



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

**Αξιολόγηση της ζύμης *Hansienaspora vineae* στην οινοποίηση
των ποικιλιών Μοσχοφίλερο και Ασύρτικο**

Γαραζανάκης Αλκιβιάδης-Θωμάς

ΑΜ: 18685027

Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Όνοματεπώνυμο: Επίκουρη Καθηγήτρια Δημοπούλου Μαρία

ΑΘΗΝΑ ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2023

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

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

**« Αξιολόγηση της ζύμης *Hansienaspora vineae* στην οινοποίηση των
ποικιλιών Μοσχοφίλερο και Ασύρτικο »**

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Υπογραφή επιβλέποντα καθηγητή	
Υπογραφή επιβλέποντα καθηγητή	
Υπογραφή επιβλέποντα καθηγητή	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογράφων **ΓΑΡΑΖΑΝΑΚΗΣ ΑΛΚΙΒΙΑΔΗΣ-ΘΩΜΑΣ** του **ΓΕΩΡΓΙΟΥ**, με αριθμό μητρώου **18685027** φοιτητής 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 αίτησή μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Ο Δηλών



Γαραζανάκης Αλκιβιάδης-Θωμάς

Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα Καθηγητή

Ψηφιακή Υπογραφή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη κυρία Δημοπούλου για την ευκαιρία που μου δόθηκε να λάβω μέρος σε ένα τόσο πρωτοποριακό πείραμα καθώς και την υποψήφια Διδάκτορα Αικατερινή Τζαμουράνη για όλη τη βοήθεια και στήριξη που μου έδωσε κατά την διάρκεια της πειραματικής πορείας και της συγγραφής της εν λόγω διπλωματικής εργασίας. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τη κυρία Χούχουλα που επέτρεψε την εκτέλεση των μοριακών αναλύσεων στο εργαστήριο της, καθώς και το οινοποιείο Τρουπής για την διεξαγωγή των αλκοολικών ζυμώσεων στην εγκαταστάσεις τους. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής για τον χρόνο που αφιέρωσαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Hanseniaspora vineae* είναι σπάνιο είδος ζύμης που χρησιμοποιείται στην οινοποίηση και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερο οινολογικό ενδιαφέρον λόγω των αρωματικών ενώσεων που παράγει. Καθώς το είδος της *H. vineae* δεν παρουσιάζει υψηλή ζυμωτική ικανότητα σαν non-*Saccharomyces* ζύμη, συνίσταται να εμβολιάζεται ταυτόχρονα ή διαδοχικά με το είδος *Saccharomyces cerevisiae*. Στην εν λόγω πτυχιακή μελέτη αξιολογήθηκε το οινολογικό δυναμικό της ζύμης *H. vineae* σε γλεύκη από δύο λευκές ελληνικές ποικιλίες, το Μοσχοφίλερο και το Ασύρτικο. Εμπορικά στελέχη *H. vineae* και *S. cerevisiae*, μελετήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες εμβολιασμού και αξιολογήθηκαν οι παραγόμενοι οίνοι. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η κινητική των αλκοολικών ζυμώσεων, η σύσταση της μικροχλωρίδας στην αρχή-μέσα και τέλος της ζύμωσης ενώ σε όλους τους πειραματικούς οίνους έγιναν οινολογικές μετρήσεις. Με στόχο την εξέταση της σύστασης της μικροχλωρίδας, ζύμες απομονώθηκαν από τα γλεύκη και σε 2 στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν μοριακές αναλύσεις αυτών των ζυμών με τις μεθόδους RAPD-PCR και Interdelta-PCR, με σκοπό την εύρεση της ζύμης που επικράτησε σε κάθε στάδιο σε επίπεδο είδους και στελέχους. Επιπλέον, στους παραγόμενους οίνους έλαβαν χώρα φυσικοχημικές και οργανοληπτικές αναλύσεις. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ο *H. vineae* αποτελεί είδος με δυνατότητα επικράτησης σε εν ζυμώσει γλεύκος στα πρώτα στάδια αλλά και επιτυχούς συνύπαρξης με τον *S. cerevisiae*. Ο διαδοχικός εμβολιασμός με *H. vineae* προσδίδει πολυπλοκότητα στον παραγόμενο οίνο, λόγω της εμφάνισης αρωμάτων άνθων, με καλύτερη επίδραση στην ποικιλία Μοσχοφίλερο. Αυτή η επίδραση καθιστά το είδος ιδανικό για χρήση στην παραγωγή οίνων, καθώς μπορεί να συμβάλει θετικά στη βιομηχανική παραγωγή οίνου.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:

Διαδοχικός εμβολιασμός, *Hanseniaspora vineae*, επικράτηση, αρωματικό προφίλ, non-*Saccharomyces*

ABSTRACT

Hanseniaspora vineae is a rare yeast species that has been isolated from grapes in some wine producing regions and is of particular oenological interest due to the aromatic compounds it produces. Studying its impact on the aroma profile and mouthfeel of wine is essential. To be used in large-scale winemaking, a yeast strain must meet certain basic specifications. Therefore, understanding the effect of using *H. vineae* in wine production, as well as its interaction with *S. cerevisiae*, is crucial to evaluate whether co-inoculation or sequential inoculation with a strain of *S. cerevisiae* can yield desirable and high-quality results. In this bachelor's study, the course of alcoholic fermentation was studied with and without sequential inoculation of *H. vineae* with a commercial strain of *S. cerevisiae* in must from two Greek white grape varieties with distinct varietal aromas, Moschofilero and Assyrtiko. Furthermore, the effect of inoculation and co-inoculation on varietal aroma and on the final product was examined. To assess the prevalence and interaction of the two inoculants, yeasts were isolated from the must and two other stages during alcoholic fermentation. Molecular analyses of these yeasts were subsequently performed using RAPD-PCR and Interdelta-PCR methods to identify the yeast that prevailed at each stage, at species and strain level. Additionally, physical-chemical and sensory analyses were conducted on the resulting wines. According to the results of this study, *H. vineae* is a species with the potential to dominate in a fermenting must and to compete with *S. cerevisiae*. Sequential inoculation with *H. vineae* boosts the complexity of the resulting wine due to the emergence of floral and especially rose aromas. This effect makes the species ideal for use in wine production, as it can positively contribute to industrial wine production.

Περιεχόμενα

Κατάλογος Πινάκων	8
1. Εισαγωγή.....	10
1.1. Οινοποίηση	10
1.2. Η αλκοολική ζύμωση	11
1.3. Μικροχλωρίδα του Οίνου	12
1.3.1. <i>S. cerevisiae</i> ζύμες	14
1.3.2. Οι <i>non-Saccharomyces</i> ζύμες	15
1.3.3. <i>Hanseniaspora vineae</i>	16
1.4. Επίδραση των ζυμών στις αρωματικές ενώσεις	17
1.5. Μέθοδοι ταυτοποίησης μικροοργανισμών στον οίνο.....	19
2. Σκοπός.....	22
3. Υλικά και μέθοδοι.....	22
3.1. Οινοποίηση- Προέλευση δειγμάτων	22
3.2. Απομονώσεις	23
3.3. Εμπλουτισμός	24
3.4. Εκχύλιση γενετικού υλικού (DNA)	25
3.5. PCR	27
3.5.1. RAPD-PCR	27
3.5.2. Interdelta-PCR.....	27
3.6. Ηλεκτροφόρηση	28
3.7. Οινολογικές αναλύσεις	29
3.7.1. pH	29
3.7.2. Ογκομετρούμενη οξύτητα.....	29
3.7.3. Αλκοόλη	30

3.7.4. Θειώδες ελεύθερο και ολικό	31
3.8. Οργανοληπτικός έλεγχος	31
3.9. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	32
4. Αποτελέσματα και συζήτηση	33
4.1. Βιωσιμότητα - Επικράτηση επιλεγμένων ζυμών.....	33
4.2. Οινολογικές αναλύσεις	36
4.3. Μοριακές Αναλύσεις	37
4.3.1. Μοσχοφίλερο	38
4.3.2. Ασύρτικο	41
4.4. Οργανοληπτικός έλεγχος στο τελικό οίνο.....	44
Συμπεράσματα	51
Βιβλιογραφία.....	52
Παράρτημα	55

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων των 4 οινοποιήσεων που διεξήχθησαν στο πείραμα	23
Πίνακας 2. Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων στα 4 τελικά δείγματα οίνου. Οι δείκτες συμβολίζουν της στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από το Tuckey's test (Statgraphics software)	36
Γράφημα 1. Η καμπύλη ζύμωσης του δείγματος AS (*) (Ασύρτικο <i>S. cerevisiae</i> Vin A) και η καμπύλη θερμοκρασίας του γλεύκους (●).	33
Γράφημα 2. Η καμπύλη ζύμωσης του δείγματος AB (*) (Ασύρτικο Both <i>H. vineae</i> + <i>S. cerevisiae</i> A) και η καμπύλη θερμοκρασίας του γλεύκους (●).	34
Γράφημα 3. Η καμπύλη ζύμωσης του δείγματος MS (*) (Μοσχοφίλερο <i>S. cerevisiae</i> A) και η καμπύλη θερμοκρασίας του γλεύκους (●).	35
Γράφημα 4. Η καμπύλη ζύμωσης του δείγματος MB (*) (Μοσχοφίλερο Both <i>H. vineae</i> + <i>S. cerevisiae</i> A). και η καμπύλη θερμοκρασίας του γλεύκους (●).	35
Γράφημα 5. Τα αποτελέσματα των RAPD-PCR και Interdelta-PCR στα δείγματα του Μοσχοφίλερου σε συνδυαστικό διάγραμμα με απεικόνιση της επί τις % επικράτησης των γηγενείς ζυμών, του <i>S. cerevisiae</i> και του <i>H. vineae</i> .	38

Γράφημα 6. Τα αποτελέσματα των PCR για όλα τα δείγματα του Μοσχοφίλερου με απεικόνιση της επί τις % επικράτησης των γηγενών ειδών, τον <i>S. cerevisiae</i> A και των 7 διαφορετικών στελεχών του <i>S. cerevisiae</i> που εντοπίστηκαν στα γηγενή είδη.	40
Γράφημα 7. Τα αποτελέσματα των RAPD-PCR και Interdelta-PCR στα δείγματα του Ασύρτικου σε συνδυαστικό διάγραμμα με της επί τις % επικράτησης απεικόνιση των γηγενών ζυμών, του <i>S. cerevisiae</i> και του <i>H. vineae</i> .	41
Γράφημα 8. Τα αποτελέσματα των PCR στα δείγματα του Ασύρτικου με απεικόνιση της επί τις % επικράτησης των 2 διαφορετικών γηγενών στελεχών του <i>S. cerevisiae</i> που εντοπίστηκαν, τα γηγενή είδη και τον <i>S. cerevisiae</i> A.	42
Γράφημα 9. Τα αποτελέσματα του τριγωνικού τεστ για το Ασύρτικο	45
Γράφημα 10. Τα αποτελέσματα του τριγωνικού τεστ για το Μοσχοφίλερο	46
Γράφημα 11. Ο οργανοληπτικός έλεγχος στα δείγματα AB-AS (Ασύρτικο Both <i>H. vineae</i> + <i>S. cerevisiae</i> A) - (Ασύρτικο <i>S. cerevisiae</i> A) με βάση κύριους αρωματικούς και γευστικούς παράγοντες.	47
Γράφημα 12. Ο οργανοληπτικός έλεγχος στα δείγματα MB (Μοσχοφίλερο Both <i>H. vineae</i> + <i>S. cerevisiae</i> A) - MS (Μοσχοφίλερο 9 A)	48
Γράφημα 13. Η αξιολόγηση της αρωματικής παραμέτρου "Τριαντάφυλλο" στα δείγματα Ασύρτικου και Μοσχοφίλερου από εξειδικευμένο πάνελ με βάση τους μέσους όρους από την ελεύθερη κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε.	49
Γράφημα 14 Η αξιολόγηση της αρωματικής παραμέτρου "Μέλι" στα δείγματα Ασύρτικου και Μοσχοφίλερου από εξειδικευμένο πάνελ με βάση τους μέσους όρους από την ελεύθερη κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε.	50

1. Εισαγωγή

1.1. Οινοποίηση

Ο οίνος παράγεται και καταναλώνεται εδώ και αρκετά χιλιάδες χρόνια από τον άνθρωπο. Η αλκοολική ζύμωση είναι η βιομετατροπή των σακχάρων του μούστου σε αιθυλική αλκοόλη, διοξείδιο του άνθρακα και δευτερογενείς μεταβολίτες. Όμως ένας ποιοτικός οίνος δεν εξαρτάται μόνο από το στάδιο της ζύμωσης αλλά και από τις προζυμωτικές και μεταζυμωτικές διεργασίες που παίζουν καθοριστικό ρόλο (P. Ribereau-Gayon et al., 2001).



Εικόνα 1. Στάδια λευκής οινοποίησης

Η παραγωγή οίνου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία με πολλά στάδια (Εικόνα 1). Αρχικά γίνεται έκθλιψη των σταφυλιών για να γίνει εξαγωγή του χυμού από τη σάρκα τους. Αμέσως μετά γίνονται κατεργασίες του χυμού οι οποίες καθορίζουν το περιβάλλον ζύμωσης, όπως προσθήκη οξέων για την βελτίωση της οξύτητα αλλά και θειώδους ανυδρίτη για την προστασία του μούστου από οξειδώσεις και αλλοιώσεις (Boulton Richard et al., 2013). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ο κατάλληλος εμβολιασμός ζυμομυκήτων, εφόσον έχει επιλεγθεί, και εφόσον είναι απαραίτητο προστίθεται αφομοιώσιμο άζωτο, ως θρεπτική ουσία για να μπορούν οι ζύμες να αναπτυχθούν πιο εύκολα. Μόλις οι ζύμες προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον ξεκινάει η αλκοολική ζύμωση. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας, η ανάδευση των οινολασπών, η προσθήκη θρεπτικών και οξυγόνου είναι όλα παράγοντες που ελέγχει ο οινοποιός για να βελτιστοποιήσει τις συνθήκες ζύμωσης (Bisson, 1999).

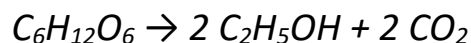
Μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, ξεκινούν οι φυσικοχημικές κατεργασίες που θα βοηθήσουν στην ποιοτική σταθερότητα του προϊόντος. Σημαντικότερη είναι η θείωση, με την οποία προσδίδεται αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή προστασία στον οίνο. Έπειτα γίνεται προσθήκη μπετονίτη ο οποίος, λόγω ηλεκτρικού φορτίου, ελκύει τις πρωτεΐνες οι οποίες θα προκαλούσαν θόλωμα στον οίνο και δημιουργεί μεγάλα συσώματα τα οποία καθιζάνουν και απομακρύνονται υπό τη μορφή λάσπης (P. Ribéreau-Gayon et al., 2006). Τέλος, για την πλήρη ασφάλεια του οίνου, πρέπει να γίνει η τρυγική σταθεροποίηση. Το τρυγικό οξύ είναι το κύριο οξύ του οίνου, όμως είναι ασταθές καθώς μπορεί να αντιδράσει με το κάλιο και το ασβέστιο του οίνου και να δημιουργήσει άλατα, τα οποία καθιζάνουν. Για το λόγο αυτό γίνεται ειδική κατεργασία πριν την εμφιάλωση, έτσι ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση του συγκεκριμένου ελαττώματος αργότερα (P. Ribéreau-Gayon et al., 2006). Έπειτα ακολουθεί η εμφιάλωση και η προώθηση του οίνου στους καταναλωτές.

Απ' όλα τα στάδια μιας οινοποίησης τον πιο καθοριστικό ρόλο στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου, πέρα από την ποικιλία του σταφυλιού που οινοποιείται, παίζει η αλκοολική ζύμωση και το είδος της ζύμης που την πραγματοποιεί

1.2. Η αλκοολική ζύμωση

Πολλοί μικροοργανισμοί στον πλανήτη έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίζουν χημικές ενώσεις, όπως τα σάκχαρα και τα οξέα, με σκοπό την παραγωγή ενέργειας για την επιβίωσή τους. Κατά τον μεταβολισμό λαμβάνουν χώρα χημικές αντιδράσεις οι οποίες παράγουν και κάποια πάρα-προϊόντα τα οποία συνήθως ελευθερώνονται στο περιβάλλον (Jackson, 2014).

Μια από αυτές τις μεταβολικές οδούς που μπορούν να ακολουθήσουν πολλά είδη μικροοργανισμών, όπως οι ζύμες και τα βακτήρια, είναι η γλυκόλυση και η αλκοολική ζύμωση, ο μεταβολισμός δηλαδή της γλυκόζης και της φρουκτόζης σε πυροσταφυλικό οξύ και ενέργεια και έπειτα η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέως σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα (Jackson, 2014). Η χημική αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης, συμπεριλαμβανομένης της γλυκόλυσης, χωρίς την παραγόμενη ενέργεια, μπορεί απλοποιημένα να αναλυθεί ως εξής:



1.3. Μικροχλωρίδα του Οίνου

Οι μικροοργανισμοί που ακολουθούν τη μεταβολική οδό της αλκοολικής ζύμωσης για να επιβιώσουν είναι οι ζυμομύκητες και κάποια βακτήρια. Ανάλογα με το είδος το οποίο την εκτελεί διαφέρουν τα παραπροϊόντα και τα ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα της ζύμωσης (Fleet GH., 2003)., έγινε η κατηγοριοποίησή τους σε διάφορα είδη όπως τα *S. cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans* και *Hansienaspora unarum*. Έχουν γίνει απομονώσεις αυτών των ειδών από φρούτα, όπως τα σταφύλια, τα κεράσια και οι ελιές αλλά και από ποτά, όπως η μπύρα και το κρασί. Πέρα από τις ζύμες έχουν απομονωθεί και πολλά είδη βακτηρίων από τα γένη *Acetobacter* (*A. Aceti*) και *Gluconobacter* (*G. Oxydans*) τα οποία ακολουθούν διάφορα μεταβολικά μονοπάτια προς την παραγωγή οξικού οξέως (*Daniela Campaniello, et al. 2017*). Ενώ άλλα είδη από βακτήρια που έχουν απομονωθεί είναι τα γαλακτικά, όπως ο *Oenococcus oeni* ένα είδος που εκτελεί σε κατάλληλες συνθήκες τη μηλογαλακτική μετατροπή και άλλα του γένους *Lactobacillus*, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση λόγω αύξησης της πτητικής οξύτητας (Bartowsky, 2009). Επιπλέον έχουν απομονωθεί είδη μυκήτων, όπως ο *Brettanomyces bruxellensis*, τα οποία έχουν αλλοιωτική δράση στον οίνο, λόγω της παραγωγής μη επιθυμητών αρωματικών ενώσεων. Αυτά τα είδη βρίσκονται και επηρεάζουν, με το δικό τους τρόπο, τη χημική σύσταση του οίνου και το τελικό αποτέλεσμα. Οι βιοχημικές αυτές αντιδράσεις ξεκινούν τη στιγμή που ελευθερώνονται ο χυμός και τα σάκχαρα και οξέα που περιέχει, από τη φλούδα του καρπού.

Στη φύση οι ζύμες επιβιώνουν στους φλοιούς των καρπών, όταν έρθουν σε επαφή με το χυμό του φρούτου και τα σάκχαρα που περιέχει, ξεκινούν την αλκοολική ζύμωση, καταναλώνουν τα σάκχαρα για θρέψη και πολλαπλασιάζονται. Οι ζύμες αυτές ονομάζονται γηγενείς, αυτόχθονες ή άγριες ζύμες και ανήκουν στην πανίδα ενός οικοσυστήματος. Στις γηγενείς ζύμες ανήκουν όλα τα είδη και στελέχη που προέρχονται από το οικοσύστημα του φυτού, ακόμα και στελέχη *S. cerevisiae* (Padilla et al., 2016). Όμως τα είδη και τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες σε εργαστήρια και υπάρχουν σε ειδικά σκευάσματα αναφέρονται ως εμπορικές ζύμες. Στο αμπέλι επιβιώνουν στη φλούδα του σταφυλιού και μέσω της πίεσης μεταφέρονται στο γλεύκος.

