



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της κινητικής ανάπτυξης νέων στελεχών ζυμών του
Ελληνικού terroir**

ΜΑΖΩΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

A.M. : 718171052

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

Αθήνα, Οκτώβριος 2023



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

BACHELOR THESIS

**Kinetic growth study of new yeast strains of the Greek
terroir**

MAZONAKI VASILIKI
REGISTRATION NUMBER: 718171052

SUPERVISOR NAME & SURNAME:
DIMOPOULOU MARIA

Athens, October 2023



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

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

«Μελέτη της κινητικής ανάπτυξης νέων στελεχών ζυμών του ελληνικού terroir»

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή υπογραφή επιβλέποντα καθηγητή (1^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή υπογραφή (2^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή υπογραφή (3^ο Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα **ΜΑΖΩΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ** του **ΓΕΩΡΓΙΟΥ**, με αριθμό μητρώου **718171052**, φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, της Σχολής Επιστημών Τροφίμων, του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία.

Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο.

Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι 31/12/2024 και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή*

Η Δηλούσα

Μαζωνάκη Βασιλική



Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα Καθηγητή

Ψηφιακή Υπογραφή

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρήση διαφορετικών γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων και η παραλλακτικότητα της βιολογικής τους απόκρισης σε διαφορετικά περιβάλλοντα ανάπτυξης, αποτέλεσε το επίκεντρο της παρούσας μελέτης. Έξι επιλεγμένα προς μελέτη στελέχη χρησιμοποιήθηκαν, τα οποία ανήκουν σε διαφορετικά είδη ζυμών. Πιο συγκεκριμένα τα A6Y6, A6Y10, A26Y5 και K33Y14 ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*, το A9Y1 στο είδος *Trigonopsis californica* και το A19Y5 στο είδος *Zygosaccharomyces bailii*. Όλα τα παραπάνω ιθαγενή στελέχη απομονώθηκαν στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, από λευκούς οίνους του ελληνικού αμπελώνα. Αρχικά, αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα ανάπτυξής τους σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης (18 °C και 15 °C) σε καλλιέργεια λευκού χυμού σταφυλιού. Υπολογίστηκαν και συγκρίθηκαν οι κινητικές τους παράμετροι, οι οποίες εμφάνισαν διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών στις δύο θερμοκρασίες, με την χαμηλότερη να εμφανίζει πιο αργές ζυμώσεις. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η ικανότητα προσκόλλησης και δημιουργίας βιοϋμενίων σε επιφάνεια γυαλιού, καθώς και η ικανότητα των προσκολλημένων κυττάρων να παράγουν πολυσακχαρίτες. Τα παραπάνω στελέχη, μελετήθηκαν επίσης ως προς την ικανότητα κροκίδωσής τους (flocculation), ως επιθυμητό χαρακτηριστικό των ζυμών, στη διευκόλυνση της διαύγασης των οίνων. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την παραλλακτικότητα που εμφανίζουν οι ζύμες τόσο μεταξύ των ειδών, όσο και μεταξύ των στελεχών.

Λέξεις κλειδιά: αλκοολική ζύμωση, *Saccharomyces cerevisiae*, *non-Saccharomyces*, βιοϋμένιο, κροκίδωση, πολυσακχαρίτες

ABSTRACT

The use of different indigenous yeast strains and the variability of their biological response to different growth environments, led to the focus of the present study. Six strains were selected for study, which belong to different types of yeasts. Specifically, A6Y6, A6Y10, A26Y5 and K33Y14 belong to the species *Saccharomyces cerevisiae*, A9Y1 to the species *Trigonopsis californica* and A19Y5 to the species *Zygosaccharomyces bailii*. All the above indigenous strains were isolated at the end of alcoholic fermentation, from white wines of the greek vineyard. Initially, they were evaluated for their ability to grow at two different growth temperatures (18 °C and 15 °C) in white grape juice culture. Their kinetic parameters were calculated and compared, which showed a difference between the strains at the two temperatures, with lower temperatures showing slower fermentations. Then, the ability to adhere and form biofilms on a glass surface was evaluated, as well as the ability of the attached cells to produce polysaccharides. The above strains were also studied in terms of their flocculation ability, as a desirable characteristic of yeasts, in facilitating the clarification of wines. The results confirmed the variability shown by yeasts, both between species and strains.

Key words: alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, *non-Saccharomyces*, biofilm, flocculation, polysaccharides

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια Δημοπούλου Μαρία, επιβλέπουσα καθηγήτρια της εργασίας, για την εξαιρετική συνεργασία της, την εμπιστοσύνη της και την έμπρακτη καθοδήγησή της, καθ' όλη τη διάρκεια των μηνών που πέρασαν. Η πρώτη μου εμπειρία με τον τομέα της έρευνας μαζί της ήταν αξιομνημόνευτη και είμαι πολύ τυχερή που βρέθηκα στην ομάδα της.

Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ στη Διδάκτωρ του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, Τζαμουράνη Αικατερίνη, για την συμπαράσταση, την υπομονή και την αμέριστη βοήθεια και στήριξή της, σε κάθε βήμα.

Ευχαριστώ πολύ, επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή Ταταρίδη Παναγιώτη, για τον χρόνο που αφιέρωσε στην αξιολόγηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, για τη συνεχή τους στήριξη και εμπιστοσύνη σε κάθε μου βήμα, όπως και στους φίλους μου, για τις συμβουλές, την κατανόηση και τη στήριξή τους.

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	1
1.1	Αλκοολική ζύμωση	1
1.2	Ζύμες κατά την οινοποίηση	2
1.2.1	Το είδος του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.2.2	Το είδος του <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	3
1.2.3	Το είδος του <i>Trigonopsis californica</i>	4
1.2.4	Βιολογικός κύκλος ανάπτυξης κυττάρων ζυμών.....	5
1.2.5	Κινητικές παράμετροι ανάπτυξης ζυμομυκήτων.....	6
1.2.5.1	Φάση προσαρμογής (Lag phase)	6
1.2.5.2	Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης - Χρόνος διπλασιασμού	7
1.2.6	Στρεσογόνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες - Θερμοκρασία	8
1.3	Τεχνολογικά χαρακτηριστικά ζυμών	9
1.3.1	Βιοϋμένια (Biofilms).....	9
1.3.1.1	Δημιουργία βιοϋμενίου	9
1.3.2	Ικανότητα κροκίδωσης κυττάρων ζυμών (Flocculation).....	12
1.3.3	Πολυσακχαρίτες	15
2	Σκοπός	16
3	Υλικά και μέθοδοι	17
3.1	Στελέχη μικροοργανισμών	17
3.2	Θρεπτικά υποστρώματα	17
3.3	Ενεργοποίηση κυττάρων μικροοργανισμών	18
3.4	Κινητική ανάπτυξη μικροοργανισμών	19
3.4.1	Υπολογισμός Αφομοιώσιμου Αζώτου (YAN-Yeast Assimilable Nitrogen)...	20
3.4.1.1	Μέθοδος τιτλοδότησης με φορμαλδεΐδη	21
3.5	Μέθοδος σχηματισμού βιοϋμενίου (Biofilm)	21
3.5.1	Προετοιμασία εμβολίου	21
3.5.2	Μέσο προσκόλλησης και ανάπτυξης βιοϋμενίου	22
3.5.3	Καταμέτρηση βιοϋμενικών κυττάρων – Μέθοδος στροβιλισμού γυάλινων σφαιριδίων (Glass Bead Vortexing Method).....	23
3.6	Μελέτη ικανότητας κροκίδωσης στελεχών (Flocculation test)	24
3.6.1	Προετοιμασία εμβολίου	24
3.7	Ποσοτικοποίηση πολυσακχαριτών – Τεστ ανθρόνης (Anthrone Test)	25
3.7.1	Προετοιμασία δειγμάτων.....	25
3.7.2	Τεστ ανθρόνης - (Anthrone Test).....	26
4	Αποτελέσματα – Συζήτηση	28

4.1	Μελέτη κινητικής ανάπτυξης στελεχών σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας.....	28
4.2	Μελέτη ικανότητας προσκόλλησης	31
4.3	Μελέτη ικανότητας κροκίδωσης στελεχών (Flocculation)	34
4.4	Μελέτη ποσοτικοποίησης πολυσακχαριτών βιοϋμενικών κυττάρων	35
5	Συμπέρασμα	38
6	Βιβλιογραφία.....	40

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Σύνοψη διεργασιών αλκοολικής ζύμωσης.	1
Εικόνα 2. Μορφολογία κυττάρων του είδους <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
Εικόνα 3. Μορφολογία κυττάρων του είδους <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	4
Εικόνα 4. Μορφολογία κυττάρων του είδους <i>Trigonopsis</i> (Kurtzman, 2007).	4
Εικόνα 5. Βιολογικός κύκλος ανάπτυξης κυττάρων ζυμών.	6
Εικόνα 6. Απεικόνιση των τεσσάρων σταδίων σχηματισμού βιοϋμενίου από πλαγκτονικά κύτταρα (Maunder, 2017).	10
Εικόνα 7. Εξωκυτταρική μήτρα <i>S. cerevisiae</i> , κατά την παραγωγή βιοϋμενίου.	11
Εικόνα 8. Μηχανισμός προσομοίωσης κροκίδωσης του <i>S. cerevisiae</i> . (α) τα ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) επιτρέπουν στις λεκτίνες να επιτύχουν την ενεργή τους διαμόρφωση και (β) οι λεκτίνες ενεργής κροκίδωσης, που υπάρχουν μόνο στα κύτταρα με δυνατότητα κροκίδωσης, προεξέχουν από το κυτταρικό τοίχωμα του ζυμομύκητα και αλληλεπιδρούν με τα υπολείμματα μαννόζης (υποδοχείς) στα γειτονικά κυτταρικά τοιχώματα (Miki et al, 1982). 13	
Εικόνα 9. Αναπαράσταση κυτταρικού τοιχώματος του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
Εικόνα 10. Βιολογικός χυμός λευκού σταφυλίου.	18
Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση βημάτων ενεργοποίησης κυττάρων μικροοργανισμών. ..	18
Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της καταμέτρησης των αποικιών, με τη μέθοδο δεκαδικών αραιώσεων.	20
Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση ποσοτικοποίησης βιοϋμενικών κυττάρων, με τη μέθοδο στροβιλισμού γυάλινων σφαιριδίων (glass bead vortexing method).	23
Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση μεθόδου ικανότητας κροκίδωσης (flocculation test).	25
Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση ποσοτικοποίησης πολυσακχαριτών (anthrone method). ..	26
Εικόνα 16. Μηχανισμός αντίδρασης τεστ ανθρόνης (Katoch, 2011).	27

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Στελέχη μικροοργανισμών.....	17
Πίνακας 2. Σύσταση χυμού σταφυλιού-γλεύκους.....	19
Πίνακας 3. Μέσοι όροι των κινητικών παραμέτρων κάθε στελέχους ± τυπική απόκλιση σε συνθήκες θερμοκρασίας 18 °C. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).....	28
Πίνακας 4. Μέσοι όροι των κινητικών παραμέτρων κάθε στελέχους ± τυπική απόκλιση σε συνθήκες θερμοκρασίας 15 °C. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).....	29
Πίνακας 5. Μέσοι όροι του πληθυσμού προσκολλημένων κυττάρων κάθε στελέχους σε κουπόνι γυαλιού ± τυπική απόκλιση. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).....	32
Πίνακας 6. Μέσοι όροι ικανότητας κροκίδωσης κάθε στελέχους ± τυπική απόκλιση. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).	34

Κατάλογος γραφημάτων

Γράφημα 1. Καμπύλες ανάπτυξης μέσου πληθυσμού κυττάρων (log cfu/ml) των έξι στελεχών σε θερμοκρασίες 18 °C και 15 °C, στο πέρασμα του χρόνου.....	29
Γράφημα 2. Μέσος πληθυσμός προσκολλημένων κυττάρων κάθε στελέχους σε κουπόνι γυαλιού. Η τυπική απόκλιση εμφανίζεται με τη μορφή γραμμών σφάλματος μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).....	32
Γράφημα 3. Μέσοι όροι του λόγου EPS / log CFU που παράγει κάθε στέλεχος, για τα πλαγκτονικά και τα κύτταρα βιοϋμενίου, αντίστοιχα. Η τυπική απόκλιση εμφανίζεται με τη μορφή γραμμών σφάλματος μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).....	36

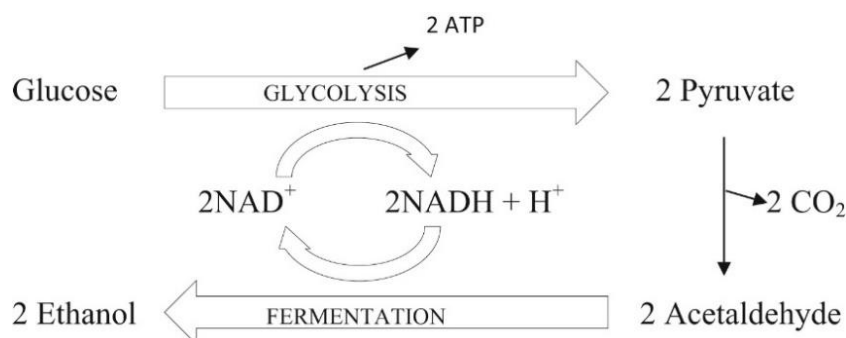
1 Εισαγωγή

1.1 Αλκοολική ζύμωση

Η ικανότητα των ζυμομυκήτων να μεταβολίζουν τα σάκχαρα του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, παράγοντας αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενέργειας, αντιπροσωπεύει τη μεγαλύτερη παγκόσμια βιοτεχνολογική διαδικασία.

Η διαδικασία αυτή, γνωστή ως αλκοολική ζύμωση, αποτελεί μεταβολική διαδικασία, που επιτυγχάνεται μέσω δύο διεργασιών. Κατά το στάδιο της γλυκόλυσης, τα κύρια σάκχαρα του χυμού σταφυλιού (γλυκόζη, φρουκτόζη) μετατρέπονται από τους ζυμομύκητες σε πυροσταφυλικό οξύ. Ακολουθεί η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεΐδη, με τελική παραγωγή αιθανόλης και έκλυση διοξειδίου του άνθρακα.

Παρότι το είδος *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί τον κατεξοχήν χρησιμοποιούμενο ζυμομύκητα της αλκοολικής ζύμωσης, η σύγχρονη τεχνολογία, τόσο από την άποψη της γνώσης των μεταβολικών διεργασιών των ζυμομυκήτων, όσο και από την άποψη της τεχνολογίας οινοποίησης, αποτελεί σύμμαχο στην μελέτη περαιτέρω ειδών ζυμομυκήτων, με σκοπό την εκμετάλλευσή τους στην βιομηχανία των αλκοολούχων ποτών (Maicas, 2020; Walker and Walker, 2018).



Εικόνα 1. Σύνοψη διεργασιών αλκοολικής ζύμωσης.

1.2 Ζύμες κατά την οινοποίηση

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στη φύση και παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη ζύμωση πολλών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του ψωμιού, της μύρας και του κρασιού. Το πιο κοινό είδος ζύμης που χρησιμοποιείται στην οινοποίηση είναι το είδος του *Saccharomyces cerevisiae*, το οποίο είναι ικανό να ζυμώνει τόσο τη γλυκόζη όσο και τη φρουκτόζη, τα δύο κύρια σάκχαρα που υπάρχουν στο γλεύκος (Fleet et al., 2003). Η επιλογή του στελέχους ζυμομύκητα που χρησιμοποιείται κατά τη ζύμωση, μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στο άρωμα, τη γεύση και τη συνολική ποιότητα του τελικού οινικού προϊόντος (Maicas, 2021). Η μικροβιακή μικροχλωρίδα του σταφυλιού αποτελείται από ζύμες, βακτήρια και μύκητες (Considine and Frankish, 2014; Walker, 2014). Ωστόσο, οι ζύμες εμφανίζονται να έχουν μεγαλύτερο ρόλο, καθώς πραγματοποιούν την αλκοολική ζύμωση. Στην επιφάνεια των σταφυλιών, ο αριθμός ζυμών κυμαίνεται μεταξύ 10^2 - 10^6 cfu/g σταφυλιού (Mas et al., 2016). Αποτελούν είδη των γενών *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Dekkera*, *Torulasporea*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* και *Kluiveromyces* (Capozzi et al., 2015; Considine and Frankish, 2014; Walker, 2014). Η ζύμωση ξεκινά με τα είδη *Hanseniaspora*, *Candida* και *Metschnikowia*, τα οποία αναπτύσσονται σε πληθυσμούς 10^7 - 10^8 cfu/ml και πεθαίνουν κατά την αρχή της εκθετικής φάσης. Στο στάδιο αυτό, ο *S. cerevisiae* κυριαρχεί, με πληθυσμούς 10^7 - 10^8 cfu/ml και είναι το είδος που ολοκληρώνει την αλκοολική ζύμωση.

1.2.1 Το είδος του *Saccharomyces cerevisiae*

Το είδος που είναι υπεύθυνο για την αλκοολική ζύμωση, ο *Saccharomyces cerevisiae*, βρίσκεται σε μικρούς πληθυσμούς στην αρχή της ζύμωσης (Mas et al., 2016). Η αλκοολική ζύμωση ξεκινά με ζύμες που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*, στη πορεία όμως συνεχίζεται από στέλεχη του *Saccharomyces cerevisiae*, τα οποία είναι ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Αντίθετα, οι ζύμες που δεν ανήκουν στο γένος αυτό, αλλά σε *non-Saccharomyces* είδη, συνήθως δεν είναι ανθεκτικές σε

υψηλές ποσότητες αιθανόλης με αποτέλεσμα να μην επιβιώνουν όταν η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης φτάσει στο 5% v/v, κάτι το οποίο συμβαίνει 4-10 μέρες μετά την έναρξη της ζύμωσης (Walker, 2014). Πλέον, είναι παγκοσμίως αναγνωρισμένο ότι για την παραγωγή ποιοτικού οίνου, απαιτείται η αλληλεπίδραση και/ ή από κοινού συμμετοχή του *Saccharomyces cerevisiae* και διαφόρων άλλων ζυμομυκήτων στην αλκοολική ζύμωση (Maicas, 2021; Tofalo et al., 2022).

