



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ**

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης**

**«Μικροβιακή Βιοτεχνολογία»**

Ασύρτικο Σαντορίνης: Μικροβιακή ανάλυση του  
γλεύκους, της αλκοολικής ζύμωσης και του κρασιού

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια**

**Αμαλία Δ. Καραγκούνη, Καθηγήτρια**

**ΤΑΓΑΡΟΥΛΙΑ ΝΙΚΟΛΙΤΣΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2013**

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια Μικροβιολογίας του Τομέα Βοτανικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καραγκούνη Α. Αμαλία, Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Χατζηνικολάου Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής

Γκόνου – Ζάγκου Ζαχαρούλα, Λέκτορας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Τομέα Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών και οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα στο οινοποιείο του κ. Γαβαλά στο Μεγαλοχώρι της Σαντορίνης.

Φθάνοντας στο τέλος αυτής της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που με την παρουσία τους, την προθυμία τους, τις γνώσεις τους και την εμπειρία τους βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίβλεπουσα Καθηγήτρια κ. Αμαλία Καραγκούνη, η οποία υπέδειξε το θέμα και προσδιόρισε τους στόχους της έρευνας, για τις ουσιαστικές συμβουλές της και για τον σωστό ερευνητικό προσανατολισμό της εργασίας αυτής, την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια, τις εύστοχες υποδείξεις καθώς και για την κατανόηση και εμπιστοσύνη με την οποία με περιέλαβε στην ολοκλήρωση και περάτωση της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου οφείλω να εκφράσω στον Επικ. Καθ. κ. Δημήτρη Χατζηνικολάου για την πάντα πρόθυμη και επικοινωνιακή συμβουλή του και την πολύ καλή συνεργασία.

Θερμές ευχαριστίες επιθυμώ να εκφράσω και στο τρίτο μέλος της τριμελούς επιτροπής, την κ. Ζαχαρούλα Γκόνου – Ζάγκου για τον χρόνο που αφιέρωσε στη διόρθωση του κειμένου της παρούσας εργασίας, για τις εύστοχες και επικοινωνιακές παρατηρήσεις της, καθώς και για τη θετική στάση και κατανόηση που υπέδειξε στο πρόσωπό μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας – Τομέα Βοτανικής τον Δρ. Ε. Κατσίφα και τον Δρ Α. Σαββίδη για την άριστη συνεργασία, συνεχή συμπαράσταση και βοήθεια που μου προσέφεραν.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους, συναδέλφους, συνεργάτες και συμφοιτητές: Παναγιώτα Σταθοπούλου, Κική Καννινή, Βάσω Κωστή, Παράσχα Γιώργο και Αναστασία Δέλλιου για την πολύτιμη βοήθειά τους, την ηθική συμπαράσταση, την υπομονή τους καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου τόσο για την ηθική όσο και για την οικονομική υποστήριξή της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής εργασίας αυτής.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο οίνος, που είναι το προϊόν της αλκοολοποίησης του γλεύκους (χυμός σταφυλιών), αποτέλεσε και αποτελεί βασικό στοιχείο του ανθρώπινου πολιτισμού και ιδιαίτερα του Ελληνικού. Η νήσος Σαντορίνη είναι ο παλαιότερος Ευρωπαϊκός αμπελώνας (3.500 χρόνων) με παράδοση σε παραγωγή οίνων εκλεκτής ποιότητας. Το κρασί της Σαντορίνης επιδεικνύει εξαιρετικό ενδιαφέρον όταν συγκρίνεται με άλλες οινοπαραγωγικές περιοχές, καθ' ότι παρουσιάζει διαφορές τόσο στις περιβαλλοντικές συνθήκες, όσο και στις κλασσικές μεθόδους οινοποίησης. Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, μελετήθηκαν: α) η ενδογενής μικροβιακή ποικιλότητα του γλεύκους, της αυθόρμητης ζύμωσης (σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα) και του κρασιού, ποικιλίας Ασύρτικο, καθώς και β) η διαδοχή και η επικράτηση των βακτηρίων και των ζυμών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Τα δείγματα (κρασί σοδειάς 2009, γλεύκος σοδειάς 2010, αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους σοδειάς 2011) προήλθαν από την «Οινοποιεία Γαβαλά», η οποία εδρεύει στο Μεγαλοχώρι της Σαντορίνης. Η επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση τόσο κλασσικών τεχνικών καλλιέργειας, σε εκλεκτικά και διαγνωστικά θρεπτικά υποστρώματα, όσο και μοριακών μεθόδων PCR (BOX – PCR και 16S PCR για τα βακτήρια και ITS PCR για τις ζύμες). Συνολικά, απομονώθηκαν 1040 στελέχη ζυμών και 374 στελέχη βακτηρίων. Πραγματοποιώντας συγκριτική μελέτη των πληθυσμών των μικροοργανισμών διαπιστώθηκε ότι οι ζύμες επικράτησαν σε όλα τα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης έναντι των βακτηρίων, αφού κατά την οινοποίηση οι συνθήκες παύουν να είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων (λόγω κατανάλωσης θρεπτικών συστατικών, αύξησης συγκέντρωσης αιθανόλης, ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών). Επιπλέον, από τα αποτελέσματα του ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού στελεχών ζυμών και βακτηρίων από τις τρεις μελετημένες περιπτώσεις διαπιστώθηκε ότι η διαδοχή των βακτηρίων και της ζυμογλωρίδας οινοποίησης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, σοδειάς 2011 έρχεται σε συμφωνία με τα είδη των βακτηρίων και των ζυμών που απομονώθηκαν από τα άλλα 2 δείγματα, παρά το γεγονός ότι προέρχονται από γλεύκη διαφορετικής σοδειάς. Συνολικά, τα βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν ήταν στελέχη των: *Paenibacillus sp.*, *Kozakia baliensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Gluconobacter oxydans* και *Bacillus pumilus*, και οι ζύμες που απομονώθηκαν ήταν στελέχη των:

*Saccharomyces cerevisiae* YJM789, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces carsonii*, *Candida cantarellii* και *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN.

Τέλος, τα απομονωθέντα στελέχη βακτηρίων και ζυμών μελετήθηκαν περαιτέρω ως προς συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που κρίνονται σημαντικά στη βιομηχανία του οίνου, καθώς τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μια συνεχής προσπάθεια απομόνωσης στελεχών ζυμών και βακτηρίων με συγκεκριμένες ιδιότητες, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια εμπλουτισμού σε οινοποιήσεις, ώστε να οδηγήσουν στην παραγωγή κρασιών με καθορισμένα οινολογικά χαρακτηριστικά. Τα κριτήρια επιλογής στελεχών ζυμών ήταν η ανθεκτικότητα σε αιθανόλη και γλυκόζη, καθώς και η μειωμένη παραγωγή υδρόθειου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Από το σύνολο των στελεχών των ζυμών της παρούσας μελέτης καταλληλότερο στέλεχος βρέθηκε να είναι η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Όσον αφορά τα βακτηριακά στελέχη, τα κριτήρια επιλογής ήταν η παρουσία ενεργότητας τανάσης και η δυνατότητα καταβολισμού του αμινοξέος L-αργινίνη. Από το σύνολο του βακτηριακού πληθυσμού μόνο τα *Bacillus licheniformis* και *Bacillus amyloliquefaciens* εμφανίζουν βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον καθότι παρουσιάζουν ενεργότητα τανάσης. Βέβαια, το γεγονός ότι μπορούν να μεταβολίζουν και την αργινίνη, χρήζει περισσότερης προσοχής, καθώς υποβόσκει ο κίνδυνος να είναι παραγωγοί της καρκινογόνου ουσίας, καρβαμίδιο.

## ABSTRACT

Wine, being the product of alcoholic fermentation of must (grape juice) was and is still considered to be a basic element of human culture, especially that of Greece. The island of Santorini is considered to be the oldest European vineyard (3.500 years) producing wine of superior quality. The wine of Santorini is incredibly interesting when it is compared to the normal practices and ideas of viticulture. Taking under consideration the above mentioned it was studied: a) the biodiversity of yeast and bacteria flora found in spontaneous vinification (in a laboratory bioreactor) and b) the sequencing and dominance of yeast and bacteria species during spontaneous fermentation of must obtained from the variety “Asyrtico”.

The samples (wine 2009, must 2010, spontaneous fermentation of must 2011) derived from the Greek winery of Gavalas from Megalochori of Santorini. The treatment of samples included standard cultivation methods on selective and diagnostic media along with the development of culture – independent techniques such as: BOX – PCR and 16S PCR for the classification and identification of bacteria and b) ITS PCR for the classification and identification of yeasts strains. Totally, 1040 yeasts strains and 374 bacterial strains were isolated. A comparative study of their populations demonstrated that yeasts dominated in all stages of fermentation as the conditions did not favor the growth of bacteria (deficiency of nutrients, increased volume of ethanol, prevalence of anaerobic conditions). In addition, qualitative and quantitative determination of isolated yeasts and bacteria in all studied cases revealed that their succession and dominance among the three samples was in good agreement, instead of the fact that the three samples were of different time of selection (different crop year). The isolated bacterial strains assigned to the species: *Paenibacillus sp.*, *Kozakia baliensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus pumilus*, while the isolated yeasts assigned to the species: *Saccharomyces cerevisiae* YJM789, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces carsonii*, *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN.

Finally, the isolated bacteria and yeasts were further investigated for bearing specific characteristics, crucial for the wine industry. Indeed, the last decades, international competition within the wine market and consumer demands for newer styles of wines are providing new challenges for innovation in wine fermentation, such as the

isolation of new strains (bacteria or yeasts) with specific properties, which could be used as starter cultures for performing wines with the desirable organoleptic characteristics. The criteria for selecting wine yeasts were ethanol and glucose tolerance and the diminished production of the gas H<sub>2</sub>S. *Saccharomyces cerevisiae* seemed to be the most appropriate strain from the total of isolated yeasts. On the other hand, isolated bacteria were screened for tannase activity and the ability of degrading L – arginine. The results demonstrated that only strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens* were of biotechnological interest as they presented tannase activity. However, the fact that they degraded arginine is of practical significance in wine production as they may be producers of the carcinogen carbamido. Hence, a further investigation is required.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική αναδρομή.....	2
1.2 Η αμπελουργία της Σαντορίνης.....	5
1.3 Ποικιλία Ασύρτικο.....	10
1.4 Ορισμός του γλεύκους και η σύστασή του.....	11
1.5 Χημικές διεργασίες κατά την οινοποίηση.....	16
1.5.1 Αλκοολική ζύμωση.....	16
1.5.1.1 Παράγοντες που επιδρούν στην αλκοολική ζύμωση.....	17
1.5.1.2 Αλκοολική ζύμωση και κύκλος αύξησης των ζυμών.....	21
1.5.2 Μηλογαλακτική ζύμωση.....	22
1.5.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στη μηλογαλακτική ζύμωση.....	23
1.6 Ζύμες και οινοποίηση.....	25
1.7 Βακτήρια κατά την οινοποίηση.....	27
1.7.1 Οξικά βακτήρια (Acetic Acid Bacteria – AAB).....	27
1.7.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria –LAB).....	30
1.8 Αυθόρμητη και Ελεγχόμενη ζύμωση.....	32
1.8.1 Κριτήρια επιλογής ζυμών ως εκκινητών καλλιιεργειών.....	34
1.8.1.1 Ανθεκτικότητα στην αιθανόλη.....	35
1.9 Καταβολισμός της αργινίνης.....	37
1.10 Ενεργότητα τανάσης.....	38
1.11 Σκοπός της εργασίας.....	40

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία.....	43
2.1.1 Τρόπος δειγματοληψίας.....	43
2.1.2 Κωδικοποίηση δειγμάτων.....	44
2.2 Επεξεργασία δειγμάτων.....	44

2.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός ζυμών και βακτηρίων δείγματος.....	45
2.2.2 Απομόνωση καθαρών στελεχών ζυμών και βακτηρίων.....	46
2.3 Θρεπτικά Υποστρώματα.....	46
2.4 Χημικά και Ρυθμιστικά διαλύματα.....	48
2.5 Βιοχημικές Δοκιμές.....	51
2.5.1 Χρώση κατά Gram.....	51
2.5.2 Ενεργότητα καταλάσης.....	51
2.5.3 Ενεργότητα οξειδάσης.....	51
2.5.4 Ενεργότητα τανάσης.....	52
2.5.5 Ικανότητα καταβολισμού αργινίνης.....	52
2.5.6 Παραγωγή υδρόθειου.....	52
2.6 Απομόνωση ολικού DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίων.....	53
2.7 Απομόνωση ολικού DNA από καθαρή καλλιέργεια ζυμών.....	53
2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction).....	54
2.8.1 Μέθοδος BOX-PCR.....	54
2.8.2 Ενίσχυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου.....	55
2.8.3 Μέθοδος ITS (Internal Transcribed Spacer) –PCR.....	56
2.9 Μοριακή ταυτοποίηση των μικροοργανισμών.....	57
2.10 Κλειστές καλλιέργειες των ζυμών.....	58
2.10.1 Καλλιέργειες ζυμών παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης.....	58
2.10.2 Καλλιέργειες ζυμών παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης.....	59
2.10.3 Εκτίμηση βιομάζας μικροοργανισμών μέσω οπτικής πυκνότητας.....	59
2.10.4 Εκτίμηση του Μέγιστου Ειδικού Ρυθμού Αύξησης ( $\mu_{max}$ ) και του χρόνου διπλασιασμού της καλλιέργειας ( $t_d$ ).....	59
2.11 Περιγραφή της εκτίμησης της ζύμωσης σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα.....	60
2.12 Χημικές αναλύσεις κρασιού.....	62
2.12.1 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων.....	62

2.12.2 Προσδιορισμός ολικής οξύτητας.....	62
2.12.3 Προσδιορισμός αλκοολικών βαθμών.....	63
2.13 Μέθοδος δινιτροσαλικυλικού οξέος και κατασκευή καμπύλης αναφοράς γλυκόζη.....	63
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
3.1 Εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας κρασιού σοδειάς 2009.....	66
3.1.1 Απομόνωση και μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών.....	66
3.2 Εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας γλεύκους σοδειάς 2010.....	71
3.2.1 Απομόνωση και μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών.....	71
3.3 Εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας κατά την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους σοδειάς 2011 σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα.....	78
3.3.1 Κινητική ζύμωσης.....	78
3.3.2 Μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών των ζυμών.....	80
3.3.3 Μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών των βακτηρίων.....	83
3.3.4 Διαδοχή και επικράτηση των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.....	86
3.3.5 Διαδοχή και επικράτηση των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.....	90
3.3.6 Χημικές αναλύσεις τελικού προϊόντος της αυθόρμητης ζύμωσης.....	94
3.4 Εκτίμηση ανθεκτικότητας διαφορετικών στελεχών ζυμών σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης.....	95
3.5 Εκτίμηση ανθεκτικότητας διαφορετικών στελεχών ζυμών σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.....	101
3.6 Εκτίμηση της παραγωγής υδρόθειου από διαφορετικά στελέχη ζυμών.....	109
3.7 Προσδιορισμός ενεργότητας τανάσης και ικανότητας αποικοδόμησης αργινίνης στα απομονωμένα στελέχη βακτηρίων.....	110
3.7.1 Ενεργότητα αργινάσης.....	110
3.7.2 Ενεργότητα τανάσης.....	110

#### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

4.1 Μικροβιακή ποικιλότητα δειγμάτων.....	113
4.2 Ζύμες με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.....	116
4.3 Βακτήρια με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.....	119
4.4 Γενικά συμπεράσματα.....	119
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>123</b>

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>**

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1 Ιστορική αναδρομή

Το νησί της Σαντορίνης αποτέλεσε το κέντρο της Αρχαίας Μινωικής κοινωνίας και του πολιτισμού. Το 1976, ο Έλληνας αρχαιολόγος Σπυρίδων Μαρινάτος, αποκάλυψε τα εναπομείναντα στοιχεία μιας αρκετά προηγμένης πόλης της Σαντορίνης, το Ακρωτήρι, το οποίο κατοικήθηκε περίπου το 1800 π. Χ. Ανάμεσα στα αρχαία ερείπια της συγκεκριμένης πόλης, οι ανασκαφές έφεραν στο φως πήλινα δοχεία κρασιού, ψευδόστομους αμφορείς για τη μεταφορά υγρών, κάρβουνα από ξύλα αμπέλου και γίγαρτα, καθώς επίσης και αποθηκευτικούς χώρους στους οποίους εναπόθεταν σειρές από πιθάρια με κρασιά, στοιχεία τα οποία μαρτυρούν την οινοποιητική και εμπορική δραστηριότητα στην προϊστορική φάση του νησιού (δηλαδή, πριν από την ηφαιστειακή έκρηξη που τοποθετείται περίπου στο 1700 π. Χ.). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η αμπελουργία και η οινοποίηση στη Σαντορίνη έχει παράδοση 3.500 χρόνων (Doumas, 1995). Το 1640 π.Χ. το Ακρωτήρι και γενικά η Σαντορίνη, η προϊστορική Στρογγύλη (όπως ονομάστηκε λόγω του στρογγυλού της σχήματος), άλλαξαν ριζικά μετά από τη μεγάλη έκρηξη του ηφαιστείου, όπου το νησί χωρίστηκε σε 5 μικρότερα, τα γνωστά σήμερα νησιά: Θήρα, Θηρασιά, Ασπρονήσι, Νέα Καμένη και Παλιά Καμένη (Doumas, 1995). Η μεγάλη έκρηξη ερήμωσε το νησί και σύμφωνα με τον Ηρόδοτο, οι πρώτοι που το αποίκησαν ήταν οι Φοίνικες (τέλη 13<sup>ου</sup> αιώνα μέχρι και τον 9<sup>ο</sup> π.Χ. αιώνα). Εικάζεται ότι ήταν αυτοί που αναβίωσαν την αμπελουργική παράδοση που είχε διακόψει το ηφαίστειο μέχρι τον 15<sup>ο</sup> αιώνα. Απόδειξη ύπαρξης αυτής της παράδοσης αποτελούν τόσο η παρουσία των μοναδικών ποικιλιών αμπέλου, όσο και ο συνήθης τρόπος κλαδέματος των αμπελιών, η λεγόμενη αμπελιά ή κουλούρα (Εικ. 1.1), τεχνική που εφαρμόζεται εδώ και χιλιάδες χρόνια από τους αμπελουργούς της Σαντορίνης (Kourakou-Dragona, 1995α). Διαπιστώνεται, λοιπόν, ότι το αμπέλι της Σαντορίνης είναι από τα αρχαιότερα στον ελληνικό χώρο. Η αμπελιά εντοπίζεται και στην Παντελερία, ένα μικρό νησί της Ιταλίας, το οποίο εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με τη Σαντορίνη, καθώς είναι ίσο σε μέγεθος, φέρει αμμώδες έδαφος από λάβα και ηφαιστειακή στάχτη και επιπλέον, αποικήθηκε από τους Φοίνικες (Kourakou-Dragona, 1995β).



**Εικόνα 1.1** Η παραδοσιακή αμπελιά ή κουλούρα της Σαντορίνης.

Τον 8<sup>ο</sup> αιώνα οι Λακεδαιμόνιοι διαδέχτηκαν τους Φοίνικες, όπου το νησί ονομάστηκε Θήρα, προς τιμή του αρχηγού τους τον Θήρα. Με το πέρασμα των αιώνων, το όνομα Θήρα άλλαξε και μετατράπηκε σε Santo- Erini από τους ιταλούς ναυτικούς του Μεσαίωνα, που ταξιδεύοντας για την Πόλη και τους Αγίους Τόπους σταματούσαν στο νησί για ανεφοδιασμό. Λόγω της φυσικής ιδιομορφίας του νησιού και του απρόσιτου της Θήρας, ήταν αναγκασμένοι να αγκυροβολούν στο λιμάνι της Θηρασιάς, μπροστά στο εκκλησάκι της Αγίας Ειρήνης. Από το συγκεκριμένο αραξοβόλι, λοιπόν, ονομάστηκε ολόκληρο το νησί. Με τον καιρό από την ονομασία Santo-Erini υπήρξε αποβολή του E καταλήγοντας στο Σαντορίνη (Kourakou-Dragona, 1995β).

Στους ίδιους αυτούς θαλασσινούς του Μεσαίωνα, μπορεί να αποδοθεί και η «βάφτιση» του εξαιρετικού γλυκού κρασιού που παρήγαγε το νησί και το οποίο εύλογα ονόμασαν κρασί της Σαντορίνης, vino Santo, vinsanto. Με αυτό το διεθνές όνομα λοιπόν, που μαρτυρούσε την καταγωγή του, το περίφημο αυτό κρασί έγινε γνωστό αρχικά στα κοντινά λιμάνια της Πόλης, του Χάνδακα, της Χίου και της Σμύρνης και αργότερα, καθώς το Βενετσιάνικο εμπόριο ανθούσε, στη Βενετία (στη Ripa del Vin, την αγορά κρασιού στο Canale Grande), την Τεργέστη, την Αγκόνα, και όπου αλλού έφταναν τα εμπορικά της θαλασσοκράτειρας Γαληνοτάτης Δημοκρατίας. Το Βινσάντο ήταν περιζήτητο από τους μεσαιωνικούς άρχοντες που το καταλάωναν στα επίσημα δείπνα τους, μα και από τους ταξιδιώτες της εποχής όχι μόνο για την

πλούσια γεύση του, αλλά και για την τόνωση και τη θερμιδογόνο δύναμη που προσέφερε, βοηθώντας τους να αντιμετωπίζουν τις αρρώστιες και την ταλαιπωρία των κουραστικών και με αβέβαιη διάρκεια ταξιδιών (Kourakou-Dragona, 1995β). Επιπλέον, λόγω της σύνθεσής του ήταν ανθεκτικό στα ταξίδια, γεγονός το οποίο διευκόλυνε ακόμα περισσότερο τις εξαγωγές.

Το κρασί επομένως, ήταν το πιο προσοδοφόρο προϊόν της Σαντορίνης. Η συνθήκη του Κιουτσούκ-Καϊναρτζή (1774) άνοιξε στους καπεταναίους και το Βινσάντο το δρόμο για τη Μαύρη Θάλασσα. Στα τέλη του 18<sup>ου</sup> αιώνα έως και τις πρώτες δεκαετίες του 19<sup>ου</sup>, σχεδόν το σύνολο της παραγωγής του Βινσάντο εξάγονταν στη Ρωσία όπου χρησιμοποιούνταν και ως νάμα για τη Θεία Κοινωνία στις εκκλησίες Πασών των Ρώσων. Επιπλέον, σημαντικός παράγοντας για εκείνη την ακμαία περίοδο αποτέλεσε και το γεγονός ότι τα αμπέλια της Σαντορίνης ουδέποτε προσβλήθηκαν από τη Φυλλοξήρα, ένα παράσιτο το οποίο απείλησε να εξαφανίσει την αμπελοργία της Ευρώπης από το τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα έως και το 1956. Το ηφαιστειακό έδαφός της, το οποίο χαρακτηρίζεται μεταξύ άλλων από έλλειψη πηλού και από εξαιρετικά υψηλή περιεκτικότητα σε άμμο (93-97%), δημιουργεί ένα εχθρικό περιβάλλον για την παρουσία της φυλλοξήρα. Η χρυσή όμως, εποχή των εξαγωγών θα αρχίσει να κάμπτεται από το 1840 και θα φτάσει στο τέλος της στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Ως κύρια αιτία για την εξέλιξη αυτή αποτελεί η ευρύτερη ανακατάταξη στη διεθνή αγορά του κρασιού το 19<sup>ο</sup> αι. Πτυχές αυτής της ανακατάταξης που έθεσε το Βινσάντο και γενικά το ελληνικό κρασί στο περιθώριο, ήταν η αλλαγή στις προτιμήσεις των καταναλωτών καθώς και η εξέλιξη της τεχνολογίας που επέτρεπε πλέον τη διακίνηση και άλλων ευπαθέστερων ειδών κρασιού που πριν δεν άντεχαν στην ταλαιπωρία του ταξιδιού. Αρνητικά συνέβαλε και το υψηλό κόστος του Βινσάντο λόγω των ειδικών συνθηκών καλλιέργειας και μεταφοράς του στα απόκρημα μονοπάτια της καλντέρας. Στο μεσοδιάστημα σημειώθηκαν κάποιες προσπάθειες για προσαρμογή του κόστους, ευθυγράμμιση των προϊόντων με τις απαιτήσεις των νέων αγορών και αναβάθμιση της ποιότητας, όμως χωρίς αποτέλεσμα. Μόνο από τη στιγμή που η εσωτερική αγορά διευρύνθηκε αποφασιστικά και άρχισε να ζητά επώνυμα και ακριβότερα κρασιά, δηλαδή τα τελευταία χρόνια, άρχισε η οινοπαραγωγή της Σαντορίνης να αναδιοργανώνεται σε νέες βάσεις (Kourakou-Dragona, 1995β).



## 1.2 Η Αμπελουργία της Σαντορίνης

Το κρασί της Σαντορίνης επιδεικνύει εξαιρετικό ενδιαφέρον όταν συγκρίνεται με άλλες οινοπαραγωγικές περιοχές, καθ' ότι παρουσιάζει διαφορές τόσο στις περιβαλλοντικές συνθήκες, όσο και στις κλασσικές μεθόδους οινοποίησης. Το κλίμα της Σαντορίνης είναι ασύγκριτο, όπως θα γίνει και παρακάτω κατανοητό, σε σχέση με άλλες οινοπαραγωγικές περιοχές του κόσμου.

Όπως αναλυτικά αναφέρει στο βιβλίο του ο Gladstones, *Viticulture and the Environment*, υπάρχουν επτά βασικά στοιχεία του κλίματος που επηρεάζουν την αμπελουργία: 1) Μέση Θερμοκρασία Ιανουαρίου, 2) Μέση Ετήσια Διακύμανση, 3) Θερμές Ημέρες, 4) Ετήσια Βροχόπτωση, 5) Σχετική Υγρασία, 6) Δείκτης Ξηρασίας, 7) Ώρες Ηλιοφάνειας (Gladstones, 1992).

Η σημαντικότητα της Μέσης Θερμοκρασίας Ιανουαρίου και της Μέσης Ετήσιας Διακύμανσης προκύπτει από την ιδέα δημιουργίας ενός «ηπειρωτικού» κρασιού. Η έννοια «ηπειρωτικό» σχετίζεται με το γεγονός ότι το ηπειρωτικό κλίμα θεωρείται ως ένα από τα καλύτερα κλίματα για τη δημιουργία υψηλής ποιότητας οίνου, το οποίο διατηρεί τη φυσική του οξύτητα και χαρακτηρίζεται από εκλεκτό άρωμα και λεπτή γεύση φρούτων (Beeston, 1999). Το ηπειρωτικό, λοιπόν, κλίμα περιλαμβάνει κρύους χειμώνες, ζεστή άνοιξη και σχετικά θερμά καλοκαίρια, πλησίον δηλαδή του κλίματος της Γαλλίας (η οποία παράγει αναγνωρισμένα και υψηλής ποιότητας κρασιά). Τα στοιχεία του κλίματος της Σαντορίνης απέχουν από αυτά του ηπειρωτικού. Ο χειμώνας είναι γλυκός και ήπιος με μέση θερμοκρασία 10 °C, ενώ ταυτόχρονα χαρακτηρίζεται από έντονες βροχοπτώσεις. Τα καλοκαίρια είναι εξαιρετικά ζεστά και άγονα, με μεγάλες περιόδους ηλιοφάνειας – πάνω από δεκαέξι ώρες τη μέρα. Όπως αναφέρεται και παρακάτω, αυτές τις βροχερές χειμωνιάτικες μέρες είναι που τα αμπέλια απορροφούν το απαραίτητο νερό και περιβάλλονται από την κατάλληλη υγρασία για να αναπτυχθούν, καθότι το νησί είναι σχεδόν άνυδρο με ελάχιστα πηγαία νερά.

Οι ώρες ηλιοφάνειας και οι θερμές μέρες αποτελούν άλλον ένα σημαντικό παράγοντα για την αμπελουργία. Την άνοιξη είναι γνωστό ότι η ζέστη και ο ήλιος βοηθούν την άνθιση και προωθούν την ανάπτυξη, τη γονιμοποίηση και την καρποφορία (Beeston, 1999). Κλίματα με υψηλή ηλιοφάνεια, όπως αυτό της Σαντορίνης, τείνουν να παρουσιάζουν διακυμάνσεις θερμοκρασίας και να έχουν χαμηλά επίπεδα υγρασίας,

παράγοντες που θεωρούνται καθοριστικοί για την αμπελουργία. Συνακόλουθα, οι ώρες της ηλιοφάνειας φέρουν ευεργετικά αποτελέσματα μόνο όταν υπάρχει διακύμανση της θερμοκρασίας και όταν η σχετική υγρασία βρίσκεται στα κατάλληλα επίπεδα (Gladstones, 1992). Σε κλίματα με υψηλές θερμοκρασίες, όπως αυτό της Σαντορίνης, τα αμπέλια απαιτούν αρκετές ώρες έκθεσης στον ήλιο ώστε να ολοκληρωθεί αποτελεσματικά το σώμα του κρασιού, σε σχέση με τα αμπέλια πιο κρύων κλιμάτων, καθ' ότι η απορρόφηση των θρεπτικών στοιχείων από την άμπελο αυξάνεται με την άνοδο της θερμοκρασίας (Gladstones, 1992).

Η βροχόπτωση αποτελεί άλλον ένα σημαντικό παράγοντα για τη δημιουργία κρασιού υψηλής ποιότητας. Όμως, η μετα-ηφαιστειακή Θήρα ουδέποτε από την αρχαιότητα ως σήμερα, διέθετε αρκετό πηγαίο νερό. Κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, στις ξερικές καλλιέργειες του νησιού, το νερό προέρχεται μόνο από τη βροχή και τις θαλάσσιες ομίχλες. Οι τελευταίες αρχίζουν από τα μέσα Ιουνίου και διαρκούν όλη την καλοκαιρινή περίοδο, σκεπάζοντας πολλές φορές το νησί, κατά τις νυχτερινές ώρες, με ένα υγρό πέπλο, καμιά φορά πυκνό σαν βαμβάκι που εξασφαλίζει αρκετή ποσότητα νερού (φαινόμενο εξάτμισης οφειλόμενο στην καλντέρα).

Μια έντονη υδατική καταπόνηση, είτε αφορά υπερβολική βροχόπτωση είτε παντελή έλλειψη νερού, έχει δυσμενείς επιπτώσεις τόσο για την ανάπτυξη του φυτού όσο και στην ποιότητα των προϊόντων, με δεδομένο ότι προκαλεί μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας. Έτσι, λοιπόν, για την παραγωγή αμπελοοινικών προϊόντων υψηλής ποιότητας και την επιτυχή εκμετάλλευση του αμπελώνα η διαχείριση του νερού αποτελεί βασική παράμετρο ελέγχου. Η ξηρασία σε θερμά κλίματα, όπως αυτό της Σαντορίνης, μπορεί να προκαλέσει την πτώση των φύλλων, εκθέτοντας με αυτόν τον τρόπο τους καρπούς στο ηλιακό φως. Σε περίπτωση που τα σταφύλια δεν έχουν ωριμάσει πλήρως, η διαδικασία ωρίμανσής τους σταματάει σε αυτό το στάδιο και οι καρποί εμφανίζονται συρρικνωμένοι και ρυτιδωμένοι. Η βροχόπτωση είναι κυρίως καταστροφική κατά την άνθιση ή τις εβδομάδες πριν της ωρίμανσης, καθότι μπορεί να οδηγήσει στο σάπισμα των καρπών. Ειδικά το χειμώνα, όπου η άμπελος είναι αδρανής και χρειάζεται λίγη υγρασία, ο αμπελουργός πρέπει να βρει τρόπο ώστε να αποφύγει την είσοδο πλεονάζουσας ποσότητας νερού στις ρίζες της άμπελου, διότι θα έχει ως αποτέλεσμα να τις καταστρέψει (Beeston, 1999).

Στη Σαντορίνη, η βροχόπτωση είναι σπάνια έως και ανύπαρκτη, ειδικά κατά την περίοδο της βλάστησης, ενώ παρατηρείται μόνο κατά τη χειμερινή περίοδο, όπου

είναι έντονη. Έτσι, το κλίμα της Σαντορίνης έρχεται σε αντίθεση με τις οινοπαραγωγικές τεχνικές και τις απαιτήσεις για λίγη υγρασία το χειμώνα. Αυτή τη διαφοροποίηση οι αμπελουργοί της Σαντορίνης το εκμεταλλεύονται με διάφορες τεχνικές. Το πρώτο όργωμα στη Σαντορίνη καλείται «νιατό» και λαμβάνει χώρα κατά το μήνα Δεκέμβριο. Με το όργωμα αυτό καταστρέφονται τα επιφανειακά ζιζάνια και παραχώνονται φύλλα και κομμάτια κληματίδων για τον καλύτερο αερισμό του εδάφους. Καθώς αποσυντίθενται μέσα στη γη, λιπαίνουν το έδαφος, αυξάνοντας έτσι τη γονιμότητα, ενώ ταυτόχρονα το έδαφος είναι έτοιμο να απορροφήσει το βρόχινο νερό του χειμώνα. Μετά το πρώτο όργωμα, οι αμπελουργοί ανοίγουν τρύπες στο έδαφος σχήματος ανεστραμμένης πυραμίδας και βάθους 15 cm, έτσι ώστε να συγκεντρώνεται το βρόχινο νερό κοντά στις ρίζες. Το δεύτερο όργωμα καλείται «δίβολο» και πραγματοποιείται κατά το Φεβρουάριο ή το Μάρτιο, πριν από το άνοιγμα των οφθαλμών του φυτού, με κύριο σκοπό να μαλακώσει το χώμα που είχε σβολιάσει και σκληρύνει με τις βροχές. Το «τριαλέτρι», όπως λέγεται το τρίτο όργωμα γίνεται κατά τον Απρίλιο – Μάιο, όταν οι νέοι βλαστοί έχουν αποκτήσει μήκος 10 έως 50 cm. Οι αμπελουργοί το θεωρούν απολύτως απαραίτητο γιατί ο αερισμός του εδάφους αυξάνει τη γονιμότητά του (Kourakou-Dragona, 1995δ).

Η σχετική υγρασία αποτελεί άλλον έναν σημαντικό παράγοντα στα πλαίσια ύπαρξης υδατικού στρες. Ως σχετική υγρασία ορίζεται ο λόγος της πραγματικής ποσότητας υδρατμών που περιέχει ένας όγκος αέρα προς την ποσότητα που θα έπρεπε να είχε ο ίδιος όγκος για να είναι κορεσμένος κάτω από την ίδια θερμοκρασία. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία της ατμόσφαιρας, τόσο αυξάνεται και η ικανότητά της να αποθηκεύει υδρατμούς. Στη Σαντορίνη, η σχετική υγρασία παρουσιάζεται εξαιρετικά ευνοϊκή για την καλλιέργεια αμπελιού. Βέβαια, η υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία σε συνδυασμό με την αύξηση θερμοκρασίας κατά την ημέρα αποτελούν πρόσφορο περιβάλλον για την ανάπτυξη των μυκητολογικών ασθενειών στα φυτά. Στη Σαντορίνη, όμως, ένας άλλος κλιματικός παράγοντας, τα μελτέμια, εμποδίζουν την ανάπτυξη των ασθενειών. Αρχίζουν τις πρώτες, μέρες του Μαΐου με αυξανόμενη συχνότητα και μικρής διάρκειας, χαρακτήρα που διατηρούν ως το τέλος Ιουνίου. Από τα μέσα Ιουλίου και ως τα μέσα Σεπτεμβρίου τα μελτέμια κυριαρχούν στη θάλασσα των Κυκλάδων και πνέουν συνεχώς επί δύο και πλέον μήνες χωρίς διακοπή, μειώνοντας την ατμοσφαιρική υγρασία και δροσίζοντας το νησί. Από τα μέσα Ιουνίου και μετά το νησί καλύπτεται συνήθως από ομίχλη. Αυτό έχει ευεργετική επίδραση στις

καλλιέργειες μιας και κατά την περίοδο αυτή υποφέρουν από την έλλειψη βροχοπτώσεων (Ρούσσου, 2006).

Οι άνεμοι μπορεί να έχουν τόσο ευεργετικό ρόλο όσο και καταστροφικό ρόλο στην αμπελουργία, αναλόγως της έντασης που τους χαρακτηρίζει, σε συνδυασμό με την περίοδο με την οποία πνέουν. Η ανακύκλωση του αέρα είναι σημαντική γιατί εξομαλύνει τις θερμοκρασίες και ειδικά όταν πνέουν μετά από βροχή, απομακρύνουν την υγρασία από τα φύλλα, μειώνοντας την περίπτωση εμφάνισης μυκήτων. Επιπλέον, οι ασθενείς άνεμοι είναι ωφέλιμοι κατά την ανθοφορία και υποβοηθούν την επικονίαση και τη γονιμοποίηση. Στη Σαντορίνη πνέουν πολύ ισχυροί βόρειοι άνεμοι, οι οποίοι πολύ συχνά ξεπερνούν τα 8 και 9 μποφόρ. Ο ευεργετικός τους ρόλος στην αμπελουργία του νησιού εξαρτάται από την ένταση τους. Όταν η άνεμοι είναι ορμητικοί σχίζουν, σπάζουν ή και απομασχαλίζουν τους βλαστούς και μάλιστα τους τρυφερούς βλαστούς την άνοιξη ή και τινάζουν τον ανθό όταν βρουν τα κλήματα ανθισμένα. Το καλοκαίρι μπορούν να ρίξουν μεγάλο μέρος από τα σταφύλια στο έδαφος ή και να προκαλέσουν τον απορραγισμό τους. Ειδικά στη Σαντορίνη, οι σφοδροί άνεμοι επιφέρουν ζημιές και με έμμεσο τρόπο, γιατί σηκώνουν και μετακινούν μεγάλα ποσά θηραϊκής γης και ελαφρόπετρα. Όταν αυτό συμβαίνει την άνοιξη, τότε που ανοίγουν οι οφθαλμοί του φυτού, οι σκληροί κόκκοι της άμμου και της ελαφρόπετρας νεκρώνουν όσους χτυπήσουν, προκαλώντας τη μείωση της ετήσιας παραγωγής. Παρά ταύτα η Σαντορίνη εξελίχθηκε στο αμπελονήσι των Κυκλάδων, γιατί οι αμπελουργοί όλων των εποχών εργάστηκαν σκληρά, μεθοδικά και εφευρετικά και έτσι με τις μεθόδους αμπελοκομικής τεχνικής και καλλιέργειας της γης που εφάρμοσαν μπόρεσαν να αμβλύνουν τις δυσμενείς επιπτώσεις ενός δύσκολου οικολογικού περιβάλλοντος (Ρούσσου, 2006).

Το έδαφος αποτελεί άλλον έναν σημαντικό παράγοντα για την παραγωγή αμπελοοινικών προϊόντων υψηλής ποιότητας. Το έδαφος είναι αποτέλεσμα τριών φυσικών συνιστωσών: του υπεδάφους (δηλαδή, του μητρικού πετρώματος από το οποίο προέρχεται), της τοπογραφίας της περιοχής και του κλίματος, που επεμβαίνει στην εξέλιξη του. Στην αμπελοκαλλιέργεια, το έδαφος παίζει συγχρόνως δύο ρόλους. Είναι το φυσικό υπόβαθρο που στηρίζει το αμπέλι καθώς και το υπόστρωμα από το οποίο θα προμηθευτεί τα απαραίτητα για τη θρέψη του στοιχεία. Γιατί το αμπέλι έχει ανάγκη από αέρα, φως, νερό και ανόργανη τροφή (N, P, K, S, Fe, Mg, B, Mn, Cu, Zn, Mo, Na, Cl, Co). Είναι λοιπόν, φανερό πως από τη σύσταση του εδάφους εξαρτάται

και η ανόργανη θρέψη του αμπελιού. Σαν αποτέλεσμα, στα πλούσια εδάφη, το αμπέλι μπορεί να απλώσει τις ρίζες του και να βρει αρκετή υγρασία ώστε να αναπτύξει υπερβολικά πυκνό φύλλωμα και να παρουσιάσει μεγάλη παραγωγή σταφυλιών. Αντίθετα, στα εδάφη που δε συγκρατούν το νερό, το αμπέλι πρέπει να «παλέψει» για να το βρει. Σ' αυτά τα φτωχά εδάφη τα φυτά υποφέρουν σε σημαντικές εποχές του ετήσιου κύκλου ζωής τους (Freese, 2005). Το έδαφος της Σαντορίνης είναι το θεμέλιο του αμπελώνα της. Από την έκρηξη του ηφαιστείου τον 17<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. αναβλήθηκαν τεράστιες ποσότητες ελαφρόπετρας και ηφαιστειακής τέφρας που αποτέθηκαν στην επιφάνεια του νησιού μαζί με ηφαιστειακή άμμο και κομμάτια στερεοποιημένης λάβας. Το έδαφος της Σαντορίνης έχει επομένως ως μητρικό πέτρωμα θηραϊκή γη, ελαφρόπετρα και λιθάρια της μαύρης λάβας, ασχέτως αν το βαθύτερο υπόστρωμα αποτελείται από ασβεστόλιθο και σχιστόλιθο, που ήταν τα προ-ηφαιστειακά εδάφη. Τα εδάφη του νησιού επειδή αποτελούνται από ηφαιστειακή τέφρα και πορώδεις κόκκους ελαφρόπετρας, έχουν την ιδιότητα να απορροφούν και να συγκρατούν το νερό. Για αυτό, το υπέδαφος είναι συμπαγές και αδιαπέραστο από τις ρίζες των περισσότερων φυτών, που περιορίζονται σε ένα μικρό στρώμα επιφανειακού εδάφους. Σε μεγάλο βάθος δεν έχουν βρεθεί αποτυπώματα ριζών που να μαρτυρούν την ύπαρξη, στα παλαιότερα χρόνια, δένδρων με βαθύτερες ρίζες. Αντίθετα, στα μη ηφαιστειογενή εδάφη του νησιού που είναι ασβεστολιθικά, όπως όλων των άλλων Κυκλαδίτικων νησιών, η διείσδυση των ριζών είναι ευκολότερη. Τα εδάφη όμως, αυτά κρατούν ελάχιστη υγρασία, γεγονός μεγάλης σημασίας για τη βλάστηση σε ένα νησί με μακρά περίοδο θερινής ανομβρίας (Ρούσσου, 2006).

Με τη λέξη γονιμότητα εννοούμε τη δύναμη του χωραφιού. Σε εδάφη με μεγάλη γονιμότητα, όπου η οργανική ουσία περιέχεται σε αναλογίες μεγαλύτερες των κανονικών, το πρέμνο ανθορροεί, έχει βλαστομανία (όταν καρπίζει δίνει μεγάλες αποδόσεις), αλλά η ποσότητα των σταφυλιών είναι κατώτερη σε ποιότητα, σε χρώμα και σε σάκχαρα. Αυτό είναι ένα από τα βασικά προβλήματα των αμπελώνων που όμως δεν παρουσιάζεται στη Σαντορίνη, μιας και οι ποσότητες της οργανικής ουσίας είναι πολύ μικρές (1%) και γι' αυτό γίνεται προσθήκη οργανικής ουσίας (Ρούσσου, 2006).

Όσον αφορά τη μηχανική του σύσταση, το έδαφος της Σαντορίνης χαρακτηρίζεται αμμώδες, δηλαδή έχει ελαφριά σύσταση. Σε ορισμένα σημεία είναι αμμοπηλώδες εξαιτίας του αρχικού ασβεστόλιθου που δίνει αυξημένα ποσά πηλού. Η

περιεκτικότητα σε άργιλο είναι μικρή. Όλα τα εδάφη είναι κορεσμένα με βάση δηλαδή, εδάφη αλκαλικά με pH που κυμαίνεται από 7,20 έως 8,90. Γενικά, το έδαφος του νησιού της Καλλίστης χαρακτηρίζεται από καλή εδαφική δομή και από ικανοποιητική περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία σε K (κάλιο) και σε ιχνοστοιχεία. Αντίθετα, έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε N (άζωτο), καθώς και σε οργανική ουσία, ενώ είναι οριακή σε P (φώσφορο) (Ρούσσου, 2006).

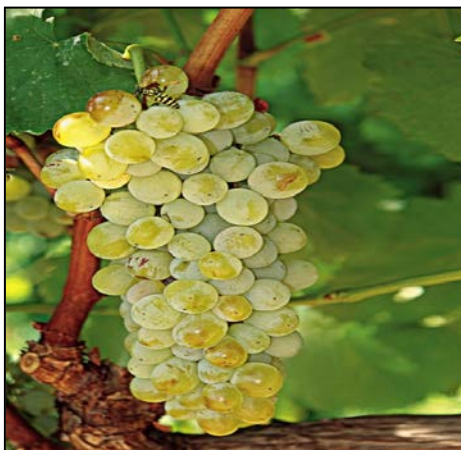
### **1.3 Ποικιλία Ασύρτικο**

Σύμφωνα με την πρώτη επίσημη έκθεση του Ινστιτούτου Οίνου για τις ποικιλίες αμπέλου που υπάρχουν στο νησί, στις αρχές του αιώνα καλλιεργούνταν περίπου πενήντα. Σήμερα, υπάρχουν περί τις σαράντα. Μεταξύ αυτού του πλήθους όμως, αυτές που δεσπόζουν πραγματικά είναι το Ασύρτικο, λευκή ποικιλία που διατηρεί υψηλές οξύτητες και αρωματικά στοιχεία παρά τις υψηλές καλοκαιρινές θερμοκρασίες (Alley, 2003), οι λευκές Αθήρι και Αϊδάνι καθώς και οι κόκκινες Μαντηλαριά, Μαυροτράγανο, και Βουδόματο.

Το Ασύρτικο είναι η κυρίαρχη ποικιλία του αμπελώνα της Σαντορίνης. Βρίσκεται στο 65% - 75% των λευκών ποικιλιών αμπέλου. Πρόκειται για μια εγχώρια ποικιλία, που καλλιεργείται από την αρχαιότητα (καλλιεργείται από το 1600 π.Χ.) διατηρώντας μέχρι σήμερα αμετάβλητη την ποιότητά του και τα χαρακτηριστικά του. Πιθανολογείται ότι καλλιεργούνταν στο όρος του Προφήτη Ηλία μέχρι τη μεγάλη ηφαιστειακή έκρηξη, όπου η ηφαιστειακή τέφρα σκέπασε την Καλλίστη, εξαφανίζοντας κάθε είδους βλάστηση πάνω στο νησί, με εξαίρεση τα φυτά που υπήρχαν στην οροσειρά του Προφήτη Ηλία (Kourakou-Dragona, 1995γ).

Η ποικιλία Ασύρτικο βρίσκεται σε πλήρη αρμονία με τις σκληρές συνθήκες της Σαντορίνης. Είναι απόλυτα προσαρμοσμένη στο ξηροθερμικό της περιβάλλον καθώς και στο ηφαιστειογενές της έδαφος, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο ωίδιο και τον περονόσπορο (Kourakou-Dragona, 1995γ). Είναι, όμως, ευαίσθητη στον άνεμο για αυτό και καλλιεργείται κυριολεκτικά υπό τη γη, με το χαρακτηριστικό κλάδεμα της γραφικής κουλούρας (αμπελιά). Συμπερασματικά, το Ασύρτικο αποτελεί την κατάλληλη ποικιλία για την οικολογία της Σαντορίνης και λόγω των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών του, κρασιά τα οποία προέρχονται από τη συγκεκριμένη ποικιλία χαρακτηρίζονται ως κρασιά Ονομασίας Προελεύσεως Ανωτέρας Ποιότητας, όπως για παράδειγμα αποτελεί το κρασί Βινσάντο.

Το φύλλο του είναι μέτριο έως μεγάλο μέγεθος, σφηνοειδές, τρίκολπο ή πεντάκολπο. Το έλασμα είναι παχύ, με τους λοβούς να καμπυλώνουν προς τα πάνω. Η πάνω επιφάνεια του φύλλου είναι λεία με βαθυπράσινο χρώμα ενώ η κάτω επιφάνεια είναι φαιοπράσινη και καλύπτεται από πυκνό χνούδι. Η ράγα είναι μετρίου μεγέθους, σφαιρική με 2 – 3 γίγαρτα κατά ράγα, ο φλοιός είναι μετρίου πάχους, χρώματος κίτρινο με χρυσές ανταύγειες και πλούσιος σε τανίνες. Η σάρκα είναι χυμώδες, μαλακή και με χαρακτηριστική υπόξινη γεύση (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2 Ποικιλία Ασύρτικο

#### 1.4 Ορισμός του γλεύκους και η σύστασή του

Γλεύκος (μούστος) είναι σύμφωνα με τη διεθνή νομολογία ο χυμός που λαμβάνεται με την έκθλιψη και την πίεση ώριμου, νεπού σταφυλιού.

Το γλεύκος αποτελείται κυρίως από το χυμό του σαρκώματος της ρώγας του σταφυλιού, αλλά περιέχει και σε μικρή αναλογία συστατικά των φλοιών, των βοστρύχων και των γιγάρτων εφόσον συμμετέχουν στην έκθλιψη και την πίεση. Η πλήρης γνώση της σύστασης του γλεύκους είναι απαραίτητη γιατί οι ποιοτικοί χαρακτήρες του οίνου εξαρτώνται από τη σύσταση της πρώτης ύλης του, δηλαδή το γλεύκος.

Ο καθαρός διαυγασμένος μούστος έχει πυκνότητα που κυμαίνεται από  $1,050 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  έως  $1,130 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  ή και περισσότερο για μούστο από υπερώριμα σταφύλια. Περιέχει διάφορες ύλες διαλυμένες στο νερό. Από αυτές, άλλες μεταφέρονται αναλλοιώτες στον οίνο, ενώ άλλες υφίστανται μεγάλες μεταβολές είτε κατά την αλκοολική ζύμωση είτε λόγω των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων είτε λόγω επίδρασης διαφόρων εξωτερικών παραγόντων (θερμοκρασίας, οξυγόνου κ.α.)

Τα σπουδαιότερα συστατικά του μούστου είναι τα παρακάτω (Λιούνη, 2010):

1. Υδωρ. Αποτελεί το 70 – 80% του βάρους του μούστου και είναι το κύριο συστατικό του στο οποίο βρίσκονται διαλυμένα τα υπόλοιπα συστατικά του.

2. Σάκχαρα. Το γλεύκος αποτελείται κυρίως από τα αναγωγικά σάκχαρα d-γλυκόζη (σταφυλοσάκχαρο) και d-φρουκτόζη (οπωροσάκχαρο). Επίσης, στο γλεύκος ανιχνεύεται και καλαμοσάκχαρο μέχρι 1%, το οποίο σε ορισμένες αμερικάνικες ποικιλίες φθάνει μέχρι το 10%.

Το σάκχαρο του σταφυλιού προέρχεται από το άμυλο που σχηματίζεται στα φύλλα. Αυτό, κατά τη μεταφορά του στη ρώγα σακχαροποιείται μόνο προς d-γλυκόζη, για αυτό και στην αρχή υπάρχει στις ρώγες σχεδόν μόνο γλυκόζη. Κατόπιν, αυξάνεται η ποσότητα της φρουκτόζης, η οποία κατά την ωρίμανση γίνεται ίση με την ποσότητα της γλυκόζης, ενώ στην υπερωρίμανση την ξεπερνά. Τα σάκχαρα αυτά θα ζυμωθούν κατά την αλκοολική ζύμωση σε αιθυλική αλκοόλη και μάλιστα η γλυκόζη ζυμώνεται πιο γρήγορα από τη φρουκτόζη.

Η ποσότητα του σακχάρου στο γλεύκος εξαρτάται από την ποικιλία του σταφυλιού, τις συνθήκες καλλιέργειας, τις κλιματολογικές συνθήκες, το βαθμό ωρίμανσης καθώς και από άλλους παράγοντες, όπως είναι η περίπτωση προσβολής των σταφυλιών από το μύκητα *Botrytis cinerea*, ο οποίος προκαλεί μικρές ρωγμές στο φλοιό με αποτέλεσμα την εξάτμιση νερού και συνεπώς την αύξηση της περιεκτικότητας του σταφυλιού σε σάκχαρο. Επίσης, η ποσότητα του σακχάρου είναι αντιστρόφως ανάλογη με την περιεκτικότητα σε οξέα δηλαδή, σε μούστους με μικρό σακχαρικό τίτλο η περιεκτικότητα σε οξέα είναι μεγάλη και αντίστροφα.