Στο γλεύκος, αμέσως μετά την πίεση, επιβιώνουν πάρα πολλά από τα γηγενή είδη ζυμών, και ξεκινάει μεταξύ τους μια ανταγωνιστικότητα για τα σάκχαρα και τα θρεπτικά του γλεύκους. Εφόσον υπάρχει τροφή και κατάλληλες συνθήκες οι ζύμες αναπτύσσονται, πολλαπλασιάζονται και περνάνε από τις φάσεις προσαρμογής, εκθετική/ανάπτυξης, στατική και θανάτου (Boulton Richard et al., 2013). Προσπαθούν όλα τα είδη να καταναλώσουν ταυτόχρονα τα σάκχαρα, με αποτέλεσμα να επικρατεί ανταγωνισμός μεταξύ τους. Λόγω αυτού του ανταγωνισμού κάποια είδη δεν έχουν την κατάλληλη πρόσβαση στις θρεπτικές ουσίες και οδηγούνται σε θάνατο ή παρατεταμένη

στατική φάση. Η ζυμωτική ικανότητα και οι αντοχές στις συνθήκες του γλεύκους ωφελούν κάποια είδη δίνοντάς τους τη δυνατότητα επικράτησης. Στο τέλος το μεγαλύτερο κομμάτι της ζύμωσης γίνεται από τα πιο ανταγωνιστικά είδη, αυξάνοντας κατά πολύ τον πληθυσμό τους στο γλεύκος. Σε αυτή την περίπτωση τα υπόλοιπα είδη περνάνε σύντομα στη φάση θανάτου ή επιβιώνουν σε μικρό πληθυσμό, πάρα τον ανταγωνισμό.

Υπάρχουν πάρα πολλοί παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν ποιο είδος θα επικρατήσει. Κυρίαρχο είναι το είδος *S. cerevisiae* το οποίο επικρατεί λόγω χαρακτηριστικών, όπως η αντοχή σε υψηλά επίπεδα αλκοόλης, θειώδους και άλλων χημικών ενώσεων που βρίσκονται στον οίνο (P. Ribereau-Gayon et al., 2001). Εξαιτίας αυτών των αντοχών, στη πλειοψηφία των ζυμώσεων στον οίνο, το τελικό στάδιο της ζύμωσης και η αποζύμωση των σακχάρων γίνεται από στελέχη του *S. cerevisiae*, όμως τα αρχικά στάδια της ζύμωσης μπορούν να εκτελεστούν από γηγενή ή εμβολιασμένα non-*Saccharomyces* είδη.

Λόγω αυτού, το ποιο είδος θα εκτελέσει τα αρχικά στάδια της ζύμωσης έχει τεράστιες επιπτώσεις στο οργανοληπτικό αποτέλεσμα του οίνου και στο αρωματικό προφίλ αλλά και στην αίσθηση στο στόμα (Medina et al., 2013). Η αλληλεπίδραση των διαφόρων ειδών που ζυμώνουν στα πρώτα στάδια έως 8% vol έχει καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή εστέρων οι οποίοι αυξάνουν κατά πολύ το αρωματικό δυναμικό του οίνου (Ciani & Comitini, 2015).

Βέβαια στα περισσότερα οινοποιεία αμέσως μετά την έκθλιψη γίνεται προσθήκη θειώδους ανυδρίτη καθώς προσφέρει αντιοξειδωτική προστασία αλλά και για μείωση του πληθυσμού των γηγενών ζυμών και των βακτηρίων. Έπειτα εμβολιασμός με εμπορικά στελέχη του *S. cerevisiae* τα οποία έχουν απομονωθεί σε εργαστήρια και έχουν ελεγχθεί ως προς την ικανότητα παραγωγής επιθυμητών αποτελεσμάτων. Η μείωση του γηγενούς πληθυσμού είναι αναγκαία καθώς τα είδη αυτά είναι συνήθως άγνωστα και μπορούν να έχουν αλλοιωτική επίδραση στον παραγόμενο οίνο, αν δεν γίνει μείωση του πληθυσμού αμέσως μετά την έκθλιψη των σταφυλιών. Έπειτα, ο εμβολιασμός με γνωστά στελέχη δίνει τη δυνατότητα παραγωγής ενός οίνου με τυπικό αρωματικό προφίλ και ένα σταθερό αποτέλεσμα κάθε χρόνο, κάτι που επιδιώκουν τα οινοποιεία (Fleet GH., 2003).

Παρόλα τα οφέλη που προσδίδει η μείωση του γηγενούς πληθυσμού και ο εμβολιασμός με ένα μόνο στέλεχος του *S. cerevisiae*, έχει πάρα πολύ ενδιαφέρον η αλληλεπίδραση που μπορεί να υπάρξει στα αρχικά στάδια της ζύμωσης με ένα non-*Saccharomyces* είδος. Υπάρχουν γηγενείς ζύμες οι οποίες έχουν αρκετή ανταγωνιστικότητα και αντοχή στο θειώδες, ώστε να μπορούν να επιβιώσουν και να επικρατήσουν εν μέρει στα πρώτα στάδια της ζύμωσης, και έπειτα η αποζύμωση να γίνει από τον *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2006).

Ο συν-εμβολιασμός είναι μια πρακτική στην οποία γίνεται εμβολιασμός με δύο ή περισσότερα επιλεγμένα είδη ή στελέχη στο γλεύκος. Στο συν-εμβολιασμό το κάθε είδος προσφέρει επιθυμητά χαρακτηριστικά στον οίνο που θα παραχθεί (Ciani, M., et al., 2016). Ο συν-εμβολιασμός μπορεί να γίνει ή με τη χρήση μικτής καλλιέργειας ζυμών, όπου εμβολιάζονται ταυτόχρονα τα είδη στο γλεύκος, είτε με διαδοχικό εμβολιασμό (sequential inoculation) όπου 2 είδη εμβολιάζονται ξεχωριστά με διαφορά ενός χρονικού διαστήματος, το οποίο επιλέγει ο παραγωγός.

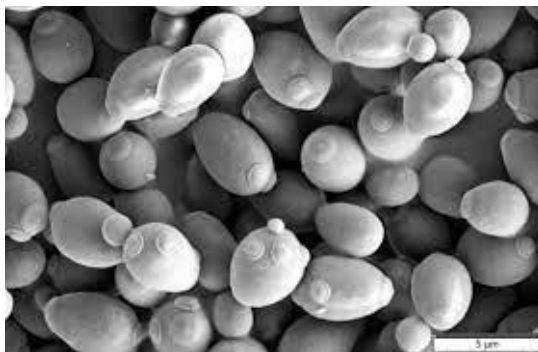
Συν-εμβολιασμός μπορεί να γίνει και με 2 ή περισσότερα διαφορετικά στελέχη *S. cerevisiae* όμως, καθώς τα non-Saccharomyces είδη έχουν πολλά ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, είναι πιο ενδιαφέροντα τα αποτελέσματα που δίνουν.

Βέβαια στον συν-εμβολιασμό με non-Saccharomyces είδη είναι συνηθέστερο να γίνεται η χρήση ενός non-Saccharomyces είδους και ενός στελέχους του *S. cerevisiae*. Με ένα τέτοιο εμβόλιο στα αρχικά στάδια της ζύμωσης επικρατεί η non-Saccharomyces ζύμη και την αποζύμωση του γλεύκους την κάνει το επιλεγμένο είδος *S. cerevisiae*. Έτσι ο οίνος που παράγεται έχει επιθυμητά χαρακτηριστικά και από τα δύο είδη, κάτι πολύ σημαντικό για την οινολογία, καθώς έτσι παράγονται οίνοι με περισσότερη πολυπλοκότητα (Ciani & Comitini, 2015).

Οποιαδήποτε και αν είναι η πρακτική, εμβολιασμός με *S. cerevisiae*, αυθόρμητη ζύμωση ή συν-εμβολιασμό με non-Sacharomyces είδη, πρέπει να είναι κατανοητή η επιρροή και οι ανάγκες του κάθε είδους, έτσι ώστε να παραχθεί ποιοτικό αποτέλεσμα. Επομένως η μελέτη του *S. cerevisiae* και των non-Sacharomycces ζυμών είναι υψίστης σημασίας (Ciani & Comitini, 2011).

1.3.1. *S. cerevisiae* ζύμες

Το κυρίαρχο είδος στην αλκοολική ζύμωση οίνου είναι ο *S. cerevisiae* λόγω της υψηλής ζυμωτικής του ικανότητας, δηλαδή της ταχύτερης κατανάλωσης των σακχάρων, άρα και πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επίσης ο *S. cerevisiae* λόγω υψηλής αντοχής στην αιθυλική αλκοόλη είναι ιδανικός για τη ζύμωση γλεύκους. Πρέπει να γίνει κατανοητό πως παρότι οι ζύμες παράγουν αιθυλική αλκοόλη, από μια συγκέντρωση και έπειτα είναι τοξική γι' αυτές (Boulton Richard et al., 2013). Ο *S. cerevisiae*, σε αντίθεση με άλλα είδη, μπορεί να επιβιώνει ακόμη και σε περιβάλλον με 15% κατ' όγκο αλκοόλ. Αυτή η αντοχή μαζί με τον έντονο ανταγωνισμό καθιστά τον *S. cerevisiae* οργανισμό ο οποίος θα ζυμώνει στα τελικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Όμως η αλληλεπίδραση με άλλα είδη στα αρχικά στάδια παίζει πολύ σημαντικό ρόλο (Jackson, 2014).



Εικόνα 2. *O S. cerevisiae*

Όμως, όπως με αρκετούς οργανισμούς έτσι και με τον *S. cerevisiae* παρουσιάζεται μια ποικιλομορφία σε επίπεδο υπο-είδους, τα στελέχη. Η ποικιλομορφία στα στελέχη του *S. cerevisiae* είναι τεράστια με μεγάλο αντίκτυπο στα παραπροϊόντα της ζύμωσης, την αντοχή στην αλκοόλη ακόμα και στο φαινόμενο Killer. Επομένως για τον *S. cerevisiae* γίνεται αξιολόγηση σε επίπεδο στελέχους όσον αφορά τη χρήση στην οινοπαραγωγή και αλληλεπίδραση με τις γηγενείς ζύμες ή τις non-Saccharomyces ζύμες σε περίπτωση συν-εμβολιασμού.

1.3.2. Οι non-Saccharomyces ζύμες

Όπως και με τα στελέχη του *S. cerevisiae*, υπάρχουν δεκάδες είδη και στελέχη non-Saccharomyces με ποικιλομορφία ανά περιοχή, ακόμα και στην ίδια αμπελοοινική ζώνη (Padilla et al., 2016). Επομένως η μελέτη των non-Saccharomyces αποτελεί ένα μεγάλο ερευνητικό κλάδο ο οποίος αφορά γενικότερα την ποτοβιομηχανία και όχι μόνο τον οίνο, καθώς πολλές non-Saccharomyces ζύμες χρησιμοποιούνται σε άλλα ποτά, όπως η μπύρα και τα αποστάγματα (Varela, C. 2016).

Ειδικότερα για το κρασί ζύμες από τα είδη *Torulaspota delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans* και *Metschnikowia pulcherrima* έχουν απομονωθεί και μελετηθεί από εταιρείες και είναι διαθέσιμα σε εμπορικά σκευάσματα για χρήση στην παραγωγή οινοποίησης. Η πληθώρα θετικών χαρακτηριστικών που μπορούν να προσφέρουν τα non-Saccharomyces είδη στον οίνο κυμαίνονται από εμφάνιση νέων αρωματικών χαρακτηριστικών έως ζυμώσεις σε αντίξοες συνθήκες, όπως ψυχο-οινοποιήσεις (Borren & Tian, 2021). Όμως πολλά από αυτά τα είδη, λόγω της τοξικότητας της αλκοόλης, δυσκολεύονται να επιβιώσουν σε υψηλό αλκοολικό βαθμό, κάτι προβληματικό ειδικά στην οινοπαραγωγή του 21ου αιώνα, όπου η κλιματική αλλαγή αυξάνει τον μέσο αλκοολικό τίτλο ακόμα και στις ψυχρές αμπελοοινικές ζώνες. Μια λύση στο πρόβλημα της αποζύμωσης είναι ο συν-εμβολιασμός. Το είδος *Torulaspota delbrueckii*, για παράδειγμα, σε συν-εμβολιασμό αυξάνει σε μεγάλο βαθμό τους αιθυλικούς εστέρες του

οίνου, δίνοντας μεγαλύτερη ένταση στο φρουτώδες αρωματικό προφίλ. Αυτή η επίδραση μπορεί να βοηθήσει ποικιλίες με χαμηλή αρωματική ένταση να αποκτήσουν ισορροπημένο αρωματικό προφίλ και βελτιωμένο οργανοληπτικό χαρακτήρα (Zhang et al., 2022).

Ένα από τα είδη τα οποία εξετάζεται εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια είναι ο *H. vineae*. Έχουν διεξαχθεί διάφορες πειραματικές οινοποιήσεις και εργαστηριακές μελέτες για να εξετασθεί πώς δρα σε περιβάλλον συν-εμβολιασμού με στελέχη του *S. cerevisiae* (Martin et al., 2022).

1.3.3 *Hansienaspora vineae*

Το γένος *Hansienaspora/Klockerea* ανήκει στα κύρια γένη που έχουν απομονωθεί από το σταφύλι στις περισσότερες αμπελοοινικές χώρες του κόσμου. Τα είδη του γένους *Hansienaspora* χρησιμοποιούνται ευρέως στην ποτοβιομηχανία, ιδιαίτερα στη βιομηχανία ζύθου. Συγκεκριμένα το είδος *Hansienaspora unarum* αποτελεί το συνηθέστερο γηγενές είδος ζύμης μετά τον *S. cerevisiae*. Ο *H. unarum* έχει απομονωθεί και έχει χρησιμοποιηθεί και στην παραγωγή οίνου, μέσω συν-εμβολιασμού. Όμως, λόγω μειωμένης αντοχής στο θειώδες και παραγωγής μη επιθυμητών αρωματικών ενώσεων, τα τελευταία χρόνια εξετάζονται και άλλα είδη του γένους (Mančić et al., 2022). Για την οινοποίηση μεγαλύτερο ενδιαφέρον υπάρχει για το είδος *Hansienaspora vineae* εξαιτίας των ιδιαίτερων αρωματικών ενώσεων που παράγει έχοντας θετική επίδραση στην πολυπλοκότητα του αρωματικού προφίλ του οίνου (Tello et al., 2012).

Η χρήση του *H. vineae* σε συν-εμβολιασμό έχει μεγάλο ενδιαφέρον που οφείλεται στις αρωματικές ενώσεις που παράγει. Ενώσεις όπως ο αιθανικός αιθυλεστέρας, ο οξικός ισοαμυλεστέρας και η 2-φαινυλαιθανόλη έχουν παρατηρηθεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις σε οίνους που έχουν παραχθεί από *H. vineae*. Οι τρεις αυτές ενώσεις συνδέονται με τα ανθικά και γλυκά αρώματα στον οίνο. Είναι κατανοητό πως η χρήση ενός είδους που παράγει μεγάλη συγκέντρωση ανθικών αρωμάτων έχει τεράστιο οινολογικό ενδιαφέρον (Ciani & Comitini, 2015).

Βέβαια κατά την αξιολόγηση ενός είδους, ως προς τη δυνατότητα χρήσης του στην παραγωγή οίνου, υπάρχουν δύο ομάδες παραγόντων οι οποίοι πρέπει να εξετασθούν. Πρώτον, πρέπει να μελετηθεί η αλληλεπίδρασή του με τον *S. cerevisiae* και γενικότερα το περιβάλλον ζύμωσης, δηλαδή τις θερμοκρασίες, το θειώδες και τα οινολογικά πρόσθετα που θα επηρεάσουν την εξέλιξη της ζύμωσης. Δεύτερον, πρέπει να μελετηθούν τα παράγωγα προϊόντα του είδους, αν βελτιώνει ποιοτικά το αποτέλεσμα ή αν παράγει κάποια μη-επιθυμητή χημική ένωση, όπως το υδρόθειο.

Από μελέτες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια οι οποίες εξετάζουν την ικανότητα χρήσης του *H. vineae* έχει βρεθεί πως μπορεί να αναπτυχθεί στις τυπικές

θερμοκρασίες λευκής οινοποίησης, αλλά και να επιβιώσει σε περιβάλλον υψηλής θείωσης. Η αντοχή στο θειώδες είναι πολύ σημαντική καθώς η έντονη χρήση θειώδους για την αποφυγή επιμολύνσεων και οξειδώσεων είναι πολύ συνηθισμένη στην παραγωγή του οίνου. Επιπλέον ο *H. vineae* διαθέτει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ως προς τη μειωμένη παραγωγή των δύο κυριότερων αλλοιωτικών χημικών ενώσεων, του οξικού οξέος και του υδρόθειου. Το υδρόθειο είναι μια από τις κυριότερες αλλοιωτικές ενώσεις στον οίνο και η αποφυγή παραγωγής της αποτελεί μεγάλο προσόν για το είδος. Ενώ η πτητική οξύτητα είναι ο πρώτος αλλοιωτικός παράγοντας που εξετάζεται για την ποιότητα ενός οίνου (Del Fresno et al., 2021).

Βέβαια υπάρχουν και κάποια μικρό-εμπόδια στη χρήση του είδους, όπως η κατανάλωση της θειαμίνης. Παρότι το είδος έχει τη δυνατότητα ανάπτυξης σε περιβάλλον χαμηλού αζώτου, δεν έχει τη δυνατότητα σύνθεσης θειαμίνης. Η θειαμίνη αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αμινοξέα για τις ζύμες στον οίνο απαραίτητο για την ανάπτυξή τους. Ο *H. vineae* καταναλώνει πλήρως τη θειαμίνη χωρίς να συνθέτει, επομένως σε οποιαδήποτε μορφή συν-εμβολιασμού πρέπει μαζί με τον εμβολιασμό του 2^{ου} είδους να ακολουθήσει και προσθήκη θειαμίνης στο γλεύκος (Del Fresno et al., 2021).

Τέλος, όσον αφορά τα παραπροϊόντα της ζύμωσης, ουσίες όπως το πυροσταφυλικό οξύ και η γλυκερόλη καθορίζουν την επίγευση και το σώμα του οίνου και είναι επιθυμητή η παραγωγή τους. Έχει βρεθεί πως ο *H. vineae* έχει αυξημένη παραγωγή αυτών των ουσιών καθώς και λόγω κάποιων εξελικτικών μηχανισμών έχουν πολύ γρήγορη αυτόλυση, κάτι που προσδίδει σώμα στον οίνο και τον εξελίσσει οργανοληπτικά (Martin et al., 2022).

Εφόσον ένα γηγενές είδος, όπως ο *H. vineae*, μπορεί να επιβιώσει στο περιβάλλον της ζύμωσης και παράγει ποιοτικά αποτέλεσμα αποφεύγοντας την παραγωγή αλλοιωτικών ενώσεων, τότε είναι κατάλληλο για συν-εμβολιασμό και χρήση στη μαζική παραγωγή οίνου. Όμως πέρα από την αλκοολική ζύμωση και όλα όσα επηρεάζουν οι ζύμες σε μικροβιολογικό επίπεδο, υπάρχουν και οι βιομηχανικοί παράγοντες στην παραγωγή του οίνου.

1.4. Επίδραση των ζυμών στις αρωματικές ενώσεις

Κυριότερος παράγοντας στο αρωματικό προφίλ του οίνου είναι η πρώτη ύλη, το σταφύλι. Όσο μεγάλη επίδραση και να έχει το είδος της ζύμης, τον καθοριστικότερο ρόλο στην ποιότητα του οίνου τον έχει η ποιότητα και η ποικιλία των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται. Η ποικιλία του σταφυλιού καθορίζεται από τον γενετικό κώδικα του φυτού και η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων είναι που επηρεάζει το χρώμα, τα αρώματα, την απόδοση σε λίτρα και διάφορα άλλα. Επομένως, όλοι οι παράγοντες αυτοί

πρέπει να συνυπολογιστούν όταν γίνεται η επιλογή του στελέχους και είδους ζύμης που θα χρησιμοποιηθεί.

