



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης FTIR φασματοσκοπίας σε
οίνους με επιμόλυνση από Βρεττανομύκητα**

ΖΕΡΒΑΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΑΜ:18685102

Επιβλέπουσα

Όνοματεπώνυμο:

ΜΠΑΣΑΛΕΚΟΥ ΜΑΡΙΑΝΘΗ

ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος – 2023



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

BACHELOR THESIS

Feasibility of using FTIR in wines spoiled by Brettanomyces

ZERVAKI GEORGIA

Registration Number: 18685102

Supervisor name and surname: Basalekou Marianthi

ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος – 2023



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

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

**«Διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης FTIR
φασματοσκοπίας σε οίνους με επιμόλυνση από
Βρεττανομύκητα»**

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3^ο Μέλους Επιτροπής)	


ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα ΖΕΡΒΑΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ του ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥ,
με αριθμό μητρώου 18685102 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής
ΤΡΟΦΙΜΩΝ του Τμήματος ΟΙΝΟΥ ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ, 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».

Ο/Η Δηλών/ούσα


(Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *Brettanomyces bruxellensis* αποτελεί έναν κοινό μολυσματικό παράγοντα στον οίνο και είναι γνωστός για την ικανότητα του να πολλαπλασιάζεται και να παραμένει στα κελάρια παραγωγής. Η παρουσία του δημιουργεί σημαντικές αλλαγές στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. Ο μύκητας παράγει ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών, όπου τα σημαντικότερα είναι το οξικό οξύ και οι αιθυλφαινόλες με κύριες την 4-αιθυλφαινόλη και την 4-αιθυλγουαϊκόλη. Τα αρώματα του μύκητα περιγράφονται ως ιδρώτας αλόγου, φαρμακευτικά, μυρωδιά αχυρώνα και ζωικό δέρμα. Οι τρέχουσες μέθοδοι που διατίθενται για την μέτρηση της παρουσίας του μύκητα είναι χρονοβόρες και δαπανηρές. Η φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier αποτελεί μια γρήγορη και με μεγάλη ακρίβεια μέθοδο η οποία εφαρμόζεται ολοένα και περισσότερο. Η παρούσα μελέτη διερεύνησε την ταυτοποίηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του μύκητα σε ερυθρό οίνο και την κινητική του στην πάροδο του χρόνου. Τα αποτελέσματα δείχνουν διαφοροποιήσεις στα φάσματα τόσο μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων μύκητα, που εμβολιάστηκαν, όσο και μεταξύ των διαφορετικών ημερών. Έτσι φαίνεται καθιστάτε εφικτή η αξιοποίηση της τεχνικής αυτής στην ταυτοποίηση του *Brettanomyces bruxellensis* σε ερυθρό οίνο.

Λέξεις κλειδιά:

Βρεττανομύκητας, FTIR, Φασματοσκοπία Υπερύθρου, Οίνος

ABSTRACT

Brettanomyces bruxellensis is a common wine yeast spoilage and is known for its ability to multiply and persist in production cellars. Its presence creates significant changes in the organoleptic profile of the wine. The yeast produces a wide range of metabolites, where the most important are the acetic acid and the ethylphenols with the main ones being 4-ethyl phenol and 4-ethyl guaiacol. The aromas of *Brettanomyces* are described as horse sweat, medicinal, barn smell and animal skin. Current methods available to measure the presence of *Brettanomyces* are time-consuming and expensive. The Fourier Transform Infrared Spectroscopy is fast and highly accurate method that is applied ever more. The present study investigated the identification of increasing concentrations of Brett in red wine and its kinetics over time. The results show variations in the spectra both between the different concentrations of Brett, that inoculated, and between the different days. Thus, it seems possible to use this technique in the identification of *Brettanomyces bruxellensis* in red wine.

Keywords:

Brettanomyces bruxellensis, FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Wine

Αφιέρωση

Αφιερώνω την πτυχιακή μου εργασία στην οικογένεια μου που είναι πάντα στο πλευρό μου και με στηρίζουν σε κάθε μου στιγμή και σε οποιαδήποτε απόφασή μου!

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τους καθηγητές μου, την κυρία Μπασαλέκου Μαριάνθη για όλη την υποστήριξή της σε αυτή την τη διαδρομή μου, την κυρία Δημοπούλου Μαρούλα και την κυρία Τζαμουράνη Κατερίνα για την ευγενική χορηγία του μύκητα. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την πολύτιμη στήριξή τους.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
Αφιέρωση	7
Ευχαριστίες.....	8
Κατάλογος Πινάκων.....	12
Κατάλογος Σχημάτων	13
Κατάλογος Εικόνων.....	14
Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί	18
1.Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας	19
1.1Εισαγωγή.....	19
1.2 Σκοπός.....	20
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	21
2.1 Το είδος <i>Brettanomyces Bruxellensis</i>	21
2.1.1 Τρόποι εξάπλωσης.....	21
2.1.2 Η επίδραση του στο κρασί.....	22
2.1.3 Τρόποι αντιμετώπισης.....	24
2.1.4 Σημασία <i>Brettanomyces</i> σε ζυμώσεις	26
2.2 Μέθοδοι απομόνωσης, καταμέτρησης, ταυτοποίησης.....	27
2.2.1 Μέθοδοι άμεσης ανάλυσης.....	28
2.2.2 Μέθοδοι έμμεσης ανάλυσης.....	36
2.3 Φασματοσκοπία.....	38
2.3.1 Εισαγωγή στην φασματοσκοπία.....	38
2.3.2 Απορρόφηση της ακτινοβολίας.....	39
2.3.3 Φασματοσκοπία IR.....	39
2.3.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου- Μετασχηματισμού (FT-IR)	40
2.3.4 Το όργανο και η βαθμονόμησή του.....	41
2.3.5 Πλεονεκτήματα φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier	42
2.3.6 Χρήση FTIR φασματοσκοπίας στην ανάλυση οίνων	43
2.3.7 Εφαρμογές φασματοσκοπίας FT-IR σε μικροοργανισμούς	44
3.Υλικά και Μέθοδοι.....	45
Χειρισμός δειγμάτων και λήψη φασμάτων	46
Ανάλυση με FTIR.....	49
4.Αποτελέσματα & Συζήτηση	50
5.Συμπεράσματα.....	90
Βιβλιογραφία.....	92

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1 Παραδείγματα θρεπτικών υποστρωμάτων (Tubia et al., 2018).....	30
Πίνακας 1.2 Διάφορα παραδείγματα θρεπτικών υποστρωμάτων (Tubia et al., 2018).....	30
Πίνακας 2. Συνθετικό υπόστρωμα ανάπτυξης και διαφοροποίησης Βρετανομύκητα (Kurtzman et al., 2011).....	31
Πίνακας 3.0 Δείγματα μύκητα προς ανάλυση.....	48
Πίνακας 3.1 Δείγματα αραιώσεων YPD προς ανάλυση.....	48
Πίνακας 3.2 Δείγματα YPD και Οίνου προς ανάλυση.....	49
Πίνακας 4.0 Περιγραφή αντιπροσωπευτικών περιοχών του φάσματος FTIR.....	51

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1. Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-IR6700 της εταιρίας Thermo-Nicolet.....	42
---	----

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 Τρυβλίο με DBDM μέσο καλλιέργειας με αποικίες <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (Tubia et al., 2018).....	32
Εικόνα 2. Μικροσκοπική εικόνα επιφθορισμού από κύτταρα <i>B.bruxellensis</i> (x400) (Tubia et al., 2018).....	32
Εικόνα4.0 4 αιθυλ-φαινόλη.....	53
Εικόνα4.0.1 4 αιθυλ-φαινόλη, στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	53
Εικόνα4.0.2 4 αιθυλ-γουαϊκόλη.....	54
Εικόνα4.0.3 4 αιθυλ-γουαϊκόλη, στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	54
Εικόνα 4.0.5 RedNoBrett.....	55
Εικόνα 4.0.6 YPD.....	55
Εικόνα 4.0.6.1 Brett1millcfu.....	56
Εικόνα 4.0.7 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των δειγμάτων: YPD, BrettYPD1millcfu, την ημέρα 0 των μετρήσεων.....	56
Εικόνα 4.0.8 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των δειγμάτων: YPD, BrettYPD1millcfu, την ημέρα 0 των μετρήσεων.....	57
Εικόνα 4.0.9 Συνολική εικόνα διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRed105, Brett2Red105, Brett3Red105 και Brett4Red105.....	57
Εικόνα 4.0.10 Διακύμανση των δειγμάτων: BrettRed105, Brett2Red105, Brett3Red105 και Brett4Red105, στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	58
Εικόνα 4.0.11 Συνολική εικόνα διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRed104, Brett2Red104, Brett3Red104 και Brett4Red104.....	58
Εικόνα 4.0.12 Διακύμανση των δειγμάτων: BrettRed104, Brett2Red104, Brett3Red104 και Brett4Red104 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	59
Εικόνα 4.0.13 Επικάλυψη των διακυμάνσεων του μύκητα με συγκέντρωση μύκητα 10^5 cfu/ml στο πέρας των ημερών (κόκκινο) και αυτού με συγκέντρωση 10^4 cfu/ml (μπλε).....	59
Εικόνα 4.0.14 Επικάλυψη των διακυμάνσεων του μύκητα με συγκέντρωση μύκητα 10^5 cfu/ml στο πέρας των ημερών (μοβ) και αυτού με συγκέντρωση 10^4 cfu/ml (κόκκινο), στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	60
Εικόνα 4.0.15 Συνολική εικόνα διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRed103, Brett2Red103, Brett3Red103 και Brett4Red103.....	60
Εικόνα 4.0.16 Διακύμανση των δειγμάτων: BrettRed103, Brett2Red103, Brett3Red103 και Brett4Red103 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	61
Εικόνα 4.0.17 Επικάλυψη των διακυμάνσεων του μύκητα με συγκέντρωση μύκητα 10^4 cfu/ml στο	

πέρασ των ημερών (κόκκινο) και αυτού με συγκέντρωση 10^3 cfu/ml (μπλε), στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	61
Εικόνα 4.1 Συνολική εικόνα Διακύμανσης των BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103 την ημέρα 28.....	62
Εικόνα 4.1.1 Διακύμανση των BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103 την ημέρα 28 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	62
Εικόνα 4.1.2 Συνολική εικόνα Διακύμανσης των Brett2RED105, Brett2RED104, Brett2RED103 την ημέρα 29.....	63
Εικόνα 4.1.3 Διακύμανση των Brett2RED105, Brett2RED104, Brett2RED103 την ημέρα 29 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	63
Εικόνα 4.1.4 Επικάλυψη των διακυμάνσεων ημέρα 28(κόκκινο) και ημέρα 29 (μπλε).....	64
Εικόνα 4.1.5 Συνολική εικόνα διακύμανσης των Brett3RED105, Brett3RED104, Brett3RED103 την ημέρα 30.....	65
Εικόνα 4.1.6 Διακύμανση των Brett3RED105, Brett3RED104, Brett3RED103 την ημέρα 30 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.	65
Εικόνα 4.1.7 Επικάλυψη των διακυμάνσεων ημέρα 29(κόκκινο) και ημέρα 30 (μπλε).....	66
Εικόνα 4.1.8 Συνολική εικόνα διακύμανσης των Brett4RED105, Brett4RED104, Brett4RED103 την ημέρα 31.....	66
Εικόνα 4.1.9 Διακύμανση των Brett4RED105, Brett4RED104, Brett4RED103 την ημέρα 31 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	67
Εικόνα 4.1.10 Επικάλυψη διακυμάνσεων ημέρα 30 (κόκκινο) και ημέρα 31 (μπλε).....	68
Εικόνα 4.1.11 Συνολική εικόνα διακύμανσης των BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103, YPDRED101, YPDRED102, YPDRED103 την ημέρα 28 λήψης των δειγμάτων.....	68
Εικόνα 4.1.12 Διακύμανση των BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103, YPDRED101, YPDRED102, YPDRED103 την ημέρα 28 λήψης των δειγμάτων στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.....	69
Εικόνα 4.1.13 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED105 και YPDRED101 την ημέρα 28 λήψης των δειγμάτων.....	69
Εικόνα 4.1.14 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED104 και YPDRED102 την ημέρα 28 λήψης των δειγμάτων.....	70
Εικόνα 4.1.15 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED103 και YPDRED103 την ημέρα 28 λήψης των δειγμάτων.....	71
Εικόνα 4.2.0 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED105(γαλάζιο), Brett2RED105(κόκκινο), Brett3RED105(μοβ), Brett4RED105(πράσινο).....	72
Εικόνα 4.2.1 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των	

BrettRED105WATER(κόκκινο), Brett2RED105WATER (πράσινο), Brett3RED105WATER (ροζ), Brett4RED105WATER (μπλε), έχοντας ως υπόβαθρο το νερό.....	73
Εικόνα 4.2.2 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED104(κόκκινο), Brett2RED104(μπλε), Brett3RED104(μοβ), Brett4RED104(πράσινο).....	74
Εικόνα 4.2.3 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED104WATER(κόκκινο), Brett2RED104WATER (μπλε), Brett3RED104WATER (μοβ), Brett4RED104WATER (πράσινο), έχοντας ως υπόβαθρο το νερό.....	75
Εικόνα 4.2.4 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED103(κόκκινο), Brett2RED103(μπλε), Brett3RED103(μοβ), Brett4RED103(πράσινο).....	76
Εικόνα 4.2.5 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των: RED(μοβ), YPDRED101(πράσινο), BrettRED105(κόκκινο) ημέρα 28 ^η των μετρήσεων.....	77
Εικόνα 4.3 Μέσος όρος πορείας (Average) στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED105, Brett2RED105, Brett3RED105, Brett4RED105.....	77
Εικόνα 4.3.1 Μέσος όρος πορείας (Average) στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED104, Brett2RED104, Brett3RED104, Brett4RED104.....	78
Εικόνα 4.3.2 Μέσος όρος πορείας (Average) στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED103, Brett2RED103, Brett3RED103, Brett4RED103.....	79
Εικόνα 4.3.3 Επικάλυψη των μέδων όρων των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων.....	80
Εικόνα 4.4 Επικάλυψη των δειγμάτων δεύτερου μήνα στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος στα δείγματα 2BrettRed105(κόκκινο), 2BrettRed104(μοβ), 2BrettRed103(ροζ) ημέρα 57 ^η των μετρήσεων.....	80
Εικόνα 4.4.1 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των 2BrettRed105water, 2BrettRed104water, 2BrettRed103water, την ημέρα 57 ^η λήψης των δειγμάτων, έχοντας ως υπόβαθρο το νερό.....	81
Εικόνα 4.4.2 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των 2BrettRed105, 2BrettRed104, 2BrettRed103 την ημέρα 57 ^η λήψης των δειγμάτων, έχοντας ως υπόβαθρο τον αέρα.....	82
Εικόνα 4.4.3 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος της διακύμανσης των δειγμάτων του μύκητα (ημέρα 28 ^η) και της διακύμανσης των δειγμάτων του μύκητα (ημέρα 57 ^η)	82
Εικόνα 4.4.4 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος Brettred105(μοβ) και 2BrettRed105(κόκκινο).....	83
Εικόνα 4.4.5 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος BrettRed104(μοβ) και 2BrettRed104(κόκκινο).....	84
Εικόνα 4.4.6 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος για τα δείγματα BrettRed103(μοβ) και 2BrettRed103(κόκκινο).....	84

Εικόνα 4.4.7 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος στα δείγματα 2BrettRed105 και YPD2Red101.....	85
Εικόνα 4.4.8 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος της διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRED105, YPDRed101 (ημέρα 28η) και της διακύμανσης των δειγμάτων: 2BrettRed105, YPD2Red101 (ημέρα 57η).....	85
Εικόνα 4.4.9 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος της διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRED104, YPDRed104 (ημέρα 28η) και της διακύμανσης των δειγμάτων: 2BrettRed104, YPD2Red102 (ημέρα 57η).....	86
Εικόνα 4.4.10 Overlay στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος της διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRED104, YPDRed104, BrettRED105, YPDRed101 (ημέρα 28η) και του της διακύμανσης των δειγμάτων: 2BrettRed104, YPD2Red102, 2BrettRed105, YPD2Red101 (ημέρα 57η).....	87
Εικόνα 4.4.11 Overlay στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος της διακύμανσης των δειγμάτων: RED(μπλε), RED2(κόκκινο).....	88
Εικόνα 4.4.12 Overlay στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των δειγμάτων: YPD, YPD2.....	88

Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

Abv: Alcohol by volume

°C: Βαθμοί Κελσίου

IR: Infrared

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy

FTMIR: Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy

NIR: Near Infrared MIR: Mid-Infrared

FIR: Far Infrared Spectroscopy

UV: Ultra Violet

UV-Vis: Ultra Violet Visible Spectroscopy

pH: ενεργή οξύτητα

ATR: Attenuated total reflectance

C-H: Δεσμός άνθρακα – υδρογόνο

OH: Υδροξύλιο

C-O: Δεσμός άνθρακα-οξυγόνου

C-C: Δεσμός άνθρακα – άνθρακα

C-N: Δεσμός άνθρακα- άζωτο

C=O: Διπλός δεσμός άνθρακα – οξυγόνο

C=C: Διπλός δεσμός άνθρακα- άνθρακα

CO₂: Διοξείδιο του άνθρακα

1.Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας

1.1Εισαγωγή

Στις μέρες μας, ο οίνος αποτελεί ένα πολύ διαδεδομένο ποτό το οποίο καταναλώνεται ευρέως ανά τον κόσμο (Fabani et al.,2010) , προσφέροντας ένα πλήθος από οικονομικά οφέλη για τις χώρες που το παράγουν.

Μια από τις παλαιότερες διαδικασίες ζύμωσης που έχουν προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον στο πέρασμα των αιώνων είναι η διαδικασία της οινοποίησης, δηλαδή η μετατροπή του αζύμωτου σταφυλοπολτού σε κρασί μέσω της κύριας διεργασίας της αλκοολικής ζύμωσης. Ως μια αυθόρμητη διεργασία είναι το αποτέλεσμα δράσης των ζυμομυκήτων *Saccharomyces cerevisiae* που απαντούν φυσικά είτε στη σταφυλή είτε προέρχονται από τον χώρο του οινοποιείου.

Εκτός από το κύριο είδος ζύμης του κρασιού *Saccharomyces cerevisiae*, διαφορετικά γένη και είδη βακτηριών και μη- *Saccharomyces* ζύμες έχουν εξακριβωθεί. Οι μικροοργανισμοί αποτελούν ένα φυσικό μέρος στην διαδικασία της οινοποίησης καθώς βρίσκονται στα σταφύλια, στο μούστο και στο κρασί και άρα συμβάλλουν στις οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος (Heard and Fleet, 1988; Fleet and Heard, 1993; Lambrechts και Pretorius, 2000). Η επίδραση τους ωστόσο δεν είναι μόνο θετική, καθώς η μικροβιακή δραστηριότητα οδηγεί συχνά σε αλλοίωση του κρασιού το οποίο αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα για την οινοποιεία γιατί καθιστά τα προϊόντα ελλατωματικά.

Μια από τις αμφιλεγόμενες ζύμες που έχει κερδίσει την προσοχή τα τελευταία χρόνια, καθώς συνδέεται με την αλλοίωση του οίνου, ανήκει στα γένη *Brettanomyces* και *Dekkera* γνωστά για την παραγωγή αιθυλφαινολών. Θεωρούνται ως μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοίωση καθόλη την διαδικασία της οινοποίησης και είναι αναγνωρισμένοι για την ικανότητα τους να παράγουν ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Chatonnet et al., 1995). Ο βρεττανομύκητας αποτελεί μια μεγάλη απειλή στην βιομηχανία του οίνου καθώς οδηγεί σε επιζήμιες οικονομικές απώλειες παγκοσμίως (du Toit and Pretorius, 2000; Oelofse et al., 2008).

1.2 Σκοπός

Όσον αφορά , τα εργαλεία που διατίθενται για την μέτρηση της παρουσίας της μικροβιακής αλλοίωσης, ιδιαίτερα για τις ζύμες *Brettanomyces/Dekkera*, είναι περιορισμένα. Οι τρέχουσες μέθοδοι είναι χρονοβόρες και επομένως γρηγορότερες και με μεγάλη ακρίβεια μέθοδοι είναι αναγκαίοι. Η φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier αποτελεί μία τεχνική για την διαφοροποίηση στελεχών βακτηρίων και ζυμομυκήτων (Naumann et al., 1991; Wenning et al., 2002; Ngo-Thi et al., 2003; Essendoubi et al., 2005).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διαπιστώσει την δυνατότητα αξιοποίησης της φασματοσκοπίας υπερύθρου κατά μετασχηματισμό Fourier στην ταυτοποίηση της επίδρασης του *Brettanomyces bruxellensis* σε ερυθρό οίνο. Για το σκοπό αυτό επιχειρήθηκε ο εμπλουτισμός του οίνου με μύκητα και η δημιουργία διαφορετικών δειγμάτων βασισμένων στην διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων. Μετά από την παραμονή τους για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, τα δείγματα μετρήθηκαν και αξιολογήθηκαν με στόχο την διαπίστωση διαφορών τόσο για την επίδραση του μύκητα στο φάσμα του οίνου όσο και για κινητική του ίδιου του μύκητα μέσα σε αυτό.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1 Το είδος *Brettanomyces bruxellensis*

Μία από τις ζύμες που αντέχουν την τοξικότητα των επιπέδων αιθανόλης και που έχει γίνει η πιο πρόσφατη ανησυχία για τους περισσότερους οινοποιούς ως αποτέλεσμα των φαινολικών δυσάρεστων γεύσεων, είναι το *Brettanomyces/Dekkera* (Licker et al., 1999; Loureiro and Malfeito-Ferreira., 2003). Το όνομα *Dekkera*, που αναφέρεται συχνά μαζί με τον Βρεττανομύκητα στη λογοτεχνία, αναφέρεται στην εναλλάξιμη ονομασία του *Brettanomyces* (Barnett et al., 1990; Heresztyn.,1986) Το *Dekkera* είναι η σπορογόνος μορφή (που σχηματίζει ασκοσπόρια) ή το σεξουαλικό τελεόμορφο του Βρεττανομύκητα και το *Brettanomyces* η ασεξουαλική μη σποριώδης μορφή (Coulter et al. 2003). Όσον αφορά την ταξινόμηση τους, οι *Brettanomyces/Dekkera* έχουν αναταξινομηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια. Σήμερα κυριαρχούν πέντε αναγνωρισμένα είδη: *D. bruxellensis*, *D. anomala*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* και *B. nana* (Egli και Henick-Kling, 2001).

Το είδος *Brettanomyces bruxellensis* ανήκει στον γένος των Βρεττανομύκητων. Από καιρό αναγνωρίζεται ως κοινός μολυσματικός παράγοντας στον οίνο (Custers 1940, van der Walt and van Kerken 1958). Είναι γνωστό για την ικανότητα του να πολλαπλασιάζεται και να παραμένει στα κελάρια παραγωγής. Η παρουσία του προκαλεί σημαντικές αλλαγές στο οργανοληπτικό προφίλ ενός οίνου το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Μπορεί να παράγει ισχυρές δυσάρεστες γεύσεις όπως ιδρώτας αλόγου, αχυρώνα και καμένο πλάστικό. Η σύνθεση των παραπάνω προϊόντων γίνεται μέσω ειδικών μεταβολικών μονοπατιών, ανύπαρκτων σε άλλες ζύμες του οίνου (Curtin et al., 2014). Επιπλέον, ορισμένα στελέχη *B. bruxellensis* είναι ικανά να παράξουν βιογενείς αμίνες (Agnolucci et al., 2009). Οι βιογενείς αμίνες είναι νευροδιαβιβαστές οι οποίες συντίθενται από αμινοξέα και μπορεί να επηρεάσουν λειτουργίες όπως η ρύθμιση της θερμοκρασίας και της αρτηριακής πίεσης και είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων (Vander et al., 2011). Παρόλα αυτά, ο χαρακτήρας αυτός δεν είναι καθολικά ανεπιθύμητος.

2.1.1 Τρόποι εξάπλωσης

Ο Βρεττανομύκητας δεν προέρχεται μόνο από μια αιτία μόλυνσης, αλλά από ένα ευρύ φάσμα φαινομένων. Τα στέμφυλα χαρακτηρίζονται από αρκετά ποικιλόμορφο μικροβιακό σύστημα και αποτελούν την κυριότερη πηγή εισαγωγής του *Brettanomyces bruxellensis* στο χώρο

του οινοποιείου (Renouf and Lonvaud-Funel, 2007).

Τα πρώτα βήματα όσον αφορά την διαδικασία της οινοποίησης δημιουργούν αρκετές ευκαιρίες για την εξάπλωση αυτής της ζύμης αλλοίωσης. Η πορεία και η σωστή διαχείριση τόσο της αλκοολικής όσο και της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι σημαντική ώστε να μην αναπτυχθεί ο Βρετανομύκητας. Ευνοϊκές συνθήκες αποτελούν η σταματημένη ή η πολύ αργή ζύμωση, το pH άνω του 3.6, οι υψηλές θερμοκρασίες, οι τεχνικές μικροοξυγόνωσης και οι λανθασμένες θειώσεις (Tubia et al, 2018).

Όταν ο μούστος ή ο οίνος έρχονται σε επαφή με μολυσμένες περιοχές, η εξάπλωση του μύκητα αυξάνεται. Τέτοιες περιοχές μπορεί να είναι ο μη καθαρός εξοπλισμός παραλαβής σταφυλιών, όπως η σταφυλοδόχος ή ο σπαστήρας και το πιεστήριο, οι γραμμές μεταφοράς του μούστου ή του οίνου, οι δεξαμενές που δεν έχουν καθαριστεί με αποτελεσματικό τρόπο και τέλος οι κάβες των βαρελιών (Tubia, et al. 2018).

Πιο συγκεκριμένα, οι Yap et al. (2007) απέδωσαν την αύξηση των περιστατικών επιμόλυνσης από τον Βρετανομύκητα την τελευταία δεκαετία στα εξής παραδείγματα:

1. Νέες τάσεις σε ορισμένα στυλ οινοποίησης, όπως η παραγωγή κρασιών με υψηλότερες τιμές pH και υπολειμματικά σάκχαρα.
2. Διαφορετικές πρακτικές οινοποίησης με μειωμένη χρήση της διήθησης και του SO₂
3. Κακή υγιεινή του κελαριού σε συνδυασμό με τον ακατάλληλο καθαρισμό και την απολύμανση των βαρελιών
4. Η χρήση μολυσμένων βαρελιών, τα οποία πολλές φορές εν αγνοία του αγοραστή πωλούνται στην αγορά ως μεταχειρισμένα βαρέλια.
5. Εισαγωγή κρασιού που έχει μολυνθεί από τον Βρετανομύκητα από άλλα οινοποιεία.

Κατά αυτόν τον τρόπο, η παρουσία του μύκητα έχει ανιχνευτεί από την πρώτη ύλη, το σταφύλι, όπου οι Renouf and Lonvaud-Funel (2006) ανίχνευσαν τον *B.bruxellensis* σε ράγες σταφυλιών, μέχρι τον εξοπλισμό του οινοποιείου αλλά η κύρια εστία είναι ο χώρος που βρίσκονται τα βαρέλια.

2.1.2 Η επίδραση του στο κρασί

Ο χαρακτήρας του Βρετανομύκητα δημιουργείται κυρίως κατά την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης σε έναν δευτερεύοντα μεταβολισμό. Η περίοδος μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης κατά την περίοδο της μηλογαλακτικής ζύμωσης, είναι επίσης ιδιαίτερα

κρίσιμη για την ανάπτυξη του *B. bruxellensis* στο κρασί (Renouf et al., 2005). Έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί διάφορες πηγές άνθρακα συμπεριλαμβανομένης και της αιθανόλης (Dias et al. 2003). Το είδος που συνδέεται κυρίως με την οινοποίηση είναι ο *B. bruxellensis* (*D. Bruxellensis*) (Egli & HenickKling, 2001; Stender et al., 2001; Cocolin et al., 2004). Η παρουσία περισσότερων από 10^4 cfu/mL μπορεί να έχει επιζήμια επίδραση στην αισθητηριακή ποιότητα του κρασιού, με αποτέλεσμα την δημιουργία δυσάρεστων οσμών και γεύσεων (du Toit and Pretorius, 2000; Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2006;). Ο μύκητας, παράγει ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών, τα σημαντικότερα των οποίων είναι το οξικό οξύ και οι αιθυλφαινόλες, όπως η 4-αιθυλφαινόλη και η 4-αιθυλγουαϊκόλη (Chatonnet et al. 1995, 1997), καθώς και διάφορες άλλες τόσο γνωστές όσο και άγνωστες ενώσεις (Licker 1998). Οι παραγόμενες ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως σχετιζόμενες με την παρουσία του “Brett”, η 4-αιθυλγουαϊκόλη και η 4-αιθυλφαινόλη, αποτελούν τις δύο χημικές ουσίες που έχουν συνδεθεί με την παρουσία και της δραστηριότητα της ζύμης αυτής (Heresztyn 1986a,b, Chatonnet 1997). Το κατώφλι αντίληψης των ενώσεων αυτό είναι αρκετά χαμηλό, αλλά έστω και μια μικρή ποσότητα αν βρεθεί, προκαλείται μείωση της οσφρητικής ποιότητας του οίνου. Αναφέρεται ότι το 80% του *Brettanomyces* είναι σε θέση να παράγει αυτές τις φαινόλες αλλά μόνο το 50% σε υψηλά επίπεδα (Conterno et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγή αυτών των ενώσεων πραγματοποιείται με τη δραστηριότητα δύο ενζύμων τα οποία αποκαρβοξυλιώνουν τα υδροξυκιναμικά οξέα και στη συνέχεια ανάγονται σε παράγωγα αιθυλίου. Ο *Brettanomyces* είναι σε θέση να χρησιμοποιήσει π-κουμαρικό και φερουλικό οξύ (τα οποία βρίσκονται στο μούστο), μετατρέποντάς τα σε 4-αιθυλφαινόλη και 4-αιθυλγουαϊκόλη, αντίστοιχα (Steensels et al., 2015, Suárez et al., 2007). Η αναλογία μεταξύ των δύο κυρίων φαινολών που προαναφέρθηκαν ποικίλλει σε κάθε κρασί. Μερικές μελέτες αναφέρουν διακυμάνσεις μεταξύ 3:1 και 40:1, χωρίς να υπάρχει κάποιος πειστικός ρόλος που να εξηγεί αυτές τις διαφορές (Šušur et al., 2016). Επιπρόσθετα, ο σχηματισμός της 4-αιθυλφαινόλης σχετίζεται με το είδος και το στέλεχος του Βρεττανομύκητα (Di Toro et al., 2015). Πρόσφατα, η 4-αιθυλική κατεχόλη βρέθηκε ως μεταβολίτης που σχετίζεται με τον *Brettanomyces* και είναι υπεύθυνη για ένα μέρος του χαρακτήρα στους μολυσμένους οίνους (Hesford et al. 2004) Τα αρώματα του μύκητα περιγράφονται ως ιδρώτας αλόγου, φαρμακευτικά, μυρωδιά αχυρώνα ή και ζωικό δέρμα. Πέρα αυτών των αρωμάτων, παράγει και έναν χαρακτήρα εξωτικών φρούτων όπως μάνγκο, σταφύλι, ανανάς και αχλάδι. Όμως αυτός ο χαρακτήρας όταν πρόκειται για την παραγωγή «φυσικών οίνων» μπορεί να είναι επιθυμητός .

Σε άλλη περίπτωση η παραγωγή των πτητικών οξέων, συμπεριλαμβανομένου του οξικού και του ισοβαλερικού οξέος, μπορεί να προκαλέσουν ταγγές και/ή τυρώδεις γεύσεις και οσμές (Oelofse et al., 2008; Steensels et al., 2015). Πέρα από την οργανοληπτική επίδραση του με την

δημιουργία αιθυλοφαινολών σε ερυθρούς οίνους, ο *B. Bruxellensis* έχει επίδραση και σε άλλους παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να σχετίζονται και με την οπτική εικόνα. Κατά την παρουσία του δημιουργείται πάνω στην επιφάνεια του οίνου ένα λεπτό στρώμα, ο οίνος θολώνει, το ερυθρό χρώμα αλλοιώνεται, αυξάνεται η πτητική οξύτητα και παράγεται ένα φάσμα μη επιθυμητών γεύσεων (mousy)-τετραϋδροπιριδίνες (Vendrame et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, οι χρωστικές ουσίες όπως οι ανθοκυανίνες και η βινυλοφαινόλη μετατρέπονται χάρη στον Βρεττανομύκητα σε παράγωγα αιθυλίου προκαλώντας αλλοίωση στο χρώμα του οίνου (Tubia et al., 2018).

Ακόμα πρέπει να τονιστεί πως ο *Brettanomyces bruxellensis* είναι κυρίως υπεύθυνος για τη δημιουργία ανεπιθύμητου οργανοληπτικού χαρακτήρα σε ένα ερυθρό οίνο που έχει ωριμάσει σε δρύινα βαρέλια. Όταν το κρασί αποθηκεύεται στα ξύλινα βαρέλια με σκοπό να πραγματοποιήσει την διαδικασία της ωρίμανσης, η πορώδης μικροδομή των βαρελιών επιτρέπει την είσοδο του οξυγόνου όπου προάγει την ανάπτυξη του Βρεττανομύκητα (Tubia et al., 2018). Η ικανότητα του μύκητα να μπορεί να μεταβολίσει μια ποικιλία πηγών του άνθρακα, του δίνει το πλεονέκτημα να αναπτύσσεται πιο εύκολα από άλλες ζύμες κατά την διάρκεια των τελικών σταδίων της ζύμωσης (Tubia et al., 2018)

Όσον αφορά την παρουσία του Βρεττανομύκητα σε λευκούς οίνους, δεν απαντάται τόσο συχνά. Αυτό αποδίδεται κυρίως στην αποτελεσματικότητα του διοξειδίου του θείου σε συνθήκες με χαμηλό pH, καθιστώντας χαμηλή τη βιωσιμότητα του μύκητα.

2.1.3 Τρόποι αντιμετώπισης

Ένα τρόπος δεν είναι αρκετός για την διαχείριση και την αντιμετώπιση του μύκητα. Για να σταματήσει η πρόοδος του, θα πρέπει να υπάρχουν διάφορα εμπόδια στο δρόμο, των οποίων ο συνδυασμός τους θα αποτρέψει την αχαλίνωτη ανάπτυξη των μικροβίων (Edwards, 2007).

Ας ξεκινήσουμε από την πρώτη ύλη, όσον αφορά τον οίνο, η οποία είναι το σταφύλι. Ο αμπελώνας έχει σίγουρα ένα καθοριστικό ρόλο καθώς μια καλύτερη ποιότητα σταφυλιού, μπορεί να συμβάλλει στην μείωση ορισμένων κινδύνων που οδηγούν στην παραγωγή φαινολικών δυσάρεστων γεύσεων (Loureiro & Malfeito Ferreira, 2006; Taillandier, 2007).

Όσον αφορά το στάδιο της παραγωγής του οίνου, παρακάτω αναφέρονται ορισμένοι τρόποι με στόχο τον έλεγχο αλλά και την αποφυγή ανάπτυξης του μύκητα.

Οι Gerbaux et al. (2002) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας κατά την διαδικασία

την διαβροχής και την ένταση της απελευθέρωσης των υδροξυκυκνναμικών οξέων από τις φλούδες των σταφυλιών ως παράγοντες που συμβάλουν στον σχηματισμό των πτητικών φαινολών. Αυτοί οι παράγοντες σε συνδυασμό με τη χρήση ειδικών ενζύμων τα οποία χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή αλλά και την διαύγαση του χρώματος, ένζυμα που περιέχουν την δραστηριότητα την κινναμυλ εστεράσης μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή αυξημένων επιπέδων πτητικής φαινόλης από Βρετανομύκητα (Dugelay et al., 1993; Gerbaux et al., 2002). Έτσι η αποφυγή τους θα μπορούσε να αποτελέσει μια προληπτική μέθοδο για την αποφυγή ανάπτυξης των αρωμάτων του.

Οι μέθοδοι βιοελέγχου αποτελούν επίσης μια πολύ ενδιαφέρουσα μέθοδος αντιμετώπισης για του παραγωγούς. Ο αριθμός των κυττάρων του Βρετανομύκητα ελέγχεται και από την αλληλεπίδραση του με τα διάφορα βακτήρια και τις ζύμες. Ορισμένες μελέτες απέδειξαν ότι οι ζυμομύκητες μη- *Saccharomyces* (π.χ., *Kluyveromyces wickerhamii*, *Pichia anomala*) εκκρίνουν τοξίνες οι οποίες δύναται να επιφέρουν θάνατο όπως και ορισμένες αντιμικροβιακές πρωτεϊνούχες ενώσεις οι οποίες με την σειρά τους αναστέλλουν ευαίσθητες ζύμες (Mehlomakulu et al., 2015). Ακόμα, ο εμβολισμός με καθαρές καλλιέργειες και στην αλκοολική αλλά και στην μηλογαλακτική ζύμωση έδειξε ότι είναι ένας τρόπος αποφυγής της ανάπτυξης του Βρετανομύκητα και του σχηματισμού των πτητικών φαινολών (Tubia et al., 2018).

Έναν ακόμη κοινό τρόπο αντιμετώπισης αποτελεί η χρήση της προσθήκης θειώδους SO₂ ως μια προληπτική μέθοδο κατά της διαδικασίας ελέγχου για την ποιότητα του κρασιού (Ough et al, 2005). Πρέπει να τονιστεί πως, αν και τα στελέχη του Βρετανομύκητα ποικίλλουν ως προς την αντοχή τους σε SO₂ (Conterno et al. 2006; Barata et al. 2008a), συγκεντρώσεις από 0,4 έως 0,8 mg/L μοριακού SO₂, συνήθως οδηγούν σε αναστολή ανάπτυξης του μύκητα στο κρασί (Fugelsang και Edwards 2007). Παρόλα αυτά, η χρήση του θειώδους, σε ορισμένες χώρες, ελέγχεται ή απαγορεύεται λόγω των επιβλαβών επιπτώσεων στην υγεία (Vally and Misso, 2012).

Η μείωση της βιωσιμότητας ή η απενεργοποίηση του Βρετανομύκητα μπορεί ακόμα να επιτευχθεί με τη δημιουργία κατάλληλων φυσικοχημικών συνθηκών. Ως μεταβλητές φυσικοχημικές συνθήκες αναφέρονται: α) Οι χαμηλές θερμοκρασίες ωρίμανσης, β) Το χαμηλό pH, γ) Η μείωση της συγκέντρωσης σε οξυγόνο, δ) Η αποφυγή μικροοξυγόνωσης, ε) Τα υψηλά επίπεδα αιθυλικής αλκοόλης και στ) Η θερμική απενεργοποίηση. Οι φυσικοχημικές αυτές συνθήκες μπορεί να έχουν αντίκτυπο στον οργανοληπτικό χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Tubia et al., 2018). Έπειτα, η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με τη χρήση ζελατίνης, ασπράδι του αυγού και καζεϊνικού καλίου οδηγεί στην μείωση του μέσω της διαδικασίας της συσσωμάτωσης (Flocculation), καθώς γίνεται και μείωση των αιθυλφαινολών.

