



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μελέτη της ικανότητας προσκόλλησης της ζύμης αλλοίωσης του οίνου  
*Brettanomyces bruxellensis*»**

**ΜΟΥΡΔΟΥΚΟΥΤΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ**

**Α.Μ. : 18685059**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:**

**Επίκουρη Καθηγήτρια ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ**

Αθήνα, 2024



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**

**SCHOOL OF FOOD SCIENCE**

**DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES**

**BACHELOR THESIS**

**“Study of adhesion ability by the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*”**

**MOURDOUKOUTAS NIKOLAOS**

**REGISTRATION NUMBER: 18685059**

**SUPERVISOR NAME & SURNAME:**

**Assistant Professor DIMOPOULOU MARIA**

Athens, 2024



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

**«Μελέτη της προσκόλλησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου από τη ζύμη αλλοίωσης του οίνου *Brettanomyces bruxellensis*»**

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

<b>Ψηφιακή υπογραφή επιβλέποντα καθηγητή (1<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	
<b>Ψηφιακή υπογραφή (2<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	
<b>Ψηφιακή υπογραφή (3<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	

## **ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο κάτωθι υπογράφων **ΜΟΥΡΔΟΥΚΟΥΤΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ** του **ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ**, με αριθμό μητρώου **18685059**, φοιτητή 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 31/12/2025 και έπειτα από αίτησή μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Ο Δηλών

Μουρδουκούτας Νικόλαος



**Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα Καθηγητή**

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ικανότητα προσκόλλησης και η δημιουργία βιοϋμενίων από αλλοιογόνους μικροοργανισμούς απασχολεί τη βιομηχανία τροφίμων λόγω των σημαντικών οικονομικών συνεπειών που μπορεί να επιφέρει. Πολλές φορές οι αντιμικροβιακοί τρόποι αντιμετώπισης δεν επαρκούν για την καταστολή των μεταβολικά ενεργών κυττάρων ενός βιοϋμενίου, επομένως η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού και του σχηματισμού διευκολύνει την έρευνα με στόχο την εύρεση νέων τρόπων αντιμετώπισης. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της ικανότητας προσκόλλησης τεσσάρων στελεχών της ζύμης αλλοίωσης *Brettanomyces bruxellensis*, K16Y7, K16Y17, D17Y7, A26Y7 σε ανοξείδωτη επιφάνεια καθώς και η ικανότητα των προσκολλημένων κυττάρων να προκαλούν αλλοίωση στον οίνο. Πιο συγκεκριμένα η ικανότητα προσκόλλησης μελετήθηκε σε διαφορετικές συνθήκες επώασης (μονοκαλλιέργεια της ζύμης, παρουσία γαλακτικών βακτηρίων, προσθήκη εμπορικής χιτοζάνης). Παράλληλα, μελετήθηκε και η ικανότητα των προσκολλημένων κυττάρων να παράγουν πολυσακχαρίτες. Στην συνέχεια επιλέχθηκαν δύο στελέχη με στατιστικά διαφορετική ικανότητα προσκόλλησης και αξιολογήθηκε η ικανότητά τους να προκαλούν αλλοίωση όταν εμβολιαστούν σε ελεύθερη και σε προσκολλημένη μορφή σε ερυθρό βιολογικό οίνο.

**Λέξεις κλειδιά:** *Brettanomyces bruxellensis*, βιοϋμένια, αλλοίωση οίνου, πολυσακχαρίτες, προσκόλληση, οργανοληπτική αξιολόγηση

## ABSTRACT

The adhesion ability and biofilm formation by spoilage microorganisms are of concern to the food industry due to the significant economic implications they can entail. Often, antimicrobial approaches are insufficient to suppress the viable cells of a biofilm, thus a better understanding of the mechanism and formation facilities research aimed at finding new treatment methods. The objective of this study was to evaluate the adhesion ability of four strains of the wine spoilage yeast *B. bruxellensis*. K16Y7, K16Y17, D17Y7, A26Y7, on stainless steel surfaces, as well as the ability of the adhered cell to cause wine spoilage. Specifically, adhesion ability was studied under different incubation conditions (monoculture of yeast, presence of lactic acid bacteria, addition of commercial chitosan). Additionally, the ability of adhered cells to produce polysaccharides was also investigated. Subsequently, two strains with statistically different adhesion abilities were selected, and their ability to cause spoilage when inoculated in free and adhered forms in red organic wine was evaluated.

**Key words:** *Brettanomyces bruxellensis*, biofilms, wine spoilage, polysaccharides , sensory analysis

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας προπτυχιακής μελέτης έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Οίνου αμπέλου και ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Με την ολοκλήρωση της παρούσης εργασίας, θα πρέπει να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη καθηγήτρια Δημοπούλου Μαρία, επιβλέπουσα καθηγήτρια της εργασίας για την άριστη συνεργασία, την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στη πρώτη μου εμπειρία και επαφή με τον τομέα της έρευνας. Νιώθω ιδιαίτερα τυχερός που υπήρξα μέλος της ομάδας της, καθώς μου δόθηκε η ευκαιρία και η ελευθερία να πειραματιστώ και να εκφράσω τις ιδέες μου χωρίς δισταγμό γύρω από μια επιστημονική έρευνα.

Δεν πρέπει να ξεχάσω να ευχαριστήσω εγκάρδια την υποψήφια Διδάκτωρ του Τμήματος Επιστημών Οίνου Αμπέλου και Ποτών, Τζαμουράνη Αικατερίνη, για τη στήριξη, την υπομονή της και την άμεση και πρακτική βοήθειά της σε κάθε στιγμή.

Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ στην συνάδελφο Μαζωνάκη Βασιλική για την άψογη συνεργασία μας μέσα στο χώρο του εργαστηρίου καθώς η αλληλοβοήθεια και η στήριξη της με βοήθησε να φέρω εις πέρας τις καθημερινές απαιτήσεις του πειράματος.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, που πάντα στέκεται δίπλα μου, περήφανη για κάθε μου βήμα, όπως και στους φίλους μου για τις συμβουλές, την κατανόηση και την αρωγή τους.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>5</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>1</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Οινοποίηση</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Οι μικροοργανισμοί του οίνου</b> .....	<b>2</b>
1.2.1. Η ζύμη αλλοίωσης <i>Brettanomyces bruxellensis</i> ( <i>Dekkera bruxellensis</i> ) .....	3
<b>1.3. Μικροβιακή αλλοίωση</b> .....	<b>5</b>
1.3.1. Μεταβολισμός και επιπτώσεις στον οίνο .....	5
<b>1.4. Τρόποι αντιμετώπισης</b> .....	<b>7</b>
1.2.1. Θειώδης ανυδρίτης (SO <sub>2</sub> ) .....	7
1.2.2. Χιτοζάνη .....	8
1.2.3. Δικαρβονικός διμεθυλεστέρας (DMDC).....	9
1.2.4. Αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών στον οίνο .....	10
<b>1.5. Βιοϋμένια</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Πολυσακχαρίτες.....	12
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>13</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1. Στελέχη μικροοργανισμών</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2. Θρεπτικά και Υλικά</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3. Ενεργοποίηση κυττάρων μικροοργανισμού</b> .....	<b>15</b>
<b>3.4. Προσκόλληση και ανάπτυξη βιοϋμενίου</b> .....	<b>16</b>
3.4.1 Προετοιμασία εμβολίου .....	16
3.4.2 Επιφάνεια και συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίου .....	16
3.4.3 Σχηματισμός βιοϋμενίου και ποσοτικοποίηση με την μέθοδο στροβιλισμού παρουσία γυάλινων σφαιριδίων (beads).....	17
<b>3.5. Προσδιορισμός πολυσακχαριτών</b> .....	<b>18</b>
2.5.1 Προετοιμασία δειγμάτων και παρασκευή πρότυπων συγκεντρώσεων γλυκόζης .....	18
Μέθοδος ανθρόνης και μέτρηση απορροφήσεων .....	19
<b>3.6 Οργανοληπτική αξιολόγηση</b> .....	<b>20</b>



3.7 Στατιστική ανάλυση .....	21
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>21</b>
4.1. Σχηματισμός βιοϋμενίων από διαφορετικά στελέχη <i>Brettanomyces bruxellensis</i> και η παραλλακτικότητά τους.....	21
4.1.1 Ικανότητα προσκόλλησης σε ανοξείδωτη επιφάνεια .....	21
4.2. Μελέτη βιοϋμενίου .....	24
4.2.1 Ικανότητα προσκόλλησης υπό διαφορετικές συνθήκες .....	24
4.2. Μελέτη ποσοτικοποίησης πολυσαχαριτών βιοϋμενικών κυττάρων.....	28
4.3. Οργανοληπτική δοκιμασία και αξιολόγηση χαρακτηριστικών των στελεχών <i>B. bruxellensis</i> σε οίνο.....	33
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>36</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>37</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Στάδια λευκής οينوποίησης .....	2
Εικόνα 2: <i>Brettanomyces bruxellensis</i> σε φάση αναπαραγωγής κυττάρων σε μούστο, θερμοκρασία 25°C. ....	5
Εικόνα 3: Αποκαρβοξυλίωση υδροξυκιναμικών οξέων προς παραγωγή ανεπιθύμητων φαινολών .....	6
Εικόνα 5: Μικροσκοπική παρατήρηση βιοϋμενίων του στελέχους K16Y17 (φακός x100) ...	11
Εικόνα 4: Συμπλέγματα κυττάρων <i>Brettanomyces bruxellensis</i> <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>	
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση βημάτων ενεργοποίησης κυττάρων.....	15
Εικόνα 7: Ανοξείδωτα κουπόνια .....	17
Εικόνα 8: Χημική αντίδραση πολυσακχαριτών με ανθρόνη παρουσία πυκνού διαλύματος H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	19
Εικόνα 9: Αλλαγή χρώματος μετά την αντίδραση.....	20
Εικόνα 10: Falcon 50mL.....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Αποκαρβοξυλίωση υδροξυκιναμικού οξέος προς παράγωγα αιθυλίου.....	5
Πίνακας 2: Παραγωγή πολυσακχαριτών από βιοϋμένια του είδους <i>B. bruxellensis</i> παρουσία <i>O. oeni</i> A6L1 .....	30
Πίνακας 3: Παραγωγή πολυσακχαριτών από βιοϋμένια του είδους <i>B. bruxellensis</i> παρουσία <i>O. oeni</i> VP41.....	31

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 4. 1: Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων (logCFU/mL) 4 στελεχών του <i>B. bruxellensis</i> στην επιφάνεια ανοξειδωτού ατσάλινου κουπονιού σε διάλυμα Ringer..	22
Διάγραμμα 4. 2: Επί τοις εκατό συσχέτιση προσκόλλησης κυττάρων παρουσία χιτοζάνης των τεσσάρων στελεχών <i>B. bruxellensis</i> . .....	24
Διάγραμμα 4 4: Επί τοις εκατό προσκόλληση κυττάρων των στελεχών <i>B. bruxellensis</i> πάνω σε ατσάλινη και ανοξειδωτή επιφάνεια κουπονιού και με παρουσία βακτηριακού στελέχους <i>O. oeni</i> (A6L1).....	27
Διάγραμμα 4.5: Συγκεντρωτικό διάγραμμα που παρουσιάζει τις επί τοις εκατό προσκολλήσεις κάθε στελέχους <i>B. bruxellensis</i> υπό διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίων.. .....	28
Διάγραμμα 4 6: Μέσοι όροι του λόγου EPS/log CFU που παράγουν τα κύτταρα κάθε στελέχους υπό μορφή βιοϋμενίων.....	29
Διάγραμμα 4 7: Μέσοι όροι του λόγου EPS/log CFU που παράγουν τα κύτταρα κάθε στελέχους υπό μορφή βιοϋμενίων.....	30
Διάγραμμα 4 8: Διαφοροποίηση δειγμάτων παρουσία <i>B. bruxellensis</i> . % επιτυχία απομόνωσης διαφοροποιημένου δείγματος κατά την τριγωνική δοκιμασία.....	35

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

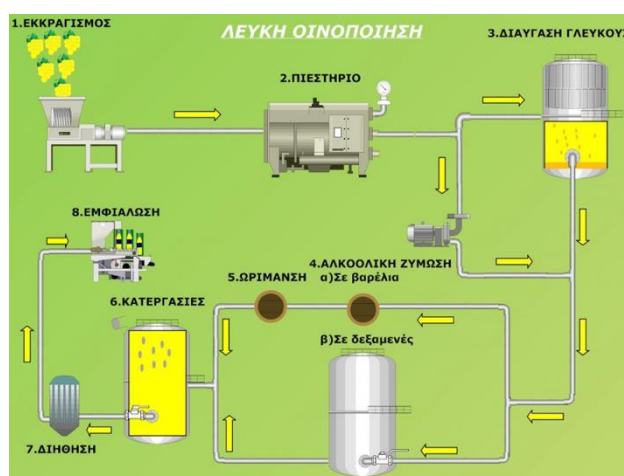
## 1.1. Οινοποίηση

Η οινοποίηση έχει εξελιχθεί σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Οι άνθρωποι έχουν ανακαλύψει νέες μεθόδους και τεχνικές για την παραγωγή του οίνου, εκμεταλλευόμενοι την εξέλιξη των επιστημών. Ένα από τα πιο κατασταλτικά στάδια της διαδικασίας παραγωγής είναι η αλκοολική ζύμωση, κατά την οποία τα σάκχαρα, γλυκόζη και φρουκτόζη, των σταφυλιών μετατρέπονται σε αιθυλική αλκοόλη, διοξείδιο του άνθρακα και ενέργεια. Ωστόσο, η ποιότητα του τελικού προϊόντος εξαρτάται επίσης και από τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν από τους οινολόγους, οι οποίοι βελτιστοποιούν το αποτέλεσμα για να παράγουν έναν οίνο υψηλής ποιότητας και ευχάριστο στην κατανάλωση. (P. Riberaeu- Gayon et al., 2001).

Η διαδικασία της οινοποίησης είναι πολυσύνθετη και περιλαμβάνει πολλά στάδια. Αρχικά, τα σταφύλια αφού πρώτα συλλεχθούν, πιέζονται για την απόσπαση του χυμού τους, ενώ στη συνέχεια γίνονται ενέργειες στον χυμό οι οποίες θα καθορίσουν το περιβάλλον ζύμωσης, όπως η προσθήκη οξέων για την μείωση του pH, θειώδους ανυδρίτη για τη προστασία του μούστου από οξειδώσεις και αλλοιώσεις, όπως και εκχυλίσες έτσι ώστε να διαλυτοποιηθούν στο χυμό πρόδρομες αρωματικές ενώσεις τις οποίες θα μεταβολίσουν οι ζυμομύκητες σε επόμενο στάδιο. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ο εμβολιασμός με κατάλληλο στέλεχος ζυμομυκήτων, εάν και εφόσον έχει επιλεγεί, ενώ ταυτόχρονα εξετάζεται το ενδεχόμενο προσθήκης αφομοιώσιμου αζώτου, ως θρεπτική ουσία, προκειμένου να αναπτυχθούν οι ζύμες ευκολότερα. Μετά τη προσαρμογή των ζυμών στο νέο περιβάλλον ξεκινάει η αλκοολική ζύμωση κατά την οποία ο έλεγχος της θερμοκρασίας για την βοήθεια του πολλαπλασιασμού των ζυμών, η ανάδευση των οινολασπών, η προσθήκη θρεπτικών και το οξυγόνο, είναι βασικοί παράγοντες που κρίνονται από τον οινολόγο έτσι ώστε να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες ζύμωσης (Bisson, 1999). Μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, ξεκινούν οι φυσικοχημικές κατεργασίες έτσι ώστε να επιτευχθεί η σταθεροποίηση του προϊόντος. Βασική ενέργεια είναι η θείωση που προσδίδει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιοξειδασική προστασία στον οίνο. Κατόπιν, προστίθεται μπετονίτης που φέρει αρνητικό φορτίο και καταφέρνει να δεσμεύσει

τις θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για το θόλωμα (πρωτεϊνικό θόλωμα) στον οίνο.

Συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα δημιουργούν μεγάλα συσσωματώματα τα οποία καθιζάνουν και απομακρύνονται υπό μορφή λάσπης (P. Ribéreau-Gayon et al., 2001). Τέλος για τη πλήρη σταθεροποίηση και ασφάλεια του εμφιαλωμένου οίνου, χρειάζεται να γίνει και τρυγική σταθεροποίηση. Το βασικό οξύ του σταφυλιού και του οίνου είναι το τρυγικό οξύ, όμως είναι ασταθές και αντιδρά με κατιόντα καλίου και ασβεστίου που υπάρχουν στο μέσο με αποτέλεσμα τη δημιουργία αλάτων τα οποία καθιζάνουν. Για τον παραπάνω λόγο, πριν την εμφιάλωση γίνεται ειδική κατεργασία έτσι ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση του ιζήματος αργότερα εντός της φιάλης. Τέλος, ακολουθεί η εμφιάλωση και η προώθηση του οίνου στην αγορά και στους καταναλωτές. Σημαντικό να σημειωθεί είναι το γεγονός πως το πιο καθοριστικό κριτήριο στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου, εκτός της ποικιλίας σταφυλιού που οινοποιείται, είναι η αλκοολική ζύμωση καθώς και το είδος ζυμομύκητα που την εκτελεί.



Εικόνα 1: Στάδια λευκής οινοποίησης

## 1.2. Οι μικροοργανισμοί του οίνου

Στο οινοποιείο, αυτοί οι μικροοργανισμοί προέρχονται από τα σταφύλια, τα οποία στην επιφάνεια των φλοιών τους φέρουν ένα μικροβιακό φορτίο κοντά στα  $10^3$  CFU/g (CFU= colony forming unit). Ωστόσο η μικροχλωρίδα είναι ιδιαίτερα μεταβαλλόμενη καθώς επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες, τις αμπελουργικές επεμβάσεις (χρήση σκευάσματος και

φυτοφαρμάκων) και φυσικά από την ανάπτυξη του ίδιου του καρπού. Οι μικροοργανισμοί που ακολουθούν την μεταβολική οδό της αλκοολικής ζύμωσης είναι οι ζυμομύκητες και ορισμένα βακτήρια. Το είδος αυτών των οργανισμών επηρεάζει τα παραγόμενα προϊόντα και τα αποτελέσματα της ζύμωσης.

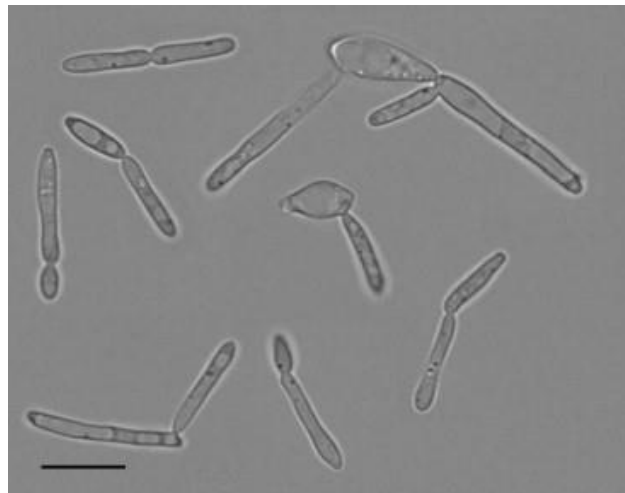
Με την συνεχή πρόοδο της επιστήμης της μικροβιολογίας και την εμβάθυνση στη μελέτη αυτών των οργανισμών, έχει προχωρήσει και η κατηγοριοποίησή τους σε διάφορα είδη, όπως τα *S. cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans* και *Hansienaspora uvarum*. Έχουν διεξαχθεί απομονώσεις αυτών των ειδών από φρούτα όπως το σταφύλι, τα κεράσια, τις ελιές, αλλά και από ποτά όπως η μύρα και το κρασί. Εκτός των ζυμών, έχουν απομονωθεί και πολλά είδη βακτηρίων από τα γένη *Acetobacter* (*A. Aceti*) και *Gluconobacter* (*G. Oxydans*), τα οποία ακολουθούν διάφορα μεταβολικά μονοπάτια για την παραγωγή οξικού οξέος. Άλλα είδη από βακτήρια που έχουν απομονωθεί είναι τα γαλακτικά όπως ο *Oenococcus oeni*. Αυτό το είδος εκτελεί, υπό κατάλληλες συνθήκες συνθήκες τη μηλογαλακτική μετατροπή του γένους *Lactobacillus*. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση λόγω της αύξησης της πτητικής οξύτητας. (Bartowsky, 2009). Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί είδη μυκήτων, όπως ο *Brettanomyces bruxellensis*, τα οποία εκδίδουν μη επιθυμητές αρωματικές ενώσεις, επηρεάζοντας αρνητικά τον χαρακτήρα του οίνου. Αυτά τα είδη μυκήτων επηρεάζουν τη χημική σύσταση και το τελικό αποτέλεσμα του οίνου με τον δικό τους τρόπο. Όλη η διαδικασία της αλλοίωσης ξεκινάει μόλις ο χυμός και τα σάκχαρα ελευθερώνονται από τη φλούδα του καρπού.

#### 1.2.1. Η ζύμη αλλοίωσης *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*)

Τα κύτταρα του *Brettanomyces bruxellensis* εμφανίζουν ποικιλία μορφολογιών, συμπεριλαμβανομένων των σφαιρικών, ελλειψοειδών και επιμήκων μορφών. Επιπλέον, είναι ικανά να σχηματίζουν ψευδομυκήλια (Smith et al., 2016). Αυτό το είδος, χαρακτηρίζεται από αργή ταχύτητα ανάπτυξης και μπορεί να αντέξει και να αναπτυχθεί κάτω από αντίξοες συνθήκες, όπως υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης σε επίπεδα 14,5-15%vol, χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών, παρουσία διοξειδίου του άνθρακα, χαμηλό pH. Ταυτόχρονα, έχει την δυνατότητα να αντιμετωπίζει χαμηλούς ρυθμούς μεταφοράς οξυγόνου (λιγότερο από 24mg O<sub>2</sub>/L/h) και οσμωτικό στρες (Agnolucci et al., 2017); (Ciani & Comitini, 2014); (Pinto et.al.,2020). Τέλος, σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης του, είναι το γεγονός ότι παρουσιάζει

ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις θειώδους ανυδρίτη και στο κυκλοεξαμίδιο, με ένα βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος να κυμαίνεται από 25-28 °C. Οι παραπάνω παράγοντες φαίνεται πως είναι οι λόγοι για τους οποίους το συγκεκριμένο είδος καταφέρνει να έχει τόση μεγάλη ανταγωνιστική ικανότητα με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς του οίνου. (Ciano & Comitini, 2014). Αρκετές έρευνες έχουν δείξει την υψηλή αντοχή του *B. bruxellensis* έναντι της έλλειψης θρεπτικών συστατικών (Uscanga et al., 2000), της παρουσίας αιθανόλης (Medawar et al., 2003), της διαδικασίας της κρυοεκχύλισης (cold maceration) (Renouf, Perello, Strehaiano, & Lonvaud-Funel, 2006), της θερμικής επεξεργασίας (Couto et al., 2005) και των τεχνικών απολύμανσης του οινοποιείου (Renouf et al., 2006). Επομένως, το συγκεκριμένο είδος ζύμης μπορεί να θεωρηθεί ως ένα από τα πιο προσαρμοστικά είδη ζυμών σε συνθήκες οινοποίησης. Αποτελεί έναν από στους μεγαλύτερους κινδύνους σε ένα οινοποιείο καθώς μπορεί να επιβιώσει σε στους στους επιφάνειες, συμπεριλαμβανομένων των τοίχων, των δεξαμενών ζύμωσης, στους πόρους του ξύλου, στο ταβάνι, στο πάτωμα. (Smith et al., 2016)

Το δεύτερο στάδιο κατά το οποίο ο *B. bruxellensis* μπορεί να αναπτυχθεί είναι μετά την αλκοολική ζύμωση, όπου ακολουθεί η μηλογαλακτική ζύμωση η οποία πραγματοποιείται από οξυγαλακτικά βακτήρια κυρίως του είδους *Oenococcus oeni* (Lonvaud-Funel, 1999). Συγκεκριμένα, ο πολλαπλασιασμός του τελευταίου, παρατηρείται συχνά όσο τα γαλακτικά βακτήρια βρίσκονται και αυτά σε φάση ανάπτυξης (Gerbaux et al., 2000). Έχει επίσης συσχετιστεί η διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης και της αναπτυσσόμενης βιομάζας του *B. bruxellensis*. Ειδικότερα, όσο μεγαλύτερη είναι η μηλογαλακτική ζύμωση, τόσο υψηλότερη παραγόμενη βιομάζα παρατηρείται και αυτό θα μπορούσε να είναι ένα αποτέλεσμα της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ βακτηρίων και μυκήτων ή μέσω έμμεσων αλληλεπιδράσεων (Renouf et al., 2005). Παρόλο που ο *B. bruxellensis* μπορεί να ανιχνευθεί σε κάθε στάδιο της οινοποίησης, συνήθως απομονώνεται μετά το τέλος της αλκοολικής και πριν την έναρξη της μηλογαλακτικής ή κατά την διάρκεια της ωρίμανσης στα βαρέλια. Αυτό γιατί οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη του καθώς δεν προστατεύεται από το θειώδες και ταυτόχρονα δεν υπάρχει ανταγωνισμός από άλλους μικροοργανισμούς.



*Εικόνα 2: Brettanomyces bruxellensis σε φάση αναπαραγωγής κυττάρων σε μούστο, θερμοκρασία 25°C.*

### 1.3.Μικροβιακή αλλοίωση

Η ανάπτυξη του συγκεκριμένου είδους στον οίνο μπορεί να αλλάξει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος λόγω της παραγωγής ανεπιθύμητων αρωμάτων. Αυτά τα ανεπιθύμητα αρώματα σχετίζονται με φαρμακευτικές, ζωικές οσμές. (Chatonnet & Boutou, 2006); (D Toro et al., 2015)

*Πίνακας 1: Αποκαρβοξυλίωση υδροξυκιναμικού οξέος προς παράγωγα αιθυλίου*

Κιναμικό οξύ	Υδροξυκιναμικό οξύ	Υδροξυστυρένια	Παράγωγα αιθυλίου
R = H →	p-κουμαρικό οξύ →	4-βινυλφαινόλη →	4-αιθυλφαινόλη
R = OCH <sub>3</sub> →	φερουλικό οξύ →	4-βινυλγκουαιακόλη →	4-αιθυλγκουαιακόλη
R = OH: →	καφεϊκό οξύ →	4-βινυλφαινόλη →	4-αιθυλκατεχόλη

#### 1.3.1 Μεταβολισμός και επιπτώσεις στον οίνο

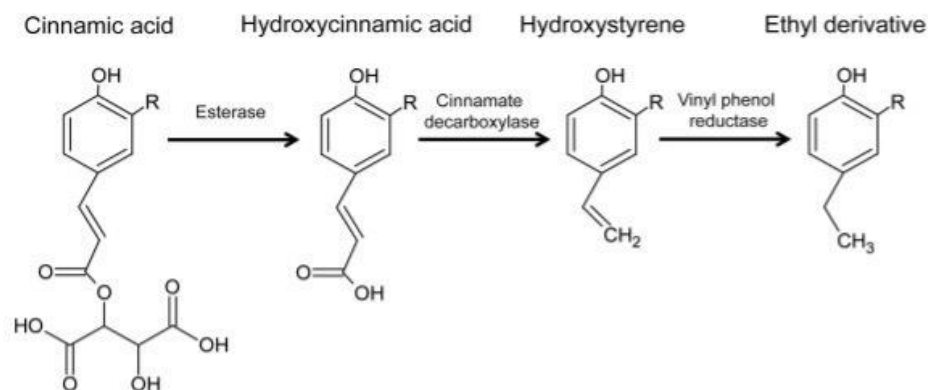
Αρκετά είδη μικροοργανισμός έχουν την ικανότητα να πραγματοποιήσουν αποκαρβοξυλίωση των υδροξυκιναμικών οξέων. Ένα από αυτά είναι και ο *Brettanomyces bruxellensis*, ο οποίος έχει την δυνατότητα αποξαρβοξυλίωσης του φερουλικού οξέος, του p-κουμαρικού οξέος και του καφεϊκού οξέος. Σημαντικό να αναφερθεί, είναι το γεγονός ότι αυτή την ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να την πραγματοποιήσει και το είδος *Saccharomyces*



*cerevisiae* όπως και διάφορα άλλα στελέχη ζυμομυκήτων και βακτηρίων. Το αποτέλεσμα αυτής της ενέργειας, είναι η παραγωγή υδροξυστυρενίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τα έντονα καπνιστά αρώματα, όπως επίσης και για τα χαρακτηριστικά αρώματα της επιμόλυνσης που αυτά με τη σειρά τους, θεωρούνται υπεύθυνα για την ανάπτυξη των φαινολικών ανεπιθύμητων οσμών και γεύσεων (αιθυλ-φαινόλες) στον οίνο. (Duncan A. N. Edlin et al., 1998).

Συγκεκριμένα αυτές οι ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των πτητικών φαινολών είναι οι: 4-αιθυλ-φαινόλη (4EP), 4-αιθυλ-γουαϊακόλη (4EG) και 4-αιθυλ-κατεχόλη (4EC) και μπορούν να παραχθούν από όλα τα στελέχη του συγκεκριμένου είδους υπό σωστές συνθήκες ανάπτυξης (Agnolucci et al., 2017; Butzke et al., 2010; Ciani & Comitini, 2014; Malfeito-Ferreira, 2014 ; Pinto et al., 2020 ; Smith & Divol, 2016; Smith, 2011; Steensels et al., 2015).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2, η παραγωγή των πτητικών φαινολών πραγματοποιείται σε 2 στάδια. Στο πρώτο στάδιο τα υδροξυκινναμικά οξέα αποκαρβοξυλιώνονται από μια κινναμική αποκαρβοξυλάση και σχηματίζονται υδροξυστυρένια. Συγκεκριμένα, η 4-βινυλφαινόλη παράγεται από το μεταβολισμό του p-κουμαρικού οξέος και η 4-βινυλγουαϊακόλη αντίστοιχα από το φερουλικό οξύ.



**Εικόνα 3:** Αποκαρβοξυλίωση υδροξυκινναμικών οξέων προς παραγωγή ανεπιθύμητων φαινολών (Oelofse et al., 2016).

Στη συνέχεια, κατά το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης πραγματοποιείται η αναγωγή των παράγωγων βινυλίου σε 4-αιθύλφαινόλη και 4-αιθυλγουαϊακόλη και 4-αιθυλκατεχόλη αντίστοιχα με την βοήθεια της αναγωγάσης της βινυλικής φαινόλης (Cibrario et al., 2020). Το δεύτερο στάδιο είναι εκείνο κατά το οποίο παράγονται οι αλλοιογόνες ενώσεις (ελεύθερες μορφές αιθυλίου παραμένουν πτητικές) και γίνονται αντιληπτές από τον καταναλωτή όταν όμως βέβαια η συγκέντρωση αυτών υπερβαίνει τα 400μg/L (Cibrario et al., 2020). Από

μικροβιολογική σκοπιά, αρκετοί μικροοργανισμοί έχουν την δυνατότητα να πραγματοποιήσουν το πρώτο στάδιο της αντίδρασης, όμως πολύ λίγα είδη εκτός του *Brettanomyces bruxellensis* είναι επιβεβαιωμένο πως πραγματοποιούν και το δεύτερο στάδιο.

Αυτές οι ενώσεις, δηλαδή τα αιθυλικά παράγωγα όπως η 4-αιθυλφαινόλη (4-EP) και η 4-αιθυλγκουαϊακόλη (4-EG), όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να προσθέσουν στοιχεία πολυπλοκότητας στο άρωμα του κρασιού. Ωστόσο, όταν η συγκέντρωση τους υπερβαίνει τα 400  $\mu\text{g/L}$ , επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις, δημιουργώντας ανεπιθύμητες αλλοιώσεις γνωστές και ως “Brett effect” που συχνότερα εμφανίζονται στα κόκκινα. Παράλληλα, στα λευκά, περιγράφονται ως «φαρμακευτικές» ενώ αντίθετα στα κόκκινα περιγράφονται ως «δέρμα», «ιδρώτας», «στάβλος», «ζωϊκά», «καπνιστό» και «πικάντικο» (Agnolucci et al., 2017; Ciani & Comitini, 2014; Cibrario et al., 2020; Fleet, 2011; Malfeito-Ferreira, 2014; Smith & Divol, 2016; Wedral et al., 2010). Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι παρατηρείται μείωση του φρουτώδους χαρακτήρα, παρουσίαση θολερότητας, καθώς και αλλοίωση στη γεύση η οποία ονομάζεται και ως “Mousy off flavours” ή αλλιώς “Mousiness” (Smith & Divol, 2016; Steensels et al., 2015). Όπως είναι φυσικό όσο μεγαλύτερη είναι η ανάπτυξη των κυττάρων, τόσο μεγαλύτερη είναι και η επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού.