Όσον αφορά την αλληλεπίδραση της ποικιλίας με τις ζύμες ο μεγαλύτερος παράγοντας είναι το πρωτογενές αρωματικό προφίλ της ποικιλίας, δηλαδή τα αρώματα που παράγονται και οφείλονται στο γενετικό προφίλ του φυτού. Πολλές λευκές ποικιλίες έχουν χαρακτηριστικά αρώματα λεμονιού ή πράσινων φρούτων, ενώ άλλες έχουν έντονα ανθικά αρώματα τριαντάφυλλου και γερανιού, άλλες έχουν φρουτώδη, ενώ υπάρχουν και κάποιες με χαμηλό και ήπιο αρωματικό προφίλ, χωρίς έντονα χαρακτηριστικά (Zhu et al., 2016). Το αρωματικό προφίλ της ζύμης πρέπει να αλληλοεπιδρά θετικά με τα πρωτογενή αρώματα, για να είναι το αποτέλεσμα ποιοτικό. Επίσης, θεωρείται ποιοτικό χαρακτηριστικό να είναι εμφανή τα πρωτογενή χαρακτηριστικά της ποικιλίας στο τελικό προϊόν και να μην επισκιάζονται από τα αρώματα της ζύμωσης. Άρα, η παραγωγή ενώσεων όπως η 2-φαινυλαιθανόλη σε οίνους από ποικιλίες με φρουτώδη προφίλ, όπως το Chardonnay, δεν θεωρείται επιθυμητό και ποιοτικό χαρακτηριστικό.

Όπως έχει αναφερθεί ο *H. vineae* έχει μεγάλη επίδραση στα αρώματα που παράγονται, κυρίως με ενώσεις όπως η γερανιόλη και η 2-φαινυλαιθανόλη οι οποίες ανήκουν στα φρέσκα ανθικά αρώματα. Επομένως για καλύτερη αξιοποίηση των δυνατοτήτων της ζύμης αλλά και για την παραγωγή ποιοτικού οίνου είναι ιδανικό το αρωματικό προφίλ που παράγει η ζύμη να συμπίπτει με αυτό της ποικιλίας (Rocha et al., 2010). Δηλαδή για ποιοτικότερα αποτελέσματα ο συν-εμβολιασμός με *H. vineae* να γίνει σε ποικιλίες με ανθικό αρωματικό προφίλ, όπως το Μοσχοφίλερο, Gewurtzstraminer και Riesling. Επίσης, όπως έχει παρατηρηθεί, ο *H. vineae* παράγει μεγάλες συγκεντρώσεις 2-φαινυλαιθανόλη δημιουργώντας έντονο ανθικό αρωματικό προφίλ. Οινολογικά αυτό έχει μεγάλο τεχνολογικό ενδιαφέρον, καθώς η χρήση του *H. vineae* σε ποικιλίες με ήπιο αρωματικό προφίλ μπορεί να συμβάλει στην παραγωγή πιο έντονου αρωματικού προφίλ απ' ό,τι παράγει τυπικά η ποικιλία, κάτι που μπορεί να συμβάλει πολύ στην προώθησή της στους καταναλωτές (Martin et al., 2022). Επομένως κυριότερο κριτήριο για τον εμπολιασμό ενός γλεύκους με *H. vineae* είναι οι αρωματικές ενώσεις που παράγει και πώς εξελίσσουν το αρωματικό προφίλ του οίνου.

Ο κύριος τρόπος που επηρεάζει ο *H. vineae* το αρωματικό προφίλ είναι με τη μεγάλη παραγωγή β-γλυκοζιδάσων. Οι β-γλυκοζιδάσες είναι ένζυμα με τεράστιες εφαρμογές στη βιομηχανία του οίνου, καθώς έχουν τη δυνατότητα να διασπάνε γλυκοζιτικούς δεσμούς ανάμεσα στα σάκχαρα του μούστου και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις. Με τη διάσπαση των γλυκοζιτικών δεσμών ενώσεις, όπως τα τερπένια, ελευθερώνονται στο γλεύκος αυξάνοντας κατά πολύ την αρωματική ένταση (Martin et al., 2022).

Πέρα από τα θετικά αρωματικά χαρακτηριστικά τα οποία προσδίδει η ζύμωση με συν-εμβολιασμό από τον *H. vineae* υπάρχουν και κάποια αρνητικά αρώματα τα οποία

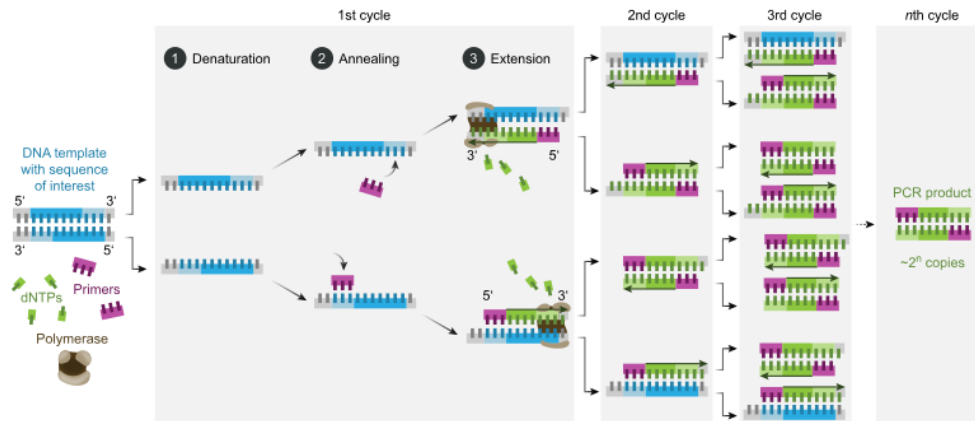
παράγουν ζύμες, όπως ο *S. cerevisiae* και άλλες γηγενείς αλλά όχι ο *H. vineae*. Συγκεκριμένα κατά τη ζύμωση ο μεταβολισμός των ζυμών οδηγεί στην παραγωγή υδρόθειου, μια ένωση με έντονο άρωμα κλούβιου αυγού και μια από τις κυριότερες αλλοιώσεις στον οίνο. Ο *S. cerevisiae*, όπως και πολλές γηγενείς ζύμες, ακολουθούν αυτή τη μεταβολική οδό και κατά τη ζύμωση πρέπει να γίνουν χημικές προσθήκες αμμωνιακών αλάτων και οξυγόνωση για να αποφευχθεί η παραγωγή υδρόθειου. Ο *H. vineae*, όμως, έχει παρατηρηθεί ότι έχει ελάχιστη παραγωγή υδρόθειου, κάτι πολύ ενδιαφέρον για την οργανοληπτική επίδραση που έχει στον οίνο (Martin et al., 2022).

1.5. Μέθοδοι ταυτοποίησης μικροοργανισμών στον οίνο

Η ταυτοποίηση και κατηγοριοποίηση των ζωντανών οργανισμών σε γένη, είδη και στελέχη γίνεται με βάση το φαινότυπο και τον γονότυπο τους. Ο γονότυπος, το DNA δηλαδή, είναι το πιο αξιόπιστο μέσω ταυτοποίησης ειδικά όσον αφορά μονοκύτταρους οργανισμούς όπως οι ζύμες και τα βακτήρια. Φαινοτυπικά μπορεί 2 οργανισμοί να έχουν υψηλό ποσοστό ομοιότητας άρα και ταυτοποίησης, όμως να διαφέρουν αρκετά στο γονότυπο ώστε να υπάρχει διαφοροποίηση είδους. Γι' αυτό και η ταυτοποίηση των ζυμών βασίζεται σε μοριακή ανάλυση του DNA καθώς πολλά είδη έχουν όμοιο σχήμα, μέγεθος και άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά και δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με ακρίβεια μέσω μελέτης του φαινότυπου (Ribereau-Gayon et al., 2001).

Η ταυτοποίηση των ζυμών όπως ο *S. cerevisiae* και ο *H. vineae* γίνεται με την αξιοποίηση της μεθόδου PCR (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μια διαδικασία κατά την οποία συγκεκριμένα μικρά τμήματα DNA ή RNA μπορούν να αντιγραφούν μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης και να αυξηθεί κατά πολύ η συγκέντρωσή τους σε ένα δείγμα. Οι χρήσεις της PCR είναι πάρα πολλές, καθώς ο ταχύς πολλαπλασιασμός του DNA έχει πολλές προοπτικές στην εγκληματολογία, τη γενετική και τη μοριακή βιολογία (Mullis, 1990).

Κατά την PCR τμήμα DNA αναμιγνύεται με εκκινητές, ένζυμα, Taq και dNTPs και υποβάλλεται σε συγκριμένο πρωτόκολλο αύξησης και μείωσης της θερμοκρασίας το οποίο επιτρέπει την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντιγραφής (Mullis, 1990).



Εικόνα 3. Τα στάδια μιας PCR και η αύξηση του γενετικού υλικού.

Οι εκκινητές είναι συγκεκριμένα μονοκλωνικά τμήματα DNA τα οποία μπορούν να προσκολληθούν στην αντίστοιχη αλληλουχία του δείγματος, με βάση την αντιστοιχία των βάσεων, και να ξεκινήσουν την αντιγραφή. Γίνεται θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 90 °C) προκαλώντας τη διπλή έλικα να ανοίξει, επιτρέποντας στους εκκινητές να προσκολληθούν στα αντίστοιχα τμήματα. Οι dNTP's επιτρέπουν την αντιγραφή και σύνθεση 2 νέων μορίων DNA, η αντιγραφή γίνεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία για να επιτραπεί η σύνθεση νέων αλυσίδων. Στο τέλος ενός κύκλου το DNA του δείγματος έχει διπλασιαστεί και οι εκκινητές έχουν αποκολληθεί από το δείγμα. Με αλληπάλληλες αυξήσεις και μειώσεις της θερμοκρασίας μπορεί να γίνει αυτή η διαδικασία αλυσιδωτά και να αυξηθεί μόνον ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA, λόγω των εκκινητών που επιλέχθηκαν (Andrighetto et al., 2000). Μέσω αυτής της διαδικασίας μπορούν να πολλαπλασιαστούν συγκεκριμένα τμήματα DNA και να επιτρέψουν τη μοριακή ανάλυση.

Υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα PCR τα οποία έχουν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους. Η RFLP-PCR (restriction fragment length polymorphism) ήταν από τις πρώτες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση σε επίπεδο ειδών σε γαλλικά κρασιά (*P. Ribéreau-Gayon, et al., 2001*) ενώ το πρωτόκολλο PCR-TGGE έχει χρησιμοποιηθεί για τη γρήγορη και ακριβή ταυτοποίηση στελεχών του *S. cerevisiae* από στερεά σκευάσματα (Manzano et al., 2006). Στη RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) μικρά τμήματα DNA, 10 νουκλεοτιδίων σε έκταση, χρησιμοποιούνται ως εκκινητές. Η μικρή τους έκταση διασφαλίζει ότι επαναλαμβάνονται πολλές φορές στο γενετικό κώδικα ενός είδους, οπότε αντιγράφονται πολλές φορές κατά την κυκλοποίηση. Λόγω αυτού αν δυο δείγματα υποβληθούν σε RAPD-PCR με τον ίδιο εκκινητή, στις ίδιες συνθήκες το προϊόν της PCR θα είναι ίδιο μόνον αν έχουν ίδιο γονότυπο και ανήκουν στο ίδιο είδος (*Li, S. et al, 2013*). Στην Itredelta-PCR γίνεται χρήση διάφορων εκκινητών οι οποίοι αντιγράφουν συγκεκριμένες μικρές αλληλουχίες DNA στο γονιδίωμα των ζυμών,

ιδιαίτερα του *S. cerevisiae* (P. Ribereau-Gayon et al., 2001). Αυτό επιτρέπει τη διαφοροποίηση σε επίπεδο στελεχών του *S. cerevisiae* με υψηλή ακρίβεια σε μικρό χρονικό διάστημα (Xufre et al., 2011). Βέβαια το πρωτόκολλο δεν έχει τόσο μεγάλη ακρίβεια για τις non-Sacharomyces ζύμες, όμως είναι ιδανικό για τη διαφοροποίηση μεταξύ στελεχών του *S. cerevisiae* εμβολιασμένα ή γηγενή. Με τη χρήση συνδυασμού πρωτοκόλλων, όπως των RAPD-PCR και Interdelta-PCR, μπορεί να γίνει ταυτοποίηση των ζυμών που απομονώθηκαν από γλεύκος σε επίπεδο είδους και στελεχών. Για να ολοκληρωθεί η ταυτοποίηση πρέπει να γίνει ανάλυση των PCR-product με κατάλληλες διαδικασίες.

Η ανάλυση των PCR-product γίνεται με την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μέσω gel αγαρόζης. Το gel αγαρόζης έχει πόρους οι οποίοι επιτρέπουν τη συγκράτηση και τον διαχωρισμό τμημάτων DNA, ανάλογα με την ποσότητά τους. Το gel χρησιμοποιείται ως μέσο διαχωρισμού, ενώ το DNA ηλεκτροφορείται και προκαλείται διαχωρισμός και φιλτράρισμά του μέσω των πόρων του gel. Το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός του PCR-product, με βάση το DNA, και η δημιουργία χαρακτηριστικών αποτυπώματων πάνω στο gel. Αυτά τα αποτυπώματα ή μπάντες μπορούν να γίνουν εμφανή με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα δείγματα που έχουν παρόμοιο αποτύπωμα έχουν και όμοιο DNA, επομένως ανήκουν στο ίδιο είδος (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Έτσι γίνεται η ταυτοποίηση των ζυμών και με αυτή τη μέθοδο μπορεί να γίνει ανάλυση δειγμάτων οίνου για να ταυτοποιηθεί το είδος της ζύμης το οποίο έκανε τη ζύμωση στο στάδιο της απομόνωσης (Manzano et al., 2006).

2. Σκοπός

Στην εν λόγω πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση και αξιολόγηση της χρήσης της ζύμης *H. vineae* ως εναρκτήρια καλλιέργεια σε διαδοχικό εμβολιασμό με στέλεχος *S. cerevisiae*. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ζυμωτική ικανότητα σε ημιβιομηχανική κλίμακα, η επικράτηση έναντι γηγενών ζυμών, η αλληλεπίδραση με τον *S. cerevisiae*, καθώς και το ποιοτικό αποτέλεσμα διαφορετικών εμβολιασμών σε γλεύκη από δύο λευκές ελληνικές ποικιλίες με έντονο τυπικό ποικιλιακό άρωμα, το Μοσχοφίλερο και το Ασύρτικο.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Οινοποίηση- Προέλευση δειγμάτων

Για τη μελέτη της επίδρασης του μικροοργανισμού *H. vineae* στη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης επιλέχθηκαν γλεύκη από δύο πολύ διαδεδομένες ελληνικές ποικιλίες (Μοσχοφίλερο και Ασύρτικο). Οι συγκεκριμένες ποικιλίες επιλέχθηκαν λόγω του έντονου ανθικού και λεμονάτου πρωτογενούς χαρακτήρα, αντίστοιχα. Το γλεύκος επεξεργάστηκε ομοίως και στις δύο περιπτώσεις προζυμωτικά με προσθήκη 0,50 g/L θειαμίνης και έπειτα διαχωρίστηκε και τοποθετήθηκε σε ανοξείδωτες δεξαμενές με ελεγχόμενη ψύξη. Η οινοποίηση πραγματοποιήθηκε σε βιομηχανική κλίμακα στις εγκαταστάσεις του οινοποιείου Τρουπή στην Μαντινεία (Οκτώβριος 2022). Δύο συνθήκες εμβολιασμού εφαρμόστηκαν για κάθε ποικιλία. Στη μία δεξαμενή πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με το εμπορικό στέλεχος *S. cerevisiae* A (Oenobrand, France) από την αρχή της οινοποίησης ενώ στη δεύτερη έγινε διαδοχικός εμβολιασμός *H. vineae* (Oenobrand, France) και *S. cerevisiae* A. Στις δεξαμενές με διαδοχικό εμβολιασμό αμέσως μετά την πίεση έγινε εμβολιασμός με τον *H. vineae* και την 5^η μέρα έγινε εμβολιασμός με τον *S. cerevisiae* A. Ενώ στις δεξαμενές με μόνον τον *S. cerevisiae* A έγινε εμβολιασμός αμέσως μετά την πίεση. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης λήφθηκαν δείγματα για ανάλυση από τις δεξαμενές σε τέσσερα διαφορετικά σημεία της ζύμωσης, την ημέρα που έγινε η πίεση, στις 48 ώρες ζύμωσης, στα 2/3 της ζύμωσης και στο τέλος της ζύμωσης.

Κωδικός	Περιγραφή
MS	Μοσχοφίλερο εμβολιασμένο με <i>S. cerevisiae</i> A(Fermivin)

MB	Μοσχοφίλερο εμβολιασμένο με <i>H. vineae</i> (Fermivin VINEAE) και μετά από 30 μονάδες πυκνότητας με <i>S. cerevisiae</i> A (Fermivin)
AS	Ασύρτικο εμβολιασμένο με <i>S. cerevisiae</i> A (Fermivin)
AB	Ασύρτικο εμβολιασμένο με <i>H. vineae</i> (Fermivin VINEAE) και μετά από 30 μονάδες πυκνότητας με <i>S. cerevisiae</i> A (Fermivin)

Πίνακας 1. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων των 4 οινοποιήσεων που διεξήχθησαν στο πείραμα

3.2. Απομονώσεις

Για τη μελέτη της επικράτησης των επιλεγμένων στελεχών πραγματοποιήθηκαν μοριακές αναλύσεις. Αρχικά διεξήχθη η απομόνωση των μικροοργανισμών από τα δείγματα στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης όπως έχει ήδη αναφερθεί.

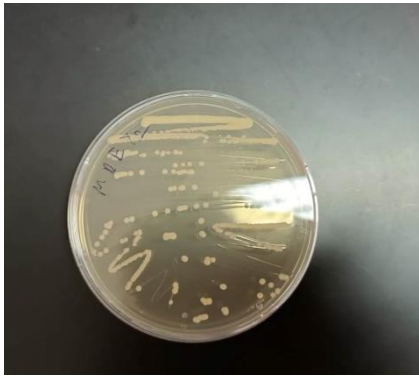
Αρχικά πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς



Εικόνα 4. Διαδοχικές αραιώσεις

σωλήνες με υδατικό διάλυμα Ringer (Sigma-Aldrich, USA). Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα όπου ο πληθυσμός των κυττάρων είναι πολύ μεγάλος και δίχως αραιώση, η απομόνωση θα είναι αδύνατη. Αντιθέτως αν γίνει πολύ μεγάλη αραιώση, οι μικροοργανισμοί που θα απομονωθούν δεν θα είναι αντιπροσωπευτικοί του δείγματος. Απ' όλες τις διαδοχικές αραιώσεις λήφθηκε ποσότητα 100-200μL και επιστρώθηκε εις διπλού σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα YPD (Yeast extract 10 g/L, Bacteriological Peptone 20 g/L, Dextrose 20 g/L, Bacteriological agar 20 g/L, Condalab, Spain), έγινε επώαση για 48 ώρες στους 28 °C. Μετά την επώαση έγινε καταμέτρηση των κυττάρων και εξέταση καθαρότητας. Για κάθε συνθήκη επιλέχθηκαν τρυβλία που περιείχαν τουλάχιστον 30-300 καθαρές μεμονωμένες αποικίες από τους προς εξέταση οργανισμούς.

Υπό ασηπτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε απομόνωση έως 20 μεμονωμένων αποικιών, για κάθε δείγμα οίνου. Η επιλογή των αποικιών στα δείγματα όπου ο αριθμός των αποικιών ξεπερνούσε το 20 στη μηδενική αραιώση πραγματοποιήθηκε από τα τρυβλία της μεγαλύτερης αραιώσης στα οποία το πλήθος των αποικιών κυμαίνονταν



Εικόνα 5. Τρυβλίο γραμμικής εξάπλωσης

μεταξύ 30-300. Η γραμμική εξάπλωση (streaking) είναι η διαδικασία κατά την οποία λαμβάνεται ασηπτικά μία αποικία από το επωασμένο, επιστρωμένο τρυβλίο και αραιώνεται γραμμωτά, σε νέο τρυβλίο YPD (Condalab, Spain), με σκοπό τη δημιουργία καθαρών αποικιών ενός μόνον μικροοργανισμού. Ακολούθησε επώαση για 48 ώρες στους 28 °C. Η διαδικασία του streaking πραγματοποιήθηκε εις διπλούν σε όλες τις απομονώσεις. Μετά το δεύτερο streaking οι καθαρές, μεμονωμένες αποικίες αποθηκεύτηκαν στους -20 °C σε θρεπτικό υλικό YPD Broth (Yeast extract 10g/L, Bacteriological Peptone 20g/L, Dextroze 20g/L, Condalab, Spain) εμπλουτισμένο με 30% γλυκερόλη

Η αποθήκευση γίνεται σε erpendorf των 2 mL χαμηλές θερμοκρασίες. Το YPD Broth (Condalab, Spain) επιτρέπει την επιβίωση στα κύτταρα, ενώ η γλυκερόλη τα προστατεύει από τις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες.