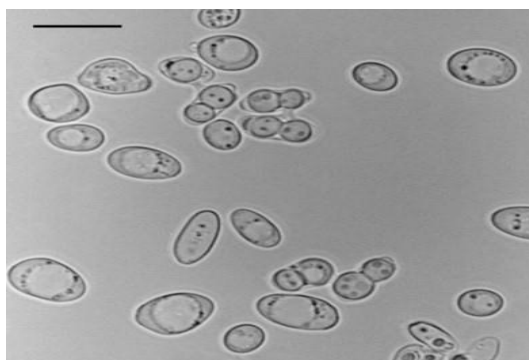


Εικόνα 2. Μορφολογία κυττάρων του είδους *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2.2 Το είδος του *Zygosaccharomyces bailii*

Το *Zygosaccharomyces bailii* είναι ένα είδος ζύμης που υπάρχει ευρέως σε διάφορες ζυμώσεις τροφίμων, όπως ζυμώσεις κρασιού, τσαγιού και ξιδιού (Teoh et al., 2004; Solieri et al., 2006). Στις περισσότερες βιομηχανίες τροφίμων και ποτών, το *Z. bailii* θεωρείται ως προβληματική ζύμη αλλοίωσης, λόγω της υψηλής αντοχής του στα συντηρητικά και της ανοχής σε διάφορες καταπονήσεις, όπως ύπαρξη σορβικού, βενζοϊκού και οξικού οξέος ή διοξειδίου του θείου (Stratford et al., 2013; Palma et al., 2015). Σε σύγκριση με το *S. cerevisiae*, το *Z. bailii* εμφανίζει τριπλάσια ανοχή σε αυτά τα οξέα (Statford et al., 2013). Ανεξάρτητα από τη συσχέτισή του με την αλλοίωση (Escott et al., 2018, Malfeito-Ferreira and Silva, 2019), οι πιθανές ευεργετικές επιδράσεις του *Z. bailii* έχουν επίσης προταθεί στις βιομηχανίες τροφίμων, λόγω της μεγάλης παραλλακτικότητας των στελεχών (Ciani et al., 2009; Domizio et al., 2011). Όπως αναφέρεται από τους Domizio et al., (2011), η συγκαλλιέργεια του *Z. bailii* με το *S. cerevisiae*, επέφερε αύξηση της παραγωγής πολυσακχαριτών, βελτιώνοντας τη γεύση και το σώμα του παραγόμενου οίνου. Επίσης, η συγκαλλιέργεια *S. cerevisiae* με

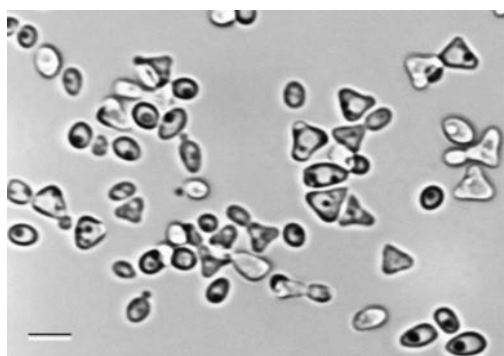
Z. bailii, έδειξε να βελτιώνει την παραγωγή αιθυλεστέρων που συμβάλλουν στο άρωμα του κρασιού, με φρουτώδεις νότες και νότες λουλουδιών (Garavaglia et al., 2015).



Εικόνα 3. Μορφολογία κυττάρων του είδους *Zygosaccharomyces bailii*.

1.2.3 Το είδος του *Trigonopsis californica*

Σπάνιο είδος αποτελεί το *Trigonopsis californica*, ένα είδος μύκητα που περιγράφηκε από τον Kurtzman το 2007. Τα κύτταρα αυτού του γένους είναι τριγωνικά ή ελλειψοειδή (Yarrow, 1998). Από τα τέσσερα είδη που έχουν πλέον αποδοθεί στο *Trigonopsis*, το *T. californica* σχετίζεται στενότερα με το *T. cantarellii* (Portugal et al., 2015). Το είδος *T. cantarellii* αποικίζει διαφορετικά περιβάλλοντα οινοποιείου, επιβιώνει και αναπτύσσεται σε ακραίες συνθήκες, όπως αυτές που παρέχονται από την παλαίωση κόκκινων κρασιών με υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη (> 12,7%) (Garijo et al., 2015). Πιθανόν να σχετίζεται με την παραγωγή αιθυλφαινόλης στους οίνους (Dias et al., 2003).



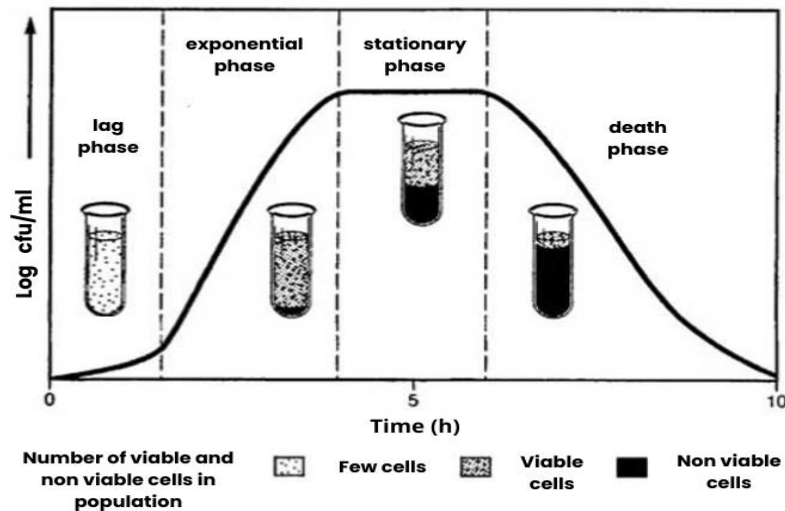
Εικόνα 4. Μορφολογία κυττάρων του είδους *Trigonopsis* (Kurtzman, 2007).

1.2.4 Βιολογικός κύκλος ανάπτυξης κυττάρων ζυμών

Κατά την ανάπτυξη του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, παρατηρούνται τέσσερις διακριτές φάσεις της ανάπτυξής του.

Στην αρχική φάση, γνωστή ως λανθάνουσα (lag phase), τα κύτταρα βρίσκονται σε στάδιο προσαρμογής στις νέες συνθήκες, είναι βιοχημικά ενεργά, αλλά εξακολουθούν να μην διαιρούνται (Gibson et al., 2007). Πρόσφατες μελέτες αξιολόγησαν τη λανθάνουσα φάση, όταν τα κύτταρα ζυμομύκητα μεταφέρθηκαν από τη γλυκόζη σε μια λιγότερο προτιμώμενη πηγή άνθρακα όπως η μαλτόζη, η γαλακτόζη ή η αιθανόλη (Perez-Samper et al., 2018; Cerulus et al., 2018). Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλες διαφορές στη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης μεταξύ διαφορετικών στελεχών ζυμομύκητα. Η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης σχετίζεται με την κυτταρική συγκέντρωση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αναπνοή (Perez-Samper et al., 2018). Τα στελέχη ζυμομύκητα που κατά μέσο όρο περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αναπνοή, ειδικότερα πρωτεΐνες που συνδέονται με τα σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, εμφανίζουν μικρότερες λανθάνουσες φάσεις (Perez-Samper et al., 2018).

Ακολουθεί η εκθετική φάση ανάπτυξης (exponential/log phase), όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και αυξάνονται εκθετικά. Ο ρυθμός αύξησης σε αυτή τη φάση είναι μέγιστος και τα περισσότερα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση. Η διάρκεια της εκθετικής φάσης είναι σχετικά μικρή, λόγω εξάντλησης των θρεπτικών στοιχείων, υπερβολικής συσσωμάτωσης κυττάρων ή συσσώρευσης ανασταλτικών μεταβολιτών. Μετά από μερικούς διπλασιασμούς, ο ρυθμός ανάπτυξής τους επιβραδύνεται και τα κύτταρα εισέρχονται σε στατική φάση (stationary phase). Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής, τα κύτταρα προσαρμόζουν το μεταβολισμό τους αλλάζοντας τη μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων, οδηγώντας σε πολλές φυσιολογικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της συσσώρευσης αποθεμάτων υδατανθράκων και της δημιουργίας ανθεκτικότερου κυτταρικού τοιχώματος. Εδώ, ο ρυθμός κυτταρικής διαίρεσης είναι παρόμοιος με τον ρυθμό κυτταρικού θανάτου, έτσι ο αριθμός των κυττάρων παραμένει σταθερός. Μετά την μακρά παραμονή στη στατική φάση, τα κύτταρα εισέρχονται στη φάση θανάτου (death phase), όπου επέρχεται αυτόλυσή τους.



Εικόνα 5. Βιολογικός κύκλος ανάπτυξης κυττάρων ζυμών.

1.2.5 Κινητικές παράμετροι ανάπτυξης ζυμομυκήτων

Η εξέλιξη του αριθμού των κυττάρων των ζυμομυκήτων με την πάροδο του χρόνου σε διαφορετικές συνθήκες, μπορεί να μελετηθεί και να συγκριθεί εκτενέστερα, από τα δεδομένα για την απεικόνιση της καμπύλης ανάπτυξης.

1.2.5.1 Φάση προσαρμογής (Lag phase)

Ο χρόνος υστέρησης ή προσαρμογής (lag time), ορίζεται ως το χρονικό διάστημα που απαιτεί κάθε ζυμομύκητας, μετά τον εμβολισμό του σε μέσο ανάπτυξης, για να προσαρμοστεί και να ξεκινήσει να διαιρείται. Οι υψηλές, αλλά και περιορισμένες, συγκεντρώσεις σακχάρου στο μέσο ανάπτυξης, το χαμηλό pH, όπως επίσης και οι χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης (κυρίως στη λευκή οινοποίηση), αποτελούν παράγοντες που παρατείνουν τον χρόνο υστέρησης, με συνέπειες αργές ζυμώσεις και πιθανή επικράτηση ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας στο μέσο ζύμωσης, προκαλώντας αλλοιώσεις στο τελικό προϊόν. Στοχευμένη ήταν η μελέτη των Ferreira et al., (2017) με σκοπό την επιβεβαίωση των παραπάνω. Ειδικότερα, σύγκριναν τον χρόνο υστέρησης σε οκτώ στελέχη *Saccharomyces* και δύο *non Saccharomyces* (*T. delbrueckii*, *S. uvarum*). Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως, σε θερμοκρασία 16 °C, ο μέσος χρόνος

υστέρησης των στελεχών (32,3 h) βρέθηκε να είναι αυξημένος κατά περίπου 30%, σε σχέση με τον μέσο χρόνο υστέρησης στους 28 °C (8,5 h). Τα στελέχη *non Saccharomyces* εμφάνισαν εμφανώς μεγαλύτερους χρόνους υστέρησης, σε σύγκριση με τα *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2.5.2 Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης - Χρόνος διπλασιασμού

Σε περιβάλλον με περίσσεια θρεπτικών υλικών, καθώς και ήπιων καλλιεργητικών τεχνικών, οι ζυμομύκητες μπορούν να διπλασιάζονται περίπου κάθε 1,5 ώρες. Ωστόσο, κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, οι ζυμομύκητες αντιμετωπίζουν συνθήκες που δυσκολεύουν την ανάπτυξή τους. Ως αποτέλεσμα, μεταβολές στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξής τους και, κατά συνέπεια, στη βιωσιμότητά τους. Η ικανότητα προσαρμογής και αντίστασης σε τέτοια εχθρικά περιβάλλοντα, είναι η ειδοποιός διαφορά για την επιλογή τους ως ζύμες εναρκτήριας καλλιέργειας. Σε υπόστρωμα λευκού χυμού με χαμηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (ικανές για να παραχθεί αλκοόλη) και ζύμωση στους 25 °C, μεταξύ *non Saccharomyces* στελεχών (*Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomycodes ludwigii* και *Candida stellata*) και σε σύγκριση με το *Saccharomyces cerevisiae*, ο πιο μικρός ρυθμός ανάπτυξης αντιστοιχεί στο στέλεχος *Candida stellata*, ενώ ο μεγαλύτερος ρυθμός ανάπτυξης στο *Saccharomyces cerevisiae*. Τα υπόλοιπα στελέχη εμφανίζουν ενδιάμεσες τιμές, χωρίς να ξεπερνούν το *Saccharomyces cerevisiae* (Ciani, Picciotti, 1995). Η θερμοκρασία αποτελεί σημαντικό παράγοντα στον ρυθμό ανάπτυξης των στελεχών, με την αύξησή της, να έχει ως απόρροια την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο *Saccharomyces cerevisiae*, εμφανίζει μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης ($\sim 0,42 \text{ h}^{-1}$), σε θερμοκρασία 33 °C, καθιστώντας το, το πιο θερμοανθεκτικό στο γένος του. Ακόμα και υπό τις βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης για τα είδη *non Saccharomyces* ($\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$), η τιμή του ρυθμού ανάπτυξης του *Saccharomyces cerevisiae* ήταν εμφανώς υψηλότερη (Salvadó et al., 2011).

1.2.6 Στρεσογόνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες - Θερμοκρασία

Τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς, μέσω των οποίων ανταποκρίνονται σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, προκειμένου να μην απειληθεί η βιωσιμότητά τους. Κομμάτι της παρούσας μελέτης βασίστηκε στην ανάπτυξη στελεχών ζυμών σε διαφορετικές θερμοκρασίες, προκειμένου να εντοπιστούν αλλαγές στην ανάπτυξή τους. Η θερμοκρασία είναι μια μεταβλητή που επηρεάζει άμεσα τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Charoenchai et al., 1998), συνεπώς και την τελική σύνθεση του κρασιού (Torija et al., 2003). Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία των ζυμών στη συγκέντρωση αλκοόλης, το ρυθμό ανάπτυξης, τη βιωσιμότητα, τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης. Τα κύτταρα των ζυμών ενεργοποιούν ένα προστατευτικό μεταγραφικό πρόγραμμα που ονομάζεται απόκριση θερμικού σοκ (HSR), προκαλώντας αλλαγή των συστατικών της φυσιολογίας τους, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης της μεμβράνης και της ροής υδατανθράκων. Ο Παράγοντας Θερμικού Σοκ 1 (HSF1), είναι ένας εξαιρετικά διατηρημένος παράγοντας μεταγραφής στους ευκαρυώτες, όπου σε συνθήκες στρες προκαλεί το παραπάνω προστατευτικό μεταγραφικό πρόγραμμα που ονομάζεται απόκριση θερμικού σοκ (HSR) (Wang et al., 2013; Steurer et al., 2018). Ο *S. cerevisiae*, καθώς και άλλοι μεσόφιλοι ζυμομύκητες διατηρούν την ανάπτυξή τους σε θερμοκρασίες έως 42° C, αλλά δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν τη χρόνια έκθεση σε τέτοιες ψηλές θερμοκρασίες. Στον *S. cerevisiae*, το HSF1 (Παράγοντα Θερμικού Σοκ 1) κωδικοποιείται από ένα βασικό γονίδιο, το HsfSF1 (Sorger and Pelham 1988; Wiederrecht et al., 1987; Ciccarelli et al., 2023). Ένας δεύτερος μεταγραφικός παράγοντας που αντιπροσωπεύεται από τα γονίδια MSN2 και MSN4, συμβάλλει επίσης ουσιαστικά στην έκφραση γονιδίου θερμικού σοκ (Morano et al., 2012).

Επειδή τα στελέχη ζυμών διαφέρουν ως προς την απόκριση σε διαφορετικές θερμοκρασίες, η βέλτιστη θερμοκρασία για οινοποίηση μπορεί να ποικίλλει (Jackson, 2000). Η προτίμηση για τη διεξαγωγή της ζύμωσης λευκού γλεύκους κυμαίνεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 15–20 °C, δίνοντας πιο φρέσκα, πιο φρουτώδη κρασιά. Αυτό εν μέρει σχετίζεται με την αυξημένη σύνθεση εστέρων, που προσδίδουν αρώματα φρούτων. Τα κόκκινα κρασιά συνήθως ζυμώνονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τα λευκά, σε ένα εύρος από 20 έως 27 °C, ευνοώντας την εκχύλιση τανινών και ανθοκυανών. Ωστόσο, αυτές οι θερμοκρασίες μπορεί να εμφανίζουν

ανεπιθύμητες συνέπειες, καθώς ευνοείται η παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων οξικού οξέος, ακεταλδεϋδης και ακετοΐνης.

Αρκετοί συγγραφείς έχουν προτείνει ότι ορισμένα είδη *non Saccharomyces* έχουν καλύτερες πιθανότητες να αναπτυχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες από ότι τα είδη *Saccharomyces* (Sharf and Margalith, 1983; Heard and Fleet, 1988), γεγονός που επιβεβαιώνεται από την ανάκτηση ζυμών των ειδών *Hanseniaspora* και *Candida* στο τέλος ζυμώσεων σε χαμηλές θερμοκρασίες, σε οίνους που η αιθανόλη βρισκόταν ακόμα και σε ποσοστά 10-13% (Gao and Fleet, 1988). Ζυμώσεις σε θερμοκρασίες μεταξύ 15 και 20 °C ξεκίνησαν πιο αργά, με μεγαλύτερη λανθάνουσα φάση, ειδικά στους 15 °C, προκαλώντας μια καθυστέρηση στην επίτευξη του μέγιστου πληθυσμού (Torija et al., 2003).

