



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

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην  
Επιστήμη Οίνου και Ζύθου  
Κατεύθυνση: Οίνος**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

**Η επίδραση της κυτταρικής επαφής στην αλληλεπίδραση  
μεταξύ της ζύμης *Metschnikowia pulcherrima* και κοινών  
ειδών οινοποίησης**

Της

**Στέλλα Ταουσάνη**

Παρουσιάστηκε για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων για την απονομή του  
Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών στο Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών  
του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

**Επιβλέπων: Γεώργιος Μπανίλας**

ΑΘΗΝΑ, 2023



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

**Master of Science in  
Wine and Beer Science  
Option: Wine**

**Master Thesis**

**Effect of cell contact interaction between *Metschnikowia pulcherrima* and common winemaking yeasts**

**By**

**Stella Taousani**

Presented for the partial fulfillment of the obligations for the award of the  
Master's Degree in the Department of Wine, Vine and Beverage Sciences  
of the University of West Attica

**Supervisor: Georgios Banilas**

Athens, 2023

## Διασαφήσεις

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Η επίδραση της κυτταρικής επαφής στην αλληλεπίδραση μεταξύ της ζύμης *Metschnikowia pulcherrima* και κοινών ειδών οινοποίησης**» που παρουσιάστηκε από την ΣΤΕΛΛΑ ΤΑΟΥΣΑΝΗ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis titled “**Effect of cell contact interaction between *Metschnikowia pulcherrima* and common winemaking yeasts**” presented by STELLA TAOUSANI and we affirm that it is accepted.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 1ου Μέλους Επιτροπής**  
(Name and Signature of 1<sup>st</sup> Commission Member):

**ΜΠΑΝΙΛΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 2<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής**  
(Name and Signature of 2<sup>nd</sup> Commission Member):

**ΚΟΡΚΑΣ ΗΛΙΑΣ**

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 3<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής**  
(Name and Signature of 3<sup>rd</sup> Commission Member):

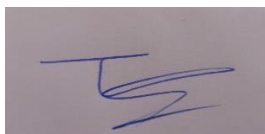
**ΓΚΙΖΗ ΔΑΝΑΗ**

Με την υποβολή αυτής της διατριβής, δηλώνω ότι το σύνολο των εργασιών που περιέχονται σε αυτή είναι το δικό μου, πρωτότυπο έργο, ότι εγώ είμαι ο μοναδικός δημιουργός τους (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), ότι η αναπαραγωγή και η δημοσίευσή της από το Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής δεν θα παραβιάζει οποιαδήποτε δικαιώματα τρίτων και ότι δεν έχω υποβάλει στο παρελθόν το σύνολο ή μέρος αυτής για την απόκτηση οποιουδήποτε τίτλου.

By submitting this thesis, I declare that the entirety of the work contained therein is my own, original work, that I am the sole author thereof (save to the extent explicitly otherwise stated), that reproduction and publication thereof by University of West Attica will not infringe any third party rights and that I have not previously in its entirety or in part submitted it for obtaining any qualification.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή Υποψηφίου**  
(Surname and first name of the candidate):

..... Στέλλα Ταουσάνη .....



Πνευματική ιδιοκτησία © 2023 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2023 University of West Attica  
All rights reserved

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

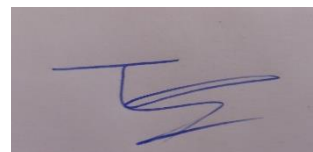
Η κάτωθι υπογεγραμμένη Στέλλα Ταουσάνη του Ευάγγελου, με αριθμό μητρώου 21211, φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Επιστήμη Οίνου και Ζύθου με Κατεύθυνση: Οίνος του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

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

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

Ο/Η Δηλών/ούσα



**Ο Επιβλέπων  
Καθηγητής**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Νέες οινοποιητικές τεχνικές και κυρίως μικροβιολογικοί συνδυασμοί εναρκτήριων καλλιιεργειών ζυμών, μελετώνται στις μέρες μας για τη βελτίωση της ποιότητας των οίνων και την κάλυψη των απαιτήσεων των καταναλωτών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη συγκαλλιιεργειών *Saccharomyces cerevisiae* και μη-Σακχαρομυκήτων. Στη παρούσα έρευνα εξετάστηκαν οι «άγριες» ζύμες *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida zemplinina*, *Torulasporea delbrueckii*, καθώς και η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της ζύμης *Metschnikowia pulcherrima* με τις υπόλοιπες ζύμες ξεχωριστά, σε υπόστρωμα συνθετικού γλεύκους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κατά τη συγκαλλιιεργεια της *M. pulcherrima* με την *C. zemplinina*, η *M. pulcherrima* δεν επηρέασε την ανάπτυξη της *C. zemplinina* αλλά ούτε και το αντίστροφο. Παρομοίως, κατά τη συγκαλλιιεργεια των ειδών *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae*, η *S. cerevisiae* δεν επηρέασε την ανάπτυξη της *M. pulcherrima*. Ωστόσο, η *M. pulcherrima* επηρέασε την ανάπτυξη της *S. cerevisiae*, μειώνοντας τον πληθυσμό στις 72 ώρες κατά 0,74 log cfu/mL. Κατά τη συγκαλλιιεργεια των ειδών *M. pulcherrima* με *H. opuntiae*, η *H. opuntiae* δεν επηρέασε την ανάπτυξη της *M. pulcherrima*. Αντίθετα, η *M. pulcherrima* επηρέασε την *H. opuntiae*, καθώς μείωσε τον πληθυσμό της κατά 1,2 log cfu/mL στις 48 ώρες. Κατά τη συγκαλλιιεργεια *M. pulcherrima* με *H. guilliermondii*, η ανάπτυξη της *M. pulcherrima* δεν επηρεάστηκε. Αντίθετα, ο πληθυσμός της *H. guilliermondii* μειώθηκε κατά 1,2 log cfu/mL στις 48 ώρες. Τέλος, κατά τη συγκαλλιιεργεια *M. pulcherrima* με *T. delbrueckii*, η ανάπτυξη της *M. pulcherrima* δεν επηρεάστηκε. Αντίθετα, η ανάπτυξη της *T. delbrueckii* επηρεάστηκε καθώς ο πληθυσμός της μειώθηκε κατά 0,8 log cfu/mL στις 48 ώρες. Συμπερασματικά, η έρευνα αυτή έδειξε την ικανότητα της *M. pulcherrima* να κυριαρχεί σε ζυμώσεις έναντι άλλων ζυμών, προσδίδοντας ακόμη περισσότερο ενδιαφέρον για βαθύτερη ανάλυση, προκειμένου να κατανοηθούν καλύτερα οι μηχανισμοί δράσεις της ζύμης αυτής κατά την οινοποίηση.

# ABSTRACT

## Effect of cell contact interaction between *Metschnikowia pulcherrima* and common winemaking yeasts

Stella Taousani

Department of Wine, Vine & Beverage Sciences,  
University of West Attica, 2023

New oenological techniques and especially starter culture combinations of *Saccharomyces* with non-*Saccharomyces* yeasts are currently studied to improve the quality of wines and cover consumers' demands. The present study explores the interaction of co-culture between *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*, *H. guilliermondii*, *H. opuntiae*, *T. delbrueckii* and *C. zemplinina*, separately in substrate of synthetic must. The results have shown that in all co-culture combinations were examined, the population of *M. pulcherrima* remains at the same levels as its corresponding monoculture. Also, *M. pulcherrima* doesn't affect the growth rate of *C. zemplinina*. In contrast to the above, this yeast can affect the growth rate of the rest yeasts were examined. Specifically, in co-culture of *M. pulcherrima* vs *S. cerevisiae*, the population of *S. cerevisiae* decreased by 0.74 log cfu/mL at 72 hours. In co-culture of *M. pulcherrima* vs *H. opuntiae*, the population of *H. opuntiae* decreased by 1.2 log cfu/mL at 48 hours. In co-culture of *M. pulcherrima* vs *H. guilliermondii*, the population of *H. guilliermondii* decreased by 1.2 log cfu/mL at 48 hours. In co-culture of *M. pulcherrima* vs *T. delbrueckii*, the population of *T. delbrueckii* decreased by 0.8 log cfu/mL at 48 hours. In conclusion, this study showed that the *M. pulcherrima* can dominate against other yeasts species in co-culture, giving more interesting in deeper analysis. Thus, the scientific community could understand better the mechanical activity of this yeast, having potential applications in the field of winemaking.

## Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Οίνου του ΕΛ.Γ.Ο «ΔΗΜΗΤΡΑ».

Ολοκληρώνοντας τις μεταπτυχιακές μου σπουδές, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μπανίλα και την κ. Νησιώτου που μου έδωσαν την ευκαιρία να ασχοληθώ με την μικροβιολογία, πραγματοποιώντας έτσι μια μεγάλη μου επιθυμία. Οι γνώσεις και η εμπειρία που έλαβα, πιστεύω πως θα με βοηθήσουν σημαντικά στην μετέπειτα επαγγελματική μου πορεία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου του Ινστιτούτου Οίνου, για τη άψογη συνεργασία και το όμορφο κλίμα καθώς και για την υπομονή και επιμονή που έδειξαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, τους φίλους μου και τον άνθρωπό μου, που με στήριξαν σε αυτό το ταξίδι από την αρχή μέχρι το τέλος.



# Βιβλιογραφικό CV

**Στέλλα Ταουσάνη**

Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών  
«Επιστήμη Οίνου και Ζύθου», κατεύθυνση: Οίνος

Τίτλος: Η επίδραση της κυτταρικής επαφής στην αλληλεπίδραση μεταξύ της ζύμης *Metschnikowia pulcherrima* και κοινών ειδών οινοποίησης

Επιστημονικό Πεδίο: Τμήμα επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών

Εκπαίδευση: BSc Τεχνολογίας Τροφίμων

Εκπλήρωσε τις απαιτήσεις για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών Επιστήμη Οίνου & Ζύθου με κατεύθυνση: Οίνος στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών, τον Απρίλιο, 2023.

ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ: Γεώργιος Μπανίλας

## Πίνακας περιεχομένων

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>Ευχαριστίες</b> .....	<b>viii</b>
<b>Κατάλογος Σχημάτων</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. Εισαγωγή</b> .....	<b>1</b>
1.1 Ο Ρόλος των Ζυμών στην Οινοποίηση.....	1
1.2 Ζύμες .....	4
1.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
1.3 Άγριες Ζύμες (non- <i>Saccharomyces</i> ) .....	4
1.3.1 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	4
1.3.2 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	5
1.3.3 <i>Candida zemplinina</i> .....	6
1.3.4 <i>Hanseniaspora</i> spp. ....	6
<b>2. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	<b>11</b>
2.1 Μικροβιολογικές Αναλύσεις.....	11
2.1.1 Θρεπτικά Υποστρώματα.....	11
2.1.2 Συνθετικό Γλεύκος .....	12
2.1.3 Μικροοργανισμοί .....	13
2.1.4 Προετοιμασία Καλλιεργειών .....	14
2.1.5 Δειγματοληψίες .....	15
<b>3. Αποτελέσματα &amp; Συζήτηση</b> .....	<b>16</b>
3.1 Συγκαλλιέργειες με κυτταρική επαφή .....	16
3.1.1 Συγκαλλιέργεια <i>M. pulcherrima</i> με <i>S. cerevisiae</i> .....	16
3.1.2 Συγκαλλιέργεια <i>M. pulcherrima</i> με <i>H. opuntiae</i> .....	19
3.1.3 Συγκαλλιέργεια <i>M. pulcherrima</i> με <i>T. delbrueckii</i> .....	21
3.1.4 Συγκαλλιέργεια <i>M. pulcherrima</i> με <i>H. guilliermondii</i> .....	23
3.1.5 Συγκαλλιέργεια <i>M. pulcherrima</i> με <i>C. zemplinina</i> .....	25
<b>4. Συμπεράσματα</b> .....	<b>28</b>
<b>5. Βιβλιογραφία</b> .....	<b>29</b>

## Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1- Σχηματική απεικόνιση πορείας αλκοολικής ζύμωσης

Σχήμα 2- Μηχανισμοί αλληλεπιδράσεων ζυμών

Σχήμα 3- Σχηματική απεικόνιση συστημάτων συγκαλλιέργειών με κυτταρική επαφή

Σχήμα 4- Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους

Σχήμα 5- Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae*

Σχήμα 6- Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*

Σχήμα 7- Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *H. oruntiae* (Ho) κατά τη συγκαλλιέργειά τους

Σχήμα 8- Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *H. oruntiae*

Σχήμα 9- Καμπύλες ανάπτυξης *H. oruntiae* (Ho) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*

Σχήμα 10- Καμπύλες ανάπτυξης συγκαλλιέργειας *M. pulcherrima* (Mp) και *T. delbrueckii* (Td) κατά τη συγκαλλιέργειά τους

Σχήμα 11- Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *T. delbrueckii*

Σχήμα 12- Καμπύλες ανάπτυξης *T. delbrueckii* (Td) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*

Σχήμα 13- Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *H. guilliermondii* (Hg) κατά τη συγκαλλιέργειά τους

Σχήμα 14– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *H. guilliermondii*