3.3. Εμπλουτισμός

Για την επίτευξη του εμπλουτισμού και συγχρονισμού των καλλιεργειών από τα τρυβλία του streaking λαμβάνεται ασηπτικά μια αποικία και τοποθετείται σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 7mL υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPD Broth (Condalab, Spain) και αφήνεται να επώασει για 48 ώρες στους 28 °C. Ο εμπλουτισμός της βιομάζας επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά. Από τα επωασμένα σωληνάκια, έπειτα από



Εικόνα 6. Εμπλουτισμός σε YPD Broth

ανάδευση, λαμβάνεται 100 μL και εμβαπτίζεται σε νέα σωληνάκια YPD Broth (Condalab, Spain). Γίνεται επώαση για 48 ώρες.

Μετά την επώαση 1,5mL επωασμένης καλλιέργειας τοποθετείται σε φιαλίδια erppendorf και φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά (5000g στους 4 °C) (Hereus Biofuge Stratos, Thermo Scientific, USA). Ακολούθως, το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται, γίνεται επαναραίωση του ιζήματος σε 1 mL Ringer για την έκπλυση των κυττάρων και τέλος φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες. Η έκπλυση με Ringer εκτελείται δύο φορές για πλήρη καθαρισμό των κυττάρων, έπειτα διατηρείται η βιομάζα που αποτελεί το ιζήμα pellet και αποθηκεύεται στους -20 °C.

3.4. Εκχύλιση γενετικού υλικού (DNA)

Η απομόνωση του DNA των ζυμών βασίζεται στην ιδιότητα του ενζύμου της λυσοζύμης και του ενζύμου της λυτικάσης αντίστοιχα. Και τα δύο έχουν σαν κύριο ρόλο τη λύση των κυττάρων, το οποίο είναι βασικό εργαλείο για την απομόνωση του DNA.

Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης έχουν ως εξής (Bonatsou et al., 2018):

- 1) Επαναδιάλυση της βιομάζας (από τους -20 °C) σε ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελούνταν από 1M σορβιτόλη και 0,1 M EDTA (pH=7,5). Για τις ζύμες χρησιμοποιήθηκε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος και προστέθηκαν 8 μL λυτικάσης .
- 2) Επώαση για 2h σε θερμοκρασία 37 °C (με ανάδευση κάθε 30 min σε συσκευή vortex). Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση για 30 sec.
- 3) Φυγοκέντρηση για 10 min σε 17.000 g, σε θερμοκρασία 4 °C.
- 4) Επαναδιάλυση σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος που αποτελείται από 50 mM Tris και 20 mM EDTA (pH=7,4)
- 5) Προσθήκη 50 μL 10% SDS και επώαση σε θερμοκρασία 65 °C για 30 min. Το διάλυμα δωδεκασουλφονικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS) παίζει σημαντικό ρόλο στην απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας DNA. Το SDS βοηθά στη διάσπαση των μεμβρανών και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το DNA.
- 6) Προσθήκη 0,2 mL οξικού καλίου και παραμονή στον πάγο για 30 min. Το οξικό κάλιο (Potassium Acetate) καθιζάνει το SDS αλλά και τις δεσμευμένες πρωτεΐνες για να επιτρέψει την απομάκρυνση τους από το DNA.
- 7) Φυγοκέντρηση για 10 min σε 17.000 g, σε θερμοκρασία 4 °C.
- 8) Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό φιαλίδιο erppendorf και επανάληψη της φυγοκέντρησης.
- 9) Προσθήκη 700 μL ισοπροπανόλης, η οποία βρισκόταν στους -20 °C, μικρή ανάδευση με το χέρι και παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 min
- 10) Φυγοκέντρηση για 10 min σε 17.000 g σε θερμοκρασία 4 °C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.

- 11) Προσθήκη 500 μL αιθανόλης η οποία βρισκόταν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και φυγοκέντρωση.
Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- 12) Επανάληψη του βήματος 11.
- 13) Προσθήκη 0,5 mL αιθανόλης 70% ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) και επανάληψη τη φυγοκέντρωσης. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται δύο φορές.
- 14) Αναμονή έως ότου εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη, προσέχοντας να μη στεγνώσει το ίζημα.
- 15) Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μL RNAase free H_2O

Το προϊόν της εκχύλισης μπορεί να περιέχει ποσοστό πρωτεϊνών οι οποίες θα παρεμποδίσουν τη σωστή διεξαγωγή της PCR, επιπλέον για να λειτουργήσει σωστά η PCR πρέπει να υπάρχουν συγκεκριμένες συγκεντρώσεις DNA. Επομένως, πρέπει να γίνει ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του DNA. Τόσο η συγκέντρωση όσο και η καθαρότητα του DNA υπολογίστηκε με τη χρήση νανοφωτόμετρου/plate reader (BioTek, USA).



*Εικόνα 7. Το plate reader -
νανοφωτόμετρο*

Αρχικά, μετρήθηκε η συγκέντρωση του DNA, η οποία εκφράστηκε σε $\text{ng}/\mu\text{L}$, δηλαδή η ποσότητα του νουκλεϊκού οξέος (ng) ανά όγκο διαλύματος μL , και στη συνέχεια η απορρόφηση στα μήκη κύματος 260 nm, όπου εκεί παρουσιάζεται η μέγιστη απορρόφηση για τα νουκλεϊκά οξέα και 280 nm όπου παρουσιάζουν τη μέγιστη απορρόφησή τους οι πρωτεΐνες. Για να πληροί τις συνθήκες καθαρότητας το DNA έπρεπε ο λόγος 260/280 να είναι περίπου 1,8 (αποδεκτά όρια είναι 1,8-2). Ποσοτικά για τη σωστή διεξαγωγή της PCR πρέπει η συγκέντρωση του DNA να μην υπερβαίνει τα 20-40ng/L. Προς αυτή την κατεύθυνση, τα 240 δειγμάτων εξετάσθηκαν ως προς την καθαρότητα και την ποσότητα του DNA. Τα πιο πυκνά δείγματα αραιώθηκαν αναλόγως με RNAase free H_2O . Το πλέον καθαρό DNA μπορεί να αναλυθεί μοριακά και να ταυτοποιηθεί το είδος και το στέλεχος του οργανισμού από τον οποίο εκχυλίστηκε.

Τα στάδια της απομόνωσης, του εμπλουτισμού και της εκχύλισης DNA έγιναν και για τα 2 στελέχη *H. vineae* (Oenobrand, France) και *S. cerevisiae* A (Oenobrand, France), τα οποία αποτέλεσαν το εμβόλιο των ζυμώσεων, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα στις PCR.

3.5. PCR

3.5.1. RAPD-PCR

Για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους χρησιμοποιήθηκε η RAPD-PCR με τον ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή M13 (Eurofins Genomics, Germany), με αλληλουχία 5'-GAGGGTGGCGGTCT-3'. Για τη διεξαγωγή της PCR παρασκευάστηκε ένα διάλυμα mastermix που περιείχε τα απαραίτητα συστατικά (Buffer, primer, dNTP's, Taq κοκ) για τη διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), όπως αναλυτικά αναγράφεται παρακάτω. Ανάλογα με τη συγκέντρωση του DNA γίνονται τροποποιήσεις στο mastermix αυξάνοντας ή μειώνοντας την ποσότητα του νερού, ώστε η τελική ποσότητα του DNA που θα αντιδράσει να είναι 30-50 ng. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ειδικά PCR tubes.

Μετά την προσθήκη του DNA στο mastermix, πραγματοποιήθηκε η θερμική κυκλοποίηση (BIO-RAD, USA) με τις εξής συνθήκες:

- ◆ 1 κύκλος:
 - 94 °C για 0:30 min
- ◆ 2 κύκλοι:
 - 94 °C για 0:30 min
 - 35 °C για 5:00 min
 - 68 °C για 5:00 min
- ◆ 32 κύκλοι:
 - 95 °C για 0:30 min
 - 53 °C για 2:00 min
 - Σταδιακή αύξηση θερμοκρασίας κατά 0,6 °C/sec
- ◆ 1 κύκλος: 68 °C για 10:00 min

3.5.2. Interdelta-PCR

Για το διαχωρισμό των απομονώσεων *S. cerevisiae* σε επίπεδο στελέχους εφαρμόστηκε Interdelta PCR με τους εκκινητές d21 (Eurofins Genomics, Germany) με αλληλουχία βάσεων 5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3' και d12 (Eurofins Genomics,

Germany) με αλληλουχία βάσεων 5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'. Η σύσταση του mastermix αναγράφεται αναλυτικά παρακάτω. Όπως και στην RAPD-PCR τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο, καθώς είναι θερμοευαίσθητα, ενώ η Taq (Karabiosystems, USA) πρέπει να διατηρηθεί και μακριά από φως.

Οι συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης της Interdelta PCR ήταν οι εξής:

- ◆ 1 κύκλος:
 - 95 °C για 4:00 min
- ◆ 40 κύκλοι:
 - 95 °C για 0:30 min
 - 46 °C για 0:30 min
 - 72 °C για 1:30 min
- ◆ 1 κύκλος: 72 °C για 10:00 min
- ◆ 1 κύκλος 4 °C έως απομάκρυνση των pcr tubes

3.6. Ηλεκτροφόρηση

Μετά το πέρας της Interdelta-PCR προστίθεται στα PCR tubes 3μL από τη χρωστική κυανούν της βρωμοθυμόλης με γλυκερόλη (μπλε χρώμα) κάνοντας έτσι πιο εύκολη την τοποθέτησή τους στα πηγαδάκια αλλά και την καλύτερη παρακολούθησή τους κατά την ηλεκτροφόρηση. Αυτό το βήμα παραλήφθηκε στα προϊόντα της RAPD-PCR, καθώς το buffer περιείχε εξ' αρχής τη χρωστική και τη γλυκερόλη.

Για την παρασκευή της πηκτής αгарόζης διαλύονται 2,25g αгарόζης (Canva, Spain) σε 150mL TAE 1X, γίνεται θέρμανση μέχρι το διάλυμα να είναι διαυγές και



Εικόνα 8. Συσκευή απεικόνισης gel

προστίθενται 20μL βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma-Aldrich, USA). Η πλάκα τοποθετείται στη

συσσκευή ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται με διάλυμα TAE 1X και 40 μL βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma-Aldrich, USA). Στην πρώτη και την τελευταία θέση της πλάκας τοποθετείται μάρτυρας (ladder 1 Kb)(Nippon Genetics Europe GmbH, Germany), ο οποίος βοηθάει στην καλύτερη σύγκριση των αποτελεσμάτων της PCR. Επίσης, σε κάθε πηκτή παράλληλα με τις υπό ανάλυση απομονώσεις τοποθετούνται οι μάρτυρες (*S. cerevisiae* Vin13, *H. vineae*). Στη συνέχεια, γίνεται η φόρτωση των δειγμάτων στις θέσεις που δημιούργησαν οι χτένες. Τοποθετείται ποσότητα 9μL του PCR product για κάθε δείγμα, καθώς και τα πρότυπα είδη τα οποία απομονώθηκαν από τις αρχικές καλλιέργειες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το gel απομακρύνεται από την πλάκα ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται σε ειδικό θάλαμο για να εκτεθεί σε UV ακτινοβολία (DNR, Israel).

Η απεικόνιση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης αποτυπώνεται με το λογισμικό και τα γενετικά αποτυπώματα των υπό μελέτη απομονώσεων συγκρίνονται με αυτά των προτύπων.

3.7. Οινολογικές αναλύσεις

Οι οινολογικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης ήταν: I) η καταμέτρηση του pH, II) η καταμέτρηση της ογκομετρούμενης οξύτητας, III) ο προσδιορισμός της αλκοόλης και IV) ο προσδιορισμός του ολικού και του ελεύθερου θειώδους.

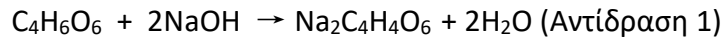
3.7.1. pH

Στους τελικούς οίνους μετρήθηκε το pH με ηλεκτρονικό πεχάμετρο (Hanna Instruments, USA). Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται 50mL δείγματος, το ηλεκτρόδιο και το θερμόμετρο του πεχάμετρου ξεπλένονται με απιονισμένο νερό και βυθίζονται μέσα στο δείγμα, μόλις σταθεροποιηθεί η μέτρηση γίνεται καταγραφή της τιμής. Γίνεται επανάληψη της μέτρησης δύο φορές για κάθε δείγμα.

3.7.2. Ογκομετρούμενη οξύτητα

Σε κάθε οίνο υπάρχουν διάφορα οξέα τα οποία προέρχονται από το σταφύλι ή από προσθήκες, τα οποία καθορίζουν την οξύτητα του οίνου. Τα κύρια οξέα είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό, που υπάρχουν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο σταφύλι. Η συγκέντρωσή τους επηρεάζει το άρωμα, τη γεύση και τη χημική ισορροπία του οίνου. Ο προσδιορισμός της τιτλοδοτούμενης οξύτητας γίνεται με τιτλοδότηση με καυστικό νάτριο NaOH 0,1 M. Με βάση την εξουδετέρωση που ακολουθεί (Αντίδραση 1) γίνεται και η μέτρηση της οξύτητας. Στο σημείο της πλήρους εξουδετέρωσης γίνεται απότομη

αλλαγή του pH και χρησιμοποιείται ο δείκτης φαινολοφθαλεΐνη (1% w/v) που αλλάζει χρώμα στο ισοδύναμο σημείο (Amerine & Ough, 1988).



Σε κωνική φιάλη τοποθετούνται 10mL δείγμα και 2-3 σταγόνες φαινολοφθαλεΐνη (1% w/v) καθώς έχει διάφανο χρώμα σε χαμηλά pH, ενώ σε pH μεγαλύτερα του 8,2 παρατηρείται αλλαγή σε απαλό ροζ χρώμα. Με τη χρήση προχοΐδας γίνεται ελεγχόμενη προσθήκη, σε πολύ μικρές ποσότητες, NaOH 0,1M (Penta, Czech Republic) στην κωνική φιάλη και μόλις παρατηρηθεί αλλαγή χρώματος, σταματάει η προσθήκη και σημειώνεται η κατανάλωση σε mL. Η ογκομέτρηση επαναλαμβάνεται 2^η φορά για ακρίβεια. Με βάση τις καταναλώσεις σε NaOH, γίνεται ποσοτικά ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της οξύτητας.

$X \text{ g/L τρυγικό} = A * 0,75$, όπου A η κατανάλωση NaOH. (I)

Ο συντελεστής 0,75 προκύπτει από την στοιχειομετρία της αντίδρασης 1.

$C_{\text{NaOH}} * A = 2 \text{ m/M}_{\text{τρυγ. οξέος}}$, έπειτα από τις μετατροπές λόγω του όγκου 10 mL του δείγματος και $M_r=150$, η εξίσωση παίρνει την μορφή (I).

Η ογκομετρούμενη οξύτητα εκφράζεται σε g/L τρυγικού οξέος, καθώς το τρυγικό υπάρχει σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στον οίνο και είναι και το ισχυρότερο από τα βασικά οξέα.

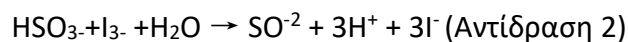
3.7.3. Αλκοόλη

Η μέτρηση της αλκοόλης βασίζεται στη μέθοδο της απόσταξης, η οποία είναι και η επίσημη μέθοδος του OIV. Κατά τη μέτρηση με απόσταξη 200 mL δείγματος τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη μαζί με κόκκους ελαφρόπετρας για να αποφευχθεί ο αφρισμός κατά την απόσταξη. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε αποστακτική στήλη και ξεκινάει η απόσταξη, έως ότου να αποσταχθούν τα 2/3 του αρχικού όγκου του δείγματος. Το απόσταγμα λαμβάνεται στην ίδια ογκομετρική φιάλη που πάρθηκε το δείγμα, η οποία έχει και λίγες σταγόνες νερού που θα βοηθήσουν στην αποφυγή της εξάτμισης του αποστάγματος. Το απόσταγμα ψύχεται, καθώς οι ογκομετρικές φιάλες είναι βαθμονομημένες στους 25 °C, και με την ψύξη αποφεύγεται το σφάλμα λόγω διαφοράς όγκου. Έπειτα γίνεται απογέμιση της φιάλης με απιονισμένο νερό (Amerine & Ough, 1988).

Το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετείται σε ογκομετρικό κύλινδρο και γίνεται μέτρηση της θερμοκρασίας και της αλκοόλης με κατάλληλο αλκοολόμετρο. Με βάση τους επίσημους πίνακες συσχέτισης θερμοκρασίας-αλκοόλης γίνεται διόρθωση του αλκοολικού τίτλου και βρίσκεται ο αλκοολικός τίτλος του δείγματος.

3.7.4. Θειώδες ελεύθερο και ολικό

Η μέτρηση του ολικού θειώδους γίνεται με βάση την αντίδραση του θειώδους ανυδρίτη με το Ιώδιο:



- 20 mL δείγματος λαμβάνονται με σιφόνι πληρώσεως και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη
- Γίνεται προσθήκη 9mL NaOH 1N (Penta, Czech Republic) για να αποδεσμευτεί το δεσμευμένο θειώδες. Αφήνεται για 10min σε περιβάλλον με απουσία φωτός για να πραγματοποιηθεί η αποδέσμευση
- Γίνεται προσθήκη 6 mL H₂SO₄ (Chem-Lab NV, Belgium) για τη δημιουργία όξινου περιβάλλοντος το οποίο εμποδίζει το SO₂ από το να δεσμευτεί
- Γίνεται προσθήκη δείκτη αμύλου (Sigma-Aldrich, USA), το δείγμα πρέπει να έχει διάφανο χρώμα
- Με χρήση προχοΐδας προστίθεται σταγόνα-σταγόνα I₂ (Sigma-Aldrich, USA) μέχρι να γίνει αλλαγή του χρώματος σε έντονο μπλε και να παραμείνει το χρώμα για 20-30 sec
- Γίνεται μέτρηση της κατανάλωσης και υπολογισμός της συγκέντρωσης σε ολικό θειώδες.

$X \text{ mg/L ολικού θειώδους} = B * 0,01 * 32,033$ όπου B η κατανάλωση του I₂

Το ελεύθερο θειώδες μετρήθηκε, επίσης, με βάση την αντίδραση του θειώδους με I₂:

- Με τη χρήση σιφωνίου πληρώσεως γίνεται λήψη 50mL δείγματος και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
- Προστίθενται 3mL δείκτη αμύλου (Sigma-Aldrich, USA) και 3mL H₂SO₄ (Chem-Lab NV, Belgium)
- Με τη χρήση προχοΐδας γίνεται προσθήκη I₂ (Sigma-Aldrich, USA) και μετρείται η κατανάλωση.

Και οι δύο μετρήσεις επαναλήφθηκαν δεύτερη φορά για μεγαλύτερη ακρίβεια.

