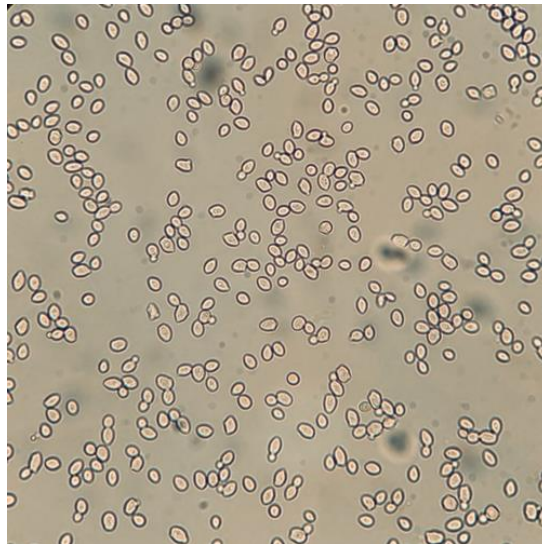




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΓΗΓΕΝΩΝ ΖΥΜΩΝ
ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ
ΠΕΡΙΟΧΩΝ”**



Πετρίδου Αικατερίνη

171077

Φέρμελη Μαρία-Δανάη

171104

Επιβλέπουσα: επ. Καθηγήτρια Δημοπούλου Μαρία

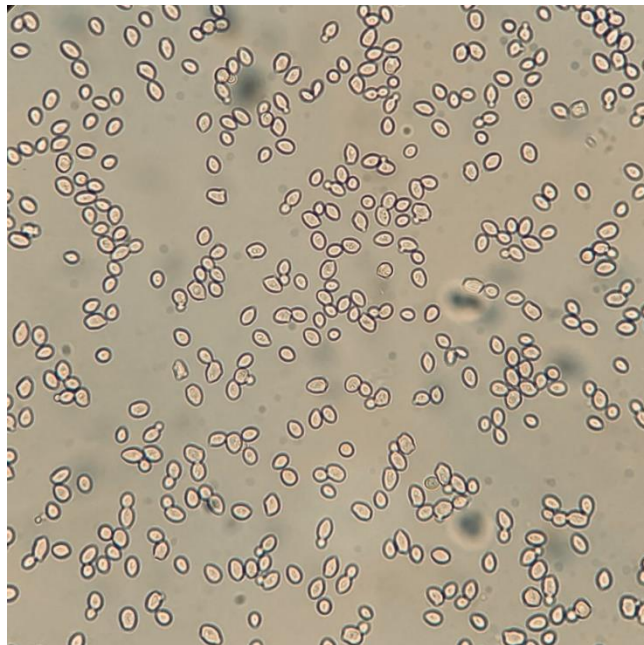
ΑΘΗΝΑ, ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2023



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

BACHELOR THESIS

**“EVALUATION OF PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF
INDIGENOUS WINE YEASTS ISOLATED FROM DIFFERENT
AREAS OF GREECE”**



Fermeli Maria-Danai

171104

Petridou Aikaterini

171077

Supervisor: Dimopoulou Maria

ATHENS, FEBRUARY 2023



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

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

**“ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΓΗΓΕΝΩΝ
ΖΥΜΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ”**

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1 ^{ου} Μέλους Επιτροπής)		
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2 ^{ου} Μέλους Επιτροπής)		
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3 ^{ου} Μέλους Επιτροπής)		

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

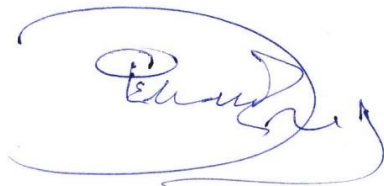
Ο/η κάτωθι υπογράφων/-ουσα Φέρμελη Μαρία-Δανάη του Νικολάου, με αριθμό μητρώου 171104 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων και Ποτών του Τμήματος Οίνου, Αμπέλου και Επιστημών Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι 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 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 31/12/2023 και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή*

Ο/Η Δηλών/ούσα

Φέρμελη Μαρία-Δανάη



*Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα Καθηγητή: Δημοπούλου Μαρία

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογράφων/-ουσα Πετρίδου Αικατερίνη του Γρηγορίου, με αριθμό μητρώου 171077 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων και Ποτών του Τμήματος Οίνου, Αμπέλου και Επιστημών 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 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 31/12/2023 και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή*

Ο/Η Δηλών/ούσα

Πετρίδου Αικατερίνη



*Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα Καθηγητή: Δημοπούλου Μαρία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον του οινολογικού κόσμου, για την χρήση των κατάλληλων ζυμομυκήτων ως εναρκτήριες καλλιέργειες στην αλκοολική ζύμωση, όλο και αυξάνεται. Στην παρούσα μελέτη, 188 ζυμομύκητες που είχαν προηγουμένως απομονωθεί από αυθόρμητες αλκοολικές ζυμώσεις ελληνικών οίνων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, αξιολογήθηκαν για τα τεχνολογικά τους χαρακτηριστικά με οινολογικό ενδιαφέρον όπως χαρακτηρίρα η εμφάνιση του χαρακτήρα killer, η παραγωγή οξικού οξέος και υδροθείου, η παραγωγή του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης καθώς και η αντοχή σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θειώδη ανυδρίτη. Με βάσει τα αποτελέσματα, η πλειοψηφία των ζυμών είναι ουδέτερες ως προς τον χαρακτήρα killer και παράγουν διαφορετικές συγκεντρώσεις οξικού οξέος Όσον αφορά την παραγωγή H₂S, παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις ως προς την ποσότητα παραγωγής ανά απομόνωση, ενώ τα περισσότερα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως εξαιρετικά ανθεκτικά ακόμη και παρουσία ακραίων συγκεντρώσεων SO₂. Στο τέλος οι απομονώσεις κατηγοριοποιήθηκαν ως προς τα αποτελέσματα στο σύνολο των φαινοτυπικών τους χαρακτηριστικών, σε ζύμες με χαμηλό και υψηλό οινολογικό δυναμικό. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης οδηγούν στην αξιολόγηση μιας ομάδας βασικών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των γηγενών ζυμών, τα οποία με τη σειρά τους θα καθορίσουν την καταλληλότητα του εκάστοτε ζυμομύκητα ώστε να επιλεγθεί ως καλλιέργεια εκκίνησης της αλκοολικής ζύμωσης για παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας.

Λέξεις κλειδιά: ζυμομύκητες, φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ζυμομυκήτων, εναρκτήριες καλλιέργειες, αλκοολική ζύμωση οίνου

ABSTRACT

Nowadays, the oenological interest about using indigenous yeasts with beneficial technological properties as starter cultures in wine fermentation is growing. In the present study, 188 yeast isolates from spontaneous alcoholic fermentation from Greek wines of different geographical regions were evaluated based on their phenotypic characteristics with oenological interest namely, killer character, acetic acid production, β -glycosidase production, H₂S production and SO₂ tolerance. Most of the isolates were characterized as neutral, producing different amounts of acetic acid. Moreover, regarding H₂S production some differences in quantity terms from yeast to yeast was noticed. It is noteworthy that most isolates show very high tolerance to SO₂ in vitro even in extremely high concentrations. Finally, all isolates were categorized based on the sum of the tested phenotypes to groups with low and high enological potential. The results of the present study led to an easy isolates characterization for the selection of yeast starters for the fermentation of high quality wines.

Key words: yeasts, wine yeasts, phenotypic characteristics, starter cultures, wine alcoholic fermentation

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την επιβλέπουσα καθηγήτρια της εργασίας μας, κυρία Δημοπούλου Μαρία, για την συνεργασία, την καθοδήγηση και τις συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος αλλά και της συγγραφής. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορ του τμήματος Τζαμουράνη Αικατερίνη για την όμορφη συνεργασία που είχαμε, την καθοδήγησή της και την βοήθειά της στην έρευνα κατά την διάρκεια του πειράματος και κατά την συγγραφή.

Φυσικά, δεν θα μπορούσαμε να παραλείψουμε να ευχαριστήσουμε την τριμελή επιτροπή των καθηγητών, για την παρουσία τους και την διαρκή καθοδήγησή τους και συνεργασία τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μας.

Τέλος, ευχαριστούμε τους φίλους και τις οικογένειες μας που ήταν δίπλα μας και μας στήριζαν για το απαιτητικό αυτό διάστημα της εκπόνησης της πτυχιακής μας εργασίας.

Πετρίδου Αικατερίνη - Φέρμελη Μαρία-Δανάη.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	8
1. Εισαγωγή.....	12
1.1. Οίνος.....	12
1.2. Η μικροχλωρίδα στην οινοποίηση.....	12
1.3. Αλκοολική ζύμωση & μικροοργανισμοί.....	14
1.4. Εναρκτήριες καλλιέργειες.....	19
1.4.1. Είναι επιθυμητή η χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών; Αυθόρμητες ή ελεγχόμενες ζυμώσεις;.....	19
1.4.2. Επιθυμητά και μη επιθυμητά χαρακτηριστικά εναρκτήριων.....	21
1.5. Τεχνολογικά χαρακτηριστικά ζυμομυκήτων με οινολογικό ενδιαφέρον.....	24
1.5.1. Χαρακτήρας Killer.....	24
1.5.2. Οξικό οξύ.....	25
1.5.3. Υδρόθειο (H ₂ S).....	25
1.5.4. β-γλυκοσιδάση.....	27
1.5.5. Θειώδης ανυδρίτης (SO ₂).....	29
2. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ.....	30
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
3.1. Όργανα & Σκεύη.....	33
3.2. Ανακαλλιέργεια – εμπλουτισμός μικροοργανισμών.....	33
3.3. Αξιολόγηση τεχνολογικών χαρακτηριστικών.....	34
3.3.1. Χαρακτήρας Killer.....	34
3.3.2. Οξικό οξύ.....	35
3.3.3. Ενζυματική δραστικότητα β-γλυκοσιδάσης.....	36
3.3.4. Παραγωγή υδρόθειου (H ₂ S).....	37
3.3.5. Αντοχή στο θειώδες (SO ₂).....	38
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
4.1. Χαρακτήρας killer.....	40
4.2. Παραγωγή οξικού οξέος.....	43
4.3. Παραγωγή β-γλυκοσιδάσης.....	43
4.4. Παραγωγή H ₂ S.....	44
4.5. Ανθεκτικότητα στο SO ₂	45
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	55

Κατάλογος Πινάκων

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Τεχνολογικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά ζυμών για την παραγωγή καλλιεργειών εκκίνησης

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Προέλευση δειγμάτων, ποικιλίες, οινοποιεία, χρονιές οινοποιήσεων και απομονώσεις ζυμομυκήτων

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Ταυτοποίηση δειγμάτων μέσω Φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Φαινοτυπικά αποτελέσματα των υπό μελέτη ζυμομυκήτων

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων

Κατάλογος Εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1: Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων που εμπλέκονται στην οινοποίηση

ΕΙΚΟΝΑ 2: Σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης της μικροχλωρίδας κατά την διάρκεια της οινοποίησης – από το σταφύλι μέχρι την εμφιάλωση του οίνου

ΕΙΚΟΝΑ 3: Σχηματική απεικόνιση των δευτερογενών αρωμάτων και των ενώσεων και παραγόντων απ' τους οποίους προκύπτουν

ΕΙΚΟΝΑ 4: Γενική απεικόνιση των μεταβολιτών του αρωματικού δυναμικού κατά την οινοποίηση

ΕΙΚΟΝΑ 5: Σχηματική απεικόνιση των τύπων της ζύμωσης

ΕΙΚΟΝΑ 6: Περιγραφή των χαρακτηριστικών και συνθηκών του κάθε τύπου ζύμωσης

ΕΙΚΟΝΑ 7: Χάρτης των περιοχών από τις οποίες απομονώθηκαν οι ζυμομύκητες

ΕΙΚΟΝΑ 8.1.: Υπόστρωμα killer με ανεπτυγμένες αποικίες

ΕΙΚΟΝΑ 8.2.: Υπόστρωμα για το οξικό οξύ με ανεπτυγμένες αποικίες, όπου παρατηρείται ο διαυγής δακτύλιος περιφερειακά ορισμένων αποικιών

ΕΙΚΟΝΑ 8.3.: Υπόστρωμα για β-γλυκοσιδάση με ανεπτυγμένες αποικίες ζυμών

ΕΙΚΟΝΑ 8.4.: Υπόστρωμα biggy agar με ανεπτυγμένες αποικίες με την μέθοδο της γραμμικής εξάπλωσης (streaking)

ΕΙΚΟΝΑ 8.5.: Υπόστρωμα για την αντοχή στο SO₂ με ανεπτυγμένες αποικίες σε συγκεντρώσεις SO₂ a) 0mg, b) 100mg, c) 200mg, d) 300mg, e) 400mg και f) 500mg

Κατάλογος Διαγραμμάτων

ΓΡΑΦΗΜΑ 1: Πλήθος απομονώσεων που ταυτοποιήθηκαν ως ευαίσθητες ζύμες killer εν συναρτήσει με την περιοχή απομόνωσης και το είδος του ζυμομύκητα

ΓΡΑΦΗΜΑ 2: Πλήθος απομονώσεων με μερικώς θετική απόκριση στο τεστ της β-γλυκοσιδάσης ως προς την περιοχή και το είδος του ζυμομύκητα

ΓΡΑΦΗΜΑ 3: (α & β). Πλήθος απομονώσεων της (α) μέγιστης παραγωγής και (β) της ελάχιστης παραγωγής του H₂S μετά από 8 ημέρες επώασης ως προς την περιοχή απομόνωσης και το είδος του ζυμομύκητα

ΓΡΑΦΗΜΑ 4: Πλήθος απομονώσεων με χαμηλής έως και της καλής ανθεκτικότητας στο θειώδες ως προς την περιοχή απομόνωσης και το είδος του ζυμομύκητα

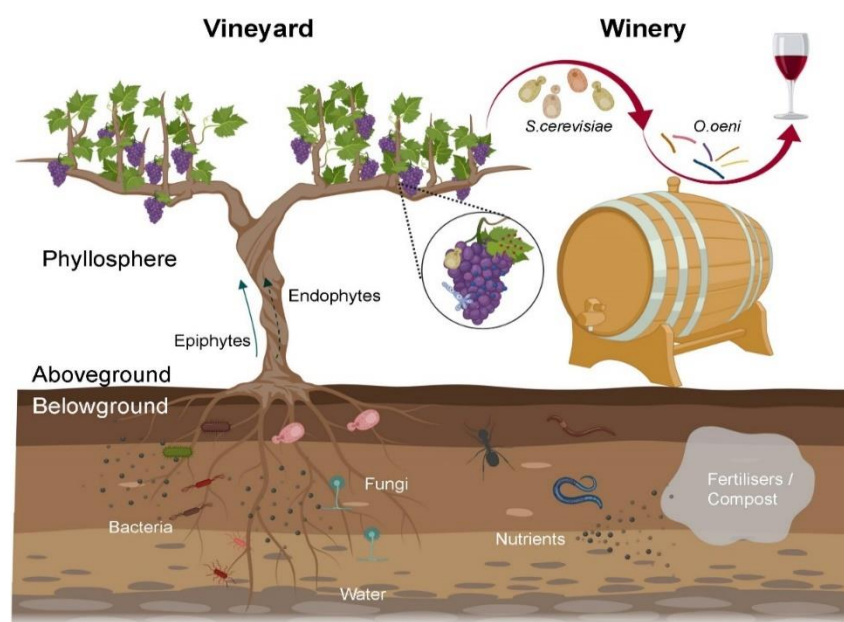
1. Εισαγωγή

1.1. Οίνος

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Οίνου και Αμπέλου OIV (International Organisation of Vine and Wine), ο οίνος ορίζεται ως το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με πλήρη ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών, είτε αυτά έχουν υποστεί έκθλιψη είτε όχι, ή γλεύκους σταφυλιών. Το επίπεδο της αλκόολης που περιλαμβάνει ο οίνος δεν πρέπει να είναι τουλάχιστον 8,5%vol και οξύτητα >3,5gr/L τρυγικού οξέος (OIV, 2013).

1.2. Η μικροχλωρίδα στην οινοποίηση

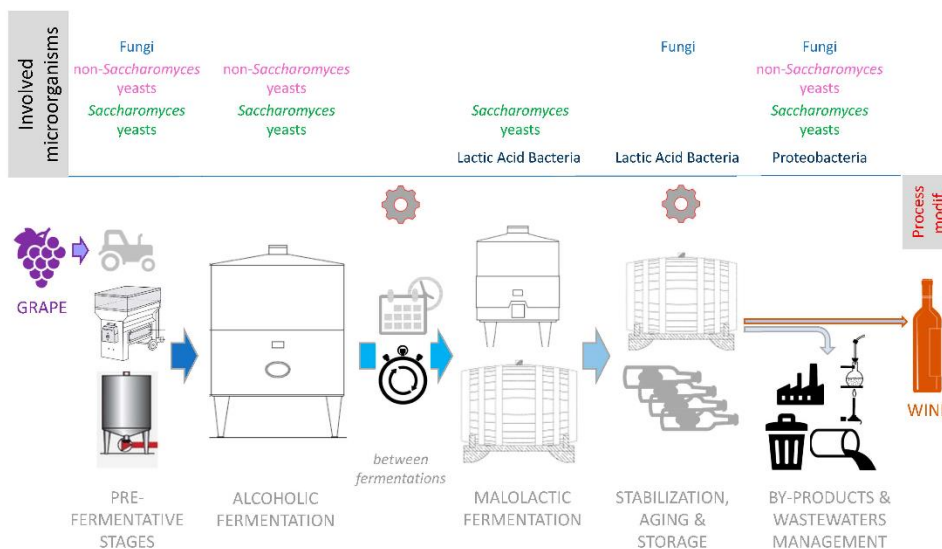
Πλήθος και ποικιλία μικροοργανισμών είναι αυτοί που υπάρχουν και συμμετέχουν στην οινοποίηση. Η πρώτη ύλη του οίνου είναι τα σταφύλια, τα σταφύλια αποτελούν ένα περιβάλλον ανάπτυξης πολλών μικροοργανισμών. Το έδαφος αποτελεί υπόστρωμα ανάπτυξης πολλών μυκήτων αλλά και βακτηρίων. Επίσης, οι ρίζες, τα φύλλα, τα άνθη ή/και οι καρποί – συγκεκριμένα ο φλοιός των σταφυλιών – είναι περιβάλλον ανάπτυξης μυκήτων και βακτηρίων αλλά και ζυμομυκήτων του είδους *Saccharomyces* ή και non *Saccharomyces*. Βακτήρια, μύκητες και ζυμομύκητες συναντιούνται και μετά την σύνθλιψη των σταφυλιών στον χυμό τους και αργότερα στο γλεύκος (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων που εμπλέκονται από το αμπέλι, στο σταφύλι, στην οινοποίησή του και έως ότου να παραχθεί ο οίνος (Liu et al., 2019).