Σχήμα 15– Καμπύλες ανάπτυξης *H. guilliermondii* (Hg) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*

Σχήμα 16– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *C. zemplinina* (Cz) κατά τη συγκαλλιέργειά τους

Σχήμα 17– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *C. zemplinina*

Σχήμα 18– Καμπύλες ανάπτυξης *C. zemplinina* (Cz) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*

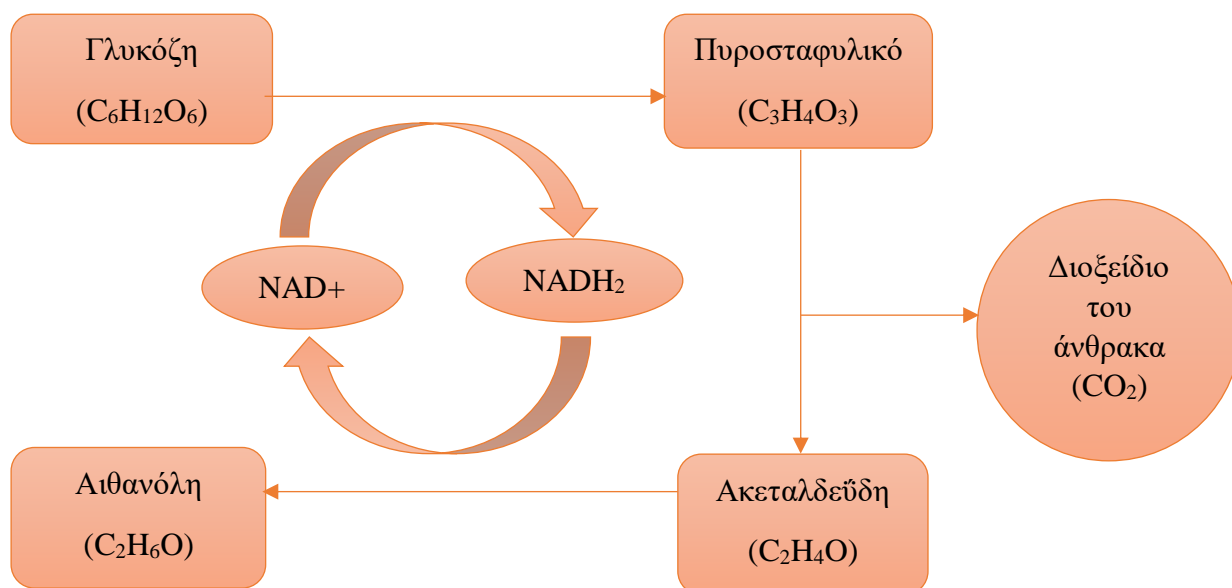
# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ο Ρόλος των Ζυμών στην Οινοποίηση

Οι ζύμες αποικίζουν στις ράγες των σταφυλιών και έχουν τη μεγαλύτερη σημασία στην οινοποίηση γιατί είναι υπεύθυνες για την αλκοολική ζύμωση. Η μεταφορά τους στα οινοποιεία γίνεται μέσω της μεταφοράς των τρυγημένων σταφυλιών ενώ αντιστρόφως, διάφορες ζύμες που προϋπάρχουν στο οινοποιείο μπορούν να μεταφερθούν στον αμπελώνα (Chalvantzi *et al.*, 2020). Η βιοποικιλότητα των ζυμών αυτών έχει πλέον αναγνωριστεί ότι πιθανώς συμβάλλει στο terroir των κρασιών, συμβάλλοντας έτσι στην ανάδειξη της εντοπιότητά τους (Bokulich *et al.*, 2014; Knight *et al.*, 2015; Banilas *et al.*, 2016, Chalvantzi *et al.*, 2021; Sgouros *et al.*, 2023). Γενικώς, η μικροβιοχλωρίδα που επικρατεί στο αμπέλι μπορεί να επηρεάσει την υγεία και την ανάπτυξη του αμπελιού και των καρπών και συνεπώς την ποιότητα των κρασιών, προσδίδοντας χαρακτηριστικό άρωμα, γεύση και στυλ εξαιτίας της συμμετοχής των μικροοργανισμών αυτών στην αλκοολική ζύμωση (Knight *et al.*, 2015). Η οινοποίηση είναι μια αρχαία διεργασία ζύμωσης και αποτελεί μέρος της παράδοσης. Η μετατροπή του γλεύκους σε κρασί γίνεται μέσω της αλκοολικής ζύμωσης από ζύμες. Η αλκοολική ζύμωση είναι είτε ελεγχόμενη είτε αυθόρμητη. Ως ελεγχόμενη, ορίζεται η αλκοολική ζύμωση που διεξάγεται με την προσθήκη εμπορικών εναρκτήριων καλλιιεργειών *Saccharomyces cerevisiae* ή/και μη-*Saccharomyces*), ενώ η αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση διεξάγεται από τις ζύμες που υπάρχουν στο σταφύλι και από είδη που ανήκουν κυρίως στα γένη *Metschnikowia*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Hanseniaspora* κ.α (Binati *et al.*, 2022 ; Aplin *et al.*, 2019). Η αυθόρμητη ζύμωση μπορεί να παρουσιάσει προβλήματα, όπως είναι το μεγάλο χρονικό διάστημα έναρξης της ζύμωσης, η διακοπή της ζύμωσης, η πιθανή επιμόλυνση από μικροοργανισμούς και η οξείδωση (Liu *et al.*, 2016 ; WineLand Media, 2023). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, ορισμένες non-*Saccharomyces* ζύμες μπορούν να συμβάλουν ευεργετικά στη διαδικασία της οινοποίησης, ενισχύοντας το άρωμα και τη γεύση του κρασιού, ελέγχοντας την ανεπιθύμητη μικροχλωρίδα ή μειώνοντας την αιθανόλη, όταν αυτές

χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με κάποια εμπορική εναρκτήρια ζύμη (Romano *et al.*, 2019).

Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες κυρίως από ζυμομύκητες σε υποστρώματα πλούσια σε σάκχαρα, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά με απώτερο σκοπό τη παραγωγή ενέργειας ATP. Ένα από αυτά είναι και ο χυμός σταφυλιού, που περιέχει σάκχαρα σε συγκέντρωση 150-250 g/L. Το πρώτο στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης περιλαμβάνει την αποικοδόμηση της γλυκόζης προς τον σχηματισμό του πυροσταφυλικού οξέος (γλυκόλυση). Στη συνέχεια, το πυροσταφυλικό οξειδώνεται σε ακεταλδεΐδη από μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση. Η οξειδοαναγωγική ισορροπία της αλκοολικής ζύμωσης επιτυγχάνεται με τον σχηματισμό  $\text{NAD}^+$  κατά την αναγωγή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη, η οποία καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογονάση σχηματίζοντας τελικώς την αιθανόλη. Η απόδοση της αλκοολικής ζύμωσης σε ATP είναι 1 ή 2 mol ATP ανά mol γλυκόζης που οξειδώνεται. Επιπλέον, κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται και δευτερογενείς μεταβολίτες όπως η γλυκερίνη, το οξικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ και η 2,3- βουτανοδιόλη (Ciani *et al.*, 2008 ; InfoWine, 2023).



Σχήμα 1- Σχηματική απεικόνιση πορείας αλκοολικής ζύμωσης

Οι εναρκτήριοι καλλιέργειες ζυμών που επιλέγονται από τους οινοποιούς για την διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης, καθορίζονται από τη διαφορετική αντοχή σε ουσίες όπως είναι η αιθανόλη, το διοξείδιο του θείου, η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο και άλλους παράγοντες (Englezos *et al.*, 2019). Στις μέρες μας, τα κριτήρια επιλογής των ζυμών οινοποίησης αλλάζουν προκειμένου να καλύψουν τις απαιτήσεις των καταναλωτών. Τα κριτήρια αυτά είναι:

- Η ικανότητα των ζυμών να παράγουν πτητικές ενώσεις όπως εστέρες και ανώτερες αλκοόλες, ενισχύοντας το αρωματικό προφίλ των οίνων.
- Η ικανότητα των ζυμών να παράγουν πολυαλκοόλες, όπως η γλυκερόλη και η 2,3- βουτανοδιόλη, και η ικανότητα να απελευθερώνουν μανοπρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, παρέχοντας καλύτερη δομή και σώμα στον οίνο (Suarez-Lepe and Morata, 2012).
- Η ικανότητα μιας ζύμης να ενισχύει το χρώμα του οίνου μέσω του μεταβολικού σχηματισμού σταθερών χρωστικών, π.χ βιταμινών, προανθοκυανινών, και της ελάχιστης απορρόφησης ανθοκυανινών από το κυτταρικό τοίχωμα των ζυμών.
- Η παρουσία και η δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης, προκειμένου να προληφθεί η υποβάθμιση του χρώματος του οίνου.
- Η ικανότητα της ζύμης να διευκολύνει τη κολλοειδή σταθεροποίηση στα κόκκινα κρασιά, δηλαδή τη διαύγαση, υποβοηθώντας έτσι τη σταθεροποίηση του χρώματος του οίνου.

Οι ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση, μπορούν να παράγουν μεταβολίτες που προσδίδουν χαρακτηριστικό άρωμα στον οίνο. Οι μεταβολίτες αυτοί είναι κυρίως πτητικές ουσίες π.χ ανώτερες αλκοόλες, οξέα, εστέρες, καρβονύλια και θειόλες, της τάξης  $10^{-1}$  έως  $10^{-10}$  mg/L, όπου η μεταξύ τους ισορροπία και αλληλεπίδραση, καθορίζουν την ποιότητα του αρώματος (Padilla *et al.*, 2016 ; Romano *et al.*, 2019). Οι non-*Saccharomyces* ζύμες κυριαρχούν κατά τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, φτάνοντας σε πληθυσμό  $10^8$  cfu/mL, πριν ο πληθυσμός τους μειωθεί δραστικά στα επόμενα στάδια (Englezos *et al.*, 2019). Είναι ικανές να παράγουν πτητικές ουσίες και εξωκυτταρικά ένζυμα όπως η β-γλυκοσιδάση, λιπάσες και πρωτεάσες. Η β-γλυκοσιδάση μπορεί να υδρολύσει τον γλυκοζιτικό δεσμό των τερπενίων και να απελευθερώσει ενώσεις που ενισχύουν την πολυπλοκότητα του αρώματος. Οι πρωτεάσες και οι λιπάσες προάγουν την απελευθέρωση πτητικών ουσιών (Qiu *et al.*, 2022). Οι συχνότερες πτητικές ουσίες που παράγουν οι non-

*Saccharomyces* ζύμες είναι ο οξικός αιθυλεστέρας και ο οξικός ισοαμυλεστέρας (Moreira *et al.*, 2008).

Στις μέρες μας, η κλιματική αλλαγή έχει προκαλέσει μείωση της οξύτητας των οίνων. Επιπλέον, η εκτεταμένη χρήση της εμπορικής ζύμης έχει οδηγήσει στη παραγωγή λιγότερο περίπλοκων και περισσότερο τυποποιημένων κρασιών. Για τον λόγο αυτόν, πλέον ερευνώνται εναλλακτικοί τρόποι οινοποίησης όπως η χρήση μεικτών καλλιιεργειών ζυμών (Romano *et al.*, 2019 ; Sadoudi *et al.*, 2012).

## 1.2 Ζύμες

### 1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Η ζύμη *S. cerevisiae* είναι πολύ καλά προσαρμοσμένη στις συνθήκες οινοποίησης όπως είναι το χαμηλό pH, η υψηλή ωσμωτική πίεση, τα μειωμένα θρεπτικά συστατικά, η παρουσία αιθανόλης κ.α. Είναι η ζύμη που κυριαρχεί και είναι ικανή να ζυμώσει όλα τα σάκχαρα και να ολοκληρώσει την αλκοολική ζύμωση. Ωστόσο, τροποποιώντας κάποια χαρακτηριστικά στον μούστο όπως για παράδειγμα τη περιεκτικότητα σε άζωτο, το pH, την περίσσεια βιταμινών κ.α., οδηγεί σε μειωμένη απόδοση της ζύμης αυτής και έτσι κάποια στελέχη non-*Saccharomyces* μπορούν να κυριαρχήσουν (Vicente *et al.*, 2023).

## 1.3 Άγριες Ζύμες (non-*Saccharomyces*)

### 1.3.1 *Torulaspora delbrueckii*

Η *T. delbrueckii* είναι μια άγρια ζύμη που έχει βρεθεί ότι μπορεί να βελτιώσει την απόδοση της μηλογαλακτικής ζύμωσης και συνεπώς το τελικό προϊόν (Ruiz-de-Villa *et al.*, 2023). Επίσης, σε συγκαλλιέργεια με την ζύμη *S. cerevisiae* παράγει λιγότερη πτητική οξύτητα και ακεταλδεΐδη, σε αλκοολική ζύμωση με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων (Sgouros *et al.*, 2023). Ακόμη, παράγειθειόλες, εστέρες και τερπένια και



έχει την ικανότητα να απελευθερώνει μανοπρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες μέσα στο κρασί (Roca-Mesa *et al.*, 2022). Έτσι, είναι μια ζύμη με πιθανές εφαρμογές κατά τη ζύμωση προσδίδοντας ευνοϊκές αλλαγές στο οργανοληπτικό προφίλ των κρασιών, αυξάνοντας την πολυπλοκότητα, τον αρωματικό χαρακτήρα, το χρώμα και την αίσθηση στο στόμα (Ruiz-de-Villa *et al.*, 2023 ; Sgouros *et al.*, 2023).