Επιπρόσθετα, η χρήση φίλτρων με μεμβράνες 0,45μm ή με σύστημα Ultrafiltration

συμβάλει στην μείωση του πληθυσμού του με φυσικό διαχωρισμό. Τα αρνητικά αποτελέσματα από την χρήση αυτής της τεχνικής είναι τόσο η απώλεια του χρώματος όσο και το κόστος των φίλτρων (ιδίως το σύστημα Ultrafiltration) και σε περίπτωση αρκετά υψηλού πληθυσμού του Βρετανομύκητα υπάρχει ο κίνδυνος να βουλώσουν τα φίλτρα πιο εύκολα (Tubia et al., 2018). Σύμφωνα με τους Calderón et al. (2004), το μέγεθος του φίλτρου που απαιτείται για την αφαίρεση του *Brettanomyces/ Dekkera* είναι 0,45μm. Από την άλλη, οι Renouf et al. (2007) αναφέρει ότι ένα φίλτρο 1 μm έχει επίσης πολύ θετικά αποτελέσματα.

Μια ακόμα από τις καλύτερες εφαρμογές που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην αποφυγή των μολύνσεων από τον Βρετανομύκητα είναι ο σωστός έλεγχος και καθαρισμός του εξοπλισμού ενός οινοποιείου, η βελτίωση των πρωτοκόλλων υγιεινής και η χρήση αντιμικροβιακών τεχνολογιών. Τα τυπικά πρωτόκολλα υγιεινής στηρίζονται τόσο στο πλύσιμο όσο και στην απολύμανση των δεξαμενών, γραμμών αντλιών και του υπολοίπου εξοπλισμού πριν και μετά την κάθε χρήση (Tubia et al., 2018). Η χρησιμοποίηση χημικών, κυρίως με χλώριο, δεν είναι κατάλληλη για την κατεργασία του ξύλου καθώς πραγματοποιείται απελευθέρωση διαφόρων ουσιών. Σε αντίθεση, στις πιο κατάλληλες τυποποιημένες διαδικασίες υγιεινής περιλαμβάνονται αυτές με την χρήση ζεστού νερού ή μέθοδοι με ατμό (Zuehlke et al., 2013). Επιπλέον, η παρουσία του Βρετανομύκητα έχει ανιχνευτεί σε βάθος 8 mm στις ξύλινες ράβδους του βαρελιού, που αντιστοιχεί στο μέγιστο επίπεδο διείσδυσης του κρασιού (Barata et al., 2013). Κατά αυτόν τον τρόπο, ως κρίσιμο σημείο στο μικροβιολογικό έλεγχο, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη έμφαση κατά τον καθαρισμό των βαρελιών και την απολύμανσή τους.

Πρέπει να αναφερθεί πως σε πειραματικό στάδιο βρίσκονται οι βιολογικές τεχνικές, οι οποίες συμβάλλουν και αυτές στην αποτροπή ανάπτυξης του μύκητα ή και στην μείωση του πληθυσμού του. Σε αυτές περιλαμβάνεται η χρήση βακτηριοσινών (Bacteriocins), βακτηριολογικών ενζύμων, ζυμοσινών (Zymocins), ζυμών με killer toxins (Tubia et al., 2018). Τέλος, η χρήση τεχνικών γενετικής μηχανικής δεν επιτρέπονται από την Ε.Ε για εφαρμογή στα τρόφιμα. Ερευνώνται ακόμη σε πειραματικό στάδιο και δεν έχουν εμφανίσει ακόμα την επιθυμητή απόδοση. Οι συγκεκριμένες τεχνικές κάνουν χρήση των γενετικά τροποποιημένων ζυμών οι οποίες αποτρέπουν την ανάπτυξη των Βρετανομυκήτων (Tubia et al., 2018).

2.1.4 Σημασία *Brettanomyces* σε ζυμώσεις

Η απομόνωση του *Brettanomyces spp.* έγινε από αυθόρμητες διαδικασίες ζύμωσης, όπως για παράδειγμα αυτές από τα οινοπνευματώδη ποτά (κρασί, μύρα, μηλίτης και μύρα), τα αναψυκτικά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, της kombucha, τις ξινές ζύμες και από τις ελιές. Στις μέρες μας, η σημασία των ειδών του έχει αναγνωριστεί πάνω στην ζύμωση της μύρας, του

κρασιού και της βιοαιθανόλης (Colomer et al, 2018). Παρόλα αυτά τα μοριακά και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα για την παρασκευή αυτών των ειδών είναι ελάχιστα κατανοητά, καθώς ο ρόλος του Βρετανομύκητα στις ζυμώσεις αυτές είναι συχνά διφορούμενος, όπως αναφέρεται.

Στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων, δεν είναι επιθυμητή η παρουσία *Brettanomyces* στις καλλιέργειες οίνου λόγω της δημιουργίας του ανεπιθύμητου οργανοληπτικού προφίλ. Παρόλα αυτά, ορισμένοι οινοποιοί αναφέρουν πως η επίδραση του μύκητα σε χαμηλά επίπεδα μπορεί να συμβάλλει θετικά στην πολυπλοκότητα του οίνου δίνοντας έναν χαρακτήρα παλαιώσης σε μερικά νεαρά κόκκινα κρασιά. Η οινοποίηση των γαλλικών κρασιών Château de Beaucastel βασίζεται στο *Brettanomyces* για την απόκτηση του χαρακτηριστικού τους αρώματος καθώς μπορεί να προσθέσει θετικά αποτελέσματα όπως η αισθητηριακή πολυπλοκότητα και να προσδώσει ώριμους χαρακτήρες σε μερικά νεαρά κόκκινα κρασιά (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003).

Σε γενικές γραμμές όμως, ο *B. bruxellensis* είναι ένα τέτοιο είδος, το οποίο μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα μέσα στο χώρο του οινοποιείου και να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα του κρασιού. Έτσι ο έγκαιρος εντοπισμός του *Brettanomyces bruxellensis* είναι απαραίτητος για την επιτυχή αντιμετώπιση του και την προστασία των οίνων. Ως εκ' τούτου πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανακάλυψη μεθόδων για την ανίχνευση κυττάρων *Brettanomyces* σε ζύμωση οίνου με σκοπό την ανακάλυψη της μόλυνσης όσο το δυνατόν πιο σύντομα στην διαδικασία της οινοποίησης (Cecchini et al., 2013, Cocolin et al., 2004).

2.2 Μέθοδοι απομόνωσης, καταμέτρησης, ταυτοποίησης

Οι πιο χρησιμοποιούμενες τεχνικές και για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό του Βρετανομύκητα είναι οι παραδοσιακές μέθοδοι. Αυτό συμβαίνει λόγω της απλότητας τους αλλά και του σχετικά χαμηλού τους κόστους. Οι μέθοδοι αυτοί διακρίνονται σε άμεσες και έμμεσες. Το μειονέκτημα των δύο παραπάνω μεθόδων αποδίδεται στην δυσκολία χρήσης τους από μονάδες παραγωγής. Για την εφαρμογή τους απαιτείται ένα εξειδικευμένο προσωπικό δοκιμών, χρειάζεται επώαση αρκετών ημερών μέχρι και δύο εβδομάδων ή και περισσότερο, καθώς επίσης μπορεί να υπάρξουν ανακριβή αποτελέσματα. Επομένως, στα οινοποιεία θα χρειαστούν πιο ευαίσθητες, γρήγορες και αποδοτικές τεχνικές ανίχνευσης (Tubia et al., 2018).

Από την άλλη μεριά, οι συμβατικοί μέθοδοι ταυτοποίησης του Βρετανομύκητα είναι εξίσου ανεπαρκείς. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων και στα χαρακτηριστικά του μεταβολισμού (αργή ανάπτυξη σε θρεπτικά μέσα σε σύγκριση με άλλες ζύμες) (Vendrame et al.,

2014).

2.2.1 Μέθοδοι άμεσης ανάλυσης

Οι μέθοδοι της άμεσης ανάλυσης στοχεύουν στον εντοπισμό διαφόρων μικροοργανισμών έχοντας ως βάση την άμεση παρατήρηση των κυττάρων της ζύμης, την ανάλυση διαφόρων παραμέτρων όπως μορφολογία, κινητική ανάπτυξης, αποικίες, σχηματίζοντας έτσι μονάδες και βιοδείκτες. Οι παραπάνω τεχνικές παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν μικρές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών. Το ελάττωμά τους είναι ότι είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες και απαιτούν έως και δύο βδομάδες για να βγουν τα αποτελέσματα (Tubia et al., 2018).

Οι πιο σχετικές άμεσες τεχνικές για τον Βρετανομύκητα είναι οι μέθοδοι επίστρωσης, η μικροσκοπία, η μοριακή ανίχνευση και η κυτταρομετρία ροής (Cocolin et al., 2004, Ibeas et al., 1996, Renouf and Lonvaud-Funel, 2007).

Ως άμεσοι μέθοδοι ανάλυσης:

1. Μέθοδοι επίστρωσης

Στην παραπάνω τεχνική χρησιμοποιούνται πλάκες επιλεκτικής- διαφορικής καλλιέργειας, οι οποίες ακολουθούνται από κάποια συμπληρωματική βιοχημική και φυσιολογική ανάλυση. Θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν αυτές οι τεχνικές επίσης και την μελέτη μορφολογίας με μικροσκόπιο (Wedral et al., 2010). Σε ένα συνήθη βαθμό, η ανάλυση της διαφορετικής μορφολογίας των αποικιών πάνω στην πλάκα άγαρ είναι δυνατή. Παρόλα αυτά η διάκριση και η αναγνώριση όσον αφορά την μορφολογία και την φυσιολογία τους είναι δύσκολη, και συχνά, δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Επιπρόσθετα εφαρμόζεται αποκλειστικά και μόνο για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιώσιμων κυττάρων, εφόσον τα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα (VBNC) δεν θα αναπτυχθούν, παρόλο που βρίσκονται στο μέσο.

Για την ανίχνευση του *Brettanomyces*, τα πιο συνήθη καλλιεργητικά μέσα που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από ένα σύνολο διαφόρων χημικών και αντιδραστήριων. Περιέχουν συνήθως σάκχαρα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη, πρωτεΐνες οι οποίες έχουν υποστεί πέψη ως πηγή αζώτου (π.χ. πεπτόνη και τρυπτόνη) και σύνθετα συμπληρώματα (π.χ. εκχύλισμα ζύμης και εκχύλισμα βύνης).

2. Μέθοδος με τρυβλία

Η μέθοδος με τρυβλία στηρίζεται στην χρήση τρυβλίων με επιλεγμένες ή διαφορετικές καλλιέργειες και ακολουθείται από κάποια συμπληρωματική και φυσιολογική ανάλυση. Για παράδειγμα μπορεί να συμπεριλαμβάνεται η μελέτη της μορφολογίας με μικροσκόπιο. Ωστόσο, παρόλο που μπορεί να δίδεται η δυνατότητα για ανάλυση της διαφορετικής μορφολογίας των αποικιών, είναι δύσκολη η περαιτέρω διάκριση και ταυτοποίησή τους όσον αφορά τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους. Έτσι, εφαρμόζεται μόνο έχοντας ως σκοπό την ποσοτικοποίηση των βιώσιμων κυττάρων, όμως δεν είναι σε θέση να ανιχνεύσει τα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα (VBNC – Viable But Non-Cultivable) που δεν θα αναπτυχθούν, παρόλη την επιβίωση και παρουσία τους στο μέσο ανάπτυξης (Tubia et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε από μελέτες ότι οι Βρεττανομύκητες παρόλο που μπορεί να είναι βιώσιμοι και ενεργοί, μπορεί να μην αναπτυχθούν (VBNC – Viable But Non-Cultivable). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν στρες, όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του οξυγόνου και η ωσμωτική πίεση. Έτσι, αυτά τα κύτταρα μπορεί να οδηγήσουν στην λανθασμένη εκτίμηση του πληθυσμού κατά την αρίθμηση σε τρυβλία. Παρά το γεγονός αυτό, διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα των πτητικών φαινολών αντιστοιχεί στο ήμισυ συγκριτικά με τα βιώσιμα κύτταρα (Tubia et al., 2018). Ακόμα ο *B.bruxellensis* είναι σε θέση να εισέλθει σε κατάσταση VBND (βιώσιμη αλλά όχι καλλιεργήσιμη ακόμα και μετά την προσθήκη θειωδών (du Toit et al., 2005; Agnolucci et al., 2010; Serpaggi et al., 2012; Capozzi et al., 2016; Longin et al., 2016), ακολουθούμενη από ανάκαμψη της ανάπτυξης όταν τα θειώδη μειώνονται με την πάροδο του χρόνου.

Για την ανίχνευση του *Brettanomyces* γίνεται χρήση ορισμένων υποστρωμάτων με τα πιο συνηθισμένα να είναι τα σάκχαρα (φρουκτόζη, γλυκόζη και σακχαρόζη), οι αφομιώσιμες πηγές αζώτου (πεπτόνη και τρυπτόνη), και τα σύνθετα συμπληρώματα (εκχύλισμα βύνης και εκχύλισμα ζύμης). Έχει πραγματοποιηθεί επίσης εφαρμογή διάφορων αντιβιοτικών έχοντας ως στόχο την αποφυγή ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών όπως το κυκλοεξαμίδιο και η γλωραμφενικόλη (Tubia et al, 2018). Πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι ο Βρεττανομύκητας σε γενικές γραμμές είναι πολύ ανθεκτικός στο κυκλοεξιμίδιο, του οποίου η δράση του στηρίζεται σε ένα κοινό αντιμυκητιακό παράγοντα ο οποίος αναστέλλει την βιοσύνθεση πρωτεΐνης σε πολλούς ευκαριωτικούς οργανισμούς (Morneau et al., 2011; Steensels et al., 2015).

Επιπρόσθετα, η αιθανόλη χρησιμοποιείται τόσο για τις βακτηριοκτόνες ιδιότητές της όσο και σαν πηγή άνθρακα για τους *Brettanomyces*. Ακόμα, η παρουσία του π-κουμαρικού οξέος αποτελεί πρόδρομο για την δημιουργία των 4-αιθυλοφαινολών από τον Βρεττανομύκητα ενώ θετικό είναι ότι η ανίχνευση του είναι εύκολη λόγω της χαρακτηριστικής μυρωδιάς που παράγεται. Τέλος η

προσθήκη του πράσινου της Βρωμοκρεσόλης ως δείκτη pH συμβάλλει στην ανίχνευση της παραγωγής οξέων (Tubia et al., 2018).

Πίνακας 1.1 Παραδείγματα θρεπτικών υποστρωμάτων (Tubia et al., 2018).

Μέσα καλλιέργειας	BSM	DBDM	DHSA	WLD
Επιλογή διαφορετικών παραγόντων	Κυκλοεξιμίδιο	Κυκλοεξιμίδιο	Κυκλοεξιμίδιο	WLD
	Χλωραμφενικόλη	Π-κουμαρικό οξύ	Πενικιλίνη	Κυκλοεξιμίδιο
	Χλωροτετρακυκλίνη	Πράσινο Βρωμοκρεσόλης	Σορβικό οξύ	
	Γενταμικίνη	Αιθανόλη	Πράσινο Βρωμοκρεσόλης	
		Χωρίς υδατάνθρακες	Αιθανόλη Τρεχαλόζη, Σακχαρόζη	

Πίνακας 1.2 Διάφορα παραδείγματα θρεπτικών υποστρωμάτων (Tubia et al., 2018).

Μέσα καλλιέργειας	BSM	DBDM	DHSA	WLD
Επιλογή διαφορετικών παραγόντων	Κυκλοεξιμίδιο	Κυκλοεξιμίδιο	Κυκλοεξιμίδιο	Κυκλοεξιμίδιο
	Χλωραμφενικόλη	Π-κουμαρικό οξύ	Πενικιλίνη	
	Χλωροτετρακυκλίνη	Πράσινο Βρωμοκρεσόλης	Σορβικό οξύ	
	Γενταμικίνη	Αιθανόλη	Πράσινο Βρωμοκρεσόλης	
		Χωρίς υδατάνθρακες	Αιθανόλη	

			Τρεχαλόζη, Σακχαρόζη	
--	--	--	-------------------------	--

Πίνακας 2. Συνθετικό υπόστρωμα ανάπτυξης και διαφοροποίησης Βρετανομύκητα (Kurtzman et al., 2011).

Συνθετικό υπόστρωμα	
Yeast Nitrogen Base	6,7 g/L
Agar	20 g/L
Κυκλοξιμίδιο	0,01 g/L
Π-κουμαρικό οξύ (ή φερουλικό οξύ)	0,1 g/L
Αιθανόλη	48 g/L ή 6%vol
Χλωραμφενικόλη	0,1 g/L
Πράσινο της Βρωμοκρεσόλης	0,022 g/L
pH	5,4

Επιπρόσθετα, υπάρχουν στην αγορά έτοιμα μέσα καλλιέργειας όπως το "KITBRETT" της εταιρείας Vivelys ([vivelys.com](http://www.vivelys.com)). Η χρήση του συμβάλει στην έγκαιρη και γρήγορη παρακολούθηση του Βρετανομύκητα μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Αυτή είναι εφικτή λόγω της χαρακτηριστικής οσμής ζωικών που παράγεται από το μύκητα.

Όσον αφορά τα μέσα καλλιέργειας που προαναφέρθηκαν εμφανίζουν θετικές και αρνητικές παρατηρήσεις κατά την διάρκεια της χρήσης τους. Πιο συγκεκριμένα, το BSM παρόλο που παρέχει αποτελέσματα γρήγορα, σε διάστημα 4-6 ημερών, δεν έχει την ικανότητα της διαφοροποίησης μεταξύ των οργανισμών καθώς ενδέχεται να εμφανίσει εσφαλμένα αποτελέσματα λόγω της αντίστασης των άλλων ζυμών στο κυκλοεξαμίδιο καθώς και της ανάπτυξης μούχλας. Το προνόμιο των DBDM, DHSΑ και WLD είναι ότι είναι εκλεκτικά ως προς τους

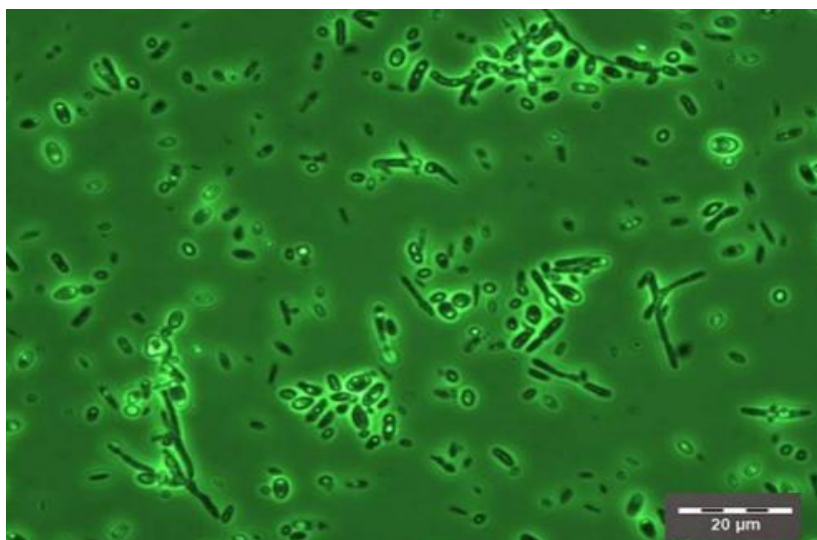
δεν παρέχουν γρήγορα αποτελέσματα για την χρήση τους σε οινοποιείο ή ζυθοποιείο, καθώς χρειάζονται τουλάχιστον 15 ημέρες για την ανάπτυξή τους (τουλάχιστον 10 ημέρες για το WLD). Ακόμα, η παρασκευή του DHSΑ είναι περίπλοκη (Tubia et al., 2018).



Εικόνα 1 Τρυβλίο με DBDM μέσο καλλιέργειας με αποικίες *Brettanomyces bruxellensis* (Tubia et al., 2018).

3. Μικροσκοπία

Ο *Brettanomyces* δεν είναι εύκολο να εντοπιστεί με την χρήση των κλασσικών τεχνικών της μικροβιολογίας. Γι αυτό το λόγο, η άμεση οπτικοποίηση των μικροοργανισμών αποτελεί μια συνήθη μέθοδο. Διαφορετικά στελέχη του παρουσιάζουν ποικίλες μορφολογίες και μεγέθη κυττάρων. Επιπλέον, παρουσιάζει διαφορετική μορφολογία σε συνάρτηση με την ηλικία, το μέσο όπου καλλιεργείται αλλά και το περιβαλλοντικό στρες. Τα σχήματα που έχουν αναφερθεί μπορεί να είναι σχήμα βάρκας, άλλα εμφανίζονται ως επιμήκη, ελλειψοειδή, σφαιρικά όπως επίσης έχουν αναφερθεί και κυλινδρικά (Tubia et al., 2018).



Εικόνα 2.Μικροσκοπική εικόνα επιθροισμού από κύτταρα *B.bruxellensis* (x400)
(Tubia et al., 2018)

Καινοτόμες τεχνικές μικροσκοπίας οι οποίες βασίζονται σε *in situ* υβριδισμό με χρήση πεπτιδικών νουκλεϊκών οξέων ανιχνευτών χρησιμοποιούνται για να παρέχουν μια ταχύτερη αλλά και ακριβέστερη ταυτοποίηση των *Brettanomyces* με την βοήθεια της μικροσκοπίας φθορισμού.

4. Τεχνικές μοριακής βιολογίας και γονιδωματικές τεχνικές

Οι τεχνικές μοριακής βιολογίας στην ενίσχυση συγκεκριμένων θραυσμάτων ριβοσωμικού DNA και RNA με την αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) για την αναγνώριση μικροοργανισμών. Οι μοριακές τεχνικές είναι εξίσου γρήγορες, ευαίσθητες και ειδικές για την ανίχνευση των μικροοργανισμών (Oelofse et al., 2009).

Η διάκριση των μη βιώσιμων κυττάρων από τα βιώσιμα , με σκοπό τη βελτίωση του περιορισμού της μεθόδου PCR, προτάθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση PCR (PT-PCR). Η παραπάνω τεχνική με στηρίζεται στην χρήση ενός συγκεκριμένου ενζύμου που είναι ικανό να συνθέσει DNA από RNA στην κατεύθυνση 5-3-3. Ακόμα, αποτελεί μια ευαίσθητη τεχνική χωρίς να αυξάνεται ο απαιτούμενος χρόνος συγκριτικά με την παραδοσιακή PCR. Κατά αυτόν τον τρόπο, η PT-PCR είναι μια μέθοδος μοριακής ανίχνευσης όπου χρησιμοποιείται συνήθως (Phister and Mills, 2003, Shimotsu et al., 2015).

Μια ακόμη μέθοδος μοριακής ανίχνευσης η οποία χρησιμοποιείται για τον *Brettanomyces* είναι η τεχνική ένθετης ενίσχυσης (Nested-PCR). Χρησιμοποιεί τέσσερις εκκινητές, δύο εσωτερικούς και δύο εξωτερικούς, παρέχοντας έτσι μια μοναδική μέθοδο για την ανίχνευσή του σε ποτά χωρίς να είναι απαραίτητη η απομόνωση στελέχους (Tubia et al,2018).

Πρόσφατα επίσης, εφαρμόστηκε μια ποσοτική PCR με απευθείας δειγματοληψία (Cells-qPCR) με σκοπό την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των συνολικών ζυμών (π.χ. *B. 80 bruxellensis*, *S. cerevisiae* και *Zygosaccharomyces bailii*) τόσο σε γλεύκος σταφυλιών όσο και σε κρασί. Έτσι πρότειναν διακοπή του κυτταρικού τοιχώματος με μηχανικές αλλά και ενζυματικές μεθόδους, επιτυγχάνοντας με αυτό το σκοπό καλή απόδοση. Τα κύτταρα-qPCR με μηχανικά λύματα εξασφαλίζουν μθα άμεση, γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική για τον προσδιορισμό, και ποσοτικό, της μαγιάς *Brettanomyces bruxellensis*, με συγκέντρωση ενός κυττάρου ανά αντίδραση (Tubia et al,2018).

Επιπρόσθετα, διάφορες γενετικές τεχνικές έχουν εφαρμοστεί με σκοπό τόσο την ανάλυση όσο και την κατανόηση της γενετικής πολυπλοκότητας , ποικιλομορφίας, του *B.bruxellensis*. Μερικές από τις βασικές μεθόδους είναι:

1. Ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE)

Η PFGE έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της γενετικής πολυπλοκότητας των απομονωμένων στελεχών του *B.bruxellensis*, διαχωρίζοντας μεγάλα θραύσματα DNA από ένζυμα περιορισμού (Schifferdecker et al., 2014). Αυτή η μέθοδος επέτρεψε τη διαφοροποίηση των απομονωμένων στελεχών και παρείχε πληροφορίες σχετικά με την γενετική τους συγγένεια.

2. Ενισχυμένος πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (AFLP):

Η AFLP αποτελεί άλλη μία μέθοδο που έχει εφαρμοστεί με σκοπό την αξιολόγηση της γενετικής ποικιλομορφίας του *B.bruxellensis* (Borneman et al., 2010). Αναλύοντας τις διαφορές στα μήκη των ενισχυμένων DNA θραυσμάτων, οι ερευνητές είναι σε θέση να συμπεράνουν γενετικές σχέσεις μεταξύ των απομονωμένων στελεχών.

3. Πολυτοπική ανάλυση αλληλουχίας (MLST)

Η MLST είναι μία τεχνική βασισμένη στην αλληλουχία που συγκρίνει τις αλληλουχίες πολλαπλών διαχειριστικών γονιδίων για τον προσδιορισμό της γενετικής συγγένειας των απομονωμένων στελεχών του *B.bruxellensis* (Crauwels et al., 2015). Αυτή η μέθοδος μπορεί να παρέχει υψηλότερη ανάλυση γενετικής ποικιλότητας από την PFGE και την AFPL.

4. Πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματος (WGS)

Η WGS έχει φέρει τη επανάσταση πάνω στην μελέτη του *B.bruxellensis* παρέχοντας ολοκληρωμένες γνώσεις σχετικά με την γενετική του σύνθεση (Curtin & Pretorius, 2014). Επίσης αυτή η μέθοδος επέτρεψε στους ερευνητές να εντοπίσουν γονίδια και μονοπάτια τα οποία σχετίζονται με τα μοναδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του, καθώς και να αναλύσουν την γονιδιωματική πλαστικότητα και την προσαρμογή του σε διαφορετικά περιβάλλοντα.

5. Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)

Αποτελεί μια ισχυρή τεχνική η οποία επιτρέπει από την μια πλευρά την ανίχνευση και από την άλλη την απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών στην διαδικασία παρασκευής ποτών και τροφίμων. Αποτελεί μια αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιεί μόνο φυσιολογικές χρωστικές, καθώς καλείται χρήσιμη για την παρακολούθηση μίας διαδικασίας, παρόλα αυτά η απουσία ειδικότητας υποσκάπτει την χρησιμότητά της σε βιομηχανίες ποτών. Το μικροσκοπικό ρεύμα υγρού παίρνει τις διάφορες ζύμες αλλοίωσης να περνούν το φως λέιζερ ανά ένα κύτταρο κάθε φορά. Το φως όπου διασκορπίζεται από τις ζύμες ανιχνεύεται κατά την διέλευση τους από τη δέσμη λέιζερ. Η κυτταρομετρία ροής με την βοήθεια διαφορετικών ανιχνευτών, μπορεί να εντοπίσει τον φθορισμό που προέρχεται από τους ζυμομύκητες με θετική χρώση.

Σε πρόσφατο μελέτες για την ανίχνευση του *Brettanomyces bruxellensis* εφαρμόστηκε μία νέα τεχνική, αυτή της ανοσοκυτταρομετρίας («Bretta-Test», Amarak Biotechnologies). Η

συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων αντι-*Brettanomyces* συζευγμένων με φθοροχρώμιο έχοντας ως σκοπό τη διάκριση και τη ποσοτικοποίηση αυτής της ζύμης αλλοίωσης. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να την αναγνωρίσει σε ένα συνθετικό μέσο μεταξύ άλλων ειδών ζύμης με αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα. Έτσι, η παραπάνω τεχνική έχει την ιδιότητα να διαφοροποιήσει το *Brettanomyces* από τα άλλα είδη αλλά και να αξιολογήσει την βιωσιμότητά του. Οι (Longin et al., 2016) στην ερευνά τους με την χρήση τόσο της κυτταρομετρίας ροής όσο και με την μέτρηση του πληθυσμού με πλάκες απέδειξαν μια σχέση μεταξύ του επιπέδου του πληθυσμού του *Brettanomyces* και της αντοχής του σε SO₂. Όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση του μύκητα τόσο χαμηλότερη ήταν η αποτελεσματικότητα του σε SO₂. Ακόμα, πρέπει να τονιστεί πώς οι πληθυσμοί και για τα δύο στελέχη ήταν ικανοί να αναπτυχθούν στο κρασί χωρίς την προσθήκη θειώδους και να φτάσουν τα 10⁶ cfu/ml ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση πληθυσμού.

Πρόσφατα, ακόμα εφαρμόστηκαν οι τεχνικές μοριακής ανίχνευσης σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές. Ένα παράδειγμα αυτού αποτελεί μία μέθοδος που συνδυάζει τεχνικές κυτταρομετρίας ροής (FCM) και in situ υβριδισμού φθορισμού (FISH), ως μια πραγματική εναλλακτική λύση με το RT-PCR (Serpaggi et al. 2012).

6. Ταυτοποίηση αποικιών μέσω FTIR

Μία καινοτόμος προσέγγιση στην ταυτοποίηση αποικιών αποτελεί και η φασματοσκοπία υπερύθρου κατά μετασχηματισμό Fourier. Πιο συγκεκριμένα, έχει γίνει χρήση της στην ταξινόμηση και την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών σε επίπεδο ειδών και στελεχών (Wenning et al., 2013; Wang et al., 2012)

Η φασματοσκοπία FTIR έχει χρησιμοποιηθεί για την διαφοροποίηση, την ταξινόμηση και την ταυτοποίηση των *Lactobacilli* (Oust et al., 2004a; Oust et al., 2004b), των στελεχών *Listeria* (Lin et al., 2004), θειικά και θειοθειικά αναγωγικά βακτηρία (Rubio et al., 2006), *Candida* (Taneja et al., 2013; Essendoubi et al., 2005; Tintelnot et al., 2000; Timmins et al., 1998a), *Saccharomyces cerevisiae* (Wenning et al., 2002; Timmins et al., 1998b) και *Streptomyces* είδη (Zhao et al., 2006). Τα φάσματα FTIR των βακτηρίων κυριαρχούνται κυρίως από τους δεσμούς του αμιδίου-I και του αμιδίου-II των διαφόρων πρωτεϊνών και των ολίγο και πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων. (Naumann et al., 1995).

Σε πρόσφατη έρευνα, οι Dimoroulou et al., (2021) πέτυχαν την διάκριση μεταξύ των φασμάτων πλαγκτονικών κυττάρων έναντι συνδεδεμένων κυττάρων από 11 διαφορετικά στελέχη

Βρεττανομύκητα. Αποκαλύφθηκε επίσης το μεταβολικό δαχτυλικό αποτύπωμα που εμπλέκεται στο σχηματισμό του βιοφίλμ.

2.2.2 Μέθοδοι έμμεσης ανάλυσης

Οι έμμεσες τεχνικές επικεντρώνονται κυρίως στην ανάλυση των μεταβολισμένων μορίων και στα χημικά χαρακτηριστικά που υπάρχουν τόσο στον οίνο όσο και στον μηλίτη. Αυτές οι τεχνικές συνδυάζονται συνήθως με αυτές των άμεσων μεθόδων με σκοπό την πλήρη ανάλυση του δείγματος για ένα πιο αξιόπιστο αποτέλεσμα.

1. Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών του Βρεττανομύκητα γίνεται με την χρήση αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την φασματογραφία μάζας (GC-MS). Η παραπάνω τεχνική αποτελεί μια ακριβή μέθοδο και βασίζεται στην ποσοτικοποίηση των φαινολών 4-αιθυλοφαινόλης και 4-αιθυλογουαιακόλης, που αποτελούν τα δύο πιο σχετικά μεταβολικά προϊόντα του Βρεττανομύκητα. Παρά το γεγονός ότι αποτελεί μία ακριβή μέθοδο ανίχνευσης των ποσοτήτων του επιπέδου της φαινόλης στα δείγματα, το αρνητικό της μεθόδου είναι ή μη γνωστή συγκέντρωση των κύτταρων που παράγουν τα προϊόντα αυτά (Tubia et al., 2018). Παραδοσιακά, έχουν χρησιμοποιηθεί μέθοδοι εκχύλισης υγρού-υγρού της τεχνικής GC-MS. Ωστόσο στις μέρες μας για την ανίχνευση του *Brettanomyces*, έχουν αναπτυχθεί πιο επιλεκτικές αι απλές μέθοδοι εκχύλισης: εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE, στερεάς φάσης μικροεκχύλιση (SPME) ή αναρροφητική ράβδος ανάδευσης (SBSA) (Tubia et al,2018).

Από την άλλη μεριά, ένα από τα κυριότερα μειονεκτήματα είναι ότι έχει υψηλό όριο ανίχνευσης της προηγούμενης παρουσίας του Βρεττανομύκητα και δεν μπορεί να ποσοτικοποιήσει τον πληθυσμό του. Δεν αποτελεί μια μέθοδο πρόληψης, καθώς τα αποτελέσματα λαμβάνονται εφόσον στο προϊόν εντοπίζεται η δράση του μύκητα καθώς και λόγω των υψηλών ορίων των φαινολών που είναι 28 μg/L για 4-αιθυλοφαινόλης και 44 μg/L για αιθυλογουαιακόλη (Tubia et al., 2018). Τέλος, η τεχνική αυτή είναι ακριβή και απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό για την χρήση του με αποτέλεσμα να αυξάνεται το κόστος του κεφαλαίου.

2. Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο τόσο για τον ποσοτικό έλεγχο όσο και για την έγκαιρη ανίχνευση των παθογόνων σε διάφορους τομείς όπως η κλινική

διάγνωση, η βιοεπεξεργασία, η ανάλυση τροφίμων αλλά και η παρακολούθηση του περιβάλλοντος. Η ικανότητα των βιοαισθητήρων στηρίζεται στην ενσωμάτωση in-situ κάτω από διαφορετικά περιβάλλοντα με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία και αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο στην ανάλυση τροφίμων τόσο για τον ποιοτικό έλεγχο, όσο και για την έγκαιρη ανίχνευση παθογόνων. Σήμερα, μόνο οι ανιχνευτές σύνθετης αντίστασης και οι ανιχνευτές αμπερομετρικής βάσης έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό την ανίχνευση ζύμης σε βιομηχανικές ρυθμίσεις. Διάφορα παραδείγματα που έχουν συμβάλει στην ανίχνευση του *B. bruxellensis* είναι η χρήση του αμπερομετρικού ανοσοαισθητήρα (immunosensor). Το όριο ανίχνευσης του ήταν 8 CFU/ml για τα ρυθμιστικά διαλύματα και 56 CFU/ml για δείγματα κρασιού (Tubia et al., 2018). Ακόμα για την ανίχνευσή του συγκεκριμένου μύκητα στο κρασί έχει συμβάλει η δημιουργία ενός οπτικού νανοαισθητήρα SPR (Surface Plasmon Resonance). Η παραπάνω μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει 0,1 ng/μL Brett-DNA λόγω της υψηλής της ευαισθησίας. Ακόμη μια τεχνική ανίχνευσης του *B. bruxellensis* είναι ο αισθητήρας οπτικών ινών Chemiluminescent DNA, η οποία αναφέρεται ως επαναλαμβανόμενη και γρήγορη συγκριτικά με παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης (Tubia et al., 2018).

Επιπρόσθετα, κατά την τελευταία δεκαετία, η ανάπτυξη και η εφαρμογή ηλεκτρονικών συσκευών μύτης και γλώσσας αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα συστοιχιών αισθητήρων και συστημάτων αναγνώρισης προτύπων τα οποία μετρούν και συγκρίνουν γεύσεις, όψεις αλλά και οσμές. Έτσι, τα τελευταία χρόνια οι συσκευές αυτές χρησιμεύουν στον έλεγχο της ποιότητας αλλά και της γήρανσης του κρασιού. Πιο συγκεκριμένα έχουν την ικανότητα να προβλέψουν τη συγκέντρωση διαφόρων επιθυμητών ενώσεων/συνθηκών στο κρασί, όπως για παράδειγμα οι φαινόλες, σάκχαρα και pH.

Οι ηλεκτρονικές γλώσσες θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα αναλυτικό όργανο το οποίο αναπαράγει τεχνητά το ανθρώπινο γευστικό σύστημα, με την αναπαραγωγή της αίσθηση των πέντε γεύσεων (γλυκό, αλμυρό, ξινό, πικρό και umami). Παρομοίως, οι ηλεκτρονικές μύτες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίσουν τόσο απλές όσο και πολύπλοκες οσμές, που χαρακτηρίζουν διαφορετικά μείγματα αερίων. Τέτοιου συσκευές μπορούν να συμβάλλουν σε μια ποιοτική και ποσοτική μέτρηση διαφορετικών ειδών του δείγματος. Στους ευρύτερα χρησιμοποιούμενες συστοιχίες αισθητήρων (ηλεκτρονικοί αισθητήρες) περιλαμβάνονται οι ηλεκτροχημικοί (π.χ. ποτενσιομετρικοί, ιμιδιμετρικοί, αμπερομετρικοί), οι οπτικοί και οι ενζυματικοί αισθητήρες (Tubia et al., 2018).

3. Μικρορευστικές συσκευές

Παρόλο που αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο με σκοπό την ανίχνευση των

ζυμομυκήτων σε υγρά δείγματα, δεν έχει χρησιμοποιηθεί για τον *Brettanomyces bruxellensis*. Ο συγκεκριμένος τύπος πλατφορμών έχει εφαρμοστεί επί το πλείστον σε βακτήρια (π.χ. *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*).

