



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ρόλος της σακχαροπεριεκτικότητας και του σιδήρου στην
αλληλεπίδραση μεταξύ των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae*
και *Metschnikowia pulcherrima* στην αλκοολική ζύμωση**

ΒΑΣΙΛΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΜ: 18685045

Επιβλέπων Ονοματεπώνυμο: ΜΠΑΝΙΛΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ – 2023



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES**

BACHELOR THESIS

**The role of sugar and iron contents in the interaction
between *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia
pulcherrima* during alcoholic fermentation**

VASILAKIS GEORGIOS

Registration Number: 18685045

Supervisor name and surname: BANILAS GEORGIOS

ATHENS, JULY – 2023

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:

«Ο ρόλος της σακχαροπεριεκτικότητας και του σιδήρου στην
αλληλεπίδραση μεταξύ των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae*
και *Metschnikowia pulcherrima* στην αλκοολική ζύμωση»

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγήτῆ ΜΠΑΝΙΛΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	
Ψηφιακή Υπογραφή 2^ο Μέλους Επιτροπῆς ΝΗΣΙΩΤΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ ΚΥΡΙΑ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ, ΕΛΓΟ	
Ψηφιακή Υπογραφή 3^ο Μέλους Επιτροπῆς ΚΟΡΚΑΣ ΗΛΙΑΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογράφων/-ουσα Βασιλάκης Γεώργιος του Νικόλαου, με αριθμό μητρώου 18685045 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστήμων Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Οίνου Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

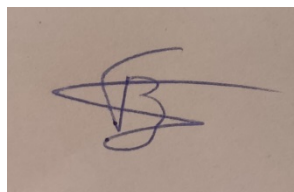
Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

*Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι 12 μήνες λόγω επικείμενης δημοσίευσης των αποτελεσμάτων και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή**

Ο/Η Δηλών/ούσα

ΒΑΣΙΛΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

(Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή)



***Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα Καθηγητή**

ΜΠΑΝΙΛΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Ψηφιακή Υπογραφή

** Σε εξαιρετικές περιπτώσεις και μετά από αιτιολόγηση και έγκριση του επιβλέποντα, προβλέπεται χρονικός περιορισμός πρόσβασης (embargo) 6-12 μήνες. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να υπογράψει ψηφιακά ο/η επιβλέπων/ουσα καθηγητής/τρια, για να γνωστοποιεί ότι είναι ενημερωμένος/η και συναινεί. Οι λόγοι χρονικού αποκλεισμού πρόσβασης περιγράφονται αναλυτικά στις πολιτικές του Ι.Α. ([σελ. 6](#)):*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο οίνος είναι το προϊόν αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους, όπου συμμετέχουν πολλοί μικροοργανισμοί, με σημαντικότερη τη δράση του *Saccharomyces cerevisiae* που συνήθως κατευθύνει και ολοκληρώνει τη διαδικασία. Παράλληλα, άλλοι πληθυσμοί άγριων ζυμών, γνωστών ως μη-*Saccharomyces*, συμμετέχουν κυρίως στα αρχικά στάδια και αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με το είδος *Saccharomyces cerevisiae*. Ενώ η δράση κάθε είδους ξεχωριστά έχει διερευνηθεί σε μεγάλο βαθμό κατά την οινοποίηση, πολύ λίγα είναι γνωστά για τις τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο σημαντικών ζυμών οινοποίησης, του *Saccharomyces cerevisiae* και του *Metschnikowia pulcherrima*, κάτω από την επίδραση διαφόρων θρεπτικών υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν πως σε σε συγκαλλιέργεια *S. cerevisiae*/*M. pulcherrima* σε υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους με 200 g/L σάκχαρα το *S. cerevisiae* είχε καλύτερες επιδόσεις της τάξης 0,5 log cfu/ml σε σχέση με το *M. pulcherrima*. Καθώς μειώνονταν τα σάκχαρα στα 100 g/L ο πληθυσμός *S. cerevisiae* σημείωσε πτώση μέχρι και 1 log cfu/ml ενώ η *M. pulcherrima* σημείωσε αύξηση πληθυσμού κατά 0,5 log cfu/ml και ξεπέρασε στα 20 g/L σακχάρων τους πληθυσμούς της *S. cerevisiae*. Στο υπόστρωμα YPD η *M. pulcherrima* φάνηκε να επηρεάζει την ανάπτυξη του *S. cerevisiae*, η οποία εμφάνισε σημαντική πτώση κατά 3 log cfu/ml. Όταν προσθέσαμε ποσότητα σιδήρου 10 mg/L στο YPD η πτώση αυτή περιορίστηκε σε 2 log cfu/ml. Κατά τη συγκαλλιέργεια των δυο ζυμών σε συνθετικό γλεύκος με 400 mg/L YAN η *M. pulcherrima* έδειξε πως επωφελείται και σημείωσε αύξηση του πληθυσμού της κατά 0,5 log cfu/ml φτάνοντας έτσι τους πληθυσμούς της *S. cerevisiae*. Ωστόσο όταν η τιμή αζώτου έφτασε τα 800-1200 mg/L YAN η ανάπτυξη της *M. pulcherrima* περιορίστηκε σε σχέση με τα 400 mg/L YAN από εκείνη της *S. cerevisiae*. Ακόμη όταν αντικαταστήθηκε η μορφή του αζώτου YAN με αυτή των 20 g/L πεπτόνης παρατηρήθηκε πτώση του πληθυσμού του *S. cerevisiae* κατά 1,2 log cfu/ml ενώ η *M. pulcherrima* έμεινε ανεπηρέαστη. Συνοψίζοντας η μελέτη έδειξε πως και οι δύο μικροοργανισμοί εκμεταλλεύονται το σίδηρο και το άζωτο, όταν βρίσκονται σε περίσσεια στο υπόστρωμα. Όμως αποδείχθηκε πως η μορφή του αζώτου συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την ανάπτυξη του *S. cerevisiae*. Τέλος τα σάκχαρα επιδρούν σημαντικά στην ανάπτυξη της *M. pulcherrima* ενώ δεν επηρεάζουν τον *S. cerevisiae*. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να αποτελέσουν βάση για εκτενέστερη διερεύνηση της σχέσης των δυο μικροοργανισμών, όχι μόνο μεταξύ τους αλλά και με άλλα είδη ζυμών σε διαφορετικά υποστρώματα.

Λέξεις κλειδιά: *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, αλκοολική ζύμωση, σίδηρος, σακχαροπεριεκτικότητα, μονοκαλλιέργεια, συγκαλλιέργεια, ζύμες, οινοποίηση.

ABSTRACT

Wine is the product of alcoholic fermentation of must, where many microorganisms participate, with the most important being the action of *Saccharomyces cerevisiae* which usually directs and completes the process. At the same time, other wild yeast populations, known as non-*Saccharomyces*, participate mainly in the initial stages and interact both with each other and with the *Saccharomyces cerevisiae* species. While the action of each individual species has been largely investigated in winemaking, very little is known about any interactions between the different species. In this work the interaction between two important winemaking yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima*, under the influence of different nutrient substrates was studied. The results of this research showed that in co-culture *S. cerevisiae*/*M. pulcherrima* on synthetic wort substrate with 200 g/L sugars *S. cerevisiae* performed better by 0.5 log cfu/ml than *M. pulcherrima*. As sugars were reduced to 100 g/L the *S. cerevisiae* population dropped by up to 1 log cfu/ml while *M. pulcherrima* showed a population increase of 0.5 log cfu/ml and at 20 g/L sugars exceeded the populations of *S. cerevisiae*. On YPD medium *M. pulcherrima* appeared to affect the growth of *S. cerevisiae*, which showed a significant drop of 3 log cfu/ml. When we added 10 mg/L iron to YPD this drop was limited to 2 log cfu/ml. During the co-cultivation of the two yeasts in synthetic wort with 400 mg/L YAN, *M. pulcherrima* showed that it benefits and recorded an increase in its population by 0.5 log cfu/ml, thus reaching the populations of *S. cerevisiae*. However, when the nitrogen value reached 800-1200 mg/L YAN the growth of *M. pulcherrima* was limited compared to 400 mg/L YAN than that of *S. cerevisiae*. Furthermore when the nitrogen form of YAN was replaced by that of 20 g/L peptone a drop in the population of *S. cerevisiae* by 1.2 log cfu/ml was observed while *M. pulcherrima* remained unaffected. In summary, the study showed that both microorganisms take advantage of iron and nitrogen, when they are in excess in the substrate. But it turned out that the form of nitrogen is largely related to the growth of *S. cerevisiae*. Finally, sugars significantly affect the growth of *M. pulcherrima* while they do not affect *S. cerevisiae*. These results can form the basis for a more extensive investigation of the relationship between the two microorganisms, not only with each other but also with other types of yeasts in different substrates.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae* , *Metschnikowia pulcherrima*, alcoholic fermentation, iron, sugar content, single culture, co-culture, yeasts, vinification.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γεώργιο Μπανίλα και την Δρ. Ασπασία Νησιώτου, ερευνήτρια στο ΙΤΑΠ (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) όπου πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα, οι οποίοι με συμβούλευαν καθόλη τη διάρκεια αυτής της μελέτης, βοηθώντας με σε κάθε δυσκολία που παρουσιάστηκε και αφιερώνοντας τον κατάλληλο χρόνο στην διδασκαλία εργαστηριακών τεχνικών και όχι μόνο, για την ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Επίσης οφείλω ένα ευχαριστώ στους συναδέλφους μου Στέλλα Ταουσάνη και Μαρίνα Καλφάκη, οι οποίες συνέβαλαν στην διεκπεραίωση των πειραμάτων και προσέφεραν τις γνώσεις τους για την επίλυση προβλημάτων που προέκυπταν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Ιωάννα Χαλβατζή για την βοήθειά της, τις συμβουλές της, την υπομονή της, τις γνώσεις που μου μετέδωσε και τον χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα που εμφανίστηκαν και να ολοκληρωθούν με επιτυχία τα πειράματα αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT.....	7
Ευχαριστίες	8
1. Εισαγωγή	15
1.1 Η αλκοολική ζύμωση και το κρασί.....	15
1.2 Σκοπός της εργασίας.....	16
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	17
2.1 Η ζύμη <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.2 Η ζύμη <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	18
2.3 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών	18
2.4 Σχετικές μελέτες	19
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
3.1 Θρεπτικά Υποστρώματα	20
3.2 Όργανα.....	21
3.3 Συνθετικό Γλεύκος.....	21
3.4 Μικροοργανισμοί.....	22
3.5 Προετοιμασία Καλλιιεργειών	22
3.6 Δειγματοληψίες.....	23
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	24
4.1 ΣΑΚΧΑΡΑ.....	24
4.1.1 <i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος με 200 g/L σάκχαρα.....	24
4.1.2. <i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος με 100 g/L σάκχαρα.....	26
4.1.3 <i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L σάκχαρα.....	29
4.1.4 Αποτελέσματα σακχάρων	33
4.2 ΣΙΔΗΡΟΣ.....	37
4.2.1. <i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i> σε YPD χωρίς σίδηρο	37
4.2.2. <i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i> σε YPD με σίδηρο	40
4.2.3 Αποτελέσματα σιδήρου.....	42
4.3 YAN	46
4.3.1. <i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος με 220 mg/L YAN.....	47
4.3.2. <i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος με 400 mg/L YAN.....	47
4.3.3. <i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος με 800 mg/L YAN.....	48
4.3.4 <i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος με 1200 mg/L YAN.....	49

4.3.5 <i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN	50
4.3.6 Αποτελέσματα YAN.....	54
4.4 Συνθετικό γλεύκος -YPD.....	56
4.5. Συγκρίσεις όλων των πειραμάτων – Αποτελέσματα.....	59
5. Συζήτηση.....	64
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος 200 g/L σακχάρων.....	25
Σχήμα 2: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>M. pulcherrima</i> σε συνθετικό γλεύκος 200 g/L σακχάρων.....	25
Σχήμα 3: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 200 g/L σάκχαρα.....	26
Σχήμα 4: : Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος 100 g/L σακχάρων.....	27
Σχήμα 5: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>M. pulcherrima</i> σε συνθετικό γλεύκος 100 g/L σακχάρων.....	28
Σχήμα 6: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 100 g/L σάκχαρα.....	29
Σχήμα 7: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό γλεύκος 20 g/L σακχάρων.....	30
Σχήμα 8: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>M. pulcherrima</i> σε συνθετικό γλεύκος 20 g/L σακχάρων.....	31
Σχήμα 9: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L σάκχαρα.....	32
Σχήμα 10: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε μονοκαλλιέργεια σε συνθετικό γλεύκος 200, 100 και 20 g/L σακχάρων	33
Σχήμα 11: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε μονοκαλλιέργεια σε συνθετικό γλεύκος 200, 100 και 20 g/L σακχάρων	34
Σχήμα 12: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε συγκαλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε συνθετικό γλεύκος 200, 100 και 20 g/L σακχάρων.....	35
Σχήμα 13: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε συγκαλλιέργεια με <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε συνθετικό γλεύκος 200, 100 και 20 g/L σακχάρων	36
Σχήμα 14: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε YPD χωρίς σίδηρο.....	37
Σχήμα 15: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε YPD χωρίς σίδηρο	38
Σχήμα 16: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε YPD χωρίς σίδηρο	39
Σχήμα 17: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε YPD με σίδηρο	40
Σχήμα 18: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε YPD με σίδηρο.....	41

Σχήμα 19: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε YPD με σίδηρο	42
Σχήμα 20: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε μονοκαλλιέργεια σε YPD με σίδηρο και χωρίς σίδηρο	43
Σχήμα 21: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε μονοκαλλιέργεια σε YPD με σίδηρο και χωρίς σίδηρο	44
Σχήμα 22: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε συγκαλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε YPD με σίδηρο και χωρίς σίδηρο	45
Σχήμα 23: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε συγκαλλιέργεια με <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε YPD με σίδηρο και χωρίς σίδηρο	46
Σχήμα 24: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 220 mg/L YAN.....	47
Σχήμα 25: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 400 mg/L YAN.....	48
Σχήμα 26: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 800 mg/L YAN.....	49
Σχήμα 27 : Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 1200 mg/L YAN.....	50
Σχήμα 28: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN	51
Σχήμα 29: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN.....	52
Σχήμα 30: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN.	53
Σχήμα 31: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε συγκαλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε συνθετικό γλεύκος με 1200, 800, 400, 220 mg/L YAN και 20 g/L πεπτόνη.	55
Σχήμα 32: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε συγκαλλιέργεια με <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε συνθετικό γλεύκος με 1200, 800, 400, 220 mg/L YAN και 20 g/L πεπτόνη.....	56
Σχήμα 33: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 220 mg/L YAN.....	57
Σχήμα 34: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) και <i>S. cerevisiae</i> (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN.	58
Σχήμα 35: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε μονοκαλλιέργεια σε όλα τα υποστρώματα.	60
Σχήμα 36: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε μονοκαλλιέργεια σε όλα τα υποστρώματα.	61

Σχήμα 37: Καμπύλες ανάπτυξης <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε συγκαλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε όλα τα υποστρώματα.....	62
Σχήμα 38: Καμπύλες ανάπτυξης <i>S. cerevisiae</i> (Sc) σε συγκαλλιέργεια με <i>M. pulcherrima</i> (Mp) σε όλα τα υποστρώματα.....	63

Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

SM Synthetic must (συνθετικό γλεύκος)

Mp *Metschnikowia pulcherrima*

Sc *Saccharomyces cerevisiae*

1. Εισαγωγή

1.1 Η αλκοολική ζύμωση και το κρασί.

Αλκοολική ζύμωση ονομάζεται η μετατροπή του γλεύκους των σταφυλιών σε κρασί με την συμβολή των ζυμών. Πρόκειται για μια περίπλοκη πορεία αντιδράσεων που επιφέρουν μεταξύ άλλων την παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα, προερχόμενα από την επεξεργασία των σακχάρων από τους μικροοργανισμούς. Πέρα από την αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα δημιουργούνται και άλλες ενώσεις με σημαντικό οινολογικό ενδιαφέρον. Αυτές μπορεί να είναι η γλυκερίνη, διάφορα ανόργανα οξέα, ανώτερες αλκοόλες, εστέρες και μια ποικιλία πτητικών ενώσεων. Όλες αυτές οι ενώσεις συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην τελική διαμόρφωση του κρασιού και διαφέρουν από οίνο σε οίνο. Ένα πλήθος παραγόντων συμμετέχουν για τη συσσώρευση των χημικών ενώσεων που καθορίζουν το τελικό προϊόν. Μεταξύ αυτών είναι η ποικιλία του αμπελιού, η τοποθεσία του αμπελώνα και η σύσταση του εδάφους, οι οινολογικές πρακτικές και τα είδη των ζυμών που αναλαμβάνουν την οينوποίηση (Cavaglia et al., 2022).

Οι διάφορες ζύμες που πραγματοποιούν τη ζύμωση, μπορούν να ανευρίσκονται στον αμπελώνα και συγκεκριμένα επάνω στον φλοιό των σταφυλιών. Υπάρχουν διάφορα είδη ανάλογα την περιοχή και τη ποικιλία που καλλιεργείται. Ανάλογα βέβαια και με τις προτιμήσεις του οينوποιού, γίνεται να προστεθούν επιλεγμένες ζύμες με επιθυμητά χαρακτηριστικά για το τελικό κρασί που θα παρασκευαστεί. Συχνότερες και γνωστότερες ζύμες για την διεξαγωγή μιας ζύμωσης αποτελούν αυτές του είδους *Saccharomyces* και ευρύτερα *S. cerevisiae* και *S. bayanus* οι οποίες μπορούν να δώσουν ωραία αρώματα και επιθυμητές γεύσεις ολοκληρώνοντας τη διαδικασία της ζύμωσης σε υποστρώματα με υψηλά σάκχαρα (Boulton et al., 2018).

Οι ζύμες οινολογικού ενδιαφέροντος θα μπορούσαν να χωριστούν σε *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces* είδη με τις τελευταίες να αποτελούνται κυρίως από τα γένη *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Hansenula* και *Metschnikowia*. Αυτές μπορούν να συμμετάσχουν σε ζυμώσεις κρασιού, όμως είναι δυνατό να δράσουν αρνητικά στη πορεία της ζύμωσης, είτε αναστέλλοντάς την είτε προκαλώντας άλλα προβλήματα στα αρχικά στάδια αυτής. Άλλα είδη ζυμών, όπως αυτά του γένους *Schizosaccharomyces* έχουν τα προσόντα να ζυμώσουν το γλεύκος των σταφυλιών. Παρόλα αυτά η τελική έκβαση της διαδικασίας, τις περισσότερες φορές, είναι μη αποδεκτή οινολογικά (Boulton et al., 2018).

Ως πολύπλοκο προϊόν το κρασί-γλεύκος χρειάζεται συνεχώς αναλύσεις, κατά την διάρκεια της ζύμωσης, ως προς το Ph, τη πυκνότητα, τη θερμοκρασία και την εκτίμηση από έμπειρο οινολόγο σχετικά με την γεύση, την μυρωδιά και το χρώμα του κρασιού. Όλα αυτά πραγματοποιούνται για την αποφυγή σφαλμάτων όπως αρνητική αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του κρασιού ή και

επιμόλυνση από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς, δηλαδή μύκητες και βακτήρια. Για την αποφυγή τέτοιου είδους καταστάσεων οι οινοποιοί προσθέτουνθειώδες, μια ουσία που προστατεύει το κρασί μας από μικροοργανισμούς, οξειδώσεις κ.ά. Η ποσότητα αυτής της ουσίας που μπορεί να προστεθεί είναι περιορισμένη (150 mg/L και 200 mg/L για κόκκινα και λευκά κρασιά αντίστοιχα) για λόγους πρώτα από όλα υγείας και έπειτα οργανοληπτικούς. Οι αναλύσεις του κρασιού για την εξασφάλιση της ποιότητας συχνά πραγματοποιούνται με φασματοσκόπια, όργανα ικανά να δώσουν γρήγορα αποτελέσματα αναφορικά με ουσίες όπως γλυκόζη και φρουκτόζη, φαινολικές ενώσεις, οξύτητα και αλκοολικό βαθμό. Όλα αυτά με λίγο κόπο όσον αναφορά τον χρόνο ετοιμασίας των δειγμάτων προς ανάλυση. Απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος και δεν υπάρχει φόβος αρνητικής μεταβολής του κρασιού μας (Julieta Cavaglia et al., 2022).

1.2 Σκοπός της εργασίας

Σε αυτή την εργασία θα επικεντρωθούμε στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* και *Metschnikowia pulcherrima*. Σκοπός μας είναι η κατανόηση των χαρακτηριστικών κάθε μικροοργανισμού όσον αναφορά την συμπεριφορά τους στα διάφορα υποστρώματα που θα αναπτυχθούν, αλλά και η μεταξύ τους σχέση ως συγκαλλιέργεια. Στόχος μας είναι η διεξαγωγή συμπερασμάτων ως προς τις προτιμήσεις των δύο αυτών ζυμών στα διαφορετικά αυτά υποστρώματα και η διερεύνηση της αναλογίας στη ποσότητα και στο είδος του υποστρώματος προκειμένου να ομοιάζει με εκείνο του γλεύκους.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1 Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

Η ζύμη *S. cerevisiae* είναι ένας από τους γνωστότερους μικροοργανισμούς στη μικροβιολογία όταν αναφερόμαστε στη διεξαγωγή ζυμώνσεων. Αυτό το είδος ζύμης μπορεί να ζυμώσει σάκχαρα πολύ καλά και να παράγει αιθανόλη, ανεξάρτητα του εάν υπάρχει οξυγόνο στο θρεπτικό μέσο που αναπτύσσεται ή όχι. Επιπρόσθετα υφίσταται ένα πλήθος παραγόντων, όπως η υψηλή θερμοκρασία, το διοξείδιο του άνθρακα, η χρήση αζώτου και γενικότερα η ικανότητα πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων, η γρήγορη κατανάλωση σακχάρων και η τελική παραγωγή αιθανόλης, οι οποίοι δημιουργούν ένα περιβάλλον μη ιδανικό για τους ανταγωνιστές του *S. cerevisiae*. Έτσι δίνεται η δυνατότητα σε αυτόν να κυριαρχεί σε πολλές ζυμώσεις έναντι άλλων ζυμών (Alonso-del-Real et al., 2019).

Η *S. cerevisiae* είναι δυνατόν να ζυμώσει και σε υψηλές αλλά και σε χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης. Η μόνη διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι στις χαμηλότερες θερμοκρασίες καταφέρνουν περισσότερα είδη ζυμών να ανταπεξέλθουν και να συμβάλλουν στην διαμόρφωση του τελικού προϊόντος (Alonso-del-Real et al., 2019).

Στην σύγχρονη οινολογία πολλές φορές ο *S. cerevisiae* τοποθετείται σε ζυμώσεις μαζί με non-*Saccharomyces*, δηλαδή άγριες ζύμες για τον συνδυασμό χαρακτηριστικών. Συνήθως οι άγριες ζύμες δεν επιφέρουν επιθυμητά αποτελέσματα όσον αφορά τη ζύμωση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν (Ciani et al., 2010). Παρόλα αυτά υπάρχουν και ορισμένες άγριες ζύμες που δίνουν μοναδικά χαρακτηριστικά στο κρασί, είτε από μόνες τους είτε σε συνδυασμό με άλλες ζύμες. Χαρακτηριστικά τέτοια που οδηγούν σε σημαντική πρόοδο στην αξία του τελικού κρασιού (Carozzi et al., 2015; Jolly et al., 2014; Tofalo et al., 2016). Αυτό είναι πολύ σημαντικό για ένα κρασί καθώς συστατικά που λείπουν από τον *S. cerevisiae*, όπως διάφοροι εστέρες, οξέα, ανώτερες αλκοόλες, μονοτερπένια και ένζυμα, συμπληρώνονται από τις άγριες ζύμες και το αντίστροφο (Carozzi et al., 2015). Με αυτόν τον τρόπο το παραγόμενο κρασί είναι πιο ολοκληρωμένο οργανοληπτικά και επιπλέον οι κίνδυνοι για μειωμένη ταχύτητα ζύμωσης ή ακόμα και για κολλημένη ζύμωση, σχεδόν εξαλείφονται. Τέλος τα ανεπιθύμητα οινολογικά χαρακτηριστικά από τις άγριες ζύμες μειώνονται ή και εξαφανίζονται με τη συμβολή του *S. cerevisiae* και των προϊόντων του (Nisiotou et al., 2018; Fleet, 2008; Jolly et al., 2006).

2.2 Η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima*.

Η *M. pulcherrima* είναι ένα άγριο είδος ζύμης που συναντάται σε διάφορα φυτά και επιλέγεται για ζυμώσεις είτε μοναχή της είτε σε συνδυασμό με άλλες ζύμες. Είναι γνωστή για την αντιμικροβιακή της δράση λόγω της αντιμικροβιακής ουσίας που παράγει: pulcherriminic οξύ. Αυτό είναι υπεύθυνο για την κατακράτηση σιδήρου και έτσι σχηματίζεται επίσης και η κόκκινη – βυσσινί χρωστική του pulcherrimin. Με αυτή τη τεχνική η Mr είναι σε θέση να εμποδίζει την επαρκή πρόσληψη σιδήρου από τους ανταγωνιστές της (Melvydas et al., 2020; Sipiczki, 2020; Vicente, et al., 2020).

Σε περίπτωση που προτιμηθεί η *M. pulcherrima* σε ζυμώσεις γλεύκους, αυτό θα συμβεί διότι επιδρά με θετικό τρόπο σε ουσίες όπως πολυφαινόλες, ανθοκυανίνες και φλαβονοειδή καθώς και στο χρώμα των κρασιών. Το τελευταίο οφείλεται στη μη επαρκή συσσώρευση ανθοκυανινών, από τη *M. pulcherrima*, που βρίσκονται σε κυτταρικά τοιχώματα (Karabegović, et al., 2021).