Η βασική μεταβολική οδός που μετατρέπει το γλεύκος σταφυλιών σε οίνο είναι η αλκοολική ζύμωση. Η αλκοολική ζύμωση είναι ουσιαστικά η μετατροπή των σακχάρων του γλεύκους σε αλκοόλη (αιθανόλη) με παράλληλη απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα (Tristezza et al., 2014). Η διαδικασία αυτή φέρεται εις πέρας από τους ζυμομύκητες (Carozzi et al., 2015; Rainieri, 2000; Tsiare-Kollioroulou, 2022). Η έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης συνήθως πραγματοποιείται από τα non *Saccharomyces* γένη είναι αυτά που ξεκινούν την αλκοολική ζύμωση όπως *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Priceomyces*, *Trigonopsis*, *Torulaspota*, *Candida*, *Lachancea* (*Kluyveromyces*), *Metschnikowia* κ.α. Ωστόσο, κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης η πλειοψηφία των γηγενών μικροοργανισμών δεν θα μπορέσει να ανταπεξέλθει στις υπάρχουσες αντίξοες συνθήκες (υψηλή οσμωτική πίεση, παρουσία αλκοόλης και θειώδη ανυθρίτη, υψηλή οξύτητα κτλ). Συνεπώς οι non *Saccharomyces* ζύμες αντικαθίστανται πολύ γρήγορα από τα στελέχη του *S. cerevisiae*, τα οποία και οδηγούν την διαδικασία έως την αποζύμωση του οίνου (Carozzi et al., 2015; Tsiare-Kollioroulou, 2022).

Μετά την πλήρη αποζύμωση των σακχάρων – ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης – οι συνθήκες έχουν γίνει πιο ευνοϊκές και έχει δημιουργηθεί ένα νέο υπόστρωμα ανάπτυξης για μικροοργανισμούς. Κάποιοι τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι τα γαλακτικά βακτήρια που συμμετέχουν στην μηλογαλακτική ζύμωση των οίνων. Κατά το στάδιο των σταθεροποιήσεων και αργότερα της ωρίμανσης ή/και παλαίωσης των οίνων μπορεί να υπάρξει ανάπτυξη/εμφάνιση μη επιθυμητών μικροοργανισμών όπως οξικών βακτηρίων του γένους *Acetobacter* ή ζυμών αλλοίωσης που να ανήκουν στο γένος *Brettanomyces bruxellensis* (Bozoudi & Tsaltas, 2016; Liu et al., 2019; Nardi, 2020) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης της μικροχλωρίδας κατά την διάρκεια της οινοποίησης – από το σταφύλι μέχρι την εμφιάλωση του οίνου (Nardi, 2020).

1.3. Αλκοολική ζύμωση & μικροοργανισμοί

Το γλεύκος είναι ένα περιβάλλον που αποτελεί υπόστρωμα ανάπτυξης για πολλούς μικροοργανισμούς. Ωστόσο, το χαμηλό pH του (pH=3-3.6) και η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων (κατά μέσο όρο: 220g/L), το καθιστούν ως ένα υπόστρωμα ανάπτυξης για περιορισμένα είδη μικροοργανισμών (Carpello et al., 2010). Απ' την στιγμή που ξεκινάει η αλκοολική ζύμωση, οι αναερόβιες συνθήκες που δημιουργούνται συμβάλουν στην επιλεκτική επιβίωση των μικροοργανισμών. Δηλαδή οι μικροοργανισμοί που δεν μπορούν να επιβιώσουν στις συνθήκες που δημιουργεί ο μεταβολισμός της αλκοολικής ζύμωσης (π.χ. ορισμένοι μύκητες, βακτήρια κλπ.) αναστέλλονται προσωρινά ή/και δεν επιβιώνουν. Όσο η αλκοολική ζύμωση συνεχίζει, τα θρεπτικά συστατικά καταναλώνονται και η αιθανόλη αυξάνεται, με αποτέλεσμα την εξαφάνιση των ευαίσθητων στην αιθανόλη μικροοργανισμών (Carozzi et al., 2015; Rainieri, 2000).

1.3.1. Αλκοολική ζύμωση & ζυμομύκητες

Οι ζυμομύκητες παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην διαδικασία της οινοποίησης. Οι ζυμομύκητες είναι ευκαρυωτικοί και μονοκύτταροι μικροοργανισμοί, μικρών διαστάσεων (από 4 έως 40μm) που κατατάσσονται στο βασίλειο των μυκήτων. Ανάλογα με τον τρόπο πολλαπλασιασμού τους χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Οι σπορογόνες πολλαπλασιάζονται είτε αγενώς, μέσω εκβλαστήσεων ή/και

εγγενώς, μέσω σπορίων, ενώ οι ασπορόγονες πολλαπλασιάζονται αποκλειστικά με εκβλάστηση. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του κυττάρου των ζυμομυκήτων αυτά είναι ο πυρήνας, το κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, η κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι αυτό που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο όσον αφορά την αλκοολική ζύμωση, κατά την οποία απελευθερώνει συστατικά όπως γλυκάνες, μαννοπρωτεΐνες και μικρές ποσότητες χυτίνης, τα οποία συμβάλλουν στην ανάδειξη της πολυπλοκότητας των οργανοληπτικών χαρακτήρων του οίνου. Ωστόσο, ο ρόλος τους δεν σταματά εκεί. Τα πολλά διαφορετικά είδη των ζυμομυκήτων έχουν αντίστοιχα και διαφορετικές επιδράσεις στην ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Επομένως, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ποια είναι αυτά τα χαρακτηριστικά και ποιες οι επιδράσεις τους στον οίνο (Carozzi et al., 2015; Rainieri, 2000; Soufleros, 2015)

Στην περίπτωση μιας αυθόρμητης ζύμωσης τα χαρακτηριστικά των γηγενών ζυμομυκήτων που προϋπάρχουν στην φυσική μικροχλωρίδα του φλοιού του σταφυλιού δεν είναι απόλυτα προσδιορισίμα. Αντίστοιχα και οι επιδράσεις που μπορεί να έχουν αυτές οι «άγριες» ζύμες στο τελικό προϊόν δεν είναι γνωστές και πιθανόν ανεπιθύμητες. Αντίθετα, σε μια ελεγχόμενη ζύμωση, οι «επιλεγμένες» ζύμες που χρησιμοποιούνται έχουν γνωστές και κατά κύριο λόγο επιθυμητές ιδιότητες τόσο για την πορεία της οινοποίησης όσο και για το τελικό προϊόν. Παρ' όλα αυτά δεν αποτελεί πανάκεια το γεγονός ότι η χρήση «επιλεγμένων» ζυμών είναι πάντα μία επιτυχημένη διαδικασία καθώς το τελικό αποτέλεσμα δεν εξαρτάται αποκλειστικά από τη χρήση των κατάλληλων ζυμών (Carozzi et al., 2015; Comitini et al., 2011a; Rainieri & Pretorius, 2000).

1.3.2. Δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα ζυμομυκήτων

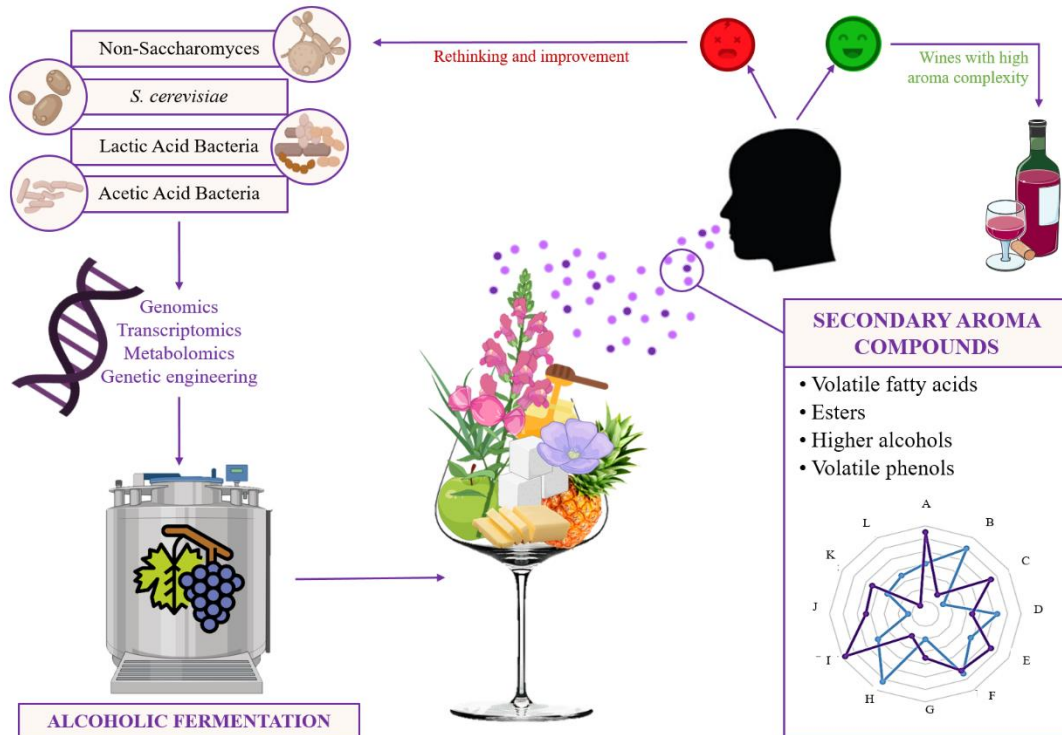
Κατά την οινοποίηση και πιο συγκεκριμένα στη φάση της αλκοολικής ζύμωσης, οι ζυμομύκητες εκτός από την αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα παράγουν και ορισμένες ουσίες που αποτελούν δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού τους. Μερικά από αυτά τα μεταβολικά προϊόντα μπορεί να έχουν επιθυμητές (β-γλυκοσιδάση, πρωτεάσες, κ.α.) ή/και ανεπιθύμητες επιδράσεις (ορισμένες θειούχες ενώσεις, οξικό οξύ σε υψηλές συγκεντρώσεις, κλπ.).

Οι ζυμομύκητες που προέρχονται από τα σταφύλια συμμετέχουν ενεργά στη απελευθέρωση των δευτερογενών αρωμάτων του οίνου. Πιο συγκεκριμένα μέσω της ενζυμικής τους δράσης, υδρολύουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς και απελευθερώνουν τα αρωματικά μόρια. Μεταξύ αυτών, μερικές από τις πιο γνωστές μονοτερπενικές αλκοόλες, όπως η λιναλοόλη, η γερανιόλη, η νερόλη κ.α., εμπλουτίζουν το μπουκέτο του οίνου με αρώματα ανθικά, φρουτώδη ή/και εσπεριδοειδών. Όσον αφορά τους μονοτερπενικούς γλυκοζίτες και τους εστέρες που περιλαμβάνονται δεν σημειώνεται σημαντική αλλαγή στην ποσότητά τους κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (Carpena et al., 2021).

Ωστόσο, ακόμη και το κυτταρικό τοίχωμα των ζυμομυκήτων απελευθερώνει ορισμένα σημαντικά συστατικά. Οι μαννοπρωτεΐνες είναι από τα σημαντικότερα μακρομόρια των οίνων, οι οποίες αποτελούν το 25-50% του κυτταρικού τοιχώματος των ζυμών, ενώ με την υδρόλυση τους απελευθερώνονται σημαντικά ένζυμα απαραίτητα για τη λειτουργία του κυττάρου (γλυκανάσες). Οι γλυκανάσες είναι τα ένζυμα που παραμένουν ακόμη και μετά την αποζύμωση του γλεύκους και συμβάλουν στην αυτόλυση των κυττάρων κατά την ωρίμανση του οίνου με τις οινολάσπες. Αυτή η τεχνική αποτελεί το επονομαζόμενο *battonage* (επαφή του αποζυμωμένου γλεύκους με τις οινολάσπες) ή/και δευτερογενούς ζύμωσης όταν γίνεται λόγος για αφρώδεις οίνους (Arenalovillena et al., 2017; Carozzi et al., 2015; Comitini et al., 2011b; Rainieri, 2000).

Πριν την αλκοολική ζύμωση τα αρώματα προκύπτουν από την σύνθλιψη ή/και πίεση των σταφυλιών, ενώ τα λεγόμενα αρώματα της ζύμωσης προκύπτουν κατά τη διάρκεια της αλκοολικής και της μηλογαλακτικής ζύμωσης – στην περίπτωση που η τελευταία επιλεγχθεί να εκπονηθεί (Carpena et al., 2021).

Οι ζυμομύκητες παράγουν ορισμένες ομάδες παραπροϊόντων του μεταβολισμού τους. Μερικές από τις σημαντικότερες είναι: οι ανώτερες αλκοόλες, οξέα, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες, ορισμένες πτητικές ενώσεις του θείου, όπως και ορισμένα ένζυμα. Κάθενα από αυτά τα παραπροϊόντα έχει σημαντική επίδραση στα οργανοληπτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των δευτερογενών αρωμάτων και των ενώσεων και παραγόντων απ' τους οποίους προκύπτουν (Carpena et al., 2021).

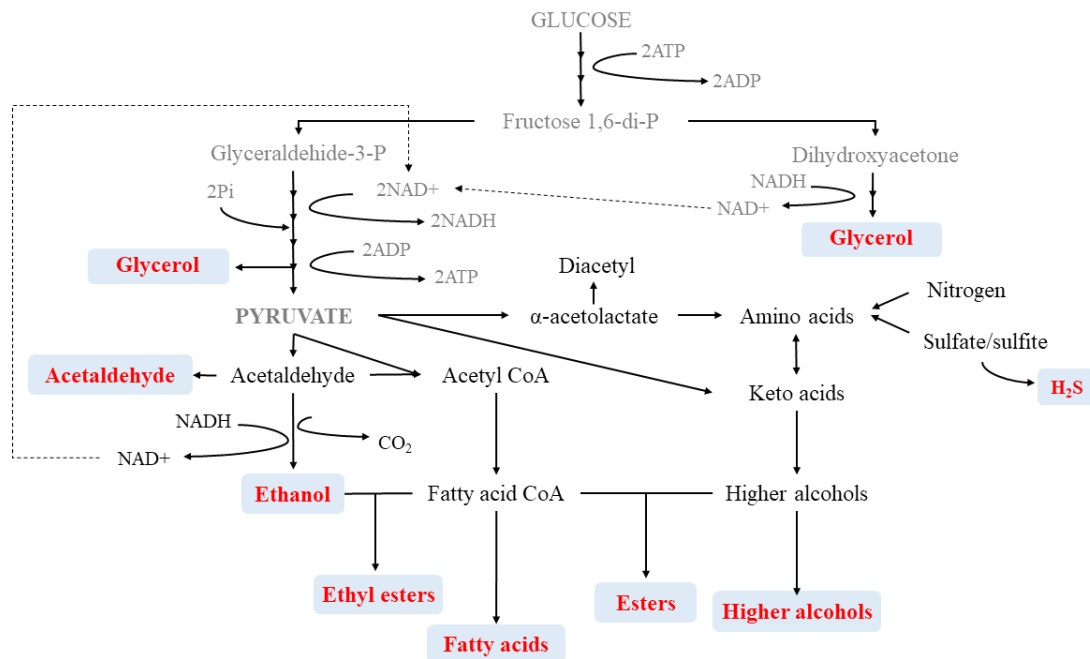
Οι βασικότερες κατηγορίες αρωματικών ενώσεων που παράγονται από τους μικροοργανισμούς μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω κατηγορίες (Εικόνα 4):

- Οι ανώτερες αλκοόλες παράγονται συνήθως σε μεγάλες ποσότητες και επηρεάζουν το αρωματικό δυναμικό των οίνων – είτε θετικά, είτε αρνητικά επικαλύπτοντας ορισμένα από τα επιθυμητά αρώματα (Comitini et al., 2011b).
- Οι εστέρες είναι οι ενώσεις που σχετίζονται άμεσα με το αρωματικό δυναμικό των οίνων, εμπλουτίζοντας το «μπουκέτο» τους με αρώματα φρούτων ή/και άνθεων.
- Τα οξέα στον οίνο είναι πολλά και διαφορετικά και δεν έχουν τα περισσότερα άμεση επίπτωση στα αρώματα του οίνου. Το τρυγικό οξύ – το οποίο αποτελεί το βασικότερο οξύ – δεν επηρεάζεται από την δράση των ζυμών. Ωστόσο, το μηλικό οξύ συνήθως μεταβολίζεται από ορισμένα στελέχη *S. cerevisiae*, προς παραγωγή άλλων υποπροϊόντων. Η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος είναι ανάλογη της παραγωγής της αιθανόλης κατά την αλκοολική ζύμωση. Το πυροσταφυλικό οξύ είναι ενδιάμεσος μεταβολίτης της διαδικασίας της γλυκόλυσης, ωστόσο αφορά οίνους που έχουν

οινοποιηθεί από σταφύλια προσβεβλημένα από σήψη (Comitini et al., 2011b). Το οξικό οξύ είναι προϊόν κυρίως βακτηριακής δραστηριότητας, ωστόσο παράγεται από κάποιες ζύμες σε μικρές.