1.3 Τεχνολογικά χαρακτηριστικά ζυμών

1.3.1 Βιοϋμένια (Biofilms)

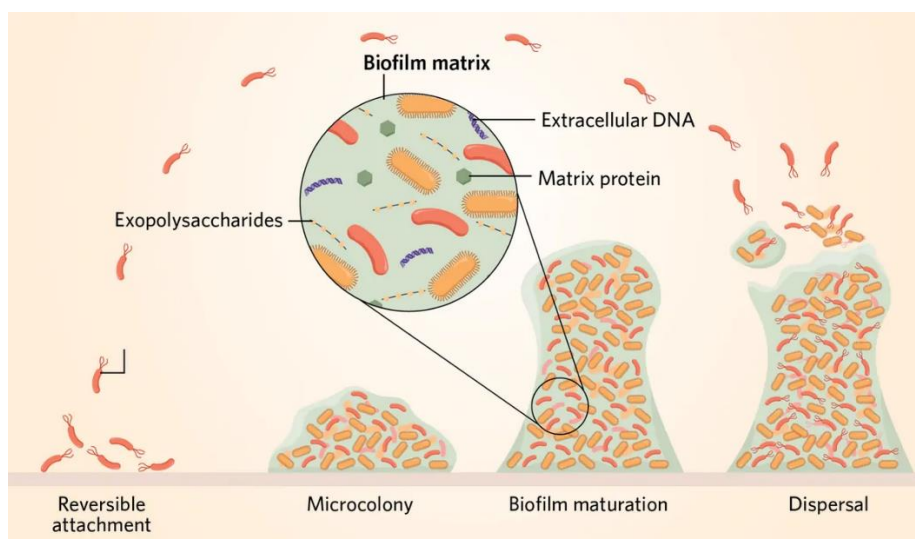
Ως βιοϋμένια ορίζονται οι δομημένες μικροβιακές κοινότητες που εμφανίζονται ως κοινότητες προσαρτημένες σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες. Αποτελούνται από μικροβιακά κύτταρα (βακτήρια και/ή μύκητες) ενσωματωμένα σε μια αυτοπαραγόμενη εξωκυτταρική μήτρα που αποτελείται από εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (Extracellular Polymeric Substances): κυρίως πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιπίδια και εξωκυτταρικό DNA (Flemming et al., 2010). Η εξωκυτταρική μήτρα είναι ένα από τα βασικά στοιχεία για τη δημιουργία και τη διατήρηση της δομής και των ιδιοτήτων του βιοϋμενίου (Di Martino, 2018; Pradhan et al., 2023). Έχει δομή καναλιού που ελέγχει την απελευθέρωση αερίων, θρεπτικών ουσιών και αντιμικροβιακών ουσιών (Zhao et al., 2023).

1.3.1.1 Δημιουργία βιοϋμενίου

Τα βιοϋμένια δημιουργούνται ως στρατηγική προσαρμογής και επιβίωσης από τα μικροβιακά κύτταρα, όταν παρουσιάζονται δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες

(Chew et al., 2016). Η προσαρμογή αυτή εκφράζεται μέσω μεταβολικών διασταυρώσεων, αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων, όπως επίσης μέσω χημικής και φυσικής αντίστασης (Lebleux et al., 2020; Iñiguez-Moreno et al., 2019). Έχει παρατηρηθεί πως η δημιουργία βιοϋμενίου προσδίδει πλεονεκτήματα στα μικροβιακά κύτταρα, όπως φυσική αντίσταση στην ψύξη, τη θερμότητα, την αποξήρανση, την οξύτητα και την αλατότητα, μηχανική αντίσταση και χημική προστασία από αντιμικροβιακά και απολυμαντικά, σε σχέση με τα αντίστοιχα πλαγκτονικά κύτταρα (Iñiguez-Moreno et al., 2019; Coeny, 2022).

Η μετατροπή των πλαγκτονικών κυττάρων σε αντίστοιχα βιοϋμενικά κύτταρα περιλαμβάνει τέσσερα βήματα. Αυτά περιλαμβάνουν, α) σχηματισμό μεμβράνης θρεπτικών συστατικών στην επιφάνεια προσκόλλησης, β) προσκόλληση κυττάρων, γ) ωρίμανση βιοϋμενίων και δ) διασπορά-διάλυση βιοϋμενίων (Iñiguez-Moreno et al., 2019; Perez Alonso et al., 2023; Lebleux et al., 2020).

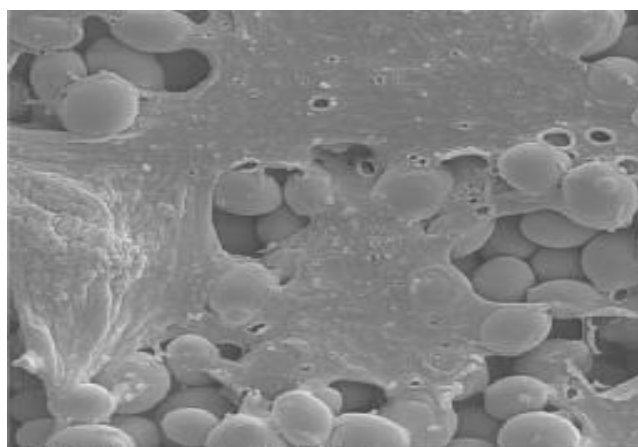


Εικόνα 6. Απεικόνιση των τεσσάρων σταδίων σχηματισμού βιοϋμενίου από πλαγκτονικά κύτταρα (Maunders, 2017).

Τα στάδια σχηματισμού βιοϋμενίου στα κύτταρα ζυμομύκητα παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με αυτά των βακτηριακών κυττάρων (Perez Alonso et al., 2023). Στο πρώτο στάδιο εμφανίζεται αναστρέψιμη ή μη αντιστρέψιμη προσκόλληση στην επιφάνεια (Klemm et al., 2021). Η προσκόλληση των κυττάρων ζυμομύκητα στην επιφάνεια του υλικού είναι το πρώτο βήμα για την ανάπτυξη του βιοϋμενίου, το οποίο παρέχει

ευνοϊκές συνθήκες για τη ζύμη, λόγω της καλύτερης διαθεσιμότητας θρεπτικών ουσιών και της προστασίας από περιβαλλοντικούς κινδύνους (Reinmets et al., 2019). Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας προσκόλλησης επηρεάζεται από τις επιφανειακές ιδιότητες των προσκολλημένων κυττάρων, από τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου με κύτταρο και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροβιακών κυττάρων και επιφανειών (Van Nguyen et al., 2020; Carpentier, 2014; Korber et al., 2009).

Η παραγωγή και η έκκριση εξωκυτταρικού πολυμερικού περιβλήματος EPS, καθώς και γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την μετάφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, επηρεάζουν την δημιουργία βιοϋμενίου (Butzke et al., 2010; Carpentier, 2014; Korber et al., 2009). Ως EPS ορίζονται ενυδατωμένα πολυμερή (εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες) που εκκρίνουν τα κύτταρα και αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα (RNA, DNA), αμινοξέα, γλυκοπρωτεΐνες, φωσφοπρωτεΐνες, σάκχαρα, φωσφολιπίδια, ουρονικά οξέα και φαινολικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να βρίσκονται σε διαφορετικές ποσότητες, εξαρτώμενες από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την ηλικία του βιοϋμενίου και τον τύπο των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στο σχηματισμό του (Carpentier, 2014; Korber et al., 2009; Lebleux et al., 2020). Η πολύπλοκη σύνθεση του EPS διατηρεί τα κύτταρα το ένα κοντά στο άλλο. Η επικοινωνία και η αλληλεπίδραση στα βιοϋμένια επιτυγχάνεται μέσω χημικής επικοινωνία, με μόρια ανίχνευσης απαρτίας (QSM) (Flemming et al., 2016). Η επικοινωνία μέσω QS επιτρέπει στα κύτταρα να λειτουργούν ως πολυκύτταροι οργανισμοί και συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό, τη διατήρηση και τη διάδοση του βιοϋμενίου (Whiteley et al., 2017).

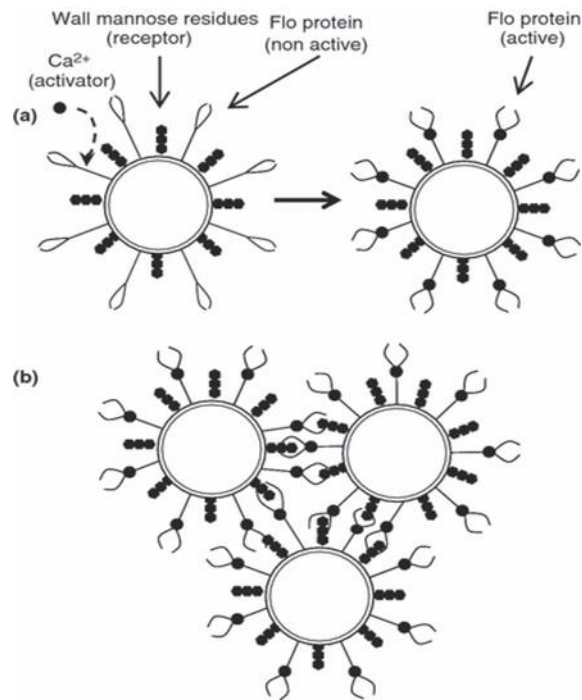


Εικόνα 7. Εξωκυτταρική μήτρα *S. cerevisiae*, κατά την παραγωγή βιοϋμενίου.

Η ωρίμανση και η διασπορά είναι τα τελικά στάδια του κύκλου του βιοϋμενίου (Sharahi et al., 2019; Zara et al., 2020). Η ωρίμανση του βιοϋμενίου δημιουργείται όταν το συσσωμάτωμα των κυττάρων παγιδεύει οργανικά και ανόργανα υπολείμματα, θρεπτικά συστατικά και άλλους μικροοργανισμούς (Butzke et al., 2010; Carpentier, 2014; Korber et al., 2009; Speranza et al., 2020). Κατά το τελικό στάδιο διασποράς, το περιβάλλον μέσα στα βιοϋμενικά κύτταρα γίνεται αναερόβιο, καθώς αυξάνεται ο μικροβιακός πληθυσμός, οδηγώντας σε αύξηση της συγκέντρωσης αδιάλυτων οξέων και αερίων, που εξασθενούν τη δομή και προκαλούν αποκόλληση κυττάρων ή θραυσμάτων αυτών (Rumbaugh and Sauer, 2020). Τα κύτταρα που θα αποκολληθούν από το βιοϋμένιο έχουν ήδη υιοθετήσει εκ νέου τον φαινότυπο πλαγκτονικών κυττάρων (Korber et al., 2009).

1.3.2 Ικανότητα κροκίδωσης κυττάρων ζυμών (Flocculation)

Η κροκίδωση ορίζεται ως η αναστρέψιμη συσσώρευση κυττάρων, που προάγεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ υποδοχέων πρωτεΐνης που μοιάζουν με λεκτίνη, με πλευρικές αλυσίδες μαννόζης σε γειτονικά κυτταρικά τοιχώματα. Η αλληλεπίδραση εξαρτάται από τα μόρια Ca^{2+} μεταξύ λεκτινών (φλοκουλίνες) και πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος, ιδίως μαννανών και γλυκανών (Miki et al., 1982). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η λεκτίνη που υπάρχει μόνο στα κύτταρα ζυμομύκητα με ικανότητα κροκίδωσης, εκκρίνεται στα εξωτερικά άκρα του κυτταρικού τοιχώματος και το N-τελικό τμήμα αυτής της πρωτεΐνης δεσμεύει δύο υπολείμματα μαννόζης που υπάρχουν στα κυτταρικά τοιχώματα γειτονικών κυττάρων ζύμης, τόσο με ικανότητα, όσο και με μη ικανότητα κροκίδωσης (Steward, 2018). Παρά το γεγονός ότι οι λεκτίνες κροκίδωσης υπάρχουν μόνο σε κύτταρα με ικανότητα κροκίδωσης, οι υποδοχείς (υπολείμματα μαννόζης κυτταρικού τοιχώματος) είναι παρόντες τόσο σε κύτταρα με ικανότητα κροκίδωσης, όσο και σε αυτά που δεν εμφανίζουν την ικανότητα αυτή, καθώς το εξωτερικό στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος του *S. cerevisiae* αποτελείται από α-μαννάνες (πολυμερή με κύριο συστατικό τη μαννόζη) (Soares et al., 2010).



Εικόνα 8. Μηχανισμός προσομοίωσης κροκίδωσης του *S. cerevisiae*. (α) τα ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) επιτρέπουν στις λεκτίνες να επιτύχουν την ενεργή τους διαμόρφωση και (β) οι λεκτίνες ενεργής κροκίδωσης, που υπάρχουν μόνο στα κύτταρα με δυνατότητα κροκίδωσης, προεξέχουν από το κυτταρικό τοίχωμα του ζυμομύκητα και αλληλεπιδρούν με τα υπολείμματα μαννόζης (υποδοχείς) στα γειτονικά κυτταρικά τοιχώματα (Miki et al, 1982).

Στη ζύμη, οι λεκτίνες είναι προϊόντα μιας οικογένειας γονιδίων, γνωστά ως γονίδια Flo. Τα γονίδια FLO1, FLO5, FLO9 και FLO10 κρυπτογραφούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την προσκόλληση μεταξύ κυττάρων (Guo et al., 2000). Το FLO1 είναι ένα δομικό γονίδιο κροκίδωσης. κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη κυτταρικού τοιχώματος (Watari et al., 1994; Bony et al., 1997) και προκαλεί κροκίδωση ενός φαινότυπου Flo1 (Kobayashi et al., 1998). Σε ζύμες ζυθοποιίας, περιγράφηκε ότι ένα νέο ομόλογο FLO1, που ονομάζεται Lg-FLO1, κωδικοποιεί μια προσκολλητική ουσία που είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο NewFlo (Kobayashi et al., 1998; Sato et al., 2002).

Η κροκίδωση εξαρτάται από διάφορους φυσιολογικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του τύπου σακχάρου που διατίθεται (Nayar et al., 2017). Είναι γνωστοί δύο κύριοι φαινότυποι κροκίδωσης, βασισμένοι στην ευαισθησία των στελεχών σε διαφορετικά σάκχαρα: ο φαινότυπος Flo1 και NewFlo (Stratford and

Assinder 1991). Ο φαινότυπος Flo1 περιλαμβάνει στελέχη στα οποία η κροκίδωση αναστέλλεται από τη μαννόζη. Από την άλλη πλευρά, ο φαινότυπος NewFlo περιέχει την πλειονότητα των στελεχών μύρας ζυθοποιίας, η κροκίδωση των οποίων είναι αναστρέψιμη και αναστέλλεται από τη μαννόζη, τη μαλτόζη, τη γλυκόζη και τη σακχαρόζη (Sato et al., 2002). Τα στελέχη φαινοτύπου NewFlo είναι πιο ευαίσθητα στην αναστολή από κατιόντα.

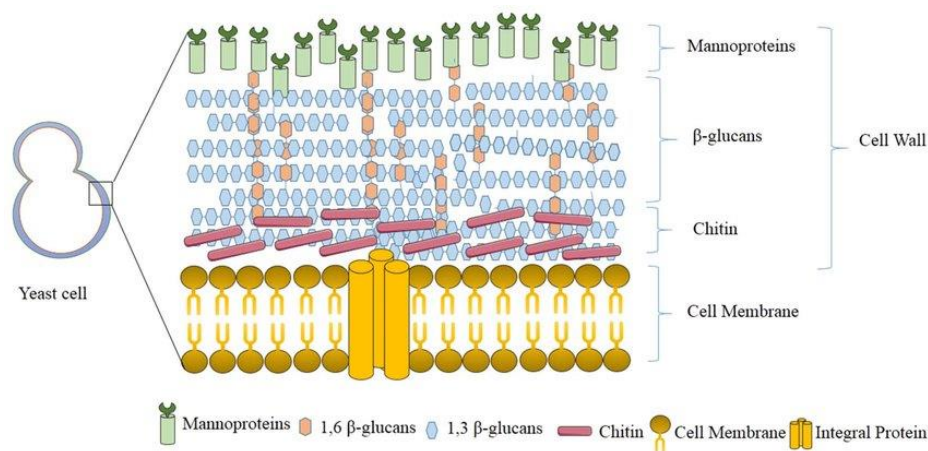
Τα κατιόντα έχουν επίσης κεντρικό ρόλο στην κροκίδωση του *S. cerevisiae*. Μεταξύ αυτών, το Ca^{2+} αναγνωρίζεται ως το πιο αποτελεσματικό στην προώθηση της κροκίδωσης (Miki et al., 1982; Stratford 1989). Αρκετά ακόμη κατιόντα (Rb^+ , Cs^+ , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) έχουν περιγραφεί ως επαγωγείς κροκίδωσης (Soares et al., 2002; Miki et al., 1982; Nishihara et al., 1982). Αντίθετα, κατιόντα όπως τα Ba^{2+} , Sr^{2+} και Pb^{2+} αναστέλλουν ανταγωνιστικά την κροκίδωση ζυμομύκητα, λόγω της ομοιότητας της ιοντικής αναλογίας τους με το Ca^{2+} (Gouveia and Soares, 2004). Πιθανή εξήγηση, πως τα συγκεκριμένα κατιόντα ανταγωνίζονται για την ίδια θέση ασβεστίου των λεκτινών κροκίδωσης, παρόλα αυτά δεν είναι σε θέση να επάγουν τη σωστή διαμόρφωση των λεκτινών.

Με το σχηματισμό αυτό, τα κροκιδωμένα κύτταρα διαχωρίζονται γρήγορα από το μέσο με καθίζηση (Verstrepen et al., 2003; Vidgren et al., 2011). Ο σχηματισμός κροκίδωσης παρέχει όφελος στους πληθυσμούς ζυμομυκήτων, καθώς η μορφή αυτή τους προστατεύει από αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (διαθεσιμότητα οξυγόνου, θερμοκρασία, pH) και ελλείψεις θρεπτικών συστατικών (Li et al., 2013; Vidgren et al., 2011). Η ικανότητα κροκίδωσης είναι ένα από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά που πρέπει να παρουσιάζει ένα στέλεχος κρασιού (Pretorius 2000; Vilanova and Massneuf-Pomarede 2005). Στην παραγωγή των αλκοολούχων ποτών, ο έλεγχος της έναρξης της κροκίδωσης είναι υψίστης σημασίας. Είναι επιθυμητό τα κύτταρα ζυμομύκητα να βρίσκονται σε μη κροκιδωτική κατάσταση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης, για γρήγορο ρυθμό ζύμωσης και στο τέλος της διαδικασίας, να εμφανίζουν κροκιδωτική ικανότητα, για την γρηγορότερη καθίζηση των κυττάρων (Bauer, 2002).

1.3.3 Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερείς δομές υδατανθράκων, που σχηματίζονται από την ένωση απλών σακχάρων – μονοσακχαριτών (π.χ γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη) ή δισακχαριτών (π.χ σακχαρόζη, λακτόζη), συνδεδεμένα μεταξύ τους με γλυκοσιδικούς δεσμούς (Holdt and Kraan, 2011; Mizrahy and Peer, 2011). Αυτές οι επαναλαμβανόμενες μονάδες μπορούν να κατασκευαστούν από πολλούς διαφορετικούς μονοσακχαρίτες (ετεροπολυσακχαρίτες) ή από την επανάληψη ενός μόνο (ομοπολυσακχαρίτες).