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει και η ενασχόληση με το συνδυασμό της *M. pulcherrima* με τον *S. cerevisiae* σε συγκαλλιέργια. Η *M. pulcherrima* είναι ανθεκτική ως προς τις τοξικές ουσίες που παράγονται από τον *S. cerevisiae* (Melvydas et al., 2020; Sipiczki, 2020; Vicente, et al., 2020). Παρόλα αυτά οι διαφορές των προηγούμενων μικροοργανισμών, από μονοκαλλιέργεια σε συγκαλλιέργια, έχουν να κάνουν και με την επαφή των κυττάρων τους και με τα θρεπτικά συστατικά που μοιράζονται (Sipiczki, 2020). Επιπρόσθετα βρέθηκε ότι μεταβολίτες που παρήχθησαν σε μονοκαλλιέργεια *M. pulcherrima*, απουσίαζαν σε συγκαλλιέργιες *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* συμπεραίνοντας έτσι πως υφίσταται εναλλαγή μεταβολιτών ανάμεσα σε αυτές τις ζύμες. Επιπλέον αυτή η ανάπτυξη μεταβολιτών στην συγκεκριμένη συγκαλλιέργια οφείλεται πέρα από την αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών και στην ικανότητα αφομοίωσης και αξιοποίησης των θρεπτικών ουσιών που προσφέρονται από το υπόστρωμα. Συνεπώς τα θρεπτικά στοιχεία επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη ποσότητα και το είδος των μεταβολιτών των *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae*. (Zilelidou και Nisiotou, 2021).

2.3 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών

Το κρασί περιέχει μια τεράστια ποικιλία ενώσεων και μικροοργανισμών που αντιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να δώσουν το τελικό προϊόν. Με άλλα λόγια η μικροβιολογία του γλεύκους σταφυλιών είναι τέτοια που σε συνδυασμό με τις φυσικοχημικές τάσεις που το χαρακτηρίζουν, μας δίνει ζυμωμένο μούστο ο οποίος στην ουσία έχει προέλθει από μικροβιακές αλλαγές και μικροβιακές αλληλεπιδράσεις (Zilelidou και Nisiotou, 2021).

2.4 Σχετικές μελέτες

Επιπλέον μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί, με αφορμή την αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των σακχάρων στα σταφύλια (Venios, X. et al., 2020). Έτσι οι οινολόγοι αναζητούν ζύμες ή συνδυασμό ζυμών που να μπορούν να επιφέρουν οίνους με χαμηλές ποσότητες αλκοόλης και ωραίο συνδυασμό αρωμάτων, καθώς αυτές φαίνεται να είναι οι προτιμήσεις των σημερινών καταναλωτών. Αποδείχθηκε λοιπόν πως ο συνδυασμός υβριδίων *S. kudriavzevii* με *S. cerevisiae* και *S. uvarum* έδωσαν κρασιά με τα προαναφερόμενα επιθυμητά χαρακτηριστικά και για αυτό φαίνεται να πρωταγωνιστούν σε πολλές ζυμώσεις τελευταία (Bruner, J. et al., 2020).

Επίσης σε άλλη έρευνα πραγματοποιήθηκε πείραμα μεταξύ *S. cerevisiae* και *Torulaspora delbrueckii* σε συγκαλλιέργεια με σκοπό να διασαφηνιστούν οι μηχανισμοί λειτουργίας στα αρχικά στάδια της προσαρμογής των δύο μικροοργανισμών σε μούστο με υψηλά σάκχαρα. Φάνηκε πως ο *T. delbrueckii* ωθεί τον *S. cerevisiae* στην αξιοποίηση των σακχάρων για καλύτερη προσαρμογή στο υπόστρωμα και μεγαλύτερη ανταγωνιστικότητα αναφορικά με την αφομοίωση θρεπτικών συστατικών. Ενώ ο *T. delbrueckii* επιβιώνει χάρις την ανθεκτικότητά του στο στρες που δημιουργείται από την οσμωτική πίεση (Tondini et al, 2020).

Ένα άλλο πείραμα όμως έγινε από μια συνάδελφο που περιείχε διάφορους συνδυασμούς μικροοργανισμών, το οποίο οδήγησε στην διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της *Metschnikowia pulcherrima* και του *S. cerevisiae*. Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκαν οι μονοκαλλιέργειες των ζυμών *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora uvarum*, *Lachancea thermotolerans* σε υπόστρωμα YPD. Επιπλέον, εξετάστηκαν και οι συγκαλλιέργειες της *M. pulcherrima* με τις επιμέρους άγριες ζύμες και αυτές σε υπόστρωμα YPD. Παρατηρήθηκαν μερικές πτώσεις πληθυσμών σε ορισμένους μικροοργανισμούς στη συγκαλλιέργεια με την *M. pulcherrima*, η οποία φαινόταν πως ευθύνεται για αυτή την αλλαγή, ενώ η ίδια παρέμενε αμετάβλητη. Η μεγαλύτερη πτώση είχε σημειωθεί στην συγκαλλιέργεια της *M. pulcherrima* με τον *S. cerevisiae* και για αυτόν τον λόγο διερευνήσαμε σε αυτή τη μελέτη την μεταξύ τους σχέση σε διάφορα υποστρώματα, κυρίως σε διάφορες παραλλαγές συνθετικού μούστου αλλά και σε YPD.

Πέρα από τα παραπάνω διερευνήθηκε και η περίπτωση ζύμωσης του *S. cerevisiae* και του *S. kudriavzevii* σε συγκαλλιέργεια. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι ο *S. cerevisiae* δεν αλλοιώνεται από τον ανταγωνιστή του *S. kudriavzevii* στις διάφορες θερμοκρασίες ζύμωσης που επιβλήθηκαν παρά μόνο σε εκείνες που η θερμοκρασία έφτανε τους 8°C. Εκεί φάνηκε οι δύο μικροοργανισμοί να συνυπάρχουν σε μοιρασμένα ποσοστά (περίπου 50-50) καθώς και να παράγουν κρασιά με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης και λιγότερη ποσότητα της αλκοόλης αιθανόλης, συγκριτικά με άλλες ζυμώσεις του ίδιου τύπου σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (Alonso-del-Real et al, 2019).

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Θρεπτικά Υποστρώματα

Τα μικροβιολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Lab M Limited, neogen culture media, neo Lab Mighe Labarbedarf-vertriebs GmbH, PanReac AppliChem ITW Reagents, SIGMA, SIGMA-ALDRICH, Riedel-deltaën, Honeywell Fluka, Merck, Mallinckrodt, Fluka-Garantie, SPL LIFE SCIENCES. Τα υλικά και η προετοιμασία τους για την διεξαγωγή των πειραμάτων περιγράφονται παρακάτω:

- Yeast Growth Medium (YPD) Agar: 20 gr/L Glucose, 20 gr/L Peptone, 10 gr/L Yeast Extract, 20 gr/L Agar
- Yeast Growth Medium (YPD) Broth: 20 gr/L Glucose, 20 gr/L Peptone, 10 gr/L Yeast Extract
- Yeast Growth Medium (YPD) Broth με σίδηρο: 20 gr/L Glucose, 20 gr/L Peptone, 10 gr/L Yeast Extract, 50mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.
- Wallerstein Laboratory (WL) Nutrient Agar : 60 gr/L Agar.
- Συνθετικό γλεύκος (SM-1) [Synthetic Must (Taillandrier et al., 2014)] τροποποιημένος, που περιείχε: 100 gr/L γλυκόζη, 100 gr/L φρουκτόζη, 3 gr/L μηλικό οξύ, 3 gr/L τρυγικό οξύ, 0,3 gr/L κιτρικό οξύ, 0,5 gr/L K_2SO_4 , 0,75 gr/L KH_2PO_4 , 0,25 gr/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,16 gr/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 3 gr/L NaCl, 50 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Oligoelements, Vitamins, Amino-acids
- Συνθετικό γλεύκος 100gr (SM100), περιείχε 50gr/L γλυκόζη και 50gr/L φρουκτόζη.
- Συνθετικό γλεύκος 20gr (SM20) σακχάρων περιείχε 10gr/L γλυκόζη και 10gr/L φρουκτόζη, πέρα από αυτές τις αλλαγές η σύσταση του μούστου ήταν ίδια με του SM-1.
- Συνθετικό γλεύκος με 200gr σακχάρων (100gr/L γλυκόζη και 100gr/L φρουκτόζη) αλλά με 400mg/L YAN, πέρα από αυτές τις αλλαγές η σύσταση του μούστου ήταν ίδια με του SM-1.
- Συνθετικό γλεύκος με 200gr σακχάρων (100gr/L γλυκόζη και 100gr/L φρουκτόζη) αλλά με 800mg/L YAN, πέρα από αυτές τις αλλαγές η σύσταση του μούστου ήταν ίδια με του SM-1.
- Συνθετικό γλεύκος με 200gr σακχάρων (100gr/L γλυκόζη και 100gr/L φρουκτόζη) αλλά με 1200mg/L YAN, πέρα από αυτές τις αλλαγές η σύσταση του μούστου ήταν ίδια με του SM-1.
- Συνθετικό γλεύκος με 200gr σακχάρων (100gr/L γλυκόζη και 100gr/L φρουκτόζη) αλλά με 20gr πεπτόνης αντί για 220mg YAN, πέρα από αυτές τις αλλαγές η σύσταση του μούστου ήταν ίδια με του SM-1.
- Ringer's solution ¼ strength

Η αποστείρωση των υποστρωμάτων και των μέσων έγινε στους 120 οC, 1,3 atm για 20 λεπτά πριν τη χρήση τους.

3.2 Όργανα

- Cell culture (SPL LIFE SCIENCES)
- Πλάκες Neubauer

3.3 Συνθετικό Γλεύκος

Για την παρασκευή του συνθετικού γλεύκους 1L ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Παρασκευή διαλύματος μικροστοιχείων (Διάλυμα 1): Ζυγίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των Oligoelements που αποτελούνται από 4 gr/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4 gr/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 gr/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 1 gr/L KI, 0,4 gr/L $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 gr/L H_3BO_3 και 1 gr/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ και στη συνέχεια διαλυτοποιήθηκαν σε ποσότητα απεσταγμένου νερού 1L. Τέλος, αποστειρώθηκαν με φίλτρο 0,22 mm.
- Παρασκευή διαλύματος Αναερόβιων παραγόντων (Διάλυμα 2): Ζυγίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των Anaerobic Factors που αποτελούνται από 15 gr/L ergosterol, 5 ml/L oleic acid, και προστέθηκαν ποσότητες 500 ml/L Tween 80 και 500 ml/L αιθανόλη. Στη συνέχεια διαλύθηκαν σε ποσότητα απεσταγμένου νερού 1L. Τέλος, αποστειρώθηκαν με φίλτρο 0,22 mm.
- Παρασκευή διαλύματος Βιταμινών (Διάλυμα 3): Ζυγίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των Vitamins που αποτελούνται από 0,15 gr/L παντοθενικό ασβέστιο, 0,025 gr/L υδροχλωρική θειαμίνη, 0,2 gr/L νικοτινικό οξύ, 0,025 gr/L πυριδοξίνη, 0,0003 gr/L βιοτίνη και 2 gr/L μυο ινοσιτόλη και στη συνέχεια διαλυτοποιήθηκαν σε ποσότητα απεσταγμένου νερού 1L. Τέλος, αποστειρώθηκαν με φίλτρο 0,22 mm.
- Παρασκευή διαλύματος αμινοξέων (Διάλυμα 4): Ζυγίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των αμινοξέων που αποτελούνται από 1,4 gr/L τυροσίνη, 13,7 gr/L τρυπτοφάνη, 2,5 gr/L ισολευκίνη, 3,4 gr/L ασπαρτικό οξύ, 9,2 gr/L γλουταμινικό οξύ, 28,6 gr/L αργινίνη, 3,7 gr/L λευκίνη, 5,8 gr/L θρεονίνη, 1,4 gr/L γλυκίνη, 38,6 gr/L γλουταμίνη, 11,1 gr/L αλανίνη, 3,4 gr/L βαλίνη, 2,4 gr/L μεθειονίνη, 2,9 gr/L φενυλαμίνη, 6,0 gr/L σερίνη, 2,5 gr/L χιστιδίνη, 1,3 gr/L λυσίνη, 1,0 gr/L κυστεΐνη, 46,8 gr/L προλίνη και στη συνέχεια διαλυτοποιήθηκαν σε ποσότητα απεσταγμένου νερού 1L. Τέλος, αποστειρώθηκαν με φίλτρο 0,22 mm.
- Παρασκευή Συνθετικού γλεύκους (1L): Ζυγίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των επιμέρους συστατικών 100 gr/L φρουκτόζη, 100 gr/L γλυκόζη, 3 gr/L τρυγικό οξύ, 3 gr/L μηλικό οξύ, 0,3 gr/L κιτρικό οξύ, 0,75 gr/L KH_2PO_4 , 0,5 gr/L K_2SO_4 , 0,25 gr/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,16 gr/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 gr/L NaCl και 50 mg/L $\text{FeSO}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ και διαλυτοποιήθηκαν σε ποσότητα απεσταγμένου νερού 1L. Έπειτα έγινε η ρύθμιση του pH στο 3,3 με τη προσθήκη NaOH ή HCl και μετά το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 120 oC, 1,3 atm για 20 λεπτά. Αφού το διάλυμα

έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκαν 1 mL από το Διάλυμα 1, 1 mL από το Διάλυμα 2, 10 mL από το Διάλυμα 3, 9,11 mL από το Διάλυμα 4 και 1,47 mL NH₄Cl, για να έχουμε το τελικό αφομοιώσιμο άζωτο ζυμών (YAN) στη ποσότητα των 220 gr/L, υπό ασηπτικές συνθήκες.

3.4 Μικροοργανισμοί

Στη παρούσα έρευνα εξετάστηκαν οι μονοκαλλιέργειες των ζυμών *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* και η συγκαλλιέργεια της *M. pulcherrima* με τον *S. cerevisiae* σε επαφή.

Οι ζύμες που ήταν αποθηκευμένες στους - 80°C, *Saccharomyces cerevisiae* Vin 13 και *Metschnikowia pulcherrima* WI4, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri με YPD agar, με τη μέθοδο της απομόνωσης και επώαστηκαν στους 28°C για 2-3 ημέρες. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε η κατάλληλη αποικία και ενοφθαλμίστηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 10 mL YPD broth και επώαστηκε στους 28°C για 24 ώρες χωρίς ανάδευση. Έπειτα, αφού ελέγχθηκε η θολερότητα της καλλιέργειας, μεταφέρθηκαν 300 μL σε κωνική, που περιείχε 30 mL SM, η οποία επώαστηκε στους 28°C για 18 ώρες, υπό ανάδευση (180 rpm). Η διαδικασία ακολουθήθηκε για αυτές τις δύο ζύμες σε όλα τα διαφορετικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

3.5 Προετοιμασία Καλλιεργείων

Μετά την επώαση των ζυμών στους 28°C για 18 ώρες, καταμετρήθηκαν τα κύτταρα τους με τη τεχνική άμεσης μικροσκοπικής καταμέτρησης με αιμοκυττόμετρο, τύπου Neubauer. Με τη τεχνική αυτή υπολογίστηκε η ποσότητα του εμβολίου κάθε ζύμης που θα χρησιμοποιηθεί.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές οι αραιώσεις των δειγμάτων με διάλυμα Ringer, εφόσον ήταν απαραίτητο. Παράλληλα, στην αντικειμενοφόρο της Neubauer τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα νερού στις ειδικές προεξοχές και στη συνέχεια τοποθετήθηκε μια καλυπτρίδα. Έγινε πλήρωση της αντικειμενοφόρου με τη κατάλληλη ποσότητα δείγματος και στη συνέχεια έγινε μικροσκόπηση με φακό εστίασης 40x. Τέλος, τα κύτταρα καταμετρήθηκαν και υπολογίστηκε ο πληθυσμός των ζυμών από τον παρακάτω τύπο:

Πληθυσμός: $5 \cdot 10^v \cdot 10^4 = \text{cfu/mL}$, όπου 5: ο αριθμός που πολλαπλασιάζεται για να καλυφθεί όλο το πλέγμα, 10^v : συντελεστής αραιώσης, 10^4 : ο συνολικός όγκος του πλέγματος

Αφού βρέθηκε ο πληθυσμός, υπολογίστηκε η ποσότητα του εμβολίου από τον ακόλουθο τύπο:

Εμβόλιο: $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$ όπου, C1: κύτταρα που υπολογίστηκαν, C2: επιθυμητά κύτταρα εμβολιασμού, V1: όγκος εμβολιασμού, V2: όγκος μέσου που θα εμβολιαστεί

Μετά τον υπολογισμό του εμβολίου, σε Falcon που περιέχει την κατάλληλη ποσότητα SM τοποθετήθηκε το εμβόλιο, αφού πρώτα αφαιρέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα που θα προστεθεί. Στη συνέχεια, σε εξειδικευμένα τρυβλία προστέθηκαν 3 mL για κάθε μονοκαλλιέργεια ξεχωριστά και 1,5 mL κάθε εξεταζόμενης ζύμης για κάθε συγκαλλιέργεια, υπό ασηπτικές συνθήκες. Μετά το πέρας των εμβολιασμών, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 20°C υπό ανάδευση σε 120 rpm. Στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο τεχνικές επαναλήψεις αφού χρησιμοποιήθηκε το ίδιο εμβόλιο. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκφράζονται με τη δημιουργία καμπυλών ανάπτυξης σε μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες.

3.6 Δειγματοληψίες

Οι δειγματοληψίες για την καταμέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκαν στους εξής χρόνους: t_0 =χρόνος εμβολιασμού, t_1 = 3 ώρες, t_2 = 6 ώρες, t_3 = 9 ώρες, t_4 = 12 ώρες, t_5 = 24 ώρες, t_6 = 36 ώρες, t_7 = 48 ώρες, t_8 = 72 ώρες ή σε t_0 =χρόνος εμβολιασμού, t_1 = 24 ώρες, t_2 = 48 ώρες, t_3 = 72 ώρες, t_4 = 96 ώρες, t_5 = 120 ώρες. Κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, υπό ασηπτικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, όπου σε 900 μ L διαλύματος Ringer προστίθενται 100 μ L δείγματος. Έπειτα, έγινε σπορά σε τρυβλία με YPD agar και WL agar, τα οποία στη συνέχεια επώαστηκαν στους 28°C για 3 ημέρες και ακολούθησε η καταμέτρηση των αποικιών και τέλος οι καμπύλες ανάπτυξης.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

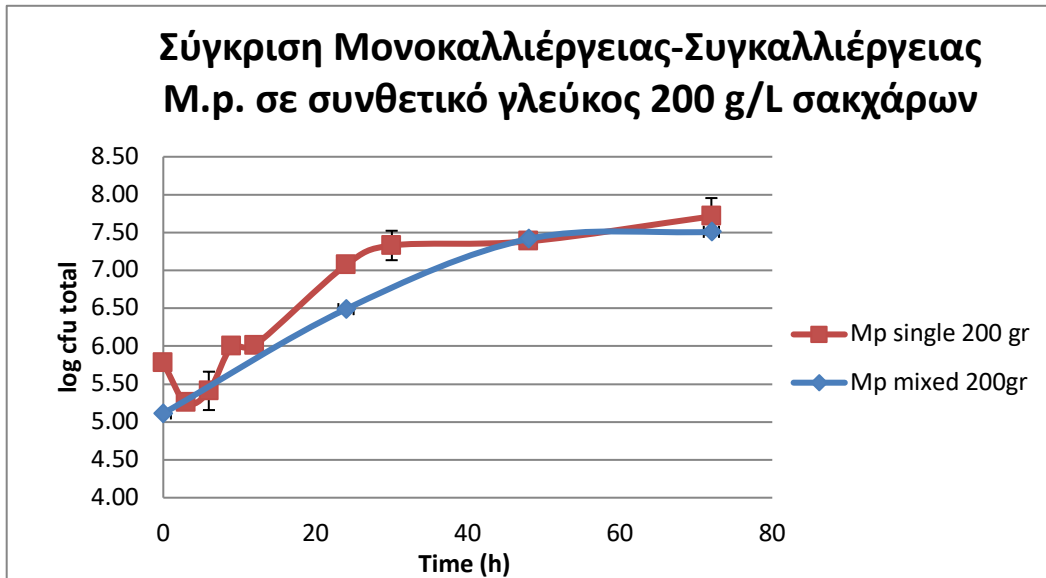
Για την καλύτερη κατανόηση των διαγραμμάτων οφείλουμε να υπογραμμίσουμε το εξής : κάποιες επαναλήψεις πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν για 120 ώρες αντί για 72, διότι θέλαμε να εξετάσουμε το ενδεχόμενο αλλοίωσης της πρώτης επανάληψης σε βάθος χρόνου. Με άλλα λόγια απορρίψαμε το ενδεχόμενο του χρόνου ως αιτία για διαφορετικό αποτέλεσμα. Σε όλα τα πειράματα που οι μετρήσεις διήρκησαν παραπάνω ώρες σε σχέση με τη πρώτη επανάληψη δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στο γενικό συμπέρασμα αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών.

4.1 ΣΑΚΧΑΡΑ

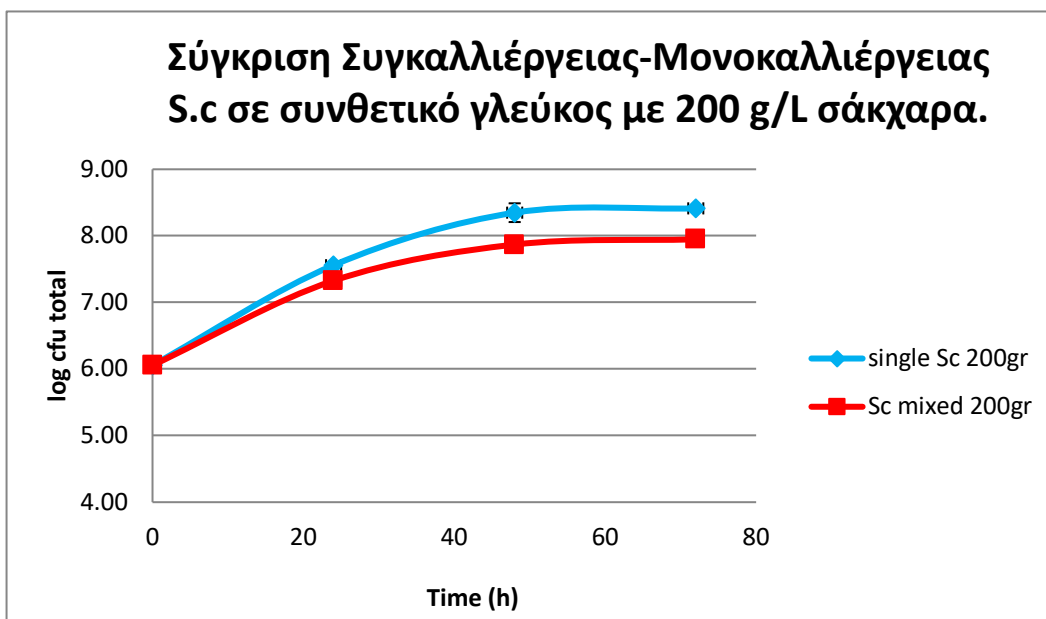
Σε αυτά τα πειράματα βάλουμε τους μικροοργανισμούς να αναπτυχθούν με επαφή σε διάφορες συγκεντρώσεις σακχάρων προκειμένου να εντοπίσουμε την ιδανικότερη ποσότητα αυτών για κάθε μικροοργανισμό.

4.1.1 *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος με 200 g/L σάκχαρα

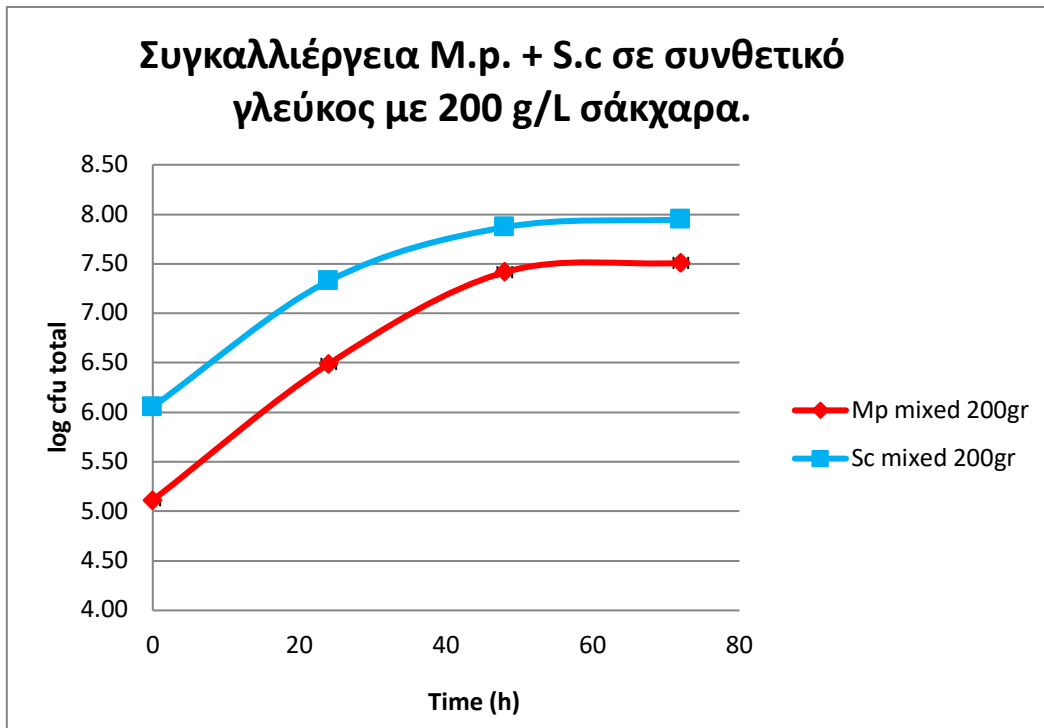
Οι μικροοργανισμοί *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae* αναπτύχθηκαν σε συνθετικό γλεύκος 200 g/L σακχάρων για 72 ώρες μαζί ως συγκαλλιέργεια αλλά και ξεχωριστά ως μονοκαλλιέργειες. Παρατηρήθηκε πως και οι δυο μικροοργανισμοί λόγω ανταγωνισμού έχουν μια πτώση στη συγκαλλιέργεια περίπου 0,5 log cfu/ml συγκριτικά με τους πληθυσμούς που πέτυχαν ως μονοκαλλιέργειες (η *M. pulcherrima* όχι σε όλα τα σημεία). Παρόλα αυτά η *M. pulcherrima* στη συγκαλλιέργεια είχε μικρότερο πληθυσμό σε σχέση με τον *S. cerevisiae*. Τέλος παρουσιάστηκε μια δυσκολία αναφορικά με τη *M. pulcherrima* η οποία φαίνεται πως δεν μπορεί να φτάσει τον αρχικό επιθυμητό πληθυσμό 10^6 cfu/ml στην t0 (0 hours) στο συγκεκριμένο μέσο ανάπτυξης.



