. απομονώνονται συνήθως από στελέχη και κλαδιά ασθενών ξυλωδών ξενιστών και από ανθρώπους με φαιοϋφομκητίαση.

Για την καταπολέμηση της ασθένειας, προτείνεται η χρησιμοποίηση πολλαπλασιαστικού υλικού που είναι υγιές, η λήψη μέτρων υγιεινής στα φυτώρια με σκοπό να αποφεύγεται η μόλυνσής τους και η λήψη κατάλληλων μέτρων, προκειμένου να αποφεύγεται η μόλυνση στις τομές του κλαδέματος στον αμπελώνα (Gramaje et al., 2015).

#### 5.2.16 Μελανή νέκρωση των βραχιόνων

Η ασθένεια της μελανής νέκρωσης των βραχιόνων παρατηρήθηκε στη χώρα μας το 1999 και συγκεκριμένα στην ποικιλία Μοσχάτο Σάμου, ενώ το 2000 στην ποικιλία Ροδίτη στην περιοχή της Νέας Αγχιάλου Βόλου. Παρατηρήθηκε προσβολή του ξύλου της αμπέλου και νέκρωση των βραχιόνων, καθώς, και ολόκληρου του μέρους των πρέμων. Τα συμπτώματα στα φύλλα μοιάζουν με αυτά της Ίσκας και της ασθένειας του Petri. Οι απώλειες, που προκαλούνται από την ασθένεια αυτή, στους αμπελώνες του Μπορντό φτάνουν σε ποσοστό από 4 έως 20%.

Τα συμπτώματα ξεκινούν από τα φύλλα των βλαστών που είναι παλαιότερα. Αρχικά, νεκρώνονται τα φύλλα και στη συνέχεια οι ταξιανθίες ή οι βότρυες και τέλος οι βλαστοί. Με την απομάκρυνση του ρυτιδώματος του φλοιού, παρατηρείται μελανός μελαχρωματισμός σκούρας απόχρωσης, του οποίου η επέκταση φτάνει σε όλες τις κατευθύνσεις. Στις περιπτώσεις που η νέκρωση περιβάλλει το σημείο του βραχίονα ή του κορμού, που έχει προσβληθεί, ακολουθεί νέκρωση του υπεράνω τμήματος του φυτού. Αυτό το γεγονός, μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της χειμερινής περιόδου, οπότε οι αμπελουργοί το διαπιστώνουν κατά την εποχή του κλαδέματος, καθώς, οι κληματίδες είναι ήδη νεκρές (Ρούμπος, 2016).

Υπεύθυνος για την ανάπτυξη της ασθένειας είναι ο μύκητας *Botryosphaeria dothidea*. Οι μύκητες του γένους αυτού αναπτύσσονται ταχύτατα σε υψηλές θερμοκρασίες. Η μόλυνση εγκαθίσταται μέσω πληγών και συνηθέστερα μέσω των τομών του κλαδέματος. Για την



αντιμετώπιση της ασθένειας, απαιτείται η αφαίρεση και το κάψιμο των κεφαλών των βραχιόνων και των πρέμων που έχουν προσβληθεί. Προτείνεται το κλάδεμα να γίνεται αργά, κατά τη χειμερινή περίοδο, και οι τομείς να προστατεύονται με ειδικό προστατευτικό. Τέλος, το κλάδεμα πρέπει να ακολουθεί προληπτικά η διενέργεια ψεκασμού με σκεύασμα χαλκούχο (Ρούμπος, 2016).

#### 5.2.17 Μελανή νέκρωση της βάσης του υποκειμένου

Η μελανή νέκρωση της βάσης του υποκειμένου αναφέρθηκε πρώτη φορά το 2000 στη χώρα μας και συσχετίζεται με απώλειες, οι οποίες έχουν παρατηρηθεί κατά την εγκατάσταση νεαρών αμπελώνων. Ο μύκητας υπήρχε σε πολλές περιπτώσεις σε έρριζα απλά, αλλά και σε έρριζα ήδη εμβολιασμένα φυτά προερχόμενα από φυτώρια ελληνικά και εξωτερικού (Ρούμπος, 2016).

Προβλήματα μπορεί να προκληθούν κατά την αποθήκευση αλλά και την διατήρηση του πολλαπλασιαστικού υλικού της αμπέλου. Τα συμπτώματα εμφανίζονται σε νεαρά φυτά, τα οποία παρουσιάζουν χαρακτηριστική καχεκτική ανάπτυξη. Σε μερικές περιπτώσεις, οι οφθαλμοί δεν εκπτύσσονται καθόλου κατά την περίοδο της άνοιξης. Επίσης, το καλοκαίρι παρατηρείται ξήρανση ολόκληρου του φυτού. Στο κατώτερο μέρος του υποκειμένου εμφανίζονται μεταχρωματισμοί καστανής απόχρωσης, οι οποίοι ξεκινούν από τον κόμβο όπου γίνεται η έκφυση των ριζών και προχωρούν προς τα επάνω. Σε προχωρημένες περιπτώσεις, υπάρχει κίνδυνος νέκρωσης ολόκληρου του κατώτερου τμήματος του υποκειμένου αλλά και πλήρους ξήρανσης του φυτού. Παρατηρείται ανάπτυξη νεαρών ριζών σε ψηλότερο σημείο από το υποκείμενο, οι οποίες αναπτύσσονται επιφανειακά σε παράλληλη θέση σχετικά με την επιφάνεια του εδάφους. Αυτό αποδεικνύει, ότι το φυτό προσπαθεί να ξεπεράσει τα προβλήματα τροφοδοσίας λόγω του προσβεβλημένου υποκειμένου (Ρούμπος, 2016).

Το γένος *Cylindrocarpon*, το οποίο περιλαμβάνει μύκητες του εδάφους περιλαμβάνει και παθογόνα τα οποία προσβάλλουν τις νεαρές ρίζες. Επίσης, υπάρχουν στελέχη τα οποία είναι και παθογόνα και σαπρόφυτα. Η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται από παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν στη μείωση της ευρωστίας των φυτών, όπως είναι τα βαριά και συμπαγή εδάφη (Ρούμπος, 2016).

Η μόλυνση γίνεται μέσω πληγών ή μέσω των φυσικών ανοιγμάτων των ριζών ή του υποκειμένου, το οποίο βρίσκεται μέσα στο έδαφος. Ο μύκητας έχει την ικανότητα να επιβιώνει στο έδαφος για πολλά χρόνια (Ρούμπος, 2016).



Συνιστάται να αποφεύγονται τα συμπαγή και βαριά εδάφη, η υπερβολική υγρασία, η χρήση μεγάλων τρακτέρ και να προτιμάται η επέμβαση με μύκητες του γένους *Trichoderma* σε φυτώρια αμπελιών, έτσι ώστε να αναπτύσσονται πιο εύρωστα φυτά, τα οποία προσβάλλονται λιγότερο από *Cylindrocarpon* (Ρούμπος, 2016).

#### 5.2.18 Σήψεις σταφυλών από μύκητες του γένους *Aspergillus*

Στην περίπτωση ύπαρξης πληγών πάνω στις ράγες, λόγω διαφορετικών αιτίων όπως π.χ. λόγω προσβολής από οίδιο, μπορεί να μεταφερθούν σπόρια μυκήτων. Στην περίπτωση αυτή, υπάρχει εξέλιξη της σήψης σε προσβολή καθαρά μυκητολογικού χαρακτήρα., όπως συμβαίνει με τον μύκητα *Botrytis cinerea*, *Aspergillus sp.*, κ.λπ. Όταν συνυπάρχουν βακτήρια ή σακχαρομύκητες, η προσβολή είναι περίπλοκη. Σε αρκετές περιπτώσεις, παρατηρείται νέκρωση των μυκήτων και πολλαπλασιασμός μόνο των βακτηρίων και των σακχαρομυκήτων. Αυτό το φαινόμενο έχει σαν αποτέλεσμα την όξινη σήψη. Η πιο συνηθισμένη περίπτωση συνύπαρξης όξινης σήψης με μύκητα είναι με τους μύκητες του γένους *Aspergillus*. Η ζημιά που προκαλείται από τους μύκητες αυτούς είναι σημαντική, καθώς, ο μύκητας έχει την ικανότητα να παράγει την ουσία ωχρατοξίνη Α. Το σκεύασμα Switch έχει την ικανότητα μείωσης του πληθυσμού και χημικής αντιμετώπισής του. Σε μελέτες, οι οποίες διενεργήθηκαν στην Κύπρο προκειμένου να εντοπιστούν ζύμες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την βιολογική αντιμετώπιση των μυκήτων, έδειξαν ότι το είδος *Aureobasidium pullulans* παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus tubingensis* σε μεγάλο ποσοστό έως και 93,78%. Παρόμοιες μελέτες από το γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, για να αντιμετωπιστεί βιολογικά ο μύκητας *A. Carbonarius*, οδήγησαν στη χρήση της επιφυτικής ζύμης *Aureobasidium pullulans* (Ρούμπος, 2016).

Προϋπόθεση για να αντιμετωπιστεί αυτή η ασθένεια είναι η αποφυγή δημιουργίας πληγών στις ράγες (Ρούμπος, 2016).

### 5.3 Βακτηριολογικές ασθένειες

Οι ασθένειες που προσβάλλουν την άμπελο, λόγω βακτηρίων, δεν είναι πολλές και είναι σχετικά μικρής οικονομικής σημασίας. Μία απ' αυτές τις ασθένειες είναι ο καρκίνος, ο οποίος μπορεί να δημιουργήσει πολλά προβλήματα ειδικά στα φυτώρια. Η ασθένεια Τσιλίκ-Μαράζι επισημάνθηκε σε ηλικιωμένους αμπελώνες σε ελάχιστες περιοχές αμπελοκαλλιιεργειών (Ρούμπος, 2016).

Η ασθένεια του Pierce έχει αρκετά σοβαρές επιπτώσεις, αλλά δεν έχει διαπιστωθεί στην Ευρώπη και επομένως ούτε στη χώρα μας. Σε αντίθεση η βακτηριολογική ασθένεια, η οποία προκαλεί τις μεγαλύτερες απώλειες στην παραγωγή και με συμπτώματα ειδικά στο στάδιο ωρίμανσης των σταφυλιών, είναι η όξινη σήψη. Παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή σε ποσοστά 20 έως 30%, τα ξηροθερμικά έτη 1985 και 1986, σε διάφορες περιοχές στη χώρα μας. Εξαιτίας απόδοσης των συμπτωμάτων της ασθένειας αυτής στον Βοτρύτη οι ζημιές συχνά είναι αυξημένες, καθώς, ακολουθείται στρατηγική η οποία είναι λανθασμένη για την αντιμετώπιση της ασθένειας (Ρούμπος, 2016).

### 5.3.1 Καρκίνος της αμπέλου- βακτηρίωση

Η ασθένεια της βακτηρίωσης της αμπέλου, οφείλεται στον βιότυπο 3 του *Agrobacterium tumefaciens* που προκαλεί την καθυστέρηση και την ανάπτυξη της αμπέλου λόγω δυσκολιών στην κυκλοφορία των χυμών. Στις περιπτώσεις σοβαρής προσβολής παρατηρείται μαρasmus της αμπέλου, είτε απότομα, είτε βαθμιαία (Ρούμπος, 2016).

Το *Agrobacterium vitis* είναι, παγκόσμια, ο σημαντικότερος πρωταρχικός παράγοντας στον οποίο οφείλεται η ασθένεια. Στα συμπτώματα της ασθένειας συγκαταλέγονται ο σχηματισμός όγκων στα υπέργεια μέρη του φυτού, η νέκρωση των ριζών, λόγω καρπογόνων όσο και μη καρπογόνων στελεχών του. Η αποίκισή του γίνεται μέσω της ενδοφυτικής οδού. Έχει την ικανότητα επιφυτικής επιβίωσης στην άμπελο και ανιχνεύεται στα εδάφη. Λόγω της ύπαρξης του στο αμπέλι, χωρίς εμφανή συμπτώματα, δεν αντιμετωπίζεται άμεσα και διαδίδεται αποτελεσματικά σε μακρινές περιοχές, μέσω της διάθεσης του πολλαπλασιαστικού υλικού με το εμπόριο. Μέσω της χρήσης φυτευτικού υλικού που είναι υγιές, σε εδάφη χωρίς ιστορικό στην ασθένεια της κορυφοβλάστης, γίνεται διαχείριση της ασθένειας του καρκίνου. Πρόσθετα βιολογικά μέτρα συμβάλλουν στην παραγωγή ποικιλιών σταφυλιών, που θα είναι ανθεκτικά έναντι του καρκίνου της αμπέλου. (Kuzmanovic et al., 2018).

Επίσης, για την αντιμετώπισή της, πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία πληγών στις ρίζες και τον λαιμό των πρέμνων και η περαιτέρω εξάπλωσή της, μέσω μεταφοράς του βακτηρίου, με τα ρούχα, τα παπούτσια και τα χέρια των εργατών. Συνιστάται η προσθήκη θείου σε ποσότητες των 100 έως 200 κιλών ανά στρέμμα, η απολύμανση των εργαλείων του κλαδέματος, του χώματος και του πολλαπλασιαστικού υλικού (Ρούμπος, 2016).

Επίσης, νεότερες έρευνες απέδειξαν, μέσω φυλογενωμικής ανάλυσης των διαφόρων στελεχών του *All. Vitis*, ότι αυτό δεν είναι ένα είδος ενιαίας μορφής, αλλά σύμπλεγμα γονιδιωματικών ειδών (Kuzmanovic et al., 2022).

### 5.3.2 Βακτηριακή νέκρωση (τσιλίκ μαράζι) της αμπέλου

Η ασθένεια της βακτηριακής νέκρωσης θεωρείται πολύ παλιά, η οποία πιθανώς μεταφέρθηκε μέσω των Ελλήνων της Μικράς Ασίας, οι οποίοι διατήρησαν την τουρκική εκδοχή του ονόματος της ασθένειας. Διαπιστώθηκε σε πολλές αμπελοκαλλιέργειες της Κρήτης, της Κω, της Λέσβου, της Ζακύνθου και της Πελοποννήσου (Ρούμπος, 2016).

Οι ποικιλίες οι οποίες θεωρούνται ευαίσθητες είναι η Σουλτανίνα και Ραζακί. Τα πρέμνα που έχουν προσβληθεί εμφανίζουν ξηράνσεις στις κεφαλές ή στους βραχίονες και σταδιακά τίθενται εκτός παραγωγής. Την περίοδο της άνοιξης παρατηρείται ότι κάποιες από τις κεφαλές των πρέμνων που έχουν προσβληθεί δεν βλαστάνουν ή βλαστάνουν, αλλά δίνουν βλαστούς ασθενικούς, οι οποίοι οδηγούνται στην αποξήρανση αργότερα. Συνήθως, εντοπίζεται προσβολή στη μία πλευρά του πρέμνου (Ρούμπος, 2016).

Οι κεφαλές που έχουν προσβληθεί εμφανίζονται ελάχιστα διογκωμένες, λόγω της υπερπλασίας των ιστών στην περιοχή του καμβίου. Επίσης, παρατηρούνται και σχισμές επιμήκεις στον φλοιό. Με την αφαίρεση του φλοιού γίνονται ορατές οι υπερπλασίες, στις περιοχές της κεφαλής ή του βραχίονα, και έχουν λευκή έως λευκοπράσινη απόχρωση. Κάτω από τις υπερπλασίες αυτές, παρατηρείται μεταχρωματισμός του ξύλου, όπως φαίνεται στην εικόνα 16, καστανής απόχρωσης και έχει τη μορφή επιμηκών ραβδώσεων. Στις νεαρές κληματίδες, παρατηρούνται κηλίδες ελλειψοειδούς μορφής και μικρές στους μίσχους των φύλλων, αλλά και στη ράχη των βοτρυών. Αυτό το φαινόμενο, έχει ως αποτέλεσμα την ξήρανσή τους, μερική ή ολική. Ο μαρασμός και η νέκρωση ολόκληρου του φύλλου ή τμήματός του, οδηγεί στην πτώση του. Κατά τη διάρκεια της ασθένειας, το παθογόνο διαχειμάζει μέσα στο ξύλο των κεφαλών και των βραχιόνων που έχουν προσβληθεί. Η μόλυνση, η οποία αναπτύσσεται στα σχηματιζόμενα έλκη, μεταφέρεται μέσω των σταγονιδίων της βροχής και μέσω του ανέμου σε πρέμνα γειτονικών περιοχών προκαλώντας νέες μολύνσεις. Η είσοδος του παθογόνου επιτυγχάνεται μέσω των τομών του κλαδέματος ή άλλων πληγών. Η υγρασία παίζει καθοριστικό παράγοντα στην εξάπλωση της ασθένειας αυτής. Μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζουν οι ιστοί της αμπέλου κατά τη χειμερινή περίοδο. Η θερμοκρασία δεν παίζει σημαντικό παράγοντα στην εξάπλωσή της, καθώς, παρατηρήθηκε ότι το βακτήριο αναπτύσσεται μεταξύ 0 και 30 °C (Ρούμπος, 2016).

Για την καταπολέμηση της ασθένειας, απαιτείται η αφαίρεση και το κάψιμο των κεφαλών, των βραχιόνων και των πρέμων που έχουν προσβληθεί, όψιμο κλάδεμα, το οποίο πρέπει να ακολουθείται από ψεκασμό με σκεύασμα χαλκούχο. Επίσης, πρέπει να αποφεύγεται η διαδικασία του κλαδέματος όταν ο καιρός είναι υγρός. Απαιτείται η απολύμανση των εργαλείων με φορμόλη και η αποφυγή χρησιμοποίησης πολλαπλασιαστικού υλικού (Ρούμπος, 2016).

Το έτος 2003, η ασθένεια της βακτηριακής νέκρωσης της αμπέλου είχε τεράστια οικονομική επίπτωση σε αμπελώνες τριών περιοχών της Γαλλίας (Cognac, Armagnac και Die). (Grall & Manceau, 2003).



Εικόνα 16. Τσιλίκ μαράζι (Αντωνόπουλος, 2018)

### 5.3.3 Όξινη σήψη (σακχαρομύκητες και βακτήρια)

Για την ασθένεια της όξινης σήψης θεωρούνται υπεύθυνα παθογόνα τα βακτήρια και οι σακχαρομύκητες. Η ασθένεια παρατηρείται, κατά την περίοδο της ωρίμανσης των βοτρυών και συγκεκριμένα όταν το ποσοστό των σακχάρων πλησιάσει το 10%. Η αύξηση της ευαισθησίας των βοτρυών, παρατηρείται τον καιρό που πλησιάζει η συγκομιδή. Η σήψη ξεκινάει από πληγές της ράγας και επεκτείνεται γρήγορα και στα υπόλοιπα μέρη του σταφυλιού. Μέσω των προσβεβλημένων ραγών, ρέει υγρό το οποίο συμβάλλει στην επέκταση της προσβολής, καθώς, έρχεται σε επαφή και με τις υπόλοιπες ράγες. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της ασθένειας αυτής είναι η οσμή όξους, η οποία αναδύεται από τα τμήματα που έχουν προσβληθεί. Οι ράγες που έχουν προσβληθεί είναι υδαρείς, έχουν απόχρωση καστανή και η επιδερμίδα τους αποκολλάται εύκολα με ελάχιστη πίεση, όπως φαίνεται στην εικόνα 17. Στα προχωρημένα στάδια της προσβολής υπάρχει πολύ εύκολη αποκόλληση των ραγών από τον ποδίσκο και στη συνέχεια πτώση τους (Ρούμπος, 2016).

Η ομάδα στην οποία ανήκουν τα βακτήρια, είναι η ομάδα παραγωγής οξικού οξέος, γι αυτό και δικαιολογείται η οσμή όξους που προαναφέρθηκε. Η εξάπλωση της ασθένειας γίνεται και μέσω του εντόμου *Drosophila melanogaster* (κοινή μύγα του ξυδιού). Η οσμή της σάρακας ελκύει το συγκεκριμένο έντομο, το οποίο αφήνει τα αυγά του ή και σπόρια μυκήτων, βακτηρίων και σακχαρομυκήτων. Ακολουθεί πολλαπλασιασμός αυτών των μικροοργανισμών, οι οποίοι προκαλούν την εκροή του υγρού. Καθώς ρέει αυτό το υγρό οδηγεί σε σχίσμο των ραγών και μόλυνση του εσωτερικού του σταφυλιού. Στην περίπτωση που η μόλυνση και η επέκτασή της γίνεται χωρίς τη συμβολή εντόμου η εξέλιξη της σήψης είναι καθαρά μυκητολογική. Σε περίπτωση όμως της παρουσίας βακτηρίων και σακχαρομυκήτων, η προσβολή θεωρείται περίπλοκη. Στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχει νέκρωση των μυκήτων και πολλαπλασιασμός βακτηρίων και σακχαρομυκήτων.

Οι ποικιλίες που προσβάλλονται σημαντικά είναι ο Ροδίτης και το Ραζακί. Επίσης σε μικρότερα ποσοστά προσβάλλονται το Μοσχάτο Αμβούργου, το Κάρντιναλ και η Σουλτανίνα (Ρούμπος, 2016).

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί η ασθένεια, πρέπει να αποφευχθεί η δημιουργία των πληγών στις ράγες. Σε αυτό συμβάλλει η επιμελής καταπολέμηση του Ωιδίου και της Ευδεμίδας. Στην περίπτωση ύπαρξης της όξινης σήψης, απαιτείται η διενέργεια ψεκασμών με κατάλληλα εντομοκτόνα. Επειδή όμως η εφαρμογή του ψεκασμού γίνεται την περίοδο κοντά στη συγκομιδή, θα πρέπει να επιλέγεται φάρμακο με ιδιαίτερη προσοχή και λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο διενέργειας του τελευταίου ψεκασμού προ της συγκομιδής. Καλύτερα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν στην πράξη μέσω της προσθήκης χαλκούχου σκευάσματος στο σκεύασμα του εντομοκτόνου (Ρούμπος, 2016).

Η ασθένεια της σήψης των τσαμπιών του σταφυλιού που οινοποιείται και οφείλεται κυρίως στον μύκητα *Botrytis cinerea*, αποτελεί πρόβλημα μεγάλης χρονικής διάρκειας περιορίζοντας την παραγωγικότητα αμπελοκαλλιέργειών σε ποικιλίες με τσαμπιά συμπαγή. Πραγματοποιήθηκε μία μελέτη από τους Hed, Ngugi & Travis (2011), σκοπός της οποίας ήταν η αξιολόγηση ψεκασμών με γιββερελικό οξύ (GA), προκειμένου να μειωθεί η συμπαγής σύσταση και η σήψη των τσαμπιών στις ποικιλίες Chardonnay και Vignoles. Διαπιστώθηκε η μείωση του αριθμού των ραγών ανά εκατοστό και η εμφάνιση και σοβαρότητα της σήψης τους στην ποικιλία Vignoles και στην ποικιλία Chardonnay, σε μικρότερο βαθμό, σε διάστημα 3 διαδοχικών χρόνων.

Η αποτελεσματικότητα εξαρτήθηκε και από το χρονικό διάστημα και από το ρυθμό της εφαρμογής των ψεκασμών. Οι εφαρμογές GA, κατά την χρονική περίοδο της άνθησης, ήταν αποτελεσματικότερες συγκριτικά με τους ψεκασμούς πριν από αυτήν. Επίσης, οι αρνητικές επιδράσεις, λόγω των εφαρμογών στον παραγόμενο οίνο, ήταν αμελητέες υπό την προϋπόθεση δόσεων μικρότερων των 25 ppm. (Hed, Ngugi & Travis, 2011).



Εικόνα 17. Όξινη σήψη (ΕΡ.Ο.Σ. – Ερασιτεχνικός Οινοελαιουργικός Σύλλογος Μυκονίων, διαδίκτυο)

#### 5.3.4 Ασθένεια του pierce

Για την εμφάνιση της ασθένειας του Pierce υπεύθυνο είναι το παθογόνο *Xylella fastidiosa*. Τα συμπτώματα της ασθένειας κάνουν την εμφάνισή τους, κατά τα μέσα της καλοκαιρινής περιόδου, και μοιάζουν με αυτά που εκδηλώνονται λόγω της έλλειψης νερού. Τα πρωταρχικά συμπτώματα εκδηλώνονται στα φύλλα, μέσω ξήρανσης ολόκληρης της περιφέρειας ή τμημάτων του ελάσματος. Παρατηρείται η πτώση των φύλλων που έχουν προσβληθεί αφήνοντας το μίσχο επάνω στις κληματίδες. Οι βότρυες σταματούν την ανάπτυξή τους και οδηγούνται σε ξήρανση. Οι κληματίδες, που έχουν αρρωστήσει, δεν ακολουθούν την διαδικασία της κανονικής ωρίμανσης, διατηρούν το πράσινο χρώμα τους ή ωριμάζουν κατά συγκεκριμένες θέσεις, με αποτέλεσμα την ξήρανσή τους, κατά τη διάρκεια της χειμερινής περιόδου. Το ξύλο που έχει προσβληθεί εμφανίζει μεταχρωματισμό των αγγείων του κιτρινοκάστανης απόχρωσης. Στα αρχικά στάδια εκδήλωσης της ασθένειας οι ρίζες εμφανίζονται υγιείς, στη συνέχεια όμως ακολουθεί η αποξήρανσή τους (Ρούμπος, 2016).

Το βακτήριο *Xylella fastidiosa* περιορίζεται στα ξυλώδη αγγεία του φυτού, και έχει την ικανότητα μόλυνσης ενός ευρέως φάσματος φυτών-ξενιστών, προκαλώντας την ασθένεια Pierce όχι μόνο στο αμπέλι, αλλά και σε πολλούς τύπους φυτών, καλλιεργούμενων και καλλωπιστικών και δασικών δέντρων. Το 2013, στην νότια Ιταλία και συγκεκριμένα στην περιοχή της Απουλίας προκάλεσε ασθένεια με καταστροφικές συνέπειες στην *Olea europaea*



(γρήγορη παρακμή). Το βακτήριο αυτό συνέχισε την εξάπλωση και την εγκατάστασή του σε περιοχές χωρών της Ευρώπης (Κορσική Γαλλίας, Βαlearίδες Νήσοι, Μαδρίτη Ισπανίας και Πόρτο Πορτογαλίας). Μέσω πρόσφατων δεδομένων για την ευρωπαϊκή ήπειρο διαπιστώθηκε η παρουσία *X. fastidiosa* σε 174 ξενιστές. Έξι υποείδη του *X. Fastidiosa*, αναφέρθηκαν παγκόσμια. Τα τέσσερα καταγράφηκαν στις ευρωπαϊκές χώρες. Για την αντιμετώπισή του, προτείνεται η χρησιμοποίηση πολλαπλασιαστικού υλικού απαλλαγμένου από παθογόνα, η εκρίζωση, η οριοθέτηση των περιοχών και ο έλεγχος των φορέων, ταυτόχρονα με τη χρήση ποικιλιών της αμπέλου, που είναι ανθεκτικές στις βακτηριοκτόνες θεραπείες. (Trkulja et al., 2022).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΛΛΟΙΩΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΚΑΙ ΤΟ ΑΜΠΕΛΙ

### 6.1 Εισαγωγή

Το κρασί θεωρείται προϊόν των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν μεταξύ των μυκήτων, των ζυμών και των βακτηρίων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, που ξεκινάν από τους αμπελώνες, εξακολουθούν σε όλη τη διαδικασία της ζυμωτικής περιόδου έως και τη συσκευασία του οίνου. Παρ' όλο που τα θεμέλια της γεύσης του οίνου είναι η ποικιλία και ο τρόπος αμπελοκαλλιέργειας, έχει διαπιστωθεί ακόμα ότι η λεπτότητα και η ατομικότητα της γευστικής απόκρισης επηρεάζονται από τους μικροοργανισμούς και ειδικότερα τις ζύμες. Επομένως, είναι αναγκαίο να προσδιοριστεί και να κατανοηθεί ο τρόπος των οικολογικών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν ανάμεσα σε διάφορες μικροβιακές ομάδες (είδη και στελέχη). Μεταξύ των αλληλεπιδράσεων αυτών, συγκαταλέγονται οι αντιδράσεις ζύμης και ζυμομύκητα, ζυμομύκητα και μυκήτων και ζυμομύκητα και βακτηρίων (Fleet, 2003).

Στην επιφάνεια των σταφυλιών που είναι υγιή και ανάλογα με το στάδιο της ωρίμανσης επικρατούν τα είδη *Metschnikowia*, *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) και *Rhodotorula*. Αυτού του είδους η μικροχλωρίδα συμβάλλει στον μετριασμό της ανάπτυξης μυκήτων με μυκητοξινογόνα δράση και των αλλοιώσεων στα σταφύλια, στα στελέχη και τα είδη των ζυμομυκήτων, οι οποίοι συμβάλλουν στη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης και στα βακτήρια, που συμβάλλουν στη διαδικασία της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Τα σταφύλια, που έχουν καταστραφεί, οδηγούν σε αύξηση των πληθυσμών των βακτηρίων του γαλακτικού και του οξικού οξέος, γεγονός το οποίο επηρεάζει, κατά την εξέλιξη της διαδικασίας αλκοολικής ζύμωσης, τις ζύμες. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της αλκοολικής ζύμωσης είναι η ανάπτυξη στελεχών και ειδών ζύμης, διαφορετικών μεταξύ τους, διαδοχικά, με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μαγιάς και ζύμης να είναι καθοριστικές. Μέσω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ζυμών και βακτηρίων, καθορίζεται η εξέλιξη της διαδικασίας της μηλογαλακτικής ζύμωσης και η πιθανή ανάπτυξη βακτηρίων, υπεύθυνων για την αλλοίωση του τελικού προϊόντος (Fleet, 2003).