#### 1.4. Τρόποι αντιμετώπισης

Ο οίνος αποτελεί ένα περιβάλλον ανάπτυξης που δεν είναι φιλόξενο για μικροοργανισμούς λόγω της έλλειψης θρεπτικών ουσιών, της υψηλής περιεκτικότητας σε αιθανόλη (10%-15% vol), των υψηλών επιπέδων θειώδους ανυδρίτη, το χαμηλό pH (3-4) και τέλος της έλλειψης οξυγόνου. Ταυτόχρονα κατά την οινοποίηση η θερμοκρασία για τους ερυθρούς οίνους παραμένει υψηλή (περίπου 22 °C) ενώ για τους λευκούς κυμαίνεται σε τιμές κοντά στους 16 °C. Για την αντιμετώπιση των μικροβιολογικών επιμολύνσεων, χρησιμοποιείται ο θειώδης ανυδρίτης, ο οποίο μπορεί να προστεθεί σε διαφορετικά στάδια κατά την οινοποίηση. Συγκεκριμένα, συνήθως προστίθεται κατά την συγκομιδή των σταφυλιών, κατά την σύνθλιψη των καρπών ή μόλις ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση με σκοπό την μείωση του κινδύνου οξειδωσης και αλλοίωσης μέσω της καταστολής γηγενών ζυμών και βακτηρίων. (Considine & Flankish 2014; Smith & Divol, 2016)

##### 1.2.1 Θειώδης ανυδρίτης (SO<sub>2</sub>)

Ο θειώδης ανυδρίτης αποτελεί τον βασικό σύμμαχο ενός οινοπαραγωγού προκειμένου να μπορεί να αντιμετωπίσει τις περισσότερες αλλοιώσεις από μικροοργανισμούς. Στη

προκειμένη περίπτωση του *B. bruxellensis*, πολλές έρευνες αποδεικνύουν την σημαντική επίδρασή του πάνω στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου μύκητα, ωστόσο γίνεται εκτεταμένη συζήτηση για το κατά πόσο μόνο η προσθήκη θειώδους αρκεί για την αντιμετώπισή του. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με κάποιες έρευνες (Barata et al. 2008) υποστηρίζεται πως ένα επίπεδο μοριακού θειώδους (mSO<sub>2</sub>) κοντά στο 1 mg/L είναι απαραίτητο για να περιοριστούν οι διανθίσεις του *B. bruxellensis* στον οίνο σε βαρέλια παλαίωσης, ενώ αντίθετα άλλες έρευνες (Curtis, et al.; 2015, Zuehlke & Edwards, 2013) φανερώνουν πως 0,6 mg/L και 0,4 mg/L, αποτελούν τις ελάχιστες απαιτούμενες ποσότητες για την μείωση της ανάπτυξης του αλλοιογόνου μύκητα. Γίνεται εύκολα κατανοητό λοιπόν πως η αποτελεσματική χρήση του θειώδους δεν είναι μια εύκολη υπόθεση καθώς η ανοχή του *B. bruxellensis* εξαρτάται από το στέλεχος και επίσης από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία και το pH (Zuehlke & Edwards, 2013). Σημαντικό να αναφέρουμε είναι το γεγονός πως η ζύμη μπορεί να αναπτυχθεί στην ωρίμανση των ερυθρών οίνων σε βαρέλια, όταν το mSO<sub>2</sub> είναι χαμηλό, (<0,5 mg/L) το pH υψηλό, (>3,8) και η θερμοκρασία κυμαίνεται σε τιμές υψηλότερες των 15 °C. (Benito et al., 2009).

### 1.2.2. Χιτοζάνη

Αποτελεί ένα υδρόφιλο βιοπολυμερές που παράγεται βιομηχανικά με την N-αποακετυλίωση της χιτίνης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας (Taillandier et al., 2015). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η χρήση της έχει εγκριθεί σχετικά πρόσφατα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αμπέλου και Οίνου-Internationale Organisation de la Vigne et du Vin (O.I.V). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά της, η χιτοζάνη μυκητιακής προέλευσης μπορεί να επηρεάσει τα κύτταρα του *B. bruxellensis* (Garcia et al., 2020; Taillandier et al., 2015) μέσω πέντε κύριων μηχανισμών:

- i. Μέσω αλληλεπιδράσεων των θετικά φορτισμένων μορίων χιτοζάνης και αρνητικά φορτισμένων μορίων των κυτταρικών τοιχωμάτων των μικροοργανισμών που έχουν ως αποτέλεσμα, αλλαγές στη δομή και την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας σε απώλεια ικανότητας επιβίωσης και στη συνέχεια σε θάνατο.
- ii. Η δράση της ως χηλικός παράγοντας που δεσμεύει επιλεκτικά ιχνοστοιχεία και στην συνέχεια αναστέλλει την μικροβιακή ανάπτυξη
- iii. Ανασταλτικός παράγοντας ενζύμων
- iv. Διεσδύει στο ενδοκυτταρικό υγρό των κυττάρων (κυτοσόλη), συνδέεται με το DNA, παρεμβάλλοντας στη σύνθεση mRNA και πρωτεϊνών (που μπορεί να βοηθούν την προσκόλληση)

- v. Δημιουργία ενός αδιαπέραστου πολυμερούς στρώματος στην επιφάνεια των κυττάρων ικανό να εμποδίσει την είσοδο των θρεπτικών σε αυτό (Garcia et al., 2020; Taillandier et al., 2015).

### 1.2.3. Δικαρβονικός διμεθυλεστέρας (DMDC)

Νέες έρευνες για την πρόληψη και αντιμετώπισης της ανάπτυξης έχουν πραγματοποιηθεί, όπως για παράδειγμα η χρήση του δικαρβονικού διμεθυλεστέρα. (DMDC).

Ο δικαρβονικός διμεθυλεστέρας είναι μία χημική ένωση με τύπο  $C_4H_6O_4$ . Χρησιμοποιείται συχνά ως πρόσθετο τροφίμων και συντηρητικό, κυρίως σε ποτά όπως κρασί, μηλίτης και χυμό φρούτων για να αναστείλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών επιβλαβούς για την ποιότητα του προϊόντος και να επεκτείνει τη διάρκεια ζωής του. Το DMDC λειτουργεί αφού πρώτα διασπαστεί σε μεθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα όταν προστίθεται σε ένα υγρό. Η μεθανόλη αντιδρά με παραγόμενα συστατικά από τους οργανισμούς, όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, διαταράσσοντας έτσι τη δομή και τη λειτουργία του κυττάρου με αποτέλεσμα το θάνατο των μικροοργανισμών. Λόγω της αποτελεσματικότητάς του και των χαμηλών απαιτήσεων δοσολογίας, το DMDC χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Ωστόσο, η χρήση του ρυθμίζεται και τα μέγιστα επίπεδα ποικίλουν ανάλογα με τη χώρα και τη συγκεκριμένη εφαρμογή σε τρόφιμα

Η επίδραση του DMDC δεν περιορίζεται στο *B. bruxellensis*. Σε σύγκριση με τα είδη που απαρτίζουν την μικροχλωρίδα της επιφάνειας του σταφυλιού (*Aureobasidium pullulans*, *Bulleromyces albus*, *R. mucilaginosa* και *Cryptococcus albus*), καθώς και τα είδη που είναι γνωστά για την συμμετοχή τους κατά το πρώτο στάδιο της οινοποίησης (*P.anomala*, *Candida stellata*, *Metschikowia fructicola*, κτλ), ο *B. bruxellensis* εμφανίζει μια ενδιάμεση αντίσταση στο DMDC. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, οι γηγενείς ζύμες (συμπεριλαμβανομένου και το *B. bruxellensis*) καθώς και οι *S. cerevisiae* επηρεάζονται από το DMDC. Ωστόσο η επίδραση του είναι προσωρινή. Σύμφωνα με έρευνες (Temple & Ough, 1978) εκτιμάται πως σε ένα αλκοολικό διάλυμα με 12%vol αιθανόλης και για ένα εύρος pH από 2,0 έως 6,0, τέσσερις ώρες είναι αρκετές για την υδρόλυση του DMDC σε διοξείδιο του άνθρακα ( $CO_2$ ) και μεθανόλη. Επομένως, το DMDC δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως προληπτικός παράγοντας, αλλά μόνο ως μέσο αντιμετώπισης κατά των μη επιθυμητών πληθυσμών που ήδη υπάρχουν στον οίνο. Αυτή η προσωρινή επίδραση μπορεί επίσης να θεωρηθεί και ως πλεονέκτημα. Έτσι, μετά την προσθήκη DMDC, είναι δυνατός ο επαναεμβολιασμός του μέσου με ένα εμπορικό στέλεχος για την ολοκλήρωση της ζύμωσης.

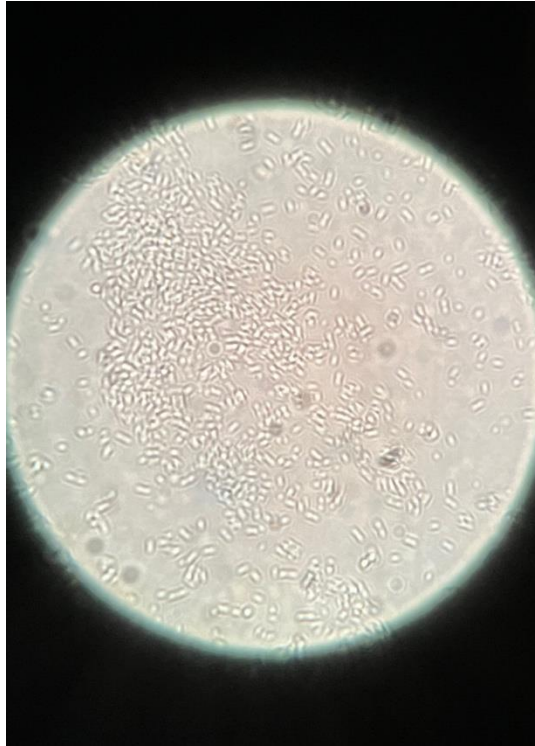
Αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποτραπεί η ανάπτυξη του *B. bruxellensis* όταν αυτός αναπτύσσεται ταυτόχρονα με τα υπόλοιπα στελέχη *S. cerevisiae* στην αρχή της ζύμωσης. Μετά το πέρας αυτής, η περίοδος της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι κρίσιμη για την ανάπτυξή του, (Renouf et al., 2005). Ωστόσο, ο *O. oeni* επηρεάζεται εξίσου, και η μηλογαλακτική μπορεί να καθυστερήσει ή να αποτραπεί εντελώς με την προσθήκη DMDC. (Renouf et al., 2007).

#### 1.2.4. Αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών στον οίνο

Οι συνεχείς αλληλεπιδράσεις, ανταγωνισμοί και συνεργασίες των μικροοργανισμών κατά την διάρκεια της οινοποίησης είναι ένα συχνό φαινόμενο που παρατηρείται τόσο μεταξύ των επιλεγμένων μικροοργανισμών που έχουν εμβολιαστεί όσο και των γηγενών (Pardo & Ferrer, 2019). Είναι αλήθεια πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζυμών και βακτηρίων δεν είναι απόλυτα γνωστές, καθώς εξαρτώνται και επηρεάζονται από μια αλυσίδα παραγόντων, όπως για παράδειγμα το είδος, το στέλεχος, την παραγωγή μεταβολιτών από τις ζύμες (αιθανόλη), την παρουσία θειώδη ανυδρίτη, θρεπτικά συστατικά του μέσου, το στάδιο οινοποίησης κ.α. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων παρατηρείται μια μεταβολή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος και άρα την αλλαγή στο προφίλ των αρωματικών ενώσεων του κρασιού (Pardo & Ferrer., 2019). Για παράδειγμα, υπάρχουν είδη ζυμομυκήτων που διεγείρουν την ανάπτυξη των βακτηρίων και άλλα που την αναστέλλουν ή την επιβραδύνουν. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων και πιθανή αναστολή της μηλογαλακτικής ζύμωσης και το αντίστροφο.

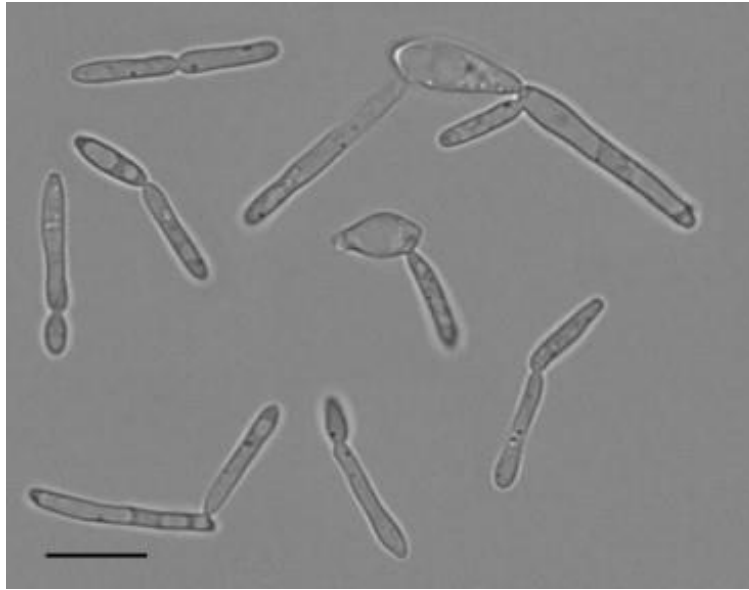
#### **1.5. Βιοϋμένια**

Τα βιοϋμένια αποτελούν πολυμερικά σώματα πολυμικροβιακής φύσης που συσχετίζονται με βιολογικές και μη βιολογικές επιφάνειες, δημιουργώντας πλήρεις κοινότητες. Αυτή η πολύπλοκη τρισδιάστατη δομή αποτελείται κυρίως από εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS), ενώ λιγότερο από το 10% της ξηρής μάζας ανήκει στους μικροοργανισμούς. Η δημιουργία των πολυμερών ουσιών (EPS) είναι περίπλοκη και περιλαμβάνει διάφορους πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες καθώς και γλυκολιπίδια και, σύμφωνα με πρόσφατα ευρήματα, υψηλές ποσότητες εξωκυτταρικού DNA (e-DNA) (Flemming & Wingender, 2010; Frølund et al., 1996).



**Εικόνα 5:** Μικροσκοπική παρατήρηση βιοϋμενίων του στελέχους K16Y17 (φακός x100)

Ο βιοϋμενικός τρόπος ζωής ορισμένων μικροοργανισμών, τους επιτρέπει να προσαρμοστούν καλύτερα στις περιβαλλοντικές συνθήκες μέσω της μεταβολικής αλληλοτροφίας, των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων και ειδικά, της χημικής και φυσικής αντοχής. Αυτή η στρατηγική ανάπτυξης, μέσω της κάλυψης επιφανειών και της αύξησης της αντοχής στο στρες, συμβάλλει στην επιμονή των μικροοργανισμών σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως αυτά που συναντώνται στη βιομηχανία τροφίμων (Bastard et al., 2016; Tek et al., 2018).



*Εικόνα 6: Συμπλέγματα κυττάρων Brettanomyces bruxellensis (From the Book “The Yeasts (Fifth Edition) 2<sup>nd</sup> Volume (2011), Maudy Th. Smith)*

Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα βιοϋμένια χρησιμοποιούνται για την αύξηση της απόδοσης των μικροοργανισμών, όπως για παράδειγμα στην παραγωγή αιθανόλης. (Germec et al., 2016), τη συμμετοχή σε διαδικασίες ζύμωσης και την αντοχή τους σε περιβάλλον κρασιού (Bastard et al., 2016; Tek et al., 2018). Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν μελετήσει την παρουσία των βιουμενίων, ιδίως όταν πρόκειται για αρνητικές επιπτώσεις λόγω του κινδύνου επανεμφάνισης μόλυνσης τροφίμων και πρώτων υλών από παθογόνα ή επιβλαβή είδη.