Το κυτταρικό τοίχωμα του *S. cerevisiae* αποτελεί το 15-30% του ξηρού βάρους του κυττάρου, ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης. Οι μαννοπρωτεΐνες (MP) αποτελούν το εξωτερικό μέρος της στιβάδας πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος των ζυμών. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και της παλαίωσης στις οινολάσπες, μερικές από τις MP απελευθερώνονται στο κρασί, όπου αλληλεπιδρούν με πολλά άλλα συστατικά του. Το εξωτερικό στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος των ζυμών αποτελείται από MP, συνδεδεμένο με μια μήτρα άμορφης β-1,3 γλυκάνης, ενώ το εσωτερικό στρώμα αποτελείται από ινώδη β-1,3 γλυκάνη, πάνω από μια μικρή ποσότητα χιτίνης. Στο γένος *Saccharomyces*, τα MP αποτελούνται από μαννόζη (περίπου 90%), N -ακετυλο-γλυκοζαμίνη και μαννοσυλοφωσφορικό (0,1–1%), σε ποικίλες αναλογίες, ανάλογα με το στέλεχος και τη φάση ανάπτυξης (Ballou 1976; Jigami and Odani 1999; Klis et al., 2002).



Εικόνα 9. Αναπαράσταση κυτταρικού τοιχώματος του *Saccharomyces cerevisiae*.

Η σύνθεση και η δομή των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη διαδικασία παρασκευής του κυτταρικού τοιχώματος. Η βιομηχανική ζύμωση επιβάλλει πολυάριθμες περιβαλλοντικές πιέσεις στα κύτταρα ζυμομύκητα, οι οποίες τελικά επηρεάζουν τη βιωσιμότητα και τη βιοδραστηριότητά τους (θερμοκρασιακό σοκ, οσμωτικό στρες, οξειδωτικό στρες, διαθεσιμότητα οξυγόνου, υδροστατική πίεση, συγκέντρωση αιθανόλης, pH, περιορισμός θρεπτικών ουσιών) (Ekberg et al., 2013; Gibson, Lawrence, Leclaire, Powell, & Smart, 2007). Επίσης, οι μαννοπρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος υφίστανται αναδιαμόρφωση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής του κυτταρικού τοιχώματος, ευνοώντας την κροκίδωση του ζυμομύκητα, μέσω της αλληλοσύνδεσης των λεκτινών του κυτταρικού τοιχώματος με τους υποδοχείς α-μαννάνης (Gibson et al., 2007; Powell, Quain, & Smart, 2003).

Οι πολυσακχαρίτες που αποτελούν τα κυτταρικά τοιχώματα της χρησιμοποιούμενης ζύμης, είναι δομικά διαφορετικοί από εκείνους της ζύμης πριν από τη βιομηχανική διεργασία, λόγω των τροποποιήσεων που προωθούνται από την προσαρμογή της στο στρες των συνθηκών ζύμωσης, όπως αναφέρεται από τους Bastos et al., (2015) και Latgé, (2007).

2 Σκοπός

Στην εν λόγω πτυχιακή μελέτη, μελετήθηκε η αξιολόγηση της χρήσης διαφορετικών γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces*, ως εναρκτηρίες καλλιέργειες, που έχουν προηγουμένως απομονωθεί από ελληνικούς λευκούς οίνους διαφορετικών περιοχών. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε και αξιολογήθηκε η κινητική ανάπτυξη κάθε στελέχους, καθώς και συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τους, επιθυμητά και μη στην οινοποιητική διαδικασία, συμπεριλαμβανομένων της θερμικής αντίστασης σε χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης, της ικανότητας κροκίδωσης, του μηχανισμού αντίστασης σε αντίξοες συνθήκες, μέσω της δημιουργίας βιοϋμενικών κυττάρων και της παραγωγής πολυσακχαριτών.

3 Υλικά και μέθοδοι

3.1 Στελέχη μικροοργανισμών

Συνολικά, μελετήθηκαν έξι νέα στελέχη του ελληνικού terroir, που ανήκουν σε *Saccharomyces* και *non Saccharomyces* είδη, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Τα παραπάνω στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, λήφθηκαν από κρυογονικά φιαλίδια (cryogenic storage vials) αποθηκευμένα στους -20 °C, τα οποία περιείχαν 80% θρεπτικό υπόστρωμα YPD Broth και 20% γλυκερόλη, για την προστασία των κυττάρων.

Πίνακας 1. Στελέχη μικροοργανισμών.

Είδος	Στέλεχος	Οίνος προέλευσης/Συλλογή
<i>S. cerevisiae</i>	A6Y6	Ασύρτικο Σαντορίνης
<i>S. cerevisiae</i>	A6Y10	Ασύρτικο Σαντορίνης
<i>S. cerevisiae</i>	A26Y5	Ασύρτικο Πηλίου
<i>S. cerevisiae</i>	K33Y14	Αγιωργίτικο Νεμέα
<i>T. californica</i>	A9Y1	Ροδίτης Νεμέα
<i>Z. bailii</i>	A19Y5	50 Μαλαγουζιά/50 Μοσχάτο Γουμένισσα

3.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων στους μελέτης, παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν υγρά και στερεά θρεπτικά υποστρώματα. Για την ανάπτυξη των ζυμών χρησιμοποιήθηκε YPD Broth (g/L αποστειρωμένου H₂O) : 10g Yeast Extract (Condalab, Madrid), 20g Bacteriological Peptone (Condalab, Madrid), 20g D-Glucose anhydrous (Condalab, Madrid), ενώ για την Παρασκευή YPD Agar, στα παραπάνω προστέθηκαν 20g Bacteriological Agar (Condalab, Madrid).

Ως υπόστρωμα για τη μελέτη στους κινητικής ανάπτυξης των στελεχών, χρησιμοποιήθηκε χυμός λευκού σταφυλιού, χωρίς προσθήκη θειώδους (Οινοποιείο Γεώργια, Σπάτα).

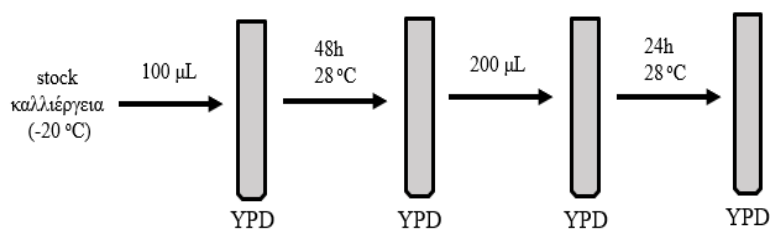


Εικόνα 10. Βιολογικός χυμός λευκού σταφυλιού.

Για στους πλύσεις των κυττάρων των ζυμών, καθώς και για στους δεκαδικές αραιώσεις, χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer (Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A SA). Το υγρό και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, καθώς και το διάλυμα Ringer αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 min, πριν τη χρήση.

3.3 Ενεργοποίηση κυττάρων μικροοργανισμών

Για την ενεργοποίηση των κυττάρων για τη μελέτη της κινητικής ανάπτυξης των στελεχών, προστέθηκαν ασηπτικά 100μL από τις αποθηκευμένες καλλιέργειες με γλυκερόλη (-20 °C) σε 7 ml αποστειρωμένο YPD Broth σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολούθησε επώαση στους 28 °C για 48 ώρες. Σκοπός, η ενεργοποίηση των μεταβολικών μηχανισμών των κυττάρων των ζυμών.



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση βημάτων ενεργοποίησης κυττάρων μικροοργανισμών.

3.4 Κινητική ανάπτυξη μικροοργανισμών

Η μελέτη της κινητικής ανάπτυξης των ζυμών διεξήχθη σε θρεπτικό υπόστρωμα παστεριωμένο χυμού λευκού σταφυλιού, (χωρίς προσθήκη θειώδους) και σταθερή θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια στους 15 °C και 18 °C. Παράλληλα, οι πληθυσμοί των ζωντανών κυττάρων των στελεχών παρακολουθούνταν με τη μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων και μετρήσεων οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600nm, σε συγκεκριμένα σημεία-ώρες (0, 3, 6, 8, 9, 12, 20, 24, 30, 32, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 288, 384, 456, 648, 720 h).

Ο χυμός λευκού σταφυλιού, πριν τον εμβολιασμό των στελεχών, υποβλήθηκε σε παστερίωση (70 °C για 10 min), καθώς και σε χημική ανάλυση, για τον υπολογισμό του αφομοιώσιμου αζώτου (YAN-Yeast Assimilable Nitrogen). Η ανάλυση YAN παρέχει πληροφορίες για την ποσότητα του αφομοιώσιμου αζώτου που διατίθεται στο χυμό-γλεύκος, την οποία θα χρησιμοποιήσουν οι ζυμομύκητες, προκειμένου να αναπτυχθούν. Η σύσταση του χυμού παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

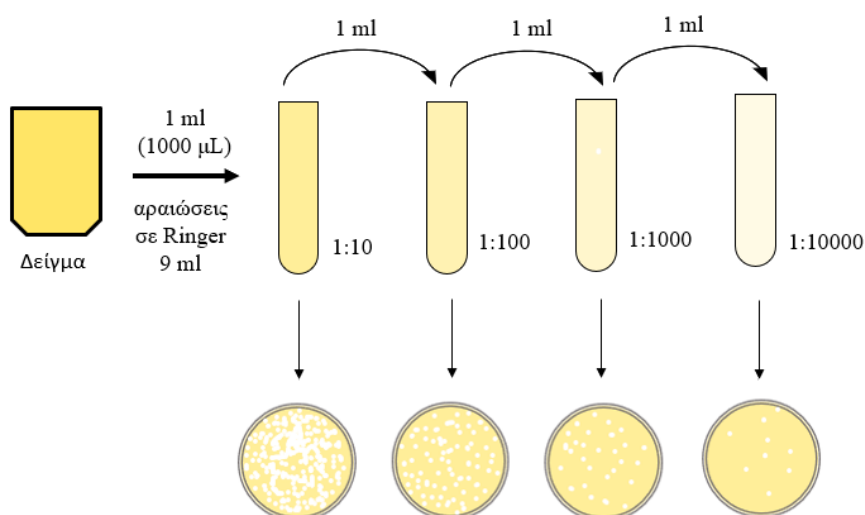
Πίνακας 2. Σύσταση χυμού σταφυλιού-γλεύκους.

Σύσταση	Χαρακτηριστικά
Σάκχαρα	158 (g/L)
pH	3,5
Αφομοιώσιμο Άζωτο	230 (mg N /L)

Ακολούθησε ξεχωριστά ο εμβολιασμός κάθε στελέχους σε 100 ml παστεριωμένου χυμού, με τον πληθυσμό των κυττάρων του εμβολίου να αντιστοιχεί σε 10^5 cfu/mL. Η παραπάνω συγκέντρωση κυττάρων επιλέχθηκε, με σκοπό να προσομοιωθούν στο μέγιστο οι συνθήκες οινοποίησης.

Κατά τη μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων, από το κάθε δείγμα, λαμβανόταν με ασηπτικές τεχνικές 1 ml δείγματος και μεταγχιζόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα με 9 ml αποστειρωμένου Ringer, για πραγματοποίηση δεκαδικών αραιώσεων. Στη συνέχεια, από τις κατάλληλες αραιώσεις, 100 μ L αραιωμένου δείγματος επιστρώνονταν σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (μέθοδος spreading). Ακολουθούσε

επώαση στους 28 °C για 48 ώρες. Οι σχηματιζόμενες αποικίες στα τρυβλία Petri μετρούνταν (20-300 αποικίες) και εκφράζονταν σε CFU/mL καλλιέργειας. Παράλληλα, ακόμα 1 ml δείγματος λαμβανόταν και γινόταν μέτρηση της οπτικής του πυκνότητας στα 600nm (X-ma 1000 spectrophotometer, Human Corporation). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε συνολικά δύο φορές για δύο βιολογικές επαναλήψεις, για εγκυρότερα αποτελέσματα.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της καταμέτρησης των αποικιών, με τη μέθοδο δεκαδικών αραιώσεων.

3.4.1 Υπολογισμός Αφομοιώσιμου Αζώτου (YAN-Yeast Assimilable Nitrogen)

Στον χυμό σταφυλιού προηγήθηκε χημική ανάλυση, για τον υπολογισμό του αφομοιώσιμου αζώτου (YAN-Yeast Assimilable Nitrogen). Η ανάλυση YAN παρέχει πληροφορίες για την ποσότητα του αφομοιώσιμου αζώτου που διατίθεται στο χυμό-γλεύκος, την οποία θα χρησιμοποιήσουν οι ζυμομύκητες, προκειμένου να αναπτυχθούν.

3.4.1.1 Μέθοδος τιτλοδότησης με φορμαλδεΰδη

Η τιτλοδότηση με φορμαλδεΰδη χρησιμοποιείται ευρέως στον κλάδο της οινοποίησης, για την ποσοτικοποίηση του αφομοιώσιμου αζώτου που περιέχεται στο γλεύκος, καθώς αποτελεί μέθοδο εύκολη, απλή και με έγκαιρα αποτελέσματα.

Αρχικός όγκος δείγματος χυμού 100 ml, εξουδετερώθηκε σε pH = 8 με προσθήκη διαλύματος 0,1 N NaOH. Το δείγμα αφέθηκε για ανάδευση για 10 λεπτά και διηθήθηκε μέσω φίλτρου σύριγγας (0,45 mm). Πραγματοποιήθηκε αραιώση σε ογκομετρική φιάλη 200 ml με απιονισμένο νερό και 100 ml αραιωμένου διαλύματος μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως. Υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα, προστέθηκαν 25 ml διαλύματος φορμαλδεΰδης (37%), προηγουμένως εξουδετερωμένης σε pH = 8 με προσθήκη 0,1N NaOH. Ακολούθησε τιτλοδότηση του δείγματος με πρότυπο διάλυμα NaOH 0,1N, έως ότου το pH να επανέλθει ξανά στο 8. Τέλος, σημειώθηκε η συνολική κατανάλωση NaOH και μέσω υπολογισμών προσδιορίστηκε αν η περιεκτικότητα σε αφομοιώσιμο άζωτο του χυμού ήταν μέσα στα επιθυμητά πλαίσια ή έχριζε ανάγκη κατάλληλης τροποποίησης.

Η περιεκτικότητα αφομοιώσιμου αζώτου στον χυμό υπολογίστηκε από τον εξής τύπο:

$$\text{YAN (mg N / L)} = (\text{καταναλωθέντα mL 0.1N NaOH}) \times 28$$

3.5 Μέθοδος σχηματισμού βιοϋμενίου (Biofilm)

3.5.1 Προετοιμασία εμβολίου

Για την προσκόλληση και ανάπτυξη βιοϋμενίου, μετά την πρώτη επώαση (μεταφορά 100 μL από τις αποθηκευμένες καλλιέργειες στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$) διαδέχεται 2^η ανανέωση των καλλιεργειών, προσθέτοντας 200 μL της επωασμένης καλλιέργειας ($28\text{ }^\circ\text{C}$) σε 7 ml

YPD Broth και ακολουθώντας τελική επώαση στους 28 °C για 24 ώρες. Σκοπός, η επίτευξη της στατικής φάσης όλων των στελεχών, ώστε να μην υπάρχει ταυτόχρονη ανάπτυξη των κυττάρων στις παραπάνω μεθόδους.

Για την λήψη έγκυρων αποτελεσμάτων, σχετικά με τον αρχικό πληθυσμό κάθε εμβολίου, οι επωασμένες καλλιέργειες φωτομετρούνταν (600 nm) και η τιμή της απορρόφησης αντιστοιχίζόταν με τον πληθυσμό από τα επωασμένα τρυβλία Petri της μελέτης της κινητικής ανάπτυξης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιούταν φυγοκέντριση 5000 g στους 4 °C για 10 min (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Scientific). Ακολουθούσε έκπλυση του ιζήματος των κυττάρων με 4 ml αποστειρωμένο διάλυμα Ringer, συνολικά δύο φορές, και τέλος επαναιώρηση σε τελικό όγκο δείγματος, τέτοιο ώστε ο πληθυσμός των στελεχών να αντιστοιχεί σε 10^7 cfu/mL.

3.5.2 Μέσο προσκόλλησης και ανάπτυξης βιοϋμενίου

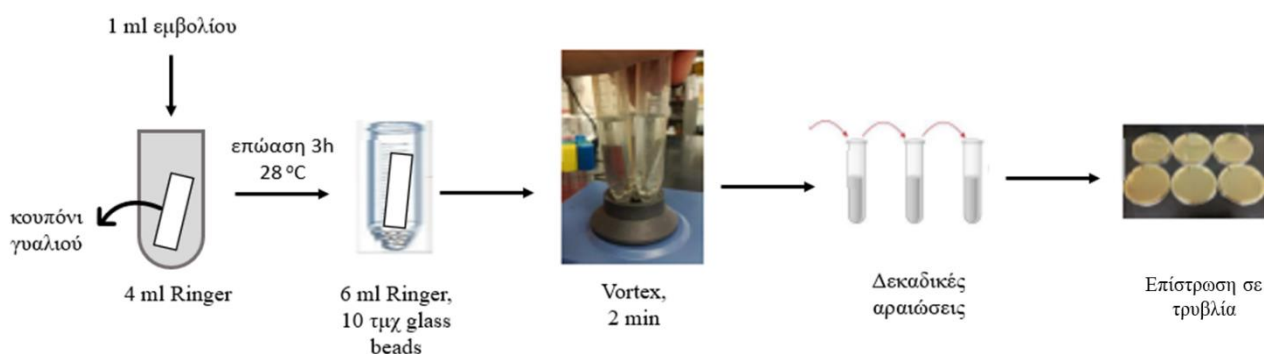
Η μελέτης της ικανότητας προσκόλλησης των παραπάνω στελεχών εφαρμόστηκε σε κουπόνια γυαλιού (3cm× 1cm× 0,1cm), ως υλικό χρησιμοποιούμενο στην οινοποίηση. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 4 mL διαλύματος Ringer, τοποθετήθηκαν τα κουπόνια γυαλιού και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν στον κλίβανο. Η επιλογή διαλύματος Ringer ως μέσου ανάπτυξης έγινε, με σκοπό να μελετηθεί αποκλειστικά η ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων. Κάθε αποστειρωμένος δοκιμαστικός σωλήνας που περιείχε κουπόνι γυαλιού, ενοφθαλμίστηκε με 1 mL εμβολίου, με σκοπό ο πληθυσμός των κυττάρων να είναι 10^7 cfu/mL. Ακολούθησε επώαση των δοκιμαστικών σωλήνων με τα κουπόνια για 3 ώρες στους 28 °C, χρόνος απαιτούμενος για την προσκόλληση των βιοϋμενικών κυττάρων (Dimoroulou et al., 2021).