Σχήμα 1: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος 200 g/L σακχάρων.



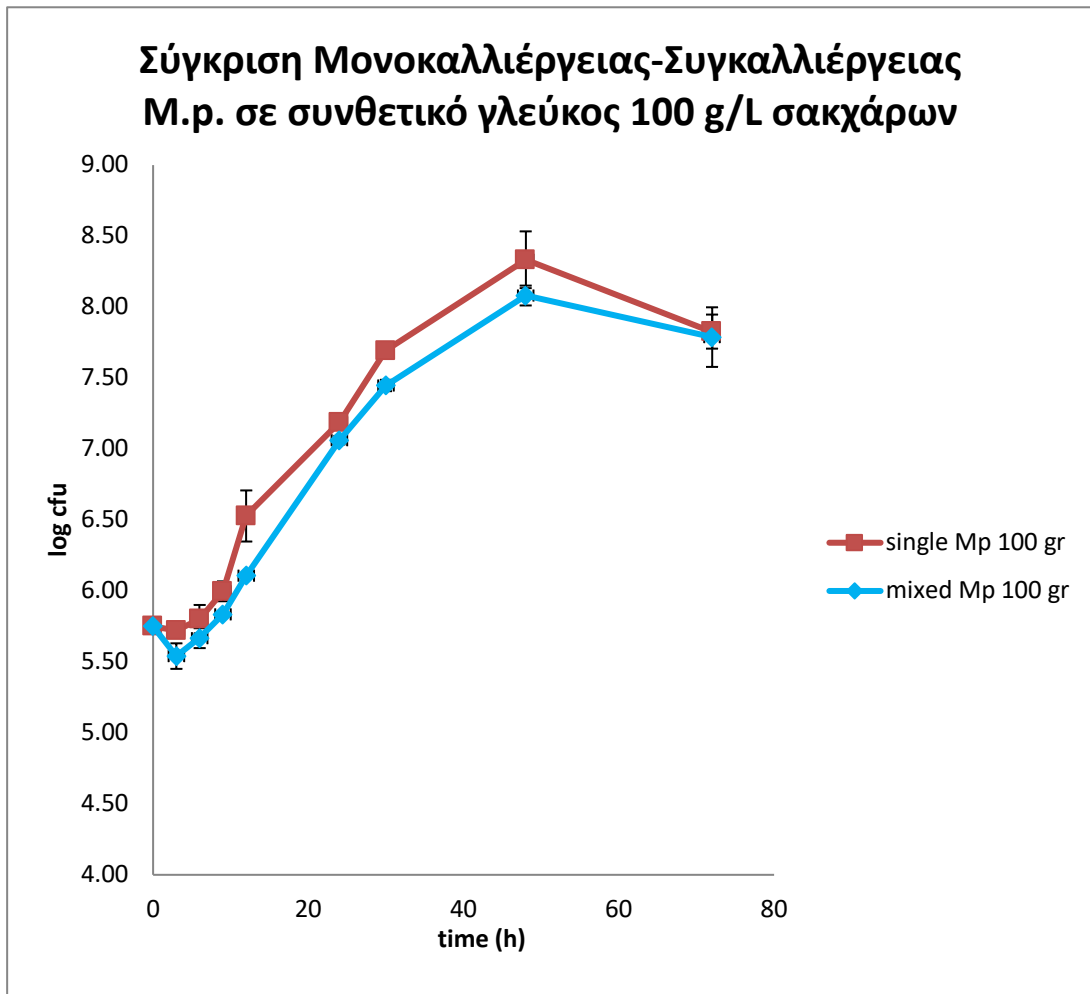
Σχήμα 2: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* σε συνθετικό γλεύκος 200 g/L σακχάρων.



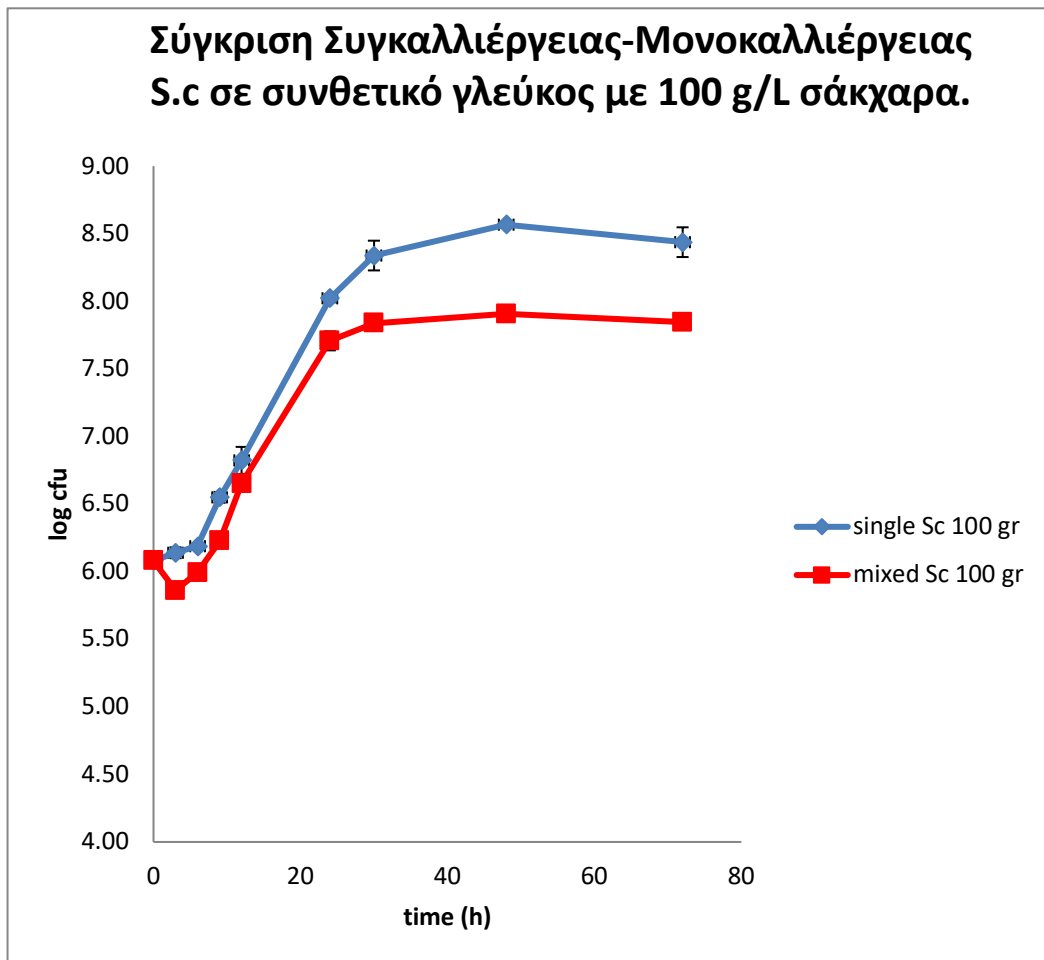
Σχήμα 3: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 200 g/L σάκχαρα.

4.1.2. *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος με 100 g/L σάκχαρα

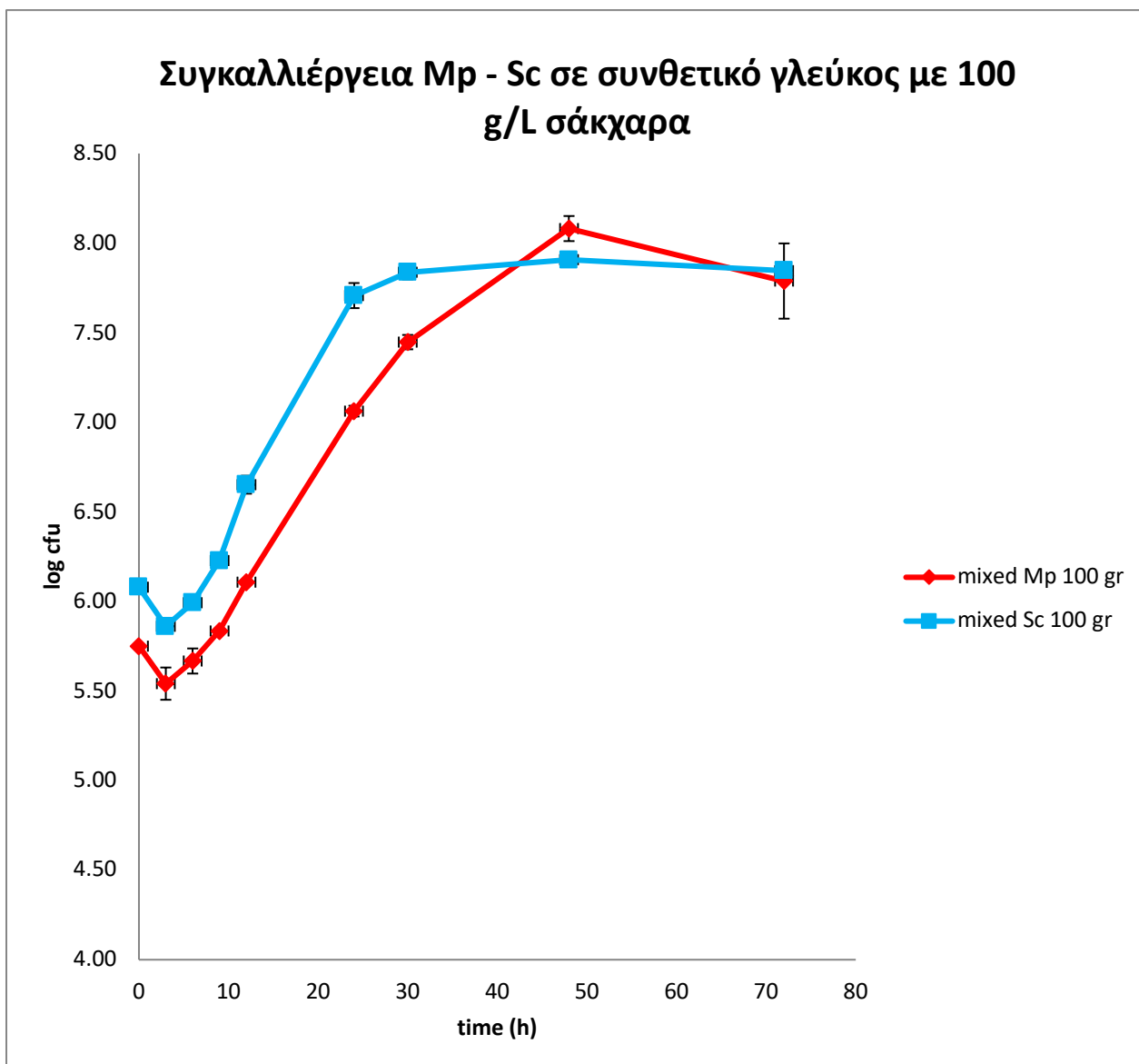
Το πείραμα επαναλήφθηκε αλλά με διαφορετική και μειωμένη ποσότητα σακχάρων και για 72 ώρες αντί για 120. Οι ίδιοι μικροοργανισμοί τοποθετήθηκαν σε συνθετικό μούστο με 100 g/L σακχάρων και παρατηρήθηκε πως η *M. pulcherrima* δεν επηρεάστηκε από τον *S. cerevisiae* στη συγκαλλιέργεια ενώ ο *S. cerevisiae* επηρεάστηκε από την *M. pulcherrima* στη συγκαλλιέργεια έχοντας πτώση στον πληθυσμό του κατά περίπου 0,5 log cfu/ml. Στη συγκαλλιέργεια γενικότερα κάτω υπό αυτές τις συνθήκες (100 g/L σάκχαρα) οι μικροοργανισμοί όπως φαίνεται παρακάτω πετυχαίνουν τους ίδιους πληθυσμούς (διάγραμμα Mp-Sc) στα τελευταία σημεία με τη μόνη διαφορά ότι η *M. pulcherrima* παρουσιάζει μεγαλύτερη φάση προσαρμογής.



Σχήμα 4: : Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος 100 g/L σακχάρων.



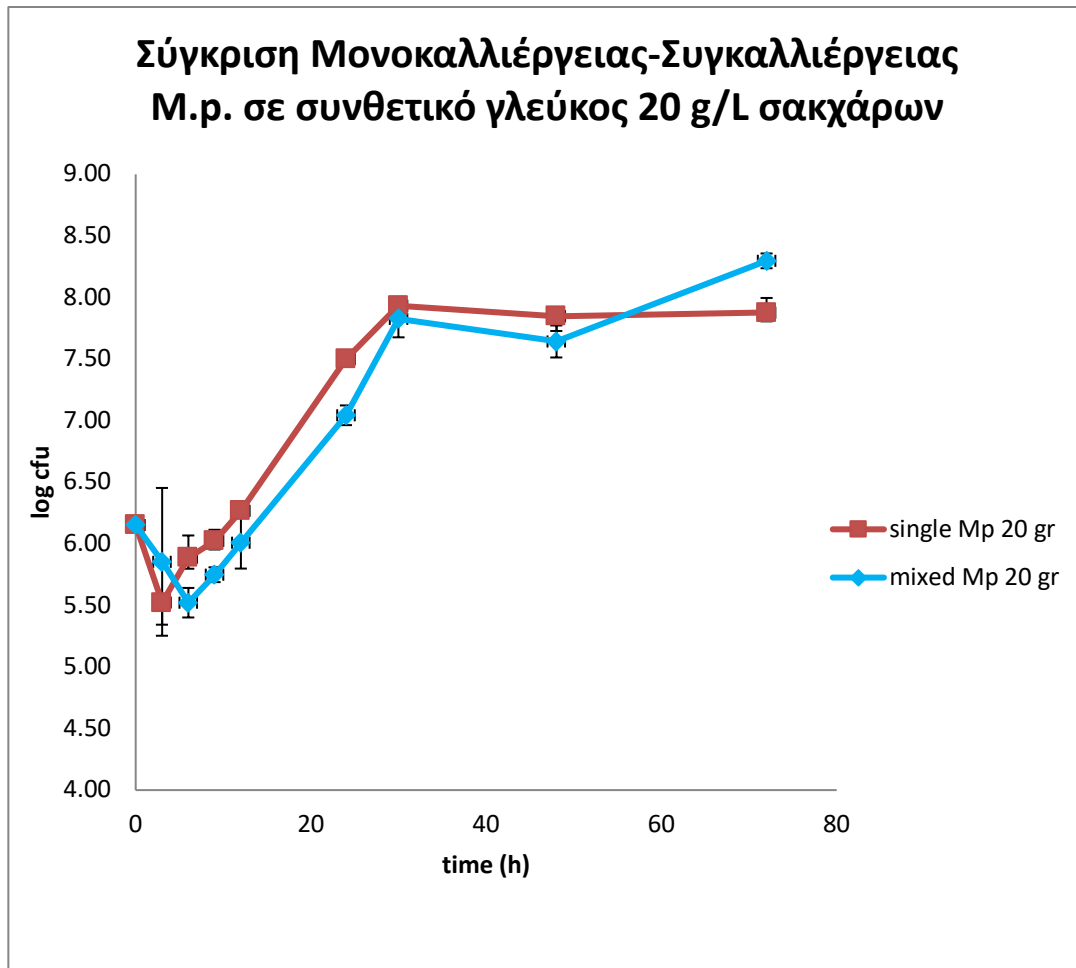
Σχήμα 5: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (*Sc*) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* σε συνθετικό γλεύκος 100 g/L σακχάρων



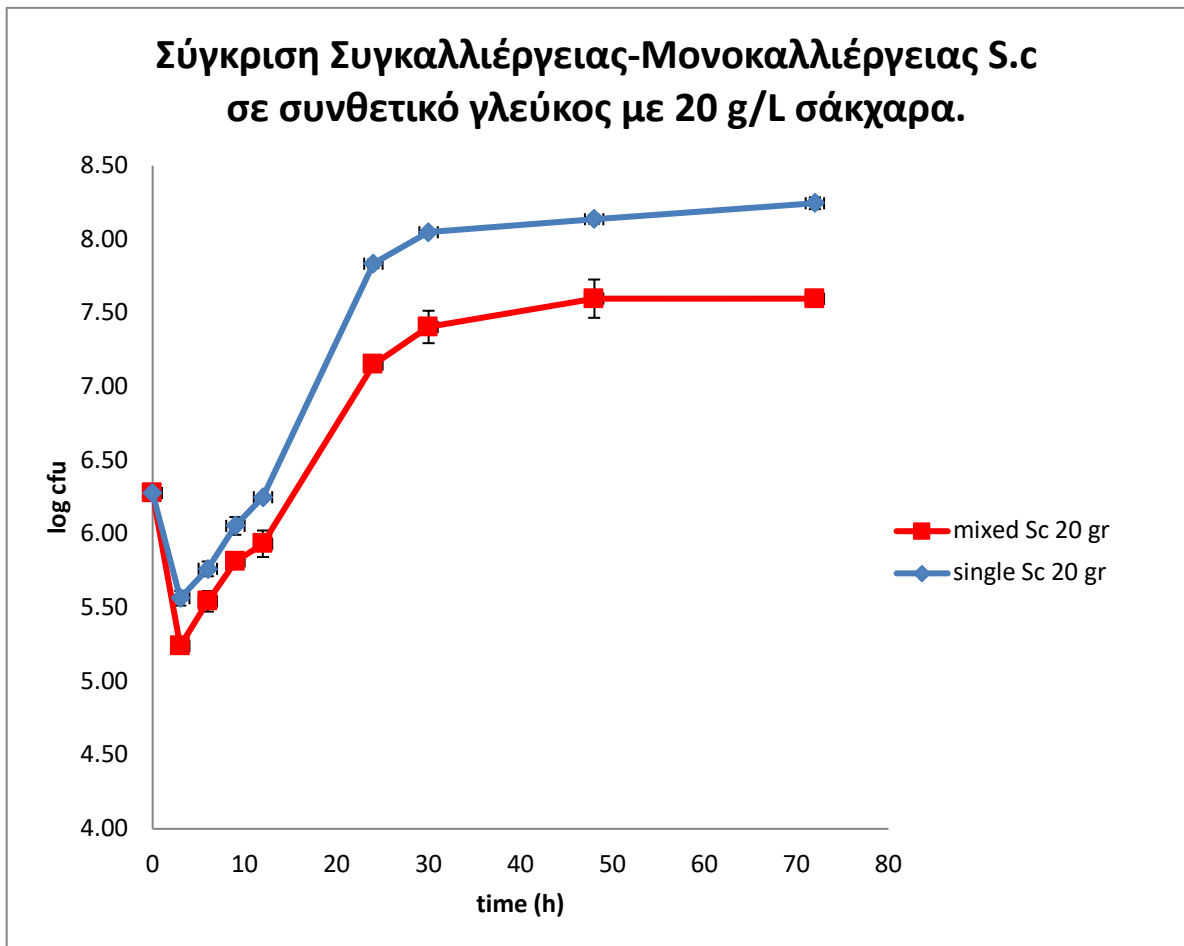
Σχήμα 6: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 100 g/L σάκχαρα.

4.1.3 *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L σάκχαρα

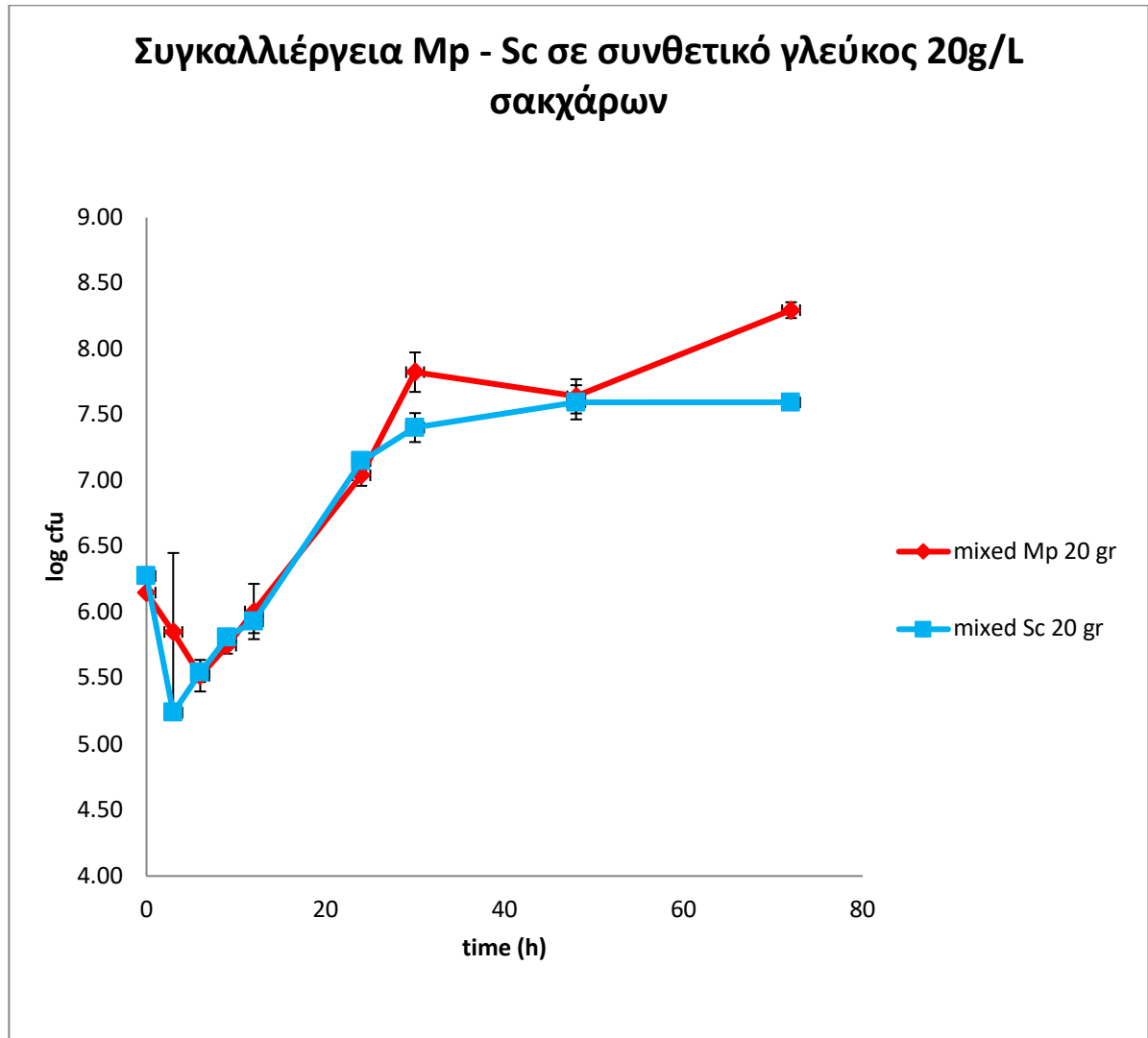
Ένα τρίτο πείραμα πραγματοποιήθηκε με διαφορετική ποσότητα σακχάρων, αυτή τη φορά 20 g/L και για 72 ώρες. Η *M. pulcherrima* για μια ακόμα φορά δείχνει να μην επηρεάζεται από τον *S. cerevisiae*. Από την άλλη ο *S. cerevisiae* όταν αναπτύσσεται σε συγκαλλιέργεια με τη *M. pulcherrima* έχει μια διαφορά περίπου 0,5 log cfu/ml όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις διαφορετικής περιεκτικότητας σακχάρων. Όμως στη συγκαλλιέργεια σημειώθηκε μεγαλύτερος πληθυσμός της *M. pulcherrima* από τον *S. cerevisiae* φαινόμενο που στις προηγούμενες περιπτώσεις ήταν ανεστραμμένο. Συγκεκριμένα οι δυο μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν παράλληλα στα πρώτα σημεία αλλά προς το τέλος των μετρήσεων βλέπουμε διαφορά 0,4-0,7 log cfu/ml με την *M. pulcherrima* αυτή τη φορά να υπερέχει του *S. cerevisiae*.



Σχήμα 7: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος 20 g/L σακχάρων.



Σχήμα 8: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* σε συνθετικό γλεύκος 20 g/L σακχάρων.

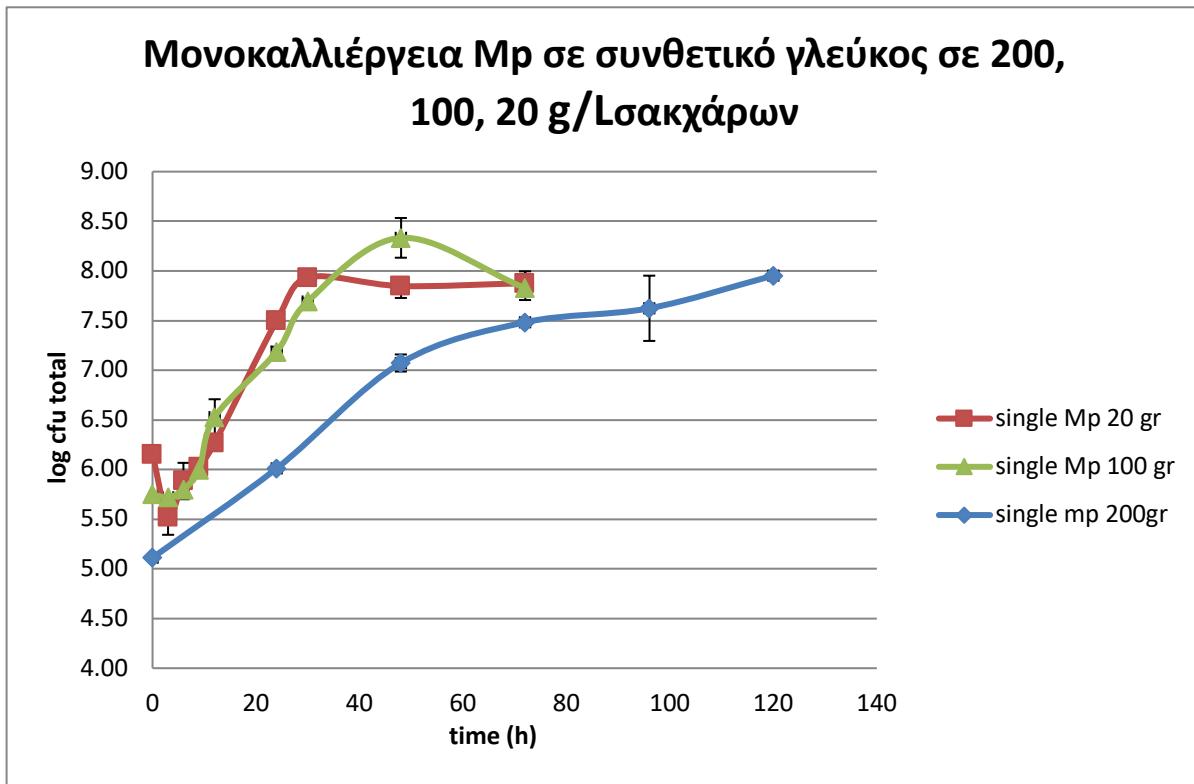


Σχήμα 9: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L σάκχαρο.