### 1.3.1. Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι μακρομοριακές δομές των υδατανθράκων, που δημιουργούνται από την σύνθεση απλών σακχάρων, (όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γαλακτόζη, ή δισακχαριτών όπως η σακχαρόζη και η λακτόζη) με γλυκοζιδικούς δεσμούς. Αυτές οι επαναλαμβανόμενες μονάδες μπορούν να δημιουργούνται είτε από διαφορετικούς μονοσακχαρίτες (ετεροπολυσακχαρίτες) είτε από την επανάληψη του ίδιου μονοσακχαρίτη (ομοιοπολυσακχαρίτες).

Τεκμηριωμένα πλέον τα βιοϋμένια συνδέονται με την παραγωγή πολυσακχαριτών, ειδικά στην περίπτωση των βακτηρίων. Οι πολυσακχαρίτες είναι η πρωταρχικό υλικό του EPS (extracellular Polymeric Substances) μαζί με νουκλεϊκά οξέα (eDNA και eRNA), πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα βιομόρια (Karygianni et al., 2020) και με αυτό το τρόπο συμμετέχουν στην

προσκόλληση των κυττάρων σε επιφάνειες. (Dimoroulou et al., 2021). Τέλος έχει παρατηρηθεί πως η παρουσία των β-γλυκανίων μπορεί να συνδέεται με την διαδικασία απελευθέρωσης των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων (β,1-6) όπως και των εκτεταμένων πολυσακχαριτών (β,1-4). Ταυτόχρονα αυτό το πολυμερές μπορεί να επηρεάσει την προσκόλληση κυττάρων, όπως μηλικά και γαλακτικά βακτήρια υπό βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες και επιφάνειες.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη έχει ως σκοπό την αξιολόγηση της ικανότητας προσκόλλησης τεσσάρων διαφορετικών στελεχών του αλλοιογόνου μικροοργανισμού *B. bruxellensis*, K16Y17, K16Y7, D17Y7 και A26Y7 σε διαφορετικές συνθήκες και την ικανότητα αλλοίωσης ερυθρού οίνου των προσκολλημένων κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα τα τέσσερα στελέχη εμβολιάστηκαν : 1) σαν μονοκαλλιέργεια 2) με παρουσία του βακτηριακού στελέχους *O. oeni* A6L1 3) με παρουσία του βακτηριακού στελέχους *O. oeni* VP41 4) με την προσθήκη εμπορικού σκευάσματος χιτοζάνης 20 g/hL. Στη συνέχεια, με τη χρήση του τεστ ανθρόνης ποσοτικοποιήθηκε η παραγωγή πολυσακχαριτών των βιοϋμενικών κυττάρων των στελεχών *B. bruxellensis*, όταν αυτά αναπτύσσονται πάνω σε ανοξειδωτο κουπόνι και όταν βρίσκονται παρουσία των δύο στελεχών *O. oeni* πάνω στο ίδιο μέσο ανάπτυξης. Τέλος, δύο στελέχη που παρουσίασαν στατιστική διαφορά στην ικανότητα προσκόλλησης σε ανοξειδοτη επιφάνεια, εμβολιάστηκαν σε βιολογικό ερυθρό σε ελεύθερη και προσκολλημένη μορφή. Οι τελικοί οίνοι αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά με δύο διαφορετικά τεστ.

## 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1. Στελέχη μικροοργανισμών

Στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζονται τα τέσσερα στελέχη της ζύμης *B. bruxellensis* που χρησιμοποιήθηκαν. Οι πληροφορίες αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1 Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή βρίσκονται αποθηκευμένα σε θερμοκρασία -20 °C μέσα σε φιαλίδια. Τα φιαλίδια περιείχαν ένα μείγμα, με 80% θρεπτικό υπόστρωμα YPD και 30% γλυκερόλη, για να προστατεύονται τα κύτταρα από τις αρνητικές συνθήκες. Επιπλέον, στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και 2 στελέχη από βακτηριακά στελέχη του είδους *Oenococcus oeni*, από τα οποία το ένα ήταν εμπορικό ενώ το άλλο είχε απομονωθεί προηγουμένως από οίνους αμέσως μετά από το πέρας αυθόρμητης αλκοολικής ζύμωσης.



*Πίνακας 1: Στελέχη μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν*

<b>Είδος</b>	<b>Στέλεχος</b>	<b>Οίνος Προέλευσης (Σοδειά)- Περιοχή</b>
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	K16Y17	Ξινόμαυρο (2020) - Γουμένισσα
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	K16Y7	Ξινόμαυρο (2020) - Γουμένισσα
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	D17Y7	Ξινόμαυρο (2017) - Νάουσα
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	A26Y7	Ασύρτικο (2020) - Πήλιο
<i>Oenococcus oeni</i>	A6L1	Ασύρτικο (2020) - Σαντορίνη
<i>Oenococcus oeni</i>	VP41	LALLEMANDE - Καναδάς

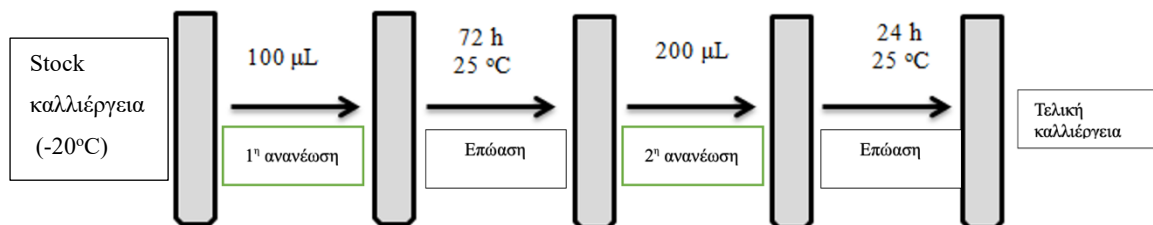
### 3.2 Θρεπτικά και Υλικά

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν υγρά και στερεά θρεπτικά υποστρώματα. Συγκεκριμένα, για τον πολλαπλασιασμό της ζύμης έγινε χρήση YPD Broth (σύσταση ανά λίτρο): 10 g εκχυλίσματος ζυμών (Laboratories Conda S.A., Madrid), 20 g βακτηριακή πεπτόνη (Laboratories Conda S.A., Madrid), 20 g άνυδρη D-γλυκόζη (Condalab S.A., Madrid), ενώ στο YPD άγαρ προστέθηκαν 20 g/L βακτηριακό άγαρ (Laboratoire Conda S.A., Madrid). Παράλληλα, η ανάπτυξη του βακτηρίου έγινε σε θρεπτικό υλικό MRS Broth (Laboratories Conda S.A., Madrid) και MRS άγαρ, 62 g/L (Conda S.A., Madrid). Οι πλύσεις των κυττάρων και οι δεκαδικές αραιώσεις έγιναν με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer (LAB M, U.K.)

### 3.3 Ενεργοποίηση κυττάρων μικροοργανισμού

Για την πρώτη καλλιέργεια, πραγματοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Προστέθηκαν 100  $\mu\text{L}$  από την αρχική καλλιέργεια ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) σε ένα μείγμα 10 mL YPD Broth. Έπειτα η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 72h κατά την διάρκεια των οποίων πραγματοποιήθηκε ανανέωση με την προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  από την πρώτη καλλιέργεια ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) σε ένα νέο μείγμα 10 mL YPD Broth. Τέλος, η τελική καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 24h, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση βημάτων ενεργοποίησης κυττάρων

### 3.4 Προσκόλληση και ανάπτυξη βιοϋμενίου

#### 3.4.1 Προετοιμασία εμβολίου

Πριν την έναρξη κάθε πειράματος, οι καλλιέργειες μετρήθηκαν φωτομετρικά στα 600 nm και όλα τα δείγματα αραιώθηκαν στην ίδια τελική οπτική πυκνότητα (OD:1). Ακολούθησε φυγοκέντριση στα 5000 g για 10 min στους 4 °C, χρησιμοποιώντας τον προσαρμοσμένο κεντροσφαιρικό προσυμπιεστή Thermo Biofuge Stratos Certifuge. Γίνεται έκπλυση του ιζήματος των κυττάρων 2 φορές με 5 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Τέλος, το ίζημα αναστάλθηκε στον κατάλληλο όγκο διαλύματος Ringer, έτσι ώστε ο πληθυσμός όλων των διαλυμάτων να αντιστοιχεί σε πυκνότητα  $10^7$  CFU/mL. Με αυτόν τον τρόπο προετοιμάστηκε και εμπλουτίστηκε το εμβόλιο.

#### 3.4.2 Επιφάνεια και συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίου

Για την μελέτη της προσκόλλησης και ανάπτυξης του βιοϋμενίου, επιλέχθηκαν κουπόνια από ανοξείδωτο ατσάλι (Stainless steel/SS coupons). Τα κουπόνια ήταν πλακίδια διαστάσεων 3 cm x 0,8 cm x 0,1 cm. Αυτά τα υλικά είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στην οινοποίηση καθώς τα εν λόγω κουπόνια προήλθαν από ανοξείδωτη δεξαμενή του οινοποιείου ΓΑΙΑ (Νεμέα). Τέλος, η επώαση των κουπονιών, πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 28 °C. Για την τοποθέτηση των κουπονιών, χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες. Αυτοί οι σωλήνες περιλάμβαναν τα κουπόνια, τα οποία αποστειρώθηκαν μαζί με 4,5 mL Ringer.



*Εικόνα 8: ανοξείδωτα κουπόνια*

Όσο αφορά τις αντιμικροβιακές τεχνικές χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer με προσθήκη εμπορικού σκευάσματος χιτοζάνης (Stab Micro, Esseco s.r.l. – Divisione Enartis, 28069 San Martino, Trecate NO Italy) με την εταιρεία να συνιστά 2-15 g/hL ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του κρασιού και το μικροβιακό φορτίο. Στη περίπτωση θεραπείας το περιθώριο χρήσης είναι τα 10-20 g/hL και ως εκ τούτου, στη πειραματική πορεία έγινε χρήση της σε συγκέντρωση 20 g/hL. Παράλληλα, η χρήση δυο γαλακτικών βακτηρίων του είδους *Oenococcus oeni* σε πληθυσμό  $10^7$  CFU/mL εμβολιάστηκαν μαζί με στελέχη του *B. bruxellensis*. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίων:

*Πίνακας 2: Παρουσίαση συνθηκών μελέτης*

Control	ΣΥΝΘΗΚΗ 1	ΣΥΝΘΗΚΗ 2	ΣΥΝΘΗΚΗ 3
<i>B. bruxellensis</i> D17Y7	+Χιτοζάνη	+ <i>O. oeni</i> VP41	+ <i>O. oeni</i> A6L1
<i>B. bruxellensis</i> A26Y7	+Χιτοζάνη	+ <i>O. oeni</i> VP41	+ <i>O. oeni</i> A6L1
<i>B. bruxellensis</i> K16Y7	+Χιτοζάνη	+ <i>O. oeni</i> VP41	+ <i>O. oeni</i> A6L1
<i>B. bruxellensis</i> K16Y7	+Χιτοζάνη	+ <i>O. oeni</i> VP41	+ <i>O. oeni</i> A6L1

#### 3.4.3 Σχηματισμός βιοϋμενίου και ποσοτικοποίηση με την μέθοδο στροβιλισμού παρουσία γυάλινων σφαιριδίων (beads)

Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας που περιείχε αποστειρωμένα κουπόνια ανοξειδώτου ατσαλιού και 4,5 mL Ringer, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία, υποβλήθηκε σε ενοφθάλμιση με 1 mL εμβολίου, προκειμένου να επιτευχθεί περίπου συγκέντρωση  $10^7$  CFU/mL.

Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα προσκόλλησής του πάνω στην επιφάνεια του κουπονιού, επομένως μετά τον εμβολιασμό τα δείγματα επώαστηκαν για 3h σε επωαστικό θάλαμο στους 28 °C ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων. Σε αυτό το στάδιο, έγινε μαζί με τον εμβολιασμό της ζύμης και εμβολιασμός του βακτηρίου 0,5 mL ή η προσθήκη χιτοζάνης με τις τελευταίες 2 ενέργειες να γίνονται ως προληπτικό μέσο. Μετά το πέρας των

3h, πραγματοποιήθηκε έκπλυση των κουπονιών με 2 mL Ringer ώστε να αποκολληθούν τα ελαφρώς προσκολλημένα κύτταρα και μεταφέρονται με προσοχή και με χρήση αποστειρωμένης λαβίδας εντός αποστειρωμένων σωλήνων falcon (15 mL) που περιέχουν 6 mL Ringer και ποσότητα γυάλινων σφαιριδίων (beads). Οι σωλήνες falcon φέρονται σε στροβιλισμό (vortex) για 2 min, με στόχο την αποκόλληση όλων των βιοϋμενικών κυττάρων από την επιφάνεια του κουπονιού. Στη συνέχεια, για την ποσοτικοποίηση των προσκολλημένων, γίνονται δεκαδικές αραιώσεις (σε αποστειρωμένο Ringer) από το εναιώρημα του δείγματος και λαμβάνονται 100  $\mu$ L του εναιωρήματος της κατάλληλης αραιώσης για την καταμέτρηση των ζυμών. Αυτή η ποσότητα, επιστρώθηκε σε τρυβλία Petri με υπόστρωμα YPD άγαρ και τα τρυβλία επώστηκαν στους 28 °C για το απαραίτητο χρονικό διάστημα ανάπτυξης κάθε στελέχους. Τέλος, έγινε απαρίθμηση των σχηματιζόμενων αποικιών των βιοϋμενικών κυττάρων, οι οποίες εκφράστηκαν σε δεκαδικό λογάριθμο CFU/mL.

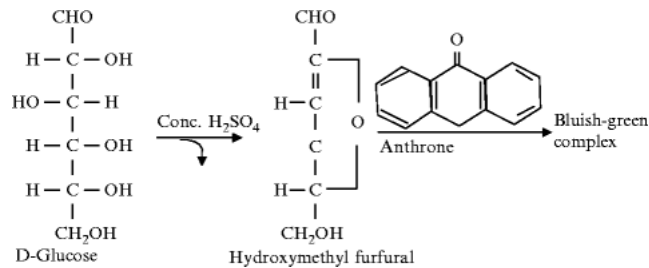
### **3.5. Προσδιορισμός πολυσακχαριτών**

#### 2.5.1 Προετοιμασία δειγμάτων και παρασκευή πρότυπων συγκεντρώσεων γλυκόζης

Για τον υπολογισμό της ποσότητας πολυσακχαριτών κάθε στελέχους με την παρουσία των γαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιείται ποσότητα (2 mL) εναιωρήματος από τα δείγματα των προσκολλημένων βιοϋμενίων τα οποία φυγοκεντρώνονται σε 10000 g/15min, στους 4 °C. Αφού γίνει η φυγοκέντρηση, λαμβάνονται 0,5 mL υπερκειμένου και προστίθεται ποσότητα 1,5 mL διαλύματος αιθανόλης-HCl (95%-5%) σε Eppendorf των 2 mL, τα οποία αφήνονται για 24h στους 4 °C προκειμένου να γίνει σωστότερα η κατακρύμνιση των πολυσακχαριτών. Μετά το πέρας των 24h, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση 18000 g/15 min στους 4 °C και στη συνέχεια απόχυση του υπερκειμένου με προσοχή. Έπειτα, προστίθεται 0,5 mL από διάλυμα 80% κρύας αιθανόλης και στη συνέχεια προσεκτική ανάδευση. Η πειραματική πορεία συνεχίζεται με ακόμα μια φυγοκέντρηση υπό τις ίδιες συνθήκες και αφού ολοκληρωθεί απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται αποστειρωμένο και υπερκαθαρό νερό HPLC και για ακόμα μια φορά πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Κατόπιν, πραγματοποιείται εκ νέου απόχυση του υπερκειμένου και τα δοχεία Eppendorf αφήνονται για ξήρανση τους 65 °C για 10-15 min. Τέλος τα δείγματα ενυδατώνονται με 0,5 mL ddH<sub>2</sub>O και αφήνονται σε ηρεμία για 5-10 min. Παράλληλα, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα γλυκόζης συγκεντρώσεων 0 mg/L, 12,5 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L και 100 mg/L. Η εξίσωση της ευθείας αυτών των συγκεντρώσεων, θα βοηθήσει στον υπολογισμό της ζητούμενης ποσότητας πολυσακχαριτών των δειγμάτων.