3.5.3 Καταμέτρηση βιοϋμενικών κυττάρων – Μέθοδος στροβιλισμού γυάλινων σφαιριδίων (Glass Bead Vortexing Method)

Μετά το πέρας των 3 ωρών, τα κουπόνια συλλέγονταν με τη βοήθεια ειδικής αποστειρωμένης λαβίδας και γινόταν έκπλυση και των δύο πλευρών τους, με 5 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Έπειτα, τα γυάλινα κουπόνια μεταφέρονταν σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon με 6 ml διαλύματος Ringer και 10 γυάλινα σφαιρίδια (glass beads), όπου στροβιλίζονταν για 2 λεπτά με τη χρήση μηχανήματος vortex. Σκοπός, η αποδέσμευση των προσκολλημένων βιοϋμενικών κυττάρων από τα κουπόνια γυαλιού.

Για την ποσοτικοποίηση των προσκολλημένων κυττάρων, ακολούθησαν δεκαδικές αραιώσεις στο εναιώρημα που δημιουργήθηκε μετά τον στροβιλισμό τους. Από τις κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις, 100 μl κάθε δείγματος επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri με YPD Agar και τοποθετήθηκαν για επώαση για 48 ώρες. Από την καταμέτρηση των σχηματιζόμενων αποικιών, υπολογίστηκε η τιμή cfu/cm² της επιφάνειας του γυάλινου κουπονιού.

Η παραπάνω πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε τρεις φορές, για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Από κάθε δείγμα, λήφθηκαν 2 ml από τους δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς το κουπόνι και 2 ml από τους σωλήνες Falcon, που περιείχαν το στροβιλισμένο κουπόνι και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη, για μελλοντική ανάλυση των πολυσακχαριτών τους.



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση ποσοτικοποίησης βιοϋμενικών κυττάρων, με τη μέθοδο στροβιλισμού γυάλινων σφαιριδίων (glass bead vortexing method).

3.6 Μελέτη ικανότητας κροκίδωσης στελεχών (Flocculation test)

3.6.1 Προετοιμασία εμβολίου

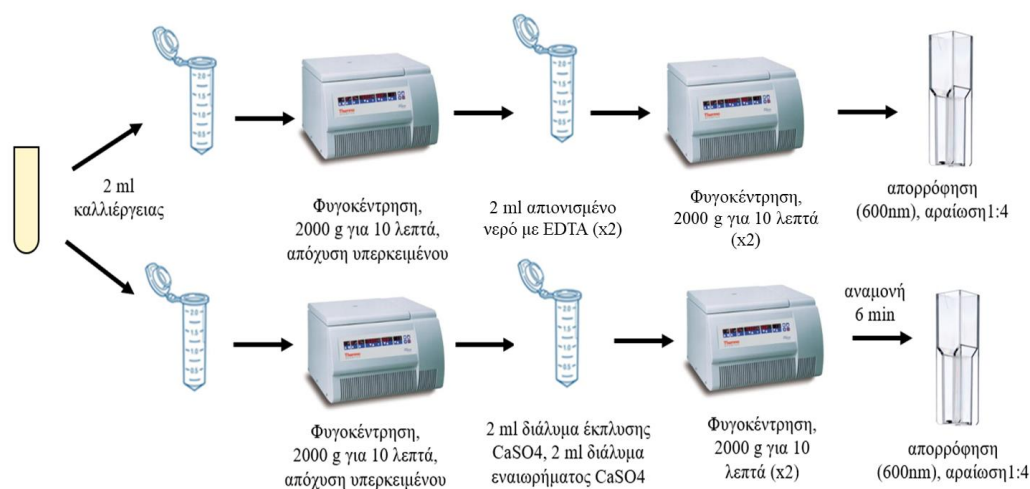
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία του εμβολίου ήταν ίδια με αυτή που περιγράφηκε για την ανάπτυξη βιοϋμενίου. Για το flocculation test, η πρώτη επώαση διαδέχεται 2^η ανανέωση των καλλιέργειών, προσθέτοντας 200 μ L της επωασμένης καλλιέργειας (28 °C) σε 7 ml YPD Broth και ακολουθώντας τελική επώαση στους 28 °C για 24 ώρες. Σκοπός, η επίτευξη της στατικής φάσης όλων των στελεχών, ώστε να μην υπάρχει ταυτόχρονη ανάπτυξη των κυττάρων στις παραπάνω μεθόδους.

Οι επωασμένες καλλιέργειες, πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας φωτομετρήθηκαν (600 nm), με σκοπό να διαπιστωθεί η συγκέντρωση των κυττάρων.

Εφόσον τα κύτταρα βρίσκονταν στη στατική φάση, λαμβάνονταν 2 ml από κάθε καλλιέργεια και τοποθετούνταν σε φιαλίδιο Eppendorf 2ml. Στα φιαλίδια γινόταν φυγοκέντρωση στα 2000g για 10 λεπτά, απόχυση του υπερκειμένου και στη συνέχεια έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml απιονισμένου νερού με EDTA και φυγοκέντρωση εκ νέου. Έπειτα, στο δείγμα γινόταν αραιώση 1:4 (0,5 ml δείγματος : 2 ml απιονισμένο νερό) και φωτομέτρηση.

Παράλληλα, σε διαφορετικά φιαλίδια Eppendorf 2ml, ακολουθούσε διαφορετική κατεργασία των δειγμάτων. Αντί της διπλής έκπλυσης των κυττάρων με απιονισμένο νερό, χρησιμοποιήθηκαν την πρώτη φορά 2 ml διάλυμα έκπλυσης θεικού ασβεστίου (0,51 g CaSO₄ σε 1 L απεσταγμένο νερό) και στη συνέχεια 2 ml διάλυμα εναιωρήματος θεικού ασβεστίου (0,51 g CaSO₄, 6,8 g CH₃COONa και 4,05 g CH₃COOH σε 1 L απεσταγμένου νερού). Στη συνέχεια, αφού το δείγμα παρέμεινε για 6 λεπτά σε ακίνητη θέση, λήφθηκε ποσότητα από το υπερκείμενο και έγινε αραιώση 1:4, ώστε να φωτομετρηθεί. Τέλος, υπολογίστηκε το ποσοστό ικανότητας κροκίδωσης κάθε στελέχους και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε συνολικά 3 φορές, για επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Η φασματοφωτομετρική μέθοδος βασίστηκε σε τροποποίηση του τεστ κροκίδωσης του Helm. Ο βαθμός κροκίδωσης

καθορίστηκε από την ταξινόμηση σε κατηγορίες. Λιγότερο από 20% χωρίς ικανότητα κροκίδωσης, 20-80% μέτρια κροκίδωση, πάνω από 85% πολύ μεγάλη κροκίδωση.



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση μεθόδου ικανότητας κροκίδωσης (flocculation test).

3.7 Ποσοτικοποίηση πολυσακχαριτών – Τεστ ανθρόνης (Anthrone Test)

3.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η μέτρηση των παραγόμενων πολυσακχαριτών από τα κύτταρα των στελεχών, έγινε μετά την διενέργεια της μεθόδου σχηματισμού βιοϋμενιών, προκειμένου να μελετηθεί η συσχέτιση των παραγόμενων πολυσακχαριτών με το μηχανισμό δημιουργίας βιοϋμενικών κυττάρων (Lahiri D. et al., 2022).

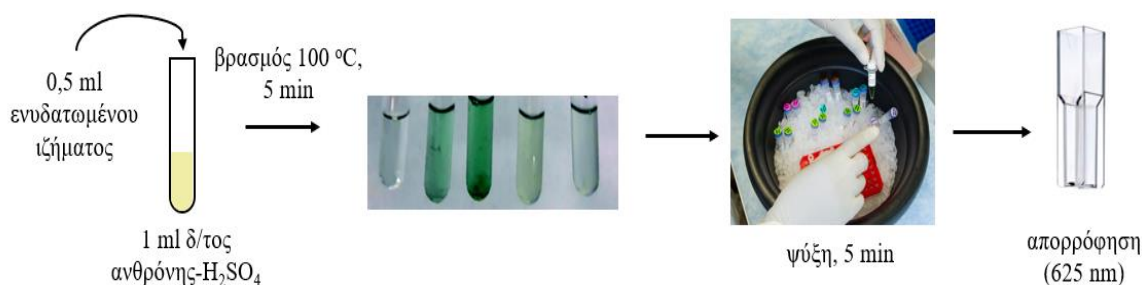
Τα δείγματα που βρίσκονταν στην κατάψυξη αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 15 λεπτά, στους 4 °C. Από το υπερκείμενο, λήφθηκαν 0,5 ml, τοποθετήθηκαν σε κενό φιαλίδιο Eppendorf 2ml και συμπληρώθηκαν με 1,5 ml διαλύματος αιθανόλης – HCl 1 N (950 ml αιθανόλης – 50 ml HCl / L). Παρέμειναν για 24 ώρες στους 4 °C, για την κατακρήμνιση των πολυσακχαριτών. Μετά το πέρας των ωρών, φυγοκεντρήθηκαν στα 18.000 g για 15 λεπτά, στους 4 °C, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν 0,5

ml παγωμένης αιθανόλης 80%. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση (18.000 g για 15 λεπτά, στους 4 °C), απόχυση υπερκειμένου και προσθήκη 0,5 ml αποστειρωμένου νερού για έκπλυση της αιθανόλης και τελευταία φυγοκέντρηση. Έπειτα, το ίζημα ξηράνθηκε για 20 λεπτά στους 65 °C και ενυδατώθηκε με 0,5 ml αποστειρωμένου νερού για 15 λεπτά.

3.7.2 Τεστ ανθρόνης - (Anthrone Test)

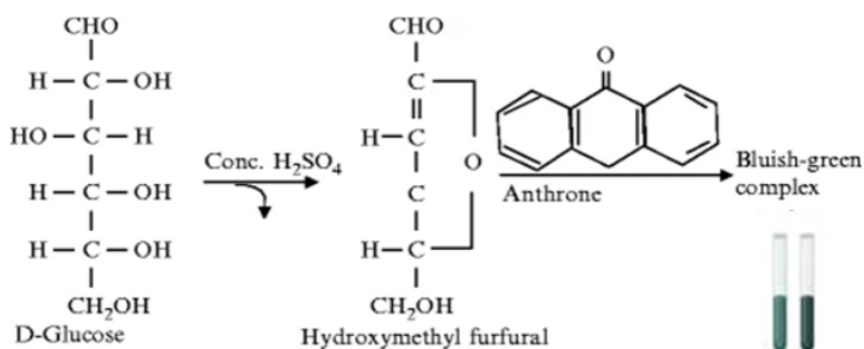
Το τεστ ανθρόνης αποτελεί χρωματογραφική μέθοδο υπολογισμού της συνολικής συγκέντρωσης πολυσακχαριτών σε ένα δείγμα. Βασίζεται στην διάσπαση των πολυσακχαριτών σε μονοσακχαρίτες, που υπό όξινες συνθήκες δίνουν χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα στο δείγμα. Η μέθοδος προϋποθέτει την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων γλυκόζης γνωστής συγκέντρωσης, με σκοπό τον υπολογισμό της αντίστοιχης συγκέντρωσης του κάθε δείγματος.

Ειδικότερα, τα 0,5 ml ενυδατωμένου ιζήματος μεταφέρονται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, αφού πρώτα αναδευτούν με τη χρήση μηχανήματος vortex. Σε αυτά προστίθεται 1 ml διαλύματος ανθρόνης – H₂SO₄ (200 mg/100 ml), αναδεύονται και τοποθετούνται στους 100 °C για βρασμό για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, βυθίζονται ακόμα 5 λεπτά σε δοχείο με πάγο, για την διακοπή της αντίδρασης. Τέλος, γίνεται μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 625 nm. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για τα πρότυπα διαλύματα, όπου αντί για 0,5 ml δείγματος, στα γυάλινα σωληνάκια προστίθενται 0,5 ml της αντίστοιχης συγκέντρωσης γλυκόζης. Η συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε γλυκόζη, υπολογίζεται από την εξίσωση της βαθμονομημένης πρότυπης καμπύλης των προτύπων γλυκόζης.



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση ποσοτικοποίησης πολυσακχαριτών (anthrone method).

Στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης, πραγματοποιείται υδρόλυση των πολυσακχαριτών σε μονοσακχαρίτες, με την προσθήκη πυκνού H_2SO_4 . Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αφυδάτωση των υδατανθράκων του δείγματος από το πυκνό H_2SO_4 , σχηματίζοντας φουρφουράλη. Η ενεργή μορφή του αντιδραστηρίου είναι η ανθρανόλη, το ταυτομερές της ενόλης της ανθρόνης, η οποία αντιδρά με την φουρφουράλη, δίνοντας ένα πράσινο χρώμα, το οποίο προσδιορίζεται χρωματομετρικά. Το πράσινο διάλυμα έχει μέγιστη απορρόφηση στα 625 nm. Ο προσδιορισμός των πολυσακχαριτών προσδιορίζεται από καμπύλες πρότυπων διαλυμάτων γλυκόζης, διαφορετικών συγκεντρώσεων (Katoch, 2011; Rajendar et al., 2020).



Εικόνα 16. Μηχανισμός αντίδρασης τεστ ανθρόνης (Katoch, 2011).

4 Αποτελέσματα – Συζήτηση

4.1 Μελέτη κινητικής ανάπτυξης στελεχών σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας

Οι διαφορές στην πορεία της κινητικής ανάπτυξης των έξι διαφορετικών στελεχών μελετήθηκαν ως προς την σύγκριση των καμπυλών ανάπτυξης (Γράφημα 1) και των διαφορετικών κινητικών παραμέτρων τους, σε συνθήκες οινοποίησης (Πίνακες 3 & 4). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε εμπορικός, βιολογικός, λευκός χυμός σταφυλιού (Σάκχαρα 158 g/L, pH 3,5, Αφομοιώσιμο Άζωτο 230 mg N/L).

Στους Πίνακες 3 και 4 που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι κινητικές παράμετροι κάθε στελέχους, στους 18 °C και στους 15 °C, αντίστοιχα. Οι υπολογισμοί βασίστηκαν στην καταμέτρηση των αποικιών από επωασμένα τρυβλία Petri για συνολικό διάστημα 30 ημερών. Τα αποτελέσματα των αποικιών, εκφρασμένα σε log CFU/ml, εφαρμόστηκαν στο λογισμικό Sum'Previous, όπου και υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι

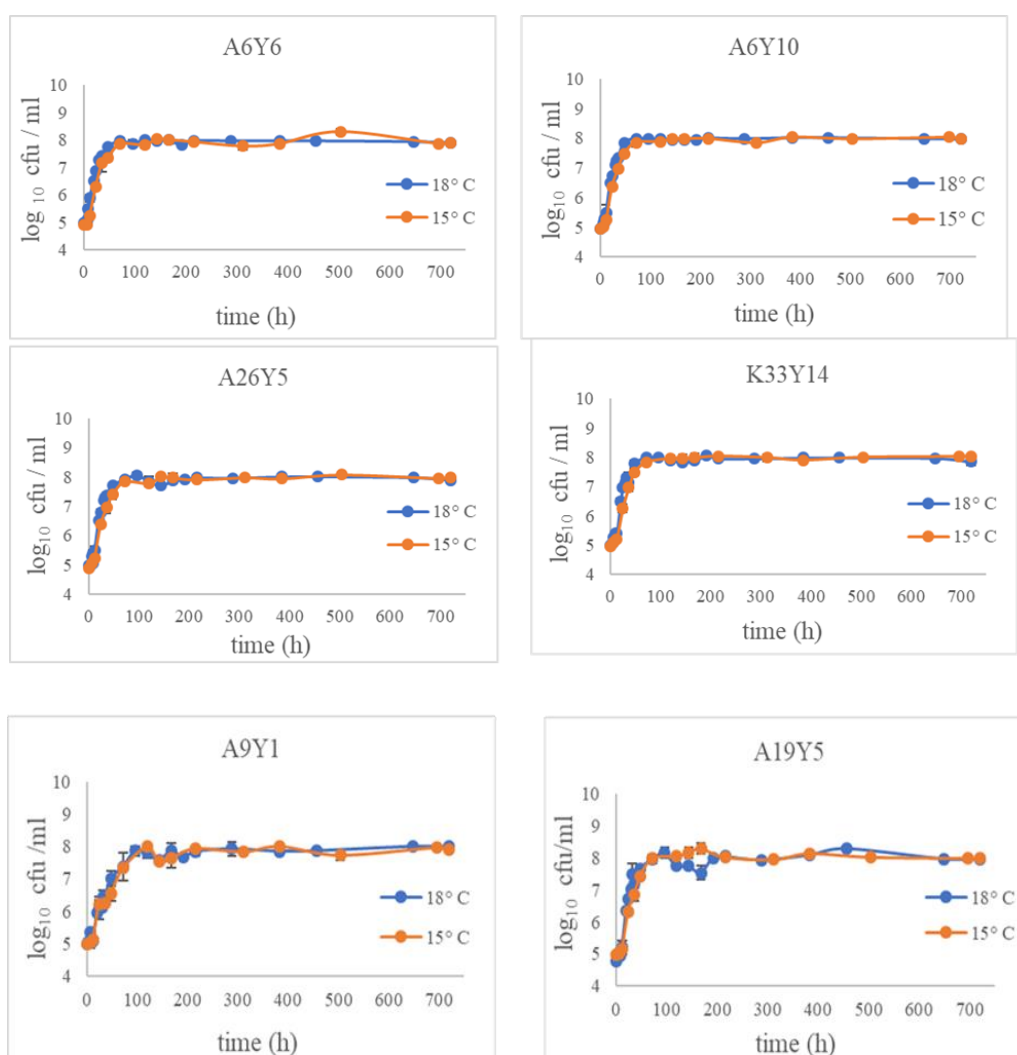
Πίνακας 3. Μέσοι όροι των κινητικών παραμέτρων κάθε στελέχους ± τυπική απόκλιση σε συνθήκες θερμοκρασίας 18 °C. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).