Το κρασί παράγεται μέσω ζύμωσης του γλεύκους των σταφυλιών, όπου η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* έχει τον σημαντικότερο ρόλο. Κίνδυνοι μικροβιακής προέλευσης από το στάδιο του τρύγου έως και το στάδιο της εμφιάλωσης του οίνου, απειλούν την οινοποιητική διαδικασία. Οι ζύμες που είναι μολυσματικές παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις ως προς το δυναμικό της

αλλοίωσης και τη συχνότητα της εμφάνισης. Μεταξύ των πιο επικίνδυνων συγκαταλέγονται τα *Dekkera bruxellensis*, ο *Zygosaccharomyces bailii* και ο *Saccharomyces cerevisiae*. Αυτές οι ζύμες έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε οίνους που για την παραγωγή τους έχει ακολουθηθεί ορθή πρακτική. Το πρώτο είδος ευθύνεται για κακοσμίες, λόγω της παραγωγής πτητικών φαινολών σε ερυθρό κρασί εμφιαλωμένο ή χύμα. Τα άλλα δύο είδη, έχουν τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού σε οίνους εμφιαλωμένους δημιουργώντας ιζήματα που είναι ορατά ή με έντονη θολότητα. Επίσης, γεύσεις δυσάρεστες σε οίνους μη εμφιαλωμένους αποτρέπονται εύκολα μέσω λήψης κατάλληλων τεχνολογικών μέτρων (Malfeito-Ferreira & Silva, 2019).

Σημαντική είναι η ανάπτυξη κατάλληλων μεθοδολογιών και η εκπαίδευση των οινοποιών, προκειμένου να έχουν την ικανότητα να τις αξιοποιούν με πρακτικούς τρόπους για την αντιμετώπιση των μολυσματικών ζυμομυκήτων και την αποφυγή αλλοίωσης του παραγόμενου οίνου (Malfeito-Ferreira & Silva, 2019).

Κατά την διαδικασία αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους από ζυμομύκητες, οι οινοπαραγωγοί έχουν τη δυνατότητα να δημιουργήσουν τον χαρακτήρα και την αξία του παραγόμενου οίνου, μέσω διαδικασιών που βελτιώνουν τη διαχείριση της ζύμης, με άμεσα αποτελέσματα στην στρατηγική προώθησης του οίνου σε μια αγορά που συνεχώς μεταβάλλεται. (Fleet, 2008).

## 6.2 Βακτήρια οξικού οξέος

### 6.2.1 Ταξινομική και μεταβολισμός των βακτηρίων του οξικού οξέος

Τα βακτήρια του οξικού οξέος είναι βάκιλλοι. Τα βακτήρια αυτά είναι αρνητικά κατά Gram, αερόβια, θετικά στην αντίδραση της καταλάσης και η οικογένεια στην οποία ανήκουν είναι η *Acetobacteraceae*. Τα βακτήρια αυτά απομονώθηκαν αρχικά από τα άνθη, τα φρούτα το κρασί και την μύρα και είναι οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που συμβάλλουν στην παραγωγή του ξυδιού (Νεραντζής κ.α., 2015).

Τα είδη *A.aceti* και *A.Pasteurianus* απομονώθηκαν από σταφύλια και γλεύκη. Οι ζυμομύκητες των σταφυλιών συμβάλλουν στον μεταβολισμό των σακχάρων σε αλκοόλη, η οποία ακόλουθα μετατρέπεται σε οξικό οξύ μέσω των βακτηρίων αυτών. Λόγω του γεγονότος ότι, τα βακτήρια του οξικού οξέος είναι αερόβια κατά την οινοποίηση εμποδίζεται η ανάπτυξή τους, καθώς, το περιβάλλον της είναι αναερόβιο (Νεραντζής κ.α., 2015).

Τα βακτήρια αυτά παράγουν οξικό οξύ, μέσω οξείδωσης της αιθανόλης, υπό την βοήθεια δύο ενζύμων τα οποία συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη. Τα δύο ένζυμα αυτά είναι, η αλκοολική αφυδρογονάση και η αλδεϋδική αφυδρογονάση. Ο ρόλος της αλκοολικής αφυδρογονάσης είναι αυτός της οξείδωσης της αιθανόλης σε ακεταλδεϋδη. Στην συνέχεια, η ακεταλδεϋδη οξειδώνεται σε οξικό οξύ, μέσω της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης. Κατά την διάρκεια που αναπτύσσονται αυτά τα οξέα στον οίνο χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα την γλυκόζη (Νεραντζής κ.α., 2015).

Το οξικό οξύ θεωρείται οργανικό οξύ ασθενές, το οποίο επιδρά τοξικά σε μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών, με συγκεντρώσεις της τάξης του 0,5 % κατά βάρος. Μέσω της διάσπασης του οξικού οξέος, η οποία συμβαίνει στα μικροβιακά κύτταρα και συγκεκριμένα στο εσωτερικό τους, προκαλείται μείωση του ενδοκυτταρικού pH, καθώς, και λόγω συνόλου μεταβολικών διαταραχών από το ανιόν, εμφανίζεται τοξικότητα. Λόγω αυτών των μικροβιακών μηχανισμών αναστολής, επιτρέπεται η χρήση του οξικού οξέος σαν συντηρητικό μέσο, παρ' όλο τον περιορισμό της χρησιμότητάς του, λόγω εμφάνισης στελεχών με υψηλή ανοχή στις αλλοιώσεις. Αναστολή αρκετών βιοτεχνολογικών διεργασιών, π.χ. οινοποίησης, παρατηρείται λόγω της συσσώρευσης του οξικού οξέος στο μέσο ανάπτυξης (Trček, Mira, Jarboe & Trcek, 2015).

#### 6.2.2 Αλλοίωση του οίνου από βακτήρια του οξικού οξέος

Η μεγάλη ποσότητα παραγωγής του οξικού οξέος έχει καθοριστικό ρόλο στο φαινόμενο της αλλοίωσης του οίνου. Αποδεκτή θεωρείται η συγκέντρωσή του, όταν είναι της τάξης μεταξύ των 1,2 έως και 1,4 g/L. Η αποδεκτή αυτή συγκέντρωση, δυστυχώς, υποβαθμίζει την ποιότητα του οίνου που παράγεται. Επίσης, ο οξικός αιθυλεστέρας είναι μία άλλου είδους ένωση, η οποία έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα του οίνου. Από τα βακτήρια του οξικού οξέος παράγονται και άλλες ουσίες, οι οποίες επίσης έχουν την ιδιότητα να επηρεάζουν την ποιότητα του οίνου αρνητικά. Αυτές οι ουσίες είναι, η ακετοΐνη, η διϋδροξυακετόνη και η ακεταλδεϋδη (Νεραντζής κ.α., 2015).

Στην διαδικασία της οινοποίησης στη σημερινή εποχή, και προκειμένου να μην απορριφθεί ο παραγόμενος οίνος από τους καταναλωτές, σημαντική πρόκληση αποτελεί ο έλεγχος της ποσότητας παραγωγής οξικού οξέος από τα βακτήριά του.

Στόχος είναι η επινόηση ενός οικονομικά βιώσιμου και εύχρηστου μέσου υγρής καλλιέργειας, που θα συμβάλλει στην ανίχνευση, προληπτικά, των μικροοργανισμών που έχουν την

ικανότητα παραγωγής οξικού οξέος στον οίνο. Στην έρευνα των Parra, Ovejas, González-Arenzana, Gutiérrez & López-Alfaro (2023), χρησιμοποιήθηκε ένα τροποποιημένο μέσο το οποίο, ενσωματώνοντας θρεπτικές ουσίες συγκεκριμένης σύστασης, ευνόησε την ανάπτυξη των βακτηρίων του οξικού οξέος και οδήγησε σε αύξηση της επιλεκτικότητας. Διαπιστώθηκε ότι κάτω από συγκεκριμένες και διαφορετικές συνθήκες και μέσω της χρήσης διαφορετικών τύπων οίνου, ήταν δυνατή η σύγκριση εμφάνισης οσμής και οξικού οξέος, με δοκιμές του μέσου αυτού μαζί με δείγματα εμβολιασμένα. Ως αποτέλεσμα, παράχθηκε ένα υγρό μέσο, το οποίο βασίστηκε στην οσμομετρία και σχεδιάστηκε, ώστε να διευκολυνθεί το προσωπικό που εκπαιδεύτηκε κατάλληλα, στην χρήση του στα οινοποιεία, χωρίς την απαίτηση ύπαρξης περίπλοκου εργαστηριακού εξοπλισμού (Parra et al., 2023).

### 6.2.3 Τα βακτήρια του οξικού οξέος στην εμφιάλωση

Πάντα υπήρχε η αίσθηση ότι, τα βακτήρια του οξικού οξέος αναπτύσσονται μόνο αερόβια. Δυστυχώς, αυτό δεν ισχύει για τον οίνο, ο οποίος θεωρείται ότι κατά την αποθήκευσή του σε βαρέλια είναι ασφαλής, λόγω του ότι δεν μπορούν να αναπτυχθούν οξικά βακτήρια. Παρόλα αυτά, κατόπιν μελετών που έχουν διεξαχθεί και αφού λήφθηκαν δείγματα από την βάση βαρελιών και δεξαμενών, διαπιστώθηκε ότι οι συνθήκες στα σημεία όπου διενεργήθηκε η δειγματοληψία ήταν ή αναερόβιες ή οι μη αναερόβιες (Νεραντζής κ.α., 2015).

Υποστηρίχθηκε ότι, το οξυγόνο έχει την ικανότητα να διαπερνά το ξύλο στο βαρέλι σε συγκεκριμένη ποσότητα 30 mg/L τον χρόνο. Αυτή η ποσότητα είναι ικανή για να επιτρέψει στα βακτήρια αυτά να επιβιώσουν σε χαμηλούς πληθυσμούς. Υποστηρίχθηκε, επίσης, ότι σε οίνους ερυθρών ποικιλιών, έστω και ελάχιστος αερισμός του κρασιού, ο οποίος οφείλεται στην άντληση κατά την διάρκεια διάφορων μεταγγίσεων, είναι ικανός να οδηγήσει σε ανάπτυξη τέτοιων βακτηρίων, βακτηρίων δηλαδή του οξικού οξέος, ακόμα και στις περιπτώσεις που πραγματοποιείται η διαδικασία θείωσης. Ο κίνδυνος για την καταστροφή του κρασιού από βακτήρια αυτού του είδους, αυξάνεται κατά την διάρκεια που αποθηκεύονται μεγάλες ποσότητες στα κελάρια και προ της εμφιάλωσης. Επίσης, έχει διαπιστωθεί η παραγωγή πολυσακχαριτών βιομηχανικού ενδιαφέροντος από τα βακτήρια αυτά (Νεραντζής κ.α., 2015).

### 6.3 Βακτήρια του γαλακτικού οξέος

Τα βακτήρια τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για την βιοχημική μετατροπή του γλεύκους σε κρασί είναι τα γαλακτικά. Τα βακτήρια αυτά τα βρίσκουμε σε όλα τα γλεύκη, καθώς, και σε όλους του οίνους που παράγονται από τις διάφορες ποικιλίες των αμπελιών (Νεραντζής κ.α., 2015) .

Η σημασία τους είναι εξαιρετική για την οινολογία, καθώς, λόγω αυτών, διενεργείται η μηλογαλακτική ζύμωση, αλλά ταυτόχρονα είναι υπεύθυνα και για ασθένειες διαφόρων ειδών, που οδηγούν στην υποβάθμιση της ποιότητας των οίνων (Νεραντζής κ.α., 2015).

Τα αποτελέσματα αυτής της αρνητικής επίδρασής τους στην ποιότητα των οίνων που παράγονται, δεν εξαρτώνται μόνο από παράγοντες του περιβάλλοντος, αλλά και από την επιλογή των βακτηρίων, τα είδη και τα στελέχη τους. Η ικανότητα που έχουν τα βακτήρια στον πολλαπλασιασμό τους, εξαρτάται άμεσα από το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η διαδικασία της οиноποίησης, καθώς, και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος (Νεραντζής κ.α., 2015).

Μέσω της ανάπτυξής τους μεταβολίζεται ένας μεγάλος αριθμός υποστρωμάτων. Κοινό γνώρισμα όλων είναι, μέσω του μεταβολισμού των σακχάρων και των βιοχημικών μονοπατιών της ετεροζύμωσης ή της ομοζύμωσης, η παραγωγή του γαλακτικού οξέος. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι οργανισμοί προκαρυωτικοί, των οποίων η οργάνωση κυτταρικά, θεωρείται εξαιρετικά απλή και είναι παρόμοια για τα βακτήρια όλων των ειδών (Νεραντζής κ.α., 2015).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι μικροοργανισμοί που συμβάλλουν στην ζυμωτική διαδικασία. Έχουν συνδεθεί με σημαντικά οφέλη για την υγεία, γι' αυτό και έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών. Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα σύνθεσης βιταμινών και μετάλλων, παραγωγής βιολογικά ενεργών πεπτιδίων με ένζυμα (πρωτεϊνάση, πεπτιδάση) και απομάκρυνσης ορισμένων μη θρεπτικών συστατικών. Τα βιολογικά ενεργά πεπτίδια είναι οι ενώσεις στις οποίες βασίζεται η ζύμωση. Τα τρόφιμα που έχουν ζυμωθεί, επομένως και το κρασί πιστεύεται ότι δρουν αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά, αντιμυκητιασικά, προστατεύοντας από φλεγμονές, τον διαβήτη και την αθηρωμάτωση (Şanlier, Gökçen & Sezgin, 2017).

Από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, ειδικά το βακτήριο *Oenococcus oeni*, συμβάλλει θετικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Άλλα είδη όμως, όπως τα *Lactobacillus sp.* και το *Pediococcus sp.* ευθύνονται για την παραγωγή ανεπιθύμητων πτητικών ενώσεων.

Στις επιπτώσεις από βακτηριακή αλλοίωση των οίνων περιλαμβάνονται φαινόμενα μούχλας, πικράδας, πτητικής οξύτητας, λιπαρής και γλοιώδους υφής και εμφάνιση βουτυρώδους χαρακτήρα. Για τη διαχείριση των αλλοιώσεων του οίνου από βακτήρια, είτε προστίθεται διοξείδιο του θείου, είτε χρειάζονται παρόμοιοι χειρισμοί με αυτούς για τον έλεγχο της οξύτητάς του (Bartowsky, 2009).

Οι έρευνες αναφορικά με τα είδη που συμμετέχουν στη μηλογαλακτική ζύμωση, τα γενετικά δεδομένα τους και τη βιοχημεία τους (*Oenococcus oeni* και *Lactobacillus*), συνέβαλαν στην κατανόηση του ρόλου τους, ως προς την τροποποίηση του αρώματος, αλλά και τη σταθερότητα του οίνου μικροβιακά. Μέσω της χρήσης των μοριακών τεχνικών, παρέχονται στοιχεία αναφορικά με την υψηλή ποικιλότητα σε είδη και στελέχη, και έτσι βελτιώνονται οι γνώσεις ταξινόμιας και οικολογίας τους (lactic acid bacteria - LAB του οίνου). Επίσης, ανιχνεύονται στελέχη με επιθυμητά ή μη χαρακτηριστικά για τους σκοπούς της οινοποίησης. Ταυτόχρονα, πρόοδοι σημειώθηκαν αναφορικά με τις ιδιότητες του LAB ενζυματικού χαρακτήρα, που ευθύνονται για την ανάπτυξη των μορίων που σχετίζονται με το άρωμα του οίνου. Η ποικιλομορφία γενετική και βιοχημικού περιεχομένου των πληθυσμών LAB του οίνου είναι δυνατόν να δημιουργήσει αισθητηριακά αποτελέσματα στο κρασί ευρέου φάσματος (Carpello, Zapparoli, Logrieco, & Bartowsky, 2017).

### **6.3.1 Ανάπτυξη και εξέλιξη των γαλακτικών βακτηρίων κατά την διάρκεια παραγωγής του οίνου**

Η ανάπτυξη και εξέλιξη των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, της παραγωγής δηλαδή του οίνου, ακολουθεί τα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, της λανθάνουσας φάσης, της μηλογαλακτικής ζύμωσης και του τέλους της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Κατόπιν των σταδίων αυτών, ακολουθεί η διαδικασία της παλαίωσης (Νεραντζής κ.α., 2015).

Κατά τις πρώτες ημέρες της αλκοολικής ζύμωσης, παρατηρείται πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και των ζυμών. Οι ζύμες, βέβαια, εξαιτίας της καλύτερης προσαρμογής που επιδεικνύουν στο γλεύκος επικρατούν. Πάρα το γεγονός ότι, τα γαλακτικά βακτήρια έχουν χαρακτηριστική ανθεκτικότητα κατά την παραγωγή του γαλακτικού οξέος, τα οξέα του γλεύκους, έχουν τη ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξή τους (Νεραντζής κ.α., 2015).

Ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων εξαρτάται από το pH, καθώς, και από το επίπεδο της θείωσης του γλεύκους. Ακολούθως, κατά τη φάση που συμβαίνει η έντονη αλκοολική ζύμωση



μέχρι και το στάδιο αποικοδόμησης των σακχάρων, παρατηρείται εμφανής μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η λανθάνουσα φάση, που ακολουθεί την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, έχει διάρκεια ακόμη και μερικών μηνών, στην περίπτωση που το pH, η θερμοκρασία και η αιθανόλη έχουν τέτοιες τιμές που θα το επιτρέψουν. Η συνήθης διάρκεια της λανθάνουσας φάσης είναι μερικές ημέρες. Κατά την μηλογαλακτική ζύμωση, παρατηρείται ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων. Η διάρκεια του συγκεκριμένου σταδίου εξαρτάται, άμεσα, από την σύσταση του μέσου. Η επόμενη φάση που ακολουθεί είναι η φάση της στασιμότητας (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης συμπίπτει με τη φάση κατά την οποία τα γαλακτικά βακτήρια φθίνουν. Αφού γίνει η αποικοδόμηση του μηλικού οξέος, ακολουθεί η διαδικασία της θείωσης με σκοπό την εξάλειψη των βακτηρίων. Στην περίπτωση που δεν θειωθεί ο οίνος, τότε παρατηρείται ότι, τα βακτήρια συνεχίζουν να επιβιώνουν για αρκετούς μήνες, με τα αποτελέσματα να είναι δυσάρεστα για τους οίνους που παράγονται (Νεραντζής κ.α., 2015).

Συγκεκριμένα, αναπτύσσονται ασθένειες, παρατηρούνται σφάλματα οργανοληπτικά και παράγονται βιογενείς αμίνες και ουρεθάνη. Η δράση, στη φάση αυτή των βακτηρίων, εξαρτάται άμεσα από την θερμοκρασία που επικρατεί (Νεραντζής κ.α., 2015).

Κατά την διαδικασία της παλαίωσης, η επιβίωση των γαλακτικών βακτηρίων είναι ευκολότερη στα βαρέλια, συγκριτικά με τις δεξαμενές. Παρατηρήθηκε ότι, ο πληθυσμός τους, όταν η παλαίωση πραγματοποιείται σε βαρέλι, μειώνεται πολύ λίγο παρά την ύπαρξη του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη (Νεραντζής κ.α., 2015).

Όταν οι συνθήκες οινοποίησης χαρακτηρίζονται κανονικές, παρατηρείται, πρωταρχικά αύξηση των ζυμών και μετά την αποικοδόμηση των σακχάρων, ξεκινάει ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων. Στην περίπτωση όμως, που κατά τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων υπάρχουν εναπομείναντα σάκχαρα αυτά χρησιμοποιούνται από τα βακτήρια τα ετεροζυμωτικά, έχοντας ως συνέπεια την αύξηση της πτητικής οξύτητας του οίνου (Νεραντζής κ.α., 2015).

### **6.3.2 Ο μεταβολισμός των γαλακτικών βακτηρίων και οι εκτροπές του οίνου**

Το σύνολο των αντιδράσεων, που πραγματοποιούνται για την αποικοδόμηση ή αλλιώς τον καταβολισμό και το σύνολο των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται για την σύνθεση ή αλλιώς αναβολισμό, αποτελούν τον μεταβολισμό του κυττάρου των γαλακτικών βακτηρίων. Μέσω των καταβολικών αντιδράσεων παράγεται ενέργεια σε μορφή, η οποία είναι βιολογικά



εύχρηστη, ATP, και επίσης παράγεται δύναμη αναγωγική, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται η παραγωγή των πρόδρομων ουσιών, οι οποίες ευθύνονται για την σύνθεση των συστατικών από τα οποία αποτελείται το κύτταρο. Οι αντιδράσεις του αναβολισμού, έχουν ως στόχο να συνθέσουν τα μοριακά συστατικά των κυττάρων, τα οποία είναι τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια, οι υδατάνθρακες, οι δομικές και οι βιολογικά ενεργές πρωτεΐνες. Αυτός είναι και ο λόγος, που παρατηρείται στις αντιδράσεις αυτές κατανάλωση ενέργειας, η οποία προέρχεται από την οξειδωτική διάσπαση π.χ. των σακχάρων ή γενικότερα των μακρομορίων. Για τον μεταβολισμό, τα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούν για υποστρώματα απλές ενώσεις, κυρίως, τα σάκχαρα αλλά και τα οργανικά οξέα. Παρατηρείται μερικός μεταβολισμός άλλων πιο πολύπλοκων ενώσεων. Μεταξύ αυτών είναι τα φαινολικά και αρωματικά συστατικά, καθώς, και οι πρόδρομες αρωματικές ενώσεις μικρών ποσοτήτων. Η επίδραση του μετασχηματισμού τους στα αρωματικά χαρακτηριστικά του οίνου χαρακτηρίζεται εξίσου σημαντική με αυτή των κύριων αντιδράσεων. Το υπόστρωμα, το οποίο μπορεί να μεταβολιστεί από το σύνολο των ειδών των γαλακτικών βακτηρίων, είναι το μηλικό οξύ. Αυτός είναι και ο μετασχηματισμός, ο οποίος είναι πραγματικά επιθυμητός, καθώς, η αντικατάσταση του μηλικού από το γαλακτικό οξύ επιδρά σημαντικά σε οίνους υψηλής οξύτητας. Το σύνολο των υπόλοιπων μεταβολισμών είναι ανεπιθύμητοι, καθώς, επιφέρουν σημαντικές αλλοιώσεις στους οίνους και ταυτόχρονα προκαλούν πολλές ασθένειες (Νεραντζής κ.α., 2015).

#### **6.4 Αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών των οίνων**

Στο γλεύκος περιέχεται ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών διαφόρων ποικιλιών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποτελούνται από τις ζύμες, τα γαλακτικά και τα οξικά βακτήρια. Ένα μέρος των μικροοργανισμών προέρχεται από την ράγα της αμπέλου, ένα άλλο μέρος από τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται κατά τον τρύγο και ένα άλλο μέρος από τα εξαρτήματα, αλλά και τα μηχανήματα του οινοποιείου (Νεραντζής κ.α., 2015).

Κάποιοι από αυτούς τους μικροοργανισμούς καταφέρνουν να επιβιώσουν, μέσω της φυσικής επιλογής, η οποία εξαρτάται από τις συνθήκες του μέσου ανάπτυξης και από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών, ανταγωνιστικές ή συνεργιστικές. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, παρατηρούνται ανάμεσα στις ζύμες και στα βακτήρια, αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικά είδη και στελέχη του ίδιου μικροοργανισμού (Νεραντζής κ.α., 2015).

Από αυτή την τεράστια ποικιλία των αλληλεπιδράσεων, μόνο ένα μέρος είναι γνωστό μέχρι σήμερα. Από τις σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν, κατά την διάρκεια της ζύμωσης, είναι αυτές μεταξύ των ζυμών και των βακτηρίων (Νεραντζής κ.α., 2015).

Πολλά από τα είδη και τα στελέχη των ζυμών είτε συνυπάρχουν είτε αλληλεπιδρούν, τόσο με το περιβάλλον τους, όσο και μεταξύ τους κατά τη ζυμωτική διαδικασία. Οι αλληλεπιδράσεις ζύμης με ζύμη πραγματοποιούνται από τα αρχικά στάδια της, συμβάλλοντας στον καθορισμό της δομής και της δυναμικής της κοινότητάς τους κατά την εξέλιξη της διαδικασίας. Οι διαφορετικοί τύποι των αλληλεπιδράσεων αυτών, όπως η αμοιβαία σχέση και ο κοινοτισμός ή ο ανταγωνισμός, οι οποίες σχετίζονται με τις μεταβολικές δραστηριότητές τους, ασκούν επιδράσεις είτε θετικές είτε αρνητικές στους πληθυσμούς των ζυμών, επηρεάζοντας το αναλυτικό προφίλ του οίνου και διαμορφώνοντας τον χαρακτήρα του (Zilelidou & Nisiotou, 2021).

#### 6.4.1 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών και των γαλακτικών βακτηρίων

Γενικά οι ζύμες κυριαρχούν έναντι των βακτηρίων. Μέσω του εμβολιασμού του γλεύκους με *Saccharomyces Cerevisiae* και διάφορους λακτοβάκιλλους ή *Saccharomyces Cerevisiae* και *Oenococcus oeni*, σε συγκεντρώσεις ίσες μεταξύ τους, παρατηρείται ολοκληρωτική εξάλειψη των λακτοβάκιλλων μετά τη πάροδο οκτώ ημερών. Ταυτόχρονα, το *O.oeni* εξαφανίζεται αργά, ενώ κάποια ποσότητα κυττάρων παραμένει μικρή. Στην περίπτωση του εμβολιασμού του γλεύκους με ποσότητα βακτηρίων δεκαπλάσια έως και εκατονταπλάσια, παρατηρείται ότι αυτά παραμένουν ζωντανά για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο. Τελικά όμως, εξαφανίζονται, με εξαίρεση το βακτήριο *O. Oeni*, το οποίο φαίνεται να προσαρμόζεται καλύτερα στις συνθήκες, κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η οινοποίηση (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του *Saccharomyces Cerevisiae* και του *O.oeni* έχει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο έχει μελετηθεί περισσότερο. Στην περίπτωση που εμβολιαστεί γλεύκος, με περιεκτικότητα 220 g σακχάρων ανά L, με τα δύο αυτά είδη, παρατηρείται ότι, ο αριθμός των ζυμών αυξάνεται θεαματικά στα αρχικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ ταυτόχρονα, ο αριθμός των βακτηρίων μειώνεται (Νεραντζής κ.α., 2015).

Ακολούθως, συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο. Τη στιγμή που συμβαίνει ο θάνατος των ζυμών παρατηρείται ταχύτατη αύξηση των βακτηρίων. Οι ζύμες έχουν δράση ανταγωνιστική έναντι των βακτηρίων. Η αύξηση των ζυμών οφείλεται σε τροφοπενίες των βακτηρίων. Κατά τη φάση

που οι ζύμες αναπτύσσονται γρήγορα αποικοδομούν τα αμινοξέα που υπάρχουν στο γλεύκος. Οι τροφοπενίες των βακτηρίων όταν συνοδεύονται από τοξικούς μεταβολίτες, οι οποίοι απελευθερώνονται από τις ζύμες, οδηγούν στην παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού τους (Νεραντζής κ.α., 2015).

Αρχικά, μετά τις τρεις έως τέσσερις πρώτες ημέρες η παραγόμενη αλκοόλη δεν έχει αρνητική δράση, καθώς, η συγκέντρωση σε αιθανόλη (τάξης 5-6%vol) έχει θετική δράση στα βακτήρια και την ανάπτυξή τους. Από τις ζύμες απελευθερώνονται λιπαρά οξέα, τα οποία είναι τοξικά, και οδηγούν σε τροποποίηση της κυτοπλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων. Κατά την επώαση των κυττάρων με την παρουσία αυτών των οξέων συμβαίνει απώλεια σε ATP και μειώνεται η ενεργότητα του γαλακτικού ενζύμου. Κατά τη διάρκεια που οι ζύμες εισέρχονται σε φάση στασιμότητας λαμβάνουν χώρα δύο γεγονότα. Παρατηρείται πολλαπλασιασμός κάποιων κυττάρων και επίσης η λύση και ο θάνατος κάποιων άλλων. Κατά τη λύση των τελευταίων, παρατηρείται η απελευθέρωση αζωτούχων βάσεων, πεπτιδίων, βιταμινών και αμινοξέων, τα οποία έχουν το ρόλο αυξητικού παράγοντα για τα βακτήρια. Όπως αποδεικνύεται κατά το στάδιο που τελειώνει η αλκοολική ζύμωση οι ζύμες βοηθούν τα κύτταρα να αναπτυχθούν. Ταυτόχρονα με τη διαδικασία αυτή παρατηρείται ότι τα βακτήρια συμβάλλουν στην αναστολή ανάπτυξης των ζυμών και στην επιτάχυνση του θανάτου τους, καθώς, λόγω της δράσης της γλυκοσιδάσης και της πρωτεάσης υδρολύεται το κυτταρικό τοίχωμα των ζυμών, που στη συνέχεια καταλήγει στη λύση του κυττάρου (Νεραντζής κ.α., 2015).