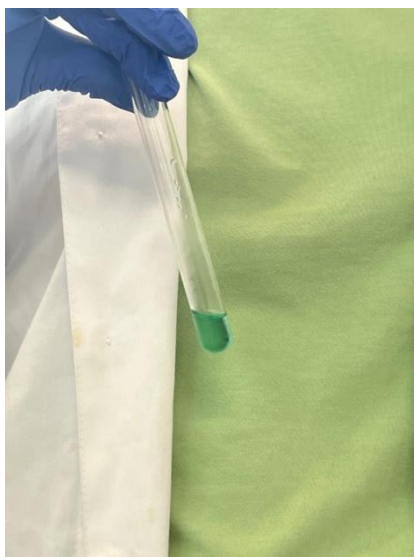
## Μέθοδος ανθρόνης και μέτρηση απορροφήσεων

Το τεστ της ανθρόνης είναι ένα γενικό τεστ για όλους τους υδατάνθρακες. Σε αυτό το τεστ, οι πολυσακχαρίτες αφυδατώνονται όταν αντιδρούν με πυκνό  $H_2SO_4$  για να σχηματιστεί φουρφουράλη. Η τελευταία αντιδρά με την ανθρόνη και παράγει ένα πράσινο-μπλε σύμπλοκο χρώματος.



*Εικόνα 10: Χημική αντίδραση πολυσακχαριτών με ανθρόνη παρουσία πυκνού διαλύματος  $H_2SO_4$ .*

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 0,5 mL δείγματος, μαζί με 1 ml διαλύματος ανθρόνης συγκέντρωσης 200 mg/ 100 ml το οποίο έχει διαλυθεί σε πυκνό διάλυμα  $H_2SO_4$ . Έπειτα τοποθετούνται τα σωληνάκια σε νερό υπό βρασμό για 5 min προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση και στη συνέχεια για τα επόμενα 5 min τα δείγματα αφήνονται σε πάγο έτσι ώστε να διακοπεί την χημική αντίδραση μεταξύ ανθρόνης και πολυσακχαριτών. Τέλος αφού παρατηρηθεί η αλλαγή χρώματος φασματοφωτομετρικά μετρείται η απορρόφηση κάθε δείγματος, σε μήκος κύματος  $A=625$  nm. Η ίδια ακριβώς διαδικασία γίνεται και για τα πρότυπα διαλύματα γλυκόζης μέσω της οποίας θα κατασκευαστεί στη συνέχεια η πρότυπη καμπύλη με την εξίσωσή της που στη συνέχεια θα βοηθήσει στον προσδιορισμό των πολυσακχαριτών των δειγμάτων.



*Εικόνα 12: Αλλαγή χρώματος μετά την αντίδραση και προσθήκης ανθρόνης*

### **3.6 Οργανοληπτική αξιολόγηση**

Ερυθρός βιολογικός οίνος από την Χαλκιδική των ποικιλιών Syrah, Cabernet Sauvignon και Λημιό 13,5% vol (ελάχιστης προσθήκης θειώδους) επιλέχθηκε έτσι ώστε να εξεταστεί το δυναμικό αλλοίωσης των προσκολλημένων κυττάρων στα κουπόνια, συγκριτικά με αυτή που μπορεί να προκληθεί από ελεύθερα κύτταρα τα οποία εμβολιάστηκαν κατευθείαν στον οίνο. Για την περάτωση του πειράματος και λαμβάνοντας υπόψιν τις στατιστικές διαφορές στις προσκολλήσεις των στελεχών, επιλέχθηκαν τα στελέχη D17Y7 και K16Y7. Ο πληθυσμός προσκόλλησης κυμαίνεται από  $10^3$ - $10^4$  CFU/mL. Η ίδια συγκέντρωση βιομάζας εμβολιάστηκε κατευθείαν στο μέσο (ερυθρός οίνος). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η προσκόλληση των κυττάρων (βλ. Ενότητα 3.4) και στην συνέχεια κάθε κουπόνι μεταφέρθηκε ασηπτικά σε falcon 50 mL με φρέσκο ερυθρό οίνο. Ταυτόχρονα σε άλλα σωληνάκια falcon 50 mL εμβολιάστηκε ποσότητα βιομάζας  $10^3$ - $10^4$  CFU/mL από τα ίδια στελέχη. Μάρτυρας στη προκειμένη περίπτωση, ήταν ο οίνος που επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες με τα κουπόνια απαλλαγμένο από κύτταρα. Όλα τα δείγματα αφέθηκαν για έναν μήνα σε σκιερό μέρος με σταθερή θερμοκρασία 20 °C.

Η αλλοίωση του οίνου μελετήθηκε με οργανοληπτική αξιολόγηση. Τα δείγματα με κωδικοποιημένους τριψήφιους αριθμούς παρουσιάστηκαν σε panel αποτελούμενο από 8 άτομα. Ζητήθηκε αρχικά να χαρακτηριστεί και να αξιολογηθεί η αρωματική ένταση κάθε

δείγματος χρησιμοποιώντας κλίμακα 10 σημείων, από χαμηλή (1) έως ισχυρή (10). Τα αρωματικά χαρακτηριστικά του κρασιού ήταν 7: i) Μαύρα φρούτα, ii) Κόκκινα φρούτα, iii) Βοτανικότητα, iv) Μπαχαρικά (spices), v) Ζωόδη, vi) Δέρμα/Ιδρώτας, vii) Φαρμακευτικά. Οι οίνοι τοποθετήθηκαν και δοκιμάστηκαν σε τυχαία σειρά από κάθε δοκιμαστή.



Εικόνα 13: Falcon των 50 mL

Στη συνέχεια, ακολούθησε μια τριγωνική δοκιμασία στην οποία το ίδιο panel κλήθηκε να εντοπίσει και να απομονώσει το δείγμα που διέφερε, κρίνοντας το μόνο από τα αρώματα. Τα δείγματα με διαφορετικούς κωδικοποιημένους τριψήφιους αριθμούς παρουσιάστηκαν με τυχαία σειρά στον καθένα από το panel.

### 3.7 Στατιστική ανάλυση

Για την αξιολόγηση της παρουσίας στατιστικά σημαντικών διαφορών καθ' όλη την αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA μέσω του στατιστικού προγράμματος (STATGRAPHICS, USA). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το Tukey's test και με γράμματα (a, b) απεικονίζονται οι εκάστοτε τιμές ως εκθέτες.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

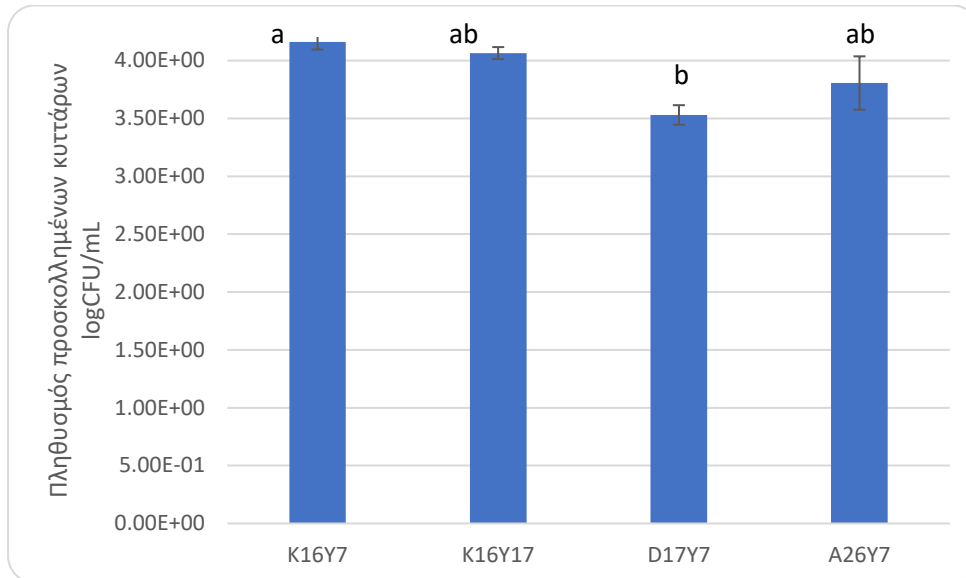
### 4.1. Σχηματισμός βιοϋμενίων από διαφορετικά στελέχη *Brettanomyces bruxellensis* και η παραλλακτικότητά τους

#### 4.1.1 Ικανότητα προσκόλλησης σε ανοξειδωτή επιφάνεια

Ένα από τα πρωταρχικά αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι η διαφορετική ικανότητας προσκόλλησης των διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους *B. bruxellensis*. Αυτό επιτεύχθηκε με την χρήση κουπονιών από ανοξειδωτο ατσάλι τα οποία



τοποθετήθηκαν μέσα σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer για 3h στους 28 °C. Στο διάγραμμα 3.1 παρουσιάζονται σε δεκαδικό λογάριθμο ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων κάθε στελέχους.



Διάγραμμα 4. 1: Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων (logCFU/ mL) 4 στελεχών του *B. bruxellensis* στην επιφάνεια ανοξείδωτου ασάλινου κουπονιού σε διάλυμα Ringer. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Οι τιμές με διαφορετικά λατινικά γράμματα (a,ab,b) διαφέρουν στατιστικά και προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA – tuckey’s test (Statgraphics software)

Από το παραπάνω Διάγραμμα 4.1 φαίνεται πως και τα 4 στελέχη έχουν την ικανότητα να προσκολληθούν επιτυχώς πάνω στις ανοξειδωτες επιφάνειες σε διάστημα 3h. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη θα μπορούσαν να χωριστούν στατιστικά σε 3 ομάδες που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ανάλογα με την προσκόλληση κυττάρων. Παρατηρείται πως στη πρώτη ομάδα a με την μεγαλύτερη ικανότητα προσκόλλησης είναι το στέλεχος K16Y7 ( $16 \pm 0,06 \text{ logCFU/mL}$ ), ακολουθούν στη ab ομάδα τα στελέχη K16Y17 ( $4,06 \pm 0,05 \text{ logCFU/mL}$ ), και A26Y7 ( $3,81 \pm 0,23 \text{ logCFU/mL}$ ) που δεν διαφέρουν ιδιαίτερος στατιστικά μεταξύ τους και παρουσιάζουν ομοιότητες με αυτά των ομάδων a και b και τέλος στην b ομάδα, το στέλεχος D17Y7 ( $3,53 \pm 0,08 \text{ logCFU/mL}$ ) με τη μικρότερη ικανότητα προσκόλλησης.

#### 4.1.1. Παραλλακτικότητα ως προς την ικανότητα προσκόλλησης εντός του είδους

Η παρούσα έρευνα εστίασε στην μελέτη της παραλλακτικότητας εντός του ίδιου είδους *B. bruxellensis*, ως προς την ικανότητα προσκόλλησης τεσσάρων διαφορετικών μεταξύ τους στελεχών. Από το παραπάνω Διάγραμμα 3.1 παρατηρείται διαφορετική ικανότητα προσκόλλησης για τα 4 στελέχη. Παρόμοια αποτελέσματα είναι αυτά από τους Joseph et al. 2007, όπου σύμφωνα με την έρευνα μόλις το 95% των στελεχών του ίδιου είδους μπορούν να προσκολληθούν σε επιφάνειες πολυστερενίου, υπό παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης σακχάρων και χωρίς να ληφθεί υπόψη τη γενετική ποικιλομορφία του είδους. Παρόμοια αποτελέσματα φαίνεται να υπάρχουν και από πρόσφατη έρευνα. Σύμφωνα με την έρευνα των Dimoroulou et al. 2021 εξετάστηκαν 11 διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους και παρατηρήθηκε εξίσου μια παραλλακτικότητα ως προς την ικανότητα προσκόλλησης παρουσιάζοντας ένα κοινό μεταβολικό αποτύπωμα. Το τελευταίο αποδείχθηκε για πρώτη φορά με χρήση φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Σε άλλες μελέτες με το είδος *B. bruxellensis*, όπως αυτή των Lebreux et al., 2020; Dimoroulou et al., 2019 αλλά και με το είδος *Saccharomyces cerevisiae* Bovo et al., 2018; Speranza et al., 2020 έχει παρατηρηθεί διαφοροποίηση στη δημιουργία βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα κατά Dimoroulou, τα στελέχη *B. bruxellensis* διέφεραν στις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης και λόγω αυτού μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ικανότητά τους να προσκολλώνται σε επιφάνειες και στην ικανότητα να δημιουργούν βιοϋμένια. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν διαφορετικούς μηχανισμούς προσκόλλησης με βάση τη γενετική ομάδα.

Με τον όρο «μεταβλητότητα στελέχους» (“strain variability”) αποδίδεται η έννοια των έμφυτων διαφορών μεταξύ στελεχών ενός είδους, τα οποία έχουν μεταχειριστεί με τον ίδιο τρόπο, οι οποίες βασίζονται σε γονοτυπικά ή φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η δημιουργία βιοϋμενίων αποτελεί ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό ενός είδους (Lianou et al., 2020)

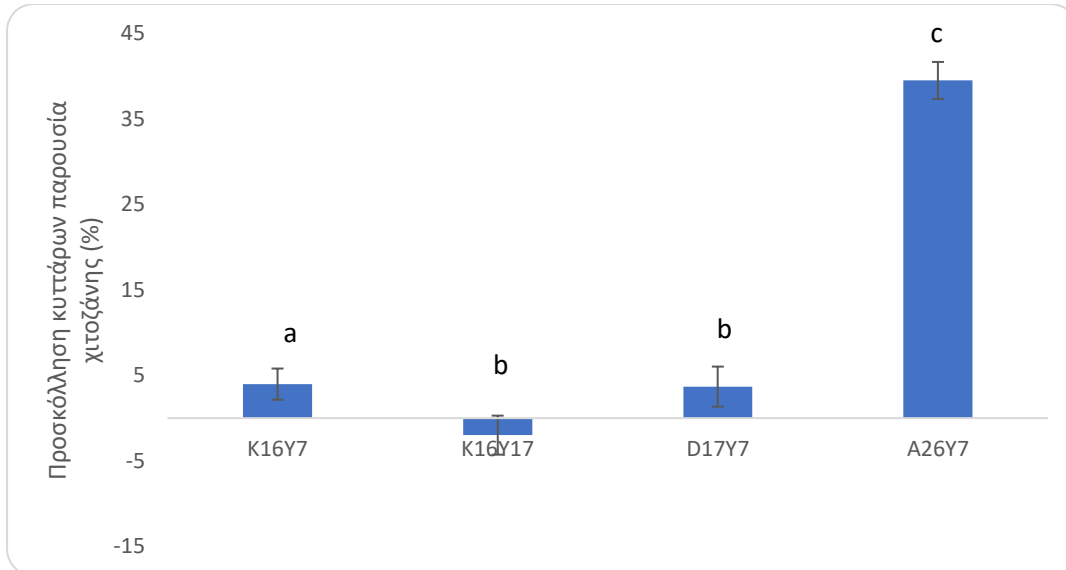
## 4.2. Μελέτη βιοϋμενίου

### 4.2.1 Ικανότητα προσκόλλησης υπό διαφορετικές συνθήκες

Αφού παρατηρήθηκε η προσκόλλησης και των τεσσάρων στελεχών πάνω σε ανοξειδωτες επιφάνειες, στη συνέχεια η έρευνα επικεντρώθηκε στην ικανότητας τους να δημιουργούν βιοϋμένια και να προσκολλώνται σε διαφορετικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η προσκόλληση κυττάρων σε ίδιες ανοξειδωτες επιφάνειες παρουσία: α) 20 g/hL χιτοζάνης, β) ανταγωνιστή εμπορικού γαλακτικού βακτηρίου *O. oeni* A6L1, γ) ανταγωνιστή γαλακτικού βακτηρίου *O. oeni* VP41. Σε όλες τις περιπτώσεις η ικανότητα προσκόλλησης μελετήθηκε για τη διάρκεια των 3h στους 28 °C.