### **1.3.2 *Metschnikowia pulcherrima***

Η *M. pulcherrima* είναι άγρια ζύμη που βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό στις ράγες των σταφυλιών και η ανεκτικότητα της σε αιθανόλη δεν ξεπερνάει το 4-5% (v/v). Για το λόγο αυτό, μπορεί να κυριαρχήσει μόνο κατά τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης (Vicente *et al.*, 2020). Ωστόσο, μια αξιοσημείωτη ιδιότητά της είναι η ικανότητά της να παράγει χαμηλόβαθμους οίνους λόγω της χαμηλής της απόδοσης σε αιθανόλη (Mencher *et al.*, 2021). Επιπλέον, έχει μεγαλύτερη αντοχή στο SO<sub>2</sub> από τις υπόλοιπες non-*Saccharomyces* ζύμες αλλά όχι όμως από μεγαλύτερη από *Saccharomyces* ζύμες (Vicente *et al.*, 2020). Έχει μέτρια ζυμωτική ικανότητα αλλά προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ενζυματικής της δραστηριότητας που περιλαμβάνει τον σχηματισμό πρόδρομων ουσιών αρώματος και χρώματος. Ακόμη ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της ζύμης αυτής, είναι η κόκκινη χρωστική ουσία που παράγει (πουλχεριμίνη) η οποία της προσδίδει αντιμικροβιακή δράση. Αυτό συμβαίνει λόγω της πρόδρομης ένωσης του πουλχεριμικού οξέος, το οποίο οδηγεί σε κατανάλωση σιδήρου του υποστρώματος, με αποτέλεσμα το συστατικό αυτό να βρίσκεται σε έλλειψη στις υπόλοιπες ζύμες (Kregiel *et al.*, 2022). Γενικά, συμβάλλει ευεργετικά στη ποιότητα του κρασιού ρυθμίζοντας τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών και την απελευθέρωση διάφορων εξωκυτταρικών ενώσεων και ιδιαίτερα ενώσεων που αφορούν την ποικιλομορφία και τη πολυπλοκότητα του αρώματος (Zhang *et al.*, 2022). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η συγκαλλιέργεια *M. pulcherrima* με *S. cerevisiae* αυξάνει σημαντικά τον οξικό φαινυλαιθυλεστέρα, τον οξικό ισοαμυλεστέρα και διαμορφώνει τα τερπενοειδή στο κρασί (Liu *et al.*, 2016). Συμπερασματικά, η *M. pulcherrima* είναι μια ζύμη που αξίζει να μελετηθεί εκτενέστερα ως προς τις οινολογικές της εφαρμογές.

### 1.3.3 *Candida zemplinina*

Η *C. zemplinina* είναι άγρια ζύμη που βρίσκεται στο γλεύκος των σταφυλιών σε συγκεντρώσεις  $10^4$ - $10^6$  cfu/mL, ανεξαρτήτως περιοχής ή ποικιλίας σταφυλιών. Επιπλέον, ανιχνεύεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στις επιφάνειες οινοποιείων πριν από τη συγκομιδή, έχοντας έτσι τη δυνατότητα να μεταφέρεται σε κάθε παρτίδα οινοποίησης. Ορισμένα στελέχη *C. zemplinina* ανιχνεύονται και κατά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά της ζύμης αυτής να αναπτύσσεται σε υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και σε χαμηλές θερμοκρασίες και στην ικανότητά της να παράγει και να ανέχεται υψηλά επίπεδα αιθανόλης (Manseuf-Pomarede *et al.*, 2015). Έχει βρεθεί ότι σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae*, μειώνει το οξικό οξύ και διατηρεί τα επίπεδα γλυκερόλης και αιθανόλης υψηλά (Rantsiou *et al.*, 2012). Επιπλέον, έχει την ικανότητα να ζυμώνει μόνο φρουκτόζη, χωρίς να επηρεάζει τη συγκέντρωση της γλυκόζης (Englezos *et al.*, 2015). Έτσι, λόγω του φρουκτοφιλικού χαρακτήρα της, της μειωμένης απόδοσης αιθανόλης από τα σάκχαρα που καταναλώνει και την αυξημένη παραγωγή ορισμένων αρωματικών ενώσεων κατά τη συγκαλλιέργειά της με *S. cerevisiae*, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η περαιτέρω μελέτη της κατά την οινοποίηση (Englezos *et al.*, 2015; Nisiotou & Nychas, 2007; Manseuf-Pomarede *et al.*, 2015).

### 1.3.4 *Hanseniaspora* spp.

Το γένος *Hanseniaspora* είναι το πιο διαδεδομένο στο σταφύλι καθώς αντιπροσωπεύει το 50-75% του συνολικού πληθυσμού, στην επιφάνεια του καρπού. Τα είδη αυτά έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται στα αρχικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, δηλαδή τις πρώτες 4-6 μέρες, φτάνοντας μέγιστο πληθυσμό  $10^7$  κύτταρα/mL ή και περισσότερο (Lage *et al.*, 2014 ; Nisiotou & Nychas, 2007). Έπειτα ο πληθυσμός τους, λόγω της υψηλής ποσότητας αιθανόλης που παράγεται από τον *S. cerevisiae* ο οποίος έχει μεγαλύτερη ικανότητα ζύμωσης και αντοχής στην αιθανόλη, μειώνεται. Ορισμένα είδη από το γένος αυτό είναι οι *H. uvarum*, *H. guilliermondii* και *H. opuntiae* (Moreira *et al.*, 2011). Η ικανότητα των ζυμών αυτών να παράγουν οξικούς εστέρες και ένζυμα, όπως το ένζυμο β-γλυκοσιδάση, σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae*, οδηγεί στη

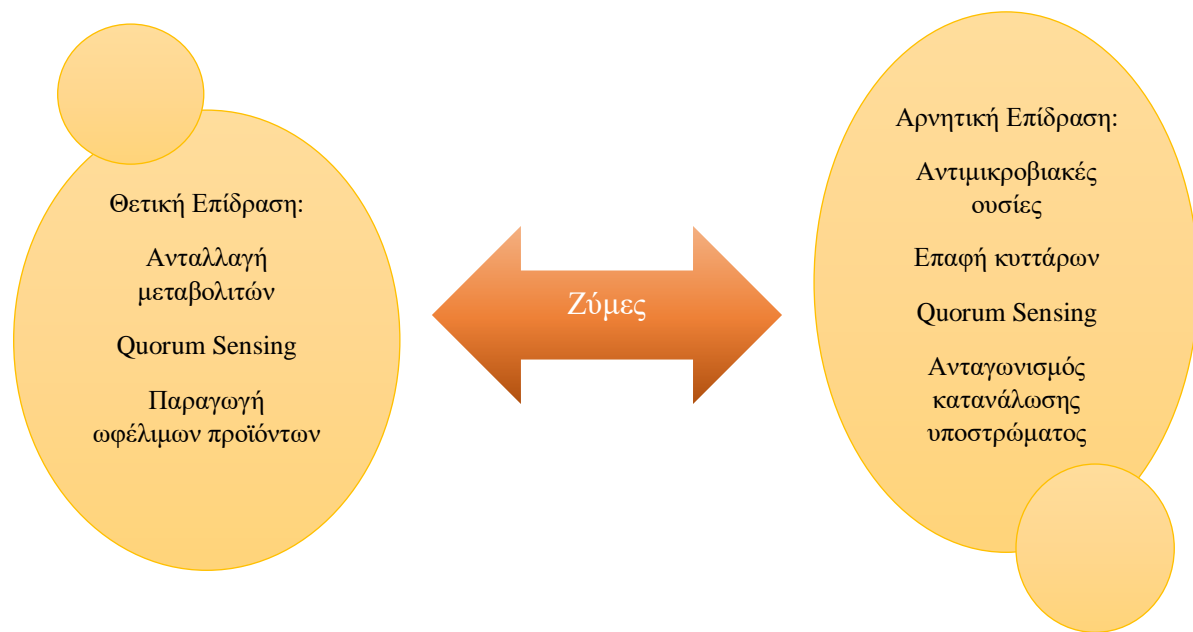
βελτίωση του αρωματικού προφίλ των κρασιών (Hu *et al.*, 2018; Romano *et al.*, 2019; Zilelidou and Nisiotou, 2021). Επίσης, έχει βρεθεί ότι μειώνει τη περιεκτικότητα σε βιογενής αμίνες, βελτιώνοντας έτσι τη συνολική ποιότητα του κρασιού (Han *et al.*, 2022). Οι βιογενής αμίνες είναι αζωτούχες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες σε συγκεκριμένα επίπεδα αλλοιώνουν το κρασί και επιδρούν αρνητικά στην υγεία των καταναλωτών (Gravity Wine House, 2023).

#### **1.4 Αλληλεπιδράσεις ζυμών**

Εστιάζοντας στη μελέτη συγκαλλιέργειών μεταξύ ζυμών, έχει ιδιαίτερη σημασία η ζύμη που θα καταφέρει να κυριαρχήσει κατά την αλκοολική ζύμωση. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών μπορεί να είναι είτε θετικές είτε αρνητικές. Στις θετικές αλληλεπιδράσεις συγκαταλέγονται η τροποποίηση του περιβάλλοντος μέσω των μεταβολιτών που παράγονται (π.χ. ισορροπία οξειδοαναγωγής μέσω της παραγωγής ακεταλδεϋδης), η απελευθέρωση ωφέλιμων προϊόντων (π.χ. αμινοξέα), οι επιδράσεις που οφείλονται στην επαφή των κυττάρων και οι ενώσεις που ευνοούν τον μηχανισμό διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας (π.χ. αρωματικές αλκοόλες) και η επίδραση στη γονιδιακή έκφραση. Στις αρνητικές αλληλεπιδράσεις συγκαταλέγονται ο ανταγωνισμός κατανάλωσης θρεπτικών μέσων (π.χ. άζωτο, γλυκόζη, οξυγόνο), η παραγωγή ουσιών (π.χ. τοξίνες, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, πεπτίδια), οι επιδράσεις που οφείλονται στην επαφή των κυττάρων και οι ενώσεις που δεν ευνοούν τον μηχανισμό διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας (Zilelidou and Nisiotou, 2021; Roullier – Gall *et al.*, 2022).

Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης ζυμών:

- Ανταλλαγή μεταβολιτών: Η εξωκυτταρική πρωτεολυτική δραστηριότητα ορισμένων ειδών, προκαλεί απελευθέρωση αμινοξέων που υποβοηθούν στην ανάπτυξη άλλων ζυμών. Επίσης, νεκρά κύτταρα ζυμών ενισχύουν στην ανάπτυξη άλλων ζυμών καθώς παρέχουν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Γενικότερα, η παραγωγή ορισμένων μεταβολιτών από ζύμες μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη άλλων ζυμών (Liu *et al.*, 2015).



Σχήμα 2- Μηχανισμοί αλληλεπιδράσεων ζυμών

- Ανταγωνισμός κατανάλωσης υποστρώματος: Παρά την ποικιλόμορφη μικροβιοχλωρίδα των ζυμών non-*Saccharomyces* που βρίσκεται στο σταφύλι, η ζύμη που καταφέρνει να κυριαρχήσει κατά την αλκοολική ζύμωση είναι το είδος *S. cerevisiae*. Ο λόγος έγκειται στο γεγονός ότι, η ζύμη παρουσιάζει αυξημένη αντοχή στην αιθανόλη και έχει την ικανότητα να καταναλώνει γρήγορα πηγές αζώτου και άνθρακα. Έτσι, προσαρμόζεται γρηγορότερα στο περιβάλλον συγκριτικά με τις υπόλοιπες ζύμες (Brice *et al.*, 2018). Σημαντικός είναι ο ανταγωνισμός για το αφομοιώσιμο άζωτο καθώς είναι καθοριστικός παράγοντας για τη συμπεριφορά των ζυμών κατά την αλκοολική ζύμωση. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η *T. delbrueckii* καταναλώνει γρηγορότερα το αφομοιώσιμο άζωτο κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του *S. cerevisiae* και η ζύμωση να «κολλάει» (Liu *et al.*, 2015). Γενικότερα, η ταχύτερη και αποτελεσματικότερη χρήση θρεπτικών συστατικών ή η πρόσληψη οξυγόνου από ζύμες που προσαρμόζονται ευκολότερα, μπορεί να επηρεάσει την κατανάλωση των συστατικών αυτών από ζύμες που προσαρμόζονται δυσκολότερα (Zilelidou and Nisiotou, 2021).