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών και των βακτηρίων εξαρτώνται άμεσα από το μέσο ανάπτυξης και τις συνθήκες που επικρατούν σ' αυτό (PH). Μέσω της αύξησης του PH ευνοείται η ανάπτυξη των βακτηρίων. Επίσης, η διαδικασία της θείωσης στο αρχικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης συμβάλλει στη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού και στον πολλαπλασιασμό των ζυμών. Καταλήγοντας, μέσω της ορθής χρήσης του SO<sub>2</sub>, επιτρέπεται ο έλεγχος των μικροβιακών πληθυσμών και αποφεύγονται οι βακτηριακές προσβολές, ενώ ταυτόχρονα αντιμετωπίζονται οι δυσκολίες που αφορούν την έναρξη καθώς και τη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης με ορθό τρόπο. Στην περίπτωση ύπαρξης υπολειμμάτων ζυμών, παρατηρείται η ανάπτυξη των βακτηρίων (Νεραντζής κ.α., 2015).

#### 6.4.2 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων

Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα απελευθέρωσης ουσιών, οι οποίες έχουν παρεμποδιστική και αντιμικροβιακή δράση. Αυτές οι ουσίες μπορεί να είναι είτε απλές, όπως π.χ. το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή τα

οργανικά οξέα, είτε πολύπλοκες. Οι βακτηρισίνες αποτελούν μια πρωτεϊνική κατηγορία ενώσεων, οι οποίες έχουν δράση αντιβακτηριακή. Η δράση τους θεωρείται μικρού εύρους και περιορίζεται στο είδος και στο στέλεχος από το οποίο παράγονται. Οι βακτηρισίνες, ανήκουν στις ενώσεις που θεωρούνται πολύ εξειδικευμένες και πιστεύεται, ότι κάθε στέλεχος οδηγεί στην παραγωγή και μίας ειδικής βακτηριοσίνης (Νεραντζής κ.α., 2015).

Έως σήμερα, έχει γίνει ταυτοποίηση των βακτηριοσίνων μπρεβισίνη και καζεϊσίνη. Η πρώτη έχει δράση μεγάλου εύρους και βοηθά στην παρεμπόδιση εκτός από τα στελέχη του *L. Brevis* και στα στελέχη των *O. oeni* και *P. damnosus*. Η δεύτερη έχει δράση μόνο σε στελέχη του *L. casei* (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η μπρεβισίνη θεωρείται πρωτεΐνη θερμοανθεκτική, η οποία παραμένει σταθερή σε καταστάσεις μεγάλων διακυμάνσεων του pH. Η καζεϊσίνη θεωρείται ασταθής και έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο (Νεραντζής κ.α., 2015).

#### 6.4.3 Βακτηριοφάγοι

Βακτηριοφάγοι ονομάζονται οι ιοί, οι οποίοι έχουν την ικανότητα ολοκληρωτικής καταστροφής καλλιεργειών, οι οποίες έχουν ευαίσθητα βακτηριακά στελέχη. Οι βακτηριοφάγοι που υπάρχουν στο γλεύκος έχουν την ικανότητα προσβολής των βακτηρίων, με σκοπό να πολλαπλασιαστούν (Νεραντζής κ.α., 2015).

Μέσω της χρήσης του γενετικού υλικού και του ενζυμικού συστήματος του κυττάρου ξενιστή, μπορούν να αντιγράψουν το δικό τους DNA και έτσι να καλύψουν τις ανάγκες που έχουν. Η επίδρασή τους επί του πληθυσμού των βακτηρίων, εξαρτάται άμεσα από το αν θεωρούνται μέτριας βλαπτικότητας φάγοι ή θεωρούνται θανατηφόροι (Νεραντζής κ.α., 2015).

Στην πρώτη περίπτωση, που θεωρούνται μέτριας βλαπτικότητας φάγοι, το γενετικό τους υλικό παραμένει ακέραιο εντός του βακτηριακού χρωμοσώματος, και μπορεί να αντιγραφεί και να μεταβιβαστεί μαζί με το DNA του βακτηρίου στα βακτηριακά θυγατρικά κύτταρα (Νεραντζής κ.α., 2015).

Στην δεύτερη περίπτωση παρατηρείται πολλαπλασιασμός του ιού, ο οποίος δημιουργεί μεγάλο αριθμό αντίτυπων μέσα στο βακτήριο, που στην συνέχεια με την λύση του κυττάρου απελευθερώνεται στο μέσο ανάπτυξης, όπου ακολούθως προκαλεί την προσβολή άλλων κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή, η καλλιέργεια καταστρέφεται ολοκληρωτικά. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο βοήθησε στην ανακάλυψή τους (Νεραντζής κ.α., 2015).

Πολλές φορές το απότομο τέλος της διαδικασίας μηλογαλακτικής ζύμωσης οφείλεται σε φάγους, οι οποίοι προσβάλλουν το *O.oeni* ολοκληρωτικά. Έχει παρατηρηθεί ότι, κατά την διαδικασία προσβολής ενός στελέχους από έναν φάγο υπάρχει κάποιο άλλο στέλεχος, το οποίο πολλαπλασιάζεται, με σκοπό την παρεμπόδιση της διαδικασίας της ζύμωσης (Νεραντζής κ.α., 2015).

#### 6.4.4 Επίδραση του θειώδους

Το SO<sub>2</sub>, το οποίο χρησιμοποιείται για προσθήκη στους οίνους, υπάρχει σε μορφή δεσμευμένη και ελεύθερη. Είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιοξειδασικές και αντιαλδεϋδικές ιδιότητές του. Παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητά του είναι η σύσταση του οίνου καθώς και το pH. Η μορφή του, η οποία είναι δραστική και που συμβάλλει στην προστασία των οίνων, είναι το μοριακό SO<sub>2</sub>, το οποίο εξαρτάται άμεσα από το ελεύθερο SO<sub>2</sub> και από το pH. Για χαμηλότερες τιμές του pH έχουμε υψηλότερα ποσοστά μοριακού SO<sub>2</sub>. Ο μηχανισμός που δρα το SO<sub>2</sub> στα βακτήρια έχει πολλές ομοιότητες με τον μηχανισμό που δρουν οι ζύμες. Συγκεκριμένα, το μοριακό SO<sub>2</sub>, έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυττοπλασματική μεμβράνη και στην συνέχεια να εισέρχεται, μέσω απλής διάχυσης, στο κύτταρο. Το κυτόπλασμα, όπου είναι υψηλότερο το pH, αντιδρά με ένζυμα, με συνένζυμα και με πρωτεΐνες. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας, είναι να διακόπτεται η αύξηση του κυττάρου και τελικά να οδηγείται στον θάνατό του. Επίσης, το μοριακό SO<sub>2</sub> είναι γνωστό για την ανασταλτική δράση του στο μηλογαλακτικό ένζυμο (Νεραντζής κ.α., 2015).

### 6.5 Μύκητες και ζύμες

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί περιλαμβάνουν τους ζυμομύκητες και άλλες πολύπλοκες μορφές μυκήτων. Ο μικροβιακός κύκλος ανάπτυξής τους, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, καθώς και η δομή των κυττάρων τους, είναι τα κύρια στοιχεία τα οποία τους οδηγούν στην διαφοροποίησή τους από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η σύνθεση των μακρομοριακών ενώσεων των κυττάρων καθορίζει τη μικροβιακή ανάπτυξή τους και τη διαφοροποίησή τους. Πολλά είναι τα ήδη των βακτηρίων όπως και των μυκήτων, τα οποία έχουν την ικανότητα ανάπτυξης σε διαλύματα, τα οποία περιέχουν πολύ μικρές ποσότητες αλάτων και μία πηγή άνθρακα. Αυτή η πηγή άνθρακα, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί από έναν μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων (Νεραντζής κ.α., 2015).

Πρωταγωνιστικό ρόλο στην διαδικασία της οινοποίησης κατέχουν οι ζυμομύκητες. Το σχήμα των κυττάρων τους, είναι συνήθως ελλειψοειδές. Διπλασιάζονται ανά ενενήντα λεπτά, κάτω από συνθήκες ήπιες καλλιεργητικά και με περίσσεια θρεπτικών υλικών. Ο κυτταρικός τους κύκλος περιλαμβάνει την λανθάνουσα, την εκθετική, τη στατική φάση, καθώς, και τη φάση του θανάτου. Μεταξύ της λανθάνουσας και της εκθετικής είναι γνωστή μία άλλη φάση αυτή της επιτάχυνσης, ενώ ανάμεσα στην εκθετική και τη στατική υπάρχει η φάση της επιβράδυνσης. Η λανθάνουσα φάση και η εκθετική έχουν ιδιαίτερη τεχνολογική και οικονομική σημασία οινολογικά. Αναφορικά με την λανθάνουσα φάση, αυτή θα πρέπει να είναι πολύ σύντομη, αυτό σημαίνει ότι πρέπει η ανάπτυξη των ζυμών να γίνεται κατευθείαν μετά τον εμβολιασμό. Καθώς αν καθυστερήσει η ανάπτυξή τους, τα βακτήρια που ήδη υπάρχουν στο γλεύκος θα προχωρήσουν στην ανάλωση των σακχάρων και στην παραγωγή μεταβολιτών, οι οποίοι θα οδηγούσαν στην συνέχεια τους στην αλλοίωση της γεύσης και στην αλλοίωση των αρωματικών χαρακτηριστικών του οίνου που πρόκειται να παραχθεί. Επίσης, η ανάλωση όπως ήδη αναφέρθηκε των σακχάρων από τα βακτήρια οδηγεί στην αύξηση της πτητικής οξύτητας (Νεραντζής κ.α., 2015).

Παράλληλα, αν αναπτυχθούν μικροοργανισμοί, τότε η οινοποίηση είναι πιθανόν να καταστραφεί, καθώς, επειδή δεν θα υπάρχει ικανός αριθμός ζυμώσιμων σακχάρων θα σταματήσει η παραγωγή της απαιτούμενης αιθανόλης. Κατά την εκθετική φάση ελέγχεται η ταχύτητα εξέλιξής της. Στην περίπτωση που η ταχύτητα, με την οποία παράγεται η αιθανόλη, είναι υψηλή, τότε και η παραγωγή του CO<sub>2</sub> είναι υψηλή. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την απογύμνωση του παραγόμενου οίνου από τα αρωματικά του γλεύκους. Εάν από την άλλη ζυμωθεί αργά, τότε, θα έχουμε υπερβολική καθυστέρηση της αποζύμωσης. Πάντα πρέπει να υπάρχει ισορροπία μεταξύ κόστους και ποιότητας. Γενικά, σε χαμηλό pH δεν υπάρχει ανάπτυξη βακτηρίων. Αντίθετα, σε χαμηλό pH και με συνθήκες χαμηλού οξυγόνου, υπάρχει ανάπτυξη ζυμομυκήτων. Αυτή είναι η σημαντική διαφορά που κάνει αναγκαία την απομόνωση των συνθηκών ανάπτυξης των ζυμομυκήτων από τις συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριακών πληθυσμών, οι οποίοι έχουν ως στόχο να αποσπάσουν τμήμα του υποστρώματος, προκειμένου να αναπτυχθούν οι ίδιοι (Νεραντζής κ.α., 2015).

Μεταξύ των μικροοργανισμών των σταφυλίων συμπεριλαμβάνονται και οι νηματοειδείς μύκητες, η παρουσία των οποίων οδηγεί στην υποβάθμιση της ποιότητάς τους, και επακόλουθα και στην υποβάθμιση της ποιότητας του παραγόμενου οίνου (Felšöciová et al., 2023).



## 6.6 Μικροβιακή οικολογία της οινοποίησης

### 6.6.1 Μικροοργανισμοί στον τρύγο

Το γλεύκος θεωρείται οικοσύστημα που έχει πολύπλοκη λειτουργία. Οι διάφορες μικροβιακές ομάδες, καθώς, και τα μικροβιακά συστήματα των μυκήτων, αλλά και των βακτηρίων που περιέχονται στο γλεύκος αναπτύσσονται αλληλοεξαρτώμενα (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η αφετηρία των ζυμομυκήτων είναι η χλωρίδα των σταφυλιών και των επιφανειών του οινοποιείου, και ο εξωτερικός εμβολιασμός. Το έργο των μικροοργανισμών αρχίζει από το αμπέλι. Η ποιότητα του παραγόμενου οίνου καθορίζεται από τους συσχετισμούς μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών και των μικροβιακών ομάδων. Επίσης, η ποιότητα εξαρτάται από την ποικιλία του σταφυλιού και από το μικροκλίμα της περιοχής. Η γνώση του τρόπου ανάπτυξης των μικροοργανισμών, αλλά και του ελέγχου τους κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, θεωρείται απαραίτητη. Η ζωή και η ανάπτυξη των μικροοργανισμών επηρεάζουν όλες τις εργασίες, οι οποίες συμβαίνουν κατά την αμπελοκαλλιέργεια έως την παραγωγή των προϊόντων της, από την φροντίδα του αμπελιού μέχρι και την εμφιάλωση του οίνου (Νεραντζής κ.α., 2015).

Πρωτογενής πηγή των ζυμομυκήτων, που συμμετέχουν στην οινοποίηση, είναι τα σταφύλια. Επομένως, οι οικολογικοί συσχετισμοί στο σταφύλι θα έχουν ως αποτέλεσμα τις μεταβολές στο μυκητιακό φορτίο, καθώς και στο στάδιο της κυρίως ζύμωσης. Μικρός είναι ο αριθμός των ζυμομυκήτων, ο οποίος παρατηρείται στην επιφάνεια των σταφυλιών όταν είναι άγουρα. Ο αριθμός αυτός έχει αυξητική τάση κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των σταφυλιών. Αυτό το φαινόμενο οφείλεται στο γεγονός ότι, κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης, παρατηρείται διάχυση των σακχάρων από τους ιστούς της ράγας και συγκεκριμένα από την εσωτερική προς την εξωτερική επιφάνειά της. Αποτέλεσμα αυτού είναι η ανάπτυξη του μικροβιακού φορτίου. Στις περιπτώσεις καταστροφής της εξωτερικής επιφάνειας της ράγας (επιδερμίδα) παρατηρείται έξοδος των θρεπτικών υλικών, η οποία συμβάλλει στην περαιτέρω ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας. Πρέπει να επισημανθεί ότι, ενώ το σημαντικότερο είδος στη διαδικασία της οινοποίησης είναι η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, η συγκέντρωσή της στα σταφύλια είναι πολύ μικρή. Οι πληθυσμοί αυτού αναπτύσσονται μέσω της χρησιμοποίησης εμπλουτισμένων θρεπτικών υλικών (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η ζύμωση ξεκινάει με είδη τα οποία υπάρχουν στη ζυμοχλωρίδα των σταφυλιών. Οι γνωστότεροι μύκητες είναι τα είδη *Hanseniaspora*, *Candida* και *Metschnikowia*, οι οποίοι



αναπτύσσονται και σταδιακά πεθαίνουν στο στάδιο που βρίσκεται κατά το μέσο της ζυμωτικής διαδικασίας. Στη φάση αυτή ο *S.cerevisiae* είναι κυρίαρχος συνεχίζοντας τη ζύμωση έως την ολοκλήρωσή της. Κάποιες φορές παρατηρείται διακοπή της ζύμωσης, με αποτέλεσμα αυτές να χαρακτηρίζονται ημιτελείς με μεγάλα προβλήματα (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η εμφάνιση και η ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, κατά τη διαδικασία μιας αλκοολικής ζύμωσης, επηρεάζεται από τον αρχικό πληθυσμό τους, από την βιοποικιλότητα των στελεχών και των ειδών του γλεύκους, τη χημική του σύσταση συμπεριλαμβανομένων και των μυκητοκτόνων, τα οποία υπάρχουν ως κατάλοιπα, τη χρήση αντιοξειδοτικών και του διοξειδίου του θείου. Επίσης, παράγοντες που επηρεάζουν την καλλιέργεια είναι η οξύτητα στα αρχικά στάδια, οι μικροοργανισμοί και η δράση τους, οι συσχετισμοί μεταξύ τους, καθώς και η θερμοκρασία της ζύμωσης. Οι μεταβολίτες επηρεάζουν άμεσα τους συσχετισμούς των μικροοργανισμών που παράγονται από αυτούς, καθώς, άλλες φορές ο μεταβολίτης είναι το υπόστρωμα για μικροοργανισμούς και άλλες φορές έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξή τους. Σαν παράδειγμα για την περίπτωση αυτή, αναφέρεται η αιθανόλη, η οποία όταν παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τον μύκητα *S. Cerevisiae* έχει ανασταλτική έως τοξική δράση για τους μη Σακχαρομύκητες (Νεραντζής κ.α., 2015).

Ο γηγενής μύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, θεωρείται νέο εργαλείο που είναι χρήσιμο για τη διαδικασία της ζύμωσης, προκειμένου να συμβάλλει στην ενίσχυση των χαρακτηριστικών αρωματικών ιδιοτήτων του παραγόμενου οίνου (Gao et al., 2022).

#### 6.6.2 Οι μικροοργανισμοί στη φάση της οινοποίησης

Οι ζυμομύκητες προκαλούν σοβαρά μικροβιολογικά προβλήματα και αλλοίωση στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του οίνου με άμεση επίπτωση στις βιομηχανίες παραγωγής τους. Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών, απαιτείται η αύξηση των διαθέσιμων εργαλείων αξιολόγησής τους. Αποδεικνύεται ότι, από οικολογική σκοπιά, μέσω της βαθύτερης γνώσης των οικοσυστημάτων που επικρατούν στους αμπελώνες και τα οινοποιεία, θα προσδιοριστούν η προέλευση των ζυμών αλλοίωσης του κρασιού, οι οδοί μόλυνσής του, τα κρίσιμα σημεία μόλυνσης από τους ζυμομύκητες, και θα επιτευχθεί ο έλεγχός τους. Σημαντικά εργαλεία στην κατεύθυνση αυτή, αξιολόγησης της μικροβιολογικής ποιότητας των οίνων, αποτελούν οι ζυμολογικοί δείκτες που σπανίως χρησιμοποιούνται. Έννοιες, όπως αυτές της ευαισθησίας και της σταθερότητας του οίνου, έναντι αλλοιωμένων ζυμών, αντιμετωπίζονται σήμερα, μέσω της επιστημονικής γνώσης και των βιομηχανικών πρακτικών παρακολούθησης της μόλυνσής του από ζυμομύκητες (Loureiro, 2003).

Οι ζυμομύκητες στη διαδικασία της οينوποίησης εμφανίζονται με μία αλληλουχία, η οποία συσχετίζεται με τρεις παράγοντες, αυτούς της σταδιακής αύξησης της αλκοόλης, της παρουσίας λιπαρών οξέων μικρού μοριακού μεγέθους και της διαθεσιμότητας των θρεπτικών ουσιών (Νεραντζής κ.α., 2015).

Μεγαλύτερη ευαισθησία στην έλλειψη οξυγόνου παρουσιάζουν οι μη-Σακχαρομύκητες συγκριτικά με τους Σακχαρομύκητες. Στην περίπτωση απομάκρυνσης του οξυγόνου και γρήγορης ανάπτυξης του Σακχαρομύκητα, εμποδίζεται η ανάπτυξη των μη-Σακχαρομυκήτων. Στις περιπτώσεις που οι μη-Σακχαρομύκητες αναπτυχθούν πλήρως περιορίζουν την ανάπτυξη του Σακχαρομύκητα καταναλώνοντας το σύνολο των αμινοξέων και των βιταμινών του γλεύκους. Μέσω θανάτου και autolysis πολλών μη-Σακχαρομυκήτων παράγονται χρήσιμες ουσίες για την ανάπτυξη του *S.cerevisiae*. Πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων συνδυαστικά με τις ανθοκυάνες και τις ταννίνες έχουν επίδραση γευστική και χρωματική στον οίνο (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η ανάπτυξη αρχικά των μη-Σακχαρομυκήτων και ακολούθως των Σακχαρομυκήτων διασφαλίζει τη ζυμωτική διαδικασία χωρίς αυτή να παρεκκλίνει σε λάθος κατευθύνσεις (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η μικροβιακή ποικιλομορφία επιδρά σημαντικά όχι μόνο στις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου αλλά και άλλων προϊόντων, τα οποία έχουν υποστεί τη ζυμωτική διαδικασία. Σήμερα, θεωρείται σημαντικό να κατανοηθεί η μικροβιακή δυναμική εντός των ζυμωτικών διεργασιών και ο τρόπος που αυτή συμβάλλει στη διασφάλιση της ποιότητας και στην παραγωγή καινοτόμων προϊόντων, προκειμένου να βοηθηθούν ιδιαιτέρως οι οινοποιοί, οι οποίοι χρησιμοποιούν αυθόρμητες τεχνικές ζυμωτικής διαδικασίας, και οι οποίες εξαρτώνται άμεσα από περιβαλλοντικούς παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος (Ohwofasa et al., 2023).

## 6.7 Αίτια προβληματικών οينوποιήσεων

Στη σημερινή εποχή οι τεχνολογίες της διαδικασίας οينوποίησης και οι βελτιώσεις στον έλεγχο της ζυμωτικής διαδικασίας έχουν προοδεύσει. Παρά την πρόοδο όμως, παραμένουν τα προβλήματα κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Διάφοροι είναι οι παράγοντες στους οποίους οφείλονται αυτά τα προβλήματα (Νεραντζής κ.α., 2015).

Για τις προβληματικές οινοποιήσεις ευθύνονται: η αναστολή της ζύμωσης, η οσμή εστέρα, η επαναζύμωση στη φιάλη, η άνθιση, η οσμή πικραμύγδαλου, η πικράδα, το διακετύλιο, η γεύση γερανίου, η μαννιτόλη, το μέλλωμα και η «ποντικίλα» (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η αναστολή της ζύμωσης οφείλεται στην ελλιπή λίπανση, καθώς και σε χαμηλό βαθμό της ωριμότητας του καρπού κατά τον τρύγο. Επίσης, αναστολή παρατηρείται και λόγω χρησιμοποίησης υπερώριμων σταφυλιών (Νεραντζής κ.α., 2015).

Για την οσμή εστέρα ευθύνεται η συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα σε ποσότητες άνω των 200mg/l, με αποτέλεσμα το κρασί να έχει άρωμα διαλύτη ή κόλλας και επομένως να θεωρείται αλλοιωμένο. Ο προσεκτικός τρύγος, η διαύγαση και θείωση του γλεύκους και ο επαρκής εμβολιασμός μπορούν να διαφυλάξουν την εξέλιξη της διαδικασίας ζύμωσης (Νεραντζής κ.α., 2015).

Για την επαναζύμωση στη φιάλη υπεύθυνος θεωρείται ο ζυμομύκητας *Zygosaccharomyces bailii*, ο οποίος δημιουργεί προβλήματα στον εμφιαλωμένο οίνο προσβάλλοντάς τον κατά το στάδιο της αποθήκευσής του. Συνυπάρχει κίνδυνος ανεπανόρθωτων καταστροφών στην κάβα, ενώ προσβάλλονται και συμπυκνωμένα γλεύκη που έχουν χρήση γλυκαντικής ενίσχυσης των οίνων (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η δημιουργία υμενίου στην επιφάνεια των κρασιών, τα οποία βρίσκονται σε διαδικασία παλαίωσης, λόγω ανάπτυξης ζυμομυκήτων, με ανάλωση των οργανικών ουσιών που παρέμειναν στον οίνο, μετά το τέλος της κυρίως διαδικασίας της ζύμωσης, ονομάζεται άνθιση. Οφείλεται στην παρουσία οξυγόνου και δημιουργεί έντονα μικροβιακά θολώματα (Νεραντζής κ.α., 2015).

Για το φαινόμενο της οσμής του πικραμύγδαλου στους οίνους ευθύνονται η βενζαλδεΐδη, ως προϊόν ενζυματικής οξείδωσης της βενζυλικής αλκοόλης, οι άγριες ζύμες, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, η επίστρωση των βαρελιών με εποξειδικές ρητίνες και το κολλάρισμα με διαυγαστικά ζελατινώδους βάσης (Νεραντζής κ.α., 2015).

Ορισμένα στελέχη βακτηρίων του γένους *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus* είναι υπεύθυνα για το φαινόμενο της πίκρινσης του οίνου. Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης παρατηρείται διάσπαση της γλυκερίνης, η οποία αφυδατώνεται σε ακρολεΐνη που αντιδρά στη συνέχεια με ανθοκυάνες και άλλου είδους φαινόλες σχηματίζοντας και άλλη χρωστική στους οίνους (Νεραντζής κ.α., 2015).

Για την παραγωγή του διακετύλιου στο κρασί ευθύνονται βακτήρια του γαλακτικού οξέος, κυρίως του είδους *Oenococcus oeni*, προσδίδοντας έντονη γεύση είτε βουτύρου είτε καραμέλας. Η ιδιαίτερη αυτή γεύση θεωρείται ελαττωματική για τον παραγόμενο οίνο (Νεραντζής κ.α., 2015).

Κατά τη διεργασία του μεταβολισμού του σορβικού καλίου, το οποίο προστίθεται ως συντηρητικό για την καταπολέμηση ανάπτυξης των μυκήτων, σχηματίζεται στο κρασί μία ένωση, η 2-αιθοξυεξα-3,5-διένιο, που προσδίδει στο κρασί άρωμα γερανίου (Νεραντζής κ.α., 2015).

Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια του γαλακτικού οξέος (*Lactobacillus brevis*), εξαιτίας μείωσης της ποσότητας φρουκτόζης, οδηγούν στην παραγωγή της μαννιτόλης, σε κρασιά που πραγματοποιείται μηλογαλακτική ζύμωση, αφήνοντας την αίσθηση, κατά την κατανάλωσή τους, ενοχλητικού τελειώματος με υψηλό ιξώδες (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η εκδήλωση γλοιώδους και λιπαρής αίσθησης στο στόμα λόγω κατανάλωσης οίνου, οφείλεται στην αύξηση του ιξώδους και είναι γνωστή ως μέλλωμα. Οφείλεται στην παραγωγή πολυσακχαριτών (δεξτρίνες και βακτήρια γαλακτικού οξέος) (Νεραντζής κ.α., 2015).

Άλλο ελάττωμα του οίνου είναι η ονομαζόμενη «ποντικίλα», η οποία οφείλεται στο γένος *Brettanomyces* ή σε γαλακτικά βακτήρια. Παράγονται ουσίες οι οποίες κατά την ανάμιξή τους με το σάλιο, το οποίο έχει ουδέτερο pH, προσδίδουν την αίσθηση στον ουρανίσκο «κλούβας» ή «ουράς» ποντικού (Νεραντζής κ.α., 2015).

Επίσης, υπάρχουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες, στους οποίους οφείλονται οι προβληματικές οινοποιήσεις. Λόγω της υπερθέρμανσης του πλανήτη επηρεάζονται διάφορες αμπελουργικές παράμετροι, μεταξύ αυτών και η ωρίμανση των σταφυλιών. Η αυξανόμενη φωτοσυνθετική δραστηριότητα έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση των σακχάρων στο σταφύλι. Το φαινόμενο αυτό ακολουθείται από μια διεργασία αφυδάτωσης, λόγω της οποίας αυξάνεται η συγκέντρωση σε διαλυτά στερεά. Παρατηρείται επιδείνωση της κατάστασης αυτής λόγω των σημερινών αμπελουργικών πρακτικών, οι οποίες ευνοούν τη συγκομιδή σταφυλιών που είναι πολύ ώριμα, προκειμένου να παραχθούν οίνοι με ταννίνες ιδιαίτερα γλυκές. Λαμβάνοντας υπόψη την υπερωσμωτική καταπόνηση, αρχικά, και την συγκέντρωση αιθανόλης σε υψηλά επίπεδα για τον παραγόμενο οίνο, η ζύμωση του γλεύκους των σταφυλιών υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα μπορεί να καταστεί προβληματική για τη δράση των ζυμομυκήτων (Sánchez et al., 2022).

## 6.8 Οίνοι και αλλοιώσεις τους κατά τη μεταζυμωτική φάση

Η μεταζυμωτική φάση ξεκινάει από το κυρίως στάδιο της διαδικασίας ζύμωσης και ολοκληρώνεται στη συσκευασία. Τη μεταζυμωτική φάση αποτελούν η τρυγική σταθεροποίηση, η διαύγαση και η εμφιάλωση. Σε όλα αυτά τα στάδια μπορεί να υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες αλλοίωσης του οίνου (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η τρυγική σταθεροποίηση πραγματοποιείται μέσω φυσικής μεθόδου. Ο παραγόμενος οίνος ψύχεται στους  $-4^{\circ}\text{C}$  παραμένοντας στην κατάσταση αυτή από 24 έως και 48 ώρες. Η απομάκρυνση των τρυγικών αλάτων του σώματος του οίνου γίνεται με καθίζηση, τα οποία στη συνέχεια συσσωρεύονται στον πυθμένα της δεξαμενής στην οποία έγινε η σταθεροποίηση. Αρκετοί οινοποιοί χρησιμοποιούν τη διαδικασία της μετάγγισης με μεταφορά του παραγόμενου οίνου σε άλλες δεξαμενές. Αυτή η διαδικασία είναι προβληματική, καθώς, μπορεί να συμβούν οξειδωτικά φαινόμενα επιμόλυνσης από βακτήρια του οξικού οξέος (Νεραντζής κ.α., 2015).