- Η σημαντικότερη εκ της ομάδας των αλδευδών είναι η ακεταλδεΐδη. Η ακεταλδεΐδη εμπλέκεται άμεσα ως πρόδρομος της αιθανόλης στο μεταβολισμό των ζυμών (Comitini et al., 2011b). Επιπλέον, αποτελεί μία σημαντική ένωση λόγω της ιδιότητάς της να λειτουργεί σαν γέφυρα στη δημιουργία σταθερών συμπλόκων τανινών και ανθοκυανών κατά την ερυθρή οινοποίηση. Οι ζυμομύκητες παράγουν μικρές ποσότητες ακεταλδεΐδης, ωστόσο η ποσότητα και η παραγωγή επηρεάζονται άμεσα από τη διαθεσιμότητα σε θρεπτικά, τη θερμοκρασία όπως και την συγκέντρωση του διοξειδίου του θείου καθώς και το είδος/στέλεχος της ζύμης.
- Οι κετόνες παράγονται σε μικρές συγκεντρώσεις από τις ζύμες και συμβάλουν στο αρωματικό δυναμικό των οίνων (Comitini et al., 2011b). Παραδείγματος χάριν, η ακετοΐνη και το διακετύλιο συνδυαστικά με την συμβολή των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος κατά την μηλογαλακτική ζύμωση, προσδίδουν ένα ευχάριστο άρωμα καραμέλας βουτύρου.
- Η παραγωγή πτητικών ενώσεων του θείου από τους ζυμομύκητες είναι ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό καθώς οι περισσότερες από τις θειούχες ενώσεις αποτελούν προδρόμους δημιουργίας αναγωγικών οσμών (μερκαπτάνες, πολυμερκαπτάνες κλπ.). Η πιο γνωστή από αυτή την κατηγορία ενώσεων είναι το υδρόθειο (H_2S), που έχει χαρακτηριστική οσμή κλούβιου αυγού ή βραστού λάχανου.
- Όσον αφορά την ενζυμική δραστηριότητα των ζυμών είναι πολύ μία πολύ σημαντική ιδιότητα, η οποία παρατηρείται πιο έντονα σε non *Saccharomyces* ζυμομύκητες, στους οποίους παρατηρήθηκε παραγωγή εστερασών, γλυκοσιδασών, λιπασών, β-γλυκοσιδασών, πρωτεασών κ.α.. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Strauss et al. (2001) παρατηρήθηκε ότι ορισμένοι *S. cerevisiae*, ενώ δεν είναι αξιοσημείωτοι παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων, αποικοδομούν το πολυγαλακτουρονικό. Σύμφωνα με αντίστοιχες έρευνες, η παραγωγή γλυκοσιδασών από στελέχη *S. cerevisiae* είναι κάτι που έχει αρκετές προοπτικές και θα συμβάλει κομβικά στην βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων τόσο στις

αυθόρμητες όσο και στις ελεγχόμενες ζυμώσεις (Carpena et al., 2021; Strauss et al., 2001).



Εικόνα 4: Γενική απεικόνιση των μεταβολιτών του αρωματικού δυναμικού κατά την οινοποίηση (Carpena et al., 2021).

1.4. Εναρκτήριες καλλιέργειες

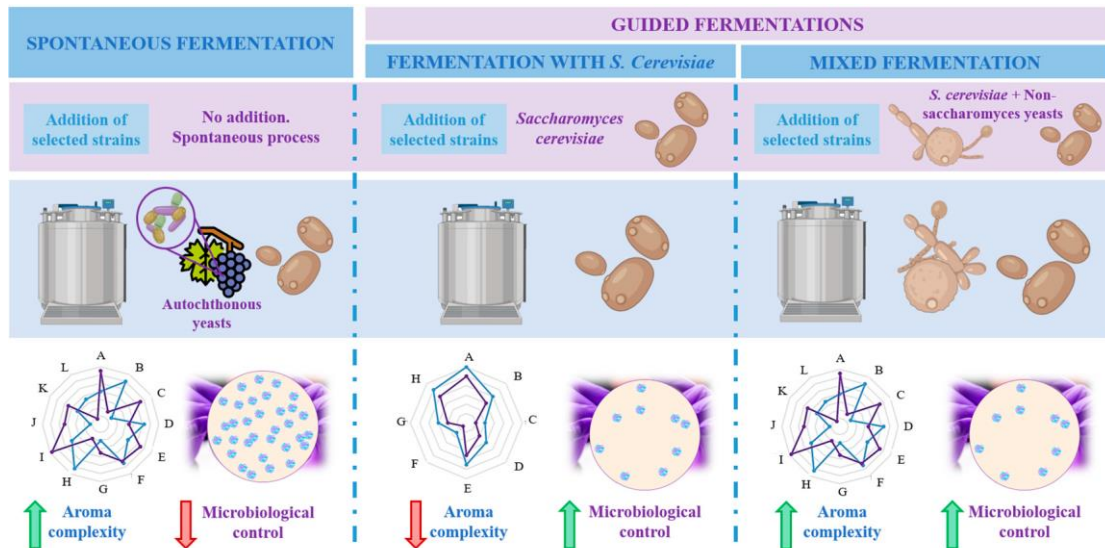
Μια καλλιέργεια εκκινήτη είναι ένα μικροβιακό στέλεχος που χαρακτηρίζεται και επιλέγεται για τις ιδιότητες ζύμωσης και γενικότερου βιοχημικού προφίλ που διαθέτει. Έχουν υποδειχθεί συγκεκριμένα κριτήρια για την επιλογή καλλιεργειών εκκίνησης ζυμών με εξαιρετικές οινολογικές ιδιότητες. Ωστόσο, το πρώτο θεμελιώδες βήμα για την επιλογή οινολογικών εκκινήτων είναι η διαθεσιμότητα γενετικών και μοριακών διαγνωστικών εργαλείων που επιτρέπουν τη γρήγορη και ακριβή ταυτοποίηση των ζυμομυκήτων, είτε σε επίπεδο είδους είτε σε επίπεδο στελέχους, και την παρακολούθησή τους κατά τη διάρκεια της οινικής ζύμωσης (Hurtado et al., 2010; De Castro et al., 2002).

1.4.1. Είναι επιθυμητή η χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών;

Αυθόρμητες ή ελεγχόμενες ζυμώσεις;

Παραδοσιακά η αλκοολική ζύμωση είναι μία διαδικασία που γίνεται αυθόρμητα, δηλαδή μέσω των γηγενών ζυμομυκήτων που υπάρχουν φυσικά στο σταφύλι. Ένα τέτοιο είδος ζύμωσης όμως δεν είναι απόλυτα ελεγχόμενο με κίνδυνο να δημιουργήσει προβλήματα επηρεάζοντας την ποιότητα του παραγόμενου

οίνου. Για τον λόγο αυτό εφαρμόστηκε ευρέως η «ελεγχόμενη» ζύμωση στην οποία χρησιμοποιούνται επιλεγμένα στελέχη ζυμομυκήτων ως εναρκτήρια καλλιέργεια τα οποία επικρατούν στα «άγρια» ή αλλιώς γηγενή στελέχη που υπάρχουν στο γλεύκος. Στην ζύμωση με χρήση εναρκτήριων καλλιιεργειών, δηλαδή επιλεγμένων στελεχών ζυμών, επιτυγχάνονται ελεγχόμενες συνθήκες ζύμωσης και η παραγωγή ενός τελικού προϊόντος προκαθορισμένης ποιότητας και με τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, τα επιλεγμένα στελέχη που χρησιμοποιούνται σαν εναρκτήριες καλλιέργειες σε μεγάλο βαθμό μπορούν να επικαλύψουν την τυπικότητα των αρωμάτων της κάθε περιοχής/ποικιλίας (*terroir*). Επιπλέον, ενδέχεται να μην επιτευχθεί η ομαλή προσαρμογή της εναρκτήριας καλλιέργειας στις ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν στον μούστο ή κατά τον εμβολιασμό, με αποτέλεσμα τα επιλεγμένα στελέχη να μην καταφέρουν να κυριαρχήσουν έναντι των γηγενών στελεχών, καθώς οι «άγριες» ζύμες μπορούν να ηγηθούν της διαδικασίας λόγω της καλύτερης προσαρμοστικότητάς τους στο περιβάλλον του οίνου (Aronte & Villano, 2020). Αντίθετα, στην περίπτωση της αυθόρμητης ζύμωσης με τις γηγενείς ζύμες οι παραγόμενοι οίνοι παρουσιάζουν πολυπλοκότητα αρωμάτων, πλούσιο μπουκέτο και βασικότερο όλων την τυπικότητα της περιοχής στην οποία καλλιεργήθηκε το σταφύλι εκφράζοντας το *terroir*. Ωστόσο ενδέχεται κατά την αυθόρμητη ζύμωση να δημιουργηθούν προβλήματα, όπως είναι η καθυστερημένη αλκοολική ζύμωση ή/και η διακοπή της, με άμεσο επακόλουθο την ανάπτυξη αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Aronte & Villano, 2020) (Εικόνα 5 και 6). Συμπερασματικά, το ερώτημα εάν είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούμε εναρκτήριες καλλιέργειες ή να επιλέγουμε αυθόρμητη ζύμωση δεν έχει ξεκάθαρη απάντηση και η επιλογή αφήνεται στην κρίση του εκάστοτε οινολόγου.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των τύπων της ζύμωσης, οι εφαρμοσμένες ζύμες σε κάθε περίπτωση και τα τελικά χαρακτηριστικά του επιδιωκόμενου τύπου οίνου σύμφωνα με το αρωματικό δυναμικό και τον έλεγχο της μικροχλωρίδας (Carpena et al., 2021).

Fermentation	Initial population	Inoculum	Fermentation span	Comments
a Spontaneous	 5-6 log ₁₀ CFU/ml		> 16 days	Variable outcome Stuck fermentation danger Quality control issues
b Pure culture <i>S. cerevisiae</i> 40 mg/L SO ₂	 ↓ 2-3 log ₁₀ CFU/ml	 <i>S. cerevisiae</i> 8 log ₁₀ CFU/ml	6-8 days	Quality controlled High ethanol yield Poor aroma profile

Εικόνα 6: Περιγραφή των χαρακτηριστικών και συνθηκών της κάθε ζύμωσης, όπου στο (a) αυθόρμητη ζύμωση και (b) ελεγχόμενη ζύμωση, με εμβολιασμός με ζυμομύκητες *S. cerevisiae* (Santamera et al., 2020).

1.4.2. Επιθυμητά και μη επιθυμητά χαρακτηριστικά εναρκτηρίων καλλιέργειών

Η επιλογή και η εφαρμογή μιας καλλιέργειας εκκίνησης είναι μια κρίσιμη και περίπλοκη διαδικασία για την επιτυχία της ζύμωσης. Οι συνθήκες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μπορεί να είναι ανασταλτικές για την ανάπτυξη των

επιλεγμένων στελεχών. Επιπλέον, η επιλογή ακατάλληλων στελεχών μπορεί να οδηγήσει σε αρνητικά αποτελέσματα, όπως η παραγωγή ανεπιθύμητων μεταβολιτών ή ακόμη και η εκτροπή της διαδικασίας. Παρόλο που, δεν υπάρχουν συγκεκριμένοι κανόνες για την επιλογή, υπάρχουν τρία βασικά βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν (Carnevali et al., 2007): (i) απομόνωση και επιλογή "in vitro"- η απομόνωση από το περιβάλλον ζύμωσης και ο χαρακτηρισμός των στελεχών είναι ένα σημαντικό βήμα για την επιλογή- (ii) επικύρωση σε εργαστηριακή κλίμακα- (iii) επικύρωση σε βιομηχανική κλίμακα- τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητές τους που παρουσιάζονται στην εργαστηριακή κλίμακα πρέπει να επιβεβαιωθούν σε ζυμώσεις μεγάλης κλίμακας. Οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να προσαρμόζονται εύκολα στο περιβάλλον της ζύμωσης και να έχουν μη παθογόνα και τα περισσότερα δυνατά τεχνολογικά χαρακτηριστικά.

Η επιλογή άγριων στελεχών *Saccharomyces* και non *Saccharomyces* που απομονώνονται από φυσικά περιβάλλοντα και ανήκουν σε μία αμπελουργική περιοχή είναι πάντα το σημείο εκκίνησης για ένα πρόγραμμα επιλογής ζύμης. Ειδικοί φαινότυποι που ενδιαφέρουν την οινοποίηση σχετίζονται με: (α) την απόδοση της ζύμωσης – η οποία επιτυγχάνεται με την πλήρη αποζύμωση των σακχάρων του γλεύκους, χωρίς την ανάπτυξη ανεπιθύμητων χαρακτηριστικών (π.χ. δυσοσμίες), (β) οργανοληπτική ποιότητα – με την ανάπτυξη ενός πλούσιου και πολύπλοκου μπουκέτου και (γ) αποτελεσματικότητα των κατεργασιών, ώστε να διευκολυνθεί η σταθεροποίηση και διαύγαση του οίνου. Πολλές μελέτες έχουν αξιολογήσει τέτοιους φαινοτύπους σε απομονώσεις *S. cerevisiae* που λαμβάνονται από οινοποιητικές περιοχές παγκοσμίως. Τα σχήματα επιλογής στελεχών βασίζονται συνήθως σε μια αυστηρή προσέγγιση, μειώνοντας τον αρχικά υψηλό αριθμό στελεχών που πρέπει να ελέγχονται με διαδοχικές δοκιμές (Caridi et al., 2002), όπου τα στελέχη απορρίπτονται όταν δεν πληρούν τα απαιτούμενα κριτήρια (Bozoudi & Tsaltas, 2016).

Συνήθως, οι καλλιέργειες εκκίνησης ή τα γηγενή στελέχη πρέπει να επιλέγονται με βάση τυπικά οινολογικά χαρακτηριστικά λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του γλεύκους, του τύπου οίνου που θα παρασκευαστεί και των επιθυμητών χαρακτηριστικών του. Μια αποτελεσματική διαδικασία για την επιλογή των στελεχών εκκίνησης *S. cerevisiae* χρειάζεται την αξιολόγηση μιας

σειράς ορισμένων χαρακτηριστικών με τελικό στόχο τη βελτιστοποίηση της συνολικής ποιότητας των οίνων (Tristezza et al., 2014). Αρκετοί συγγραφείς πρότειναν τεχνολογικά και ποιοτικά κριτήρια για την επιλογή των κατάλληλων στελεχών ζύμης (Nikolaou et al., 2006). Στον Πίνακα 1 αναφέρονται τα σημαντικότερα τεχνολογικά και ποιοτικά κριτήρια για την επιλογή των καλλιιεργειών εκκίνησης ζύμης.

Η ικανότητά τους να αναπτύσσονται και να κυριαρχούν στο γηγενές μικροβίωμα αποτελεί προϋπόθεση για την επιλογή τους ως καλλιέργειες εκκίνησης στη ζύμωση. Άλλα σχετικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν τον ειδικό για κάθε στέλεχος σχηματισμό μεταβολιτών που σχετίζονται με τη ζύμωση (όπως γλυκερόλη, γλυκινικό οξύ, ακεταλδεΐδη, n-προπανόλη, ισοβουτανόλη, ισοαμυλική αλκοόλη, και β-φαινυλαιθανόλη) και η παρουσία ειδικών εξωκυτταρικών ενζυμικών δραστηριοτήτων (β-γλυκοσιδάση, β-ξυλοσιδάση, πρωτεάση, πολυγαλακτουρονάση, πηκτινάση, γλυκανάση, ξυλανάση και αποκαρβοξυλάση) (Csoma et al. , 2010). Προφανώς, η ικανότητα επικράτησης των εναρκτήριων καλλιιεργειών είναι επίσης ένα κριτήριο που πρέπει να ελέγχεται κατά τη διάρκεια των προγραμμάτων τεχνολογικής επιλογής εναρκτήριων καλλιιεργειών. Πράγματι, αρκετές μελέτες υπέδειξαν ότι η κυριαρχία των καλλιιεργειών εκκινητών δεν είναι πάντα εγγυημένη, ως συνάρτηση της ποικιλότητας που συνδέεται με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα, και ότι κατά τη διάρκεια της οινοποίησης οι γηγενείς ζύμες μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν, επηρεάζοντας την κυριαρχία των εκκινητών (Beltran et al., 2002).

Πίνακας1. Τεχνολογικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά ζυμών για την παραγωγή καλλιιεργειών εκκίνησης.

Τεχνολογικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά
Αντοχή σε χαμηλό pH, υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και αιθανόλης, αντοχή στο διοξείδιο του θείου
Χαμηλή παραγωγή πτητικής οξύτητας
Χαμηλή παραγωγή θειούχων ενώσεων (H ₂ S, SO ₂)
Ζωτικότητα ζύμωσης

Επιθυμητές ενζυματικές δραστηριότητες (π.χ. β-γλυκοσιδάση, β-ξυλοσιδάση, πρωτεάση, πολυγαλακτουρονάση, πηκτινάση, γλυκανάση, ξυλανάση και αποκαρβοξυλάση)
Επιθυμητοί μεταβολίτες που σχετίζονται με τη ζύμωση (γλυκερόλη, οξικό οξύ, ακεταλδεΐδη, η-προπανόλη, ισοβουτανόλη, ισοαμυλική αλκοόλη και β-φαινυλαιθανόλη)
Ικανότητα επικράτησης

1.5. Τεχνολογικά χαρακτηριστικά ζυμομυκήτων με οινολογικό ενδιαφέρον

1.5.1. Χαρακτήρας Killer

Στα μισά του 20^{ου} αιώνα ανακαλύφθηκε η ιδιότητα κάποιων ζυμών που εκκρίνουν *killer* τοξίνες, η οποία είναι θανατηφόρα για τις ευαίσθητες ζύμες. Οι τοξίνες εκκρίνονται συνήθως από πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες αντιδρούν με τους υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των ευαίσθητων κυττάρων. Υπάρχει ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών που παράγουν τις τοξίνες, καθώς σε ένα δεδομένο είδος ή πληθυσμό μπορεί να περιλαμβάνονται μεμονωμένα στελέχη που να παράγουν διαφορετικές τοξίνες. Ομοίως εμφανίζεται ποικιλομορφία και όσον αφορά στην ευαισθησία και την ανθεκτικότητα των στελεχών στις τοξίνες, η οποία εξελίσσεται διαρκώς αναλογικά με τις εργαστηριακές μελέτες (Boynton, 2019). Ως *killer* (K) ορίζονται τα στελέχη των ζυμών που παράγουν και εκκρίνουν μία εξωκυτταρική τοξίνη πρωτεϊνικής ή γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως, η οποία είναι θανατηφόρα στα ευαίσθητα στελέχη (S). Ως ουδέτερα (N) ορίζονται τα στελέχη τα οποία δεν είναι ευαίσθητα στις τοξίνες αλλά ούτε τις παράγουν. Ως *killer* ευαίσθητα (KS) ορίζεται ο τύπος των στελεχών που παράγουν μία τοξίνη και παρουσιάζουν ανοσία στην τοξίνη που παράγουν, ενώ μπορεί να εμφανίσουν ευαισθησία στις τοξίνες που παράγουν άλλα είδη ζυμών (Sangorrín et al., 2001). Η εφαρμογή των *killer* στελεχών στην οινολογία συμβάλλει τόσο στην προστασία από επιμολύνσεις όσο και στην παραγωγή ενός υψηλά ποιοτικού προϊόντος που παρουσιάζει τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Florentina &

Gageanu, 2011). Τα στελέχη killer επικρατούν στις αποικίες ορισμένων ευαίσθητων γηγενών ζυμών και εξασφαλίζουν την παραγωγή ενός προϊόντος ελεγχόμενης ποιότητας και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (de Ullivarri et al., 2011).