Ο υπολογισμός γίνεται με βάση τους ακόλουθους τύπους:

$X \text{ mg/L ελευθέρου θειώδους} = A * 0,01 * 32,033$ όπου A η κατανάλωση του I₂

3.8. Οργανοληπτικός έλεγχος

Πέρα από τις οινολογικές αναλύσεις, εξετάστηκε και η επίδραση των διαφορετικών εναρκτήριων καλλιεργειών στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. Σκοπός ήταν η

ανάλυση σε αρωματικό επίπεδο της επίδρασης που είχε η ζύμωση από τον *H. vineae*. Γι' αυτό έγινε οργανοληπτική αξιολόγηση των τεσσάρων οίνων από εξειδικευμένο πάνελ 8 δοκιμαστών. Η γευσιγνωσία έγινε σε ειδικό χώρο απαλλαγμένο από εξωτερικές οσμές. Οι δοκιμαστές δεν είχαν πληροφορίες για το δείγμα το οποίο δοκίμαζαν. Τα δείγματα σερβιρίστηκαν σε ποτήρια γευσιγνωσίας τύπου ISO κατάλληλα για οίνο και θερμοκρασία 10-13°C. Για καλύτερη στατιστική ανάλυση των δειγμάτων διεξήχθη και βιολογική επαναληπτική δοκιμή από δεύτερο μπουκάλι για κάθε συνθήκη.

Επιλέχθηκαν παράμετροι, οι οποίες σχετίζονται με την επιρροή του *H. vineae*, όπως τα ανθικά αρώματα, τα εσπεριδοειδή, τα τροπικά και τα καραμελωμένα αρώματα, καθώς και σημαντικοί γευστικοί παράγοντες όπως η οξύτητα και η διάρκεια γεύσης. Δημιουργήθηκαν φύλλα αξιολόγησης (Παράρτημα I) όπου με χρήση ελεύθερης κλίμακας (ελάχιστο το 0 και μέγιστο το 10) οι δοκιμαστές αξιολόγησαν τα δείγματα ανά χαρακτηριστικό. Επίσης, για να αξιολογηθεί η διαφοροποίηση, διεξήχθη τριγωνικό τεστ (Παράρτημα II). Στο τριγωνικό τεστ στον δοκιμαστή σερβίρονται τρία ποτήρια εκ των οποίων το ένα είναι διαφορετικό. Στους δοκιμαστές δόθηκε ερωτηματολόγιο όπου σημειώθηκε αν έγινε απομόνωση του διαφορετικού δείγματος και αξιολόγηση της διαφοράς με ελεύθερη κλίμακα. Όλες οι δοκιμές οργανοληπτικού ελέγχου πραγματοποιήθηκαν με 2 βιολογικές επαναλήψεις και από τους 8 δοκιμαστές.

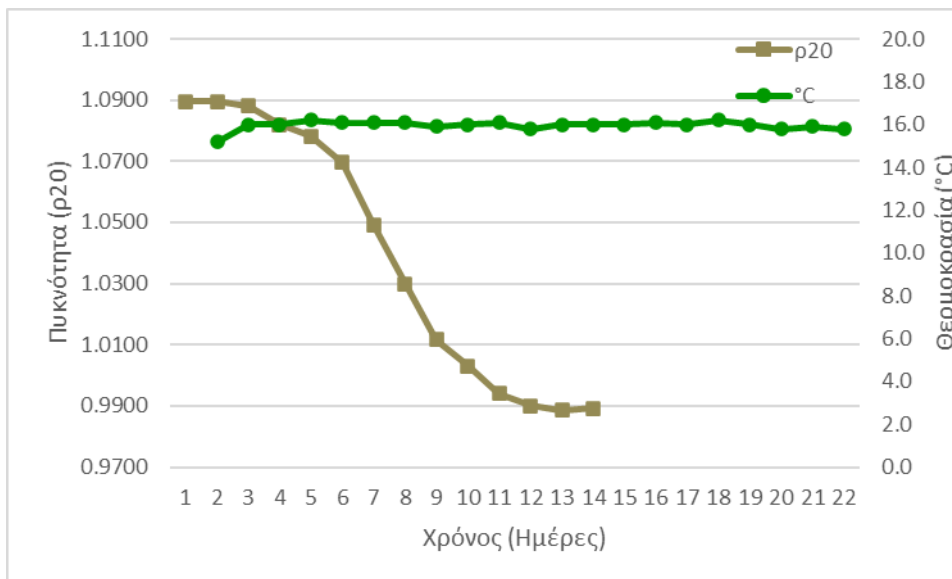
3.9. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων του οργανοληπτικού ελέγχου η αξιολόγηση έγινε με μέτρηση με χάρακα της ελεύθερης κλίμακας και στατιστική ανάλυση για κάθε παράμετρο (One way ANNOVA, Statgraphics). Ενώ για την εύρεση των στατιστικά σημαντικών διαφορών στα αποτελέσματα των οινολογικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε το Tuckey's test (*Statgraphics software*).

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

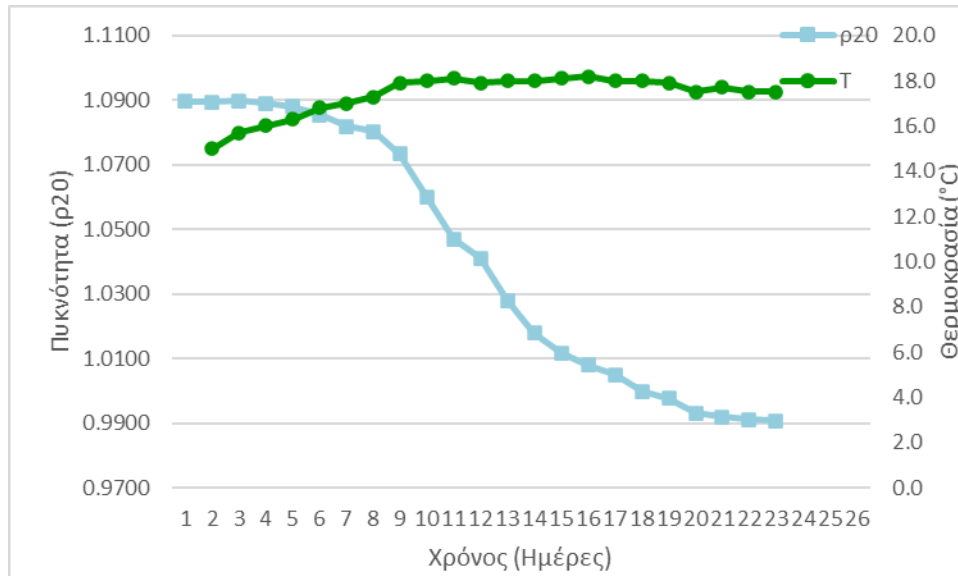
4.1. Βιωσιμότητα - Επικράτηση επιλεγμένων ζυμών

Για το πείραμα έγιναν, όπως έχει προαναφερθεί, 4 οινοποιήσεις. Λαμβάνονταν σε καθημερινή βάση μετρήσεις της πυκνότητας για να παρακολουθείται η εξέλιξη της ζύμωσης. Μέσω της πτώσης της πυκνότητας δημιουργήθηκαν και οι παρακάτω καμπύλες ζύμωσης. Μαζί με την πυκνότητα καταγραφόταν και η θερμοκρασία του γλεύκους.



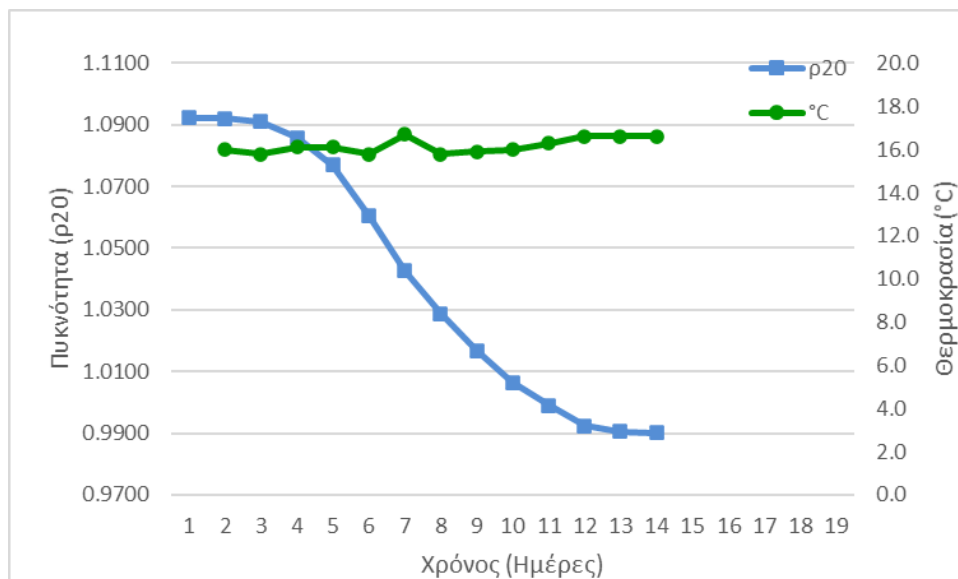
Γράφημα 1. Η καμπύλη ζύμωσης του δείγματος AS (■) (Ασύρτικο *S. cerevisiae* A) και η καμπύλη θερμοκρασίας του γλεύκους (●).

Στο γράφημα 1 φαίνεται η κινητική του δείγματος AS (Ασύρτικο *S. cerevisiae* A). Η ζύμωση διήρκησε 13 ημέρες, φυσιολογικό χρονικό διάστημα για εμβολιασμό γλεύκους με ένα στέλεχος. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης διατηρήθηκε, με τη χρήση ψυκτικού εξοπλισμού, στους 16 °C.



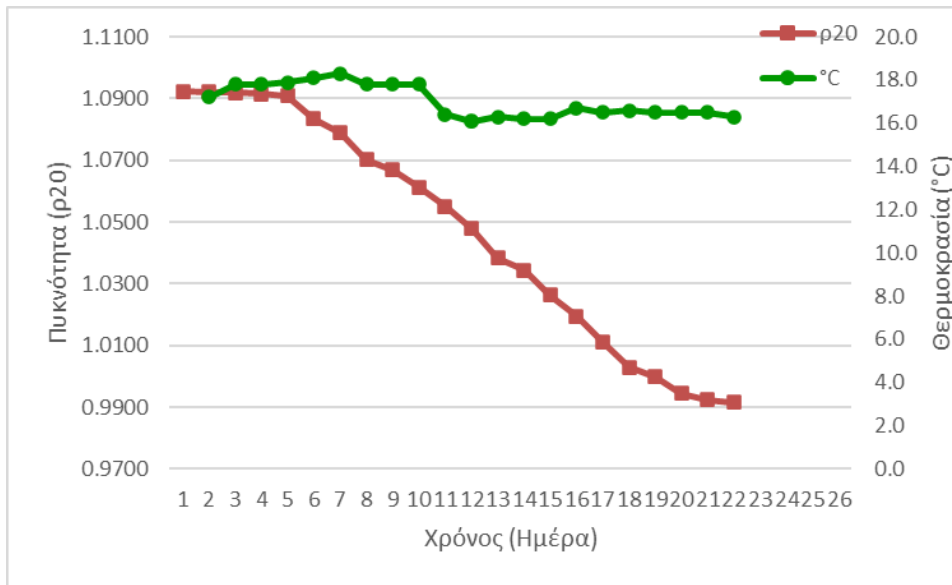
Γράφημα 2. Η καμπύλη ζύμωσης του δείγματος AB (▪) (Ασύρτικο *Both H. vineae + S. cerevisiae A*) και η καμπύλη θερμοκρασίας του γλεύκους (•).

Στο γράφημα 2 παρουσιάζεται η κινητική της ζύμωσης του δείγματος AB (Ασύρτικο *Both H. vineae + S. cerevisiae A*) με βάση την πτώση της πυκνότητας. Από το γράφημα φαίνεται η διάρκεια της ζύμωσης η οποία ήταν 22 ημέρες καθώς και η αύξηση της θερμοκρασίας κατά 2 °C, από τους 16 °C στους 18 °C, το οποίο οφείλεται στην έκκληση θερμότητας κατά την αλκοολική ζύμωση. Η μεγάλη διάρκεια ζύμωσης οφείλεται στον διαδοχικό εμβολιασμό με 2 είδη. Το δεύτερο εμβόλιο προστέθηκε την 5^η μέρα, επομένως η καλλιέργεια του *S. cerevisiae A* χρειάστηκε περισσότερες μέρες για να αφομοιωθεί στο περιβάλλον και να αποζυμώσει πλήρως τα σάκχαρα (Ciani & Comitini, 2015).



Γράφημα 3. Η καμπύλη ζύμωσης του δείγματος MS (■) (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A) και η καμπύλη θερμοκρασίας του γλεύκους (●).

Το Γράφημα 3 απεικονίζει τη ζύμωση στο δείγμα MS (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A) η οποία διήρκεσε 13 μέρες όπως και στο δείγμα AS (Ασύρτικο *S. cerevisiae* A). Παρατηρήθηκε αύξηση κατά 1 °C την 6^η μέρα ζύμωσης, με χρήση ψυκτικού εξοπλισμού έγινε σταθεροποίηση στους 16,5 ± 0,2 °C .



Γράφημα 4. Η καμπύλη ζύμωσης του δείγματος MB (■) (Μοσχοφίλερο *Both H. vineae + S. cerevisiae* A). και η καμπύλη θερμοκρασίας του γλεύκους (●).

Το γράφημα 4 απεικονίζει την καμπύλη ζύμωσης του δείγματος MB (Μοσχοφίλερο *Both H. vineae + S. cerevisiae* A) η οποία, ομοίως με το δείγμα AB, διήρκεσε παραπάνω, φτάνοντας τις 21 ημέρες. Αυτό, όπως αναφέρθηκε, οφείλεται στον συν-εμβολιασμό. Επιπλέον υπήρξαν αυξομειώσεις της θερμοκρασίας κατά τη ζύμωση, ειδικά μετά την εισαγωγή του *S. cerevisiae* A στο δείγμα. Κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης η θερμοκρασία κυμαινόταν στους 17±0,34 °C, ενώ μετά την 6^η μέρα έγινε μια αύξηση στους 18 °C και έπειτα στην 10^η μέρα πτώση με χρήση ψυκτικού εξοπλισμού στους 16±0,18 °C. Αυτή η διαφορά έχει μεγάλο αντίκτυπο στην παραγωγή, καθώς οι μεγάλες διάρκειες ζυμώσεων έχουν επιπλέον κόστος, λόγω δέσμευσης δεξαμενών και εξοπλισμού αλλά και λόγω της καθυστέρησης προώθησης του προϊόντος.

4.2. Οινολογικές αναλύσεις

Έγιναν οι κύριες χημικές αναλύσεις μέσω των οποίων μελετήθηκε η φυσικοχημική σύσταση του τελικού οίνου καθώς και η ύπαρξη ή μη επίδρασης, λόγω είδους, στα βασικά χημικά χαρακτηριστικά του οίνου, όπως η οξύτητα, το ελεύθερο και δεσμευμένο θειώδες και ο αλκοολικός τίτλος. Στον Πίνακα 2 αναλύονται τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων.

	pH	vol %	Ογκ. Οξύτητα (g/L)	Ελεύθερο θειώδες (mg/L)	Ολικό Θειώδες (mg/L)	Γλυκερόλη (g/L)	Πτητική οξύτητα (g/L)
AB	3,09±0,01 ^a	12,9	7,39±0,05 ^c	2,04 ± 0,00 ^a	16,00 ± 0,00 ^a	5,90	0,4
AS	3,01±0,00 ^a	12,8	7,42±0,00 ^c	3,00± 0,15 ^b	22,00± 0,13 ^{ab}	6,30	0,4
MB	3,41±0,01 ^b	13,5	7,05±0,00 ^a	9,05 ± 0,12 ^b	31,00± 0,2 ^b	7,80	0,4
MS	3,24±0,01 ^c	13,6	6,78±0,00 ^b	3,00 ± 0,00 ^c	41,00± 0,00 ^c	6,85	0,5

Πίνακας 2. Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων στα 4 τελικά δείγματα οίνου. Οι δείκτες συμβολίζουν της στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν από το Tuckey's test (Statgraphics software).

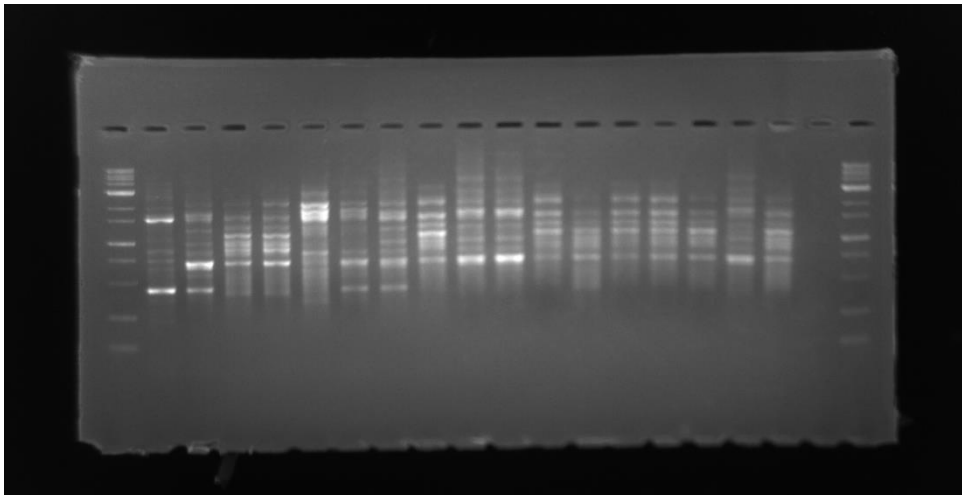
Η διαφορά στο pH μεταξύ των δειγμάτων MB (Μοσχοφίλερο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) και MS (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A) μπορεί να οφείλεται στην επίδραση του *H. vineae* ή ακόμα και στην επίδραση κάποιου γηγενούς είδους. Σε παρόμοια πειράματα που έχουν γίνει με συν-εμβολιασμό του *H. vineae*, όπως αυτό των K. Medina et al. (2013) καθώς και αυτό των Del Fresno et al. (2020), το pH ήταν ίδιο στα δείγματα συν-εμβολιασμού και τα δείγματα με στέλεχος *S. cerevisiae*.

Οι διαφορές στον αλκοολικό τίτλο είναι της τάξεως του 0,1 για τα δείγματα AB-AS και για τα δείγματα MB (Μοσχοφίλερο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) - MS (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A). Η απόδοση της ζύμωσης σε αλκοολικούς βαθμούς δεν αλλάζει σε μεγάλο βαθμό από είδος σε είδος, οι παρεμφερείς αλκοολικοί τίτλοι ήταν κάτι αναμενόμενο από την πειραματική πορεία αλλά και με βάση άλλα πειράματα που έχουν γίνει με συν-εμβολιασμό ειδών. Σε πείραμα με μικτή καλλιέργεια με τα είδη *Schizosaccharomyces pombe* και *Torulasporea delbrueckii* από την ομάδα των Iris Loira et al. (2015) η παραγωγή αιθανόλης ήταν όμοια, με απόκλιση 0,1 του αλκοολικού βαθμού ανάμεσα σε 3 δείγματα. Ομοίως στο πείραμα των Kai Hu et al. (2018) σε συν-εμβολιασμό στελεχών του *S. cerevisiae* με *Hansienasporea unarum* η συγκέντρωση της αιθανόλης δεν διέφερε ανάμεσα στα δείγματα. Αναφορικά, ακόμα και από το νόμο, αποκλίσεις κατά 0,1 μονάδες στον αλκοολικό τίτλο θεωρούνται αμελητέες.

Τέλος, ενδιαφέρον σε ερευνητικό αλλά και παραγωγικό επίπεδο, περισσότερο ακόμα και από τα οξέα και τον αλκοολικό τίτλο, έχει η συσχέτιση του είδους με το ελεύθερο θειώδες. Έχει παρατηρηθεί πως το είδος *H. vineae* έχει την ικανότητα να επιβιώνει και σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση θειώδους, κάτι που επιβεβαιώνεται από το δείγμα MB (Μοσχοφίλερο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) όπου υπάρχει υψηλό ποσοστό ελεύθερου θειώδους σε επίπεδο 9mg/L (Martin et al., 2022). Η αντοχή στην υψηλή θείωση είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για τα non-Sacharomyces είδη και τα αποτελέσματα του πειράματος επιβεβαιώνουν την καταλληλότητα του *H. vineae* για χρήση σε διαδοχικό εμβολιασμό.

4.3. Μοριακές Αναλύσεις

Από τη μικροβιολογική ανάλυση των οινικών δειγμάτων απομονώθηκαν 186 αποικίες ζυμομυκήτων, οι οποίες υποβλήθηκαν σε RAPD-PCR ανάλυση με τον εκκινητή M13 για την κατηγοριοποίησή τους σε επίπεδο είδους, όπως έκαναν και στο πείραμά τους ο Andrighetto C. et al. (2000).