Τέλος στο μούστο περιέχονται πεντόζες και πεντοζάνες.

3. Οξέα. Τα οξέα του μούστου, όπως και τα σάκχαρα, έχουν μεγάλη επίδραση στην ποιότητα του οίνου. Τα οξέα είναι προϊόντα οξειδωτικής διάσπασης των σακχάρων και σχηματίζονται κατά την αναπνοή των ρωγών ως ενδιάμεσα προϊόντα της εναλλαγής της ύλης. Στις άγουρες ρώγες που η αναπνοή είναι έντονη το ποσόν των οξέων είναι αυξημένο, ενώ όσο προχωρεί η ωρίμανση η παραγωγή των οξέων μειώνεται με αποτέλεσμα την ελάττωση της ποσότητας των οξέων. Για παράδειγμα, στις άγουρες ρώγες η οξύτητα φθάνει το 30% ενώ, κατά την ωρίμανση πέφτει στο 4-6% για τα νότια κλίματα και λίγο περισσότερο για τα βόρεια.

Τα οργανικά οξέα που βρίσκονται στους μούστους από υγιή σταφύλια είναι όλα φυσικά συστατικά των σταφυλιών, ενώ οι μούστοι που προέρχονται από σάπια



σταφύλια περιέχουν και ορισμένα οξέα που προέρχονται από τη δράση των μυκήτων σε συστατικά του σταφυλιού.

Η ογκομετρούμενη οξύτητα του μούστου οφείλεται στα ελεύθερα οξέα (τρυγικό, μηλικό) και στα όξινα άλατα (όξινο τρυγικό κάλιο). Η κατανομή των οξέων στο σάρκωμα της ρώγας δεν είναι σε όλες τις ζώνες η ίδια. Έτσι, στην κεντρική ζώνη βρίσκεται το μεγαλύτερο ποσόν των οξέων ενώ, όσο προχωράμε προς την περιφερειακή ζώνη η ποσότητά τους ελαττώνεται. Αυτός είναι ο λόγος που ο μούστος της πρώτης έκθλιψης έχει πολύ μικρότερη οξύτητα από αυτόν των πιεστηρίων, το μεγαλύτερο ποσοστό του οποίου προέρχεται από την κεντρική στιβάδα με τα περισσότερα οξέα.

Τα κυριότερα οξέα του μούστου είναι το D-τρυγικό, το L-μηλικό και το L-κιτρικό. Ειδικά τα δύο πρώτα αποτελούν το 90 – 97% της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας. Το *τρυγικό οξύ* είναι το ειδικό οξύ του σταφυλιού. Παρότι είναι πολύ λίγο διαδεδομένο στη φύση είναι το πιο ισχυρό οργανικό οξύ του μούστου ( $pK = 3.01$ ), γι' αυτό και από τη συγκέντρωσή του σε ελεύθερη κατάσταση επηρεάζεται το pH του οίνου. Σαν ελεύθερο, το τρυγικό βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα σε άγουρα σταφύλια, ενώ, στα ώριμα ελαττώνεται αισθητά και λόγω καύσης και λόγω δέσμευσής τους από βάσεις προς σχηματισμό κυρίως όξινου τρυγικού καλίου και τρυγικού ασβεστίου. Από αυτά το όξινο τρυγικό κάλιο αποτελεί περισσότερο του μισού της ολικής οξύτητας του μούστου.

Το *μηλικό οξύ*, αντίθετα προς το τρυγικό, είναι πολύ διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο. Το οξύ αυτό είναι πολύ ευπαθές, οξειδώνεται και προσβάλλεται εύκολα, γι' αυτό, στην άγουρη ρώγα το μηλικό οξύ αποτελεί το 60 – 70 % της ολικής οξύτητας. Κατά την ωρίμανση όμως, ελαττώνεται περισσότερο από το τρυγικό κάλιο και φθάνει το 10 – 40% της οξύτητας.

Το *κιτρικό οξύ* αποτελεί συστατικό του μούστου σε ποσοστό 0,25 – 0,3  $g \cdot L^{-1}$ . Όταν όμως, τα σταφύλια έχουν προβληθεί από τον μύκητα *Botrytis cinerea* (όπου σαπίζουν οι ρώγες) έχουν αυξημένο ποσό κιτρικού οξέος μέχρι και 1  $g \cdot L^{-1}$ . Το κιτρικό οξύ βρίσκεται κυρίως στα κυτταρικά τοιχώματα οπότε παραλαμβάνεται δύσκολα στο μούστο. Επίσης, είναι πιο σταθερό οξύ από τα προηγούμενα για αυτό και επηρεάζεται λίγο κατά την ωρίμανση. Κατά την αλκοολική ζύμωση δεν μεταβάλλεται το ποσόν του κιτρικού οξέος. Όμως, κατά τη διαδικασία της μηλογαλακτικής ζύμωσης στον οίνο, το κιτρικό οξύ μετατρέπεται σε οξικό οξύ, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην εξαφάνισή του.

Αυτά είναι τα κύρια οξέα του γλεύκους, αλλά υπάρχουν και άλλα σε μικρότερες ποσότητες όπως το οξαλοξικό, το ασκορβικό, το γαλακτουρονικό, το γλυκολικό, το φουμαρικό και το κινικό οξύ. Επίσης, σε γλεύκη από σάπια σταφύλια ανιχνεύονται το γλυκονικό, το βλεννικό και το 2,5-δικετο-γλυκονικό οξύ που σχηματίζονται από ενζυματική οξείδωση των σακχάρων και των πηκτινών.

Κατά την αλκοολική ζύμωση σχηματίζονται εκτός από την αλκοόλη και το διοξείδιο του άνθρακα και διάφορα οργανικά οξέα, τα οποία όπως είναι φυσικό απαντούν μόνο στους οίνους και όχι στα γλεύκη. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι το ηλεκτρικό, το γαλακτικό, το οξικό, το κιτρομηλικό, το διαθυλενογλυκό, το πυροσταφυλικό και το ακετογλουταρικό.

Τέλος, στους οίνους υπάρχουν και οξέα που προέρχονται από βακτηριακή προσβολή συστατικών του οίνου (σάκχαρα, τρυγικό οξύ, μηλικό οξύ κ.λ.π.). Από αυτά τα κυριότερα είναι το γαλακτικό και το οξικό οξύ.

Το γαλακτικό οξύ μπορεί να προέλθει από τις εξής πηγές:

α) Από την αλκοολική ζύμωση που σχηματίζονται μικρές ποσότητες ( $0,1 - 0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) και κυρίως της D (-) ισομερούς μορφής.

β) Από τη μηλογαλακτική ζύμωση που η ποσότητα του γαλακτικού οξέος εξαρτάται από αυτή του μηλικού και είναι L (+) ισομερούς μορφής, και

γ) Από τα γαλακτικά βακτήρια που προσβάλλουν διάφορα συστατικά του οίνου (π.χ. σάκχαρα, γλυκερίνη, τρυγικό οξύ) και σχηματίζουν άλλα D (-) ισομερή και άλλα L (+). Η ποσότητα του παραγόμενου γαλακτικού οξέος εξαρτάται από το βαθμό της βακτηριακής προσβολής και φθάνει μέχρι  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Η ποσότητα του οξικού οξέος που σχηματίζεται από τις ζύμες ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες ζύμωσης (είδος ζύμης, σύσταση και υγιεινή κατάσταση του μούστου).

Κατά την αλκοολική ζύμωση μούστου από υγιή σταφύλια που διεξάγεται υπό κανονικές συνθήκες και σύμφωνα με τις σύγχρονες τεχνολογικές μεθόδους, σχηματίζεται μικρή ποσότητα οξικού οξέος μέχρι  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  από την ακεταλδεΐδη.

Το οξικό οξύ σχηματίζεται επίσης:

α) κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, γιατί τα βακτήρια που διασπούν το μηλικό οξύ προς γαλακτικό προσβάλλουν ταυτόχρονα το κιτρικό με σχηματισμό μικρής ποσότητας οξικού οξέος ( $0,2 - 0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),

β) με την οξείδωση της αλκοόλης από τον αέρα,

γ) με την ενζυματική οξείδωση της αλκοόλης υπό την επίδραση οξικών βακτηρίων, σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες οξικού οξέος ώστε να μετατραπεί ο οίνος σε ξύδι,

δ) με τη βακτηριακή προσβολή διαφόρων συστατικών του οίνου (σάκχαρα, γλυκερίνη, τρυγικό οξύ κ.λ.π.) προς σχηματισμό αλειφατικών οξέων, όπου παρατηρείται να υπερισχύει ποσοτικά το οξικό οξύ.

4. Πηκτίνες. Οι πηκτίνες περιέχονται στις κυτταρικές μεμβράνες του σταφυλιού, είναι μεγαλομοριακοί υδατάνθρακες με  $M.B. > 30000$  και αποτελούνται από μακριές αλυσίδες μορίων γαλακτουρονικού οξέος ενωμένων μεταξύ τους με 1,4-γλυκοζυτικό δεσμό. Το 75% των καρβοξυλομάδων του γαλακτουρονικού οξέος είναι στεροποιημένες με μεθανόλη.

Στα σταφύλια περιέχονται 1 – 3% πηκτίνες, οι οποίες κατά τη ζύμωση ελαττώνονται λόγω υδρόλυσης και στο κρασί περιέχονται σε ίχνη. Αυτές είναι ανεπιθύμητες στον οίνο διότι μπορεί να εμποδίσουν τη διαύγασή του.

5. Αζωτούχες ενώσεις. Στους μούστους βρίσκονται διάφορες αζωτούχες ύλες, οργανικές (αμινοξέα, πεπτίδια, πολυπεπτίδια, πρωτεΐνες) και ανόργανες (αμμωνιακά άλατα και ίχνη νιτρικών). Το συνολικό ποσόν τους είναι  $0,2 - 1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

6. Δεσικές ύλες (ταννίνες). Είναι άμορφες με στυφή γεύση και βρίσκονται κυρίως στα κοτσάνια, στους φλοιούς και στα κουκούτσια των σταφυλιών για αυτό και οι μούστοι που ζυμώνονται μαζί με τα στέμφυλα είναι πλούσια σε δεσικές ύλες.

Οι δεσικές ύλες έχουν ορισμένες ιδιότητες που ενδιαφέρουν την οινοποίηση, όπως το ότι προσδίδουν στυφή γεύση στον οίνο, σταθεροποιούν το χρώμα του, γιατί σαν ευοξειδωτές οξειδώνονται αυτές και όχι οι χρωστικές του οίνου και τέλος συντελούν στη διατήρηση του οίνου γιατί σχηματίζουν δυσδιάλυτες ενώσεις με τις αζωτούχες ύλες και τις πηκτίνες που καθιζάνουν και έτσι διανγάζεται ο οίνος. Η αυξημένη όμως ποσότητα των δεσικών συντελεί στην αλλοίωση του οίνου, την γνωστή σαν κυανούν ή μέλαν θόλωμα, όπου σχηματίζεται δεσικός σίδηρος που καθιζάνει με δυσμενή αποτελέσματα στην ποιότητα του οίνου.

7. Χρωστικές. Αυτές διακρίνονται στις χρωστικές: α) των λευκών σταφυλιών και β) σε αυτές των ερυθρών.

Στα λευκά σταφύλια υπάρχουν η πράσινη χρωστική η χλωροφύλλη που στην αρχή βρίσκεται σε όλα τα μέρη του σταφυλιού ενώ στην ωρίμανση χάνεται και οι κίτρινες χρωστικές που είναι τα καροτίνια και η κερκετίνη. Οι χρωστικές αυτές δεν βρίσκονται στον μούστο γιατί τα λευκά σταφύλια ζυμώνονται χωρίς τα στέμφυλα.

Οι χρωστικές των ερυθρών σταφυλιών είναι οι ανθοκυάνες. Αυτές περιέχονται μόνον στους φλοιούς, εκτός από ελάχιστες περιπτώσεις που είναι χρωματισμένο και το σάρκωμα. Η σπουδαιότερη ανθοκυάνη είναι η οινίνη, μίγμα μονογλυκοζιτού και διγλυκοζιτού της οινιδίνης. Οι χρωστικές αυτές είναι κόκκινες. Με την επίδραση όμως, των αλκαλίων το χρώμα τους μεταβάλλεται σε κυανούν ιώδες. Οι χρωστικές διαλύονται περισσότερο στην αλκοόλη από το νερό, άρα και στο ζυμωμένο γλεύκος.

8. Ανόργανες Ύλες. Ο μούστος περιέχει  $3 - 5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ανόργανα συστατικά, ενώ στο κρασί ελαττώνονται στο  $1,8 - 2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Η ποσότητά τους εξαρτάται από το έδαφος, τις καιρικές συνθήκες, τη λίπανση καθώς και από άλλους παράγοντες. Τα συστατικά αυτά προσδιορίζονται στην τέφρα.

## 1.5 Χημικές διεργασίες κατά την οινοποίηση

Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, οι μεταβολικές διεργασίες και οι χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι υψίστης σημασίας για την ποιότητα του κρασιού. Πιο συγκεκριμένα, τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων επηρεάζουν τη χημική σύσταση του οίνου, καθώς και τις οργανοληπτικές του ιδιότητες, δηλαδή την υφή, τη γεύση και το άρωμά του.

Οι χημικές διεργασίες που λαμβάνουν μέρος είναι κατά κύριο λόγο ζυμώσεις. Ως ζυμώσεις ορίζονται οι διασπάσεις σύνθετων οργανικών υλών σε άλλες απλούστερες με τη βοήθεια ενζύμων. Πρόκειται για αναερόβιες μεταβολικές διεργασίες κατά τη διάρκεια των οποίων αθροίζονται ή απεκκρίνονται προϊόντα, όπως γαλακτικό οξύ ή αιθανόλη. Αυτές οι χημικές διεργασίες πραγματοποιούνται από μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την παραγωγή ATP. Οι ζυμώσεις χαρακτηρίζονται από το παραγόμενο προϊόν π.χ. αλκοολική ζύμωση, γαλακτική ζύμωση, προπιονική ζύμωση. Το αρχικό υπόστρωμα για τις περισσότερες ζυμώσεις είναι η γλυκόζη (Karlson *et al.*, 1994). Στο κρασί πραγματοποιούνται κυρίως δύο ζυμώσεις: η αλκοολική και η μηλογαλακτική ζύμωση.

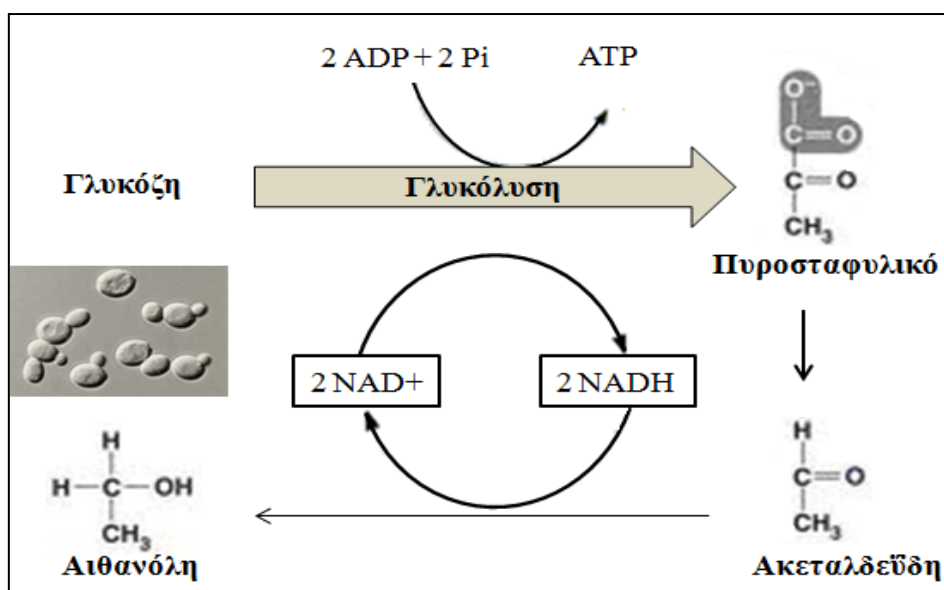
### 1.5.1 Η αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση, η οποία πραγματοποιείται κυρίως από ζύμες, είναι η διάσπαση των σακχάρων του γενικού τύπου  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  (εξόζες) από ένζυμα μικροοργανισμών (ζύμες, γαλακτικά και οξικά βακτήρια), κατά κύριο λόγο προς αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη) και διοξείδιο του άνθρακα (Εικ. 1.3). Η γλυκόζη αποικοδομείται μέχρι το

στάδιο του πυροσταφυλικού οξέος σε μια μεταβολική πορεία που περιλαμβάνει εννέα στάδια και ονομάζεται γλυκόλυση ή μεταβολική πορεία Emden-Meyerhord-Parnas. Ακολουθεί αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού προς ακεταλδεΐδη, η αναγωγή της οποίας δίνει αιθανόλη. Η μετατροπή αυτή γίνεται με ένα πολύπλοκο μηχανισμό, μέσω κατάλυσης διαδοχικών αντιδράσεων από σειρά ενζύμων και κατά το μεγαλύτερο μέρος υπό αναερόβιες συνθήκες (κατανάλωση μοριακού οξυγόνου στα αρχικά στάδια της ζύμωσης), με την ταυτόχρονη απελευθέρωση ενέργειας:



Εκτός από την παραγωγή αλκοόλης κατά την αλκοολική ζύμωση, παράγονται και άλλα δευτερεύοντα προϊόντα, όπως για παράδειγμα γλυκερίνη, ακεταλδεΐδη, ακετογλουταρικό οξύ, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, γαλακτουρονικό οξύ, α-βουτανιοδιόλη, μεθανόλη, ακετοΐνη, διακετύλιο και πολλές αρωματικές ενώσεις.



Εικόνα 1.3 Τα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης

### 1.5.1.1 Παράγοντες που επιδρούν στην αλκοολική ζύμωση

Η οινοποίηση του γλεύκους (αλκοολική ζύμωση) αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που έχουν άμεση σχέση με την ανάπτυξη των μικροοργανισμών του γλεύκους οι οποίοι προκαλούν την οινοποίησή του. Οι παράγοντες αυτοί κατατάσσονται στις 3 ακόλουθες κατηγορίες:

1. Παράγοντες θρέψης και επιβίωσης. Σημαντικοί παράγοντες θρέψης και επιβίωσης των μικροοργανισμών κατά την αλκοολική ζύμωση είναι οι εξής:

- *Συγκέντρωση πηγών αζώτου.* Η ανάπτυξη των ζυμών εξαρτάται άμεσα από το άζωτο διότι αποτελεί σημαντικό συστατικό για τη σύνθεση των αμινοξέων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων των κυττάρων. Επομένως έλλειψη αζώτου στο γλεύκος έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων (Rose & Harrison, 1970, Bisson, 2001).
- *Αερισμός –Ανάγκη σε οξυγόνο.* Κατά την αλκοολική ζύμωση παρατηρούνται δύο φάσεις, η αρχική φάση αερόβιας ανάπτυξης ζυμών, η οποία ακολουθείται από την αναερόβια φάση ανάπτυξης. Στην πρώτη φάση οι ζύμες έχουν ανάγκη για οξυγόνο αφ' ενός μεν για να δημιουργήσουν τα απαραίτητα μακρομόρια και να μπορέσουν να πολλαπλασιαστούν, αφετέρου για να αντέξουν στις αντίξοες συνθήκες που δημιουργούνται από τα παραπροϊόντα της ζύμωσης, ιδίως όταν οι ζύμες βρίσκονται στη φάση θανάτου (Larue *et al*, 1980, Bisson, 2001). Οι αναερόβιες συνθήκες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αναστέλλουν την ανάπτυξη των οξικών βακτηρίων και των νηματοειδών μυκήτων.
- *Θερμοκρασία ζύμωσης και συγκέντρωση υδρογονοϊόντων (pH).* Η θερμοκρασία παίζει αποφασιστικό ρόλο για την ανάπτυξη των ζυμών κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης γιατί επιδρά στον ρυθμό ανάπτυξης, στη βιωσιμότητα και στις μεταβολικές διαδικασίες των κυττάρων. Συνήθως, οι ζύμες του γλεύκους έχουν θερμοκρασιακό άριστο γύρω στους 20 °C, ο δε ρυθμός ανάπτυξής τους διαταράσσεται σημαντικά σε μεγάλες και απότομες θερμοκρασιακές αλλαγές. Η θερμοκρασία δρα και ως συνεργός παράγοντας στην τοξικότητα της αλκοόλης προς τα κύτταρα, διότι σε υψηλές θερμοκρασίες ζύμωσης αυξάνεται ο ρυθμός παραγωγής της αιθανόλης με συνέπεια την αναστολή της κυτταρικής αύξησης λόγω ενδοκυτταρικής συσσώρευσης αλκοόλης (Navarro & Durand, 1978). Η ανθεκτικότητα των κυττάρων σε αιθανόλη μειώνεται σε υψηλές θερμοκρασίες εξαιτίας της ελαττωμένης διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης που προκαλείται από την αύξηση της ενσωμάτωσης κορεσμένων λιπαρών οξέων σε αυτήν (Riberaux-Gayon, 1985). Τέλος, η θερμοκρασία έχει και έμμεση επίδραση στην αλκοολική ζύμωση, λόγω της εξάτμισης της αλκοόλης και άλλων αρωματικών ουσιών που συμβάλλουν στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου. Το pH του γλεύκους επειδή συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 3,0 και 3,5 δρα επιλεκτικά στη μικροβιακή ανάπτυξη επιτρέποντας να αναπτυχθούν ζύμες,

οξυγαλακτικά και οξικά βακτήρια και κάποιοι νηματοειδείς μύκητες. Το pH του γλεύκος σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία ζύμωσης παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην πορεία της ζύμωσης, μέσω επίδρασής του στην ανάπτυξη και την αλκοολοανθεκτικότητα των κυττάρων (Heart & Fleet, 1988, Bisson, 2001).

- *Συγκέντρωση ακόρεστων λιπαρών οξέων, στερολών.* Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα όπως και οι στερόλες αποτελούν δομικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης που εξασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία της. Οι ουσίες αυτές λειτουργούν ως παράγοντες επιβίωσης για τα κύτταρα, γιατί διευκολύνουν την έξοδο της αιθανόλης από το κυτταρόπλασμα αυξάνοντας έτσι τη βιωσιμότητά τους. Επίσης, οι στερόλες μπορεί να λειτουργούν και ως αναστολείς ανάπτυξης κατά την αυθόρμητη και γρήγορη αερόβια ανάπτυξη των κυττάρων (Ribereau-Gayon, 1985, Bisson, 2001).
- *Συγκέντρωση βιταμινών.* Οι βιταμίνες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των κυττάρων. Μερικά δε στελέχη ζυμών έχουν ανάγκη συγκεκριμένων βιταμινών και σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (Ough *et al.*, 1989, Bisson, 2001). Επομένως, πιθανή έλλειψη των βιταμινών προκαλεί αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων.

2. Παράγοντες αναστολείς ανάπτυξης. Σημαντικοί παράγοντες που αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών της αλκοολικής ζύμωσης είναι:

- *Συγκέντρωση σακχάρων.* Υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων στο γλεύκος περιορίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1979, Bisson, 2001). Κατά τη ζύμωση λόγω χαμηλού ωσμωτικού δυναμικού στα κύτταρα προκαλείται επιμήκυνση της φάσης επώασης και μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Επίσης, περιορίζεται η ικανότητα των κυττάρων να αποβάλλουν την αλκοόλη με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή της στα κύτταρα, γεγονός που δημιουργεί πρόβλημα στην επιβίωσή τους.
- *Συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα-Πίεση.* Η ανασταλτική δράση του διοξειδίου του άνθρακα στην ανάπτυξη των κυττάρων είναι μικρή υπό ατμοσφαιρική πίεση ενώ υπό πιέσεις μεγαλύτερες της ατμοσφαιρικής αυξάνεται αισθητά (Rose & Harrison 1970, Bisson, 2001).
- *Συγκέντρωση θείου.* Ο θειώδης ανυδρίτης δρα ως αντισηπτικό και αντιοξειδωτικό. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλεί αναστολή της δράσης

των μεταβολικών ενζύμων των μυκήτων και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δρα ως μυκητοκτόνο. Η αφομοίωση του SO<sub>2</sub> γίνεται με ενεργή μεταφορά ή με απλή διάχυση (Stratford & Rose, 1986). Τα κύτταρα παίζουν το ρόλο παγίδας SO<sub>2</sub> με συνέπεια την ενδοκυτταρική συσσώρευση ανιόντων θείου, το οποίο προκαλεί μη αναστρέψιμη αναστολή της ανάπτυξης και επομένως θανάτωση των κυττάρων (Gunnison, 1981, Bisson, 2001).

- *Συγκέντρωση ταννινών.* Οι ταννίνες (πολυφαινόλες) ενεργούν ως αναστολείς ανάπτυξης των κυττάρων των ζυμών και των βακτηρίων (Rose & Harrison, 1970, Bisson, 2001).
- *Συγκέντρωση μετάλλων.* Μικρή ποσότητα μετάλλων, όπως, Fe, Cu, Co, Al, Mg, Zn, είναι αναγκαία για τη λειτουργία των κυττάρων. Αυξημένες ποσότητες όμως αυτών προκαλούν επιβράδυνση ή και αναστολή της ζύμωσης λόγω του ότι είναι τοξικά για τα κύτταρα (Rose & Harrison, 1970, Bisson, 2001).
- *Συγκέντρωση προϊόντων μικροβιακού μεταβολισμού.* Η αιθανόλη που παράγεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης είναι τοξική για τα κύτταρα όπως αναφέρθηκε παραπάνω, γιατί εκτός του ότι δρα ως διαλύτης λιπιδίων των μεμβρανών, μετουσιώνει και τις ενζυμικές πρωτεΐνες τους αναστέλλοντας έτσι τη δράση τους, με αποτέλεσμα να μεταφέρονται συστατικά δια μέσου της μεμβράνης. Η ανθεκτικότητα στην αιθανόλη σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωσή της στο εσωτερικό του κυττάρου, επομένως όσο πιο εύκολα εξέρχεται από αυτό, τόσο αυξάνει η αντοχή του. Οι ζύμες εμφανίζουν ποικιλία ως προς την ανθεκτικότητά τους. Προϊόντα κυτταρικού μεταβολισμού των ζυμών είναι και τα λιπαρά οξέα, τα οποία όταν βρίσκονται πάνω από ορισμένη συγκέντρωση είναι τοξική για τα κύτταρα (Ribereau-Gayon, 1985, Bisson, 2001). Οι αιθυλεστέρες είναι και αυτοί προϊόντα κυτταρικού μεταβολισμού που έχουν τοξική δράση στα κύτταρα πάνω από ορισμένες συγκεντρώσεις. Τέλος, στα πλαίσια του μικροβιακού ανταγωνισμού, ορισμένοι ζυμομύκητες εκκρίνουν ουσίες τοξικές για άλλες ζύμες, οι οποίες ονομάζονται μυκοτοξίνες.

3. Τεχνικές της οινοποίησης. Η τεχνική της οινοποίησης παίζει καθοριστικό ρόλο στην αλκοολική ζύμωση. Η επιλογή της ποικιλίας των σταφυλιών από την οποία προέρχεται το γλεύκος και η ωριμότητα σταφυλιών είναι σημαντικές καθότι



αποτελούν την πρώτη ύλη οινοποίησης. Ο τρόπος σύνθλιψης των σταφυλιών παίζει επίσης σημαντικό ρόλο γιατί σχετίζεται με την εκχύλιση των στερολών που είναι παράγοντες επιβίωσης των κυττάρων (Ribereau-Gayon, 1985, Bisson, 2001). Η διαύγαση του γλεύκους μπορεί να αποτελέσει αιτία καθυστέρησης της ζύμωσης λόγω ελάττωσης του μικροβιακού φορτίου του γλεύκους. Η ελαφρά διαύγαση με καθίζηση των μεγάλων σωματιδίων του γλεύκους επιτρέπει την καλύτερη θρέψη των κυττάρων. Επίσης, η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η οινοποίηση, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, είναι καθοριστική για τη ζύμωση.

#### **1.5.1.2 Αλκοολική ζύμωση και κύκλος αύξησης των ζυμών**

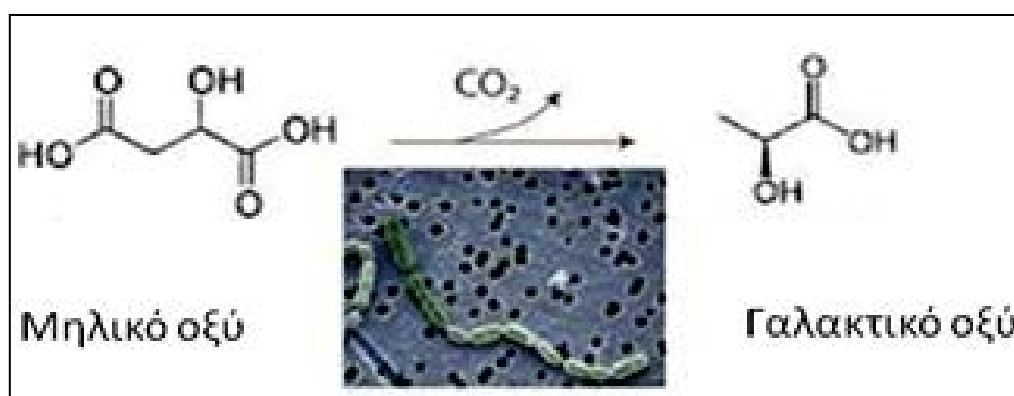
Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης διακρίνονται τέσσερις φάσεις του κύκλου ανάπτυξης των ζυμών:

1. Φάση Επώασης: Είναι η αρχική φάση όπου το μέγεθος του πληθυσμού των κυττάρων δεν αυξάνεται και διαρκεί περισσότερο από 1 – 2 ημέρες. Στο διάστημα αυτό τα κύτταρα προσαρμόζονται στο περιβάλλον του υποστρώματος (π.χ. γλεύκος).
2. Εκθετική Φάση: Μικρή σε διάρκεια φάση πολλαπλασιασμού η οποία διαρκεί 2 – 5 ημέρες, κατά την οποία ο τελικός πληθυσμός των κυττάρων είναι της τάξεως του  $10^7$  –  $10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>. Συχνά η αύξηση στη φάση αυτή αναφέρεται ως ισορροπημένη αύξηση, επειδή όλες οι βιολογικές πορείες που επηρεάζουν την παραγωγή της βιομάζας αυξάνονται με το ίδιο ρυθμό. Η εκθετική φάση δεν μπορεί να συνεχιστεί επ' αόριστον και είναι γεγονός ότι αυτό το ιδανικό στάδιο αύξησης μπορεί να είναι σχετικά μικρό.
3. Φάση Στασιμότητας: Είναι η φάση όπου ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων παραμένει μεταβολικά ενεργός και σταθερός για περίπου 8 ημέρες. Στη φάση αυτή ο πληθυσμός είναι μέγιστος και έχει τη δυνατότητα να συνεχίσει την αύξηση η οποία θα συνέβαινε αν νέες ευνοϊκές συνθήκες αύξησης μπορούσαν να δημιουργηθούν. Επιπλέον, στη φάση αυτή τα αποταμιευθέντα υλικά χρησιμοποιούνται για το σκοπό της διατήρησης της βιωσιμότητας, για όσο το δυνατόν περισσότερο χρόνο, αλλά βασικά η ικανότητα επιβίωσης κάτω από αυτές τις συνθήκες περιορίζεται σταδιακά και έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο των κυττάρων και τη λύση τους.
4. Φάση Θανάτου: Είναι η φάση όπου ο πληθυσμός των κυττάρων σταδιακά μειώνεται (ελάττωση βιωσιμότητας) μέχρι το επίπεδο των  $10^4$  –  $10^5$  κύτταρα · mL<sup>-1</sup>, περίπου.

Οι τέσσερις φάσεις αντιπροσωπεύουν έναν κλασικό μικροβιακό κλειστό κύκλο αύξησης, αλλά στη ζύμωση παρατηρούνται αρκετές διαφορές όπως είναι: α) η μεγάλη χρονική διάρκεια, β) η ολική ανάπτυξη ζυμών που είναι περιορισμένη και αντιστοιχεί σε 4 ή 5 γενεές κυττάρων και γ) ότι η ανάπτυξη δε σταματά εξαιτίας της κατανάλωσης των σακχάρων στο γλεύκος (Ribereau-Gayon, 1985, Bisson, 2001).

### 1.5.2 Η μηλογαλακτική ζύμωση

Η μηλογαλακτική ζύμωση (Εικ. 1.4), η οποία πραγματοποιείται κυρίως από οξυγαλακτικά βακτήρια, είναι η μετατροπή του ενός από τα δύο κύρια οξέα των σταφυλιών που βρίσκονται στον οίνο, το L-μηλικό οξύ, σε ένα άλλο οξύ, το L-γαλακτικό οξύ, μέσω της διαδικασίας της αποκαρβοξυλίωσης (Lonvaud-Funel, 1995). Αυτή η μετατροπή συνοδεύεται από παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και πραγματοποιείται μόνο όταν τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρίσκονται στη φάση στασιμότητας. Η παρουσία του συμπαραγόνα NAD<sup>+</sup> και του μαγγανίου κρίνεται απαραίτητη για την πραγμάτωση της συγκεκριμένης ζύμωσης. Το L-γαλακτικό οξύ έχει λιγότερο ξινή και πιο "απαλή" γεύση από το μηλικό οξύ, με αποτέλεσμα η μηλογαλακτική ζύμωση να συνεισφέρει στη μείωση της οξύτητας του οίνου. Επίσης, μπορεί να τροποποιήσει τη γεύση και το άρωμα του οίνου με θετικό ή αρνητικό τρόπο. Αυτό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος των γαλακτικών βακτηρίων που κυριαρχούν σε αυτήν.



Εικόνα 1.4 Τα στάδια και η χημική εξίσωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης

### 1.5.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στη μηλογαλακτική ζύμωση

Οι παράγοντες που επιδρούν στη μηλογαλακτική ζύμωση είναι οι ακόλουθοι (Bisson, 2001):

1. pH. Το pH του μέσου ανάπτυξης καθορίζει ποια είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων θα είναι παρόντα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης, ενώ σε πολύ χαμηλές τιμές (<3,1) αποτελεί ανασταλτικός παράγοντας ανάπτυξης. Επιπλέον, έχει επίδραση στον μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Ο καταβολισμός του μηλικού οξέος πραγματοποιείται σε τιμές pH γύρω στο 3,2, αλλά με 10 φορές μικρότερο ρυθμό από ότι όταν το pH του μέσου καλλιέργειας είναι 3,8.

2. Διοξείδιο του Θείου (SO<sub>2</sub>). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ευαίσθητα στο διοξείδιο του θείου, πολύ περισσότερο από ότι τα στελέχη της ζύμης *Saccharomyces*. Όλα τα στελέχη φαίνονται να είναι το ίδιο ευαίσθητα και δεν υπάρχουν ανθεκτικά στελέχη του *Oenococcus*.

3. Διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Η διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και για την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, όπως άλλωστε ισχύει και για τις ζύμες και την αλκοολική ζύμωση. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια όμως, έχουν περισσότερες απαιτήσεις σε ιχνοστοιχεία και αυξητικούς παράγοντες, εν σχέση με τις ζύμες. Για αυτόν τον λόγο η μηλογαλακτική ζύμωση επάγεται όταν οι ζύμες αυτολύονται. Σε αντίθεση με τις ζύμες, τα βακτήρια απαιτούν την παρουσία αρκετών αμινοξέων στο μέσο ανάπτυξης. Η εξωγενής προσθήκη μίγματος γαλακτικού οξέος και θρεπτικών στοιχείων κρίνεται σημαντική, αλλά αν πραγματοποιηθεί σε πρώιμα στάδια ζύμωσης μπορεί να ενεργοποιήσει την ανάπτυξη των ζυμών, οπότε και την αναστολή ανάπτυξης των βακτηρίων. Επιπλέον, είναι σημαντικός ο χρόνος στον οποίο γίνεται ο εμπλουτισμός του υποστρώματος καλλιέργειας σε θρεπτικά συστατικά, ώστε να ευνοείται η ανάπτυξη μόνο των επιθυμητών μικροοργανισμών.

4. Μοριακό οξυγόνο. Το μοριακό οξυγόνο ενεργοποιεί την ανάπτυξη ορισμένων οξυγαλακτικών βακτηρίων, δρώντας ως αυξητικός παράγοντας, όπως και στην περίπτωση των ζυμών. Με τον τρόπο αυτό επάγεται και η μηλογαλακτική ζύμωση από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Βέβαια, υπάρχουν κάποια άλλα είδη βακτηρίων των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από την παρουσία οξυγόνου. Σε γενικές γραμμές, μερική παροχή αερισμού, άρα και οξυγόνου, αποτελεί παράγοντα ενεργοποίησης της

μηλογαλακτικής ζύμωσης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Όμως, πλεονάζουσα ποσότητα οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή οξικού οξέος, ειδικά όταν στο ζυμωμένο γλεύκος υπάρχουν κυρίως ετεροζυμωτικοί μικροοργανισμοί. Αερισμός του γλεύκους δεν πρέπει να πραγματοποιείται πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης (δηλαδή στο αζύμωτο ακόμα γλεύκος), διότι μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση οξικού οξέος λόγω πρόωρης έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

5. Διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>). Το CO<sub>2</sub> αποτελεί παράγοντα ενεργοποίησης της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Επιπλέον, μπορεί να προσφέρει καλύτερη ανάμιξη και καλύτερη ρυθμιστική ικανότητα στο κρασί. Ο μηχανισμός όμως, δράσης του συγκεκριμένου αερίου παραμένει ακόμα άγνωστη.

6. Αλκοόλη. Όπως και οι ζύμες, έτσι και τα βακτήρια έχουν κάποιο ανώτερο όριο ανοχής αλκοόλης, πέραν του οποίου πεθαίνουν. Γενικά, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αναστέλλονται από συγκεντρώσεις αιθανόλης περισσότερο του 14%. Βέβαια, υπάρχουν είδη βακτηρίων με μεγαλύτερη ευαισθησία στην αλκοόλη. Σε γενικές γραμμές, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αιθανόλης στο υπόστρωμα ανάπτυξης, τόσο πιο αργή είναι η μηλογαλακτική ζύμωση.

7. Θερμοκρασία. Η θερμοκρασία κρίνεται πολύ σημαντική καθ' ότι μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση ή την αναστολή της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης βρίσκεται μεταξύ 20 – 37 °C. Η ανάπτυξη των βακτηρίων αναστέλλεται σε τιμές θερμοκρασίας κάτω από 15 °C. Σε γενικές γραμμές, όσο πιο υψηλή είναι η θερμοκρασία (εντός των επιτρεπτών ορίων ανάπτυξης), τόσο πιο γρήγορα αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί και τόσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός μεταβολισμού του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ.

8. Οργανικά οξέα. Η παρουσία οργανικών οξέων μπορεί να επηρεάσει τη μηλογαλακτική ζύμωση, όπως επίσης και άλλες μεταβολικές διαδικασίες των μικροοργανισμών. Το μηλικό οξύ επάγει την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων πριν την έναρξη μετατροπής του μηλικού σε γαλακτικό οξύ. Το φουμαρικό οξύ το οποίο παράγεται από τις ζύμες, αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης των βακτηρίων. Το κιτρικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ορισμένα λιπαρά οξέα μπορούν επίσης να αποτελέσουν παράγοντες αναστολής για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

9. Φαινολικές ενώσεις. Τα βακτήρια επηρεάζονται από την παρουσία των φαινολικών ενώσεων στο κρασί.

10. Παρουσία άλλων οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να επηρεαστεί από την παρουσία άλλων οξυγαλακτικών βακτηρίων, είτε με θετικό τρόπο, (π.χ. αν το βακτήριο *Oenococcus oeni* αυξήσει το pH σε επίπεδο επιτρεπτό για την ανάπτυξη και άλλων οξυγαλακτικών βακτηρίων), είτε με αρνητικό τρόπο (π.χ. παράγοντας βακτηριοσίνες ή καταναλώνοντας τα θρεπτικά στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξή τους).

11. Βακτηριοφάγοι. Οι βακτηριοφάγοι προσβάλλουν και προκαλούν τη λύση των βακτηρίων. Εξαπλώνονται από το ένα βακτήριο στο άλλο και έχουν τη δυνατότητα να περιορίσουν ολόκληρο πληθυσμό βακτηρίων.

## 1.6 Ζύμες και οινοποίηση

Οι ζυμομύκητες είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που κατατάσσονται στο βασίλειο των Μυκήτων. Ανήκουν στην πλειονότητά τους στο φύλο των Ασκομυκήτων και ένα μικρό ποσοστό των Βασιδιομυκήτων. Οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι οργανισμοί και συχνά σχηματίζουν ψευδομυκήλιο (Madigan *et al.*, 2003).

Όπως έχει αναφερθεί από τους Pretorius *et. al.* (1999) περίπου 15 γένη ζυμών είναι συνδεδεμένα με την οινοποίηση: *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* και *Zygosaccharomyces*.

Η μικροχλωρίδα των ζυμομυκήτων κατέχει κυρίαρχο ρόλο στον καθορισμό της γεύσης και του αρώματος των παραγόμενων οίνων. Ορισμένα είδη ζυμομυκήτων προσδίδουν επιθυμητές γεύσεις και αρώματα (φρούτων, λουλουδιών, μπαχαρικών, μελιού κλπ), ενώ άλλα ανεπιθύμητες. Συνήθως, είδη και στελέχη, τα οποία δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* (non-*Saccharomyces*) επικρατούν πληθυσμιακά στην επιφάνεια των ώριμων και υγιών σταφυλιών, και ως εκ τούτου και στα αρχικά στάδια μιας αυθόρμητης οινοποίησης (Fleet & Heard, 1993, Torija *et. al.*, 2001). Πολλές μελέτες έχουν δείξει τα είδη *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Schizosaccaromyces*, *Kluveromyces*,

*Hansenula*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* και *Debaryomyces* κυριαρχούν στο αρχικό στάδιο της αυθόρμητης ζύμωσης (Fleet, 2008).

Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι τα γένη *Hanseniaspora* και *Kloeckera* συνιστούν περίπου το 50 – 75% της συνολικής ζυμοχλωρίδας που υπάρχει στην επιφάνεια των υγιών σταφυλιών, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις συναντώνται όλα τα υπόλοιπα είδη (Fleet, 1993, Van der Westhuizen *et. al.*, 2000). Στο υπόστρωμα της ζύμωσης και όταν η αιθανόλη είναι περίπου 3 – 4% (w/v) επικρατούν στελέχη των γενών *Pichia* και *Metschnikowia* (Fleet & Heard, 1993) ενώ αντιθέτως, στα τελευταία στάδια της ζύμωσης επικρατούν κυρίως τα αλκοολοανθεκτικά στελέχη του είδους *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius, 2000). Βέβαια, δεν αποκλείεται η παρουσία στελεχών ζυμών non-*Saccharomyces* στα τελευταία στάδια της ζύμωσης, όπως είδη των *Brettanomyces* spp. και *Zygosaccharomyces* spp. τα οποία έχουν βρεθεί να είναι σχεδόν εξίσου ανθεκτικά στην αιθανόλη όπως ο *S. cerevisiae* (Silva *et al.*, 2004, Martorell *et al.*, 2007).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι πληθυσμοί του γένους *Saccharomyces* και πιο συγκεκριμένα του είδους *Saccharomyces cerevisiae* απαντώνται σε εξαιρετικά χαμηλούς πληθυσμούς στις ράγες των σταφυλιών και σπάνια έχει αναφερθεί κάποια απομόνωση στελέχους από αμπέλι ή το έδαφος του αμπελώνα (Martini, 1993). Το γεγονός αυτό διχάζει τους ερευνητές όσον αφορά την προέλευση των στελεχών του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Συγκεκριμένα, κάποιοι από αυτούς θεωρούν ότι τα στελέχη του είδους του *Saccharomyces cerevisiae* προέρχονται από τον αμπελώνα, και συγκεκριμένα εντοπίζονται σε μικρούς πληθυσμούς στην επιφάνεια των σταφυλιών (Török *et al.*, 1996), ενώ κάποιοι άλλοι υποστηρίζουν ότι προέρχονται από το περιβάλλον του οινοποιείου (Martini, 1993, Vaughan-Martini & Martini, 1995).

Μολονότι όμως, τα στελέχη ζυμών non-*Saccharomyces* δεν μπορούν να φέρουν σε πέρας την αλκοολική ζύμωση, εντούτοις παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του τελικού προϊόντος εξαιτίας της δράσης των ειδικών μεταβολικών ενζύμων που διαθέτουν (Torija *et. al.*, 2001). Έχει πολλές φορές αναφερθεί ότι τα non-*Saccharomyces* στελέχη ενισχύουν σημαντικά το άρωμα και τη γεύση του παραγόμενου οίνου (Mendes-Ferreira *et. al.*, 2001, Romano *et. al.*, 2008), διαμορφώνοντας τον ιδιαίτερο χαρακτήρα του και προσδίδοντάς του ένα πλουσιότερο «μπουκέτο» αρωμάτων (Pramateftaki *et. al.*, 2000).

Τα στελέχη ζυμών non-*Saccharomyces* που εντοπίζονται στο γλεύκος και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες:

α) ζύμες που είναι αερόβιες π.χ. *Pichia* spp., *Debaryomyces* sp., *Rhodototula* spp., *Candida* spp. και *Cryptococcus albidus* (Longo *et al.*, 1991, Torija *et al.*, 2001, Zahavi *et al.*, 2002,),

β) ζύμες με χαμηλή ικανότητα ζύμωσης π.χ. *Kloeckera apiculata*, *K. apis*, *K. javanica* (Longo *et al.*, 1991, De Cos *et al.*, 1999, Torija *et al.*, 2001) και

γ) ζύμες με ζυμωτικό μεταβολισμό π.χ. *Kluyveromyces marxianus*, *Tolurespora* spp. και *Zygosaccharomyces* spp. (Longo *et al.*, 1991, Zahavi *et al.*, 2002, Combina *et al.*, 2005).

## 1.7 Βακτήρια κατά την οινοποίηση

Τα στελέχη των βακτηρίων που συνήθως συναντώνται σε μικρό ποσοστό στην επιφάνεια των σταφυλιών ανήκουν στα γένη: *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Micrococcus*. Τα κυρίαρχα όμως, στελέχη είναι αυτά που ανήκουν στις εξής 2 ομάδες βακτηρίων: τα οξικά και τα γαλακτικά βακτήρια, τα οποία κρίνονται ως ιδιαίτερα σημαντικά στη μικροβιολογία του οίνου. Τέλος, μπορούν να απομονωθούν και άλλα είδη βακτηρίων (π.χ. *Streptomyces*) σε μικρότερες ποσότητες, τα οποία δεν εντοπίζονται στην επιφάνεια των σταφυλιών, αλλά στο χόμα των αμπελουργιών ή σε άλλα μέρη των φυτών (Bisson, 2001).

Σε ώριμα και υγιή σταφύλια, ο πληθυσμός των βακτηρίων στους χυμούς αυτών είναι μικρός ( $< 10^3 - 10^4$  cfu·mL<sup>-1</sup>). Με το δραστήριο ξεκίνημα της αλκοολικής ζύμωσης από τις ζύμες, συνήθως τα βακτήρια παρουσιάζουν μικρή ανάπτυξη και πέφτουν σχεδόν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (Fleet, 2008). Σε αντίθεση, χαλασμένα και σαπισμένα σταφύλια αποτελούν πρωτογενή πηγή βακτηρίων στο περιβάλλον οινοποίησης (Wibowo *et al.*, 1985, Drysdale & Fleet, 1988).

### 1.7.1 Οξικά βακτήρια (Acetic Acid Bacteria –AAB)

Τα οξικά βακτήρια ανήκουν στην οικογένεια των *Acetobacteraceae* και είναι υποχρεωτικά αερόβιοι βάκιλλοι, αρνητικοί κατά Gram και θετικοί στην καταλάση. Τα οξικά βακτήρια χωρίζονται σε έξι γένη: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Asaia* και *Kozakia* (Yamada *et al.* 1997, Ruiz *et al.* 2000, Lisdiyanti *et al.*, 2002, Dworkin *et al.*, 2006.). Από αυτά τα βακτήρια *Gluconobacter*

*oxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter liquefaciens* και *Gluconobacter hansennii* συνήθως απαντώνται στα σταφύλια και στο κρασί (Drysdale & Fleet, 1988). Άλλα είδη, περιλαμβάνοντας *Acidomonas methanolica*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter europeus*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Gluconacetobacter sacchari*, *Gluconobacter asaii*, *Gluconobacter frateurii*, *Acetobacter oboediens*, *Acetobacter pomorum* και *Acetobacter intermedius* δεν έχουν απομονωθεί από τους καρπούς σταφυλιών, ούτε από το κρασί (Frankle *et al.* 1999). Η κοινή ιδιότητα που χαρακτηρίζει όλα τα οξικά βακτήρια (με εξαίρεση το *Asaia*) είναι η αερόβια οξειδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ και συσσώρευση αυτού στο μέσο ανάπτυξης. Μετά την πλήρη οξειδωση της αιθανόλης, στελέχη των *Acetobacter*, *Acidomonas* και *Gluconacetobacter* οξειδώνουν το οξικό οξύ σε CO<sub>2</sub> και νερό. Φαινόμενο το οποίο δεν έχει παρατηρηθεί σε στελέχη του *Acetobacter*, και σε μικρότερο βαθμό στα στελέχη των *Asaia* και *Kozakia*.

Το κύριο είδος οξικών βακτηρίων που εντοπίζεται σε υγιή σταφύλια είναι το *Gluconobacter oxydans*, του οποίου ο πληθυσμός υπολογίζεται μεταξύ 10<sup>2</sup> – 10<sup>5</sup> cfu · mL<sup>-1</sup> (Du Toit & Lambrechts, 2002). Το ίδιο μέγεθος πληθυσμού υπολογίζεται να ισχύει και για το γλεύκος, καθώς αυτά τα είδη προτιμούν περιβάλλοντα με υψηλή συγκέντρωση σακχάρων. Παρότι θεωρείται ότι το *Gluconobacter oxydans* πεθαίνει γρήγορα κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων, λόγω της χαμηλής ανθεκτικότητας σε αιθανόλη, έχουν απομονωθεί στελέχη αυτού (10<sup>4</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>) από κρασί (Drysdale & Fleet, 1988). Κανονικά, ο πληθυσμός τους μειώνεται από 0 – 10<sup>2</sup> cfu · mL<sup>-1</sup> στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης (Du Toit & Lambrechts, 2002). Όμως, σε σάπιους καρπούς ή μολυσμένους από τον μύκητα *Botrytis* ο πληθυσμός των οξικών βακτηρίων αυξάνει μέχρι και 10<sup>6</sup> cfu · mL<sup>-1</sup> (Barbe *et al.*, 2001). Όταν αυτό συμβαίνει, τα είδη *Acetobacter* αρχίζουν να κυριαρχούν. Η σημαντική αύξησή τους μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή αιθανόλης από τις ζύμες που υπάρχουν στους χαλασμένους καρπούς, καθώς τα είδη του *Acetobacter* προτιμούν την αιθανόλη σαν πηγή άνθρακα (De Ley *et al.*, 1984). Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνεύσει και την επικράτησή τους στα τελευταία στάδια της ζύμωσης και στο κρασί (Du Toit & Lambrechts 2002).

Όταν τα κόκκινα σταφύλια συνθλιβούν, αφήνονται με τη φλούδα τους για κάποιες μέρες σε χαμηλές θερμοκρασίες ώστε να βγει περισσότερο χρώμα πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000β). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το μικροβιολογικό προφίλ του μούστου αλλάζει, παρά την προσθήκη



SO<sub>2</sub> (χρησιμοποιείται για να αποτραπεί η ανάπτυξη ανεπιθύμητων ζυμών και βακτηρίων).

Η ανάπτυξη των οξικών βακτηρίων στο κρασί επηρεάζεται από τους ακόλουθους παράγοντες:

α) Συγκέντρωση αιθανόλης. Τα οξικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ. Συνεπώς, η αιθανόλη αποτελεί καλή πηγή άνθρακα για αυτά. Σε υψηλές όμως, συγκεντρώσεις αιθανόλης η ανάπτυξή τους αναστέλλεται (Du Toit & Pretorius, 2002).