#### α) Χιτοζάνη

Στο διάγραμμα 4.2 εμφανίζεται το ποσοστό προσκόλλησης των κυττάρων των 4 στελεχών *B. bruxellensis*. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η παράμετρος που μελετήθηκε εμφανίζει σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που περιείχαν χιτοζάνη και των δειγμάτων control (χωρίς χιτοζάνη). Συγκεκριμένα παρακάτω παρουσιάζεται η επί τοις εκατό συσχέτιση των παραπάνω:



Διάγραμμα 4. 2: Επί τοις εκατό συσχέτιση προσκόλλησης κυττάρων παρουσία χιτοζάνης των τεσσάρων στελεχών *B. bruxellensis*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση και κάθε λατινικό γράμμα (a.b.c) και προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA – tuckey's test (Statgraphics software)

Έπειτα από την παρατήρηση των παραπάνω αποτελεσμάτων γίνεται αντιληπτή μια ελαφρώς αυξητική τάση της προσκόλλησης των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα όμως, τα στελέχη χωρίζονται σε 3 ομάδες που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, ανάλογα

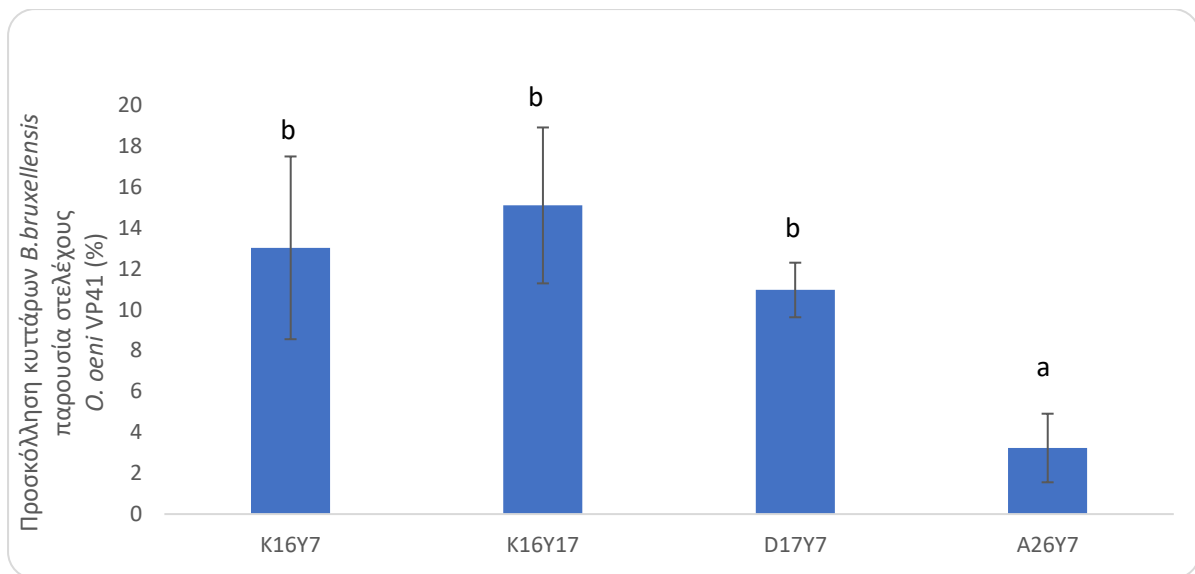
με την προσκόλληση. Στην πρώτη ομάδα a ανήκει το στέλεχος K16Y7 όπου παρουσιάζεται μια αύξηση της προσκόλλησης της τάξης του 4% ενώ στη συνέχεια στην ομάδα b ανήκουν τα στελέχη K16Y17 και D17Y7. Στο πρώτο στέλεχος έχει ενδιαφέρον να παρατηρηθεί το αρνητικό ποσοστό -2% που φανερώνει την αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης πάνω σε συγκεκριμένα στελέχη του ίδιου είδους ενώ αντίθετα στο D17Y7 φαίνεται πως για άλλη μια φορά η χιτοζάνη δρα βοηθητικά στην προσκόλλησης των κυττάρων. Τέλος, στην ομάδα c παρατηρείται μια αισθητή αύξηση 39% της προσκόλλησης του στελέχους A26Y7.

Σύμφωνα με έρευνες η οινολογική χρήση χιτοζάνης ως μέσο αντιμετώπισης μικροβιολογικών προβλημάτων είναι αποτελεσματική (Miot-Sertier et al., 2022) είτε μέσω της θανάτωσης κυττάρων, είτε ως μέσο πρόληψης και ελέγχου των πληθυσμών. Παρ'όλα αυτά, μελέτες όπως αυτή των Paulin et al., 2020 δείχνουν αξιόλογες διαφορές στη συμπεριφορά και την ευαισθησία μεταξύ των στελεχών του ίδιου είδους. Ταυτόχρονα, οι Taillandier et al., 2015 φανερώνουν πως τα διαφορετικά φορτία στα κυτταρικά τοιχώματα μπορούν να εμπλέκονται σε αυτές τις ποικιλομορφίες των αποτελεσμάτων της χρήσης χιτοζάνης, ενισχύοντας ή περιορίζοντας τις αλληλεπιδράσεις. Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης κατά του είδους *B. bruxellensis* δεν είναι ένας εύκολος μηχανισμός αλλά το αποτέλεσμα πολλαπλών μηχανισμών που δρουν ταυτόχρονα.

#### β) *O. oeni*

Συνεχίζοντας τη πειραματική διαδικασία για τους τρόπους αντιμετώπισης των σχηματιζόμενων βιοϋμενίων από τα στελέχη *B. bruxellensis* πραγματοποιήθηκε συν-εμβολιασμός με διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων. Για άλλη μια φορά εξετάστηκε η ικανότητα προσκόλλησης κυττάρων πάνω σε ανοιξείδωτα κουπόνια, με μέσο αποστειρωμένο διάλυμα Ringer (μάρτυρας) παρουσία δυο διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου *O. oeni* το VP41 και το A6L1 για τρεις ώρες στους 28 °C.

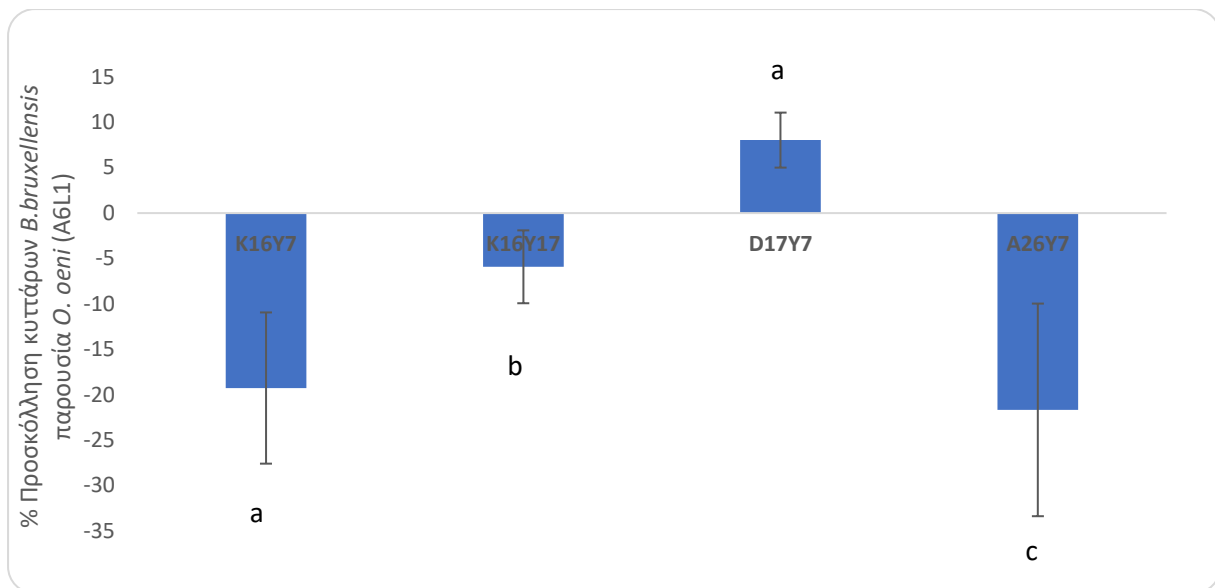
Παρακάτω εμφανίζεται το Διάγραμμα 4.3 στο οποίο παρουσιάζεται η % προσκόλληση των κυττάρων του κάθε στελέχους σύμφωνα με έναν αντίστοιχο μάρτυρα. Συγκεκριμένα, μάρτυρας αποτελεί το δείγμα στο οποίο δεν έχει γίνει συν-εμβολιασμός του μύκητα με το βακτήριο, αλλά υπάρχει μόνο το στέλεχος *B. bruxellensis* και έχουν ακολουθηθεί ακριβώς οι ίδιες συνθήκες επώασης.



Διάγραμμα 4.3. Επί τοις εκατό προσκόλληση κυττάρων των στελεχών *B. bruxellensis* πάνω σε ασόλινη και ανοξειδωτή επιφάνεια κουπονιού και με παρουσία βακτηριακού στελέχους *O. oeni* (VP41). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων ( $n=6$ ). Οι τιμές με λατινικά γράμματα (a,b) διαφέρουν στατιστικά και αναφέρονται στα προσκολλημένα κύτταρα. Προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA – tuckey's test (Statgraphics software)

Στο Διάγραμμα 4.3 φαίνεται πως η παρουσία του βακτηρίου υποβοηθά την προσκόλληση των κυττάρων *B. bruxellensis* ωστόσο παρατηρούνται κάποιες στατιστικές διαφορές, οι οποίες θα μπορούσαν να ομαδοποιηθούν σε 2 ομάδες. Αρχικά έχουμε την ομάδα (b) με την μεγαλύτερη αύξηση της προσκόλλησης όπου σε αυτή ανήκουν τα στελέχη: K16Y7 ( $13,03 \pm 4,47\%$ ), K16Y17 ( $15,1 \pm 3,81\%$ ) και το D17Y7 ( $10,97 \pm 1,34\%$ ). Αντίθετα, η ομάδα a απαρτίζεται από το στέλεχος A26Y7 ( $3,23 \pm 1,68\%$ ) το οποίο φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο από τα υπόλοιπα στελέχη με την παρουσία του βακτηρίου και γι' αυτό το λόγο η αύξηση της προσκόλλησης του είναι σαφέστατα μικρότερη και στατιστικά διαφορετική από αυτή των υπόλοιπων στελεχών. Το συγκεκριμένο στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου φαίνεται να μην έχει αποτρεπτικά αποτελέσματα πάνω στην ανάπτυξη βιοϋμενίων *B. bruxellensis* και προσκόλληση αυτών πάνω σε ανοξειδωτές επιφάνειες καθώς σε όλα παρουσιάζεται αύξηση της προσκόλλησης.

Στη συνέχεια της πειραματικής πορείας ακολουθήθηκε ακριβώς το ίδιο πρωτόκολλο προκειμένου να χρησιμοποιηθεί διαφορετικό στέλεχος *O. oeni* (A6L1) και παρακάτω στο Διάγραμμα 4.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.



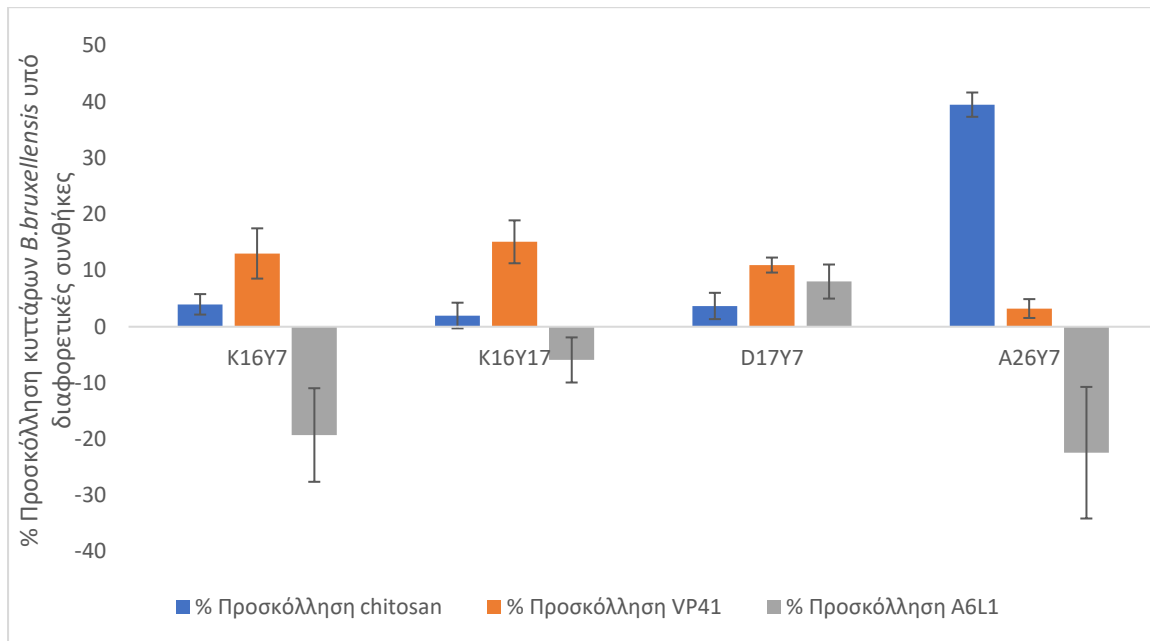
Διάγραμμα 4 3: Επί τοις εκατό προσκόλληση κυττάρων των στελεχών *B. bruxellensis* πάνω σε ατσάλινη και ανοξείδωτη επιφάνεια κουπονιού και με παρουσία βακτηριακού στελέχους *O. oeni* (A6L1). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων ( $n=6$ ). Οι τιμές με λατινικά γράμματα (a,b,c) διαφέρουν στατιστικά και προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA – tuckey's test (Statgraphics software)

Συγκριτικά με το προηγούμενο στέλεχος *O. oeni* παρατηρείται μια διαφορετική εικόνα. Καταρχάς, η ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με την τυπική απόκλιση μπορεί να γίνει σε 3 ομάδες. Στην ομάδα a φαίνεται να ανήκει το στέλεχος K16Y7 ( $-19,26 \pm 8,32\%$ ) όπως και το D17Y7 ( $8,03 \pm 3,03\%$ ). Παράλληλα, η ομάδα b απαρτίζεται από το στέλεχος K16Y17 ( $-5,91 \pm 4,01\%$ ) ενώ στην ομάδα c ανήκει μόνο το A26Y7 ( $-22,41 \pm 11,7\%$ ).

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, ένας εμβολιασμός με μηλογαλακτικά βακτήρια σε αρχικό στάδιο μετά την αλκοολική ζύμωση είναι επιθυμητός καθώς επιταχύνεται η μηλογαλακτική ζύμωση και ταυτόχρονα ελέγχεται ο πολλαπλασιασμός του *B. bruxellensis*. (Berbegal et al., 2017, 2018). Σύμφωνα με τους προηγούμενως αναφερθέντες ερευνητές αποδεικνύεται πως ο συνεμβολιασμός *S. cerevisiae* με *O. oeni* εμποδίζει την ανάπτυξη *B. bruxellensis* ωστόσο πρέπει να συνυπολογιστεί και η μειωμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

Συμπερασματικά, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα συγκεντρωτικά, φαίνεται πως ανάλογα με το στέλεχος του μύκητα, η αντίδραση του στις διαφορετικές επεμβάσεις διαφέρει από στέλεχος σε στέλεχος επομένως δεδομένου ότι η βιβλιογραφία γύρω από την βιοπροστασία έναντι των βιοϋμενίων είναι περιορισμένη, υπάρχει χώρος για περαιτέρω μελέτη

πάνω στις αλληλεπιδράσεις διαφορετικών εμπορικών στελεχών γαλακτικών βακτηρίων και του *B. bruxellensis*.