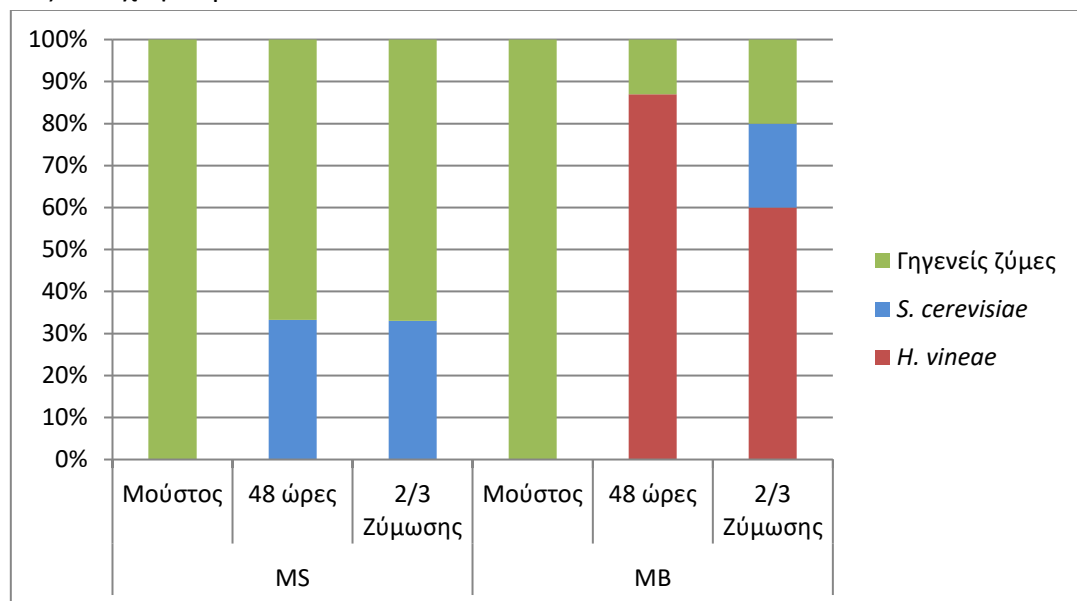
Εικόνα 9. Φωτογραφία των προϊόντων ηλεκτροφόρησης της RAPD-PCR για το δείγμα AB2-3. Η πρώτη και τελευταία στήλη αποτελείται από το μοριακό μάρτυρα.

Στην εικόνα 9 φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης στα 15 απομονωμένα δείγματα από τον οίνο AB2-3. Τα δείγματα των απομονωμένων ζυμών που είναι όμοια με τον μάρτυρα *H. vineae* κατηγοριοποιούνται ως *H. vineae*. Αντιθέτως όσα είναι όμοια με τον μάρτυρα του *S. cerevisiae* A εξετάστηκαν περαιτέρω και με το πρωτόκολλο Interdelta-PCR για να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια σε επίπεδο είδους. Ενώ όσα δεν ταυτοποιήθηκαν με κανένα μάρτυρα, υποβλήθηκαν και αυτά στο πρωτόκολλο της Interdelta-PCR. Συνολικά από τα 186 δείγματα ζυμών που υποβλήθηκαν στην RAPD-PCR, 105 υποβλήθηκαν και στο πρωτόκολλο Interdelta-PCR με τους εκκινητές D12-D21 για να

γίνει κατηγοριοποίηση σε γηγενή είδη, στελέχη του *S. cerevisiae* και τον *S. cerevisiae* A. Με την κατηγοριοποίηση σε είδη μπορεί να εξακριβωθεί το ποσοστό επικράτησης και επιβίωσης του *H. vineae*, ενώ με την κατηγοριοποίηση σε στελέχη γίνεται ανάλυση της επικράτησης του *S. cerevisiae* A.

4.3.1. Μοσχοφίλερο

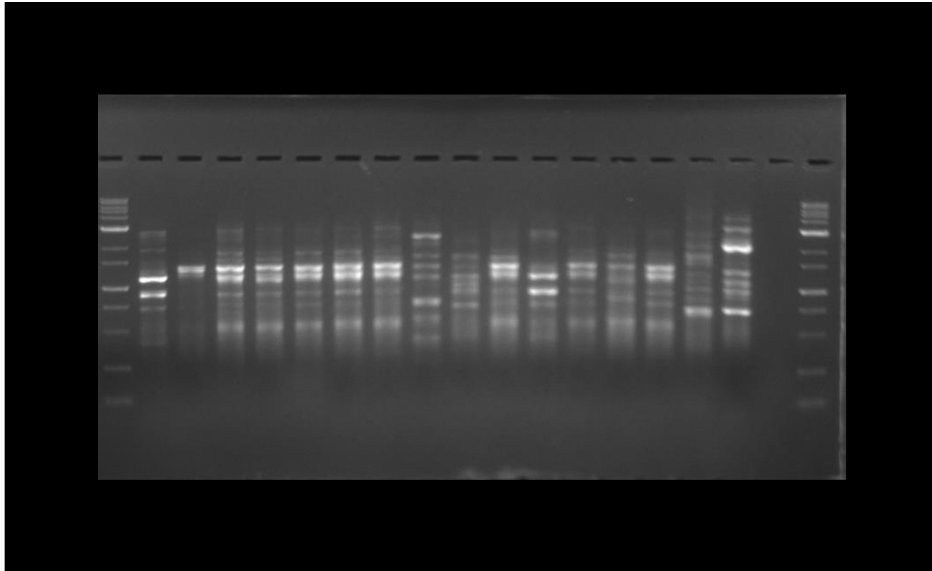
Στο διάγραμμα 5 παρουσιάζονται σε συνδυαστικό διάγραμμα, με βάση τα πρωτόκολλα RAPD-PCR και Interdelta-PCR που έγιναν, τα ποσοστά γηγενών ειδών, *H. vineae* και *S. cerevisiae* A στις απομονώσεις που προέκυψαν κατά τη ζύμωση της ποικιλίας Μοσχοφίλερου.



Γράφημα 5. Τα αποτελέσματα των RAPD-PCR και Interdelta-PCR στα δείγματα του Μοσχοφίλερου σε συνδυαστικό διάγραμμα με απεικόνιση της επί τις % επικράτησης των γηγενείς ζυμών, του *S. cerevisiae* και του *H. vineae*.

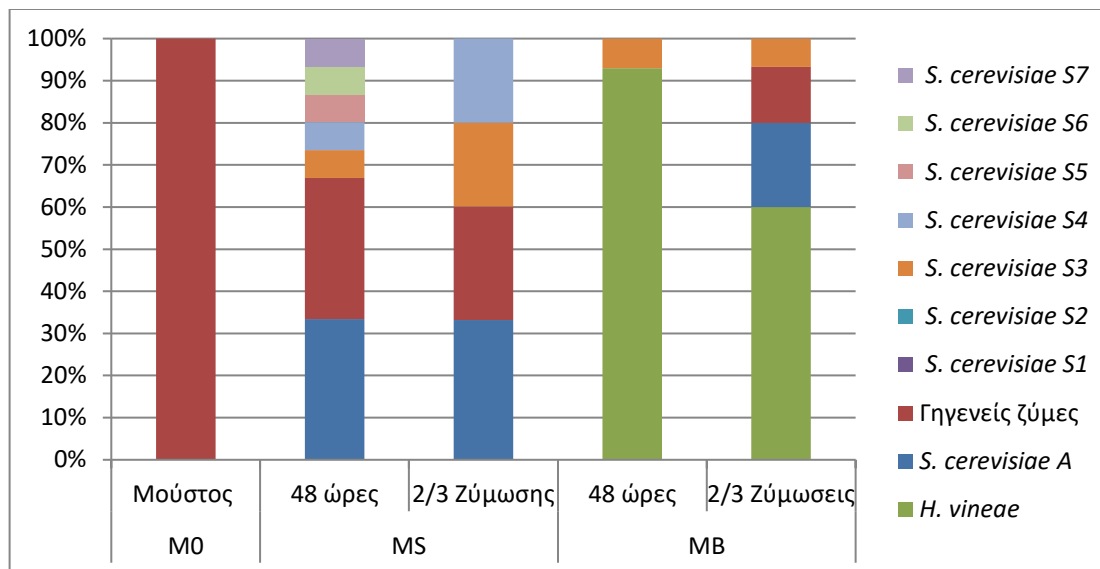
Όπως είναι αναμενόμενο, στο δείγμα MS0 (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A 1^η μέρα), MB0 (Μοσχοφίλερο Both 1^η μέρα) όπου έγινε η δειγματοληψία πριν τον εμβολιασμό, το 100% των απομονωμένων ζυμών είναι γηγενείς, κάποιες από αυτές μάλιστα ανήκουν στο είδος *S. cerevisiae*. Η ποικιλομορφία των ειδών και η παρουσία στελέχους του *S. cerevisiae* είναι απολύτως φυσιολογική, έχει προαναφερθεί η τεράστια παραλλακτικότητα που έχουν οι ζύμες εξαρτώμενες από το εδαφοκλιματικό «terroir» (Ciani & Comitini, 2011). Λόγω αυτής της ποικιλομορφίας των γηγενών ειδών, πέρα από τη συμβίωση του *H. vineae* με τον *S. cerevisiae* A, ήταν κρίσιμο για το συγκεκριμένο πείραμα να γίνει κατανοητός και ο τρόπος με τον οποίο αλληλοεπίδρασαν τα 2 εμβολιασμένα είδη με τα γηγενή. Επίσης ήταν κρίσιμο να

αποκλειστεί το γεγονός να υπάρχει ο *H. vineae* στις γηγενείς ζύμες. Σε αυτό το ενδεχόμενο, με παράλληλη επικράτηση του *H. vineae* στο γλεύκος, δεν θα ήταν εμφανές, μέσω της πειραματικής πορείας, αν επικράτησε ο γηγενής ή ο εμβολιασμένος. Από την RAPD-PCR δεν βρέθηκε *H. vineae* στις γηγενείς ζύμες, επομένως η επικράτησή του στο γλεύκος οφείλεται στον εμβολιασμό.



Εικόνα 10. Φωτογραφία των προϊόντων ηλεκτροφόρησης της RAPD-PCR για το δείγμα MS0 (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A Μούστος). Η πρώτη και τελευταία στήλη αποτελείται από το μοριακό μάρτυρα.

Όπως φαίνεται από το δείγμα MS2 (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A 2^η μέρα) το εμβόλιο του *S. cerevisiae* A επικράτησε κατά 33% έναντι των ζυμών, με το υπόλοιπο 67% των ζυμών του γλεύκος να είναι γηγενή είδη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αδυναμία του *S. cerevisiae* A να επικρατεί πλήρως έναντι των γηγενών ειδών της περιοχής της Μαντινείας. Επίσης μπορεί να οφείλεται στις οινοποιητικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν οι οποίες, ίσως, δυσκόλεψαν τον πολλαπλασιασμό του είδους (Bisson, 1999).



Γράφημα 6. Τα αποτελέσματα των PCR για όλα τα δείγματα του Μοσχοφίλερου με απεικόνιση της επί τις % επικράτησης των γηγενών ειδών, τον *S. cerevisiae* A και των 7 διαφορετικών στελεχών του *S. cerevisiae* που εντοπίστηκαν στα γηγενή είδη.

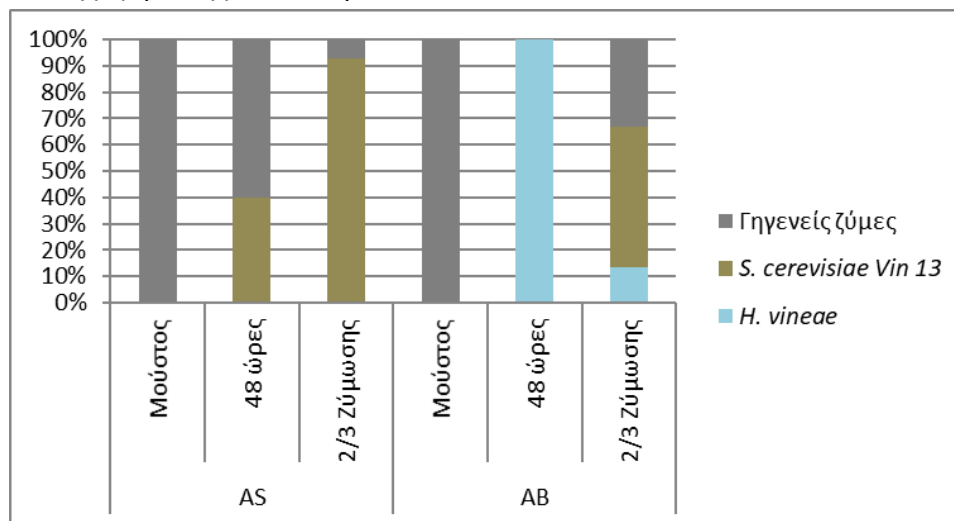
Παρά την αδυναμία του *S. cerevisiae* A να επικρατήσει πλήρως, ήταν σημαντική και η ανάλυση της αλληλεπίδρασής του με τις γηγενείς ζύμες. Από τη διεξαγωγή της Interdelta-PCR, με την οποία έγινε ταυτοποίηση των *S. cerevisiae* ζυμών σε επίπεδο στελέχους, είναι εμφανές ότι το υπόλοιπο 67% των ζυμών αποτελείται από διάφορα γηγενή είδη με κανένα να μην υπερβαίνει το 15% του συνόλου, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 6. Επομένως, ακόμα και αν δεν επικράτησε πλήρως ο *S. cerevisiae* A, παραμένει το είδος το οποίο εκτέλεσε σε μεγαλύτερο βαθμό την αλκοολική ζύμωση και τα οργανοληπτικά αποτελέσματα, που παρατηρήθηκαν στον οίνο, οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στην επιρροή του (P. Ribereau-Gayon et al., 2001). Τέλος, στα προχωρημένα στάδια της ζύμωσης η επικράτηση του *S. cerevisiae* A παραμένει σταθερή σε ποσοστό 33%, με τα υπόλοιπα να είναι γηγενή είδη σε μικρότερα ποσοστά. Η μη αύξηση του πληθυσμού του *S. cerevisiae* A μπορεί να οφείλεται στις οινοποιητικές μεθόδους, όπως τη χαμηλή θερμοκρασία ζύμωσης και την αποφυγή ανάδευσης των λασπών (Bisson, 1999).

Στα δείγματα MB (Μοσχοφίλερο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A), στα οποία έγινε ο διαδοχικός εμβολιασμός, υπήρξε ενδιαφέρον αποτέλεσμα με το ποσοστό επικράτησης του *H. vineae* να ανέρχεται στο 87%. Το τόσο υψηλό ποσοστό επιβίωσης του *H. vineae* συμπίπτει και με πειράματα που έχουν γίνει με συν-εμβολιασμό του *H. vineae* στην ποικιλία Chardonnay από τους K. Medina, et. al (2013). Με τόσο υψηλή επικράτηση αποδεικνύεται πως ο *H. vineae* μπορεί να επιβιώσει και να εκτελέσει τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Ιδιαίτερα το ποσοστό επικράτησης του *H. vineae* είναι αρκετά υψηλό, σε σχέση με το 33% του *S. cerevisiae* A στο δείγμα MS2 (Μοσχοφίλερο *S.*

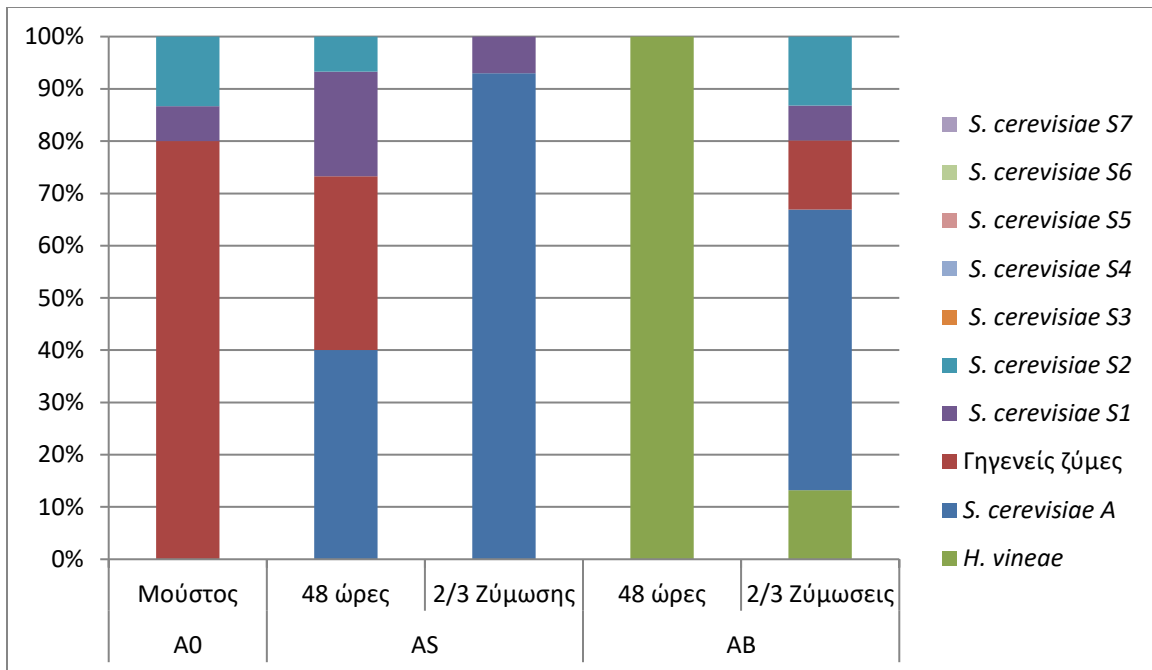
cerevisiae A 48 ώρες), το οποίο αποδεικνύει ότι ο *H. vineae* αφομοιώθηκε γρηγορότερα στο περιβάλλον και επικράτησε σε μεγαλύτερο βαθμό, έναντι των γηγενών ειδών. Έπειτα, στα αποτελέσματα από το δείγμα MB2/3 (Μοσχοφίλερο Both, 2/3 της ζύμωσης, 14^η μέρα), το ποσοστό επικράτησης του *H. vineae* έχει μειωθεί στο 60% με τη διαφορά να οφείλεται στον εμβολιασμό του *S. cerevisiae* A, ο οποίος εκτέλεσε τα τελικά στάδια της ζύμωσης. Στο δείγμα MB2/3 ο πληθυσμός του *S. cerevisiae* A ανέρχεται σε ποσοστό 20%, με το υπόλοιπο 20% των ειδών να είναι γηγενείς ζύμες οι οποίες έχουν διατηρήσει ένα μικρό πληθυσμό στα προχωρημένα στάδια της ζύμωσης. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως ο *H. vineae* είναι είδος το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαδοχικό εμβολιασμό, καθώς έχει τη δυνατότητα να επιβιώσει στα αρχικά στάδια και να επικρατήσει έναντι των γηγενών ειδών. Επίσης, όπως φαίνεται από την αλληλεπίδραση με τον A, μπορεί να επιβιώσει σε περιβάλλον με στελέχη του *S. cerevisiae*. Από αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι ο *H. vineae* αποτελεί ένα κατάλληλο είδος για χρήση σε συν-εμβολιασμό. Βέβαια, σε πειραματική μελέτη από τους K. Medina et. al (2013), το στέλεχος *S. cerevisiae* που χρησιμοποίησαν είχε επικρατήσει πλήρως έναντι του *H. vineae* την 10^η μέρα οινοποίησης. Η αδυναμία του *S. cerevisiae* A να επικρατήσει, μπορεί να οφείλεται σε διάφορους οινοποιητικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες.

4.3.2. Ασύρτικο

Στο γράφημα 7 αποτυπώνονται συνδυαστικά τα αποτελέσματα των RAPD-PCR και Interdelta-PCR που διεξήχθησαν στις απομονώσεις ζυμών που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του Ασύρτικου.