β) pH. Η βέλτιστη τιμή pH για την ανάπτυξη των οξικών βακτηρίων είναι 5,5 – 6,3 (Holt *et al.*, 1994). Βέβαια, μπορούν να επιβιώσουν και σε τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 3 – 4, όπως στο κρασί. Σύμφωνα με τον Vaughn (1955), τιμές pH μικρότερες του 3,3 αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο κρασί, αλλά όχι και για τα οξικά βακτήρια. Βέβαια, οι διάφορες τιμές του pH επηρεάζουν το βαθμό ευαισθησίας των οξικών βακτηρίων σε αιθανόλη. Οι Dupuy και Maugenet (1963) βρήκαν ότι το στέλεχος *A. pasteurianus* μπορούσε να αναπτυχθεί σε pH 3,4 και σε μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης 12,5%. Η ανάπτυξή του, όμως, περιοριζόταν σε pH 3,0 και 8,2% συγκέντρωση αιθανόλης. Επιπλέον, όταν το κρασί χαρακτηρίζεται από χαμηλές τιμές pH, ανιχνεύεται περισσότερο SO<sub>2</sub> σε ελεύθερη κατάσταση, η οποία αποτελεί και την ενεργή μορφή του για να δρα ως περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000α).

3. Παρουσία οξυγόνου. Τα οξικά βακτήρια είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί. Η παραμονή σε αναερόβιες συνθήκες και η χρήση SO<sub>2</sub> μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξή τους στο κρασί. Όμως, υπάρχουν στελέχη οξικών βακτηρίων τα οποία μπορούν να επιβιώσουν κάτω από αυτές τις ανεπιθύμητες συνθήκες (Drysdale & Fleet, 1985). Η έκθεση στον ατμοσφαιρικό αέρα, ακόμα και για πολύ μικρή χρονική περίοδο, ενισχύει αυτή την διαδικασία.

4. Θερμοκρασία. Σύμφωνα με τους Holt *et al.* (1994), η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για τα *Acetobacter* και *Gluconobacter* κυμαίνεται μεταξύ 25 – 30 °C, ενώ στους 37 °C, η ανάπτυξη του *Gluconobacter* αναστέλλεται. Βέβαια, έχουν απομονωθεί και θερμοανθεκτικά οξικά βακτήρια, ικανά να αναπτύσσονται στους 37 – 40 °C (Saeki *et al.*, 1997). Τα συγκεκριμένα βακτήρια μπορούσαν να οξειδώσουν την

αιθανόλη στους 38 – 40 °C με τον ίδιο ρυθμό που οξειδώνουν τα μεσόφιλα στελέχη στους 30 °C. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, τα οξικά βακτήρια μπορούν να είναι ενεργά. Οι Drysdale και Fleet (1989) παρατήρησαν ότι η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός των οξικών βακτηρίων ήταν το ίδιο τόσο στους 18 °C όσο και στους 25 °C. Σε χαμηλότερες όμως, θερμοκρασίες (10 – 15 °C), η αύξησή τους μειώνεται δραματικά (Joyeux *et al.*, 1984).

5. Συντηρητικά. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η χρήση του SO<sub>2</sub> αποτρέπει την ανάπτυξη των οξικών βακτηρίων στο κρασί (Amerine & Kunkee, 1968). Το διοξείδιο του θείου βρίσκεται σε 2 μορφές στο κρασί: την ελεύθερη (μοριακό SO<sub>2</sub>, δισουλφιδικό και ιόντα σουλφιδίου) και τη δεσμευμένη. Η μοριακή μορφή είναι η πιο ενεργή αντιμικροβιακή μορφή, αλλά σε φυσιολογικές τιμές pH, μόνο το 5% του ελεύθερου SO<sub>2</sub> ανευρίσκεται σε μοριακή μορφή (Ribéreau – Gayon *et al.*, 2000α). Τα οξικά βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν σε κρασί με 20 mg · L<sup>-1</sup> ελεύθερου SO<sub>2</sub> (Joyeux *et al.*, 1984). Συνεπώς, η ποσότητα του SO<sub>2</sub> που χρησιμοποιείται στο κρασί δεν είναι πάντοτε αποτελεσματική για να αναστείλει την ανάπτυξη των οξικών βακτηρίων, σε αντίθεση με τη θερμοκρασία και το pH που φαίνεται να έχουν πιο καθοριστική δράση σε αυτά.

### 1.7.2 Οξυγαλακτικά Βακτήρια (Lactic Acid Bacteria –LAB)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μια ομάδα θετικών κατά Gram βακτηρίων, τα οποία φέρουν τη χαρακτηριστική ιδιότητα να μεταβολίζουν εξόζες για την παραγωγή κυρίως του γαλακτικού οξέος. Μικροβιακές μελέτες έδειξαν ότι στο κρασί έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα 25 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων (König & Fröhlich, 2009, Mañes-Lázaro *et al.*, 2008α, 2008β, 2009). Πρόσφατα, οι Mesas *et al.*, (2011) ανέφεραν την παρουσία και νέων ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία απομονώθηκαν από ισπανικά κρασιά. Στην ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων που σχετίζονται με το κρασί περιλαμβάνονται τα εξής γένη βακτηρίων: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, και *Oenococcus*, ενώ πρόσφατα ταυτοποιήθηκε το είδος *Weissella paramesenteroides* (Dicks & Endo, 2009). Οι λακτοβάκιλλοι είναι προαιρετικά (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*) και υποχρεωτικά (*L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. fructivorans*) ετεροζυμωτικά είδη (Lonvaud – Funel, 1999). Οι ομοζυμωτικοί κόκκοι είναι κυρίως *Pediococcus damnosus* και *P. Pentosaceus* (Lonvaud – Funel, 1999). Οι ετεροζυμωτικοί κόκκοι των κρασιών ανήκουν στα γένη *Leuconostoc* (Garvie, 1981) και *Oenococcus* (Dicks *et al.*, 1995).

Ως ομοζυμωτικά βακτήρια χαρακτηρίζονται εκείνα που μεταβολίζουν τη γλυκόζη για να παράγουν περισσότερο από 85% γαλακτικό οξύ, ενώ ως ετεροζυμωτικά εκείνα που παράγουν γαλακτικό οξύ, CO<sub>2</sub>, αιθανόλη και/ ή οξικό οξύ σε ισομοριακές ποσότητες ζυμώνοντας τη γλυκόζη (Kandler & Weiss, 1986).

Τα γαλακτικά βακτήρια απαντώνται σε αρκετούς οίνους, παρά την παρουσία αιθανόλης, SO<sub>2</sub> και χαμηλού pH (3,2-3,8). Συγκεκριμένα, μόνο το βακτήριο *Oenococcus oeni* έχει απομονωθεί από κρασιά με pH μικρότερο του 3,5 (μέχρι 3,2) (Tourdot – Maréchal *et al.*, 2000), ενώ στελέχη των *Pediococcus* και *Lactobacillus* μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές pH μεγαλύτερες του 3,5 (Bisson, 2001). Είναι υπεύθυνα για τη μηλογαλακτική ζύμωση που λαμβάνει χώρα μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Η ικανότητά τους να μεταβολίζουν οργανικά οξέα όπως, μηλικό, κιτρικό και ταρταρικό οξύ μπορεί να επηρεάσει το τελικό προϊόν είτε με θετικό τρόπο είτε με αρνητικό τρόπο στις οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Σε κρασιά χαμηλής οξύτητα αυτή η διαδικασία είναι υψίστης σημασίας και καθοριστική, για αυτό και πρέπει να ελέγχεται, αφού προκαλεί μείωση της οξύτητας στο κρασί (Moreno – Arribas & Polo, 2005).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο γλεύκος και το κρασί είναι οι ακόλουθοι (Bauer & Dicks, 2004):

1. pH. Το pH του γλεύκους και του κρασιού αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες. Επηρεάζει την έναρξη και τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, τα είδη των βακτηρίων που θα αναπτυχθούν, καθώς και το μεταβολισμό των μικροοργανισμών αυτών. Σε τιμές pH μικρότερες του 3,5 η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιείται κυρίως από τα γένη *Oenococcus* και *Leuconostoc*, ενώ σε τιμές μεγαλύτερες του 3,5 είδη των *Pediococcus* και *Lactobacillus* φαίνεται να κυριαρχούν.

2. SO<sub>2</sub>. Σε χαμηλές τιμές pH (3 – 4), το SO<sub>2</sub> κυριαρχεί στην ελεύθερη μορφή του, η οποία αποτελείται από ανιόντα HSO<sub>3</sub><sup>-1</sup>, μικρή ποσότητα μοριακού SO<sub>2</sub> και ανιόντα SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>. Το μοριακό SO<sub>2</sub> είναι η μοναδική μορφή που μπορεί να διαπεράσει τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων και να επηρεάσει την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, οδηγώντας τα σε θάνατο. Η συνηθισμένη ποσότητα SO<sub>2</sub> που χρησιμοποιείται από τους οινοποιούς, είναι συνήθως 50 με 100 mg · L<sup>-1</sup>, ώστε να περιορίζει την ανάπτυξη μόνο των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών.

3. Αλκοόλη. Γενικά τα οξυγαλακτικά βακτηρία είναι ανθεκτικά στην αλκοόλη. Όμως, υπάρχει ένα εύρος ανοχής ανάμεσα στα διαφορετικά είδη βακτηρίων αυτής της

ομάδας. Η ανθεκτικότητα στην αλκοόλη εξαρτάται από τις τιμές του pH καθώς και από τη θερμοκρασία.

4. Παρουσία οξυγόνου και CO<sub>2</sub>. Μικρή ποσότητα οξυγόνου θεωρείται απαραίτητη για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ενώ η παρουσία CO<sub>2</sub> φαίνεται να ενεργοποιεί την ανάπτυξή τους.

5. Θρεπτικά στοιχεία. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας υδατάνθρακες και ανόργανα άλατα. Επιπλέον, χρειάζονται και άλλους αναπτυξιακούς παράγοντες όπως βιταμίνες και αμινοξέα.

## 1.8 Αυθόρμητη και Ελεγχόμενη ζύμωση

**Αυθόρμητη** χαρακτηρίζεται η ζύμωση του γλεύκους όταν προκαλείται από τη γηγενή μικροχλωρίδα που δρα ως φυσικό εμβόλιο χωρίς άλλη παρέμβαση, ενώ **Ελεγχόμενη** χαρακτηρίζεται η ζύμωση που προέρχεται από εμβολιασμό με κάποιο ή κάποια επιλεγμένα στελέχη (**εμβόλιο καλλιέργειας εκκίνησης**).

Αρχικά, όλοι οι οίνοι παρασκευάζονταν με τη συμμετοχή της γηγενούς μικροχλωρίδας στην αλκοολική ζύμωση. Ζύμες, μύκητες, οξικά και οξυγαλακτικά βακτήρια είναι οι μικροοργανισμοί που απαντώνται στα σταφύλια καθώς επίσης, και στις επιφάνειες των δεξαμενών οινοποίησης και είναι εκείνοι οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν σε αυτές τις αυθόρμητες ζυμώσεις οίνων. Με την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, οι αναερόβιες συνθήκες που δημιουργούνται στο μικροπεριβάλλον της οινοποίησης συμβάλλουν στην εκλεκτική πίεση. Έτσι, σε μικροοργανισμούς που δεν παρατηρείται να εμφανίζουν ζυμωτικό μεταβολισμό (όπως οι μύκητες και τα οξικά βακτήρια) αναστέλλεται η ανάπτυξή τους. Καθώς η ζύμωση εξελίσσεται παρατηρείται η κατανάλωση των θρεπτικών στοιχείων και η αύξηση της συγκέντρωσης της αλκοόλης, εμποδίζοντας την ανάπτυξη των μη ανθεκτικών σε αλκοόλη μικροοργανισμών (Henschke, 1997).

Η ζύμη *S. cerevisiae* κατέχει κεντρικό ρόλο στην επιτέλεση της αυθόρμητης ζύμωσης στο γλεύκος, παρά το γεγονός ότι στελέχη της ζύμης αυτής δεν είναι ευρέως και σε μεγάλους πληθυσμούς διαδεδομένα στα σταφύλια. Επικρατούν όμως, λόγω των ακραίων συνθηκών που αναπτύσσονται στο κρασί (υψηλή συγκέντρωση αλκοόλης), συνθήκες μη ευνοϊκές για άλλους μικροοργανισμούς.

Μια τομή στην οινοπαραγωγική διαδικασία έγινε όταν ο Hansen από τη Ζυθοποιία Carlsberg στη Δανία εισήγαγε την τεχνική της απομόνωσης καθαρών καλλιιεργειών

και το 1890 οι Muller-Thargau από το Geisenheim πρότειναν τη χρησιμοποίηση καθαρών καλλιεργειών ως εμβόλια εκκίνησης (Pretorius & Van der Westhuizen, 1991). Από τότε η χρήση εκκινητών καλλιεργειών (εμβόλια εμπλουτισμού) οδήγησε τη βελτίωση της παραγωγικότητας και της προβλεψιμότητας της ποιότητας των κρασιών. Με αυτόν τον τρόπο οι ζυμώσεις έγιναν “κατευθυνόμενες”. Το 1965, παρήχθησαν τα δύο πρώτα εμπορικά στελέχη ζύμης από ένα μεγάλο οινοποιείο της Καλιφόρνιας (Degre, 1993). Αυτά τα δύο στελέχη διαφημίστηκαν παγκοσμίως ως ζύμες για όλες τις χρήσεις με περιορισμένη επιτυχία. Η χρησιμοποίηση καλλιεργειών εκκίνησης δεν υιοθετήθηκε στην Ευρώπη μέχρι τη δεκαετία του 80’ λόγω της καθιερωμένης άποψης ότι τα γηγενή στελέχη ζυμών κάθε αμπελώνα είναι αυτά που δίνουν τα διαφορετικά χαρακτηριστικά του κάθε οίνου.

Βέβαια, οι αυθόρμητες οινοποιήσεις παρουσιάζουν πολλά μειονεκτήματα τα οποία συνίστανται κυρίως στα παρακάτω: α) στην έλλειψη ποιοτικής σταθερότητας των αποτελεσμάτων από χρονιά σε χρονιά, β) στην παρατεταμένη διάρκεια της οινοποίησης ή στην πρόωρη παύση της ζύμωσης και γ) στη συχνή εκτροπή της οινοποίησης προς παραγωγή οίνων με δυσάρεστες γεύσεις και οσμές λόγω της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Fleet, 2008).

Οι παραπάνω λόγοι, οδήγησαν τις σύγχρονες οινοποιητικές μονάδες όπου απαιτούνται ασφαλείς ζυμώσεις καθώς και σταθερότητα της ποιότητας του τελικού παραγόμενου προϊόντος, να χρησιμοποιούν επιλεγμένα στελέχη ζυμομυκήτων ως καλλιέργειες εκκίνησης (κατευθυνόμενες ζυμώσεις). Τα στελέχη αυτά ανήκουν στο είδος *S. cerevisiae* ή/και στα πολύ συγγενικά του *Saccharomyces bayanus* και *Saccharomyces pastorianus*. Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούνται από τις οινοποιητικές μονάδες σε μια συγκέντρωση της τάξης του  $10^7$  κύτταρα  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, με αποτέλεσμα να υπερισχύουν της τοπικής ζυμοχλωρίδας και να χάνεται ο παραδοσιακός χαρακτήρας του οίνου. Για αυτούς τους λόγους πολλοί ερευνητές έχουν προτείνει τη διαδοχική χρήση γηγενών στελεχών ως καλλιεργειών εκκίνησης με σκοπό την παραγωγή οίνων που θα έχουν διακριτούς τοπικούς χαρακτήρες, οι οποίοι θα αντανakλούν τη βιοποικιλότητα της περιοχής από την οποία προέρχονται (Zironi *et. al.*, 1993, Clemente-Jimenez *et. al.*, 2005).

Στη σύγχρονη οινοποιία, η ζύμωση καθοδηγείται ευρέως από εμβολιασμό ενός μόνο στελέχους της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, στο γλεύκος αμέσως μετά τη θραύση των σταφυλιών. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ο καλύτερος έλεγχος της οινοποίησης, το οποίο θα οδηγήσει σε προβλέψιμες συμπεριφορές-αποτελέσματα και

μειώνει το ρίσκο της φθοράς από άλλους μικροοργανισμούς. Υπάρχουν πολλά, πιθανά εκατοντάδες, διαφορετικά στελέχη ζυμών διαθέσιμα ως εκκινητές καλλιιεργειών, και η εκάστοτε επιλογή των οινοποιών μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του παραγόμενου οίνου (Lambrechts & Pretorius 2000, Swiegers *et al.* 2005).

Το μόνο αρνητικό των κατευθυνόμενων ζυμώνσεων είναι ότι τα εμπορικά στελέχη ζυμών, παρά το γεγονός ότι ο πληθυσμός τους είναι πλούσιος και ικανός για τη διεξαγωγή της ζύμωσης, οδηγούν στην παραγωγή κρασιών μέτριας ποιότητας και δεν ενισχύουν τα αρωματικά ίχνη που χαρακτηρίζουν πολλές ζύμες που απομονώθηκαν από συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές (δεδομένου ότι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού οφείλονται κατά κύριο λόγο στις ζύμες). Μελέτες για τη βελτίωση και την επιλογή οινολογικών στελεχών με στόχο να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν (Fleet, 2008).

### **1.8.1 Κριτήρια επιλογής ζυμών ως εκκινητές καλλιιεργειών**

Τα κριτήρια για την επιλογή και την ανάπτυξη ζυμών για την παραγωγή κρασιού έχουν εκτενώς συζητηθεί και εξελιχθεί τα 20 τελευταία χρόνια (Degre, 1993, Rainieri & Pretorius, 2000, Mannazzu *et al.*, 2002, Bisson, 2004, Schuller & Casal, 2005). Αυτά τα κριτήρια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 3 ομάδες:

1. Ιδιότητες που επηρεάζουν τη διαδικασία της ζύμωσης. Η γρήγορη, αποτελεσματική και ολοκληρωμένη ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους προς παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης (>8%) είναι βασική προϋπόθεση για τις ζύμες οίνου. Οι ζύμες πρέπει να είναι ανθεκτικές στο προστιθέμενο SO<sub>2</sub>, το οποίο χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό και αντιμικροβιακό, στις υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων γλεύκους (~ 200 g·L<sup>-1</sup>) και στις παραγόμενες υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Αυτές οι ιδιότητες πρέπει να εκφράζονται το ίδιο ικανοποιητικά τόσο σε χαμηλές θερμοκρασίες (π.χ. 15 °C) για τη ζύμωση λευκού οίνου, όσο και σε υψηλές θερμοκρασίες (25 °C) για τη ζύμωση κόκκινου οίνου (Bisson, 1999).

2. Ιδιότητες που καθορίζουν την ποιότητα και το χαρακτήρα του οίνου. Είναι σημαντικό οι ζύμες να παράγουν μια σειρά από αρωματικούς μεταβολίτες για τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού (bouquet), χωρίς όμως, την ταυτόχρονη και υπερβολική παραγωγή ανεπιθύμητων πτητικών ουσιών, όπως οξικό οξύ, υδρόθειο (οσμή σάπιου αυγού) και διοξείδιο του θείου. Επιπλέον, πρέπει να επιτρέπουν την

έκφραση των αρωμάτων του σταφυλιού και των λουλουδιών του κρασιού αλλά δεν πρέπει να επηρεάζουν το χρώμα του οίνου (Lambrechts & Pretorius, 2000, Bisson, 2004, Swiegers *et al.*, 2005).

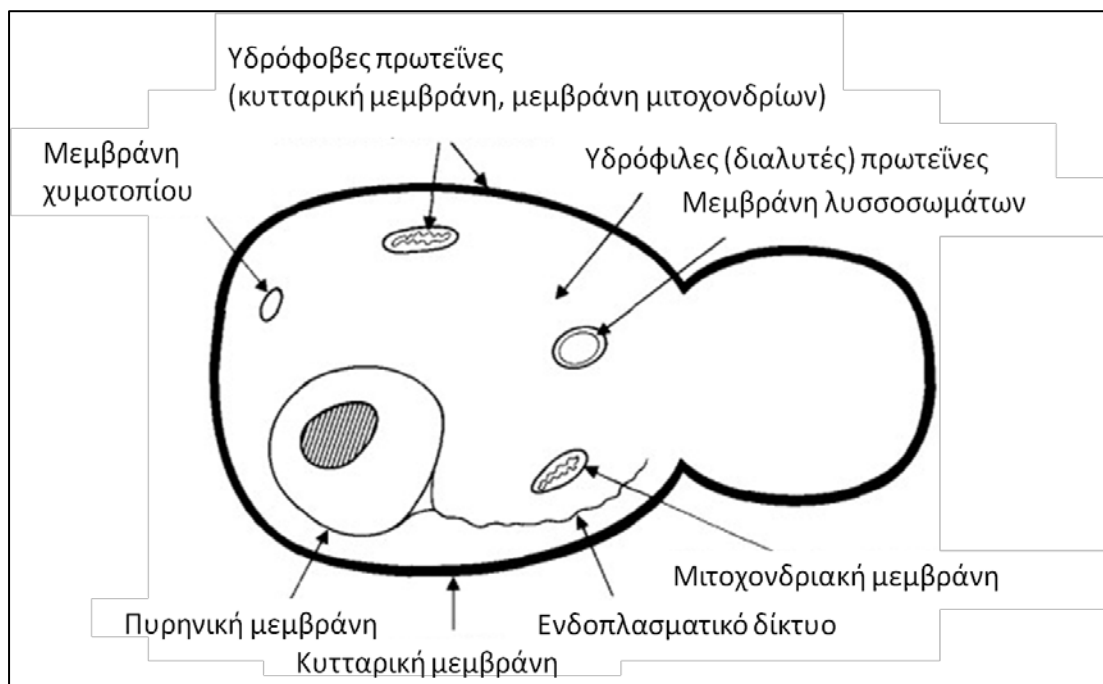
3. Ιδιότητες που σχετίζονται με την παραγωγή ζυμών οίνου σε βιομηχανική κλίμακα. Οι εταιρείες που παράγουν ζύμες για τη βιομηχανία κρασιού έχουν συγκεκριμένες απαιτήσεις για την επιλογή και την ανάπτυξη αυτών (Degre, 1993). Το κόστος παραγωγής πρέπει να είναι τέτοιο ώστε το τελικό προϊόν να αποδίδει θετικό οικονομικό αποτέλεσμα για τη βιομηχανία. Συνεπώς, οι ζύμες πρέπει να είναι δεκτικές σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας και να αναπτύσσονται το ίδιο ικανοποιητικά και αποτελεσματικά σε φθηνά υποστρώματα, όπως είναι η μελάσα. Επιπλέον, πρέπει να είναι ανθεκτικές στις διαδικασίες ξήρανσης, συσκευασίας, φύλαξης, επαναδιάλυσης και επανενεργοποίησής τους από τον οινοπαραγωγό (Soubeyrand *et al.*, 2006). Βεβαίως, όλες αυτές οι απαιτήσεις πρέπει να επιτυγχάνονται χωρίς όμως την απώλεια των σημαντικών και επιθυμητών ιδιοτήτων που φέρουν οι συγκεκριμένες ζύμες κρασιού.

#### **1.8.1.1 Ανθεκτικότητα στην αιθανόλη**

Η αιθανόλη αποτελεί το κύριο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Σε συγκεκριμένες, όμως, συγκεντρώσεις η αιθανόλη μπορεί να γίνει τοξική για τα κύτταρα της ζύμης, καθώς και για άλλους μικροοργανισμούς, καθώς αποτελεί έναν σημαντικό ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης έχει βρεθεί να επηρεάζουν τον ρυθμό αύξησης του πληθυσμού των ζυμών και των βακτηρίων, τη βιωσιμότητά τους, καθώς και τον ειδικό ρυθμό της ζυμωτικής διαδικασίας (Salgueiro *et al.*, 1988, Quintas *et al.*, 2000, Osho, 2005).

Οι πιθανοί στόχοι της αιθανόλης στα κύτταρα των ζυμών φαίνονται στην Εικόνα 1.5. Ένας από τους κύριους στόχους της αιθανόλης είναι η πλασματική μεμβράνη, όπως επίσης και η μεμβράνη διαφόρων υποκυτταρικών οργανιδίων. Συγκεκριμένα, η αιθανόλη προκαλεί αποδιοργάνωση της μεμβράνης (διαλύει τα λιπαρά οξέα) και αλλαγή στη διαπερατότητά της, αναστέλλοντας τη διαδικασία της μεσολαβούμενης μεταφοράς και ενεργοποιώντας την μεταφορά μορίων μέσω απλής διάχυσης. Η συγκεκριμένη αλλαγή στη διαπερατότητα της μεμβράνης μπορεί να είναι καταστροφική για τα κύτταρα καθώς προκαλεί είτε την έξοδο ενδοκυτταρικών ουσιών είτε την είσοδο τοξικών εξωκυτταρικών συστατικών τα οποία διαταράσσουν την σύσταση του κυτταροπλάσματος. Τα ιόντα  $H^+$  φυσιολογικά ανιχνεύονται σε

υψηλότερες συγκεντρώσεις στο εξωκυττάριο περιβάλλον και τα κύτταρα ζύμης χρησιμοποιώντας την αντλία ΑΤΡάσης- $H^+$  για να διατηρούν το ενδοκυτταρικό pH σε φυσιολογικά επίπεδα, κατάλληλο για τη λειτουργία των ενζύμων. Διαταράσσοντας την ομοιόσταση της κυτταρικής μεμβράνης ως προς τη συγκέντρωση των πρωτονίων, η αιθανόλη μπορεί να επάγει ενδοκυτταρική όξυνση και αποδόμηση του ΑΤΡ από την ΑΤΡάση (D'Amore *et al.*, 1990, Quintas *et al.*, 2000, Osho, 2005).



**Εικόνα 1.5** Πιθανές θέσεις-στόχοι της αιθανόλης σε κύτταρα ζυμών.

Μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν βρεθεί να εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη δράση της αιθανόλης, χαρακτηρίζονται από την παρουσία συγκεκριμένων χημικών μορίων στο κύτταρό τους, τα οποία τα προστατεύουν από τις υψηλές συγκεντρώσεις της. Για παράδειγμα, κύτταρα της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, ανθεκτικά στην παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης, φαίνεται να έχουν αυξημένο αριθμό ακόρεστων λιπαρών οξέων στα λιπίδια των μεμβρανών τους (Ekunsanmi & Odunfa, 1990). Οι πιο αντιπροσωπευτικές χημικές ενώσεις που απαντώνται συχνότερα είναι η τρεαλόζη, ινοσιτόλη, προλίνη και τρυπτοφάνη, καθώς και τα συστατικά της πλασματικής μεμβράνης: εργοστερόλη, παλμιτικό οξύ, στεαρικό οξύ, φωσφοτιδυλοϊνοσιτόλη, φωσφολιπιδικό παλμιτολεϊκό οξύ, παλμιτολεϊκό οξύ, τα οποία λειτουργούν ως προστατευτικά μόρια έναντι της δράσης της αιθανόλης (Mansure *et al.*, 1997, Inoue



*et al.*, 2000, Furukawa *et al.*, 2004, Osho, 2005, Takagi *et al.*, 2005, 2007, Lei *et al.*, 2007, Hirasawa *et al.*, 2007).

## 1.9 Καταβολισμός της Αργινίνης

Η αργινίνη αποτελεί ένα από τα κυριότερα αμινοξέα του χυμού των σταφυλιών και του κρασιού. Ορισμένα από τα βακτήρια του κρασιού μπορούν να την αποικοδομήσουν, ενώ κάποια άλλα όχι. Ο καταβολισμός της από βακτήρια του οίνου μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δύο κύριων μονοπατιών (Raymond *et al.*, 1986, Cotter & Hill, 2003): α) το μονοπάτι της Αργινάσης και β) το ADI μονοπάτι.

### α) Μονοπάτι καταβολισμού της αργινίνης μέσω του ενζύμου αργινάση

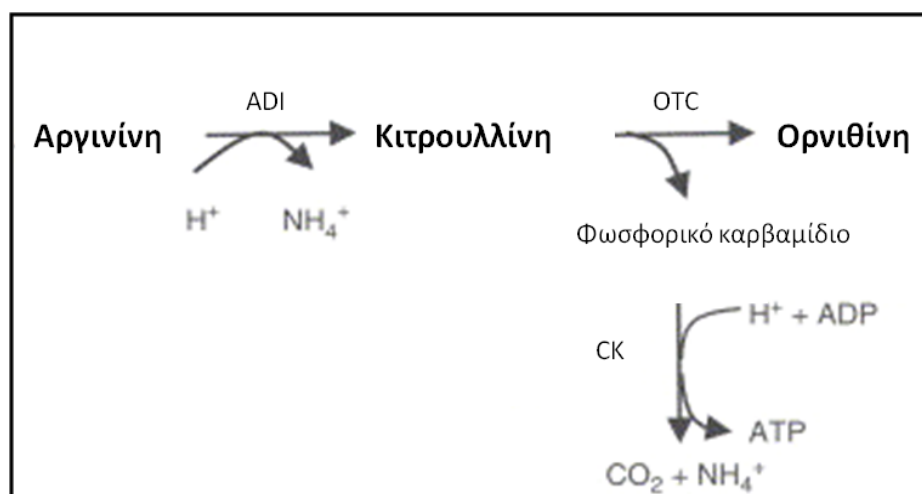
Η αργινίνη μέσω της δράσης του ενζύμου αργινάση υδρολύεται σε ορνιθίνη και ουρία. Η τύχη της ορνιθίνης και της ουρίας διαφέρει σε κάθε μικροοργανισμό. Κάποιοι χρησιμοποιούν την ορνιθίνη ως πηγή άνθρακα και κάποιοι άλλοι ως πηγή αζώτου. Η ουρία είτε αποικοδομείται περαιτέρω μέσω του ενζύμου ουρεάση για να χρησιμοποιηθεί ως πηγή αζώτου, είτε απλά απομακρύνεται από τον μικροοργανισμό.

### β) ADI Μονοπάτι (Arginine Deiminase)

Σε αυτό το μονοπάτι ο καταβολισμός της αργινίνης πραγματοποιείται μέσω δράσης των τριών ενζύμων: ADI (arginine deiminase), OTC (ornithine transcarbamylase) και CK (carbamate kinase), όπου και μεταβολίζεται σε ορνιθίνη, αμμωνία και CO<sub>2</sub> (Εικ. 1.6).

Τα προϊόντα μεταβολισμού της αργινίνης: ουρία, κιτρουλλίνη και φωσφορικό καρβαμίδιο περιέχουν στο μόριο τους μια καρβαμδική ομάδα, η οποία αντιδρώντας με την αιθανόλη σχηματίζουν το αιθυλικό καρβαμίδιο (ουρεθάνη). Το αιθυλικό καρβαμίδιο είναι μια καρκινογόνος ουσία η οποία ανιχνεύεται σε αρκετά προϊόντα ζύμωσης, όπως είναι η μύρα και το κρασί. Στη βιομηχανία κρασιού υπάρχει μεγάλη ανησυχία για το αν βακτήρια του κρασιού σχετίζονται με τον σχηματισμό του αιθυλικού καρβαμιδίου. Στελέχη βακτηρίων τα οποία παρουσιάζουν την ικανότητα αποικοδόμησης της αργινίνης, θεωρούνται ως πιθανοί παραγωγοί ουρεθάνης. Η γνώση, λοιπόν, ότι στελέχη βακτηρίων, ειδικά αυτών που ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια, μπορεί να έχουν (ή να μην έχουν) την ικανότητα να μεταβολίζουν την αργινίνη, αποτελεί σημαντικό κριτήριο επιλογής βακτηρίων ως εκκινητές

καλλιεργειών που εισάγουν την μηλονική ζύμωση κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (Raymond *et al.*, 1986, Liu & Piloni, 1998, Cotter & Hill, 2003).



**Εικόνα 1.6** Αποικοδόμηση της αργινίνης μέσω του ADI μονοπατιού, κατά το οποίο παράγονται ορνιθίνη, αμμωνία και CO<sub>2</sub>, με τη δράση των ενζύμων ADI (arginine deiminase), OTC (ornithine transcarbamylase) και CK (carbamate kinase).

## 1.10 Ενεργότητα Τανάσης

Η τανάση υδρολύει το χλωρογενικό οξύ σε καφεϊκό οξύ και κουινικό οξύ, το οποίο επηρεάζει ευνοϊκά τη γεύση του κρασιού (Lekha & Lonsane, 1997). Έχει χρησιμοποιηθεί σε γλεύκος για να απομακρύνει τα φαινολικά συστατικά βοηθώντας στη χημική σταθεροποίηση του. Επίσης, με τη δράση της τανάσης μειώνονται οι υδρολύμενες τανίνες, υδρολύοντας τους εστερικούς και τους πλευρικούς δεσμούς τους (Mondal & Pati, 2000). Οι τανίνες είναι φαινολικές ενώσεις με μοριακό βάρος να κυμαίνεται μεταξύ 500 – 3000 Daltons και μπορούν να απομονωθούν από μια μεγάλη ποικιλία φυτών. Συνήθως, εντοπίζονται στο φλοιό του σταφυλιού και περνάνε στο κρασί κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, της παραμονής δηλαδή του μούστου μαζί με τα στερεά στοιχεία του σταφυλιού, τη σάρκα και τον φλοιό. Όσο πιο μακρά είναι η εκχύλιση, τόσο περισσότερες θα είναι οι τανίνες του. Στο στόμα, η τανίνη μας δίνει τη γνώριμη αίσθηση της στυφάδας του ερυθρού κρασιού. Οι υδρολύμενες τανίνες, όπως το ταννικό οξύ, αποτελούνται από ένα κεντρικό μόριο υδρογονάνθρακα, συνήθως γλυκόζη, στο οποίο εστεροποιούνται μόρια γαλλικού οξέος ή ελλαγικού οξέος (Pandey *et al.*, 2006). Στις τανίνες οφείλεται το 50% του χρώματος του οίνου, αλλά όταν οξειδώνονται σε κινόνες προσδίδουν ανεπιθύμητη θολερότητα. Η χρήση της τανάσης έχει προταθεί ως η καλύτερη λύση στο πρόβλημα αυτό (Aguilar &

Gutiérrez-Sánchez, 2001). Η τανάση μπορεί να αποκτηθεί από φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς, αλλά η πιο σημαντική πηγή είναι οι μικροοργανισμοί επειδή το παραγόμενο ένζυμο είναι πιο σταθερό. Ένα από βακτηριακά είδη που είναι ικανό να παράγει τανάση έχει αναφερθεί ότι είναι το *Bacillus licheniformis* (Mondal & Pati, 2000).

## 1.11 Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μικροβιακή ανάλυση του γλεύκους, της αλκοολικής ζύμωσης (σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα) και του κρασιού, ποικιλίας Ασύρτικο, από την οινοπαραγωγική περιοχή Μεγαλοχώρι της Σαντορίνης. Τα απομονωθέντα στελέχη περιγράφηκαν φαινοτυπικά και χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε μοριακή ταυτοποίηση αυτών. Απώτερος στόχος της συγκεκριμένης ανάλυσης ήταν να πραγματοποιηθεί συγκριτική μελέτη της βιοποικιλότητας της γηγενούς μικροχλωρίδας των δειγμάτων, καθώς αυτά προέρχονται από γλεύκη διαφορετικής χρονιάς.

Η Σαντορίνη ξεχωρίζει ως μία από τις σημαντικότερες Ονομασίες Προέλευσης στην Ελλάδα, χάρη στην ποικιλία και την ποιότητα των κρασιών που παράγει. Το κρασί της Σαντορίνης επιδεικνύει εξαιρετικό ενδιαφέρον όταν συγκρίνεται με άλλες οινοπαραγωγικές περιοχές, καθ' όσον παρουσιάζει διαφορές τόσο στις περιβαλλοντικές συνθήκες, όσο και στις κλασσικές μεθόδους οινοποίησης. Οι αυτοφυείς ποικιλίες σταφυλιών (ανάμεσά τους και το Ασύρτικο) φαίνεται να είναι απόλυτα προσαρμοσμένες στο ξηροθερμικό περιβάλλον, καθώς και στο ηφαιστειογενές έδαφος της Σαντορίνης, ενώ παράλληλα η ιδιαίτερη τεχνική αμπελοκομικής «κουλούρα», οδηγούν στην παραγωγή κρασιών με μοναδικά χαρακτηριστικά. Με βάση τα ανωτέρω ήταν ενδιαφέρον να εξακριβωθεί εάν η μοναδικότητα των χαρακτηριστικών των οίνων της Σαντορίνης, με τις ακραίες κλιματικές και εδαφικές συνθήκες που επικρατούν, μπορεί να συσχετισθεί με το είδος του γηγενούς μικροβιακού πληθυσμού στα σταφύλια, σε σχέση με άλλες οινοπαραγωγικές περιοχές. Επιπλέον, κρίθηκε αναγκαία η ύπαρξη αντιπροσωπευτικής συλλογής γηγενών στελεχών ζυμών και βακτηρίων, τα οποία είναι καλά προσαρμοσμένα τόσο στις περιβαλλοντικές συνθήκες του Ελλαδικού χώρου, όσο και στις τεχνικές οινοποίησης που εφαρμόζονται στα Ελληνικά οινοποιεία, με σκοπό τη διατήρηση της βιοποικιλότητας και την προστασία των χαρακτηριστικών τους.

Η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας στην αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα, καθώς και η μελέτη της διαδοχής και επικράτησης των ζυμών και των βακτηρίων κατά τη ζύμωση αυτή, είχε σαν στόχο να προσφέρει πληροφορίες για την ικανότητα ελέγχου της οινοποίησης γλεύκους, άρα και την ποιότητα του τελικού προϊόντος, δηλαδή το κρασί.

Πραγματοποιώντας τις ανωτέρω μελέτες, απώτερος σκοπός ήταν η μελέτη ορισμένων οινολογικών χαρακτηριστικών των απομονωμένων στελεχών (ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης και παραγωγή υδρόθειου για τις ζύμες, ενεργότητα αργινάσης και τανάσης για τα βακτήρια), με την προοπτική απομόνωσης στελεχών με άριστους χαρακτήρες βιοτεχνολογικού και οινολογικού ενδιαφέροντος. Δεδομένου ότι τα στελέχη οινολογικού ενδιαφέροντος είναι προσαρμοσμένα σε γλεύκη Ελληνικών ποικιλιών, από τα οποία και προέρχονται, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ελεγχόμενες οινοποιήσεις, καθότι μέχρι τώρα μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ως εμβόλια Ελληνικά στελέχη.

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>**

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Δειγματοληψία

Η μελέτη της ενδογενούς μικροβιακής ποικιλότητας του γλεύκους και του κρασιού Βινσάντο (ποικιλία Ασύρτικο) της νήσου Σαντορίνης, περιελάμβανε τρεις δειγματοληψίες, όπως αναγράφονται στον Πίνακα 2.1. Τα δείγματα προήλθαν από την «Οινοποιεία Γαβαλά», η οποία εδρεύει στο Μεγαλοχώρι της Σαντορίνης. Στα υπό μελέτη δείγματα δεν υπήρξε εξωγενής προσθήκη στελεχών ζυμών, παρά μόνο η προσθήκη του χημικού συστατικού SO<sub>2</sub>. Μετά τη δειγματοληψία, τα δείγματα διατηρήθηκαν σε κάθε περίπτωση στους 4 °C για 24 h σε ψυγεία του οινοποιείου και κατόπιν μεταφέρθηκαν ακτοπλοϊκώς, υπό τις ίδιες συνθήκες, στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών, στο οποίο ακολούθησε αμέσως η επεξεργασία αυτών. Η διατήρηση των δειγμάτων ήταν απαραίτητη ώστε να αποφευχθεί η προσβολή τους από νηματοειδείς μύκητες, καθώς επίσης και η τυχόν αλλαγή του μικροβιακού φορτίου τους, έτσι ώστε ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός της μικροχλωρίδας ανά δείγμα να υπολογιστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια.

**Πίνακας 2.1** Ημερομηνίες δειγματοληψίας και τα δείγματα που συλλέχθηκαν

Δειγματοληψίες	Ημερομηνία	Δείγματα
1 <sup>η</sup> Δειγματοληψία	Ιανουάριο 2010	Κρασί (Σοδειάς 2009)
2 <sup>η</sup> Δειγματοληψία	Αύγουστο 2010	Γλεύκος (Σοδειάς 2010)
3 <sup>η</sup> Δειγματοληψία	Αύγουστο 2011	Γλεύκος (Σοδειάς 2011)

### 2.1.1 Τρόπος δειγματοληψίας

#### 1. Κρασί (Σοδειάς 2009)

Από τρία διαφορετικά βαρέλια συλλέχθηκαν τρία δείγματα κρασιού σε αποστειρωμένες φιάλες με βιδωτό πώμα, όγκου 1 L, οι οποίες εμβαπτίζονταν περίπου στο μεσαίο επίπεδο του ζυμωμένου γλεύκους. Για τη διευκόλυνση της δειγματοληψίας, γύρω από το στόμιο των φιαλών ήταν στερεωμένο συρμάτινο νήμα, του οποίου το ελεύθερο άκρο ήταν επίμηκες για να μπορεί να γίνεται η εμβάπτιση των φιαλών δειγμάτισης στο κατάλληλο επίπεδο του ζυμωμένου γλεύκους.

## 2. Γλεύκος (Σοδειάς 2010)

Αντίστοιχα, συλλέχθηκαν τρία δείγματα αζύμωτου γλεύκους από τρία βαρέλια σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία όγκου 120 mL, τα οποία εμβαπτίζονταν περίπου στο μεσαίο επίπεδο του βαρελιού.

## 3. Γλεύκος (Σοδειάς 2011)

Σε δύο αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία όγκου 3,5 L το καθένα, συλλέχθηκε αζύμωτο γλεύκος, για τη δημιουργία αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα, με σκοπό τον προσδιορισμό της διαδοχής και της επικράτησης των ζυμών και των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

### 2.1.2 Κωδικοποίηση δειγμάτων

Δείγματα κρασιού σοδειάς 2009: Κάθε δείγμα κωδικοποιήθηκε ως εξής και με την ακόλουθη σειρά:

- Κωδικός δειγματοληψίας (WY = wine yeast, WB = wine bacteria)
- Αριθμός απομόνωσης στελέχους (π.χ. 1 = πρώτο στέλεχος ζύμης/βακτηρίου)

Δείγματα γλεύκους σοδειάς 2010: Κάθε δείγμα κωδικοποιήθηκε ως εξής και με την ακόλουθη σειρά:

- Κωδικός δειγματοληψίας (MY = must yeast, MB = must bacteria)
- Αριθμός απομόνωσης στελέχους (π.χ. 1 = πρώτο στέλεχος ζύμης/βακτηρίου)

Δείγματα γλεύκους σοδειάς 2011: Κάθε δείγμα κωδικοποιήθηκε ως εξής και με την ακόλουθη σειρά:

- Κωδικός οινοποίησης (ASY = asyrtiko yeast, ASB = asyrtiko bacteria, δηλαδή αυθόρμητη οινοποίηση γλεύκους από σταφύλια ποικιλίας Ασύρτικο)
- Αριθμός απομόνωσης στελέχους (π.χ. 1 = πρώτο στέλεχος ζύμης/βακτηρίου)

## 2.2 Επεξεργασία δειγμάτων

Σε όλα τα δείγματα ακολουθήθηκαν οι παρακάτω διαδικασίες:

- Ποσοτικός προσδιορισμός ζυμών και βακτηρίων δείγματος
- Απομόνωση καθαρών στελεχών ζυμών και βακτηρίων

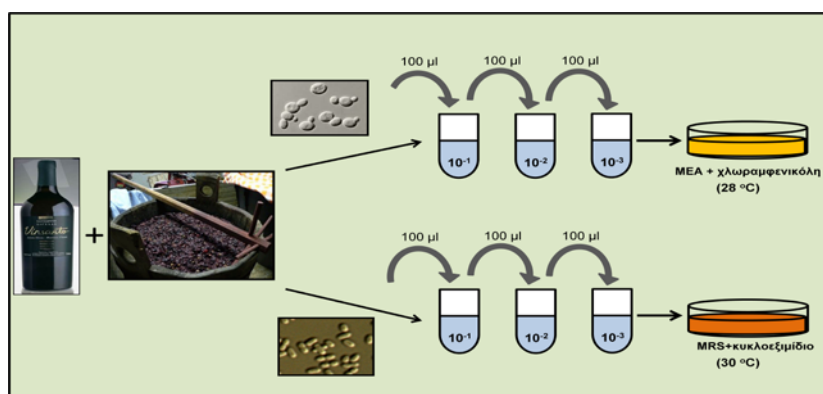
Στα δείγματα κρασιού πραγματοποιήθηκαν επιπλέον, χημικές αναλύσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν: α) προσδιορισμό αναγωγικών σακχάρων, β) προσδιορισμό της



ολικής οξύτητας και γ) προσδιορισμό των αλκοολικών βαθμών (§2.12). Οι ανωτέρω αναλύσεις επιτελέστηκαν στο εργαστήριο Οινολογίας του τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ υπό την επίβλεψη της αν. καθ. Λιούνη Μαρίας.

### 2.2.1. Ποσοτικός προσδιορισμός ζυμών και βακτηρίων δείγματος

Η απομόνωση των στελεχών των ζυμών έγινε σε επιλεγμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MEA (Malt Extract Agar) με χρήση του αντιβιοτικού χλωραμφενικόλη ( $0,1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), ως ανασταλτικού παράγοντα ανάπτυξης βακτηρίων. Αντίστοιχα, η απομόνωση των στελεχών των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MRS με τη χρήση του αντιβιοτικού κυκλοξαμίδιο ( $0,1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), για την αναστολή ανάπτυξης των ζυμών. Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε διάλυμα  $\frac{1}{4}$  Ringer από  $10^0$  έως  $10^7$  για την ανίχνευση των ζυμών και από  $10^0$  έως και  $10^3$  για την ανίχνευση των βακτηρίων. Στη συνέχεια, ποσότητα ίση με  $100 \mu\text{L}$  από κάθε αραιώση επιστρώθηκε στα αντίστοιχα επιλεγμένα θρεπτικά υποστρώματα. Η ανάλυση κάθε δείγματος, σε κάθε αραιώση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Τα εμβολιασμένα τρυβλία επωάστηκαν σε κλιβάνους των  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  (για τις ζύμες) και  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (για τα βακτήρια) για 48 h. Κατόπιν, ακολούθησε καταμέτρηση των αποικιών, εκφραζόμενη σε βιώσιμες μονάδες ανά mL δείγματος ( $\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$  – colony forming units $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ζυμών και των βακτηρίων των δειγμάτων, σε τρυβλία των οποίων ο αριθμός κυμαινόταν μεταξύ 30 και 300. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι κάθε μεμονωμένη αποικία προέρχεται από τη συνεχή αναπαραγωγή ενός και μόνο κυττάρου στελέχους της ζύμης ή του βακτηρίου.



**Εικόνα 2.1:** Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την απομόνωση βακτηρίων και ζυμών από τα δείγματα γλεύκους και κρασιού.

Οι υπολογισμοί έγιναν σύμφωνα με τον τύπο που περιέχεται στο ISO 8199 (2005):

---

όπου,

Cs: είναι ο υπολογιζόμενος αριθμός βιώσιμων μονάδων (cfu) στον όγκο αναφοράς Vs του δείγματος,

Z: είναι το σύνολο των αποικιών που καταμετρήθηκαν στο σύνολο των τρυβλίων ή των μεμβρανών στις διάφορες αραιώσεις,

Vs: είναι ο όγκος αναφοράς που επιλέγεται για να εκφράσει τη συγκέντρωση των μικροοργανισμών στο δείγμα (π.χ. cfu × 1 mL<sup>-1</sup> ή cfu × 100 mL<sup>-1</sup> δείγματος),

Vtot: είναι ο υπολογισμένος συνολικός όγκος του δείγματος, συμπεριλαμβανομένων των όγκων που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση ή το σύνολο των ξεχωριστών όγκων που χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες αραιώσεις, δηλαδή:

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i),$$

όπου:

n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, ..., n<sub>i</sub> είναι ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν αντίστοιχα για τις αραιώσεις d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>, ..., d<sub>i</sub>,

V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, ..., V<sub>i</sub> είναι ο όγκος που επιστρώθηκε στην αντίστοιχη αραιώση d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>, ..., d<sub>i</sub>,  
d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>, ..., d<sub>i</sub> είναι η αραιώση από την οποία επιστρώθηκαν οι αντίστοιχοι όγκοι V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, ..., V<sub>i</sub> (d = 1 για τη μηδενική αραιώση, d = 0,1 για την αραιώση 10<sup>-1</sup> κ.λ.π.).

### 2.2.2. Απομόνωση καθαρών στελεχών ζυμών και βακτηρίων

Με σκοπό την απομόνωση καθαρών στελεχών, αρχικά πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική παρατήρηση των αποικιών με στόχο την ομαδοποίηση των μικροβιακών αποικιών σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους και κατόπιν έγινε λήψη μεμονωμένων αποικιών ανά τρυβλίο. Ακολούθησε δημιουργία αξενικών καλλιεργειών σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα για κάθε απομονωμένο στέλεχος, με απώτερο σκοπό τη διατήρησή του σε γλυκερόλη στους -80 °C, καθώς και για την περαιτέρω μοριακή του ανάλυση. Τα απομονωθέντα στελέχη παρατηρήθηκαν και μικροσκοπικά με τη χρήση του φωτονικού μικροσκοπίου.

## 2.3 Θρεπτικά Υποστρώματα

**Θρεπτικό υπόστρωμα MRS**, (De Man *et al.*, 1960).

Χρησιμοποιήθηκε για ανάπτυξη, διατήρηση και μορφολογική μελέτη των βακτηρίων.  
Σύσταση ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): MRS (Applichem, Γερμανία) 55,0 , άγαρ 15,0.

Μετά την αποστείρωση προστέθηκε 1 mL αντιβιοτικού κυκλοεξαμίδιο  $0,1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

#### **Θρεπτικό υπόστρωμα NA (Nutrient agar)** (Scharlab, Ισπανία).

Χρησιμοποιήθηκε για ανάπτυξη βακτηρίων.

Σύσταση ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): πεπτόνη 5,0, εκχύλισμα κρέατος 1,0, εκχύλισμα ζύμης 2,0, NaCl 5,0, άγαρ 15,0. pH  $7,4 \pm 0,2$  στους  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα T-NA για βακτήρια** (tannic acid-nutrient agar) (Pepi *et al.*, 2009)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση παρουσίας ενεργότητας τανάσης σε βακτήρια.

Πάνω από το στερεοποιημένο θρεπτικό NA προστέθηκε αποστειρωμένο με ηθμό  $0,45 \mu\text{m}$  2% ταννικό οξύ, το οποίο και αφέθηκε για 20 min. Παρατηρήθηκε η δημιουργία ενός λευκού παχύρρευστου χρώματος στην επιφάνεια του τρυβλίου το οποίο μαρτυρά τη δημιουργία συμπλόκων του ταννικού οξέος με τις πρωτεΐνες του υποστρώματος. Κατόπιν, απομακρύνθηκε το μη δεσμευμένο ταννικό οξύ, ενώ ακολούθησε ξέπλυμα 2 φορές με διάλυμα  $\frac{1}{4}$  Ringer.

#### **Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-αργινίνης-αλάτων** (τροποποιημένο AGS)

Χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση ικανότητας των βακτηρίων να αποικοδομούν την αργινίνη.

Σύσταση ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): γλυκόζη 20,0, L-αργινίνη 1,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,0, NaCl 1,0,  $\text{MgSO}_4$  0,5, και 1 mL από τα διαλύματα αλάτων  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  1,0M,  $\text{CuSO}_4$  0,1M,  $\text{ZnSO}_4$  0,1M,  $\text{MnSO}_4$  0,1M. pH  $5,5 \pm 0,2$  στους  $30 \text{ }^\circ\text{C}$

#### **Θρεπτικό υπόστρωμα MEA-Malt Extract Agar** (Li *et al.*, 2010)

Χρησιμοποιήθηκε για ανάπτυξη, διατήρηση και μορφολογική μελέτη των ζυμομυκήτων.