1.5.2. Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ είναι το κύριο πτητικό οξύ των οίνων. Σχηματίζεται κατά τα αρχικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης και η παραγωγή του οφείλεται κατά κύριο λόγο σε βακτηριακή επιμόλυνση από οξικά ή/και γαλακτικά βακτήρια. Ωστόσο το οξικό οξύ παράγεται και από τον μεταβολισμό των *Saccharomyces* και άλλων ζυμών κατά την αλκοολική ζύμωση. Συγκεκριμένα, συνήθως παράγεται σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 100 έως 200 mg/L από τον *S. cerevisiae*. Οι συγκεντρώσεις αυτές επηρεάζονται τόσο από το στέλεχος της εκάστοτε ζύμης όσο και από τις συνθήκες θερμοκρασίας ζύμωσης και τη σύνθεση του χυμού των σταφυλιών (Boulton et al., 2018). Το οξικό οξύ είναι ανεπιθύμητο σε υψηλές συγκεντρώσεις λόγω των αρνητικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που ενδέχεται να παρουσιάσει ο οίνος. Παρ' όλο που ο *Saccharomyces* παράγει μια ποσότητα οξικού οξέος, η συγκέντρωση στην οποία το παράγει δεν υπερβαίνει τα νόμιμα όρια.

1.5.3. Υδρόθειο (H₂S)

Το υδρόθειο (H₂S) είναι μια ανεπιθύμητη αρωματική ένωση που υπάρχει συχνά στους οίνους από σταφύλια (*Vitis vinifera* L.) και στους μηλίτες (*Malus domestica* Borkh). Κατά τη ζύμωση των σταφυλιών, η ανεπάρκεια αφομοιώσιμου αζώτου (YAN) μπορεί να συμβάλει στην αυξημένη παραγωγή υδροθείου (H₂S) (Giudici & Kunkee, 1994). Ωστόσο, το στέλεχος της ζύμης, η θερμοκρασία και οι ελλείψεις σε άλλα θρεπτικά συστατικά της ζύμης, όπως η βιοτίνη και το παντοθενικό οξύ (Bohlscheid et al., 2011), συμβάλλουν επίσης στον σχηματισμό H₂S. Επομένως, είναι λογικό να αναμένεται ότι οι διαφορές στη χημεία μεταξύ των μούστων σταφυλιών μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση της ζύμωσης. Το YAN περιλαμβάνει πρωτογενές αμινοάζωτο (PAN) και αμμώνιο, τα οποία επηρεάζουν το ρυθμό ζύμωσης, έτσι ώστε χαμηλότερες συγκεντρώσεις YAN μπορεί να οδηγήσουν σε αργές ή σταματημένες («κολλημένες») ζυμώσεις (Bisson, 1999). Το αμμώνιο αφομοιώνεται κατά

προτίμηση από τις ζύμες κατά τη ζύμωση (Jiranek *et al.*, 1995). Παρά το γεγονός αυτό, η μεγαλύτερη συγκέντρωση PAN αυξάνει τους ρυθμούς ανάπτυξης των ζυμών, περισσότερο από ό,τι η συγκέντρωση αμμωνίου από μόνη της. Μείγματα αμμωνίου και PAN έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν τους ρυθμούς ανάπτυξης των ζυμών σε σύγκριση με οποιοδήποτε συστατικό μόνο του (Beltran *et al.*, 2005). Η αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης YAN, του ρυθμού ανάπτυξης της ζύμης και της συνολικής παραγωγής H₂S έχει καταδειχθεί στη ζύμωση οίνου σταφυλιών (Butzke & Park, 2011), και αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη αμμωνίου και των περισσότερων αμινοξέων οδηγεί σε μείωση του σχηματισμού H₂S κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Giudici & Kunkee, 1994). Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε ότι οι πηγές αζώτου αφομοιώνονται διαφορετικά λόγω της καταστολής των καταβολικών αζώτου και πιθανώς επηρεάζουν επίσης την παραγωγή H₂S. Στο μούστο, η αργινίνη είναι γενικά το πιο διαδεδομένο συστατικό PAN των οινοποιήσιμων σταφυλιών (Bell & Henschke, 2005). Οι διαφορές στη σύνθεση των αμινοξέων στο χυμό μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορές στην παραγωγή πτητικών αρωματικών ενώσεων και H₂S κατά τη ζύμωση. Η μεθειονίνη δρα ως αναστολέας στην ακολουθία αναγωγής του θείου (SRS), η οποία διαφορετικά θα παρήγαγε ελεύθερα ιόντα θείου κατά τον κανονικό μεταβολισμό της ζύμης, προκαλώντας την παραγωγή H₂S (König *et al.*, 2009). Όταν υπάρχει μεθειονίνη στο γλεύκος κατά τη ζύμωση, η παραγωγή H₂S είναι χαμηλότερη από ό,τι στη ζύμωση χωρίς παρουσία μεθειονίνης (Eschenbruch, 1974). Δεν έχει προσδιοριστεί η κατώτατη συγκέντρωση μεθειονίνης που θα αναστείλει την παραγωγή H₂S, αλλά ο Eschenbruch (1974) πρότεινε ότι η συγκέντρωση πρέπει να είναι τουλάχιστον 20 mg L⁻¹, όμως οι συγκεντρώσεις μεθειονίνης που βρίσκονται στο χυμό σταφυλιών συχνά υπερβαίνουν τα 20 mg/L (Ye *et al.*, 2014).

Η παραγωγή υδρόθειου (H₂S) αποτελεί «μείζονα ανησυχία στην οινοποίηση, δεδομένου ότι έχει βαθιά αρνητική επίδραση στην οργανοληπτική ποιότητα των οίνων λόγω της οσμής του σάπιου αυγού που ανιχνεύεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Στον *S. cerevisiae*, το H₂S είναι το προϊόν του μονοπατιού της αλληλουχίας αναγωγής θειικών (SRS) και δρα ως ενδιάμεσο προϊόν στη βιοσύνθεση των αμινοξέων που περιέχουν θείο (Thomas *et al.*, 1993). Η

βιοσύνθεση των θειούχων αμινοξέων απαιτεί πρόδρομες ενώσεις άνθρακα που περιέχουν άζωτο και προέρχονται από την ενδοκυτταρική δεξαμενή αζώτου και θειούχο από την οδό αναγωγής θειικών αλάτων. Έτσι, ο ρυθμός σχηματισμού H₂S φαίνεται να ρυθμίζεται από τις κυτταρικές απαιτήσεις για θειούχα αμινοξέα και τη διατήρηση των ενδοκυτταρικών δεξαμενών αζώτου (Fleet, 1993). Διάφοροι περιβαλλοντικοί και διατροφικοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με την παραγωγή H₂S σε συνθήκες οινοποίησης, συγκεκριμένα

- (1) Επίπεδα στοιχειακού θείου (Thomas et al., 1993) που είναι φυσικά διαθέσιμο ως θειικό άλας σε μέση συγκέντρωση 200 mg l⁻¹ (Fleet, 1993),
- (2) Παρουσία διοξειδίου του θείου (Stratford & Rose, 1985) που συνήθως προστίθεται (50-200 mg l⁻¹) στο γλεύκος σταφυλιών πριν από τη ζύμωση του οίνου,
- (3) Παρουσία οργανικών ενώσεων που περιέχουν θείο (Acree et al., 1972), και
- (4) Ανεπάρκεια βιταμινών (Wang et al., 2003).

Ωστόσο, έχουν αναφερθεί φτωχές συσχετίσεις μεταξύ του σχηματισμού H₂S και του αφομοιώσιμου αζώτου (Vos & Gray, 1979). Παρ' όλα αυτά, οι επιδράσεις του αζώτου, καθώς και οι παράγοντες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το γενετικό υπόβαθρο της ζύμης (Spiropoulos et al., 2000), καθιστώντας δύσκολη την ανάπτυξη στρατηγικών για την πρόληψη του σχηματισμού H₂S κατά την οινοποίηση. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η φύση και η διαθεσιμότητα του αφομοιώσιμου από τη ζύμη αζώτου παίζουν σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Τα οργανικά οξέα, οι ανώτερες αλκοόλες, οι αλδεΐδες, οι κετόνες και οι θειούχες ενώσεις έχουν θεωρηθεί τα σημαντικότερα οργανοληπτικά συστατικά του οίνου και αποτελούν την κύρια ομάδα ενώσεων που σχηματίζουν το "μπουκέτο ζύμωσης" (Sponholz et al., 1991).

1.5.4. β-γλυκοσιδάση

Η β-γλυκοσιδάση είναι ένα ένζυμο που υδρολύει τους β-D-γλυκοζιτικούς δεσμούς διαφόρων ενώσεων που περιλαμβάνουν αλκυλο-β-D-γλυκοζίτες, αρυλο-β-D-γλυκοζίτες, κυανογενείς γλυκοζίτες, δισακχαρίτες και

ολιγοσακχαρίτες μικρής αλυσίδας απελευθερώνοντας γλυκόζη από το μη αναγωγικό τους άκρο, επιπλέον, έχουν αναφερθεί και ορισμένες νέες β-γλυκοσιδάσες με δράση β-γαλακτοσιδάσης και β-ξυλοσιδάσης (Yeoman *et al.*, 2010). Υπό ορισμένες συνθήκες, η β-γλυκοσιδάση καταλύει επίσης συνθετικές αντιδράσεις ολιγοσακχαριτών/γλυκοζιτών (Sonia *et al.*, 2008). Η β-γλυκοσιδάση διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες. Για παράδειγμα, στα φυτά, εμπλέκεται στην άμυνα, στη σύνθεση της αλυσίδας β-γλυκάνης και στο μεταβολισμό του κυτταρικού τοιχώματος, στη λιγνινοποίηση, στην ενεργοποίηση των φυτοορμονών, στο δευτερογενή μεταβολισμό και στην ωρίμανση των καρπών (Gerardi *et al.*, 2001). Στους μικροοργανισμούς, παίζει ρόλο στην υδρόλυση της κυτταρίνης, στην ανακύκλωση του άνθρακα και στην επαγωγή γονιδίων κυτταρινάσης. Οι β-γλυκοσιδάσες, ιδίως εκείνες που προέρχονται από μικροβιακές πηγές, έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες, όπως η παραγωγή βιοαιθανόλης, η βελτίωση του αρώματος στη βιομηχανία οίνου και χυμών φρούτων μέσω της απελευθέρωσης αρωματικών ενώσεων από άοσμους γλυκοζίτες. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι ερευνητές αποκάλυψαν ότι οι περισσότερες από τις αρωματικές ενώσεις στα φυτά και στους ιστούς των φρούτων παρουσιάζονται με μορφή άοσμων, μη πτητικών ενώσεων (Maicas & Mateo, 2005).

Γλυκοσιδικές αρωματικές ενώσεις έχουν αναφερθεί σε ευρύ φάσμα φρούτων όπως το σταφύλι, το κίτρινο δαμάσκηνο, το μάνγκο και η φράουλα. Αυτοί οι γλυκοζίτες είναι πολύπλοκοι και ποικίλοι ως προς τις δομές τους, ιδίως ως προς το τμήμα της αγλυκόνης. Το τμήμα της γλυκόνης αποτελείται συνήθως από μονάδα γλυκόζης συζευγμένη με διάφορους γλυκοζίτες, όπως 6-O-α-λαραβινοφουρανοσυλ-β-D-γλυκοπυρανοζίτες και 6-O-α-λαραβινοπυρανοσυλ-β-D-γλυκοπυρανοζίτες. Για να καταστούν αυτές οι αρωματικές ενώσεις διαθέσιμες για το περιεχόμενο αρωματικών ουσιών, πρέπει να υδρολυθούν για να απελευθερωθεί το τμήμα της αγλυκόνης. Η υδρόλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση οξέων ή, πιο ευνοϊκά, ενζύμων. Η ενζυματική υδρόλυση πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικά στάδια, πρώτον, ένζυμα όπως η α-L-ραμνοσιδάση ή η α-L-αραμνοσιδάση διασπούν το τελικό σάκχαρο: αραβινόζη και ραμνόζη, δεύτερον, η β-γλυκοσιδάση δρα επί του αντίστοιχου β-

D-γλυκοζίτη απελευθερώνοντας γλυκόζη και τμήμα αγλυκόνης όπως η μονοτερπενόλη (Gunata et al., 1988). Δυστυχώς, η β-γλυκοσιδάση από φυτά, όπως τα σταφύλια, έχει χαμηλή δραστικότητα και είναι ασταθής σε συνθήκες οينوποίησης, επομένως η προσθήκη β-γλυκοσιδάσης από μικρόβια με υψηλή δραστικότητα και σταθερότητα είναι υποχρεωτική για την πλήρη υδρόλυση των αρωματικών ενώσεων. Έχει αναφερθεί β-γλυκοσιδάση με υψηλή υδρολυτική απόδοση για τερπενυλικούς γλυκοζίτες από το *Sporidiobolus pararoseus* και το *Aureobasidium pullulans*, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή εφαρμογή τους για την ανάπτυξη του αρώματος του οίνου. Έχει αναφερθεί μια άλλη β-γλυκοσιδάση από το *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 ικανή να υδρολύει γλυκοζίτες που υπάρχουν στο κρασί μοσχάτου (Michlmayr et al., 2010). Μια άλλη β-γλυκοσιδάση από *Lactobacillus brevis*, βακτήριο γαλακτικού οξέος, με δραστηριότητες ξυλοσιδάσης, αραβινοσιδάσης και κυτταροβιοσιδάσης διεγέρθηκε από αιθανόλη και μεθανόλη έως και 2 φορές, και έχει διάρκεια ζωής 50 ημέρες σε pH 7,0 και 4 ημέρες σε pH 4,0, γεγονός που υποδηλώνει τη δυνατότητα αξιοποίησής της για την ενίσχυση του αρώματος του οίνου. Ο *Oenococcus oeni* ST81 βρέθηκε να παράγει μια β-γλυκοσιδάση με υψηλή ανοχή στη φρουκτόζη, το μηλικό οξύ, τη μαννιτόλη ή τη σορβιτόλη και η δραστηριότητά του αυξήθηκε από την αιθανόλη έως και 147% και ο χρόνος ημιζωής του σε pH 5,0 ήταν 50 ημέρες, γεγονός που το καθιστά ενδιαφέρον για την οينوποίηση (Mesas et al., 2012). Μια εξωκυτταρική β-γλυκοσιδάση από το *Issatchenkia terricola* βρέθηκε επίσης να είναι ιδιαίτερα δραστική παρουσία 18% αιθανόλης, 10% γλυκόζης και 6% μεταδιθειώδους με σχετική σταθερότητα σε pH 3,0. Ακίνητοποιήθηκε επίσης σε Eupergit C αυξάνοντας τη σταθερότητά της και οδηγώντας σε αρωματοποίηση του λευκού κρασιού Μοσχάτου κατά τη διάρκεια πειράματος 16 ημερών αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε μονοτερπένια και νορισοπρενοειδή. Οι Vervoort et al. (2016) ανέφεραν μια β-γλυκοσιδάση από το *Brettanomyces anomalus* ικανή να παράγει σαλικυλικό μεθύλιο, λιναλοόλη, βενζυλική αλκοόλη και ευγενόλη σε σύγκριση με εκείνη από το *A. Niger* και τη γλυκοσιδάση του αμυγδάλου (Vervoort et al., 2016).