- Φυσική επαφή κυττάρων: Μιλώντας για αλληλεπίδραση μεταξύ ζυμών λόγω κυτταρικής επαφής, αξίζει να αναφερθεί ο τρόπος με τον οποίο αποδεικνύεται αυτό. Μια στρατηγική είναι, ο διαχωρισμός των κυττάρων των εξεταζόμενων ζυμών, με μια ημιπερατή μεμβράνη που παρεμποδίζει την μεταξύ τους επαφή αλλά επιτρέπει την ανταλλαγή υποστρωμάτων και μεταβολιτών (Bordet *et al.*, 2020). Έρευνες έχουν δείξει ότι η κυτταρική επαφή μεταξύ *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*, οδηγεί στο θάνατο των non-*Saccharomyces* ενώ κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει όταν τα κύτταρα διαχωρίζονται μεταξύ τους (Renault *et al.* 2013).
- Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών: Η παραγωγή ουσιών (αιθανόλη, λιπαρά οξέα μικρή αλυσίδα, πρωτεΐνες "killer», μικρά πεπτίδια) κάποιων ζυμών, πιθανόν να παρεμποδίζει την ανάπτυξη ή ακόμα και να θανατώνει άλλες ζύμες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παραγωγή αιθανόλης από το είδος *S. cerevisiae*, γεγονός στο οποίο οφείλεται η κυριαρχία του στην διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης (Ciani and Comitini, 2015). Ακόμη, έχει γίνει γνωστή η αντιμικροβιακή δράση της *M. pulcherrima* έναντι σε είδη *Hanseniaspora*, η οποία αποδίδεται στο πουλχεριμικό οξύ που παράγει και έχει την ικανότητα να δεσμεύει το σίδηρο καθιστώντας το ανεπαρκές για τις υπόλοιπες ζύμες (Liu *et al.*, 2015).
- Παραγωγή μορίων που ευνοούν το μηχανισμό διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας (quorum sensing): Ο μηχανισμός quorum sensing αποτελείται από μικρά μόρια που διαχέονται στο περιβάλλον και συσσωρεύονται κατά την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού. Κάθε κύτταρο ξεχωριστά είναι ικανό να ανιχνεύσει τη ποσότητα των μορίων της διακυτταρικής επικοινωνίας στο μέσο στο οποίο βρίσκεται και τελικά να εκφράσει συγκεκριμένα γονίδια (Barriuso *et al.*, 2018). Οι ζύμες είναι ικανές να παράγουν ουσίες που ενεργοποιούν τη μεταξύ τους κυτταρική επικοινωνία (Zilelidou and Nisiotou, 2021).

Η παρατεταμένη χρήση κοινών εμπορικών ζυμών οινοποίησης, έχει οδηγήσει στη παραγωγή οίνων με παρόμοια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Έτσι, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της σε εναλλακτικούς τρόπους οινοποίησης. Ένας από αυτούς είναι, η οινοποίηση με εναρκτήριοις συγκαλλιέργειες *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces* ζύμες. Στις μέρες μας, οι πληροφορίες είναι περιορισμένες όσο αφορά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών αυτών και τους μηχανισμούς που ενεργοποιούν σε κάθε περίπτωση, όταν βρίσκονται στο ίδιο μέσο. Κατανοώντας τα παραπάνω, γίνεται η αρχή για πιθανές νέες μεθόδους οινοποίησης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη αλληλεπίδρασης της άγριας ζύμης *M. pulcherrima* με τις ζύμες *S. cerevisiae*, *H. opuntiae*, *H. guilliermondii*, *C. zemplinina* και *T. delbrueckii* με κυτταρική επαφή.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

#### 2.1.1 Θρεπτικά Υποστρώματα

Τα μικροβιολογικά και χημικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Lab M, Neogen, PanReac AppliChem, NeoLab Migge, Sigma-Aldrich, Honeywell, Merck, Mallinckrodt, Fluka AG. Τα υλικά και η προετοιμασία τους για την διεξαγωγή των πειραμάτων περιγράφονται παρακάτω:

- Yeast Growth Medium (YPD) Agar: 20 gr/L Glucose, 20 gr/L Peptone, 10 gr/L Yeast Extract, 20 gr/L Agar
- Yeast Growth Medium (YPD) Broth: 20 gr/L Glucose, 20 gr/L Peptone, 10 gr/L Yeast Extract
- Wallerstein Laboratory (WL) Nutrient Agar
- Συνθετικό γλεύκος (Synthetic Must) (Taillandrier *et al.*, 2014)]
- Ringer's solution ¼ strength

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

### 2.1.2 Συνθετικό Γλεύκος

Για την παρασκευή του συνθετικού γλεύκους ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Παρασκευή διαλύματος μικροστοιχείων (Διάλυμα 1): Ζυγίστηκαν οι ποσότητες των μικροστοιχείων που αποτελούνται από 4 gr/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4 gr/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1 gr/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 1 gr/L KI, 0,4 gr/L  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 gr/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$  και 1 gr/L  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 1 L απεσταγμένου νερού. Τέλος, αποστειρώθηκαν με φίλτρο 0,22 mm.
- Παρασκευή διαλύματος αναερόβιων παραγόντων (Διάλυμα 2): Ζυγίστηκαν οι ποσότητες των αναερόβιων παραγόντων που αποτελούνται από 15 gr/L ergosterol, 5 mL/L oleic acid, 500 mL/L Tween 80 και 500 mL/L absolute ethanol και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 1 L απεσταγμένου νερού. Τέλος, αποστειρώθηκαν με φίλτρο 0,22 mm.
- Παρασκευή διαλύματος βιταμινών (Διάλυμα 3): Ζυγίστηκαν οι ποσότητες των βιταμινών που αποτελούνται από 0,15 gr/L calcium pantothenate, 0,025 gr/L hydrochloride thiamin, 0,2 gr/L nicotinic acid, 0,025 gr/L pyridoxine, 0,0003 gr/L biotin και 2 gr/L myo inositol και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 1 L απεσταγμένου νερού. Τέλος, αποστειρώθηκαν με φίλτρο 0,22 mm.
- Παρασκευή διαλύματος αμινοξέων (Διάλυμα 4): Ζυγίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των αμινοξέων που αποτελούνται από 1,4 gr/L tyrosine, 13,7 gr/L tryptophan, 2,5 gr/L isoleucine, 3,4 gr/L aspartic acid, 9,2 gr/L glutamic acid, 28,6 gr/L arginine, 3,7 gr/L leucine, 5,8 gr/L threonine, 1,4 gr/L glycine, 38,6 gr/L glutamine, 11,1 gr/L alanine, 3,4 gr/L valine, 2,4 gr/L methionine, 2,9 gr/L phenylamine, 6,0 gr/L serine, 2,5 gr/L histidine, 1,3 gr/L lysine, 1,0 gr/L cysteine, 46,8 gr/L proline και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 1 L απεσταγμένου νερού. Τέλος, αποστειρώθηκαν με φίλτρο 0,22 mm.
- Παρασκευή συνθετικού γλεύκους (1L): Ζυγίστηκαν οι ποσότητες των επιμέρους συστατικών 100 gr/L Glucose, 100 gr/L Fructose, 3 gr/L Malic acid, 3 gr/L Tartaric acid, 0,3 gr/L Citric acid, 0,5 gr/L  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0,75 gr/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25 gr/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,16 gr/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 3 gr/L NaCl, 50 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  και διαλύθηκαν σε 1 L απεσταγμένου νερού. Έπειτα έγινε η ρύθμιση του pH στο 3,3 με τη προσθήκη NaOH ή HCl και μετά το διάλυμα



αποστειρώθηκε στους 120 °C, 1,3 atm για 20 λεπτά. Αφού το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκαν 1 mL από το Διάλυμα 1, 1 mL από το Διάλυμα 2, 10 mL από το Διάλυμα 3, 9,11 mL από το Διάλυμα 4 και 1,47 mL NH<sub>4</sub>Cl ώστε το τελικό το τελικό αφομοιώσιμο άζωτο ζυμών (YAN) να είναι 220 gr/L, υπό ασηπτικές συνθήκες.

### 2.1.3 Μικροοργανισμοί

Στη παρούσα έρευνα εξετάστηκαν οι μονοκαλλιέργειες των ζυμών *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Candida zemplinina*,. Επιπλέον, εξετάστηκαν και οι συγκαλλιέργειες της *M. pulcherrima* με τις επιμέρους άγριες ζύμες.

Η ζύμη που ήταν αποθηκευμένη στους – 80 °C καλλιεργήθηκε σε τρυβλία Petri με YPD άγαρ, με τη μέθοδο της απομόνωσης και επώαστηκε στους 28 °C για 2-3 ημέρες. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε μονή αποικία και ενοφθαλμίστηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 10 mL YPD broth και επώαστηκε στους 28 °C για 24 ώρες χωρίς ανάδευση. Έπειτα, αφού ελέγχθηκε η θολερότητα της καλλιέργειας, μεταφέρθηκαν 300 μL σε κωνική φιάλη που περιείχε 30 mL συνθετικού γλεύκους, η οποία επώαστηκε στους 28 °C για 18 ώρες, υπό ανάδευση (180 rpm). Η διαδικασία ακολουθήθηκε για κάθε εξεταζόμενη ζύμη.

## 2.1.4 Προετοιμασία Καλλιιεργειών

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

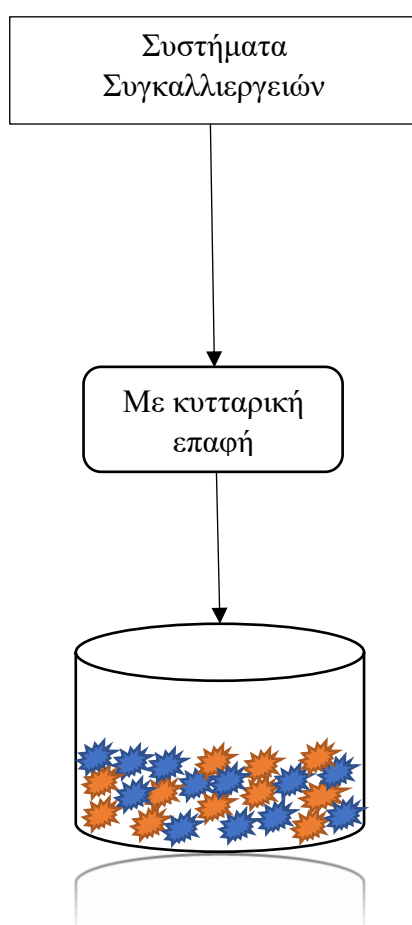
Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων με διάλυμα Ringer, εφόσον ήταν απαραίτητο. Παράλληλα, στην αντικειμενοφόρο της Neubauer τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα νερού στις ειδικές προεξοχές και στη συνέχεια τοποθετήθηκε μια καλυπτρίδα. Έγινε πλήρωση της αντικειμενοφόρου με τη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

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

Στη συνέχεια, σε τρυβλία προστέθηκαν 3 mL για κάθε μονοκαλλιέργεια ξεχωριστά και 1,5 mL κάθε εξεταζόμενης ζύμης για κάθε συγκαλλιέργεια, υπό ασηπτικές συνθήκες. Έπειτα, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 20 °C υπό ανάδευση σε 120 rpm. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκφράζονται με τον σχηματισμό καμπυλών ανάπτυξης σε μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες.

### 2.1.5 Δειγματοληψίες

Οι δειγματοληψίες για την καταμέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκαν στους εξής χρόνους:  $t_0$ =χρόνος εμβολιασμού,  $t_1$ = 3 ώρες,  $t_2$ = 6 ώρες,  $t_3$ = 9 ώρες,  $t_4$ = 12 ώρες,  $t_5$ = 24 ώρες,  $t_6$ = 36 ώρες,  $t_7$ = 48 ώρες,  $t_8$ = 72 ώρες. Κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, υπό ασηπτικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Έπειτα, έγινε σπορά σε τρυβλία με YPD agar και WL agar, τα οποία στη συνέχεια επωάστηκαν στους 28 °C για 3 ημέρες και ακολούθησε η καταμέτρηση των αποικιών.