Είδη	Στελέχη	Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (1/h)	Lag time (h)	Χρόνος διπλασιασμού (h)
<i>S. cerevisiae</i>	A6Y6	0,213±0,003 ^c	4,47±1,13 ^a	3,251±0,037 ^{ab}
<i>S. cerevisiae</i>	A6Y10	0,201±0,016 ^c	4,8±0,79 ^a	3,449±0,107 ^b
<i>S. cerevisiae</i>	A26Y5	0,206±0,007 ^b	4,36±1,3 ^a	3,371±0,179 ^c
<i>S. cerevisiae</i>	K33Y14	0,196±0,006 ^b	4,44±1,56 ^a	3,54±0,088 ^c
<i>T. californica</i>	A9Y1	0,108±0,003 ^a	7,29±1,56 ^b	6,439±0,55 ^d
<i>Z. bailii</i>	A19Y5	0,226±0,005 ^c	4,51±3,17 ^a	3,072±0,056 ^a

Πίνακας 4. Μέσοι όροι των κινητικών παραμέτρων κάθε στελέχους ± τυπική απόκλιση σε συνθήκες θερμοκρασίας 15 °C. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).

Είδη	Στελέχη	Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (1/h)	Lag time (h)	Χρόνος διπλασιασμού (h)
<i>S. cerevisiae</i>	A6Y6	0,165±0,003 ^b	5,59±2,88 ^{ab}	4,213±0,375 ^b
<i>S. cerevisiae</i>	A6Y10	0,158±0,004 ^b	6,33±1,85 ^b	4,392±0,301 ^b
<i>S. cerevisiae</i>	A26Y5	0,148±0,002 ^b	3,87±2,2 ^a	4,689±0,289 ^b
<i>S. cerevisiae</i>	K33Y14	0,15±0,007 ^b	5,51±1,59 ^{ab}	4,614±0,21 ^b
<i>T. californica</i>	A9Y1	0,085±0,009 ^a	10,24±1,3 ^c	8,125±0,846 ^c
<i>Z. bailii</i>	A19Y5	0,151±0,004 ^c	7,24±2,37 ^b	4,602±0,108 ^a

Γράφημα 1. Καμπύλες ανάπτυξης μέσω πληθυσμού κυττάρων (\log_{10} cfu/ml) των έξι στελεχών σε θερμοκρασίες 18 °C και 15 °C, στο πέρασμα του χρόνου.



Από τον Πίνακα 3, όσον αφορά την κινητική των στελεχών στους 18 °C, φαίνεται πως τα στελέχη, μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και διακρίνονται σε ομάδες κατάταξης σε σχέση με την ομοιογένειά τους στο σύνολο. Για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, το στέλεχος A9Y1 εμφανίζει το μικρότερο ρυθμό σε σχέση με τα υπόλοιπα (ομάδα a). Τα στελέχη A6Y6, A6Y10 και A19Y5 εμφανίζουν τους μεγαλύτερους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης (ομάδα c). Τα στελέχη A26Y5 και K33Y14 εμφανίζουν ενδιάμεσους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης (ομάδα b). Όσον αφορά τον χρόνο διπλασιασμού, το στέλεχος A9Y1 εμφανίζει το μεγαλύτερο χρόνο σε σχέση με τα υπόλοιπα (ομάδα d). Το στέλεχος A19Y5 εμφανίζει τον μικρότερο χρόνο διπλασιασμού (ομάδα a). Τα στελέχη A26Y5 και K33Y14 (ομάδα c) και τα A6Y10 (ομάδα b) και A6Y6 (ομάδα ab) εμφανίζουν ενδιάμεσους χρόνους διπλασιασμού. Για το lag time (χρόνος υστέρησης), τα στελέχη A6Y6, A6Y10, A26Y5, K33Y14 και A19Y5 εμφανίζουν κοντινές τιμές (ομάδα a), ενώ το A9Y1 εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή (ομάδα b). Από τον Πίνακα 4, όσον αφορά την κινητική των στελεχών στους 15 °C, φαίνεται πως και εδώ τα στελέχη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και διακρίνονται σε ομάδες κατάταξης σε σχέση με την ομοιογένεια. Για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, το στέλεχος A9Y1 εμφανίζει το μικρότερο ρυθμό σε σχέση με τα υπόλοιπα (ομάδα a). Τα στελέχη A6Y6, A6Y10, A26Y5 και K33Y14 εμφανίζουν τους μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης (ομάδα b). Το στέλεχος A19Y5 εμφανίζει ενδιάμεσο ρυθμό ανάπτυξης (ομάδα c). Για τον χρόνο διπλασιασμού, το στέλεχος A9Y1 εμφανίζει το μεγαλύτερο χρόνο σε σχέση με τα υπόλοιπα (ομάδα c). Τα στελέχη A6Y6, A6Y10, A26Y5 και K33Y14 εμφανίζουν τους μικρότερους χρόνους διπλασιασμού (ομάδα b). Το στέλεχος A19Y5 εμφανίζει ενδιάμεση τιμή (ομάδα a). Για το lag time (χρόνος υστέρησης), το στέλεχος A26Y5 εμφανίζει την μικρότερη τιμή (ομάδα a), ενώ το A9Y1 εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή (ομάδα c). Ακολουθούν τα στελέχη A6Y10 και A19Y5 (ομάδα b), A6Y6 και K33Y14 (ομάδα ab).

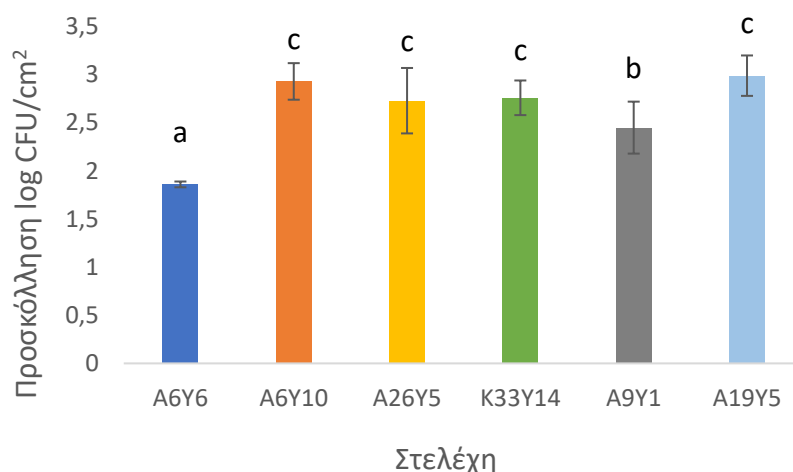
Συνολικά, παρατηρείται ότι τα στελέχη διαφοροποιούνται τόσο στη μεταξύ τους σύγκριση σε κάθε θερμοκρασία ξεχωριστά, όσο και σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη. Η θερμοκρασία αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην επίδραση της κινητικής των διαφόρων στελεχών, όπου χαμηλότερες θερμοκρασίες εμφανίζουν μεγαλύτερους χρόνους υστέρησης (lag time), μικρότερους ρυθμούς ανάπτυξης και μεγαλύτερους χρόνους διπλασιασμού. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, οι ζυμομύκητες έτειναν να

αναπτύσσονται ταχύτερα (μεγαλύτεροι ρυθμοί ανάπτυξης) (Deed et al., 2017; Sener et al., 2007). Σύμφωνα με σχετικές έρευνες (Torija et al., 2003; Beltran et al., 2008; Lainioti et al., 2011; Ferreira et al., 2017), η φάση υστέρησης των ζυμομυκήτων ήταν σαφώς μεγαλύτερη σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην επίτευξη μέγιστου αριθμού πληθυσμού, με εμφάνιση μακράς στατικής φάσης. Οι παραπάνω κινητικές διαφοροποιήσεις έχει προταθεί ότι πιθανόν να οφείλονται σε φαινοτυπικές διαφορές του κάθε στελέχους στη γονιδιακή έκφραση. Σύμφωνα με μελέτη των Brauer et al., (2007), το ένα τέταρτο όλων των γονιδίων των ζυμομυκήτων σχετίζεται γραμμικά με το ρυθμό ανάπτυξης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ερευνητική μελέτη των Vermeersch et al., (2019), κατά την οποία η διάρκεια της φάσης υστέρησης ελέγχεται από την κυτταρική συγκέντρωση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την διαδικασία της αναπνοής. Ειδικότερα, παρουσιάζεται πως τα στελέχη ζυμών που περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών συσχετιζόμενες με την αναπνοή, ειδικά πρωτεΐνες που συνδέονται με τα σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, εμφανίζουν μικρότερες λανθάνουσες φάσεις. Σύμφωνα με τους Souza et al., (2018), γρηγορότερη αποικοδόμηση των κυττάρων επιφέρει η αυξημένη παραγωγή αιθανόλης, γεγονός που ίσως υποδηλώνει την ταχύτερη αποσύνθεση σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

4.2 Μελέτη ικανότητας προσκόλλησης

Παράλληλα, προσδιορίστηκε η διαφορετική ικανότητα προσκόλλησης καθενός από τα έξι στελέχη, σε γυάλινη επιφάνεια (ικανότητα προσκόλλησης σε κουπόνια γυαλιού) που εμφανίζει ιδιαίτερο οινολογικό ενδιαφέρον σε περιπτώσεις δεύτερης ζύμωσης (παραγωγή αφρώδη οίνων). Στο Γράφημα 2 και στον Πίνακα 5 που ακολουθούν, παρουσιάζεται ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων κάθε στελέχους στο μέσο προσκόλλησης.

Γράφημα 2. Μέσος πληθυσμός προσκολλημένων κυττάρων κάθε στελέχους σε κουπόνι γυαλιού. Η τυπική απόκλιση εμφανίζεται με τη μορφή γραμμών σφάλματος μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).



Πίνακας 5. Μέσοι όροι του πληθυσμού προσκολλημένων κυττάρων κάθε στελέχους σε κουπόνι γυαλιού ± τυπική απόκλιση. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).

Είδη	Στελέχη	Προσκόλληση log CFU/cm ²
<i>S. cerevisiae</i>	A6Y6	1,86±0,03 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	A6Y10	2,93±0,19 ^c
<i>S. cerevisiae</i>	A26Y5	2,73±0,34 ^c
<i>S. cerevisiae</i>	K33Y14	2,76±0,18 ^c
<i>T. californica</i>	A9Y1	2,45±0,27 ^b
<i>Z. bailii</i>	A19Y5	2,99±0,21 ^c

Από το Γράφημα 2 και τον Πίνακα 5, παρατηρείται ότι τα στελέχη παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Ειδικότερα, τα στελέχη με την μεγαλύτερη προσκόλληση αποτελούν τα A6Y10, A26Y5, K33Y14 και A19Y5 (ομάδα c). Την μικρότερη προσκόλληση εμφανίζει το στέλεχος A6Y6 (ομάδα a). Τέλος, το στέλεχος A9Y1 ανήκει στην ομάδα με ενδιάμεση τιμή προσκόλλησης (ομάδα b).

Η παραπάνω στατιστική διαφορά, υποδηλώνει την ύπαρξη μεταβλητότητας μεταξύ των στελεχών. Ο σχηματισμός βιοϋμενικών κυττάρων αποτελεί φαινοτυπικό χαρακτηριστικό κάθε στελέχους του ίδιου είδους. Μελέτες αναφέρουν πως η

ενεργοποίηση των γονιδίων που προάγουν την δημιουργία των βιοϋμενικών κυττάρων, επηρεάζεται από στρεσογόνες συνθήκες, όπως έλλειψη θρεπτικών ουσιών, αλλαγές θερμοκρασίας και pH, όπως επίσης και από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς (Tomčić and Raspor, 2017). Στον *S. cerevisiae* έχουν ανιχνευθεί πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο σχηματισμών βιοϋμενικών κυττάρων, με σημαντικότερη την Flo11 (Zara et al, 2005). Οι διαφορές στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *S. cerevisiae* έχουν συσχετιστεί με τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και τα μεταγραφικά επίπεδα του FLO11 (Zara et al., 2009). Σύμφωνα με τους Coi et al., (2017), η αναδιάταξη του γονιδιώματός του επέτρεψε τον εντοπισμό 155 σημείων, εξαιρετικά αποκλινόντων μεταξύ 110 στελεχών *S. cerevisiae* ικανά να σχηματίσουν βιοϋμένια, σε σχέση με αυτά που δεν μπορούσαν. Κύτταρα, ικανά να σχηματίσουν ένα δίκτυο υφών/ψευδοφών, εμφανίζουν ισχυρότερη πρόσφυση σε αδρανείς επιφάνειες, πιθανώς λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας χιτίνης (πολυσακχαρίτης) που περιέχουν (Paramonova et al., 2009). Αρκετές μελέτες συνδέουν την παραγωγή πολυσακχαριτών (EPS) με την δημιουργία βιοϋμενίου από τα κύτταρα των μικροοργανισμών. Κατά την προσκόλληση, τα κύτταρα δημιουργούν μικροαποικίες, σχηματίζοντας μεγαλύτερα κυτταρικά συσσωματώματα και εκκρίνοντας μεγαλύτερους όγκους εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS). Σύμφωνα με τους Sauer et al., (2002), το τελικό στάδιο της διασποράς είναι το μοναδικό στάδιο της δημιουργία βιοϋμενίου, κατά το οποίο οι περισσότερες πρωτεΐνες μειώθηκαν. Εκτός από τους γονιδιακούς παράγοντες, οι φυσικοχημικοί παράγοντες αποτελούν ακόμα ένα μεγάλο κομμάτι της προσκόλλησης των βιοϋμενικών κυττάρων. Σε μελέτη μεταξύ δύο στελεχών *S. cerevisiae*, οι Mercier-Bonin et al., (2004), έδειξαν πως το ποσοστό των κυττάρων που αποκολλήθηκαν, αυξήθηκε με την αύξηση της διατμητικής τάσης και στα δύο είδη ζυμομυκήτων, ενώ η προσκόλληση ήταν μεγαλύτερη, όσο μεγαλύτερη ήταν η υδροφοβικότητα και οι αλληλεπιδράσεις οξέος-βάσης Van der Waals και Lewis, μεταξύ κυττάρων ζυμομύκητα και γυαλιού. Αρκετά στοιχεία έχουν αποδείξει ότι η δημιουργία βιοϋμενικών κυττάρων μπορεί να παρουσιάσει θετικά αποτελέσματα σε ορισμένους τομείς της βιομηχανίας τροφίμων. Τα βιοϋμενικά κύτταρα που σχηματίζονται κατά τη ζύμωση προϊόντων, όπως μύρα ή κρασί, καθώς και κατά την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, μπορεί να έχουν θετικές πτυχές στην ποιότητα και τη γεύση τους (Lu et al., 2022; Zara et al., 2020).

4.3 Μελέτη ικανότητας κροκίδωσης στελεχών (Flocculation)

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα κροκίδωσης του κάθε εξεταζόμενου στελέχους. Η ικανότητα αυτή είναι ιδιαίτερα επιθυμητή κατά την οινοποίηση και κυρίως στην παραγωγή αφρώδων οίνων, αφού συμβάλει στη διευκόλυνση της διαδικασίας αφαίρεσης του κυτταρικού ιζήματος (Varela et al., 2020). Στον Πίνακα 6 απεικονίζονται οι % τιμές της ικανότητας κροκίδωσης των έξι στελεχών.

Πίνακας 6. Μέσοι όροι ικανότητας κροκίδωσης κάθε στελέχους \pm τυπική απόκλιση. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση *One-way ANNOVA - Tuckey's test* (Statgraphics software).

Είδη	Στελέχη	% Ικανότητα κροκίδωσης (Flocculation)
<i>S. cerevisiae</i>	A6Y6	9,08 \pm 0,013 ^{ab}
<i>S. cerevisiae</i>	A6Y10	4,94 \pm 0,041 ^{ab}
<i>S. cerevisiae</i>	A26Y5	9,71 \pm 0,017 ^b
<i>S. cerevisiae</i>	K33Y14	10,17 \pm 0,053 ^b
<i>T. californica</i>	A9Y1	3,4 \pm 0,022 ^a
<i>Z. bailii</i>	A19Y5	20,7 \pm 0,041 ^c

Από τον Πίνακα 6, παρατηρείται ότι τα στελέχη εμφανίζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Το στέλεχος A19Y5 εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό κροκίδωσης (ομάδα c). Από την άλλη, το στέλεχος με την μικρότερη κροκίδωση εμφανίζεται να είναι το A9Y1 (ομάδα a). Τα στελέχη A6Y6, A6Y10 (ομάδα ab) και τα στελέχη A26Y5, K33Y14 (ομάδα b), εμφανίζουν ενδιάμεσες τιμές κροκιδωτικής ικανότητας.