1.5.5. Θειώδης ανυδρίτης (SO₂)

Η χρήση του διοξειδίου του θείου στην οينوποίηση χρονολογείται από πολύ παλιά. Κατά τις αρχές του 20ου αιώνα διαπιστώθηκε ότι η αντιμικροβιακή

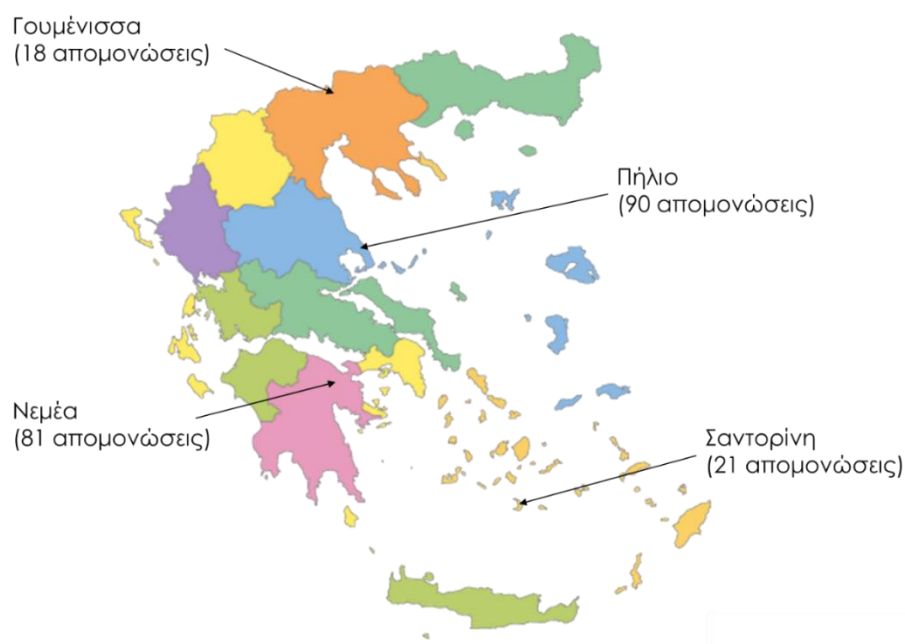
δράση των ελεύθερων μορφών του SO₂ ήταν περίπου κατά 50 φορές υψηλότερη από αυτή των δεσμευμένων του μορφών. Έχει πολλαπλές χρήσεις και εφαρμογές στην οινολογία και γι' αυτό ο ρόλος του θεωρείται ζωτικής σημασίας. Το μεγαλύτερο ποσοστό του SO₂ προστίθεται σκόπιμα στον μούστο ή/και στον οίνο, παρ' όλα αυτά σημαντικές ποσότητες παράγονται και από τους ίδιους τους ζυμομύκητες κατά την αλκοολική ζύμωση (Boulton *et al.*, 2018). Το διοξείδιο του θείου λειτουργεί κυρίως ως αντιμικροβιακός και αντιοξειδωτικός παράγοντας, προστατεύοντας έτσι τον μούστο ή/και τον οίνο από βακτηριακές – και όχι μόνο – επιμολύνσεις, όπως και από μία ενδεχόμενη οξειδωση. Το SO₂ αποτελεί, επίσης έναν μοχλό μέσω του οποίου ελέγχεται η μικροβιακή χλωρίδα, προκρίνοντας την δράση των επιθυμητών στελεχών και αναστέλλοντας την δράση των μη επιθυμητών. Τέλος, μπορεί να έχει θετική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, εμμέσως λόγω τη αποφυγής της οξειδωσης και άμεσα λόγω της δέσμευσης της ακεταλδεΐδης.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της μελέτης ήταν η αξιολόγηση των τεχνολογικών χαρακτηριστικών 188 ζυμομυκήτων με οινολογικό ενδιαφέρον που απομονώθηκαν από διαφορετικές γεωγραφικές ζώνες της Ελλάδας. Οι ζυμομύκητες αξιολογήθηκαν για το κάθε χαρακτηριστικό μέσω της παρακολούθησης της ανάπτυξής τους σε συγκεκριμένο τύπο υποστρωμάτων. Ποια είναι, λοιπόν, τα χαρακτηριστικά που πρέπει να πληροί ένας ζυμομύκητας ώστε να είναι κατάλληλος να χρησιμοποιηθεί ως εναρκτήριο καλλιέργεια μιας αλκοολικής ζύμωσης και τι επίδραση θα έχουν όλα αυτά στο τελικό προϊόν; Στο τέλος της παρούσης μελέτης προτείνονται οι απομονώσεις ζυμομυκήτων με το μεγαλύτερο οινολογικό δυναμικό βάσει των χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας οδηγούν στην αξιολόγηση των βασικότερων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που στοχεύουν στην επιλογή του κατάλληλου ζυμομύκητα ως εναρκτήριο καλλιέργεια.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη αυτή επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση των απομονώσεων ζυμομυκήτων που φαίνονται στον Πίνακα 2 ως προς τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά. Οι απομονώσεις λήφθηκαν από οίνους που βρίσκονταν στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, διαφόρων ποικιλιών και περιοχών της Ελλάδας (Εικόνα 7). Οι απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ανήκουν στη συλλογή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του ΠΑΔΑ και ταυτοποιήθηκαν (Πίνακας 3) στα πλαίσια του προγράμματος ΕΣΠΑ Ελλάδα-Ισραήλ 2019 (project code: T10ΔΙΣ-00060).



Εικόνα 7: Γεωγραφική διασπορά απομονωμένων ζυμομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ανήκουν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του ΠΑΔΑ.

Πίνακας 2. Προέλευση δειγμάτων, ποικιλίες, οινοποιεία, χρονιές οινοποιήσεων και απομονώσεις ζυμομυκήτων.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΧΡΟΝΙΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΖΥΜΩΝ
A6	Σαντορίνη	Ασύρτικο	2020	16
A9	Καλάβρυτα	Ροδίτης	2019	1
A10	Καλάβρυτα	Chardonnay	2019	3
GB	Καλάβρυτα	Ασύρτικο	2020	5
A30	Νεμέα	Ασύρτικο	2020	16
A32	Νεμέα	Αγιωργίτικο	2019	20
A33	Νεμέα	Αγιωργίτικο	2019	20
A34	Νεμέα	Αγιωργίτικο	2019	20
K13	Γουμένισσα	Ξινόμαυρο	2019	8
K16	Γουμένισσα	Ξινόμαυρο	2020	12
A19	Γουμένισσα	50 Μαλαγουζιά/ 50 Μοσχάτο	2020	6
K21	Πήλιο	Ξινόμαυρο	2019	10
K22	Πήλιο	Cabernet Sauvignon	2019	1
K23	Πήλιο	Ξινόμαυρο	2020	25
K24	Πήλιο	Ξινόμαυρο	2018	23
A26	Πήλιο	Ασύρτικο	2020	23
K29	Πήλιο	Ξινόμαυρο	2020	21

Πίνακας 3: Ταυτοποίηση δειγμάτων μέσω αναλύσεων MALDI-TOFF

Είδη	%	Απομονώσεις
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88,3	166
<i>Trigonopsis californica</i>	0,5	1
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	2,7	5
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	4,3	8
<i>Priceomyces carsonii</i>	0,5	1
<i>Pichia manshurica</i>	3,7	7

3.1. Όργανα & Σκεύη

Στη διάρκεια της παρούσας πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω εργαστηριακός εξοπλισμός:

- pH-μετρο HANNA HI 2210
- ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- αναλυτικός ζυγός ακριβείας
- μαγνητικός αναδευτήρας και θερμαντήρας
- κλίβανος αποστείρωσης
- επωαστικός κλίβανος
- μικροσκόπιο
- φιάλες Duran
- ογκομετρικές φιάλες
- ογκομετρικοί κύλινδροι
- σιφώνια
- μικροπιπέτες
- πουάρ
- falcons
- erpendorf
- τρυβλία petri

3.2. Ανακαλλιέργεια – εμπλουτισμός μικροοργανισμών

Τα στελέχη που προηγουμένως είχαν αποθηκεύει σε υπόστρωμα με 30% v/v γλυκερόλη στους -20°C ανακαλλιεργήθηκαν (100 μL) στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPD Broth (10% w/v yeast extract, 20% w/v peptone, 20% w/v dextrose) σε σωληνάκια των 7 ml. Τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 28°C για 48h. Οι μικροοργανισμοί διατηρήθηκαν σε υπόστρωμα 30% γλυκερόλης και 70% YPD Broth στην κατάψυξη στους -20 °C σε Erpendorf.

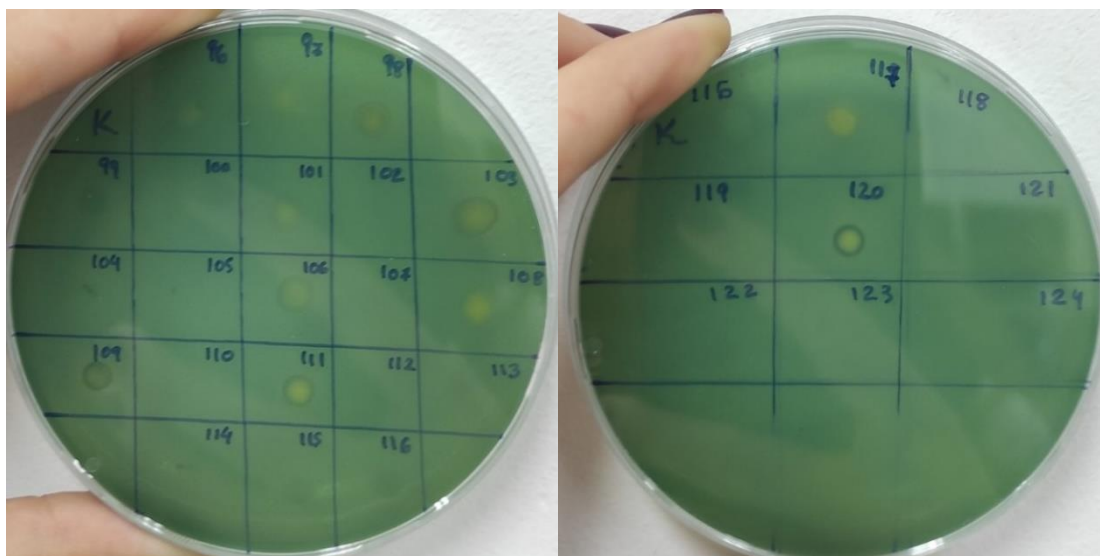
3.3. Αξιολόγηση τεχνολογικών χαρακτηριστικών

Τα tests στα οποία υποβλήθηκαν οι απομονώσεις ήταν ως προς την παραγωγή υδρόθειου (H_2S), την ανθεκτικότητα και δυνατότητα παραγωγής της τοξίνης killer, την παραγωγή του οξικού οξέος, την ανθεκτικότητα στο SO_2 και τέλος την παραγωγή της β-γλυκοσιδάσης. Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για όλα τα στελέχη κάθε πειράματος.

3.3.1. Χαρακτήρας Killer

Στη συγκεκριμένη δοκιμή εξετάστηκε τόσο η ανθεκτικότητα κάθε απομόνωσης στην killer τοξίνη όσο και η παραγωγή της τοξίνης. Τα στελέχη υποβλήθηκαν σε συνθήκες ανάπτυξης σε ειδικό τύπο υπόστρωματος και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού (ζυμομύκητα) – στην περίπτωση που στο υπόστρωμα ήταν ενσωματωμένο το στέλεχος killer – αλλά και η εμφάνιση ή όχι ζώνης διαύγασης περιφερειακά της αποικίας – στην περίπτωση που ήταν ενσωματωμένο το killer ευαίσθητο στέλεχος. Για το υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν YPD άγαρ σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 2,1% w/v και όξινου φωσφορικού νατρίου 10,1% w/v με ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 4,64. Μετά το πέρας της αποστείρωσης προστέθηκε ασηπτικά στο υπόστρωμα φιλτραρισμένο με 0.45μm μπλε του μεθυλενίου 20 ml/L. Στη συνέχεια ενσωματώθηκαν 100 μL από το στέλεχος (*S. cerevisiae* VIN13, Anchor, France) killer στα τρυβλία που αξιολογήθηκε η ανθεκτικότητα στην τοξίνη killer και 100μL από το στέλεχος (*S. cerevisiae* SO classic, Martin Vialatte, France) killer ευαίσθητο στα τρυβλία που αξιολογήθηκε η παραγωγή της τοξίνης killer. Αφού το υπόστρωμα έπηξε πλήρως, έγινε εμβολιασμός 10 μL με μικροπιπέτα. Τα εμβολιασμένα, πλέον, τρυβλία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 28°C και παρατηρήθηκαν στις 2, 5 και 8 ημέρες. Για την αξιολόγηση του εν λόγω χαρακτηριστικού: α) στην περίπτωση του ενσωματωμένου στο υπόστρωμα killer είτε παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικίας (θετικό) είτε όχι (αρνητικό) και β) στην περίπτωση του ενσωματωμένου στο υπόστρωμα killer ευαίσθητου είτε παρατηρήθηκε ζώνη διαύγασης γύρω από την αποικία (θετικό) είτε όχι (αρνητικό). Το στέλεχος χαρακτηρίστηκε ως ουδέτερο (neutral) στην περίπτωση που παρατηρήθηκε ανάπτυξη αλλά όχι

παραγωγή της τοξίνης ή ευαίσθητο (sensitive) στην περίπτωση που δεν αναπτύχθηκε.

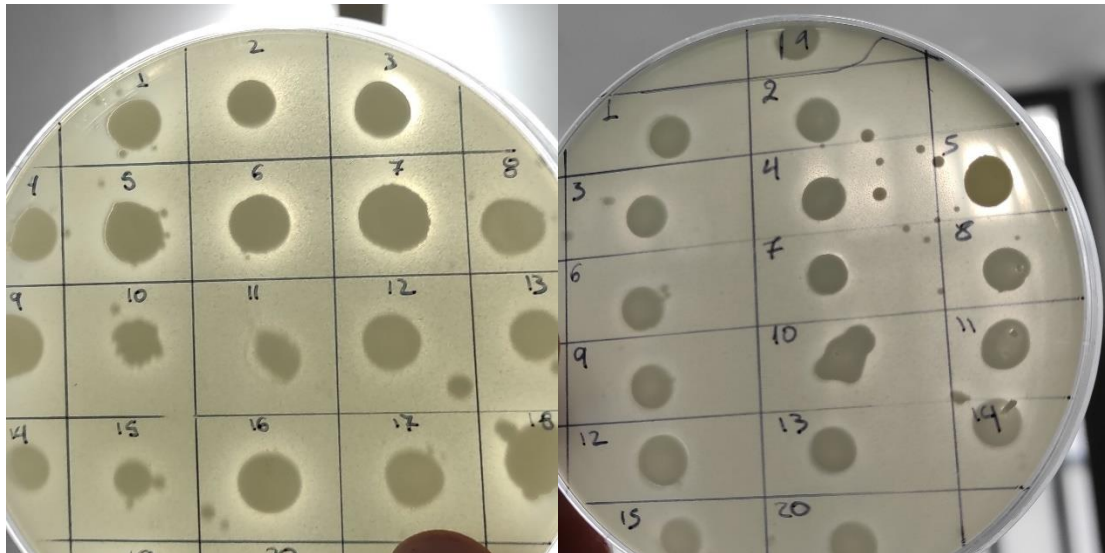


Εικόνα 8.1. Υπόστρωμα killer με ανεπτυγμένες αποικίες.

3.3.2. Οξικό οξύ

Η συγκεκριμένη δοκιμή αφορά την παραγωγή οξικού οξέος από τα στελέχη των ζυμών.

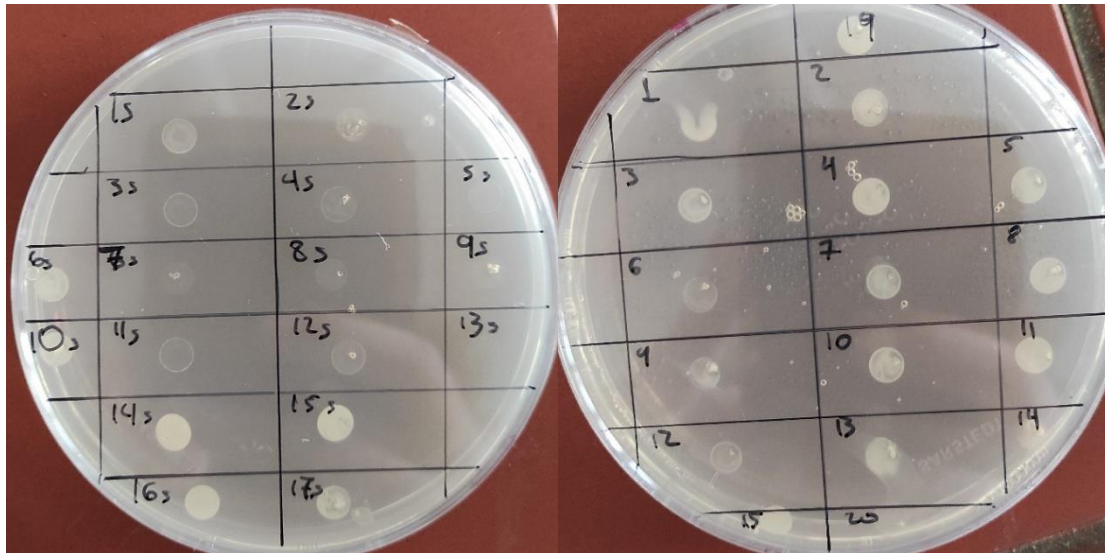
Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε: 5g/L CaCO_3 , 3g/L Yeast extract, 15g/L Agar, και 15g/L Dextrose. Το CaCO_3 που χρησιμοποιήθηκε ως κύριο συστατικό του υποστρώματος του συγκεκριμένου πειράματος, χρησιμεύει ως «δείκτης» για τον σχηματισμό ή μη του οξικού οξέος καθώς με την παραγωγή οξικού οξέος το ανθρακικό ασβέστιο υδρολύεται και παρατηρείται ζώνη διαύγασης. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με μεταφορά 10 μL από την εμπλουτισμένη καλλιέργεια με μικροπιπέτα. Τα εμβολιασμένα, πλέον, τρυβλία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 28°C και παρατηρήθηκαν στις 2, 5 και 8 ημέρες. Θετική αντίδραση στην παραγωγή οξικού οξέος παρατηρήθηκε όπου διαπιστώθηκε διαυγής δακτύλιος περιμετρικά της αποικίας.



Εικόνα 8.2. Υπόστρωμα για το οξικό οξύ με ανεπτυγμένες αποικίες, όπου παρατηρείται ο διαυγής δακτύλιος περιφερειακά ορισμένων αποικιών

3.3.3. Ενζυματική δραστικότητα β-γλυκοσιδάσης

Το συγκεκριμένο πείραμα αφορά την παραγωγή β-γλυκοσιδάσης από τα στελέχη των ζυμών. Για το υπόστρωμα ζυγίστηκαν 6,7 g/L YNB, 5 g/L Arbutin, 20 g/L Agar, το pH προσαρμόστηκε στο 5 και μετά το πέρας της αποστείρωσης προστέθηκαν 8mL αποστειρωμένου και φιλτραρισμένου διαλύματος της χρωστικής 1% w/v Ferric ammonium citrate (FAC). Παρά το γεγονός ότι το FAC θεωρείται χρωστική, δεν επηρεάζεται από τις συνθήκες του κλιβάνου αποστείρωσης (121°C, 15 min), λόγω όμως του φωτοευαίσθητου σιδήρου που περιλαμβάνεται στη σύστασή του, η προσθήκη του πραγματοποιήθηκε μετά την αποστείρωση του υποστρώματος. Τα εμβολιασμένα με 10μL από τις υγρές καλλιέργειες, πλέον, τρυβλία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 28°C για 15 μέρες. Για την αξιολόγηση του εν λόγω χαρακτηριστικού παρατηρήθηκε ο χρωματισμός του υποστρώματος και της αποικίας (καφέτιασμα).