Η διαύγαση είναι μία διεργασία, από την οποία εξαρτάται η εμφάνιση του οίνου που παράγεται και επομένως επηρεάζει την ποιότητα και την τελική τιμή του προϊόντος. Η χρησιμοποίηση των φίλτρων μπορεί να αποτελέσει την πηγή της επιμόλυνσης. Αυτό μπορεί να συμβεί στην περίπτωση χρησιμοποίησης ελαττωματικών εργοστασιακών φίλτρων, όπως επίσης και λόγω πλημμελούς χρήσης τους. Είναι γνωστές περιπτώσεις εμφάνισης επαναζύμωσης σε σημεία πώλησης των οίνων, με αποτέλεσμα τη θραύση των φιαλών εξαιτίας της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα. Τέλος, είναι αναγκαία η αποστείρωση των πωμάτων των φιαλών κατά τη διαδικασία εμφιάλωσης (Νεραντζής κ.α., 2015).

Σημαντικός θεωρείται ο ποσοτικός προσδιορισμός, μέσω αναλυτικών μεθόδων των αλοανισολών και αλογοφαινολών της μήτρας του φελλού. Οι τεχνικές για την προετοιμασία και την επεξεργασία των δειγμάτων που λήφθηκαν συγκρίθηκαν μεταξύ τους με βάση την αποτελεσματικότητά τους, τη βελτιστοποίηση του χρόνου και των εκχυλισμάτων και την ευκολία της εκτέλεσής τους. Σημαντικό ενδιαφέρον για τις αναλύσεις, αναφέρεται κυρίως για την 2,4,6-τριχλωροανισόλη (TCA), από την ομάδα των αλοανισολών (haloanisoles), καθώς, επιμολύνει τον οίνο. Μέσω χρωματογραφικών, βιοαναλυτικών και αισθητηριακών μεθόδων (σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές) παρέχεται η απαιτούμενη ευαισθησία, η εκλεκτικότητα και η επαναληψιμότητα στον προσδιορισμό τους (Tarasov, Rauhut & Jung, 2017).

Ο οίνος είναι, ως συνδυασμός πολύπλοκης σύστασης μεγάλου αριθμού αρωματικών ουσιών, ευαίσθητος σε πλήρη αλλοίωση, εξαιτίας της παρουσίας ένωσης σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, της τάξης μερικών ng ανά λίτρο, η οποία μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση (Tarasov, Rauhut & Jung, 2017).

Στις ενώσεις αυτές, που έχουν την ικανότητα να αλλοιώσουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του οίνου, συμπεριλαμβάνεται η 2,4,6-τριχλωροανισόλη (TCA), η οποία ανήκει στην οικογένεια των αλοανισολών. Πολύ συχνά αυτή είναι η ουσία, λόγω της οποίας αναπτύσσεται το φαινόμενο της κακοσμίας του φελλού. Η συγκεκριμένη ουσία έχει ως χαρακτηριστικά την υψηλή πτητικότητα και χαμηλό όριο, μεταξύ 1,5 έως και 2 ng/l, στο οποίο μπορεί να γίνει αντιληπτή στο οίνο. Λόγω παρουσίας του TCA σε υψηλότερες από τις προαναφερόμενες συγκεντρώσεις μπορεί να καταστραφεί η σύνθεση του αρώματος, με αποτέλεσμα το κρασί να κριθεί ακατάλληλο για κατανάλωση (Tarasov, Rauhut & Jung, 2017).

Η κατάσταση αυτή της «κακοσμίας του φελλού» διαπιστώνεται κυρίως λόγω των έντονων μυρωδιών μούχλας, που υπερισχύουν των αρωμάτων του οίνου, ανεξαρτήτως έντασης.

Έχει διαπιστωθεί ότι η δράση της TCA είναι δυνατόν να γίνει αντιληπτή στα κρασιά και σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των κατώτερων ορίων αντίληψης. Χαρακτηριστικό των οίνων αυτών είναι η χαμηλότερη ένταση των αρωμάτων τους, συγκριτικά με τους αντίστοιχους οίνους που δεν περιέχουν αλοανισόλες. Η διαδικασία αυτής της μόλυνσης χαρακτηρίζεται πολύπλοκη. Επίσης, ουσία TCA, όπως και άλλες αλοανόλες σχηματίζονται στα βαρέλια, στις παλέτες και σε άλλα ξύλινα μέρη, στο χώρο του κελαριού. Οι ουσίες αυτές μπορούν ακολούθως να απελευθερωθούν στον αέρα, με αποτέλεσμα τη μόλυνση των εξαρτημάτων, μηχανημάτων του οινοποιείου, και των φελλών που είναι καθαροί, και την περαιτέρω μετάδοση των αλοανισολών στον οίνο (Tarasov, Rauhut & Jung, 2017).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : Σύγχρονες μεθοδολογίες ανίχνευσης

### 7.1 Μέθοδοι προσδιορισμού της νοθείας του κρασιού.

Πολλές είναι δυστυχώς οι περιπτώσεις νοθείας του κρασιού για οικονομικούς λόγους. Για να προσδιοριστεί η νοθεία και να εκτιμηθεί η αυθεντικότητα του κρασιού εξετάζονται διάφορες παράμετροι, μεταξύ των οποίων η γεωγραφική του προέλευση, η χημική του σύνθεση, η χρονιά της οινοποίησης, και η μέθοδος οινοποίησης και παλαίωσης.

Προκειμένου να εξεταστούν συγκεκριμένες οινολογικές παράμετροι, αναλύονται ενδεικτικές ειδικές ενώσεις – δείκτες. Στους δείκτες περιλαμβάνονται κάποια μέταλλα και ιχνοστοιχεία, καθώς και η αναλογία μεταξύ σταθερών ισotόπων. Σταθερά ισotόπα θεωρούνται το υδρογόνο (H), ο άνθρακας (C) και το οξυγόνο (O). Μεταξύ των μετάλλων και των ιχνοστοιχείων περιλαμβάνονται τα: K, Na, Fe, Zn, Rb, Ca, Mg, Mn, Cu, Cr, Co, Br (Dordevic et al., 2013).

Για την ανάλυση των δεικτών αυτών χρησιμοποιούνται αναλυτικές τεχνικές, διαφορετικού βαθμού ευαισθησίας και ειδικότητας. Γνωστές τεχνικές είναι οι: η υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης (High-performance liquid chromatography - HPLC), η αέρια χρωματογραφία (GC - Gas Chromatography), η Φασματομετρία μάζας (MS), η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης και εκπομπής, η φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis), εγγύς υπερύθρου NIR, μέσου υπερύθρου MIR και Raman και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Canizo et al., 2019). Μέσω της χημειομετρικής ανάλυσης με συνδυασμό των δεδομένων των αναλυτικών τεχνικών, επιτυγχάνεται η εκτίμηση για την αυθεντικότητα του κρασιού με αποτελεσματικό τρόπο (Kallithraka et al., 2001).

#### 7.1.1 Χρωματογραφικές Μέθοδοι

Οι μέθοδοι της υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης HPLC, θεωρείται ότι προσδιορίζουν αξιόπιστα τους μονό - δισακχαρίτες, τη γλυκερίνη, τις χρωστικές και τις αρωματικές ύλες. Μέσω των μεθόδων αυτών, προσδιορίζεται επίσης η περιεκτικότητα του γλεύκους σταφυλιών στην σορβιτόλη. Λόγω των μικρών ποσοτήτων σορβιτόλης, μέχρι 80 mg/dm<sup>3</sup>, που περιέχονται στον οίνο, σε περίπτωση εξέτασής του και εύρεσης υψηλών ποσοτήτων της, υποδεικνύεται η ανάμιξη του γλεύκους των σταφυλιών με τον χυμό από άλλα φρούτα (Csapó and Albert, 2018).

Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης RPHPLC και υγρής χρωματογραφίας μάζας LC-MS, χρησιμοποιούνται και για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό της ποσότητας των φαινολικών ενώσεων και ανθοκυανινών (Canizo et al., 2019).



Η εφαρμογή των τεχνικών της αέριας χρωματογραφίας (GC) χρησιμοποιείται για να προσδιοριστούν οι πτητικές ενώσεις, μεταξύ των οποίων οι αλκοόλες, οι κετόνες, οι αλδεΐδες, και τα οργανικά οξέα. Με την εφαρμογή της μεθόδου αυτής, της αέριας χρωματογραφίας μάζας (GC-MS), γίνεται ο προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων, στις περιπτώσεις που αναμίχθηκαν κρασιά από διαφορετικές ποικιλίες κρασιών και ακολουθεί ταυτοποίηση αυτών που προέκυψαν από διαφορετικές ποικιλίες της *Vitis vinifera* (Canizo et al., 2019).

### 7.1.2 Φασματοσκοπικές Μέθοδοι

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της νοθείας στον οίνο και πλεονεκτούν έναντι άλλων μεθόδων, λόγω του σύντομου χρόνου ανάλυσης, του κόστους και του γεγονότος ότι αναλύονται μικρές ποσότητες δείγματος χωρίς να καταστρέφονται (Canizo et al., 2019).

Προκειμένου να αξιολογηθεί αξιόπιστα και γρήγορα το χρώμα του κρασιού χρησιμοποιείται η μέθοδος της φασματοσκοπίας υπεριώδους- ορατού (UV-Vis). Συγκεκριμένα, το σύνολο της περιεκτικότητας των ανθοκυανινών, η οποία εκφράζεται σε ισοδύναμα μαλβιδίνης, προσδιορίζεται μέσω απορρόφησης στα 520 nm. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος υστερεί στον προσδιορισμό συγκεκριμένων ανθοκυανινών και στην προέλευσή τους (Ferrari et al., 2011).

Επίσης, η μέθοδος φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR) εφαρμόζεται σε μεγάλο εύρος για αναλύσεις του γλεύκους και του κρασιού, επειδή αρκεί ελάχιστη προεργασία του δείγματος που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, ενώ ελάχιστος είναι ο χρόνος ανάλυσης, μερικά δευτερόλεπτα, και το κόστος χαμηλό. Βάσει επιστημονικών μελετών, έχει προκύψει ότι οι συγκεκριμένες μέθοδοι στοχεύουν να προσδιορίσουν τη γεωγραφική προέλευση του κρασιού, καθώς και τη συνολική περιεκτικότητα στο σταφύλι των ανθοκυανινών αλλά και συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων σταφύλι (Canizo et al., 2019).

Ο προσδιορισμός της σύστασης του κρασιού, όπως επίσης και η διάκρισή του, μεταξύ βιολογικού ή μη, μπορεί να γίνει με τις μεθόδους φασματοσκοπίας του εγγύς και μέσου υπερύθρου NIR και MIR, οι οποίες θεωρούνται αρκετά αξιόπιστες. Παρ' όλα αυτά η χαμηλή ευαισθησία, κατά τη διαδικασία προσδιορισμού ενώσεων που βρίσκονται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, θεωρείται το σημαντικό μειονέκτημα των μεθόδων αυτών (Ferrari et al., 2011).

Μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), επιτρέπεται ταυτόχρονα η ανάλυση παραμέτρων διαφορετικών μεταξύ τους, με προσεγγίσεις στοχευμένες και μη. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμογή για τις περιπτώσεις προσδιορισμού της γεωγραφικής

προέλευσης, αλλά και της ποικιλίας του κρασιού και της χρονιάς που παράχθηκε (Kamiloglu, 2019).

Ήδη από το έτος 1990, οι οίνοι που παράγονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση, αναλύονται μέσω της μεθόδου της ανάλυσης της αναλογίας των σταθερών ισοτόπων, της φασματοσκοπίας πυρηνικού συντονισμού NMR και της φασματομετρίας μάζας αναλογίας ισοτόπων (Isotope Ratio Mass Spectrometry - IRMS). Η μέθοδος αυτή, θεωρείται επίσημη μέθοδος για την ανάλυση των οίνων. Μέσω των συγκεκριμένων μεθόδων, προσδιορίζεται η προέλευση, η χρονιά της παραγωγής, καθώς, και τυχόν προσθήκη είτε νερού είτε ζάχαρης στο κρασί, μέσω της σύγκρισης μεταξύ των δεδομένων του δείγματος και του αυθεντικού κρασιού, το οποίο έχει ίδια γεωγραφική προέλευση με αυτό που εξετάζεται (Kamiloglu, 2019).

Επιπρόσθετα, η μέθοδος του πυρηνικού συντονισμού (NMR) εφαρμόζεται για την διαπίστωση της νοθείας οίνου με προσθήκη ανθοκυανινών και τεχνητών αρωματικών υλών (Canizo et al., 2019).

Συμπερασματικά, οι φασματοσκοπικές μέθοδοι NMR είναι μέθοδοι με χαμηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με αυτές της χρωματογραφίας, εντούτοις, είναι μη καταστροφικές και η προετοιμασία του δείγματος γίνεται απλούστερα και συντομότερα (Ferrari et al., 2011).

## 7.2 Μεθοδολογίες ανίχνευσης οίνου

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο οίνος έχει πολύπλοκη μικροβιακή σύσταση και οικολογία. Ο ρόλος των μικροβίων συμβάλλει, είτε θετικά, είτε αρνητικά στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος. Αυτός είναι και ο λόγος που η μικροβιακή οικολογία του οίνου έτυχε καλής μελέτης.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, στον οίνο περιέχονται πολλές ενώσεις και μικροοργανισμοί, μεταξύ αυτών οι ζύμες, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) και τα βακτήρια οξικού οξέος (AAB). Για την αλκοολική ζύμωση υπεύθυνη είναι η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Η παρουσία στις ράγες και στο γλεύκος, κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διαδικασίας, των μη σακχαρομυκήτων είναι δεδομένη. Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια της οινοποιητικής διαδικασίας, μπορεί να έχουν αναπτυχθεί και οι ζύμες *Brettanomyces bruxellensis* και *Candida vini*, γνωστές για την αλλοιωτική τους δράση. Αναφορικά με την παρουσία των γαλακτικών βακτηρίων στο κρασί, σε αφθονία, υπάρχουν τα

*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus damnosus*, τα *O. oeni* και *L. brevis* (Munoz et al., 2011, όπως αναφέρεται στους Longin et al (2017)). Το *Oenococcus oeni* εκτελεί τη μηλογαλακτική ζύμωση (MLF), ενώ τα βακτήρια οξικού οξέος (AAB), όπως είναι τα *Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp., *Gluconacetobacter* spp., μπορεί να είναι παρόντα κατά την οινοποιητική διαδικασία (Guillamon and Mas, 2011, όπως αναφέρεται στους Longin et al., 2017).

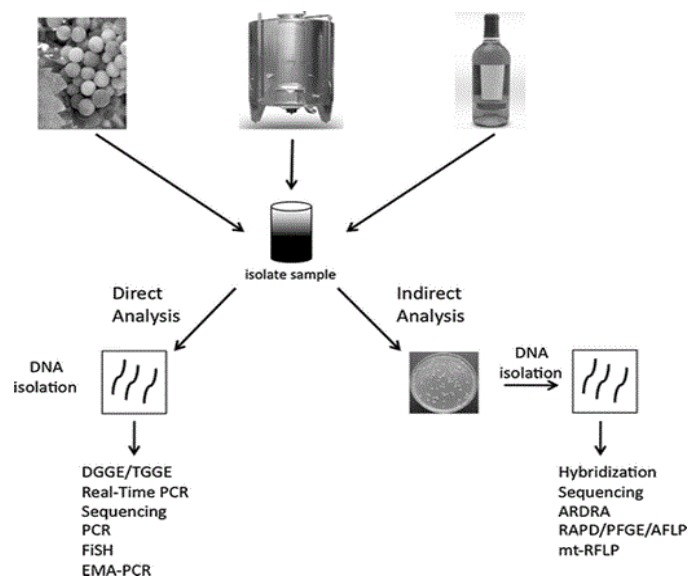
Οι οινοποιοί οφείλουν να γνωρίζουν όλους τους πληθυσμούς, που συμμετέχουν στη ζυμωτική διαδικασία, καθώς και την περιεκτικότητα σε αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, προκειμένου να παραχθεί ποιοτικός οίνος (Longin et al., 2017).

Η γνώση της βιολογίας των παθογόνων μικροβιακής προέλευσης και των παραγόντων της γένεσης των ιών, σε μοριακό επίπεδο, είναι σημαντική, προκειμένου να αναπτυχθούν νέες μέθοδοι και στρατηγικές πρόληψης και καταπολέμησής τους. Η πρόοδος της μοριακής βιολογίας, των τεχνολογιών της γονιδιωματικής και της μετα-γονιδιωματικής, και της βιοπληροφορικής, συμβάλλει στην ταυτοποίηση μοριακά και στις λειτουργικές αναλύσεις των μικροβιακών παραγόντων (Leitão, 2020).

Μοριακές μέθοδοι ανάλυσης έχουν ήδη αντικαταστήσει τις παραδοσιακές έμμεσες μεθόδους αξιολόγησης του κρασιού. Οι μέθοδοι αυτές χαρακτηρίζονται είτε έμμεσες είτε άμεσες. Με τον όρο έμμεσες, θεωρούνται αυτές, μέσω των οποίων γίνεται η ταυτοποίηση των καλλιεργημένων οργανισμών. Με τον όρο άμεσες θεωρούνται αυτές, μέσω των οποίων σκιαγραφούνται ολόκληροι πληθυσμοί ή ταυτοποιούνται συγκεκριμένα μικρόβια κάποιου μικτού πληθυσμού. Οι μοριακές μέθοδοι υπερτερούν των παραδοσιακών λόγω ταχύτητας και ακρίβειας των αποτελεσμάτων (Ivey & Phister, 2011).

Έχει διαπιστωθεί ότι, για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση μικροβίων στη διάρκεια της οινοποιητικής διαδικασίας, είτε άμεσα είτε έμμεσα, οι μοριακές μέθοδοι είναι αξιόπιστες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Στην περίπτωση δείγματος που αναλύθηκε μέσω συμβατικών μεθόδων, αυτών της εκχύλισης ή του εμπλουτισμού, μέσω της ανάπτυξης του μικροβίου, αποδείχθηκε ότι οι μοριακές μέθοδοι ταυτοποιούν τους οργανισμούς του δείγματος που υπάρχουν σ' αυτό. Η ταυτοποίηση γίνεται είτε σε επίπεδο γένους είτε σε επίπεδο είδους είτε σε επίπεδο συγκεκριμένου στελέχους. Για παράδειγμα, με τις παραδοσιακές επιμολύνσεις και τη βιοχημική ανάλυση μπορεί να διαπιστωθεί, αξιόπιστα, η ανάπτυξη ενός γαλακτοβάκιλλου στο κρασί. Το ίδιο δεν ισχύει και για τον προσδιορισμό συγκεκριμένου στελέχους, το οποίο μπορεί να ταξινομηθεί λανθασμένα, μέσω βιοχημικής τυποποίησης. Αντίθετα, μέσω των

σύγχρονων μοριακών μεθόδων, όπως είναι η μέθοδος του τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA PCR (RAPD-PCR), τα διαφορετικά είδη θα διαφοροποιηθούν σωστά. Με δεδομένο ότι, δεν αναλύθηκε ο μικροβιακός πληθυσμός του αρχικού πληθυσμού, θεωρείται ότι αυτές οι μέθοδοι είναι έμμεσες (Ivey & Phister, 2011).



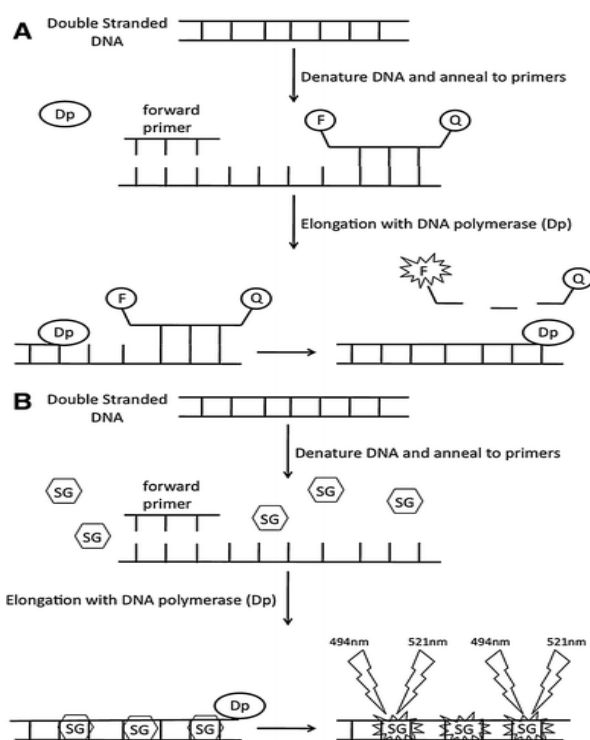
Εικόνα 18. Παράδειγμα άμεσης έναντι έμμεσης μικροβιακής ανάλυσης(Ivey & Phister, 2011).

Όπως αποτυπώνεται παραπάνω, στην εικόνα 18, η χρησιμοποίηση των μοριακών μεθόδων μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα, τα οποία λαμβάνονται από τον αμπέλι έως τη φιάλη, με έμμεσο ή με άμεσο τρόπο. Στην περίπτωση της έμμεσης ανάλυσης, πραγματοποιείται επιμόλυνση του δείγματος και ακολουθεί ανάπτυξη των μικροοργανισμών, απομόνωση του DNA και ταυτοποίηση. Στην περίπτωση της άμεσης μοριακής ανάλυσης, πραγματοποιείται απομόνωση του DNA ή του RNA, απευθείας από το δείγμα και στη συνέχεια ακολουθεί ανάλυσή τους. Οι έμμεσες αναλύσεις θεωρούνται πιο ευαίσθητες, επειδή μπορεί να γίνει ταυτοποίηση των οργανισμών σε επίπεδο στελέχους. Αντίθετα, οι άμεσες μέθοδοι χαρακτηρίζονται για την ταχύτητά τους στην ταυτοποίηση και σκιαγράφηση των κοινοτήτων μη καλλιεργήσιμων οργανισμών, αλλά δεν είναι τόσο συγκεκριμένες, καθώς, η ταυτοποίηση γίνεται σε επίπεδο γένους ή είδους (Ivey & Phister, 2011).

Τα μη καλλιεργήσιμα μικρόβια μπορεί να βρίσκονται σε κατάσταση τραυματισμού, βιώσιμη κατάσταση μη καλλιεργήσιμη ή ανικανότητας ανάπτυξής τους στο μέσο που επιλέχθηκε για την καλλιέργεια. Παρουσιάστηκε μια μελέτη των Du Toit et al (2005), στην οποία καταδείχθηκε διαφορά ανάμεσα στους πληθυσμούς του *Acetobacter pasteurianus*, που η παρατήρησή τους έγινε μέσω μικροσκοπίου επιφθορισμού και μέσω επιμετάλλωσης. Η

μικροσκοπία, η οποία κατατάσσεται στις άμεσες μεθόδους, οδήγησε στο συμπέρασμα υψηλότερου μικροβιακού πληθυσμού, συγκριτικά με τη μέθοδο της επιμετάλλωσης χωρίς οξυγόνο, η οποία κατατάσσεται στις έμμεσες μεθόδους. Η προσθήκη οξυγόνου στο κρασί εξαφάνισε τη διαφορά αυτή. Αντίθετα, με τη χρήση των συμβατικών αναλύσεων ένας μη καλλιεργήσιμος πληθυσμός δεν θα γινόταν αντιληπτός (Ivey & Phister, 2011).

Για την ταχύτητα της άμεσης ανάλυσης, αναφέρεται το παράδειγμα ανίχνευσης του *D. Bruxellensis*, η οποία με επιμετάλλωση διαρκεί μία έως δύο εβδομάδες, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση λήψης οινολογικών αποφάσεων και προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών. Μέσω της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (QPCR), που είναι άμεση μέθοδος, η μόλυνση από *D. Bruxellensis*, εντοπίζεται εντός της ίδιας ημέρας και αντιμετωπίζεται άμεσα από τον οίνο. Παρατίθεται η εικόνα 19 πραγματοποίησης PCR πραγματικού χρόνου για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων του DNA.



Εικόνα 19. Πραγματοποίηση RT-PCR ποσοτικοποίησης των γονιδίων του DNA (Ivey & Phister, 2011).

A. Παράδειγμα συστημάτων ανίχνευσης ανιχνευτή-βάσης όπως το Scorpion ή το Taqman.

Γίνεται μετουσίωση του DNA-στόχου σε μονόκλωνο DNA και ακολουθεί υβριδοποίησή του, μέσω ειδικών εκκινητών με προσαρτημένο ένα φθοριόχρωμα (F) και έναν σβέστη (Q). Με την υβριδοποίηση των εκκινητών, παρατηρείται επιμήκυνση του DNA, μέσω χρήσης DNA πολυμεράσης. Επιμήκυνση πέρα από το στοχευμένο DNA, οδηγεί στον διαχωρισμό σβέστη

και φθοριοχρώματος, το οποίο εκπέμπει φως. Έτσι γίνεται η ανίχνευση των διαφορετικών ανιχνευτών και η ποσοτικοποίηση των γονιδίων του DNA, μέσω διαφορετικού φθοριοφόρου (Ivey & Phister, 2011).

#### B. Δοκιμές SYBR Green.

Όταν το δίκλωνο DNA λιώνει, επιτρέπεται στους εκκινητές η σύνδεσή τους με το μονόκλωνο DNA. Μέσω της DNA πολυμεράσης, δημιουργείται το δίκλωνο DNA και επιτρέπεται στη χρωστική SYBR Green (SG) η δέσμευση των αλυσίδων του DNA και ο φθορισμός της. Με τη διέγερση του SYBR Green από φως στα 494nm, που είναι το μήκος κύματος διέγερσης της χρωστικής, εκπέμπεται φως στα 521 nm (μήκος κύματος εκπομπής) (Ivey & Phister, 2011).

Ως μειονέκτημα των άμεσων μεθόδων συγκριτικά με αυτές των παραδοσιακών έμμεσων μεθόδων θεωρείται η αδυναμία τους στη διάκριση μεταξύ βιώσιμων και νεκρών κυττάρων, εξαιτίας του γεγονότος ότι και στα δύο είδη κυττάρων περιέχονται DNA ή RNA. Ειδικότερα, το DNA παραμένει σταθερό για αρκετό καιρό κατόπιν θανάτου των κυττάρων, ενώ το RNA που έχει μικρότερο χρόνο επιβίωσης, μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να έχει τη θέση χρήσιμου δείκτη βιωσιμότητάς τους. Αυτές οι διαδικασίες, εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από το είδος του μεταγραφόμενου γονιδίου και από τις συνθήκες περιβάλλοντος του δείγματος. Εξετάστηκε η παραμονή ριβοσωμικού RNA και ριβοσωμικού DNA, σε μία μελέτη των Hierro et al (2006), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), υπό συνθήκες θέρμανσης μιας καλλιέργειας *Saccharomyces cerevisiae* για χρονική διάρκεια 20 λεπτών, μέσω της χρήσης QPCR. Διαπιστώθηκε ότι και το rRNA και το rDNA, παρέμειναν σταθερά για μεγαλύτερο χρόνο της μιας ημέρας. Ακολούθως, οι Cocolin και Mills το 2003, μέσω χρήσης της Ηλεκτροφόρησης πηκτής βαθμίδας μετουσίωσης DGGE, διαπίστωσαν την παραμονή του rRNA της *Hanseniaspora* για διάρκεια 29 ημερών, χωρίς την παρουσία καλλιεργήσιμου πληθυσμού (Ivey & Phister, 2011).

### 7.3 Μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση μικροβίων που σχετίζονται με τον οίνο

#### 7.3.1 Μέθοδοι υβριδισμού

Η μέθοδος του υβριδισμού του DNA, η οποία ανήκει στις έμμεσες μεθόδους, χρησιμοποιείται συχνά για να ταυτοποιηθούν διάφοροι μικροοργανισμοί, μέσω απλών ανιχνευτών ή



μικροσυστοιχιών, με σκοπό την διερεύνηση ομοιοτήτων μεταξύ ολόκληρων γονιδιωμάτων. Η πραγματοποίηση του υβριδισμού, γίνεται μέσω της προσθήκης επισημασμένου ανιχνευτή μονόκλωνου DNA, ο οποίος είναι ειδικός για ένα γονίδιο. Στις περιπτώσεις δείγματος DNA, το οποίο απομονώθηκε από οργανισμό άγνωστης προέλευσης, η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του είδους του γονιδίου, του ολικού γονιδιωματικού DNA. Την προσθήκη ακολουθεί η θέρμανση του μείγματος και το ξετύλιγμα ή η μετουσίωση της διπλής έλικας του DNA, για τον σχηματισμό μονόκλωνων αλυσίδων. Μετά τη διαδικασία ψύξης, ανασχηματίζονται οι έλικες και στην περίπτωση ομοιότητας, ο ανιχνευτής που επισημάνθηκε, συνδέεται με το άγνωστο DNA. Στις αρχικές εφαρμογές η επισημάνση των ανιχνευτών γινόταν με ραδιενεργό υλικό. Σταδιακά όμως, έγινε αντικατάστασή τους με διάφορα συστήματα χημειοφωταύγειας. Σε αυτά τα συστήματα ανήκουν τα ένζυμα υπεροξειδάσης, τα οποία έχουν την ικανότητα δημιουργίας μίας χρωματικής αλλαγής αντιδρώντας με κάποιο υπόστρωμα ή με φθοριοφόρα, τα οποία ανιχνεύονται μέσω της παρακολούθησης της διαδικασίας φθορισμού (Ivey & Phister, 2011).