Ωστόσο, οι μικρορευστικές συσκευές απαιτούν και άλλα εργαλεία ανίχνευσης τόσο για τον εντοπισμό όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό του αριθμού των μικροοργανισμών στο δείγμα. Μερικές έρευνες αναφέρουν την χρήση τεχνικών φασματοσκοπίας σύνθετης αντίστασης σε μικρές υγρές συσκευές, ανιχνεύοντας την ύπαρξη διαφορετικών μικροοργανισμών. Τα εργαλεία αυτά γίνονται όλο και πιο δημοφιλή λόγω του μικρού αντιδραστηρίου και των απαιτήσεων δειγμάτων καθώς και της ευελιξίας. Ήδη, το είδος αυτό των αποτελεσματικών συσκευών έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τομείς (π.χ. ιατρική, ακαδημαϊκή και βιομηχανική) έχοντας ως στόχο την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό βακτηρίων (Tubia et al,2018)

Εναλλακτικές τεχνικές

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει προσπάθεια εύρεσης μεθόδων που να μπορούν να δώσουν ακριβή αποτελέσματα σε μειωμένο χρόνο. Μεταξύ των πλέον υποσχόμενων μεθόδων είναι η φασματοσκοπία υπέρυθρου, εξαιτίας της μη επεμβατικής φύσης της και της ταχύτητας της.

2.3 Φασματοσκοπία

2.3.1 Εισαγωγή στην φασματοσκοπία

Η φασματοσκοπία αποτελεί τον τομέα της επιστήμης που ασχολείται με την αλληλεπίδραση διάφορων τύπων ακτινοβολίας με την ύλη. Το αρχικό ενδιαφέρον επικεντρωνόταν μόνο στην επίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη. Πλέον στις μέρες μας, η έννοια της φασματοσκοπίας στρέφεται και περιλαμβάνει και φαινόμενα αλληλεπίδρασης της ύλης και με άλλες μορφές ενέργειας. Πιο συγκεκριμένα η φασματοσκοπία είναι η μελέτη του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μιας πηγής ακτινοβολίας σε ένα εύρος συχνοτήτων (Frenzel et al., 2008)

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές όπου χρησιμοποιείται είτε ορατή είτε υπεριώδη αλλά και η υπέρυθη ακτινοβολία ονομάζονται οπτικές τεχνικές. Και για τις τρεις περιοχές γίνεται τόσο η χρήση όμοιων οργάνων όσο και η ερμηνεία των αλληλεπιδράσεων με την ύλη με κοινό τρόπο.

2.3.2 Απορρόφηση της ακτινοβολίας

Κατά την διέλευση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μέσα από ένα στρώμα, στερεό, υγρό ή αέριο, είναι δυνατή η απομάκρυνση μερικών συχνοτήτων με απορρόφηση ως αποτέλεσμα μεταφοράς της ηλεκτρομαγνητικής αυτής ενέργειας στα άτομα, τα μόρια, τα ιόντα, από τα οποία συνθέτεται το δείγμα. Η απορρόφηση προάγει την κανονική ή βασική κατάσταση των σωματιδίων σε μία ή περισσότερες διεγερμένες καταστάσεις με υψηλότερη ενέργεια.

Στην κβαντική θεωρία αναφέρεται ότι τα άτομα, τα μόρια ή τα ιόντα αποτελούνται από περιορισμένο αριθμό διακριτών ενεργειακών επιπέδων, έτσι προκειμένου να επέλθει η απορρόφηση της ακτινοβολίας πρέπει το φωτόνιο που θα προκαλέσει την διέγερση, να έχει την ίδια ακριβώς ενέργεια με την διαφορά ενεργειών της βασικής και της διεγερμένης κατάστασης του σωματιδίου. Οι παραπάνω διαφορές ενεργειών για κάθε σωματίδιο είναι μοναδικές, η μελέτη των συχνοτήτων της απορροφούμενης ακτινοβολίας αποτελεί μέσο για τον χαρακτηρισμό των συστατικών ενός δείγματος μίας ουσίας. Τα χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης έρχονται σε συνάρτηση με το μήκος του κύματος ή τη συχνότητα για την ουσία. Έτσι, η φασματοφωτομετρία αποτελεί το κλειδί για την ανακάλυψη των ατομικών ιδιοτήτων σε όλη την ύλη. Με την ιδέα πως κάθε ατομικό στοιχείο παρουσιάζει μοναδική φασματική ταυτότητα, η χρήση της φασματοσκοπίας έχει επιτραπεί σε διαφορετικούς τομείς με διαφορετικές αναλύσεις (McLaughlin, 2022).

2.3.3 Φασματοσκοπία IR

Η υπέρυθη φασματοσκοπία αποτελεί πλέον μια από τις πιο σημαντικές και φασματοσκοπικές τεχνικές. Οι λόγοι που έχουν συμβάλει στο να εφαρμόζεται ολοένα και περισσότερο είναι η ευκολία που εμφανίζει στην λήψη φασμάτων καθώς και η σύγκριση τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από το τέλος του ορατού φάσματος έως την περιοχή των μικροκυμάτων, δηλαδή μεταξύ 0,7 μm έως 300 μm . Σύμφωνα με τον (Theophanides, 2012) η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος διακρίνεται σε τρεις κύριες περιοχές:

- i. Το εγγύς υπέρυθρο (NIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 0,78 μm έως 2,5 μm (ή κυματαριθμούς 14.000-4.000 cm^{-1})
- ii. Το μέσο υπέρυθρο (MIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 2,5 μm έως 25 μm (ή κυματαριθμούς 4.000-400 cm^{-1})
- iii. Το άπω υπέρυθρο (FIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 25 μm έως 300 μm (ή κυματαριθμούς 400-10 cm^{-1})

Στην πρώτη περιοχή (NIR) επιτρέπεται η μελέτη τόσο των υπερτονικών (overtone) όσο

και των αρμονικών δονήσεων συνδυασμού (harmonic or combination vibrations). Όσον αφορά την δεύτερη περιοχή του μέσου υπέρυθρου φάσματος (MIR) εμφανίζονται οι βασικές μεταβολές στην δόνηση των μορίων εξαιτίας της απορρόφησης της ακτινοβολίας. Τέλος, η άπω υπέρυθρη περιοχή (FIR) σχετίζεται με τις μοριακές περιστροφές και τις δονήσεις βαρέων ατόμων και κρυσταλλικού πλέγματος.

Η μέθοδος της υπέρυθρης φασματοσκοπίας στηρίζεται στην απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε πιο υψηλές στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με το ηλεκτρικό δίπολο ενός μορίου, αποτελεί την προέλευση των απορροφήσεων στο φάσμα IR. Για να καλείται μια δονητική μετάπτωση ως ενεργή στην απορρόφηση ή στην εκπομπή υπέρυθρης ακτινοβολίας, θα πρέπει να πληρούνται οι δύο εξής κανονισμοί:

1. Μόνο δονήσεις για τις οποίες ισχύει $dm/dx \neq 0$ είναι ενεργές στο IR φάσμα, όπου ο λόγος dm/dx εκφράζει τη μεταβολή της διπολικής ροπής του μορίου ως προς τη μεταβολή της απόστασης του διπόλου.
2. Για ένα μόριο που προσεγγίζει το μοντέλο του απλού αρμονικού ταλαντωτή (simple harmonic oscillator) επιτρεπτές είναι μόνο οι μεταπτώσεις εκείνες που συμβαίνουν μεταξύ γειτονικών δονητικών ενεργειακών καταστάσεων και για τις οποίες ισχύει $\Delta v = \pm 1$, όπου v είναι ακέραιος θετικός αριθμός ($v = 0, 1, 2, 3 \dots$) και καλείται δονητικός κβαντικός αριθμός (vibrational quantum number). (Κούη και άλλοι 2015.)

2.3.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου- Μετασχηματισμού (FT-IR)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρων μετασχηματισμού Fourier έχει χρησιμοποιηθεί ήδη στο παρελθόν από τις δεκαετίες του 1950 και του 1960 για την διάκριση και την αναγνώριση των βακτηρίων. Η μέθοδος όμως δεν αποδείχθηκε βιώσιμη λόγω της περιορισμένης διαθέσιμης τεχνολογίας την εποχή εκείνη (Naumann et al., 1991b). Με την εξέλιξη και την πρόοδο των υπέρυθρων οργάνων, ισχυρότερων υπολογιστών καθώς και την χρήση προηγμένων αλγόριθμων, για ανάλυση δεδομένων πολλαπλών μεταβλητών και για αναγνώριση πρότυπων, το FTIR αποτελεί ένα εργαλείο ευρέως αποδεκτό για την χρησιμότητά του (Mariey et al., 2001).

Η ανάλυση κατά Fourier ή μετασχηματισμός Fourier είναι μια διαδικασία με την οποία αναλύεται μια πειραματικά λαμβανόμενη καμπύλη σε ένα άθροισμα τριγωνομετρικών σειρών ημιτόνων και συνημιτόνων, οι οποίες καλούνται σειρές Fourier. Η μέθοδος βασίζεται στην καταγραφή του φάσματος με συμβολομετρικές μετρήσεις από ένα όργανο που ονομάζεται ιντερφερόμετρο. Πρόκειται για μια διάταξη που αποτελείται από μια πλάκα κατασκευασμένη από υλικό το οποίο δεν απορροφά την υπέρυθρη ακτινοβολία, όπως το KBr. Η πλάκα αυτή είναι έτσι κατασκευασμένη, ώστε να λειτουργεί σαν διαχωριστής δέσμης, ανακλώντας το 50% της

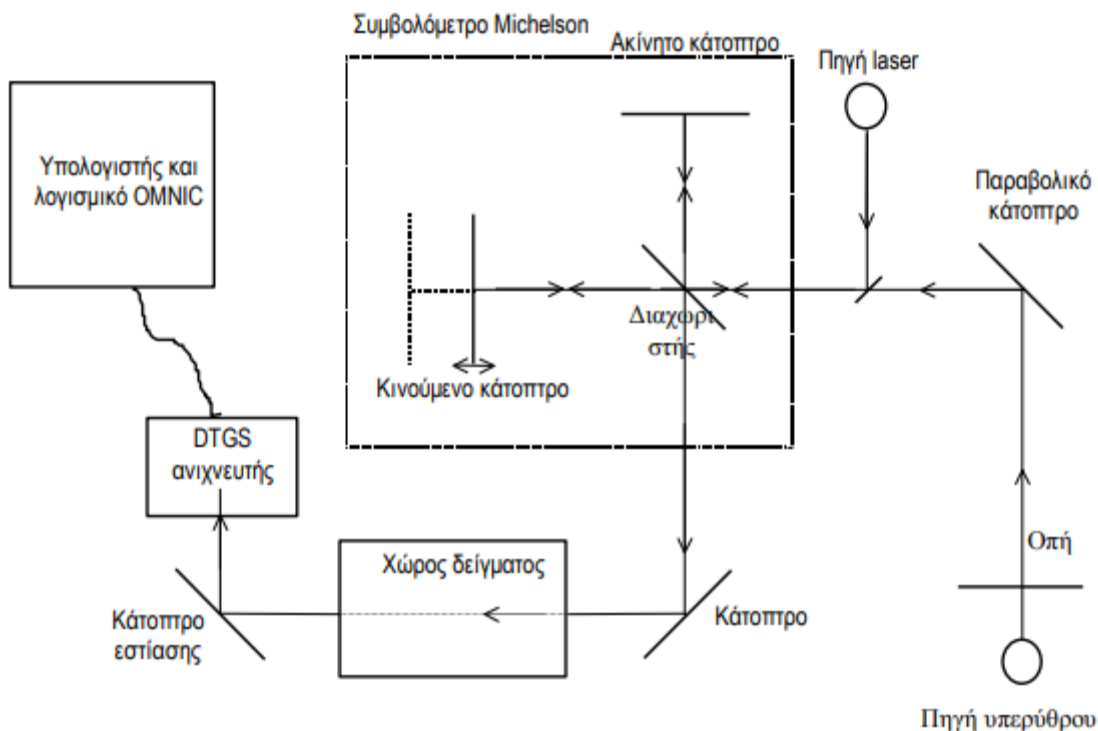
ακτινοβολίας που προσπίπτει πάνω της. Οι δύο δέσμες που προκύπτουν, κατευθύνονται προς δύο κάτοπτρα, κάθετα μεταξύ τους, εκ των οποίων το ένα είναι κινητό. Τα κάτοπτρα επιστρέφουν τις δέσμες πίσω στην πλάκα-διαχωριστή όπου αυτές συνενώνονται σε μία δέσμη φωτός, με κατεύθυνση το δείγμα και τέλος τον ανιχνευτή. Ανάλογα με τις αποστάσεις των κατόπτρων κάθε φορά, κατά την ένωση 27 των δύο δεσμών παρατηρείται θετική ή αρνητική συμβολή και ο ανιχνευτής δέχεται ακτινοβολία εναλλασσόμενης έντασης. Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής, που προσφέρει την δυνατότητα γρήγορης λήψης πολλαπλών φασμάτων, επεξεργάζεται και αποθηκεύει τα δεδομένα από τις εντάσεις απορροφήσεων σε διάφορες συχνότητες, και εκτελεί τους μετασχηματισμούς Fourier, από τους οποίους προκύπτει το τελικό φάσμα IR. Πρόκειται για μία ταχύτατη μέθοδο με ικανότητα διαχωρισμού των φασματικών γραμμών, στην περιοχή 4.000 έως 400 cm^{-1} , ίση περίπου με 4 cm^{-1} . Τα φάσματα FTIR είναι φάσματα υψηλής ποιότητας. (Βαλαβανίδης 2006).

Τα τελευταία χρόνια, όσον αφορά την ανάλυση του οίνου, η φασματοσκοπία υπέρυθρου αποτελεί μία ευρέως ολοένα χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Είναι μια ακριβής, γρήγορη αλλά και οικονομική μέθοδο, η οποία θα μπορούσε να εφαρμοστεί για αναλύσεις ροής, εξοικονομώντας κατά αυτόν τον τρόπο χρόνο και χρήμα.

2.3.4 Το όργανο και η βαθμονόμησή του

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο IR μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) αποτελείται από πέντε βασικά τμήματα:

1. Την πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας
2. Την πηγή λέιζερ
3. Το συμβολόμετρο Michelson
4. Τον ανιχνευτή
5. Τον υπολογιστή



Σχήμα 1. Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-IR6700 της εταιρίας Thermo-Nicolet.

2.3.5 Πλεονεκτήματα φασματοσκοπίας υπερώθρου μετασχηματισμού Fourier

Συγκριτικά με τις συμβατικές τεχνικές φασματοσκοπίας IR, τα φασματοφωτόμετρα FTIR παρουσιάζουν σαφή πλεονεκτήματα. Αυτά σχετίζονται κυρίως με την υψηλή ευαισθησία και την ταχύτητα καθώς και με τον βελτιωμένο λόγο σήματος προς θόρυβο (SNR) ανά μονάδα χρόνου (Fellgett advantage). Αυτή η υπεροχή τους οφείλεται στα βασικά χαρακτηριστικά κατασκευής και λειτουργίας τους που επιτρέπουν τη λήψη ενός πλήρους φάσματος κατά τη διάρκεια μίας μόνο κατοπτρικής σάρωσης, ενώ ο ανιχνευτής μπορεί να παρατηρεί όλες τις συχνότητες ταυτόχρονα. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα είναι η ικανότητα μέτρησης πολύ ασθενών σημάτων λόγω του ότι αποτελούνται από λίγα οπτικά στοιχεία, ενώ καμία σχισμή δεν εξασθενεί την ακτινοβολία. Έτσι τα οπτικά τους συστήματα παρουσιάζουν μια μεγαλύτερη ενεργειακή απόδοση σε σχέση με τα όργανα διασποράς. Ακόμα ο λόγος του σήματος προς τον θόρυβο είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τα καλής σε ποιότητα φασματοφωτόμετρα διασποράς. Επιπλέον, έχουν υψηλή διακριτική ισχύ ($0,1 \text{ cm}^{-1}$) με αποτέλεσμα τόσο την μεγαλύτερη ακρίβεια αλλά και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Ακόμη, όλη η πληροφορία που βρίσκεται στην ακτινοβολία φθάνει ταυτόχρονα στον ανιχνευτή και έτσι εξασφαλίζεται η συλλογή των δεδομένων σε ελάχιστο χρόνο, πολλές φορές και λιγότερο του δευτερολέπτου, για όλο το φάσμα (Skoog, 2002). Επιπλέον, η χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή στην FTIR φασματοσκοπία προσφέρει τη δυνατότητα ταχείας λήψης πολλαπλών φασμάτων αλλά και επεξεργασίας των

δεδομένων με μία μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων τεχνικών επεξεργασίας, με αποτέλεσμα την καταγραφή φασμάτων πολύ υψηλής ποιότητας. Ακόμα ένα πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι το γεγονός πως δεν απαιτείται σχεδόν καθόλου προετοιμασία του προς εξέταση δείγματος, καθώς επίσης μπορεί να γίνει ανάλυση πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα (Baca- Bocanegra et al., 2022; Silva et al., 2014; Friedel et al., 2013).

Έτσι, η φασματοσκοπία της υπερύθρου έτσι αποτελεί μια ευαίσθητη, γρήγορη, αυτόματη, οικολογική και μη καταστροφική μέθοδο ανάλυσης. Η χρήση της εφαρμόζεται σε μια μεγάλη ποικιλία δειγμάτων. Προσφέρει μία αναλυτική και ποιοτική πληροφορία για το κάθε αναλυόμενο συστατικό μαζί με ένα μοναδικό αποτύπωμα το οποίο επιβεβαιώνει την ταυτότητα του κάθε αναλυόμενου συστατικού. (Edelmann et al. 2003). Σε ερευνά τους οι (Miramont et al, 2021), συγκρίνοντας την μέθοδο FTIR με την μέθοδο UV- Vis, αναφέρουν ότι οι κορυφές απορρόφησης του FTIR προσφέρουν και περισσότερη πληροφορία.

2.3.6 Χρήση FTIR φασματοσκοπίας στην ανάλυση οίνων

Η φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR εφαρμόζεται όλο και περισσότερο στον τομέα της οινολογίας καθώς η χρήση τόσο εύκολων όσο και γρήγορων μεθόδων πάνω στην ανάλυση των δειγμάτων κλείνεται αναγκαία. Οι Thanasi et al. (2022) αναφέρουν πως ήδη η τεχνική FTIR εφαρμόζεται σε καθημερινή βάση, από τον έλεγχο στο σταφύλι μέχρι και τον οίνο. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιείται στον αμπελώνα με σκοπό τον έλεγχο της ωριμότητας των σταφυλιών καθώς επίσης και σε όλα τα στάδια της οινοποίησης από τον μούστο μέχρι και το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, κατά την εμφιάλωση. Στο μούστο, οι Puxeu et al., (2019) έδειξαν την δυνατότητα χρήσης της μεθόδου FTIR για τον προσδιορισμό ουσιών στην διάρκεια της ζύμωσης, όπως το άζωτο που προστίθεται όντας θρεπτικό για τις ζύμες. Παρόλα αυτά οι Patz et al., (2004) αναφέρουν πως φαίνεται να μην αποτελεί μια κατάλληλη μέθοδο για τον προσδιορισμό ουσιών που έχουν συγκέντρωση χαμηλότερη των 0,2g/L.

Όσον αφορά τον οίνο, ήδη η μέθοδος FTIR εφαρμόζεται τόσο για την ταυτοποίηση όσο και για την διαφοροποίηση των πολυσακχαριτών στον οίνο (Baca-Bocanegra et al., 2022; Boulet et al., 2007) καθώς και για τον προσδιορισμό αιθανόλης, γλυκόζης, φρουκτόζης και οργανικών οξέων, για τον εντοπισμό προβλημάτων στα πρώτα στάδια οινοποίησης και έλεγχος προκυανιδίων σε λευκά και κόκκινα σταφύλια. Οι Versari et al., (2010) απέδειξαν χρήση της μεθόδου για τον προσδιορισμό των σακχάρων και της ενεργής οξύτητας. Κατά αυτόν τον τρόπο η FTIR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των βασικών συστατικών των οίνων, όπως οι οργανικές οξέως, οι αλκοόλες, οι φαινόλες και τα σάκχαρα.

Σε γενικές γραμμές, αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο και για τον προσδιορισμό

πολυφαινολών. Η περιοχή φάσματος MIR η οποία εκτείνεται από τα 1800 ως 900 cm^{-1} δίνει πληροφορίες για τις πολυφαινόλες. Πιο αναλυτική μελέτη αυτής της περιοχής μπορεί να οδηγήσει σε πιο ακριβή προσδιορισμό των πολυφαινολών του οίνου. (P. Scano, 2021). Οι Garcia – Hernandez et al. (2020) χρησιμοποίησαν την FTIR σε ερυθρούς οίνους με σκοπό την διαφοροποίηση αυτών ανάλογα τον ποσοστό πολυφαινολών τους. Η συλλογή των πληροφοριών τους έγινε γρήγορα και αποδοτικά, προσδιορίζοντας πάνω από μια παράμετρο ταυτόχρονα, αποδεικνύοντας της χρησιμότητα της μεθόδου. Ακόμα Tarantilis et al. (2008) εφάρμοσαν την μέθοδο για διαφοροποίηση τριών ποικιλιών και συμπέραναν ότι ενώ η διάκριση τους στηρίζεται σε μικρές διαφορές ανάμεσα στα φάσματα των φαινολικών εκχυλισμάτων, η FTIR αποτελεί μια μέθοδο για τον διαχωρισμό ποικιλιών διαφορετικής προέλευσης.

Ακόμη μια εφαρμογή της τεχνικής αποδίδεται στην παρακολούθηση της παλαίωσης των οίνων προσφέροντας την δυνατότητα διαφοροποίησης μεταξύ οίνων που έχουν παλαιωθεί με διαφορετικούς τρόπους και σε διαφορετικά βαρέλια για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. (Anjos et al., 2020, Basalekou et al., 2017)

Οι Fendri et al., (2017) χρησιμοποίησαν της φασματοσκοπία FTIR με σκοπό την ανίχνευση της νοθείας στα κόκκινα κρασιά. Η μελέτη έδειξε την αποτελεσματικότητα της τεχνικής αυτής στον εντοπισμό των πιθανών νοθευμένων και στην διασφάλιση της αυθεντικότητας των δειγμάτων.

2.3.7 Εφαρμογές φασματοσκοπίας FT-IR σε μικροοργανισμούς

Η φασματοσκοπία Μετασχηματισμού Fourier αποτελεί μια ισχυρή αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό και την αναγνώριση των μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των στελεχών, των ζυμών και των βακτηριών. Οι Nauman et al., (1991) απέδειξαν την δυνατότητα χρήσης της FTIR φασματοσκοπίας για την αναγνώριση των βακτηριών σε είδος βάση των μοναδικών φασματικών δακτυλιδιών τους. Έτσι αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνική για μικροβιολογικές μελέτες που επιτρέπουν ένα ευαίσθητο δακτυλικό αποτύπωμα μικροοργανισμών, το οποίο βασίζεται στον χαρακτηρισμό των χημικών ομάδων που αποτελούν τα βιομόρια. Έτσι, η αναγνώριση (Yu & Irudayaraj, 2005), η ταξινόμηση των μικροοργανισμών (Mariey, Signolle, Amiel, & Travert, 2001) και ο χαρακτηρισμός των βιολογικών διαδικασιών στα κύτταρα (Adt, Toubas, Pinon, Manfait, & Sockalingum, 2006) έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας την παραπάνω προσέγγιση.

Η έρευνα των Mohacek-Grosev et al. (2001) εξειδικεύτηκε πάνω στην διάκριση ασκοκυμυκήτων και βασιδιομυκήτων με βάση την ταυτοποίηση των α - και β - γλουκανών από την

φασματοφωτομετρική μέτρηση και σύγκριση σε σπόρια και καρποφορίες 70 διαφορετικών ειδών και 37 γενών. Εκτός όμως από την ταυτοποίηση των μυκήτων, μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου FTIR μπορούν να ληφθούν πληροφορίες για την ανάπτυξη των υφών και των σπορίων, το οποίο συμβάλει στην συμπλήρωση των μοριακών τεχνικών (Kaminskyj et al., 2007).

Επιπρόσθετα οι Amado et al., (2017) επικεντρώθηκαν στην χρήση της φασματοσκοπίας FTIR πάνω στην ανάλυση της λιπιδιακής σύνθεσης των κυτταρικών μεμβρανών των βακτηρίων και αρχαίων μικροοργανισμών, παρέχοντας πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά της δομής τους και την δυνατότητα αναγνώρισής τους.

Επιπλέον, η FTIR αποδείχθηκε ικανή για την ανάλυση βακτηριακών μεταβολικών δραστηριοτήτων. Πιο συγκεκριμένα, οι O'Rourke et al., (2020) εξέτασαν την χρήση της στην παρακολούθηση της ανάπτυξης των βακτηρίων και στην αξιολόγηση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, εξετάζοντας τις αλλαγές στα μεταβολικά δαχτυλικά αποτυπώματα των βακτηρίων κατά την διάρκεια του χρόνου.

Όσον αφορά τον *B. bruxellensis* οι Oelofse et al., (2008) απέδειξαν την δυνατότητα της φασματοσκοπίας FTIR σε συνδυασμό με την χημειομετρία πάνω στην διαφοροποίηση των στελεχών του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα οι παραδοσιακές τεχνικές βασίζονται σε μορφολογικές και φυσιολογικές διαφορές, έτσι δεν αποτελούν κατάλληλο εργαλείο για την διάκριση των στελεχών. Ακόμα οι μοριακές τεχνικές είναι συχνά ασαφής και απαιτούν διάφορα εκτεταμένα βήματα προετοιμασίας. Η εφαρμογή της FTIR πάνω στον διαχωρισμό και της κατάταξη των μικροοργανισμών έχει διαπιστωθεί ήδη καθώς υπόσχεται για τον μελλοντικό έλεγχο των στελεχών του *B. Bruxellensis*.

3.Υλικά και Μέθοδοι

Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε στέλεχος του *B. bruxellensis* από την συλλογή του Τμήματος οίνου, αμπέλου και ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής χάρη στην ευγενική χορηγία της κυρίας Δημοπούλου.

Θρεπτικό υλικό

Ως θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το YPD (10 g l⁻¹ yeast extract, 10 g l⁻¹ Bacto-peptone, 20 g l⁻¹ glucose, 20 g l⁻¹ agar) στους 28⁰C για πέντε ημέρες για την καλλιέργεια αρχική καλλιέργεια του Βρετανομύκητα που μελετήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Δείγμα οίνου

Ως ερυθρός οίνος χρησιμοποιήθηκε ένας οίνος μη παλαιωμένος δεξαμενής του 2021 με 13% abv

Χειρισμός δειγμάτων και λήψη φασμάτων

Όσον αφορά τον χειρισμό των δειγμάτων, όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε κάτω από ασυπτικές συνθήκες και πριν από κάθε λήψη της οποιαδήποτε ποσότητας δείγματος προηγήθηκε ορθή ανακίνηση με σκοπό την πλήρη ομογενοποίηση του δείγματος. Η διαδικασία της ομογενοποίησης πραγματοποιήθηκε με το VOTREX. Τέλος πρέπει να τονιστεί ότι πριν από την μέτρηση όλων των δειγμάτων, εφαρμόστηκε ειδικό φίλτρο με πορώδες 10^4 μm με σκοπό της κατοχύρωση της διαύγειας τους.

Αρχική καλλιέργεια δείγματος:

Η αρχική καλλιέργεια ήταν 10^6 cfu/ml δηλαδή 1.000.000 αποικίες σε 1 ml θρεπτικού μέσου. Ως μέσο χρησιμοποιήθηκε το YPD. Από τον δοκιμαστικό σωλήνα της αρχικής καλλιέργειας λήφθηκε 1ml από το οποίο και μετρήθηκε το φάσμα της με την βοήθεια του FTIR.

Αρχικό θρεπτικό μέσο:

Ως αρχικό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το YPD. Από τον δοκιμαστικό σωλήνα του αρχικού θρεπτικού μέσου, στο οποίο δεν υπήρχε παρουσία μύκητα, λήφθηκε 1ml από το οποίο και μετρήθηκε το φάσμα της με την βοήθεια του FTIR.

Θρεπτικό μέσο και οίνος:

Από τον δοκιμαστικό σωλήνα με το αρχικό θρεπτικό μου μέσο YPD, χωρίς την παρουσία μύκητα, αρχικά λήφθηκε 1ml από το οποίο διαλύθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9ml ερυθρού οίνου. Πραγματοποιήθηκε δηλαδή δεκαπλάσια αραιώση του αρχικού θρεπτικού μέσου YPD.

Έπειτα ακολουθώντας την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, από τον δοκιμαστικό σωλήνα με την πρώτη αραιώση λήφθηκε 1ml το οποίο διαλύθηκε εκ νέου, σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9ml ερυθρού οίνου. Έτσι πραγματοποιήθηκε εκατονταπλάσια αραιώση, δεύτερη αραιώση, του αρχικού θρεπτικού μέσου YPD.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μια τρίτη αραιώση, πιο συγκεκριμένα λήφθηκε 1ml από τον δοκιμαστικό σωλήνα και διαλύθηκε εκ νέου σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 ml οίνου. Κατά αυτόν τον τρόπο πραγματοποιήθηκε χιλιοστή αραιώση, τρίτη αραιώση, του αρχικού

θρεπτικού μέσου YPD

Αρχική καλλιέργεια και οίνος:

Από τον δοκιμαστικό σωλήνα με το αρχική καλλιέργεια αρχικά λήφθηκε 1ml το οποίο διαλύθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9ml ερυθρού οίνου. Πραγματοποιήθηκε δηλαδή δεκαπλάσια αραίωση της αρχικής καλλιέργειας σε ερυθρό οίνο. Άρα ο τελικός πληθυσμός που προκύπτει από την πρώτη αραίωση είναι 10^5 cfu/ml.

Έπειτα από τον δοκιμαστικό σωλήνα με την πρώτη αραίωση λήφθηκε 1ml το οποίο διαλύθηκε εκ νέου, σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9ml ερυθρού οίνου. Έτσι πραγματοποιήθηκε εκατονταπλάσια αραίωση της αρχικής καλλιέργειας σε ερυθρό οίνο. Άρα ο τελικός πληθυσμός που προκύπτει από την δεύτερη αραίωση είναι 10^4 cfu/ml.

Στην συνέχεια από τον δοκιμαστικό σωλήνα με την δεύτερη αραίωση λήφθηκε 1ml το οποίο διαλύθηκε εκ νέου, σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9ml ερυθρού οίνου. Έτσι πραγματοποιήθηκε χλιαπλάσια αραίωση της αρχικής καλλιέργειας σε ερυθρό οίνο. Άρα ο τελικός πληθυσμός που προκύπτει από την τρίτη αραίωση είναι 10^3 cfu/ml.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε επί τέσσερις φορές. Έχοντας ως συνολικό άθροισμα δειγμάτων, εμβολιασμένου μύκητα σε ερυθρό οίνο, 16. Τα δείγματα με τον οίνο και το θρεπτικό μέσο ανέρχονται στα έξι. Ακόμα στα προς εξέταση δείγματα περιλαμβάνεται ο οίνος και το θρεπτικό μέσο.

Έπειτα, όλα τα δείγματα, αφέθηκαν για είκοσι οκτώ μέρες σε πωματισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες σε συνθήκες: θερμοκρασία 22°C και σκοτεινό μέρος. Στην συνέχεια λήφθηκαν τα φάσματά τους. Την εικοστή όγδοη ημέρα μετρήθηκαν τα πρώτα φάσματα των δειγμάτων. Έπειτα για τις επόμενες τρεις μέρες πραγματοποιήθηκε καθημερινή λήψη των φασμάτων για την παρατήρηση της κινητικής ανάπτυξης του μύκητα.

Ακόμα, σε όλα τα προς εξέταση δείγματα, εφόσον παρέμειναν στις ίδιες συνθήκες όντας πωματισμένα, έγινε λήψη των φασμάτων τους πάνω στο δεύτερο μήνα, δηλαδή ημέρα 57.

Την ημέρα 0, δηλαδή την ημέρα του εμβολιασμού, πάρθηκε και η μέτρηση της αρχικής καλλιέργειας με ονομασία φάσματος: Brett1millcfu.

Πίνακας 3.0 Δείγματα μύκητα προς ανάλυση

Αραίωση	Νέες συγκεντρώσεις από αρχική καλλιέργεια 10^6 cfu/ml	Διαδικασία	Ημέρα 28	Ημέρα 29	Ημέρα 30	Ημέρα 31	Ημέρα 57
10^{-1}	10^5	9 ml Οίνο Βάσης+ 1 ml από αρχική καλλιέργεια 10^6	BrettRed105	Brett2Red105	Brett3Red105	Brett4Red105	2BrettRed105
10^{-2}	10^4	9 ml Οίνο Βάσης + 1 ml από καλλιέργεια 10^5	BrettRed104	Brett2Red104	Brett3Red103	Brett4Red104	2BrettRed104
10^{-3}	10^3	9 ml Οίνο Βάσης + 1 ml από καλλιέργεια 10^4	BrettRed103	Brett2Red103	Brett3Red103	Brett4Red103	2BrettRed103

Πίνακας 3.1 Δείγματα αραιώσεων YPD προς ανάλυση

Τελικές συγκεντρώσεις YPD σε οίνο βάσης	Διαδικασία	FTIR ΗΜΕΡΑ 28	FTIR ΗΜΕΡΑ 57
10^{-1}	9 ml Οίνο Βάσης + 1 ml από YPD	YPDRed101	YPD2Red101
10^{-2}	9 ml Οίνο Βάσης + 1 ml από YPD	YPDRed102	YPDRed2102
10^{-3}	9 ml Οίνο Βάσης + 1 ml από YPD	YPDRed103	

Πίνακας 3.2 Δείγματα YPD και Οίνου προς ανάλυση

ΔΕΙΓΜΑ	FTIR ΗΜΕΡΑ 28	FTIR ΗΜΕΡΑ 57
YPD	YPD	YPD2
ΟΙΝΟΣ	RED	RED2

Ανάλυση με FTIR

Μετά την πέρας των είκοσι οκτώ ημερών αναμονής, οι αναλύσεις των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μηχάνημα FTIR της εταιρείας Thermo Fisher Scientific Inc. στα εργαστήρια του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Πέραν από το μηχάνημα, χρειάστηκαν και μια μικροπιπέτα, ένα σιφόνι πλήρώσεως των 10 ml και ειδικά φίλτρα με μικροδομή 10^4 μm τόσο για την μεταφορά των δειγμάτων όσο και για την απόκτηση διαυγών δειγμάτων πριν την μέτρησή τους καθώς και ακετόνη για τον καθαρισμό της επιφάνειας μετά από κάθε ανάλυση. Οι αναλύσεις έγιναν στην περιοχή 4000 - 400 cm^{-1} .

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του λεγόμενου υποβάθρου με τον υποδοχέα του δείγματος κενό με σκοπό την μείωση των σφαλμάτων λόγω εξωτερικών παραγόντων. Ύστερα, για το κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα τρεις μετρήσεις. Πριν και μετά από κάθε δείγμα πραγματοποιούταν ο καθαρισμός της επιφάνειας του μηχανήματος με ακετόνη. Στην συνέχεια για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε ξανά ο προσδιορισμός του λεγόμενου υποβάθρου με τον υποδοχέα του δείγματος αυτή τη φορά με το νερό. Έπειτα, ακολούθησε εκ νέου η διαδικασία της τριπλής μέτρησης για κάθε δείγμα.

Η μεταφορά των δειγμάτων και του νερού έγινε με την χρήση μικροπιπέτας διότι προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέτρηση και να γίνει σωστά η ανάλυση απαιτείται η επικάλυψη του διαμαντιού με μικρή ποσότητα δείγματος. Εν κατακλείδι, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν μια τριπλέτα μετρήσεων, τρεις μετρήσεις ταυτόχρονα.

4.Αποτελέσματα & Συζήτηση

Η πιο χρησιμοποιούμενη περιοχή όσον αφορά τα φάσματα της υπερύθρου είναι αυτή του μέσου υπερύθρου που κυμαίνεται από τα 4000 cm^{-1} έως 400 cm^{-1} . Αυτό αντιπροσωπεύει την περιοχή απορρόφησης του υπέρυθρου (MIR) στο οποίο συνήθως γίνεται η ανάλυση με FTIR διότι δίνει πληροφορίες από βασικές δονήσεις των μορίων. (Garcia- Hernandez et al., 2020; Soriano et al., 2007; Carames et al., 2016; Pizarro et al., 2010; Niimi et al., 2021; Schorn - Garcia et al., 2021). Αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε φάσματα $4400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$, $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ή $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$. (Scano, 2021; Aleixandre Tudo et al., 2018; Baca-Bocanegra et al., 2022; Silva et al., 2014; Versari et al., 2010)

Έχει παρατηρηθεί πως οι κορυφές απορρόφησης του νερού και της αιθανόλης κυριαρχούν στο φάσμα. Η ευρεία κορυφή βρίσκεται μεταξύ 4000 έως 3000 cm^{-1} , η περιοχή οφείλεται κυρίως δόνηση τάσης του δεσμού O-H του νερού, της αλκοόλης και των φαινολών. Άλλες ζώνες απορρόφησης που σχετίζονται με το νερό βρέθηκαν περίπου στα 950 και 460nm , οι οποίες σχετίζονται με το O-H. Συγκεκριμένα, διάφορες έρευνες αναφέρουν ότι οι περιοχές $3700\text{-}2971\text{cm}^{-1}$ (Hernandez Garcia et al., 2020) καθώς και οι περιοχές $3624\text{-}2971\text{cm}^{-1}$ και $1717\text{-}1543\text{cm}^{-1}$, παρουσιάζουν κορυφές οι οποίες οφείλονται στην απορρόφηση του νερού. Έντονες κορυφές μπορεί να εντοπιστούν και στα $3250\text{-}2250\text{cm}^{-1}$ και $3750\text{-}3500\text{cm}^{-1}$ (Aleixandre-Tudo et al., 2018). Άλλες έρευνες συμφωνούν στο ότι οι κορυφές του νερού εντοπίζονται στα $1717\text{-}231543\text{cm}^{-1}$ και $3627\text{-}2971\text{ cm}^{-1}$ (Silva et al., 2014; Laghi et al., 2011; Versari et al., 2010; Urtubia et al., 2008)

Οι κορυφές των απορροφήσεων που οφείλονται στις αλκοόλες παρατηρήθηκαν στα $2850\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$ που σχετίζεται με τη δόνηση τάσης CH, στα $2200\text{-}23000\text{ cm}^{-1}$ σχετίζεται με δονήσεις του δεσμού C-H της αιθανόλης και των σακχάρων, καθώς επίσης στα 1087 και 1050 cm^{-1} αφορούν άμεσα τη δόνηση τάσης του CO για τις πρωτογενής αλκοόλες και τη γλυκερόλη (Martelo-Vidal.,2013). Μέσα σε αυτά τα φάσματα κορυφές αιθανόλης έχουν βρεθεί, κυρίως, στα 1050 cm^{-1} (Aleixandre-Tudo et al., 2018), 1045 cm^{-1} (Friedel et al., 2013), 1044 cm^{-1} και 1086 cm^{-1} (Anjos et al., 2020), 1044 cm^{-1} και 1085 cm^{-1} (Zhang et al., 2010) και 1042 cm^{-1} (Urtubia et al., 2008).