Σύσταση ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): γλυκόζη 20,0, εκχύλισμα βύνης 20,0, πεπτόνη 1,0, άγαρ 15,0.

pH  $5,5 \pm 0,2$  στους  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Μετά την αποστείρωση προστέθηκε 1 mL αντιβιοτικού χλωραμφενικόλης  $0,1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

#### **Θρεπτικό υπόστρωμα MEB-Malt Extract Broth** (Li *et al.*, 2010)

Χρησιμοποιήθηκε για ανάπτυξη ζυμών. Σύσταση ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): γλυκόζη 20,0, εκχύλισμα βύνης 20,0, πεπτόνη 1,0. pH  $5,5 \pm 0,2$  στους  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **Αντιδραστήριο Οξειδάσης** (Oxidease Strips, Fluca Γερμανία)

### **Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα BIGGY Agar** (Fluca analytical, Γερμανία)

(Orlić *et al.*, 2005)

Χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη παραγωγής υδρόθειου από στελέχη ζυμών.

Σύσταση ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): πεπτόνη 10,0, εκχύλισμα κρέατος 5,0, γλυκόζη 5,0, όξινο φωσφορικό νάτριο 4,0, κιτρικό αμμώνιο βισμούθιου 1,81, θειικό σίδηρο 0,3, θειικό νάτριο 0,15, χρωστική brilliant green 0,025, άγαρ 15,0. pH  $7,6 \pm 0,2$  στους  $28\text{ }^\circ\text{C}$ .

### **Θρεπτικό υπόστρωμα YPG (yeast extract-peptone-glucose)** (Osho, 2005)

Χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη ανθεκτικότητας ζυμών σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Σύσταση ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): εκχύλισμα ζύμης 5,0, πεπτόνη 3,0, θειικό αμμώνιο 10,0, δισόξινο φωσφορικό κάλιο 1,0, θειικό αμμώνιο 0,5, χλωριούχο αμμώνιο 0,1 και γλυκόζη από 10% έως και 45% (w/v). pH  $5,5 \pm 0,2$  στους  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

## **2.4 Χημικά και Ρυθμιστικά Διαλύματα**

### **Διάλυμα Αλάτων Ringer (1/4)** (Wellington *et al.*, 1990)

Χρησιμοποιήθηκε για εναιώρηση των βακτηριακών κυττάρων κατά τις διαδοχικές αραιώσεις,

Σύσταση ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): NaCl 2,15 , KCl 0,15 , CaCl<sub>2</sub> 0,075 , K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5

### **Διάλυμα Γλυκερόλης 30% (w/v)** (Wellington & Williams, 1978)

Χρησιμοποιήθηκε για συντήρηση των μικροοργανισμών. Σύσταση: 30,0 g γλυκερόλη σε τελικό όγκο 100 mL αποστειρωμένο και απεσταγμένο H<sub>2</sub>O.

### **Διάλυμα χλωραμφενικόλης**

Σύσταση: 0,1 g χλωραμφενικόλη σε 1 mL αιθανόλη 99,0 %.

### **Διάλυμα κυκλοεξαμιδίου**

Σύσταση: 0,1 g κυκλοεξαμίδιο σε 1 mL αιθανόλη 99,0 %.

### **Διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% v/v.**

Σύσταση: 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Applichem, Γερμανία) σε 90 mL αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό.

### **Διάλυμα κρυσταλλικού ιωδίου (Crystal Violet)** (Conn, 1925)

Χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση κατά Gram.

Διάλυμα A: crystal violet 20,0 g, αιθανόλη 99% 200 mL

Διάλυμα Β: οξαλικό αμμώνιο 8,0 g, νερό 800 mL. Η πλήρης διάλυση του οξαλοξικού αμμωνίου μπορεί να επιτευχθεί με ελαφρά θέρμανση του διαλύματος και με παραμονή για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα διαλύματα παρέμειναν σταθερά για ένα χρόνο. Το διάλυμα εργασίας προέκυψε από ανάμιξη των δυο διαλυμάτων, ενώ στη συνέχεια το μίγμα διηθήθηκε.

#### **Διάλυμα αιθανόλης 99%**

##### **Διάλυμα Ιωδίου (Conn, 1925)**

Χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση κατά Gram.

Σύσταση: κρυσταλλικό ιώδιο 1,0 g, ιωδιούχο κάλιο (KI) 2,0 g, 3,0 g NaHCO<sub>3</sub> και νερό 300 mL.

##### **Διάλυμα Σαφρανίνης (Conn, 1925)**

Χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση κατά Gram.

Σύσταση: 100 mL κορεσμένου αλκοολικού διαλύματος σαφρανίνης (2,5 g χρωστικής σε 100 mL αιθανόλης) και 1000 mL νερό.

##### **Stock διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων–Lysis buffer (Hopwood *et al.*, 1985).**

Σύσταση: 25 mM Tris (MBG), 25 mM EDTA (MBG), 10,3% w/v σακχαρόζη (MBG-Applichem Γερμανία), αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό.

Σύσταση (g·L<sup>-1</sup>): Tris-Base 3,05 (ή 25 mL Tris-HCl 1M pH 8.0), EDTA 7,3 (ή 50 mL EDTA 0,5 M pH 8,0), σακχαρόζη 103,0. pH=8,0 στους 25 °C. Αποστείρωση 15 min.

Η λυσοζύμη προστέθηκε ακριβώς πριν τη χρήση σε συγκέντρωση 10 mg ·mL<sup>-1</sup>

##### **Διάλυμα SDS 10% w/v (MBG-Applichem Γερμανία)**

Χρησιμοποιήθηκε για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών κατά την απομόνωση του DNA.

Σύσταση: 49,075 g CH<sub>3</sub>COOK αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 mL. Αποστείρωση 15 min.

##### **Ισοπροπανόλη 99,7% (MBG-Applichem Γερμανία)**

Χρησιμοποιήθηκε για την κατακρήμνιση του DNA κατά την απομόνωσή του.

##### **Χλωροφόρμιο (MBG-Applichem Γερμανία).**

##### **Διάλυμα οξικού καλίου 5 M pH=5,4 (Sambrook & Russell, 2001)**

Σύσταση: CH<sub>3</sub>COOK 5M 60,0 mL, κρυσταλλικό οξικό οξύ 11,5 mL, αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό 28,5 mL. Αποστείρωση 15 min. Το διάλυμα που προέκυψε είχε συγκέντρωση 3 M όσον αφορά το κάλιο και 5 M όσον αφορά το οξικό.

#### **Διάλυμα αιθανόλης 70%**

Χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του DNA από τα άλατα κατά την απομόνωσή του. Σύσταση σε 100 mL: 72,84 mL αιθανόλη 96,1% νερό 27,16 mL.

#### **Διάλυμα λυσοζύμης**

Σύσταση: 10 mg λυσοζύμη (≈7000 Unit, Fluca Analyticals, Ελβετία) σε 1 mL αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. Η μέγιστη τιμή ενεργότητας του ενζύμου είναι στο pH 8.

#### **Διάλυμα Tris-HCl 1 M pH 8,0**

Σύσταση: 12,144 g Tris Base (MBG-Fischer Bioreagents H.Π.Α) αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 mL, πυκνό HCl για ρύθμιση pH=8.0 στους 25 °C. Αποστείρωση 15 min.

#### **Διάλυμα EDTA 0,5 M pH 8,0**

Σύσταση: 146,12 g EDTA (MBG-Applichem Γερμανία) ή 187,13 g EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 500 mL, NaOH ≈20 g για ρύθμιση pH=8,0 στους 25 °C. Αποστείρωση 15 min.

#### **Διάλυμα Tris-Acetate-EDTA (TAE) 1x pH 8,0 (Sambrook & Russell, 2001)**

Σύσταση: 40 mM Tris-acetate/1 mM EDTA

Το διάλυμα TAE 1x παρασκευάστηκε πριν τη χρήση με ανάλογη αραιώση του πυκνού διαλύματος TAE 50x.

#### **Διάλυμα Tris-Acetate-EDTA (TAE) 50x pH 8,0 (Sambrook & Russell, 2001)**

Σύσταση: 2 M Tris, 1 M κρυσταλλικό οξύ, 0,05 M EDTA. Περιείχε (ανά λίτρο): Tris 242,0 g, κρυσταλλικό οξικό οξύ 57,1 mL, EDTA 0,5 M 100,0 mL.

#### **Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich H.Π.Α.)**

Σύσταση: 10 mg·mL<sup>-1</sup> βρωμιούχο αιθίδιο και απεσταγμένο νερό. Το φιαλίδιο του διαλύματος καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και συντηρήθηκε στους 4 °C

**Νερό προς έγχυση** (water for injection) (Demo Ελλάδα)

**Διάλυμα μοριακού δείκτη 1 kb** (Fermentas, Γερμανία).

Χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων από τις PCR αντιδράσεις  
Σύσταση: 100 μL μοριακού δείκτη 1 kb, 100 μL χρωστική και 400 μL απεσταγμένο  
νερό.

**Διάλυμα μοριακού δείκτη 100 bp** (Fermentas, Γερμανία).

Χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων από τις PCR αντιδράσεις  
Σύσταση: 100 μL μοριακού δείκτη 100 bp, 100 μL χρωστική και 400 μL  
απεσταγμένο νερό.

**6x ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης σε πήκτωμα αγαρόζης** (Sambrook & Russell,  
2001).

Σύσταση: 0,25 % w/v bromophenol blue, 0,25 % w/v xylene cyanol FF, 30% w/v  
γλυκερόλη σε νερό. Χρησιμοποιούνται 2 μL χρωστικής 6x για κάθε 10 μL δείγματος  
για πήκτωμα αγαρόζης.

## 2.5 Βιοχημικές Δοκιμές

Τα απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη μελετήθηκαν ως προς τα βιοχημικά τους  
χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκαν οι δοκιμασίες για ενεργότητα  
καταλάσης, οξειδάσης και ταννάσης, δοκιμασία ικανότητας καταβολισμού αργινίνης,  
καθώς επίσης και η τεχνική χρώσης κατά Gram. Τα απομονωθέντα στελέχη  
ζυμομυκήτων μελετήθηκαν ως προς το ποσοστό παραγωγής υδρόθειου.

### 2.5.1. Χρώση κατά Gram

Η δοκιμασία της χρώσης κατά Gram εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στις  
Σημειώσεις Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας (Καραγκούνη, 2001).

### 2.5.2. Ενεργότητα καταλάσης

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του  
υδρογόνου με σύγχρονη απελευθέρωση οξυγόνου:  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{καταλάση}} 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ .

Η παρουσία της δράσης του ενζύμου αυτού εκτιμήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο  
που αναφέρεται στις Σημειώσεις Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας  
(Καραγκούνη, 2001).

### 2.5.3. Ενεργότητα οξειδάσης

Η οξειδάση καθορίζει εάν ένας μικροοργανισμός είναι σε θέση να οξειδώσει κάποιες αρωματικές αμίνες (π.χ. ρ-αμινοδιμεθυλαμίνη) οπότε και σχηματίζονται χρωματιστά προϊόντα. Η ανίχνευση της οξειδάσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικών ταινιών (Oxidase strips FLUKA) και την εμφάνιση χρωματιστών προϊόντων οξείδωσης σε αυτές. Η δοκιμασία εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στις Σημειώσεις Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας (Καραγκούνη, 2001).

#### **2.5.4. Ενεργότητα τανάσης**

Το ένζυμο τανάση ανήκει στην οικογένεια των υδρολασών και διασπά τους καρβοξυλικούς εστερικούς δεσμούς πολυφαινολικών ενώσεων, όπως είναι οι ταννίνες (π.χ. το ταννικό οξύ). Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για την εκτίμηση της δράσης του ενζύμου ήταν η εξής: με χρήση της μεθόδου των παράλληλων γραμμών επιστρώθηκε μια αποικία βακτηρίων από καλλιέργεια 48 h στο τρυβλίο T-NA (§2.2) και αφέθηκε για επώαση στους 28 °C για 48 h. Το ταννικό οξύ δημιούργησε σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες του υποστρώματος. Η διάσπαση αυτού του συμπλόκου οδήγησε στην ανάπτυξη μιας πράσινης-καφέ ζώνης γύρω από τις αποικίες, γεγονός το οποίο αποτέλεσε ένδειξη ότι ο μικροοργανισμός είναι θετικός στη δοκιμή της τανάσης (Osawa & Walshe, 1993, Pepi *et al.*, 2009).

#### **2.5.5. Ικανότητα καταβολισμού αργινίνης**

Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για την εκτίμηση της ικανότητας μεταβολισμού του αμιοξέος αργινίνη ήταν η εξής: με χρήση της μεθόδου των παράλληλων γραμμών επιστρώθηκε μια αποικία βακτηρίου από καλλιέργεια 48 h στο θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-αργινίνης-αλάτων (§2.2) και αφέθηκε για επώαση στους 28 °C για 48 h. Η ανάπτυξη αποικίας στο συγκεκριμένο υπόστρωμα αποτέλεσε ένδειξη ότι ο μικροοργανισμός είναι θετικός στη συγκεκριμένη δοκιμή (Liu *et al.*, 1996).

#### **2.5.6. Παραγωγή υδρόθειου**

Το υδρόθειο αποτελεί ένα άχρωμο αέριο το οποίο ακόμα και σε πολύ μικρές ποσότητες στο κρασί μπορεί να του αναδείξει πολύ άσχημη οσμή. Ορισμένα στελέχη ζυμομυκήτων εμφανίζουν την ιδιότητα να μπορούν να το παράγουν σε μεγάλες ποσότητες, γεγονός το οποίο αποτελεί καταστροφικό για τους οινοπαραγωγούς. Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για την εκτίμηση της δράσης του ενζύμου ήταν η εξής: με χρήση της μεθόδου των παράλληλων γραμμών επιστρώθηκε μια αποικία ζύμης από καλλιέργεια 48 h σε τρυβλίο με BIGGY Agar (§2.2) και αφέθηκε για



επώαση στους 28 °C για 48 h. Η ανάπτυξη αποικιών καφέ χρώματος πιστοποίησαν την παραγωγή υδρόθειου (Orlic *et al.*, 2005).

## **2.6 Απομόνωση Ολικού DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίων**

Η απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε από τους Haught και συνεργάτες (1994). Το ολικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα που συλλέχθηκαν από στερεή καλλιέργεια 48 h. Με αποστειρωμένο κρίκο εμβολιασμού μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου erpendorf που περιείχαν 500  $\mu$ L διαλύματος Ringer (1/4) και φυγοκεντρήθηκαν σε 13000 rpm για 10 min στους 4 °C.

Στο ίζημα έγινε προσθήκη 500  $\mu$ L διαλύματος λύσης και ακολούθησε επώαση για 2 h στους 37 °C. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 125  $\mu$ L διαλύματος SDS 10% (w/v) και το μίγμα επώαστηκε στους 35 °C για 20 min. Έπειτα, έγινε προσθήκη 216  $\mu$ L διαλύματος οξικού καλίου 5 M και άμεση μεταφορά των σωλήνων σε θερμοκρασία 0 °C, όπου και παρέμειναν για 30 min. Μετά το πέρας των 30 min τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min σε 13000 rpm (2 φορές). Ακολούθησε καταβύθιση του DNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 20 min σε 13000 rpm. Στο ίζημα έγινε διπλό ξέπλυμα με 500  $\mu$ L διαλύματος αιθανόλης 70% (v/v) και φυγοκέντρωση για 10 min σε 13000 rpm στους 4 °C. Το ίζημα ξηράνθηκε στους 60 °C για 30-45 min και αναδιαλύθηκε σε 100  $\mu$ L απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Το DNA που απομονώθηκε διατηρήθηκε στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στις μοριακές μελέτες.

## **2.7 Απομόνωση Ολικού DNA από καθαρή καλλιέργεια ζυμών**

Η απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια ζυμομύκητα πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε από τους Horwood και συνεργάτες (1987). Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα που συλλέχθηκαν από στερεή καλλιέργεια 48 h. Με αποστειρωμένο κρίκο εμβολιασμού μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου erpendorf των 2 mL, που περιείχαν 500  $\mu$ L διαλύματος Ringer (1/4) και φυγοκεντρήθηκαν σε 13000 rpm για 10 min στους 4 °C.

Στο ίζημα έγινε προσθήκη 500  $\mu$ L TE και 500  $\mu$ L SDS 10%. Ακολούθησε ανάδευση για επαναδιάλυση του ιζήματος και επώαση του μίγματος στους 65 °C για 10 min.

Έπειτα, έγινε προσθήκη 216  $\mu\text{L}$  διαλύματος οξικού καλίου 5 M και μεταφορά των σωλήνων στον πάγο για 30 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min σε 13000 rpm και μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες (2 φορές). Στη συνέχεια, με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης πραγματοποιήθηκε η καταβύθιση του DNA. Τα δείγματα παρέμειναν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν για 20 min σε 13000 rpm. Ακολούθησε καθαρισμός του DNA με 500  $\mu\text{L}$  διαλύματος αιθανόλης 70% (v/v) στους 4 °C και φυγοκέντρηση σε 13000 rpm για 10 min (2 φορές). Το ίζημα ξηράνθηκε στους 60 °C για 30-45 min και αναδιαλύθηκε σε 100  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό. Το DNA διατηρήθηκε στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στις μετέπειτα μοριακές μελέτες.

## 2.8 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

### 2.8.1 Μέθοδος BOX-PCR

Ένας μεγάλος αριθμός μικρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών εντοπίζεται σε πολλαπλές θέσεις στο γονιδίωμα πολλών βακτηρίων. Παραδείγματα τέτοιων αλληλουχιών αποτελούν οι παλίνδρομες μονάδες PU (Palindromic Units) ή οι επαναλαμβανόμενες παλίνδρομες αλληλουχίες REP (Repetitive Extragenic Palindromes) και οι ενδογονιδιακές επαναλαμβανόμενες μονάδες IRU (Intergenic Repeat Units) ή οι ενδογονιδιακές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των εντεροβακτηρίων ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). Το 1992, οι Martin B. *et al.* ανακάλυψαν και κάποιες άλλες διάσπαρτες επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες, τα BOX στοιχεία. Τα στοιχεία BOX χαρακτηρίζονται από συμμετρία, προσδίδοντάς τους τη δυνατότητα να σχηματίζουν σταθερές δομές θηλιάς και εντοπίζονται σε διαγονιδιακές περιοχές. Τα στοιχεία αυτά είναι μωσαϊκές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που προκύπτουν από διαφορετικούς συνδυασμούς και αναλογίες των τριών υπομονάδων: boxA, boxB και boxC.

Η λειτουργία των περισσότερων επαναλαμβανόμενων περιοχών είναι άγνωστη. Αποτελούν, όμως, σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τις παραπάνω αλληλουχίες για μια PCR αντίδραση και έχοντας ως μήτρα ολόκληρο το γονιδίωμα ενός στελέχους, θα προκύψουν πολλαπλά προϊόντα διαφορετικού μεγέθους τα οποία όταν διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης, σχηματίζουν ένα πρότυπο με μορφή ραβδωτού κώδικα, το οποίο είναι μοναδικό για κάθε στέλεχος (Rademaker *et al.*, 2008).

Στην παρούσα μελέτη, τα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη διαχωρίστηκαν σε ομάδες με τη μέθοδο της BOX-PCR με τη χρήση του εκκινητή BOXA1R, ο οποίος προσδένεται στην boxA υπομονάδα (Versalovic *et al.*, 1995).

Η αλληλουχία του BOXA1R ήταν: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3', με ποσοστό GC 68,2% και T<sub>m</sub>= 65,6 °C.

Η σύσταση του μίγματος της PCR που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 25 μL ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 22,5 pmoles BOXA1R, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 5 % (v/v) DMSO (μπορεί να παραληφθεί ανάλογα με την Taq πολυμεράση), 1 – 1,25 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England - Hytest Finland, αντίστοιχα), 1,75 – 2 μL (≈40 ng) DNA και water for injection μέχρι τελικό όγκο 25 μL.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης ήταν το ακόλουθο: αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA στους 95 °C για 7 min, ακολούθησαν 35 κύκλοι που περιελάμβαναν 1 min στους 94 °C (αποδιάταξη), 1 min στους 53 °C (πρόσδεση εκκινητών στο DNA) και 8 min στους 65 °C (σχηματισμός νέων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων). Η αντίδραση τερματίστηκε με ένα στάδιο 16 min στους 65 °C.

Τα προϊόντα της BOX-PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% (w/v) με 15 μL EtBr (0,5 μg·mL<sup>-1</sup>) και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνθήκες 50 mA - 50 V για 4 h. Ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφιση σε υπεριώδη ακτινοβολία με το σύστημα Doc Print II της Vilbert Lounmart.

### 2.8.2 Ενίσχυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου στα βακτήρια

Σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των απομονωμένων στελεχών των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, ενισχύθηκε το τμήμα 8-1510 (αρίθμηση κατά *E. coli*) (Lane, 1991) του 16S rDNA με τη βοήθεια των εκκινητών pA (Edwards *et al.*, 1989) και R1492 (Heuer *et al.*, 1997). Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων είναι οι ακόλουθες:

**pA** 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, ποσοστό GC 50%, T<sub>m</sub> = 51,8 °C και

**R1492** 5'-TACGGYTACCTTGTACGACT-3', με GC 43,2% και T<sub>m</sub>= 51,1-53 °C.

Η σύσταση του μίγματος της PCR για αντίδραση όγκου 50 μL ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmoles pA, 20 pmoles R1492, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 4% (v/v) DMSO (μπορεί να παραληφθεί), 1,25 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England), 2,5 μL (≈50 ng) DNA και water for injection μέχρι τελικό όγκο 50 μL.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιελάμβανε τα εξής στάδια: στους 95 °C για 3 min, ακολούθησαν 35 κύκλοι, που περιελάμβαναν 30 sec στους 94 °C (αποδιάταξη), 1 min στους 56 °C (πρόσδεση εκκινητών στο DNA) και 1 min στους 72 °C (σχηματισμός νέων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων). Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 5 min. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι 1484 βάσεις.

Τα προϊόντα της 16S PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% (w/v) με 8 μL EtBr (0,5 μg·mL<sup>-1</sup>) και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνθήκες 65 mA - 65 V για 1 h. Σημειώνεται ότι ηλεκτροφορήθηκε όλο το προϊόν της PCR (50 μL). Ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφιση σε υπεριώδη ακτινοβολία με το σύστημα Doc Print II της Vilbert Lounmart.

### 2.8.3 Μέθοδος ITS (Internal Transcribed Spacer) - PCR

Ο σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν διττός: α) ο διαχωρισμός των απομονωμένων στελεχών ζυμών σε ομάδες και β) η ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο είδους.

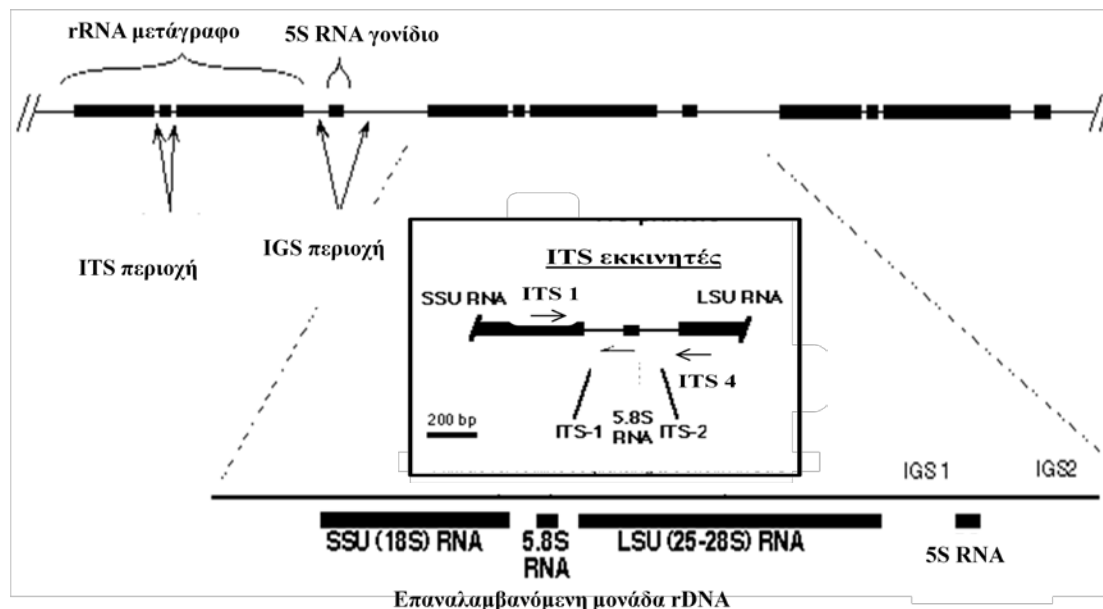
Η ITS (Internal Transcribed Spacer) περιοχή αποτελεί τμήμα του μη-λειτουργικού RNA και εντοπίζεται μεταξύ των δομικών ριβοσωμικών υπομονάδων του rRNA. Η ITS περιοχή είναι ένα από τα πιο χρήσιμα εργαλεία συστηματικής κατάταξης των μυκήτων σε επίπεδο είδους, λόγω του ότι: α) είναι πολύ εύκολη η ενίσχυσή της ακόμα και παρουσία μικρής ποσότητας DNA, δεδομένου ότι υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα των rRNA γονιδίων και β) παρουσιάζει υψηλό βαθμό ποικιλομορφίας ακόμα και μεταξύ συγγενικών ειδών, σε σχέση με άλλες περιοχές του rDNA (SSU-Small Subunit rRNA και LSU-Large Subunit rRNA), αφού τμήματα μη λειτουργικών αλληλουχιών δέχονται σχετικά μικρή εξελικτική πίεση. (Schoch *et al.*, 2012).

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της αλληλουχίας της ριβοσωμικής περιοχής ITS1-5,8S-ITS2 με τη βοήθεια των εκκινητών: ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACTGCGG-3' και ITS4 3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990, Li *et al.*, 2010).

Η σύσταση του μίγματος της PCR για αντίδραση όγκου 50 μL ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmoles ITS4, 20 pmoles ITS1, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 4 % (v/v) DMSO (μπορεί να παραληφθεί), 1,25 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England), 2,5 μL (≈50 ng) DNA και water for injection μέχρι τελικό όγκο 50 μL.

Η σύσταση του μίγματος της PCR για αντίδραση όγκου 25 μL ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmoles ITS4, 20 pmoles ITS1, 0,25 mM dNTPs

(το καθένα), 4 % (v/v) DMSO (μπορεί να παραληφθεί), 1-1,25 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England), 1,75 - 2  $\mu\text{L}$  ( $\approx 40$  ng) DNA template και water for injection μέχρι τελικό όγκο 50  $\mu\text{L}$ .



**Εικόνα 2.2** Απεικόνιση ολόκληρης της ριβοσωμικής περιοχής των μυκήτων και των περιοχών που ενισχύουν οι εκκινητές ITS1 και ITS4

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιελάμβανε τα εξής στάδια: στους 94 °C για 5 min, ακολούθησαν 35 κύκλοι, που περιελάμβαναν 1 min στους 94 °C (αποδιάταξη), 30 sec στους 53 °C (πρόσδεση εκκινητών στο DNA) και 1 min στους 72 °C (σχηματισμός νέων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων). Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 5 min.

Τα προϊόντα της ITS PCR, όγκου 25  $\mu\text{L}$ , αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% (w/v) με 15  $\mu\text{L}$  EtBr ( $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνθήκες 80 mA - 80 V για 1 h. Τα προϊόντα της ITS PCR, όγκου 50  $\mu\text{L}$ , που προορίζονταν για μοριακή ταυτοποίηση αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% (w/v) με 8  $\mu\text{L}$  EtBr ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνθήκες 65 mA - 65 V για 1 h. Σημειώνεται ότι ηλεκτροφορήθηκε όλο το προϊόν της PCR (50  $\mu\text{L}$ ). Ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφιση σε υπεριώδη ακτινοβολία με το σύστημα Doc Print II της Vilbert Lounmart.

## 2.9 Μοριακή ταυτοποίηση των Ζυμών και Βακτηρίων

Η μοριακή ταυτοποίηση των επιλεγμένων στελεχών ζυμών πραγματοποιήθηκε με ενίσχυση της αλληλουχίας της ριβοσωμικής περιοχής ITS1-5,8S-ITS2, ενώ για τα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη έγινε με ενίσχυση του 16S rDNA, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.8. Στη συνέχεια, οι ζώνες που εμφανίστηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης κόπηκαν με νυστέρι και τοποθετήθηκαν σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου erpedorf των 2 mL. Η εκχύλιση του ενισχυμένου τμήματος DNA από το πήκτωμα αγαρόζης έγινε με χρήση του Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitek, Αυστρία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε ανάλυση της αλληλουχίας των ενισχυμένων περιοχών στην VBC-Biotech (Αυστρία) και σύγκριση αυτών με όλες τις αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στις τράπεζες δεδομένων με χρήση του προγράμματος BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## 2.10 Κλειστές Καλλιέργειες των Ζυμών

Σε κλειστά συστήματα καλλιεργείων ελέγχθηκαν τουλάχιστον τρεις αντιπρόσωποι (στελέχη) από κάθε χαρακτηρισμένο γένος ζύμης για ανθεκτικότητα σε αιθανόλη 6 – 12% (v/v) σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEA και σε γλυκόζη 10 – 45% (w/v) σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG.

**Προετοιμασία εμβολίου – Εμβολιασμός:** Μεμονωμένες αποικίες των στελεχών, οι οποίες επώστηκαν στους 28 °C για 48 h σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MEA, μεταφέρθηκαν σε κωνικές των 100 mL με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG ή MEB (κατά περίπτωση) και 2% γλυκόζη (w/v). Ακολούθησε επώση για 24 h στους 28 °C. Κατόπιν, περίπου 1 mL από αυτήν την καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε κωνικές των 250 mL που περιείχαν 100 mL YPG ή σε ειδικά φιαλίδια με 50 mL MEB. Για να εξασφαλιστεί ότι όλες οι καλλιέργειες είχαν το ίδιο εμβόλιο, πριν την έναρξη του εκάστοτε πειράματος πραγματοποιήθηκε μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 600 nm.

### 2.10.1 Καλλιέργειες ζυμών παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης

Επιλεγμένα στελέχη ζυμών από κάθε ταυτοποιημένο γένος αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEA (§2.2) για τη μελέτη ανθεκτικότητας σε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις από 8% έως και 12% (v/v). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ειδικά φιαλίδια όγκου 100 mL, τα οποία σφραγίζονται αεροστεγώς εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης και στα οποία έγινε προσθήκη 50 mL θρεπτικού υποστρώματος. Οι καλλιέργειες επώστηκαν σε αναδεδυμένο

κλίβανο σε 150 rpm και σε θερμοκρασία 28 °C. Από κάθε φιαλίδιο λαμβανόταν δείγμα όγκου 0,5 mL ανά 3 h για 72 h με χρήση αποστειρωμένης σύριγγας των 2 mL. Ακολούθησε εκτίμηση της βιομάζας μέσω μέτρησης της οπτικής απορρόφησης του λαμβανόμενου δείγματος στα 600 nm και υπολογισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης.

### **2.10.2 Καλλιέργειες ζυμών παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης**

Επιλεγμένα στελέχη από κάθε ταυτοποιημένο γένος αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG (§2,2), για τη μελέτη ανθεκτικότητας σε γλυκόζη στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 100 g·L<sup>-1</sup>, 200 g·L<sup>-1</sup>, 250 g·L<sup>-1</sup>, 300 g·L<sup>-1</sup>, 350 g·L<sup>-1</sup>, 400 g·L<sup>-1</sup> και 450 g·L<sup>-1</sup>. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες όγκου 250 mL, στις οποίες προστέθηκαν 100 mL θρεπτικού υποστρώματος. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε αναδεδυμένο κλίβανο σε 150 rpm, σε θερμοκρασία 28 °C και υπό αερόβιες συνθήκες. Από κάθε κωνική λαμβάνονταν 0,5 mL δείγματος, ώστε να μην μεταβάλλεται σημαντικά ο όγκος της καλλιέργειας, ανά 1 h για 18 έως και 24 h. Ακολούθησε εκτίμηση της βιομάζας μέσω μέτρησης της οπτικής απορρόφησης του λαμβανόμενου δείγματος στα 600 nm και υπολογισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης.

### **2.10.3 Εκτίμηση βιομάζας μικροοργανισμών μέσω Οπτικής Πυκνότητας**

Η εκτίμηση της βιομάζας έγινε με θολερομετρία χρησιμοποιώντας 0,5 mL δείγματος από την κάθε καλλιέργεια. Προσδιορίστηκε η απορρόφηση της καλλιέργειας με φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 600 nm, χρησιμοποιώντας κυψελίδες χωρητικότητας 1,0 mL.

### **2.10.4. Εκτίμηση του Μέγιστου Ειδικού Ρυθμού Αύξησης ( $\mu_{\max}$ ) και του Χρόνου Διπλασιασμού Καλλιέργειας ( $t_d$ )**

Οι καμπύλες κλειστού κύκλου αύξησης των ζυμών σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας τις τιμές των απορροφήσεων των καλλιεργειών στα 600 nm. Ο υπολογισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης και του χρόνου διπλασιασμού πραγματοποιήθηκε από την κλίση της καμπύλης αύξησης όταν ο μικροοργανισμός βρισκόταν στην εκθετική φάση. Ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με το Βιβλίο Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας (Καραγκούνη 2001). Η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του χρόνου διπλασιασμού είναι  $t_d = \ln 2 / \mu_{\max}$ .

## **2.11 Περιγραφή της διαδικασίας της ζύμωσης μούστου σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα**

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε αυθόρμητη οينوποίηση γλεύκους, με σκοπό τον προσδιορισμό της διαδοχής και επικράτησης των ζυμών και των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η προέλευση του γλεύκους οينوποίησης ήταν κυρίως από την παραδοσιακή ποικιλία σταφυλιών της νήσου Σαντορίνης, Ασύρτικο.

Αρχικά, η ποσότητα του γλεύκους (συνολικός όγκος 7 L) τοποθετήθηκε στον αποστειρωμένο εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα Labfors 3 Benchtop bioreactor του οίκου INFORS HT (Ελβετία). Το δοχείο καλλιέργειας, στο οποίο πραγματοποιήθηκε η αυθόρμητη ζύμωση ήταν 7,5 L.

### **α) Προετοιμασία Βιοαντιδραστήρα ως Δοχείο Αυθόρμητης Ζύμωσης**

Το δοχείο καλλιέργειας αποστειρώθηκε στο αυτόκαστο, στους 121 °C για 45 min. Πριν πραγματοποιηθεί η αποστείρωση, όλα τα τμήματα των ηλεκτροδίων, των ηθμών, οι άκρες των σωλήνων σιλικόνης, τα σημεία ένωσης των σωλήνων σιλικόνης και τα πώματα καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο. Η αποστείρωση του ηλεκτροδίου του pH έγινε μαζί με το δοχείο καλλιέργειας. Όταν ολοκληρώθηκε η αποστείρωση τα ηλεκτρόδια ενώθηκαν με παροχή ρεύματος για τουλάχιστον 6 h. Μετά την εγκατάσταση του βιοαντιδραστήρα και πριν την προσθήκη του αζύμωτου γλεύκους, το δοχείο καλλιέργειας καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο ώστε να αποφευχθεί η έκθεση του γλεύκους στο ηλιακό φως κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, διότι προκαλείται όξυνση του παραγόμενου οίνου.

### **β) Διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας μέσα στον βιοαντιδραστήρα**

Μια ειδική αντλία, συνεχούς παροχής νερού του κεντρικού δικτύου τροφοδοτούσε τη δεξαμενή της βασικής μονάδας του βιοαντιδραστήρα, η οποία στη συνέχεια τροφοδοτούσε τον χώρο του διπλού τοιχώματος του δοχείου καλλιέργειας με νερό συγκεκριμένης θερμοκρασίας. Με το μηχανικό σύστημα ανάδευσης και το σύστημα θερμομέτρου/θερμοστάτη εξασφαλίστηκε ομοιόμορφη θερμοκρασία με ακρίβεια  $\pm 0,3$  °C. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25 °C.

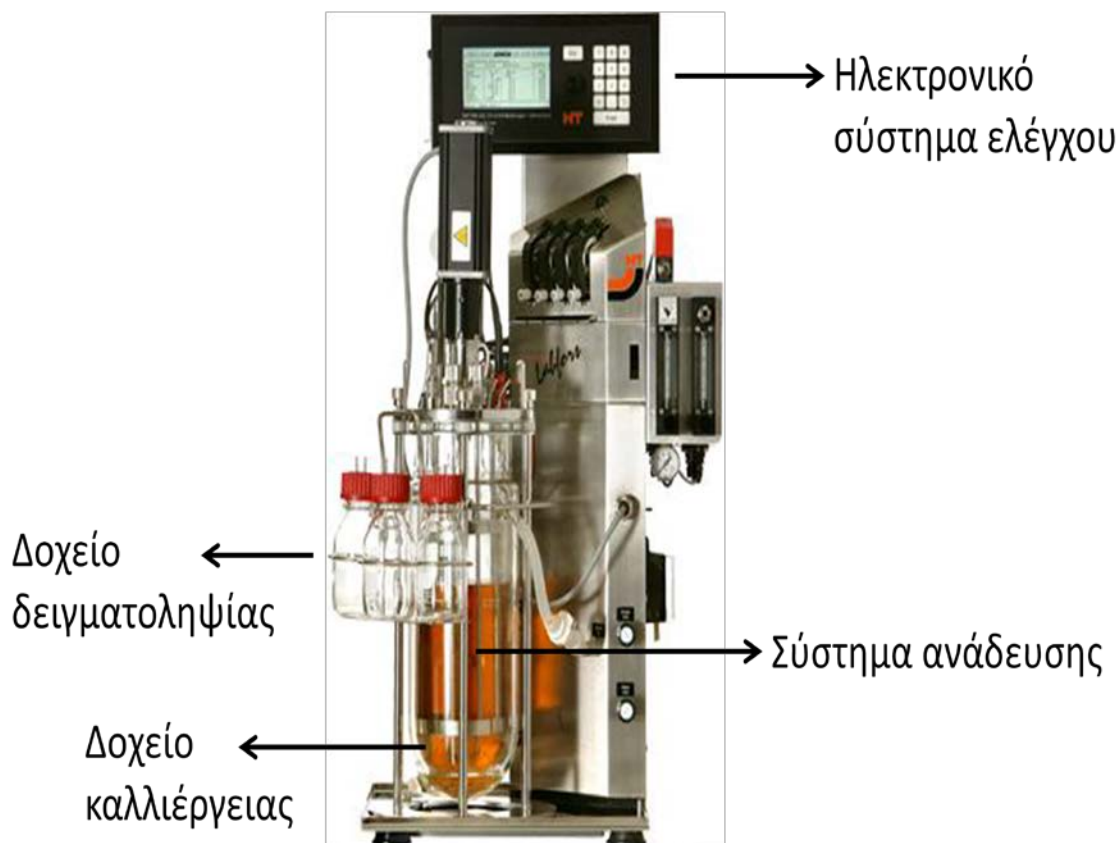
### **γ) Ανάδευση καλλιέργειας στο δοχείο ζύμωσης**



Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, την 3<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup> και 11<sup>η</sup> μέρα της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε ανάδευση του γλεύκους με τον μηχανικό αναδευτήρα που βρίσκεται στο κέντρο του μεταλλικού καλύμματος του δοχείου καλλιέργειας. Η ταχύτητα ήταν 100 στροφές ανά λεπτό. Ο σκοπός της ανάδευσης ήταν ώστε οι ζύμες να έχουν καλύτερη πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά του γλεύκους.

#### δ) Σύστημα ελέγχου της τιμής του pH στο δοχείο ζύμωσης

Το ενσωματωμένο ηλεκτρόδιο του pH στο σύστημα της βασικής μονάδας του βιοαντιδραστήρα ήταν τύπου DPAS gel type sensor του οίκου METLER TOLEDO διαμέτρου 12 mm. Το συγκεκριμένο ηλεκτρόδιο χρησιμοποιήθηκε απλά για την καταγραφή των τιμών pH του κατά τη ζύμωση.



**Εικόνα 2.3** Βιοαντιδραστήρας Labfors 3 Benchtop bioreactor του οίκου INFORS HT, Ελβετία.

#### ε) Δειγματοληψία

Κάθε μέρα, δείγμα γλεύκους όγκου 10 mL μεταφερόταν ασηπτικά από το δοχείο καλλιέργειας σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα του δοχείου καλλιέργειας. Στη συνέχεια, μεταφερόταν ασηπτικά σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα τύπου universal και

ακολουθούσε η επεξεργασία αυτού (§2.2). Επιπλέον, για τον καθορισμό της διάρκειας της ζύμωσης του γλεύκους γινόταν ανάλυση των σακχάρων του δείγματος. Η σταθεροποίηση (μη μεταβολή) του ποσοστού (% w/v) ζυμωμένων σακχάρων γλεύκους σήμαινε και το τέλος της ζύμωσης (§2.13).

## **2.12 Χημικές Αναλύσεις Κρασιού**

### **2.12.1 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων**

Ως αναγωγικά σάκχαρα ορίζονται οι υδατάθρακες οι οποίοι παρουσιάζουν αναγωγικές ιδιότητες, δηλαδή όσοι έχουν στο μόριό τους ελεύθερη αλδεϋδική ή κετονική ομάδα. Σε αυτούς περιλαμβάνονται όλοι οι μονοσακχαρίτες και ορισμένοι δι- και τρι- σακχαρίτες (πχ. μαλτόζη, λακτόζη). Τα αναγωγικά σάκχαρα που υπάρχουν στο γλεύκος ή και στον οίνο και μπορούν να ζυμωθούν είναι οι εξόζες: D (+) γλυκόζη, D (-) φρουκτόζη και D (-) γαλακτόζη. Στους οίνους υπάρχουν πεντόζες οι οποίες ανήκουν στα αναγωγικά σάκχαρα, αλλά δεν μπορούν να ζυμωθούν από τους ζυμομύκητες.

Ο χημικός προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Lane Eynon, η οποία στηρίζεται στο ότι αυτά τα σάκχαρα ανάγουν το φελίγγειο υγρό, ενώ τα ίδια οξειδώνονται. Η μέθοδος εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στον εργαστηριακό οδηγό του μαθήματος Οινολογία (Λιούνη, 2012). Σύμφωνα με αυτή, τα δείγματα οίνου, αφού πρώτα διαυγάστηκαν με διάλυμα ουδέτερου οξικού μολύβδου, αναμείχθηκαν με ποσότητα αλκαλικού διαλύματος χαλκού και η περίσσεια των ιόντων χαλκού προσδιορίστηκε ιωδομετρικώς.

### **2.12.2 Προσδιορισμός ολικής οξύτητας**

Ολική οξύτητα ονομάζεται το σύνολο των ογκομετρικών οξέων όταν με την προσθήκη τιτλοδοτημένου διαλύματος βάσης το pH του οίνου μεταφέρεται στο 7. Ο προσδιορισμός της ολικής οξύτητας πραγματοποιήθηκε με ποτενσιομετρική ογκομέτρηση, παρουσία του δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης. Η μέθοδος εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στον εργαστηριακό οδηγό του μαθήματος Οινολογία (Λιούνη, 2012). Στα διηθημένα δείγματα οίνου και αφού απομακρυνθεί η διαλυμένη ποσότητα CO<sub>2</sub> με αντλία ύδατος υπό κενό, έγινε τιτλοδότηση με διάλυμα 0,1 N NaOH παρουσία κυανού της βρωμοθυμόλης και προσδιορισμός της οξύτητας με τη χρήση ειδικού τύπου, όπως περιγράφεται στη μέθοδο.

### 2.12.3 Προσδιορισμός αλκοολικών βαθμών

Η αιθυλική αλκοόλη (αιθανόλη) αποτελεί το δεύτερο συστατικό του όγκου του οίνου μετά το νερό, αποτελεί τα 7 – 16% του όγκου του. Μεγαλύτερο ποσοστό σπανίζει διότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης εμποδίζεται η δραστηριότητα των ζυμών. Η περιεκτικότητα σε αιθανόλη εκφράζεται με τον αλκοολικό τίτλο ή αλκοολικό βαθμό ο οποίος ισούται με τον αριθμό των λίτρων της αιθανόλης που περιέχονται σε 100 L οίνου. Και οι δυο αυτοί όγκοι μετρούνται σε θερμοκρασία των 20 °C. Ο αλκοολικός βαθμός συμβολίζεται ως «% vol».

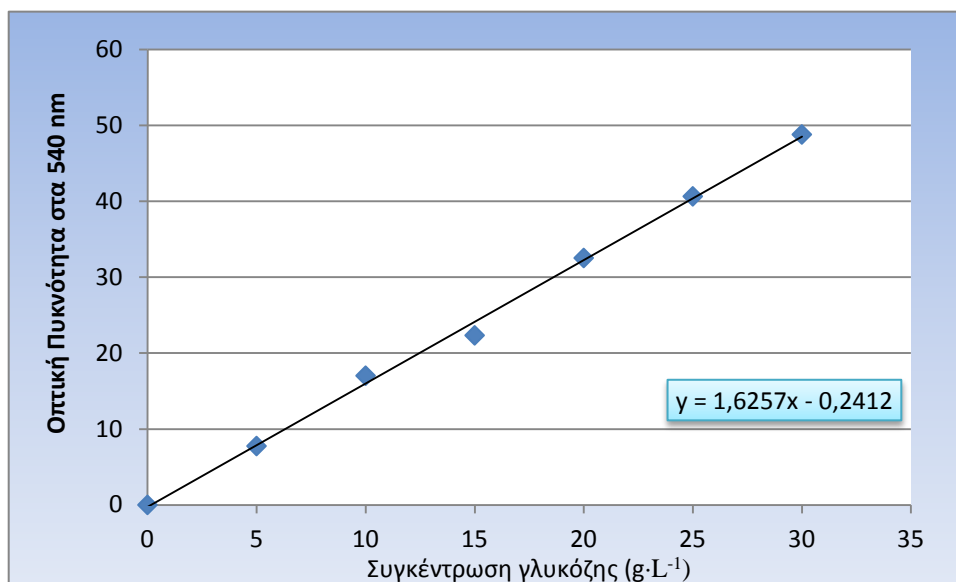
Ο προσδιορισμός της αλκοόλης έγινε με τη μέθοδο της απλής απόσταξης. Η μέτρηση της πυκνότητας του αποστάγματος γίνεται με ειδικό αραιόμετρο, το αλκοολόμετρο και οι αλκοολικοί βαθμοί προσδιορίζονται με προσέγγιση ενός δεκάτου (0.1% vol). Η μέθοδος εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στον εργαστηριακό οδηγό του μαθήματος Οινολογία (Λιούνη, 2012). Στα δείγματα του οίνου, αφού προηγουμένως προστέθηκε μικρή ποσότητα εναιωρήματος υδροξειδίου του ασβεστίου για να γίνουν αλκαλικά, έγινε απόσταξη μεθ' υδρατμών. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της πυκνότητας των αποσταγμάτων χρησιμοποιώντας αραιόμετρο (αλκοολόμετρο) και μετρώντας ταυτόχρονα τη θερμοκρασία του αποστάγματος. Ο φαινομενικός τίτλος του αποστάγματος, προσδιορίστηκε και ανάχθηκε στη θερμοκρασία των 20 °C (διόρθωση τίτλου) με τη βοήθεια ειδικού πίνακα.

## 2.13 Μέθοδος Δινιτρο-σαλικυλικού Οξέος και Κατασκευή Καμπύλης Αναφοράς Γλυκόζης

Η ανίχνευση της ποσότητας της γλυκόζης κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης έγινε με τη μέθοδο του δινιτρο-σαλικυλικού οξέος (DNS). Το συγκεκριμένο οξύ αντιδρά ποσοτικά με τα αναγωγικά σάκχαρα (πχ. γλυκόζη) και μετατρέπεται σε αμινο-νιτρο-σαλικυλικό οξύ το οποίο έχει σκούρο πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 540 nm.

Συγκεκριμένα, σε 50 μL δείγμα προστέθηκαν 150 μL υπόστρωματος (καρβοξυμεθυλ-κνιταρίνη 4% ή ξυλάνη 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα  $K_2HPO_4 - KH_2PO_4$  100 mM, pH 7) και ακολούθησε επώαση για 15 min στους 60 °C με ήπια ανάδευση. Ύστερα έγινε προσθήκη 200 μL δινιτρο-σαλικυλικού οξέος και τοποθέτηση σε

υδατόλουτρο των 100 °C για 5 min. Μετά το πέρας του βρασμού προστέθηκαν 1600  $\mu\text{L}$  d H<sub>2</sub>O και έγινε φωτομέτρηση στα 540 nm. Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης ήταν οι εξής: 0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 15  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 25  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Η συγκέντρωση της αναγωγικής γλυκόζης προέκυψε βάσει της πρότυπης καμπύλης γλυκόζης (Εικ. 2.4). Με τη βοήθεια του λογισμικού Microsoft Office, Excel υπολογίστηκε η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης, η οποία αναγράφεται στην Εικόνα 2.4 και στην οποία οι τιμές του y αντιστοιχούν στην οπτική πυκνότητα στα 540 nm και οι τιμές του x εκφράζουν τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Με τη βοήθεια αυτής της εξίσωσης έγινε η αναγωγή των τιμών της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων γλεύκους σε συγκέντρωση γλυκόζης.



**Εικόνα 2.4** Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης της γλυκόζης ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) σε συνάρτηση της οπτικής πυκνότητας στα 540 nm

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>**

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

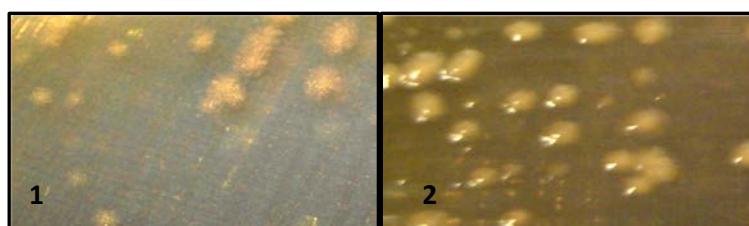
### 3.1 Μικροβιακή ποικιλότητα του κρασιού σοδειάς 2009

Στα τρία δείγματα κρασιού σοδειάς 2009 (δειγματοληψία από τρία διαφορετικά βαρέλια) πραγματοποιήθηκε ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των ενδογενών μικροοργανισμών, όπως περιγράφεται στις μεθόδους (§2.2).

#### 3.1.1 Μοριακή Ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών και των στελεχών των ζυμών

Συνολικά, απομονώθηκαν 51 βακτηριακά στελέχη (Βαρέλι I = 15, Βαρέλι II = 20, Βαρέλι III = 16) και 249 στελέχη ζυμών (Βαρέλι I = 83, Βαρέλι II = 78, Βαρέλι III = 88). Ο ολικός αριθμός των βακτηρίων κυμάνθηκε από 42 – 53 βιώσιμες μονάδες ανά mL κρασιού ( $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), ενώ των ζυμών από  $10^2$ - $10^3$   $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Η επιλογή των στελεχών έγινε με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών τους. Συνεπώς, τα βακτήρια διακρίθηκαν σε 2 κύριες κατηγορίες (Πίνακας 3.1), όπως επίσης και οι ζύμες (Πίνακας 3.2). Στην Εικόνα 3.1 φαίνονται οι αποικίες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS με κυκλοεξαμίδιο και στην Εικόνα 3.2 οι αποικίες των ζυμών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MEA και χλωραμφενικόλη.



**Εικόνα 3.1** Αποικίες στελεχών βακτηρίων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MRS με κυκλοεξαμίδιο, από δείγματα κρασιού σοδειάς 2009.1: WB52 (*Paenibacillus* sp.) και 2: WB34 (*Bacillus pumilus*).



**Εικόνα 3.2** Αποικίες στελεχών ζυμών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MEA με χλωραμφενικόλη, από δείγματα κρασιού σοδειάς 2009.1: WY10 (*Zygosaccharomyces rouxii*) και 2: WY68 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN).

**Πίνακας 3.1** Μορφολογικά χαρακτηριστικά αποικιών στελεχών βακτηρίων που απομονώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS με κυκλοεξιμίδιο, από δείγματα κρασιού σοδειάς 2009.

Ταυτοποίηση	Χρώμα	Μορφή	Περιθώριο	Επιφάνεια	Ανύψωση
<b>WB52</b> ( <i>Paenibacillus</i> sp.)	Μπεζ	Επιμήκης	Ριζοειδές	Ακανόνιστη	Επίπεδη και διάχυτη
<b>WB34</b> ( <i>Bacillus pumilus</i> )	Υπόλευκο	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Επίπεδα κυρτή

**Πίνακας 3.2** Μορφολογικά χαρακτηριστικά αποικιών στελεχών ζυμών που απομονώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MEA με γλωραμφενικόλη, από δείγματα κρασιού σοδειάς 2009.