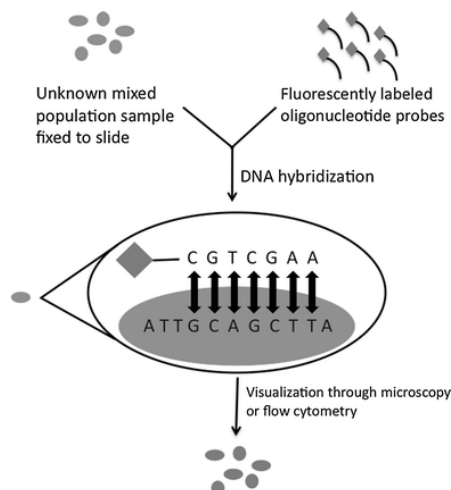
Για τη διεξαγωγή των αρχικών υβριδισμών, χρησιμοποιήθηκε ολικό DNA, του οποίου η απομόνωση έγινε από ένα στέλεχος αναφοράς και χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής. Η ομάδα των Lonvaud-Funel το 1998, όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011) χρησιμοποίησε τη συγκεκριμένη μέθοδο, προκειμένου να ταυτοποιήσει το *Leuconostoc oeni*, το οποίο είναι σήμερα γνωστό ως *Oenococcus oeni*, αλλά και άλλους γαλακτοβάκιλλους που έχουν απομονωθεί από κρασιά. Οι πρόσφατες μέθοδοι βασίζονται σε ανιχνευτές συγκεκριμένων γονιδίων και όχι ολικού γονιδιωματικού DNA. Συγκεκριμένα σε γονίδια ριβοσωμικού RNA (rDNA), οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται ως η μοναδική αλληλουχία για αρκετούς οργανισμούς. Μέσω των ανιχνευτών αυτών, σε συνέχεια των προηγούμενων ανιχνευτών ολικού γονιδιωματικού DNA, ταυτοποιούνται συγκεκριμένες ζύμες και βακτήρια και ανιχνεύεται η παρουσία συγκεκριμένων ομάδων (βακτήρια γαλακτικού οξέος) (Ivey & Phister, 2011).

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μέθοδο του υβριδισμού είναι με τη διαδικασία του φθορισμού *in situ*, που σημαίνει την εξέταση οποιουδήποτε φαινομένου στην ακριβή θέση εμφάνισής του (FISH). Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιούνται οι φθορίζοντες ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές, οι οποίοι έχουν ως στόχο το rDNA ενός μόνο είδους. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ίδια αρχή με του υβριδισμού του DNA, με τη διαφορά ότι πραγματοποιείται *in situ*, δηλαδή το DNA δεν απομονώνεται πριν τη διαδικασία



υβριδοποίησης. Ως εκ τούτου επιτρέπεται η ανίχνευση των ειδών σε δείγματα μικτών πληθυσμών, γρήγορα και εύκολα, χωρίς να είναι αναγκαία η διαδικασία της εκχύλισης (Ivey & Phister, 2011).

Περιγραφή της διαδικασίας αυτής παρατίθεται στην παρακάτω εικόνα 20.



**Εικόνα 20. Εξέταση φαινομένου στην ακριβή θέση εμφάνισής του (FISH) (Ivey & Phister, 2011).**

Πραγματοποιείται η προσθήκη ενός επισημασμένου ανιχνευτή, που είναι συνήθως η διγοξιγενίνη (DIG), απευθείας σε μία πλάκα που φέρει στερεωμένα κύτταρα και ακολουθεί η υβριδοποίηση με το DNA εσωτερικά του κυττάρου. Με την ολοκλήρωση της υβριδοποίησης, ακολουθεί κάλυψη της πλάκας με αντισώματα κατά της DIG, τα οποία περιέχουν φθοριόφορο. Κατόπιν επεξεργασίας με αντισώματα, μπορεί να ακολουθήσει εξέταση των κυττάρων με το μικροσκόπιο, μέσω του οποίου επιτρέπεται η απεικόνιση των ειδών του δείγματος, άμεσα, ενώ ταυτόχρονα αναλύονται οι λειτουργικές παράμετροί τους (π.χ. η δομή τους). Με αυτή τη διαδικασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα κύτταρα στην κυτταρομετρία ροής, μέσω της οποίας, ως οπτικό σύστημα, είναι δυνατή η εκτίμηση του αριθμού, του σχήματος, του μεγέθους και της βιωσιμότητάς τους, με μετρήσεις και σκέδαση του φωτός. Η μέθοδος αυτή, ενδείκνυται και για τη διαδικασία ταυτοποίησης οργανισμών ήδη καλλιεργημένων και μικροβίων στο δείγμα απευθείας, χωρίς καλλιέργεια (Ivey & Phister, 2011).

Η ομάδα των Perry-O'Keefe et al. (2001), προχώρησε στην ανάπτυξη ενός αριθμού ανιχνευτών βασισμένων στο πεπτιδίο του νουκλεϊκού οξέος για χρήση τους στην ανίχνευση ζυμομυκήτων και βακτηρίων, οι οποίοι συσχετίζονται με τον οίνο. Τα μόρια του πεπτιδίου αυτού (PNA) είναι ψευδοπεπτίδια, τα οποία ζευγαρώνουν βάσει του ζευγαρώματος Watson-Crick με DNA ή RNA και ο σκελετός τους είναι σκελετός πολυαμιδίου. Επιτρέπεται ο υβριδισμός, μέσω των

ανιχνευτών, κάτω από συνθήκες αυστηρότερες, συγκριτικά με αυτές των παραδοσιακών ανιχνευτών DNA, και με αυξημένη εξειδίκευση. Στην κατεύθυνση αυτή, χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές PNA, σχεδιασμένοι για rDNA, προκειμένου να ανιχνευθούν τα βακτήρια και οι ζυμομύκητες (*D. bruxellensis*, *S. cerevisiae* και *Zygosaccharomyces bailii*), που σχετίζονται με το κρασί. Μέσω της χρησιμοποίησης των συγκεκριμένων ανιχνευτών, συνδυαστικά με τη συγκέντρωση του φίλτρου μεμβράνης από ένα δείγμα οίνου, που ακολούθως εμπλουτίστηκε σε ειδικά μέσα, επιτεύχθηκε η ανίχνευση, η αναγνώριση και η απαρίθμηση των μικροβίων των σχετικών με το κρασί σε χρόνο πολύ μικρότερο περίπου το (1/3) του αντίστοιχου της παραδοσιακής επιμετάλλωσης, χωρίς ικανοποιητική συσχέτιση του αριθμού των αποικιών με την απαρίθμηση. Η μέθοδος αυτή θεωρείται ως μέθοδος *in situ* υβριδισμού, αλλά επειδή η χρήση των ανιχνευτών πραγματοποιείται σε εμπλουτισμένη καλλιέργεια, αναπτυσσόμενη σε μέσα, δεν μπορεί να θεωρηθεί άμεση. Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να χρειάζεται λιγότερο χρόνο συγκριτικά με τις τεχνικές των έμμεσων μεθόδων, αλλά είναι απαραίτητη διαδικασία ανάπτυξης του οργανισμού. Η ομάδα των Xufre et al. (2006), προχώρησε στην επέκταση της συγκεκριμένης. Μέσω της χρήσης της περιοχής D1/D2 του 26S rRNA, ανιχνεύθηκαν οι *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata*, *Hanseniaspora uvarum* κ.α. σε δείγματα γλεύκους λευκού κρασιού (Ivey & Phister, 2011).

Οι μέθοδοι υβριδισμού, συγκριτικά με τις τεχνικές που είναι νεότερες και βασίζονται σε μεθόδους ενίσχυσης PCR, θεωρούνται χρονοβόρες και δυσκίνητες, εξαιτίας της ανάγκης ανάπτυξης των οργανισμών. Η Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH), χρησιμοποιήθηκε εκτός της περίπτωσης αναγνώρισης των μικροβίων που είναι ήδη απομονωμένα, και για τις περιπτώσεις άμεσης αναγνώρισης μικροβίων προερχόμενων από δείγματα ζύμωσης κρασιού, εξοικονομώντας σημαντικό χρόνο, και ταυτόχρονα ουσιαστικό για τον έλεγχο των βακτηριών, καθώς, δεν είναι αναγκαία η αναμονή ανάπτυξης του οργανισμού. Η ομάδα των Blasco et al (2003), σχεδίασε για την υπομονάδα 6S rDNA ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές επιτυγχάνοντας την άμεση ανίχνευση σε δείγματα κρασιού των *O. oeni*, *P. damnosus* κ.α. Επίσης, η ομάδα των Hirschhäuser et al (2005), για τη διάκριση του *O. oeni* από άλλα είδη βακτηριών του γαλακτικού οξέος που θεωρούνται συγγενικά, έθεσε ως στόχο για ανάλυση FISH τη χρησιμοποίηση της υπομονάδας 5S rDNA του *O. Oeni*, η οποία είναι άριστα συντηρημένη και η αλληλουχία της είναι διαφορετική, συγκριτικά με άλλα βακτήρια του γαλακτικού οξέος που είναι σχετιζόμενα φυλογενετικά. Μέσω της χρήσης ενός ανιχνευτή με τη μέθοδο FISH, παρατηρήθηκε η ταχεία λεύκανση του φθοροφόρου. Αντίθετα μέσω της

χρήσης πολλαπλών ανιχνευτών αυξήθηκε η απόδοση στον φθορισμό. Σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τρεις ανιχνευτές για τον συγκεκριμένο στόχο (5S rDNA) και την ανίχνευση του *Oenococcus oeni* (Ivey & Phister, 2011).

Επίσης, μέσω αυτής της μεθόδου γίνεται εξέταση για τα είδη *Dekkera* και *Brettanomyces*, τα οποία είναι υπεύθυνα για φαινόμενα δυσάρεστων γεύσεων στα κρασιά. Τα συγκεκριμένα είδη, συνήθως ανιχνεύονται μετά την αλλοίωση της γεύσης που προκαλούν. Η χρησιμοποίηση της μεθόδου FISH, ως μεθόδου ανίχνευσης μικροβίων, παρ' όλο που χαρακτηρίζεται από ταχύτητα και ακρίβεια αποτελεσμάτων, δεν είναι συνηθισμένη στη βιομηχανία του κρασιού. Οι λόγοι που δεν προτιμάται είναι το υψηλό οικονομικό κόστος του μικροσκοπίου φθορισμού και τα αποδεκτά όρια της. Τυπικά επίπεδα μικροβίων κάτω των 103 cfu ml<sup>-1</sup>, δεν παρατηρούνται και η κόπωση του χειριστή του μικροσκοπίου θεωρείται ανασταλτικός παράγοντας εφαρμογής της μεθόδου αυτής (Ivey & Phister, 2011).

### 7.3.2 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry – FCM) συμπεριλαμβάνεται στις τεχνικές εξέτασης σωματιδίων, μεταξύ των οποίων βακτηριακά κύτταρα και ζυμομύκητες, που αιωρούνται σε ρευστό σώμα, μέσω της χρήσης οργάνων. Ακολουθεί η διέλευση του ρευστού μέσω εστιασμένης δέσμης φωτός, με σκοπό τη μέτρηση ενός μεμονωμένου στοιχείου. Μπορεί να γίνει ανίχνευση συνδυασμού μετρήσεων φθορισμού και σκέδασης φωτός, ανάλογα με τους διαθέσιμους τύπους ανιχνευτών. Μπορεί να πραγματοποιηθεί ανίχνευση έως και εκατό κυττάρων το δευτερόλεπτο, μέσω χρήσης τυπικών οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν στη βιομηχανία κρασιού για την εξέταση της βιωσιμότητας και της φυσιολογίας τους (Ivey & Phister, 2011).

Η FCM τεχνική, λόγω των χρησιμοποιούμενων φθορίζουσών χρωστικών και των ειδικών ανιχνευτών, συμβάλλει στην παροχή πληροφοριών αναφορικά με τη φυσιολογία και την κατάσταση των κυττάρων και στην ποσοτικοποίηση ενός μικροοργανισμού μικτής καλλιέργειας. Για τους λόγους αυτούς, προτιμάται στις περιπτώσεις που είναι αναγκαίος ο ποσοτικός προσδιορισμός των παθογόνων μικροοργανισμών, των μικροοργανισμών αλλοίωσης και των μικροοργανισμών ενδιαφέροντος (Longin et al., 2017).

Επίσης, χαρακτηρίζεται για την ταχύτητά της και την υψηλή της εξειδίκευση, μέσω της χρήσης ειδικών χρωστικών κατά τη διάρκεια της αλκοολικής (AF) και της μηλογαλακτικής ζύμωσης

(MLF). Μπορεί να γίνει απαρίθμηση και των ζυμομυκήτων και των βακτηρίων με τη συγκεκριμένη μέθοδο.

Εξαρτάται άμεσα από τον οίνο που μελετάται. Ιδιαίτερα στους ερυθρούς οίνους η απαρίθμηση καθίσταται δύσκολη, καθώς μπορεί να υπάρξει σύγχυση της αύξησης του θορύβου υποβάθρου με τα βακτήρια και τις ζύμες. Στη σημερινή εποχή υπάρχει πληθώρα διαθέσιμων εμπορικών φθορίζουσών χρωστικών (διαπερατές χρωστικές DNA), που χρησιμοποιούνται για τη χρώση των μικροοργανισμών και έτσι διευκολύνεται η ανίχνευση και η απαρίθμηση τους, ακόμη και σε συνθήκες που ο θόρυβος υποβάθρου είναι σημαντικός. Στις φθορίζουσες χρωστικές περιλαμβάνονται οι χρωστικές SYTO (9, 13 και 17), οι οποίες γίνονται φθορίζουσες με τη δέσμευσή τους στα νουκλεϊκά οξέα. Αντίθετα, υπάρχουν και οι ήδη φθορίζουσες χρωστικές, DAPI και SYBR, των οποίων ο φθορισμός αυξάνει με την σύνδεσή τους με το DNA (Díaz et al., 2010), όπως αναφέρεται στους Longin et al., 2017). Αναλόγως του μέσου στο οποίο αναπτύσσεται ο κυτταρικός αυτοφθορισμός, μπορεί να προκύψει η διαφοροποίηση αποτελεσμάτων για τον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό. Προκύπτει λοιπόν ότι το μέσο και ιδιαίτερα η σύνθεσή του είναι πολύ σημαντική για την ανίχνευση και την ανάλυση του οίνου. Πολλές αναλύσεις συνδυαστικά με τη μέθοδο FCM πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές μήτρες (φυσικό ή συνθετικό γλεύκος, λευκούς ή ερυθρούς οίνους ή συνθετικούς) (Longin et al., 2017).

Αρκετές είναι οι φορές που χρησιμοποιούνται από τις μεθόδους τα γονίδια rDNA 16S ή 26S ως στόχος, μέσω ανάλυσης FISH, όπως προαναφέρθηκε. Παρ' όλα αυτά, οι περιπτώσεις διαθέσιμων αντισωμάτων σε συγκεκριμένους οργανισμούς που χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές DNA είναι ελάχιστες. Παράλληλα όμως, λόγω έλλειψης αντισωμάτων εμπορικής προέλευσης για την ανίχνευση αρκετών ζυμών και βακτηρίων που υπάρχουν στο κρασί, είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός ανιχνευτών που θα συμβάλλουν στην ανίχνευση αλλοιωγόνων μικροβίων. Οι Serpaggi et al. (2010), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), πέτυχαν την ανίχνευση του *Dekkera*, το οποίο αναπτύχθηκε σε συγκέντρωση 102 cfu ml<sup>-1</sup> σε ποικιλία *Pinot noir*, μέσω χρησιμοποίησης της κυτταρομετρίας ροής με βάση το FISH. Ωστόσο, η παρέμβαση των φαινολικών ενώσεων στα αρχικά στάδια ανίχνευσης της διαπερατότητας των κυττάρων, ως προεπεξεργασία, καθυστέρησε την ολοκλήρωση της μεθόδου για περισσότερες από 24 ώρες. Οι Malacrino et al. (2001), πέτυχαν την ανίχνευση βιώσιμων ζυμών 103 cfu ml<sup>-1</sup> και βακτηρίων σε 104 cfu ml<sup>-1</sup>, μέσω της χρήσης φθορίζουσών χρωστικών για τον υπολογισμό των πληθυσμών των ζυμομυκήτων και των βακτηρίων του οίνου. Σε περίπτωση

δοκιμασίας των δειγμάτων Pinot noir χωρίς προεπεξεργασία, η διάκριση μεταξύ βακτηρίων και άλλων υπολειμμάτων που υπάρχουν στο κρασί ήταν δύσκολη (Ivey & Phister, 2011).

Επίσης, οι Graca da Silveira et al. (2002), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), για την εξέταση της ακεραιότητας της μεμβράνης προσαρμοσμένων και μη προσαρμοσμένων κυττάρων *Oenococcus oeni* σε αιθανόλη, έκαναν τη χρήση της μεθόδου κυτταρομετρίας ροής και των φθορίζουσών χρωστικών με καρβοξυφθοροσκεΐνη και ιωδιούχο προπίδιο. Ανακάλυψαν ότι ο πληθυσμός άθικτων μεμβρανών (χρωματισμός μόνο με καρβοξυφθοροσκεΐνη) των προσαρμοσμένων σε αιθανόλη κυττάρων ήταν μεγαλύτερος. Στις περιπτώσεις ελέγχου της βιωσιμότητας των καλλιιεργειών εκκίνησης πριν από τη διαδικασία του εμβολιασμού, τα αποτελέσματα είναι καλύτερα. Μέσω αυτής της μεθόδου και με τη χρησιμοποίηση χρωστικών διακρίνονται γρήγορα, σε διάστημα λίγων λεπτών, τα βιώσιμα από τα νεκρά ή τα τραυματισμένα κύτταρα, παρέχοντας έτσι στον οινοποιό τη δυνατότητα καλύτερου ελέγχου της ζυμωτικής διαδικασίας και επομένως του επιθυμητού αποτελέσματος (Ivey & Phister, 2011).

### 7.3.3 Πλήρης υβριδισμός του γονιδιώματος

Η πλήρης υβριδοποίηση γονιδιώματος (comparative genomic hybridization - CGH), θεωρείται μία άλλη μέθοδος υβριδοποίησης. Χρησιμοποιείται για την σύγκριση μεταξύ των στελεχών των βακτηρίων ή των ζυμομυκήτων, μέσω ολόκληρης ή μερικής γονιδιωματικής συστοιχίας. Ουσιαστικά, γίνεται η υβριδοποίηση του γονιδιώματος ενός μικροβίου μέσω ανιχνευτών, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν ολόκληρο ή μερικό από το γονιδίωμα του οργανισμού. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται για την ευαισθησία της και την ικανότητά της στην ανίχνευση πολύ μικρών νουκλεοτιδίων και συμβάντων γονιδιακής διαγραφής (Ivey & Phister, 2011).

Μέσω της τεχνικής αυτής οι Salinas et al. (2010), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), διαφοροποίησαν τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*, LV CB, L-957 και το εμπορικό στέλεχος EC118, ενώ τόσο ο Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένου θραύσματος (Amplified fragment length polymorphism – AFLP) όσο και το τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random amplified polymorphic DNA - RAPD-PCR), δεν βοήθησαν στη διάκρισή τους. Μέχρι το 2011, είχε χρησιμοποιηθεί για να μελετηθούν στελέχη *S. cerevisiae*. Οι Dunn et al (2005) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο για τη σύγκριση τεσσάρων εμπορικών στελεχών *S. cerevisiae* και ενός εργαστηριακού. Επίσης, οι Winzeler et al. συνέκριναν 14 διαφορετικά στελέχη, τα οποία απομονώθηκαν από την περιοχή της Τοσκάνης και διαπιστώθηκε η

γεωγραφική διαφοροποίησή τους και η δημιουργία διαφορετικών συστάδων μεταξύ των άγριων και των εργαστηριακών στελεχών (Ivey & Phister, 2011).

Στην περίπτωση που μία μεγάλη διαγραφή περιέχεται σε ένα στέλεχος, αυτή δεν δύναται να προσδιοριστεί ως πραγματική διαγραφή ή ως αποκλίνουσα ορθολογική αλληλουχία. Η μέθοδος ενώ θεωρείται απλή, είναι ακριβή και υπάρχει περιορισμός από τη διαθεσιμότητα αλληλουχίας γονιδιώματος. Με την πάροδο των ετών οι αλληλουχίες των γονιδιωμάτων είναι διαθέσιμες και η μέθοδος μπορεί να βελτιωθεί λόγω αυτού του γεγονότος αλλά και λόγω της βελτίωσης της βιοανάλυσης, και να χρησιμοποιηθεί σε οικολογικές μελέτες για το κρασί (Ivey & Phister, 2011).

#### 7.3.4 Μέθοδοι αλληλούχισης

Αλληλουχία ριβοσωμικού DNA (rDNA).

Πολύ συχνά για να ταυτοποιηθούν τα μικρόβια του οίνου χρησιμοποιείται η μέθοδος της αλληλούχισης του ριβοσωμικού DNA (rDNA). Θεωρείται ένα σημαντικό εργαλείο ταχείας και ακριβούς ταυτοποίησης των μικροβίων και χρησιμοποιείται συνδυαστικά και με άλλες τεχνικές άμεσης ανάλυσης, όπως η Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Είναι συνήθης η διαδικασία απομόνωσης του DNA από μια αποικία σε μια πλάκα και η αλληλούχιση ενός γονιδίου από το συγκεκριμένο DNA. Στη συνέχεια, σε μία βάση δεδομένων, γίνεται σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου με άλλα γονίδια, προκειμένου να ταυτοποιηθεί η συγκεκριμένη αποικία. Η μέθοδος αλληλούχισης είναι ακριβέστερη, συγκριτικά με τις βιοχημικές παραδοσιακές μεθόδους, για την ταυτοποίηση επειδή είναι ανεξάρτητη από την ανάπτυξη του μικροβίου ή το προηγούμενο περιβάλλον του. Λόγω εξέτασης του γονιδίου του οργανισμού, η μέθοδος αυτή είναι ανεξάρτητη από την έκφραση ενζύμων που μεταβολίζουν κάποια σάκχαρα ή ενώσεις (Ivey & Phister, 2011).

Το 16S rDNA γονίδιο στα βακτήρια, και το 26S rDNA γονίδιο στις ζύμες ανήκουν στις μεταβλητές περιοχές του ριβοσωμικού DNA (rDNA) και έχουν τη μεγαλύτερη αλληλουχία. Επιλέγονται, επειδή έχουν τη μεγαλύτερη ιστορία στη διαδικασία ταυτοποίησης των μικροβίων, και επειδή είναι αλληλουχίες μιας βάσης δεδομένων για ζυμομύκητες και βακτήρια. Υπάρχουν αλληλουχίες διαθέσιμες και για μη καλλιεργούμενα μικρόβια, που όμως η ανάλυσή τους θεωρείται περιορισμένη. Μέσω της χρήσης της περιοχής D1/D2 του γονιδίου 26S rDNA στις ζύμες, παρέχονται πληροφορίες σε επίπεδο ειδών διαφορετικών στελεχών. Υπάρχει όμως ο περιορισμός τα διαφορετικά στελέχη να έχουν έως και τρία διαφορετικά



νουκλεοτίδια, και κάθε ξεχωριστό είδος να έχει λιγότερες από 6 διαφορές. Λόγω αυτού του περιοριστικού παράγοντα χρησιμοποιούνται και άλλα γονίδια ταυτοποίησης για τα βακτήρια και τους ζυμομύκητες. Σε κάποιες περιπτώσεις είναι μεγαλύτερη η ανάλυση που παρέχεται από αυτά τα γονίδια, σε άλλες όμως υπάρχουν περιορισμοί, καθώς είναι πολύ δύσκολη η ανάπτυξη καθολικών εκκινητών για μεγάλο αριθμό γονιδίων, συγκριτικά με τη μέθοδο του ριβοσωμικού DNA, που έχει περιοχές εξαιρετικά καθορισμένες και σταθεροποιημένες, και επιτρέπουν τη λειτουργία ενός ζεύγους εκκινητών για το σύνολο των ζυμών και των βακτηρίων. Επίσης, οι βάσεις δεδομένων είναι λιγότερες για αυτά τα γονίδια συγκριτικά με αυτές των γονιδίων του rDNA, δυσκολεύοντας τη διαδικασία ταυτοποίησης των οργανισμών που είναι άγνωστοι (Ivey & Phister, 2011).

### 7.3.5 Τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών εστιών (MLST)

Ενώ όπως αναφέρθηκε, η αλληλουχία του ριβοσωμικού DNA (rDNA) είναι αξιόπιστη μέθοδος ταυτοποίησης γένους και είδους, δεν είναι αρκετά αξιόπιστη για την ανάλυση διαφοροποίησης των στελεχών του οργανισμού που ερευνάται. Η Τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών τόπων (Multilocus – MLST) είναι η μέθοδος διαφοροποίησης των στελεχών. Λειτουργεί συγκρίνοντας την αλληλουχία μεταξύ έξι έως οκτώ γονιδίων ενός οργανισμού. Την προσέγγιση αυτή επινόησαν οι Maiden et al (1998), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), και μέσω αυτής τυποποιούνται τα παθογόνα βακτήρια. Διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος αυτή συγκριτικά με την μέθοδο τυποποίησης μικροδορυφόρων, και τη μέθοδο ανάλυσης περιορισμού του μιτοχondριακού DNA (mt-RFLP) δεν δίνει καλά αποτελέσματα διάκρισης των σακχαρομυκήτων. Αυξημένη ικανότητα διάκρισης και τυποποίησης των βακτηρίων του οίνου παρέχει η μέθοδος MLST, όπως αποδεικνύεται κατά την εξέταση του *Oenococcus oeni* (Ivey & Phister, 2011).

Η ταυτοποίηση άλλωστε των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος είναι ζωτικής σημασίας για μεγάλο αριθμό βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Μέσω της οξίνισης και έκκρισης των βακτηριοσίνων, συμμετέχουν στη διαδικασία για τη μείωση της αλλοίωσης και ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών. Παραδοσιακά ταξινομούνται βάσει μορφολογικών ή βιοχημικών χαρακτηριστικών. Διαδικασία αλληλούχισης και συγκριτικής ανάλυσης των δεδομένων αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε, κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διαδικασίας του οίνου, σε 19 στελέχη των *Pediococcus parvulus* και *Pediococcus damnosus*, τα οποία συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια αυτή, μέσω συνδυασμού πέντε γονιδίων – δεικτών, των *recA*, *rplB*, *pyrG*, *leuS* και *mle*. Μέσω συνδυασμού των προαναφερόμενων πέντε γονιδίων – δεικτών

πραγματοποιήθηκε σαφής διαφοροποίηση των προς ανάλυση στελεχών, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί στη μοριακή τυποποίηση (Calmin, Lefort & Belbahri, 2008).

### 7.3.6 Μέθοδοι δακτυλικών αποτυπωμάτων

Η μέθοδος του δακτυλικού αποτυπώματος εξετάζει το σύνολο του γονιδιώματος ενός οργανισμού, με τη δημιουργία συχνά ενός μοτίβου ζωνών μέσω της ενίσχυσης περιοχών του γονιδιώματος, ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση ανάμεσα σε οργανισμούς. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών, ωστόσο, οι περισσότερες διαφοροποιούν μόνο τα στελέχη συγκεκριμένου οργανισμού. Ενώ υπάρχουν νέες μέθοδοι, μεταξύ αυτών οι συστοιχίες ολόκληρου του γονιδιώματος και η αλληλούχιση του, πολλές έρευνες σύγκρισης στελεχών στηρίζονται σε κάποιο από τα είδη των μεθόδων δακτυλικών αποτυπωμάτων, οι οποίες χαρακτηρίζονται για την ταχύτητά τους και θεωρούνται οικονομικές λύσεις (Ivey & Phister, 2011).

### 7.3.7 Ανάλυση περιορισμού του ριβοσωμικού DNA (ARDRA)

Η μέθοδος της ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού της εσωτερικής μεταγραφόμενης περιοχής διαστήματος (ITS-RFLP) αποτελεί μία λύση ως εναλλακτική για την αλληλουχία 26S rDNA, οικονομικότερη και εξίσου αξιόπιστη ταχείας ταυτοποίησης ζυμομυκήτων. Εφαρμόστηκε για να ταυτοποιηθούν σε επίπεδο είδους όλες οι ζύμες του οίνου, με επιτυχία. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε συνδυαστικά με διαφορετικές τεχνικές προκειμένου να ταυτοποιηθούν ζύμες από διάφορα μέρη παγκοσμίως, όπως σε αμπελώνες της Κίνας και της Σλοβενίας μέχρι και σε ζυμώσεις Jura της Γαλλίας. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται στην εξέταση διαδοχής των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διαδικασίας του κρασιού, καθώς και στις επιπτώσεις των διάφορων πρακτικών οινοποίησης (π.χ. ψυχρή εκχύλιση) στο πληθυσμιακό σύνολο των ζυμών (Ivey & Phister, 2011).