Οι κορυφές στην περιοχή από το 3000 έως το 2800 cm^{-1} σε πολλαπλά συστατικά των κρασιών με δονήσεις που συμπεριλαμβάνουν το τέντωμα C-H των υδρογονοθράκων, το τέντωμα O-H των καρβοξυλικών οξέων και το ασύμμετρο τέντωμα των δονήσεων του C-H ομάδων μεθυλίου ($-\text{CH}_3$): πολυόλες (γλυκερόλη), ελεύθερα φαινολικά οξέα και κατεχίνες. Η περιοχή μεταξύ $2200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ μπορεί να συσχετιστεί με το τέντωμα C-OH, τη CH_3 κάμψη, τη CH_2

κάμψη, το C=C τέντωμα και το C≡N τέντωμα των ομάδων σε ενώσεις, όπως φαινόλες, αλκοόλες, αλδεΐδες, ανώτερες αλκοόλες, πολυόλες, οξέα, σάκχαρα, πτητικά οξέα και αμινοξέα.

Η περιοχή των απορροφήσεων μεταξύ 1900-1600 cm⁻¹ αφορά συνδυασμούς O-H, C-H₃ και C-H₂, C-H (Martelo-Vidal.,2013).

Το ενδιαφέρον όμως επικεντρώνεται στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 1600 έως 900 cm⁻¹ επειδή σε αυτή την περιοχή γίνεται η απορρόφηση των χαρακτηριστικών ομάδων και αποτελεί την περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος. Η περιοχή 1800 – 900 cm⁻¹ , ονομάζεται περιοχή του αποτυπώματος, γιατί δίνει αρκετές πληροφορίες τόσο για τις φαινόλες όσο και για άλλα μόρια παρόντα στους οίνους. (Scano, 2021; Tarantilis et al., 2008; Silva et al., 2014; Schorn – Garcia et al., 2021). Κατά συνέπεια σε αυτή την περιοχή τυχόν διαφορές μεταξύ των φασμάτων μπορούν να εντοπιστούν. Γενικά στα 1600-900 cm⁻¹ μπορούν να βρεθούν ομάδες περιοχών που προέρχονται από τις φαινόλες του κρασιού. Πιο συγκεκριμένα, μέσα από διάφορες έρευνες πάνω στο αντικείμενο, φαίνεται ότι οι περισσότερες κορυφές που οφείλονται στις πολυφαινόλες εντοπίζονται κυρίως στις εξής περιοχές: 1750 – 950 cm⁻¹ (Scano, 2021), 1500-1000 cm⁻¹ , (Garcia-Hernandez et al., 2020; Tudo Aleixandre et al., 2018), 1680-900 cm⁻¹ (Tarantilis et al., 2008; Silva et al., 2014; Laghi et al., 2011), 1600-1000 cm⁻¹ (Tudo Aleixandre et al., 2018) και 1550-900 cm⁻¹ . Στην ερευνά του, ο Scano (2021) μάλιστα, εντόπισε ανθοκυάνες στην περιοχή 1016-1198cm⁻¹ , φλαβονόλες στην περιοχή 1159-1277 cm⁻¹ και στην 1376-1407cm⁻¹ βρήκε μη φλαβονοειδείς ενώσεις ενώ οι Laghi et al. (2011) αναφέρουν ότι η περιοχή 1285cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική για φλαβονοειδείς τανίνες.

Η περιοχή μεταξύ του 1450 και 1278 cm⁻¹ είναι πολύ πολύπλοκη και περιέχει πληροφορίες που σχετίζονται με το τέντωμα C=O, C=C, CH₂ και C-H για αλδεΐδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες, περίπου στα 1457–1427 cm⁻¹ (Tarantilis.,2008). Οι ζώνες στα 1200,1110-1107 και 1068-1062 cm⁻¹ ανταποκρίνονται στο τέντωμα των δονήσεων των C-O και O-H εκτείνονται δεύτεροι τόνοι από σάκχαρα και οργανικά οξέα (Tarantilis.,2008; Martelo-Vidal.,2013). Μια επιπλέον κορυφή που μπορεί να συναντάται είναι αυτή που οφείλεται στο διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) , η οποία εντοπίζεται στα 2341cm⁻¹ (Tudo Aleixandre et al., 2018; Urtubia et al., 2008).

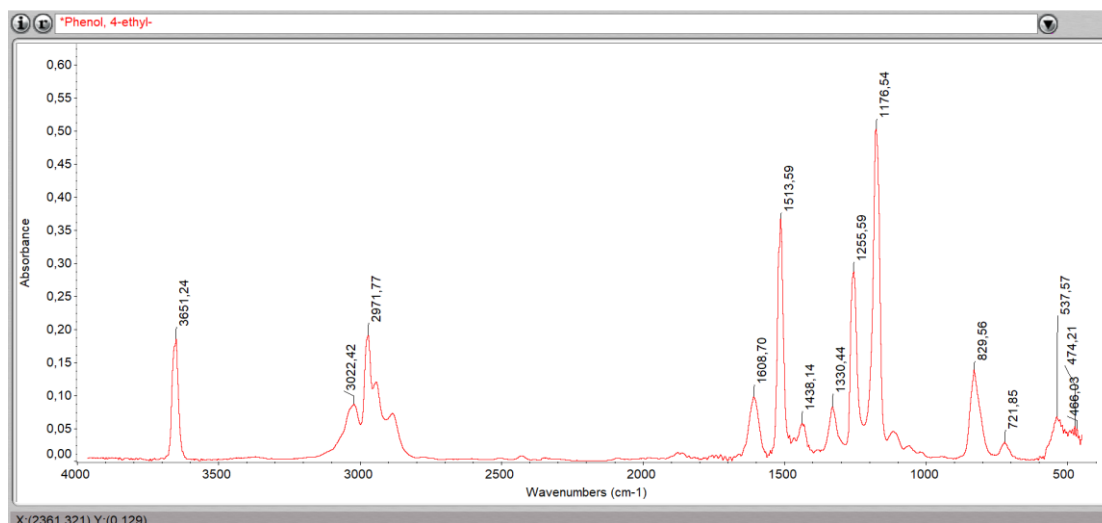
Μια λεπτομερής περιγραφή των πιο αντιπροσωπευτικών περιοχών του φάσματος FT-IR παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 4.0 Περιγραφή αντιπροσωπευτικών περιοχών του φάσματος FT-IR

FTIR περιοχή φάσματος (cm ⁻¹)	Ομάδες		Αναφορά
3500-3000	-OH	Νερό, αλκοόλες και φαινόλες	Banc et al.,(2014)

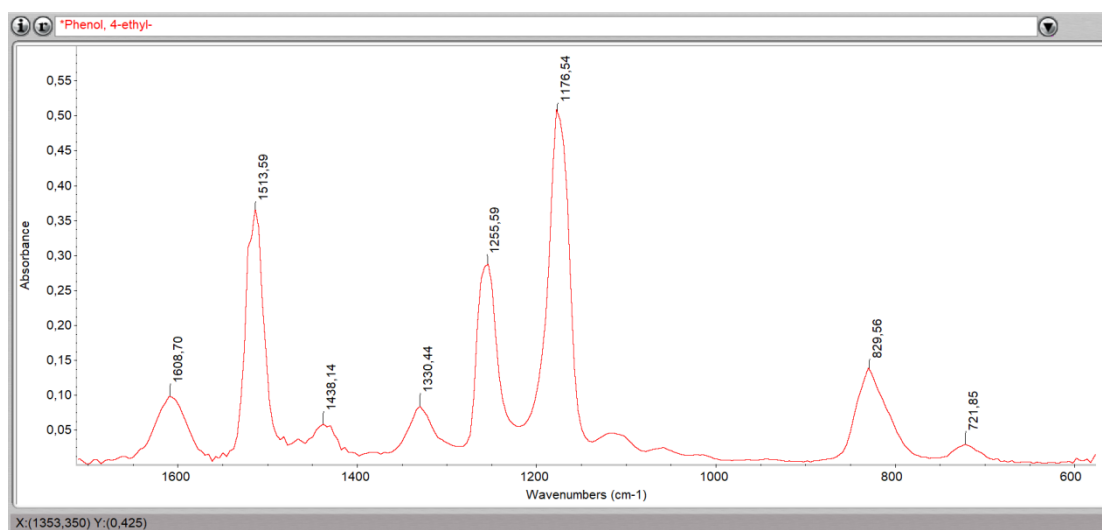
3000-2800	C–H τέντωμα των υδρογιοανθρακων –CH ₃ δόνηση ασύμμετρων τεντωμάτων O–H τέντωμα των καρβοξυλικών οξέων	Ελεύθερα φαινολικά οξέα και κατεχίνες, Πολυόλες(γλυκερόλη)	Banc et al.,(2014)
2300-2100	C–H Συνδυασμοί δονήσεων και συνδυασμοί δονήσεων και τόνων	Αιθανόλη και σάκχαρα	Martelo-Vidal et al.,(2013)
1900-1600	O–H τέντωμα C–H ₃ τέντωμα πρώτου τόνου C–H ₂ , C–H τέντωμα πρώτου τόνου	Αιθανόλη, γλυκόζη και νερό	Martelo-Vidal et al.,(2013)
1700	C=O	Οργανικά οξέα	Banc et al.,(2014)
1712-1704	C=O	Εστέρες των υδρολυόμενων ταννινών, συγκεκριμένα τα παράγωγα του γαλλικού οξέος και οι γεύσεις	Tarantilis et al., (2008) Basalekou et al.,(2017)
1610–1614 1519–1516	C=C	Αρωματικές συγκεντρώσεις και φλαβονοειδή	Tarantilis et al., (2008) Basalekou et al.,(2017)
1600-1530	C–N	Αμινοξέα και τα παράγωγα	Banc et al.,(2014)
1457-1288	C=O, C=C, –CH ₂ –, C–H, –CH ₃ , O–H	Αλδεΐδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες	Cozzolino et al.,(2011)
1250-950	Τέντωμα και κραδασμούς κάμψης	Υδρολυόμενες και συμπυκνωμένες ταννίνες Γλυκόζη, ολίγο- και πολυσακχαρίτες, αλκοόλες (αιθανόλη)	Banc et al.,(2014) Boulet et al.,(2007)
1200 1110-1107 1068-1062	Τέντωμα δόνησης του C-O O-H τέντωμα δεύτερου τόνου	Σάκχαρα και οργανικά οξέα	Tarantilis et al., (2008)
<1000	Τέντωμα και κραδασμούς κάμψης	Φωσφορικά,φαινόλες, Μονο-υποκατεστημένα φαινύλ παράγωγα,ακόρεστα λιπίδια, καροτενοειδή	Banc et al.,(2014)

Επειδή επιλέξαμε να επικεντρωθούμε στα μεταβολικά προϊόντα του μύκητα, παρακάτω παρουσιάζονται τα τυπικά τους φάσματα.



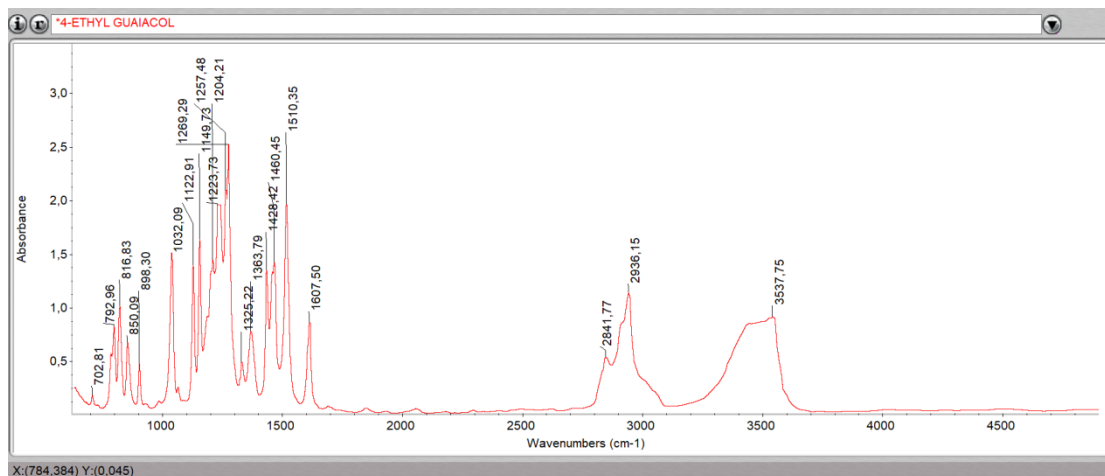
Εικόνα4.0 4 αιθυλ-φαινόλη

Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει το αντιπροσωπευτικό φάσμα της 4-αιθυλ φαινόλης . Αν επικεντρωθούμε σε όλο το μήκος του φάσματος παρατηρούμε μια περιοχή έντονων απορροφήσεων από τα 1600-1100, όπου περικλείεται μέσα την περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος. Πέρα από αυτή την περιοχή, διακρίνουμε άλλες τρεις χαρακτηριστικές κορυφές στο μήκος του φάσματος, μία στα 3651,24, μία στα 3022,42 και η τελευταία στα 2971,77.



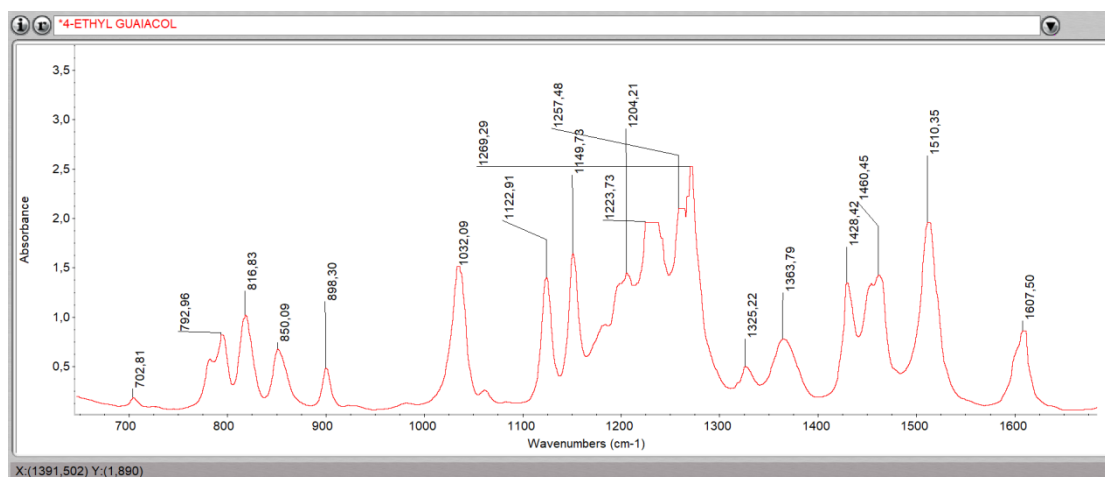
Εικόνα4.0.1 4 αιθυλ-φαινόλη, στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.

Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει το αντιπροσωπευτικό φάσμα της 4-αιθυλ φαινόλης στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος. Από την παρατήρηση μας βλέπουμε τις εξής χαρακτηριστικές κορυφές: 1608,70/1513,59/1438,14/1330,44/1255,59/1176,54/829,56. Οι υψηλότερες όμως απορροφήσεις ανέρχονται στα 5113,59, στα 1255,59 και στα 1176,54.



Εικόνα4.0.2 4 αιθυλ-γουαικόλη

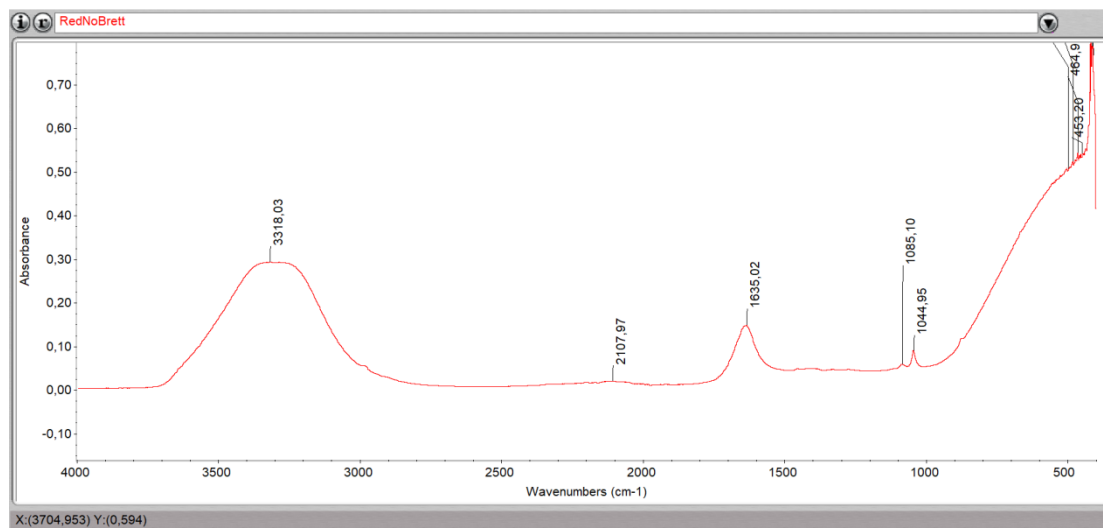
Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει το αντιπροσωπευτικό φάσμα της 4-αιθυλ γουακόλης. Αν επικεντρωθούμε σε όλο το μήκος του φάσματος παρατηρούμε μια περιοχή έντονων απορροφήσεων από τα 1600-900, όπου αποτελεί κιάλας την περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος. Εκτός από αυτή βλέπουμε άλλες τρεις χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες εντοπίζονται στα 2841,77, στα 2936,15 και στα 3537,75.



Εικόνα4.0.3 4 αιθυλ-γουαικόλη, στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος

Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει το αντιπροσωπευτικό φάσμα της 4-αιθυλ γουακόλης στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος. Παρατηρούμε μια χαρακτηριστική αύξηση των

απορροφήσεων από τα 1100 cm⁻¹ έως τα 1300 cm⁻¹, καθώς η πιο ψηλή απορρόφηση της καμπύλης της εντοπίζεται στα 1269,29.

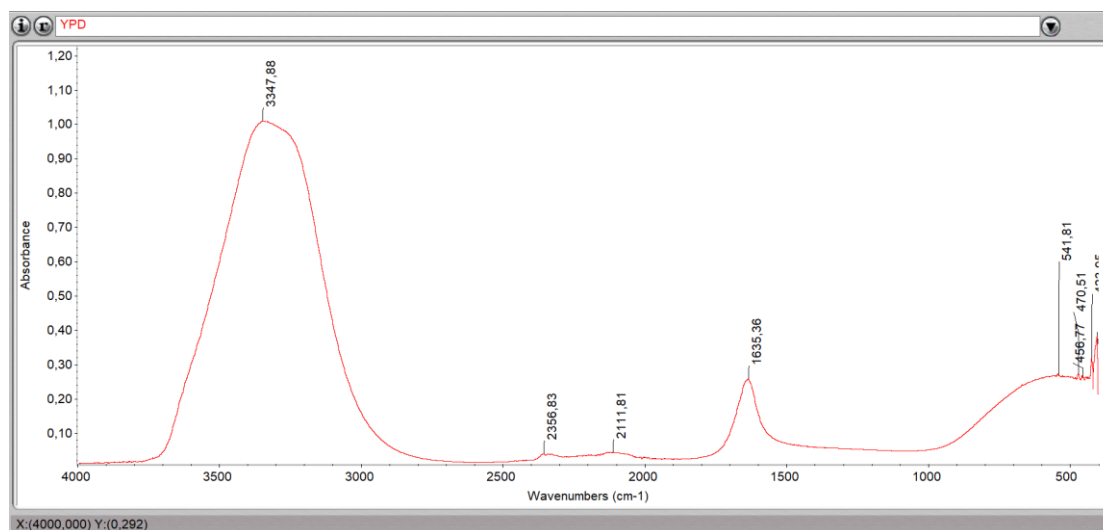


Εικόνα 4.0.5 RedNoBrett

Η παραπάνω εικόνα δείχνει ένα τυπικό φάσμα οίνου την ημέρα 0.

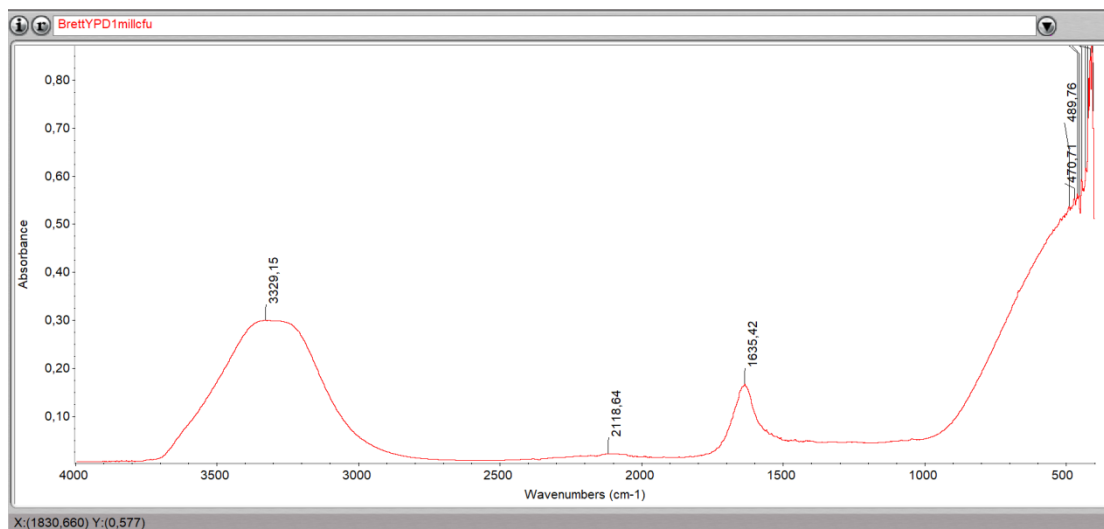
Εντοπίζονται τέσσερις χαρακτηριστικές κορυφές. Η κορυφή στα 3318,03 σύμφωνα με την βιβλιογραφία οφείλεται στην απορρόφηση του νερού.

Ακόμα σύμφωνα με τους Zhang et al., (2010) οι κορυφές που εντοπίζονται στα 1044 cm⁻¹ και 1085 cm⁻¹ αφορούν άμεσα το τέντωμα του CO για τις πρωτογενής αλκοόλες.



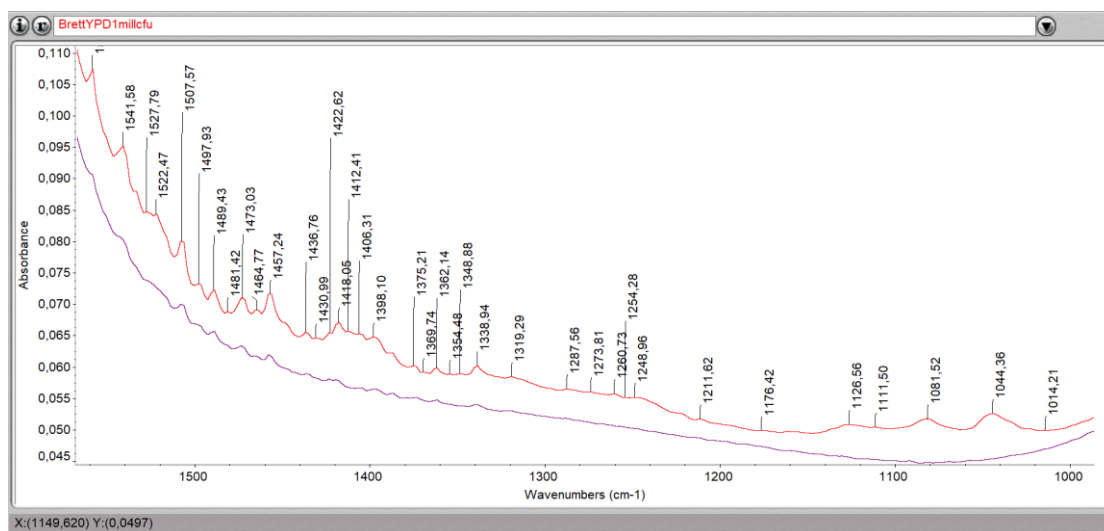
Εικόνα 4.0.6 YPD

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται ένα τυπικό φάσμα του YPD. Στο παραπάνω φάσμα παρατηρούμε δύο χαρακτηριστικές κορυφές, αυτή του νερού στα 3347,88 και αυτή στα 1635,36.



Εικόνα 4.0 Brett1millcfu

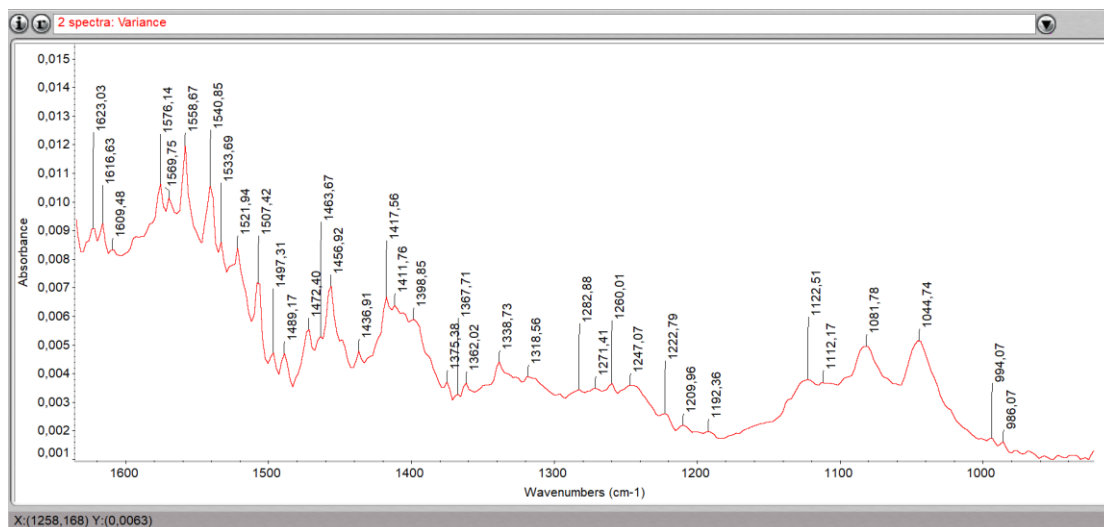
Στην παραπάνω εικόνα εμφανίζεται το χαρακτηριστικό φάσμα του Βρεττανομύκητα μέσα σε YPD, ο οποίος βρίσκεται σε συγκέντρωση 10^6 cfu/ml



Εικόνα 4.0.7 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των δειγμάτων: YPD, BrettYPD1millcfu, την ημέρα 0 των μετρήσεων.

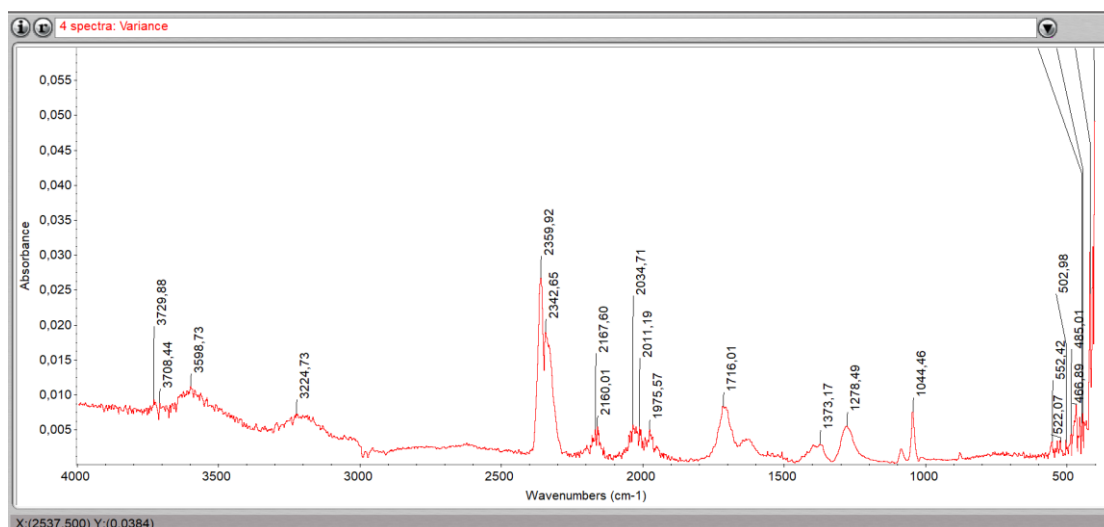
Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει τα φάσματα YPD και BrettYPD1millcfu.

Από την παρατήρηση των δύο φασμάτων βλέπουμε οι απορροφήσεις είναι μεγαλύτερες αλλά υπάρχει και μια πιο έντονη διαταραχή μεταξύ του 1550-1350. Παρατηρούνται πιο έντονες κορυφές στα 1457,24 στα 1081,52 και στα 1044,36 στο φάσμα του δείγματος BrettYPD1millcfu.

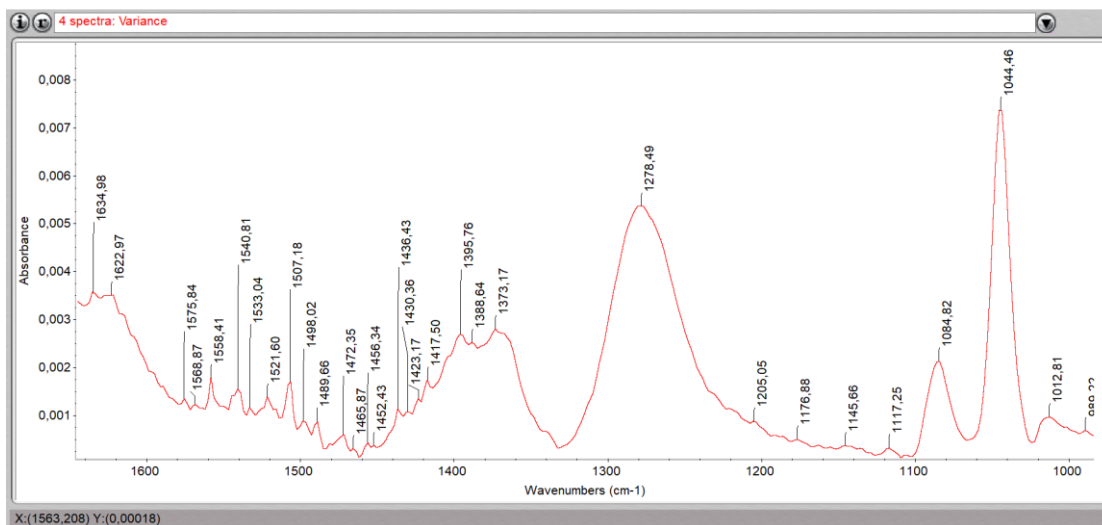


Εικόνα 4.0.8 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των δειγμάτων: YPD, BrettYPD1millcfu, την ημέρα 0 των μετρήσεων.

Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει την διακύμανση των φασμάτων YPD και BrettYPD1millcfu. Παρατηρούμε ότι εντοπίζονται διαφορές σε όλο το εύρος του φάσματος. Με την περιοχή του φάσματος 1600-1450 να εμφανίζει μια έντονη διαταραχή. Οι πιο έντονες κορυφές εντοπίζονται στα 1417,56, στα 1411,76, στα 1398,85. Καθώς επίσης και στα 1122,51, στα 1081,78 και στα 1044,74.

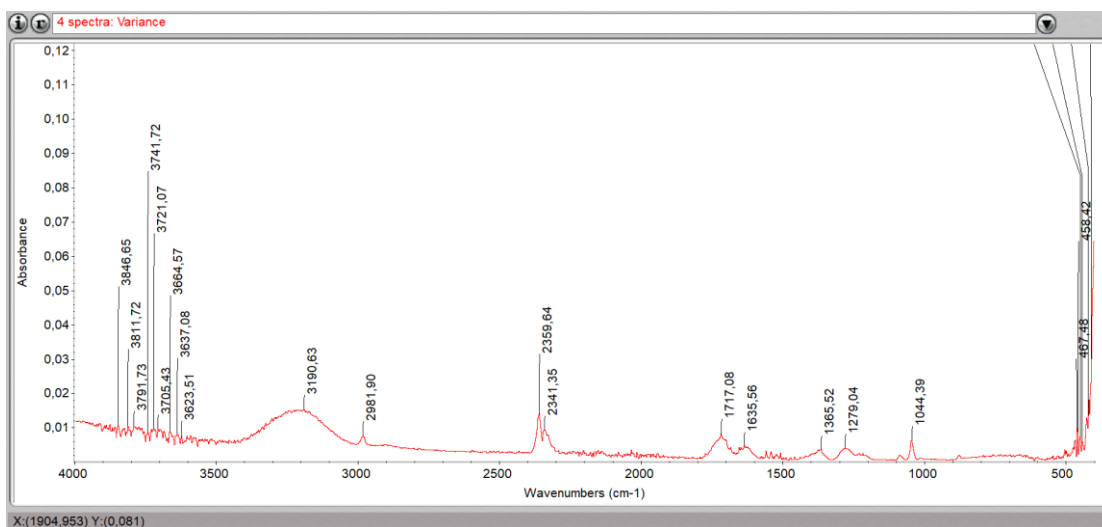


Εικόνα 4.0.9 Συνολική εικόνα διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRed105, Brett2Red105, Brett3Red105 και Brett4Red105.

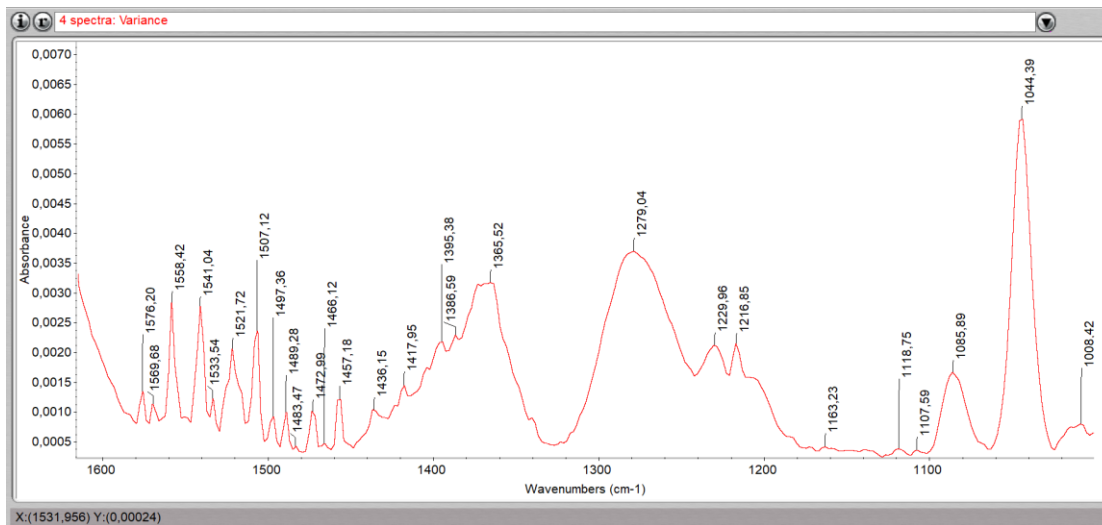


Εικόνα 4.0.10 Διακύμανση των δειγμάτων: BrettRed105, Brett2Red105, Brett3Red105 και Brett4Red105, στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.

Από την παρατήρηση της παραπάνω εικόνας για την διακύμανση του μύκητα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση 10^5 cfu/ml βλέπουμε μια έντονη διαταραχή στο φάσμα από τα 1600 έως 1450. Έπειτα παρατηρούμε τρεις χαρακτηριστικές κορυφές στα 1395,76, στα 1388,64, 1371,17 και στα 1278,49. Η περιοχή μεταξύ του 1450 και 1278 cm^{-1} είναι πολύ πολύπλοκη και περιέχει πληροφορίες που σχετίζονται με το τέντωμα $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$, CH_2 και $\text{C}-\text{H}$ για αλδεΐδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες, περίπου στα 1457–1427 cm^{-1} (Tarantilis.,2008). Ακόμα σύμφωνα με την βιβλιογραφία η καμπύλη στα 1278,49 θα μπορούσε να οφείλεται στην 4-αιθυλ γουακόλη. Ακόμα εμφανίζεται μια κορυφή στα 1176 περίπου όπου και εμφανίζεται στις χαρακτηριστικές κορυφές της 4 αιθυλ-φαινόλης .



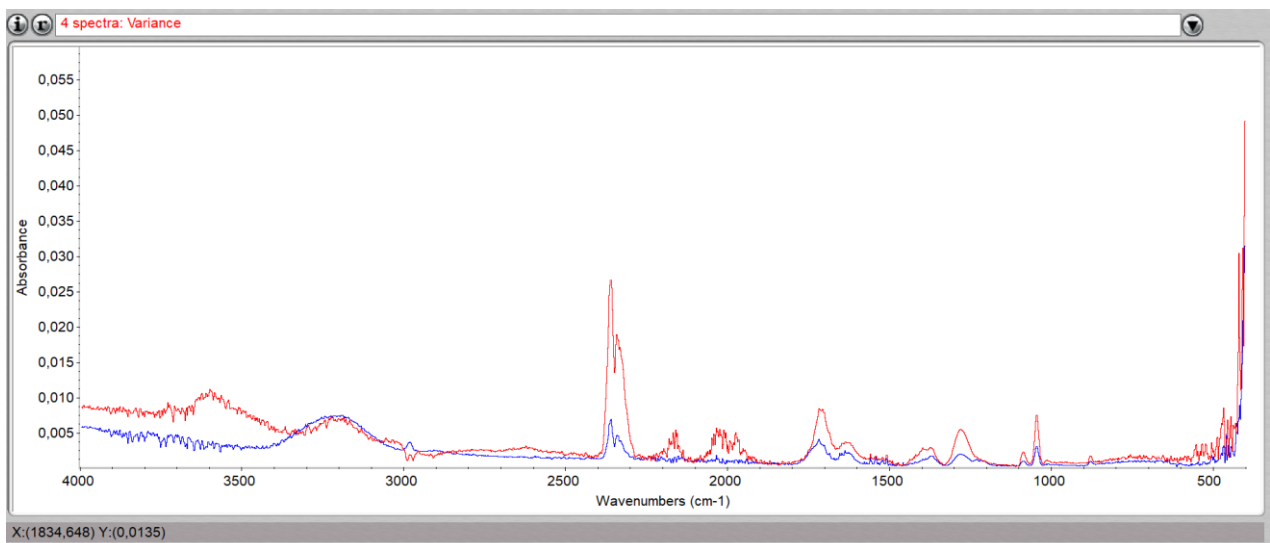
Εικόνα 4.0.11 Συνολική εικόνα διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRed104, Brett2Red104, Brett3Red104 και Brett4Red104.



Εικόνα 4.0.12 Διακύμανση των δειγμάτων: BrettRed104, Brett2Red104, Brett3Red104 και Brett4Red104 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε την διακύμανση του μύκητα με συγκέντρωση 10^4 στην πάροδο των ημερών 28-31. Βλέπουμε πως εξακολουθεί να υπάρχει μια έντονη διαταραχή μεταξύ 1600-1450. Οι καμπύλες στα 1395 έως 1373 εμφανίζονται αλλά σε μια μικρότερη απορρόφηση. Πιο συγκεκριμένα η κορυφή στα 1395,76 μειώθηκε 1395,38. Ακόμα παρατηρούνται οι κορυφές στα 1365,52 και αυτή στα 1279,04, η οποία μπορεί να οφείλεται βάση βιβλιογραφίας στην 4-αιθυλογλουκώλη.