Εικόνα 8.3. Υπόστρωμα για β-γλυκοσιδάση με ανεπτυγμένες αποικίες απομονώσεων, τα οποία δεν παράγουν την β-γλυκοσιδάση

3.3.4. Παραγωγή υδρόθειου (H_2S)

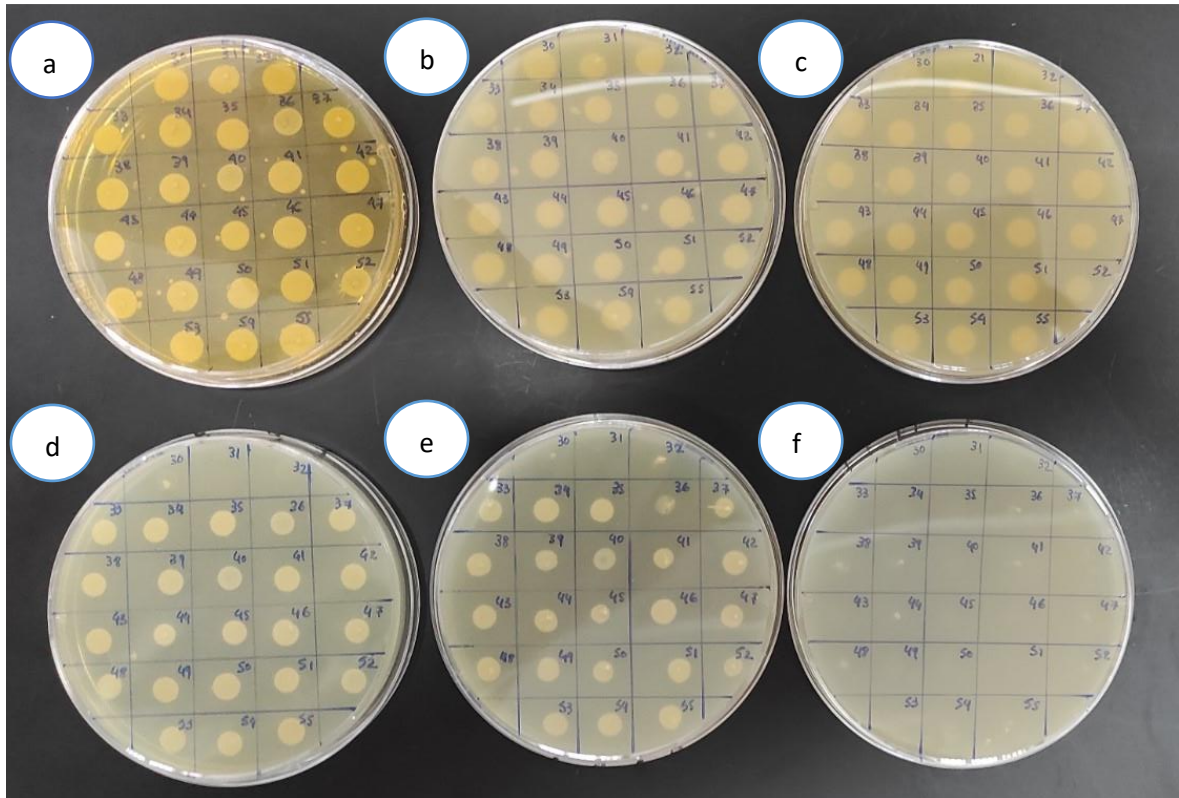
Για την μελέτη του εν λόγω χαρακτηριστικού χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα (Biggy agar Condalab, Madrid), το οποίο ανιχνεύει το βασικό επίπεδο της παραγωγής της αναγωγικής οσμής του H_2S (Linderholm et al., 2008). Το Biggy Agar περιέχει βισμούθιο, το οποίο χρησιμεύει σαν «δείκτης» για την παραγωγή του σουλφιδίου. Έτσι όσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή σουλφιδίου τόσο πιο σκούρο χρώμα εμφανίζουν οι αποικίες, λόγω της κατακρήμνισης του σουλφιδίου του βισμούθιου (Linderholm et al., 2008). 10 μ L εμβολίου τοποθετήθηκαν στα τρυβλία τη μέθοδο γραμμικής εξάπλωσης (*streaking*) και ακολούθησε επώαση στους 28°C. Οι καλλιέργειες παρατηρήθηκαν στις 2, 5 και 8 ημέρες. Η παραγωγή υδρόθειου αξιολογήθηκε ανάλογα με το χρώμα των αποικιών την εκάστοτε μέρα που παρατηρήθηκαν τα τρυβλία (λευκό αν δεν έχει παραχθεί H_2S , ανοιχτό καφέ, καφέ, σκούρο καφέ αν έχει παραχθεί μεγάλη ποσότητα H_2S) χαρακτηρίστηκαν τα στελέχη για την ικανότητα παραγωγής υδρόθειου.



Εικόνα 8.4. Υπόστρωμα biggy agar με ανεπτυγμένες αποικίες με την μέθοδο της γραμμικής εξάπλωσης (streaking), (λευκό αν δεν έχει παραχθεί H_2S , ανοιχτό καφέ, καφέ, σκούρο καφέ αν έχει παραχθεί μεγάλη ποσότητα H_2S).

3.3.5. Αντοχή στο θειώδες (SO_2)

Το συγκεκριμένο πείραμα αφορά την αντοχή των απομονώσεων στις διάφορες συγκεντρώσεις θειώδους. Για το υπόστρωμα ζυγίστηκαν YPD [10g/L Yeast extract, 20g/L Peptone, 20g/L Dextrose, pH=3]. Μετά την περάτωση της αποστείρωσης, προστέθηκε ασηπτικά η 40g άγαρ στο υπόστρωμα, ώστε να βεβαιωθούμε για την πήξη του υποοστρώματος και η φιάλη τέθηκε σε βρασμό υπό ανάδευση στον μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι την διαλυτοποίηση και ενσωμάτωση του άγαρ στο υπόστρωμα. Έπειτα, προστέθηκαν ασηπτικά οι αντίστοιχοι όγκοι υδατικού διαλύματος 20 g/L potassium metabisulfite ($K_2S_2O_5$), το οποίο προηγουμένως είχε υποστεί φιλτράρισμα σε πορώδες 0,45 μ m ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις ελεύθερου SO_2 στα τρυβλία να αντιστοιχούν σε 0, 100, 200, 300, 400 και 500 mg/L. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με ασηπτική μεταφορά 10 μ L από την υγρή καλλιέργεια με μικροπιπέτα. Τα εμβολιασμένα, πλέον, τρυβλία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 28°C και παρατηρήθηκαν στις 2, 5 και 8 ημέρες. Ανθεκτικότητα στο θειώδες παρουσίασαν τα στελέχη που κατάφεραν να αναπτύξουν αποικία στο θρεπτικό υπόστρωμα.



Εικόνα 8.5. Υπόστρωμα για την αντοχή στο SO₂ με ανεπτυγμένες αποικίες σε συγκεντρώσεις SO₂ a) 0mg/L, b) 100mg/L, c) 200mg/L, d) 300mg/L, e) 400mg/L και f) 500mg/L

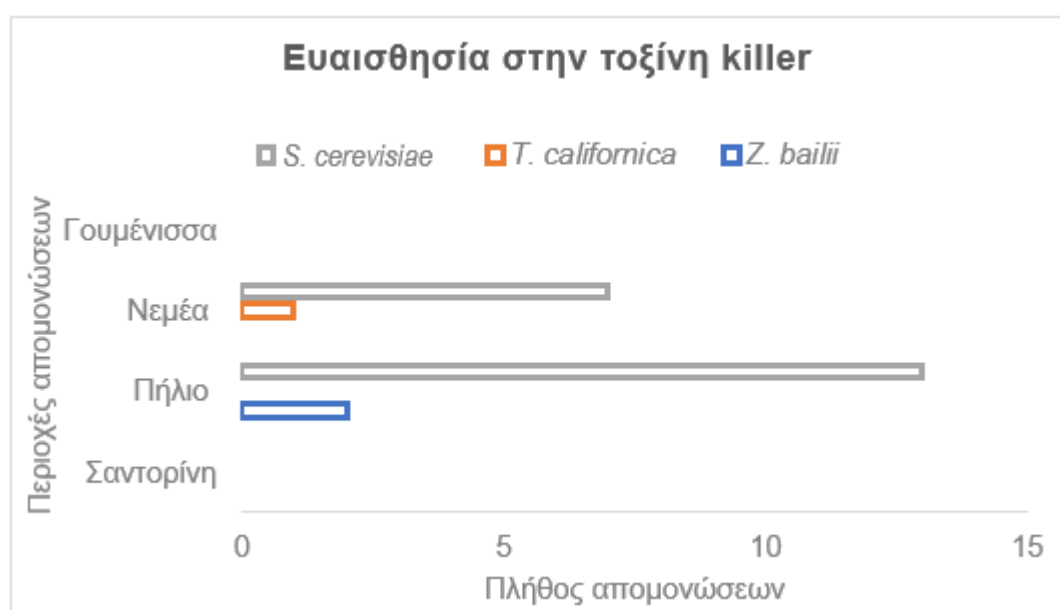
Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για όλες τις απομονώσεις κάθε πειράματος.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συνολικά εξετάστηκαν 188 απομονώσεις (166 *S. cerevisiae*, 8 *Z. bailii*, 7 *P. manshurica*, 5 *B. bruxellensis*, 1 *T. californica*, 1 *P. carsonii*) με μικροβιολογικές τεχνικές σε κατάλληλο για την κάθε παράμετρο θρεπτικό υπόστρωμα. Η διερεύνηση πραγματοποιήθηκε ώστε να αξιολογηθούν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της κάθε απομόνωσης ως προς το φαινόμενο killer, την παραγωγή υδρόθειου, οξικού οξέος, β- γλυκοσιδάσης και την αντοχή σε διάφορες συγκεντρώσεις SO₂.

4.1. Χαρακτήρας killer

Στο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό, παρατηρήθηκε ότι μόνο το 12% των ζυμών (23 απομονώσεις) χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στην killer τοξίνη όπως φαίνεται γραφικά στο *Διάγραμμα 1*, ενώ οι υπόλοιπες ζύμες ταυτοποιήθηκαν ως ουδέτερες. Δεν εντοπίστηκαν στελέχη ζυμών που να εμφάνισαν killer χαρακτήρα. Ανάμεσα στις 23 ευαίσθητες ζύμες, η μοναδική απομόνωση της *T. californica* χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητη στην killer τοξίνη, οι 20 απομονώσεις ανήκουν στο είδος *S. cerevisiae* και προέρχονται από τις περιοχές της Νεμέας και του Πήλιου, ενώ οι άλλες δύο απομονώσεις από *Z. bailii* από την περιοχή του Πήλιου. Στις περιοχές της Σαντορίνης και της Γουμένισσας όλα τα στελέχη ανεξαρτήτως είδους ταυτοποιήθηκαν ως ουδέτερα.



Γράφημα 1: Πλήθος απομονώσεων που ταυτοποιήθηκαν ως killer ευαίσθητα εν συναρτήσεσι με την περιοχή απομόνωσης και το είδος του ζυμομύκητα.

Το γεγονός ότι η συντριπτική πλειοψηφία των ζυμών χαρακτηρίστηκαν ουδέτερες ως προς την killer τοξίνη, κρίνεται ως πολύ ικανοποιητικό αποτέλεσμα καθώς δηλώνει ότι τα στελέχη ήταν ανθεκτικά και κατάφεραν να αναπτυχθούν παρουσία της τοξίνης, παρ' όλα αυτά δεν έχουν την ικανότητα παραγωγής της, ώστε να αποτελούν ρυθμιστικούς παράγοντες έναντι άλλων πιθανών ανεπιθύμητων ζυμών. Γι' αυτό το λόγο, είναι πολύ επιθυμητό χαρακτηριστικό για ζυμομύκητες που θα χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριοι καλλιέργειες. Αντίθετα, ο ευαίσθητος φαινότυπος δηλώνει την ευαισθησία των απομονώσεων ως προς την τοξίνη, με αποτέλεσμα η τελευταία να εμποδίζει την ανάπτυξή τους και ζυμομύκητες με αυτό το χαρακτηριστικό κρίνονται ακατάλληλοι για να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες έναρξης.

Έχει παρατηρηθεί μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά την χρήση killer ζυμών ως εναρκτήριοι καλλιέργειες για την παραγωγή οίνων και αφρωδών οίνων. Η δράση τους για την αποφυγή ή τη μείωση της προσβολής του οίνου από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς, οι οποίοι παρουσιάζουν ευαισθησία στην τοξίνη και η ικανότητά τους να επιταχύνουν την έναρξη της αυτόλυσης των ζυμών κατά την παραγωγή αφρωδών οίνων συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος (de Ullivarri et al., 2011), (de Ullivarri et al., 2014), (Velázquez et al., 2016). Σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι οι αυτόχθονες ζύμες είναι κατά κύριο λόγο ευαίσθητες και ουδέτερες. Πράγματι, οι *P. manshurica* και *Z. bailii* χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες/ουδέτερες, όσον αφορά το χαρακτηριστικό αυτό, ενώ ο χαρακτήρας killer ποικίλει μεταξύ των *S. cerevisiae* στελεχών (Comitini et al., 2011b; de Ullivarri et al., 2014; Velázquez et al., 2016). Σε αντίστοιχη μελέτη των Sangorrín et al. (2001), φάνηκε πως από ένα σύνολο 100 απομονώσεων το 91% των απομονώσεων *S. cerevisiae* αξιολογήθηκαν σαν killer ευαίσθητα για κάποιες απ' τις αναφερόμενες τοξίνες, ενώ το υπόλοιπο 9% παρουσίασε ανθεκτικότητα σε όλες τις αναφερόμενες τοξίνες. Επίσης, αξιολογήθηκαν και στελέχη non *Saccharomyces* και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από ένα σύνολο 35 απομονώσεων, το 42% ήταν ευαίσθητα, ενώ το 58% κατατάχθηκαν στον ουδέτερο φαινότυπο (Sangorrín et al., 2001). Στη μελέτη των Ullivarri et al., (2014) αναφέρθηκε όσον αφορά στα στελέχη του *Z. bailii* που εξετάστηκαν ότι

παρουσίασαν μεγάλη ευαισθησία στην τοξίνη, κάτι που δεν είναι χαρακτηριστικό όλων των απομονώσεων *Z. bailii* της παρούσας μελέτης. Στην ίδια μελέτη, των Ullivarri et. al., (2014), παρουσιάζεται η δυνατότητα συνδυασμού τόσο killer απομονώσεων όσο και των τοξινών τους για τον έλεγχο της μικροβιακής χλωρίδας που υφίσταται κατά την ζύμωση και την εξαφάνιση των ανεπιθύμητων σε αυτή μικροοργανισμών (de Ullivarri et al., 2014). Προτείνεται, επίσης η χρήση συνδυασμού *Saccharomyces* και non *Saccharomyces* απομονώσεων ως εναρκτήριοις καλλιέργειες στη ζύμωση, καθώς έχουν κομβικό αντίκτυπο στην ανάδειξη των οργανοληπτικών χαρακτήρων του οίνου, αλλά και στην αποφυγή παραγωγής υψηλών συγκεντρώσεων ανεπιθύμητων οσμών. Τα στελέχη του γένους *Zygosaccharomyces* είναι ένα από τα πιο καταστροφικά είδη αλλοιωτικών στελεχών. Πρόκειται για ιδιαίτερα ανθεκτικές ζύμες που μπορούν και αναπτύσσονται κάτω από αντίξοες συνθήκες (χαμηλό, pH, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων συντηρητικών κ.ο.κ.). Μεταξύ αυτών, ο *Z. bailii* είναι γνωστός για την ικανότητά του να αναπτύσσεται σε υπερβολικά υψηλές συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα νόμιμα όρια των συγκεντρώσεων. Ένας από τους τρόπους που συνιστανται για να τεθεί υπό έλεγχο η ανάπτυξη αυτών των στελεχών είναι μέσω την δράση των killer ζυμών και των τοξινών τους. Παρ' όλα αυτά όπως φαίνεται και στην παρούσα μελέτη οι απομονώσεις του *Z. bailii* δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στην killer τοξίνη που δοκιμάστηκε σε μεγάλο ποσοστό. Κρίνοντας από τα αποτελέσματα μόνο 2 από τα 8 στελέχη του είδους παρουσίασαν ευαισθησία στην τοξίνη. Σε αντίστοιχη έρευνα παρατηρούνται ανάλογα αποτελέσματα, που φανερώνουν ότι τα περισσότερα στελέχη *Z. bailii* χαρακτηρίζονται από τον ουδέτερο φαινότυπο ως προς killer και ένα μικρό ποσοστό μόνο παρουσιάζει ευαισθησία έναντι ορισμένων τοξινών (Alonso et al., 2014). Τα στελέχη *Brettanomyces bruxellensis* ανήκουν στην κατηγορία των ζυμών αλλοίωσης του οίνου, προκειμένου, λοιπόν, να τεθεί υπό έλεγχο η ανάπτυξή τους χρησιμοποιήθηκαν killer στελέχη (Santos et al., 2020). Παρ' όλα αυτά στην παρούσα μελέτη καμία απομόνωση του είδους *B. bruxellensis* δεν χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητη ως προς την killer τοξίνη που δοκιμάστηκε. Σε αντίστοιχη μελέτη, επίσης, παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα των απομονώσεων ως προς τις περισσότερες τοξίνες, με εξαίρεση ένα μικρό ποσοστό που παρουσίασε ευαισθησία (Santos et al., 2020).

4.2. Παραγωγή οξικού οξέος

Η παρακολούθηση της παραγωγής οξικού οξέος πραγματοποιήθηκε καθώς ορισμένες ποικιλίες *Saccharomyces* ζύμες παράγουν ανεπιθύμητες συγκεντρώσεις οξικού οξέος και οξικού αιθυλεστέρα από τα σάκχαρα, γεγονός που κρίνεται ακατάλληλο για την οινοποίηση (Caridi et al., 2002), (Rodríguez et al., 2004). Παρ' όλα αυτά, τα στελέχη με αρνητική δράση είναι πιο επιθυμητά, καθώς οι υψηλές ποσότητες οξικού οξέος δεν είναι επιθυμητές στον οίνο.