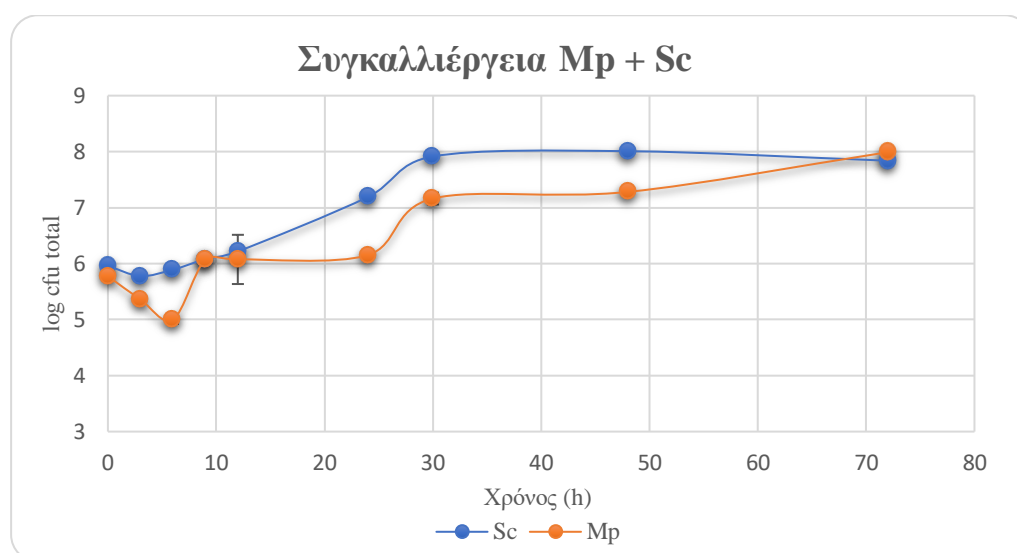
Σχήμα 3- Σχηματική απεικόνιση συστημάτων συγκαλλιιεργειών με κυτταρική επαφή

### 3. Αποτελέσματα & Συζήτηση

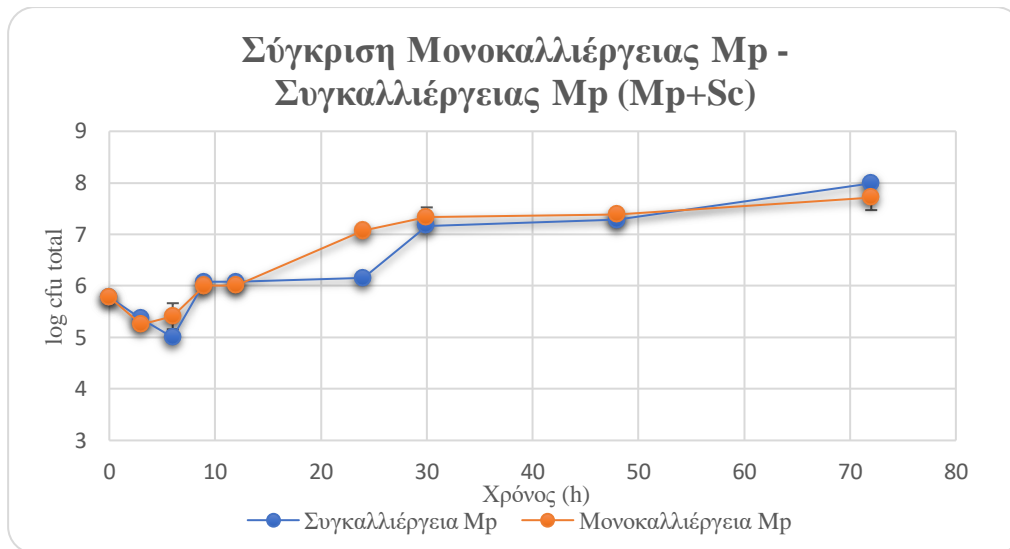
Ακολουθούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων των συγκαλλιιεργειών που βρίσκονται σε κυτταρική επαφή, δηλαδή *M. pulcherrima* με *S. cerevisiae*, *C. zemplinina*, *H. guilliermondii*, *H. oruntiae* και *T. delbrueckii*, ξεχωριστά. Συγκεκριμένα, από μικροβιολογικής άποψης παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης της κάθε ζύμης.

#### 3.1 Συγκαλλιέργειες με κυτταρική επαφή

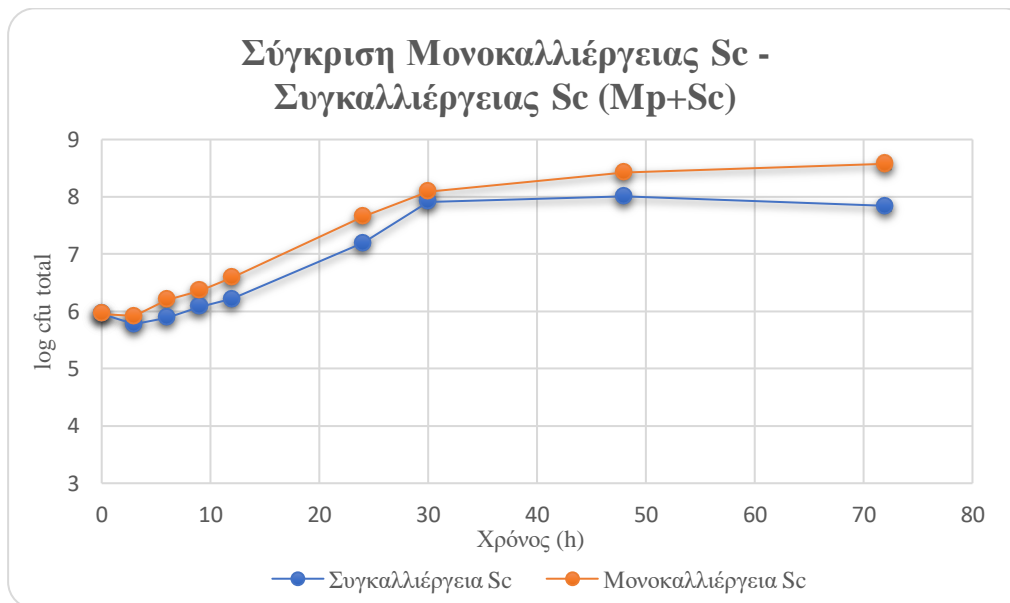
##### 3.1.1 Συγκαλλιέργεια *M. pulcherrima* με *S. cerevisiae*



Σχήμα 4— Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *S. cerevisiae* (Sc) κατά τη συγκαλλιέργειά τους.



Σχήμα 5– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mr) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae*.



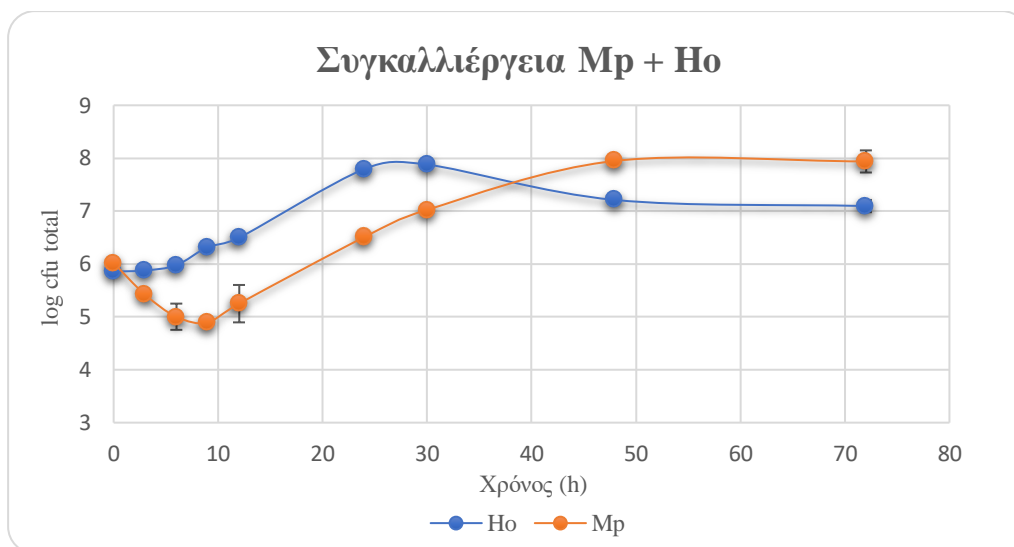
Σχήμα 6– Καμπύλες ανάπτυξης *S. cerevisiae* (Sc) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*.

Παρατηρώντας το Σχήμα 4, κατά τη συγκαλλιέργεια της *M. pulcherrima* με *S. cerevisiae*, φαίνεται ότι ο πληθυσμός της *M. pulcherrima* είναι χαμηλότερος από τον πληθυσμό *S. cerevisiae*. Ωστόσο, δεν υπάρχει επίδραση στην ανάπτυξη της *M. pulcherrima* καθώς η διαφορά που παρατηρείται οφείλεται στο γεγονός ότι η ζύμη αυτή

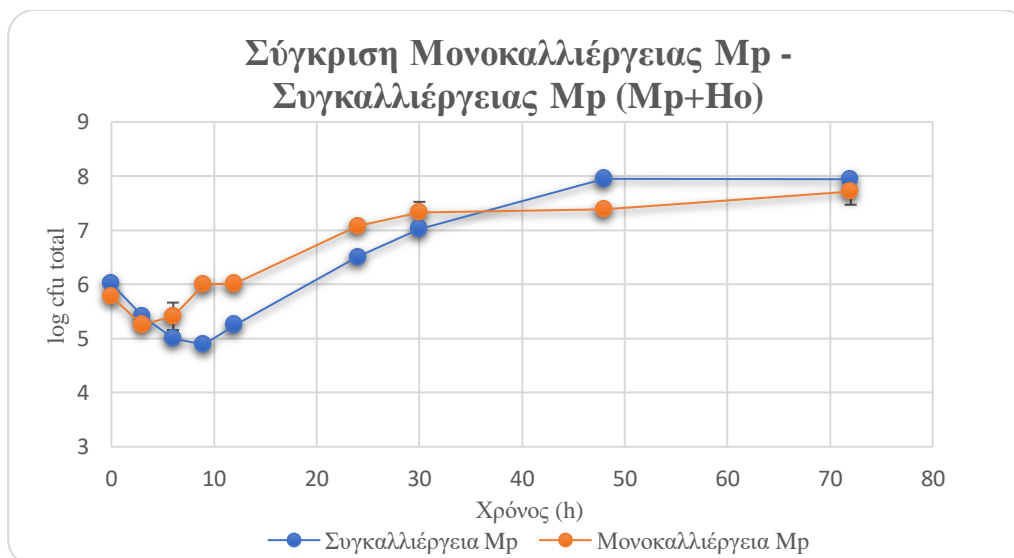
δεν μπορεί να αναπτυχθεί περισσότερο. Αυτό επιβεβαιώνεται και στο Σχήμα 5, καθώς η καμπύλη της συγκαλλιέργειας ακολουθεί την ίδια τάση με την καμπύλη της μονοκαλλιέργειας και δεν παρατηρείται καμία σημαντική διαφορά. Αντίθετα σύμφωνα με το Σχήμα 6, φαίνεται ότι η ανάπτυξη της *S. cerevisiae* παρεμποδίζεται στη συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* αφού η καμπύλη της μονοκαλλιέργειας διαφέρει από αυτή της συγκαλλιέργειας, ειδικότερα μετά από 48 ώρες. Η μέγιστη μείωση του πληθυσμού του *S. cerevisiae* παρατηρείται στις 72 ώρες με διαφορά 0,74 log cfu.

Το αποτέλεσμα αυτό δεν επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία, καθώς έρευνες που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί, έχουν αποδείξει ότι η ανάπτυξη του *S. cerevisiae* δεν επηρεάζεται από την *M. pulcherrima* όταν καλλιεργούνται μαζί (Kantor *et al.*, 2015; Oro *et al.*, 2014; Pawliskowska *et al.*, 2019). Αναλυτικότερα, οι Oro *et al.* (2014), απέδειξαν ότι κατά τη συγκαλλιέργεια αυτών των δύο ζυμών, η *S. cerevisiae* αυξάνει την έκφραση ενός γονιδίου που σχετίζεται με τον σίδηρο, με αποτέλεσμα να ανταπεξέρχεται στις στρεσογόνες συνθήκες που δημιουργεί η *M. pulcherrima*. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στα διαφορετικά στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Γεγονός που μπορεί να επιβεβαιωθεί και από την πρόσφατη μελέτη των De Gioia *et al.* (2022), οι οποίοι απέδειξαν την αναστολή του *S. cerevisiae* από συγκεκριμένο στέλεχος της *M. pulcherrima*, αποδίδοντας το φαινόμενο αυτό στη χρωστική που παράγει η ζύμη αυτή ή στον ανταγωνισμό των θρεπτικών συστατικών κατά τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης.

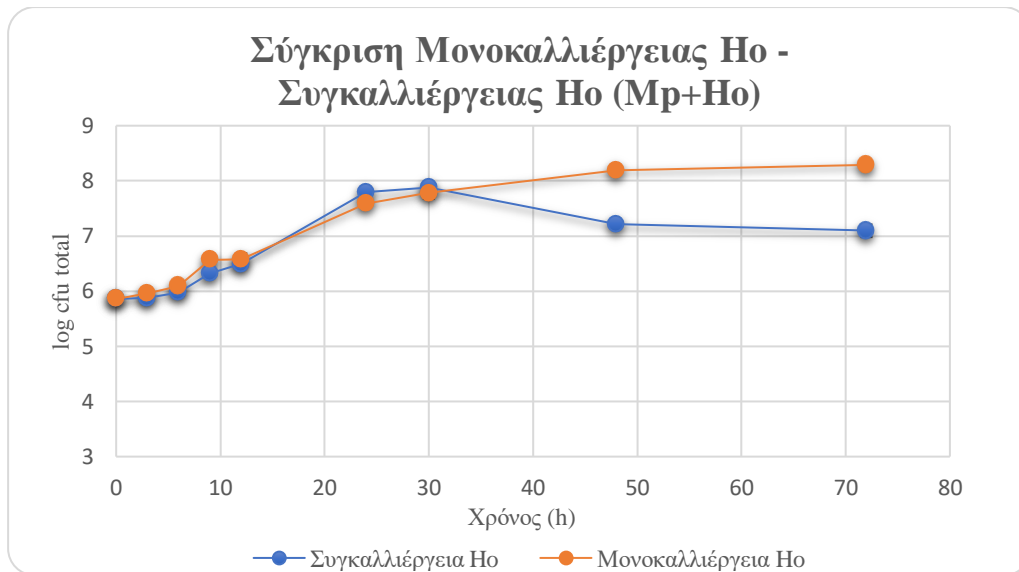
### 3.1.2 Συγκαλλιέργεια *M. pulcherrima* με *H. oruntiae*



Σχήμα 7– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Μρ) και *H. oruntiae* (Ηο) κατά τη συγκαλλιέργειά τους.