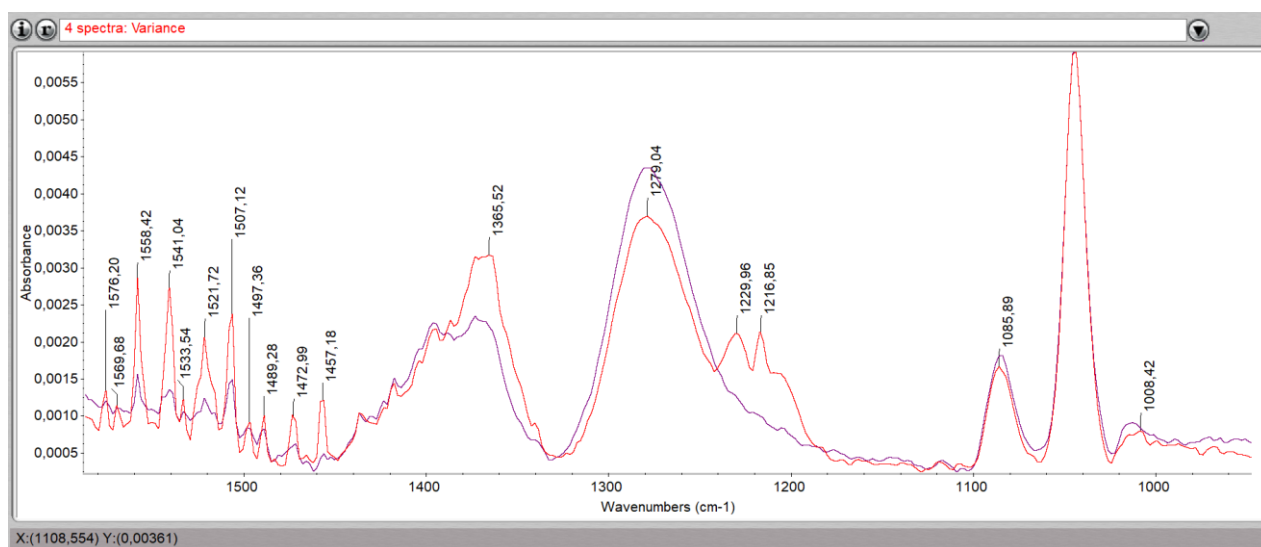
Αυτό που πρέπει να τονιστεί εδώ είναι η απότομη αύξηση στην απορρόφηση των κορυφών 1229,95 και 1216,85. Οι παραπάνω κορυφές σύμφωνα με την βιβλιογραφία αφορούν τεντώματα και κραδασμούς κάμψης και αποδίδονται σε αλδεϋδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες (Banc et al.,2014;Boulet et al.,2007)



Εικόνα 4.0.13 Επικάλυψη των διακυμάνσεων του μύκητα με συγκέντρωση μύκητα 10^5 cfu/ml

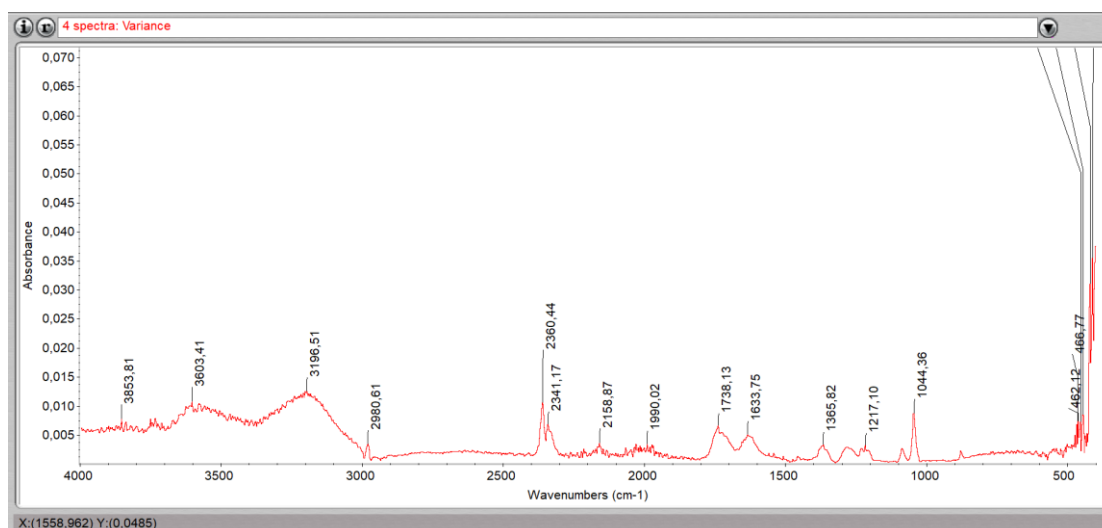
στο πέρας των ημερών (κόκκινο) και αυτού με συγκέντρωση 10^4 cfu/ml (μπλε).

Από την παρατήρηση της παραπάνω εικόνας βλέπουμε μεγαλύτερες απορροφήσεις στο φάσμα του δείγματος με την μεγαλύτερη συγκέντρωση μύκητα.

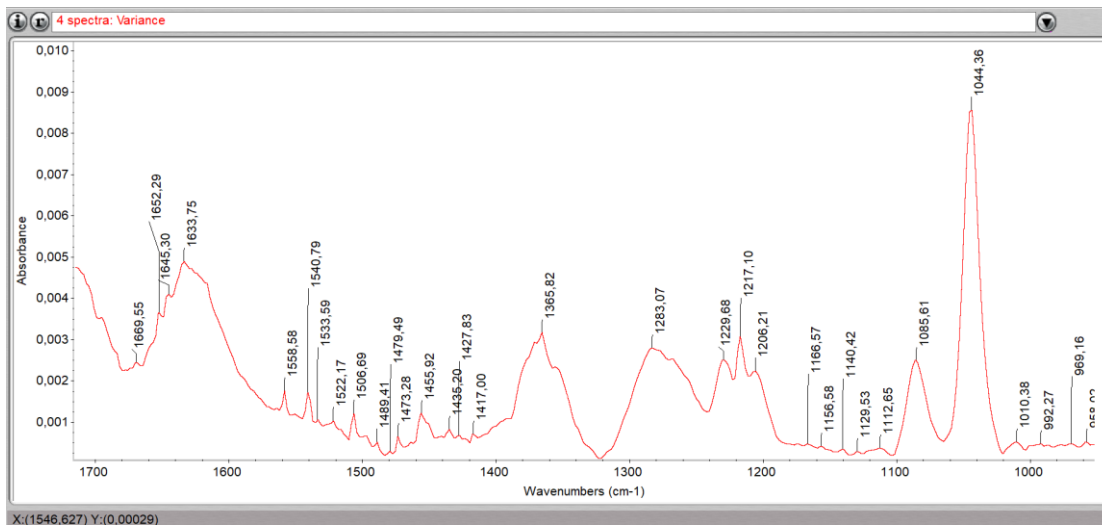


Εικόνα 4.0.14 Επικάλυψη των διακυμάνσεων του μύκητα με συγκέντρωση μύκητα 10^5 cfu/ml στο πέρας των ημερών (μοβ) και αυτού με συγκέντρωση 10^4 cfu/ml (κόκκινο), στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.

Από την παρατήρηση της παραπάνω εικόνας στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος βλέπουμε την εμφάνιση δύο νέων κορυφών στα 1229,96 και στα 1216,85 όπως προαναφέρθηκαν στην ανάλυση της εικόνας 4.0.12.



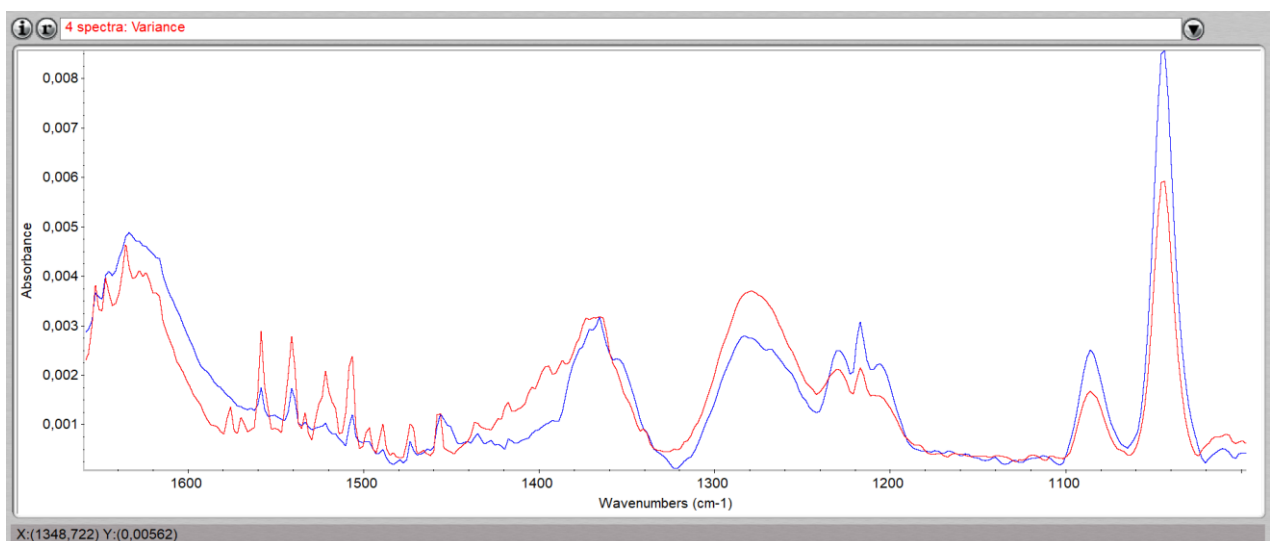
Εικόνα 4.0.15 Συνολική εικόνα διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRed103, Brett2Red103, Brett3Red103 και Brett4Red103.



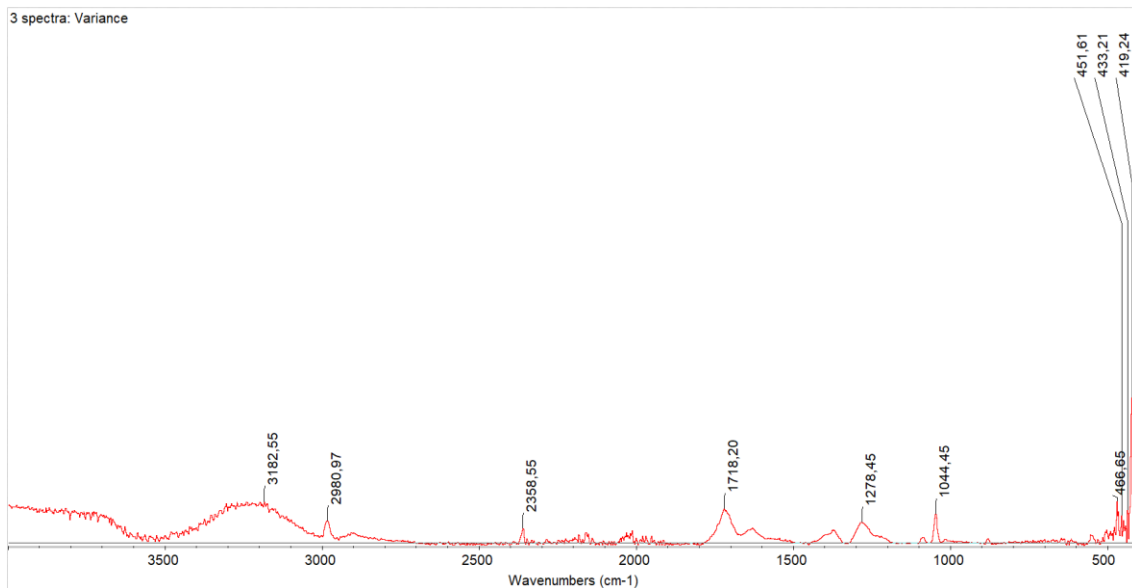
Εικόνα 4.0.16 Διακύμανση των δειγμάτων: BrettRed103, Brett2Red103, Brett3Red103 και Brett4Red103 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.

Από την παρατήρηση της παραπάνω εικόνας για την διακύμανση του μήκητα με την μικρότερη συγκέντρωση 104 cfu/ml βλέπουμε μια έντονη διαταραχή στο φάσμα από τα 1600 έως 1450. Ακόμα παρουσιάζονται έντονες κορυφές στα 1365,82, στα 1283,07, όπου η απορρόφηση της δεν εμφανίζεται τόσο υψηλά όπως στα προηγούμενα φάσματα των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων του μήκητα.

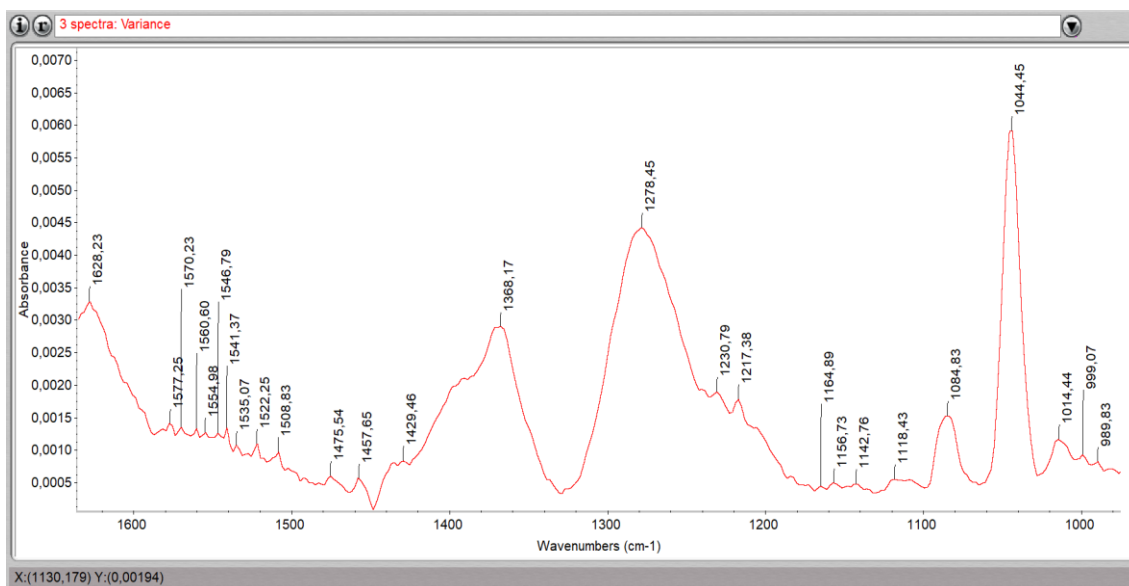
Ακόμα οι κορυφές 1229,68/ 1217,10 και 1206,21 εμφανίζουν έντονες κορυφές απορροφήσεων.



Εικόνα 4.0.17 Επικάλυψη των διακυμάνσεων του μήκητα με συγκέντρωση μήκητα 10^4 cfu/ml στο πέρας των ημερών (κόκκινο) και αυτού με συγκέντρωση 10^3 cfu/ml (μπλε), στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.



Εικόνα 4.1 Συνολική εικόνα Διακύμανσης των BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103 την ημέρα 28.



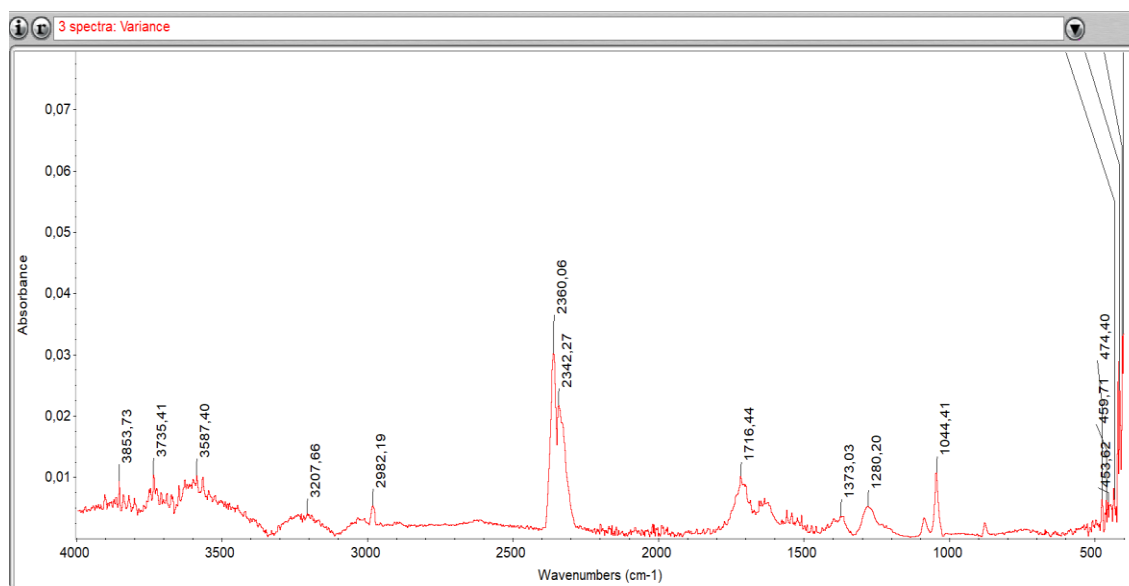
Εικόνα 4.1.1 Διακύμανση των BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103 την ημέρα 28 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.

Στη παραπάνω εικόνα παρατηρούμε τη διακύμανση των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων την 1^η ημέρα, ημέρα 28^η των μετρήσεων, δηλαδή των δειγμάτων BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103. Παρατηρούμε τρεις χαρακτηριστικές κορυφές στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος Πιο συγκεκριμένα στα 1486,17, στα 1278,45 και στο 1044,45.

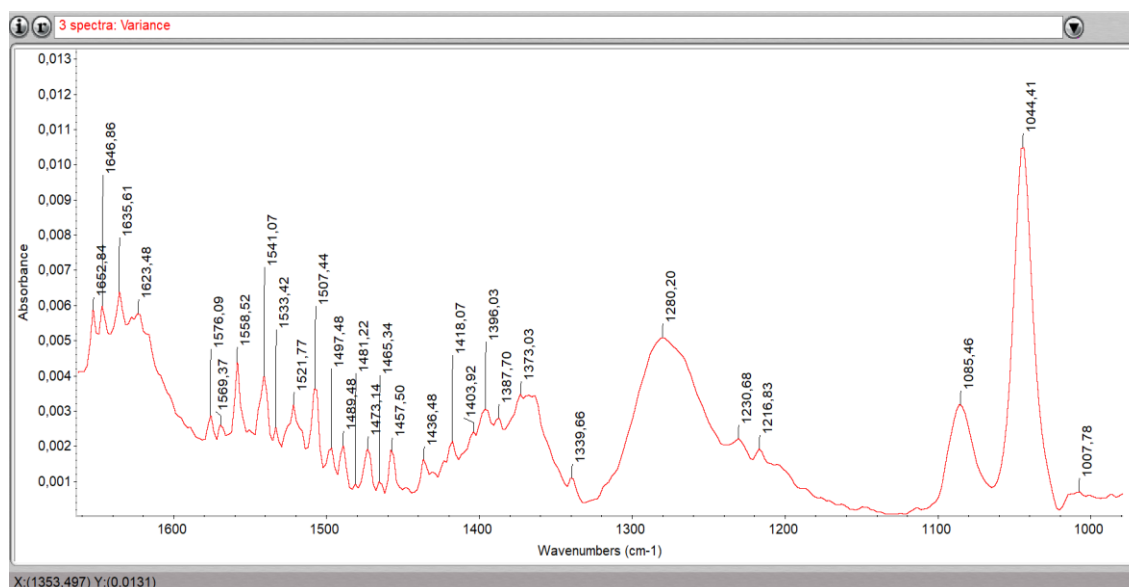
Η κορυφή στο 1044,45 ενδεχομένως οφείλεται σε κορυφή της αιθανόλης βάση της βιβλιογραφίας (Friedel et al., 2013; Zhang et al., 2010).

Η περιοχή μεταξύ του 1450 και 1278 cm^{-1} είναι πολύ πολύπλοκη και περιέχει πληροφορίες που σχετίζονται με το τέντωμα C=O, C=C, CH₂ και C–H για αλδεΐδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες, περίπου στα 1457–1427 cm^{-1} (Tarantilis.,2008).

Ακόμα παρατείνεται μια διαταραχή στο φάσμα μεταξύ του 1600 έως 1450, όπου σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι Banc et al.,(2014) αναφέρουν ότι σχετίζεται με το τέντωμα C–N στην περιοχή και αφορά αμινοξέα και τα παράγωγα 1600-1530. Επίσης οι περιοχές 1610–1614 και 1519–1516 αφορούν το C=C δεσμό και αποδίδεται σε αρωματικές συγκεντρώσεις και φλαβονοειδή (Tarantilis et al., 2008; Basalekou et al., 2017)



Εικόνα 4.1.2 Συνολική εικόνα Διακύμανσης των Brett2RED105, Brett2RED104, Brett2RED103 την ημέρα 29.



Εικόνα 4.1.3 Διακύμανση των Brett2RED105, Brett2RED104, Brett2RED103 την ημέρα 29 στην

περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.

Το φάσμα στη παραπάνω εικόνα αντιπροσωπεύει τη διακύμανση των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων του μύκητα την ημέρα 2, ημέρα 29^η των μετρήσεων, δηλαδή των δειγμάτων Brett2RED105, Brett2RED104, Brett2RED103. Σε σύγκριση με το φάσμα της ημέρας 1^{ης} διακρίνουμε μεγαλύτερες απορροφήσεις και κορυφές στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 1600-1450.

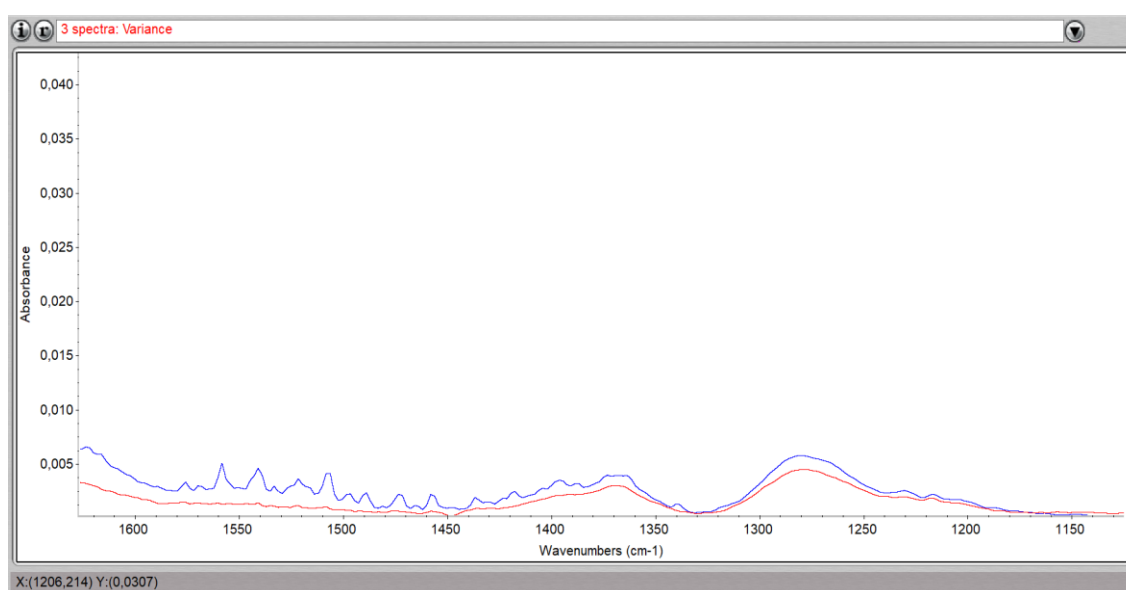
Παρατηρούμε επίσης ότι η κορυφή στο 1278,45 του αντίστοιχου φάσματος της πρώτης ημέρας έχει αυξηθεί στο 1280,20.

Ακόμα είναι λογικό η κορυφή της αιθανόλης να μειώνεται με το πέρας των ημερών. Έτσι από το αντίστοιχο φάσμα της πρώτης ημέρας όπου η απορρόφηση στην κορυφή της αιθανόλης είναι 1044,45 έχει μειωθεί στο 1044,41.

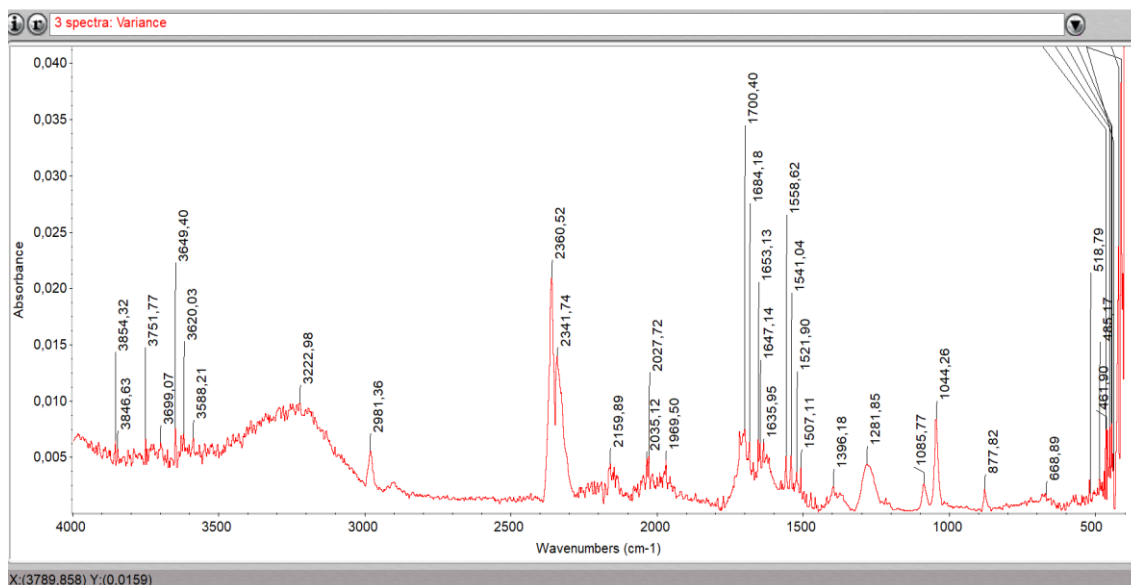
Επίσης η κορυφή στο 1373,03 εμφανίστηκε ως μια καινούργια κορυφή όπως και στο 1339,66 .

Η περιοχή μεταξύ του 1457 έως 1288 ,σύμφωνα με τον Cozzolino et al., (2011), αφορά αλδεΐδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες. Έτσι, και στο παραπάνω φάσμα όπως παρατηρούμε την κορυφή στο 1373,03.

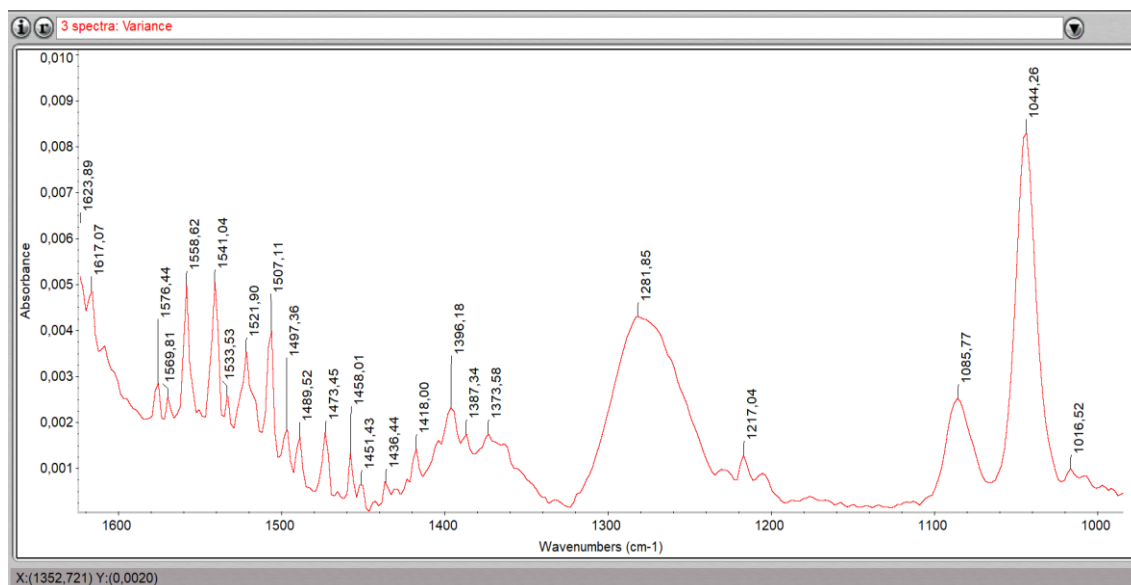
Στην παρακάτω εικόνα δίνεται η σύγκριση της Διακύμανσης των δειγμάτων την ημέρα 28 και της Διακύμανσης των δειγμάτων την ημέρα 29.



Εικόνα 4.1.4 Επικάλυψη των διακυμάνσεων ημέρα 28(κόκκινο) και ημέρα 29 (μπλε).



Εικόνα 4.1.5 Συνολική εικόνα διακύμανσης των Brett3RED105, Brett3RED104, Brett3RED103 την ημέρα 30.



Εικόνα 4.1.6 Διακύμανση των Brett3RED105, Brett3RED104, Brett3RED103 την ημέρα 30 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται η διακύμανση των δειγμάτων της τρίτης ημέρας, ημέρα 30^η των μετρήσεων, πιο συγκεκριμένα των δειγμάτων: Brett3RED105, Brett3RED104, Brett3RED103.

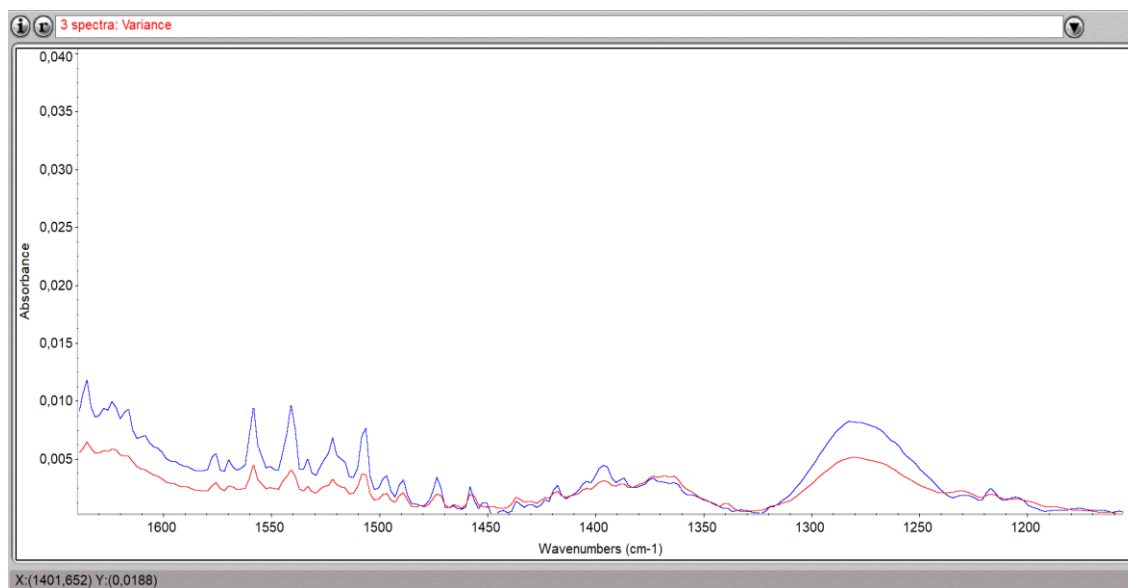
Βλέπουμε πώς στην περιοχή του φάσματος μεταξύ του 1600 και του 1450 εμφανίζονται μεγαλύτερες απορροφήσεις και πιο απότομες από το αντίστοιχο φάσμα της προηγούμενης ημέρας, 2^{ης} ημέρας και ως εκ του του και της ημέρας πρώτης.

Ακόμα η κορυφή στο 1280,20 του αντίστοιχου φάσματος της προηγούμενης ημέρας έχει αυξηθεί και πάλι στα 1281,85.

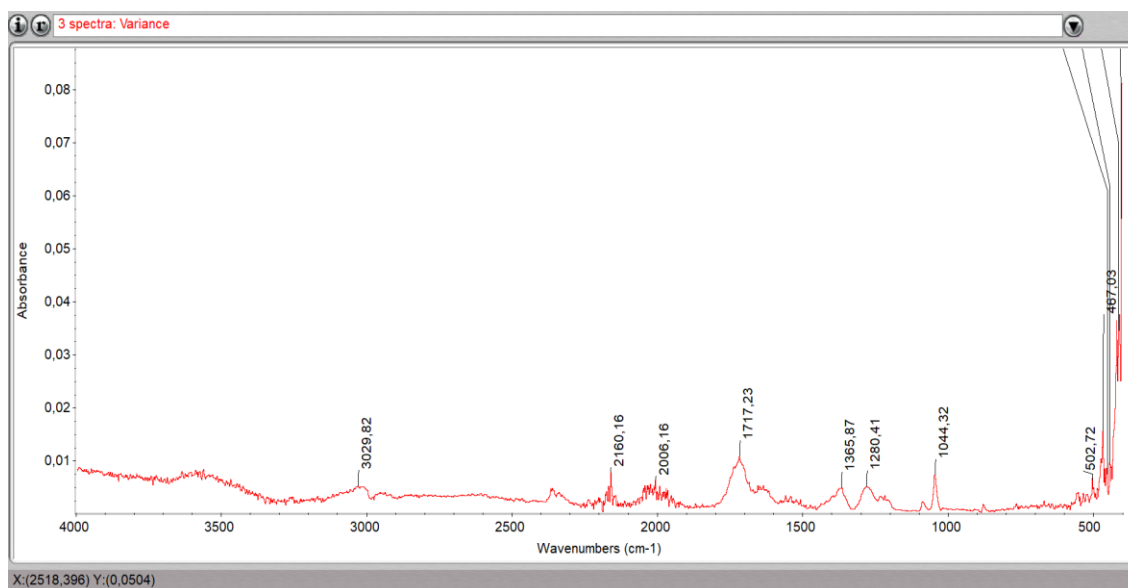
Επίσης η κορυφή στο 1373,03 της προηγούμενης ημέρας αυξήθηκε στα 1373,58 .

Επιπρόσθετα, η καμπύλη και πάλι στο 1044,41, όπου αφορά την αιθανόλη έχει μειωθεί από την προηγούμενη ημέρα, έχει μειωθεί στο 1044,26.

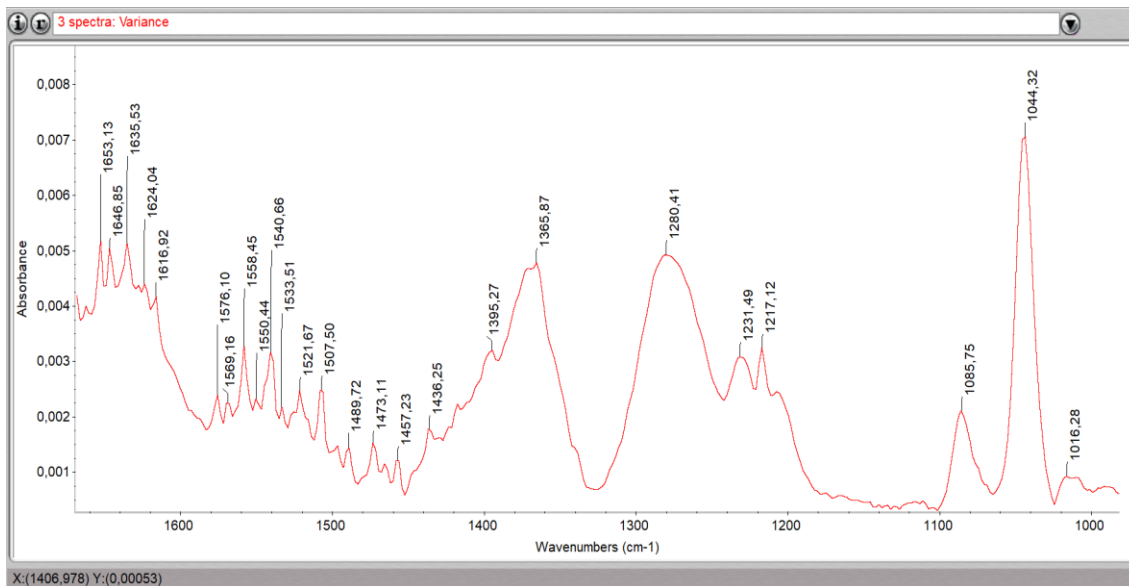
Παρακάτω στην εικόνα παρουσιάζεται η σύγκριση των διακυμάνσεων.



Εικόνα 4.1.7 επικάλυψη των διακυμάνσεων ημέρα 29(κόκκινο) και ημέρα 30 (μπλε).



Εικόνα 4.1.8 Συνολική εικόνα διακύμανσης των Brett4RED105, Brett4RED104, Brett4RED103 την ημέρα 31.



Εικόνα 4.1.9 Διακύμανση των Brett4RED105, Brett4RED104, Brett4RED103 την ημέρα 31 στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.

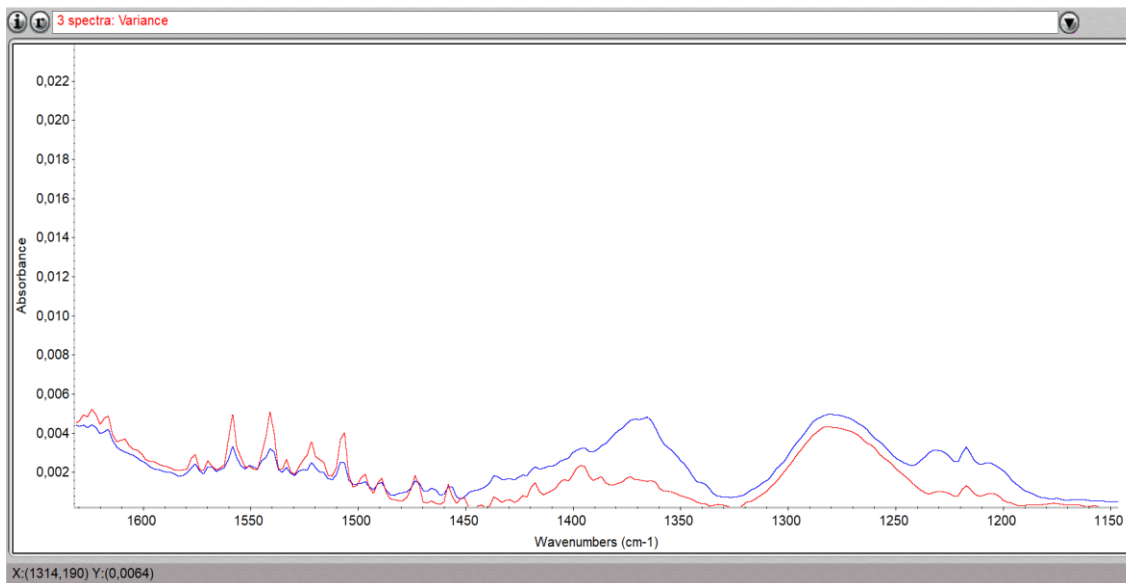
Στη παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται η διακύμανση των δειγμάτων της τέταρτης ημέρας, ημέρα 31^η των μετρήσεων, πιο συγκεκριμένα των δειγμάτων: Brett4RED105, Brett4RED104, Brett4RED103.