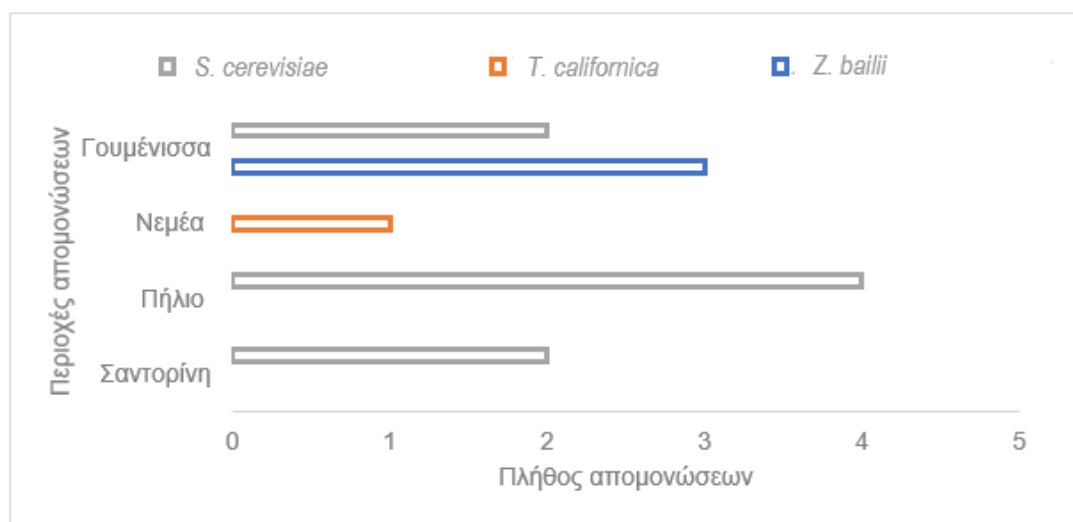
137 ζύμες παρατηρήθηκε ξεκάθαρα ότι παρήγαγαν οξικό οξύ, σχηματίζοντας δακτυλίους διαύγασης περιμετρικά των αποικιών σε υπόστρωμα άγαρ με CaCO_3 , ενώ τα υπόλοιπα 53 στελέχη δεν παρήγαγαν οξικό οξύ. Από αυτές τις απομονώσεις, η *T. californica* ήταν η μοναδική εξαίρεση (Πίνακας 4), καθώς οι υπόλοιπες 52 ζύμες ανήκαν στο είδος *S. cerevisiae*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Νεμέα ήταν η περιοχή με τις περισσότερες ζύμες που απάντησαν αρνητικά στο τεστ για την παραγωγή του οξικού οξέος.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι *Pichia spp* και *Z. bailii* παράγουν υψηλότερες συγκεντρώσεις οξικού οξέος, συγκριτικά με τον *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2006), (Domizio et al., 2011), (Settanni et al., 2012). Επιπλέον, ερευνήθηκε πρόσφατα η απόκριση των *S. cerevisiae* και *Z. bailii*, όσον αφορά την προσαρμοστικότητα και την ανθεκτικότητά τους ως προς το οξικό οξύ. Η παραγωγή οξικού οξέος από αυτόχθονα στελέχη ζυμών έχει μελετηθεί, σε αντίθεση με την παραγωγή από στελέχη *S. cerevisiae*, για τα οποία δεν εντοπίστηκε κάποια αντίστοιχη μελέτη. Η παρούσα μελέτη, επομένως, θεωρείται πρωτοποριακή όσον αφορά στην παραγωγή του οξικού οξέος από στελέχη *S. cerevisiae* (Palma et al., 2018).

4.3. Παραγωγή β-γλυκοσιδάσης

Κατά την παραγωγή της β-γλυκοσιδάσης παρατηρείται αλλαγή χρώματος στις αποικίες από λευκό σε καφέ/σκούρο καφέ, ανάλογα με την ποσότητα που παράγεται. Στο συγκεκριμένο πείραμα η πλειοψηφία των ζυμών δεν εμφάνισε μεγάλη παραγωγή β-γλυκοσιδάσης είτε δεν εμφάνισε καθόλου, συνεπώς δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή χρώματος από λευκό σε καφέ ή σκούρο καφέ. Όπως παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 2, εξαίρεση αποτελούν 29 αποικίες (23 *S. cerevisiae*, 3 *B. bruxellensis*, 1 *Z. Bailii* και 1 *T. californica*) όπου

εμφανίστηκαν ελαφρώς πιο σκούρες συγκριτικά με τις υπόλοιπες, αποκαλύπτοντας χαμηλή ενζυματική δραστηριότητα. Το μεγαλύτερο μέρος των αποτελεσμάτων μας συμβαδίζει με προηγούμενες μελέτες σχετικά με τη δραστικότητα της β-γλυκοσιδάσης που αξιολογήθηκε χαμηλή ή και απύουσα για τα είδη *S. cerevisiae*, *P. carsoni* και *Z. bailii*. Εν αντιθέσει, τα αποτελέσματα του γένους *Pichia* δεν επιβεβαιώνονται από μελέτες σύμφωνα με τις οποίες πολλά είδη του γένους παρήγαγαν μέτρια έως υψηλή ποσότητα β-γλυκοσιδάσης.

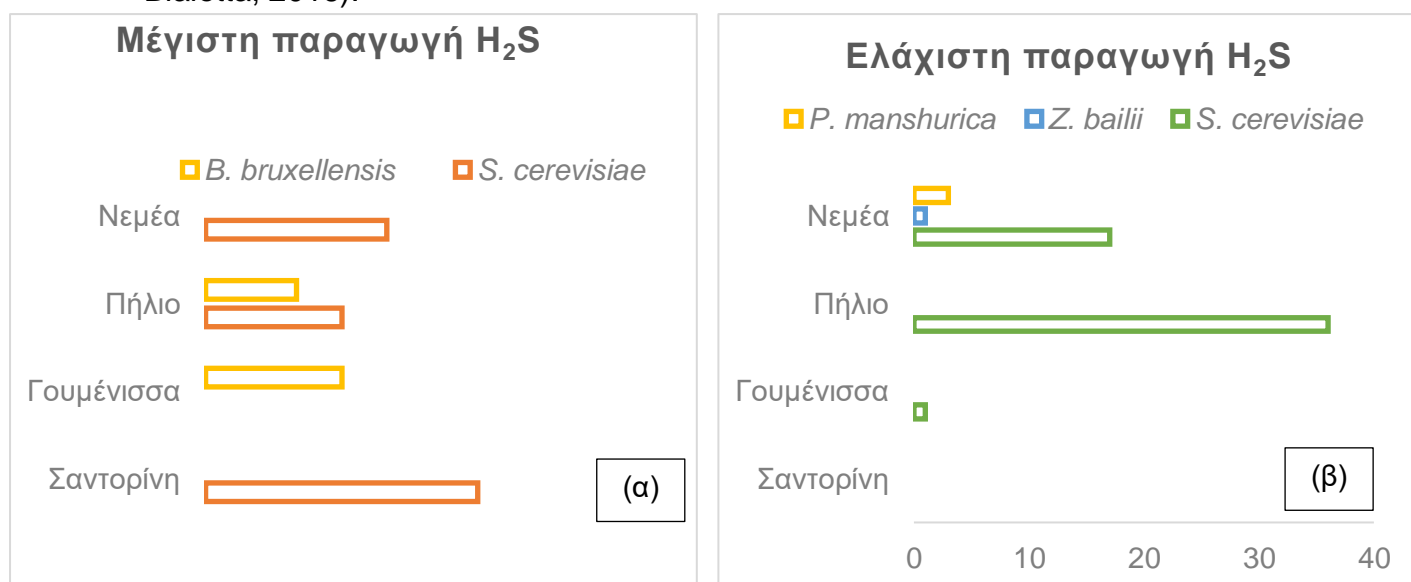


Γράφημα 2: Πλήθος απομονώσεων με μερικώς θετική απόκριση στο τεστ της β-γλυκοσιδάσης ως προς την περιοχή και το είδος του ζυμομύκητα.

4.4. Παραγωγή H₂S

Γενικά η παραγωγή H₂S είναι μη επιθυμητή κατά την παραγωγή οίνου, καθώς συμβάλλει αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Στο πείραμά μας πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις στις 2, 5 και 8 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των μικροοργανισμών στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και τα αποτελέσματα ταξινομήθηκαν βάσει χρώματος που υποδηλώνει την ποσότητα του H₂S (0=λευκό (χωρίς παραγωγή), 1=ανοιχτό καφέ, 2=καφέ, 3=σκούρο καφέ). Χαμηλότερα ήταν τα επίπεδα παραγωγής H₂S που εμφανίστηκαν από τις απομονώσεις στις περιοχές του Πήλιου και της Νεμέας που δεν υπήρχε εξάρτηση από την παράμετρο του είδους. Τα πιο υψηλά επίπεδα H₂S εμφάνισαν κατά σειρά τα *B. bruxellensis*, *T. californica* και

P. carsoni (Διάγραμμα 3α). Πιο αναλυτικά το *B. bruxellensis* παρήγαγε περισσότερο H₂S την 5η και την 8η ημέρα, ενώ η παραγωγή στα δύο ακόλουθα γένη δεν άλλαξε μετά τη 2η ημέρα (Πίνακας 4). Εν συνεχεία, τα γένη *Z. bailii*, *P. manchurica* και *S. cerevisiae* ακολούθησαν διαφορετική πορεία μεταξύ τους. Το πρώτο, ήταν παραγωγός χαμηλού H₂S, το *P. manchurica* μέτριος παραγωγός, ενώ το *S. cerevisiae* φάνηκε η παραγωγή του να εξαρτάται από το κάθε στέλεχος (Διάγραμμα 3β). Βασιζόμενοι σε βιβλιογραφίες των τελευταίων δεκαετιών το *B. bruxellensis* παράγει υψηλές συγκεντρώσεις H₂S (Antramova et al., 2018). Ακόμη, όπως έχει αποδειχθεί από σχετικές έρευνες για να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης, τα χρησιμοποιούμενα στελέχη θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από μη ή χαμηλή παραγωγή H₂S στο θρεπτικό υπόστρωμα Biggy agar (Caridi et al., 2002), (Settanni et al., 2012), (Aponte & Blaiotta, 2016).



Γράφημα 3: Πλήθος απομονώσεων της (α) μέγιστης παραγωγής και (β) της ελάχιστης παραγωγής του H₂S μετά από 8 ημέρες επώασης ως προς την περιοχή απομόνωσης και το είδος του ζυμομύκητα.

4.5. Ανθεκτικότητα στο SO₂

Η αντοχή στο SO₂ είναι ένα άκρως επιθυμητό οινολογικό χαρακτηριστικό και προσδιορίστηκε ως κοινό χαρακτηριστικό σχεδόν σε όλες τις απομονώσεις μας (Πίνακας 4). Αυτό, βέβαια, ήταν αναμενόμενο αφού οι απομονώσεις μας προέρχονταν από οίνους που είχαν περάσει από τη διαδικασία της ζύμωσης και της θείωσης. Σύμφωνα με την νομοθεσία τα ανώτερα όρια θείωσης για τους

ξηρούς οίνους είναι τα 150-200 mg/L SO₂ ενώ μπορεί να φτάσει έως και τα 400 mg/L σε εξαιρετικές περιπτώσεις γλυκών κρασιών. Οι απομονώσεις μας δοκιμάστηκαν σε ακραίες συγκεντρώσεις όπως είναι τα 500 mg/L SO₂. Από το σύνολο των απομονώσεων μόνο 6 ήταν ευαίσθητες στα 100 mg/L, 10 στα 200 mg/L και 4 στα 300 mg/L (Διάγραμμα 4). Άξιο σχολιασμού είναι το γεγονός ότι περισσότερες απομονώσεις *Z. bailii* δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν παρουσία SO₂, ενώ συνολικά το 89% των απομονώσεων ήταν ανθεκτικά έως και τις ακραίες συγκεντρώσεις των 400 και 500 mg/L. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν διεξαχθεί αφορούν την αντοχή των αυτόχθονων απομονώσεων *S. cerevisiae* στο SO₂, καθώς είναι και το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο στέλεχος στην οινοποιία, παρουσιάζοντας υψηλή αντοχή στο SO₂ εμφανίζοντας διαφοροποιήσεις σε επίπεδο στελέχους (Divol et al., 2012), (Settanni et al., 2012).



Γράφημα 4: Πλήθος απομονώσεων με χαμηλής έως και της καλής ανθεκτικότητας στο θειώδες ως προς την περιοχή απομόνωσης και το είδος του ζυμομύκητα.

4.6. Κατηγοριοποίηση των απομονώσεων βάσει των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους

Για αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μικροοργανισμοί, οι οποίοι απομονώθηκαν από οίνους μετά το πέρας αυθόρμητων αλκοολικών ζυμώσεων. Παρατηρήθηκε ότι η συντριπτική πλειοψηφία των απομονώσεων ανήκουν στο είδος *S. cerevisiae*. Τα 5 φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αξιολογήθηκαν και προέκυψαν τα αποτελέσματα που αναγράφονται στον Πίνακα 4. Στον Πίνακα αυτόν έχει εφαρμοστεί μία χρωματική ομαδοποίηση των χαρακτηριστικών. Πιο συγκεκριμένα, τα επιθυμητά χαρακτηριστικά έχουν σημειωθεί με πράσινο χρώμα, τα χαρακτηριστικά με μέτριο αποτέλεσμα είναι χρωματισμένα με κίτρινο χρώμα, ενώ με κόκκινο χρώμα έχουν σημειωθεί τα χαρακτηριστικά με τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Αυτή η χρωματική διάκριση, οδήγησε στην ομαδοποίηση και δημιουργία τριών ομάδων (groups), τα οποία απεικονίζονται στον Πίνακα 5. Τα δεδομένα του Πίνακα 5, προέκυψαν από την συνολική αξιολόγηση και ποσοστικοποίηση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 4. Στον Πίνακα 5 παρατηρείται η ύπαρξη τριών ομάδων – όπως και τα τρία χρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών στον Πίνακα 4 – όπου:

Το Group 1, απαρτίζεται από απομονώσεις που παρουσίασαν περισσότερα θετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στα tests (κάνενα δεν παρουσιάστηκε να έχει σε όλα τα πειράματα το τέλειο/επιθυμητό αποτέλεσμα) καταλαμβάνει το 24,5% του συνόλου. Αξίζει να σημειωθεί, η περίπτωση μίας απομόνωσης που είχε και τα 5 χαρακτηριστικά θετικά, όπως και μία απομόνωση με 4/5 χαρακτηριστικά θετικά και ένα μέτριο, δηλαδή ένα ποσοστό 2% του συνόλου – καθόλου ευκαταφρόνητο – κατείχε την απόλυτα επιθυμητή απόδοση στα χαρακτηριστικά. Επίσης, να σημειωθεί ότι το 19% του συνόλου των απομονώσεων έφερε 4 στα 5 χαρακτηριστικά θετικά και ένα μόνο μέτριο ή/και αρνητικό. Σε αυτό συναντάμε μόνο δύο κατηγορίες, *S. cerevisiae* που είναι και οι επικρατέστερη και *Z. bailii*. Και τα δύο, όμως, προέρχονται στη συντριπτική τους πλειοψηφία από τις περιοχές της Νεμέας και του Πηλίου, με ελάχιστες μόνο εξαιρέσεις.

Στο Group 2 οι απομονώσεις είχαν μέτρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, φαίνεται να είναι το επικρατέστερο με ποσοστό 68,6%. Σε αυτή την κατηγορία κοιτατάχθηκαν οι περισσότερες από τις απομονώσεις *S. cerevisiae* που προέρχονταν κυρίως από τις περιοχές του Πηλίου, Σαντορίνης και Νεμέας, 3 (Γουμένισσα και Πήλιο) από τις συνολικά 8 απομονώσεις *Z. Bailii* και όλες οι απομονώσεις των *P. manchurica*, *B. bruxellensis* και *P. carsoni*.

Στην τελευταία κατηγορία, στο Group 3, κατατάσσονται οι λιγότερες απομονώσεις με ποσοστό 6,9%. Στο group αυτό ανήκουν οι μικροοργανισμοί με τα περισσότερα ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά.

Επομένως, σύμφωνα με την παραπάνω ομαδοποίηση (Πίνακας 5), οι απομονώσεις του Group 1 είχαν την καλύτερη απόδοση, δηλαδή τα περισσότερα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Όποτε οι ζυμομύκητες από αυτό το group κρίνονται οι πιο κατάλληλοι για την έναρξη μιας αλκοολικής ζύμωσης, εξασφαλίζοντας μια ομαλή πορεία ζύμωσης και ένα ποιοτικό και οργανοληπτικά ισορροπημένο τελικό προϊόν. Αντίθετα, το Group 3, απαρτίζεται από ζυμομύκητες που παρουσίασαν αρκετά ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά, για το λόγο αυτό απορρίπτεται η επιλογή τους για εναρκτήριες καλλιέργειες μίας αλκοολικής ζύμωσης.

Όσον αφορά την αξιολόγηση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών της παρούσας έρευνας η πλειονότητα των απομονώσεων, ανεξαρτήτως της περιοχής, χαρακτηρίστηκαν ως killer ουδέτερες, ένα μικρό ποσοστό (12%) χαρακτηρίστηκαν ως killer ευαίσθητες, ενώ κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε τον χαρακτήρα killer, η πλειοψηφία των απομονώσεων φάνηκε ότι παρήγαγαν το οξικό οξύ και αναφορικά με την παραγωγή της β-γλυκοσιδάσης από τα στελέχη, το μεγαλύτερο ποσοστό των ζυμών δεν εμφάνισε παραγωγή του ενζύμου. Επιπροσθέτως, την υψηλότερη παραγωγή H₂S έκαναν οι απομονώσεις του είδους *B. bruxellensis*, ενώ ακολούθησαν με φθίνουσα σειρά παραγωγής το – μοναδικό – στέλεχος *T. californica*, και τα *P. carsoni*. Οι απομονώσεις του είδους *P. manchurica* χαρακτηρίστηκαν ως μέτριοι παραγωγοί, ενώ οι αντίστοιχες του *Z. bailii* παρήγαγαν χαμηλές ποσότητες H₂S και οι απομονώσεις του *S. cerevisiae* εμφάνισαν μεγάλη παραλλακτικότητα. Η ανθεκτικότητα των απομονώσεων στο SO₂, είναι από τα σημαντικότερα

χαρακτηριστικά και βάση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, παρατηρήθηκε ότι η συντριπτική πλειοψηφία των απομονώσεων (89%) εμφάνισε ανθεκτικότητα ακόμη και στις ακραίες συγκεντρώσεις SO₂ (400 & 500mg/L) στις οποίες υποβλήθηκαν τα στελέχη. Βάσει των αποτελεσμάτων της έρευνας προέκυψε ότι μία ομάδα ζυμομυκήτων (37 απομονώσεις) σε ποσοστό 19% είχε 4/5 θετικά από τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό (1%) με 2 ζυμομύκητες είχαν και τα 5 χαρακτηριστικά με θετική αξιολόγηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ζυμομύκητες με την υψηλότερη αξιολόγηση άνοιξαν όλοι στο είδος *S. cerevisiae*. Ωστόσο, δύο μόνο απομονώσεις του είδους *Z. bailii* έφεραν τα περισσότερα αρνητικά χαρακτηριστικά (4/5).