Ταυτοποίηση	Χρώμα	Μορφή	Περιθώριο	Επιφάνεια	Ανύψωση
<b>WY10</b> ( <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> )	Λευκό	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Ημίθαμπη	Θολωτή με κεντρικό θόλο
<b>WY68</b> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MA09-AN)	Λευκό	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Θολωτή

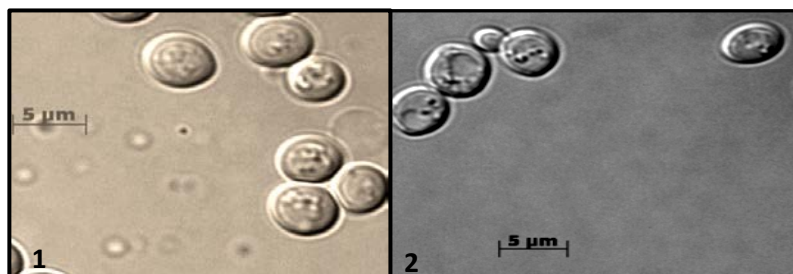
Τα στελέχη που απομονώθηκαν, παρατηρήθηκαν στο φωτονικό μικροσκόπιο, όπου και επισημάνθηκαν οι διαφορές των κυττάρων τους ως προς το σχήμα και το μέγεθός τους. Συγκεκριμένα, το κύτταρο του βακτηρίου WB34 (*Bacillus pumilus*) έχει σχήμα βακίλλου και μέγεθος 1,39  $\mu\text{m}$ , ενώ το κύτταρο του WB52 (*Paenibacillus* sp.) έχει επίσης σχήμα βακίλλου και μέγεθος 1,26  $\mu\text{m}$  (Εικ. 3.3). Όσον αφορά τις ζύμες, το κύτταρο της ζύμης WY68 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN) χαρακτηρίζεται υποσφαιρικό, με μέσο όρο διαμέτρου 4,8  $\mu\text{m}$ , ενώ της ζύμης WY10 (*Zygosaccharomyces rouxii*) χαρακτηρίζεται ωοειδές έως ελλειψοειδές και έχει μέσο όρο διαμέτρου 3,75  $\mu\text{m}$  (Εικ. 3.4).

Στα βακτηριακά στελέχη πραγματοποιήθηκαν επιπλέον, οι βιοχημικές δοκιμασίες: ανίχνευση ενεργότητας καταλάσης, ανίχνευση ενεργότητας οξειδάσης και χρώση

κατά Gram. Όλα τα στελέχη βρέθηκαν θετικά στην καταλάση, αρνητικά στην οξειδάση και χαρακτηρίστηκαν θετικά κατά Gram.



**Εικόνα 3.3** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων βακτηρίων σε φωτονικό μικροσκόπιο: 1. WB 34 (*Bacillus pumilus*), 2. WB 52 (*Paenibacillus* sp.)



**Εικόνα 3.4** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζυμών σε φωτονικό μικροσκόπιο: 1. WY68 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN), 2. WY10 (*Zygosaccharomyces rouxii*).

Τα στελέχη εκείνα τα οποία επιλέχθηκαν να απομονωθούν σε αξενικές καλλιέργειες, ομαδοποιήθηκαν με χρήση των μοριακών μεθόδων: BOX – PCR για τα βακτήρια και ITS PCR για τις ζύμες.

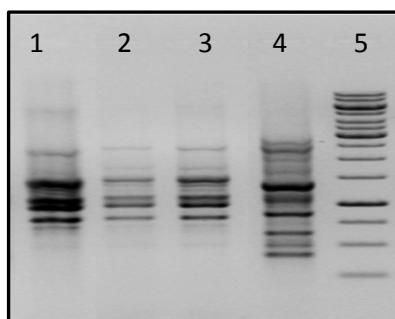
Στην Εικόνα 3.5 φαίνονται τα πρότυπα που προέκυψαν από την BOX-PCR μέθοδο. Με βάση το ραβδωτό πρότυπο που παρουσίασαν κατηγοριοποιήθηκαν σε 2 ομάδες. Δύο αντιπρόσωποι από κάθε ομάδα (συνολικά 4 στελέχη), ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια, με βάση την αλληλουχία του 16S rDNA γονιδίου, με τα βακτήρια: *Paenibacillus* sp., και *Bacillus pumilus* (Πίνακας 3.3). Στην Εικόνα 3.6 αναπαρίσταται το ποσοστό αντιπροσώπευσης του κάθε ταυτοποιημένου στελέχους, σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό βακτηρίων που ανακτήθηκε από κάθε βαρέλι ξεχωριστά. Φαίνεται πως ο πληθυσμός των βακτηρίων που αντιστοιχούν στο γένος *Paenibacillus* υπερτερεί (~42%) συγκριτικά με τον πληθυσμό των στελεχών του βακτηρίου *Bacillus pumilus*.



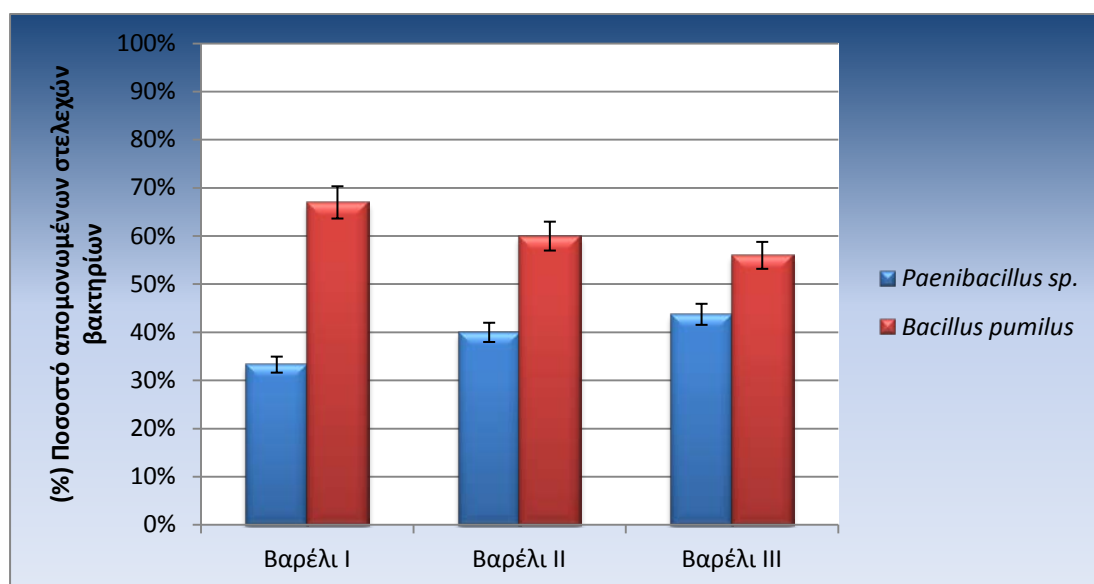
**Πίνακας 3.3:** Μοριακή ταυτοποίηση των τριών διακριτών στελεχών βακτηρίων, μέσω αλληλούχησης του 16S rDNA γονιδίου.

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια	Μέγιστη ομοιότητα (%)	Αριθμός νουκλεοτιδίων <sup>1</sup>
WB52	<i>Paenibacillus</i> sp	99,2	930
WB34	<i>Bacillus pumilus</i>	98,4	934

1. Αριθμός νουκλεοτιδίων του 16S rDNA γονιδίου του στελέχους που χρησιμοποιήθηκαν στην ευθυγράμμιση των αλληλουχιών.

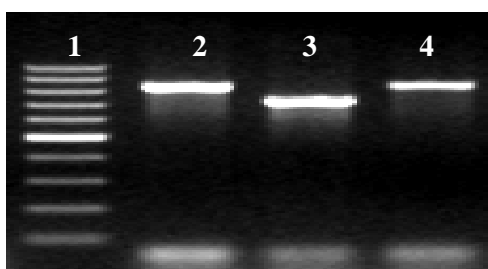


**Εικόνα 3.5** Πρότυπα ζωνών της αντίδρασης BOX-PCR. Διαδρομή: 1. WB34 (*Bacillus pumilus*), 2. WB38 (*Bacillus pumilus*), 3. WB31 (*Bacillus pumilus*), 4. WB52 (*Paenibacillus* sp.), 5. 1kb DNA ladder.



**Εικόνα 3.6** Ποσοστό (%) αντιπροσώπευσης των ταυτοποιημένων βακτηριακών στελεχών σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό βακτηρίων που ανακτήθηκε από τα τρία βαρέλια ξεχωριστά.

Στην Εικόνα 3.7 παρουσιάζονται τα διαφορετικά μεγέθη ζωνών που προέκυψαν εφαρμόζοντας τη μέθοδο ITS-PCR στα στελέχη των ζυμών. Στις ζύμες WY68 και WY122 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN) το προϊόν της ITS PCR είχε μέγεθος 778 bp, ενώ το προϊόν της ζύμης WY10 (*Zygosaccharomyces rouxii*) είχε μέγεθος 677 bp. Συνεπώς, τα στελέχη των ζυμών κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες. Δύο αντιπρόσωποι από κάθε ομάδα (συνολικά 4 στελέχη), ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια, με βάση την αλληλουχία της ITS1-5,8S-ITS2 ριβοσωμικής περιοχής, με τις ζύμες: *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN και *Zygosaccharomyces rouxii* (Πίνακας 3.4). Στην Εικόνα 3.8 αναπαρίσταται το ποσοστό αντιπροσώπευσης του κάθε ταυτοποιημένου στελέχους ζύμης σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό των ζυμών που ανακτήθηκε από κάθε βαρέλι ξεχωριστά. Όπως προκύπτει, ο πληθυσμός των στελεχών της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN υπερτερεί αριθμητικά (~80% επί του ολικού πληθυσμού των ζυμών) έναντι των στελεχών της ζύμης *Zygosaccharomyces rouxii* (~20%).

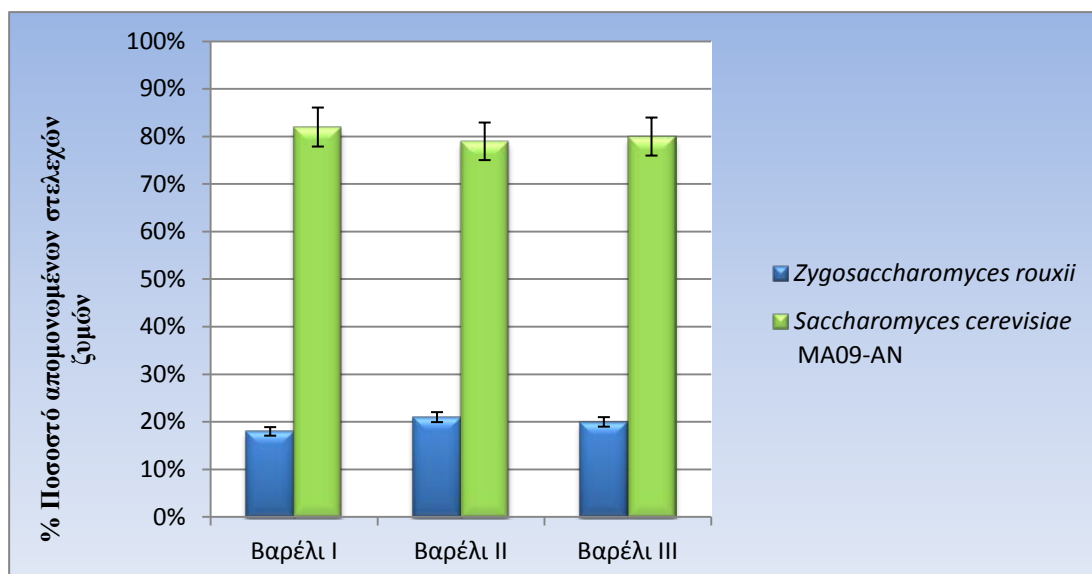


**Εικόνα 3.7** Πρότυπα ζωνών της αντίδρασης ITS-PCR για τα απομονωμένα στελέχη ζυμών. Διαδρομή: 1. 100 bp DNA ladder, 2. WY68 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN), 3. WY10 (*Zygosaccharomyces rouxii*), 4. WY122 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN).

**Πίνακας 3.4:** Μοριακή ταυτοποίηση των δυο διακριτών στελεχών ζυμών, μέσω αλληλούχησης της ριβοσωμικής περιοχής ITS1-5,8S-ITS2.

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια	Μέγιστη ομοιότητα (%)	Αριθμός νουκλεοτιδίων <sup>1</sup>
WY68	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MA09-AN	98,5	778
WY10	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	99,8	677

1. Αριθμός νουκλεοτιδίων της ριβοσωμικής περιοχής ITS1-5,8S-ITS2 του στελέχους που χρησιμοποιήθηκαν στην ευθυγράμμιση των αλληλουχιών.



**Εικόνα 3.8** Ποσοστό (%) αντιπροσώπευσης των ταυτοποιημένων στελεχών ζυμών σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό των ζυμών που ανακτήθηκε από τα τρία βαρέλια ξεχωριστά.

## 3.2 Μικροβιακή ποικιλότητα γλεύκους σοδειάς 2010


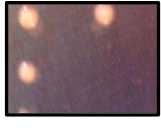
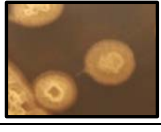



Στα τρία δείγματα γλεύκους σοδειάς 2010 (η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από τρία διαφορετικά βαρέλια) πραγματοποιήθηκε ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των ενδογενών μικροοργανισμών, όπως περιγράφεται στις μεθόδους (§2.2).

### 3.2.1 Μοριακή Ταυτοποίηση στελεχών ζυμών και βακτηρίων γλεύκους 2010

Συνολικά, απομονώθηκαν 122 βακτηριακά στελέχη (Βαρέλι I = 40, Βαρέλι II = 45, Βαρέλι III = 37) και 335 στελέχη ζυμών (Βαρέλι I = 110, Βαρέλι II = 108, Βαρέλι III = 117). Ο ολικός αριθμός των βακτηρίων κυμάνθηκε από  $10 - 10^2$  cfu · mL<sup>-1</sup>, ενώ των ζυμών από  $10^3 - 10^4$  cfu · mL<sup>-1</sup>.

Η επιλογή των στελεχών έγινε με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών τους. Τα βακτήρια διακρίθηκαν σε έξι κύριες κατηγορίες, ενώ οι ζύμες σε τέσσερις. Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται εικόνες των αποικιών των στελεχών βακτηρίων που απομονώθηκαν, καθώς και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που τις διακρίνουν, ενώ στον Πίνακα 3.6 αναπαρίστανται οι αποικίες των απομονωθέντων στελεχών ζυμών, με αντίστοιχη περιγραφή των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών.

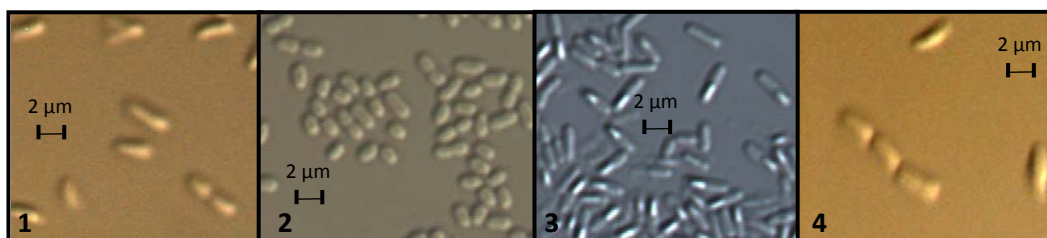
**Πίνακας 3.5:** Μορφολογικά χαρακτηριστικά αποικιών στελεχών βακτηρίων που απομονώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS και κυκλοεξιμίδιο, από δείγματα γλεύκους σοδειάς 2010.

Ταυτοποίηση	Χρώμα	Μορφή	Περιθώριο	Επιφάνεια	Ανύψωση	Εικόνα αποικίας
MB62 ( <i>Raenibacillus</i> sp.)	Μπεζ	Επιμήκης	Ριζοειδές	Ακανόνιστη	Επίπεδη και διάχυτη	
MB15 ( <i>Kozakia baliensis</i> )	Άσπρο	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Επίπεδα κυρτή	
MB102 ( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> )	Υπόλευκο	Κυκλική	Κροσσωτό	Κρατηριοειδές	Θολωτή με κεντρικό θόλο	
MB85 ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	Λευκό	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Επίπεδα κυρτή	
MB48 ( <i>Gluconobacter oxydans</i> )	Κρεμ	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Επίπεδα κυρτή	
MB8 ( <i>Bacillus pumilus</i> )	Υπόλευκο	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Επίπεδα κυρτή	

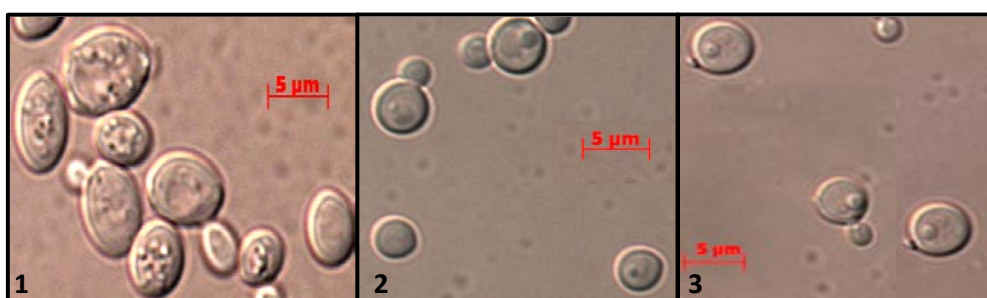
**Πίνακας 3.6:** Μορφολογικά χαρακτηριστικά αποικιών στελεχών ζυμών που απομονώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MEA και χλωραμφενικόλη, από δείγματα γλεύκους σοδειάς 2010.

Ταυτοποίηση	Χρώμα	Μορφή	Περιθώριο	Επιφάνεια	Ανύψωση	Εικόνα αποικίας
MY201 ( <i>Debaryomyces carsonii</i> )	Λευκό	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Ημίθαμπη	Επίπεδα κυρτή με κεντρικό θόλο	
MY88 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789)	Λευκό και μπεζ στο κέντρο)	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Ημίθαμπη	Δακτυλιοειδής	
MY42 ( <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> )	Λευκό	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Ημίθαμπη	Θολωτή με κεντρικό θόλο	
MY188 ( <i>Candida cantarellii</i> )	Υπόλευκο	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Ματ	Επίπεδα κυρτή	

Τα απομονωθέντα στελέχη παρατηρήθηκαν στο φωτονικό μικροσκόπιο όπου και επισημάνθηκαν οι διαφορές των κυττάρων τους ως προς το σχήμα και το μέγεθος τους. Συγκεκριμένα, το κύτταρο του βακτηρίου MB85 (*Bacillus licheniformis*) έχει σχήμα βακίλλου και μέγεθος 1,5  $\mu\text{m}$ , το κύτταρο του βακτηρίου MB48 (*Gluconobacter oxydans*) είναι κοκκιοβάκιλλος και έχει μέγεθος 0,85  $\mu\text{m}$ , το κύτταρο του MB102 (*Bacillus amyloliquefaciens*) είναι επίμηκες, σχήματος βακίλλου με μέγεθος 1,42  $\mu\text{m}$  και το κύτταρο του MB15 (*Kozakia baliensis*) είναι βάκιλος μεγέθους 1,44  $\mu\text{m}$  (Εικ. 3.9). Σχετικά με τις ζύμες, τα κύτταρα της ζύμης MY88 (*Saccharomyces cerevisiae* YJM789) χαρακτηρίζεται ελλειπτικό, με μέσο όρο διαμέτρου 6,25  $\mu\text{m}$  της ζύμης MY188 (*Candida cantarellii*) χαρακτηρίζεται σφαιρικό με μέσο όρο διαμέτρου 4,2  $\mu\text{m}$  και της ζύμης MY201 (*Debaryomyces carsonii*) χαρακτηρίζεται σφαιρικό με μέσο όρο διαμέτρου 4,4  $\mu\text{m}$  (Εικ. 3.10).

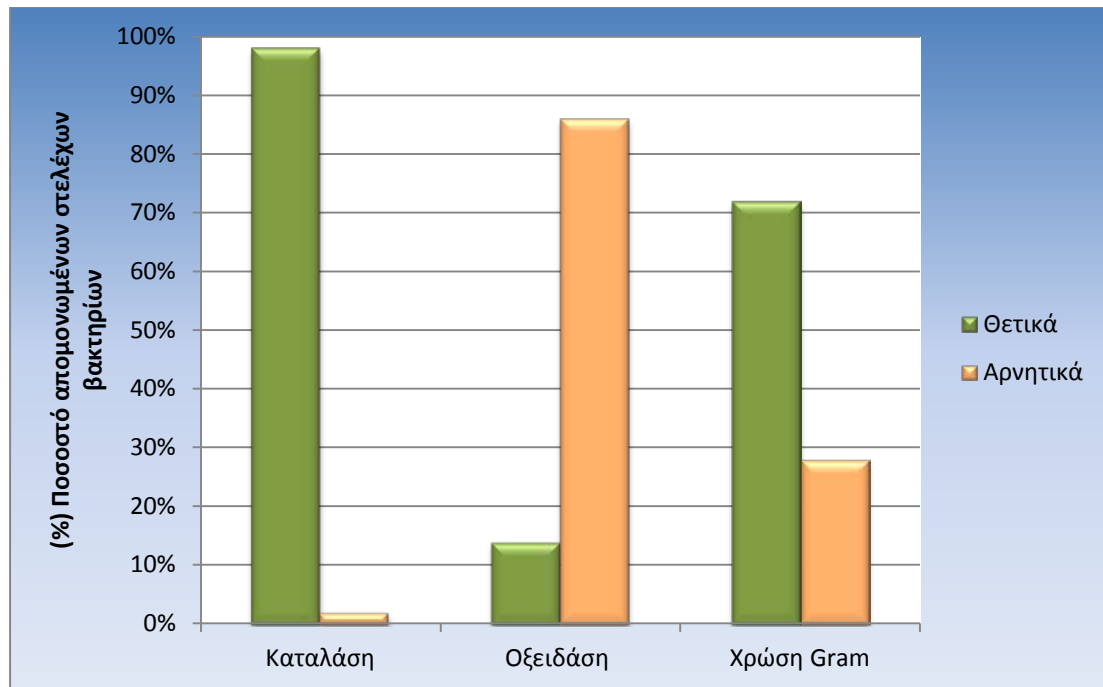


**Εικόνα 3.9** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων βακτηρίων σε φωτονικό μικροσκόπιο: 1. MB 85 (*Bacillus licheniformis*), 2. MB 48 (*Gluconobacter oxydans*) και 3. MB 102 (*Bacillus amyloliquefaciens*) και 4. MB 15 (*Kozakia baliensis*).



**Εικόνα 3.10** Μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων ζυμών σε φωτονικό μικροσκόπιο: 1. MY88 (*Saccharomyces cerevisiae* YJM789), 2. MY188 (*Candida cantarellii*) και 3. MY201 (*Debaryomyces carsonii*).

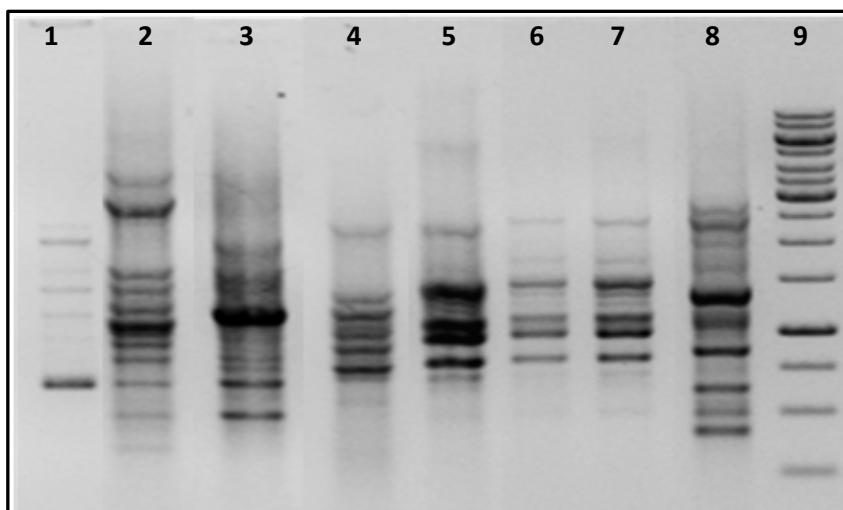
Στα βακτήρια πραγματοποιήθηκαν, επιπλέον, οι βιοχημικές δοκιμασίες: ανίχνευση ενεργότητας καταλάσης, ανίχνευση ενεργότητας οξειδάσης και χρώση κατά Gram, όπου τα αποτελέσματα αναπαρίστανται συγκεντρωτικά στην Εικόνα 3.11.



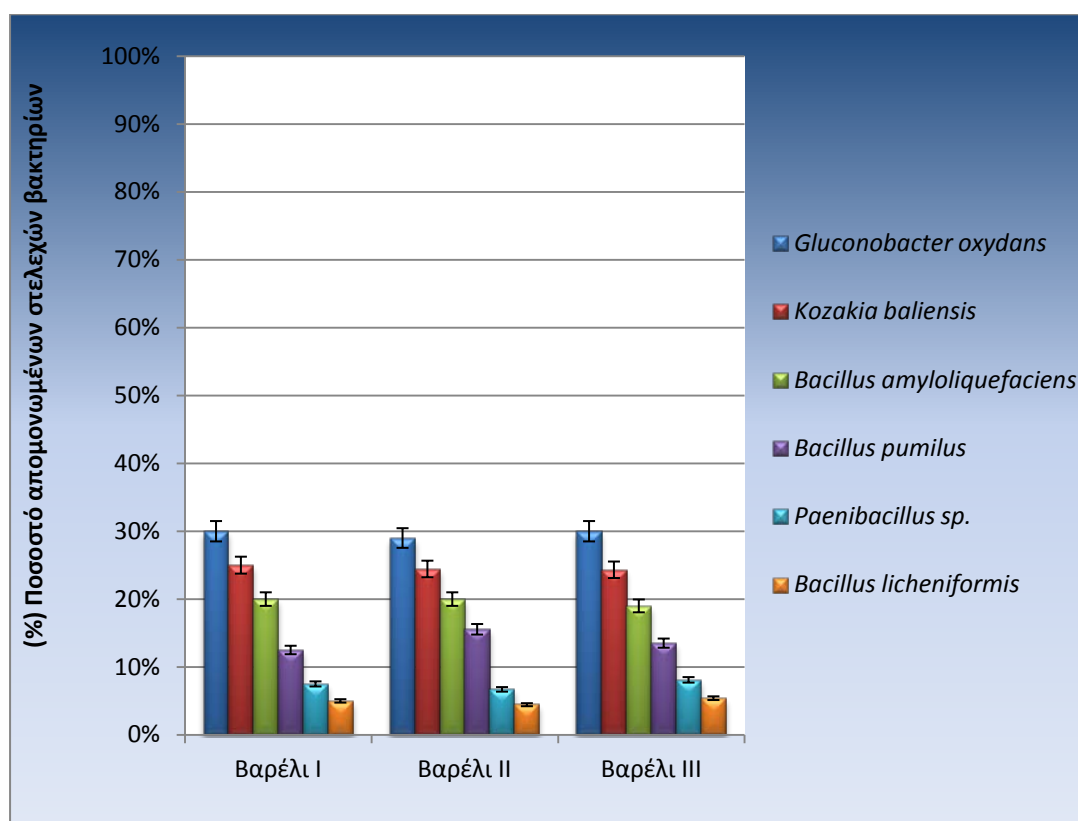
**Εικόνα 3.11** Βιοχημικές δοκιμασίες: ανίχνευση ενεργότητας οξειδάσης, ανίχνευση ενεργότητας κατατάσης και χρώση κατά Gram, στα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη.

Τα στελέχη εκείνα τα οποία επιλέχθηκαν να απομονωθούν σε αξενικές καλλιέργειες, ομαδοποιήθηκαν με χρήση των μοριακών μεθόδων: BOX-PCR για τα βακτήρια και ITS-PCR για τις ζύμες.

Στην Εικόνα 3.12 φαίνονται τα διαφορετικά πρότυπα που προέκυψαν από τη μέθοδο BOX-PCR. Με βάση το ραβδωτό πρότυπο που παρουσίασαν κατηγοριοποιήθηκαν σε 6 ομάδες. Δύο αντιπρόσωποι από κάθε ομάδα (συνολικά 12 στελέχη), ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια, με βάση την αλληλουχία του 16S rDNA γονιδίου, με τα βακτήρια: *Paenibacillus* sp., *Kozakia baliensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Gluconobacter oxydans* και *Bacillus pumilus* (Πίνακας 3.7). Στην Εικόνα 3.13 αναπαρίσταται το ποσοστό αντιπροσώπευσης του κάθε ταυτοποιημένου στελέχους, σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό βακτηρίων που ανακτήθηκε σε κάθε βαρέλι ξεχωριστά. Φαίνεται πως ο πληθυσμός των βακτηρίων που αντιστοιχούν στο γένος *Gluconobacter oxydans* (~25%) κυριαρχεί συγκριτικά με τα υπόλοιπα γένη βακτηρίων.



**Εικόνα 3.12** Πρότυπα ζωνών της αντίδρασης BOX-PCR. Διαδρομή: 1. MB102 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 2. MB 85 (*Bacillus licheniformis*), 3. MB 48 (*Gluconobacter oxydans*), 4. MB 15 *Kozakia baliensis*, 5. MB8 (*Bacillus pumilus*), 6. MB 3 (*Bacillus pumilus*), 7. MB 31 (*Bacillus pumilus*), 8. MB 62 (*Paenibacillus* sp.), 9. 1kb DNA ladder.



**Εικόνα 3.13** Ποσοστό (%) αντιπροσώπευσης των ταυτοποιημένων βακτηριακών στελεχών σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό βακτηρίων που ανακτήθηκε από τα τρία βαρέλια ξεχωριστά



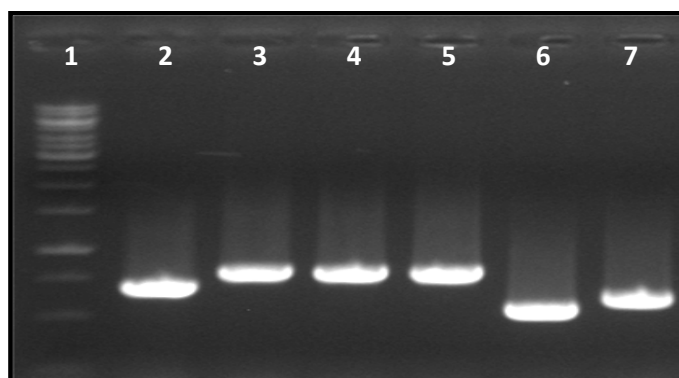
**Πίνακας 3.7:** Μοριακή ταυτοποίηση των 6 διακριτών στελεχών βακτηρίων, μέσω αλληλούχησης του 16S rDNA γονιδίου.

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια	Μέγιστη ομοιότητα (%)	Αριθμός νουκλεοτιδίων <sup>1</sup>
MB62	<i>Paenibacillus</i> sp	99	930
MB15	<i>Kozakia baliensis</i>	99	943
MB102	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	922
MB85	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	937
MB48	<i>Gluconobacter oxydans</i>	98	949
MB8	<i>Bacillus pumilis</i>	97	932

1. Αριθμός νουκλεοτιδίων του 16S rDNA γονιδίου του στελέχους που χρησιμοποιήθηκαν στην ευθυγράμμιση των αλληλουχιών.

Τα διαφορετικά μεγέθη ζωνών που προέκυψαν εφαρμόζοντας τη μέθοδο ITS-PCR στα στελέχη των ζυμών, παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.14. Στις ζύμες MY88, MY86 και MY75 (*Saccharomyces cerevisiae* YJM789) το προϊόν της ITS PCR είχε μέγεθος 778 bp, το προϊόν της ζύμης MY42 (*Zygosaccharomyces rouxii*) είχε μέγεθος 677 bp, της ζύμης MY188 (*Candida cantarellii*) ήταν 480 bp, ενώ της ζύμης MY201 (*Debaryomyces carsonii*) είχε μέγεθος 655 bp. Συνεπώς, τα στελέχη των ζυμών κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες. Δύο αντιπρόσωποι από κάθε ομάδα (συνολικά 8 στελέχη), ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια, με βάση την αλληλουχία της ITS1-5,8S-ITS2 ριβοσωμικής περιοχής, με τις ζύμες: *Saccharomyces cerevisiae* YJM789, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces carsonii* και *Candida cantarellii* (Πίνακας 3.8). Στην Εικόνα 3.15 αναπαρίσταται το ποσοστό αντιπροσώπευσης του κάθε ταυτοποιημένου στελέχους ζύμης σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό των ζυμών που ανακτήθηκε από κάθε βαρέλι ξεχωριστά. Όπως προκύπτει, ο πληθυσμός των στελεχών της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN υπερτερεί αριθμητικά (~52%) έναντι των υπόλοιπων στελεχών ζυμών που απομονώθηκαν.



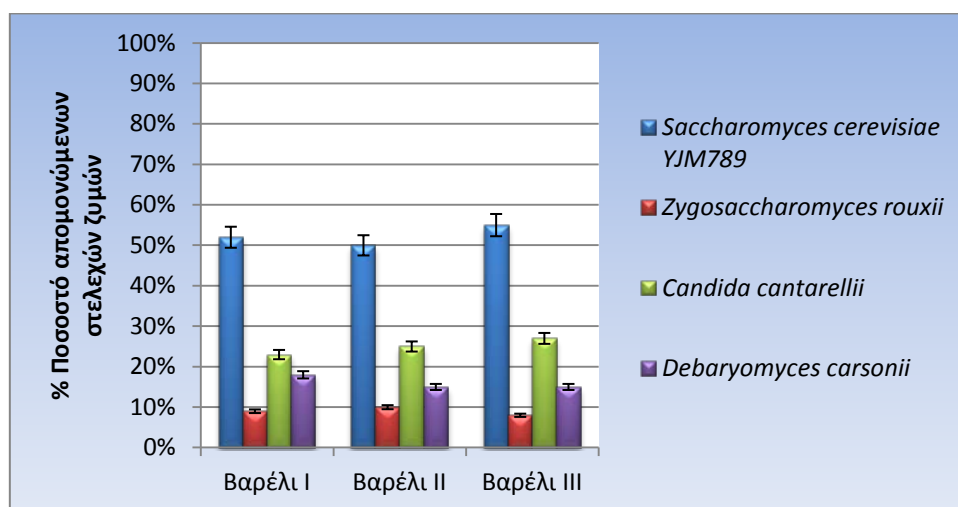


**Εικόνα 3.14** Πρότυπα ζωνών της αντίδρασης ITS-PCR για τα στελέχη ζυμών. Διαδρομή: 1. 1kb DNA ladder, 2. MY42 (*Zygosaccharomyces rouxii*), 3. MY88 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN), 4. MY86 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN), 5. MY75 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN), 6. MY188 (*Candida cantarellii*) και 7. MY201 (*Debaryomyces carsonii*).

**Πίνακας 3.8:** Μοριακή ταυτοποίηση των 4 διακριτών στελεχών ζυμών, μέσω αλληλούχισης της ριβοσωμικής περιοχής ITS1-5,8S-ITS2.

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια	Μέγιστη ομοιότητα (%)	Αριθμός νουκλεοτιδίων <sup>1</sup>
MY88	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789	98,5	778
MY42	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	99,8	677
MY188	<i>Candida cantarellii</i>	99,4	480
MY201	<i>Debaryomyces carsonii</i>	99,2	655

1. Αριθμός νουκλεοτιδίων της ριβοσωμικής περιοχής ITS1-5,8S-ITS2 του στελέχους που χρησιμοποιήθηκαν στην ευθυγράμμιση των αλληλουχιών.



**Εικόνα 3.15** Ποσοστό (%) αντιπροσώπευσης των ταυτοποιημένων στελεχών ζυμών σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό των ζυμών που ανακτήθηκε από τα τρία βαρέλια ξεχωριστά.

### **3.3 Μικροβιακή ποικιλότητα κατά την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους σοδειάς 2011 σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα**

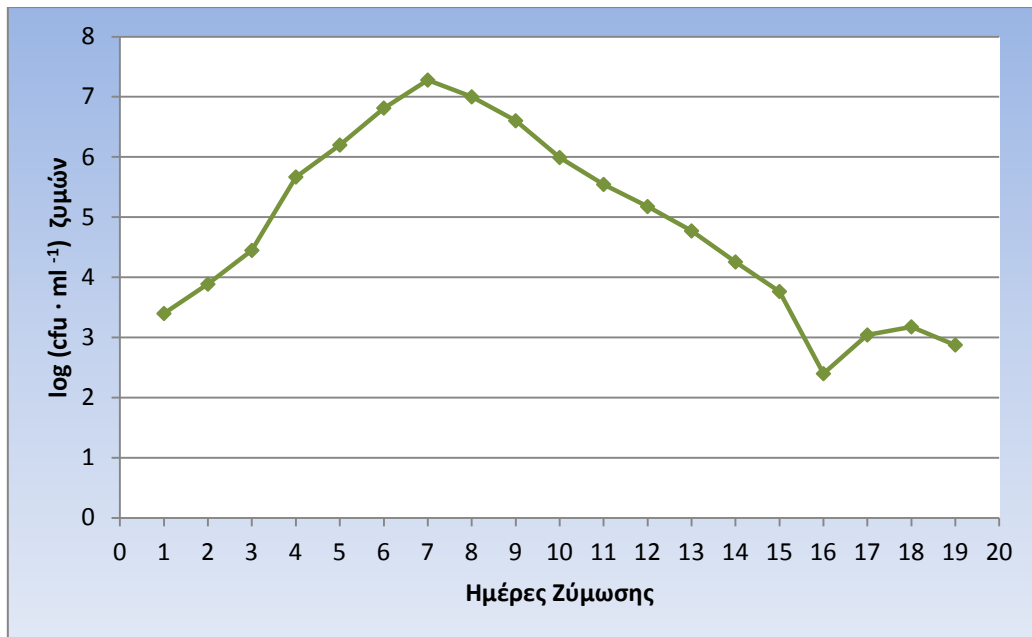
Στην παρούσα εργασία, έγινε μελέτη της διαδοχής και επικράτησης των ενδογενών ζυμών και βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γλεύκους, από σταφύλια της παραδοσιακής γηγενούς ποικιλίας Ασύρτικο, από την περιοχή Μεγαλοχώρι της Σαντορίνης. Το αζύμωτο γλεύκος σοδειάς 2011 και όγκου 7 L, τοποθετήθηκε σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα όγκου 7,5 L για την πραγμάτωση αυθόρμητης ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια της οينوποίησης, μελετήθηκε η κινητική αύξησης των ζυμών (ολικός πληθυσμός ζυμών) και των βακτηρίων (ολικός αριθμός βακτηρίων), η κινητική των καταναλωθέντων σακχάρων, με σκοπό την παρακολούθηση της πορείας της ζύμωσης, ενώ πραγματοποιήθηκε μοριακή ταυτοποίηση των απομονωθέντων μικροοργανισμών και προσδιορισμός της συμμετοχής του κάθε είδους καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (κινητική αύξησης των ειδών). Στο τελικό προϊόν της οينوποίησης πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες χημικές αναλύσεις (κεφάλαιο 3.3.6).

#### **3.3.1 Κινητική ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο σοδειάς 2011**

Κάθε μέρα, δείγμα γλεύκους όγκου 10 ml μεταφερόταν ασηπτικά από το δοχείο καλλιέργειας σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα του δοχείου καλλιέργειας. Στη συνέχεια, μεταφερόταν ασηπτικά σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα τύπου universal και ακολουθούσε η επεξεργασία αυτού για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των ενδογενών μικροοργανισμών, όπως περιγράφεται στις μεθόδους (§2.2).

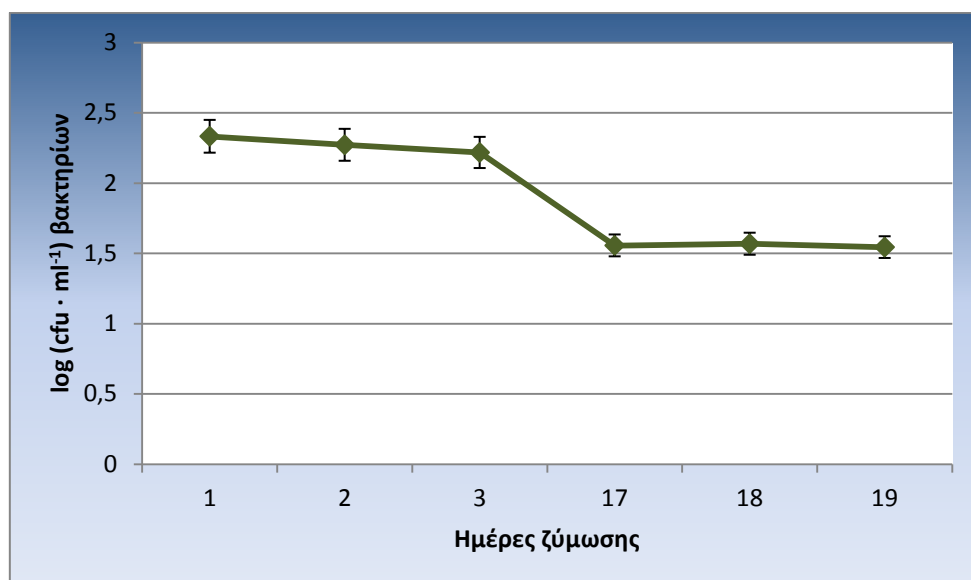
Η ζύμωση ολοκληρώθηκε σε 19 ημέρες. Στελέχη ζυμών απομονώθηκαν από κάθε δειγματοληψία, και η πορεία των βιώσιμων μονάδων τους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης απεικονίζεται στην Εικόνα 3.16. Σε αντίθεση, η απομόνωση βακτηριακών στελεχών δεν ήταν εφικτή καθ' όλη τη διάρκεια της οينوποίησης, παρά μόνο τις πρώτες 3 μέρες και τις τελευταίες 2 μέρες της ζύμωσης (Εικόνα 3.17).

Στην Εικόνα 3.18 απεικονίζεται η κινητική των καταναλωθέντων σακχάρων κατά τη διάρκεια της οينوποίησης. Η ανάλυση των σακχάρων πραγματοποιείται για την παρακολούθηση της πορείας της ζύμωσης. Η σταθεροποίηση (μη μεταβολή) του ποσοστού (% w/v) ζυμωμένων σακχάρων γλεύκους σήμαινε και το τέλος της ζύμωσης (§2.13).



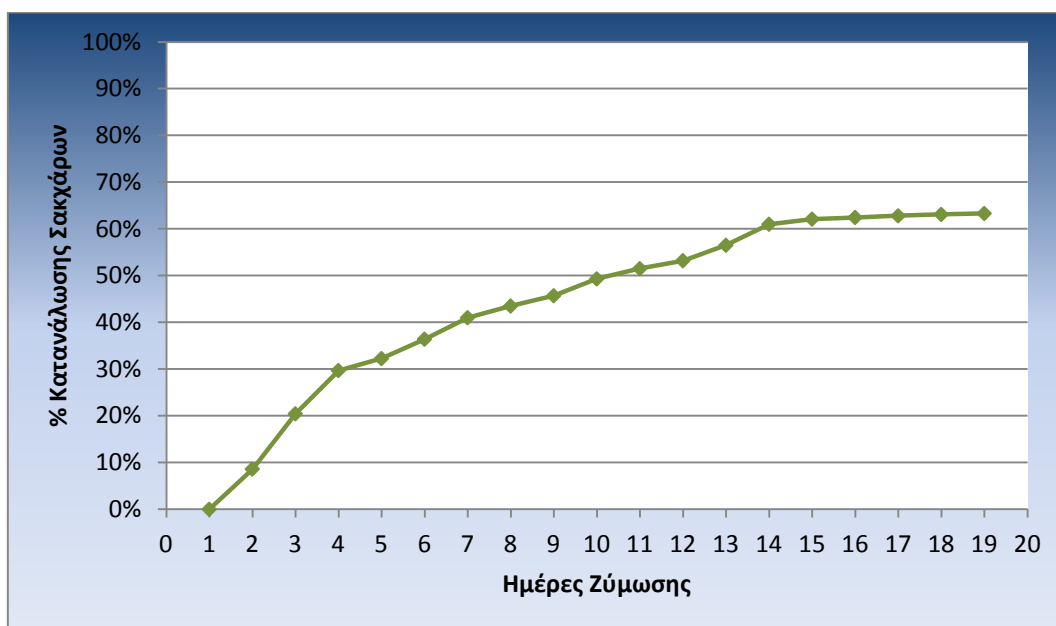
**Εικόνα 3.16** Κινητική αύξησης των ζυμών κατά την αυθόρμητη οиноποίηση γλεύκους σοδειάς 2011, ποικιλίας Ασύρτικο.

Από την εικόνα 3.16 φαίνεται ότι κατά την αυθόρμητη οινόποιηση, η εκθετική φάση των μικροοργανισμών ήταν διάρκειας 7 ημερών (όπου, ο λογάριθμος μέγιστου αριθμού βιώσιμων μονάδων ζυμών · mL<sup>-1</sup> ήταν 7,28 δηλαδή  $1,9 \cdot 10^7$  cfu · mL<sup>-1</sup>). Ακολούθησε φάση μείωσης του πληθυσμού διάρκειας 9 ημερών και αμέσως μετά παρατηρήθηκε μικρή τάση αύξησης πληθυσμού διάρκειας μόνο 2 ημερών. Τη μικρή αυτή πληθυσμιακή αύξηση ακολούθησε δεύτερη φάση μείωσης πληθυσμού, μέχρι την τιμή .



**Εικόνα 3.17** Βιώσιμες μονάδες των βακτηρίων κατά την αυθόρμητη οινόποιηση γλεύκους σοδειάς 2011, ποικιλίας Ασύρτικο.

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 3.17 ο πληθυσμός των βακτηρίων ήταν μέγιστος ( $\log \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1} = 2,33$  δηλαδή  $2,15 \cdot 10^2 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) στην αρχή της ζύμωσης (τις πρώτες 3 μέρες), σε αντίθεση με τον πληθυσμό των βακτηρίων τις 3 τελευταίες μέρες της ζύμωσης ( $\log \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1} = 1,54$  δηλαδή  $35 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Στο ενδιάμεσο της ζύμωσης η ανίχνευση βακτηριακών στελεχών ήταν αδύνατη (4<sup>η</sup> έως 16<sup>η</sup> μέρα), λόγω της έντονης ανάπτυξης των ζυμών, όπου το μέγεθος του πληθυσμού τους ήταν μέγιστο, και της ανάπτυξης δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών (υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης) για την αύξηση των βακτηριακών στελεχών.



**Εικόνα 3.18** Κινητική των καταναλωθέντων σακχάρων κατά την αυθόρμητη οиноποίηση γλεύκους σοδειάς 2011, ποικιλίας Ασύρτικο.


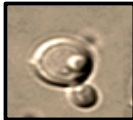








Από την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της πορείας κατανάλωσης των σακχάρων κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης (Εικόνα 3.18), φαίνεται ότι το ποσοστό κατανάλωσης σακχάρων ήταν 63,3%. Πιο αναλυτικά, το δείγμα γλεύκους πριν την έναρξη της ζύμωσης περιείχε  $370,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σάκχαρα, ενώ στο τέλος της ζύμωσης, το τελικό προϊόν περιείχε  $136 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Το τελικό ποσοστό κατανάλωσης σακχάρων επιτεύχθηκε σε διάστημα 15 ημερών.

### 3.3.2 Μοριακή Ταυτοποίηση των στελεχών των ζυμών

Τα 456 απομονωθέντα στελέχη ζυμών από δείγματα γλεύκους που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της οиноποίησης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, επιλέχθηκαν αρχικά με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών τους και σύμφωνα με τις διαφορές στο σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων τους (Πίνακας 3.9), όπου και κατηγοριοποιήθηκαν σε 4 ομάδες. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των κυττάρων

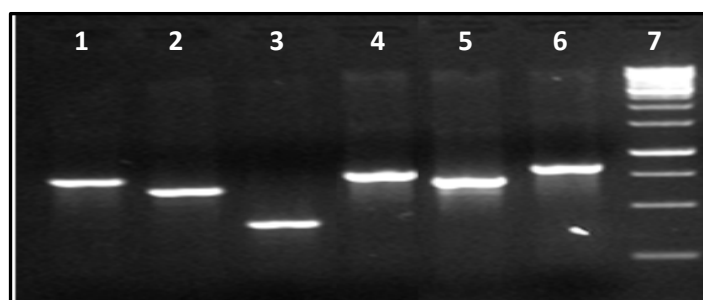
των απομονωμένων στελεχών, το κύτταρο της ζύμης ASY410 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN) χαρακτηρίστηκε υποσφαιρικό, με μέγεθος 4,8 μm, της ζύμης ASY8 (*Candida cantarellii*) χαρακτηρίστηκε σφαιρικό με μέγεθος 4,2 μm, της ζύμης ASY38 (*Debaryomyces carsonii*) χαρακτηρίστηκε σφαιρικό με μέγεθος 4,4 μm (Εικ. 3.6), της ζύμης ASY218 (*Saccharomyces cerevisiae* YJM789) χαρακτηρίστηκε ελλειπτικό, με μήκος διαμέτρου 6,25 μm, ενώ της ζύμης ASY206 (*Zygosaccharomyces rouxii*) χαρακτηρίστηκε ωοειδές έως ελλειψοειδές με διάμετρο 3,75 μm.

**Πίνακας 3.9:** Μορφολογικά χαρακτηριστικά αποικιών και των κυττάρων στελεχών ζυμών που απομονώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MEA και χλωραμφενικόλη, κατά την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους σοδειάς 2011 ποικιλίας Ασύρτικο.

Ταυτοποίηση	Χρώμα	Μορφή	Περιθώριο	Επιφάνεια	Ανύψωση	Εικόνα αποικίας	Κύτταρο στελέχους ζύμης
ASY38 ( <i>Debaryomyces carsonii</i> )	Λευκό	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Ημίθαμπη	Επίπεδα κυρτή με κεντρικό θόλο		
ASY410 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MA09-AN)	Λευκό	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Θολωτή		
ASY206 ( <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> )	Λευκό	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Ημίθαμπη	Θολωτή με κεντρικό θόλο		
ASY218 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789)	Λευκό και μπεζ στο κέντρο	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Ημίθαμπη	Δακτυλιοειδής		
ASY8 ( <i>Candida cantarellii</i> )	Υπόλευκο	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Θαμπή	Επίπεδα κυρτή		

Στη συνέχεια, εκείνα τα στελέχη ζυμών τα οποία επιλέχθηκαν να απομονωθούν σε αξενικές καλλιέργειες, ομαδοποιήθηκαν με χρήση της μεθόδου ITS-PCR, χρησιμοποιώντας ως κριτήριο κατηγοριοποίησης τα διαφορετικά μεγέθη ζωνών που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση των pcr προϊόντων (Εικ. 3.19). Συγκεκριμένα, κατηγοριοποιήθηκαν σε 4 ομάδες, ενώ τα μεγέθη των PCR προϊόντων για κάθε στέλεχος ήταν τα ακόλουθα: για το στέλεχος ASY8 ήταν 480 bp, για το στέλεχος

ASY218 ήταν 778 bp, για το στέλεχος ASY206 ήταν 677 bp, για το στέλεχος ASY410 778 bp και για το ASY38 ήταν 655 bp. Δύο αντιπρόσωποι από κάθε ομάδα (συνολικά 10 στελέχη) ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια, με βάση την αλληλουχία της ITS1-5,8S-ITS2 ριβοσωμικής περιοχής, με τις ζύμες: *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces carsonii*, *Candida cantarellii* και *Saccharomyces cerevisiae* YJM789 (Πίνακας 3.10).



**Εικόνα 3.19** Πρότυπα ζωνών της αντίδρασης ITS-PCR για τα στελέχη ζυμών. Διαδρομή: 1.ASY206 (*Zygosaccharomyces rouxii*), 2. ASY38 (*Debaryomyces carsonii*). 3. ASY8 (*Candida cantarellii*), 4. ASY218 (*Saccharomyces cerevisiae* YJM789), 5. ASY198 (*Zygosaccharomyces rouxii*), 6. ASY410 (*Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN), 7. 1kb DNA ladder.