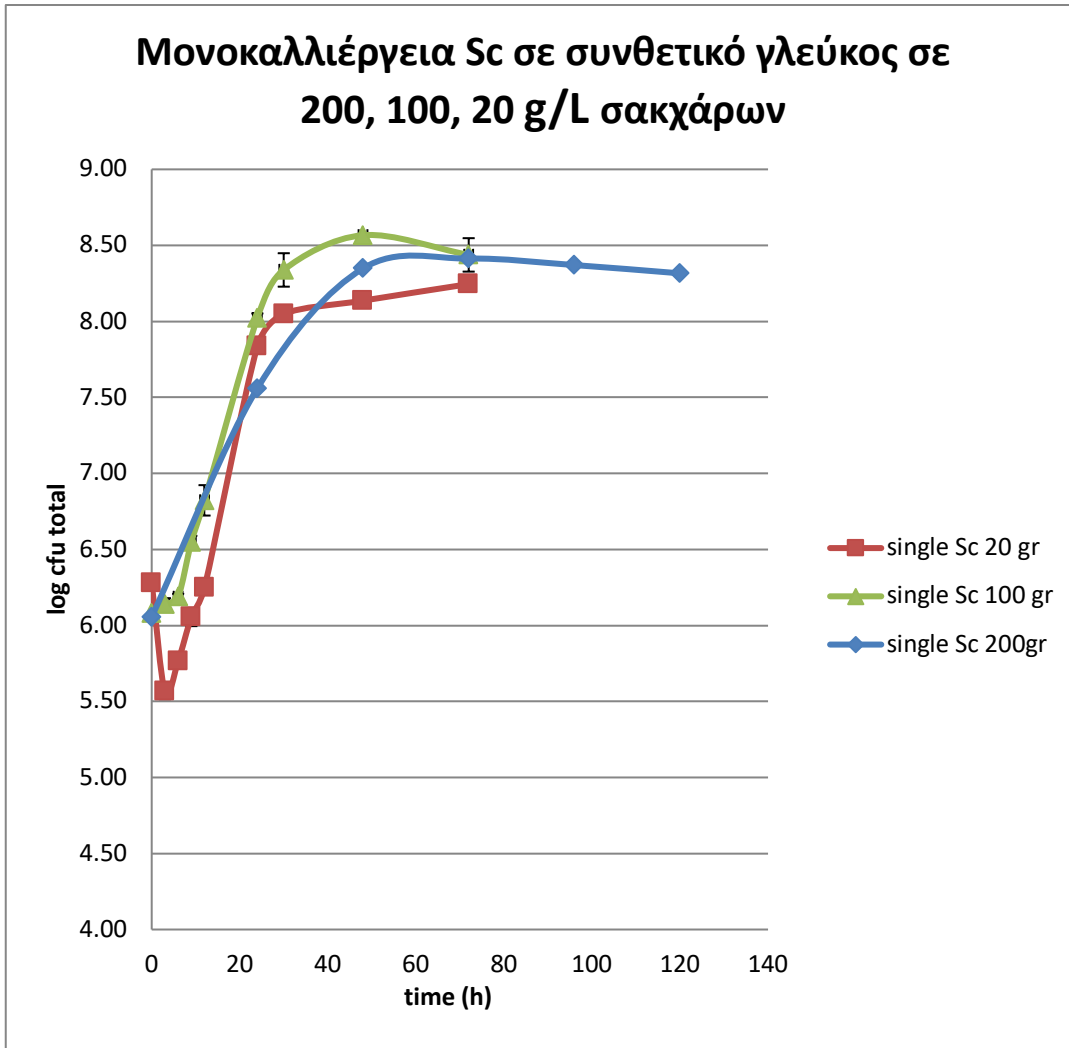
4.1.4 Αποτελέσματα σακχάρων

Στις 3 διαφορετικές μονοκαλλιέργειες της *M. pulcherrima* η χειρότερη ήταν εκείνη των 200 g/L σακχάρων, με τις άλλες δύο περιπτώσεις 20 και 100 g/L να ανεβάζουν τον πληθυσμό της *M. pulcherrima* 0,4-1 log cfu/ml, με τη μεγαλύτερη διαφορά να βρίσκεται στην εκθετική φάση. Όσον αφορά την μονοκαλλιέργεια του *S. cerevisiae* τα αποτελέσματα έδειξαν πως ανεξαρτήτως της ποσότητας των σακχάρων δεν υπάρχουν σοβαρές αλλαγές στον πληθυσμό του μικροοργανισμού.

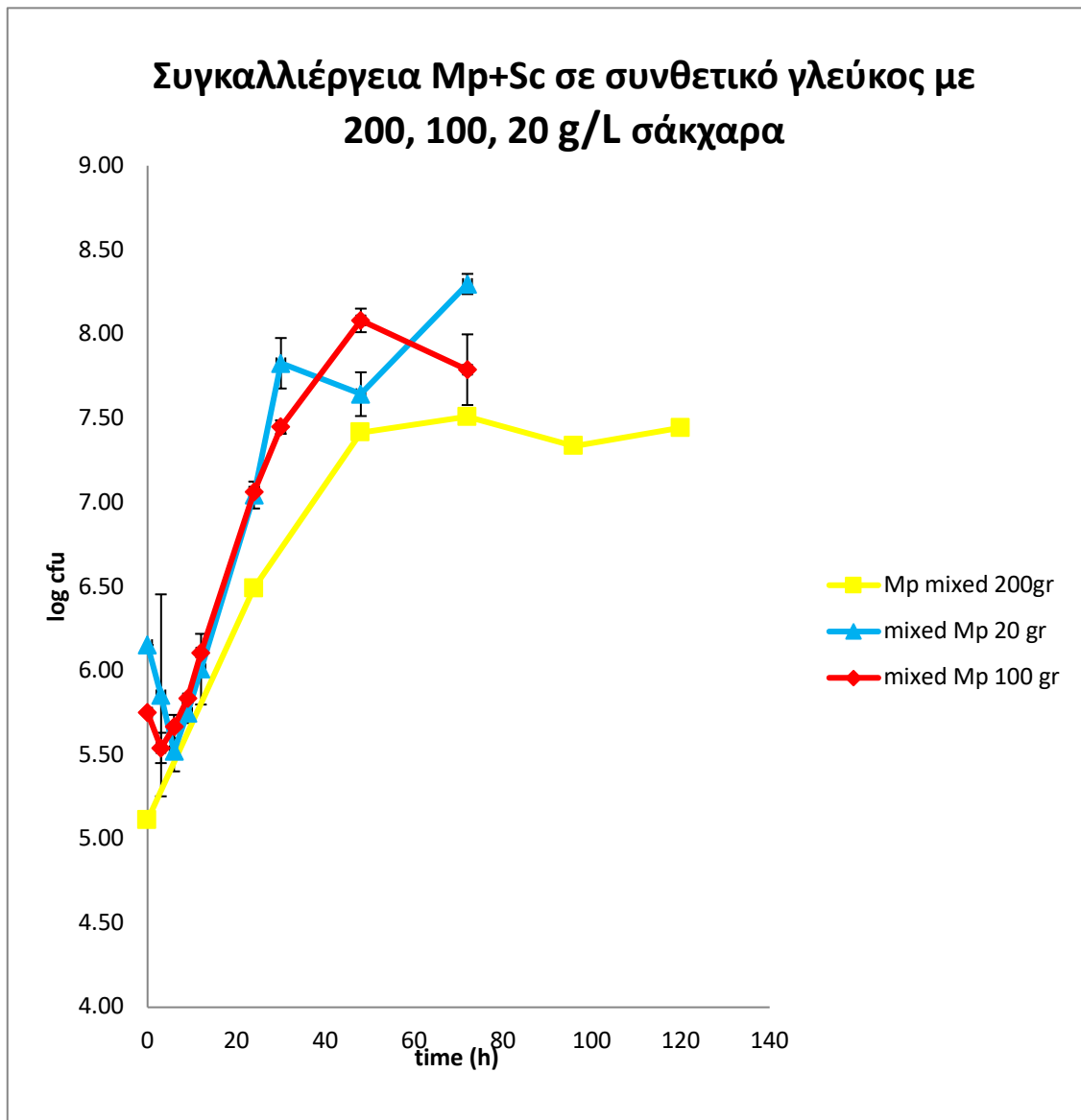
Συνεχίζοντας στις συγκαλλιέργειες παρατηρήθηκε στην περίπτωση της *M. pulcherrima* πως έχουμε μεγαλύτερη ανάπτυξη στα 20 g/L και στα 100 g/L από ότι στα 200 g/L σάκχαρα. Η διαφορά κυμαίνεται από 0,4 έως 0,7 log cfu/ml. Σχετικά με τη συγκαλλιέργεια του *S. cerevisiae* σε αυτές τις διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχάρων έχουμε να πούμε πως η ανάπτυξή του παρεμποδίζεται ελαφρώς στη ποσότητα 20 g/L σακχάρων εφόσον σε αυτό το υπόστρωμα αναπτύσσεται καλύτερα και ο ανταγωνιστής του *M. pulcherrima*.



Σχήμα 10: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια σε συνθετικό γλεύκος 200, 100 και 20 g/L σακχάρων.

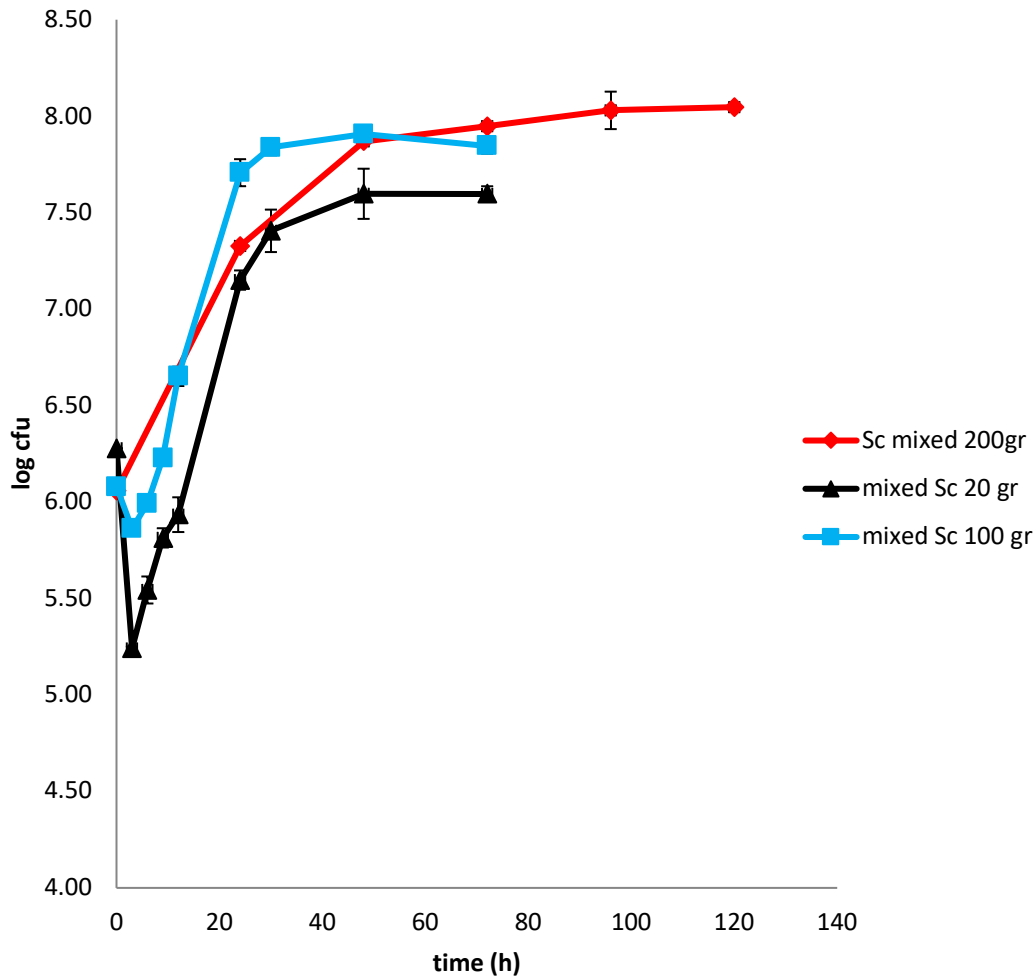


Σχήμα 11: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (*Sc*) σε μονοκαλλιέργεια σε συνθετικό γλεύκος 200, 100 και 20 g/L σακχάρων.



Σχήμα 12: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* (Sc) σε συνθετικό γλεύκος 200, 100 και 20 g/L σακχάρων.

Συγκαλλιέργεια Sc+Mr σε συνθετικό γλεύκος με 200, 100, 20 g/L σάκχαρα



Σχήμα 13: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* (Mr) σε συνθετικό γλεύκος 200, 100 και 20 g/L σακχάρων.

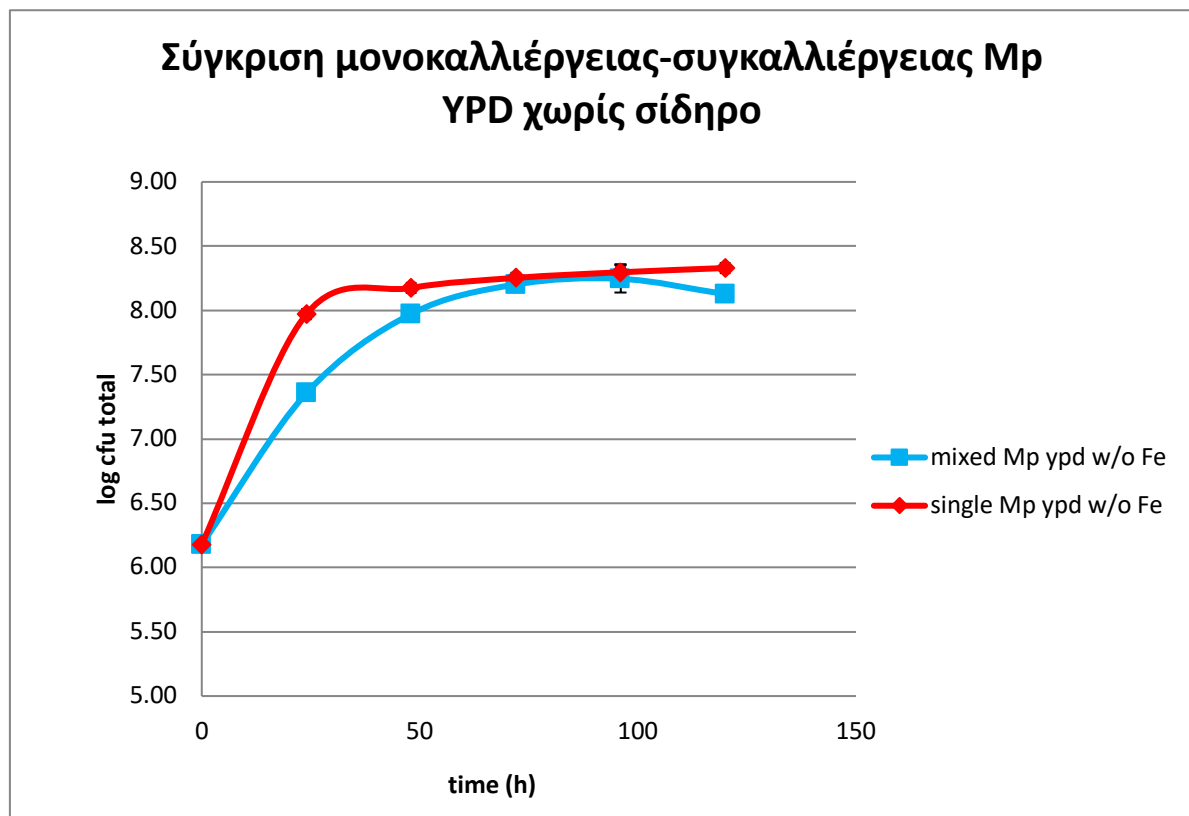
4.2 ΣΙΔΗΡΟΣ

Εξαιτίας της *M. pulcherrima* και του τρόπου με τον οποίο αφομοιώνει το σίδηρο καθώς και της ικανότητάς της να αποτρέπει την πρόσληψή του από άλλους μικροοργανισμούς (Zilelidou and Nisiotou, 2021), πραγματοποιήθηκε το επόμενο πείραμα έτσι ώστε να διαπιστώσουμε αν ο επιπλέον σίδηρος θα αποφέρει διαφορετικά αποτελέσματα. Επομένως δημιουργήθηκαν δύο ίδια υποστρώματα που το ένα περιείχε σίδηρο ενώ το άλλο όχι, προκειμένου να εντοπίσουμε τις τυχόν διαφορές που θα εμφανίζονταν.

4.2.1. *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* σε YPD χωρίς σίδηρο

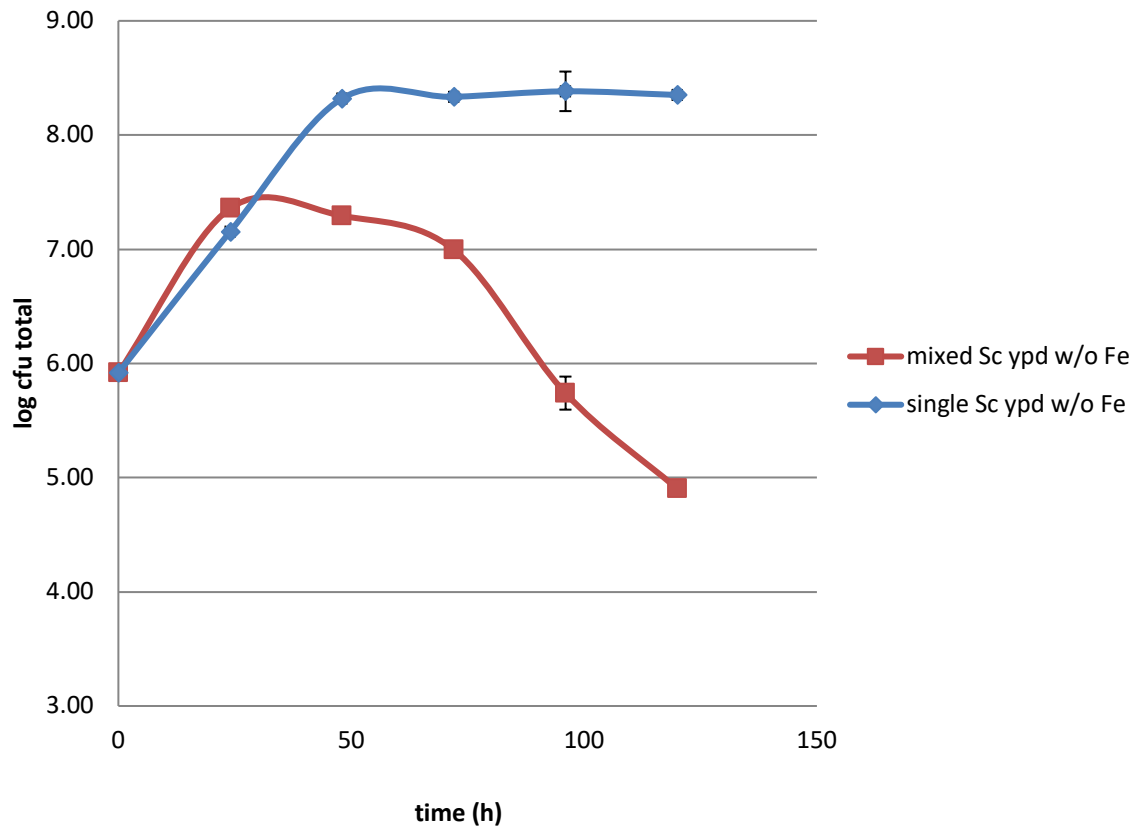
Έτσι λοιπόν σε υπόστρωμα YPD BROTH χωρίς να περιέχει σίδηρο αναπτύξαμε τους μικροοργανισμούς *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae* για 120 ώρες και σε συγκαλλιέργεια με επαφή και σε μονοκαλλιέργειες.

Η μονοκαλλιέργεια της *M. pulcherrima* έδειξε να μην επηρεάζεται από τον *S. cerevisiae* σε αυτό το υπόστρωμα. Αντιθέτως ο *S. cerevisiae* είχε μεγάλη μεταβολή στον πληθυσμό του στη συγκαλλιέργεια, η οποία ήταν μεταξύ 1-3 log cfu/ml, αρκετά σημαντική αλλαγή.

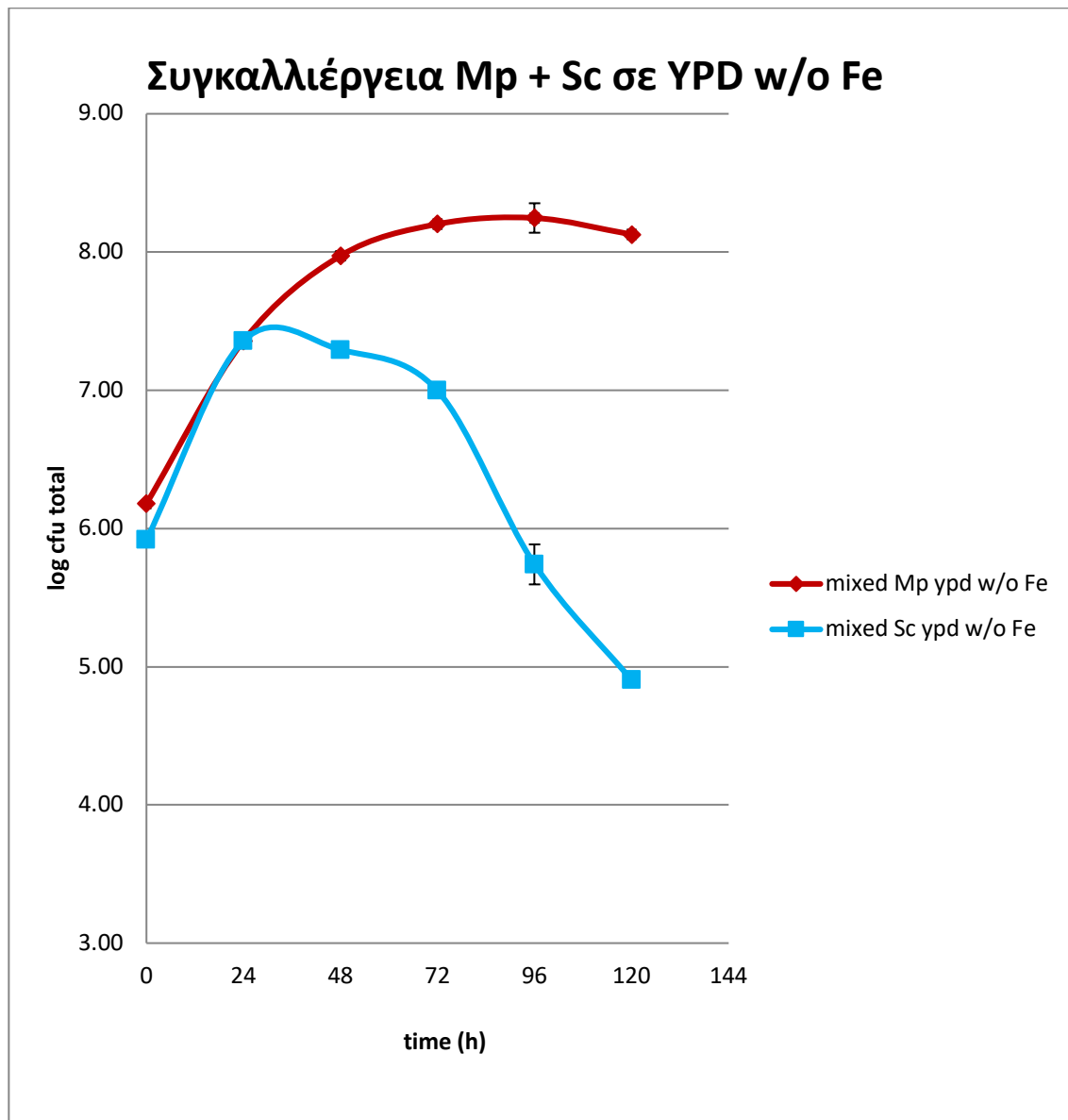


Σχήμα 14: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* (Sc) σε YPD χωρίς σίδηρο

Σύγκριση μονοκαλλιέργειας-συγκαλλιέργειας Sc YPD χωρίς σίδηρο



Σχήμα 15: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* (Mp) σε YPD χωρίς σίδηρο