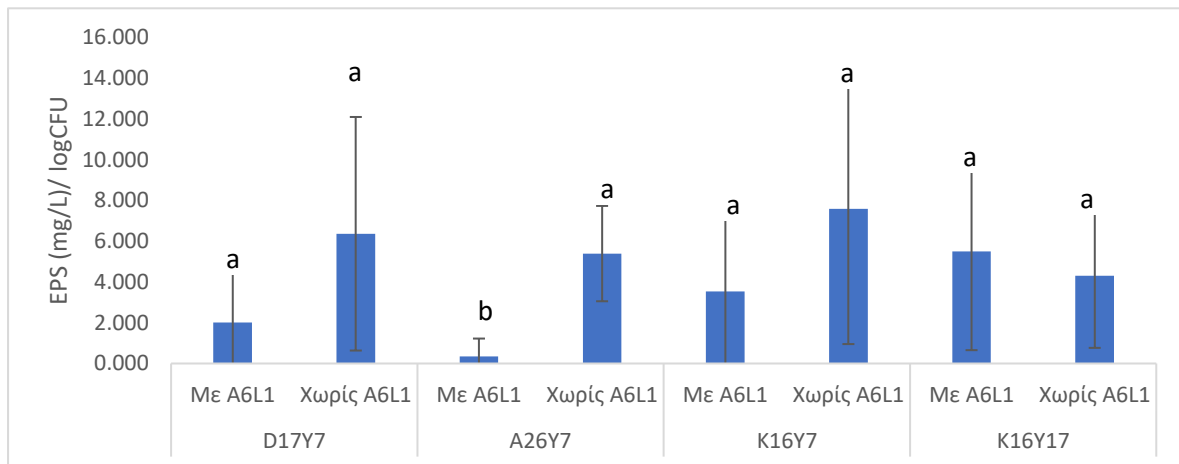


Διάγραμμα 4.4: Συγκεντρωτικό διάγραμμα που παρουσιάζει τις επί τοις εκατό προσκολλήσεις κάθε στελέχους *B. bruxellensis* υπό διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίων. Η τυπική απόκλιση εμφανίζεται με τη μορφή ράβδων σφάλματος μεταξύ των ανεξάρτητων επαναλήψεων.

#### 4.2 Μελέτη ποσοτικοποίησης πολυσαχαριτών βιοϋμενικών κυττάρων

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ποσότητας των παραγόμενων πολυσακχαριτών από τα βιοϋμενικά κύτταρα *B. bruxellensis*. Ειδικότερα, δείγματα των προσκολλημένων στο ανοξειδωτο ατσάλινο κουπόνι κυττάρων, μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να παράγουν πολυσακχαρίτες σε αντίξοες συνθήκες. Στο ακόλουθο Διάγραμμα 4.5 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των λόγων EPS/ logCFU που παράγει κάθε στέλεχος των

οποίων τα κύτταρα βρίσκονται σε μορφή βιοϋμενίου.



Διάγραμμα 4 5: Μέσοι όροι του λόγου EPS/ log CFU που παράγουν τα κύτταρα κάθε στελέχους υπό μορφή βιοϋμενίων. Η τυπική απόκλιση εμφανίζεται με τη μορφή ράβδων σφάλματος μεταξύ των ανεξάρτητων επαναλήψεων. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA.- Tuckey's test (Statgraphics software) και συμβολίζονται με λατινικά γράμματα (a,b).

Από το παραπάνω Διάγραμμα 4.5 φαίνεται πως στατιστικά τα στελέχη μεταξύ τους δεν έχουν μεγάλες διαφορές. Φαίνεται επίσης πως όταν τα στελέχη του μύκητα βρίσκονται χωρίς κάποιον ανταγωνιστή στο ίδιο περιβάλλον, παρουσιάζουν μια στατιστικά παρόμοια εικόνα παραγωγής πολυσακχαριτών. Ταυτόχρονα σχεδόν σε όλα τα στελέχη του μύκητα παρατηρείται μια μικρή μείωση της παραγωγής, όταν αυτός συν-εμβολιάζεται με στέλεχος *O. oeni* A6L1 και μεταξύ τους τα δείγματα δεν παρουσιάζουν στατιστική διαφορά. Το μόνο στέλεχος που εμφανίζει στατιστική διαφορά είναι το A26Y7 που όταν βρίσκεται μόνο του στο μέσο ανάπτυξης, παράγει πολυσακχαρίτες της τάξης του 5,40 EPS/ logCFU. Όταν όμως συνεμβολιαστεί με το γαλακτικό βακτήριο A6L1 παρουσιάζει μια παραγωγή 0,36 EPS/ logCFU κάτι που φανερώνει ενδεχομένως κάποιες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών. Αντίθετα, για το στέλεχος K16Y17 σημειώνεται μια μικρή αύξηση της παραγωγής πολυσακχαριτών, χωρίς να την διαφοροποιεί στατιστικά από τα υπόλοιπα δείγματα.

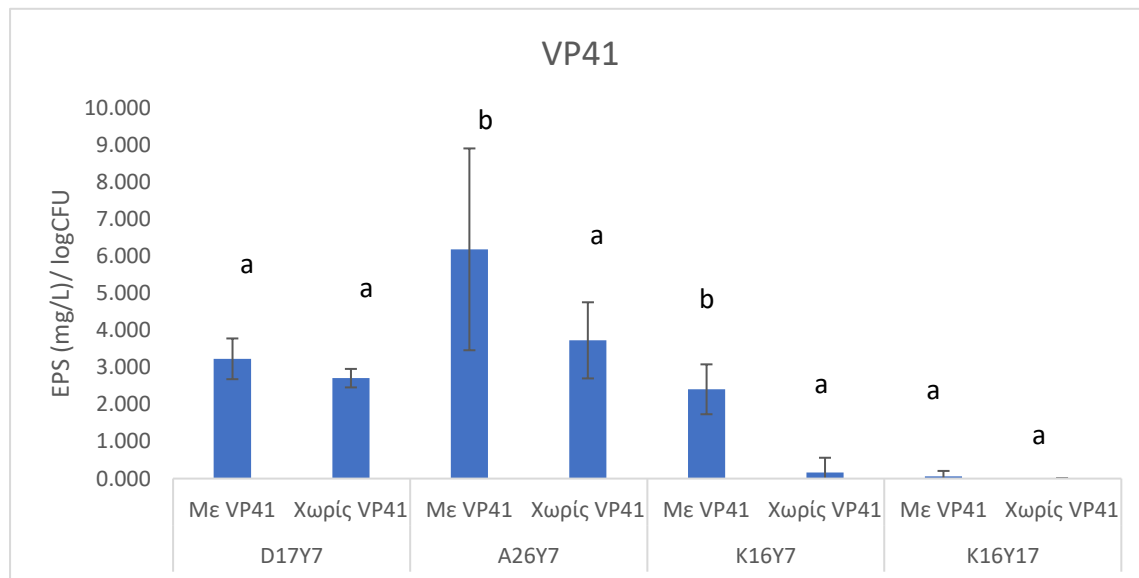


Στον παρακάτω πίνακα 2 εμφανίζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του λόγου EPS (mg/ L)/ logCFU:

**Πίνακας 2:** Παραγωγή πολυσακχαριτών από βιοϋμένια του είδους *B. bruxellensis* παρουσία *O. oeni A6L1*

<i>B. bruxellensis</i>				<i>B. bruxellensis</i> + <i>O. oeni A6L1</i>			
EPS (mg/L)/ logCFU				EPS (mg/L)/ logCFU			
D17Y7	A26Y7	K16Y7	K16Y17	D17Y7	A26Y7	K16Y7	K16Y17
6,371±5,73 <sup>a</sup>	5,40±2,34 <sup>a</sup>	7,60±6,63 <sup>a</sup>	4,30±3,54 <sup>a</sup>	2,02±2,42 <sup>a</sup>	0,36±0,87 <sup>b</sup>	3,54±3,89 <sup>a</sup>	5,51±4,86 <sup>a</sup>

Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε ακριβώς η ίδια πειραματική πορεία και για το άλλο στέλεχος γαλακτικού βακτηρίου VP41. Παρακάτω οι μέσοι όροι του λόγου EPS/logCFU:



**Διάγραμμα 4 6:** Μέσοι όροι του λόγου EPS/log CFU που παράγουν τα κύτταρα κάθε στελέχους υπό μορφή βιοϋμενίων. Η τυπική απόκλιση εμφανίζεται με τη μορφή ράβδων σφάλματος μεταξύ των ανεξάρτητων επαναλήψεων. Οι δείκτες συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές που προέκυψαν σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA.- Tuckey's test (Statgraphics software) και συμβολίζονται με λατινικά γράμματα (a,b).

Όπως εμφανίζεται και στο διάγραμμα 4.6 παρατηρείται μια διαφορετική εικόνα συγκριτικά με τα αποτελέσματα του προηγούμενου βακτηρίου. Στατιστικά ωστόσο η

ομαδοποίηση γίνεται πάλι σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα α υπάρχουν τα στελέχη: D17Y7 και K16Y17 στα οποία δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστική διαφορά είτε πραγματοποιηθεί συν-εμβολιασμός με *O. oeni* είτε όχι. Ωστόσο στο στέλεχος K16Y17 η παραγωγή πολυσακχαριτών τείνει στο μηδέν και στις δυο περιπτώσεις. Αντίθετα, για τα στελέχη A26Y7 και K16Y7, ομάδα β, σημειώνεται στατιστική διαφορά μεταξύ των συνθηκών. Σε γενικότερο πλαίσιο θα μπορούσε να ειπωθεί πως η παρουσία του *O. oeni* αυξάνει ελαφρώς την παραγωγή πολυσακχαριτών χωρίς βέβαια αυτό να αποτελεί ασφαλές συμπέρασμα καθώς βλέπουμε την μεταβλητότητα των στελεχών και πόσο διαφορετικά αντιδρούν σε παρόμοιες συνθήκες.

Στον παρακάτω πίνακα 3, σημειώνονται αναλυτικά οι τιμές του λόγου EPS/ logCFU:

*Πίνακας 3: Παραγωγή πολυσακχαριτών από βιοϋμένια του είδους B. bruxellensis παρουσία O. oeni VP41*

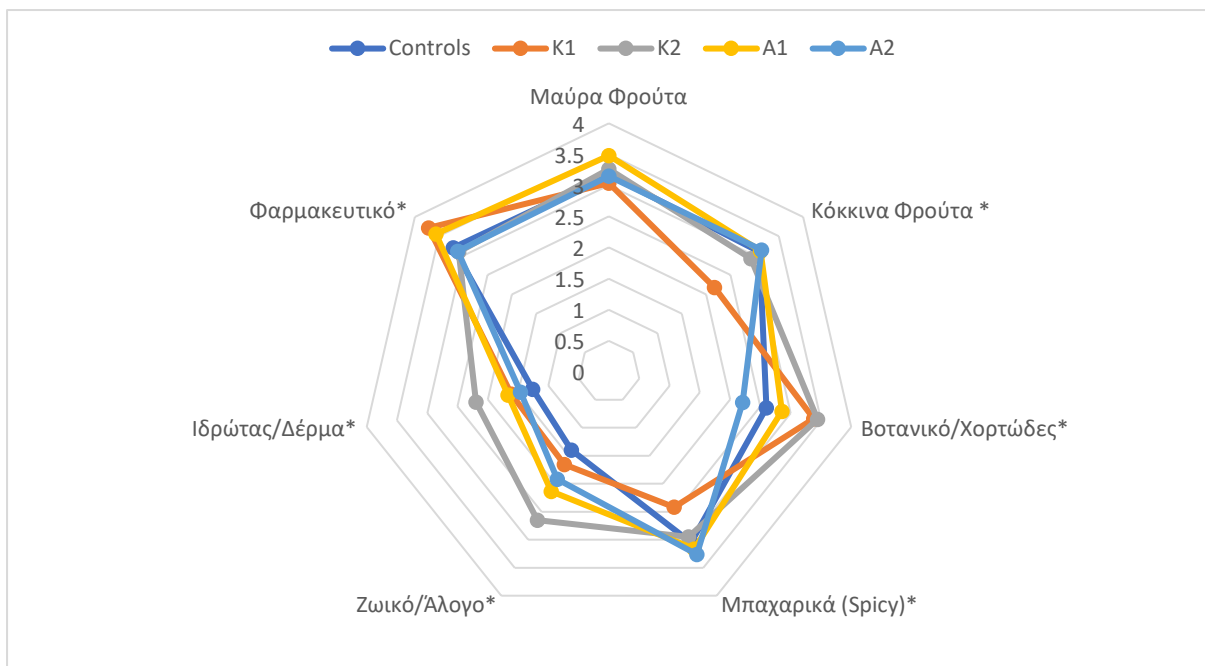
<i>B. bruxellensis</i>				<i>B. bruxellensis</i> + <i>O. oeni</i> VP41			
EPS (mg/L)/ logCFU				EPS (mg/L)/ logCFU			
D17Y7	A26Y7	K16Y7	K16Y17	D17Y7	A26Y7	K16Y7	K16Y17
2,70±0,25 <sup>a</sup>	3,73±1,03 <sup>a</sup>	0,16±0,4 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	3,23±0,55 <sup>a</sup>	6,18±2,72 <sup>b</sup>	2,41±0,67 <sup>b</sup>	0,06±0,15 <sup>a</sup>

Σημαντικό να αναφέρουμε είναι το γεγονός ότι οι πολυσακχαρίτες λειτουργούν ως είδος μοριακής κόλλας που επιτρέπει στα κύτταρα να προσκολληθούν σε επιφάνειες και να αντιστέκονται στις φυσικές πιέσεις που προκαλούνται από την κίνηση του υγρού μέσου. Αυτό επιτρέπει στα κύτταρα να παραμένουν συνδεδεμένα και να αντιστέκονται στον κίνδυνο διαχωρισμού από πηγή θρεπτικών συστατικών. (Limoli et al., 2014). Οι δομικές διαφορές του βιοϋμένιου οφείλονται στις διαφορές στη σύνθεση των πολυσακχαριτών, είτε αυτές είναι ποσοτικές ή ποσοτικές, είτε προκύπτουν από διακυμάνσεις στα σήματα μεταξύ των κυττάρων που συμμετέχουν στην ανάπτυξή του. (Lianou et al., 2020). Τέλος, ενώ δεν υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία γύρω από την παραγωγή πολυσακχαριτών από κύτταρα ζυμών, σύμφωνα με την μελέτη των Giovanni et al., 2010, παρατηρήθηκε ότι η απελευθέρωση πολυσακχαριτών αυξάνεται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης σακχάρων στον χυμό των σταφυλιών. Συγκεκριμένα, η απελευθέρωση πολυσακχαριτών ήταν περισσότερη σε συνθήκες stress, όπου τα κύτταρα ήταν λιγότερο βιώσιμα και ενεργώς μεταβολικά. Ωστόσο,

ένα στέλεχος απελευθέρωσε περισσότερους πολυσακχαρίτες σε βέλτιστες συνθήκες, όπου τα κύτταρα ήταν πιο βιώσιμα και ενεργώς μεταβολικά. Βάσει αυτών, υπάρχει πιθανότητα ότι τα στελέχη ζύμης απελευθέρωσαν διαφορετικό αριθμό πολυσακχαριτών μέσω διαφορετικών μηχανισμών του κυτταρικού τοιχώματος.

### 4.3 Οργανοληπτική δοκιμασία και αξιολόγηση χαρακτηριστικών των στελεχών *B. bruxellensis* σε οίνο

Ένας επιπλέον παράγοντας που μελετήθηκε ήταν το δυναμικό αλλοίωσης των προσκολλημένων κυττάρων στα κουπόνια, συγκριτικά με αυτή που μπορεί να προκληθεί από ελεύθερα κύτταρα τα οποία εμβολιάστηκαν κατευθείαν στον οίνο. Για την περάτωση του πειράματος και λαμβάνοντας υπόψιν τις στατιστικές διαφορές στις προσκολλήσεις των στελεχών, επιλέχθηκαν τα στελέχη D17Y7 και K16Y7. Ο πληθυσμός προσκόλλησης κυμαίνεται από  $10^3$ - $10^4$  CFU/mL. Μέσω της οργανοληπτικής αξιολόγησης έγινε προσπάθεια να αποτυπωθεί το διαφορετικό αρωματικό προφίλ που δημιουργείται σε έναν βιολογικό ερυθρό οίνο, όταν έχει επιμολυνθεί από το είδος *B. bruxellensis* και αν αυτός όταν δημιουργήσει βιοϋμένια μπορεί να αλλοιώσει το προϊόν με τέτοιο τρόπο, ώστε να γίνει αντιληπτό από τον καταναλωτή.