**Πίνακας 3.10:** Μοριακή ταυτοποίηση των δυο διακριτών στελεχών ζυμών, μέσω αλληλούχησης της ριβοσωμικής περιοχής ITS1-5,8S-ITS2.

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια	Μέγιστη ομοιότητα (%)	Αριθμός νουκλεοτιδίων <sup>1</sup>
ASY410	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MA09-AN	98,5	778
ASY206	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	99,8	677
ASY8	<i>Candida cantarellii</i>	99,4	480
ASY38	<i>Debaryomyces carsonii</i>	99,2	655
AS218	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789	98,5	778

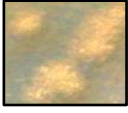
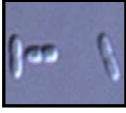
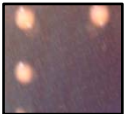

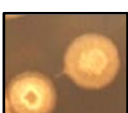
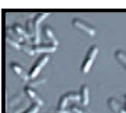


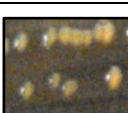
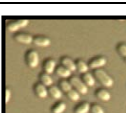


1. Αριθμός νουκλεοτιδίων της ριβοσωμικής περιοχής ITS1-5,8S-ITS2 του στελέχους που χρησιμοποιήθηκαν στην ευθυγράμμιση των αλληλουχιών.

Όπως προκύπτει από τα ανωτέρω αποτελέσματα, οι ζύμες που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν κατά την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, σοδειάς 2011 ήταν οι ίδιες με αυτές που ανακτήθηκαν συνολικά από το δείγμα γλεύκους 2010 (ποικιλία Ασύρτικο) και από το δείγμα κρασιού σοδειάς 2009 (ποικιλία Ασύρτικο).

### 3.3.3 Μοριακή Ταυτοποίηση των στελεχών των βακτηρίων

Από δείγματα γλεύκους που λαμβάνονταν κατά τη διάρκεια της οινοποίησης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, συνολικά, απομονώθηκαν 198 στελέχη βακτηρίων τα οποία επιλέχθηκαν αρχικά με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών τους και σύμφωνα με τις διαφορές ως προς το σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων τους (Πίνακας 3.11), όπου και κατηγοριοποιήθηκαν σε 6 ομάδες.

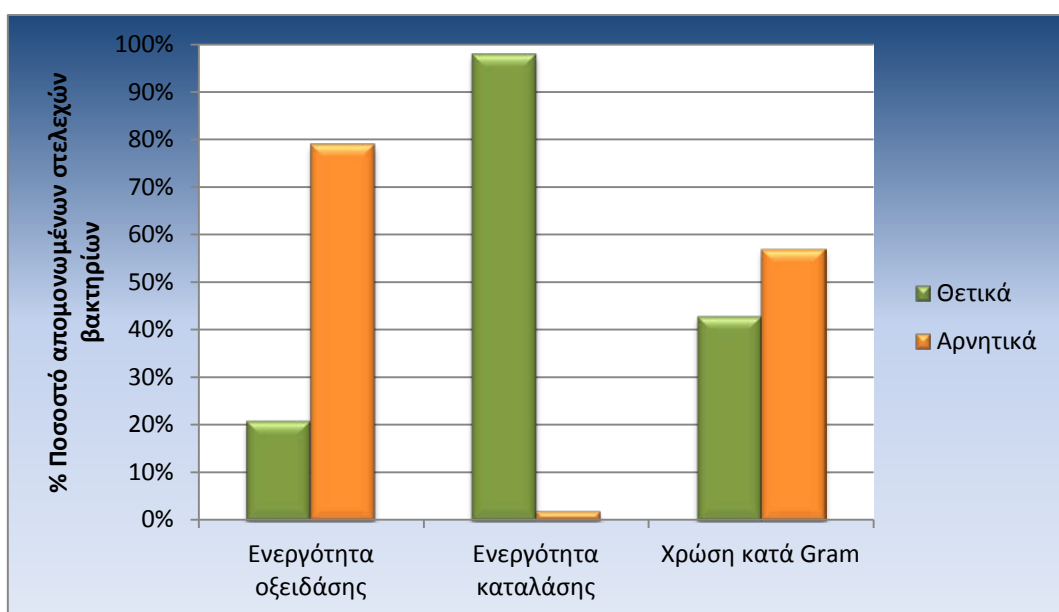
**Πίνακας 3.11:** Μορφολογικά χαρακτηριστικά αποικιών και των κυττάρων στελεχών βακτηρίων που απομονώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS και κυκλοεξιμίδιο, κατά την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους σοδειάς 2011 ποικιλίας Ασύρτικο.

Ταυτοποίηση	Χρώμα	Μορφή	Περιθώριο	Επιφάνεια	Ανύψωση	Εικόνα αποικίας	Κότταρο στελέχους βακτηρίου
ASB92 ( <i>Raenibacillus</i> sp.)	Μπεζ	Επιμήκης	Ριζοειδές	Ακανόνιστη	Επίπεδη και διάχυτη		
ASB36 <i>Kozakia baliensis</i>	Άσπρο	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Επίπεδα κυρτή		
ASB56 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Υπό-λευκό	Κυκλική	Κροσσωτό	Κρατηριοειδές	Θολωτή με κεντρικό θόλο		
ASB42 <i>Bacillus licheniformis</i>	Λευκό	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Επίπεδα κυρτή		
ASB5 <i>Glucanobacter oxydans</i>	Κρεμ	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Επίπεδα κυρτή		
ASB63 ( <i>Bacillus pumilus</i> )	Υπό-λευκό	Κυκλική	Ενιαίο ολόκληρο	Λεία Γυαλιστερή	Επίπεδα κυρτή		



Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών ήταν εφικτή μόνο τις ακόλουθες μέρες οиноποίησης: 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup>, 17<sup>η</sup>, 18<sup>η</sup> και 19<sup>η</sup>. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των κυττάρων των απομονωμένων στελεχών, το κύτταρο του βακτηρίου ASB92 (*Paenibacillus* sp.) έχει σχήμα βακίλλου και μέγεθος 1,26 μm, του ASB36 (*Kozakia baliensis*) είναι βάκιλος μεγέθους 1,44 μm, του ASB56 (*Bacillus amyloliquefaciens*) είναι επίμηκες, σχήματος βακίλλου με μέγεθος 1,42 μm, του ASB42 (*Bacillus licheniformis*) έχει σχήμα βακίλλου και μέγεθος 1,5 μm, του ASB5 (*Gluconobacter oxydans*) είναι κοκκιοβάκιλλος και έχει μέγεθος 0,85 μm και του ASB63 (*Bacillus pumilus*) έχει σχήμα βακίλλου και μέγεθος 1,39 μm.

Στα βακτήρια πραγματοποιήθηκαν, επιπλέον, οι βιοχημικές δοκιμασίες: ανίχνευση ενεργότητας καταλάσης, ανίχνευση ενεργότητας οξειδάσης και χρώση κατά Gram, όπου τα αποτελέσματα αναπαρίστανται συγκεντρωτικά στην Εικόνα 3.20.

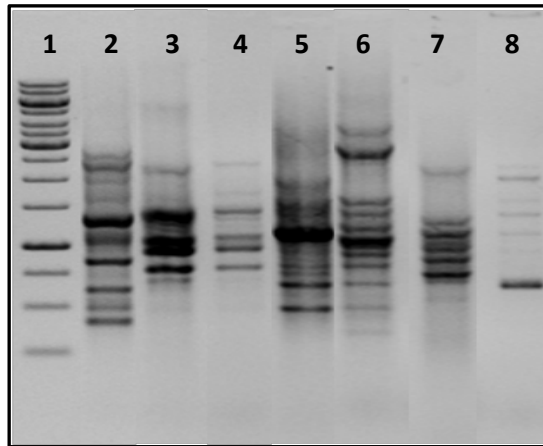


**Εικόνα 3.20** Βιοχημικές δοκιμασίες: ανίχνευση ενεργότητας οξειδάσης, ανίχνευση ενεργότητας καταλάσης και χρώση κατά Gram, στα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη.

Τα στελέχη εκείνα τα οποία επιλέχθηκαν να απομονωθούν σε αξενικές καλλιέργειες, ομαδοποιήθηκαν με χρήση της μεθόδου BOX-PCR (Εικ. 3.21). Με βάση το ραβδωτό πρότυπο που παρουσίασαν κατηγοριοποιήθηκαν σε 6 ομάδες. Δύο αντιπρόσωποι από κάθε ομάδα (συνολικά 12 στελέχη), ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια. με βάση την αλληλουχία του 16S rDNA γονιδίου, με τα βακτήρια: *Paenibacillus* sp., *Kozakia baliensis*, *Bacillus*



*amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Gluconobacter oxydans* και *Bacillus pumilus*. (Πίνακας 3.12).



**Εικόνα 3.21** Πρότυπα ζωνών της αντίδρασης BOX-PCR. Διαδρομή: 1. 1kb DNA ladder, 2. ASB92 (*Paenibacillus* sp.), 3. ASB63 (*Bacillus pumilus*), 4. ASB64 (*Bacillus pumilus*), 5. ASB5 (*Gluconobacter oxydans*), 6. ASB56 (*Bacillus licheniformis*), 7. ASB36 (*Kozakia baliensis*), 8. ASB66 (*Bacillus amyloliquefaciens*).

**Πίνακας 3.12:** Μοριακή ταυτοποίηση των τριών διακριτών στελεχών βακτηρίων, μέσω αλληλούχισης του 16S rDNA γονιδίου.

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια	Μέγιστη ομοιότητα (%)	Αριθμός νουκλεοτιδίων <sup>1</sup>
ASB92	<i>Paenibacillus</i> sp	99	930
ASB36	<i>Kozakia baliensis</i>	99	943
ASB56	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	922
ASB66	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	937
ASB5	<i>Gluconobacter oxydans</i>	98	949
ASB63	<i>Bacillus pumilus</i>	97	932

1. Αριθμός νουκλεοτιδίων του 16S rDNA γονιδίου του στελέχους που χρησιμοποιήθηκαν στην ευθυγράμμιση των αλληλουχιών.

Όπως προκύπτει από τα ανωτέρω αποτελέσματα, τα είδη των βακτηρίων που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν κατά την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, σοδειάς 2011 ήταν οι ίδια με αυτά που ανακτήθηκαν συνολικά από το

δείγμα γλεύκους σοδειάς 2010 (ποικιλία Ασύρτικο) και από το δείγμα κρασιού σοδειάς 2009 (ποικιλία Ασύρτικο).

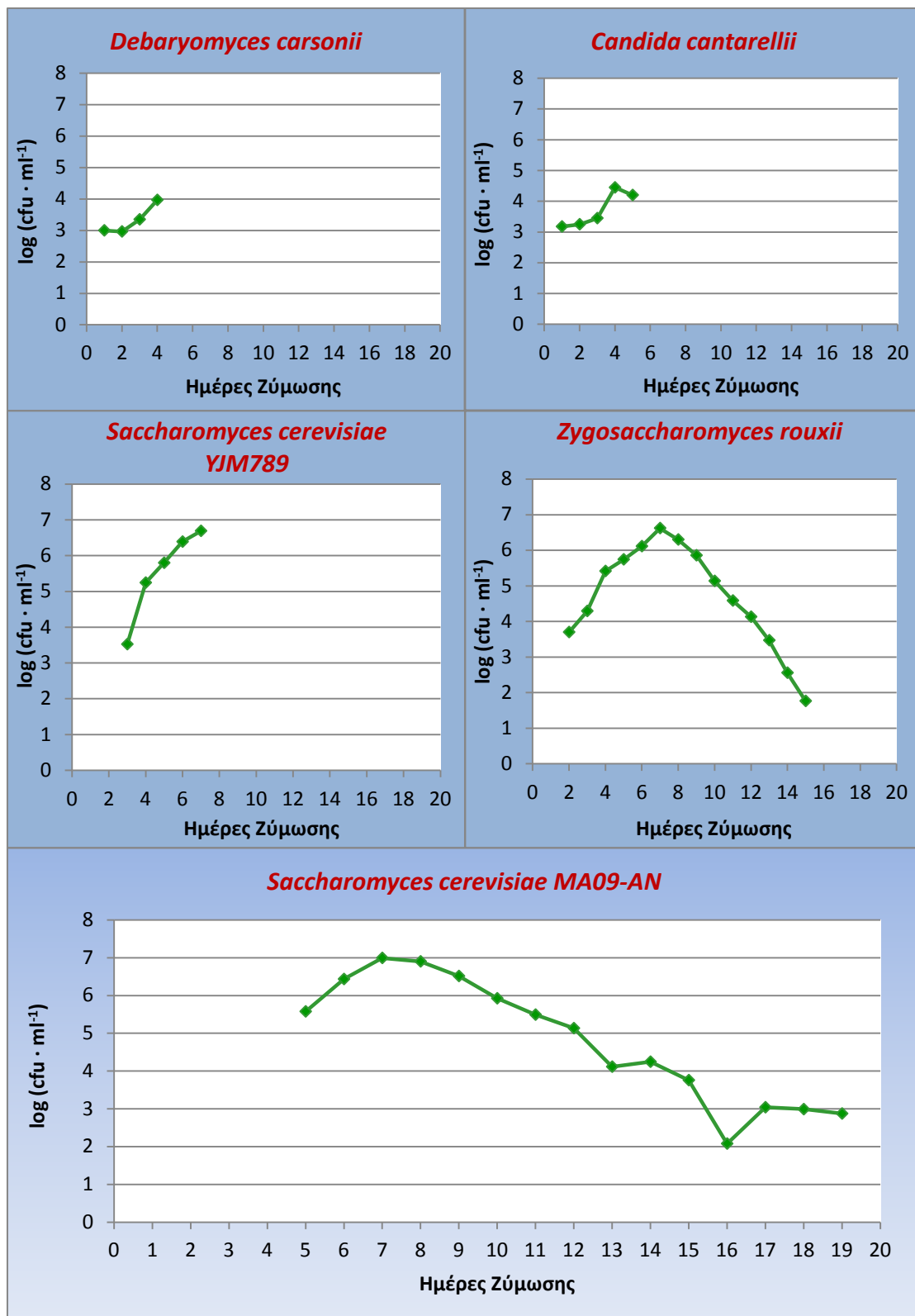
### **3.3.4 Διαδοχή και Επικράτηση των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης**

Η μελέτη της διαδοχής και της επικράτησης των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο περιλαμβάνει: α) τη μελέτη της κινητικής αύξησης των διαφορετικών ειδών ζυμών και β) τον προσδιορισμό της συμμετοχής τους στο συνολικό πληθυσμό των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.3.4.α και 3.3.4.β.

#### **α) Κινητική αύξησης των ειδών των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.**

Κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, μελετήθηκε η κινητική αύξησης των διαφορετικών ενδογενών ειδών ζυμών του γλεύκους. Οι συγκρίσεις έγιναν με βάση το δεκαδικό λογάριθμο του αριθμού των βιώσιμων μονάδων ζυμών·mL<sup>-1</sup> ζυμωμένου γλεύκους. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής απεικονίζονται στην Εικόνα 3.22.

Από την απεικόνιση της κινητικής αύξησης του κάθε είδους ανά ημέρα ζύμωσης, φαίνεται η γενικότερη συμπεριφορά των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Από τη μελέτη του ύψους του πληθυσμού των ειδών παρατηρήθηκε ότι, στην αρχή της ζύμωσης αναπτύχθηκαν και επικράτησαν οι ζύμες *Candida cantarellii* και *Debaryomyces carsonii* φθάνοντας χαμηλότερες τιμές πληθυσμού (4,45 και 3,96, αντίστοιχα), αλλά ακολούθησε γρήγορη πτώση και εξαφάνισή τους (5<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ημέρα, αντίστοιχα). Την 2<sup>η</sup> οиноποίησης εμφανίστηκε η ζύμη *Zygosaccharomyces rouxii*, ενώ την 3<sup>η</sup> μέρα η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* YJM789, φθάνοντας και οι δύο υψηλές τιμές πληθυσμού, δηλαδή 6,3 και 6,69 αντίστοιχα. Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* YJM789 ακολούθως παρουσίασε βαθμιαία πληθυσμιακή πτώση έως και εξαφάνιση την 8<sup>η</sup> ημέρα. Σε αντίθεση, η ζύμη *Zygosaccharomyces rouxii* παρότι δεν έφθασε τη μέγιστη τιμή τελικού πληθυσμού, είναι αξιοσημείωτο ότι επιβίωσε μέχρι το τέλος σχεδόν της ζύμωσης και παράλληλα με το επικρατές στέλεχος ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN, το οποίο εμφανίστηκε στο μέσο περίπου της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, εμφανίστηκε την 5<sup>η</sup> μέρα, το οποίο επικράτησε και έφθασε τη μέγιστη τιμή τελικού πληθυσμού 6,99 και επιβίωσης μέχρι το τέλος της ζύμωσης.

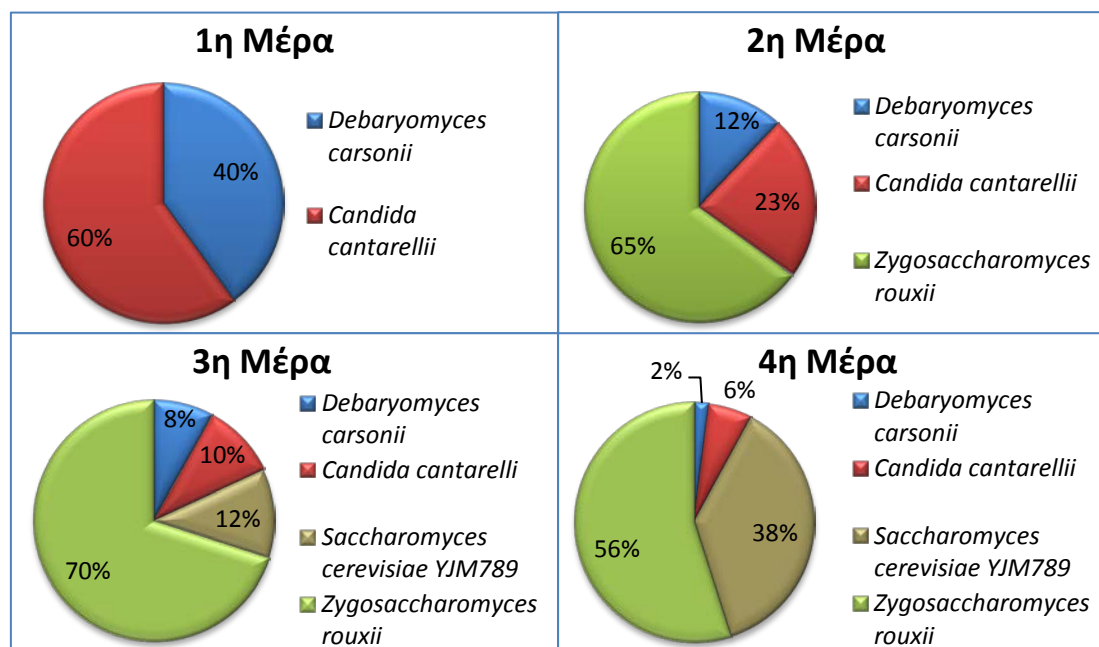


**Εικόνα 3.22** Κινητική αύξησης των ταυτοποιημένων ζυμών: *Candida cantarellii*, *Debaryomyces carsonii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae* YJM789 και *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN κατά την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο και σοδειάς 2011.

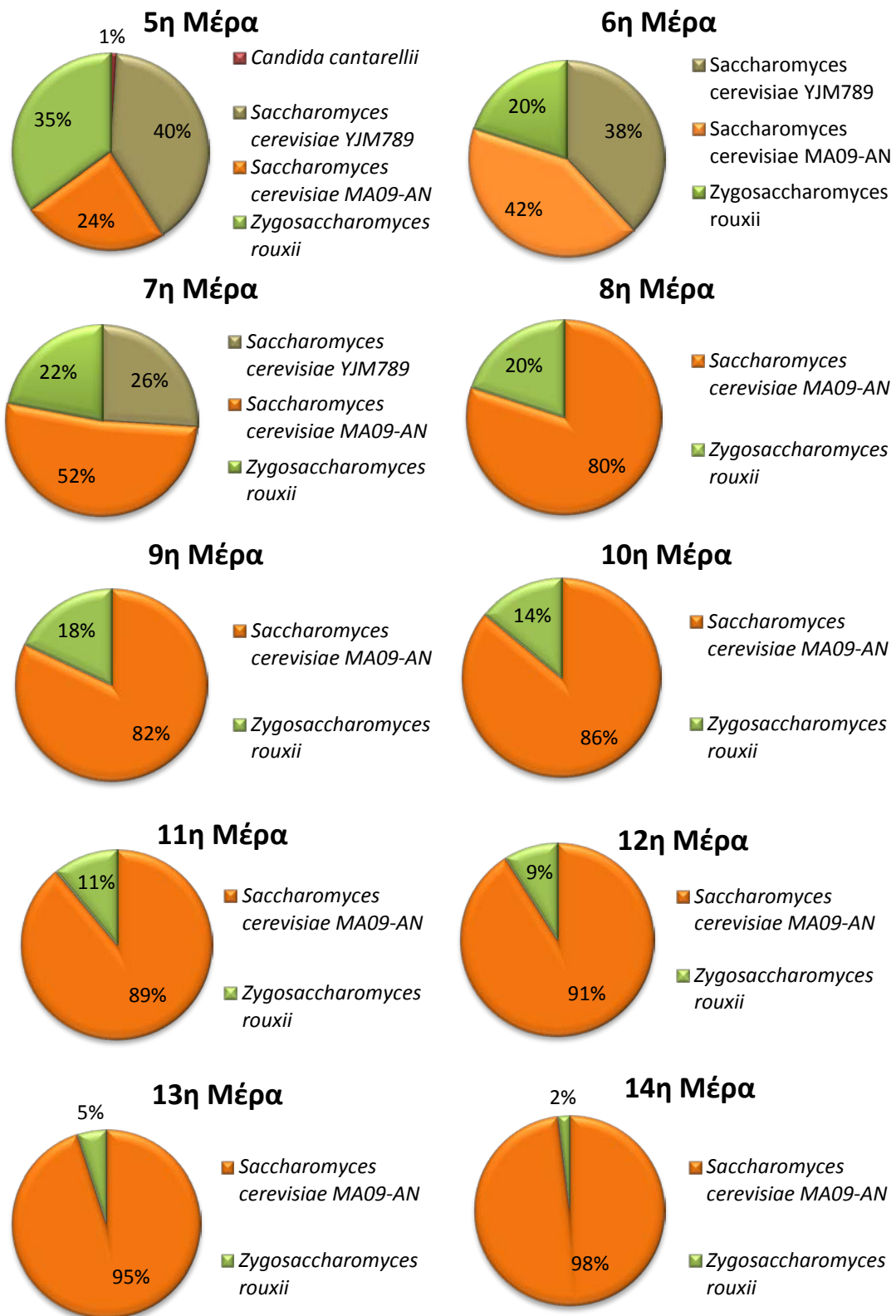
## β) Συμμετοχή των ειδών των ζυμών κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης.

Κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, μελετήθηκε το ποσοστό συμμετοχής των ενδογενών ζυμών ανά ημέρα ζύμωσης κατά την οινοποίηση, τα αποτελέσματα της οποίας απεικονίζονται στις Εικόνες 3.23, 3.24 και 3.25.

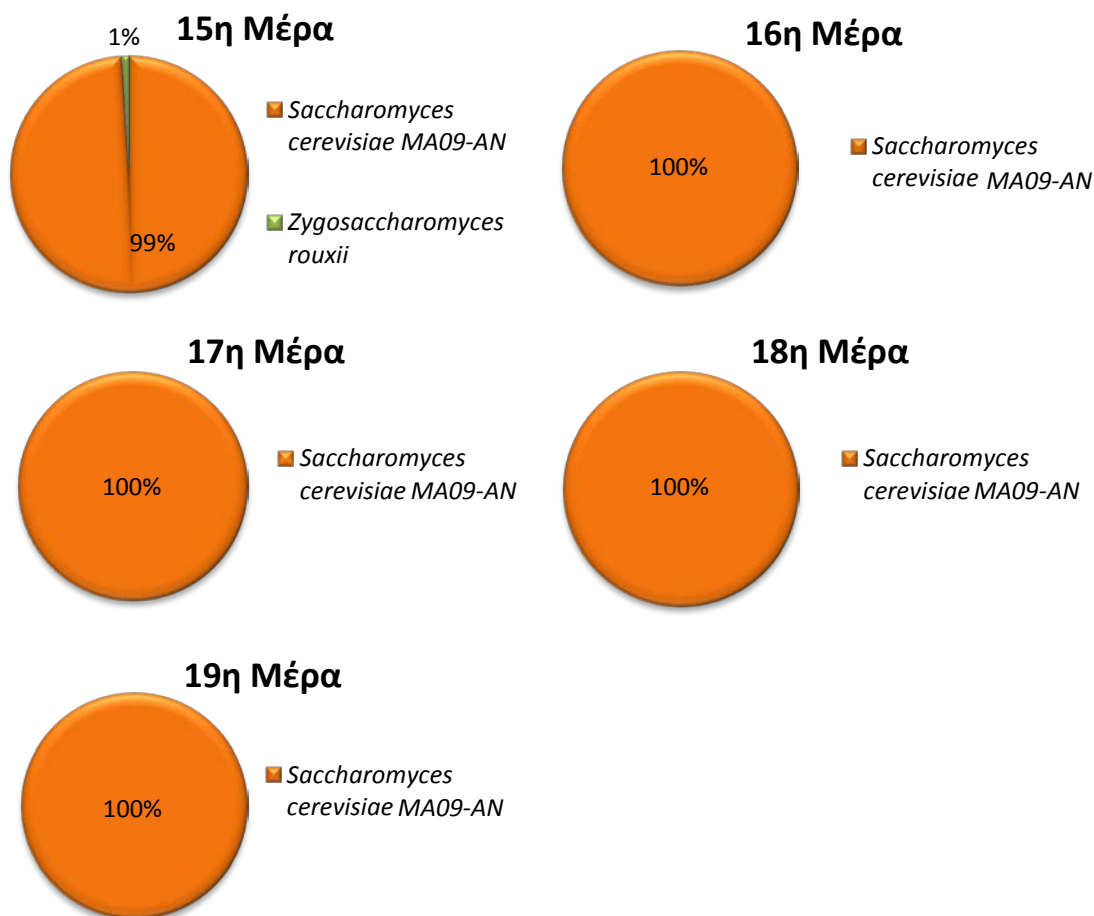
Παρατηρείται ότι στην αρχή της ζύμωσης επικράτησαν οι ζύμες *Debaryomyces carsonii* και *Candida cantarellii*, με μέγιστη ποσοστιαία συμμετοχή 40% και 60%, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, εμφανίστηκαν με τη σειρά που αναφέρονται τα ακόλουθα είδη ζυμών και με τις εξής μέγιστες τιμές συμμετοχής: *Zygosaccharomyces rouxii* με 70% και *Saccharomyces cerevisiae* YJM789 με 40%. Ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* YJM789 οδηγήθηκε απότομα σε μείωση κάτω του ορίου ανίχνευσης προς το μέσο της ζύμωσης. Σε αντίθεση με τη ζύμη *Zygosaccharomyces rouxii*, η οποία επιβίωσε σχεδόν μέχρι το τέλος της ζύμωσης, αλλά με πολύ χαμηλά ποσοστά συμμετοχής και υπερκαλυπτόμενο από τον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN (εμφανίστηκε περίπου στο μέσο της ζύμωσης), ο οποίος κυριάρχησε και ολοκλήρωσε τη ζύμωση με 100% συμμετοχή στο τέλος αυτής.



**Εικόνα 3.23** Ποσοστιαία συμμετοχή των ειδών των ζυμών κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο και σοδειάς 2011.



**Εικόνα 3.24** Ποσοστιαία συμμετοχή των ειδών των ζυμών κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκος ποικιλίας Ασύρτικο και σοδειάς 2011.



**Εικόνα 3.25** Ποσοστιαία συμμετοχή των ειδών των ζυμών κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο και σοδειάς 2011.

### 3.3.5 Διαδοχή και Επικράτηση των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Η μελέτη της διαδοχής και της επικράτησης των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο περιλαμβάνει: α) τη μελέτη της κινητικής αύξησης των διαφορετικών ειδών βακτηρίων και β) τον προσδιορισμό της συμμετοχής τους στο συνολικό πληθυσμό των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

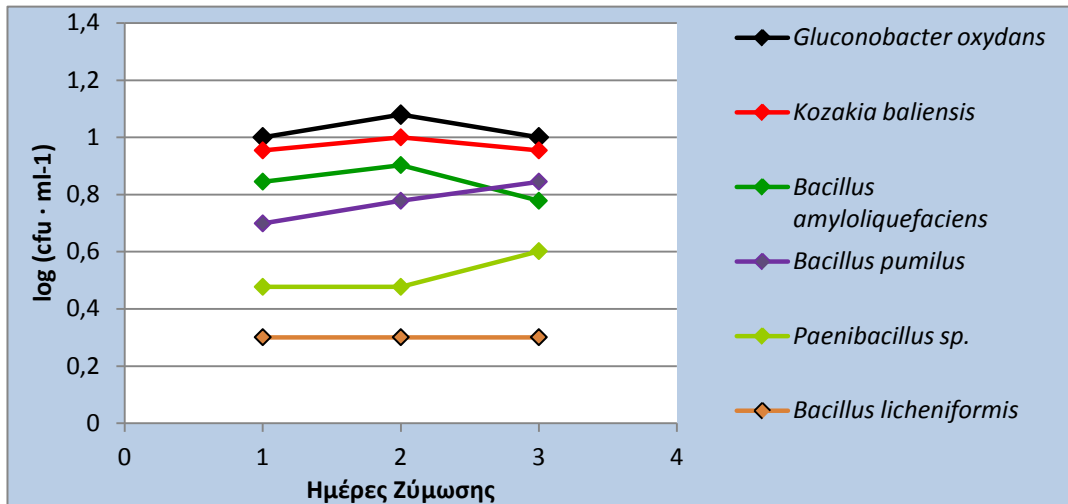
#### α) Κινητική αύξησης των ειδών των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, μελετήθηκε η κινητική αύξησης των διαφορετικών ενδογενών ειδών βακτηρίων του γλεύκους. Οι συγκρίσεις έγιναν με βάση το δεκαδικό λογάριθμο του αριθμού των βιώσιμων μονάδων βακτηρίων·mL<sup>-1</sup> ζυμωμένου γλεύκους.

Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η γενικότερη συμπεριφορά των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Όμως, μόνο εν μέρει μπορεί να γίνει η απεικόνιση των πληθυσμών κάθε είδους, καθ' ότι η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών δεν ήταν εφικτή καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, παρά μόνο τις πρώτες 3 και τις τελευταίες 3 ημέρες της οινοποίησης. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, μείωση του πληθυσμού τους, κάτω του ορίου ανίχνευσής τους. Στα τελευταία όμως στάδια, όπου ο συνολικός πληθυσμός των ζυμών μειώθηκε και επικράτησαν μόνο στελέχη του *S. cerevisiae*, ορισμένα είδη βακτηρίων μπόρεσαν να «επανακάμψουν» και εν τέλει να απομονωθούν. Από τη μελέτη του ύψους του πληθυσμού των ειδών, παρατηρήθηκε ότι στην αρχή της ζύμωσης (1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> μέρα) αναπτύχθηκαν τα βακτήρια *Paenibacillus* sp., *Kozakia baliensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Gluconobacter oxydans* και *Bacillus pumilus*, φθάνοντας σε τιμές τελικού πληθυσμού: 0,6, 0,7, 0,84, 1, 0,9, 0,3, 1 και 0,84, αντίστοιχα (Πίνακας 3.13 και Εικ 3.26). Είναι φανερό ότι τα οξικά βακτήρια (*Kozakia baliensis* και *Gluconobacter oxydans*) επικράτησαν έναντι των υπόλοιπων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια *Paenibacillus* sp. και *Bacillus pumilus*, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα είδη, παρουσίασαν σταδιακή πληθυσμιακή αύξηση, η παρουσία των οποίων «διακόπηκε» στο ενδιάμεσο της ζύμωσης, λόγω αδυναμίας απομόνωσής τους, αλλά «επανεμφανίστηκαν» τις 3 τελευταίες μέρες με τιμές τελικού πληθυσμού: 1,04 και 0,9, αντίστοιχα, ενώ τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη οδηγήθηκαν σε μείωση κάτω από το όριο ανίχνευσης (Πίνακας 3.14 και Εικ. 3.27).

**Πίνακας 3.13** Πληθυσμός [ $\log(\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1})$ ] των ταυτοποιημένων βακτηρίων τις πρώτες τρεις μέρες ζύμωσης του γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο και σοδειάς 2011.

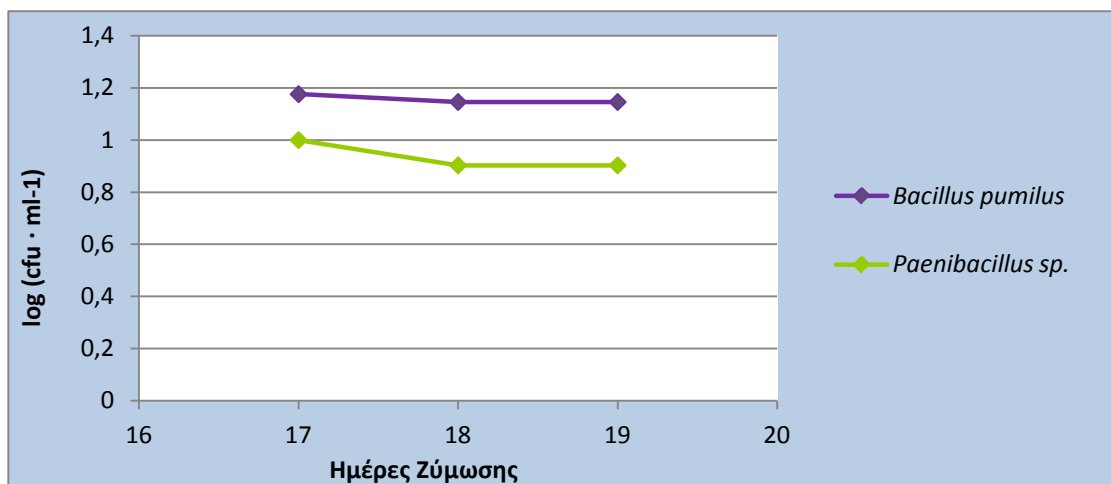
$\log(\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1})$ Ημέρες Ζύμωσης	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Kozakia baliensis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Bacillus licheniformis</i>
1η	1	0,95	0,86	0,69	0,48	0,31
2η	1,08	1	0,91	0,78	0,48	0,31
3η	1	0,95	0,78	0,84	0,61	0,31



**Εικόνα 3.26** Κινητική αύξησης των ταυτοποιημένων βακτηρίων κατά την έναρξη της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο και σοδειάς 2011.

**Πίνακας 3.14** Πληθυσμός [ $\log (\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1})$ ] των ταυτοποιημένων βακτηρίων τις τρεις τελευταίες μέρες ζύμωσης του γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο και σοδειάς 2011.

$\log (\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1})$ Ημέρες Ζύμωσης	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>
17	0,69	0,48
18	0,78	0,48
19	0,84	0,61



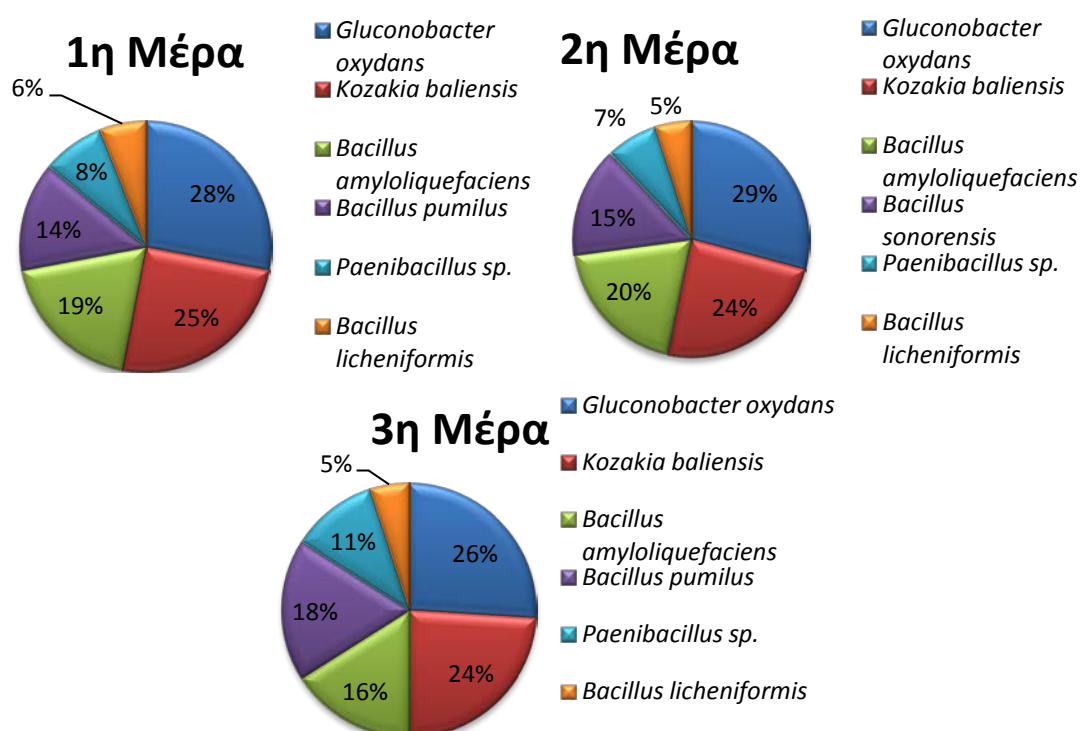
**Εικόνα 3.27** Κινητική αύξησης των ταυτοποιημένων βακτηρίων κστο τέλος της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο και σοδειάς 2011.



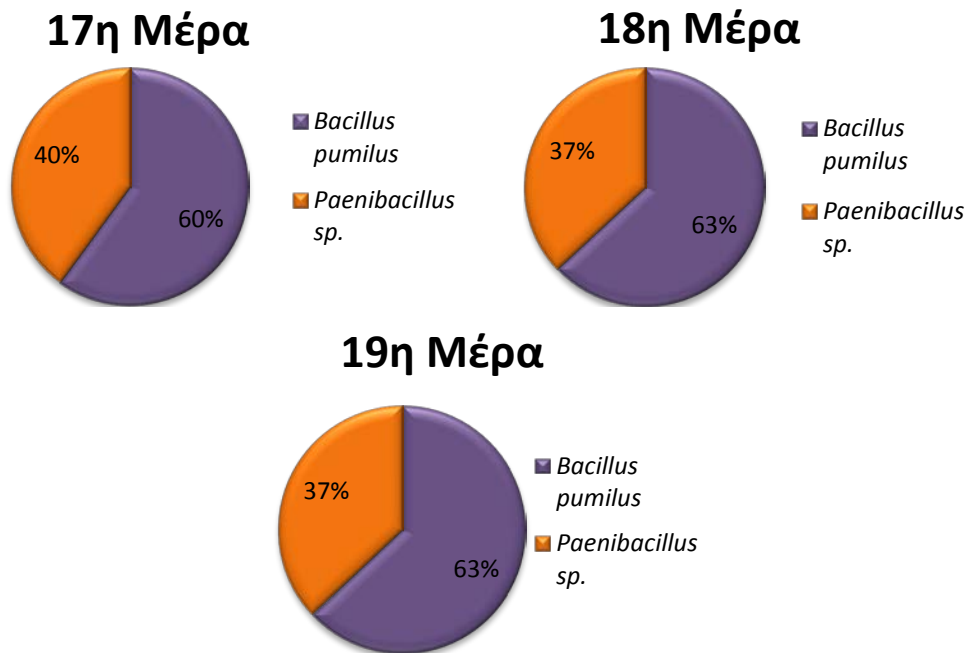
## β) Συμμετοχή των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης.

Κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, μελετήθηκε η (ποσοστιαία %) συμμετοχή των ενδογενών βακτηρίων ανά ημέρα ζύμωσης κατά την οινοποίηση, τα αποτελέσματα της οποίας απεικονίζονται στις Εικόνες 3.28 και 3.29.

Παρατηρείται, λοιπόν, ότι στην αρχή της ζύμωσης επικράτησαν τα βακτήρια *Kozakia baliensis* και *Gluconobacter oxydans*, με μέγιστη ποσοστιαία συμμετοχή 25% και 28%, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα είδη, που απομονώθηκαν παράλληλα με τα προαναφερθέντα, εμφάνισαν χαμηλότερη ποσοστιαία συμμετοχή τελικού πληθυσμού και είναι τα εξής: *Paenibacillus* sp. με 11%, *Bacillus amyloliquefaciens* με 20%, *Bacillus licheniformis* με 6%, και *Bacillus pumilus* με 18%. Τις τρεις τελευταίες μέρες της αυθόρμητης ζύμωσης επικράτησαν μόνο τα βακτήρια *Paenibacillus* sp. και *Bacillus pumilus*, τα οποία συμμετείχαν στον τελικό πληθυσμό των βακτηρίων κατά 40% και 60%, αντίστοιχα. Φαίνεται πως, κανένα από τα δύο αυτά είδη δεν επικράτησε στο 100%, φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε στις ζύμες. Τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη δεν μπόρεσαν να απομονωθούν στα τελευταία στάδια της ζύμωσης καθώς ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης.



Εικόνα 3.28 Ποσοστιαία συμμετοχή των ειδών των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο και σοδειάς 2011.



**Εικόνα 3.29** Ποσοστιαία συμμετοχή των ειδών των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο και σοδειάς 2011.

### 3.3.6 Ποιοτική και Ποσοτική χημική ανάλυση του κρασιού μετά τη ζύμωση

Οι χημικές αναλύσεις (οι οποίες πραγματοποιήθηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.12) του ζυμωθέντος γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, προϊόν της αυθόρμητης οινοποίησης σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα, έδωσαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων:  $136 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Εκτίμηση ολικής οξύτητας:  $9,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Αλκοολικοί βαθμοί:  $13^\circ$

Παρατηρήθηκε ότι η κατά τη ζύμωση του γλεύκους καταναλώθηκαν  $234 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  σάκχαρα (~ 63 % κατανάλωση) τα οποία οδήγησαν στην αύξηση της ολικής οξύτητας του γλεύκους σε τελική τιμή  $9,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Τόσο τα ποιοτικά όσο και τα ποσοτικά χαρακτηριστικά του γλεύκους αυτού δεικνύουν την καλή προσαρμογή των διαφορετικών ειδών στο περιβάλλον του οίνου.

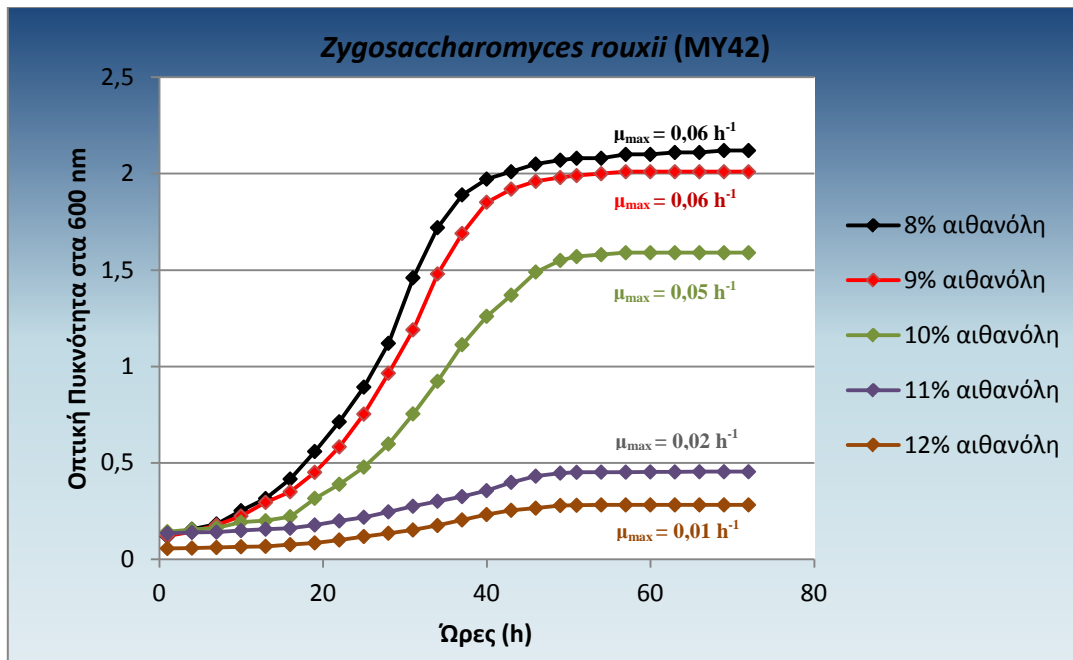
### 3.4 Ανθεκτικότητα των στελεχών ζυμών σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης

Δύο αντιπρόσωποι από κάθε ταυτοποιημένο γένος ζυμών (ένα στέλεχος από το δείγμα γλεύκους σοδειάς 2010, ποικιλίας Ασύρτικο, με εξαίρεση το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN το οποίο ανακτήθηκε από δείγμα κρασιού σοδειάς 2009 και το άλλο στέλεχος από την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους, ποικιλίας Ασύρτικο) μελετήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν σε συγκεντρώσεις αιθανόλης: 8% - 12% (v/v), σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ (§2.2), υπό αναερόβιες συνθήκες, σε 150 rpm και για 72 h. Η ανθεκτικότητα σε κάθε συγκέντρωση αιθανόλης εκτιμήθηκε προσδιορίζοντας τη βιομάζα μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του λαμβανόμενου δείγματος στα 600 nm και υπολογίζοντας την τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{max}$ ) σε κάθε καμπύλη αύξησης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.10.4.

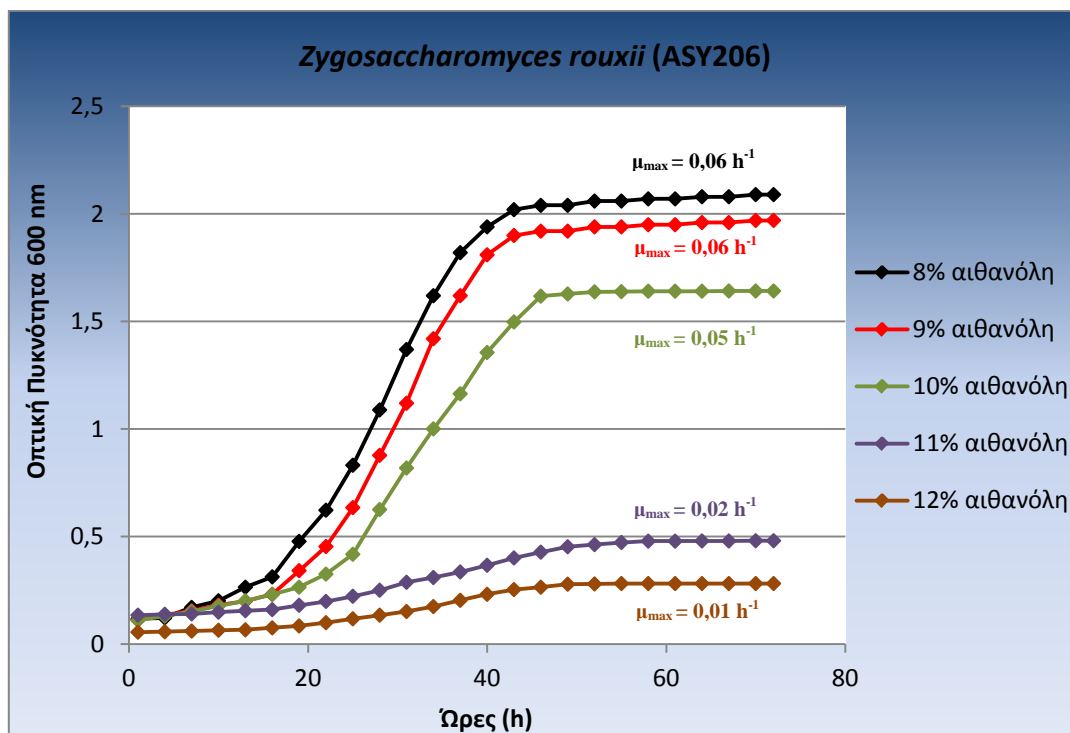
Στην Εικόνα 3.30 παρουσιάζονται δυο διαφορετικά στελέχη ζυμών, από τα οποία το ένα παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε συγκέντρωση αιθανόλης 9% (Εικ. 3.30B), ενώ στο άλλο στέλεχος δεν παρατηρείται ανάπτυξη άρα και ανθεκτικότητα στην ίδια συγκέντρωση (Εικ. 3.30A). Τα συνολικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.15.



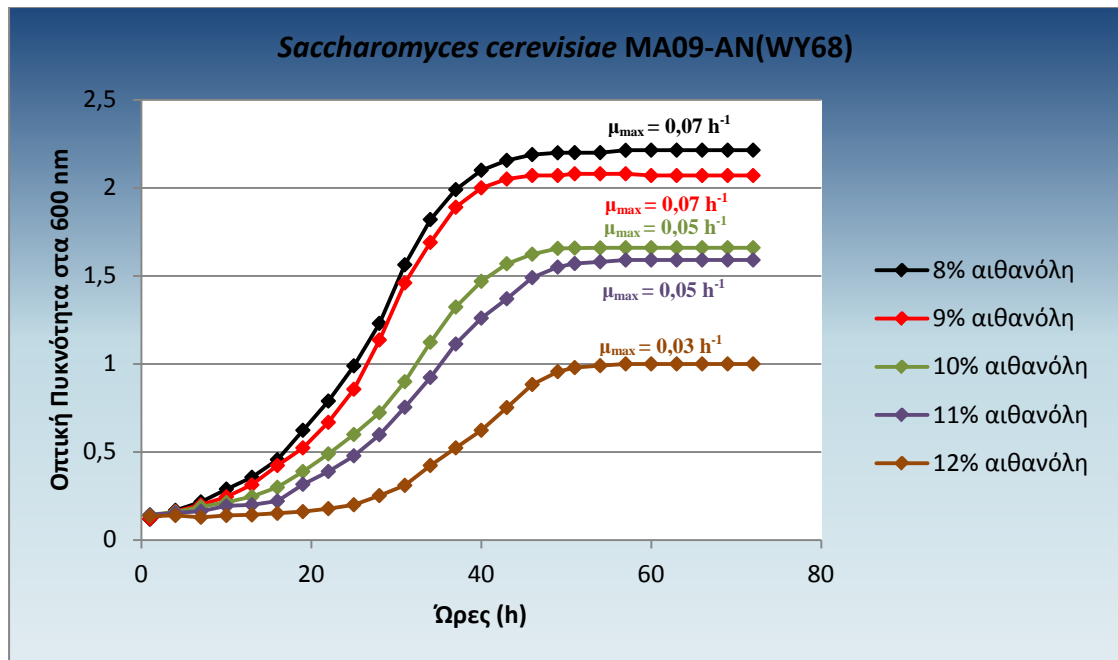
**Εικόνα 3.30** Α. Ειδικό φιαλίδιο για αναερόβιες συνθήκες με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ + αιθανόλη 9% (v/v), στο οποίο δεν παρατηρείται η ανάπτυξη του εμβολιασμένου στελέχους ζύμης μετά το πέρας των 72 h (μη ανθεκτικό). Β. Ειδικό φιαλίδιο με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ + αιθανόλη 9% (v/v), στο οποίο παρατηρείται η ανάπτυξη του εμβολιασμένου στελέχους ζύμης (ανθεκτικό) μετά από 72 h.