Στην περιοχή μεταξύ 1600 έως 1450 παρατηρούνται στην συγκεκριμένη περίπτωση χαμηλότερες απορροφήσεις.

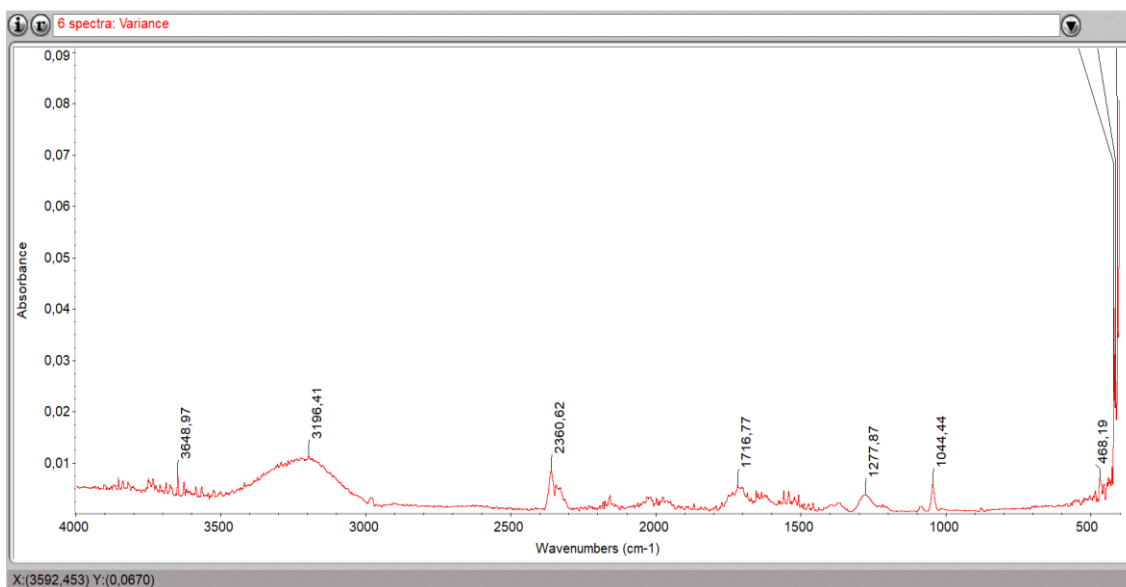
Στο 1365,87 εμφανίζεται μια απότομη αύξηση η οποία δεν είχε παρατηρηθεί σε τόσο υψηλή απορρόφηση στα αντίστοιχα φάσματα των προηγούμενων ημερών. Όπως αναφέρθηκε, η περιοχή μεταξύ του 1457 έως 1288 ,σύμφωνα με τον Cozzolino et al., (2011), αφορά αλδεϋδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες.

Η κορυφή στο αντίστοιχο φάσμα της προηγούμενης ημέρας στο 1281,85 μετατοπίστηκε στα 1280,41.

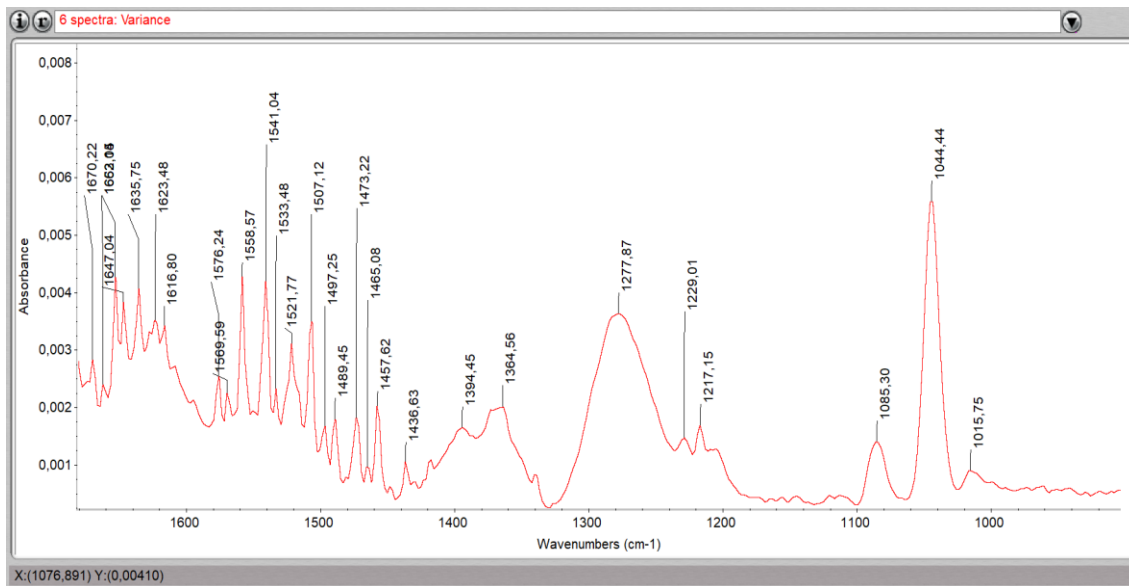
Τέλος η κορυφή στο 1044,26 της 3^{ης} ημέρας, ανέβηκε στα 1044,32 ενδεχομένως λόγω σφάλματος. Στην παρακάτω εικόνα δίνεται η σύγκριση των διακυμάνσεων της ημέρα 30 των δειγμάτων και της ημέρας 31.



Εικόνα 4.1.10 Επικάλυψη διακυμάνσεων ημέρα 30 (κόκκινο) και ημέρα 31 (μπλε)



Εικόνα 4.1.11 Συνολική εικόνα διακύμανσης των BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103, YPDRED101, YPDRED102, YPDRED103 την ημέρα 28 λήψης των δειγμάτων.

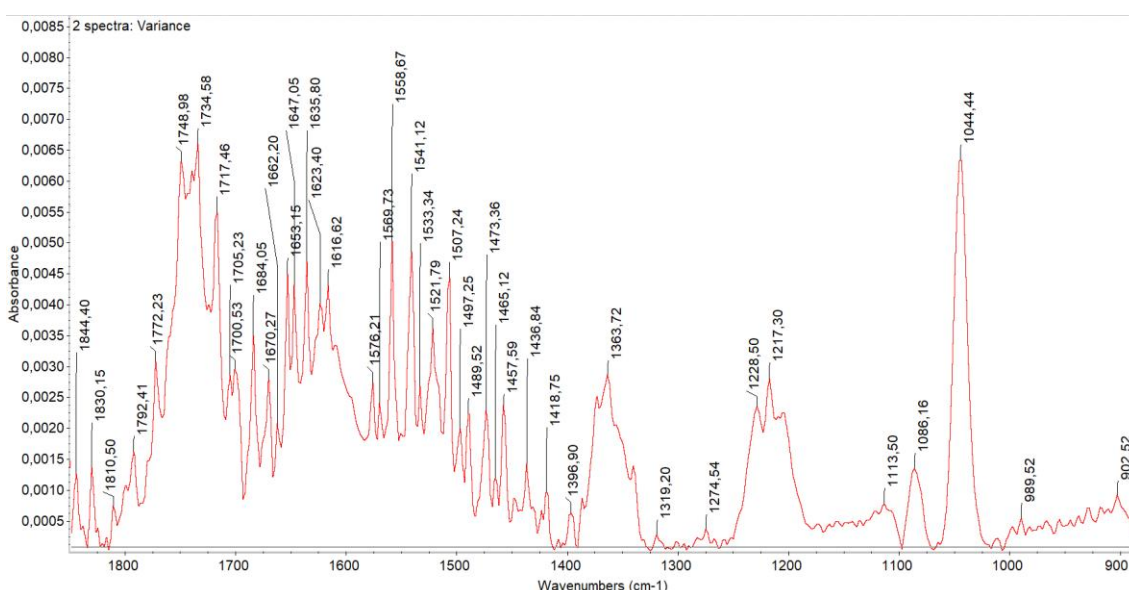


Εικόνα 4.1.12 Διακύμανση των BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103, YPDRED101, YPDRED102, YPDRED103 την ημέρα 28 λήψης των δειγμάτων στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος.

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε το φάσμα που είναι το αποτέλεσμα της διακύμανσης όλων των δειγμάτων του κρασιού με το μύκητα της πρώτης ημέρας στις διαφορετικές συγκεντρώσεις και των δειγμάτων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του οίνου με το YPD. Πιο συγκεκριμένα είναι το variance των δειγμάτων:

BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103, YPDRED101, YPDRED102, YPDRED103.

Παρατηρούμε πως στην περιοχή του φάσματος μεταξύ του 1600 και 1450 εξακολουθεί να υπάρχει μια έντονη αναστάτωση καθώς επίσης εμφανίζεται μια έντονη κορυφή στο 1277,87.



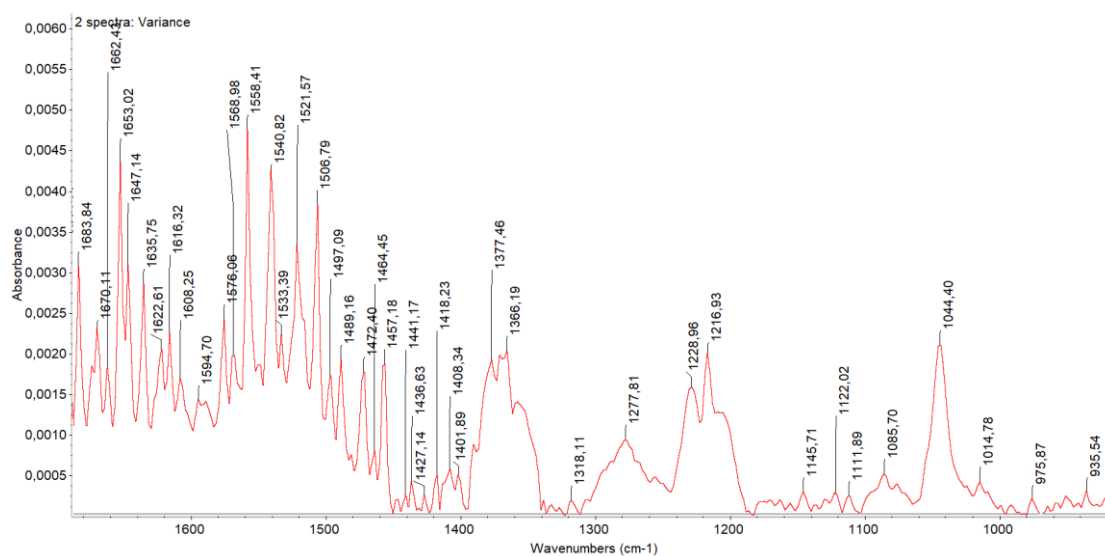
Εικόνα 4.1.13 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED105 και YPDRED101 την ημέρα 28 λήψης των δειγμάτων.

Στη παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται η διακύμανση της πρώτης ημέρας των δειγμάτων: BrettRED105 και YPDRED101

Στην περιοχή μεταξύ του 1600 έως 1400 εμφανίζεται και εδώ μια έντονη διαταραχή με απότομες κορυφές απορροφήσεων. Συγκεκριμένα στις κορυφές:

1558,67/ 1541,12/ 1521,79/ 1507,24/ 1489,52/ 1473,36/ 1457,57.

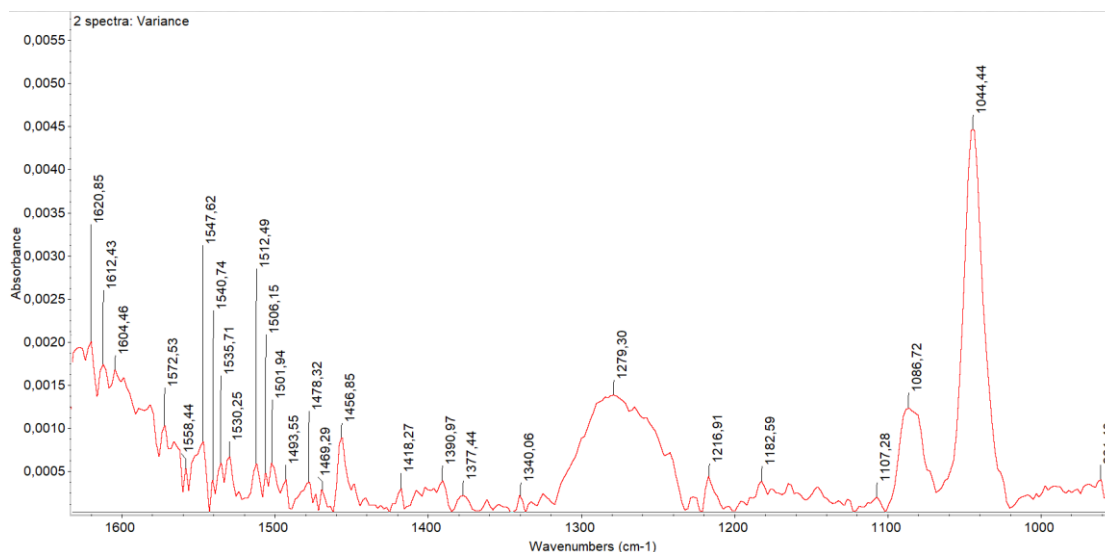
Ακόμα επίσης παρατηρούνται οι κορυφές 1363,72/1228,50/1274,54 και 1217,30.



Εικόνα 4.1.14 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED104 και YPDRED102 την ημέρα 28 λήψης των δειγμάτων.

Στη παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται η διακύμανση της πρώτης ημέρας των δειγμάτων: BrettRED104 και YPDRED102

Συγκριτικά με το παραπάνω φάσμα variance της ίδιας ημέρας αλλά με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τόσο του μύκητα όσο και του YPD, ενώ η διαταραχή εξακολουθεί να υπάρχει στην περιοχή του φάσματος 1600- 1400. Βλέπουμε πως οι απορροφήσεις είναι χαμηλότερες. Το οποίο είναι λογικό λόγω των χαμηλότερων συγκεντρώσεων τόσο του εμβολιασμένου μύκητα όσο και του YPD



Εικόνα 4.1.15 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED103 και YPDRED103 την ημέρα 28 λήψης των δειγμάτων.

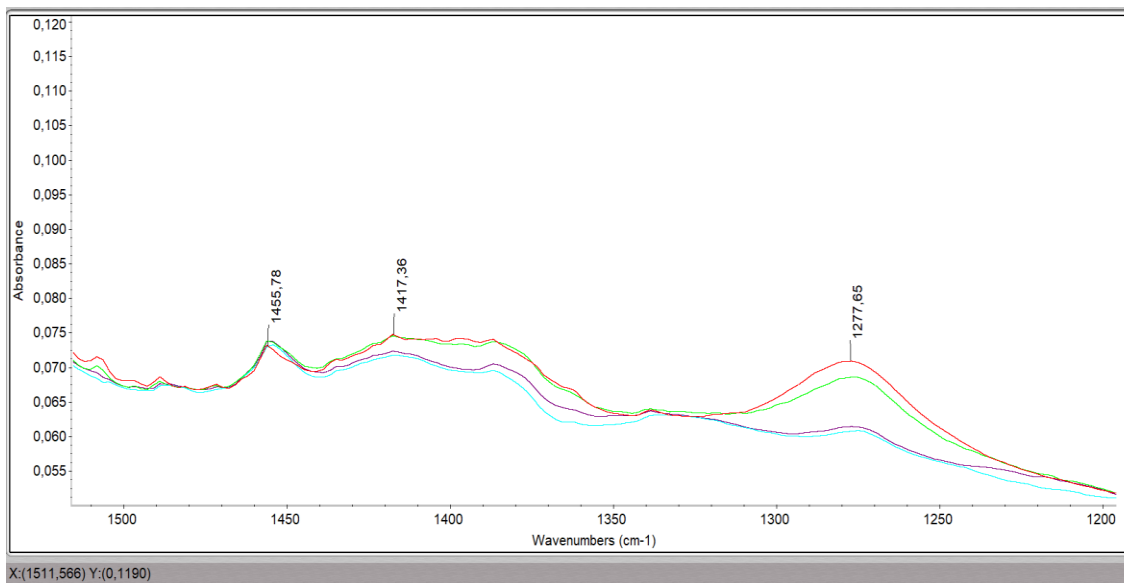
Στη παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται η διακύμανση της πρώτης ημέρας των δειγμάτων: BrettRED103 και YPDRED103

Στο παραπάνω φάσμα παρατηρούμε πώς στην περιοχή μεταξύ του 1600 έως 1450 παρουσιάζεται μια μικρή διαταραχή στο φάσμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η ταραχή αυτή έχει μικρότερες απορροφήσεις τόσο από το Variance των BrettRED104 και YPDRED102 όσο και των BrettRED105 και YPDRED101.

Το παραπάνω φαίνεται να είναι άκρως φυσιολογικό όσο και αναμενόμενο καθώς σε αυτό το φάσμα έχουμε την μικρότερη συγκέντρωση του μύκητα 10^3 εμβολιασμένου στον οίνο όσο και την μικρότερη συγκέντρωση του YPD σε οίνο και πάλι 10^3

Έτσι από τα παραπάνω τρία Variances, εικόνες 4.1.10, 4.1.11, 4.1.12, παρατηρούμε ότι είναι λογική η μείωση των απορροφήσεων και η μικρότερη διαταραχή που εντοπίζεται σε αυτή την περιοχή καθώς όσο μικραίνουν οι συγκεντρώσεις είναι λογικό η ανάπτυξη του μύκητα και η συμβολή του στο κρασί να είναι μικρότερη.

4.2 Επικάλυψη δειγμάτων πρώτου μήνα



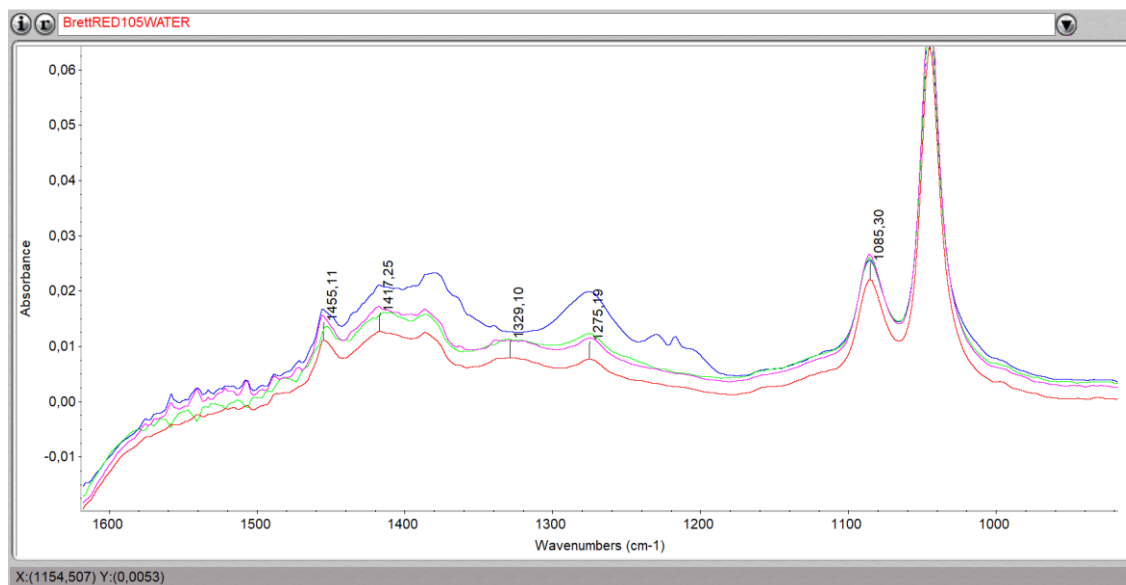
Εικόνα 4.2.0 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED105(γαλάζιο), Brett2RED105(κόκκινο), Brett3RED105(μωβ), Brett4RED105(πράσινο).

Στο παραπάνω φάσμα απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του κρασιού με την μεγαλύτερη συγκέντρωση του εμβολιασμένου μύκητα ανά ημέρα, πιο συγκεκριμένα ο μύκητας βρίσκεται σε συγκέντρωση 10^5 cfu/ml .

Δείγματα: BrettRED105, Brett2RED105, Brett3RED105, Brett4RED105

Μετά από την επεξεργασία του φάσματος, κοινή κλίμακα, παρατηρούμε ότι το BrettRED105 εμφανίζει τις μικρότερες συγκεντρώσεις. Επίσης στην περιοχή γύρω στο 1455 οι διαφορές είναι μικρές αλλά η μεγαλύτερη απορρόφηση εντοπίζεται στο Brett4RED105, δηλαδή στο δείγμα της 4^{ης} ημέρας.

Ακόμα, το Brett2RED105 εμφανίζει μια γρηγορότερη ανάπτυξη, καθώς επί το πλείστον έχει τις μεγαλύτερες απορροφήσεις. Μάλιστα στην κορυφή 1277 έχει υψηλότερη απορρόφηση από το Brett2RED105.



Εικόνα 4.2.1 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED105WATER(κόκκινο), Brett2RED105WATER (πράσινο), Brett3RED105WATER (ροζ), Brett4RED105WATER (μπλε), έχοντας ως υπόβαθρο το νερό.

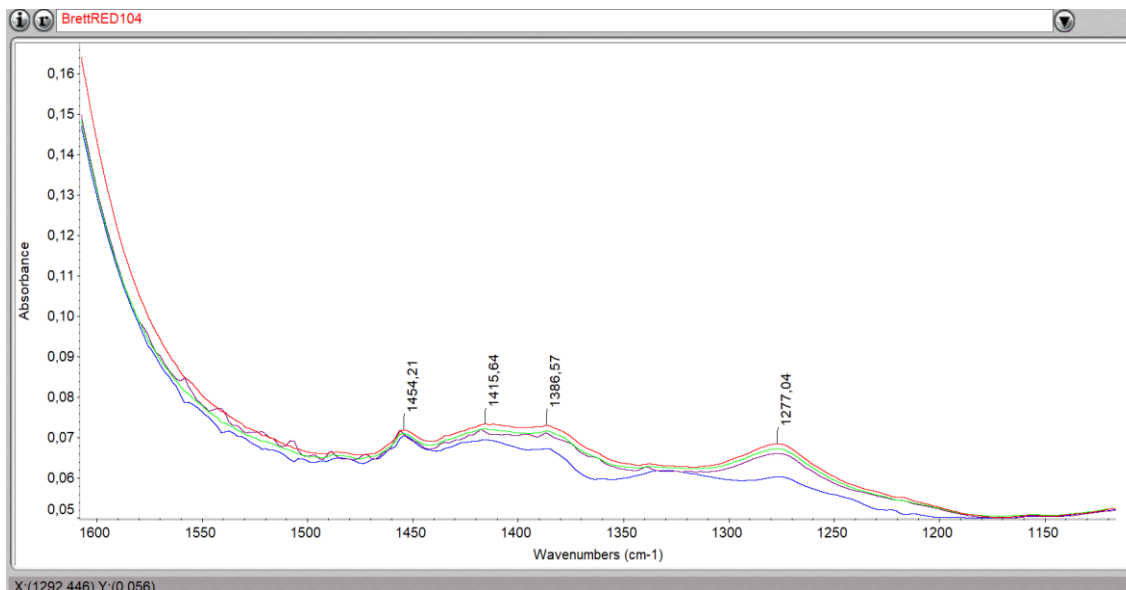
Στο παραπάνω φάσμα ως υπόβαθρο χρησιμοποιήθηκε το νερό όπως αναφέρθηκε στην διαδικασία του πειράματος. Απεικονίζονται τα φάσματα του κρασιού ανά ημέρα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μήκητα 10^5

Δείγματα: BrettRED105WATER, Brett2RED105WATER, Brett3RED105WATER, Brett4RED105 WATER

Παρατηρούμε ότι στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος εξακολουθεί να παρουσιάζεται η κορυφή στο 1455 περίπου. Το δείγμα Brett4RED105WATER εμφανίζει την μεγαλύτερη απορρόφηση, ενώ το δείγμα Brett3RED105WATER βρίσκεται σε μικρότερη απορρόφηση συγκριτικά με το δείγμα της πρώτης ημέρας που μετρήθηκε BrettRED105WATER.

Στο 1380 περίπου, την υψηλότερη απορρόφηση εξακολουθεί να εμφανίζει το Brett4RED105WATER, και γενικότερα σε όλη την περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος. Σε αντίθεση έρχεται στο 1380 οι απορροφήσεις του BrettRED105WATER και Brett2RED105WATER καθώς η διαφορά μεταξύ τους είναι ελάχιστη.

Τέλος στο 1275 περίπου, η χαμηλότερη απορρόφηση παρουσιάζεται στο δείγμα της πρώτης ημέρας BrettRED105WATER. Ενώ για το Brett2RED105WATER εντοπίζεται μια υψηλότερη κορυφή, η οποία είναι υψηλότερη από το Brett3RED105WATER αλλά χαμηλότερη από το Brett4RED105WATER.



Εικόνα 4.2.2 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED104(κόκκινο), Brett2RED104(μπλε), Brett3RED104(μοβ), Brett4RED104(πράσινο).

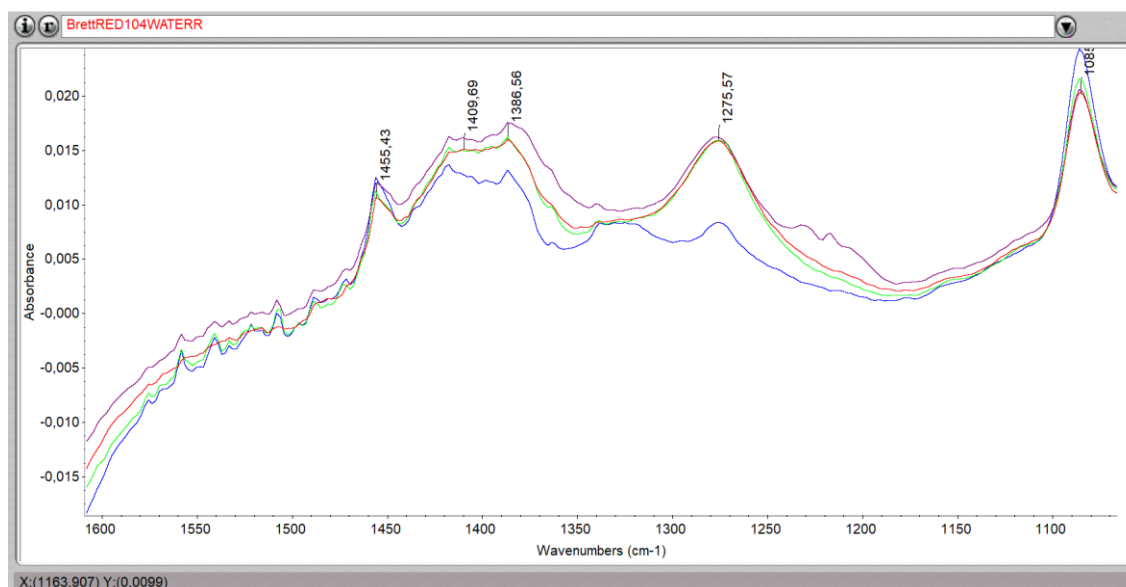
Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του κρασιού με την μεσαία συγκέντρωση του εμβολιασμένου μύκητα ανά ημέρα, πιο συγκεκριμένα ο μύκητας βρίσκεται σε συγκέντρωση 10^4 cfu/ml .

Δείγματα: BrettRED104, Brett2RED104, Brett3RED104, Brett4RED104

Στο παραπάνω φάσμα παρατηρούμε ότι τις μεγαλύτερες σε πλειοψηφία απορροφήσεις αντιστοιχούν στο Brett4RED104. Στην περιοχή όμως γύρω στο 1454 το δείγμα Brett3RED104 παρουσιάζει μεγαλύτερη απορρόφηση. Στην κατώτατη θέση έρχεται στην συγκεκριμένη κορυφή το BrettRED104 δηλαδή το δείγμα που μετρήθηκε την πρώτη μέρα, ενώ από πάνω του σε μεγαλύτερη συγκέντρωση έρχεται το δείγμα της δεύτερης ημέρας Brett2RED104.

Παρόλα αυτά, σε μια γενική εικόνα το φάσματος για το δείγμα Brett2 RED104 παρατηρείται ότι εμφανίζει τις μικρότερες απορροφήσεις, πράγμα που μπορεί να οφείλεται ενδεχομένως σε μια καθυστέρηση της ανάπτυξης.

Τέλος στο 1277 περίπου παρατηρείται πώς τόσο το Brett3RED104 και το Brett2RED104 εμφανίζουν χαμηλότερες απορροφήσεις από το δείγμα της πρώτης ημέρας BrettRED104.



Εικόνα 4.2.3 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED104WATER(κόκκινο), Brett2RED104WATER (μπλε), Brett3RED104WATER (μοβ), Brett4RED104WATER (πράσινο), έχοντας ως υπόβαθρο το νερό.

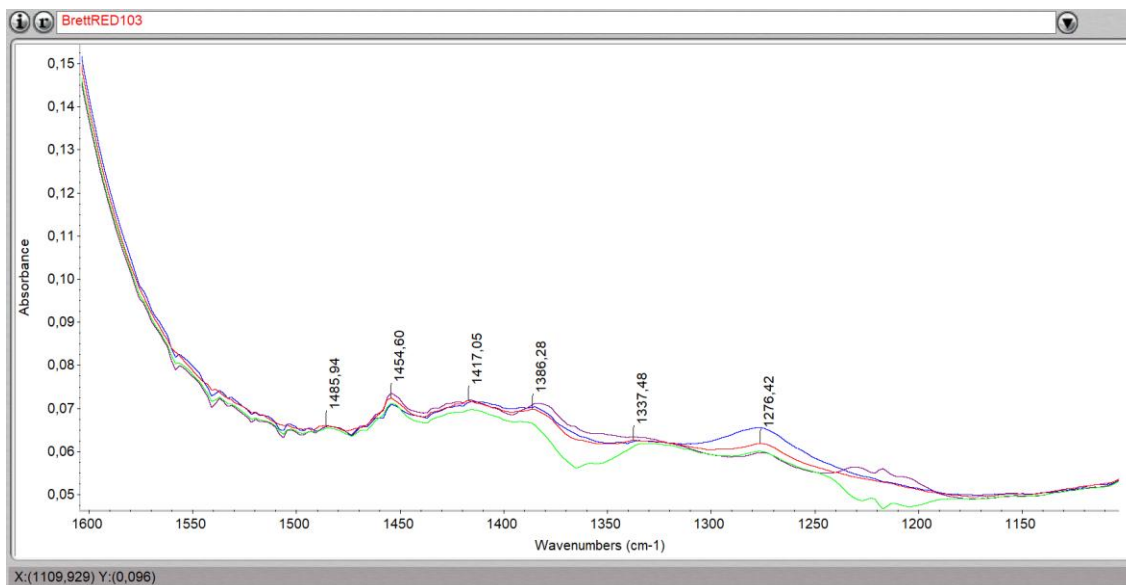
Στο παραπάνω φάσμα ως υπόβαθρο χρησιμοποιήθηκε το νερό όπως αναφέρθηκε στην διαδικασία του πειράματος. Απεικονίζονται τα φάσματα του κρασιού ανά ημέρα με τη μεσαία συγκέντρωση μήκητα 10^4

Δείγματα: BrettRED104WATER, Brett2RED104WATER, Brett3RED104WATER, Brett4RED104WATER

Παρατηρούμε ότι στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος εξακολουθεί να παρουσιάζεται η κορυφή στο 1455 περίπου. Οι απορροφήσεις και των τεσσάρων δειγμάτων είναι κοντά, με την χαμηλότερη να ανήκει στο BrettRED104, της πρώτης ημέρας.

Και πάλι στην παραπάνω εικόνα φαίνεται το δείγμα Brett2RED104 να παρουσιάζει τις μικρότερες απορροφήσεις ενώ στο 1455 περίπου κατέχει την υψηλότερη απορρόφηση.

Σε αντίθεση έρχεται το Brett4RED104 καθώς ενώ όταν είχε παρθεί το background με αέρα εμφανίζει τις μεγαλύτερες απορροφήσεις (βλέπε εικόνα 4.2.2) εδώ δεν παρατηρείται κάτι αντίστοιχο.



Εικόνα 4.2.4 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED103(κόκκινο), Brett2RED103(μπλε), Brett3RED103(μοβ), Brett4RED103(πράσινο).

Στο παραπάνω φάσμα απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του κρασιού με την μικρότερη συγκέντρωση του εμβολιασμένου μύκητα ανά ημέρα, πιο συγκεκριμένα ο μύκητας βρίσκεται σε συγκέντρωση 10^3 cfu/ml .

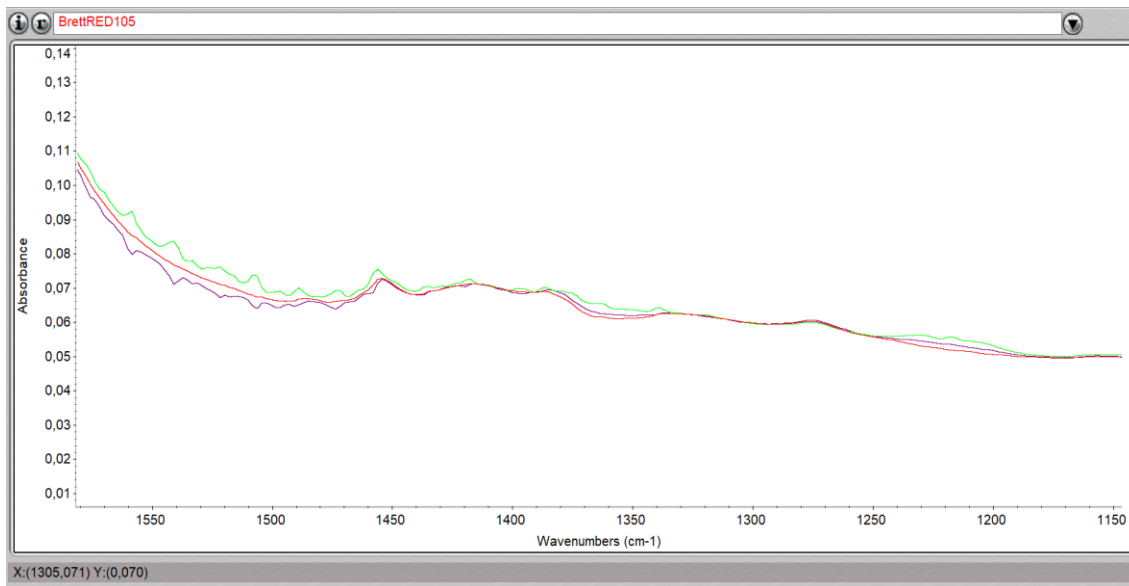
Δείγματα: BrettRED103, Brett2RED103, Brett3RED103, Brett4RED103

Στο παραπάνω φάσμα δεν παρατηρούμε μια σαφή εικόνα μεταξύ των ημερών αυτό ενδεχομένως μπορεί να οφείλεται στην χαμηλή συγκέντρωση του μύκητα και στην δυσκολία τόσο της ανάπτυξης του όσο και στην επίδραση του στον οίνο.

Πιο συγκεκριμένα στην περιοχή του φάσματος 1455 που παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική κορυφή βλέπουμε πως το Brett3RED103 εμφανίζει την μεγαλύτερη απορρόφηση ενώ η αμέσως χαμηλότερη αντιστοιχεί στο BrettRED103. Σε ακόμα χαμηλότερες με μικρή διαφορά έρχονται τα δείγματα: Brett2RED103, Brett4RED103

Στο 1386, παρουσιάζεται μια αύξηση στο φάσμα του δείγματος Brett2RED103 το οποίο βρίσκεται έχει υψηλότερη απορρόφηση από το BrettRED103 και χαμηλότερη από το Brett3RED103. Παρόλα αυτά και σε αυτή την περίπτωση το Brett4RED103 εξακολουθεί να εμφανίζει την μικρότερη απορρόφηση.

Τέλος στο 1276, το Brett2RED103 πλέον έχει την υψηλότερη απορρόφηση και από τα τέσσερα δείγματα των ημερών είτε λόγω κάποιου σφάλματος είτε λόγω πιο γρήγορης ανάπτυξης του μύκητα.

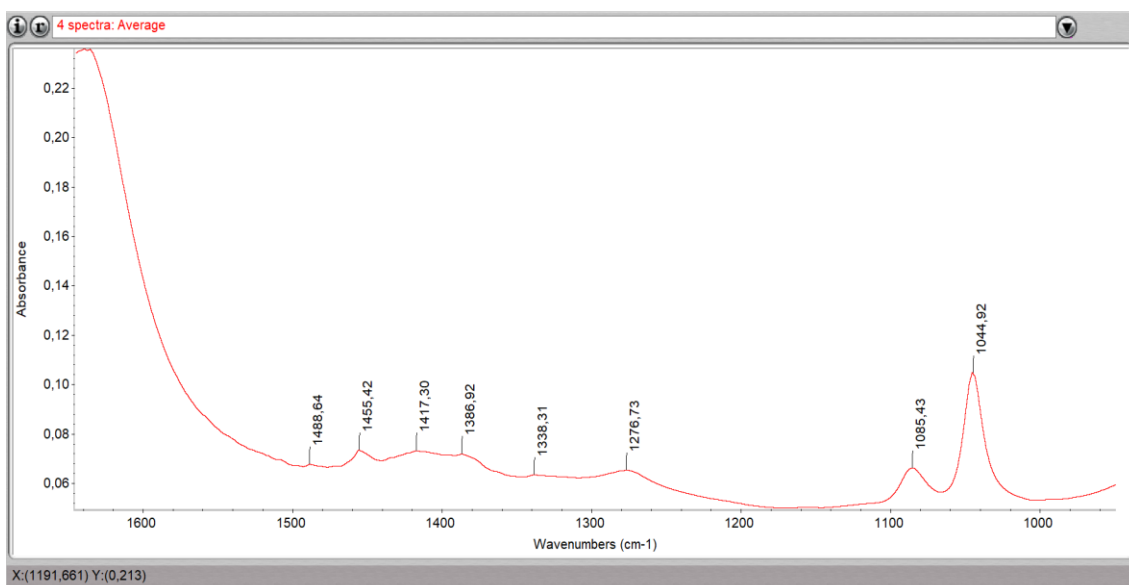


Εικόνα 4.2.5 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των : RED(μολ), YPDRED101(πράσινο), BrettRED105(κόκκινο) ημέρα 28^η των μετρήσεων.