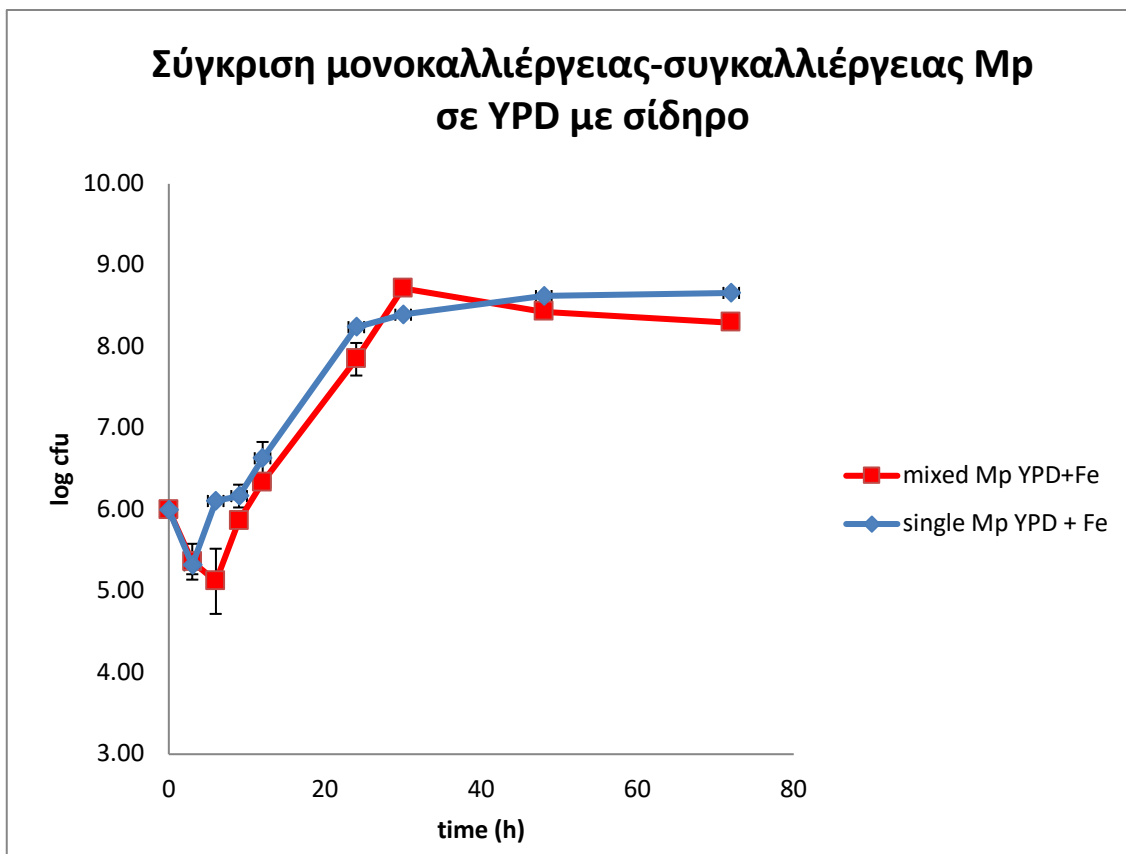


Σχήμα 16: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε YPD χωρίς σίδηρο

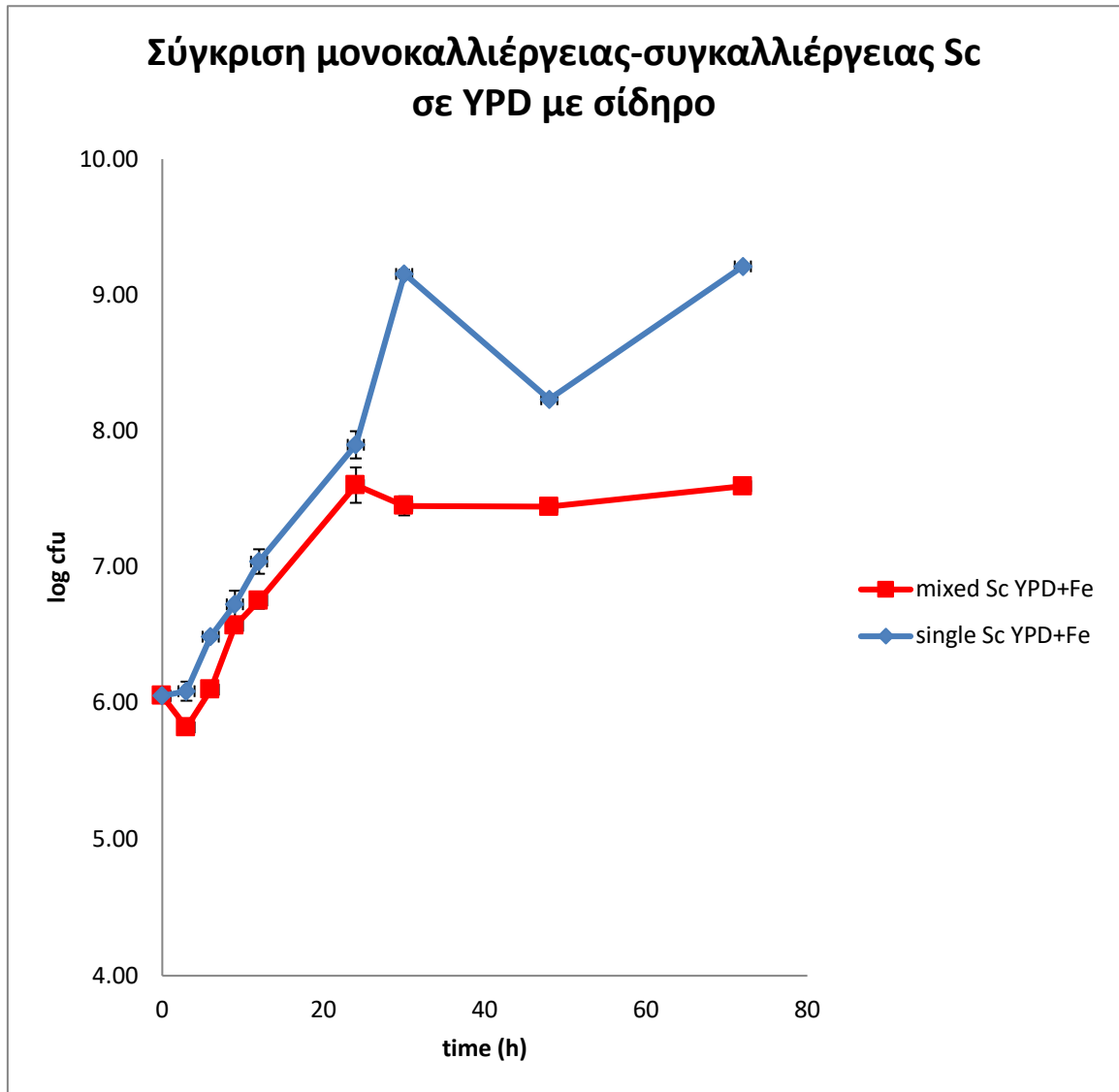
4.2.2. *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* σε YPD με σίδηρο

Πραγματοποιήθηκε παρόμοιο πείραμα αλλά με την προσθήκη επιπλέον ποσότητας σιδήρου (10 mg/L) και για 72 ώρες. Εδώ φάνηκε να μην υπάρχουν διαφορές από μονοκαλλιέργεια σε συγκαλλιέργεια αναφορικά με την *M. pulcherrima*.

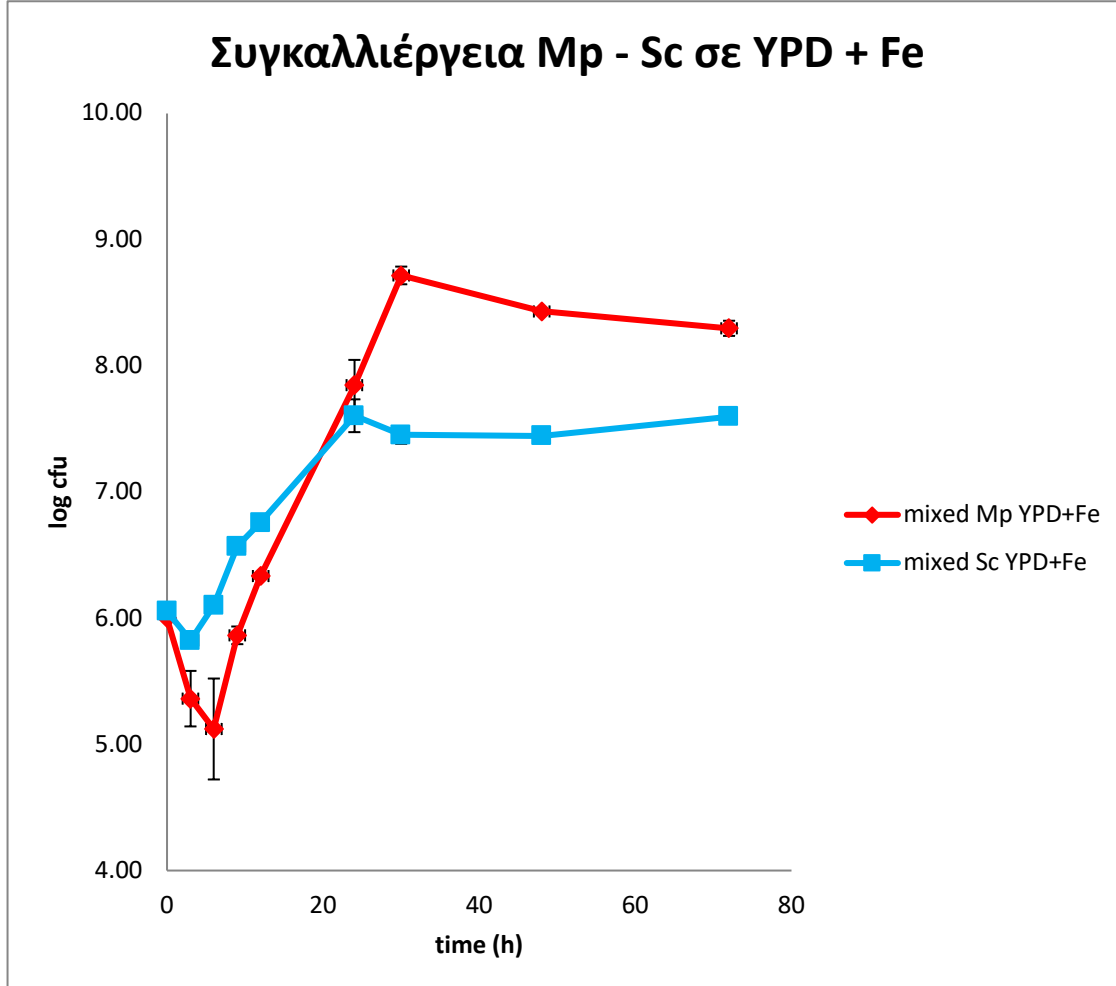
Ο *S. cerevisiae* όπως και στο προηγούμενο πείραμα (YPD χωρίς σίδηρο), έχει πτώση στο πληθυσμό του καθώς περνάμε στη συγκαλλιέργεια. Η μόνη διαφορά είναι ότι σε αυτή τη περίπτωση η πτώση περιορίζεται μέχρι 2 log cfu/ml και όχι 3 όπως είδαμε προηγουμένως.



Σχήμα 17: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* (Sc) σε YPD με σίδηρο



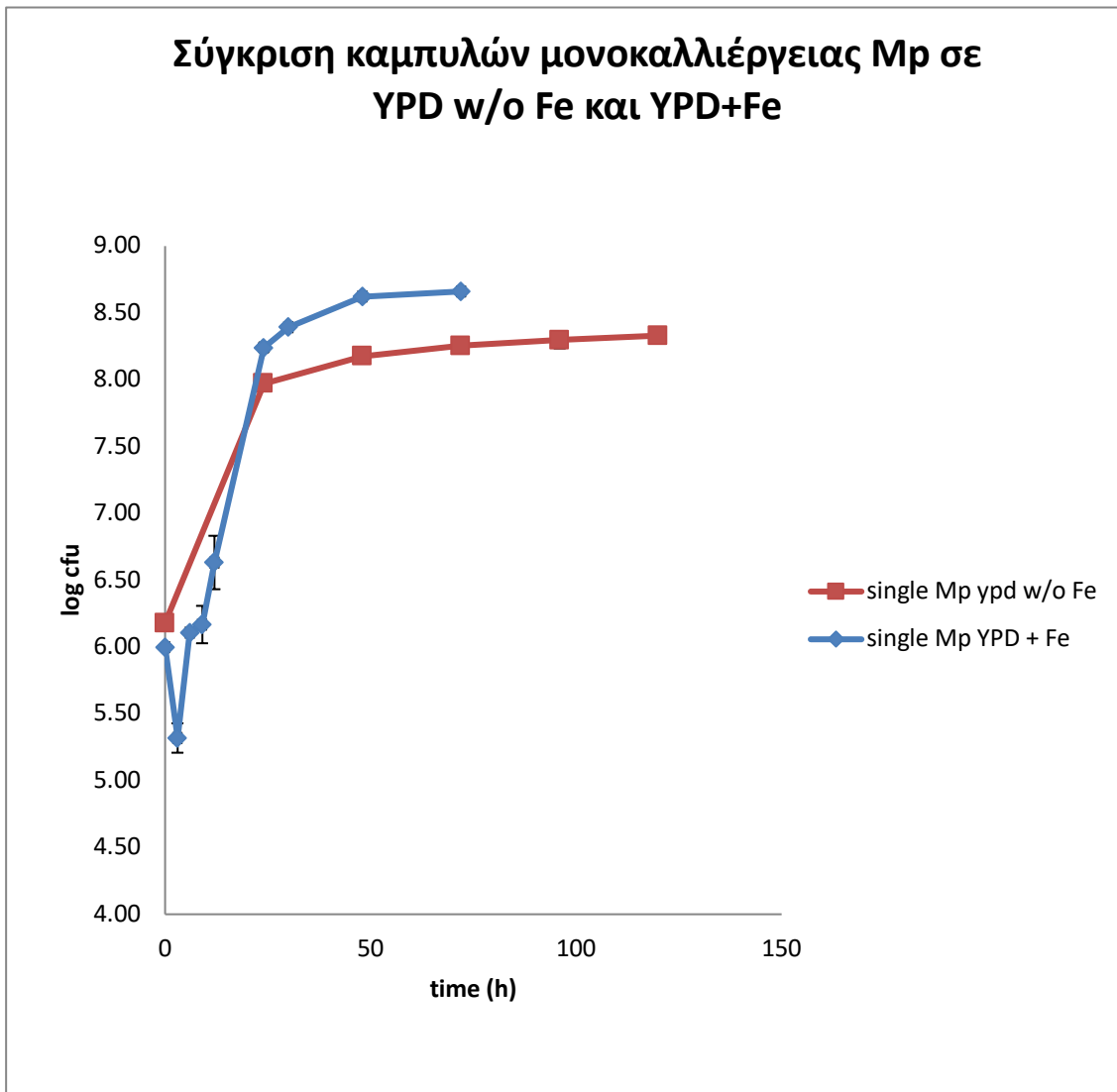
Σχήμα 18: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* (Mp) σε YPD με σίδηρο



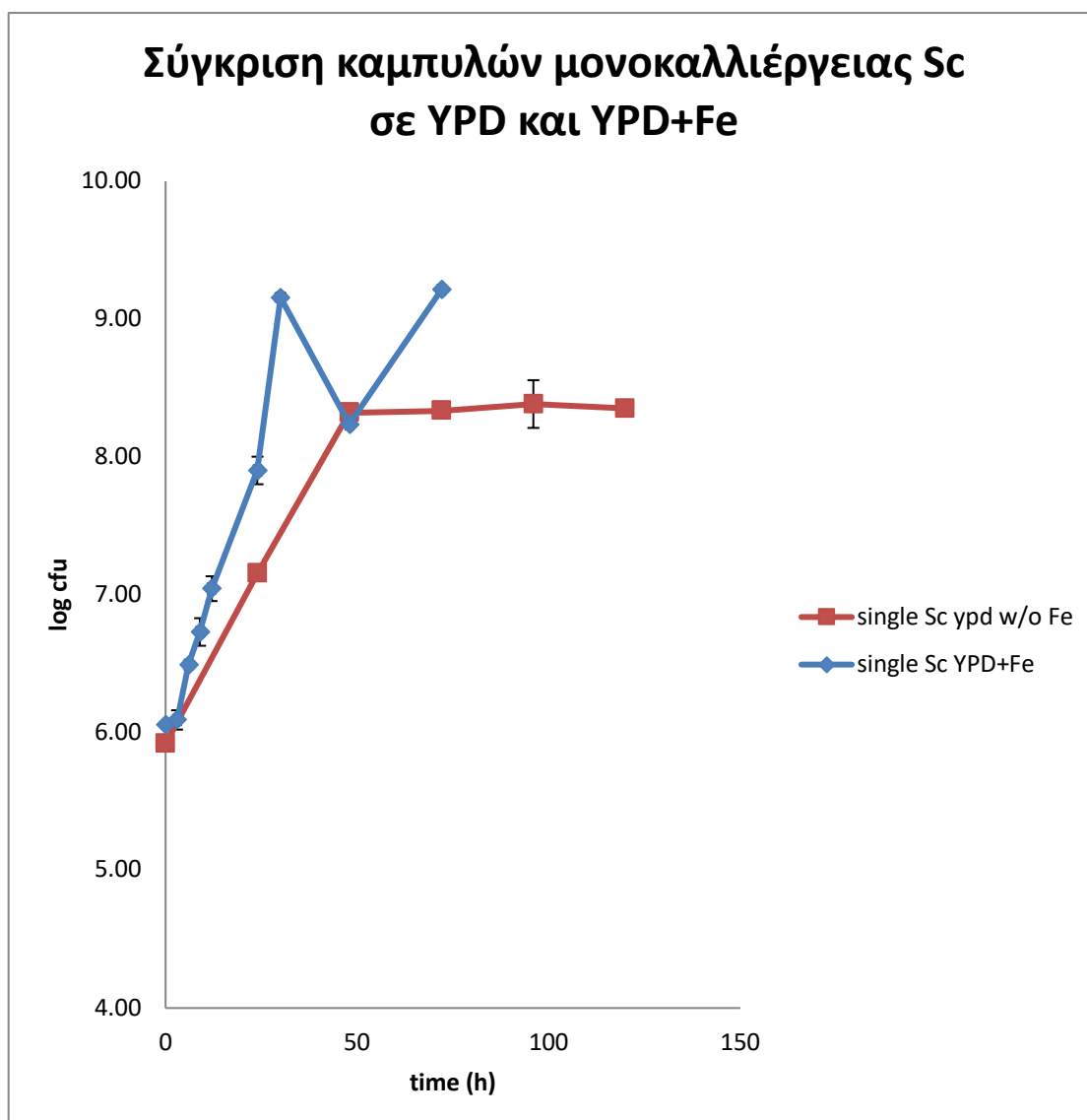
Σχήμα 19: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε YPD με σίδηρο

4.2.3 Αποτελέσματα σιδήρου

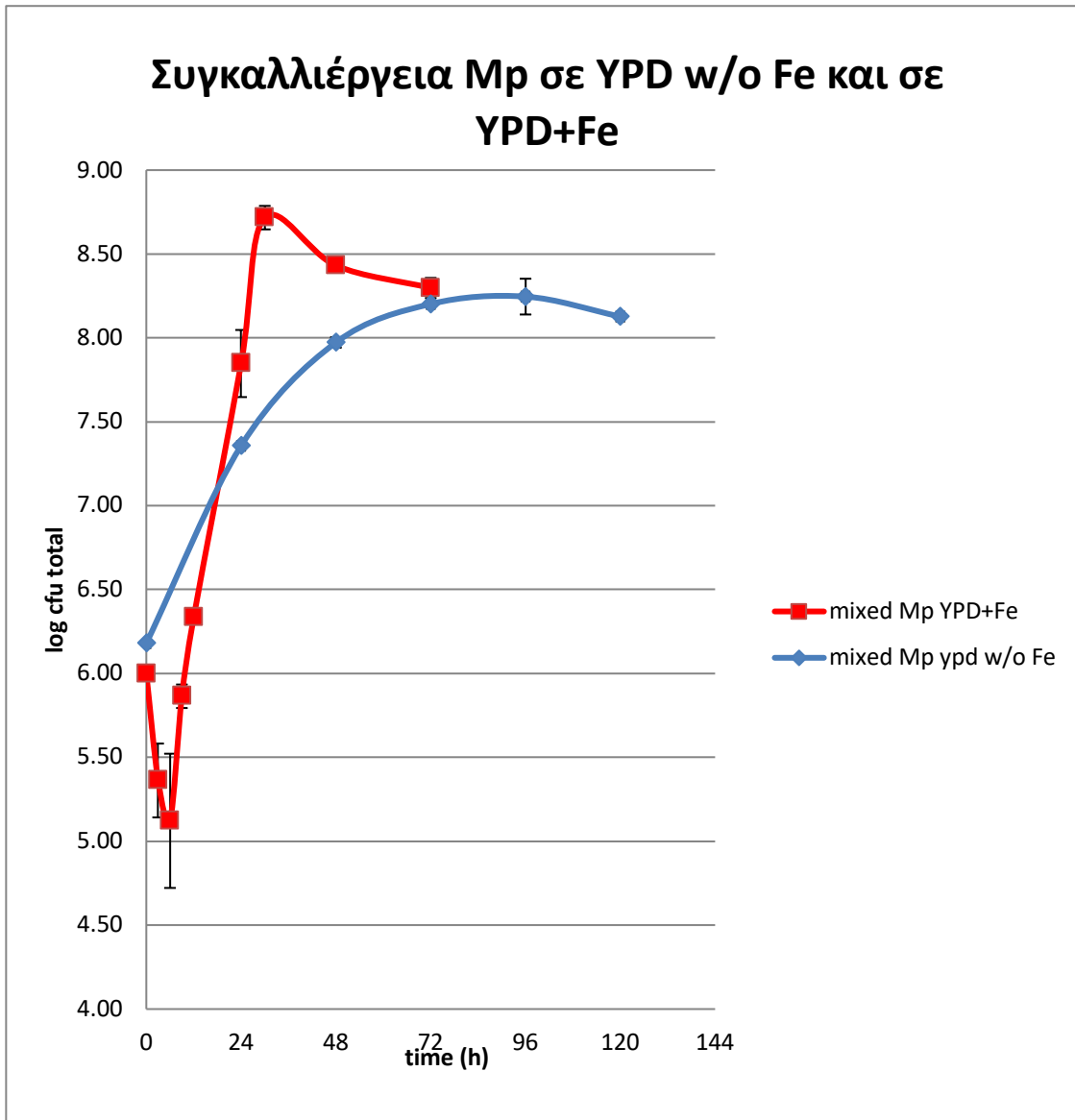
Συγκρίνοντας τις μονοκαλλιέργειες στα δυο αυτά πειράματα παρατηρούμε πως και οι δυο μικροοργανισμοί βοηθήθηκαν στη εκδοχή που είχαμε προσθέσει σίδηρο. Η *M. pulcherrima* αναπτύχθηκε 0,5 log cfu/ml περισσότερο ενώ ο *S. cerevisiae* 0,7-0,8 log cfu/ml. Στις συγκαλλιέργειες όμως δεν υπήρχε σημαντική ανάπτυξη. Σε ορισμένα σημεία η *M. pulcherrima* στο υπόστρωμα με το σίδηρο είχε παραπάνω πληθυσμό της τάξεως 0,5 log cfu/ml, αλλά στα περισσότερα σημεία οι καμπύλες εφάπτονταν. Ίδια εικόνα παρατηρήθηκε και με τον *S. cerevisiae*.



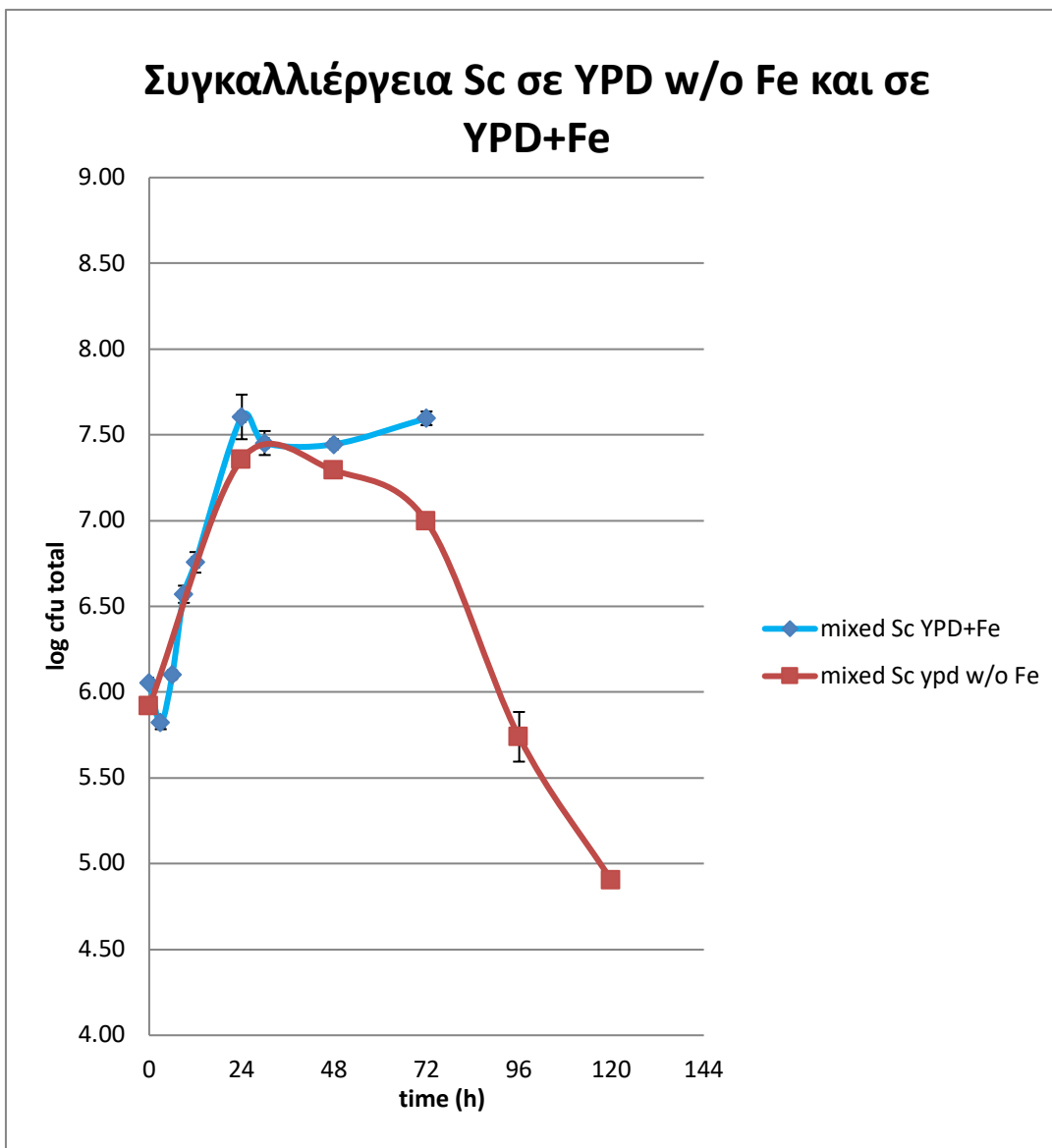
Σχήμα 20: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια σε YPD με σίδηρο και χωρίς σίδηρο



Σχήμα 21: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (*Sc*) σε μονοκαλλιέργεια σε YPD με σίδηρο και χωρίς σίδηρο.



Σχήμα 22: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* (Sc) σε YPD με σίδηρο και χωρίς σίδηρο.