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενίσχυση μέσω PCR, της περιοχής ανάμεσα στα γονίδια 18S και 26S rRNA, όπου περιέχονται εσωτερικές μεταγραφόμενες περιοχές διαστήματος. Ακολουθεί πέψη του προϊόντος της PCR με τρία ένζυμα περιορισμού για την παραγωγή ενός μοτίβου ζωνών. Η εκτέλεση της διαδικασίας αυτής σε πηκτή αгарόζης, δίνει μοτίβα για 2 έως 4 ζώνες. Η σύγκριση γίνεται μεταξύ αυτών των μοτίβων και των μοτίβων ζωνών στελεχών του είδους της ζύμης που θεωρείται ύποπτο, ενώ στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει διάθεση διάφορων μοτίβων (Ivey & Phister, 2011).

Άλλος τρόπος προσδιορισμού των ζυμών είναι μέσω της σύγκρισης του συνολικού μεγέθους προϊόντος PCR. Με εφαρμογή αυτού του τρόπου οι Guillamon et al. (1998), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), έκαναν τη διαπίστωση ότι μέσω της ενίσχυσης με PCR, της συγκεκριμένης περιοχής, στη ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* παράχθηκε ένα προϊόν 390-bp, ενώ στη *Hanseniaspora uvarum* παράχθηκε ένα προϊόν 760-bp και στις ζύμες *Saccharomyces cerevisiae*, *bayanus* και *pastorianus* παράχθηκαν θραύσματα 880-bp. Με την εφαρμογή της τεχνικής αυτής σε ζύμες «flor» στο sherry, διαπιστώθηκε μια διαγραφή 24-bp στην ίδια περιοχή συγκριτικά με άλλα στελέχη *S. cerevisiae*. Αυτή η περίπτωση θεωρείται ασυνήθιστη, καθώς, η τεχνική χρησιμοποιείται για διαφοροποίηση ειδών και όχι στελεχών ζυμομυκήτων. Τελικά, μετά τη διαδικασία αυτή (διαγραφή 24-bp, μοτίβα ζωνών, πέψη με ένζυμο περιορισμού), διαφοροποιήθηκαν στελέχη της ζύμης *S. cerevisiae flor* από τα *non-flor* (Ivey & Phister, 2011).

Όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιείται η διαδικασία της πέψης του προϊόντος της PCR με τρία ένζυμα περιορισμού. Ο αριθμός των ενζύμων που θα χρησιμοποιηθεί για τη διαδικασία της πέψης του θραύσματος και την καλύτερη διαφοροποίηση των ειδών σε συγκεκριμένα γένη των ζυμομυκήτων εξαρτάται από το είδος που πρόκειται να εξεταστεί. Για παράδειγμα αναφέρεται η περίπτωση έρευνας των Cadez et al. (2002), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), όπου διαπιστώθηκε η πλήρης διαφοροποίηση όλων των ειδών των ζυμών *Hanseniaspora* και *Kloeckera* μέσω πέψης με δύο ένζυμα DdeI και HinfI. Η τυποποίηση ARDRA μπορεί να πραγματοποιηθεί και για την ταυτοποίηση των ειδών ζυμών non-*Saccharomyces* στο κρασί, όπως ανέφεραν οι Balerias Couto et al. (2005), καθώς και για τον εντοπισμό βακτηρίων γαλακτικού και οξικού οξέος του οίνου, μέσω ανάλυσης των περιοριστικών ενζύμων της περιοχής 16S rDNA. Η μέθοδος αυτή, συγκριτικά με τις προαναφερόμενες μεθόδους αλληλούχισης, έχει απόδοση που χαρακτηρίζεται καλού βαθμού, και ο αριθμός προτύπων περιορισμού που διατίθεται για ζύμες οινοποίησης είναι μεγάλος (Ivey & Phister, 2011).

Για την ανάλυση σε επίπεδο ειδών, υποειδών και στελεχών, οι μέθοδοι της αλληλούχισης ενός μόνο γονιδίου και της ανάλυσης περιορισμού ενισχυμένου rDNA, χαρακτηρίζονται ταχείες και αξιόπιστες, λόγω της διαθέσιμης υποδομής τους. Ωστόσο, συχνά χρησιμοποιούνται συνδυαστικά με άλλες τεχνικές για ακριβέστερη ανάλυση. Έτσι, στην περίπτωση χρήσης της ARDRA συνδυαστικά με την Random amplified polymorphic PCR (RAPD-PCR), καθίσταται

σαφέστερη η συνολική εικόνα των ειδών ζύμης, των στελεχών και των ειδών τους που έχουν εμπλοκή στη ζυμωτική διαδικασία (Ivey & Phister, 2011).

Βάσει μελέτης των Rodas, Ferrer & Pardo (2003), πραγματοποιήθηκε ενίσχυση από την αποικία του 16S rDNA, απευθείας, και ακολούθησε η διαδικασία της πέψης με τρία ένζυμα περιορισμού, τα *BfaI*, *MseI* και *AluI*, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά για να απλουστευθεί η ταυτοποίηση των βακτηρίων γαλακτικού οξέος. Μέσω της τεχνικής αυτής, διακρίθηκαν 32 από τα 36 είδη αναφοράς γαλακτοβάκιλλων και επιτράπηκε η ταυτοποίηση 342 απομονωμένων ατόμων γλευκών και οίνων. Τα είδη στα οποία ανήκαν οι απομονώσεις ήταν τα *Lactobacillus Collinoides*, *coryniformis*, *bilgardii*, *mali*, *paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus* και *pentosaceus*.

#### 7.3.8 Ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου (PFGE)

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου (Pulsed-field gel electrophoresis – PFGE) θεωρείται τεχνική εξέτασης ολόκληρου του χρωμοσώματος ενός μικροβίου. Η μέθοδος αυτή για τις ζύμες έχει την ονομασία καρυότυπος. Η μέθοδος βασίζεται στην ανάπτυξη μιας μεμονωμένης αποικίας ζύμης σε υγρό μέσο, που συνδυαστικά με αγαρόζη σε λιωμένη μορφή σχηματίζει άγαρ. Πραγματοποιείται λύση των κυττάρων της ζύμης στη μήτρα άγαρ και τα κομμάτι, τα οποία διοχετεύονται σε πηκτή αγαρόζης, υποβάλλονται στη συνέχεια σε διαδικασία εναλλασσόμενης εφαρμογής δύο ηλεκτρικών πεδίων. Με αυτό τον τρόπο διαχωρίζονται μεγάλα τμήματα. Στην περίπτωση ταυτοποίησης βακτηριακών στελεχών πραγματοποιείται πέψη του χρωμοσώματος με ένζυμα περιορισμού. Αυτή θεωρείται μία παραλλαγή της μεθόδου γνωστή ως PFGE με περιοριστική ενδονουκλεάση (REA-PFGE) (Ivey & Phister, 2011).

Και οι δύο αυτές μέθοδοι έχουν εκτενή χρήση στην ταυτοποίηση των ζυμομυκήτων και των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τον οίνο, με επίπεδο διάκρισης υψηλό. Κατά την εφαρμογή τους από διάφορους ερευνητές, προέκυψαν συμπεράσματα αναφορικά με την ανάλυση και τη μελέτη των βακτηριακών στελεχών. Οι Schuller et al (2004), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), κατόπιν σύγκρισης διάφορων μεθόδων ταυτοποίησης ζύμης *S. cerevisiae* κατέληξαν ότι η μέθοδος του καρυότυπου είχε την μεγαλύτερη υψηλότερη ανάλυση (διακρίθηκαν 22 από τα 23 αναλυόμενα στελέχη). Υπάρχουν περιπτώσεις, όπως αυτή των στελεχών *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* που λόγω μικρού αριθμού χρωμοσωμάτων, παρατηρείται ασάφεια κατά την εφαρμογή της παραδοσιακής καρυοτυπικής ανάλυσης. Σημαντική για τη αξιοπιστία της μεθόδου REA-PFGE, στη μελέτη και έρευνα των

βακτηριακών στελεχών, κρίνεται η επιλογή των κατάλληλων ενζύμων περιορισμού. Για παράδειγμα σε μελέτη των Larisika et al (2008), διαπιστώθηκε ότι συνιστώμενο ένζυμο περιορισμού, *ApaI*, που είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο δεν παρείχε καλή ανάλυση των 65 στελεχών του *Oenococcus O. Oeni* συγκριτικά με το ένζυμο, *SfiI* (Ivey & Phister, 2011).

Η PFGE θεωρείται, ως τεχνική για την εφαρμογή της στον οίνο, σχετικά εύκολη στη διενέργειά της, με εξαιρετική διάκριση και αναπαραγωγή, αλλά ταυτόχρονα υψηλού κόστους και με απαίτηση υψηλού επιπέδου εκπαίδευσης. Λόγω αυτών των δυσκολιών αναπτύχθηκαν ορισμένες ταχύτερες, απλούστερες και λιγότερο ενεργοβόρες μέθοδοι (Ivey & Phister, 2011).

### 7.3.9 Ανάλυση περιορισμού του μιτοχονδριακού DNA (MT-RFLP)

Για την ανάλυση των στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*, τα οποία σχετίζονται με το κρασί χρησιμοποιείται η μέθοδος της ανάλυσης περιορισμού του μιτοχονδριακού (MT-RFLP). Σε μία απλουστευμένη εκδοχή της μεθόδου αυτής, πραγματοποιείται απομόνωση του ολικού DNA από τη ζύμη και στη συνέχεια ακολουθεί διαδικασία πέψης του με ένα ένζυμο περιορισμού (*HinFI* ή *HaeIII*). Μέσω των ενζύμων αυτών αποικοδομείται το χρωμοσωμικό DNA σε μορφή μικρών θραυσμάτων, ενώ η διάσπαση του μιτοχονδριακού DNA είναι λιγότερο συχνή. Αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος είναι η δημιουργία μοτίβου ζωνών, τα οποία χρησιμοποιούνται για να διαφοροποιηθούν τα στελέχη των ζυμών *S. Cerevisiae*. Η μέθοδος διακρίνεται για την ταχύτητα, την ευκολία χρήσης της, και την οικονομική εφαρμογή της. Οι Schuller et al (2004) διαπίστωσαν τη διακριτικότητα της μεθόδου συγκριτικά με τη μέθοδο ανάλυσης μικροδορυφόρων και δ-ακολουθιών, καθώς διαφοροποίησε 21 από τα 23 στελέχη των *Saccharomyces*, ενώ οι Munoz et al (2009), κατέληξαν στη διαπίστωση της ανωτερότητάς της συγκριτικά με την τυποποίηση MLST (Ivey & Phister, 2011).

Σπάνια είναι η χρησιμοποίησή της για την κατηγορία των μυκήτων που δεν ανήκουν στην κατηγορία ζυμών *Saccharomyces*. Οι Martorell et al (2005), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο για την διαφοροποίηση των στελεχών των *D. bruxellensis* και *Pichia guilliermondii*, διαπίστωσαν την παρουσία μόνο τριών μοτίβων mt-RFLP από 63 στελέχη *D. Bruxellensis*. Για την περαιτέρω διαφοροποίηση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RAPD-PCR (Ivey & Phister, 2011).

Στη μελέτη των Comi et al. (2000) πραγματοποιήθηκε απομόνωση 70 στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* από διάφορα είδη σταφυλιών της ιταλικής περιοχής Collio. Έγινε προσδιορισμός των χημικών παραμέτρων και των προτύπων περιορισμού του μιτοχονδριακού

DNA (mtDNA). Η κυριότερη παράμετρος διαφοροποίησης των στελεχών ήταν οι υψηλότερες αλκοόλες. Μέσω της ανάλυσης του mtDNA καταδείχθηκε υψηλή γενετική παραλλακτικότητα ανάμεσα στα στελέχη, και ασθενής συσχέτιση από τη σύγκριση των δεδομένων που προέκυψαν λόγω των χημικών και γενετικών αποτελεσμάτων. Μέσω της απλουστευμένης μεθόδου mtDNA των Querol et al., (1992), μεγάλος αριθμός στελεχών άγριας ζύμης χαρακτηρίστηκε γρήγορα, όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011).

#### 7.3.10 Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένου θραύσματος (AFLP)

Η AFLP ως τεχνική χρησιμοποιείται συνήθως προκειμένου να προσδιοριστεί ο γονότυπος των σταφυλιών και της μούχλας στον οίνο. Σπάνια εφαρμόστηκε στη διαδικασία τυποποίησης στελεχών βακτηρίων του οίνου, παρ' όλο που οι Cappello, Zapparoli, Logrieco, & Bartowsky (2017) διαπίστωσαν την αξιοπιστία της μεθόδου για να τυποποιηθούν στελέχη του *O. oeni*. Για την τυποποίηση των στελεχών ζυμομυκήτων, διεξάχθηκαν ελάχιστες μελέτες. Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται επίπονη και οικονομικά ασύμφορη, καθώς, για την ανάλυση απαιτούνται αυτοματοποιημένες συσκευές αλληλούχισης του DNA. Είναι δυνατή η χρήση της απλούστερης και φθηνότερης εκδοχής της, που συνήθως περιλαμβάνει ακτινοβολία (Ivey & Phister, 2011).

Η διαδικασία εξελίσσεται ως εξής: Αρχικά το DNA του μικροβίου ενδιαφέροντος ακολουθεί τη διαδικασία της πέψης με ένα ένζυμο περιορισμού και ακολούθως διαμοιράζεται σε θραύσματα στα οποία γίνεται πρόσδεση προσαρμογέων. Συνεχίζει ενίσχυσή τους με PCR με τη χρήση εκκινητών, που έχουν ως στόχο τις θέσεις περιορισμού και τους προσαρμογείς. Για την ανίχνευση ενός μοτίβου, ακολουθεί διαχωρισμός των θραυσμάτων μέσω χρήσης αυτοματοποιημένης αλληλουχίας DNA (Ivey & Phister, 2011).

Στην εργασία των Baselga et al. (2017), έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μιας διαδικασίας ταυτοποίησης των αυτόχθονων ζυμών των αμπελιών που υπάρχουν σε δείγματα πολύπλοκης σύστασης, γλευκών και οίνων, χωρίς την απαίτηση απομόνωσης αποικιών ή μικροβιολογικών καλλιεργειών. Η διαδικασία βασίστηκε στους μοριακούς δείκτες της μεθόδου AFLP. Έγινε σύγκριση μεταξύ των προφίλ αλληλόμορφων AFLP, που η λήψη τους έγινε από σύνθετα δείγματα, και των ειδικών, που προσδιορίστηκαν προηγουμένως, του είδους, τα οποία περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων μέσω χρήσης αλγορίθμου για την ταξινόμηση. Μέσω της διαδικασίας αυτής, επιτράπηκε η γρήγορη και ταυτόχρονα αποτελεσματική ταυτοποίηση για τα είδη και τα στελέχη των ζυμών των σύνθετων δειγμάτων, γεγονός που συμβάλλει στην απλούστευση της εργασίας των οινοποιών.



### 7.3.11 Μέθοδοι δακτυλικής εκτύπωσης με βάση την PCR

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν στελέχη των ζυμομυκήτων αλλά και των βακτηρίων του οίνου χρησιμοποιούνται τεχνικές βασισμένες στη μέθοδο PCR. Πιο συχνά χρησιμοποιείται η τυχαία ενισχυμένη πολυμορφική DNA-PCR ή RAPD-PCR, για να γίνει κατανοητή η διαδοχή συγκεκριμένων στελεχών των ζυμών και των μικροβίων στον οίνο. Σε εργασία των Urso et al (2008), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής, έγινε παρακολούθηση των στελεχών των *Saccharomyces* κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του Picolit, το οποίο είναι ένας ιταλικός γλυκός οίνος. Διαπιστώθηκε ότι, η αλκοολική ζύμωση εκτελείται από την εμβολιασμένη καλλιέργεια εκκίνησης *S. Cerevisiae* στη μία από τις δύο ζυμωτικές διαδικασίες μελέτης (Ivey & Phister, 2011).

Θεωρείται μέθοδος απλής εκτέλεσης γι' αυτό έχει εκτενή χρήση ταυτοποίησης στελεχών. Για τη διεξαγωγή της μεθόδου είναι απαραίτητος ένας μικρός εκκινητής και θερμοκρασία ανόπτησης σε χαμηλά επίπεδα, ώστε να επιτρέπεται τυχαίος υβριδισμός στο γονιδίωμα. Με την προσγείωση δύο εκκινητών σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους δημιουργείται μια ζώνη, που επιτρέπει την έρευνα των πολυμορφισμών περιμετρικά ενός συγκεκριμένου γονιδιώματος. Οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι ειδικοί για συγκεκριμένα στελέχη ζυμών ή βακτηρίων. Οι Cadez et al (2002), επισήμαναν την χρησιμότητα της μεθόδου για την αποκάλυψη της σχέσης ανάμεσα σε στέλεχη του ίδιου είδους (Ivey & Phister, 2011).

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τη μελέτη των στελεχών *Oenococcus oeni*. Οι Ruiz et al (2010), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), μέσω της χρησιμοποίησης της RAPD-PCR, προχώρησαν στον προσδιορισμό στελεχών ικανών για εμφύτευση και διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης (MLF), σε οινοποιείο τη Ισπανίας, ανάμεσα από 22 στελέχη. Επίσης, οι Solieri et al (2010), προχώρησαν στην απομόνωση και την αλληλούχιση μιας ζώνης, η οποία δημιουργήθηκε με την RAPD-PCR, για τη δημιουργία μιας μεθόδου QPCR παρακολούθησης συγκεκριμένου στελέχους του *O. Oeni*, κατά τη ζυμωτική διαδικασία. Η μέθοδος συγκριτικά με την MLST, δεν λειτουργεί τόσο αξιόπιστα για τη διάκριση μεταξύ βακτηρίων (Ivey & Phister, 2011).

Παρ' όλο που η τεχνική αυτή είναι γρήγορη, με υψηλή απόδοση, χωρίς να είναι απαραίτητες πληροφορίες αλληλούχισης για τη διαδικασία σύγκρισης των στελεχών, παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα. Η αναπαραγωγή των μοτίβων ζωνών για συγκεκριμένα στελέχη στα εργαστήρια είναι δύσκολη διαδικασία. Πρέπει να γίνεται προσεκτική τυποποίηση των βημάτων της διαδικασίας, καθώς, έχει παρατηρηθεί ότι λόγω μικρών παραλλαγών

απομόνωσης του DNA ή του τύπου κυκλοποιητή θερμοκρασίας, μπορεί να συμβεί διαφοροποίηση του μοτίβου ζωνών. Παρατηρούνται ανάλογου τύπου διαφοροποιήσεις, ακόμη και στο ίδιο εργαστήριο μεταξύ διαφορετικών ερευνητών (Ivey & Phister, 2011).

Τεχνικές που θεωρούνται χρήσιμες της ταυτοποίησης και τυποποίησης είναι η RAPD και η ριβοτύπιση, ενώ η μέθοδος της PFGE-RFLP είναι ειδική της τυποποίησης (Rodas, Ferrer & Pardo, 2005).

### 7.3.12 Ηλεκτροφόρηση πηκτής διαβάθμισης με μετουσίωση (DGGE)

Ενώ οι προαναφερόμενες μέθοδοι χρησιμοποιούνται, προκειμένου να συγκριθούν είδη και συγκεκριμένα στελέχη, η μέθοδος της DGGE χρησιμοποιείται για να συγκριθούν μικροβιακές κοινότητες του περιβάλλοντος, απευθείας εκεί. Σύμφωνα με τους Cocolin et al (2000), πρόκειται για ευαίσθητη μέθοδο, ανίχνευσης πληθυσμών ζυμομυκήτων του οίνου, οι οποίοι σε ποσοστό των *Saccharomyces* αντιπροσωπεύουν μόλις το 0,01%, ποσοστό που εξαρτάται από τη συγκεκριμένη δοκιμασία της μεθόδου κάθε φορά (Ivey & Phister, 2011).

Η βάση της μεθόδου είναι ο διαχωρισμός των τμημάτων ίδιου μήκους DNA. Μικρές παραλλαγές στην αλληλουχία των θραυσμάτων DNA προκαλούν τις αλλαγές της ηλεκτροφορητικής κινητικότητάς τους. Η χημική βαθμίδα είναι υπεύθυνη για τη μετουσίωσή τους. Αποτροπή της πλήρους μετουσίωσής τους γίνεται μέσω χρήσης εκκινητών με GC-clamp. Προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση, γίνεται σύγκριση των διαχωρισμένων θραυσμάτων με μια αλληλουχία DNA, η οποία αποτελείται από προϊόντα της PCR, ήδη αναγνωρισμένων στελεχών ελέγχου, για τα οποία θεωρείται ότι υπάρχουν στο περιβάλλον. Ωστόσο η μέθοδος αυτή, καθίσταται προβληματική στην περίπτωση ανάπτυξης ενός νέου ή καινοτόμου οργανισμού. Επομένως, είναι σημαντική η επιλογή ενός κατάλληλου γονιδίου για την ανάλυση. Τα τμήματα του DNA αναπτύσσονται σε μήκος έως τα 500 bp, με σκοπό να διαθέτουν περιοχές καλά διατηρημένες που θα χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό των εκκινητών. Το γονίδιο κωδικοποίησης της β - υπομονάδας RNA πολυμεράσης για τα περισσότερα βακτήρια, έγινε στόχος επιλογής, παρ' όλο που το γονίδιο 16S rDNA συνεχίζει να χρησιμοποιείται. Αντίστοιχα, για τους ζυμομύκητες, σχεδόν πάντα το γονίδιο-στόχος είναι ο βρόχος D1/D2 του γονιδίου 26S rDNA (Ivey & Phister, 2011).

Στην μεγαλύτερη μελέτη για τη χρήση της DGGE, οι Renouf et al (2007), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), ξεκίνησαν την παρακολούθηση του μικροβιακού πληθυσμού κατά την διάρκεια της οινοποιητικής από το γλεύκος έως τον οίνο. Βρέθηκαν, στην επιφάνεια

των σταφυλιών οκτώ διαφορετικών αμπελώνων, 52 διαφορετικά είδη ζυμομυκήτων. Μέσω της ανάλυσης της μεθόδου DGGE, διαπιστώθηκε η μείωση του πληθυσμού των ζυμών κατά την εξέλιξη της διαδικασίας σε τρία διακριτά σημεία – φάσεις. Στην πρώτη φάση, κατά την διάρκεια της αρχικής ζύμωσης ο συνολικός πληθυσμός αυξήθηκε σε περίπου 108 cfu ml<sup>-1</sup>, κυριαρχώντας ο *Saccharomyces cerevisiae*. Στη δεύτερη φάση παρατηρείται μείωση του πληθυσμού και στην τρίτη φάση της παλαίωσης, παρατηρείται πάλι αύξηση του πληθυσμού σε περίπου 103-4 cfu ml<sup>-1</sup> και σταθεροποίηση με τη ζύμη *D. bruxellensis* να είναι η κυρίαρχη στον πληθυσμό (Ivey & Phister, 2011).

Παρόμοια τεχνική θεωρείται η ηλεκτροφόρηση πηκτής βαθμίδας θερμοκρασίας (TGGE), που βασίζεται στην ίδια αρχή με την DGGE, που χρησιμοποιείται για τη διάκριση μεταξύ μικτών πληθυσμών. Βασική διαφορά της είναι η χρησιμοποίηση βαθμίδας θερμοκρασίας αντί των αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετουσιωτικού. Οι Fernandez-Gonzalez et al (2001), όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), μέσω της TGGE χαρακτήρισαν είδη *Saccharomyces* και non - *Saccharomyces* από τα γλεύκη των οίνων, κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διαδικασίας. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να διακριθούν τα γένη των απομονώσεων των non-*Saccharomyces* (*Candida*, *Kluyveromyces* και *Hanseniaspora*). Η μέθοδος είναι αποτελεσματική για να επαληθευθούν στελέχη ξηρής ζύμης προ της χρήσης τους για τη ζύμωση (Ivey & Phister, 2011).

### 7.3.13 Ανίχνευση PCR

Η παραδοσιακή PCR χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν οι πληθυσμοί - στόχοι. Το γονίδιο που στοχεύεται για τη διαδικασία προσδιορισμού υπάρχει πιθανότητα να διαφοροποιείται αρκετά μεταξύ των ειδών, αλλά επιλέγεται καθώς είναι το μοναδικό αυτού του είδους. Οι Zapparoli et al., το έτος 1998, χρησιμοποίησαν το γονίδιο κωδικοποίησης του μηλογαλακτικού ενζύμου, *mle*, του *Oenococcus oeni* ως στόχο PCR. Ανιχνεύθηκε το *O. oeni* στα 107 cfu ml<sup>-1</sup> στο γλεύκος των σταφυλιών και στα 104 cfu ml<sup>-1</sup> στον οίνο (Ivey & Phister, 2011).

Η εξειδίκευση διασφαλίζεται μέσω ενός στοχευμένου γονιδίου ή μέσω χρήσης της PCR, συνδυαστικά με μία τυχαία αλληλουχία DNA μικρού μήκους, η οποία είναι μοναδική για το συγκεκριμένο είδος. Οι Ibeas et al (1996), σχεδίασαν ένα πρωτόκολλο της μεθόδου PCR σε δύο στάδια για την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων *Dekkera* στο sherry, μέσω της χρησιμοποίησης ενός απομονωμένου θραύσματος DNA για να αναπτυχθούν εκκινητές. Μέσω αυτής της αλληλουχίας ενισχύθηκε σε πολύ καλό βαθμό το στέλεχος *Dekkera* OSB101. Η αλληλουχία ήταν συνδεδεμένη στενά με την πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA RAD4, η οποία

βρέθηκε στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Έγινε σχεδιασμός ενός δεύτερου σετ εκκινήτων στην ίδια περιοχή. Ο ένθετος εκκινήτης συνέβαλε με επιτυχία στην ανίχνευση μόνο του *D. bruxellensis* και στελεχών συνώνυμων σε αυτόν. Δεν βοήθησε στην ανίχνευση ζυμών *S. cerevisiae* (Ivey & Phister, 2011).

Για τη διασφάλιση της εμφύτευσης ενός κυρίαρχου στελέχους εκκίνησης, έγινε χρήση της μεθόδου σε δείγματα οίνων απευθείας. Μέσω της δοκιμής εκκινήτων σε στελέχη (13) της ξηρής ζύμης του *Saccharomyces cerevisiae*, το σύνολο των στελεχών διαφοροποιήθηκαν μεταξύ τους και συγχρόνως και από τρία στελέχη αναφοράς, με ευκολία, με προσδιορισμό τους με μία αντίδραση PCR. Έγιναν ζυμώσεις μικρής κλίμακας με το συνδυασμό τεσσάρων στελεχών διαφορετικών αναλογιών για τον έλεγχο της ευαισθησίας της δοκιμασίας. Αποτέλεσμα ήταν η ανίχνευση στελεχών σε ποσοστό 30 τοις εκατό ή και περισσότερο του συνολικού πληθυσμού. Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν για αρκετά δείγματα γλεύκους (Ivey & Phister, 2011).

Κύριοι περιορισμοί για τη χρήση της μεθόδου PCR στη διαδικασία ανίχνευσης είναι ότι θεωρείται ποιοτική μέθοδος και όχι ποσοτική, καθώς, παρέχονται πληροφορίες είτε παρουσίας είτε απουσίας μικροβίων, χωρίς ικανότητα διαφοροποίησης μεταξύ των βιώσιμων και μη (Ivey & Phister, 2011).

#### 7.3.14 PCR σε πραγματικό χρόνο

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (QPCR), έχει πολλές ομοιότητες με τη μέθοδο της παραδοσιακής PCR, ενσωματώνοντας μια φθορίζουσα χρωστική, της οποίας ο φθορισμός με την ολοκλήρωση κάθε κύκλου PCR, αυξάνεται. Ο κύκλος της μεθόδου PCR κατά τον οποίο ο φθορισμός φτάνει και ξεπερνάει μια τιμή κατωφλίου προκαθορισμένη ( $C_t$ ), αναφέρεται ως θετικός. Η διαδικασία ενίσχυσης του DNA έχει άμεση σύνδεση με τον φθορισμό που προκύπτει, είτε εξαιτίας προσθήκης συγκεκριμένης χρωστικής δέσμευσης DNA (SYBR Green), είτε μέσω προσθήκης ενός ανιχνευτή, ο οποίος σημαίνεται με κάποιο φθοροφόρο (Ivey & Phister, 2011).