Η παραπάνω εικόνα απεικονίζει τα δείγματα: RED, YPDRED101, BrettRED105. Τα δείγματα είναι από την πρώτη μέρα της μέτρησης.

Παρατηρούμε πως στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος, οι μεγαλύτερες απορροφήσεις ανέρχονται στο YPDRED101. Ακόμα βλέπουμε πως στην περιοχή μεταξύ 1600-1450 το δείγμα με ενσωματωμένο το μύκητα έχει μια πιο ομαλή καμπύλη καθώς επίσης οι απορροφήσεις του είναι μεγαλύτερες από αυτές του σκέτου κρασιού αλλά μικρότερες από το κρασί με το YPD

4.3 Μέσος όρος των δειγμάτων

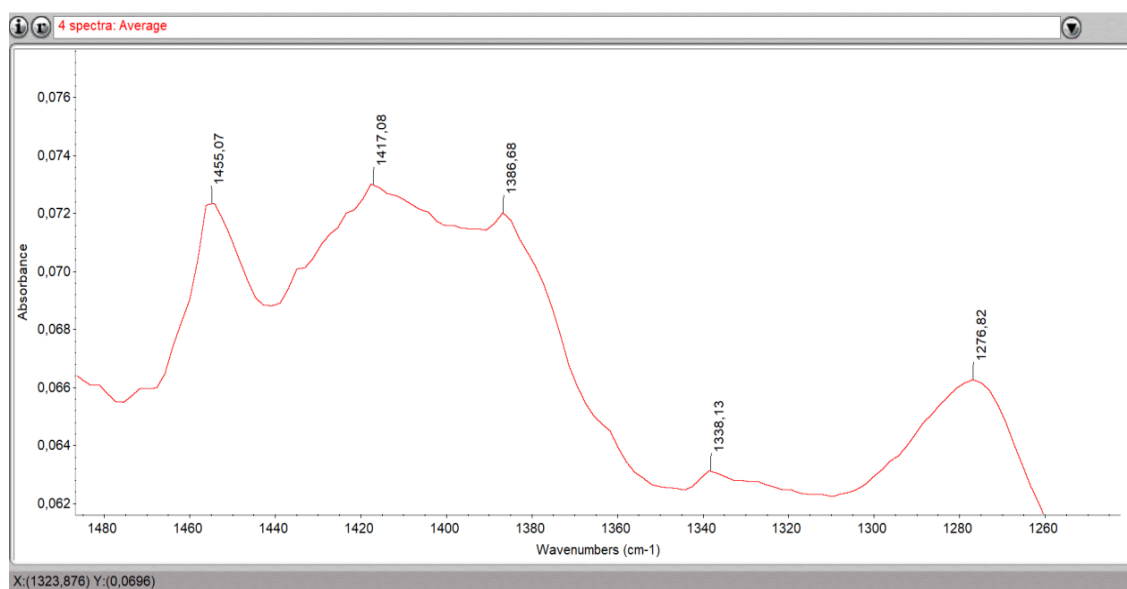


Εικόνα 4.3 Μέσος όρος πορείας (Average) στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED105, Brett2RED105, Brett3RED105, Brett4RED105.

Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζεται το average των δειγμάτων του μύκητα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση από τις τέσσερις ημέρες.

Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα είναι: BrettRED105, Brett2RED105, Brett3RED105, Brett4Red105

Παρατηρούμε ότι εμφανίζονται πέντε χαρακτηριστικές κορυφές ως μέσος όρος στο πέρας των ημερών στα : 1455,42/ 1417,30/ 1386,92/ 1338,31/ 1276,73



Εικόνα 4.3.1 Μέσος όρος πορείας (Average) στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED104, Brett2RED104, Brett3RED104, Brett4RED104.

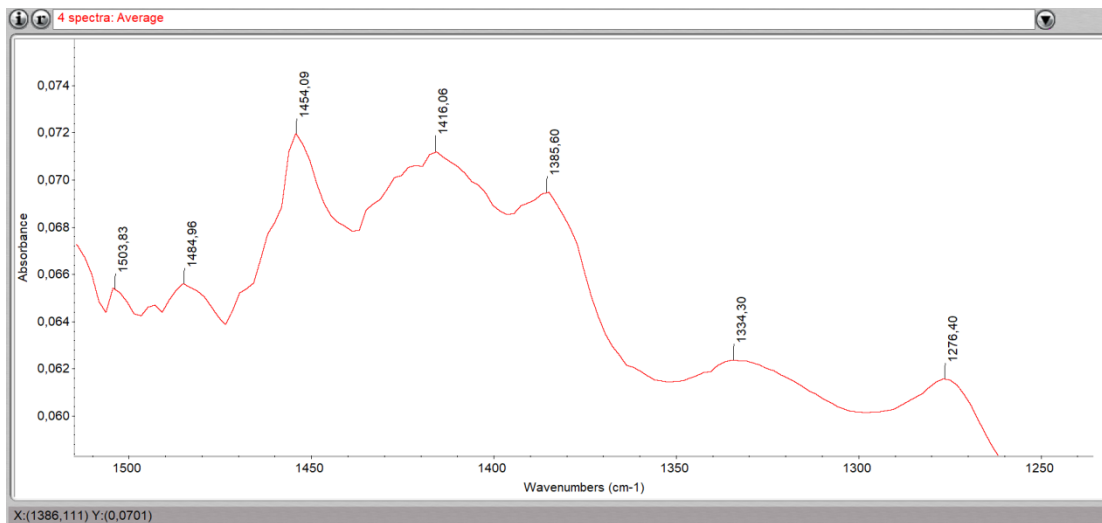
Της παραπάνω εικόνας το φάσμα αντιπροσωπεύει το average των δειγμάτων του μύκητα με συγκέντρωση 10^4 cfu/ml από τις τέσσερις ημέρες.

Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα είναι: BrettRED104, Brett2RED104, Brett3RED104, Brett4Red104

Από το παραπάνω φάσμα διακρίνουμε ότι οι κορυφές έχουν μετατοπιστεί. Έτσι οι νέες ανέρχονται στα:

1455,07/ 1417,08/ 1386,68/ 1338,13/ 1276,82

Όσον αφορά τις απορροφήσεις μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι έχουν μειωθεί οι απορροφήσεις. Σε αντίθεση έρχεται η κορυφή γύρω στο 1276 όπου η απορρόφησή της έχει αυξηθεί.



Εικόνα 4.3.2 Μέσος όρος πορείας (Average) στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των BrettRED103, Brett2RED103, Brett3RED103, Brett4RED103.

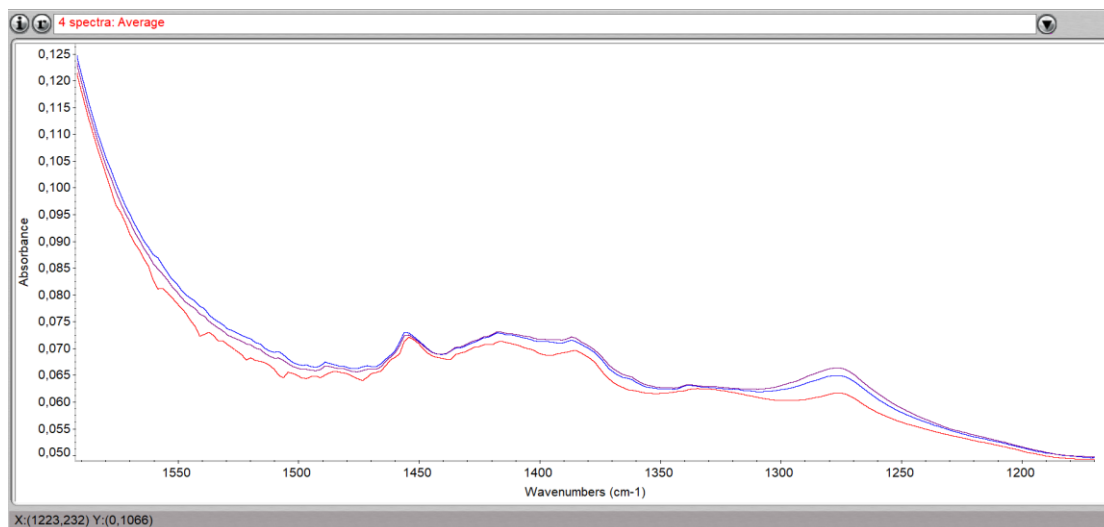
Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει το average των δειγμάτων με τα δείγματα του μύκητα με την μικρότερη συγκέντρωση από τις τέσσερις ημέρες.

Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα είναι: BrettRED103, Brett2RED103, Brett3RED103, Brett4Red103

Παρατηρούμε και πάλι ότι οι κορυφές έχουν μετατοπιστεί τόσο και από το φάσμα με εμβολιασμένο μύκητα στα 104 cfu/ml και ως εκ του του και από το φάσμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση μύκητα.

Πιο συγκεκριμένα εμφανίζονται οι κορυφές:
1454,09/ 1416,06/1385,60/ 1334,30/ 1276,40

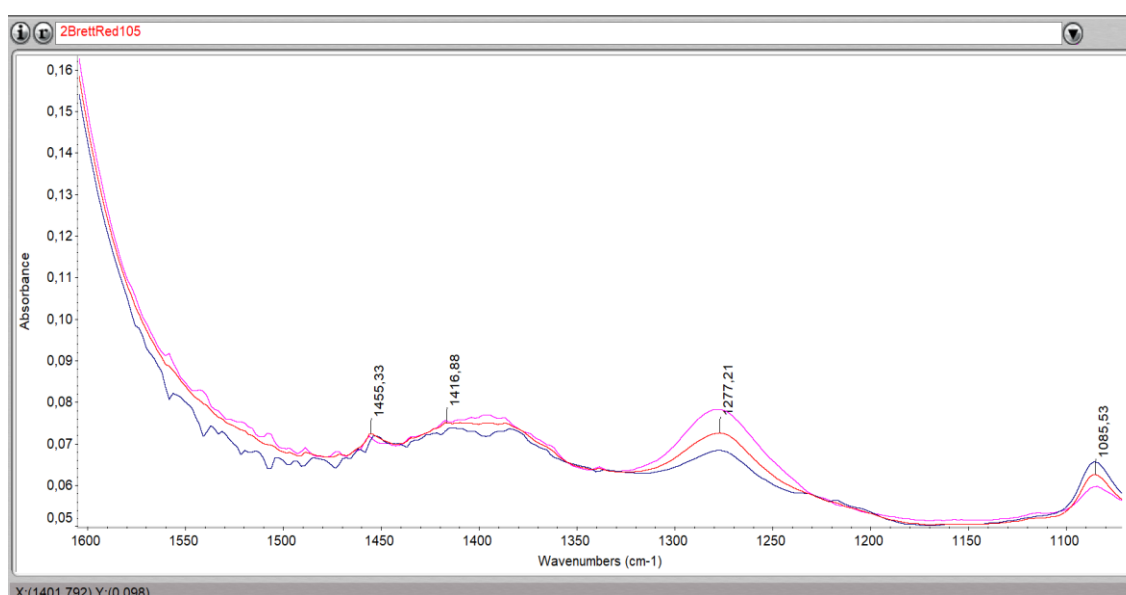
Η γενική εικόνα του φάσματος δείχνει χαμηλότερες απορροφήσεις σε όλο το εύρος και τις χαρακτηριστικές κορυφές που εμφανίζονται



Εικόνα 4.3.3 Επικάλυψη των μέσων όρων των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Το παραπάνω φάσμα απεικονίζει, μετά από την εντολή common scale μέσω OMNIC, τα τρία average για κάθε ένα δείγμα στο σύνολο των ημερών. Παρατηρούμε λοιπόν πως οι μεγαλύτερες απορροφήσεις παρατηρήθηκαν στο average της υψηλότερης συγκέντρωσης δείγματος, καθώς επίσης φαίνεται πως σε όλο το φάσμα οι απορροφήσεις αυξάνονται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του μύκητα.

1.4 Φάσματα δεύτερου μήνα

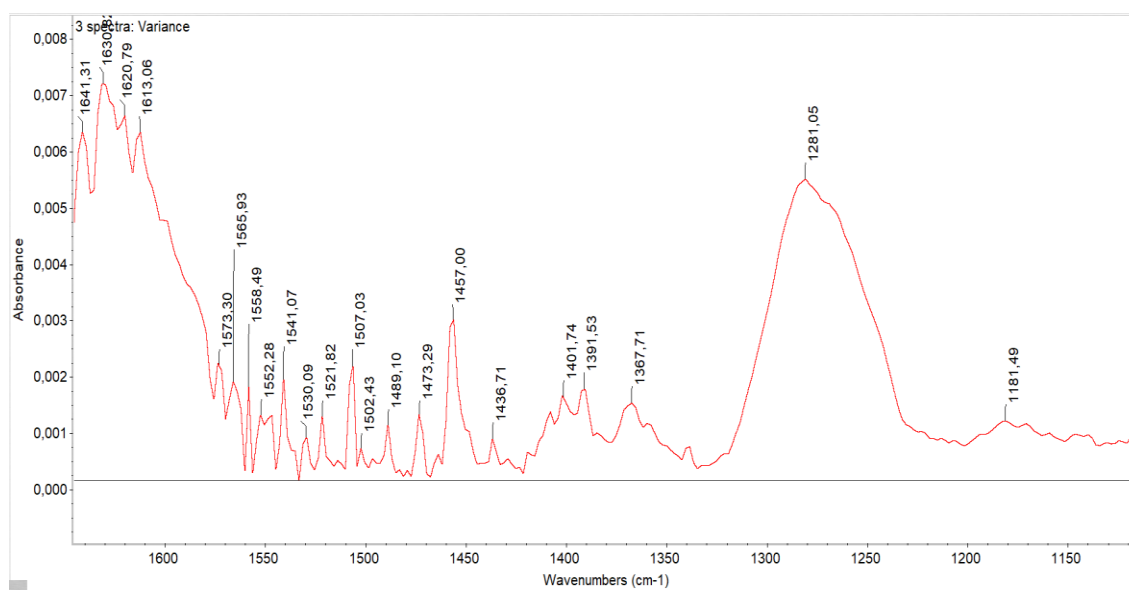


Εικόνα 4.4 Επικάλυψη των δειγμάτων δεύτερου μήνα στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος στα δείγματα 2BrettRed105(κόκκινο), 2BrettRed104(μωβ), 2BrettRed103(ροζ) ημέρα 57^η των μετρήσεων.

Στη παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα φάσματα των δειγμάτων 2BrettRed105, 2BrettRed104, 2BrettRed103.

Από την παρατήρηση του φάσματος, έχοντας πραγματοποιήσει την εντολή της κοινής κλίμακας, μέσα στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος διακρίνουμε τρεις χαρακτηριστικές κορυφές και για τα τρία δείγματα στα 1455, 1416 και 1277.

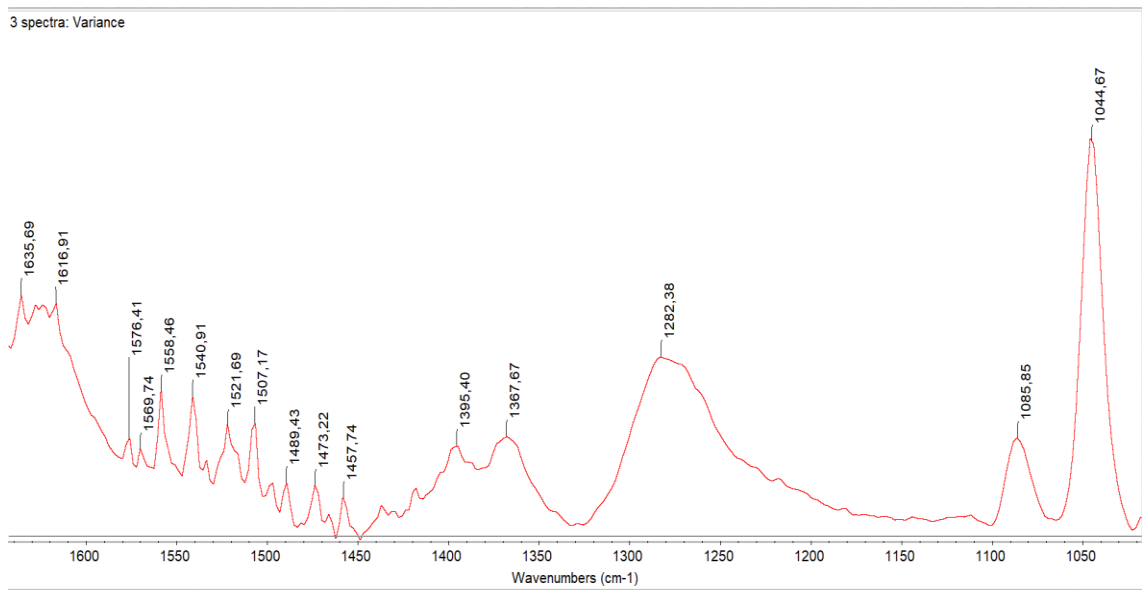
Στην κορυφή στα 1277, το δείγμα 2BrettRed103, παρουσιάζει την μεγαλύτερη απορρόφηση το οποίο μπορεί να οφείλεται πιθανώς είτε σε κάποιο σφάλμα.



Εικόνα 4.4.1 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των 2BrettRed105water, 2BrettRed104water, 2BrettRed103water, την ημέρα 57^η λήψης των δειγμάτων, έχοντας ως υπόβαθρο το νερό.

Η παραπάνω εικόνα απεικονίζει τη διακύμανση των δειγμάτων: 2BrettRed105water, 2BrettRed104water, 2BrettRed103water, τα οποία η μέτρηση των φασμάτων τους έχει παρθεί με υπόβαθρο τον νερό.

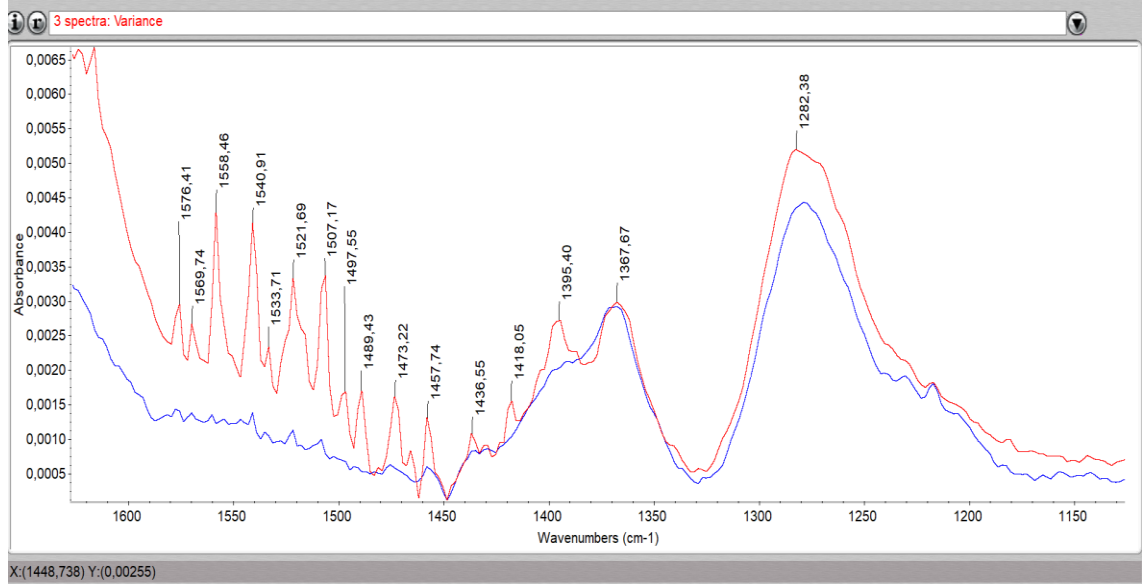
Παρατηρούμε μια έντονη διαταραχή στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 1600 έως 1400, καθώς επίσης εμφανίζεται μια κορυφή στα 1457,0 και στα 1281,05.



Εικόνα 4.4.2 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των 2BrettRed105, 2BrettRed104, 2BrettRed103 την ημέρα 57^η λήψης των δειγμάτων, έχοντας ως υπόβαθρο τον αέρα.

Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζεται τη διακύμανση των δειγμάτων: 2BrettRed105, 2BrettRed104, 2BrettRed103, τα οποία η μέτρηση των φασμάτων τους έχει παρθεί με υπόβαθρο τον αέρα.

Και στο παραπάνω φάσμα διακρίνουμε και πάλι μια έντονη διαταραχή από τα 1600 έως 1450. Ακόμα, εμφανίζονται τρεις χαρακτηριστικές κορυφές στα 1395,40/ 1367,67/ 1282,38



Εικόνα 4.4.3 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος της διακύμανσης των δειγμάτων του μύκητα (ημέρα 28^η) και της διακύμανσης των δειγμάτων του μύκητα (ημέρα 57^η)

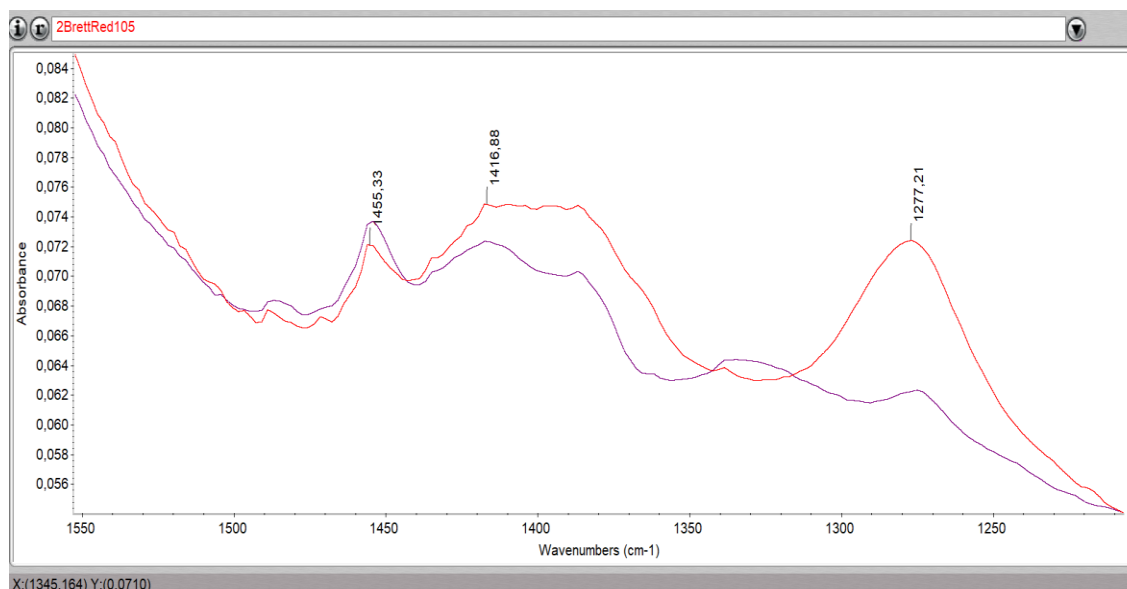
Η παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα φάσματα απεικονίζονται οι διακυμάνσεις

1. Ημέρα 28^η των δειγμάτων: BrettRED105, BrettRED104, BrettRED103 (μπλε)
2. Ημέρα 57^η των δειγμάτων: 2BrettRed105, 2BrettRed104, 2BrettRed103(κόκκινο)

Η μπλε καμπύλη είναι το φάσμα 1 και βλέπουμε τόσο μικρότερες απορροφήσεις όσο και μια πιο ήπια διαταραχή στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος μεταξύ 1600 έως 1400.

Αυτό που διακρίνεται είναι η εμφάνιση τριών νέων κορυφών και πιο συγκεκριμένα στα 1436.55, 1418.05, 1395.40.

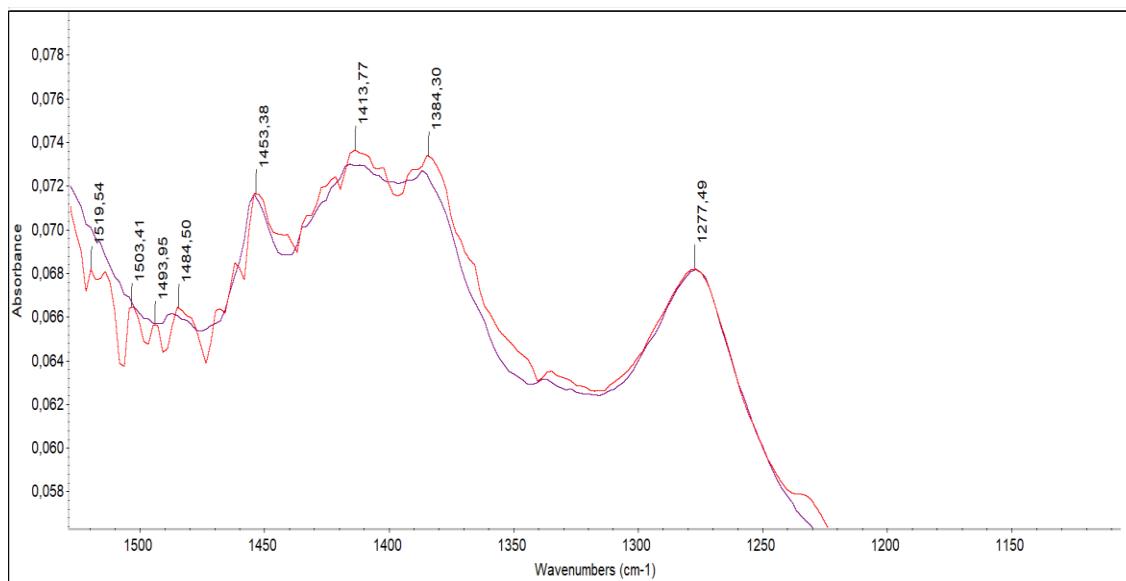
Η περιοχή μεταξύ του 1457 έως 1288 ,σύμφωνα με τον Cozzolino et al., (2011), αφορά αλδεύδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες. Έτσι, και στο παραπάνω φάσμα όπως παρατηρούμε την κορυφή στο 1373,03.



Εικόνα 4.4.4 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος Brettred105(μωβ) και 2BrettRed105(κόκκινο).

Στη παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα φάσματα: Brettred105 και 2BrettRed105.

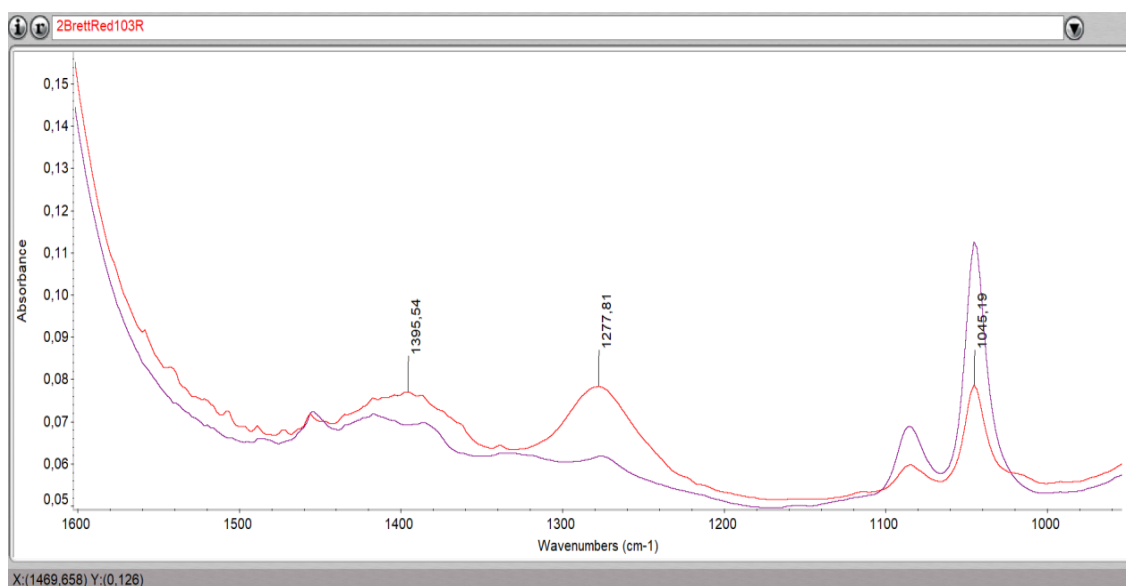
Σε σύγκριση των δύο φασμάτων παρατηρούμε μεγαλύτερες απορροφήσεις στο 2BrettRed105, καθώς επίσης η καμπύλη στο 1277,21 εμφανίζει τεραστία διαφορά απορρόφησης. Σε αντίθεση έρχεται η κορυφή στα 1455,33 όπου η απορρόφηση της έχει μειωθεί.



Εικόνα 4.4.5 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος BrettRed104(μoβ) και 2BrettRed104(κόκκινο).

Στη παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα φάσματα: BrettRed104 και 2BrettRed104.

Το κόκκινο φάσμα αντιστοιχεί στο 2BrettRed104. Και πάλι παρατηρούμε πως στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 1580 έως 1450 παρατηρείται μια έντονη διαταραχή αλλά χαμηλότερες απορροφήσεις συγκριτικά με το φάσμα του BrettRed104. Ακόμα διακρίνονται τρεις χαρακτηριστικές κορυφές: 1413.38, 1413.77 και 1277.49.



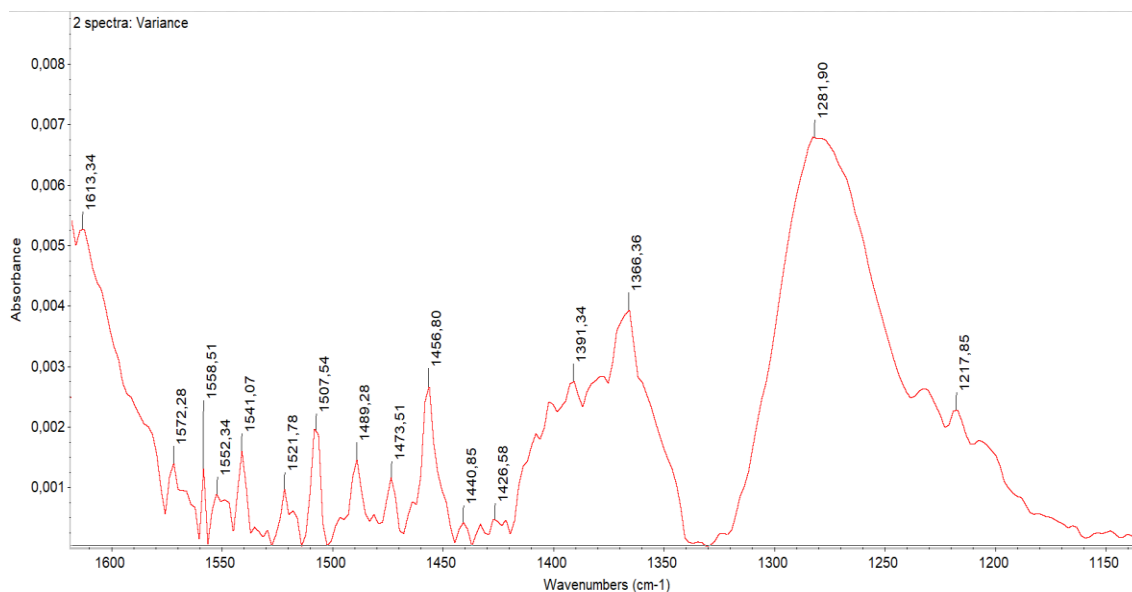
Εικόνα 4.4.6 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος για τα δείγματα BrettRed103(μoβ) και 2BrettRed103(κόκκινο).

Η εικόνα παραπάνω απεικονίζει τα φάσματα: Brettred103 και 2BrettRed103.

Παρατηρούμε ότι οι απορροφήσεις είναι υψηλότερες για το δείγμα του δεύτερου μήνα σε

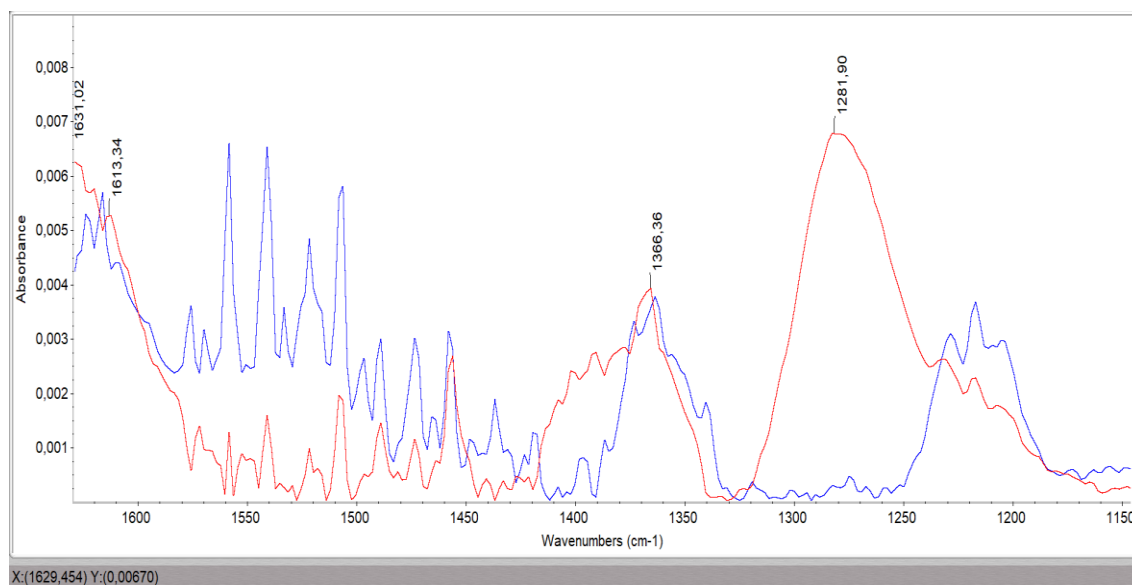
αντίθεση με αυτό του πρώτου. Αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι η αύξηση της καμπύλης στα 1277,81.

Ακόμα παρατηρείται μια νέα καμπύλη στα 1395.54, η οποία δεν υπήρχε αλλά συμφώνα με τον σύμφωνα με τον Cozzolino et al.,(2011), αφορά αλδεΐδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες. Ακόμα στηριγμένη στην έρευνα του Scano (2021) μπορεί επίσης να οφείλεται σε μη φλαβονοειδή ενώσεις διότι βρίσκεται μέσα στην περιοχή του φάσματος 1376-1407.



Εικόνα 4.4.7 Διακύμανση στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος στα δείγματα 2BrettRed105 και YPD2Red101

Το παραπάνω φάσμα αποτελεί τη διακύμανση των δειγμάτων: 2BrettRed105 και YPD2Red101. Από την παρατήρησή μας βλέπουμε πως η διαταραχή στο φάσμα μεταξύ 1600-1450 εξακολουθεί να υπάρχει. Πέρα από αυτό διακρίνονται τρεις κορυφές στα 1391.34, 1366.36 και 1281.90.

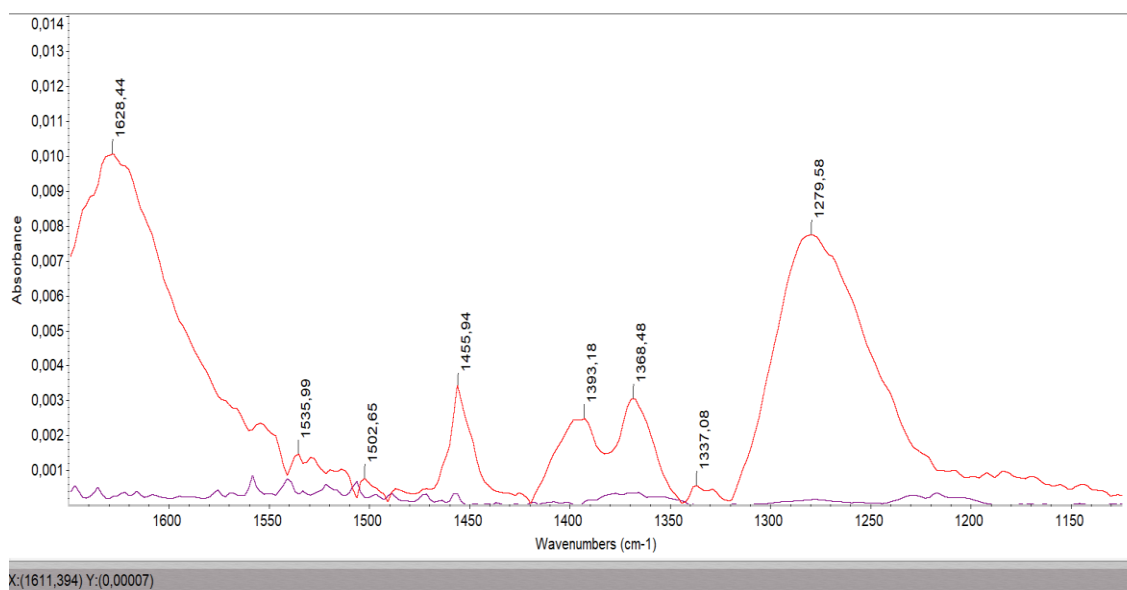


Εικόνα 4.4.8 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος της διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRED105, YPDRed101 (ημέρα 28η) και της διακύμανσης των δειγμάτων: 2BrettRed105, YPD2Red101 (ημέρα 57η)

Στο παραπάνω φάσμα απεικονίζονται τις διακυμάνσεις των:

1. Ημέρα 28^η των δειγμάτων: BrettRED105, YPDRed101 (μπλε φάσμα)
2. Ημέρα 57^η των δειγμάτων: 2BrettRed105, YPD2Red101(κόκκινο φάσμα)

Μετά από παρατήρηση βλέπουμε ότι εδώ μεταξύ 1600-1450 οι απορροφήσεις του 2^ο είναι χαμηλότερες αλλά εξακολουθούν να υπάρχουν. Σε αντίθεση έρχεται η καμπύλη στα 1366,36 καθώς επίσης και η απότομη αύξηση της καμπύλης στα 1281,90.