Σχήμα 8– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Μρ) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *H. oruntiae*.

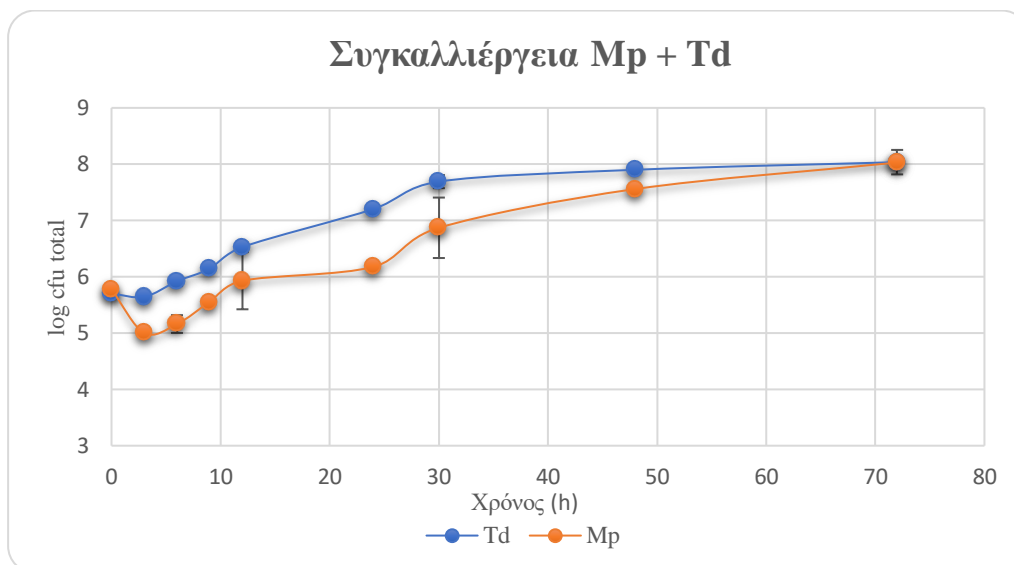


Σχήμα 9– Καμπύλες ανάπτυξης *H. opuntiae* (Ho) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*.

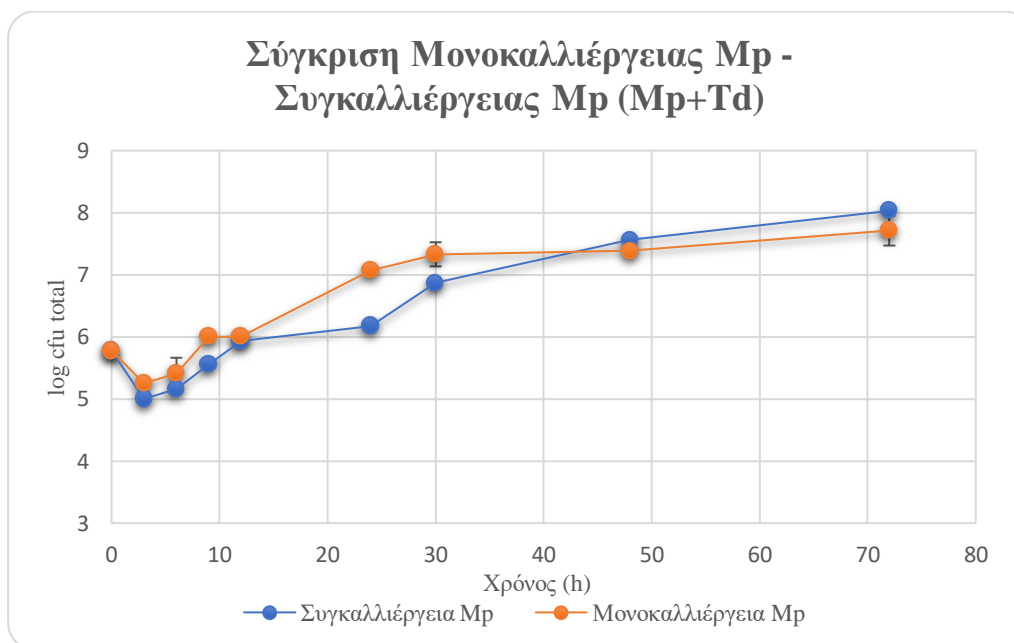
Η ανάπτυξης της *M. pulcherrima* φαίνεται να μην επηρεάζεται στη συγκαλλιέργεια με *H. opuntiae* αφού σύμφωνα με το Σχήμα 8, η καμπύλη της συγκαλλιέργειας ακολουθεί την ίδια τάση με την καμπύλη της μονοκαλλιέργειας. Ορισμένες μικρές διαφορές που παρατηρούνται δεν είναι βιολογικά σημαντικές και πιθανόν να οφείλονται σε τυχαία σφάλματα κατά τη μέτρηση. Σύμφωνα με το Σχήμα 7 και το Σχήμα 9, η ανάπτυξη του *H. opuntiae* φαίνεται να παρεμποδίζεται στη συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* αφού η καμπύλη της συγκαλλιέργειας διαφέρει με την καμπύλη της μονοκαλλιέργειας, ειδικότερα μετά από 48 ώρες. Η μέγιστη μείωση του πληθυσμού του *H. opuntiae* παρατηρείται στις 72 ώρες με μέγιστη διαφορά 1,2 log cfu. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με την έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Harle *et al.* (2020), οι οποίοι έδειξαν ότι κατά τη συγκαλλιέργεια *S. cerevisiae* με *H. opuntiae*, η εκθετική φάση της *H. opuntiae* προσομοιάζε με αυτή της *S. cerevisiae*, ωστόσο κατά την στατική φάση ο πληθυσμός της *H. opuntiae* μειώθηκε κατά περίπου 70%, μέχρι το τέλος της διαδικασίας. Συμπερασματικά, η μείωση του πληθυσμού *H. opuntiae* πιθανόν να οφείλεται στη χρωστική πουλχεριμίνη που παράγει η *M. pulcherrima* ή στους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται όταν η ζύμη αυτή βρίσκεται σε κυτταρική επαφή με άλλη ζύμη.



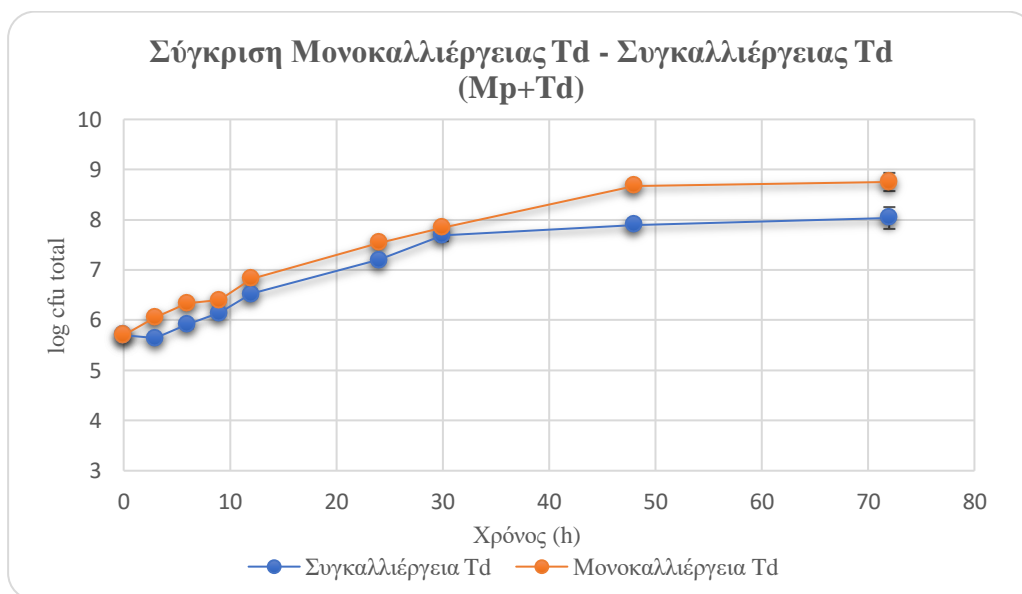
### 3.1.3 Συγκαλλιέργεια *M. pulcherrima* με *T. delbrueckii*



Σχήμα 10– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *T. delbrueckii* (Td) κατά τη συγκαλλιέργεια τους.



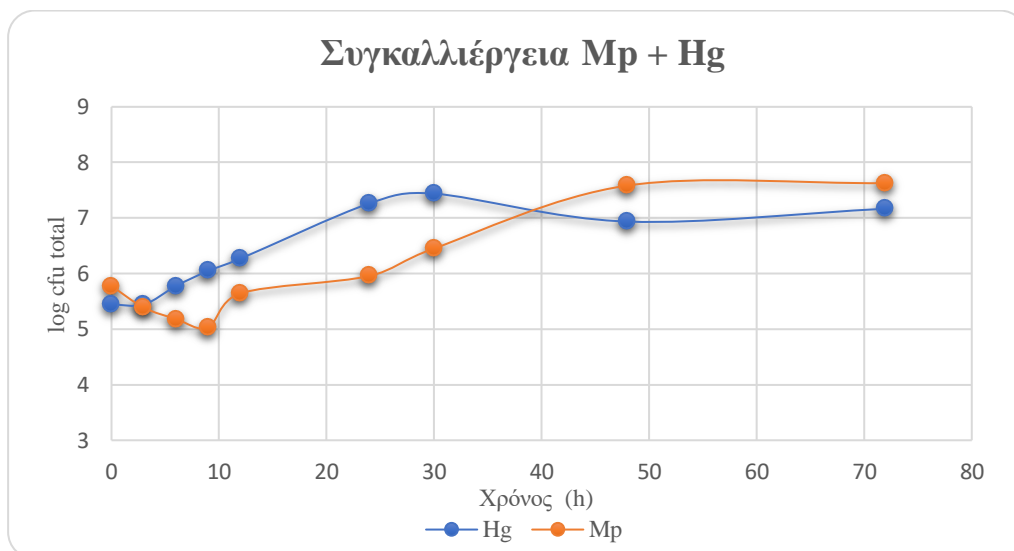
Σχήμα 11– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *T. delbrueckii*.



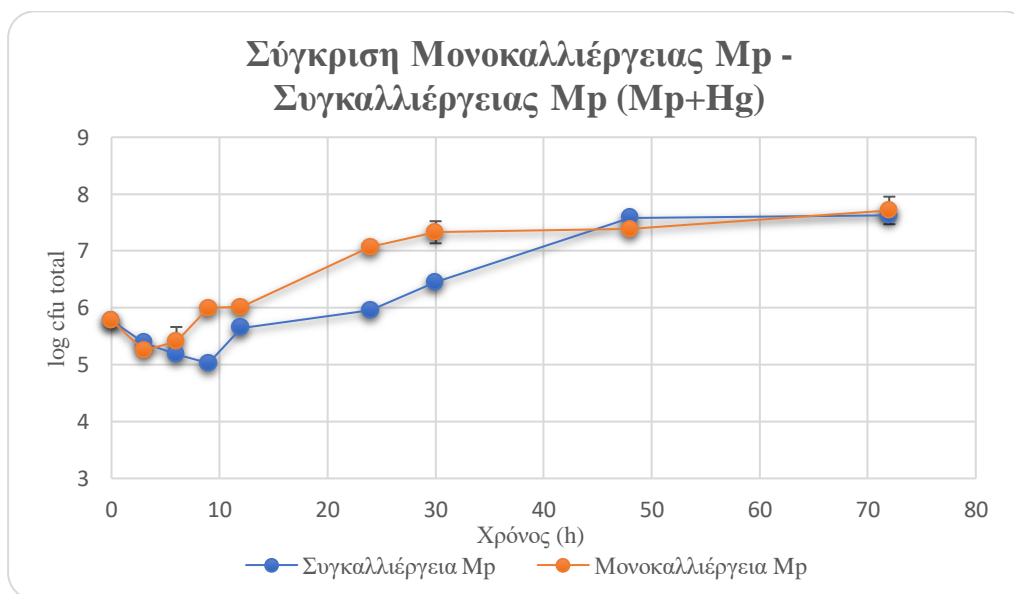
Σχήμα 12– Καμπύλες ανάπτυξης *T. delbrueckii* (Td) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*.