Η παραπάνω μελέτη της ικανότητας κροκίδωσης των έξι στελεχών πραγματοποιήθηκε, με σκοπό να διερευνηθεί η χρήση τους, κυρίως σε αφρώδεις οίνους, κατά τη δεύτερη αλκοολική ζύμωση στο μπουκάλι. Η ικανότητα αυτή είναι εξέχουσας σημασίας, κυρίως κατά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, για την καλύτερη διαύγαση του οίνου (Dequin et al., 2001). Η κροκίδωση επηρεάζεται από το γενετικό υπόβαθρο των ζυμομυκήτων, καθώς και από φυσικοχημικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων του

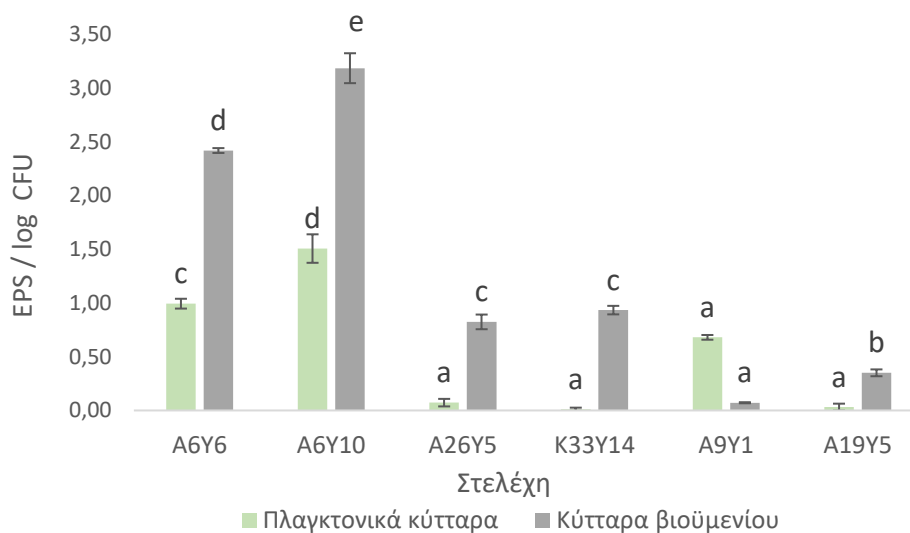
pH, θερμοκρασίας, συγκέντρωση αιθανόλης, συγκέντρωση ζυμώσιμων σακχάρων (Soares et al., 2010; Vidgren et al., 2011). Οι υπεύθυνες για την κροκίδωση πρωτεΐνες (φλοκουλίνες), έχουν ταυτοποιηθεί στην κυτταρική επιφάνεια των ζυμομυκήτων (Maekawa et al., 2020). Οι Miki et al., (1982), έδειξαν πως μια πρωτεΐνη που μοιάζει με λεκτίνη, που υπάρχει μόνο σε κύτταρα με ικανότητα κροκίδωσης, αναγνωρίζει και αλληλοεπιδρά με υπολείμματα υδατανθράκων των α-μαννανών (υποδοχείς) γειτονικών κυττάρων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις λεκτίνες κροκίδωσης ονομάζονται γονίδια FLO. Ανάμεσά τους, το Flo1 είναι το πιο γνωστό γονίδιο, του οποίου η αλληλουχία έχει προσδιοριστεί (Teunissen et al., 1993; Watari et al., 1994). Η πρωτεΐνη Flo1 βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου ζυμομύκητα και εμπλέκεται άμεσα στη διαδικασία κροκίδωσης (Bidard et al., 1995; Bony et al., 1997). Επίσης, υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους του γονιδίου FLO1 και του βαθμού κροκίδωσης (Bidard et al., 1995; Verstrepen et al., 2005). Η υπερβολική έκφραση αυτών των γονιδίων FLO προκαλεί κροκίδωση. Ωστόσο, τα διαφορετικά γονίδια FLO εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά κροκίδωσης όσον αφορά τον βαθμό κροκίδωσης και την ευαισθησία στα σάκχαρα (Govender et al., 2008; Van Mulders et al., 2009). Επιπλέον, η συγκέντρωση των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας που μοιάζουν με λεκτίνη συσχετίζεται με την ικανότητα κροκίδωσης ζυμομύκητα. Όσο μεγαλύτερος ήταν ο αριθμός τους στην κυτταρική επιφάνεια ανά κύτταρο, τόσο μεγαλύτερη ήταν η τάση των κυττάρων να κροκιδωθούν (Nayyar et al., 2017). Σύμφωνα με την παραπάνω βιβλιογραφία και με βάση τα αποτελέσματα της ικανότητας κροκίδωσης των έξι στελεχών, παρατηρείται πως το στέλεχος A19Y5 παρουσιάζει μεγαλύτερη ποσότητα υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνειά του, σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, ενώ το στέλεχος A9Y1 παρουσιάζει τους λιγότερους υποδοχείς. Καθώς δεν μελετήθηκε η ικανότητα κροκίδωσης σε διαφορετικές συνθήκες, η σύγκριση μπορεί να βασιστεί στην γονοτυπική διαφορά των ζυμομυκήτων.

4.4 Μελέτη ποσοτικοποίησης πολυσακχαριτών βιοϋμενικών κυττάρων

Τέλος, προσδιορίστηκε η ποσότητα των παραγόμενων πολυσακχαριτών από τα βιοϋμενικά κύτταρα. Ειδικότερα, δείγματα των προσκολλημένων στο κουπόνι γυαλιού

κυττάρων, αλλά και των πλαγκτονικών μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα να παράξουν πολυσακχαρίτες σε αντίξοες συνθήκες. Στο Γράφημα 3 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των λόγων EPS / log CFU που παράγει κάθε στέλεχος, για τα πλαγκτονικά και τα κύτταρα βιοϋμενίου, αντίστοιχα.

Γράφημα 3. Μέσοι όροι του λόγου EPS / log CFU που παράγει κάθε στέλεχος, για τα πλαγκτονικά και τα κύτταρα βιοϋμενίου, αντίστοιχα. Η τυπική απόκλιση εμφανίζεται με τη μορφή γραμμών σφάλματος μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA - Tuckey's test (Statgraphics software).



Από το Γράφημα 3, παρατηρείται ότι τα στελέχη παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Όσον αφορά τα πλαγκτονικά κύτταρα, ο μεγαλύτερος λόγος EPS / log CFU εντοπίζεται στο στέλεχος A6Y10 (ομάδα d). Τα στελέχη A26Y5, K33Y14 και A19Y5 εμφανίζουν την μικρότερη παραγωγή πολυσακχαριτών (ομάδα a). Με ενδιάμεσους λόγους EPS / log CFU εμφανίζονται τα στελέχη A6Y6 (ομάδα c) και A9Y1 (ομάδα b). Για τα βιοϋμενικά κύτταρα, η μεγαλύτερη παραγωγή πολυσακχαριτών εντοπίζεται και πάλι στο στέλεχος A6Y10 (ομάδα e). Το στέλεχος A9Y1 εμφανίζει την μικρότερη παραγωγή (ομάδα a). Με ενδιάμεσους λόγους εμφανίζονται τα στελέχη A6Y6 (ομάδα d), A26Y5 και K33Y14 (ομάδα c) και A19Y5 (ομάδα b). Κατά την σύγκριση της παραγωγής πολυσακχαριτών πλαγκτονικών-βιοϋμενικών κυττάρων, παρατηρείται πως στα στελέχη A6Y6, A6Y10, A26Y5, K33Y14 και A19Y5 εμφανίζουν αύξηση της παραγωγής, μετά την κατεργασία τους με

τη μέθοδο στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια. Αντίθετα, το στελέχος A9Y1, παρουσιάζει εμφανή μείωση.

Τα κύτταρα μπορούν να εντοπιστούν σε δύο φάσεις: στην πλαγκτονική τους μορφή (ελεύθερα κύτταρα) και στα βιοϋμενικά κύτταρα, τα οποία προσκολλώνται σε επιφάνειες (Balducci et al., 2023). Οι πολυσακχαρίτες εμπλέκονται στον σχηματισμό, αλλά και στη διατήρηση του βιοϋμενίου των κυττάρων. Οι πολυσακχαρίτες λειτουργούν ως μοριακή ‘κόλλα’, επιτρέποντας στα κύτταρα να προσκολληθούν σε επιφάνειες και να αντιστέκονται στις φυσικές πιέσεις που επιβάλλονται από την κίνηση του υγρού που θα μπορούσε να διαχωρίσει τα κύτταρα από μια πηγή θρεπτικών συστατικών (Limoli et al., 2014). Η διαφορά στη σύνθεση των πολυσακχαριτών συμβάλλει στις δομικές διαφορές του βιοϋμενίου. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε ποσοτικές ή ποιοτικές διαφορές των συστατικών είτε σε διαφορετικά σήματα μεταξύ των κυττάρων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του βιοϋμενίου (Lianou et al., 2020). Παρά την εκτενή βιβλιογραφία των πολυσακχαριτών για τα βιοϋμενικά βακτηριακά κύτταρα, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες για τα αντίστοιχα κύτταρα ζύμης. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως στα στελέχη A6Y6, A6Y10, A26Y5, K33Y14 και A19Y5, οι παραγόμενοι πολυσακχαρίτες ήταν περισσότεροι στα βιοϋμενικά (προσκολλημένα) κύτταρα, από ότι στα πλαγκτονικά (ελεύθερα). Αντίθετα, στο στελέχος A9Y1 ήταν λιγότεροι στα βιοϋμενικά κύτταρα. Σε μελέτη των Giovani et al., (2010), η απελευθέρωση πολυσακχαριτών έδειξε να αυξάνεται σημαντικά με αύξηση της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης σακχάρου του χυμού σταφυλιού. Η απελευθέρωση πολυσακχαρίτη ήταν μεγαλύτερη σε συνθήκες στρες, στις οποίες τα κύτταρα ήταν λιγότερο βιώσιμα και λιγότερο μεταβολικά ενεργά. Ωστόσο, ένα στελέχος απελευθέρωσε περισσότερους πολυσακχαρίτες σε βέλτιστες συνθήκες, όπου τα κύτταρα ήταν πιο βιώσιμα και μεταβολικά ενεργά. Με βάση τα παραπάνω, είναι πιθανό τα στελέχη ζύμης να απελευθέρωσαν διαφορετικό αριθμό πολυσακχαριτών, μέσω διαφορετικών μηχανισμών της οδού ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος.

5 Συμπέρασμα

Το είδος *Saccharomyces cerevisiae* και ο βιολογικός του κύκλος αποτελεί πεδίο εκτενούς μελέτης για τους ερευνητές. Σε αυτή την έρευνα, μελετήθηκαν τέσσερα νέα στελέχη που ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*, αλλά και δύο στελέχη των σπάνιων ειδών *Trigonopsis californica* και *Zygosaccharomyces bailii*. Πρώτος στόχος, αποτέλεσε η σύγκριση της κινητικής ανάπτυξης και των παραμέτρων της στα διαφορετικά στελέχη, με την επίδραση των διαφορετικών θερμοκρασιών, στους 18° C και 15° C. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλα τα στελέχη, με μείωση της θερμοκρασίας, παρουσίασαν ταυτόχρονες μειώσεις στους χρόνους ανάπτυξης και εμφάνισαν μεγαλύτερες φάσεις υστέρησης (lag phase), κατά την προσαρμογή τους στο μέσο ζύμωσης. Η θερμοκρασία επηρέασε σαφώς την ανάπτυξη των ζυμών και την κινητική της ζύμωσης, με τα διαφορετικά στελέχη να εμφανίζουν διαφορετικούς ρυθμούς και ανταποκρίσεις στις συνθήκες στρες του εμβολιασμού στο λευκό χυμό σταφυλιού. Οι παραπάνω κινητικές διαφοροποιήσεις πιθανόν να οφείλονται σε διαφορές του κάθε στελέχους στη γονιδιακή έκφραση. Το στέλεχος A9Y1, του είδους *Trigonopsis californica*, ήταν αυτό που παρουσίασε, μεταξύ των υπολοίπων στελεχών, το μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης και τη μεγαλύτερη φάση υστέρησης, με την θερμοκρασία των 15 °C, να ενισχύει την καθυστέρηση της ανάπτυξής του στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Παράλληλα, η μελέτη της προσκόλλησης και δημιουργίας βιοϋμενίου, καθώς και της κροκίδωσης, έδειξαν ότι και εδώ τα στελέχη παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους, βασιζόμενες τόσο σε γενετικό υπόβαθρο, όσο και σε φυσικοχημικές μεταβολές, καθώς και σε στρεσογόνες συνθήκες. Η εμφάνιση βιοϋμενίων αποτελεί γνώριμο φαινόμενο στη βιομηχανία των τροφίμων και των αλκοολούχων ποτών. Η δημιουργία βιοϋμενικών κυττάρων μπορεί να εμφανίζεται ωφέλιμη, όπως αυτά που σχηματίζονται από το είδος *S. cerevisiae* στο κρασί Sherry. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, βρίσκονται τα είδη *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Z. bailii* και *S. pombe*, όπου η εμφάνιση βιοϋμενίου από τα είδη αυτά, οδηγεί σε αρκετά ελαττώματα κατά την αποθήκευση του κρασιού (θολερότητα, παραγωγή ιζήματος, δυσάρεστες οσμές και γεύσεις), με επόμενο σημαντικές οικονομικές συνέπειες. Στην επεξεργασία αφρωδών οίνων κατά τη διάρκεια της δεύτερης ζύμωσης σε γυάλινες φιάλες, τα μπουκάλια αναστρέφονται και τα κύτταρα καθιζάνουν στο λαιμό του μπουκαλιού. Σε αυτή τη δευτερογενή ζύμωση, η χρήση κυττάρων με ικανότητα

κροκίδωσης φαίνεται να είναι επιθυμητή, καθώς διευκολύνουν την διαδικασία αφαίρεσης του κυτταρικού ιζήματος από τη φιάλη. Τέλος, οι παραγόμενοι πολυσακχαρίτες των βιοϋμενικών κυττάρων εμφάνισαν διαφορές, με μόνο το στέλεχος A9Y1 να εμφανίζει μείωση των παραγόμενων πολυσακχαριτών του στα βιοϋμενικά του κύτταρα.

Με βάση τα παραπάνω, τα στελέχη που εμφάνισαν καλύτερες αποδόσεις και σε μελλοντικές εναρκτήριες καλλιέργειες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλη κλίμακα, αποτελούν τα A6Y6, A26Y5, καθώς και το K33Y14, τα οποία συνδύασαν πολύ καλές αποδόσεις στις ζυμώσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες, εμφάνισαν καλή ικανότητα κροκίδωσης, σημαντική για το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς και θετικά αποτελέσματα στην παραγωγή πολυσακχαριτών.

6 Βιβλιογραφία

- Alonso, V. P. P., Gonçalves, M. P. M. B. B., de Brito, F. A. E., Barboza, G. R., Rocha, L. O., & Silva, N. C. C. (2023). Dry surface biofilms in the food processing industry: An overview on surface characteristics, adhesion and biofilm formation, detection of biofilms, and dry sanitization methods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 22(1), 688–713. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13089>.
- Balducci, E., Papi, F., Capialbi, D. E., & Del Bino, L. (2023). Polysaccharides' Structures and Functions in Biofilm Architecture of Antimicrobial-Resistant (AMR) Pathogens. *International journal of molecular sciences*, 24(4), 4030. <https://doi.org/10.3390/ijms24044030>
- Ballou C. (1976). Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. *Advances in microbial physiology*, 14(11), 93–158. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60227-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60227-1).
- Bastos, R., Carine Le Bourvellec, & Silva. (2015). Modifications of *Saccharomyces pastorianus* cell wall polysaccharides with brewing process. *Carbohydrate Polymers*, 124, 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.031>
- Beltran, Gemma & Novo, Maite & Guillamon, Jose & Mas, Albert & Rozès, Nicolas. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 121. 169-177.
- Bidard, F., Blondin, B., Dequin, S., Vezinhet, F., & Barre, P. (1994). Cloning and analysis of a FLO5 flocculation gene from *S. cerevisiae*. *Current genetics*, 25(3), 196–201. <https://doi.org/10.1007/BF00357162>
- Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P., & Blondin, B. (1997). Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *Journal of bacteriology*, 179(15), 4929–4936. <https://doi.org/10.1128/jb.179.15.4929-4936.1997>
- Brauer, M. J., Huttenhower, C., Airoidi, E. M., Rosenstein, R., Matese, J. C., Gresham, D., Boer, V. M., Troyanskaya, O. G., & Botstein, D. (2008). Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast. *Molecular biology of the cell*, 19(1), 352–367. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0779>
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological research*, 181, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>
- Carpentier, B. (2014a, January 1). *Biofilms* (C. A. Batt & M. L. Tortorello, Eds.). ScienceDirect; Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012384730000032>

- Cerulus, B., Jariani, A., Perez-Samper, G., Vermeersch, L., Pietsch, J. M., Crane, M. M., New, A. M., Gallone, B., Roncoroni, M., Dzialo, M. C., Govers, S. K., Hendrickx, J. O., Galle, E., Coomans, M., Berden, P., Verbandt, S., Swain, P. S., & Verstrepen, K. J. (2018). Transition between fermentation and respiration determines history-dependent behavior in fluctuating carbon sources. *eLife*, 7, e39234. <https://doi.org/10.7554/eLife.39234>
- Charoenchai, C., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (1998). Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(3), 283–288. <https://www.ajevonline.org/content/49/3/283>
- Chew, S. C., Kundukad, B., Teh, W. K., Doyle, P., Yang, L., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Mechanical signatures of microbial biofilms in micropillar-embedded growth chambers. *Soft matter*, 12(23), 5224–5232. <https://doi.org/10.1039/c5sm02755a>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of *non-Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS yeast research*, 10(2), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Ciccarelli, M., Masser, A. E., Kaimal, J. M., Planells, J., & Andréasson, C. (2023). Genetic inactivation of essential HSF1 reveals an isolated transcriptional stress response selectively induced by protein misfolding. *Molecular biology of the cell*, 34(10), ar101. <https://doi.org/10.1091/mbc.E23-05-0153>
- Coenye, T., Bové, M., & Bjarnsholt, T. (2022). Biofilm antimicrobial susceptibility through an experimental evolutionary lens. *NPJ biofilms and microbiomes*, 8(1), 82. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00346-4>
- Coi, A. L., Bigey, F., Mallet, S., Marsit, S., Zara, G., Gladieux, P., Galeote, V., Budroni, M., Dequin, S., & Legras, J. L. (2017). Genomic signatures of adaptation to wine biological ageing conditions in biofilm-forming flor yeasts. *Molecular ecology*, 26(7), 2150–2166. <https://doi.org/10.1111/mec.14053>
- Considine, J., & Frankish, E. (2014). *A Complete Guide to Quality in Small-Scale Wine Making*. (1 ed.) Academic Press.
- Dake, M. S., Jadhv, J. P., & Patil, N. B. (2010). Variations of two pools of glycogen and carbohydrate in *Saccharomyces cerevisiae* grown with various ethanol concentrations. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(7), 701–706. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0713-x>
- Deed, R. C., Fedrizzi, B., & Gardner, R. C. (2017). Influence of Fermentation Temperature, Yeast Strain, and Grape Juice on the Aroma Chemistry and Sensory Profile of Sauvignon Blanc Wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(40), 8902–8912. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03229>
- Dequin S. (2001). The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(5-6), 577–588. <https://doi.org/10.1007/s002530100700>