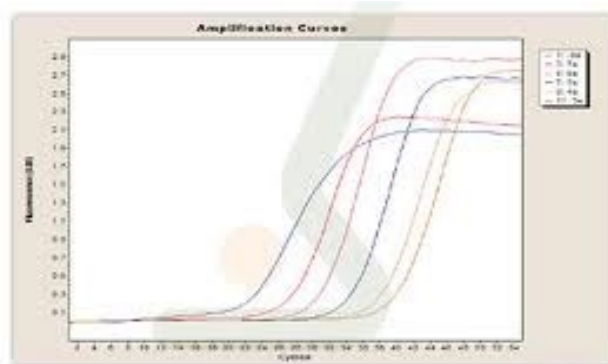
Γενικά, ο σχεδιασμός ενός ανιχνευτή πραγματοποιείται στην περιοχή ανάμεσα σε δύο εκκινήτες ποσοτικής PCR (QPCR), δίνοντας στην ανάλυση μεγαλύτερη ειδικότητα, συγκριτικά με τον προσδιορισμό μέσω προσθήκης SYBR Green, καθώς, ο ανιχνευτής θα είναι ειδικός για τον συγκεκριμένο οργανισμό. Ο ανιχνευτής, ο οποίος συνδέεται ανάμεσα στους δύο εκκινήτες, περιέχοντας ένα φθοροφόρο και έναν αποσβεστήρα, θα καταφέρει τη συσχέτισή

του με το μονόκλωνο DNA κατά τη διάρκεια του σταδίου επιμήκυνσης της μεθόδου PCR. Καθώς το θραύσμα του DNA επιμηκύνεται από την πολυμεράση DNA, συμβαίνει ανοικοδόμηση του ανιχνευτή και προκαλείται διαχωρισμός του φθοροφόρου από τον αποσβεστήρα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία φθορισμού. Η ποσότητα του φωτός, το οποίο εκπέμπεται μέσω του φθοροφόρου και μέσω του δείγματος, και στις δύο περιπτώσεις (SYBR Green και ανιχνευτή), θεωρείται θετική τη στιγμή που υπερβαίνει την τιμή κατωφλίου Ct. Από τη σύγκριση των τιμών Ct κάθε δείγματος με μία καμπύλη τυπικής μορφής, γίνεται ποσοτικοποίησή του. Τα δείγματα μικρών ποσοτήτων DNA θα έχουν τιμές Ct υψηλότερες, από τις τιμές Ct των δειγμάτων υψηλών ποσοτήτων DNA. Επομένως, στην περίπτωση ύπαρξης μεγάλου αριθμού μικροβίων σε κάποιο δείγμα, η ποσότητα DNA θα είναι μεγάλη και η τιμή Ct χαμηλότερη (Ivey & Phister, 2011).

Οι Phister and Mills, το 2003, όπως αναφέρεται στους Ivey & Phister (2011), εφάρμοσαν τη μέθοδο QPCR, όπως φαίνεται στην εικόνα 21, στο κρασί προκειμένου να ανιχνευθεί το *D. bruxellensis*. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε έκτοτε για την παρακολούθηση κάθε μικροβίου του οίνου, παρ' όλα αυτά υπάρχουν περιπτώσεις που κάποιες ενώσεις μπορεί να μεταβάλλουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης του κρασιού. Η μέθοδος QPCR, χαρακτηρίζεται για την ταχύτητά της, καθώς, έχει διάρκεια λίγων ωρών και μεγάλης ευαισθησίας. Υπάρχουν περιπτώσεις ανίχνευσης, μέσω αυτής της μεθόδου, έως και δέκα οργανισμών ανά χιλιοστόλιτρο. Μεταξύ των μειονεκτημάτων της μεθόδου είναι το κόστος εκπαίδευσης και η αδυναμία στη διαφοροποίηση βιώσιμων και μη βιώσιμων μικροβίων. Ίσως το mRNA, είναι καλύτερος δείκτης διαφοροποίησης βιώσιμων και μη βιώσιμων κυττάρων συγκριτικά με το rRNA ή το DNA (Ivey & Phister, 2011).

Η μελέτη των Καζάνιονά M. et al (2012), πραγματοποιήθηκε για να ταυτοποιήσει τον μικροβιόκοσμο σταφυλιών, γλεύκους και οίνου κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διαδικασίας, μέσω της χρήσης της κλασικής μικροβιολογικής μεθόδου και της μεθόδου Real-Time PCR. Έγινε παρακολούθηση των μεταβολών διάφορων ομάδων μικροοργανισμών, σχετικά με τον συνολικό αριθμό των βακτηρίων, των γαλακτοβάκιλλων και των ζυμομυκήτων. Κατά τη διάρκεια της ερευνητικής περιόδου, έγινε εξέταση 30 δειγμάτων οίνου, στα στάδια του αφιλτράριστου, φιλτραρισμένου γλεύκους της ζύμωσης αρχικά, κατά τη διάρκειά της και κατά την ολοκλήρωσή της, και στο στάδιο του νεαρού οίνου, μεταξύ των ποικιλιών του Müller Thurgau, του Cabernet Sauvignon, του Chardonnay, του Tramin και του Red Bio-wine. Για την παρουσία και την ευαισθησία των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηριακών ειδών έγινε

ανίχνευσή τους μέσω της χρήσης PCR πραγματικού χρόνου (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *crispatus* και *salivarius*).



Εικόνα 21. Real time PCR (εκπομπή φθορισμού κατά τη διάρκεια της qPCR)

(Η μέθοδος της real-time PCR (ποσοτική PCR ή PCR πραγματικού χρόνου). (n.d.). Retrieved from Vet In Progress plus website: <https://vetinprogress.gr/services/methodos-real-time-pcr-gr/>)

## 7.4 Παραδείγματα μεθόδων ανίχνευσης

Για την ασθένεια του περονόσπορου στην άμπελο ευθύνεται ο ωομύκητας *Plasmopara viticola*. Η αντιμετώπισή του θεωρείται σημαντική πρόκληση για την παραγωγική διαδικασία σταφυλιών και οίνου. Η έρευνα των Fu, et al. (2023) έδειξε ότι υπάρχει έντονη ρύθμιση του γονιδίου *Plasmopara viticola* στα αρχικά στάδια της μόλυνσης από τον ωομύκητα της ποικιλίας *Vitis vinifera*. Μέσω της μεθόδου προσέγγισης παγίδευσης αλληλουχίας σήματος στη ζύμη, αποδείχθηκε η λειτουργικότητα του συγκεκριμένου γονιδίου σ' αυτήν. Επιπρόσθετα, το PnAvh77 συνδυαστικά με ένα πεπτιδίο σήματος καταφέρει τη διέγερση των ανοσολογικών αποκρίσεων των φυτών στο πορώδες του δικτύου των πηκτινικών πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος (αποπλαστικό χώρο – αποπλάστη). Ειδικότερα, μέσω της εφαρμογής ενός εξωγενούς καθαρισμένου γονιδίου PnAvh77-M2 πραγματοποιήθηκε η αποτελεσματική εκκίνηση των αμυντικών αποκρίσεων της αμπέλου εξωκυτταρικά, φαινόμενο που αποδείχθηκε λόγω της αυξημένης συσσώρευσης σαλικυλικού οξέος και νερού και της μειωμένης μόλυνσης λόγω εμβολιασμένου *P. viticola*.

Μία άλλη έρευνα των Yin, et al. (2017) ανέφερε την αλληλουχία του πλήρους γονιδιώματος για το προϊόν του ωομύκητα *P. viticola* «JL-7-2» το οποίο λαμβάνεται συνδυαστικά μέσω βιοεπιστημονικών ερευνών και συγκεκριμένα μέσω τεχνολογιών αλληλούχισης και συστοιχίων Illumina και αλληλούχισης μακράς ανάγνωσης υψηλής ακρίβειας PacBio. Η



διαδικασία της μεταγραφικής ανάλυσης αποκάλυψε ότι, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης έγινε ρύθμιση σημαντικού βαθμού προς τα πάνω των περισσότερων τελεστών, των γονιδίων παθογένειας και των ενεργών σε υδατάνθρακες ενζύμων. Ως εκ τούτου, η διαθεσιμότητα του γονιδιώματος *P. viticola* θεωρείται μία πηγή πολύτιμη καθώς παρέχεται η δυνατότητα συγκριτικής γονιδιωματικής ανάλυσης και διενέργειας εξελικτικών μελετών μεταξύ ωομυκήτων, ενώ ταυτόχρονα γίνεται περισσότερο κατανοητός ο μηχανισμός των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο βιοτροφικό παθογόνο και τον ξενιστή του.

Επίσης, βάσει μελέτης των Onetto, Sosnowski, Van Den Heuvel, & Borneman (2022), στις σημαντικές ασθένειες της αμπέλου, όπως ήδη προαναφέρθηκε συμπεριλαμβάνεται και ο θάνατός της από *Eutypa*, που οφείλεται στον *Eutypa lata* μύκητα, του οποίου η ποικιλομορφία του γονιδιώματός του είναι άγνωστη. Προκειμένου να κατανοηθεί η διαδικασία εξέλιξης του γονιδιώματος αυτού του μύκητα, καθώς και η προσαρμογή, το μέγεθος και η δομή του πληθυσμού του, πραγματοποιήθηκε η τεχνική της αλληλούχισης του ολικού γονιδιώματος και της συγκριτικής γονιδιωματικής μεταξύ 40 απομονωμένων ατόμων του *E. Lata*, προερχόμενων από την Αυστραλία. Μέσω επιλεκτικών σαρώσεων επηρεάστηκαν περιοχές γονιδίων που έχουν συσχέτιση με δευτερογενείς μεταβολίτες. Τα γονίδια αυτά είχαν ικανότητα κωδικοποίησης πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν ενεργό ρόλο στην απόκτηση των θρεπτικών συστατικών, στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή και στην αντοχή έναντι μετάλλων και φαρμάκων. Μέσω της ανάλυσης της σύνθεσης του γονιδιώματος, με τη μέθοδο αλληλούχισης μακράς ανάγνωσης, αποδείχθηκε ότι η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών του συγκεκριμένου μύκητα επηρεάζεται λόγω της σημαντικής ενδοειδικής γονιδιωματικής πλαστικότητας εκτεταμένων χρωμοσωμικών αναδιατάξεων.

Αναφορικά με τις μελέτες για τον καρκίνο της αμπέλου, μία σχετική μελέτη των Úrbez-Torres, Peduto, Smith & Gubler (2013), αποκάλυψε την παρουσία του *P. Viticola*, σε αμπελώνες της Καλιφόρνιας, καθώς και των *Diaporthe ambigua*, *eres* και *neotheicola* σε άμπελο με εμφανή συμπτώματα στο ξυλώδες μέρος της, βασισμένη σε μορφολογικές μελέτες και στη μέθοδο της ανάλυσης αλληλούχισης των πολλαπλών γονιδίων. Η μελέτη αυτή πρότεινε τη συμπερίληψη του *P. viticola* στους μύκητες που ευθύνονται για την εμφάνιση της ασθένειας του καρκίνου στον κορμό της αμπέλου.

Βάσει μελέτης των Geiger, Karácsony, Geml, & Váczy (2022) εξετάστηκε η ικανότητα που έχουν οι απομονώσεις του *Clonostachys rosea* να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες για τον έλεγχο έναντι των παθογόνων ασθενειών του ξυλώδους μέρους της αμπέλου.

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση πέντε στελεχών του *C. rosea* και 174 παθογόνων στελεχών μυκήτων από αμπέλια που είχαν εμβολιασθεί, τα οποία στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε *in vitro* δοκιμές αντιπαράθεσης. Διαπιστώθηκε αποτελεσματική ανταγωνιστικότητα έναντι των παθογόνων *Eutypa lata* και των *Phaeomoniella chlamydospora*. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε το φαινόμενο του μικροπαρασιτισμού στα παθογόνα *Botryosphaeria dothidea* και στα *Diaporthe spp.* Κατά τη διαδικασία δοκιμών διπλής καλλιέργειας *in vitro* (εργαστηριακή εξέταση), ακολούθησε μέτρηση των παραγόμενων κονιδίων από τις απομονώσεις του *C. rosea* σε πλάκες PDA. Παρατηρήθηκε μείωση του μήκους και της συχνότητας εμφάνισης των αλλοιώσεων νέκρωσης, λόγω της δράσης των *Eutypa lata* και *Phaeomoniella chlamydospora* στο σημείο που πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός, κατόπιν τρίμηνης επώασης στο χώρο του θερμοκηπίου, και συγκεκριμένα σε μοσχεύματα, τα οποία φυτεύτηκαν σε εμβολιασμένα, με τα κονίδια του συγκεκριμένου στελέχους, εδάφη. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω προκύπτει ότι το *C. Rosea* μπορεί να θεωρηθεί ένας σημαντικός παράγοντας για τη βιολογική καταπολέμηση ορισμένων ασθενειών του ξυλώδους μέρους της αμπέλου.

Οι Liu et al. (2021) ερεύνησαν το παθογόνο *Coniella diplodiella* (Speg.) ως υπεύθυνο για την ασθένεια της λευκής σήψης που επηρεάζει άμεσα την παραγωγικότητα και την ποιοτική κατάσταση των αμπελιών. Δυστυχώς οι μοριακοί μηχανισμοί και οι πληροφορίες του γονιδιώματός του δεν είναι επαρκώς κατανοητοί.

Αναφορικά με την ανθράκωση της αμπέλου, που οφείλεται στον μύκητα *Elsinoe ampelina*, παρά τη διεξαγωγή ορισμένων μελετών δεν έχει γίνει διαλεύκανση των μοριακών μεθόδων και αλληλεπιδράσεων, οι οποίες θεωρούνται ασαφείς και θα μπορούσαν να συμβάλουν στην αντιμετώπισή του (Li et al., 2021).

Όπως αναφέρουν οι Bily, Nikolaeva, Olson, & Kang(2021) για την τεκμηρίωση της κατανομής του επιβλαβούς *Phytophthora spp.*, πραγματοποιήθηκε συλλογή από 64 δασικές περιοχές της περιοχής της Πενσυλβάνια, από το Υπουργείο Γεωργίας, 89 δειγμάτων φυτών, 137 δειγμάτων εδάφους και 48 δειγμάτων μεταξύ των ετών 2018 έως και 2020. Συνολικά, επιτεύχθηκε απομόνωση 231 στελεχών *Phytophthora* και έγινε ταυτοποίησή τους βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών και αλληλούχισης πυρηνικών και μιτοχονδριακών τόπων.

Παρά το γεγονός ότι ο μύκητας *Phaeomoniella chlamydospora* ανιχνεύεται πιο συχνά ως παράγοντας στον οποίο οφείλονται οι ασθένειες Petri και Ίσκα, οι οποίες είναι δύο σημαντικές μυκητιασικές ασθένειες του κορμού της αμπέλου, οι διεργασίες των προτύπων διασποράς για

το εμβόλιο του *P. chlamydospora* είναι ελάχιστα γνωστές. Στην εργασία των González-Domínguez et al. (2020), μελετήθηκε το αερομεταφερόμενο εμβόλιο *P. chlamydospora* και η διασπορά του μεταξύ των ετών 2016 έως 2018 σε δύο περιοχές καλλιέργειας αμπέλου, στην ανατολική και τη βόρεια Ισπανία. Γινόταν εβδομαδιαία παρακολούθηση των αμπελώνων μεταξύ των μηνών Νοέμβριο έως Απρίλιο. Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της *P. chlamydospora*, μέσω ειδικής ποσοτικής μεθόδου πραγματικού χρόνου (qPCR) και χρήσης παγίδων σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου. Η μέθοδος διαπιστώθηκε ότι έχει ευαισθησία και ότι ανάμεσα στους αριθμούς των κονιδίων *P. chlamydospora* (καταμέτρησή τους με μικροσκόπιο) και στους αριθμούς των αντιγράφων του DNA (ποσοτικοποιημένα με qPCR) υπάρχει καλή συσχέτιση. Παρατηρήθηκε η ανίχνευση σταθερών DNA του *P. chlamydospora* κατά τη διάρκεια όλων των εποχών και στις δύο περιοχές, με ποσοτική όμως διαφοροποίηση. Μέσω της εξίσωσης Gompertz έγινε καλύτερη περιγραφή του μοτίβου διασποράς του DNA του *P. chlamydospora*. Με την παρέλευση του χρόνου, ο οποίος εκφράστηκε ως υδροθερμικός, διαπιστώθηκε καλύτερη περιγραφή του μοτίβου. Με τον όρο υδροθερμικός χρόνος εννοείται ο χρόνος που εξαρτάται από την επίδραση των θερμοκρασιών και των βροχών. Επομένως, μέσω αυτής της εξίσωσης είναι δυνατή η πρόβλεψη των περιόδων υψηλού κινδύνου διασποράς του *P. chlamydospora*.

Μέσω της μελέτης των Auger, Esterio & Pérez (2007), διαπιστώθηκε ότι η ασθένεια της μαύρης σήψης προκαλείται από το *Cylindrocarpon macrodidymum* Halleen, Schroers & Crous. Αναφορά της έγινε πρώτη φορά στη Χιλή και προκαλεί την καταστροφή των επιτραπέζιων και των οινοποιήσιμων σταφυλιών ποικιλίας αμπέλου *Vitis vinifera*. Έγινε συλλογή 18 απομονώσεων του *Cylindrocarpon* από τις ρίζες, τα αγγεία και τους ιστούς του πυρήνα από δώδεκα περιοχές της Χιλής. Πραγματοποιήθηκε ταυτοποίησή τους με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Μέσω της μεθόδου της αλληλούχισης εσωτερικού μεταγραφόμενου διαστήματος (ITS1-5,8S-ITS4) rDNA και β-τουμπουλίνης (BT1, και BT2), διαπιστώθηκε η ταύτισή τους με αυτές του *C. macrodidymum*.

Στην μελέτη των Cosseboom & Hu (2021) έγινε συλλογή 265 απομονώσεων μυκήτων από σταφύλια που σάπισαν μεταξύ των ετών 2014 έως 2020 και προχώρησε η ταυτοποίησή τους σε επίπεδο γένους μέσω της μεθόδου αλληλούχισης εσωτερικών μεταγραφικών διαστημάτων. Από τα 15 γένη που ταυτοποιήθηκαν μεταξύ των επικρατέστερων ήταν τα *Botrytis*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Neopestalotiopsis*. Ακολούθησε αξιολόγηση της παθογένειάς τους, δύο φορές με δοκιμές πεδίου, μέσω τεχνητού εμβολιασμού των τραυματισμένων και μη

σταφυλιών *Vitis vinifera*. Αξιολογήθηκαν τέσσερις ποικιλίες στα φαινολογικά στάδια άνθησης, ωρίμανσης και συγκομιδής. Βάσει συλλογής στοιχείων από τα απομονωμένα άτομα που συλλέχθηκαν, και από τις δοκιμές στο πεδίο, προκύπτει ότι ο μύκητας *A. uvarum* για τα οινοποιήσιμα σταφύλια, που εξετάστηκαν στις μεσατλαντικές Η.Π.Α., είναι σημαντικό παθογόνο. Η χρησιμότητα της μελέτης αφορά στον εντοπισμό και διαχείριση των καρπόφυτων σήψεων των ειδών *Alternaria*, *Aspergillus* και *Neopestalotiopsis* στα οινοποιήσιμα σταφύλια.

Λόγω γενετικών και γονιδιωματικών αναλύσεων αποδείχθηκε ότι ο μύκητας *Aspergillus vitis* διαφοροποιείται από τα μέλη που ανήκουν στο γένος *Agrobacterium*. Το *Aspergillus vitis* χαρακτηρίζεται από ποικιλομορφία γενετική, αναφορικά με το πλασμιδιακό αλλά και το χρωμοσωμικό DNA. Ο καθορισμός της παθογένειάς του βασίζεται στην ύπαρξη ενός μεγάλου συζευκτικού πλασμιδίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση όγκου (Ti), και είναι χαρακτηριστικής μωσαϊκής δομής με περιοχές μεταβλητές και συντηρημένες. (Kuzmanović et al., 2018).

Ο *Xylophilus ampelinus* θεωρείται αιτιολογικός παράγοντας για την κακοήθεια και τον καρκίνο της αμπέλου (τσιλίκ μαράζι). Προκειμένου για τη βελτίωση των γνώσεων των επιστημόνων για το συγκεκριμένο είδος, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης των πλήρων αλληλουχιών του γονιδιώματος που διατίθενται στο NCBI. Έγινε εσφαλμένη ταυτοποίηση αρκετών αλληλουχιών. Κρίνεται απαραίτητη, για την αντιμετώπιση και την ερμηνεία του, νέα εκστρατεία απομόνωσης και διενέργεια επιδημιολογικών ερευνών, ταυτόχρονα με την ανάλυση για το είδος αυτό, νέων πλήρων αλληλουχιών γονιδιώματος (Portier et al., 2022).

Μέσω εργασίας που εκπονήθηκε από τους Oliveira et al. (2018) έγινε εντοπισμός των μυκήτων της φυλλόσφαιρας της αμπέλου, σε συλλογές των κύριων οριοθετημένων αμπελοοινικών περιοχών στην Πορτογαλία, με ανάλυση των φυλογενετικών τους σχέσεων. Πραγματοποιήθηκε συλλογή 46 δειγμάτων αμπέλου (φύλλα και μούρα) από διαφορετικές περιοχές της χώρας. Ζωτικής σημασίας θεωρείται η γνώση στην αναγνώριση των μυκήτων και στη γενετική ποικιλότητα, ώστε να αναπτυχθούν κατάλληλες στρατηγικές για τη διαχείριση των καλλιεργειών. Οι πληροφορίες αυτού του είδους θα συμβάλλουν και στη χρήση, με σύνεση, ειδικών μυκητοκτόνων.

Στην μελέτη των Sánchez, Chimeno, Mercado & Ciklic (2022) αποκτήθηκαν, μέσω των κλασσικών μεθόδων υβριδισμού και ανατομίας των σπορίων, δύο στελέχη ζύμης οίνου

(υβριδικό και μονοσποριακό). Αυτά τα στελέχη ζύμης θεωρούνται βελτιωμένα, καθώς έχουν φαινότυπο συνδυασμού αιθανόλης και οσμοανθεκτικότητας. Η πραγματοποίηση δοκιμών οينوποίησης, στις οποίες ήταν χαρακτηριστική η υψηλή συγκέντρωση σε σάκχαρα, απέδειξαν την εξαιρετική απόδοση των βελτιωμένων ζυμών κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διαδικασίας. Ακόμα, πρέπει να αναφερθεί, ότι ήταν πολύ καλά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων, όπως προέκυψε κατά την διαδικασία της οργανοληπτικής τους ανάλυσης. Συμπεραίνεται ότι, τα βελτιωμένα μονοσποριακά και υβριδικά στελέχη ζυμών, ως εκκινητές ζύμης κατά την διαδικασία των ζυμώσεων με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων, έχουν θετικά αποτελέσματα.

Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός νέων προϊόντων οίνου ποικιλίας Shiraz, εμπλουτισμένου με εκχύλισμα ενός ασιατικού φαρμακευτικού μανιταριού (*Ganoderma lucidum* – GL) ήταν το αποτέλεσμα της έρευνας των Nguyen, et al. (2019). Πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εκχυλίσματος GL, σε επίπεδα διαφορετικά, πριν και μετά την διαδικασία της πρωτογενούς ζύμωσης, προκειμένου να γίνει διερεύνηση του τρόπου που επιδρά στην εξέλιξη της διαδικασίας της ζύμωσης του γλεύκους, όπως και στην χημική σύνθεση και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ταχύτητα και εξέλιξη της ζύμωσης του γλεύκους ερυθρής ποικιλίας συγκριτικά με τις ζυμώσεις. Η επίδραση αυτή διερευνήθηκε μέσω βασικών χημικών αναλύσεων και μικροεκχύλισης στερεής φάσης (HS-SPME), αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας, GC-MS, συνδυαστικά με μια ομάδα αισθητήρων. Ήταν σαφής ο διαχωρισμός ανάμεσα στις επεξεργασίες των οίνων με προσθήκη GL, καθώς έγινε συσχετισμός συγκεκριμένων πτητικών συστατικών με κυρίαρχα αισθητηριακά χαρακτηριστικά των οίνων. Μέσω αυτής της έρευνας προκύπτουν νέοι ορίζοντες για τους παραγόμενους οίνους.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η άμπελος, όπως ήδη αναφέρθηκε, έχει γενετικά ποικιλόμορφο χαρακτήρα, εξαιτίας των διαφοροποιήσεων μεταξύ των ειδών και των ποικιλιών της, οι οποίες οφείλονται στις συνθήκες του περιβάλλοντος ανάπτυξής της. Αυτές οι διαφοροποιήσεις συνδυαστικά με την εντατικοποίηση της καλλιέργειας δημιούργησαν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη ασθενειών και την προσβολή της από πλήθος παθογόνων. Τα παθογόνα προξενούν βιοτικές καταπονήσεις στην άμπελο με εμφανείς τις επιπτώσεις τους στην ανάπτυξη του φυτού, αλλά και στην παραγωγή και την ποιότητα των καρπών του. Η αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών, αλλά και των εχθρών της αμπέλου, απαιτεί την έγκαιρη αναγνώριση των παθήσεων και τη λήψη μέτρων, ώστε να ελαχιστοποιούνται οι οικονομικές επιπτώσεις. Η εξάπλωση και η μετάδοση των ιώσεων της αμπέλου γίνεται μέσω της χρήσης πολλαπλασιαστικού υλικού, εμβολιασμού, μετάδοσης από είδη νηματωδών και εντόμων. Δυστυχώς όμως, η αύξηση του αριθμού των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που κυκλοφορούν στο εμπόριο, όπως είναι τα μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματωδοκτόνα κ.α., προξενεί συνθήκες αβεβαιότητας και σύγχυσης, αναφορικά με την αποτελεσματική εφαρμογή των μέτρων.

Η δράση των μικροοργανισμών, η οποία ξεκινάει από το αμπέλι και συνεχίζει έως και μετά την εμφιάλωση του οίνου, η γνώση ανάπτυξής τους, και ο έλεγχός τους κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, αποτελούν αναγκαίες προϋποθέσεις για παραγόμενα προϊόντα υψηλής ποιότητας. Ο οίνος, ως το κύριο προϊόν της αμπέλου, χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα, καθώς χιλιάδες είναι οι μεταβολίτες που αποτελούν τη σύστασή του, για την παραγωγή των οποίων δρα πληθώρα ζυμών και βακτηρίων κατά τη διαδικασία ζύμωσης του γλεύκους των σταφυλιών. Οι κοινότητες αυτές μικροβίων προέλευσης αμπελώνα και οινοποιείου, οι οποίες επηρεάζουν άμεσα τη γεύση αλλά και το άρωμα του οίνου, αντανακλούν πως επιδρούν διάφοροι παράγοντες στο παραγόμενο κρασί. Οι παράγοντες αυτοί είναι οι ποικιλίες των σταφυλιών, η θέση (γεωγραφία, κλίμα), ο χρόνος και τρόπος των ψεκασμών και των τεχνολογικών πρακτικών, καθώς και τα στάδια επεξεργασίας αλλά και η εποχή της προσυλλογής, συγκομιδής και μετασυλλογής.

Αναγκαίος είναι ο προσεκτικός έλεγχος κατά την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, προκειμένου να παραχθούν κρασιά με υψηλή ποιότητα, υπό την προϋπόθεση περιορισμού της ανάπτυξης των μικροοργανισμών που είναι ανεπιθύμητοι και της ύπαρξης ικανού αριθμού ζυμών που είναι επιθυμητές, συνδυαστικά με την επιλογή του κατάλληλου υποστρώματος



προκειμένου να αναπτυχθούν ικανοποιητικά οι ζύμες, να ρυθμίζεται η θερμοκρασία σε κανονικά επίπεδα για να αποφεύγεται η υπερθέρμανση και να αποτρέπεται η οξείδωση. Η ανάπτυξη αρχικά των μη-Σακχαρομυκήτων και ακολούθως των Σακχαρομυκήτων διασφαλίζει τη ζυμωτική διαδικασία χωρίς αυτή να παρεκκλίνει σε λάθος κατευθύνσεις.

Το τέλος της αλκοολικής ζυμωτικής διαδικασίας ακολουθούν μεταβολικές διεργασίες μετατροπής του γλεύκους σε οίνο, οι οποίες διαμορφώνουν την τελική σύνθεση των συστατικών του και ιδιαιτέρως αυτών της γεύσης και των αρωμάτων. Προκειμένου για οίνους υψηλής ποιότητας ακολουθεί διαύγαση, αποθήκευση και διατήρησή τους, με σκοπό την πραγματοποίηση μεταβολών κατά την παλαίωσή τους και την βελτίωση και σταθεροποίηση ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά προσδίδονται στο κρασί όταν αυτό ωριμάζει λόγω επίδρασης του οξυγόνου του αέρα και λόγω των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των συστατικών του.