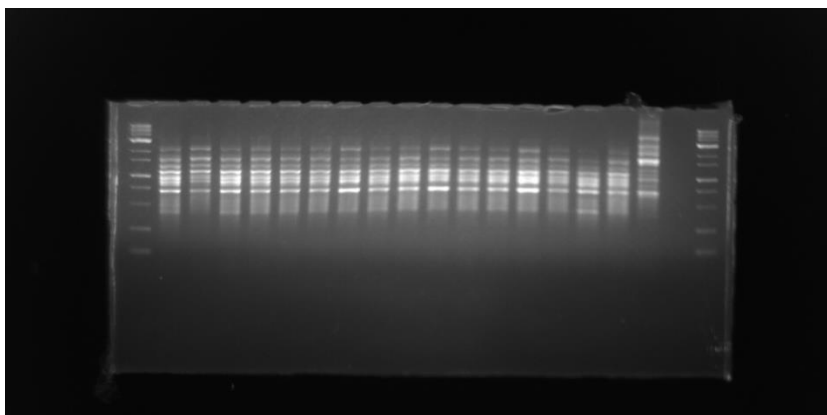


Γράφημα 7. Τα αποτελέσματα των RAPD-PCR και Interdelta-PCR στα δείγματα του Ασύρτικου σε συνδυαστικό διάγραμμα με της επί τις % επικράτησης απεικόνιση των γηγενών ζυμών, του *S. cerevisiae* και του *H. vineae*.



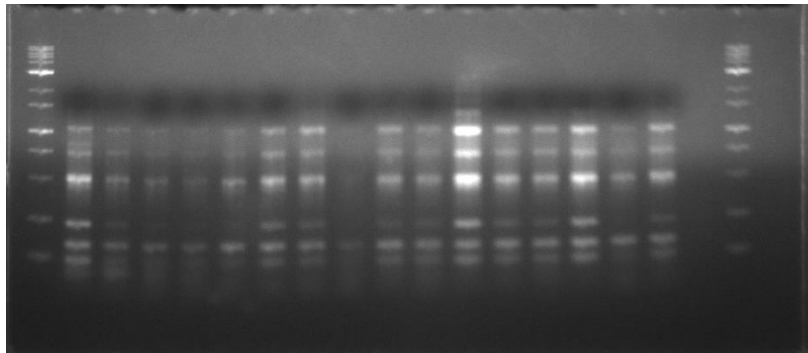
Γράφημα 8. Τα αποτελέσματα των PCR στα δείγματα του Ασύρτικου με απεικόνιση της επί τις % επικράτησης των 2 διαφορετικών γηγενών στελεχών του *S. cerevisiae* που εντοπίστηκαν, τα γηγενή είδη και τον *S. cerevisiae A*.

Όπως και στο Μοσχοφίλερο, στον μούστο AS0 (Ασύρτικο *S. cerevisiae A* 1^η μέρα) - AB0 (Ασύρτικο Both 1^η μέρα) υπάρχουν μόνο γηγενή είδη. Βέβαια στο Ασύρτικο παρατηρήθηκε η παρουσία του ίδιου στελέχους γηγενούς *S. cerevisiae S1*, όπως φαίνεται στο Γράφημα 8, σε ποσοστό 20% και στις 2 δεξαμενές (με και χωρίς συν-εμβολιασμό). Το συγκεκριμένο ιθαγενές στέλεχος παρατηρήθηκε να διατηρεί πληθυσμό έως και το τέλος της ζύμωσης στο δείγμα AB (Ασύρτικο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae A*). Η εύρεση γηγενούς στελέχους με υψηλό δυναμικό ζύμωσης αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο έρευνας, καθώς προάγει την τυπικότητα και την ποιότητα των παραγόμενων οίνων.



Εικόνα 11. Φωτογραφία των προϊόντων ηλεκτροφόρησης της RAPD-PCR για τα δείγματα AB2 (Ασύρτικο Both 48 ώρες). Η πρώτη και τελευταία στήλη αποτελείται από τον μοριακό μάρτυρα.

Στην οινοποίηση AS (Ασύρτικο *S. cerevisiae* A) όπου πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός μόνο με *S. cerevisiae* A τα ποσοστά του, έπειτα από 2 μέρες, ανέρχονται στο 40% με το υπόλοιπο 60% να αποτελείται από γηγενείς ζύμες. Αυτό υποδεικνύει δυσκολία αφομοίωσης στο περιβάλλον και επικράτησης έναντι των γηγενών ειδών αμέσως μετά τον εμβολιασμό. Όμως στο δείγμα AS2/3 (Ασύρτικο Both, 2/3 της ζύμωσης, 14^η μέρα), το 93% των απομονωμένων ζυμών είναι *S. cerevisiae* A αποδεικνύοντας την πλήρη επικράτησή του στο γλεύκος με μόνον ένα πολύ μικρό ποσοστό 7% να αποτελείται από γηγενείς ζύμες. Η επιβίωση γηγενών στελεχών σε μικρά ποσοστά, ακόμα και στα τελικά στάδια της ζύμωσης, παρατηρείται συχνά σε πειραματικό επίπεδο, όπως συνέβη και στο πείραμα των B. Esteve-Zarzoso et al. (2000). Η τάση των γηγενών ζυμών να επιβιώνουν έως τα τελικά στάδια της ζύμωσης ακόμα και σε γλεύκη με πολύ ανταγωνιστικά στελέχη του *S. cerevisiae*, τα οποία διαθέτουν και το φαινόμενο Killer, είναι ο λόγος που τα API test και η ταχεία μοριακή ανάλυση είναι απαραίτητη στη σύγχρονη βιομηχανία οίνου (López et al., 2003).



Εικόνα 12. Φωτογραφία των προϊόντων ηλεκτροφόρησης της Interdelta-PCR για τα δείγματα AS2/3 (Ασύρτικο *S. cerevisiae* A, 2/3 της ζύμωσης, 7η μέρα). Η πρώτη και τελευταία στήλη αποτελείται από τον μοριακό μάρτυρα

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων AB (Ασύρτικο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) είναι πολύ ικανοποιητικά, καθώς στη 2^η μέρα φαίνεται η πλήρης επικράτηση σε ποσοστό 100% του *H. vineae* και εκτέλεση από τον ίδιο των πρώτων σταδίων της αλκοολικής ζύμωσης. Μια τόσο υψηλή επικράτηση είναι αναμενόμενο να έχει τεράστια επίδραση και στο αρωματικό προφίλ με την παραγωγή και τον μεταβολισμό διαφορετικών χημικών ενώσεων (P. Ribereau-Gayon et al., 2001). Το υψηλό ποσοστό του *H. vineae* αποδεικνύει την ικανότητά του να επικρατήσει έναντι των γηγενών ειδών και να έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Έπειτα, στο στάδιο AB2/3 (Ασύρτικο Both, 2/3 της ζύμωσης, 14^η μέρα), φαίνεται η διατήρηση μικρού

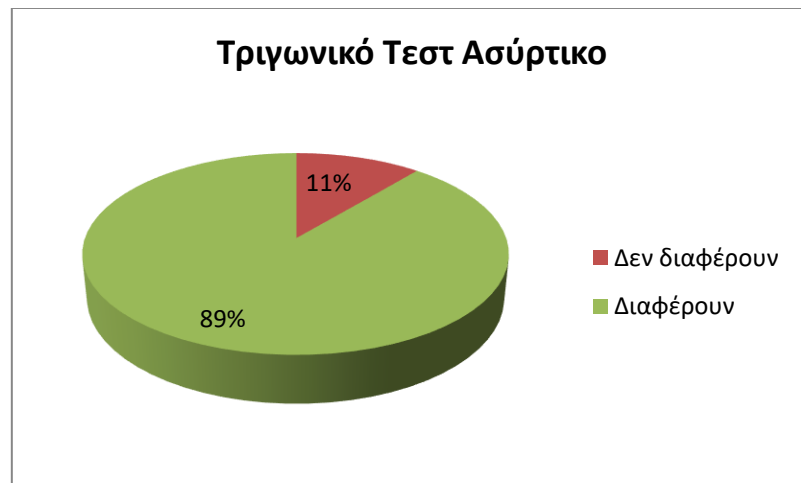
πληθυσμού του *H. vineae* σε ποσοστό 13%, ενώ το 54% των ζυμών αποτελείται από τον *S. cerevisiae* A, ο οποίος επικρατεί στο γλεύκος και εκτελεί την αποζύμωση των σακχάρων. Η επιβίωση του *H. vineae* και άλλων γηγενών ειδών σε τόσο προχωρημένο στάδιο είναι κάτι φυσιολογικό και έχει παρατηρηθεί και σε άλλα πειράματα με συν-εμβολιασμό ειδών. Ειδικά στο πείραμα των García Margarita et al. (2017) σε οίνους Denominación de Origen “Οίνος Μαδρίτης” τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στον συν-εμβολιασμό διατήρησαν πληθυσμό έως και τα προχωρημένα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Ομοίως, όπως και με το Μοσχοφίλερο, στα δείγματα AB (Ασύρτικο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) η αλκοολική ζύμωση διήρκησε 7 ημέρες παραπάνω, κάτι αναμενόμενο λόγω του συν-εμβολιασμού. Συμπερασματικά, ο *H. vineae* είναι είδος κατάλληλο για χρήση σε συν-εμβολιασμό, καθώς αντέχει τον ανταγωνισμό του *S. cerevisiae* και επικρατεί έναντι των άλλων γηγενών ειδών. Επομένως ο *H. vineae* αποτελεί είδος με δυνατότητα χρήσης σε μεγάλης κλίμακας παραγωγή οίνων.

4.4. Οργανοληπτικός έλεγχος στο τελικό οίνο

Πέρα από τις μοριακές αναλύσεις κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης στις 4 δεξαμενές, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση των παραγόμενων οίνων και τριγωνική δοκιμή. Με την οργανοληπτική αξιολόγηση από 6 εκπαιδευμένους δοκιμαστές καταγράφηκε η επίδραση που έχει ο διαδοχικός εμβολιασμός *H. vineae* /*S. cerevisiae* στο τελικό προϊόν. Όλες οι οινοποιητικές τεχνικές ήταν όμοιες για τα δείγματα MB (Μοσχοφίλερο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) - MS (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A) και AB (Ασύρτικο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) - AS (Ασύρτικο *S. cerevisiae* A). Η μόνη διαφορά ανάμεσά τους ήταν η διεξαγωγή του συν-εμβολιασμού, επομένως οποιαδήποτε διαφορά στο αρωματικό και γευστικό προφίλ, είτε θετική ή αρνητική, οφείλεται στην επίδραση του *H. vineae*.

Αρχικά με το τριγωνικό τεστ διερευνήθηκε αν είναι αντιληπτή η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων σε τυφλή δοκιμή από το πάνελ. Τα αποτελέσματα του τριγωνικού τεστ παρουσιάζονται στα Γραφήματα 9 και 10. Στο Γράφημα 9 παρουσιάζεται το τριγωνικό τεστ που διεξήχθη για τα δείγματα της ποικιλίας Ασύρτικου (AS-AB). Το 89% των δοκιμαστών εντόπισε και απομόνωσε το διαφορετικό δείγμα. Το ποσοστό αυτό είναι πολύ υψηλό και επιβεβαιώνει τη μεγάλη επίδραση που έχει ο *H. vineae* στο τελικό προϊόν. Γίνεται εμφανές ότι ακόμα και με ίδιες οινοποιητικές τεχνικές η ζύμωση από τον *H. vineae* οδήγησε στην παραγωγή διαφορετικού οίνου. Είναι κατανοητό πως ο διαδοχικός εμβολιασμός με τον *H. vineae* επηρεάζει ριζικά τον παραγόμενο οίνο, αλλάζοντας σε μεγάλο βαθμό το αρωματικό προφίλ. Ιδιαίτερα για το Ασύρτικο, το οποίο είναι μια ποικιλία με χαρακτηριστικά αρώματα λεμονιού και εσπεριδοειδών, η επίδραση του *H. vineae* άλλαξε εντελώς το αρωματικό προφίλ με την παρουσία ανθικών

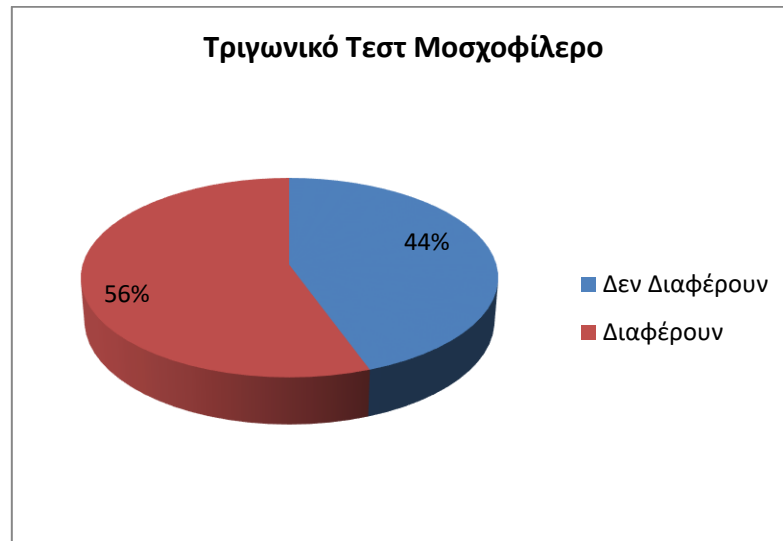
αρωματικών ενώσεων. Αυτό είναι ένα πολύ ενδιαφέρον αποτέλεσμα, καθώς η μη επικάλυψη των πρωτογενών αρωματικών ενώσεων από το είδος της ζύμης που εμβολιάζεται είναι μεγάλος ποιοτικός παράγοντας. Από τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου στο Ασύρτικο έγινε κατανοητό πως η χρήση του *H. vineae* άλλαξε εντελώς το προφίλ της ποικιλίας. Παρότι δεν παρατηρήθηκε κάλυψη ή επισκίαση του πρωτογενούς προφίλ η ύπαρξη ανθικών και γλυκών αρωμάτων δεν συμβαδίζει με το τυπικό αρωματικό προφίλ του Ασύρτικου. Ένας πολύ σημαντικός ποιοτικός παράγοντας για τον οίνο θεωρείται η διατήρηση του ποικιλιακού αρώματος και το να είναι εμφανές το ποικιλιακό προφίλ στο τελικό προϊόν. Επομένως ο εμβολιασμός με *H. vineae*, ενώ δεν επικαλύπτει το ποικιλιακό άρωμα, αλλάζει ριζικά το αρωματικό προφίλ και δεν καθιστά εμφανής την ποικιλία του προϊόντος.



Γράφημα 9. Τα αποτελέσματα του τριγωνικού τεστ για το Ασύρτικο

Στο Γράφημα 10 παρουσιάζεται το τριγωνικό τεστ για τα δείγματα MB (Μοσχοφίλερο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) - MS (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A), όπου η επίδραση του *H. vineae* δεν ήταν τόσο εμφανής. Το 56% των δοκιμαστών κατάφερε να εντοπίσει το διαφορετικό δείγμα, ένα χαμηλό ποσοστό, το οποίο όμως επιβεβαιώνει το γεγονός ότι για ποικιλίες με έντονο ανθικό αρωματικό προφίλ η επίδραση του *H. vineae* δεν αλλάζει το ποικιλιακό αρωματικό προφίλ. Η διατήρηση του πρωτογενούς

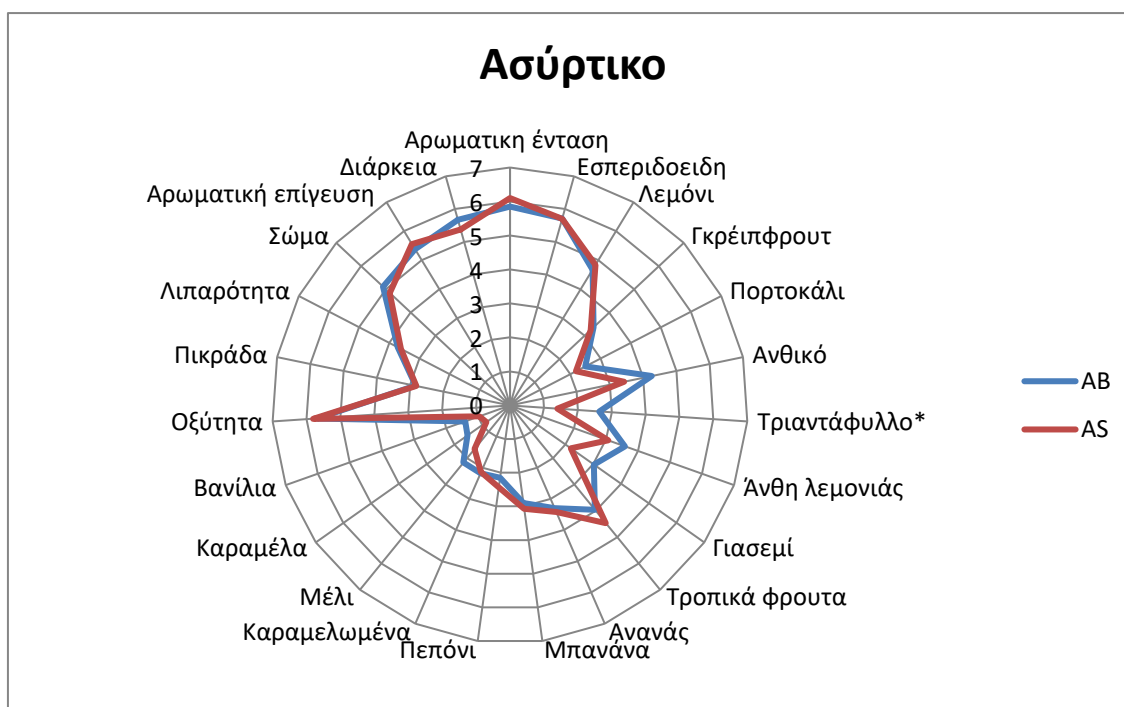
αρωματικού χαρακτήρα της ποικιλίας θεωρείται ποιοτικός παράγοντας και η επισκίαση ή επικάλυψη του αποτελεί ελάττωμα (P. Ribereau-Gayon et al., 2001).



Γράφημα 10. Τα αποτελέσματα του τριγωνικού τεστ για το Μοσχοφίλερο

Τα αποτελέσματα των τριγωνικών τεστ αποδεικνύουν ότι σε ποικιλίες όπως το Ασύρτικο, οι οποίες δεν έχουν τυπικό ανθικό προφίλ, η επίδραση του *H. vineae* είναι εμφανής και ακόμα αν δεν επικαλύπτει τον ποικιλιακό χαρακτήρα, ίσως, να μην είναι επιθυμητή σε τόσο μεγάλο βαθμό. Αντιθέτως στα αποτελέσματα για το Μοσχοφίλερο οι διαφορές δεν ήταν τόσο εμφανείς, αλλά από τον οργανοληπτικό έλεγχο η πολυπλοκότητα που πρόσφερε ο *H. vineae* θεωρείται θετικός ποιοτικός παράγοντας. Επομένως η χρήση του *H. vineae* προσφέρει πολυπλοκότητα στον παραγόμενο οίνο, όμως πρέπει να συνδυαστεί με την κατάλληλη ποικιλία για καλύτερο αποτέλεσμα.