- Di Martino P. (2018). Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS microbiology*, 4(2), 274–288. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.2.274>
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2003). Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology*, 20(5), 567–574. [https://doi.org/10.1016/s0740-0020\(02\)00152-1](https://doi.org/10.1016/s0740-0020(02)00152-1)
- Dimopoulou, M., Lonvaud-Funel, A., Dols-Lafargue, M. (2017). Polysaccharide Production by Grapes Must and Wine Microorganisms. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (eds) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_12
- Dimopoulou, Maria & Kefalloniti, Vasiliki & Tsakanikas, Panagiotis & Papanikolaou, Seraphim & Nychas, George-John. (2021). Assessing the Biofilm Formation Capacity of the Wine Spoilage Yeast *Brettanomyces bruxellensis* through FTIR Spectroscopy. *Microorganisms*. 9. 587. [10.3390/microorganisms9030587](https://doi.org/10.3390/microorganisms9030587).
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Outlining a future for *non-Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International journal of food microbiology*, 147(3), 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020>
- Ekberg, J., Rautio, J., Mattinen, L., Vidgren, V., Londesborough, J., & Gibson, B. R. (2013). Adaptive evolution of the lager brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* for improved growth under hyperosmotic conditions and its influence on fermentation performance. *FEMS yeast research*, 13(3), 335–349. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12038>
- Escott, C., Del Fresno, J. M., Loira, I., Morata, A., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). *Zygosaccharomyces rouxii*: Control Strategies and Applications in Food and Winemaking. *Fermentation*, 4(3), 69. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030069>
- Ferreira, D., Galeote, V., Sanchez, I., Legras, J. L., Ortiz-Julien, A., & Dequin, S. (2017). Yeast multistress resistance and lag-phase characterisation during wine fermentation. *FEMS yeast research*, 17(6), 10.1093/femsyr/fox051. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox051>
- Fleet G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 11–22. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00245-9)
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature reviews. Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Gao, C. and Fleet, G.H. (1988), The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and

- Kloeckera apiculata*. Journal of Applied Bacteriology, 65: 405-409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb01909.x>
- Garavaglia, J., Schneider, R. de C., Camargo Mendes, S. D., Welke, J. E., Zini, C. A., Caramão, E. B., & Valente, P. (2015). Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production. Microbiological research, 173, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.02.002>
- Garijo, P., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Garde-Cerdán, T., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2014). Analysis of grapes and the first stages of the vinification process in wine contamination with *Brettanomyces bruxellensis*. European Food Research and Technology, 240(3), 525–532. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2351-4>
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P., Powell, C. D., & Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. FEMS microbiology reviews, 31(5), 535–569. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x>
- Giovani G, Canuti V, Rosi I (2010) Effect of yeast strain and fermentation conditions on the release of cell wall polysaccharides. Int J Food Microbiol 137:303–307
- Gouveia, C., & Soares, E. V. (2004). Pb²⁺Inhibits Competitively Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the Institute of Brewing, 110(2), 141–145. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00193.x>
- Govender P Domingo JL Bester MC Pretorius IS Bauer FF (2008) Controlled expression of the dominant flocculation genes FLO1, FLO5, and FLO11 in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microb74: 6041–6052.
- Guo, B., Styles, C. A., Feng, Q., & Fink, G. R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(22), 12158–12163. <https://doi.org/10.1073/pnas.220420397>
- Iñiguez-Moreno, M., Gutiérrez-Lomelí, M. & Avila-Novoa, M.G. (2019) Kinetics of biofilm formation by pathogenic and spoilage microorganisms under conditions that mimic the poultry, meat, and egg processing industries. International Journal of Food Microbiology, 303, 32–41.
- Jackson, R.S. (2000). Wine Science. Academic Press, USA
- James, S. A., & Stratford, M. (2011, January 1). Chapter 84 - *Zygosaccharomyces* Barker (1901) (C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout, Eds.). ScienceDirect; Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444521491000847>
- Jigami, Y., & Odani, T. (1999). Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1426(2), 335–345. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00134-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00134-2)

- Katoch, R. (2011). Carbohydrate Estimations. In: Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9785-2_5
- Klemm, S., Baum, M., Qiu, H., Nan, Z., Cavalheiro, M., Teixeira, M. C., Tendero, C., Gapeeva, A., Adelung, R., Dague, E., Castelain, M., & Formosa-Dague, C. (2021). Development of Polythiourethane/ZnO-Based Anti-Fouling Materials and Evaluation of the Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida glabrata* Using Single-Cell Force Spectroscopy. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 11(2), 271. <https://doi.org/10.3390/nano11020271>
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 26(3), 239–256. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x>
- Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., & Sone, H. (1998). Region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition. *Journal of bacteriology*, 180(24), 6503–6510. <https://doi.org/10.1128/JB.180.24.6503-6510.1998>
- Korber, D. R., Mangalappalli-Illathu, A. K., & Vidovic', S. (2009). Biofilm formation by food spoilage microorganisms in food processing environments. In *Biofilms in the Food and Beverage Industries* (pp. 169-199). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1533/9781845697167.2.169>
- Kurtzman, C. P. (2011, January 1). Chapter 99 - *Trigonopsis* Schachner emend. Kurtzman & Robnett (2007) (C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout, Eds.). ScienceDirect; Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444521491000999>
- Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., & Ray, R. R. (2022, January 1). Chapter 1 - Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function (M. P. Shah, Ed.). ScienceDirect; Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323905138000030?via%3Dihub>
- Lainioti, Georgia & Kapolos, John & Farmakis, Lambros & Koliadima, Athanasia & Karaiskakis, George. (2010). Kinetic Study of the Alcoholic Fermentation Process, in the Presence of Free and Immobilized *Saccharomyces Cerevisiae* Cells, at Different Initial Glucose Concentrations by Reversed Flow GC. *Chromatographia*. 72. 1149-1156. 10.1365/s10337-010-1790-8.
- Latgé J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular microbiology*, 66(2), 279–290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>
- Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyani, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., & Rousseaux, S. (2020). New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108464. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>

- Lianou, A., Nychas, G. E., & Koutsoumanis, K. P. (2020). Strain variability in biofilm formation: A food safety and quality perspective. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 137, 109424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109424>
- Lillie, S. H., & Pringle, J. R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of bacteriology*, 143(3), 1384–1394. <https://doi.org/10.1128/jb.143.3.1384-1394.1980>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology spectrum*, 3(3), 10.1128/microbiolspec. MB-0011-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>
- Lu, J., Hu, X., & Ren, L. (2022). Biofilm control strategies in food industry: Inhibition and utilization. *Trends in Food Science & Technology*, 123, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.03.007>
- Maekawa, H., & Takegawa, K. (2020). Yeast Flocculin: Methods for Quantitative Analysis of Flocculation in Yeast Cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2132, 437–444. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0430-4_42
- Maicas S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>
- Maicas, S. (2021). Advances in Wine Fermentation. *Fermentation*, 7(3), 187. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030187>
- Malfeito-Ferreira M, Silva AC (2019) Spoilage yeasts in wine production. In: Romano P, Ciani M, Fleet GH (eds) *Yeasts in the production of wine*. Springer Nature, New York, pp 375–394
- Mas, A., Padilla, B., Esteve-Zarzoso, B., Beltran, G., Reguant, C., & Bordons, A. (2016). Taking Advantage of Natural Biodiversity for Wine Making: The WILDWINE Project. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.002>
- Maunder, E., & Welch, M. (2017). Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS microbiology letters*, 364(13), fnx120. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx120>
- Mercier-Bonin, M., Ouazzani, K., Schmitz, P., & Lorthois, S. (2004). Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *Journal of colloid and interface science*, 271(2), 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2003.11.045>
- Miki, B. L., Poon, N. H., James, A. P., & Seligy, V. L. (1982). Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 150(2), 878–889. <https://doi.org/10.1128/jb.150.2.878-889.1982>
- Mizrahy, S., & Peer, D. (2012). Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. *Chemical Society reviews*, 41(7), 2623–2640. <https://doi.org/10.1039/c1cs15239d>

- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Nayyar, A., Walker, G., Wardrop, F., and Adya, A. K. (2017) Flocculation in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of cell wall polysaccharides and lectin-like receptors. *J. Inst. Brew.*, 123: 211–218. doi: 10.1002/jib.421
- Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. H., & Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 3324–3334. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.027>
- Nishihara, H., Toraya, T. and Fukui, S. (1982) Flocculation of cell-walls of brewers-yeast and effects of metal-ions, protein-denaturants and enzyme treatments. *Arch Microbiol* 131, 112–115.
- Palma, M., Münsterkötter, M., Peça, J., Güldener, U., & Sá-Correia, I. (2017). Genome sequence of the highly weak-acid-tolerant *Zygosaccharomyces bailii* IST302, amenable to genetic manipulations and physiological studies. *FEMS yeast research*, 17(4), fox025. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox025>
- Paramonova, E., Krom, B. P., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., & Sharma, P. K. (2009). Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 6), 1997–2003. <https://doi.org/10.1099/mic.0.021568-0>
- Perez-Samper, G., Cerulus, B., Jariani, A., Vermeersch, L., Barrajón Simancas, N., Bisschops, M. M. M., van den Brink, J., Solis-Escalante, D., Gallone, B., De Maeyer, D., van Bael, E., Wenseleers, T., Michiels, J., Marchal, K., Daran-Lapujade, P., & Verstrepen, K. J. (2018). The Crabtree Effect Shapes the *Saccharomyces cerevisiae* Lag Phase during the Switch between Different Carbon Sources. *mBio*, 9(5), e01331-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01331-18>
- Portugal, C., Pinto, L., Ribeiro, M., Tenorio, C., Igrejas, G., & Ruiz-Larrea, F. (2015). Potential spoilage yeasts in winery environments: Characterization and proteomic analysis of *Trigonopsis cantarellii*. *International journal of food microbiology*, 210, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.005>
- Powell, C. D., Quain, D. E., & Smart, K. A. (2003). The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS yeast research*, 3(2), 149–157. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00002-3)
- Pretorius I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast (Chichester, England)*, 16(8), 675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B)
- Rajendar, B., Mulagalapati, R., Reddy, M. V. N. J., Patri, S., Karthik, Y. K., & Matur, R. V. (2020). 2-Phenoxyethanol: A novel reagent for improved sensitivity of carbohydrate quantification. *Analytical biochemistry*, 595, 113624. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113624>

- Reinmets, Kristina & Dehkharghani, Amin & Guasto, Jeffrey & Fuchs, Stephen. (2019). Microfluidic quantification and separation of yeast based on surface adhesion. *Lab on a Chip*. 19. 10.1039/C9LC00275H.
- Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature reviews. Microbiology*, 18(10), 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Guillamón, J. M., Salazar, G., Querol, A., & Barrio, E. (2011). Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Applied and environmental microbiology*, 77(7), 2292–2302. <https://doi.org/10.1128/AEM.01861-10>
- Sato, M., Maeba, H., Watari, J., & Takashio, M. (2002). Analysis of an inactivated Lg-FLO1 gene present in bottom-fermenting yeast. *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(4), 395–398. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(02\)80073-1](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(02)80073-1)
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, 184(4), 1140–1154. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>
- Şener, Aysun & Canbas, Ahmet & Unal, M. (2007). The effect of fermentation temperature on the growth kinetics of wine yeast species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 31. 349-354.
- Sharahi, J. Y., Azimi, T., Shariati, A., Safari, H., Tehrani, M. K., & Hashemi, A. (2019). Advanced strategies for combating bacterial biofilms. *Journal of cellular physiology*, 234(9), 14689–14708. <https://doi.org/10.1002/jcp.28225>
- Sharf, R., & Margalith, P. (1983). The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17(5), 311–313. <https://doi.org/10.1007/bf00508027>
- Smits, G. J., Kapteyn, J. C., van den Ende, H., & Klis, F. M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Current opinion in microbiology*, 2(4), 348–352. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(99\)80061-7](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(99)80061-7)
- Soares E. V. (2011). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal of applied microbiology*, 110(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x>
- Soares, E. V., & Duarte, A. A. (2002). Addition of nutrients induce a fast loss of flocculation in starved cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 24(23), 1957–1960. <https://doi.org/10.1023/a:1021154212086>
- Solieri, L., Landi, S., De Vero, L., & Giudici, P. (2006). Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. *Journal of applied microbiology*, 101(1), 63–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02906.x>
- Sorger, P. K., & Pelham, H. R. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell*, 54(6), 855–864. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(88\)91219-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(88)91219-6)

- Souza, A. C. M., Mousaviraad, M., Mapoka, K. O. M., & Rosentrater, K. A. (2018). Kinetic Modeling of Corn Fermentation with *S. cerevisiae* Using a Variable Temperature Strategy. *Bioengineering* (Basel, Switzerland), 5(2), 34. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5020034>
- Speranza, B., Sinigaglia, M., and Corbo, M. R. (2009). Non starter lactic acid bacteria biofilms: A means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Food Control* 20, 1063–1067. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.01.006
- Steurer, C., Eder, N., Kerschbaum, S., Wegrostek, C., Gabriel, S., Pardo, N., Ortner, V., Czerny, T., & Riegel, E. (2018). HSF1 mediated stress response of heavy metals. *PloS one*, 13(12), e0209077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209077>.
- Stewart, G. (2018). Yeast Flocculation—Sedimentation and Flotation. *Fermentation*, 4(2), 28. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020028>
- Stewart, G. G., and Russell, I. (1986) One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *J. Inst. Brew.* 92, 537–558
- Stratford, M., & Assinder, S. (1991). Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast* (Chichester, England), 7(6), 559–574. <https://doi.org/10.1002/yea.320070604>
- Stratford, M., Steels, H., Nebe-von-Caron, G., Novodvorska, M., Hayer, K., & Archer, D. B. (2013). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International journal of food microbiology*, 166(1), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.025>
- Teoh, A. L., Heard, G., & Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International journal of food microbiology*, 95(2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- Teunissen, A. W., Holub, E., van der Hucht, J., van den Berg, J. A., & Steensma, H. Y. (1993). Sequence of the open reading frame of the FLO1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (Chichester, England), 9(4), 423–427. <https://doi.org/10.1002/yea.320090413>
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Rossetti, A. P., Gaggiotti, S., Piva, A., Olivastri, L., Cichelli, A., Compagnone, D., & Arfelli, G. (2022). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *non-Saccharomyces* yeasts to improve traditional sparkling wines production. *Food microbiology*, 108, 104097. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104097>
- Tomičić, R., & Raspor, P. (2017). Influence of growth conditions on adhesion of yeast *Candida* spp. and *Pichia* spp. to stainless steel surfaces. *Food microbiology*, 65, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.008>
- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of food microbiology*, 80(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00144-7)
- Van Mulders, S. E., Christianen, E., Saerens, S. M., Daenen, L., Verbelen, P. J., Willaert, R., Verstrepen, K. J., & Delvaux, F. R. (2009). Phenotypic diversity

- of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS yeast research, 9(2), 178–190. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00462.x>
- Varela, C., Bartel, C., Nandorfy, D. E., Borneman, A., Schmidt, S., & Curtin, C. (2020). Identification of flocculant wine yeast strains with improved filtration-related phenotypes through application of high-throughput sedimentation rate assays. *Scientific Reports*, 10(1), 2738. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59579-y>
- Vermeersch, L., Perez-Samper, G., Cerulus, B., Jariani, A., Gallone, B., Voordeckers, K., Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2019). On the duration of the microbial lag phase. *Current genetics*, 65(3), 721–727. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00938-2>
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(3), 197–205. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1200-8>
- Verstrepen, K. J., Jansen, A., Lewitter, F., & Fink, G. R. (2005). Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nature genetics*, 37(9), 986–990. <https://doi.org/10.1038/ng1618>
- Vidgren V, Londesborough J (2011) 125th Anniversary Review: Yeast Flocculation and Sedimentation in Brewing. *J. Inst. Brew.* 117(4): 475 -487
- Vidgren, V., & Londesborough, J. (2011). 125th Anniversary Review: Yeast Flocculation and Sedimentation in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(4), 475–487. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00495.x>
- Vilanova, Mar & Masneuf-Pomarède, Isabelle. (2005). Characterization of yeast strains from Rias Baixas (NW Spain) and their contribution to the fermentation of Albariño wine. *Annals of Microbiology*. 55. 23.
- Walker, G. M. (2014). Fermentation (Industrial): media for industrial fermentations. In C. A. Batt (Ed.), *Encyclopedia of food microbiology* (2nd ed., pp. 769-777). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00107-5>
- Walker, G. M., & Walker, R. S. K. (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in applied microbiology*, 105, 87–129. <https://doi.org/10.1016/bs.aams.2018.05.003>
- Walker, G., & Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Wang, H. Y., Fu, J. C., Lee, Y. C., & Lu, P. J. (2013). Hyperthermia stress activates heat shock protein expression via propyl isomerase 1 regulation with heat shock factor 1. *Molecular and cellular biology*, 33(24), 4889–4899. <https://doi.org/10.1128/MCB.00475-13>
- Watari, J., Takata, Y., Ogawa, M., Sahara, H., Koshino, S., Onnela, M. L., Airaksinen, U., Jaatinen, R., Penttilä, M., & Keränen, S. (1994). Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene FLO1. *Yeast* (Chichester, England), 10(2), 211–225. <https://doi.org/10.1002/yea.320100208>

- Whiteley, M., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 551(7680), 313–320. <https://doi.org/10.1038/nature24624>
- Wiederrecht, G., Shuey, D. J., Kibbe, W. A., & Parker, C. S. (1987). The *Saccharomyces* and *Drosophila* heat shock transcription factors are identical in size and DNA binding properties. *Cell*, 48(3), 507–515. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90201-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90201-7)
- Yamamoto, A., Mizukami, Y., & Sakurai, H. (2005). Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 280(12), 11911–11919. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411256200>
- Yarrow, D. (1998) Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeast. In: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., Eds., *The Yeasts, a Taxonomy Study*, 4th Edition, Elsevier Publishers, Amsterdam, 77-100. <https://doi.org/10.1016/B978-044481312-1/50014-9>
- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., & Zara, S. (2020). Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World journal of microbiology & biotechnology*, 36(9), 134. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5>
- Zara, G., Zara, S., Pinna, C., Marceddu, S., & Budroni, M. (2009). FLO11 gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 12), 3838–3846. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028738-0>
- Zara, S., Bakalinsky, A. T., Zara, G., Pirino, G., Demontis, M. A., & Budroni, M. (2005). FLO11-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 2934–2939. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2934-2939.2005>
- Zhao, A., Sun, J., & Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1137947. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>