Παρατηρώντας το Σχήμα 10, φαίνεται ότι κατά της συγκαλλιέργεια της *M. pulcherrima* με την *T. delbrueckii* επηρεάζεται η ζύμη *M. pulcherrima*. Ωστόσο αυτό δεν ισχύει, αφού παρατηρώντας το Σχήμα 11, βλέπουμε ότι η καμπύλη της συγκαλλιέργειας ακολουθεί την ίδια τάση με τη καμπύλη της μονοκαλλιέργειας, με εξαίρεση τα σημεία στις 24 και 30 ώρες, τα οποία πιθανόν να οφείλονται σε τυχαία σφάλματα κατά τη μέτρηση. Αντίθετα σύμφωνα με το Σχήμα 12, η ανάπτυξη του *T. delbrueckii* φαίνεται να παρεμποδίζεται στη συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*, αφού η καμπύλη της συγκαλλιέργειας διαφέρει με την καμπύλη της μονοκαλλιέργειας ειδικότερα μετά από 48 ώρες. Η μέγιστη μείωση του πληθυσμού του *T. delbrueckii* παρατηρείται στις 48 ώρες με διαφορά 0,8 log. Έρευνα των Liu *et al.* (2015), έδειξε ότι η πρωτεΐνη 2-10 kDa του *S. cerevisiae* CCM1 886 επηρέασε τη *T. delbrueckii* προσδίδοντας στασιμότητα στη κινητική της. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να ισχύει και στη παρούσα έρευνα με συγκαλλιέργεια *M. pulcherrima* και για το λόγο αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μεταγενέστερη ανάλυση σε μοριακό επίπεδο.

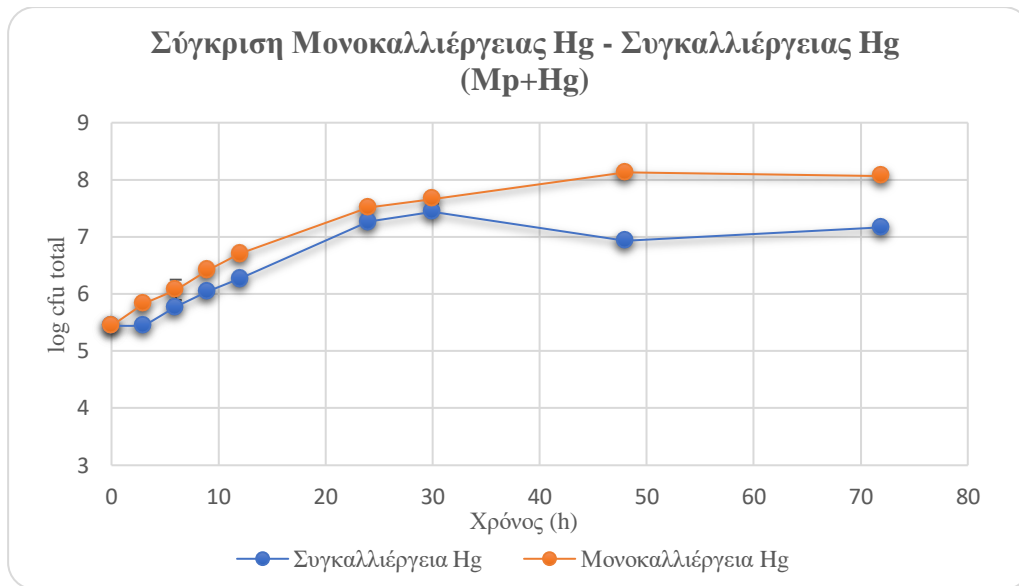
### 3.1.4 Συγκαλλιέργεια *M. pulcherrima* με *H. guilliermondii*



Σχήμα 13– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *H. guilliermondii* (Hg) κατά τη συγκαλλιέργειά τους.



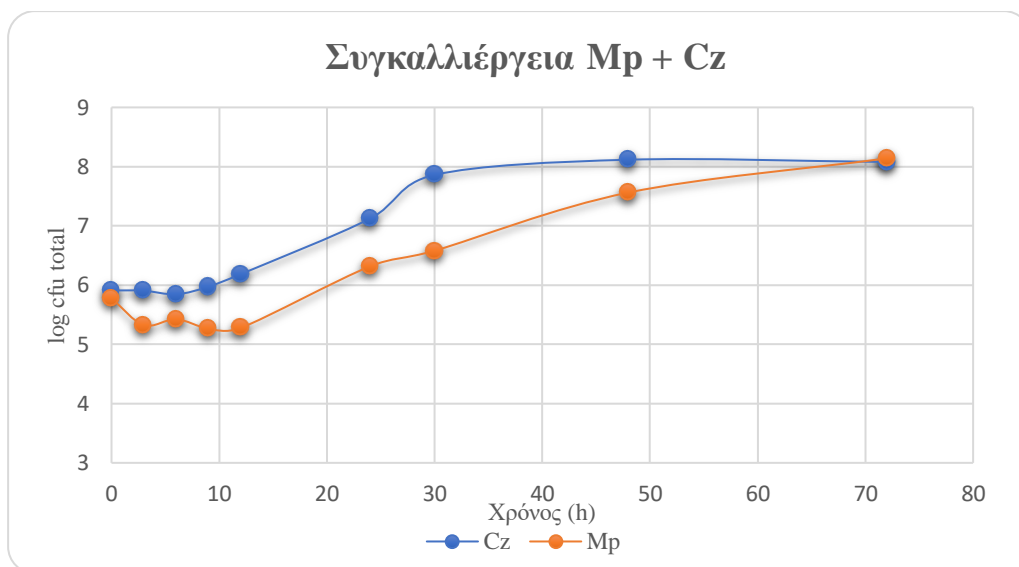
Σχήμα 14– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *H. guilliermondii*.



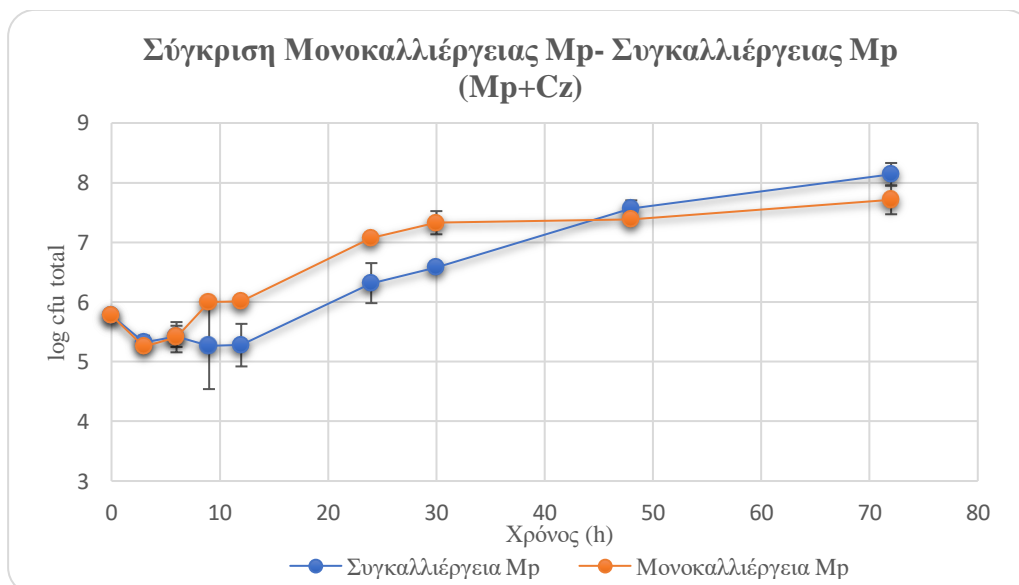
Σχήμα 15– Καμπύλες ανάπτυξης *H. guilliermondii* (Hg) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*.

Παρατηρώντας το Σχήμα 14, κατά τη συγκαλλιέργεια της *M. pulcherrima* με την *H. guilliermondii*, φαίνεται ότι η *M. pulcherrima* δεν επηρεάζεται αφού η καμπύλη της συγκαλλιέργειας ακολουθεί την ίδια τάση με την καμπύλη της μονοκαλλιέργειας. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι τις χρονικές στιγμές 24 και 30 ώρες παρατηρείται διαφορά στις καμπύλες, που πιθανόν οφείλεται σε τυχαίο σφάλμα κατά τη μέτρηση, αφού στη συνέχεια οι καμπύλες ταυτίζονται. Αντίθετα σύμφωνα με το Σχήμα 15, η ανάπτυξη του *H. guilliermondii* φαίνεται να παρεμποδίζεται στη συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* αφού η καμπύλη της συγκαλλιέργειας διαφέρει με την καμπύλη της μονοκαλλιέργειας, ειδικότερα μετά από 30 ώρες. Η μέγιστη μείωση του πληθυσμού του *H. guilliermondii* παρατηρείται στις 48 ώρες με διαφορά 1,2 log cfu. Η αντιμικροβιακή δράση της *M. pulcherrima* είναι ήδη γνωστή. Συγκεκριμένα, σε μελέτη τους οι Oro *et al.* (2014), απέδειξαν την ικανότητα της *M. pulcherrima* να επηρεάζει την ανάπτυξη της *H. guilliermondii*, αποδίδοντας την δράση της στην πρόδρομη ένωση της χρωστικής πουλχεριμίνης, δηλαδή το πουλχεριμικό οξύ που παράγει η ζύμη αυτή. Συγκεκριμένα το πουλχεριμικό οξύ, κατακρημνίζει τα ιόντα σιδήρου δημιουργώντας ένα υπόστρωμα με ελλιπή ποσότητα σιδήρου, προκαλώντας προβλήματα στην ανάπτυξη των υπόλοιπων μικροοργανισμών (Morata *et al.*, 2019).

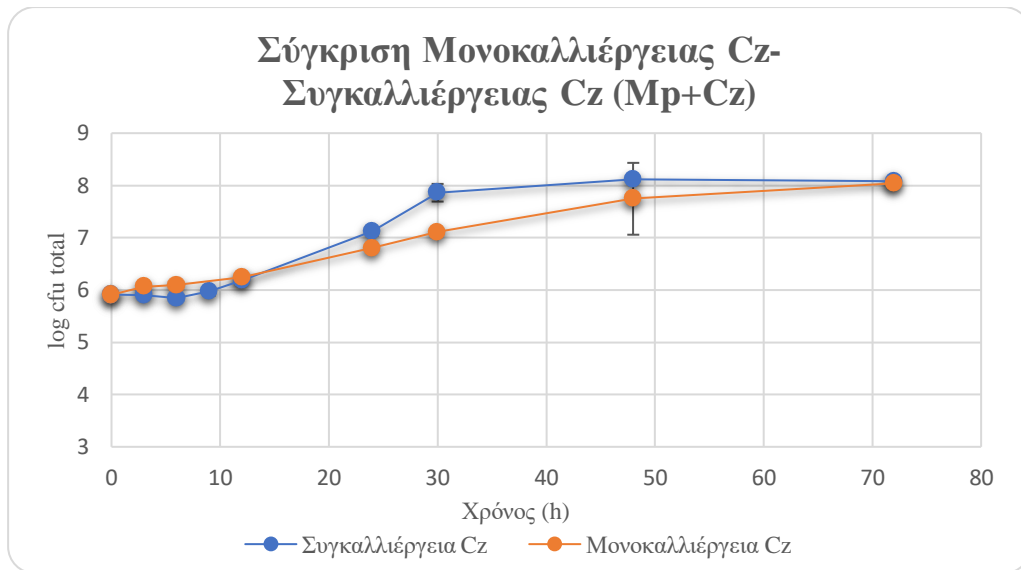
### 3.1.5 Συγκαλλιέργεια *M. pulcherrima* με *C. zemplinina*



Σχήμα 16– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) και *C. zemplinina* (Cz) κατά τη συγκαλλιέργειά τους.



Σχήμα 17– Καμπύλες ανάπτυξης *M. pulcherrima* (Mp) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *C. zemplinina*.



Σχήμα 18– Καμπύλες ανάπτυξης *C. zemplinina* (Cz) σε μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*.