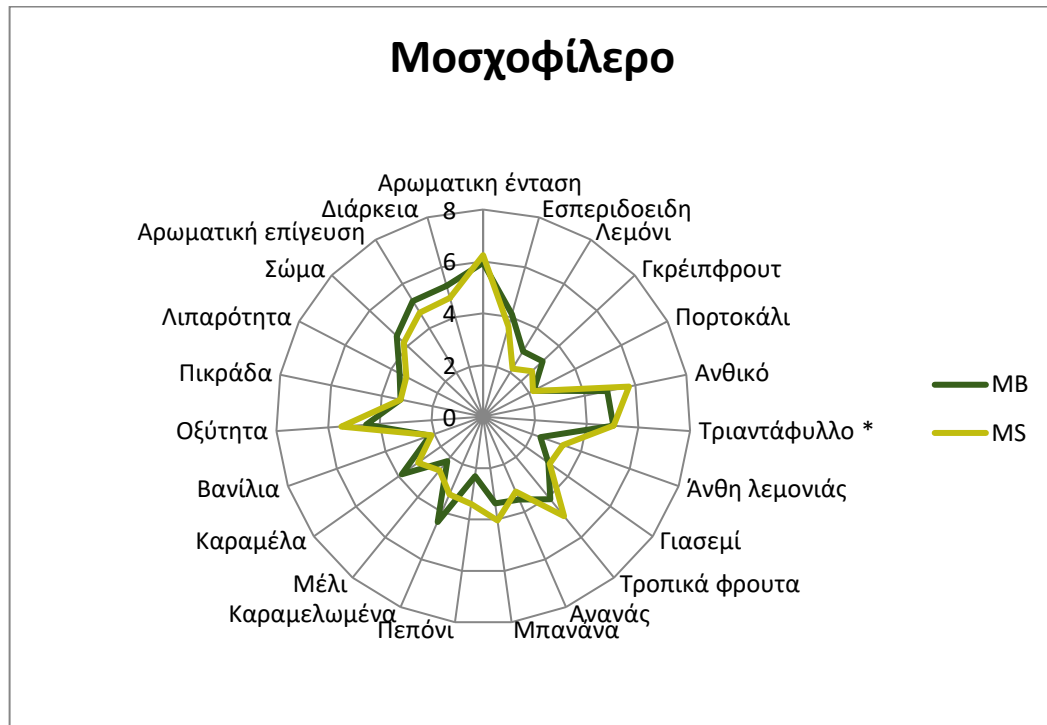
Έπειτα, τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής δοκιμής συλλέχθηκαν, αναλύθηκε η ελεύθερη κλίμακα με κλίμακα βαθμονόμησης σε εκατοστά και τέλος αναλύθηκαν στατιστικά τα αποτελέσματα. Στα Γραφήματα 11 και 12 φαίνονται, σε αραχνοειδές διαγράμματα, οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων με αναφορά στις 16 παραμέτρους τις οποίες εξέτασε το πάνελ.



Γράφημα 11. Ο οργανοληπτικός έλεγχος στα δείγματα AB-AS (Ασύρτικο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) - (Ασύρτικο *S. cerevisiae* A) με βάση κύριους αρωματικούς και γευστικούς παράγοντες.

Από τον οργανοληπτικό έλεγχο προκύπτουν μεγάλες διαφορές στο αρωματικό προφίλ στον παραγόμενο οίνο της ποικιλίας Ασύρτικο (Γράφημα 11). Η διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στα 2 δείγματα είναι σημαντική στη γενική ομάδα των ανθικών ενώσεων αλλά και στην ειδική παράμετρο του “τριαντάφυλλου”. Επομένως η επίδραση του *H. vineae* στο Ασύρτικο συμπίπτει με την καταγεγραμμένη από τη βιβλιογραφία, δηλαδή αύξηση του αρώματος του τριαντάφυλλου και του γλυκού χαρακτήρα. Συγκεκριμένα σε πείραμα της Ileixa et al. (2016) στην ποικιλία Macao ο εμβολιασμός με *H. vineae* πρόσφερε περισσότερο ανθικό χαρακτήρα στον οίνο και σε αξιολόγηση από ειδικευμένο πάνελ η επίδραση του *H. vineae* θεωρήθηκε επιθυμητή και ποιοτική. Επίσης παρατηρήθηκε απόκλιση στις αρωματικές παραμέτρους “Άνθη λεμονιάς”, “Μέλι” και «Βανίλια». Οι αποκλίσεις σε αυτές τις αρωματικές παραμέτρους συνδέεται με πιθανή αύξηση της συγκέντρωσης χημικών ενώσεων, λόγω του εμβολιασμού με *H. vineae*. Ειδικά για τις παραμέτρους “Μέλι” και “Βανίλια”, με βάση το πείραμα της Valentina Martin et al. (2018) η αύξηση αυτών των αρωμάτων έχει αποδοθεί στην παράγωγη χημικών ενώσεων, όπως ο αιθανικός αιθυλεστέρας. Ομοίως για την παράμετρο “Άνθη Λεμονιάς” έχει αποδειχθεί από το πείραμα των Del Frenso et al. (2021) ότι η επίδραση του *H. vineae* προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης χημικών ενώσεων, που οφείλονται για

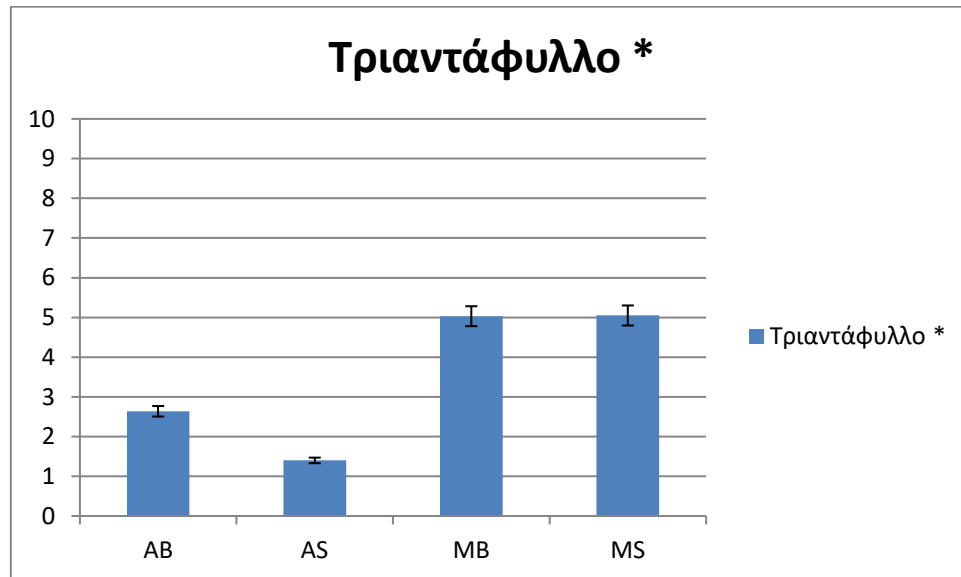
τα ανθικά και κιτρικά αρώματα, πάνω από το κατώφλι αντίληψης. Η αύξηση των συγκεντρώσεων τέτοιων χημικών ενώσεων δημιουργεί πληθώρα αρωμάτων και δίνει πολυπλοκότητα στον οίνο. Αυτή η πολυπλοκότητα που προσφέρει ο *H. vineae* στον παραγόμενο οίνο είναι επιθυμητή και μπορεί να αποτελέσει κίνητρο για τη χρήση του είδους σε οινοποιήσεις μεγάλης κλίμακας.



Γράφημα 12. Ο οργανοληπτικός έλεγχος στα δείγματα MB (Μοσχοφίλερο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) - MS (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A)

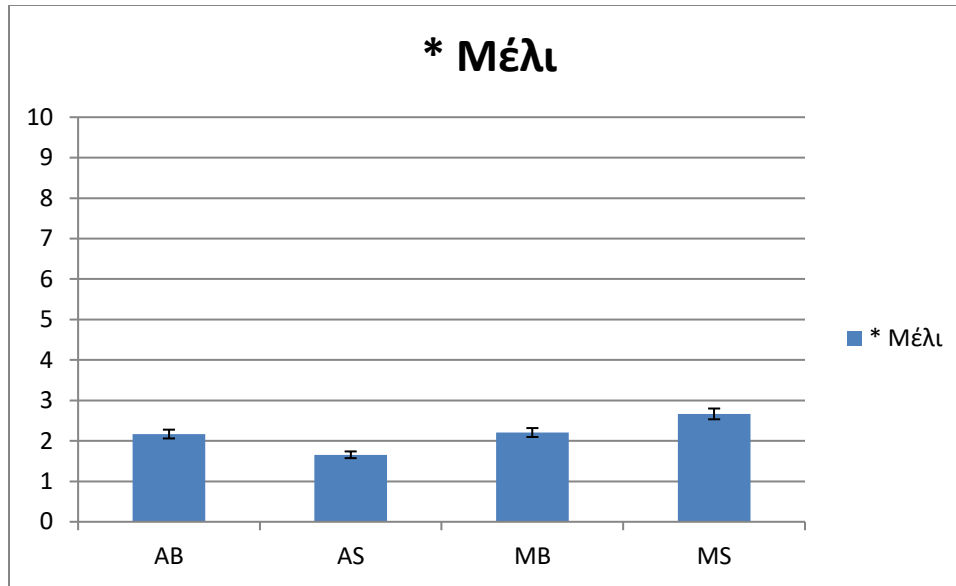
Η επίδραση του *H. vineae* στο Μοσχοφίλερο ήταν εξίσου ενδιαφέρουσα με το Ασύρτικο (Γράφημα 12). Σε αντίθεση με το Ασύρτικο, το οποίο έχει ποικιλιακά αρώματα λεμονιού και εσπεριδοειδών, το Μοσχοφίλερο χαρακτηρίζεται από ποικιλιακό άρωμα ανθών και τριαντάφυλλου. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων εντοπίστηκαν αρώματα εσπεριδοειδών. Αυτό το αποτέλεσμα συμπίπτει με πείραμα των Del Fresno et al. (2020) στην ποικιλία Albarillo όπου ο διαδοχικός εμβολιασμός με *H. vineae* οδήγησε στην παραγωγή φρουτώδη χαρακτήρα στον οίνο, καθώς και με πειράματα των A. Morata et al. (2019) και V. Martin et al. (2016) στα οποία παρατηρήθηκε αύξηση του βενζοϊκού αιθυλεστέρα, προκαλώντας αύξηση στα φρουτώδη αρώματα. Επιπλέον στο δείγμα MS (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A) υπήρξε μείωση της γενικής ομάδας των ανθικών αρωμάτων, παρά το ποικιλιακό χαρακτήρα του Μοσχοφίλερου. Η μείωση αυτή με την παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης άλλων αρωματικών ενώσεων δίνει διαφοροποίηση και πολυπλοκότητα στον παραγόμενο οίνο. Επομένως είναι προφανές πως η επίδραση του *H. vineae* σε ποικιλίες με ανθικό πρωτογενές προφίλ μπορεί να

αυξήσει την πολυπλοκότητα, χωρίς να επηρεάσει τον ποικιλιακό χαρακτήρα. Αυτό έγινε κατανοητό από την αξιολόγηση του Μοσχοφίλερου το οποίο δεν απέκλινε από τα τυπικά ανθικά αρώματα της ποικιλίας.



Γράφημα 13. Η αξιολόγηση της αρωματικής παραμέτρου "Τριαντάφυλλο" στα δείγματα Ασύρτικού και Μοσχοφίλερου από εξειδικευμένο πάνελ με βάση τους μέσους όρους από την ελεύθερη κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε. Αποτυπώνονται και οι τυπικές αποκλίσεις για κάθε δείγμα με τη μορφή μπάρας

Στο Γράφημα 13 παρουσιάζεται η αξιολόγηση για την αρωματική παράμετρο "Τριαντάφυλλο" η οποία φέρει περισσότερο ενδιαφέρον, καθώς συσχετίζεται με τις έντονα ανθικές ποικιλίες. Στα αποτελέσματα για τα δείγματα MB (Μοσχοφίλερο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) - MS (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A) τα επίπεδα του "Τριαντάφυλλου" είναι όμοια. Η διαφορά ανάμεσα στα δείγματα AB και AS (Ασύρτικο *S. cerevisiae* A) είναι εμφανής και επιβεβαιώνει την αύξηση που προκαλεί ο *H. vineae* στη συγκέντρωση των αρωμάτων τριαντάφυλλου. Το αποτέλεσμα αυτό συμπίπτει με το πείραμα των Del Fresno et al. (2020) στην ποικιλία Albarillo όπου ο εμβολιασμός με *H. vineae* αύξησε τα ανθικά αρώματα και τον χαρακτήρα "τριαντάφυλλο" σε μια ποικιλία με ουδέτερο ποικιλιακό προφίλ, που δεν εντοπίζεται ανθικός χαρακτήρας.



Γράφημα 14 Η αξιολόγηση της αρωματικής παραμέτρου "Μέλι" στα δείγματα Ασύρτικου και Μοσχοφίλερου από εξειδικευμένο πάνελ με βάση τους μέσους όρους από την ελεύθερη κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε. Στο γράφημα αποτυπώνονται και οι σταθερές αποκλίσεις με μορφή μπάρας για κάθε δείγμα.

Στο Γράφημα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της γευσιγνωσίας για την αρωματική παράμετρο "Μέλι". Στα δείγματα τους Ασύρτικου (AS-AB) δεν υπάρχει στατιστική απόκλιση, αντιθέτως στα δείγματα του Μοσχοφίλερου (MS-MB) υπάρχει απόκλιση στο δείγμα MB (Μοσχοφίλερο Both *H. vineae* + *S. cerevisiae* A) το οποίο έχει μειωμένο επίπεδο σε σχέση με το MS (Μοσχοφίλερο *S. cerevisiae* A). Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση με τα γηγενή είδη τα οποία επιβίωσαν σε αρκετά υψηλό ποσοστό έως τα 2/3 της ζύμωσης στο δείγμα MS.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά ο *H. vineae* αποτελεί είδος με δυνατότητα επικράτησης σε εν ζυμώσει γλεύκος αλλά και επιβίωσης στον ανταγωνισμό του *S. cerevisiae*. Αυτό καθιστά το είδος κατάλληλο για συν-εμβολιασμό με στελέχη του *S. cerevisiae* με τη δυνατότητα παραγωγής ποιοτικού οίνου, εφόσον επιλεγθεί η κατάλληλη ποικιλία, ώστε να υπάρχει αρωματική ισορροπία στο τελικό προϊόν. Ο διαδοχικός εμβολιασμός με *H. vineae* προσδίδει πολυπλοκότητα στον παραγόμενο οίνο, λόγω της εμφάνισης αρωμάτων ανθικού και γλυκού χαρακτήρα. Αυτή η επίδραση καθιστά το είδος ιδανικό για χρήση στην παραγωγή οίνων, καθώς μπορεί να αυξήσει κατά πολύ το αρωματικό δυναμικό και την πολυπλοκότητα του τελικού προϊόντος. Βέβαια η ένταση της επίδρασης καθιστά το είδος ιδανικό για τον εμβολιασμό μικρής ποσότητας από το συνολικό ολικό όγκο μιας ετικέτας (π.χ. μιας δεξαμενής) ώστε να παρουσιαστούν τα αρώματα τριαντάφυλλου και μελιού στο τελικό προϊόν, αλλά σε ελεγχόμενες ποσότητες, μέσω της ανάμειξης. Επιπλέον είναι ιδανικό είδος για ποικιλίες με χαμηλό αρωματικό δυναμικό οι οποίες χρησιμοποιούνται στη μαζική παραγωγή. Με τη χρήση του *H. vineae* μπορεί να αυξηθεί κατά πολύ το αρωματικό δυναμικό τέτοιων παραγωγών. Εν κατακλείδι γίνεται κατανοητό πως η αρωματική επίδραση του *H. vineae* είναι θετική και επιθυμητή και η χρήση του σε διαδοχικό εμβολιασμό μπορεί να ωφελήσει στη βιομηχανική παραγωγή οίνου.

Βιβλιογραφία

- Amerine, M. A., & Ough, C. S. (1988). *Methods for analysis of musts and wines*. (1st ed.).
- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., & Lombardi, A. (2000). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, 30(1), 5–9. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00589.x>
- Bartowsky, E. J. (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, 48(2), 149–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x>
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 107–119. <https://doi.org/10.5344/ajev.1999.50.1.107>
- Bonatsou, S., Paramithiotis, S., & Panagou, E. Z. (2018). Evolution of Yeast Consortia during the Fermentation of Kalamata Natural Black Olives upon Two Initial Acidification Treatments. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02673>
- Borren, E., & Tian, B. (2021). The Important Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to the Aroma Complexity of Wine: A Review. *Foods*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/foods10010013>
- Boulton Richard, and R. E. K., Vernon L. Singleton, Linda F. Bisson, & Ralph E. Kunkee. (2013). *Principles and Practices of Winemaking*. Springer Science & Business Media, . Springer Science & Busines.
- Ciani, M., & Comitini, F. (2011). Non-Saccharomyces wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Annals of Microbiology*, 61(1), 25–32. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0069-5>
- Ciani, M., & Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 1, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.07.001>
- Del Fresno, J. M., Escott, C., Loira, I., Carrau, F., Cuerda, R., Schneider, R., Bañuelos, M. A., González, C., Suárez-Lepe, J. A., & Morata, A. (2021). The Impact of Hanseniaspora vineae Fermentation and Ageing on Lees on the Terpenic Aromatic Profile of White Wines of the Albillo Variety. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2195. <https://doi.org/10.3390/ijms22042195>
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A.. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 49: 329-337. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 1, 329–337. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>
- Fleet GH. (2003). Yeast interactions and wine flavour. . *Int J Food Microbiol*, 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)
- Jackson, R. S. (2014). *Wine Science: Principles and Applications* (5th edition). Academic Press.
- Jolly, N., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. (2006). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *S. Afr. J. Oenol. Vitic.*, 27, 15–38. <https://doi.org/10.21548/27-1-1475>

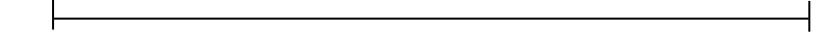
- López, V., Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E., Ramón, D., & Querol, A. (2003). A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, *81*(1), 63–71. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00194-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00194-0)
- Mančić, S., Stamenković Stojanović, S., Danilović, B., Djordjević, N., Malićanin, M., Lazić, M., & Karabegović, I. (2022). Oenological Characterization of Native *Hanseniaspora uvarum* Strains. *Fermentation*, *8*(3), 92. <https://doi.org/10.3390/fermentation8030092>
- Manzano, M., Medrala, D., Giusto, C., Bartolomeoli, I., Urso, R., & Comi, G. (2006). Classical and molecular analyses to characterize commercial dry yeasts used in wine fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(3), 599–607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02807.x>
- Martin, V., Valera, M. J., Medina, K., Dellacassa, E., Schneider, R., Boido, E., & Carrau, F. (2022). Application of *Hanseniaspora vineae* to improve white wine quality. In *White Wine Technology* (pp. 99–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823497-6.00004-1>
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*, *141*(3), 2513–2521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.056>
- Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, *262*(4), 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- P. Ribereau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Doneche, & A. Lonvaud. (2001). *Handbook of Enology The Microbiology of Wine and Vinifications* (2nd ed., Vol. 1).
- P. Ribereau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, & D. Dubourdieu. (2006). *Handbook of Enology The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments* (1st ed., Vol. 2).
- Padilla, B., García-Fernández, D., González, B., Izidoro, I., Esteve-Zarzoso, B., Beltran, G., & Mas, A. (2016). Yeast Biodiversity from DOQ Priorat Uninoculated Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00930>
- Rocha, S. M., Coutinho, P., Coelho, E., Barros, A. S., Delgadillo, I., & Coimbra, M. A. (2010). Relationships between the varietal volatile composition of the musts and white wine aroma quality. A four year feasibility study. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(10), 1508–1516. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.007>
- Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2012). Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, *112*(2), 302–315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05202.x>
- Xufre, A., Albergaria, H., Gírio, F., & Spencer-Martins, I. (2011). Use of interdelta polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* strains to monitor population evolution during wine fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *38*(1), 127–132. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0837-z>
- Zhang, B., Liu, H., Xue, J., Tang, C., Duan, C., & Yan, G. (2022). Use of *Torulaspora delbrueckii* and *Hanseniaspora vineae* co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* to improve aroma profiles and safety quality of Petit Manseng wines. *LWT*, *161*, 113360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113360>

Zhu, F., Du, B., & Li, J. (2016). Aroma Compounds in Wine. In A. Morata & I. Loira (Eds.), *Grape and Wine Biotechnology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/65102>

Παράρτημα

Αξιολογήστε στη μύτη τα παρακάτω δείγματα με τη χρήση ελεύθερης κλίμακας

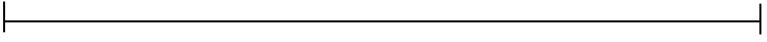
Αρωματική ένταση



Χαμηλή Υψηλή

Γράφημα 1. Η κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή του οργανοληπτικού ελέγχου των δειγμάτων

Ένα από τα ακόλουθα 3 δείγματα είναι διαφορετικό, απομονώστε το και αξιολογήστε με ελεύθερη κλίμακα την διαφορά.



Δεν Διαφέρουν
διαφέρουν πολύ

Γράφημα 2. Η κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του τριγωνικού τεστ