Πρωτογενής πηγή των ζυμομυκήτων, που συμμετέχουν στην οινοποίηση, είναι τα σταφύλια. Επομένως, οι οικολογικοί συσχετισμοί στο σταφύλι θα έχουν ως αποτέλεσμα τις μεταβολές στο μυκητιακό φορτίο, στο στάδιο της κυρίως ζύμωσης. Η εμφάνιση και η ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, κατά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, επηρεάζεται από τον αρχικό πληθυσμό τους, από την βιοποικιλότητα των στελεχών και των ειδών του γλεύκους, τη χημική του σύσταση συμπεριλαμβανομένων και των μυκητοκτόνων, τα οποία υπάρχουν ως κατάλοιπα, τη χρήση αντιοξειδοτικών και του διοξειδίου του θείου. Επίσης, παράγοντες που επηρεάζουν την καλλιέργεια είναι η οξύτητα στα αρχικά στάδια, οι μικροοργανισμοί και η δράση τους, οι συσχετισμοί μεταξύ τους, καθώς και η θερμοκρασία της ζύμωσης. Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών απαιτείται η αύξηση των διαθέσιμων εργαλείων αξιολόγησής τους.

Έννοιες, όπως αυτές της ευαισθησίας και της σταθερότητας του οίνου, έναντι αλλοιωμένων ζυμών, αντιμετωπίζονται σήμερα μέσω της επιστημονικής γνώσης και των βιομηχανικών πρακτικών παρακολούθησης της μόλυνσής του από ζυμομύκητες. Στη σημερινή εποχή οι τεχνολογίες της διαδικασίας οινοποίησης και οι βελτιώσεις στον έλεγχο της ζυμωτικής διαδικασίας έχουν προοδεύσει. Ζωτικής σημασίας θεωρείται η κατανόηση της μικροβιακής δυναμικής εντός των ζυμωτικών διεργασιών, και η ανάπτυξη κατάλληλων μεθοδολογιών, ταυτόχρονα με την εκπαίδευση των οινοποιών, προκειμένου να έχουν την ικανότητα να τις αξιοποιούν με πρακτικούς τρόπους για την αντιμετώπιση των μολυσματικών ζυμομυκήτων,

και την αποφυγή αλλοίωσης του παραγόμενου οίνου με άμεσα αποτελέσματα στην στρατηγική προώθησής του σε μια αγορά που συνεχώς μεταβάλλεται.

Μεταξύ των μεθόδων διάγνωσης των ασθενειών και ιώσεων της αμπέλου, αλλά και για τον προσδιορισμό της νοθείας, και την κατανόηση της διαδικασίας των οικολογικών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν ανάμεσα σε διάφορες μικροβιακές ομάδες (είδη και στελέχη), κατά τη διαδικασία της ζυμωτικής περιόδου έως και τη συσκευασία των οίνων, συγκαταλέγονται και μοριακές μέθοδοι (ανάλυση διπλόκλωνου RNA, νουκλεϊνικά διαγνωστικά, μέθοδος PCR, μέθοδος RT-PCR, τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενιάς (next-generation sequencing – NGS κ.α.). Ήδη, για τον έλεγχο της νοθείας του οίνου, ευρέως εφαρμοζόμενες αναλυτικές μέθοδοι είναι οι χρωματογραφικές, φασματοσκοπικές και οι μέθοδοι ανάλυσης DNA. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές πλεονεκτούν έναντι άλλων μεθόδων, λόγω του σύντομου χρόνου ανάλυσης, του κόστους και του γεγονότος ότι αναλύονται μικρές ποσότητες δείγματος χωρίς να καταστρέφονται.

Βάσει της βιβλιογραφικής ανασκόπησης που προηγήθηκε προκύπτει ότι, σήμερα οι θεμελιώδεις μοριακοί μηχανισμοί λειτουργίας των βιολογικών συστημάτων συμβάλλουν στη ρύθμιση της γονιδιακής ενεργότητας και στη συνειδητοποίηση της δυναμικής των επιγενετικών χαρακτηριστικών του γονιδιώματος. Στην κατεύθυνση αυτή, σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στον οίνο, και ταυτοποίησής τους, έχουν διερευνηθεί, μελετηθεί και αναπτυχθεί, και έχουν οδηγήσει σε συμπεράσματα αναφορικά με την φυσιολογία, την κατάσταση των κυττάρων, την ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών, την ακριβή ταυτοποίηση των ειδών και των στελεχών τους, την ταχύτητα και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων τους.

Στο άμεσο μέλλον, προκύπτει η ανάγκη για την περαιτέρω πειραματική διερεύνηση, την αξιοποίηση και την εξέλιξη των ήδη εφαρμοζόμενων μοριακών μεθόδων, είτε μεμονωμένα, είτε συνδυαστικά, ανάλογα με τα υπάρχοντα δεδομένα, τα προσδοκώμενα αποτελέσματα και τους δείκτες αξιοπιστίας, ώστε να παρέχονται στοιχεία αναφορικά με την υψηλή ποικιλότητα ειδών και στελεχών, την ταξινομία και οικολογία τους για τη διασφάλιση της ποιότητας του παραγόμενου οίνου και την παραγωγή καινοτόμων προϊόντων. Ειδικότερα, το ζητούμενο είναι η ανάπτυξη μεθόδων για την ανίχνευση των ιών, οι οποίες θα είναι ταχείες, ακριβείς και υψηλής ευαισθησίας, μέσω της προετοιμασίας του κατάλληλου δείγματος για την απομόνωσή τους από τη μήτρα του δείγματος.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

### ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agrobase (χ.χ.). Ανακτήθηκε: 25 Ιουνίου 2024 από: <https://agrobasesapp.com/greece/disease/botrutes>
2. Agro 24 (χ.χ.) Ανακτήθηκε: 25 Ιουνίου 2024 από: <https://www.agro24.gr/tags/περονόσπορος>.
3. Αλεξιάκης, Α., (2000). *Το κρασί και η παραγωγή του*. Αθήνα: Σιδερί.
4. Αντωνόπουλος, Η. (2018, June 19). Βακτηριακή Νέκρωση. Ανακτήθηκε: 25 Ιουνίου 2024, από <https://www.kalliergo.gr/extthroi-asthenies-fyton/vaktiriaki-nekrosi/>
5. Ασημιάδης, Μ. (2002). *Οινοποίησης Εγχειρίδιο*. Αθήνα: Ασημιάδης.
6. Βέκιος, Γ., Κούκης, Δ., Τσακίρης, Α., (1997) *Το Βιβλίο Του Κρασιού*. Αθήνα: Ψύχαλου.
7. ΕΡ.Ο.Σ.: Ερασιτεχνικός Οινοελαιουργικός Σύλλογος Μυκονίων (χ.χ.). Ανακτήθηκε: 25 Ιουνίου 2024 από: <https://www.erosmykonos.gr/>
8. Ζαρμπούτης, Ι., & Τσιβεριώτου, Μ., (2003). *Στοιχεία αμπελουργίας και οιολογίας*. Αθήνα: Ίων.
9. Θεοδοσίου, Π.Σ., (1992). *Μαθήματα οινοποιίας*. Θεσσαλονίκη: Υπηρεσία δημοσιευμάτων πανεπιστημιακού τυπογραφείου.
10. Ιστορικά χαμηλή η φετινή συγκομιδή σταφυλιών στη Γαλλία [Δημοσίευμα] (26.08.2021) Ανακτήθηκε: 25 Ιουνίου 2024 από: <https://paidis.com/>
11. Κουράκου – Δραγώνα, Σ., (1998). *Θέματα Οινολογίας*. Αθήνα: Τροχαλία.
12. Λαμπρόπουλος, Κ. (2024) ΔΑΟΚ Λακωνίας: Χορήγηση αδειών νέων φυτεύσεων αμπέλου με οινοποιήσιμες ποικιλίες για το έτος 2024. Ανακτήθηκε: 25 Ιουνίου 2024, από: <https://laconiatv.gr/index.php/life-styles/agrotika/item/7686-daok-lakonias-xorigisi-adeion-neon-fyteyseon-ampelou-me-oinopoiisimes-poikilies-gia-to-etos-2024>
13. Μακρή, Δ. (2023). Οινολογία και Τεχνολογία Αλκοολούχων Ποτών. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Ανακτήθηκε: 25 Ιουνίου 2024 από: [https://eclass.uth.gr/modules/document/file.php/FOOD\\_U\\_196/04\\_Must.pdf](https://eclass.uth.gr/modules/document/file.php/FOOD_U_196/04_Must.pdf)
14. Νακοπούλου, Ζ., (2005). *Αζωτούχα συστατικά γλεύκους και οίνου των ποικιλιών ροδίτη και Sauvignon plane: Μεταβολές του πρωτεϊνικού προφίλ και άλλων συστατικών κατά την αλκοολική ζύμωση*. Μεταπτυχιακή διατριβή. Θεσσαλονίκη.

15. Νεραντζής, Η., Ταταρίδης Π., Λιούνη Μ., Βαρελάς Β., (2015). *Μικροβιολογία οίνου*. Αθήνα: Έμβρυο.
16. Νικολάου, Ν.Α., (2008). *Αμπελουργία*. Θεσσαλονίκη: Σύγχρονη παιδεία.
17. Ξένια, Μ.Ι., (2018). *Μελέτη Επίδρασης Παραλλακτικότητας Αμπελοτεμαχίου σε Οίνους Ποικιλίας Αγιωργίτικο*. Μεταπτυχιακή Μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Ανθρώπου. Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών. «Αμπελουργία-Οινολογία».
18. Πολίτης, Γ., (1997). *Φτιάχνοντας το κρασί μας*. Αθήνα: Σταμούλη.
19. Ρούμπος, Ι., Χ., (2016). *Ασθένειες και εχθροί της αμπέλου*. Αθήνα: Σταμούλης Α.Ε.
20. Σουφλερός, Ε., (2015). *Οινολογία, επιστήμη και τεχνογνωσία*. Θεσσαλονίκη: Σουφλερός.
21. Σταυρακάκης, Μ. Ν., (2016). *Αμπελουργία*. Αθήνα: Τροπή.
22. Τσακίρης, Α., (2017). *Οινολογία, από το σταφύλι στο κρασί*. Αθήνα: Ψύχαλου.
23. Τσέτουρας, Π., (2003). *Οινοτεχνία, η επιστήμη του κρασιού στην πράξη*. Αθήνα: Σταμούλη.
24. [http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/Ιολογικές\\_ασθένειες\\_αμπέλου](http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/Ιολογικές_ασθένειες_αμπέλου)

## ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abelleira A., Mansilla, J. P., Padilla, V., Hita, I., C. Cabaleiro, Bertolini, E., Legorburu, F. J. (2010). First Report of *Arabis mosaic virus* on Grapevine in Spain. *Plant Disease*, 94(5), 635–635. <https://doi.org/10.1094/pdis-94-5-0635a>
2. Auger, J., Esterio, M., & Pérez, I. (2007). First Report of Black Foot Disease of Grapevine Caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* in Chile. *Plant Disease*, 91(4), 470–470. <https://doi.org/10.1094/pdis-91-4-0470a>
3. Bartowsky, E. J. (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, 48(2), 149–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02505.x>
4. Baselga, I., Zafra, O., Estela Pérez Lago, Francisco-Álvarez, R., Rodriguez-Tarduchy, G., & Santos, C. (2017). An AFLP based method for the detection and identification of indigenous yeast in complex must samples without a microbiological culture. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.014>
5. Belitz, H.D., Grosch, W. & Schieberle, P. (Επιμ.) (2012). *Χημεία Τροφίμων*. Αθήνα: Τζιόλα.
6. Bily, D., Nikolaeva, E. V., Olson, T., & Kang, S. (2021). *Phytophthora* spp. associated with Appalachian oak forests and waterways in Pennsylvania, with *P. abietivora* as a pathogen of five native woody plant species. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-21-0976-re>
7. Brouillard, R., Chassaing, S., & Fougereuse, A. (2003). Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? *Phytochemistry*, 64(7), 1179–1186. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00518-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00518-1)
8. Castiñeira, A., R.M. Peña, R.M., Herrero C., García-Martín, S. (2002). Analysis of Organic Acids in Wine by Capillary Electrophoresis with Direct UV Detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(3) 319–331. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1056>.
9. Calmin, G., Lefort, F., & Belbahri, L. (2008). Multi-Loci Sequence Typing (MLST) for Two Lacto-Acid Bacteria (LAB) Species: *Pediococcus parvulus* and *P. damnosus*. *Molecular Biotechnology*, 40(2), 170–179. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9073-4>
10. Canizo, B. V., Leticia Belén Escudero, Roberto Gerardo Pellerano, & Wuilloud, R. G. (2019). Quality Monitoring and Authenticity Assessment of Wines: Analytical and Chemometric Methods. *Elsevier EBooks*, 335–384. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816681-9.00010-2>

11. Cappello, M. S., Zapparoli, G., Logrieco, A., & Bartowsky, E. J. (2017). Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.025>
12. Comi, G., Maifreni, M., Manzano, M., Lagazio, C., & Cocolin, L. (2000). Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). *International Journal of Food Microbiology*, 58(1-2), 117–121. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00287-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00287-7)
13. Cosseboom, S. D., & Hu, M. (2021). Diversity, Pathogenicity, and Fungicide Sensitivity of Fungal Species Associated with Late-Season Rots of Wine Grape in the Mid-Atlantic United States. *Plant Disease*, 105(10), 3101–3110. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0006-RE>
14. Dordevic, N., Camin, F., Marianella, R. M., Postma, G. J., Buydens, L. M. C., & Wehrens, R. (2013). Detecting the addition of sugar and water to wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(3), 324–330. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12043>
15. Dorosh, O., Rodrigues, F., Delerue-Matos, C., & Moreira, M. M. (2022). Increasing the added value of vine-canes as a sustainable source of phenolic compounds: A review. *The Science of the Total Environment*, 830, 154600. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154600>
16. Dubois, J. (1994). *Dictionnaire de Linguistique et Des Sciences Du Langage*. The Open Library, Paris, Larousse, [openlibrary.org/books/OL860938M/Dictionnaire\\_de\\_linguistique\\_et\\_des\\_sciences\\_du\\_langage](https://openlibrary.org/books/OL860938M/Dictionnaire_de_linguistique_et_des_sciences_du_langage). Accessed 23 July 2024.
17. Enologylab. (2015, November 22). Χημική Ορολογία των αρωματικών συστατικών του οίνου. Retrieved from ENOLOGY LAB website: [https://www.enologylab.gr/2015/11/blog-post\\_72.html](https://www.enologylab.gr/2015/11/blog-post_72.html)
18. Erasmus, D., Vandermerwe, G., & Vanvuuren, H. (2003). Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*, 3(4), 375–399. [https://doi.org/10.1016/s1567-1356\(02\)00203-9](https://doi.org/10.1016/s1567-1356(02)00203-9).
19. Felšöciová, S., Sabo, J., Čmiková, N., Kowalczewski, P. Ł., & Kačániová, M. (2023). Mycobiota in Slovak wine grapes: A case study from the small Carpathians wine region. *Open Life Sciences*, 18(1), 20220676. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0676>



20. Ferrari, E., Foca, G., Vignali, M., Tassi, L., & Ulrici, A. (2011). Adulteration of the anthocyanin content of red wines: Perspectives for authentication by Fourier Transform-Near InfraRed and <sup>1</sup>H NMR spectroscopies. *Analytica Chimica Acta*, 701(2), 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.053>
21. Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11–22. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00245-9)
22. Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 979–995. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
23. Fu, Q., Wang, Y., Yang, J., Jiao, Y., Li, W., Yang, F., ... Xu, Y. (2023). Plasmopara viticola RxLR effector PvAvh77 triggers cell death and governs immunity responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 74(6), 2047–2066. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad005>
24. Gadoury, D. M., Seem, R. C., Wilcox, W. F., Henick-Kling, T., Conterno, L., Day, A., & Ficke, A. (2007). Effects of Diffuse Colonization of Grape Berries by *Uncinula necator* on Bunch Rots, Berry Microflora, and Juice and Wine Quality. *Phytopathology*, 97(10), 1356–1365. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-10-1356>
25. Gao, J., Wang, M., Huang, W., You, Y., & Zhan, J. (2022). Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Could Better Adapt to the Physicochemical Conditions and Natural Microbial Ecology of Prince Grape Must Compared with Commercial *Saccharomyces cerevisiae* FX10. *Molecules*, 27(20), 6892. <https://doi.org/10.3390/molecules27206892>
26. Geiger, A., Karácsony, Z., Geml, J., & Váczy, K. Z. (2022). Mycoparasitism capability and growth inhibition activity of *Clonostachys rosea* isolates against fungal pathogens of grapevine trunk diseases suggest potential for biocontrol. *PLOS ONE*, 17(9), e0273985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273985>
27. Gómez-Míguez, M. J., Gómez-Míguez, M., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type. *Journal of Food Engineering*, 79(3), 758–764. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.038>
28. González-Domínguez, E., Berlanas, C., Gramaje, D., Armengol, J., Rossi, V., & Berbegal, M. (2020). Temporal Dispersal Patterns of *Phaeomoniella chlamydospora*, Causal Agent of Petri Disease and Esca, in Vineyards. *Phytopathology®*, 110(6), 1216–1225. <https://doi.org/10.1094/phyto-10-19-0400-r>

29. Grall, S., & Manceau, C. (2003). Colonization of *Vitis vinifera* by a Green Fluorescence Protein-Labeled, *gfp* -Marked Strain of *Xylophilus ampelinus* , the Causal Agent of Bacterial Necrosis of Grapevine. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1904–1912. <https://doi.org/10.1128/aem.69.4.1904-1912.2003>
30. Gramaje, D., Mostert, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). Phaeoacremonium: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology*, 119(9), 759–783. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.004>
31. Hed, B., Ngugi, H. K., & Travis, J. W. (2011). Use of Gibberellic Acid for Management of Bunch Rot on Chardonnay and Vignoles Grape. *Plant Disease*, 95(3), 269–278. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-10-0382>.
32. Huang, J.-W., Lai, C.-J.-S., Yuan, Y., Zhang, M., Zhou, J.-H., & Huang, L.-Q. (2017). [Correlative analysis advance of chemical constituents of Polyporus umbellatus and Armillaria mellea]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, 42(15), 2905–2914. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20170512.009>
33. Ivey, M. L., & Phister, T. G. (2011). Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(10), 1619–1634. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1020-x>
34. Jackson, R. S. (2008). Wine science : principles and applications. Academic Press. Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/wine-science/jackson/978-0-12-373646-8>.
35. Csapó J., & Albert, C. (2018). Wine adulteration and its detection based on the rate and the concentration of free amino acids. *Acta Agraria Debreceniensis*, 139–151. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/150/1710>
36. Jiang, L., Qiu, Y., Dumlao, M. C., Donald, W. A., Steel, C. C., & Schmidtke, L. M. (2023). Detection and prediction of Botrytis cinerea infection levels in wine grapes using volatile analysis. *Food Chemistry*, 421, 136120. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136120>
37. Kačániová, M., Hleba, L., Pochop, J., Kádasi-Horáková, M., Fikselová, M., & Rovná, K. (2012). Determination of wine microbiota using classical method, polymerase chain method and Step One Real-Time PCR during fermentation process. *Journal of Environmental Science*

*and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 47(6), 571–578.  
<https://doi.org/10.1080/03601234.2012.665750>

38. Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I. S., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E., & Psarra, E. (2001). Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food Chemistry*, 73(4), 501–514. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(00\)00327-7](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(00)00327-7)
39. Kamiloglu, S. (2019). Authenticity and traceability in beverages. *Food Chemistry*, 277, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.091>
40. Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013(162750), 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
41. Kunova, A., Pizzatti, C., Saracchi, M., Pasquali, M., & Cortesi, P. (2021). Grapevine Powdery Mildew: Fungicides for Its Management and Advances in Molecular Detection of Markers Associated with Resistance. *Microorganisms*, 9(7), 1541. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071541>
42. Kuzmanović, N., Biondi, E., Overmann, J., Puławska, J., Verbarg, S., Smalla, K., & Lassalle, F. (2022). Genomic analysis provides novel insights into diversification and taxonomy of *Allorhizobium vitis* (i.e. *Agrobacterium vitis*). *BMC Genomics*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08662-x>
43. Kuzmanović, N., Puławska, J., Hao, L., & Burr, T. J. (2018). The Ecology of *Agrobacterium vitis* and Management of Crown Gall Disease in Vineyards. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 418, 15–53. [https://doi.org/10.1007/82\\_2018\\_85](https://doi.org/10.1007/82_2018_85)
44. Lazazzara, V., Avesani, S., Robatscher, P., Oberhuber, M., I. Pertot, Schuhmacher, R., & Perazzolli, M. (2021). Biogenic volatile organic compounds in the grapevine response to pathogens, beneficial microorganisms, resistance inducers, and abiotic factors. *Journal of Experimental Botany*, 73(2), 529–554. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab367>
45. Leitão, J. H. (2020). Microbial Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5320. <https://doi.org/10.3390/ijms21155320>

46. Li, Z., Santos, R. F., Gao, L., Chang, P., & Wang, X. (2021). Current status and future prospects of grapevine anthracnose caused by *Elsinoe ampelina* : An important disease in humid grape-growing regions. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.13076>
47. Liu, R., Wang, Y., Li, P., Sun, L., Jiang, J., Fan, X., Zhang, Y. (2021). Genome Assembly and Transcriptome Analysis of the Fungus *Coniella diplodiella* During Infection on Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.599150>
48. Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., & Alexandre, H. (2017). Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiology*, 62, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.023>
49. Loureiro, V. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 23–50. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00246-0)
50. Malfeito-Ferreira, M., & Silva, A. C. (2019). Spoilage Yeasts in Wine Production. *Yeasts in the Production of Wine*, 375–394. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4_12)
51. Marsberg, A., Kemler, M., Jami, F., Nagel, J. H., Postma-Smidt, A., Naidoo, S., Slippers, B. (2017). Botryosphaeria dothidea: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology*, 18(4), 477–488. <https://doi.org/10.1111/mpp.12495>
52. Masneuf-Pomarède, I., Mansour, C., Murat, ML., Tominaga, T. & Dubourdieu, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *Journal of food microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.001>
53. Mekuria, T., Martin, R. R., & Naidu, R. A. (2008). First Report of the Occurrence of *Grapevine fanleaf virus* in Washington State Vineyards. *Plant Disease*, 92(8), 1250–1250. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-8-1250a>
54. Moragrega, C., Carol, J., Bisbe, E., Fabregas, E., & Llorente, I. (2021). First Report of Verticillium Wilt and Mortality of *Ailanthus altissima* Caused by *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum sensu lato* in Spain. *Plant Disease*, 105(11), 3754. <https://doi.org/10.1094/pdis-03-21-0463-pdn>
55. Newwinesofgreece.com. (n.d.). Retrieved June 25, 2024, from www.newwinesofgreece.com website: <https://www.newwinesofgreece.com/el/home/index.html>

56. Nguyen, Capone, Johnson, Jeffery, Danner, & Bastian. (2019). Volatile Composition and Sensory Profiles of a Shiraz Wine Product Made with Pre- and Post-Fermentation Additions of *Ganoderma lucidum* Extract. *Foods*, 8(11), 538. <https://doi.org/10.3390/foods8110538>
57. Novagreen A.E. (2019, April 2). Retrieved June 25, 2024, from Novagreen A.E. website: <https://www.novagreen.gr/arthra/page/86/>
58. Ohwofasa, A., Dhimi, M., Tian, B., Winefield, C., & Stephen L.W. On. (2023). Environmental influences on microbial community development during organic pinot noir wine production in outdoor and indoor fermentation conditions. *Heliyon*, 9(5), e15658–e15658. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15658>
59. Oliveira, M., Arenas, M., Lage, O., Cunha, M., & Amorim, M. I. (2017). Epiphytic fungal community in *Vitis vinifera* of the Portuguese wine regions. *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 93–102. <https://doi.org/10.1111/lam.12826>
60. Onetto, C. A., Sosnowski, M. R., Van Den Heuvel, S., & Borneman, A. R. (2022). Population genomics of the grapevine pathogen *Eutypa lata* reveals evidence for population expansion and intraspecific differences in secondary metabolite gene clusters. *PLOS Genetics*, 18(4), e1010153. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010153>
61. Otto, M., Geml, J., Hegyi, Á. I., Hegyi-Kaló, J., Pierneef, R., Pogány, M., ... Váczy, K. Z. (2022). Botrytis cinerea expression profile and metabolism differs between noble and grey rot of grapes. *Food Microbiology*, 106, 104037. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104037>
62. Parra, A., Ovejas, A., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A. R., & López-Alfaro, I. (2023). Development and Validation of a New Method for Detecting Acetic Bacteria in Wine. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(20), 3734. <https://doi.org/10.3390/foods12203734>
63. Pearson, R. C., & Goheen, A. C. (1988). Compendium of Grape Diseases. American Phytopathological Society.
64. Portier, P., Taghouti, G., Bertrand, P.-E., Briand, M., Dutrieux, C., Lathus, A., & Fischer-Le Saux, M. (2022). Analysis of the Diversity of *Xylophilus ampelinus* Strains Held in CIRM-CFBP Reveals a Strongly Homogenous Species. *Microorganisms*, 10(8), 1531. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081531>

65. Proestos, C., Bakogiannis, A., Psarianos, C., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., & Komaitis, M. (2005). High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. *Food Control*, 16(4), 319–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.03.011>
66. Rex, F., Fechter, I., Hausmann, L., & Töpfer, R. (2014). QTL mapping of black rot (*Guignardia bidwellii*) resistance in the grapevine rootstock “Börner” (*V. riparia* Gm183 × *V. cinerea* Arnold). *Theoretical and Applied Genetics*, 127(7), 1667–1677. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2329-4>
67. Reynard, J.-S., Brodard, J., Zufferey, V., Rienth, M., Gugerli, P., Schumpp, O., & Blouin, A. G. (2022). Nuances of Responses to Two Sources of Grapevine Leafroll Disease on Pinot Noir Grown in the Field for 17 Years. *Viruses*, 14(6), 1333. <https://doi.org/10.3390/v14061333>
68. Rodas, A. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 412–422. <https://doi.org/10.1078/072320203322497446>
69. Rodas, A. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2005). Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 197–207. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63249-0>
70. Rodríguez-Delgado M.-Á., González-Hernández, G., Conde-González J.-E., & Pérez-Trujillo, J.-P. (2002). Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry*, 78(4), 523–532. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(02\)00206-6](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00206-6)
71. Sánchez, M. L., Chimeno, S. V., Mercado, L. A., & Ciklic, I. F. (2022). Hybridization and spore dissection of native wine yeasts for improvement of ethanol resistance and osmotolerance. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 38(12), 225. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03400-7>
72. Şanlıer, N., Gökcen, B. B., & Sezgin, A. C. (2017). Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 506–527. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1383355>
73. Schilling, M., Maia-Grondard, A., Baltenweck, R., Robert, E., Hugueney, P., Bertsch, C., Gelhaye, E. (2022). Wood degradation by *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer: Physiologic, metabolomic and proteomic approaches. *Frontiers in Plant Science*, 13, 988709. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.988709>



74. Shepherd, H., V. Parr, W., Lo Monaco, G., & Rodrigues, H. (2023). The meaning of the word elegance as a wine descriptor: Effect of expertise and wine type. *Food Research International*, 164, 112399. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112399>
75. Sosnowski, M. R., Ayres, M. R., & Scott, E. S. (2021). The Influence of Water Deficit Stress on the Grapevine Trunk Disease Pathogens *Eutypa lata* and *Diplodia seriata*. *Plant Disease*, PDIS-07-20-1538. <https://doi.org/10.1094/pdis-07-20-1538-re>
76. Tarasov, A., Rauhut, D., & Jung, R. (2017). “Cork taint” responsible compounds. Determination of haloanisoles and halophenols in cork matrix: A review. *Talanta*, 175, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.029>
77. Telengech, P., Sakae Hisano, Mugambi, C., Kiwamu Hyodo, Juan Manuel Arjona-López, Carlos José López-Herrera, Suzuki, N. (2020). Diverse Partitiviruses From the Phytopathogenic Fungus, *Rosellinia necatrix*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01064>
78. The Greek Vineyard. (2023, August 19). Ωρίμανση #Σταφυλιών | #Δειγματοληψία & Παράγοντες Ωρίμανσης Σταφυλιών Στο #αμπέλι. Retrieved June 25, 2024, from YouTube website: <https://www.youtube.com/watch?v=zA4exDXw2hw>.
79. Trček, J., Mira, N. P., & Jarboe, L. R. (2015). Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), 6215–6229. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6762-3>
80. Trkulja, V., Tomić, A., Iličić, R., Nožinić, M., & Milovanović, T. P. (2022). *Xylella fastidiosa* in Europe: From the Introduction to the Current Status. *The Plant Pathology Journal*, 38(6), 551–571. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.09.2022.0127>
81. Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Smith, R. J., & Gubler, W. D. (2013). Phomopsis Dieback: A Grapevine Trunk Disease Caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease*, 97(12), 1571–1579. <https://doi.org/10.1094/pdis-11-12-1072-re>
82. Varela, C., & Borneman, A. R. (2016). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, 34(3), 111–128. <https://doi.org/10.1002/yea.3219>
83. Wang, H., Wang, C., Li, B., & Jin, B. (2023). First Report of *Cercospora citrullina* Causing Spot Disease on Watermelon in China. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-23-0534-PDN>

84. Yin, L., An, Y., Qu, J., Li, X., Zhang, Y., Dry, I. B., ... Lu, J. (2017). Genome sequence of *Plasmopara viticola* and insight into the pathogenic mechanism. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep46553>
85. Zilelidou, E. A., & Nisiotou, A. (2021). Understanding Wine through Yeast Interactions. *Microorganisms*, 9(8), 1620. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081620>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.