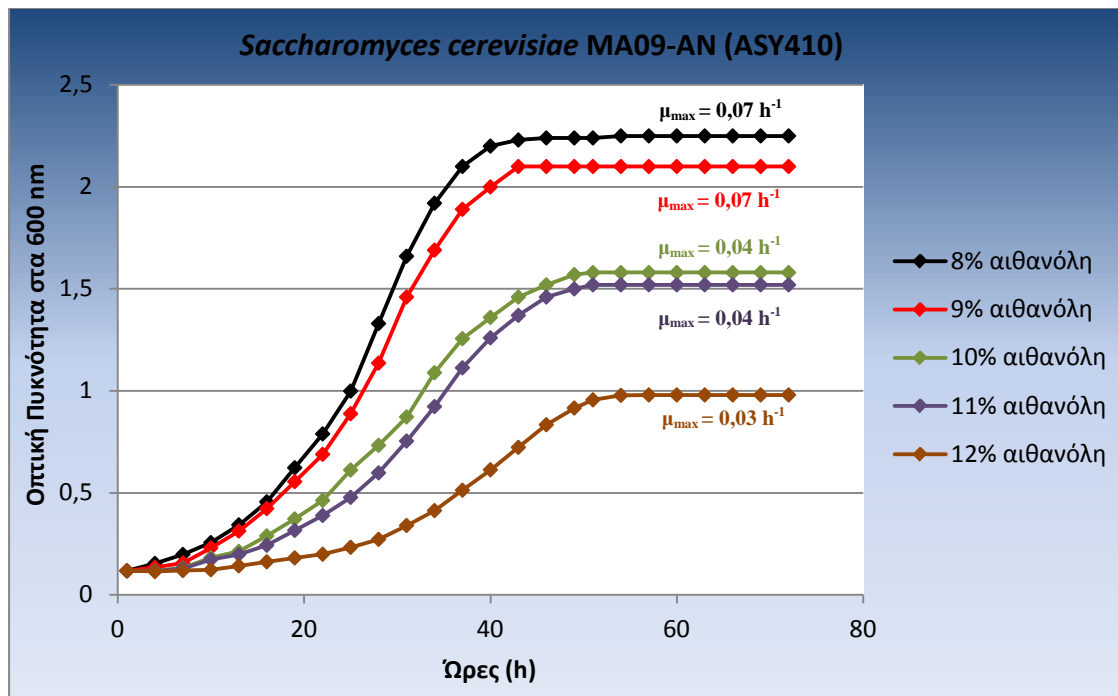
**Εικόνα 3.31** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Zygosaccharomyces rouxii* (MY42) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEA, στις συγκεντρώσεις 8% - 12% αιθανόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



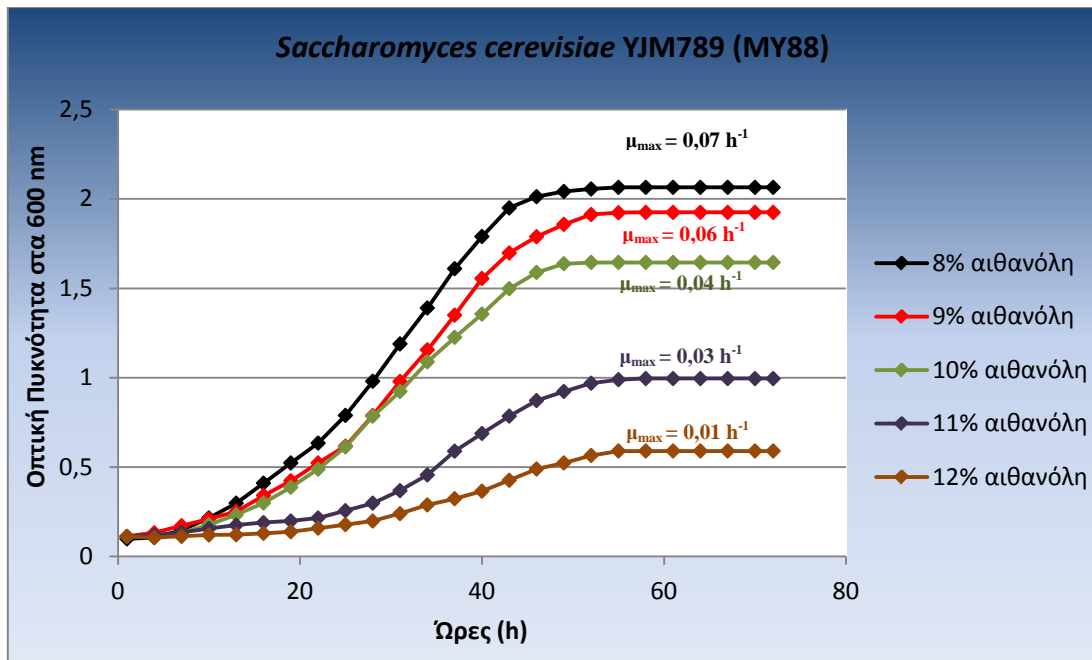
**Εικόνα 3.32** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Zygosaccharomyces rouxii* (ASY206) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEA, στις συγκεντρώσεις 8% - 12% (v/v) αιθανόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



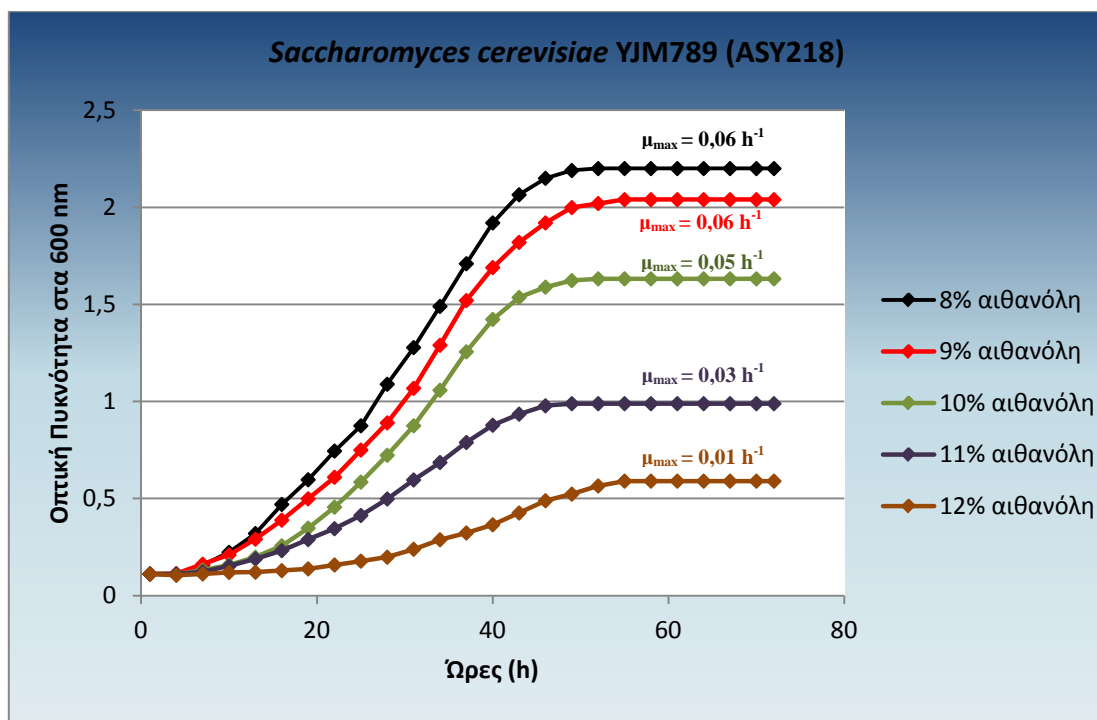
**Εικόνα 3.33** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN (WY68) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEA, στις συγκεντρώσεις 8% - 12% (v/v) αιθανόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



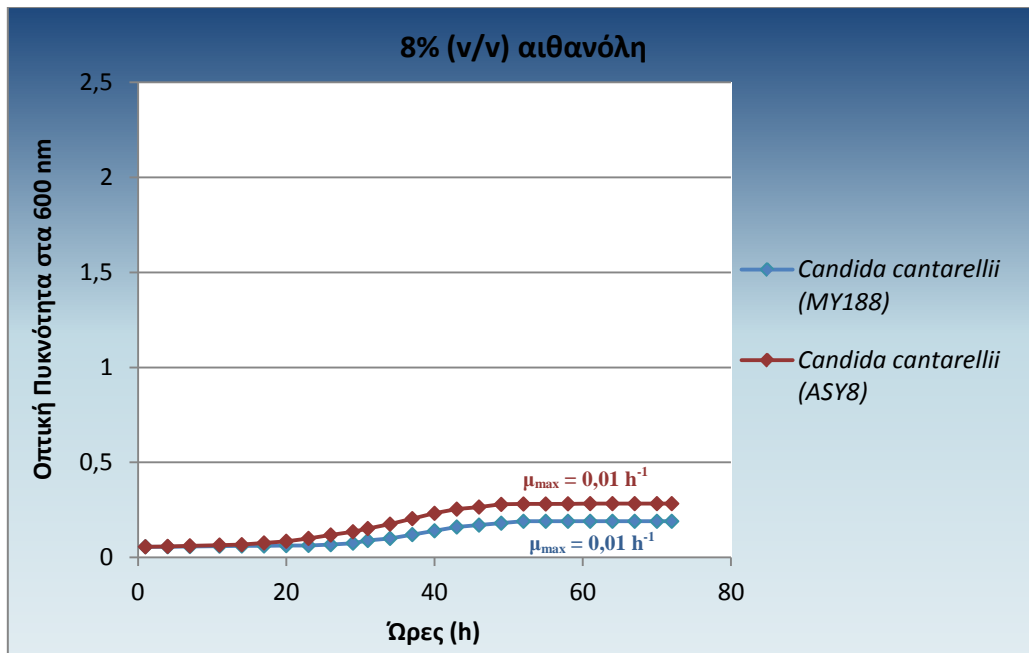
**Εικόνα 3.34** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN (ASY410) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEA, στις συγκεντρώσεις 8% - 12% (v/v) αιθανόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



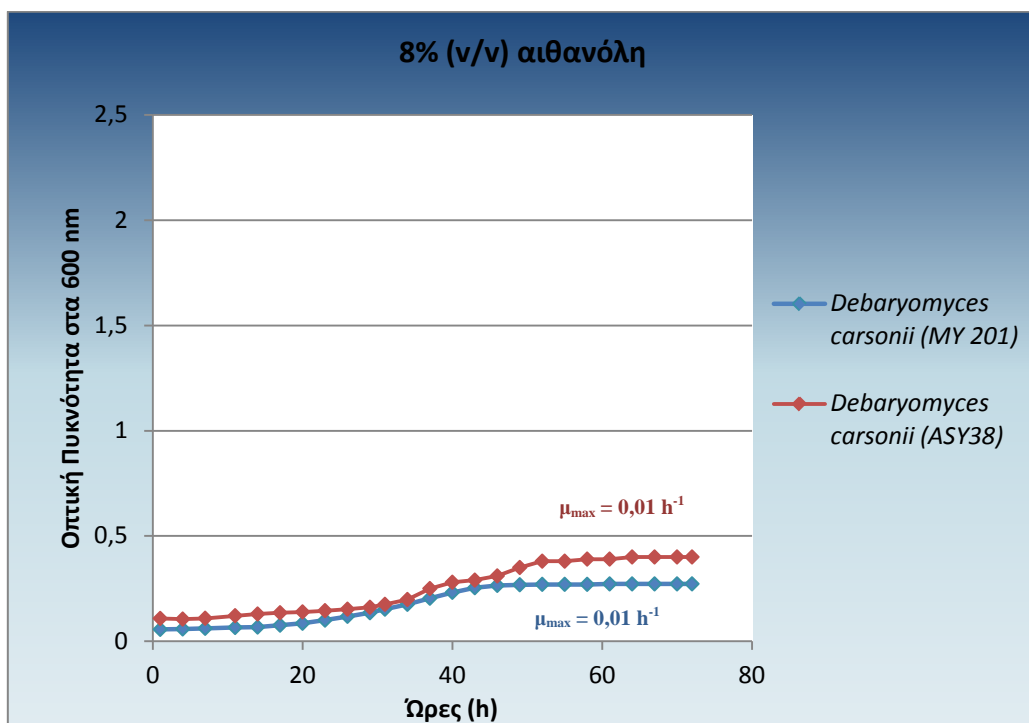
**Εικόνα 3.35** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* YJM789 (MY88) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEA, στις συγκεντρώσεις 8% - 12% (v/v) αιθανόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



**Εικόνα 3.36** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* YJM789 (ASY218) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEA, στις συγκεντρώσεις 8% - 12% (v/v) αιθανόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



**Εικόνα 3.37** Καμπύλες αύξησης των στελεχών *Candida cantarellii*: MY188 και ASY8 στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEA, σε 8% (v/v) αιθανόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες.



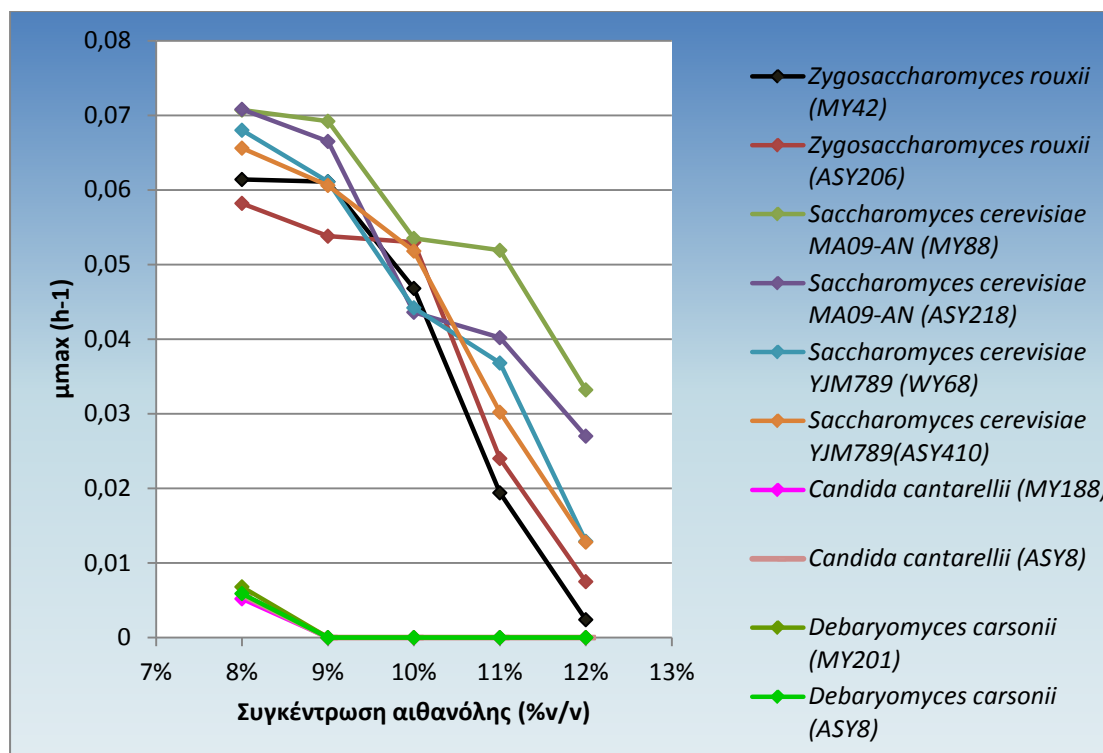
**Εικόνα 3.38** Καμπύλες αύξησης των στελεχών *Debaryomyces carsonii*: MY201 και ASY38 στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MEA, σε 8% (v/v) αιθανόλη, υπό αναερόβιες συνθήκες.

Από τον Πίνακα 3.13 καθώς και από τις αντίστοιχες εικόνες για κάθε στέλεχος ζύμης προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα. Τα στελέχη της ζύμης *S. cerevisiae* MA09-AN παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα σε αιθανόλη 12% (v/v), συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη ζυμών που μελετήθηκαν, με  $\mu_{\max} = 0,03 \text{ h}^{-1}$  τόσο για το στέλεχος MY88 (Εικ. 3.33) όσο και για το στέλεχος ASY218 (Εικ. 3.34). Σε αντίθεση, στο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* YJM789 (Εικ. 3.36 και 3.37) οι αντίστοιχες τιμές του ειδικού ρυθμού αύξησης ήταν χαμηλότερες και συγκεκριμένα  $0,01 \text{ h}^{-1}$  για τα στελέχη ASY410 και WY68. Στη ζύμη *Zygosaccharomyces rouxii* παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα σε συγκέντρωση αιθανόλης 11% (v/v), ενώ στο 12% (v/v) εμφανίστηκε πολύ μικρή ανάπτυξη (Εικ. 3.31 και 3.32). Τα στελέχη *Candida cantarelli* (Εικ. 3.37) και *Debaryomyces carsonii* (Εικ. 3.38) παρουσίασαν αρκετά μικρή ανάπτυξη σε συγκέντρωση αιθανόλης 8% (v/v), ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις δεν σημειώθηκε καμία ανάπτυξη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα ίδια στελέχη παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο ανάπτυξης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Απεικόνιση των συνολικών τιμών  $\mu_{\max}$  που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.15 αποτελεί η Εικόνα 3.39, στην οποία φαίνεται συγκεντρωτικά η συμπεριφορά όλων των στελεχών των ζυμών στις μελετημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης.

**Πίνακας 3.15** Απεικόνιση της ανθεκτικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης μέσω της τιμής  $\mu_{\max}$  των εξεταζόμενων στελεχών ζυμών.

Αιθανόλη (% v/v)	8%	9%	10%	11%	12%
Στέλεχος [ $\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )]					
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (MY42)	0,06	0,06	0,05	0,02	0,01
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (ASY206)	0,06	0,06	0,05	0,01	0,01
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MA09-AN (WY68)	0,07	0,07	0,05	0,05	0,03
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MA09-AN (ASY410)	0,07	0,07	0,04	0,04	0,03
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789 (MY88)	0,07	0,06	0,04	0,04	0,01
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789 (ASY218)	0,07	0,06	0,05	0,03	0,01
<i>Candida cantarelli</i> (MY188)	0,01	-	-	-	-
<i>Candida cantarelli</i> (ASY8)	0,01	-	-	-	-
<i>Debaryomyces carsonii</i> (MY201)	0,0	-	-	-	-
<i>Debaryomyces carsonii</i> (ASY38)	0,01	-	-	-	-



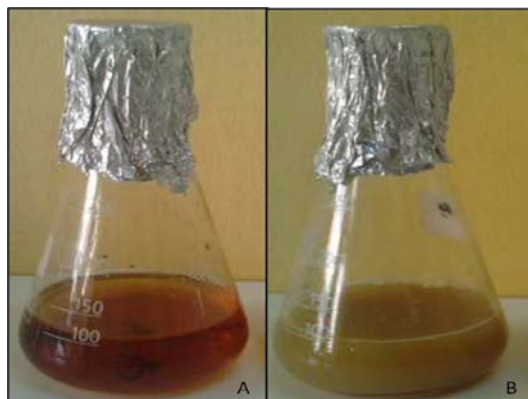


**Εικόνα 3.39** Γραφική απεικόνιση της τιμής  $\mu_{\max}$  σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις αιθανόλης 8 – 12 % v/v για όλα τα στελέχη τα οποία μελετήθηκαν.

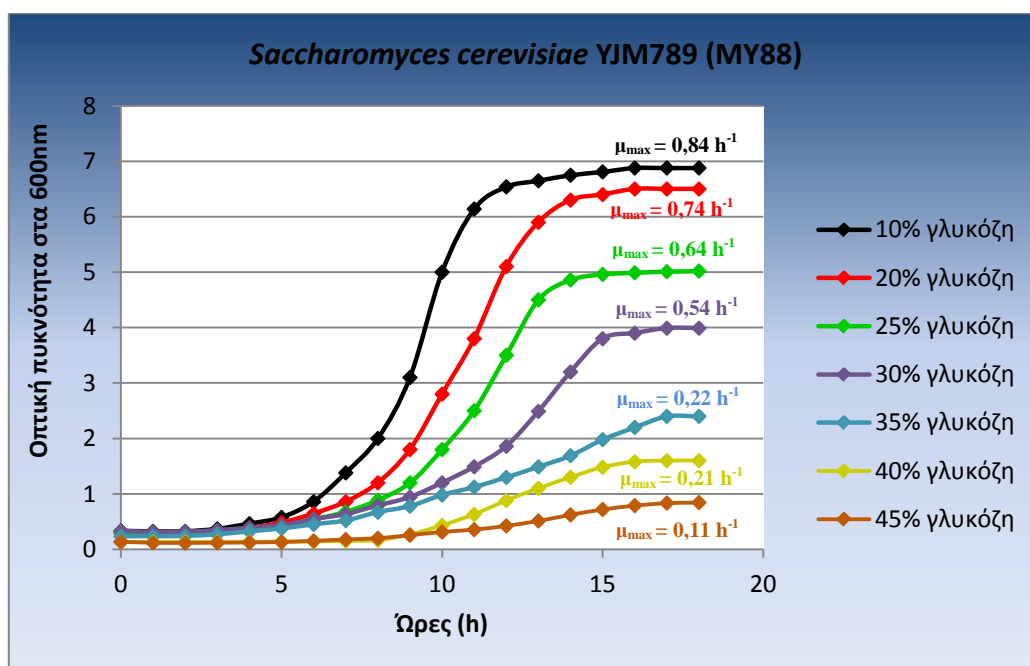
### 3.5 Ανθεκτικότητα διαφορετικών στελεχών ζυμών σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης

Δύο αντιπρόσωποι από κάθε ταυτοποιημένο γένος ζυμών (ένα στέλεχος από το δείγμα γλεύκους σοδειάς 2010, ποικιλίας Ασύρτικο, με εξαίρεση το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN WY68 το οποίο ανακτήθηκε από δείγμα κρασιού σοδειάς 2009 και το άλλο στέλεχος από την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους, ποικιλίας Ασύρτικο) μελετήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν στις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης: 100 g·L<sup>-1</sup>, 200 g·L<sup>-1</sup>, 250 g·L<sup>-1</sup>, 300 g·L<sup>-1</sup>, 350 g·L<sup>-1</sup>, 400 g·L<sup>-1</sup> και 450 g·L<sup>-1</sup>, σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG (§2,2), υπό αερόβιες συνθήκες για 18 h. Η ανθεκτικότητα σε κάθε συγκέντρωση γλυκόζης εκτιμήθηκε προσδιορίζοντας τη βιομάζα μέσω μέτρησης της οπτικής απορρόφησης του λαμβανόμενου δείγματος στα 600 nm και υπολογίζοντας την τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης ( $\mu_{\max}$ ) σε κάθε καμπύλη αύξησης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.10.4. Στην Εικόνα 3.40 παρουσιάζονται δυο διαφορετικά στελέχη ζυμών, από τα οποία το ένα παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε συγκέντρωση γλυκόζης 40% (w/v) (Εικ. 3.40B), ενώ στο άλλο στέλεχος δεν παρατηρείται ανάπτυξη άρα και ανθεκτικότητα

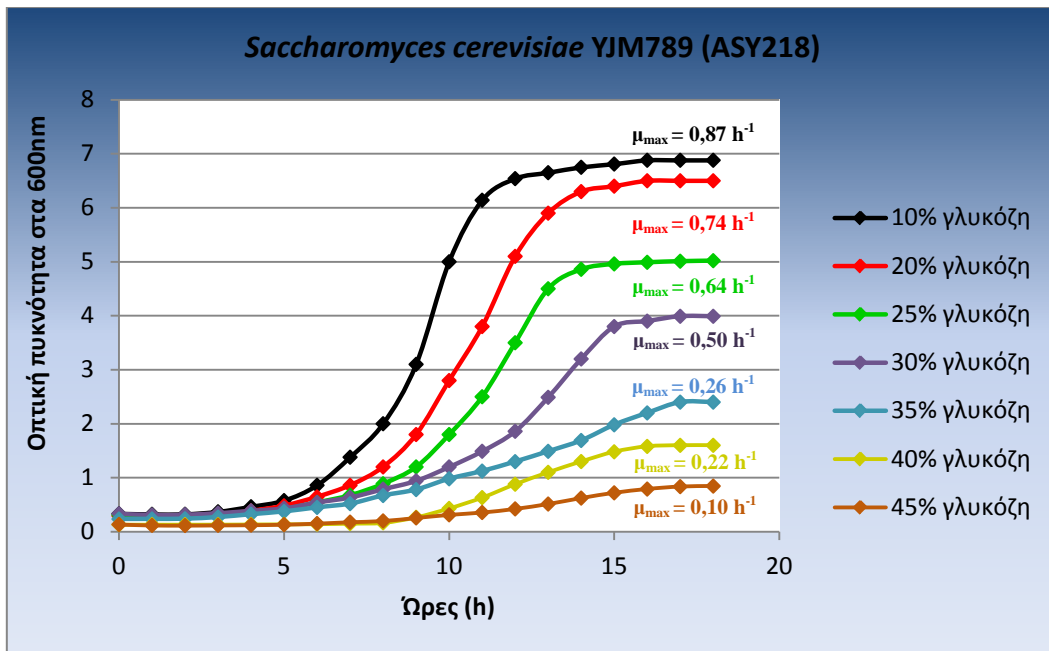
στην ίδια συγκέντρωση γλυκόζης (Εικ. 3.40Α). Τα συνολικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.16.



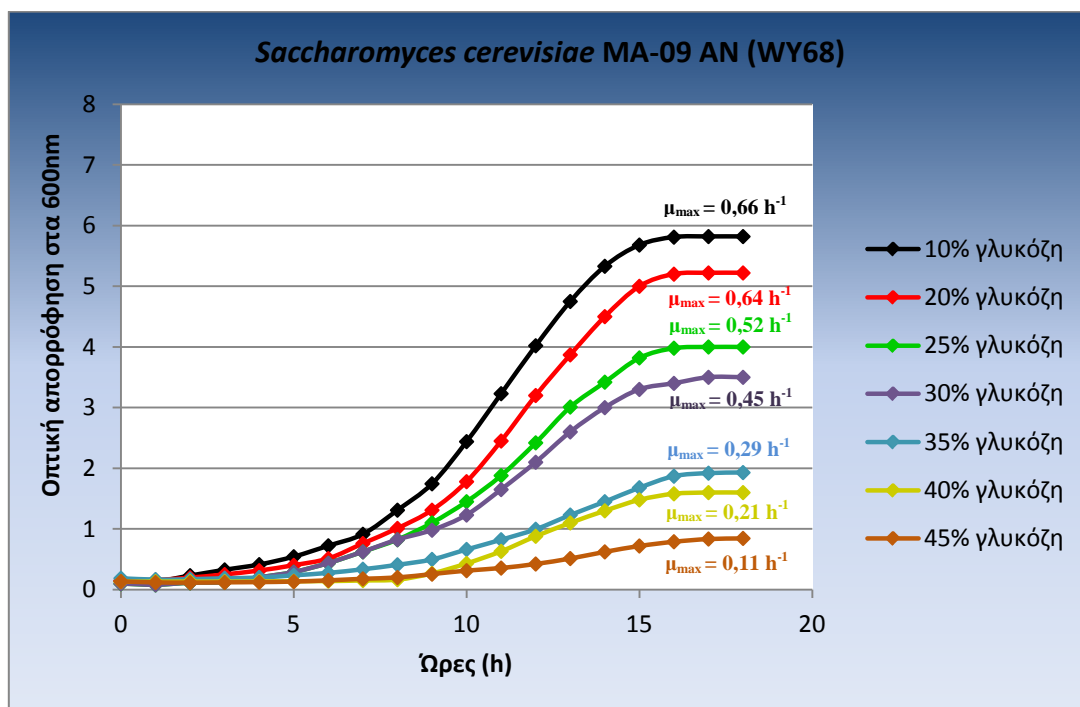
**Εικόνα 3.40** Α. Κωνική φιάλη των 250 mL με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG + γλυκόζη 40% (w/v), όπου δεν παρατηρείται η ανάπτυξη του εμβολιασμένου στελέχους ζύμης μετά το πέρας των 18 h (μη ανθεκτικό). Β. Κωνική φιάλη των 250 mL με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG + γλυκόζη 40% (w/v), όπου παρατηρείται η ανάπτυξη του εμβολιασμένου στελέχους ζύμης μετά το πέρας των 18 h (ανθεκτικό).



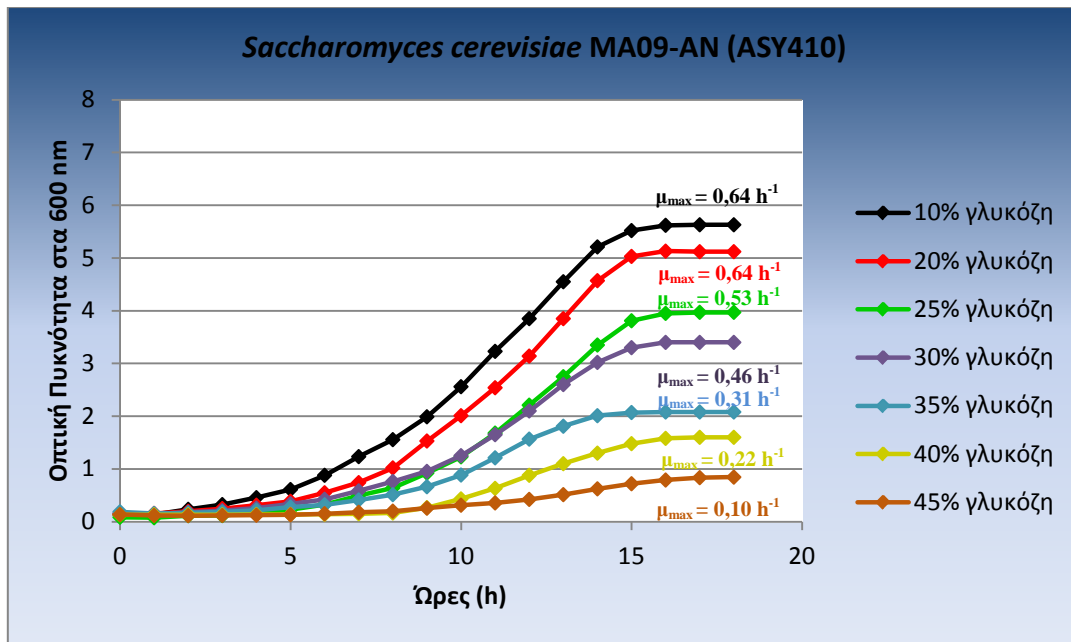
**Εικόνα 3.41** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* YJM789 (MY88) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG, στις συγκεντρώσεις 10% - 45% (w/v) γλυκόζης, υπό αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



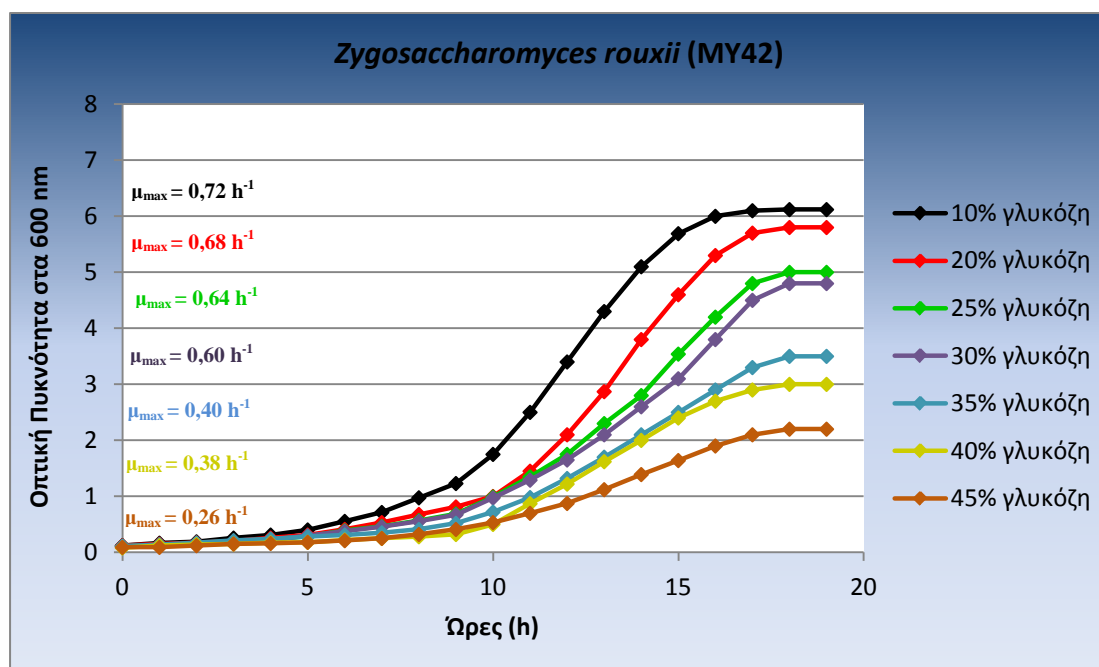
**Εικόνα 3.42** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* YJM789 (ASY218) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG, στις συγκεντρώσεις 10% - 45% (w/v) γλυκόζη, υπό αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



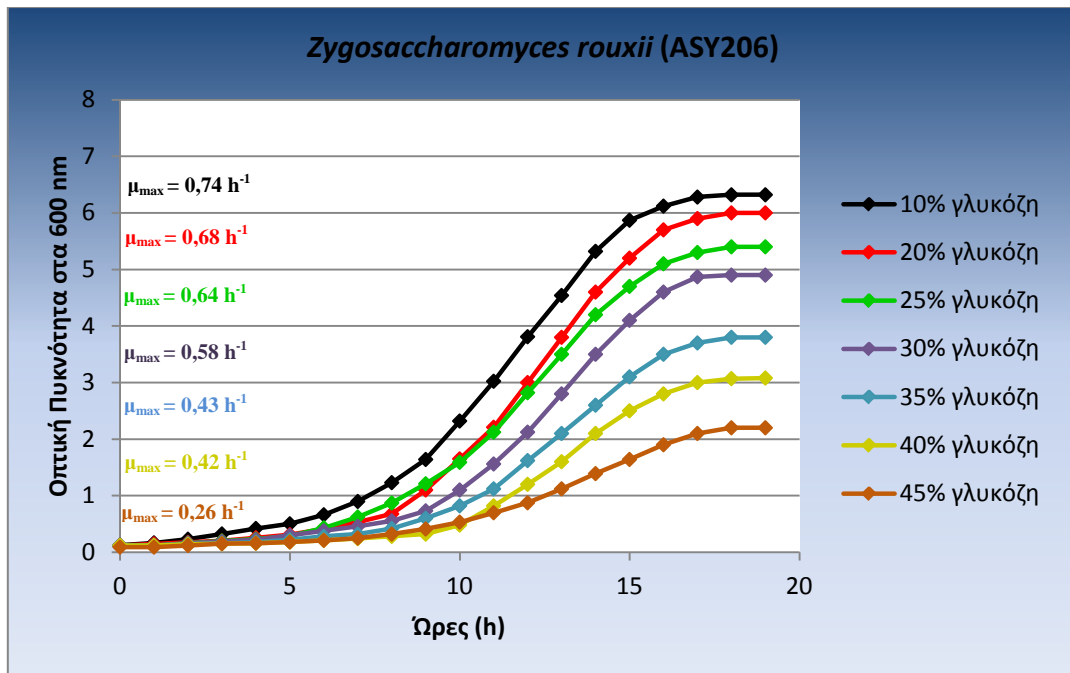
**Εικόνα 3.43** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN (WY68) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG, στις συγκεντρώσεις 10% - 45% (w/v) γλυκόζη, υπό αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



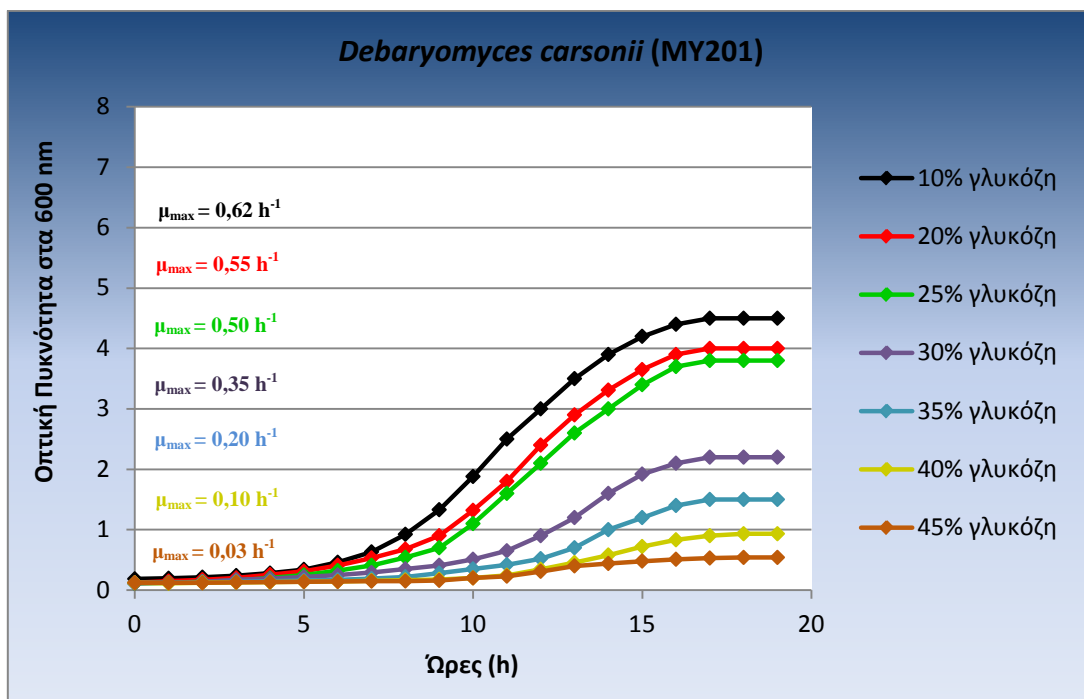
**Εικόνα 3.44** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN (ASY410) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG, στις συγκεντρώσεις 10% - 45% (w/v) γλυκόζη, υπό αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



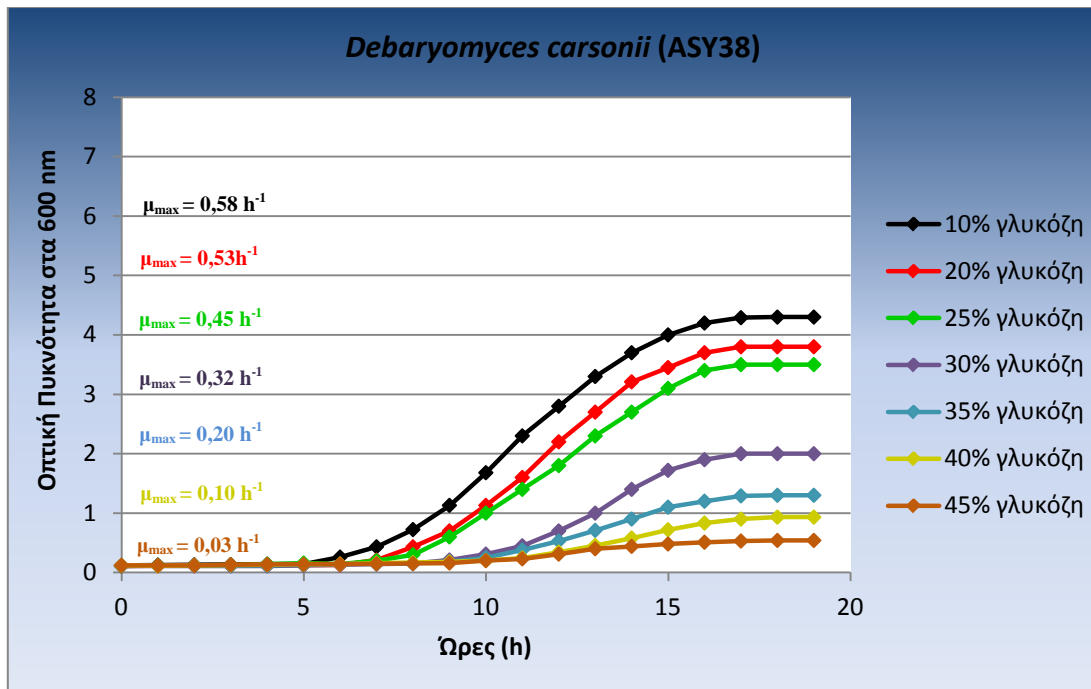
**Εικόνα 3.45** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Zygosaccharomyces rouxii* (MY42) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG, στις συγκεντρώσεις 10% - 45% (w/v) γλυκόζη, υπό αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



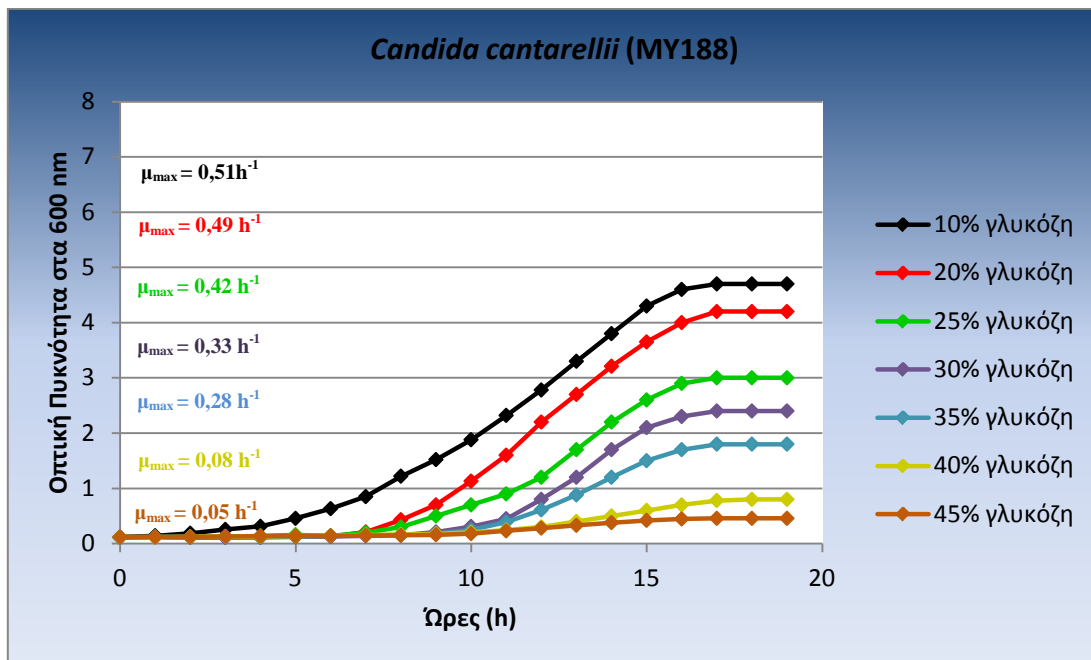
**Εικόνα 3.46** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Zygosaccharomyces rouxii* (ASY206) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG, στις συγκεντρώσεις 10% - 45% (w/v) γλυκόζη, υπό αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



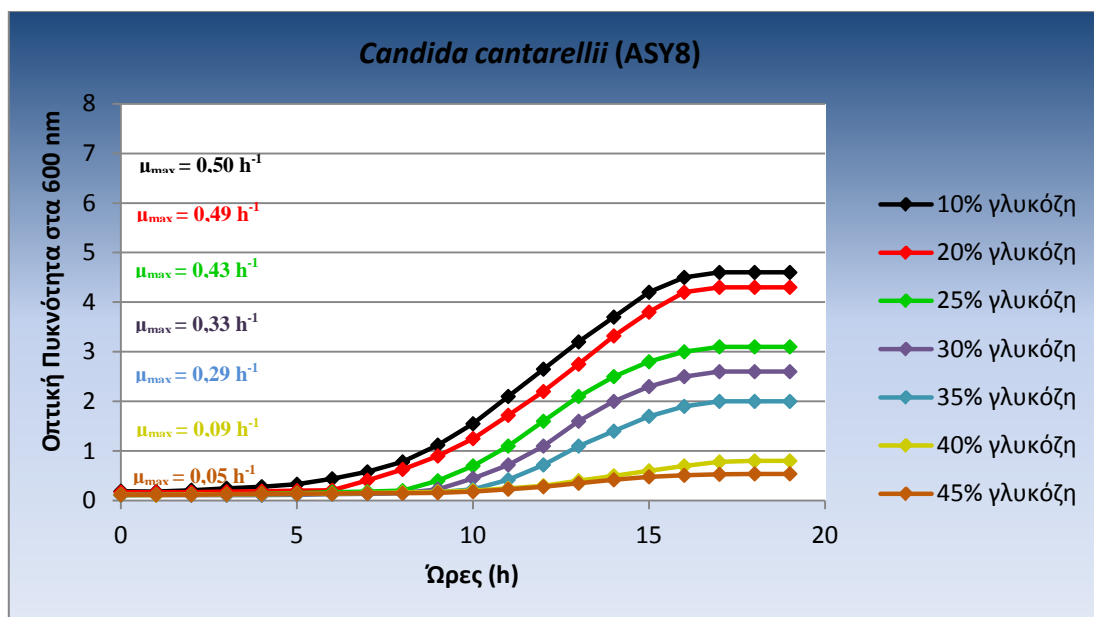
**Εικόνα 3.47** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Debaryomyces carsonii* (MY201) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG, στις συγκεντρώσεις 10% - 45% (w/v) γλυκόζη, υπό αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



**Εικόνα 3.48** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Debaryomyces carsonii* (ASY38) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG, στις συγκεντρώσεις 10% - 45% (w/v) γλυκόζη, υπό αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



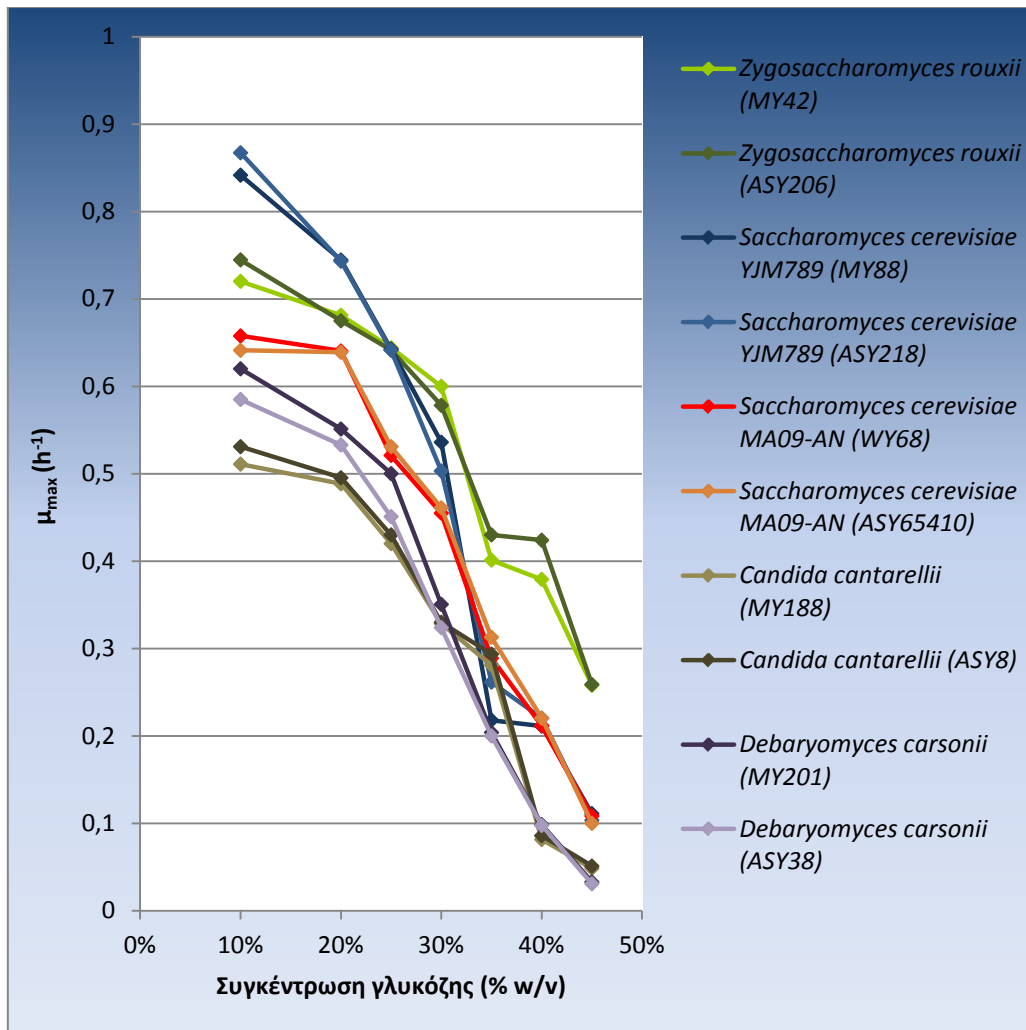
**Εικόνα 3.49** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Candida cantarellii* (MY188) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG, στις συγκεντρώσεις 10% - 45% (w/v) γλυκόζη, υπό αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.



**Εικόνα 3.50** Καμπύλες αύξησης του στελέχους *Candida cantarellii* (ASY8) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPG, στις συγκεντρώσεις 10% - 45% (w/v) γλυκόζη, υπό αερόβιες συνθήκες. Σε κάθε καμπύλη αύξησης σημειώνεται και η αντίστοιχη τιμή του ειδικού ρυθμού αύξησης.

**Πίνακας 3.16** Απεικόνιση της ανθεκτικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης μέσω της τιμής  $\mu_{max}$  των εξεταζόμενων στελεχών ζυμών

Στέλεχος [ $\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )]	Γλυκόζη (% w/v)							
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (MY42)	0,72	0,68	0,64	0,60	0,40	0,38	0,26	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (ASY206)	0,74	0,68	0,64	0,58	0,43	0,42	0,26	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789 (MY88)	0,84	0,74	0,64	0,54	0,22	0,21	0,11	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789 (ASY218)	0,87	0,74	0,64	0,50	0,26	0,22	0,10	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MA09-AN (WY68)	0,66	0,64	0,52	0,45	0,29	0,21	0,11	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MA09-AN (ASY410)	0,64	0,64	0,53	0,46	0,31	0,22	0,10	
<i>Candida cantarellii</i> (MY188)	0,51	0,49	0,42	0,33	0,28	0,08	0,05	
<i>Candida cantarellii</i> (ASY8)	0,50	0,49	0,43	0,33	0,29	0,09	0,05	
<i>Debaryomyces carsonii</i> (MY201)	0,62	0,55	0,50	0,35	0,20	0,10	0,03	
<i>Debaryomyces carsonii</i> (ASY38)	0,58	0,53	0,45	0,32	0,20	0,10	0,03	



**Εικόνα 3.51** Γραφική απεικόνιση της τιμής  $\mu_{\max}$  σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις γλυκόζης 10 – 45 % w/v για όλα τα στελέχη τα οποία μελετήθηκαν.

Από τον Πίνακα 3.16 καθώς και από τα αντίστοιχα διαγράμματα προκύπτει ότι τα στελέχη της ζύμης *Zygosaccharomyces rouxii* παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε γλυκόζη (45% w/v), συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη ζυμών που μελετήθηκαν, με  $\mu_{\max} = 0,26 \text{ h}^{-1}$  για τα στελέχη ASY206 και MY42 (Εικ. 3.45 και 3.46). Στα στελέχη των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* MA09 –AN και YJM789 (Εικ. 3.41-3.44) παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα σε 40% (w/v) γλυκόζη, ενώ σε συγκέντρωση 45% (w/v) παρατηρήθηκε μέτρια ανάπτυξη αυτών. Τέλος, τα στελέχη των *Candida cantarellii* (Εικ. 3.49 και 3.50) και *Debaryomyces carsonii* (Εικ. 3.47 και 3.48) παρουσίασαν σχετικά χαμηλή ανάπτυξη σε συγκέντρωση γλυκόζης 40% (w/v), ενώ σημειώθηκε πολύ μικρή ανάπτυξη σε 45% (w/v) γλυκόζη. Επιπλέον, παρατηρείται ότι τα ίδια στελέχη παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο ανάπτυξης και

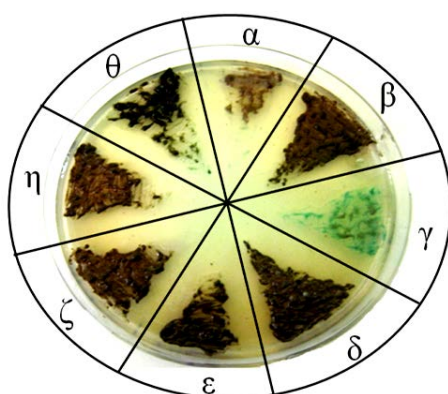


συμπεριφοράς (και ανεξάρτητα από το δείγμα προέλευσής τους) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

### 3.6 Παραγωγή υδρόθειου από στελέχη ζυμών

Δύο αντιπρόσωποι από κάθε ταυτοποιημένο γένος ζυμών (ένα στέλεχος από το δείγμα γλεύκους σοδειάς 2010, με εξαίρεση το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN WY68 το οποίο ανακτήθηκε από το δείγμα κρασιού σοδειάς 2009 και ένα στέλεχος από την αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους) μελετήθηκαν ως πιθανοί παραγωγοί υδρόθειου. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα BIGGY-Agar, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.5, όπου αποικίες χρώματος καφέ μαρτυρούν την παραγωγή του υδρόθειου (Εικ. 3.51). Αναλόγως δε της απόχρωσης του χρώματος καφέ μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα κατά πόσο έντονη είναι η παραγωγή του αερίου αυτού: όσο πιο ανοιχτόχρωμη είναι η αποικία τόσο λιγότερο υδρόθειο παράγει ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός.