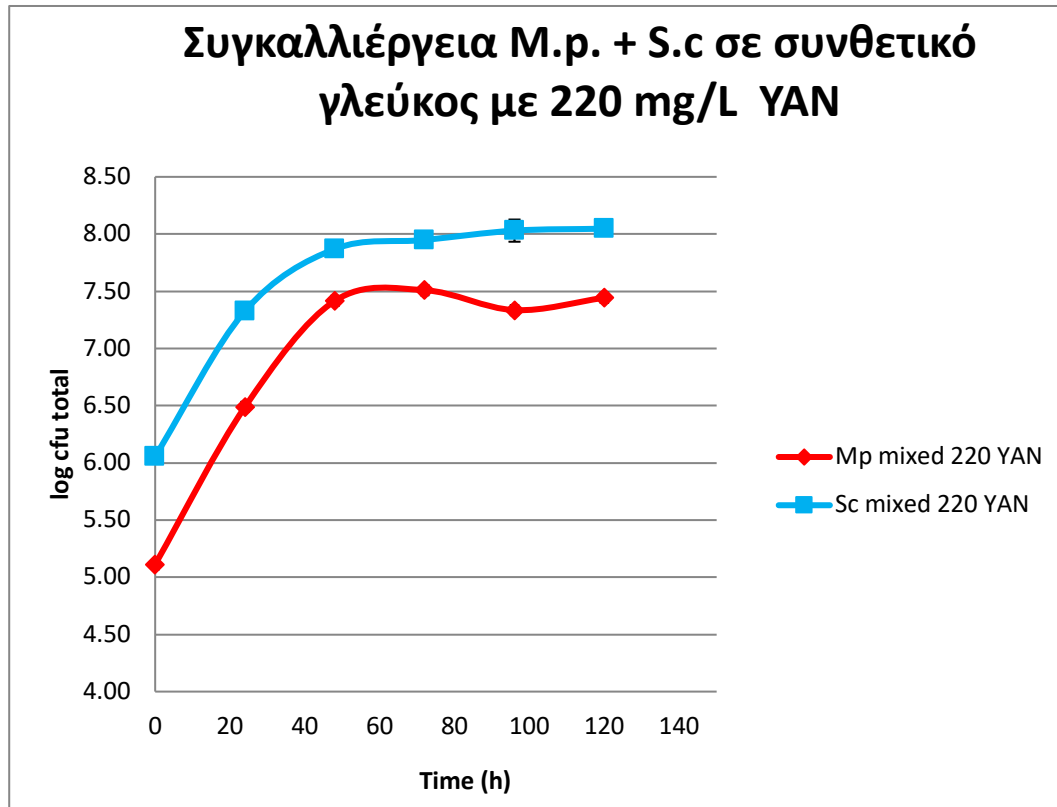
Σχήμα 23: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* (Mp) σε YPD με σίδηρο και χωρίς σίδηρο.

4.3 YAN

Στα πειράματα αυτά που ακολούθησαν η σύσταση του γλεύκους παρέμεινε ίδια (200 gr/L σάκχαρο κτλ), αλλά αλλάξαμε την ποσότητα και σε μια περίπτωση και το είδος του YAN. Σκοπός μας ήταν να δούμε εάν η περίσσεια αζωτούχων ενώσεων θα προσφέρει κάτι διαφορετικό, ακόμα και σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις. Στη συγκεκριμένη μελέτη αφοσιωθήκαμε στις συγκαλλιέργειες και μόνο, διότι εκεί έγκειται το ενδιαφέρον με τον βασικό παράγοντα που τροποποιήθηκε.

4.3.1. *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος με 220 mg/L YAN

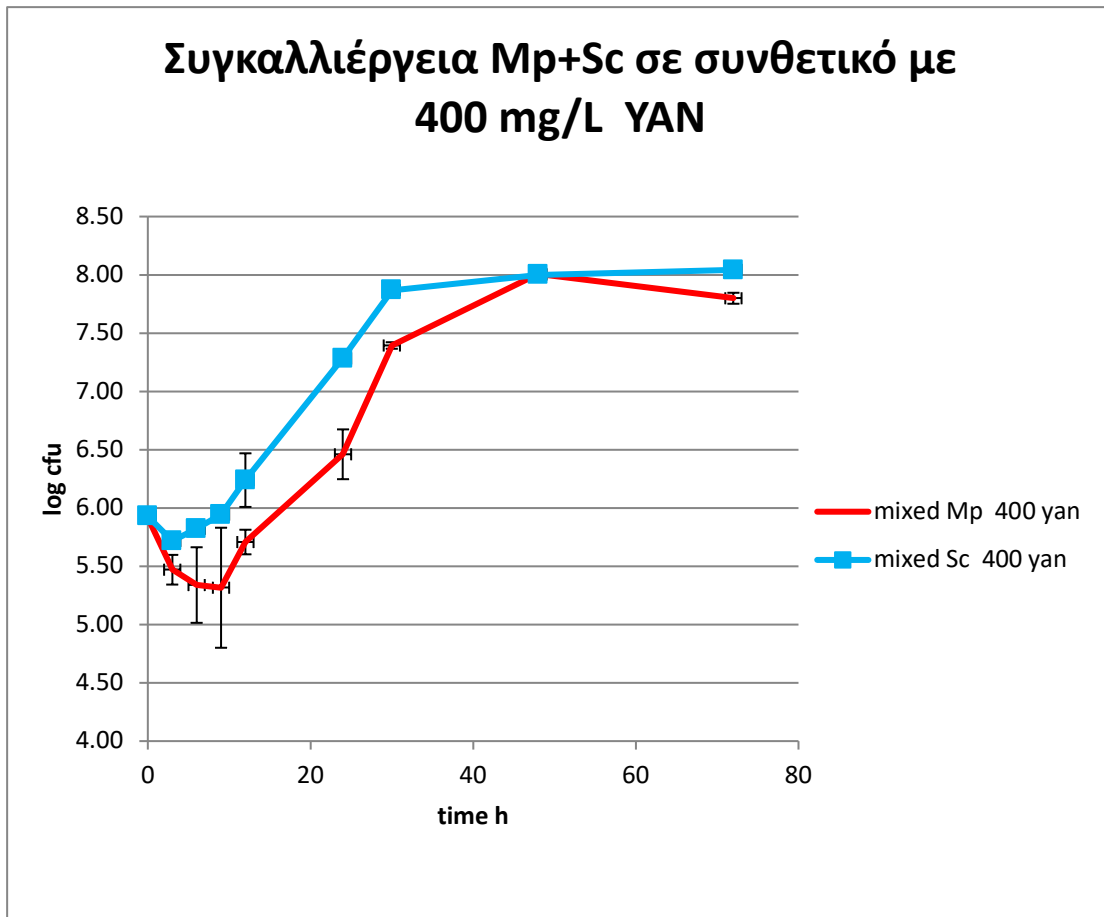
Σε συνθετικό γλεύκος πάντα 200 g/L σακχάρων και με 220 mg/L YAN, από τα οποία το 65% ήταν αμινοξέα και το υπόλοιπο 35% ήταν της ουσίας NH₄Cl, οι *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae* βάλθηκαν σε συγκαλλιέργεια για 120 ώρες. Τα αποτελέσματα σε αυτό το σημείο ήταν τα ίδια με αυτά του πειράματος με τα 200 g/L σάκχαρα και για 72 ώρες, που συζητήθηκε παραπάνω, εφόσον πρόκειται και για το ίδιο υπόστρωμα. Δηλαδή ο *S. cerevisiae* υπερέχει της *M. pulcherrima* κατά 0,5 log cfu/ml και περισσότερο σε κάποια σημεία.



Σχήμα 24: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 220 mg/L YAN.

4.3.2. *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος με 400 mg/L YAN

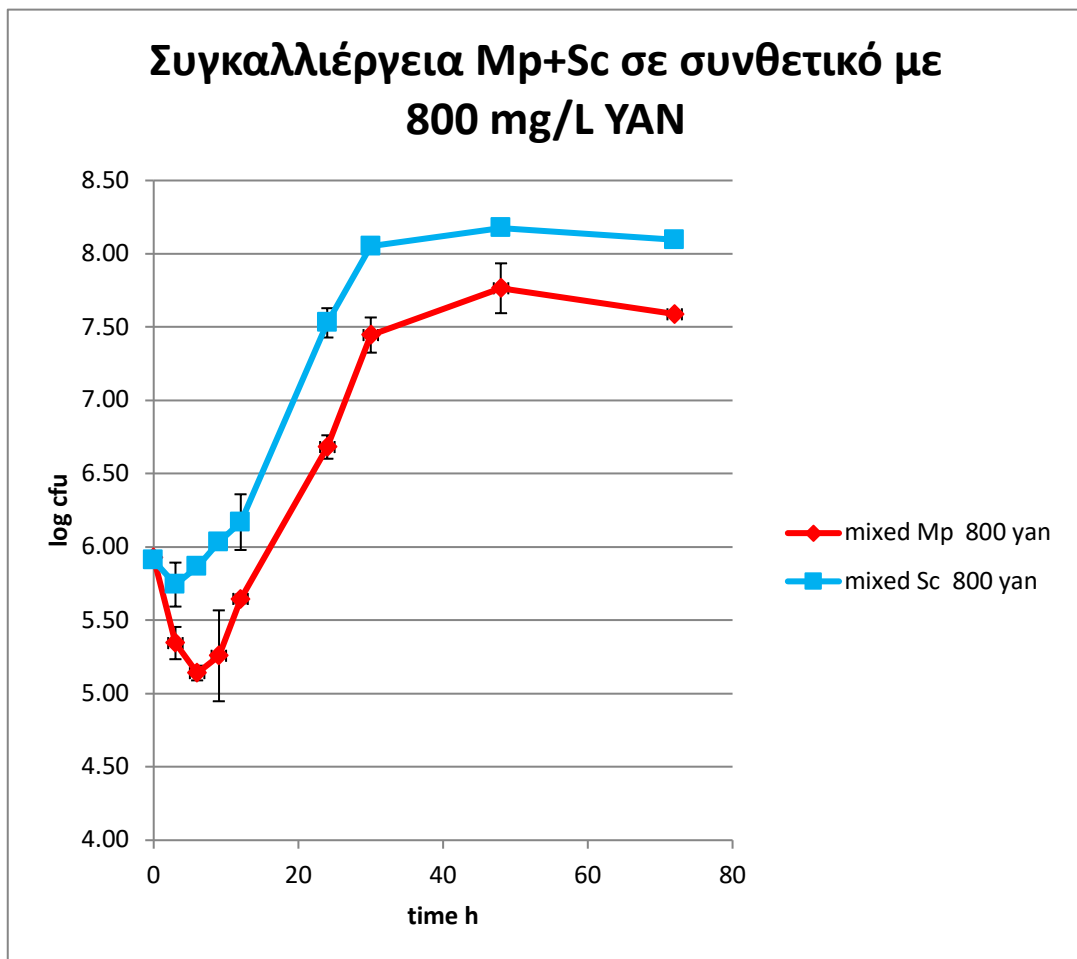
Το πείραμα επαναλήφθηκε αλλά για 72 ώρες και με 400 mg/L YAN αυτή τη φορά. Με σχεδόν τη διπλάσια ποσότητα αζώτου η *M. pulcherrima* πλησίασε τη καμπύλη του *S. cerevisiae* κατεβάζοντας τη διαφορά σε ορισμένα σημεία σε 0-0,2 log cfu/ml.



Σχήμα 25: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 400 mg/L YAN

4.3.3. *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος με 800 mg/L YAN

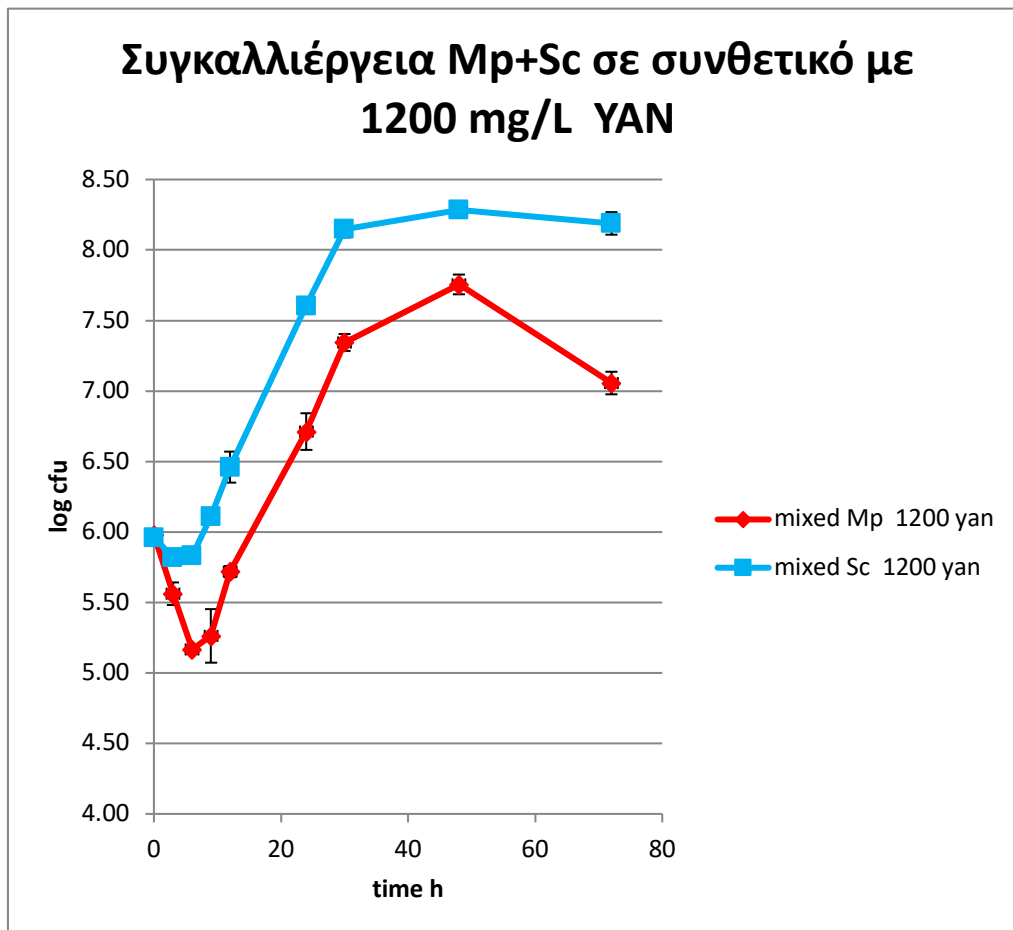
Επανάλαβαμε για ακόμη μια φορά το πείραμα με 800 mg/L YAN, έτσι ώστε να εξετάσουμε εάν ακόμα περισσότερο άζωτο ισούται με ακόμα καλύτερες επιδόσεις, όσον αναφορά την *M. pulcherrima*. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο *S. cerevisiae* φαίνεται να αξιοποιεί το επιπρόσθετο άζωτο και η διαφορά να επιστρέφει στο 0,5 log cfu/ml όπως και στα 220 mg/L YAN.



Σχήμα 26: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 800 mg/L YAN.

4.3.4 *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος με 1200 mg/L YAN

Παράλληλα με το προηγούμενο πείραμα ερευνήσαμε τη εκδοχή των 1200 mg/L YAN στο υπόστρωμα. Οι μετρήσεις ήταν ξανά για 72 ώρες και με το ίδιο συνθετικό γλεύκος, αλλά με διαφορετική ποσότητα αζώτου, με τους ίδιους μικροοργανισμούς σε συγκαλλιέργεια. Αποδείχθηκε πως ο *S. cerevisiae* αξιοποίησε το παραπάνω άζωτο καλύτερα από τη *M. pulcherrima* και η διαφορά στους πληθυσμούς αυξήθηκε, σε σχέση με τα υπόλοιπα πειράματα που περιείχαν λιγότερο άζωτο, και ήταν της τάξης 0,5-1,1 log cfu/ml.

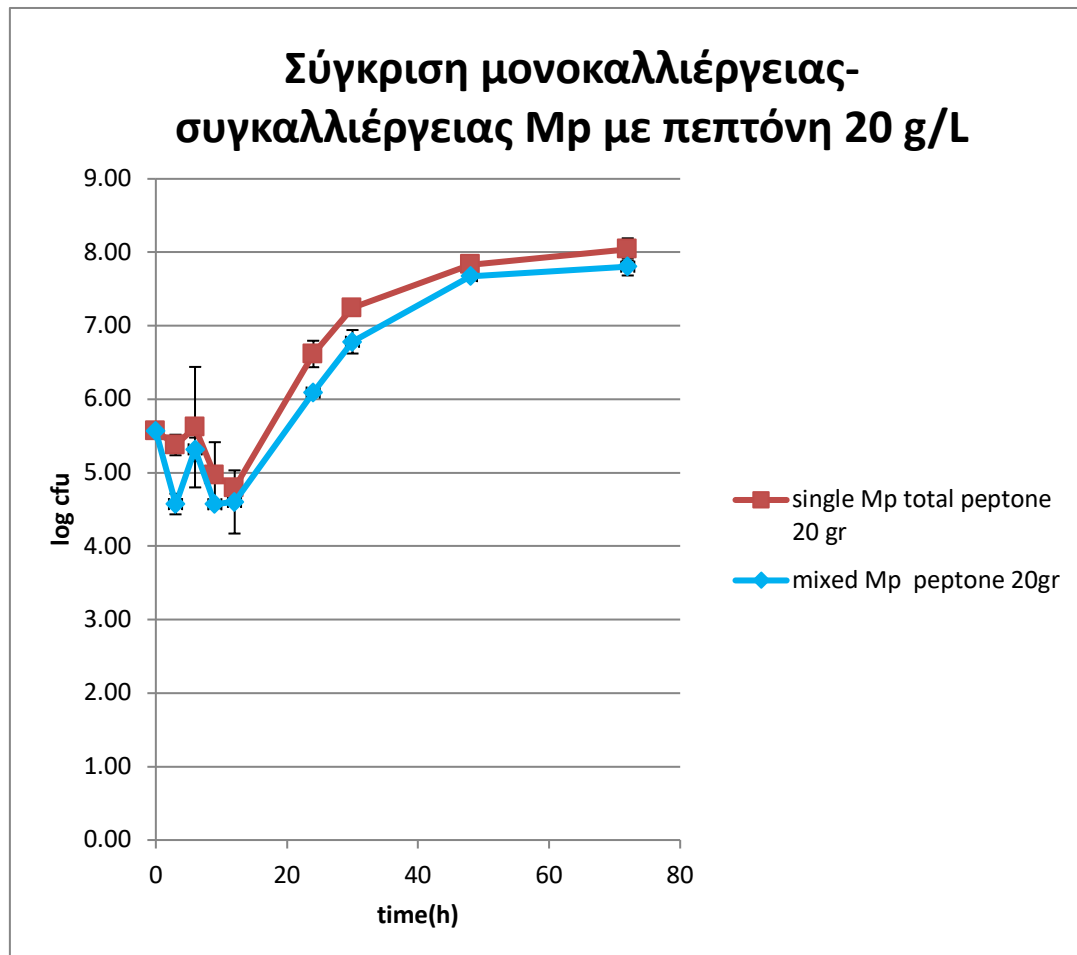


Σχήμα 27 : Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 1200 mg/L YAN.

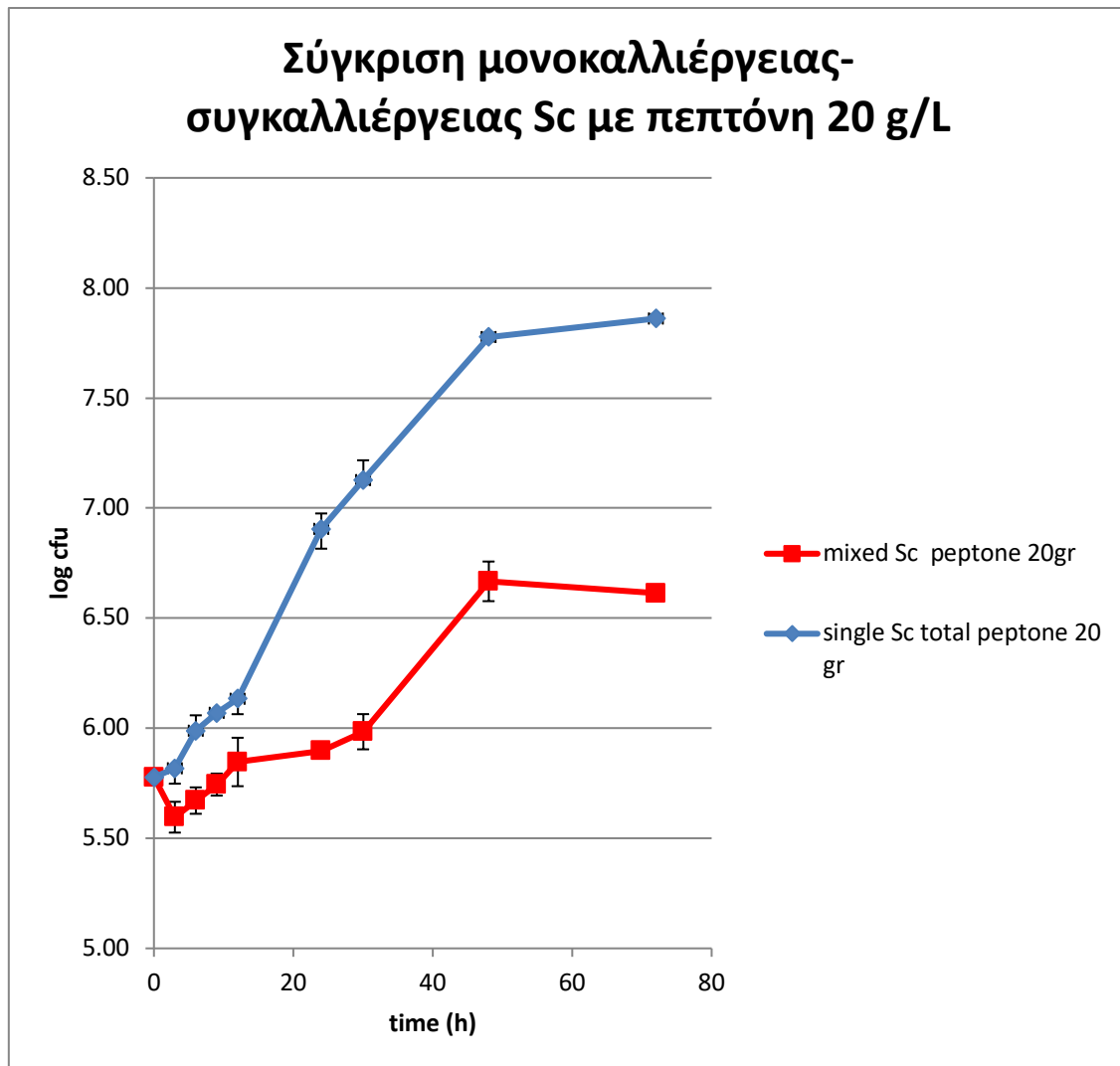
4.3.5 *M. pulcherrima* - *S. cerevisiae* σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN.

Ένα τελευταίο πείραμα πραγματοποιήθηκε στο ίδιο συνθετικό γλεύκος. Όμως για να ελέγξουμε την περίπτωση στην οποία η μορφή του αζώτου επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών μας, αντικαταστήσαμε εξολοκλήρου το YAN με ποσότητα πεπτόνης 20 g/L που αντιστοιχούσε σε 1200 mg/L YAN αλλά διαφορετικής μορφής. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σάκχαρα ήταν 200 g/L όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις που το YAN διέφερε σε σύσταση. Αναπτύξαμε όχι μόνο τη συγκαλλιέργεια των *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae* αλλά και τις μονοκαλλιέργειες καθώς η νέα μορφή αζώτου που προσθέσαμε δε γνωρίζαμε τι επιπτώσεις θα έχει σε γενικό πλαίσιο. Οι καμπύλες της *M. pulcherrima* συγκαλλιέργεια-μονοκαλλιέργεια σχεδόν εφάπτονταν δείχνοντάς μας πως δεν επηρεάζεται από τον *S. cerevisiae* ακόμα και αν αλλαχθεί το είδος του αζώτου στο υπόστρωμα. Από την άλλη ο *S. cerevisiae* είχε πτώση έως και 1,2 log cfu/ml κατευθυνόμενοι από τη μονοκαλλιέργεια στη συγκαλλιέργεια. Αναφορικά με τη συγκαλλιέργεια είναι ξεκάθαρο πως η *M. pulcherrima* αξιοποίησε πολύ καλύτερα τη μορφή αζώτου που περιείχε η

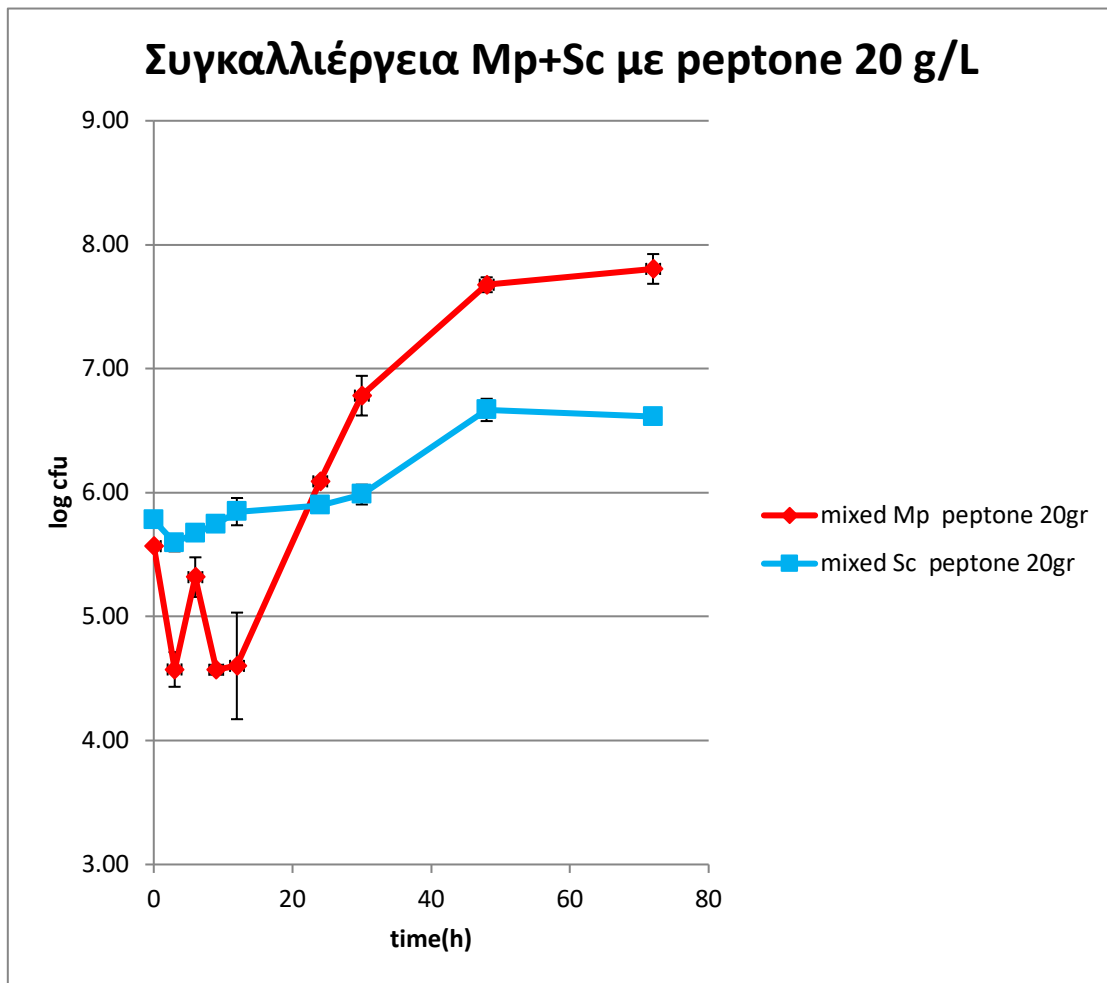
προστιθέμενη πεπτόνη και κατάφερε να πετύχει υψηλότερους πληθυσμούς από τον *S. cerevisiae*.