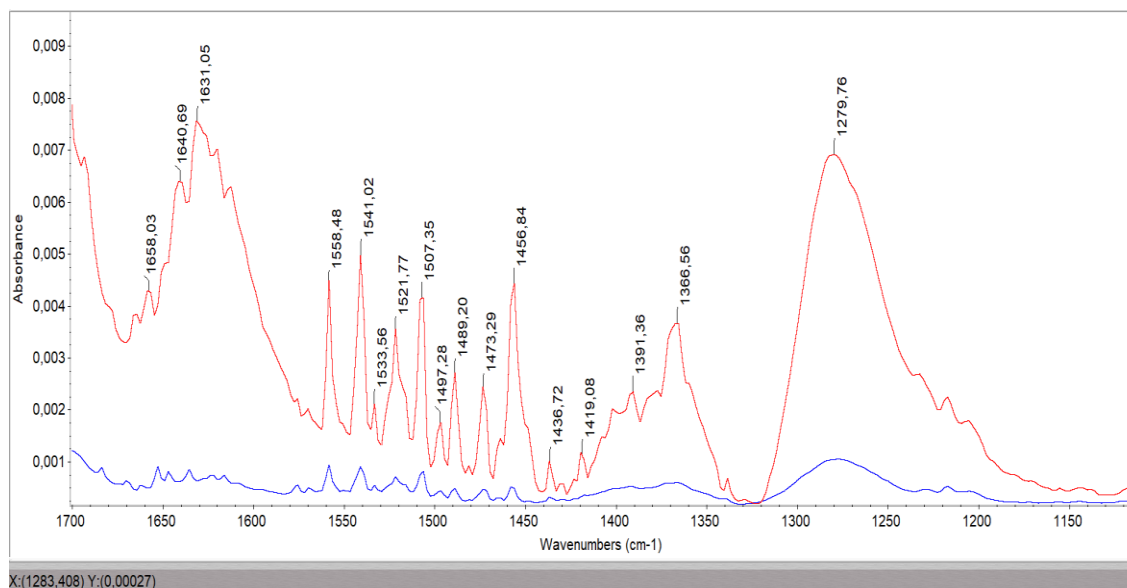
Εικόνα 4.4.9 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος της διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRED104, YPDRed104 (ημέρα 28η) και της διακύμανσης των δειγμάτων: 2BrettRed104, YPD2Red102 (ημέρα 57η)

Στο παραπάνω φάσμα απεικονίζονται τις διακυμάνσεις των:

1. Ημέρα 28^η των δειγμάτων: BrettRED104, YPDRed104 (μοβ φάσμα)
2. Ημέρα 57^η των δειγμάτων: 2BrettRed104, YPD2Red102(κόκκινο φάσμα)

Βλέπουμε πώς οι απορροφήσεις του 2^ο είναι μεγαλύτερες. Εξακολουθεί να υπάρχει η διαταραχή σε πιο έντονο βαθμό στο 2^ο μεταξύ 1600-1450. Ακόμα έχουμε μια απότομη αύξηση στο 1455.94 όπως και στο 1279.58

Επιπρόσθετα βλέπουμε την εμφάνιση τριών νέων κορυφών στα 1393.18, 1369.48 και 1279.58



Εικόνα 4.4.10 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος της διακύμανσης των δειγμάτων: BrettRED104, YPDRed104, BrettRED105, YPDRed101 (ημέρα 28η) και της διακύμανσης των δειγμάτων: 2BrettRed104, YPD2Red102, 2BrettRed105, YPD2Red101 (ημέρα 57η)

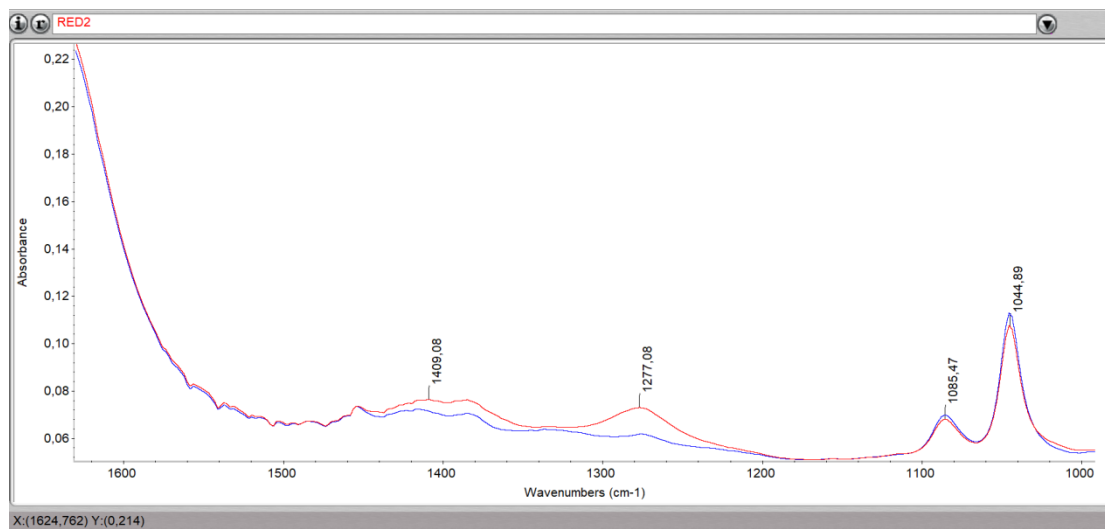
Στο παραπάνω φάσμα απεικονίζονται οι διακυμάνσεις των:

1. Ημέρα 28^η των δειγμάτων: BrettRED104, YPDRed104, BrettRED105, YPDRed101 (μπλε φάσμα)
2. Ημέρα 57^η των δειγμάτων: 2BrettRed104, YPD2Red102, 2BrettRed105, YPD2Red101 (κόκκινο φάσμα)

Η συνολική εικόνα του φάσματος δείχνει τόσο μεγαλύτερες απορροφήσεις όσο και πιο απότομες καμπύλες για τη 2^η διακύμανση. Στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος μεταξύ 1600-1450 παρατηρούμε η διαταραχή να υπάρχει και στα δύο ενώ είναι πιο έντονη στο 2^ο. Ακόμα κάνουν την εμφάνισή τους τέσσερις κορυφές στα:1436.72, 1419.08, 1391.36 και στα 1366.56.

Η περιοχή μεταξύ του 1450 και 1278 cm-1 είναι πολύ πολύπλοκη και περιέχει πληροφορίες που σχετίζονται με το τέντωμα C=O, C=C, CH₂ και C-H για αλδεϋδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες, περίπου στα 1457–1427 cm⁻¹ (Tarantilis.,2008).

Τέλος πρέπει να τονιστεί η κορυφή στα 1279.76 όπου η απορρόφηση της είναι τόσο μεγαλύτερη όσο και η καμπύλη της είναι πολύ απότομη.



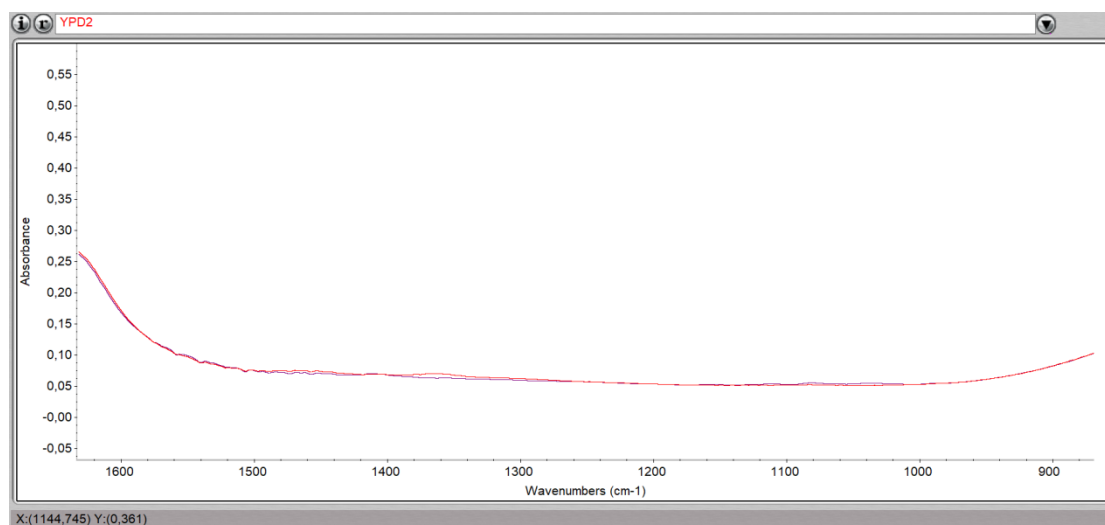
Εικόνα 4.4.11 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος της διακύμανσης των δειγμάτων: RED(μπλε), RED2(κόκκινο).

Στο παραπάνω φάσμα απεικονίζονται τα επιμέρους φάσματα του οίνου που δεν έχει εμβολιαστεί μύκητας αλλά δεν έχει γίνει και προσθήκη YPD. Τα δείγματα είναι : RED, RED2

Παρατηρούμε ότι η καμπύλη της αιθανόλης έχει μειωθεί, η οποία βρίσκεται γύρω στο 1044, το οποίο είναι λογικό με το πέρασ των ημερών.

Η καμπύλη που εμφανίζει μεγαλύτερη τόσο απορρόφηση όσο είναι αυτή στα 1277,08.

Η παραπάνω κορυφή βρίσκεται στην περιοχή μεταξύ του 1450 και 1278 cm^{-1} όπου σχετίζεται με το τέντωμα C=O, C=C, CH₂ και C-H για αλδεϋδες, καρβοξυλικά οξέα, πρωτεΐνες και εστέρες, περίπου στα 1457–1427 cm^{-1} (Tarantilis.,2008).



Εικόνα 4.4.12 Επικάλυψη στην περιοχή του δαχτυλικού αποτυπώματος των δειγμάτων: YPD, YPD2

Το παραπάνω φάσμα απεικονίζει τα επιμέρους φάσματα του YPD , πιο συγκεκριμένα των δειγμάτων: YPD, YPD2

Παρατηρούμε ότι τα φάσματα δεν εμφανίζουν αλλαγές, δεν υπάρχει επηρεασμός.

5.Συμπεράσματα

Στο παρόν πείραμα διερευνήθηκε η καταλληλότητα χρήσης της FTIR για την ανίχνευση της επίδρασης του *Brettanomyces bruxellensis* σε οίνους. Για το σκοπό αυτό αξιολογήθηκε το φάσμα που προέκυψε από αυξανόμενες συγκεντρώσεων του *Brettanomyces bruxellensis* σε ερυθρό οίνο αλλά και κατά τη διάρκεια του χρόνου με αρχικές συγκεντρώσεις εμβολιασμού συγκεντρώσεις μύκητα $10^5, 10^4, 10^3$ cfu/ml. Παρατηρήθηκε δηλαδή η μεταβολή του φάσματος όχι μόνο μεταξύ των αυξανόμενων αρχικών συγκεντρώσεων αλλά και μεταξύ των ημερών. Η διάρκεια παραμονής των δειγμάτων σε συνθήκες οινοποιείου που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένας μήνας και αντιστοιχεί στην χρονική στιγμή που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ξεκινά η παραγωγή του χαρακτήρα του “Brett”. Για την παρατήρηση των μεταβολικών μόνο προϊόντων του μύκητα, η χρήση των ειδικών φίλτρων $0.45\mu\text{m}$ βοήθησε στην κατακράτηση του πληθυσμού των κυττάρων του μύκητα.

Από την παρατήρηση των φασμάτων του μύκητα παρατηρείται ότι μεταβάλλεται το φάσμα του στην πάροδο του χρόνου. Το κάθε δείγμα εμφανίζει τον δικό του ρυθμό ανάπτυξης και μεταβολής του φάσματος. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μύκητα η μεταβολή αυτή παρουσιάζεται πιο ξεκάθαρα με την εμφάνιση μεγαλύτερων απορροφήσεων και πιο απότομων κορυφών. Επίσης η μεταβολή στο φάσμα του μύκητα και οι περιοχές απορροφήσεων που εμφανίζεται η διαταραχή φαίνεται να συνάδουν με τις περιοχές απορροφήσεων των μεταβολικών προϊόντων.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την μεγαλύτερη συγκέντρωση του μύκητα δηλαδή 10^5 cfu/ml φαίνεται πως, σε όλο το εύρος του δαχτυλικού αποτυπώματος, το δείγμα που μετρήθηκε την 29^η ημέρα από τον αρχικό εμβολιασμό παρουσίασε μεγαλύτερες απορροφήσεις και από την ημέρα 30^η και 31^η, πράγμα που μπορεί να οφείλεται σε μια γρηγορότερη ανάπτυξη του δείγματος. Παρόλα αυτά, η ομοιομορφία μεταξύ των ημερών εμφανίζεται στην κορυφή στο 1455 όπου με την αύξηση των ημερών, αυξάνονται και οι απορροφήσεις των δειγμάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διακύμανση της συγκέντρωσης του μύκητα 10^4 cfu/ml καθώς στο φάσμα παρουσιάζονται δυο νέες κορυφές στα 1229,96 και στα 1216,85 οι οποίες εξακολουθούν να υπάρχουν και στο φάσμα της διακύμανσης του μύκητα με συγκέντρωση 10^3 cfu/ml σε ακόμα μεγαλύτερες απορροφήσεις. Όσον αφορά τις συνολικές διακυμάνσεις των τριών διαδοχικών συγκεντρώσεων ανά ημέρα, φαίνεται πως με την πάροδο του χρόνου, ακόμα και μεταξύ συνεχόμενων ημερών, εμφανίζεται αύξηση στις απορροφήσεις των κορυφών. Η χαρακτηριστική κορυφή στα 1280 που εμφανίζεται στο φάσμα της διακύμανσης των δειγμάτων ανά ημέρα φαίνεται να συνάδει με την περιοχή απορρόφησης της 4-

αιθυλγουαϊκόλης.

Κατά αυτόν τον τρόπο καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το FTIR θα μπορούσε να συμβάλλει στην παρατήρηση του μύκητα σε ερυθρό οίνο. Σε μελλοντική έρευνα προτείνεται η παράλληλη χρήση της GC-MS για την ταυτοποίηση των αιθυλφαινολών που παράγει ως μεταβολικά προϊόντα ο *Brettanomyces bruxellensis*. Ενδιαφέρον θα αποτελούσε επίσης η παρατήρηση των ουσιών που μειώνονται (π.χ. πτητικές φαινόλες) ή που παράγονται (π.χ βυνιλ-, αιθυλ- φαινόλες, τετραυδροπυριδίνες, κ.α.) σε παράλληλο συνδυασμό με οργανοληπτικό έλεγχο και ποσοτικοποίηση των ουσιών αυτών με αέρια χρωματογραφία. Καθώς επίσης και η συσχέτιση με τον τελικό πληθυσμό και τη βιωσιμότητα του *Brettanomyces* στα δείγματα.

Βιβλιογραφία

- Adt, I., Toubas, D., Pinon, J.-M., Manfait, M., & Sockalingum, G. D. (2006). FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. *Archives of Microbiology*, 185, 277–285.
- Agnolucci M, Vigentini I, Capurso G, Merico A, Tirelli A, Compagno C, et al. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *International Journal of Food Microbiology*. 2009; 130(3):238–44.
- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., et al. (2010). Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 76–80. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.022
- Amado, A. M., Fernandes, L., & Enguita, F. J. (2017). Characterization of bacterial and archaeal lipid structure using Fourier transform infrared spectroscopy. *Frontiers in Microbiology*, 8, 919.
- Anjos Ofelia, Miguel Martinez Comesana, Ilda Caldeira, Soraia Ines Pedro, Pablo EguiaOller& Sara Canas. (2020). Application of Functional Data Analysis and FTIR_ATR Spectroscopy to Discriminate wine Spirits Ageing Technologies. *Mathematics*.
- Baca- Bocanegra Berta, Leticia Martinez – Lapuente, Julio Nogales- Bueno, Jose Miguel Hernandez-Hierro& Raul Ferrer- Gallego. (2022). Feasibility study of the use of ATR-FTIR spectroscopy as a tool for the estimation of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*.
- Banc, R.; Loghin, F.; Miere, D.; Fetea, F.; Socaciu, C. Romanian Wines Quality and Authenticity Using FT-MIR Spectroscopy Coupled with Multivariate Data Analysis. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj Napoca* 2014, 42, 556–564.
- Barata, A., P. Laureano, I. D’Antuono, P. Martorell, H. Stender, M. Malfeito-Ferreira, A. Querol, and V. Loureiro. Enumeration and identification of 4-ethylphenol producing yeasts recovered from the wood of wine ageing barriques after different sanitation treatments. *J. Food Res.* 2: 140-149 (2013)
- Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D., 1990. *Yeasts: Characteristics and Identification* 2nd ed., Cambridge, Cambridge University Press.
- Basalekou Marianthi, Christos Pappas, Petros Tarantilis, Yorgos Kotseridis&StamatinaKallithraka. (2017). Wine authentication with Fourier-Transform Infrared Spectroscopy: a feasibility study on variety, type of barrel wood and ageing time classification. *International Journal of food Science + Technology*.
- Basalekou, M.; Pappas, C.; Kotseridis, Y.; Tarantilis, P.A.; Kontaxakis, E.; Kallithraka, S. Red Wine Age Estimation by the Alteration of Its Color Parameters: Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Tool to Monitor Wine Maturation Time. *J. Anal. Methods Chem.* 2017, 2017, 1–9.
- Borneman, A. R., Zeppel, R., Chambers, P. J., & Curtin, C. D. (2014). Insights into the *Dekkera bruxellensis* genomic landscape: comparative genomics reveals variations in ploidy and nutrient utilisation potential amongst wine isolates. *PLoS Genetics*, 10(2), e1004161.
- Boulet J.C., P. Williams & T. Doco. (2007). A Fourier-transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*
- Boulet, J.C.; Williams, P.; Doco, T. A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 2007, 69, 79–85.
- Calderón, F., Morata, A., Uthurry, C., & Sua´rez, J. A. (2004). Aplicaciones de la ultrafiltracio´n en la industria enolo´gica. *U´ltimos avances tecnolo´gicos. Tecnologia del vino*, 16, 49–54.

- Capozzi, V., Di Toro, M. R., Grieco, F., Michelotti, V., Salma, M., Lamontanara, A., et al. (2016). Viable But Not Culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in wine: new insights on molecular basis of VBNC behaviour using a transcriptomic approach. *Food Microbiol.* 59, 196–204. doi: 10.1016/j.fm.2016.06.007
- Cecchini, F., Iacumin, L., Fontanot, M., Comuzzo, P., Comi, G., Manzano, M., 2013. Dot blot and PCR for *Brettanomyces bruxellensis* detection in red wine. *Food Control* 34, 40–46.
- Chatonnet, P., C. Viala, and D. Dubourdieu. 1997. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 48:443- 448.
- Chatonnet, P., D. Dubourdieu, and J.N. Boidron. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethyl phenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:463- 468.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., Comi, G., 2004. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1347– 1355.
- Colomer, M. S., Funch, B., and Forster, J. (2018) The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production, *Current Opinion in Biotechnology* 56, 30–35.
- Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-kling, T., Bisson, L.F., 2006. Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces Bruxellensis* Strains Isolated from Wines., *Am. J. Enol. Vitic* 57,139–147.
- Coulter, A., Robinson, E., Cowey, G., Francis I.L., Lattey, K., Capone, D., Gishen, M. and Godden, P. 2003. *Dekkera/Brettanomyces* Yeast - an Overview of Recent AWRI Investigations and Some Recommendations for Its Control. *Proceedings of Grapegrowing at the Edge; Managing the Wine Business; Impacts on Wine Flavour: Proceedings of a Seminar* 41–50.
- Cozzolino, D.; Cynkar, W.U.; Shah, N.; Smith, P.A. Can spectroscopy geographically classify Sauvignon Blanc wines from Australia and New Zealand? *Food Chem.* 2011, 126, 673–678.
- Crauwels, S., Zhu, B., Steensels, J., Busschaert, P., De Samblanx, G., Marchal, K., ... & Lievens, B. (2015). Assessing genetic diversity among *Brettanomyces* yeasts by DNA fingerprinting and whole-genome sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4757-4768.
- Curtin, C. D., & Pretorius, I. S. (2014). Genomic insights into the evolution of industrial yeast species *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Research*, 14(7), 997-1005.
- Curtin, C., Borneman, A., Zeppel, R., Cordente, T., Kievit, R., Chambers, P., Herderich, M. and Johnson, D. (2014) ‘Staying a step ahead of “Brett”’, *Wine & Viticulture Journal*, , pp. 34–37.
- Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W. and de Barros Lopes, M.A. (2007) ‘Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries’, *FEMS Yeast Research*, 7(3), pp. 471–481.
- Custers, M.T.J. 1940. *Onderzoekingen over het gistgeslacht Brettanomyces*. Thesis, Delft University, The Neth
- Di Toro, M.R., Capozzi, V., Beneduce, L., Alexandre, H., Tristezza, M., Durante, M., Tufariello, M., Grieco, F., Spano, G., 2015, Intraspecific biodiversity and “spoilage potential” of *Brettanomyces bruxellensis* in Apulian wines. *LWT Food Sci. Technol.* 60,102–108.
- Dias L., S. Pereira-da-Silva, M. Tavares, M. Malfeito-Ferreira, and V. Loureiro. 2003. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* 20:377-384.

- Dimopoulou, M., Kefalloniti, V., Tsakanikas, P., Papanikolaou, S., Nychas, G.-J.E., 2021. Assessing the biofilm formation capacity of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* through ftr spectroscopy. *Microorganisms* 9, 1–13. [https://doi.org/ 10.3390/microorganisms9030587](https://doi.org/10.3390/microorganisms9030587).
- Du Toit, M. & Pretorius, I.S., 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 74-96.
- du Toit, W. J., Pretorius, I. S., and Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862–871. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02549.x
- Dugelay, I., Gunata, Z., Sapis, J.C., Baumes, R. & Bayonove, C., 1993. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2092-2096.
- Edelmann Andrea, Jose Diewok, Josefa Rodriguez Baena& Bernhard Lendl. (2003). High-performance liquid chromatography with diamond ATR-FTIR detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in red wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- Egli, C.M. & Henick-Kling, T., 2001. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 241-247
- Elem T.S. Carames, Priscila D. Alamar, Ronei J. Poppi& Juliana A. Lima Pallone. (2016). Rapid Assessment of Total Phenolic and Anthocyanin Contents in Grape Juice using Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Food Analytical Methods*.
- Essendoubi, M., Toubas, D., Bouzaggou, M., Pinon, J.-M., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2005. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1724 (3), 239-247.
- Fabani, Arrúa and Wunderlin (2010, Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines, *Chemistry* 119(1):372-379 and chemometrics to classify Riesling wines from different countries, *Food Chemistry*, 2008, 106, 781–786
- Fendri, I., Chaabane, F. B., Bouzidi, M., & Gargouri, A. (2017). Detection of adulteration in red wines by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Control*, 73, 199-205.
- Fleet, G.H. & Heard, G.M., 1993. Yeasts: growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (ed). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. pp. 27-54.
- Frenzel Wolfgang & Ian D. McKelvie (2008). *Comprehensive Analytical Chemistry*. Chapter 12. Photometry. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166526X08006120>)
- Friedel Matthias, Claus-Dieter Patz & Helmut Dietrich. (2013). Comparison of different measurements techniques and variable selection methods for FT-MIR in wine analysis. *Food Chemistry*.
- Friedel Matthias, Claus-Dieter Patz & Helmut Dietrich. (2013). Comparison of different measurement techniques and variable selection methods for FT-MIR in wine analysis.
- Fugelsang, K.C. and C.G. Edwards. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. Second edition. Springer Science and Business Media, NY. ISBN 978-0-387-33349-6 (2007).
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. Springer, 87, 164-166, 20-209

- Garcia-Hernandez C., C. D. Salvo-Comino, F. Martin-Pedrosa, C. Garcia-Cabezon & M.L. Rodriguez-Mendez. (2020). Analysis of red wines using an electronic tongue and infrared spectroscopy. Correlations with Phenolic content and color parameters. LWT.
- Garcia-Hernandez C., C. D. Salvo-Comino, F. Martin-Pedrosa, C. Garcia-Cabezon & M.L. Rodriguez-Mendez. (2020). Analysis of red wines using an electronic tongue and infrared spectroscopy. Correlations with Phenolic content and color parameters. LWT.
- Gerbaux, V., Vincent, B. & Bertrand, A., 2002. Influence of maceration, temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 131-137.
- Heard, G.M. & Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 23-28.
- Heresztyn, 1986. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 127- 131.
- Heresztyn, T. 1986a. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:127-132.
- Hesford, F., K. Schneider, N.A. Porret, and J. Gafner. 2004. Identification and analysis of 4-ethyl catechol in wine tainted by *Brettanomyces* off-flavor. *Abstr. Am. J. Enol. Vitic.* 55:304A.
- Holt S., Mukherjee V., Lievens B., Verstrepen K. J., Thevelein J. M. (2017). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer. *Food Microbiology* 72 pp. 55-66.
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F., Jimenez, J., 1996. Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 998–1003.
- Kaminskyj, S.G.W., Gough, K.M., Isenor, M., Jilkine, K., Szeghalmi, A.V., Rodriguez, R.J., Redman, R.S., Schmidt, R. (2007). FTIR spectromicroscopy of saprotrophic and endophyte fungi: growth under optimal and stressed conditions. *Canadian Light Source* 112, Activity Report.
- Kamnev, A.A., Sadovnikova, J.A., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Antonyuk, L.P. (2008). Responses of *Azospirillum brasilense* to nitrogen deficiency and to wheat lectin: a diffuse reflectance infrared fourier transform (DRIFT) spectroscopic study. *Microbial Ecology* 56: 615–624.
- Kamnev, A.A., Tugarova, A.V., Antonyuk, L.P., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Gardiner, P.H.E. (2005) Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: comparison of endophytic and nonendophytic strains of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Trace Elements and Electrolytes* 19: 91–95.
- Kurtzman C.P., Fell J. W., Boekhout T., (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Volume 1, Fifth Edition, Elsevier B.V.
- Laghi Luca, Andrea Versari, Giuseppina P. Parpinello, David Y. Nakaji & Roger B. Boulton. (2011). FTIR Spectroscopy and direct orthogonal signal correction preprocessing applied to selected phenolic compounds in red wines. *Food Analytical Methods*.
- Licker, J.L. 1998. The sensory analysis and gas chromatography/olfactometry (GCO) of wines with “Brett” flavor. Master’s thesis, Cornell University
- Licker, J.L., Acree, T.E., Henick-Kling, T., 1999. What is 'Brett' (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 714, 96-115.
- Lin, M., Al-Holy, M., Al-Qadiri, H., Kang, D.H., Cavinato, A.G., Huang, Y., Rasco, B.A., 2004. Discrimination of intact and injured *Listeria monocytogenes* by Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. *J Agric Food Chem* 52 (19), 5769-5772

- Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., and Alexandre, H. (2016). Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Res. Int.* 89(Pt 1), 620–630. doi: 10.1016/j.foodres.2016.09.019
- Loureiro, V. & Malfeito-Ferreira, M., 2006. *Dekkera/Brettanomyces* spp. Chapter 13. In: Blackburn, C. de W. (ed). *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing Ltd, Abington, Cambridge, UK. pp. 353-398.
- Loureiro, V.M., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food. Microbiol.* 86, 23- 50.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., van den Braak, N., Endtz, H.P., Naumann, D., Puppels, G.J., 2002. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Methods* 51 (3), 255-271
- Mariey, L., Signolle, J. P., Amiel, C., & Travert, J. (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 26(2), 151–159.
- Mariey, L., Signolle, J.P., Amiel, C., Travert, J., 2001. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibr Spectrosc* 26 (2), 151-159.
- Martelo-Vidal, M.J.; Domínguez-Agis, F.; Vázquez, M. Ultraviolet/visible/near-infrared spectral analysis and chemometric tools for the discrimination of wines between subzones inside a controlled designation of origin: A case study of Rías Baixas. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2013, 19, 62–67.
- McLaughlin. Ryan P. (2022). Spectroscopy: Overview. *Encyclopedia of Dairy sciences* (Third edition)
- Mehloimakulu, N.N., Setati, M.E., Divol, B., 2015. Non-saccharomyces killer toxins: possible biocontrol agents against *brettanomyces* in wine? *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 36, 1–11.
- Millet, V. and Lonvaud-Funel, A. 2000. The Viable but Non-Culturable State of Wine Micro-Organisms during Storage. *Letters in Applied Microbiology* 30(2):136-41
- Miramont Clement, Michael Jourdes & Pierre-Louis Teissedre. (2021). Development of UV-Vis and FTIR Partial Least Squares models: comparison and combination of two spectroscopy techniques with chemometrics for polyphenols quantification in red wine.
- Mohacek-Grosov, V., Bozac, R., Puppels, G.J., 2001. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 57 (14): 2815 – 2829.
- Mohacek-Grosov, V., Bozac, R., Puppels, G.J., 2001. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 57 (14): 2815 – 2829.
- Morneau, A.D., Zuehlke, J.M., Edwards, C.G., 2011, Comparison of media formulations used to selectively cultivate *Dekkera/Brettanomyces*. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 460–465.
- Naumann, A. (2009). A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neural network analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. *Analyst* 134: 1215–1223.
- Naumann, D., Helm, D. & Labischinski, H., 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 351, 81–82.
- Naumann, D., Helm, D., & Labischinski, H. (1991). Rapid identification of microorganisms by Fourier transform infrared spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 54(1-2), 1-7.

- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., Giesbrecht, P., 1991b. The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy. In: Nelson, W. H. (ed). *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis*, John Wiley & Sons New York. pp. 263
- Naumann, D., Keller, S., Helm, D., Schultz, C., Schrader, B., 1995. FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells. *J Mol Struct* 347 399-405.
- Ngo-Thi, N.A., Kirschner, C. & Naumann,D., 2003. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. *J. Mol. Struct.* 661-662, 371-380.
- Niimi Jun, Kristian H. Liland, Oliver Tomic, David W. Jeffery Susan E.P. Bastian & Paul K. Boss. (2021). Prediction of wine sensory properties using mid-infrared spectra of Cabernet Sauvignon and Chardonnay grape berries and wines. *Food Chemistry*.
- Oelofse A. Pretorius I.S., Su Toit M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking. *A Synoptic Review. S. Afr. J. Enol. Vitic.* 29, pp.128-144.
- Oelofse A., Lonvaud-Funel A. and du Toit M., 2009, Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production, *Food Microbiology* 26, no. 4, 377-385.
- O'Rourke, A. T., Deng, J., Turner, K. L., Rasmussen, L. C., & Babauta, J. T. (2020). Application of Fourier transform infrared spectroscopy for monitoring bacterial growth and antibiotic susceptibility. *Frontiers in Microbiology*, 11, 972.
- Ough, C.S & Were, Lilian, 2005, Sulfur dioxide and sulfites, *Antimicrobials in Food*, 3rd edition, 143-167
- Oust, A., Moretro, T., Kirschner, C., Narvhus, J.A., Kohler, A., 2004a. Evaluation of the robustness of FTIR spectra of lactobacilli towards changes in the bacterial growth conditions. *FEMS Microbiol Lett* 239 (1), 111-116
- Oust, A., Moretro, T., Kirschner, C., Narvhus, J.A., Kohler, A., 2004b. FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *J Microbiol Methods* 59 (2), 149-162
- Patz C.-D, A. Blieke, R Ristow & H Dietrich. (2004). Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica Chimica Acta*.
- Phister T. and Mills D.,2003, Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, no. 12, 7430-7434.
- Pizarro C., J.M. Gonzalez-Saiz, I. Esteban Diez & P. Orio. (2010). Prediction of total and volatile acidity in red wines by Fourier-Transform mid- infrared spectroscopy and iterative prediction weighting. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Puxeu Niquel, Imma Andorra, Silvia De Lamo-Castellvi & Raul Ferrer-Gallego. (2019). Degtermination pof Nutrient Supplementation by Means of ATR-FTIR Spectroscopy during Wine Fermentation. *Fermentation*.
- Renouf V. and Lonvaud-Funel A., 2007, Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries, *Microbiological Research* 162 , no. 2, 154-167.

- Renouf, V. & Lonvaud-Funel, A., 2006. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol. Res.* 162, 154-167.
- Renouf, V., Gindreau, E., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Microbial changes during malolactic fermentation in red wine elaboration. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 39,179–190.
- Rozpedowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O.P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., Piskur, J., 2011, Parallel evolution of the make– accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts, *Nature Communications*2, 302.
- Rubio, C., Ott, C., Amiel, C., Dupont-Moral, I., Travert, J., Mariey, L., 2006. Sulfato/thiosulfato reducing bacteria characterization by FT-IR spectroscopy: A new approach to biocorrosion control. *J Microbiol Methods* 64 (3), 287-296
- Salman A., Tsrer L., Pomerantz A., Moreh R., Mordechai S., Huleihel M. (2010) FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. *Spectroscopy* 24: 261–267.
- Scano Paola. (2021). Characterization of the medium infrared spectra of polyphenols of red and white wines by integrating FTIR and UV-Vis spectral data. *LWT*.
- Schifferdecker, A. J., Dashko, S., Ishchuk, O. P., & Piškur, J. (2014). The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast*, 31(9), 323-332.
- Schron-Garcia Daniel, Julieta Cavaglia, Barbara Giussani, Olga Busto, Laura Acena, Montserrat Mestres & Ricard Boque. (2021) ATR-MIR spectroscopy as a process analytical technology in wine alcoholic fermentation – A tutorial. *Microchemical Journal*.
- Shimotsu, S., Asano, S., Lijima, K., Suzuki, K., Yamagishi, H., and Aizawa, M. (2015) Investigation of beer-spoilage ability of *Dekkera/ Brettanomyces* yeasts and development of multiplex PCR method for beer-spoilage yeasts, *Journal of the Institute of Brewing* 121, 177–180.
- Silva Sandra D., Rodrigo P. Feliciano, Luis V. Boas & Maria R. Bronze. (2014). Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total Phenolic 73 and flavonoid contents and antioxidant capacity. *Food Chemistry*.
- Soriano A., P.M. Perez-Juan, A. Vicario, J. M. Gonzalez & M.S. Perez-Coello. (2007). Determination of anthocyanins in red wines using a newly developed method based on Fourier Transforms Infrared spectroscopy. *Food Chemistry*.
- Steensels J., Daenen L., Malcorps P., Derdelinckx G., Verachtert H., Verstrepen K.J. (2015). *Brettanomyces* yeasts- from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 206, pp.24-38.
- Strong G., England K. (2015). Beer Judge Certification Program (BJCP): Style Guidelines Beer Style Guidelines, World-wide certifying organization.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.a., Morata, a., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chem.* 102, 10–21.
- Šučur, S., Čadez, N., Kosmerl, T., 2016. Volatile phenols in wine: control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. *Acta Agric. Slov.* 107, 453–472.
- Taillandier, P., 2007. Humidité et azote, des facteurs aggravants. *La Vigne*. No. 189 de Juillet-Aout, p. 50.

- Taneja, S., Mishra, B., & Thakur, S. (2013). Identification and differentiation of *Candida* species by Fourier transform infrared spectroscopy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1331-1338.
- Tarantilis P.A., V.E. Troianou, C.S. Pappas, Y.S. Kotseridis & M.G. Polissiou. (2008). Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*.
- Thanasi Vasiliki, Catarino Sofia, Ricardo-da-Silva, Jorge M. (2022). Fourier transform infrared spectroscopy in monitoring the wine production.
- Theophanides, T. 2012. « Introduction to Infrared Spectroscopy», *Materials Science, Engineering and Technology*, chapter 1.
- Timmins, E.M., Howell, S.A., Alsberg, B.K., Noble, W.C., Goodacre, R., 1998a. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol* 36 (2), 367-374
- Timmins, E.M., Quain, D.E., Goodacre, R., 1998b. Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Yeast* 14 (10), 885–893
- Tintelnot, K., Haase, G., Seibold, M., Bergmann, F., Staemmler, M., Franz, T., Naumann, D., 2000. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 38 (4), 1599–1608
- Tubia I., Prasad K., Perez-Lorenzo E., Abadin C., Zumarraga M., Oyanguren I., Barbero F., Paredes J., Arana S. (2018). Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of *Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology* 283 pp. 65-76.
- Tudo Jose Luis Aleixandre, Helene Nieuwoudt, Jose Luis Aleixandre & Wesel du Toit. (2018). Chemometric Compositional analysis of phenolic compounds in fermenting samples and wines using different infrared spectroscopy techniques. *Talanta*.
- Urtubia Alejandra, J. Ricardo Perez-correa, Francisco Pizarro & Eduardo Agostin. (2008). Exploring the applicability of MIR spectroscopy to detect early indications of wine fermentation problems. *Food Control*.
- Vally, H., Misso, N.L.A., 2012, Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterol Hepatol. Bed Bench* 5, 16–23.
- van der Walt, J.P., and A.E. van Kerken. 1958. The wine yeasts of the Cape. Part I. A taxonomic study of the yeasts causing turbidity in South African table wines. *Ant. Leeuwenhoek* 24: 239- 251.
- Vendrame M., Manzano M., Comi G., Bertrand J., Iacumin L. (2014). Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Brettanomyces bruxellensis* in wine and beer by quantitative PCR. *Food Microbiology* 42 pp.196-204
- Versari Andrea, Giuseppina Paola Parpinello, Francesca Scazzina & Daniele Del Rio. (2010). Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Control*.
- Wang, Y.; Zhou, Q.; Li, B.; Liu, B.; Wu, G.; Ibrahim, M.; Xie, G.; Li, H.; Sun, G. Differentiation in MALDI-TOF MS and FTIR Spectra between Two Closely Related Species *Acidovorax oryzae* and *Acidovorax citrulli*. *BMC Microbiol.* 2012, 12, 182.
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J., 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT Food Sci. Technol.* 43, 1474–1479.

- Wenning, M., Seiler, H., Scherer, S., 2002. Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl Envir Microbiol* 68 (10), 4717–4721
- Wenning, M.; Scherer, S. Identification of Microorganisms by FTIR Spectroscopy: Perspectives and Limitations of the Method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 97, 7111–7120.
- Yan-ling Zhang, Jian-bo Chen, Yu Lei, Qun Zhou, Su-qin Sun & Isao Noda.(2010) Discrimination of different red wine by Fourier-transform infrared and twodimensional infrared correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*.
- Yap, A., Jiranek, V., Grbin, P., Barnes, M. & Bates, D., 2007. Studies on the application of high-power ultrasonics for barrel and plank cleaning and disinfection. *Aus. Wine Ind. J.* 22, 96-104.
- Yu, C., & Irudayaraj, J. (2005). Spectroscopic characterization of microorganisms by FTIR microspectroscopy. *Journal of Biopolymers*, 77(6), 368–377.
- Zhao, H., Parry, R.L., Ellis, D.I., Griffith, G.W., Goodacre, R., 2006. The rapid differentiation of *Streptomyces* isolates using Fourier transform infrared spectroscopy. *Vibr Spectrosc* 40 (2), 213-218
- Zuehlke, J.M., Petrova, B., Edwards, C.G., 2013. Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 57–78.
- Βαλαβανίδης, Αθ. (2006). Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Κούη, Μ., Χειλάκου, Ε., Θεοδωρακέας, Π., Δρίτσα, Β., Αβδελίδης, Ν., 2015. « ΜηΚαταστρεπτικέςκαιΦασματοσκοπικές Μέθοδοι Εξέτασης των Υλικών», κεφ. 7, σελ. 190 – 220.
- Πολυσίου Μ. Γ., (1989). Μαθήματα οργανικής στερεοχημείας και ενόργανη ανάλυση GC, UV - Vis, IR, NMR. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.
- Χατζηϊωάννου, Θ.Π., Κουπάρη, Μ.Α. (1990). Ενόργανη ανάλυση. Πανεπιστήμιο Αθηνών (Εκδόσεις Δ. Μαυρομάτη). Αθήνα.