Παρατηρώντας αρχικά το Σχήμα 16, φαίνεται ότι κατά τη συγκαλλιέργεια της *M. pulcherrima* με την *C. zemplinina*, επηρεάζεται η ανάπτυξη της *M. pulcherrima*. Ωστόσο αυτό δεν ισχύει σύμφωνα με το Σχήμα 17, καθώς παρατηρείται ότι η καμπύλη ανάπτυξης της *M. pulcherrima* στη συγκαλλιέργεια, έχει την ίδια τάση με την καμπύλη ανάπτυξης στη μονοκαλλιέργεια. Παρόλο που παρατηρούνται κάποιες διαφορές, αυτές είναι μικρές και πιθανόν οφείλονται σε τυχαία σφάλματα. Επιπλέον, σύμφωνα με το Σχήμα 18, η *C. zemplinina* δεν φαίνεται να επηρεάζεται κατά τη συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima*, αφού η καμπύλη ανάπτυξης της συγκαλλιέργειάς της έχει την ίδια τάση και προσομοιάζει με την καμπύλη της μονοκαλλιέργειάς της. Οπότε δεν παρατηρείται καμία αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο εξεταζόμενων ζυμών. Τα αποτελέσματα αυτά, πιθανόν να οφείλονται στον φρουκτο-φιλικό χαρακτήρα της ζύμης αυτής, στο διαφορετικό γένος *Candida* ή σε γονίδια που ενεργοποιούνται από την *C. zemplinina* που όμως μέχρι τώρα δεν έχουν μελετηθεί. Σύμφωνα με έρευνα που διεξήχθη από τους Sadouidi *et al.* (2012), η *C. zemplinina* σε συγκαλλιέργεια με *S. cerevisiae* έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την ανάπτυξη της *S. cerevisiae*, αφού κατάφερε και μείωσε τον πληθυσμό της κατά 49%, σε σύγκριση με την μονοκαλλιέργεια. Αυτό οφειλόταν στον φρουκτο-φιλικό χαρακτήρα της *C. zemplinina* αφού σε αναλύσεις που έγιναν βρέθηκε ότι, η φρουκτόζη καταναλώθηκε ταχύτερα στη συγκαλλιέργεια των δύο

ζυμών από ότι στη μονοκαλλιέργεια *S. cerevisiae*, καθιστώντας περιορισμένη την ανάπτυξη της ζύμης αυτής στη συγκαλλιέργεια.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, η μείωση του πληθυσμού κατά τις πειραματικές συγκαλλιέργειες, πιθανόν να μην οφείλεται μόνο στους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ των εξεταζόμενων ζυμών. Εξίσου σημαντικό ρόλο έχει το μέσο στο οποίο διεξάγεται το πείραμα και συγκεκριμένα η σύνθεση του συνθετικού γλεύκους. Αναλυτικότερα, έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Brou *et al.* (2018), απέδειξε ότι η περιεκτικότητα σε αναερόβιους παράγοντες του συνθετικού γλεύκους επηρεάζει την μέγιστη συγκέντρωση του πληθυσμού των ζυμών. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι με κατάλληλη συγκέντρωση αναερόβιων παραγόντων, κατά τη συγκαλλιέργεια *S. cerevisiae* με *T. delbrueckii*, η *S. cerevisiae* κυριάρχησε καθώς οι αναερόβιοι παράγοντες προκάλεσαν μείωση των ζωντανών κυττάρων της *T. delbrueckii* και η φυσική επαφή με τη *T. delbrueckii* ευνόησε την ανάπτυξη της *S. cerevisiae*. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να εμφανίζεται και στη παρούσα έρευνα που χρήζει περαιτέρω έρευνα, δηλαδή η μελέτη αλληλεπίδρασης των συστατικών του συνθετικού γλεύκους στην ανάπτυξη των ζυμών

## 4. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ των εξεταζόμενων ζυμών κατά τις συγκαλλιέργειες τους, αποδίδεται σε μια σειρά παραγόντων όπως ο ανταγωνισμός σε θρεπτικά συστατικά κατά τη μεταξύ τους κυτταρική επαφή και η σύνθεση του μέσου στο οποίο εξετάζονται. Η *M. pulcherrima* φαίνεται να κυριαρχεί κατά τη συγκαλλιέργειά της με *S. cerevisiae*, *H. opuntiae*, *H. guilliermondii* και *T. delbrueckii*. Επιπλέον, η μεγαλύτερη επίδρασή της παρατηρείται σε ζύμες *Hanseniaspora* spp., ενώ δεν παρατηρείται καθόλου επίδραση στην ανάπτυξη της *C. zemplinina*.

Ενδιαφέρουσα πρόταση για μελλοντική έρευνα είναι η μελέτη των συγκαλλιιεργειών χωρίς κυτταρική επαφή της *M. pulcherrima* με τις ζύμες που επηρέασε την ανάπτυξή τους στη παρούσα έρευνα. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η μελέτη των ζυμών που επηρεάζονται στη παρούσα έρευνα, σε επίπεδο έκφρασης mRNA, όταν βρίσκονται σε συγκαλλιέργεια με *M. pulcherrima* προκειμένου να βρεθούν τα γονίδια που ενεργοποιούνται, κατανοώντας έτσι καλύτερα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών.



## 5. Βιβλιογραφία

- Aplin, J. J., White, K. P., & Edwards, C. G. (2019). Growth and metabolism of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Washington state vineyards in media and high sugar grape musts. *Food Microbiology*.
- Banilas, G., Sgouros, G., & Nisiotou, A. (2016). Development of microsatellite markers for *Lachancea thermotolerans* typing and population structure of wine-associated isolates. *Microbiological Research*, 193, 1–10.
- Barriuso, J., Hogan, D. A., Keshavarz, T., & Martínez, M. J. (2018). Role of quorum sensing and chemical communication in fungal biotechnology and pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), 627–638.
- Binati, R.-L., Larini, I., Salvetti, E. & Torriani, S. (2022). Glutathione production by non-*Saccharomyces* yeasts and its impact on winemaking: A review. *Food Research International*, 156.
- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2013). PNAS Plus: From the Cover: Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), E139–E148.
- Bordet, F., Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., & Alexandre, H. (2020). Yeast–Yeast Interactions: Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition. *Microorganisms MDPI*, 8(4), 600.
- Brice, C., Cubillos, F. A., Dequin, S., Camarasa, C., & Martínez, C. (2018). Adaptability of the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to wine fermentation conditions relies on their strong ability to consume nitrogen. *PLOS ONE*, 13(2).
- Brou, P.-R.-J., Taillandier, P., Beaufort, S. & Brandam C. (2018). Mixed culture fermentation using *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* with direct and indirect contact: impact of anaerobic growth factors. *European Food Research and Technology*, 244 (10), 1699-1710.

- Chalvantzi, I., Banilas, G., Tassou, C., & Nisiotou, A. (2020). Patterns of Genetic Diversity and the Invasion of Commercial Starters in *Saccharomyces cerevisiae* Vineyard Populations of Santorini Island. *Foods*, 9(5), 561.
- Chalvantzi, I., Banilas, G., Tassou, C. & Nisiotou, A. (2021). Biographical Regionalization of Wine Yeast Communities in Greece and Environmental Drivers of Species Distribution at a Local Scale. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Ciani, M., Comitini, F., & Mannazzu, I. (2008). Fermentation. *Encyclopedia of Ecology*, 1548–1557.
- Ciani, M., & Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 1, 1–6.
- De Gioia, M., Russo, P., Di Simone, N., Grieco, F., Spano, G., Capozzi, V. & Fragasso, M. (2022). Interaction among Relevant Non-*Saccharomyces*, *Saccharomyces* and Lactic Acid Bacteria Species of the Wine Phenomena and Biocontrol Potential. *Applied Science - MDPI*, 12, 12760.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., & Cocolin, L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. *International Journal of Food Microbiology*, 199, 33–40.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Giacosa, S., Segade, S. R., Rolle, L., & Cocolin, L. (2019). Cell-to-cell contact mechanism modulates *Starmerella bacillaris* death in mixed culture fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 106-114.
- Harle, O., Legrand, J., Tesniere, C., Pradal, M., Mouret, J.-R., & Nidelet, T. (2020). Investigations of the mechanisms of interactions between four non-conventional species with *Saccharomyces cerevisiae* in oenological conditions. *PLOS ONE*, 15(5).
- Han, B., Gao, J., Han, X., Deng, H., Wu, T., Li, C., Zhan, J., Huang, W. and You, Y. (2022). *Hanseniaspora uvarum* FS35 degrade putrescine in wine through the direct oxidative deamination pathway of copper amine oxidase 1. *Food Research International*, 162.

- Hu, K., Jin, G.-J., Xu, Y.-H., & Tao, Y.-S. (2018). Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 108, 119–127.
- Kantor, A., Hutkova, J., Petrova, J., Hleba, L. & Kacaniova, M. (2015). Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 5(3), 282-285.
- Fugelsang, K.-C. & Edwards, C.-G. (2007). Wine Microbiology-Practical Applications and Procedures-Second Edition. *Springer*.
- Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., & Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific Reports*, 5(1).
- Kregiel, D., Pawlikowska, E., Antonak, H, Dziekonska-Kubczak, U. & Pielech-Przybylska, K. (2022) Exploring Use of *Metschnikowia pulcherrima* Clade to Improve Properties of Fruit Wines. *Fermentation*, 8, 247.
- Lage, P., Barbosa, C., Mateus, B., Vasconcelos, I., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2014). *H. guilliermondii* impacts growth kinetics and metabolic activity of *S. cerevisiae*: The role of initial nitrogen concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 62–69.
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2015). Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4), 856–873.
- Liu, P.-T., Lu, L., Duan, C.-Q., & Yan, G.-L. (2016). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 356–363.
- Masneuf-Pomarede, I., Juquin, E., Miot-Sertier, C., Renault, P., Laizet, Y., Salin, F., Alexander, H., Capozzi, Cocolin, L., Colonna-Ceccaldi, B., Englezos, V., Girard, P., Gonzalez, B., Lucas, P., Mas, A., Nisiotou, A., Sipiczki, M., Spano, G., Tassou, C.,

- Bely, M. & V., Albertin, W. (2015). The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Research*, 15(5).
- Mencher, A., Morales, P., Curiel, J. A., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2021). *Metschnikowia pulcherrima* represses aerobic respiration in *Saccharomyces cerevisiae* suggesting a direct response to co-cultivation. *Food Microbiology*, 94, 103670.
- Morata, A., Loira, I., Escott, C., Manuel del Fresno, J., Banuelos, M.-A. & Suarez-Lepe, J.-A. (2019). Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in Wine Biotechnology. *Fermentation-MDPI*, 5, 63.
- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 231–238.
- Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J. A., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control*, 22(5), 662–667.
- Nisiotou, A. A., & Nychas, G.-J. E. (2007). Yeast Populations Residing on Healthy or Botrytis-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2765–2768.
- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*.
- Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Pawlikowska, E., James, S. A., Breierova, E., Antolak, H., & Kregiel, D. (2019). Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*.
- Qiu, S., Chen, K., Liu, C., Wang, Y., Chen, T., Yan, G. & Li, J. (2022). Non-*Saccharomyces* yeasts highly contribute to characterization of flavor profiles in greenage fermentation. *Food Research International*, 157.

- Renault, P. E., Albertin, W., & Bely, M. (2013). An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 4105–4119.
- Roca-Mesa, H., Delgado-Yuste, E., Mas, A., Torija, M.-J. & Beltran G. (2022). Importance of micronutrients and organic nitrogen in fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 381.
- Romano, P., Ciani, M. & Fleet, G.-H. (2019). Yeast in the Production of wine. *Springer*.
- Roullier-Gall, C., Bordet, F., David, V., Schmitt-Kopplin, R. & Alexandre, H. (2022). Yeast interaction on Chardonnay wine composition: Impact of strain and inoculation time. *Food Chemistry*, 374.
- Ruiz-de-Villa, C., Roblet, M., Cordero-Otero, R, Bordons, A., Reguant, C. & Rozes, N. (2023). Screening of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* strains in relation to their effect on malolactic fermentation. *Food Microbiology*, 112.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guerin-Schneider, R., Caixach, J., & Alexandre, H. (2012). Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces yeasts*. *Food Microbiology*, 32(2), 243–253.
- Sgouros, G., Mallouchos, A., Dourou, D., Banilas, G., Chalvantzi, I., Kourkoutas, Y. and Nisiotou, A. (2023). *Torulaspora delbrueckii* May Help Manage Total and Volatile Acidity of Santorini-Assyrtiko Wine in View of Global Warming. *Research Advances in Wine Technology and Microbiology*, 12 (1), 191.
- Suarez-Lepe, J. A., & Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 39–50.
- Taillandier, P., Lai, Q.-P., Julien-Ortiz, A. & Brandam, C. (2014). Interaction between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30:1959-1967.

Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., Benito, S. (2020). The Genus *Metschnikowia* in Enology. *Microorganisms*, 8(7), 1038.

Vicente, J., Ruiz, J., Tomasi, S., Miguel de Celis, Ruiz-de-Villa, C., Gombau, J., Rozes, N., Zamora, F., Santos, A., Marquina, D. & Belda, I., (2023). Impact of rare yeasts in *Saccharomyces cerevisiae* wine fermentation performance: Population prevalence and growth phenotype of *Cyberlindnera fabianii*, *Kazachstania unispora*, and *Naganishia globosa*. *Food Microbiology*, 110.

Zilelidou, E. A., & Nisiotou, A. (2021). Understanding Wine through Yeast Interactions. *Microorganisms MDPI*, 9(8), 1620.

Zhang, M., Zhong, T., Heygi, F., Wang, Z. & Du, M. (2022). Effects of inoculation protocols on aroma profiles and quality of plum wine in mixed culture fermentation of *Metschnikowia pulcherrima* with *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT-Food Science and Technology*, 161.

Gravity Wine House (<https://gravitywinehouse.com/blog/winery-sanitation-biogenic-amines-in-the-wine-industry/>) (Πρόσβαση 04/04/2023)

Info Wine (<https://www.infowine.gr/el/winepedia/enology/vinification/?nid=534>) (Πρόσβαση 05/03/2023)

WineLand Media (<https://www.wineland.co.za/the-advantages-and-disadvantages-of-spontaneous-fermentation/>) (Πρόσβαση 04/04/2023)