Σχήμα 28: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* (Sc) σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN



Σχήμα 29: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* (Mp) σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN



Σχήμα 30: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN.

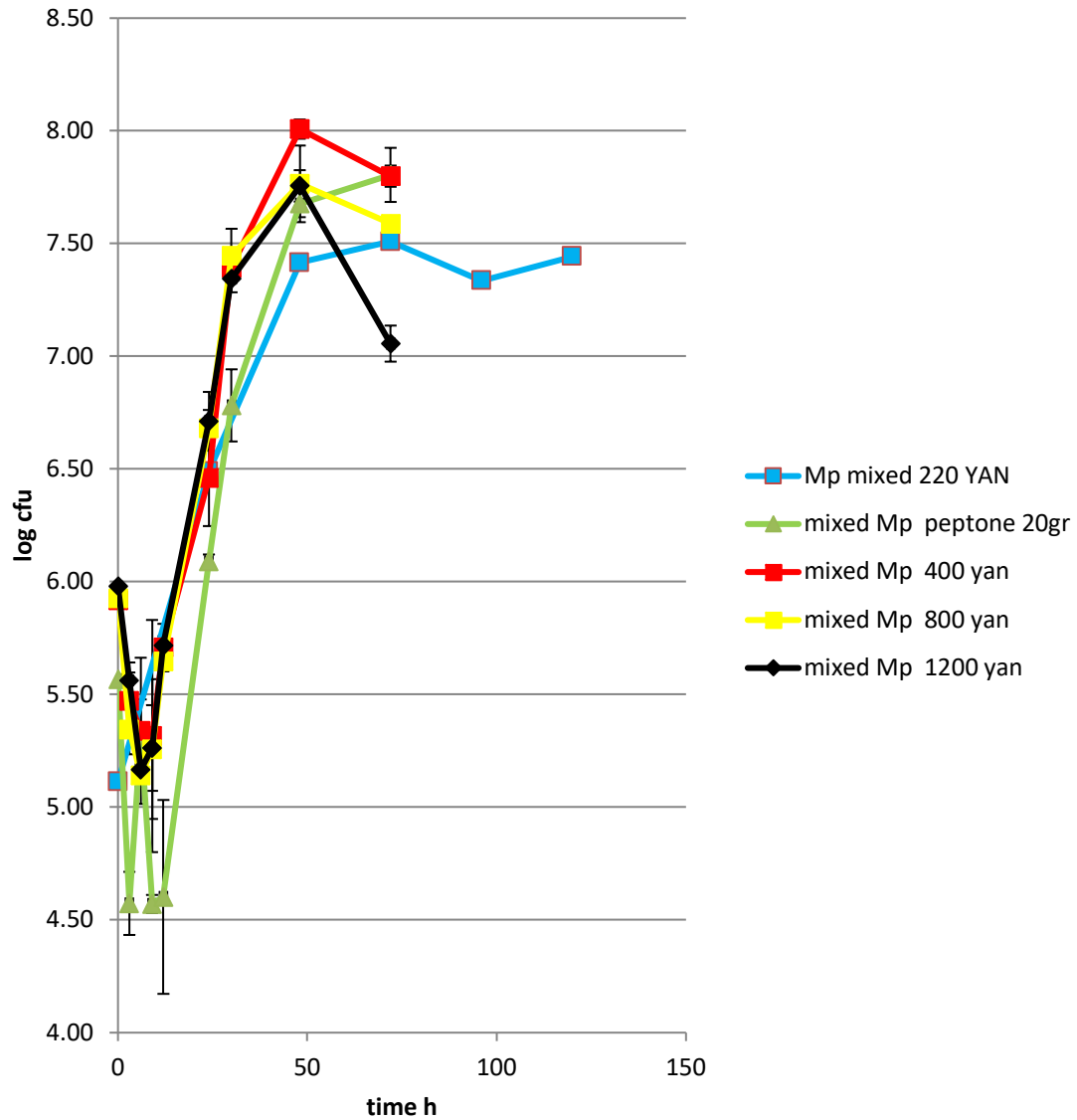
4.3.6 Αποτελέσματα YAN

Συνοψίζοντας όλα τα πειράματα που σχετίζονται με την ποσότητα και το είδος του διαθέσιμου αζώτου, έχουμε να πούμε τα εξής:

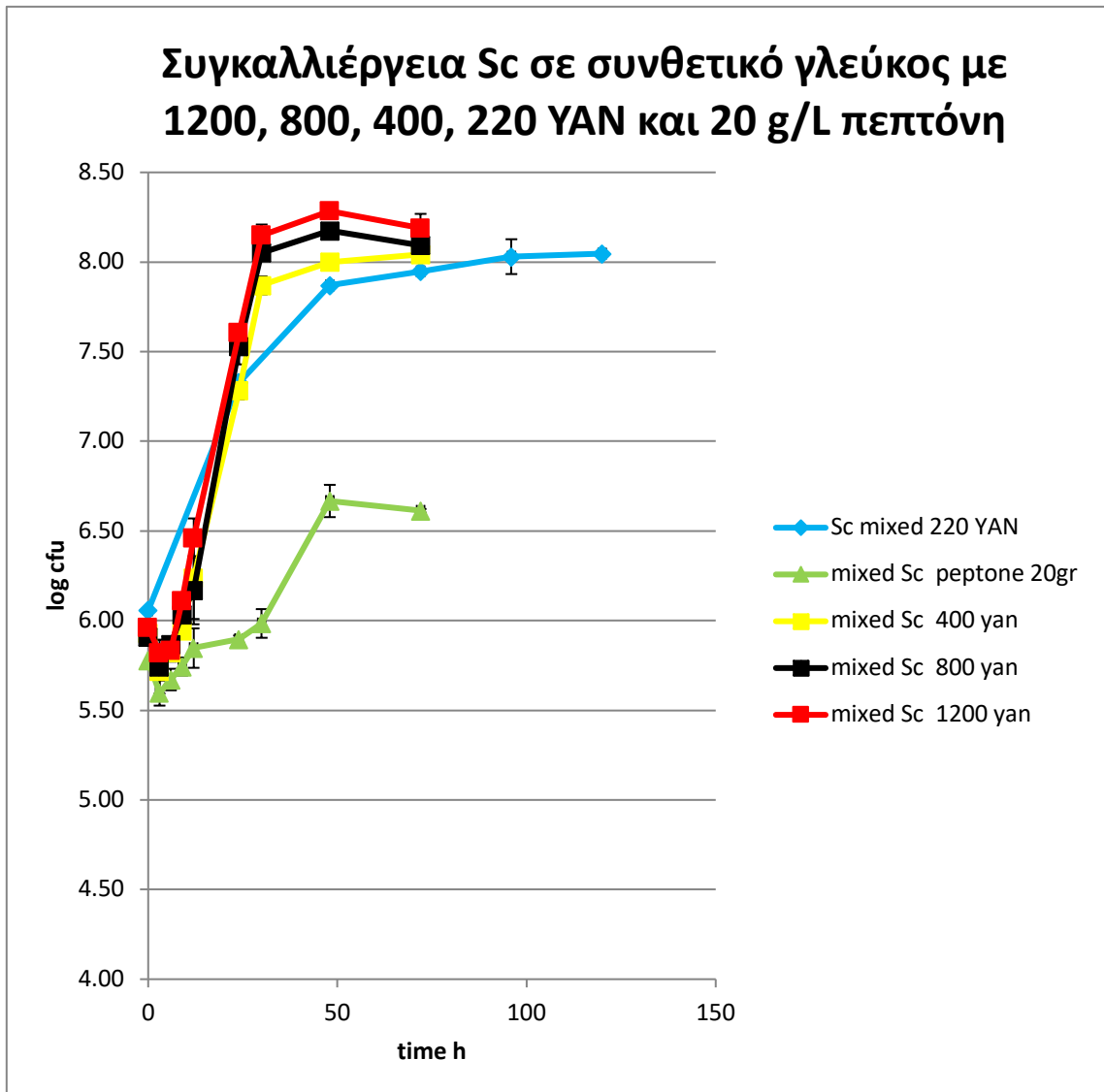
Η *M. pulcherrima* σε συγκαλλιέργεια είχε τις καλύτερες επιδόσεις στα υποστρώματα με τα 400 mg/L YAN και σε εκείνο με τα 20 g/L πεπτόνης. Αξίζει να σημειωθεί, στη περίπτωση της πεπτόνης, πως ενώ είχαμε μια από τις καλύτερες εκβάσεις του μικροοργανισμού πληθυσμιακά, παρατηρήθηκε πως κατείχε την χειρότερη φάση προσαρμογής. Ακολουθεί το υπόστρωμα με τα 800 mg/L YAN, που είχε ελαφρώς μικρότερους πληθυσμούς, δηλαδή 0,3 log cfu/ml μικρότερους σε σχέση με τα προηγούμενα υποστρώματα. Ύστερα το θρεπτικό μέσο με τα 220 mg/L YAN, στο οποίο η *M. pulcherrima* προς το τέλος φτάνει τους πληθυσμούς της προηγούμενης περίπτωσης, ενώ απέχει στη χειρότερη των περιπτώσεων 0,6 log cfu/ml από τα καλύτερα αποτελέσματα που διεξήχθησαν. Ως το πιο μη ικανοποιητικό υπόστρωμα θα μπορούσαμε να πούμε πως ήταν εκείνο με τα 1200 mg/L YAN επειδή αν και παρατηρήθηκε πολύ καλή φάση ανάπτυξης, από τη λήξη και έπειτα της εκθετικής φάσης σημείωσε πτώση 0,8 log cfu/ml σε σχέση με τα πρώτα και καλύτερα αποτελέσματα. Γενικά όμως η τάση των καμπυλών ακολουθούσε την ίδια πορεία με εξαίρεση την φάση προσαρμογής στη περίπτωση της πεπτόνης.

Στον *S. cerevisiae* στη συγκαλλιέργεια τα συμπεράσματα που προέκυψαν με μια απλή ματιά ήταν άμεσα και ξεκάθαρα. Εξαιρώντας το υπόστρωμα που περιείχε πεπτόνη, οι τιμές στο διάγραμμα ήταν πολύ κοντά, με τις καμπύλες σχεδόν να εφάπτονται σε όλα τα κρίσιμα σημεία με τη μεγαλύτερη διαφορά πληθυσμού να μη ξεπερνά τα 0,4 log cfu/ml. Όσον αφορά όμως τη πεπτόνη υπήρξε κατακόρυφη πτώση στους πληθυσμούς με τη διαφορά στα διάφορα σημεία να βρίσκεται στους 1,5-2 log cfu/ml. Επομένως το είδος της πεπτόνης (του αζώτου με άλλα λόγια) επηρέασε σημαντικά τον *S. cerevisiae*. Όπως και στην *M. pulcherrima* έτσι και εδώ η φάση προσαρμογής της τελευταίας ήταν η πιο κακή των περιπτώσεων.

Συγκαλλιέργεια Μρ σε συνθετικό γλεύκος με 1200, 800, 400, 220 YAN και 20 g/L πεπτόνη



Σχήμα 31: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* (Sc) σε συνθετικό γλεύκος με 1200, 800, 400, 220 mg/L YAN και 20 g/L πεπτόνη.



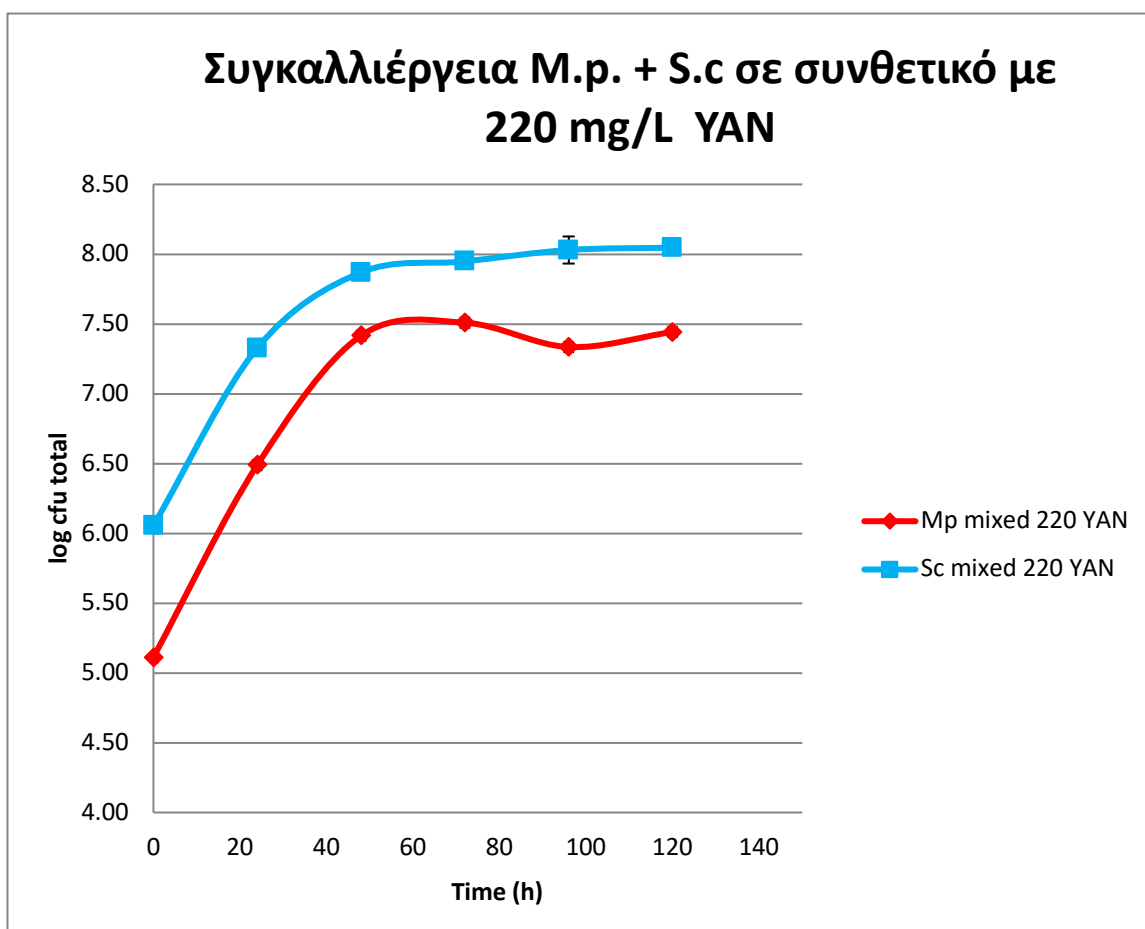
Σχήμα 32: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* (Mp) σε συνθετικό γλεύκος με 1200, 800, 400, 220 mg/L YAN και 20 g/L πεπτόνη.

4.4 ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΓΛΕΥΚΟΣ-YPD

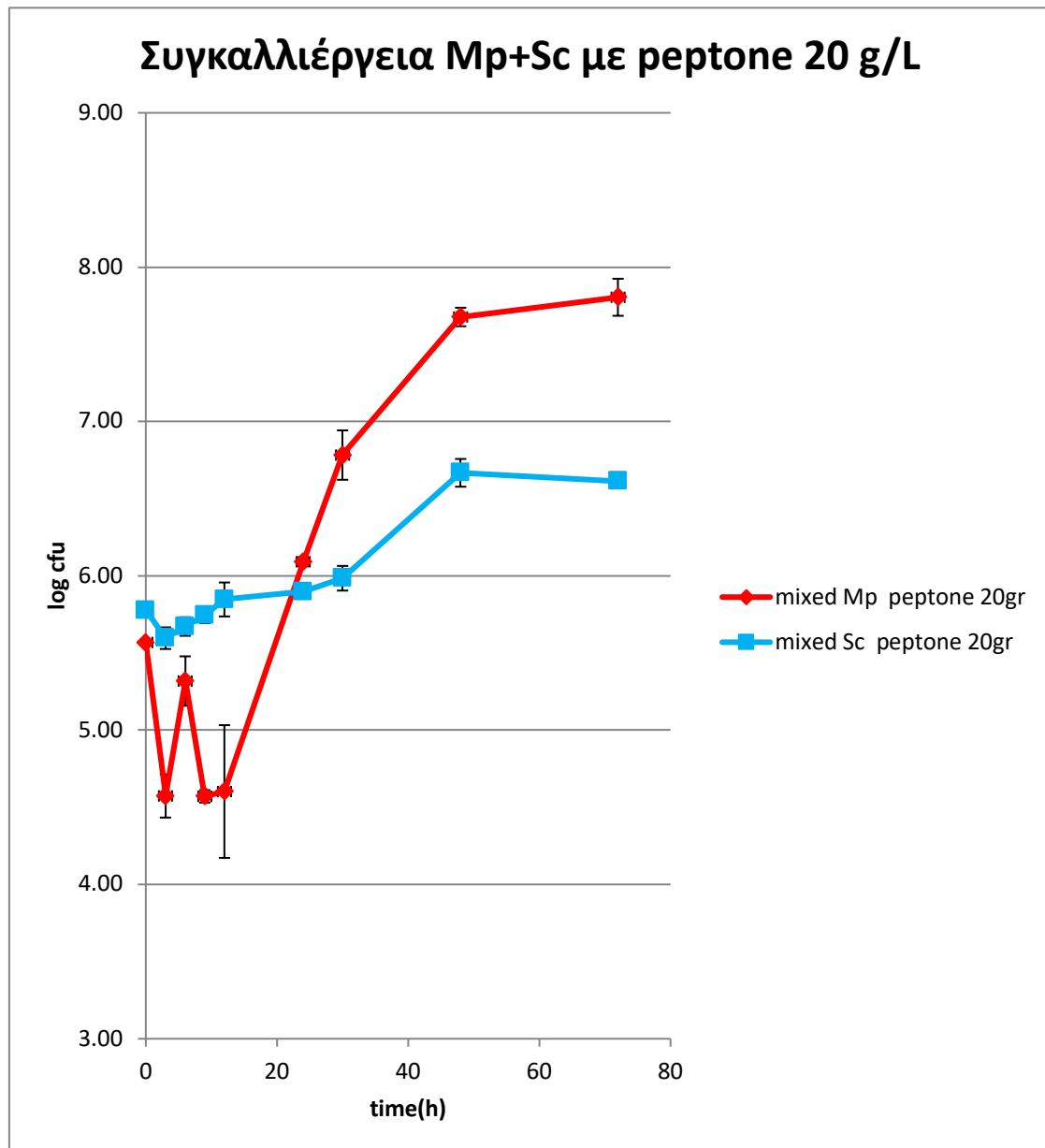
Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι παρόλο που στο YPD ο *S. cerevisiae* απείχε (ήταν μειωμένος) κατά 2 log cfu/ml και περισσότερο από τη *M. pulcherrima* και στη περίπτωση με τη προσθήκη σιδήρου, στο συνθετικό γλεύκος αντιστράφηκαν οι καμπύλες και η *M. pulcherrima* ήταν πλέον εκείνη που δυσκολευόταν να προσαρμοστεί.

Με την *M. pulcherrima* καταλήξαμε σχετικά σύντομα κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων πως τα συστατικά του γλεύκους, κυρίως τα σάκχαρα και έπειτα η ποσότητα αζώτου, ευθύνονται για τις επιδόσεις του. Αντιθέτως με τον *S. cerevisiae* η απάντηση στο ερώτημα της πτώσης στο YPD ήρθε στο τέλος, όταν

πραγματοποιήθηκε το πείραμα με τη πεπτόνη που ακόμα και στο συνθετικό γλεύκος, που περιείχε αρκετά σάκχαρα (200 g/L) και άζωτο, σημειώθηκε μεγάλη πτώση, παρόμοια με εκείνη που μας είχε προβληματίσει στα πειράματα με το YPD. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως ενώ τη *M. pulcherrima* την επηρεάζει η ποσότητα του αζώτου, τον *S. cerevisiae* τον επηρεάζει το είδος του αζώτου. Παρακάτω δηλαδή παρατηρούμε στα σχήματα 33 και 34 πως με την προσθήκη πεπτόνης στο συνθετικό γλεύκος αντί για το YAN, τα αποτελέσματα ομοιάζουν με εκείνα στη συγκαλλιέργεια των μικροοργανισμών στο υπόστρωμα YPD. Δηλαδή η *M. pulcherrima* κυριαρχεί στο υπόστρωμα ενώ ο *S. cerevisiae* δυσκολεύεται να προσαρμοστεί.



Σχήμα 33: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 220 mg/L YAN.



Σχήμα 34: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους σε συνθετικό γλεύκος με 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN.

4.5. Συγκρίσεις όλων των πειραμάτων – Αποτελέσματα

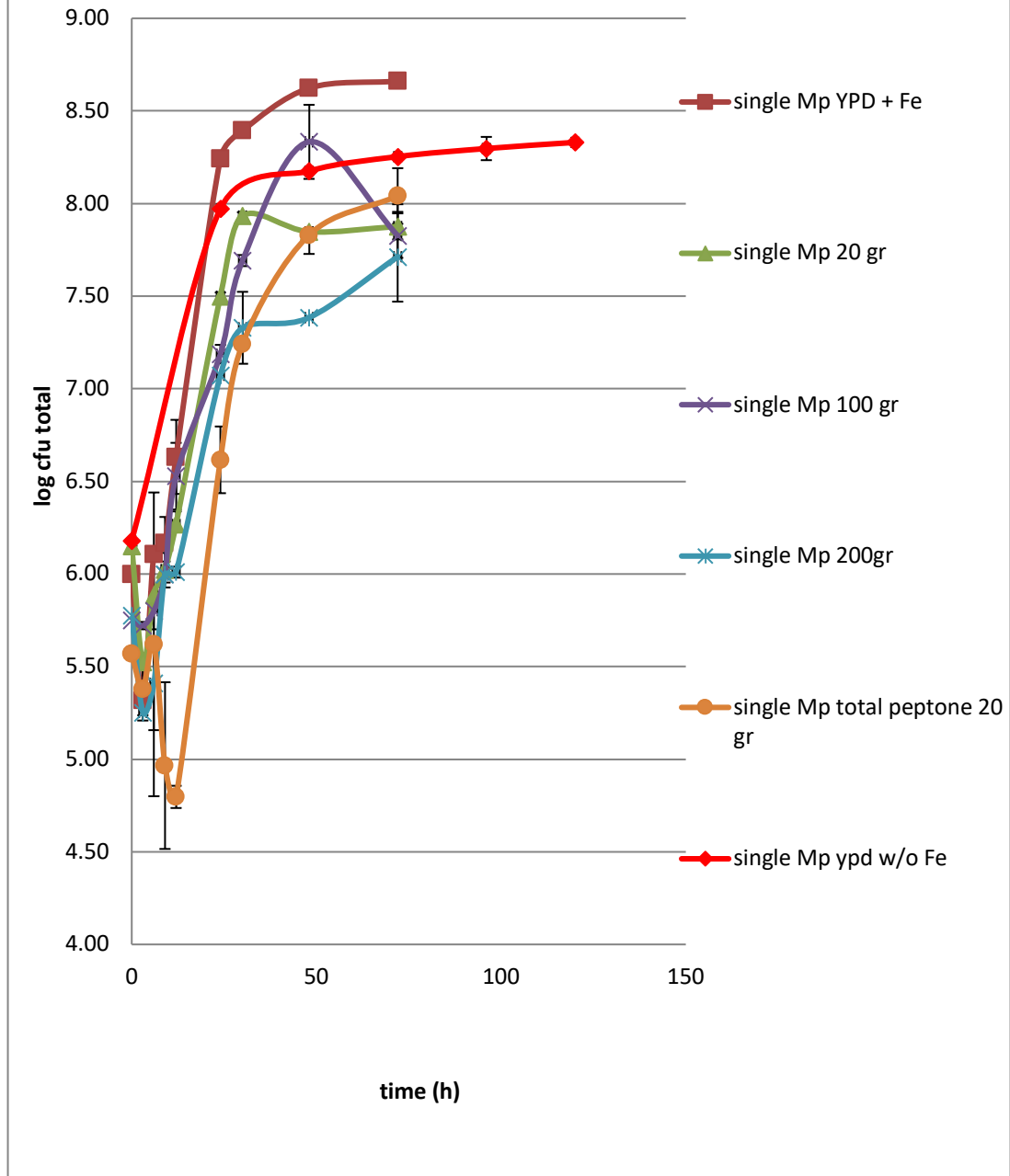
Συγκρίσεις :

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από όλα τα παραπάνω πειράματα διαπιστώνουμε τα εξής:

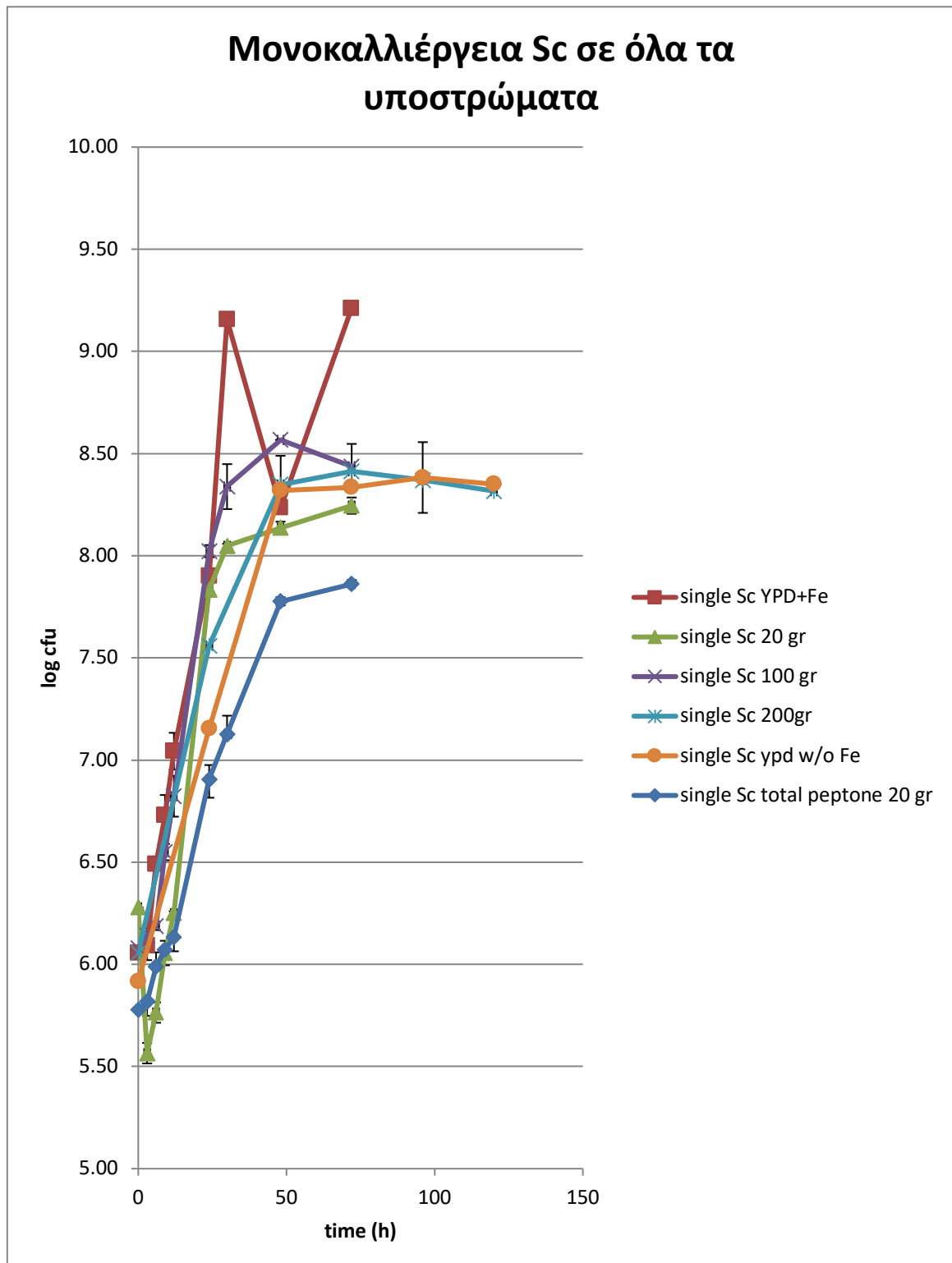
Για τη *M. pulcherrima* αποδείχθηκε στις μονοκαλλιέργειες πως το υπόστρωμα YPD με σίδηρο ήταν το καταλληλότερο, ενώ αμέσως επόμενο κρίθηκε το YPD που δεν περιείχε έξτρα ποσότητα σιδήρου. Ακολουθεί το συνθετικό γλεύκος με 200 g/L στον οποίο αντικαταστήσαμε το άζωτο από τα αμινοξέα και το αμμώνιο με εκείνο της πεπτόνης. Ύστερα έχουμε τα υποστρώματα με τα 220 mg/L YAN και με διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχάρων. Από τα προαναφερόμενα χειρότερο υπόστρωμα αναδείχθηκε το συνθετικό γλεύκος με τα περισσότερα σάκχαρα ενώ καλύτερο αυτό με τα λιγότερα. Στις συγκαλλιέργειες της *M. pulcherrima* η εικόνα ήταν ίδια με τις μονοκαλλιέργειες όσον αναφορά τα υποστρώματα YPD και το συνθετικό γλεύκος με τα 20 g/L σάκχαρα. Όμως τα υποστρώματα συνθετικού γλεύκους με 100 g/L σάκχαρα, 20 g/L πεπτόνη αντί για YAN και εκείνο με τα 200 g/L σάκχαρα και 400 mg/L YAN φαίνεται να μην είχαν σημαντικές διαφορές στον τελικό πληθυσμό. Η μόνη παρατήρηση που αξίζει να σημειωθεί εδώ είναι πως η καμπύλη της πεπτόνης έχει την πιο αργή φάση προσαρμογής. Συνεχίζοντας ακολουθούν τα υποστρώματα κατά σειρά (καλύτερο προς χειρότερο) του συνθετικού γλεύκους με τα 800 mg/L YAN, έπειτα το γλεύκος με τα 220 mg/L YAN και τέλος το γλεύκος με τα 1200 mg/L YAN.

Περνώντας στον *S. cerevisiae* τώρα, έχουμε να πούμε σχετικά με τις μονοκαλλιέργειες πως όπως και με την *M. pulcherrima* ιδανικότερο υπόστρωμα ήταν πάλι το YPD με σίδηρο. Και χειρότερο με διαφορά αναδείχθηκε εκείνο που περιείχε πεπτόνη. Όλα τα υπόλοιπα πέτυχαν παρόμοιους πληθυσμούς καθώς και παραπλήσιες τάσεις καμπύλης σχετικά με ολόκληρη την πορεία του μικροοργανισμού, δηλαδή από τη φάση προσαρμογής μέχρι και τη στατική. Στις συγκαλλιέργειες ωστόσο εκεί που η *M. pulcherrima* εμφανίστηκε ως χειρότερη, ο *S. cerevisiae* παρουσιάστηκε με τα καλύτερα αποτελέσματα. Πρόκειται για το υπόστρωμα με το περισσότερο άζωτο της μορφής αμινοξέων-αμμωνίου με τα 1200 mg/L YAN. Σειρά έχει το υπόστρωμα με τα 800 mg/L YAN και αμέσως μετά τα 400 mg/L YAN. Ακολουθεί το συνθετικό γλεύκος με τα 220 mg/L YAN και το γλεύκος με τα 100 g/L σάκχαρα ενώ με λίγο μειωμένους πληθυσμούς, αλλά σε σχετικά ίδια επίπεδα μεταξύ τους, έχουμε τα υποστρώματα με τα 20 g/L σακχάρων και το YPD με σίδηρο. Κλείνουμε με τα πιο αναποτελεσματικά για τον μικροοργανισμό υποστρώματα, το YPD χωρίς σίδηρο και τον συνθετικό γλεύκος που περιείχε πεπτόνη. Σε αυτές τις συνθήκες εμφανέστατα ο *S. cerevisiae* δεν κατόρθωσε να αναπτυχθεί όσο στις άλλες περιπτώσεις.

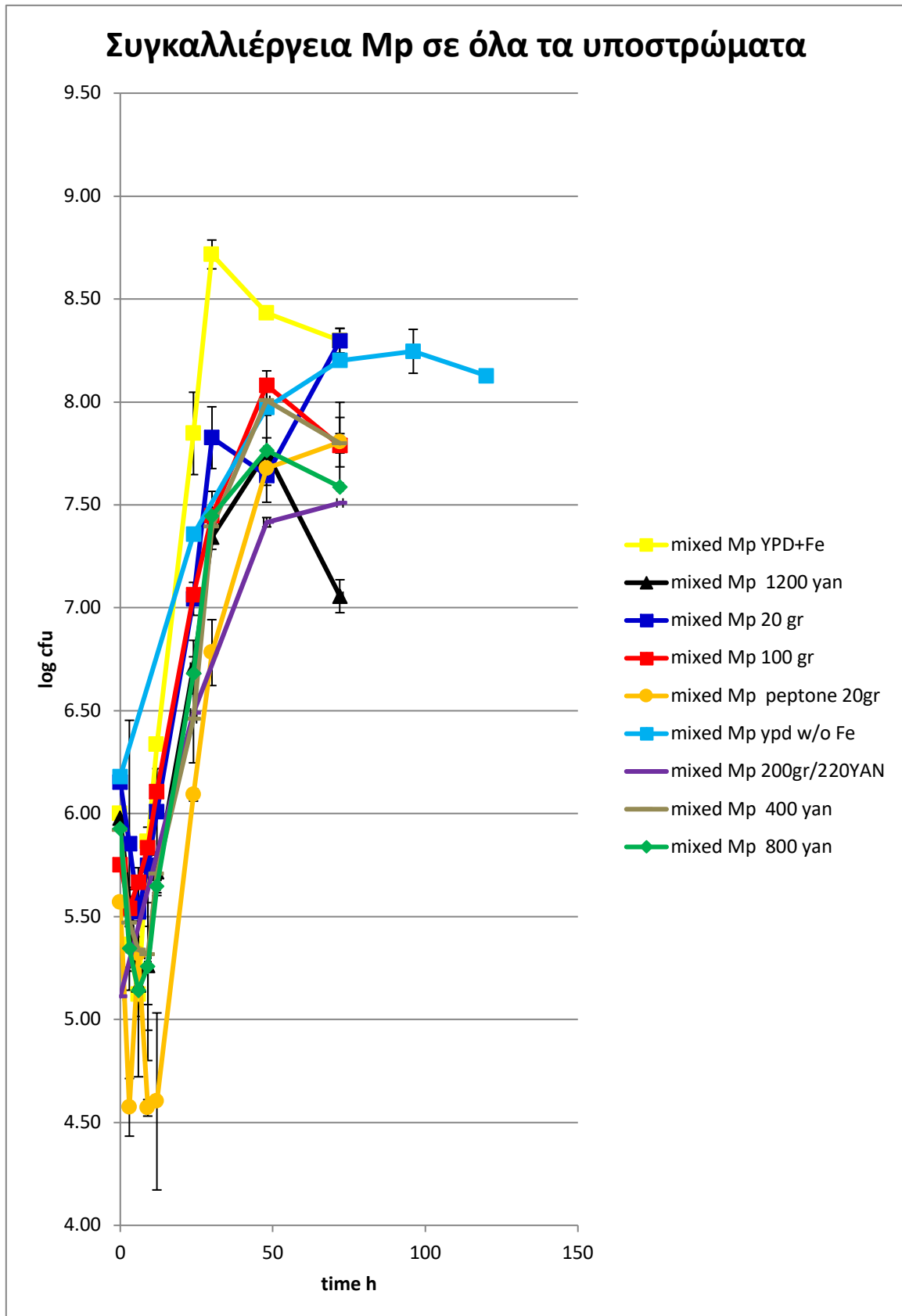
Μονοκαλλιέργεια Mp σε όλα τα υποστρώματα.



Σχήμα 35: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια σε όλα τα υποστρώματα.

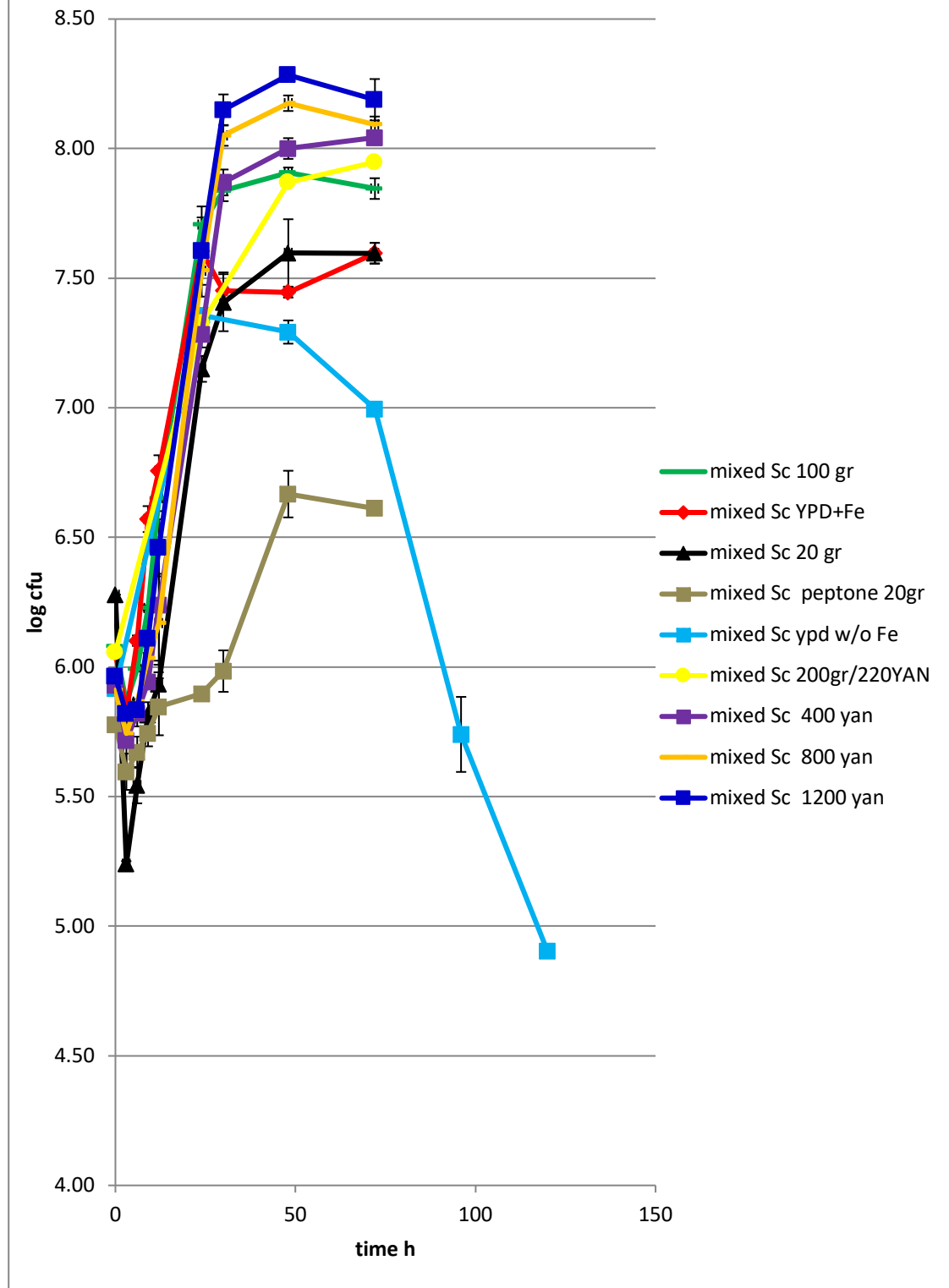


Σχήμα 36: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (*Sc*) σε μονοκαλλιέργεια σε όλα τα υποστρώματα.



Σχήμα 37: Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Μρ) σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* (Sc) σε όλα τα υποστρώματα.

Συγκαλλιέργεια Sc σε όλα τα υποστρώματα



Σχήμα 38: Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* (Mp) σε όλα τα υποστρώματα.

5. Συζήτηση

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ *S. cerevisiae* και *M. pulcherrima* σε σχέση με το υπόστρωμα σαν μικροοργανισμοί σε συγκαλλιέργεια αλλά και σαν ζύμες σε ένα μούστο. Άρα λοιπόν επιδιώξαμε να διεξάγουμε συμπέρασμα βιολογικά που να αφορούν τους δυο αυτούς μικροοργανισμούς ως μονάδες και συμπεράσματα σχετικά με την επιρροή των υποστρωμάτων. Ένα άλλο κομμάτι της διερεύνησης αυτής ήταν και η εξακρίβωση της σχέσης μεταξύ των δύο αυτών μικροοργανισμών και του συνδυασμού συστατικών που θα βρίσκονταν σε ένα μούστο, προκειμένου να συνυπάρξουν και να δώσουν έναν ποιοτικό οίνο.

Οι προαναφερόμενοι στόχοι επιτεύχθηκαν σε ικανοποιητικό βαθμό. Βρέθηκαν ορισμένα χαρακτηριστικά και για τους δυο μικροοργανισμούς που θα βοηθούσαν από βιολογικής απόψεως ως μονοκαλλιέργειες, για την ανάπτυξη καθενός μικροοργανισμού ξεχωριστά και για μελλοντική χρήση. Αυτά τα χαρακτηριστικά μας βοήθησαν να καταλάβουμε τον λόγο για τον οποίο ο ένας μικροοργανισμός επικρατούσε του άλλου ανάλογα το υπόστρωμα.

Αναλυτικότερα η *M. pulcherrima* επικράτησε του *S. cerevisiae* στο υπόστρωμα YPD λόγω της μορφής αζώτου που περιείχε το υπόστρωμα, της πεπτόνης. Ενώ στον συνθετικό μούστο επικράτησε εντελώς αντίθετο αποτέλεσμα λόγω της περιεκτικότητας σακχάρων αλλά και της μορφής του αζώτου (YAN). Η εικόνα αυτή της *M. pulcherrima* στον συνθετικό μούστο φάνηκε να καλυτερεύει όταν τα σάκχαρα είχαν μικρότερη τιμή και το διαθέσιμο άζωτο ήταν αρκετό και για τους δύο μικροοργανισμούς.

Όσον όμως αναφορά τον σίδηρο τα αποτελέσματα διαφέρουν από άλλες έρευνες. Αποδείχθηκε πως ο σίδηρος βοηθά και τους δυο μικροοργανισμούς στην ανάπτυξη τους ανεξάρτητος υποστρώματος. Μάλιστα σε καμία περίπτωση δεν παρουσιάστηκε αφομοίωση του σιδήρου από την *M. pulcherrima* εις βάρος του *S. cerevisiae*, όπως είχε παρατηρηθεί στην έρευνα : κατανόηση του κρασιού μέσω των αλληλεπιδράσεων ζυμών, των ερευνητριών Zilelidou και Nisiotou, 2021. Παρόλο που είναι ευρέως γνωστή αυτή η ιδιότητα της *M. pulcherrima* σχετικά με την δέσμευση σιδήρου σε αυτή τη διατριβή δεν σημειώθηκε σημαντική επιρροή σε αυτό το σημείο.

Σχετικά με το οινολογικό κομμάτι του σκοπού που προαναφέραμε μπορούμε να πούμε πως επιτεύχθηκε έως ένα σημείο. Βγήκαν πορίσματα σχετικά με το πως θα πρέπει να είναι ένας ιδανικός μούστος, όσον αναφορά τη σύσταση, έτσι ώστε να αναπτυχθούν αρμονικά οι δυο μικροοργανισμοί. Αναφορικά με τα συστατικά που θα πρέπει να έχει ο μούστος έχουμε να πούμε τα εξής. Τα σάκχαρα θα πρέπει να είναι περίπου στη ποσότητα αυτή των 100 g/L (50 g/L γλυκόζη και 50 g/L φρουκτόζη) για να αναπτύσσεται ομαλά η *M. pulcherrima*, το YAN κοντά στα 400 mg/L έτσι ώστε να υπάρχει άφθονο και για τους δύο μικροοργανισμούς. Ο σίδηρος σε μια ποσότητα 10 mg/L φαίνεται να είναι αρκετός, εφόσον μετρήθηκε στο τέλος της ζύμωσης και βρέθηκε σε περίσσεια.

Συνοψίζοντας όλα τα αποτελέσματα και τις παρατηρήσεις από τα πειράματα, θα αναφερθούμε στα πορίσματα που καταλήξαμε σχετικά με κάθε μικροοργανισμό ξεχωριστά. Παρακάτω για πιο εύκολη κατανόηση απαριθμούνται οι αξιοσημείωτες αποκρίσεις των *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae* στα διάφορα υποστρώματα που τοποθετήθηκαν για να αναπτυχθούν είτε ως μονοκαλλιέργειες είτε ως συγκαλλιέργειες.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα για την *M. pulcherrima*:

- Ο σίδηρος βοηθά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.
- Το άζωτο δρα θετικά στην ανάπτυξη της *M. pulcherrima*. Στην περίπτωση συγκαλλιέργειας από ένα σημείο και μετά έχει αρνητική επίδραση διότι επωφελείται και ο ανταγωνιστής, στη δικιά μας περίπτωση ο *S. cerevisiae*.
- Η *M. pulcherrima* δεν επηρεάζεται άμεσα από τον *S. cerevisiae* αλλά πολύ περισσότερο από τη σύσταση του υποστρώματος.
- Όσα περισσότερα σάκχαρα βρίσκονται στο υπόστρωμα τόσο πιο δύσκολα προσαρμόζεται και αναπτύσσεται η *M. pulcherrima* και αντίστροφα, όσα λιγότερα σάκχαρα περιέχονται στο μέσο ανάπτυξης τόσο καλύτερες είναι οι επιδόσεις της (εξαιρέση εδώ αποτελεί το υπόστρωμα που περιείχε πεπτόνη καθώς και κει η σύσταση των σακχάρων ήταν υψηλή και παρόλα αυτά η *M. pulcherrima* είχε μεγάλη ανάπτυξη).
- Η *M. pulcherrima* αξιοποιεί πολύ καλά το άζωτο της πεπτόνης. Μάλιστα εάν βρίσκεται αρκετή πεπτόνη στο υπόστρωμα απορρίπτεται το προηγούμενο συμπέρασμα. Όμως γίνεται αντιληπτή η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, η οποία είναι μεγαλύτερη από όλες τις περιπτώσεις και οφείλεται στις δύσκολα αφομοιώσιμες από τις ζύμες ενώσεις του αζώτου που έχει η πεπτόνη στη σύνθεσή της.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα για τον *S. cerevisiae*:

- Ο σίδηρος βοηθά την ανάπτυξη και αυτού του μικροοργανισμού.
- Ο *S. cerevisiae* επηρεάζεται από τη *M. pulcherrima* αλλά όχι τόσο από το υπόστρωμα.
- Εξαιρέση στο παραπάνω συμπέρασμα αποτελεί η περίπτωση της πεπτόνης, στην οποία ο *S. cerevisiae* επηρεάζεται και από τον ανταγωνιστή μικροοργανισμό και από το υπόστρωμα. Με αποτέλεσμα να έχουμε τους χειρότερους πληθυσμούς.
- Ο *S. cerevisiae* αφομοιώνει πολύ καλά το άζωτο του μούστου.
- Ο *S. cerevisiae* δυσκολεύεται υπερβολικά στην αξιοποίηση του αζώτου που προέρχεται από την πεπτόνη. Με άλλα λόγια επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη μορφή του αζώτου. Είναι το στοιχείο που δεν περιέχεται σε ένα

φυσιολογικό συνθετικό μούστο και για αυτό καταφέρνει και αναπτύσσεται καλύτερα από την *M. pulcherrima*, ενώ η εικόνα αντιστρέφεται στο υπόστρωμα YPD.

- Ο *S. cerevisiae* δεν επηρεάζεται από την ποσότητα σακχάρων στο υπόστρωμα. Οι επιδόσεις του παραμένουν σχεδόν ίδιες σε όλες τις περιπτώσεις με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχάρων (200 και 100 g/L παρόμοιες καμπύλες, 20 g/L ελαφρώς μειωμένος πληθυσμός).
- Η πεπτόνη καθυστερεί και αυτόν τον μικροοργανισμό στην φάση προσαρμογής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alonso-del-Real, J., Perez-Torrado, R., Querol A., & Barrio, E. (2019). Dominance of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains over *S. kudriavzevii* in industrial fermentation competitions is related to an acceleration of nutrient uptake and utilization, 1628.

Boulton, R., B., Singleton, V., L., Bisson, L., F., & Kunkee, R., E. Οινολογία – Βασικές αρχές & μέθοδοι οινοποίησης, σελ. 129-130, μετάφραση Εύα Αρβανίτη κ.ά., Κύπρος 2018.

Bruner, J., & Fox, G. Novel Non-*Cerevisiae Saccharomyces* Yeast Species Used in Beer and Alcoholic Beverage Fermentations. *Fermentation* 2020, 6, 116. [CrossRef]

Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*, 181, 75–83.

Cavaglia, J., Silvia Mas Garcia, Roger, J., M., Mestres, M., & Boque, R. (2022). Detection of bacterial spoilage during wine alcoholic fermentation using ATR-MIR and MCR-ALS.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10, 123–133.

Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8, 979–995.

Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 15–38.

Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14, 215–237

Karabegović, I., Malićanin, M., Danilović, B., Stanojević, J., Stojanović, S.S., Nikolić, N., & Lazić, M. (2021). Potential of non-*Saccharomyces* yeast for improving the aroma and sensory profile of Prokupac red wine. *Oeno One*, 55, 181–195. [CrossRef]

Melvydas, V., Svediene, J., Skridlaite, G., Vaiciuniene, J., & Garjonyte, R. (2020). In vitro inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by *Metschnikowia* spp. triggered by fast removal of iron via two ways. *Braz. J. Microbiol.*, 51, 1953–1964. [CrossRef]

Nisiotou, A., Sgouros, G., Mallouchos, A., Nisiotis, C.S., Michaelidis, C., Tassou, C., & Banilas, G. (2018). The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines, 499.

Sipiczki, M. (2020). *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin-producing yeasts: Fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms*, 8, 1019. [CrossRef]

Taillandier, P., Lai, Q.-P., Julien-Ortiz, A. & Brandam, C. (2014). Interaction between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30:1959-1967.

Tofalo, R., Patrignani, F., Lanciotti, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Di Gianvito, P., & Suzzi, G. (2016). Aroma profile of Montepulciano d'Abruzzo wine fermented by single and co-culture starters of autochthonous *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–12.

Tondini, F., Onetto, C. A., & Jiranek, V. (2020). Early adaptation strategies of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* to co-inoculation in high sugar grape must-like media.

Venios, X., Korkas, E., Nisiotou, A., & Banilas, G. (2020). Grapevine responses to heat stress and global warming. *Plants*, 9, 1754. [CrossRef]

Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., & Benito, S. (2020). The genus *Metschnikowia* in enology. *Microorganisms*, 8, 1038. [CrossRef] [PubMed]

Zilelidou, E.A., & Nisiotou, A. (2021). Understanding Wine through Yeast Interactions. *Microorganisms*, 9, 1620.