Όπως προκύπτει από την Εικόνα 3.51 ο ισχυρότερος παραγωγός υδρόθειου ήταν η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* YJM789. Ακολουθούν οι ζύμες (αναφερόμενες με ελαττωμένη σειρά ισχύος): *Debaryomyces carsonii*, *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN, *Candida cantarellii* και τέλος, η ζύμη *Zygosaccharomyces rouxii* η οποία προκύπτει ως ο μικρότερος παραγωγός υδρόθειου.



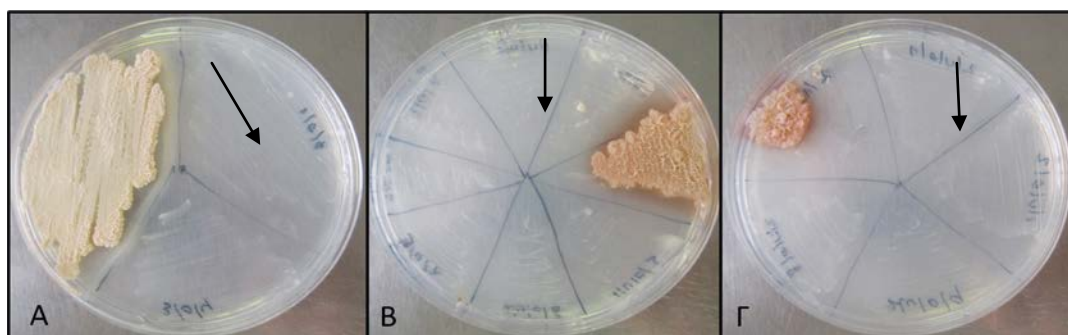
**Εικόνα 3.51** Παραγωγή υδροθείου σε θρεπτικό υπόστρωμα BIGGY-Agar, pH 5,8±0,2, στους 30 °C διαφορετικών ειδών ζυμών: (θ-δ-ζ) *Saccharomyces cerevisiae* YJM789, (α-η) *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN, (γ) *Zygosaccharomyces rouxii*, (ε) *Debaryomyces carsonii* και (ζ) *Candida cantarellii*.

### 3.7 Ενεργότητα τανάσης και ικανότητα αποικοδόμησης αργινίνης στα απομονωμένα στελέχη βακτηρίων

Δεδομένου ότι τα απομονωμένα στελέχη βακτηρίων ανακτήθηκαν από δείγματα κρασιού και μούστου, θεωρήθηκε απαραίτητο να πραγματοποιηθούν σε αυτά δύο επιπλέον βιοχημικές δοκιμασίες, οι οποίες έχουν ιδιαίτερη σημασία όταν γίνεται αναφορά σε βακτήρια οίνου. Οι δύο αυτές δοκιμασίες ήταν: α) προσδιορισμός ενεργότητας τανάσης και β) ανίχνευση ικανότητας μεταβολισμού της αργινίνης, σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα, όπως περιγράφεται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 2.5.

#### 3.7.1 Ενεργότητα Αργινάσης

Συνολικά, ελέγχθηκαν 12 βακτηριακά στελέχη (2 αντιπρόσωποι από κάθε ταυτοποιημένο γένος). Από αυτά μόνο 2 διαφορετικά στελέχη χαρακτηρίστηκαν θετικά ως προς την ικανότητα αποικοδόμησης της αργινίνης (ενεργότητα αργινάσης), γεγονός το οποίο αποδεικνύεται με την ανάπτυξη του εκάστοτε μικροοργανισμού σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-αργινίνης-αλάτων (§2.5). Συγκεκριμένα, τα στελέχη τα οποία βρέθηκαν να εμφανίζουν ενεργότητα αργινάσης ήταν τα εξής: *Bacillus amyloliquefaciens* (Εικ. 3.52. Β,Γ) και *Bacillus pumilus* (Εικ. 3.52.Α).

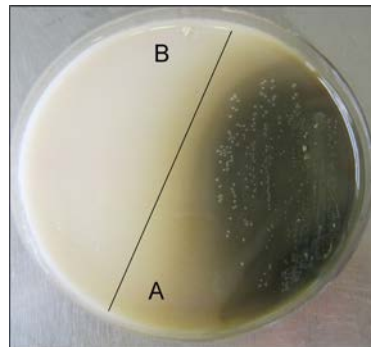


**Εικόνα 3.52** Ενεργότητα αργινάσης. Η παρουσία αποικιών δεικνύει την ικανότητα αποικοδόμησης L-αργινίνης (παρουσία αργινάσης). Οι αποικίες χρώματος μπλεζ (Α: *Bacillus pumilus*) και πορτοκαλί (Β,Γ: *Bacillus amyloliquefaciens*) αντιστοιχούν σε βακτηριακά στελέχη θετικά ως προς την αργινάση. Τα βέλη υποδεικνύουν στελέχη βακτηρίων αρνητικά ως προς την ενεργότητα της αργινάσης.

#### 3.7.2 Ενεργότητα Τανάσης

Συνολικά, ελέγχθηκαν 12 βακτηριακά στελέχη (2 αντιπρόσωποι από κάθε ταυτοποιημένο γένος). Από αυτά μόνο τα 4 χαρακτηρίστηκαν θετικά ως προς την παρουσία του ενζύμου τανάσης, γεγονός το οποίο αποδεικνύεται με την ανάπτυξη μιας

πράσινης ζώνης στα σημεία όπου αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός, το οποίο και μαρτυρά την αποικοδόμηση του συμπλόκου ταννικού οξέος - πρωτεϊνών του θρεπτικού υποστρώματος NA (Εικ. 3.53). Συγκεκριμένα, ενεργότητα τανάσης παρουσίασαν μόνο τα στελέχη *Bacillus amyloliquefaciens* και *Bacillus liquefaciens*.



**Εικόνα 3.53** Απομόνωση βακτηρίων με ενεργότητα τανάσης σε θρεπτικό υπόστρωμα T-NA (tannic acid-nutrient agar). A: βακτήριο θετικό στην ενεργότητα τανάσης και B: Βακτήριο αρνητικό στην ενεργότητα της τανάσης. Η παρουσία της πράσινης ζώνης γύρω από την αποικία μαρτυρά την αποικοδόμηση του συμπλόκου ταννικού οξέος-πρωτεϊνών θρεπτικού υποστρώματος.

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>**

**ΣΥΖΗΤΗΣΗ-**

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

#### 4.1 Μικροβιακή ποικιλότητα δειγμάτων

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης απομονώθηκαν 1040 στελέχη ζυμών και 374 στελέχη βακτηρίων. Πραγματοποιώντας συγκριτική μελέτη των πληθυσμών των μικροοργανισμών (ζύμες:βακτήρια) σε κάθε περίπτωση προκύπτει ότι παρά το γεγονός ότι τα τρία δείγματα (κρασί σοδειάς 2009, γλεύκος σοδειάς 2010, αυθόρμητη ζύμωση γλεύκους σοδειάς 2011) προέρχονται από γλεύκος διαφορετικής χρονιάς, δεν παρουσιάζονται αξιοσημείωτες πληθυσμιακές διαφορές μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, στο κρασί σοδειάς 2009 ο πληθυσμός των ζυμών ήταν  $2 - 3 \log (\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1})$  και των βακτηρίων  $1,62 - 1,72 \log (\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1})$  και ο αντίστοιχος πληθυσμός των ζυμών της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους σοδειάς 2011 τις 3 τελευταίες μέρες (17<sup>η</sup> - 19<sup>η</sup>) ήταν  $2,8 - 3,2 \log (\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1})$ , ενώ των βακτηρίων  $1,54 \log (\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1})$ . Ομοίως, ο πληθυσμός των ζυμών και των βακτηρίων στο αζύμωτο γλεύκος σοδειάς 2010 ήταν αντίστοιχα  $3 - 4 \log (\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1})$  και  $1 - 2 \log (\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1})$ , δηλαδή συγκρίσιμος με το μέγεθος του πληθυσμού των μικροοργανισμών που ανιχνεύτηκαν τις πρώτες τρεις μέρες της ζύμωσης γλεύκους σοδειάς 2011, όπου οι ζύμες αντιστοιχούσαν σε  $3,5 - 4 \log (\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1})$  και τα βακτήρια σε  $2,33 \log (\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1})$ . Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι ζύμες επικρατούν σε όλα τα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ ο πληθυσμός των βακτηρίων παραμένει σε χαμηλά και μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (στο ενδιάμεσο της αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους σοδειάς 2011), γεγονός το οποίο συμφωνεί και με τη διεθνή βιβλιογραφία (König H. *et al.*, 2009). Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι οι συνθήκες κατά την οينوποίηση παύουν να είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη των βακτηρίων μετά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης (κατανάλωση θρεπτικών συστατικών, αύξηση συγκέντρωσης αιθανόλης, αναερόβιες συνθήκες), ενώ ταυτόχρονα οι ζύμες και ειδικά στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* αρχίζουν να αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς, δρώντας ανταγωνιστικά προς τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς (König H. *et al.*, 2009).

Από τα αποτελέσματα του ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού στελεχών ζυμών από τις τρεις μελετημένες περιπτώσεις διαπιστώθηκαν τα εξής:

1. Παρατηρείται συμφωνία μεταξύ των ειδών των ζυμών που απομονώθηκαν και από τα τρία δείγματα της παρούσας εργασίας, όταν πραγματοποιείται σύγκριση αυτών στα αντίστοιχα στάδια της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, τα στελέχη των ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν από το γλεύκος ποικιλίας Ασύρτικο, σοδειάς 2011, τις πρώτες 3

μέρες ήταν: *Saccharomyces cerevisiae* YJM789, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces carsonii* και *Candida cantarellii*, δηλαδή τα ίδια στελέχη με αυτά που απομονώθηκαν από το δείγμα αζύμωτου μούστου σοδειάς 2010. Επίσης, τις τρεις τελευταίες μέρες τις αυθόρμητης ζύμωσης γλεύκους σοδειάς 2011 απομονώθηκαν τα ακόλουθα στελέχη ζυμών: *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN και *Zygosaccharomyces rouxii*, με τον *Saccharomyces cerevisiae* MA09-AN να επικρατεί μέχρι το τέλος. Τα ίδια, δηλαδή, στελέχη που απομονώθηκαν από το δείγμα κρασιού σοδειάς 2009.

2. Σε σχέση με το ποσοστό αντιπροσώπευσης των ζυμών στα δείγματα, πάλι παρατηρείται συμφωνία αποτελεσμάτων καθώς φαίνεται ότι ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, επικρατεί σε όλα τα στάδια της οινοποίησης έναντι των υπολοίπων ζυμών, γεγονός το οποίο συμφωνεί με τη διεθνή βιβλιογραφία (Cocolin *et al.*, 2000; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Fleet, 2008) ακολουθώντας με φθίνουσα σειρά αντιπροσώπευσης οι υπόλοιπες non-*Saccharomyces* ζύμες: *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida cantarellii* και *Debaryomyces carsonii*, δεδομένου του γεγονότος ότι είναι λιγότερο ανθεκτικές στην αιθανόλη (Toro M.E. and Vazquez F, 2002, Pina *et al.*, 2004) η οποία δρα ως περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης.

Σε αυτό το σημείο, θα ήταν σημαντικό να αναφερθεί ότι σε παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Pramateftaki *et al* (2000) στην περιοχή της Σαντορίνης, σε σταφύλια ποικιλίας *Vitis vinifera*, η βιοποικιλότητα των ζυμών ήταν περιορισμένη, γεγονός το οποίο έρχεται σε αντίθεση με την παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα, δεν απομονώθηκαν στελέχη ζυμών non-*Saccharomyces*, παρά μόνο στελέχη του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Συμπερασματικά, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων (όσον αφορά το στάδιο της ζύμωσης) δειγμάτων τόσο σε επίπεδο βιοποικιλότητας της γηγενούς ζυμοχλωρίδας, όσο και σε επίπεδο διαδοχής και επικράτησης, παρά το γεγονός ότι προέρχονται από γλεύκη διαφορετικής χρονιάς. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε αντίθεση με τους Torija *et al* (2001), καθώς σε αντίστοιχη μελέτη βρήκαν ότι παρουσιάζονται διαφορές μεταξύ των ειδών των ζυμών σε αυθόρμητες οινοποιήσεις 3 συνεχόμενων χρόνων. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι από χρονιά σε χρονιά νέα είδη ζυμών έκαναν την εμφάνισή τους, και τα οποία προστέθηκαν στην ήδη υπάρχουσα γηγενή ζυμοχλωρίδα. Οι ίδιοι πιθανολογούν ότι

τα συγκεκριμένα στελέχη μεταφέρθηκαν είτε από τον άνθρωπο είτε από άλλους οργανισμούς π.χ. έντομα, στο οиноποιείο και κατάφεραν να επιβιώσουν και εν τέλει να αποτελέσουν μέρος του περιβάλλοντος οиноποίησης.

Σε αυτό το σημείο, κρίνεται απαραίτητο να αναφερθεί ότι τα στελέχη των ζυμών *Debaryomyces carsonii* και *Candida cantarellii*, σύμφωνα με το Index Fungorum, αναφέρονται πλέον ως *Priceomyces carsonii* και *Trigonopsis cantarellii*, αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα του ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού στελεχών βακτηρίων από τις τρεις μελετημένες περιπτώσεις διαπιστώθηκαν τα εξής:

1. Η διαδοχή των βακτηρίων οиноποίησης γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο, σοδειάς 2011 έρχεται σε συμφωνία με τα είδη των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα άλλα 2 δείγματα. Συγκεκριμένα, στην αρχή της ζύμωσης του γλεύκους σοδειάς 2011 και στο δείγμα μούστου σοδειάς 2010 απομονώθηκαν τα βακτήρια: *Paenibacillus* sp., *Kozakia baliensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Gluconobacter oxydans* και *Bacillus pumilus*, ενώ στα τελευταία στάδια της αυθόρμητης ζύμωσης σοδειάς 2011 και στο κρασί σοδειάς 2009 ταυτοποιήθηκαν στελέχη των βακτηρίων: *Paenibacillus* sp., και *Bacillus pumilus*.

2. Σε σχέση με το ποσοστό αντιπροσώπευσης των βακτηρίων στα δείγματα, πάλι παρατηρείται συμφωνία αποτελεσμάτων καθώς φαίνεται ότι στην αρχή της ζύμωσης κυριαρχούν τα οξικά βακτήρια *Gluconobacter oxydans* και *Kozakia baliensi*, ενώ στο τέλος της ζύμωσης στελέχη του βακτηρίου *Paenibacillus* sp. και *Bacillus pumilus*.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων (όσον αφορά το στάδιο της ζύμωσης) δειγμάτων, τόσο σε επίπεδο βιοποικιλότητας των βακτηρίων, όσο και σε επίπεδο διαδοχής και επικράτησης. Επιπλέον, το γεγονός ότι τα οξικά βακτήρια επικρατούν έναντι των υπολοίπων βακτηρίων φαίνεται να συμφωνεί με τη διεθνή βιβλιογραφία (Du Toit and Lambrechts 2002). Οι πληθυσμοί τους είναι υψηλοί στα πρώιμα στάδια της ζύμωσης, ενώ μετά, λόγω αύξησης συγκέντρωσης της αιθανόλης και ανάπτυξης αναερόβιων συνθηκών, το μέγεθος του πληθυσμού τους ελαττώνεται ραγδαία, μέχρι να εξαφανιστούν στα τελευταία στάδια της ζύμωσης (Bisson, 2001; Du Toit and Lambrechts 2002).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στο ενδιάμεσο της αυθόρμητης οινοποίησης δεν ήταν εφικτή η απομόνωση βακτηριακών στελεχών. Το γεγονός αυτό οφείλεται αφενός μεν στο μέγεθος του πληθυσμού των ζυμών το οποίο ήταν μέγιστο στο ενδιάμεσο της ζύμωσης, με αποτέλεσμα η αύξησή τους να δράσει ανασταλτικά στην αύξηση των βακτηρίων, αφετέρου στις συνθήκες οινοποίησης οι οποίες αποτέλεσαν ακραίο περιβάλλον ανάπτυξης για τα βακτήρια.

Τα είδη *Paenibacillus* sp., *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* και *Bacillus licheniformis* δεν έχουν βρεθεί να σχετίζονται με τη διαδικασία της οινοποίησης. Η απομόνωσή τους ίσως πιθανά να οφείλεται στην τυχαία παρουσία τους στο περιβάλλον της οινοποίησης, είτε στην παρουσία τους στην επιφάνεια των σταφυλών από το έδαφος και το οικοσύστημα του αμπελώνα, όπως το είδος, *Bacillus pumilus*, σύμφωνα με τους Garbeva *et al.* (2003).

Τέλος, παρατηρήθηκε ότι σε κανένα από τα 3 μελετημένα δείγματα της παρούσας εργασίας δεν ανιχνεύτηκαν οξυγαλακτικά βακτήρια. Πράγματι, στο συγκεκριμένο γλεύκος δεδομένου ότι το pH του είναι πολύ χαμηλό (~2,98), η ανάπτυξη της συγκεκριμένης ομάδας βακτηρίων αναστέλλεται. Η χαμηλότερη τιμή pH που επιτρέπει την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι το 3,5. Συγκεκριμένα, μόνο το βακτήριο *Oenococcus oeni* έχει απομονωθεί από κρασιά με pH μικρότερο του 3,5 (μέχρι 3,2) (Tourdot – Maréchal *et al.*, 2000), ενώ στελέχη των *Pediococcus* και *Lactobacillus* μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές pH μεγαλύτερες του 3,5 (Bisson, 2001).

## 4.2 Ζύμες με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον

Ο διεθνής ανταγωνισμός στη βιομηχανία κρασιού, καθώς και οι απαιτήσεις των καταναλωτών για την παραγωγή κρασιών διαφορετικού προφίλ παρέχουν νέες προκλήσεις για την ανάπτυξη καινοτόμου τεχνολογίας κατά την οινοποίηση. Έτσι, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια συνεχής προσπάθεια απομόνωσης στελεχών ζυμών με συγκεκριμένες ιδιότητες ώστε να οδηγήσουν στην παραγωγή κρασιών με συγκεκριμένα οινολογικά χαρακτηριστικά. Τα κριτήρια επιλογής αυτών των στελεχών μεταξύ των άλλων είναι η ανθεκτικότητα σε αιθανόλη και γλυκόζη, καθώς και η μειωμένη παραγωγή υδρόθειου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.



Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια απομόνωσης στελεχών ζυμών με βάση τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά και προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Από τις ζύμες που απομονώθηκαν και μελετήθηκαν, μόνο τα στελέχη της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* (YJM789 και MA09-AN) πληρούν και τα τρία κριτήρια επιλογής. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε 40% (w/v) γλυκόζη και 11% (v/v) αιθανόλη, ενώ η παραγωγή σε υδρόθειο ήταν σε σχετικά χαμηλά επίπεδα. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με εκείνα του στελέχους *S. cerevisiae* (BSOSU 0269) των Orlic *et al.* (2005). Το συγκεκριμένο, λοιπόν, στέλεχος επειδή τυγχάνει να αποτελεί και ενδογενές του Ελλαδικού χώρου, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εκκινήτης καλλιιεργιών σε διαδικασίες οινοποίησης, ειδικά σε γλεύκη που χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, όπου λόγω του υπεροσμωτικού περιβάλλοντος που κυριαρχεί συνίσταται η χρήση αιθανο-οσμω-ανθεκτικών στελεχών ζυμών με αποτελεσματική ικανότητα ζύμωσης (Malacrinò *et al.*, 2005).
- Στέλεχη της ζύμης *Zygosaccharomyces rouxii* βρέθηκαν να παρουσιάζουν την υψηλότερη ανθεκτικότητα σε γλυκόζη (45%), σε σχέση με τις υπόλοιπες ζύμες που μελετήθηκαν, γεγονός το οποίο συμφωνεί με τους Martorell *et al.* (2007), οι οποίοι αναφέρουν ότι στελέχη της συγκεκριμένης ζύμης μπορούν να αναπτυχθούν σε 90% (w/v) συγκέντρωση γλυκόζης, για αυτό και χαρακτηρίζονται ως οσμω-ανθεκτικά. Παρουσίασαν, όμως, λιγότερη ανθεκτικότητα σε αιθανόλη (9%), σε σχέση με τη ζύμη *S. cerevisiae*, αποτέλεσμα το οποίο είναι συγκρίσιμο με τα αντίστοιχα στελέχη των Martorell *et al.* (2007), τα οποία παρουσίασαν ανθεκτικότητα μέχρι και 10% (v/v). Τέλος, η παραγωγή σε υδρόθειο εκτιμήθηκε σε σχετικά χαμηλά επίπεδα. Η συγκεκριμένη ζύμη δεν θα μπορούσε να θεωρηθεί η πλέον κατάλληλη για χρήση ως εκκινήτης καλλιιεργιών, καθώς θεωρείται ότι ανήκει στις ζύμες που αλλοιώνουν τη ποιότητα του οίνου (spoilage yeasts), παράγοντας υψηλές ποσότητες οξικού οξέος, σε περίπτωση που παραμένουν μέχρι και τα τελευταία στάδια της ζύμωσης. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα μολυσματικές σε οινοποιεία γλυκού και αφρώδους οίνου (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003), λόγω του ότι είναι ανθεκτικές στα συντηρητικά και στην υψηλή συγκέντρωση σακχάρων. Βέβαια, χαρακτηρίζεται και ως

φρουκτόφιλη, δηλαδή, μεταβολίζει πιο γρήγορα τη φρουκτόζη από ότι τη γλυκόζη (σε αντίθεση με τον *S. cerevisiae*). Αυτή η ιδιότητα την καθιστά χρήσιμη για την εξωγενή προσθήκη της σε μούστους που προέρχονται από ώριμους καρπούς με μεγαλύτερη αναλογία φρουκτόζης/γλυκόζης, υποβοηθώντας έτσι στην κατανάλωση της φρουκτόζης και στην αποφυγή συσσώρευσής της στο ζυμωμένο γλεύκος, φαινόμενο το οποίο παρατηρείται συχνά κατά την οινοποίηση. Όμως, λόγω του ότι αποτελεί ένα ιδιαίτερα ανθεκτικό στέλεχος ζύμης, η αποφυγή παραμονής της μέχρι και το τελικό προϊόν, το κρασί, θα μπορούσε να περιοριστεί με τον εμβολιασμό *S. cerevisiae* (λίγες μέρες μετά την προσθήκη του *Z. rouxii*), ζύμη η οποία δρα ανταγωνιστικά προς τις υπόλοιπες ζύμες, διαμορφώνοντας έτσι τον τελικό πληθυσμό της ζυμοχλωρίδας του οίνου.

- Τα στελέχη των ζυμών *Candida cantarellii* και *Debaryomyces carsonii*, παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε 40% (w/v) γλυκόζη, μικρή παραγωγή υδρόθειου και ελάχιστη ανθεκτικότητα σε αιθανόλη. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία, καθώς οι συγκεκριμένες ζύμες ανιχνεύονται μόνον στην αρχή της ζύμωσης, ενώ μετά εξαφανίζονται λόγω του ότι δεν είναι ανθεκτικές στην παραγόμενη, κατά την αλκοολική ζύμωση, αιθανόλη (Fleet & Heard, 1993; Fleet, 2008). Οι συγκριμένες ζύμες δεν θα μπορούσαν να αποτελέσουν ιδανικά στελέχη για καλλιέργειες εκκίνησης καθώς δεν φέρουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ως προς τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Όμως, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της βιομηχανίας οίνου έχει επικεντρωθεί για χρήση στελεχών non-*Saccharomyces* ως εκκινητές καλλιέργειών, καθότι και αυτές οι ζύμες συμβάλλουν στη γεύση και στο άρωμα του κρασιού. Συγκεκριμένα, οι Hernández-Orte *et al.* (2007) αναφέρουν ότι παρά το γεγονός ότι το στέλεχος *Debaryomyces carsonii* έχει μικρή ικανότητα ζύμωσης, παρουσίασε τη μέγιστη παραγωγή ορισμένων αρωματικών ενώσεων, όπως Z-3-εξανόλη, γ-δεκαλακτόνη, ευγενόλη και νερόλη. Σε παρόμοιες μελέτες που διεξήχθησαν σε στελέχη της ζύμης *Candida cantarellii* από τους Manzanares *et al.* (1999) αναφέρεται ότι είναι παραγωγικοί εξωκυττάρων ενζύμων (β-γλυκοσιδάσης), τα οποία διασπούν ενώσεις που σχετίζονται τόσο με το άρωμα (π.χ. μονοτερπένια) του οίνου όσο και με το χρώμα του (π.χ. ανθοκυανίνες). Συμπερασματικά, θα ήταν ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτη

στα συγκεκριμένα στελέχη ζυμών, δεδομένου ότι πρόκειται για γηγενή στελέχη που είναι καλά προσαρμοσμένα τόσο στις περιβαλλοντικές συνθήκες του Ελλαδικού χώρου, όσο και στις τεχνικές οινοποίησης που εφαρμόζονται στα Ελληνικά οινοποιεία, ώστε να αποτελούν δυνητικά μέρος μιας αντιπροσωπευτικής τράπεζας στελεχών. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορέσει να διατηρηθεί η ποικιλότητα των ζυμών της Ελλάδας και να προστατευτούν τα χαρακτηριστικά των εγχώριων κρασιών.

### 4.3 Βακτήρια με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον

Στην παρούσα μελέτη τα βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν μελετήθηκαν ως προς τα οινολογικά χαρακτηριστικά: ενεργότητα τανάσης και δυνατότητα αποικοδόμησης αργινίνης, τα οποία θεωρούνται σημαντικά στη βιομηχανία κρασιού. Από το σύνολο του βακτηριακού πληθυσμού μόνο τα *Bacillus licheniformis* και *Bacillus amyloliquefaciens* εμφανίζουν βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον καθότι παρουσιάζουν ενεργότητα τανάσης. Παρ' όλο που για τα συγκεκριμένα βακτήρια δεν έχει αναφερθεί να σχετίζονται με την οινοποίηση, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της συγκεκριμένης ενζυμικής τους δραστηριότητας, αφού μέσω της δράσης της τανάσης μειώνονται η θολερότητα και η στυφότητα στο κρασί (Aguilar & Gutiérrez-Sánchez, 2001; Mondal & Pati, 2000). Βέβαια, το γεγονός ότι μπορούν να μεταβολίζουν και την αργινίνη, χρήζει περισσότερης προσοχής, καθώς υποβόσκει ο κίνδυνος να είναι παραγωγοί της καρκινογόνου ουσίας, καρβαμίδιο. Έτσι, απαιτείται να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτη για το μεταβολικό μονοπάτι καταβολισμού της αργινίνης το οποίο ακολουθούν ώστε να διαλευκανθεί αν τελικά είναι παραγωγοί καρβαμιδίου (Raymond *et al.*, 1986, Cotter & Hill, 2003).

### 4.4 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την ανασκόπηση των μέχρι τώρα βιβλιογραφικών δεδομένων διαπιστώθηκε η αναγκαιότητα να ολοκληρωθεί μια εργασία με αντικείμενο τον προσδιορισμό της γηγενούς μικροχλωρίδας γλεύκους παραδοσιακών ποικιλιών από τη νήσο Σαντορίνη, να μελετηθεί η διαδοχή και η επικράτηση των ζυμών και των βακτηρίων κατά την οινοποίηση γλεύκους ποικιλίας Ασύρτικο και εν τέλει να πραγματοποιηθεί η απομόνωση στελεχών με έντονο οινολογικό και γενικότερα βιοτεχνολογικό

ενδιαφέρον. Ολοκληρώνοντας, λοιπόν, την παρούσα εργασία, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

1. Η ζύμωση στην ποικιλία Ασύρτικο καθοδηγείται από ένα κυρίαρχο είδος ζύμης, όπως είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, αλλά ταυτόχρονα συμμετέχουν και αρκετά άλλα είδη που δεν ανήκουν στο γένος αυτό, τα οποία επιμένουν να υπάρχουν στο γλεύκος και η συμμετοχή τους δεν θεωρείται αμελητέα.

2. Η πλούσια μικροβιακή ποικιλότητα που εμφάνισε το Ασύρτικο δηλώνει ότι γλεύκη από σταφύλια παραδοσιακών ποικιλιών δεν υστερούν σε τίποτε έναντι των μη εγχώριων, οι οποίες σε αρκετά μεγάλο ποσοστό αντικαθιστούν τις παραδοσιακές ποικιλίες εις βάρος της ενδογενούς μικροχλωρίδας που τις συνοδεύει.

3. Η επιβίωση και συμμετοχή των ειδών στη ζύμωση του συγκεκριμένου γλεύκους βρίσκεται σε πολύ λεπτή ισορροπία. Ανάλογα με την ανάπτυξη που παρουσιάζουν τα απομονωθέντα είδη, επηρεάζουν σημαντικά το τελικό προϊόν. Διαφορετικά είδη ενδογενών ζυμών, πλην στελεχών του *Saccharomyces cerevisiae* (το οποίο αποτέλεσε το κυρίαρχο είδος της οινοποίησης), όπως είναι των *Zygosaccharomyces* spp., *Candida* spp. και *Debaryomyces* spp. και διαφορετικά είδη βακτηρίων, όπως είναι τα οξικά βακτήρια, μπορούν να επηρεάσουν οργανοληπτικά τον οίνο. Επομένως, ο καθορισμός της διαδοχής και επικράτησης των ζυμών και των βακτηρίων στο γλεύκος και ιδιαίτερα η μελέτη της συμπεριφοράς τους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γλεύκους Ελληνικής προέλευσης, σχετικά με την οποία οι βιβλιογραφικές αναφορές σπανίζουν, προσφέρει πολύ σημαντικές πληροφορίες για την αναμενόμενη ποιότητα του οίνου και ίσως βοηθά στην πρόληψη πιθανών προβλημάτων κατά την οινοποίηση.

4. Συγκεντρώθηκε ένας σεβαστός αριθμός ενδογενών ζυμών και βακτηρίων με οινολογικό ενδιαφέρον. Με αυτόν τον τρόπο, η παρούσα μελέτη συμβάλλει στον εμπλουτισμό της τράπεζας των ενδογενών μικροβιακών στελεχών.

5. Έγινε συσχέτιση της διαφοροποίησης της γηγενούς μικροβιακής ποικιλότητας, τόσο σε επίπεδο διαδοχής όσο και σε επίπεδο επικράτησης, με το χρόνο σοδειάς του εκάστοτε γλεύκους και διαπιστώθηκε ότι δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων.

6. Στα πλαίσια της εργασίας αυτής, στελέχη των ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως προς την ικανότητα παραγωγής υδρόθειου και προσδιορίστηκε το ποσοστό ανθεκτικότητάς τους σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και αιθανόλης. Αυτά τα τρία κριτήρια μπορούν να οδηγήσουν στην επιλογή ζυμών με καλούς οινολογικούς χαρακτήρες.

7. Επιπλέον, η ικανότητα καταβολισμού της αργινίνης και η παρουσία ενεργότητας τανάσης από στελέχη βακτηρίων παρέχουν τη δυνατότητα μιας αρχικής προσέγγισης και επιλογής βακτηρίων με βιοτεχνολογικό και οινολογικό ενδιαφέρον.

8. Τέλος, μέσω της παρούσας εργασίας δόθηκε η ευκαιρία να αναγνωριστεί ένα επιπλέον μοριακό εργαλείο διαχωρισμού και ταυτοποίησης των ζυμών, το οποίο είναι η ITS PCR. Η συγκεκριμένη τεχνική έδωσε τη δυνατότητα να μπορεί να ελέγχεται η διαδοχή και η συμμετοχή των ζυμών στο αζύμωτο και ζυμωμένο γλεύκος και να προσδιορίζεται επακριβώς το σημείο αλλαγής ισορροπίας των ενδογενών πληθυσμών, καθορίζοντας τα είδη που συμβάλλουν στην αλλαγή αυτή, γεγονός το οποίο παρουσιάζει μεγάλο οικολογικό, οινολογικό και βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aguilar C. N. & Gutierrez-Sanchez G. (2001) Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Sci. Technol. Int.* **7** (5), 373-382.

Alexandre H. I., Rousseaux I. & Charpentier C. (1994) Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**, 17-22.

Alley L. (2003) Greece's Enduring Wine Heritage. *Wine Spectator*.

Amerine M. A. & Kunkee R. E. (1968) Microbiology of Winemaking. *Ann. Rev. Microbiol.* **22**, 323-358.

Ansanay-Galeote V., Blondin B., Dequin S. & Sablayrolles J. M. (2001) Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 677-681.

Barbe J.-C., de Revel G., Joyeux A., Bertrand A. & Lonvaud-Funel A. (2001) Role of botrytized grape microorganisms in SO<sub>2</sub> binding phenomena. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 34-42.

Bauer R. & Dicks L. M. T. (2004) Control of malolactic fermentation in wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **25** (2), 74-88.

Beeston J. (1994) A Concise History of Australian Wine. St. Leonards New South Wales, Australia: Rathdown.

Beltrana G., Torija M. J., Novoa M., Ferrera N., Pobleta M., Guillamóna J. M., Rozèsa N. & Masa A. (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *J. Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 287-293.

Besançon X., Ratomahenina R. & Galzy P. (1995) Isolation and partial characterization of an esterase (EC 3.1.1.1) from a *Debaryomyces hansenii* strain. *Netherlands Milk and Dairy Journal.* **49**, 97-100.

Bisson L. F. (2004) The biotechnology of wine yeast. *Food Biotechnol.* **18**, 63-96.

Bisson L. F. (2001) Wine Production (VEN 124). University of California at Davis, University Extension.

- Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F. & Kunkee R. E. (1996) Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. Principles and Practices of Winemaking. *Chapman and Hall*, New York, 102–192.
- Clemente-Jimenez J. M., Mingorance-Cazorla L., Martinez- Rodriguez S., Heras-Vazquez F. J. L. & Rodriguez-Vico F. (2005) Influence of sequential mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **98**, 301–308.
- Cocolin L., Bisson L. F. & Mills D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentation (2000) *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 81-87.
- Combina M., Elía A., Mercado L., Catania C., Ganga A. & Martinez C. (2005) Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* **99**, 237-243.
- Conn H. J. (1925). Biological strains: a handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory. Geneva, NY: Commission on Standardization of biological strains. 68-69.
- Costa V., Amorim M. A., Reis E., Quintanilha A. & Moradas-Ferreira P. (1997) Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* **143**, 1649–1656.
- Cotter P. D. & Hill C. Surviving the acid test: Response of Gram – positive bacteria to low pH (2003) *Microbiol. Mol. Biol. Res.* **67** (3), 429-453.
- Cunin R., Glansdorff N., Piérard A. & Stalon V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria (1986) *Microbiol. Rev.* **50** (3), 314-352.
- D'Amore T., Panchal C. J., Russell I. & Stewart G. G. 1990. A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.* **9** (4), 287-304.
- De Cos P. S. S., Ponsjoán S. G. & Cristellys E. C. (1999) Isolation and identification of the yeast biota in the D.O. Valle de la Orotava (1st part). *Vitic. Enol. Sci.* **54**, 21-25.
- Degre R. (1993) Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet GH, ed). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 421–448.
- De Ley J., Gosselé F. & Swings J. (1984) Genus I *Acetobacter*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkens, Maryland, U.S.A. **1**, 268-274.



- De Man J. C., Rogosa M. & Sharpe M.E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135.
- Dicks L. M., Dellaglio F. & Collins M. G. (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 395–397.
- Dicks L. M. T. & Endo A. (2009) Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to differentiate species. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **30**, 72-90.
- Doumas, C. (1995). *A Historical Review*. In “The Santorini of Santorini.” Athens: The Boutari Foundation. 27-34.
- Drysdale G. S. & Fleet G. H. (1985) Acetic acid bacteria in some Australian wines. *Food Technol. Aust.* **37**, 17-20.
- Drysdale G. S. & Fleet G. H. (1988) Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**, 143– 153.
- Drysdale G. S. & Fleet G. H. (1989) The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 471-481.
- Dupuy P. & Maugenet J. (1963) Métabolisme de l’acid lactique par *Acetobacter rancens*. *Ann. Technol. Agric.* **12**, 5-14.
- Du Toit M. & Pretorius I. S. (2000) Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature’s own arsenal. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 74-96.
- Du Toit W. J. & Lambrechts M. G. (2002) The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **74**, 57-64.
- Du Toit W. J. & Pretorius I. S. (2002) The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Ann. Microbiol.* **52**, 155-179.
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg B., Schleifer K.-H. & Stackebrandt E. (2006) The Prokaryotes, Third Edition, A Handbook on the Biology of Bacteria: *Proteobacteria: Alpha and Beta subclasses*. Springer **5**, 163-200.
- Edwards U., Rogall T., Blocker H., Emde M. & Bottger E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* **17**, 7843-7853.

- Ekunsanmi T. J. & Odunfa S. A. (1990) Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activities of some yeast strains isolated from steep water of fermenting cassava tubers. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 672-675.
- Franke I. H., Fegan M., Hayward C., Leonard G., Stackebrandt E. & Sly L. I. (1999) Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1681-1693.
- Fleet G. H. & Heard G. M. (1993) Yeasts: growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic, Chur, Switzerland 27– 54.
- Fleet G. H. (2008) Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 979-995.
- Freese C. C. (2005) The role of wine production in changing structure of an Island economy: A case study of Santorini Greece. Master Thesis. University of Cincinnati.
- Furukawa K., Kitano H., Mizoguchi H. & Hara S. (2004) Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.* **98**, 107–113.
- Garvie E. I. (1981) Sub-divisions within the genus *Leuconostoc oenos* as shown by RNA/DNA hybridization. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 209–212.
- Gladstones J. (1992) *Viticulture and Environment*. Winetitles, Adelaide, South Australia.
- Gunnison A. F. (1981) Sulfite toxicity: A critical review of in vitro and in vivo data. *Food Cosmet. Toxicol.* **19**, 667-682
- Haught C., Wilkinson D. L., Zfagas K. & Harrison R. G. (1994) A method to insert a DNA fragment into a double-stranded plasmid. *Biotechniques* **16**, 46-48.
- Heart M. G. & Fleet H. G. (1988) The effect of temperature and p H on the growth of yeast species during fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 447-451.
- Henschke P. (2007) Yeast strains available for winemaking. *Austr. Wine Res. Instit. Tech. Rev.* **171**, 9–29.

- Hernández-Orte P., Cersosimo M., Loscos N., Cacho J., Garcia-Moruno E. & Ferreira V. (2007) The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chem.* **107**, 1064-1077.
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K. & Wellington E. M. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microb.* **63**, 3233–3241.
- Hirasawa T., Yoshikawa K., Nakakura Y., Nagahisa K., Furusawa C., Katakura Y., Shimizu H. & Shioya S. (2007) Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *J. Biotechnol.* **131**, 34–44.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T. & Williams S. T. (1994) Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed., Williams & Wilkens, Maryland, U.S.A., 71-84.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M. & Schrepf H. (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*. *The John Innes Foundation*, Norwich.
- Inoue T., Iefuji H., Fujii T., Soga H. & Satoh K. (2000) Cloning and characterization of a gene complementing the mutation of an ethanol-sensitive mutant of sake yeast. *Biosci. Biotech. Biochem.* **64**, 229–236.
- Jiranek V., Langridge P. & Henschke P. A. (1995) Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H<sub>2</sub>S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast under enological conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**, 269–273.
- Joyeux A., Lafon-Lafourcade S. & Ribéreau-Gayon P. (1984) Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 153-156.
- Kandler O. & Weiss N. (1986) Microbiology of Mesu, a traditional fermented food shoot product. *Bergey's manual systematic bacteriology*. In Sneath, P.H.A., N.S. Mair Sharpe and J.G. Holt (Eds.). Baltimore: Williams and Wilkins, **2**,1209-1234.
- Karlson P., Doenecke D. & Koolman J. (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*, 14th edition

- König H. & Fröhlich J., (2009) *Lactic acid bacteria*. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine*. Springer, Heidelberg. 3-29.
- König H., Uden G. & Fröhlich J. (2009) *Biology of microorganisms on grapes in must and wine*. XVIII, Springer.
- Kourakou-Dragona S. (1995α) *The Historical Testimony of Ampelies*. In “The Santorini of Santorini.” Athens: The Boutari Foundation. 35-38.
- Kourakou-Dragona S. (1995β) *The Wine of Santorini: Testimony in Writings of Travellers*. In “The Santorini of Santorini.” Athens: The Boutari Foundation, 39-60.
- Kourakou-Dragona S. (1995γ) *The Assyrtiko*. In “The Santorini of Santorini.” 101-112. Athens: The Boutari Foundation.
- Kourakou-Dragona S. (1995δ) *Cultural Practices: Adaptation to the Natural Environment*. In “The Santorini of Santorini.” Athens: The Boutari Foundation. 113-120.
- Lafon-Lafoucarde S., Geneix C. & Ribereau-Gayon P. (1979) Evidences for the existence of “survival factors” as an explanation for some peculiarities of yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. *Appl. Envir. Microbiol.* **38**, 1069-1073.
- Lambrechts M. G. & Pretorius I. S. (2000) Yeast and its importance in wine aroma – a review. *S Afr J Enol Vitic* 21, 97–129.
- Lane D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. New York, John Wiley and Sons, 115-175.
- Larue F., Lafon-Lafoucarde S. & Ribereau-Gayon P. (1980) Relation between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 80-111.
- Lei J., Zhao X., Ge X. & Bai F. (2007) Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution. *J. Biotech.* **131**, 270–275.
- Li S. S., Cheng C., Li Z., Chen J. Y., Yan B., Han B. Z. & Reeves M. (2010) Yeast species associated with wine grapes in China. *Int. J. Food Microbiol.* **138**, 85-90.

- Lisdiyanti P., Kawasaki H., Widyastuti Y., Saono S., Seki T., Yamada Y., Uchimura T. & Komagata K. (2002) *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -*Proteobacteria*. *IJSEM* **52**, 813-818.
- Liu S.-Q., Pritchard G. C., Hardman M. J. & Pilone G. J. (1996) Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway? *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 486-492.
- Liu S.-Q. & Pilone G. J. (1998) A review: arginine metabolism in wine lactic acid bacteria. *J Appl. Microbiol.* **84**, 315-327.
- Longo E., Cansado J., Agrelo D. & Villa T. G. (1991) Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 141-144.
- Lonvaud-Funel A. (1995) Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 209-214.
- Lonvaud-Funel A. (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 317-331
- Loureiro V. & Malfeito-Ferreira M. (2003) Spoilage yeasts in the wine industry (review). *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 23-50.
- Madigan M., Martinko J. & Parker J. (2003) Brock Biology of Microorganisms, *Pearson Education, Inc.*, 10th edition
- Malacrino P., Tosi E., Caramia G., Prisco R. & Zapparoli G. (2005) The vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study of *Saccharomyces cerevisiae* strains under high sugar stress. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**, 466-472.
- Mañes-Lázaro R., Ferrer S., Roselló-Mora R. & Pardo I. (2008 $\alpha$ ) *Lactobacillus bobalius* sp nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2699-2703.
- Mañes-Lázaro R., Ferrer S., Roselló-Mora R. & Pardo I. (2008 $\beta$ ) *Lactobacillus uvarum* sp. nov.—A new lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**, 425-433.
- Mañes-Lázaro R., Ferrer S., Roselló-Mora R. & Pardo I. (2009) *Lactobacillus oeni* sp. nov., from wine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2010-2014.

- Mannazzu I, Clementi F & Ciani M (2002) Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts* (Ciani M, ed). Research Signpost, Trivandrum, India. 19–34.
- Mansure J. J., Panek A. D., Crowe L. M. & Crowe J. H. (1997) Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1191**, 309–316.
- Manzanares P.M Rojas V., Genovés S. & Vallés S. (1999) A preliminary search for anthocyanin- $\beta$ -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Sci. Technol.* **35** (1), 95-103.
- Martini A. (1993) Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* **3**, 165–176.
- Martorell P., Fernández-Espinar M. T. & Querol A. (2005) Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces*". *FEMS Yeast Res.* **5**, 1157-1165.
- Martorell P., Stratford M., Steels H., Fernández-Espinar Ma Teresa & Querol A. (2007) Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 234-242.
- Mendes Ferreira A., Climaco M. C. & Mendes Faia A. (2001) The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 67-71.
- Mesas J. M., Rodriguez M. C. & Alegre M. T. (2011) Characterization of lactic acid bacteria from musts and wines of three consecutive vintages of Ribeira Sacra. *Lett. Appl. Microbiol.* **52**, 258-268.
- Mondal K. C. & Pati B. R. (2000) Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6. *J. Basic Microbiol.* **40**(4), 223-32.
- Moreno-Arribas M. V. & Polo M. C. (2005) Winemaking microbiology and biochemistry. Current knowledge and future trends. *Cr. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 265-286.

- Navarro J. M. & Durand G. (1978) Fermentation alcoolique. Influence de la temperature sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levures. *Ann. Microbiol.* **129**, 215-221.
- Orlić S., Očić N., Jeromel A., Huić K. & Redžepović S. (2005) Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from Kutjevo wine growing area at the laboratory scale. *Agric. Cons. Sci.* **70** (3), 93-97.
- Osawa R. & Walsh T. P. (1993) Visual reading method for detection of bacterial tannase. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1251-1252.
- Osho A. (2005) Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. *African J. Biotechnol.* **4**, 660-662.
- Ough C. S., Davenport M. & Joseph K. (1989) Effects of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active dry wine yeasts. *Sm. J. Enol. Vitic.* **40**, 208-213.
- Pandey A., Webb C., Socol C. R. & Larroche C (2006) Enzyme technology. Springer Science and Business Media, Inc. and Asiatech Publishers, Inc.
- Pepi M., Lampariello L. R., Altieri R., Esposito A., Poerra G., Renzi M., Lobianco A., Feola A., Gasperini S. & Focardi S. E. (2009) Tannic acid degradation by strains *Serratia* spp. and *Pantoea* sp. isolated from olive oil mill waste mixtures. *Int. Biodeter. Biodegr.* 1-8.
- Pina C., Santos C., Couto A. J., Hogg T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* 21: 439–447.
- Prakitchaiwattana C. J., Fleet G. H. & Heard G. M. (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyze the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res.* **4**, 865-877.
- Pramateftaki P.V., Lanaridis P. & Typas M.A. (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 236-248.
- Pretorius I .S. & Van der Westhuizen T. J. (1999) The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine-industry- a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **12**, 3-31.

Pretorius I. S., van der Westhuizen T. J. & Augustyn O. P. H. (1999) Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **20**, 61–74

Pretorius I. S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16** (8), 675-729

Quintas C., Lima-Costa E. & Loureiro-Dias M. C. (2000) The effect of ethanol on the plasma membrane permeability of spoilage yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* **38** (1) 47-51.

Rademaker J. L. W., Louws F. J., Versalovic J. V., & de Bruijn F. J. (2008) Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kowalchuck G. A., de Bruijn F. J., Head I. M., Akkermans A. D. L., and van Elsas J. D. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Springer 611–644.

Rainieri S. & Pretorius I. S. (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol* **50**, 15–31.

Ribéreau-Gayon P. (1985) New developments in wine microbiology. *Am. Enol. Vitic.* **36**, 1-10.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donéche B. & Lonvaud A. (2000a) The use of sulfur dioxide in must and wine treatment. In: Ribéreau-Gayon P., ed., *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, **1**, 179-205.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donéche B. & Lonvaud A. (2000b) Red winemaking. In: Ribéreau-Gayon P., ed., *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England **1**, 359-406.

Romano P. & Suzzi G. (1993) Potential use for *Zygosaccharomyces* species in winemaking”. *J. Wine Res.* **4** (2), 87-94.

Romano P. Suzzi G., Comi G., Zironi R. & Maifreni M. (2008) Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 615-618.

Rose H. A. & Harrison S. J. (1970) *The Yeasts*. Academic Press London **1,2**.



- Ruiz A., Poblet M., Mas A. & Guillamon J. M. (2000) Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1981–1987.
- Saeki A., Theeragool G., Matsushita K., Toyama H., Lotong N. & Adachi O. (1997 $\beta$ ) Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 138-145.
- Salgueiro S. P, Sa-Correia I. & Novais J. M. (1988) Ethanol-induced Leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics and Relationship to Yeast Ethanol Tolerance and Alcohol Fermentation Productivity. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 903-909.
- Sambrook J. & Russel D. W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. 3<sup>rd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A. & Chen W. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Nat. Am. Soc.* **109** (16), 6241-6246.
- Schuller D. & Casal M. (2005) The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 292–304.
- Silva P., Cardoso H. & Gerós H. (2004) Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* **55**, 65-72.
- Soubeyrand V, Julien A. & Sablayrolles J. M. (2006) Rehydration protocols for active dry wine yeasts and search for early indicators of yeast activity. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 474–480.
- Stratford M. & Rose A. H. (1986) Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1-6.
- Swiegers J. H, Bartowsky E. J, Henschke P. A. & Pretorius I. S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Aust. J. Grape Wine Res.* **11**, 139–173.
- Takagi H., Takaoka M., Kawaguchi A. & Kubo Y. (2005) Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8656–8662.

- Takagi H., Matsui F., Kawaguchi A., Wu H., Shimoi H. & Kubo Y. (2007) Construction and analysis of self-cloning sake yeasts that accumulate proline. *J. Biosci. Bioeng.* **103**, 377–380.
- Torija M. J., Roze's N., Poblet M., Guillamo'n J. M. & Mas A. (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine areas during three consecutive years. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**, 345–352.
- Toro M.E. and Vazquez F. (2002) Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **18**: 347–354.
- Török T., Mortimer R. K., Romano P., Suzzi G. & Polsinelli M. (1996) Quest for wine yeasts – an old story revisited. *J. Indust. Microbiol.* **17**, 303-313.
- Tourdot-Maréchal R., Gaboriau D., Beney L. & Diviès C. (2000) Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 269-273.
- Van der Westhuizen T. J., Augustyn O. P. H., Khan W. & Pretorius I. S. (2000) Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21** (1), 10-16.
- Vaquero I., Macrobal A. & Muñoz R. (2004) Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Food Microbiol.* **96** (2), 199-204.
- Vaughan-Martini A. & Martini A. (1993) A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. *System. Appl. Microbiol.* **16**, 113–119.
- Vaughan-Martini A. (1995) *Saccharomyces barnetti* and *Saccharomyces spencerorum*: two new species of *Saccharomyces* sensu lato (van der Walt). *System. Appl. Microbiol.* **12**, 179–182.
- Vaughn R. H. (1955) Bacterial spoilage of wines with special reference to California conditions. *Adv. Food Res.* **6**, 67-108.
- Versalovic J., Kapur V., Koeth T., Mazurek G. H., Whittam T. S., Musser J. M., & Lupski J. R. (1995) DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-enhanced repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **119**, 23–29.

Wellington E. M. H., Williams S. T. (1978) Preservation of actinomycete inoculums in frozen glucerol. *Microbios. Lett.* **6**, 151-157.

Wellington E. M. H., Cresswell N. & Saunders V. A. (1990) Growth and survival of streptomycete inoculants and extent of plasmid transfer in steril and nonsterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1413-1419.

White T. J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. and White T. J. Academic Press Inc., New York.

Wibowo D., Eschenbruch R., Davis C. R., Fleet G. H. & Lee T. H. (1985) Occurance and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 203-313.

Yamada Y., Hoshino K. & Ishikawa T. (1997) The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1244-1251.

Zahavi T., Droby S., Cohen L., Weiss B. & Ben-Arie R. (2002) Characterisation of the yeast flora on the surface of grape berries in Israel. *Vitis.* **41**, 203-308.

Zironi R., Romano P., Suzzi G., Battistutta F. & Comi G. (1993) Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **15**, 235– 238.

Καραγκούνη Α. Δ. (2001) Εργαστηριακές ασκήσεις Γενικής Μικροβιολογίας. Εκδόσεις Σταμούλης ΑΕ, Αθήνα.

Λιούνη Μ. (2010) Σημειώσεις και Εργαστηριακές ασκήσεις Χημείας και Τεχνολογίας οίνου και άλλων αλκοολούχων ποτών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις. Αθήνα.

Ρούσσου Α. (2006) Συμβατική και Βιολογική καλλιέργεια αμπελιού στη Σαντορίνη. Πτυχιακή εργασία. Τμήμα Φυτικής Παραγωγής. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης.