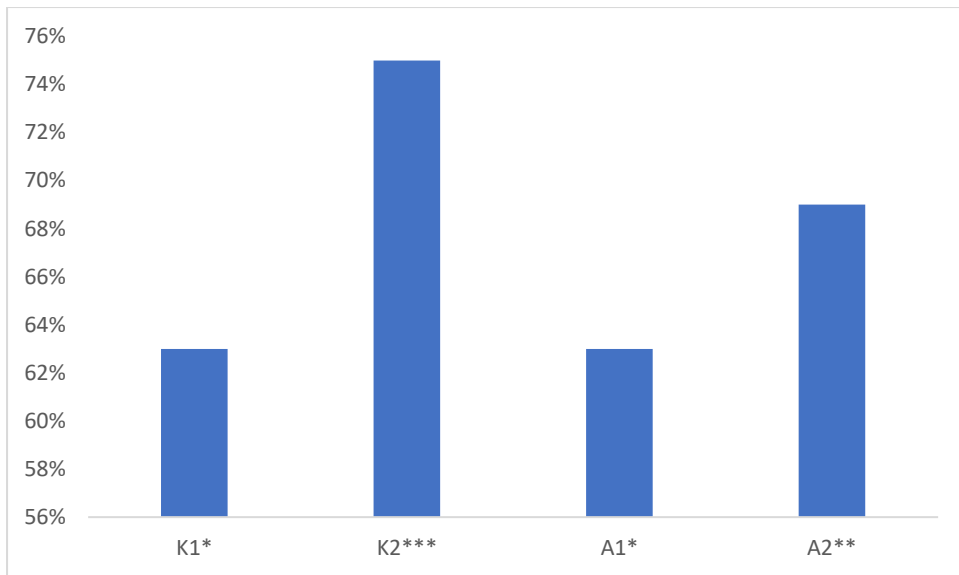


Διάγραμμα 4 7: Οργανοληπτική αξιολόγηση αρωματικής έντασης δειγμάτων. Όπου Controls=ερυθρό οίνο. Αντίθετα, K1= οίνος+ανοξείδωτο κουπόνι με προσκολλημένα κύτταρα D17Y7 και K2= οίνου ανοξείδωτο κουπόνι προσκολλημένα τα κύτταρα K16Y7. Παράλληλα A1=οίνος+ εμβολιασμένο ( $10^3$ - $10^4$  CFU/mL) το στέλεχος D17Y7 και A2=οίνος+εμβολιασμένο ( $10^3$ - $10^4$  CFU/mL) το στέλεχος K16Y7. Με αστερίσκο εμφανίζονται οι ομάδες αρωμάτων στις οποίες εμφανίζεται στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση One-way ANNOVA.- Tuckey's test (Statgraphics software).

Από το παραπάνω αραχνοειδές Διάγραμμα 4.7 και λαμβάνοντας υπόψη την αξιολόγηση του μάρτυρα (οίνος) από τους δοκιμαστές, φαίνεται πως οι ίδιοι σημείωσαν σχεδόν σε όλα τα χαρακτηριστικά διαφορές. Γενικά, δεν παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις ωστόσο σημαντικό

να αναφερθεί είναι το γεγονός πως τα δείγματα τα οποία είχαν επωαστεί μαζί με τα ανοξείδωτα κουπόνια φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ένταση στα χορτώδη και βοτανικά αρώματα σε σχέση πάντα με τον μάρτυρα. Επιπλέον, το δείγμα K2 σημειώνει διαφορά στα αρώματα που παραπέμπουν σε ζωικά χαρακτηριστικά όπως και σε δέρμα, τα οποία είναι και τα χαρακτηριστικά αρώματα του *B. bruxellensis* (βλ. Ενότητα 1.1.1) ενώ ταυτόχρονα η ελάττωση των αρωμάτων κόκκινων φρούτων φαίνεται χαρακτηριστικά. Επιπλέον, το στέλεχος D17Y7 είτε υπό ελεύθερη μορφή (A1), είτε υπό μορφή βιοϋμενίων (K1) παρουσιάζει μια ελαφριά αύξηση της έντασης των φαρμακευτικών αρωμάτων.

Στο Διάγραμμα 4.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της τριγωνικής δοκιμής που φανερώνουν τη διαφοροποίηση των δειγμάτων από τον μάρτυρα (ίδιος βιολογικός ερυθρός οίνος που χρησιμοποιήθηκε και ως μέσο ανάπτυξης των κυττάρων). Για τα δείγματα K-D17 (το δείγμα που είχε διατηρηθεί παρουσία κουπονιού από ανοξείδωτο ατσάλι με προσκολλημένα κύτταρα του στελέχους *B. bruxellensis*-D17Y7), K-K7 (το δείγμα που είχε διατηρηθεί παρουσία κουπονιού από ανοξείδωτο ατσάλι με προσκολλημένα κύτταρα του στελέχους *B. bruxellensis*-K16Y7. Επιπροσθέτως, τα D17 και K7 χαρακτηρίζονται τα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί και διατηρηθεί με ελεύθερα κύτταρα από τα στελέχη *B. bruxellensis* D17Y7 και K16Y7, αντίστοιχα. Η τριγωνική δοκιμή αποκάλυψε ότι σε όλες τις περιπτώσεις, οι οίνοι που είχαν εμβολιαστεί είτε με ελεύθερα κύτταρα είτε σε μορφή βιοϋμενίων παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) το αρωματικό προφίλ του οίνου. Το στέλεχος K16Y7 παρουσίασε πιο υψηλή διαφοροποίηση συγκριτικά με τον μη επιμολυσμένο οίνο (μάρτυρας) με ποσοστό 75% και 69% όταν το εμβόλιο ήταν προσκολλημένα κύτταρα σε κουπόνι και ελεύθερα κύτταρα, αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό επικυρώνει την προηγούμενη παρατήρησή μας ότι αυτό το στέλεχος επιδρά στην απελευθέρωση ζωικών χαρακτηριστικών και μυρωδιά δέρματος. Τέλος, το στέλεχος D17Y7 είχε επίσης ευκρινή διαφοροποίηση με ποσοστό 63% και στις δύο περιπτώσεις (ελεύθερα και προσκολλημένα κύτταρα). Επίσης, τα αποτελέσματα της τριγωνικής δοκιμής συνάδουν με αυτά της περιγραφικής οργανοληπτικής ανάλυσης καθώς και εκεί τα χαρακτηριστικά που έχουν συνδεθεί βιβλιογραφικά με την επίδραση του *B. bruxellensis* είναι λιγότερο έντονα παρουσία του στελέχους D17Y7. Επίσης, δεν διαφοροποιείται στατιστικά η επίδραση μεταξύ προσκολλημένων και ελεύθερων κυττάρων.



Διάγραμμα 4 8: Διαφοροποίηση δειγμάτων παρουσία *B. bruxellensis*. % επιτυχία απομόνωσης διαφοροποιημένου δείγματος κατά την τριγωνική δοκιμασία. Όπου K- = το δείγμα που είχε επωαστεί παρουσία κουπονιού από ανοξείδωτο ασάλι, προσκολλημένα κύτταρα D1Y7(K1) του στελέχους *B. bruxellensis*, K16Y7(K2). Όπου A- = εμβολιασμός με κύτταρα του στελέχους *B. bruxellensis* D17Y7 (A1) και K16Y7 (A2). Με αστερίσκο επισημαίνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (one-way ANOVA, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,001$ ).

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ζύμης αλλοίωσης του οίνου *B. bruxellensis* αποτελεί ένα πολυδιάστατο θέμα ερευνητικής μελέτης. Σημαντικό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου είδους είναι η μεγάλη αντοχή που παρατηρείται στις αντίξοες οινολογικές συνθήκες καθώς επίσης και η υψηλή επιβίωσή της σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Η ικανότητα της να προσκολλάται σε οινολογικές επιφάνειες αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς της ζύμης αλλοίωσης να προσαρμόζεται και να επιμολύνει στη διάρκεια παραγωγής του οίνου, συνεπώς η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την ικανότητά αυτή είναι υψηλής σημασίας. Με βάσει την παρούσα μελέτη αποδείξαμε ότι η παραλλακτικότητα του είδους *B. bruxellensis* δεν παρατηρείται μόνο στην ικανότητα προσκόλλησης των στελεχών αλλά και στην παρουσία οινολογικών stress, που εφαρμόζονται από τους οινοπαραγωγούς παγκοσμίως. Το κάθε στέλεχος της ζύμης αλλοίωσης φαίνεται να επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο και πολλές φορές να αυξάνεται ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων ανάλογα με το στέλεχος του βακτηρίου που θα συνεμβολιαστεί ή την παρουσία χιτοζάνης. Παράλληλα δείξαμε για πρώτη φορά ότι ικανότητα αλλοίωσης δεν έχουν μόνο τα ελεύθερα κύτταρα της ζύμης αλλά και τα προσκολλημένα. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η αντιμετώπιση του συγκριμένου είδους ζύμης είναι πολύπλοκη και σίγουρα όχι καθολική λόγω της υψηλής παραλλακτικότητας που παρουσιάζει και συνάμα του υψηλού δυναμικού αλλοίωσης ακόμη και σε διαφορετικές μορφές.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agnolucci, M., & al, e. (2017). *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: an impact on wine and winemaking. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-017-2235-y>
- Avramova, M., Cibrario, A., Peltier, E., Coton, M., Coton, E., Schacherer, J., Spano, G., Capozzi, V., Blaiotta, G., Salin, F., Dols-Lafargue, M., Grbin, P., Curtin, C., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I. (2018). *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. Scientific Reports, 8, 4136. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>
- Barata et al., (2008). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulfur dioxide, International Journal of Food Microbiology, Volume 121, Issue 2, pages 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.020>.
- Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J., Weidmann, S. (2016). Effect of Biofilm Formation by *Oenococcus oeni* on Malolactic Fermentation and the Release of Aromatic Compounds in Wine. Frontiers in Microbiology, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00613>
- Bartowsky, E.J. (2009) Bacterial Spoilage of Wine and Approaches to Minimize It. Letters in Applied Microbiology, 48, 149-156. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x>
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., Suárez-Lepe, J. A. (2009). Factors affecting the hydroxycinnamate decarboxylase/vinylphenol reductase activity of *Dekkera/B. bruxellensis*: application for *Dekkera/B. bruxellensis* control in red wine making.
- Berbegal, C., Garofalo, C., Russo, P., Pati, S., Capozzi, V., Spano, G. (2017). Use of Autochthonous Yeasts and Bacteria in Order to Control *Brettanomyces bruxellensis* in Wine. Fermentation, 3, 65. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040065>
- Berbegal, C., Spano, G., Fragasso, M., Grieco, F., Russo, P., Capozzi, V. (2018). Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. Applied Microbiology and Biotechnology, 102, 569–576. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8666-x>
- Bisson F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations, <https://doi.org/10.5344/ajev.1999.50.1.107>
- Butzke, C.E. (2010). Winemaking Problems Solved. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology, and Nutrition.
- Campaniello D. et al. (2017). Chapter 10- Wine Spoilage Phenomena. Woodhead Publishing Series in Food Sciences, Technology and Nutrition, The Microbiological Quality of Food, pages 237-255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00013-3>
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M., Grieco, F., & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine.



- Chatonnet, P., & Boutou, S. (2006). Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. 1-9. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967306022394>
- Ciani, M., Comitini, F. (2014). *Brettanomyces*. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier, pp. 316–323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00046-X>
- Cibrario, A., Miot-Sertier, C., Paulin, M., Bullier, B., Riquier, L., Perello, M.-C., de Revel, G., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M. (2020). *Brettanomyces bruxellensis* phenotypic diversity, tolerance to wine stress and wine spoilage ability. Food Microbiology, 87, 103379. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103379>
- Considine, J.A., Frankish, E. (2014). Microbiology and Methods. In: A Complete Guide to Quality in Small-Scale Winemaking. Elsevier, pp. 79–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408081-2.00006-8>
- Couto, J. A., Neves, F., Campos, F., Hogg, T. (2005). Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. Food Microbiology. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.014>.
- Di Toro, M., & al, e. (2015). Intraspecific biodiversity and ‘spoilage potential’ of *Brettanomyces bruxellensis* in Apulian wines. Elsevier, 102-108.
- Dimopoulou, M., Hatzikamari, M., Masneuf-Pomarede, I., Albertin, W. (2019). Sulfur dioxide response of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Greek wine. Food Microbiology, 78, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.013>
- Dimopoulou, M., Raffenne, J., Claisse, O., Miot-Sertier, C., Iturmendi, N., Moine, V., Coulon, J., Dols-Lafargue, M. (2018). *Oenococcus oeni* Exopolysaccharide Biosynthesis, a Tool to Improve Malolactic Starter Performance. Frontiers in Microbiology, 9, 1276. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01276>
- Dimopoulou, M., Renault, M., Dols-Lafargue, M., Albertin-Leguay, W., Herry, J.-M., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarede, I. (2019). Microbiological, biochemical, physicochemical surface properties and biofilm forming ability of *Brettanomyces bruxellensis* (preprint). Microbiology. <https://doi.org/10.1101/579144>
- Duncan, A., Edlin, N., et al. (1998). The biotransformation of phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. [https://www.researchgate.net/publication/230216054\\_The\\_biotransformation\\_of\\_phenolic\\_compounds\\_by\\_Brettanomyces\\_anomalus](https://www.researchgate.net/publication/230216054_The_biotransformation_of_phenolic_compounds_by_Brettanomyces_anomalus)
- Edwards, C.G., Oswald, T.A. (2018). Interactive effects between total SO<sub>2</sub>, ethanol, and storage temperature against *Brettanomyces bruxellensis*. Letters in Applied Microbiology, 66, 71–76. <https://doi.org/10.1111/lam.12816>
- Fleet, G.H. (2003) Yeast Interactions and Wine Flavor. International Journal of Food Microbiology, 86, 11-22. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Flemming, H.-C., Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, 30, 1749–1758. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00323-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00323-1)
- Garcia, L.G.S., Guedes, G.M. de M., da Silva, M.L.Q., Castelo-Branco, D.S.C.M., Sidrim, J.J.C., Cordeiro, R. de A., Rocha, M.F.G., Vieira, R.S., Brillhante, R.S.N. (2018). Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. *Carbohydrate Polymers*, 195, 662–669. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.091>
- Giovani G, Canuti V, Rosi I (2010). Effect of yeast strain and fermentation conditions on the release of cell wall polysaccharides. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 303–307.
- Le Montagner, P., Bakhtiar, Y., Miot-Sertier, C., Guilbaud, M., Albertin, W., Moine, V., Dols-Lafargue, M., & Masneuf-Pomarède, I. (2024). Effect of abiotic and biotic factors on *Brettanomyces bruxellensis* bioadhesion properties. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104480>
- Lianou, A., Nychas, G.-J.E., Koutsoumanis, K.P. (2020). Strain variability in biofilm formation: A food safety and quality perspective. *Food Research International*, 137, 109424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109424>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 3(3), MB-0011-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>
- Malfeito-Ferreira, M. (2019). Spoilage Yeasts in Red Wines. In: *Red Wine Technology*. Elsevier, pp. 219–235. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00015-3>
- Malfeito-Ferreira, M. (2014). WINES | Wine Spoilage Yeasts and Bacteria. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 805–810. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00390-6>
- P.Ribereau-Gayon et al., (2001). *The handbook of Enology: Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications 2<sup>nd</sup> Edition*
- Padro, I., & Ferrer, S. (2019). Yeast-Bacteria Coinoculation. Retrieved from *Red Wine Technology*: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00007-4>
- Pinto, L., Baruzzi, F., Cocolin, L., Malfeito-Ferreira, M. (2020). Emerging technologies to control *Brettanomyces* spp. in wine: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.013>
- Renouf, V., Strehaiano, P., & Lonvaud-Funel, A. (2008). Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control*, 19(2), 208-216.
- Smith, B., & al, e. (2016). *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.008>
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K.J. (2015). *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>

- Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J.-B., Gautier, S., Sieczkowski, N., Granes, D., Brandam, C. (2015). Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 123–131. <https://doi.org/10.1111/jam.12682>
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. (2010). The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1474–1479. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010>
- Zuehlke & Edwards (2013). Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23215631/>