Πίνακας 4: Φαινοτυπικά αποτελέσματα των υπό μελέτη ζυμομυκήτων: α) χαρακτήρας killer (N=neutral, S=sensitive), β) παραγωγή υδρόθειου, γ) παραγωγή οξικού οξέος ((+) για την παραγωγή και (-) για την μη παραγωγή οξικού οξέος), δ) αντοχή στις διάφορες συγκεντρώσεις SO₂ (0=καθόλου αντοχή, 100=αντοχή στα 100mg/L SO₂, 200=αντοχή στα 200mg/L SO₂, 300=αντοχή στα 300mg/L SO₂, 400=αντοχή στα 400mg/L SO₂, 500=αντοχή στα 500mg/L SO₂,) και ε) β- γλυκοσιδάσης ((+) για την ύπαρξη ή (-) για την μη ύπαρξη δραστηριότητας της μη β-γλυκοσιδάσης). Τα χρώματα του πίνακα αντιπροσωπεύουν την καταλληλότητα των αποτελεσμάτων ως προς τα επιθυμητά χαρακτηριστικά (κόκκινο=αρνητικό χαρακτηριστικό, κίτρινο=ενδιάμεσο χαρακτηριστικό, πράσινο=θετικό χαρακτηριστικό).

ΜΟ	Είδη	Προέλευση	Έτος παραγωγής	killer	Παραγωγή H ₂ S	Οξικό οξύ	Αντοχή στο SO ₂ (mg/L)	β-γλυκοσιδάση
A6Y1	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	500	-
A6Y2	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	500	-
A6Y3	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	400	-
A6Y4	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	500	-
A6Y5	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	400	-
A6Y6	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	500	-
A6Y7	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	400	-
A6Y9	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	1	+	500	-
A6Y10	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	1	+	400	-
A6Y11	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	500	-
A6Y12	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	500	-
A6Y13	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	400	-
A6Y14	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	500	-
A6Y15	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	400	-
A6Y16	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	400	-
GBY1	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	2	+	500	-
GBY2	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	3	+	500	-
GBY3	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	1	+	500	+

GBY4	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	1	+	500	+
GBY5	<i>S. cerevisiae</i>	Σαντορίνη	2020	N	1	-	500	-
K16Y1	<i>Z. bailii</i>	Γουμένισσα	2020	N	1	+	400	-
K16Y7	<i>B. bruxellensis</i>	Γουμένισσα	2020	N	3	+	500	+
K16Y17	<i>B. bruxellensis</i>	Γουμένισσα	2020	N	3	+	500	+
K16Y29	<i>B. bruxellensis</i>	Γουμένισσα	2020	N	3	+	500	+
A19Y2	<i>S. cerevisiae</i>	Γουμένισσα	2020	N	1	-	400	-
A19Y4	<i>S. cerevisiae</i>	Γουμένισσα	2020	N	2	+	500	-
A19Y5	<i>Z. bailii</i>	Γουμένισσα	2020	N	2	+	500	-
A19Y6	<i>S. cerevisiae</i>	Γουμένισσα	2020	N	1	+	400	-
A9Y1	<i>T. californica</i>	Καλάβρυτα	2019	S	2	+	400	-
K21Y1	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2019	N	2	+	200	-
K21Y2	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2019	N	2	-	300	-
K21Y3	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2019	N	1	+	500	-
K21Y4	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2019	N	2	-	400	-
K21Y5	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2019	N	2	+	500	-
K21Y7	<i>Z. bailii</i>	Πήλιο	2019	N	1	+	500	-
K21Y8	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2019	N	2	+	300	-
K21Y9	<i>P. carsonii</i>	Πήλιο	2019	N	2	+	300	-
K21Y10	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2019	N	1	+	100	-
A23Y1	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	100	-
A23Y2	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y3	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y4	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y5	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	0	+	400	-
A23Y6	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y7	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y8	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23 Y9	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	0	+	400	-
A23Y10	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y11	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y12	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y13	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y15	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y16	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y17	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y18	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y19	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y20	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y21	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	0	+	400	-
A23Y22	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y23	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
A23Y24	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-

A23Y25	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	0	+	400	-
A24Y1	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y2	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y3	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y4	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	S	0	-	300	-
A24Y5	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y6	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	0	-	400	-
A24Y7	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	S	0	-	400	-
A24Y8	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y11	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	0	+	400	-
A24Y12	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	100	-
A24Y13	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y14	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y15	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y16	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y17	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	0	+	400	-
A24Y18	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y19	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	1	+	400	-
A24Y20	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	2	+	400	-
A24Y21	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	0	+	400	-
A24Y22	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	0	+	400	-
A24Y23	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2018	N	2	+	400	-
A26 Y1	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	0	-	500	-
A26 Y3	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	-	500	+
A26 Y4	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	2	+	200	-
A26 Y5	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	-	200	+
A26 Y6	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	1	-	500	-
A26 Y7	<i>B. bruxellensis</i>	Πήλιο	2020	N	3	+	500	+
A26 Y8	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	0	-	500	+
A26Y10	<i>B. bruxellensis</i>	Πήλιο	2020	N	2	+	200	-
A26Y11	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	0	-	500	-
A26Y12	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	0	+	500	-
A26Y13	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	500	-
A26Y14	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	500	+
A26Y15	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	+	400	-
A26Y17	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	0	+	400	-
A26Y18	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	+	400	-
A26Y19	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	0	+	400	-
A26Y20	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	0	-	400	-
A26Y21	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	0	+	400	-
A26Y22	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	0	+	500	-
A26Y23	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	0	-	400	-
K29Y1	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	0	-	400	-

K29Y2	<i>Z. bailii</i>	Πήλιο	2020	N	2	-	0	+
K29Y3	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	3	+	400	-
K29Y4	<i>Z. bailii</i>	Πήλιο	2020	S	0	+	0	-
K29Y5	<i>Z. bailii</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	0	-
K29Y6	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	+	500	-
K29Y8	<i>Z. bailii</i>	Πήλιο	2020	S	2	+	0	-
K29Y9	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	+	400	-
K29Y10	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	+	400	-
K29Y11	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	+	400	-
K29Y13	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	+	500	-
K29Y14	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	0	+	400	-
K29Y15	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	+	400	-
K29Y16	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	0	+	500	-
K29Y17	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	1	+	400	-
K29Y18	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	2	+	400	-
K29Y19	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	S	0	-	200	-
K29Y21	<i>S. cerevisiae</i>	Πήλιο	2020	N	1	+	400	-
K30 Y2	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	0	+	500	-
K30 Y3	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	3	+	500	-
K30 Y4	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	1	-	500	-
K30 Y5	<i>Z. bailii</i>	Νεμέα	2020	N	1	-	200	-
K30 Y8	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	1	+	200	-
K30 Y9	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	1	+	200	-
K30Y10	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	2	+	500	-
K30Y11	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	1	+	200	-
K30Y14	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	1	+	500	-
K30Y15	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	1	+	500	-
K30Y18	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	1	+	200	-
K30Y19	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2020	N	1	+	400	-
K32 Y1	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	1	+	400	-
K32 Y2	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	-	400	-
K32 Y4	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	400	-
K32 Y5	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	500	-
K32 Y6	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	400	-
K32 Y7	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	-	400	-
K32 Y8	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	1	-	500	-
K32 Y9	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	500	-
K32Y10	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	1	-	500	-
K32Y11	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	-	500	-
K32Y12	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	1	-	400	-
K32Y13	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	1	-	500	-
K32Y14	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	S	1	-	500	-
K32Y15	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	1	-	500	-

K32Y16	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	1	-	500	-
K32Y17	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	-	500	-
K32Y18	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	1	-	500	-
K32Y19	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	S	0	-	400	-
K32Y20	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	S	0	-	400	-
K33 Y1	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	-	500	-
K33 Y2	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	500	-
K33 Y3	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	S	1	-	500	-
K33 Y4	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K33 Y5	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	500	-
K33 Y6	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K33 Y7	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	400	-
K33 Y9	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	-	500	-
K33Y10	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	500	-
K33Y11	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	500	-
K33Y12	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K33Y13	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K33Y14	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	400	-
K33Y15	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	400	-
K33Y18	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K33Y19	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	S	0	-	500	-
K33Y20	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	S	0	-	500	-
K34Y1	<i>P. manshurica</i>	Νεμέα	2019	N	0	+	500	-
K34Y2	<i>P. manshurica</i>	Νεμέα	2019	N	1	+	500	-
K34Y3	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K34Y4	<i>P. manshurica</i>	Νεμέα	2019	N	1	+	500	-
K34Y5	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K34Y6	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K34Y7	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	S	0	-	500	-
K34Y8	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K34Y9	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K34Y10	<i>P. manshurica</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K34Y11	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	1	-	500	-
K34Y12	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K34Y13	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K34Y15	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	-	400	-
K34Y16	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K34Y17	<i>P. manshurica</i>	Νεμέα	2019	N	1	+	500	-
K34Y18	<i>S. cerevisiae</i>	Νεμέα	2019	N	0	-	500	-
K34Y19	<i>P. manshurica</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-
K34Y20	<i>P. manshurica</i>	Νεμέα	2019	N	2	+	500	-

Πίνακας 5. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων

Κατηγορίες	Απομονώσεις	Αριθμός	Ποσοστό	Συνολικό ποσοστό
Group 1 (καλό)	<i>S. cerevisiae</i>	44	23,4 %	24,5 %
	<i>Z. bailii</i>	2	1,1 %	
Group 2 (μέτριο)	<i>S. cerevisiae</i>	113	60,1 %	68,6 %
	<i>Z. bailii</i>	3	1,6 %	
	<i>P. manshurica</i>	7	3,7 %	
	<i>B. bruxellensis</i>	5	2,7 %	
	<i>P. carsoni</i>	1	0,6 %	
Group 3 (κακό)	<i>S. cerevisiae</i>	9	4,8 %	6,9 %
	<i>Z. bailii</i>	3	0,6 %	
	<i>T. californica</i>	1	1,6 %	

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συμπερασματικά, με την παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η αξιολόγηση των τεχνολογικών χαρακτηριστικών με οινολογικό ενδιαφέρον απομονώσεων γηγενών ζυμών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η ανάπτυξη εύκολα εφαρμόσιμων πρωτοκόλλων για ταχεία μελέτη τεχνολογικών χαρακτηριστικών ολοκληρώθηκε επιτυχώς. Τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν είναι τα πλέον χρήσιμα και βασικά χαρακτηριστικά που θα έπρεπε να αξιολογούνται για την επιλογή ενός στελέχους ως εναρκτήριο καλλιέργεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η αξιολόγηση βασικών χαρακτηριστικών απομονώσεων ζυμομυκήτων από ελληνικούς οίνους στο τέλος αυθόρμητων αλκοολικών ζυμώσεων είναι πρωτοπόρα και η επιλογή του κατάλληλου στελέχους ζύμης σαν εναρκτήριο καλλιέργεια είναι κομβικής σημασίας για το τελικό προϊόν, καθώς επηρεάζει τα τελικά οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά και την συνεπώς την ποιότητά του σε πιο αυθεντικές κατευθύνσεις. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης φάνηκε ότι ένα σημαντικό ποσοστό (20%) των απομονώσεων έχουν υψηλό οινολογικό δυναμικό. Όλοι οι ζυμομύκητες της ομάδας αυτής ανήκαν στο είδος *S. cerevisiae*. Το γεγονός αυτό προσφέρει σημαντικές πληροφορίες και προτάσεις, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή ζυμομυκήτων απ' τη συγκεκριμένη ομάδα ως οι πιο κατάλληλες εναρκτήριες καλλιέργειες για την αλκοολική ζύμωση, στοχεύοντας σε ένα υψηλά ποιοτικό τελικό προϊόν. Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε και η περαιτέρω μελέτη της κινητικής των ζυμών σε διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης, όπως και ο ρυθμός ζύμωσής τους. Ωστόσο, η αξιολόγηση της παραγωγής ορισμένων από τα παραπροϊόντα των ζυμομυκήτων (ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, ακεταλδεΐδη κλπ.), όπως και της δράσης των διαφορετικών στελεχών ζυμών έναντι του μηλικού οξέος θα έδινε σημαντικές πληροφορίες για την εξέλιξη και βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων. Τέλος, για ακόμη μία φορά τα στελέχη του *S. cerevisiae* υπερέχουν έναντι των στελεχών άλλων ειδών και κρίνονται ως αυτά με τα περισσότερα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acree, T. E., Sonoff, E. P., & Splittstoesser, D. F. (1972). Effect of yeast strain and type of sulfur compound on hydrogen sulfide production. *American Journal of Enology and Viticulture*, 23(1), 6-9.

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances*, 29(6), 675-685.

Alberti, A., Vieira, R. G., Drilleau, J. F., Wosiacki, G., & Nogueira, A. (2011). Apple wine processing with different nitrogen contents. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(3), 551-558.

Arevalo-Villena, M., Briones-Perez, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Biotechnological application of yeasts in food science: Starter cultures, probiotics and enzyme production. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1360–1372.

Belda, I., Gobbi, A., Ruiz, J., de Celis, M., Ortiz-Álvarez, R., Acedo, A., & Santos, A. (2021). Microbiomics to Define Wine Terroir. *Comprehensive Foodomics*, 438–451.

Bell, S. J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242-295.

Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(4), 996-1002.

Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., ... & Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 287-293.

Bisaria, V. S., & Kondo, A. (Eds.). (2014). *Bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts*. John Wiley & Sons.

Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 107-119.

Bohlscheid, J. C., Osborne, J. P., Ross, C. F., & Edwards, C. G. (2011). Interactive effects of selected nutrients and fermentation temperature on H₂S production by wine strains of *Saccharomyces*. *Journal of Food Quality*, 34(1), 51-55.

Boulton B. Roger, Singleton L. Vernon, Bisson F. Linda, K. E. R. (2018). *ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ & ΜΕΘΟΔΟΙ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ* (B. H. L. Publishers (ed.); 1st ed.). Broken Hill Publishers LTD.

Boynton, P. J. (2019). The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. *Yeast*, 36(8), 473–485. <https://doi.org/10.1002/yea.3398>

Butzke, C. E., & Park, S. K. (2011). Impact of fermentation rate changes on potential hydrogen sulfide concentrations in wine. *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(5), 519-524.

Cairns, J. R. K., & Esen, A. (2010). [beta]-Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(20), 3389.

Cappello, M. S., Poltronieri, P., Blaiotta, G., & Zacheo, G. (2010). Molecular and physiological characteristics of a grape yeast strain containing atypical genetic material. *International journal of food microbiology*, 144(1), 72-80.

Caridi, A., Cufari, A., & Ramondino, D. (2002). Isolation and clonal pre-selection of enological *Saccharomyces*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 48(5), 261–267.

Caridi, A., Cufari, A., & Ramondino, D. (2002). Isolation and clonal pre-selection of enological *Saccharomyces*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 48(5), 261-267.

Carnevali, P., Ciati, R., Leporati, A., & Paese, M. (2007). Liquid sourdough fermentation: Industrial application perspectives. *Food microbiology*, 24(2), 150-154.

Choi, J. Y., Park, A. R., Kim, Y. J., Kim, J. J., Cha, C. J., & Yoon, J. J. (2011). Purification and Characterization of an Extracellular β -Glucosidase Produced by *Phoma* sp. KCTC11825BP Isolated from Rotten Mandarin Peel. *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(5), 503-508.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS yeast research*, 10(2), 123-133.

Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5), 873–882.

Crowell, E. A., Guymon, J. F., & Ingraham, J. L. (1961). Techniques for studying the mechanism of higher alcohol formation by yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 12(3), 111-116.

Csoma, H., Zakany, N., Capece, A., Romano, P., & Sipiczki, M. (2010). Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 239-248.

De Castro, A., Montañó, A., Casado, F. J., Sánchez, A. H., & Rejano, L. (2002). Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, 19(6), 637-644.

de Ullivarri, M. F., Mendoza, L. M., & Raya, R. R. (2014). Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 106(5), 865–878.

de Ullivarri, M. F., Mendoza, L. M., Raya, R. R., & Farías, M. E. (2011). Killer phenotype of indigenous yeasts isolated from Argentinian wine cellars and their potential starter cultures for winemaking. *Biotechnology Letters*, 33(11), 2177–2183.

Demirbaş, A. (2001). Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy conversion and Management*, 42(11), 1357-1378.

Dhake, A. B., & Patil, M. B. (2005). Production of β -Glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 170-176.

Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 170–180.

Eschenbruch, R. (1974). Sulfite and sulfide formation during winemaking--a review. *American journal of Enology and Viticulture*, 25(3), 157-161.

Fay, J. C., & Benavides, J. A. (2005). Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics*, 1(1), e5.

Fleet, G. H. (1993). Wine microbiology and biotechnology. CRC Press.

Florentina, M., & Gageanu, A. (2011). Killer profile of wine yeast strains isolated in Dealurile Bujorului vineyard. Romanian Biotechnological Letters, 16(6), 144–147.

Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (Eds.). (2007). Wine microbiology: practical applications and procedures. Boston, MA: Springer US.

Gerardi, C., Blando, F., Santino, A., & Zacheo, G. (2001). Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. Plant Science, 160(5), 795-805.

Giudici, P., & Kunkee, R. E. (1994). The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. American Journal of Enology and Viticulture, 45(1), 107-112.

Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J. M., Bayonove, C., & Cordonnier, R. (1988). Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. Carbohydrate Research, 184, 139-149.

Gupta, P., Samant, K., & Sahu, A. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. International journal of microbiology, 2012.

Hays, W. S., VanderJagt, D. J., Bose, B., Serianni, A. S., & Glew, R. H. (1998). Catalytic mechanism and specificity for hydrolysis and transglycosylation reactions of cytosolic β -glucosidase from guinea pig liver. Journal of Biological Chemistry, 273(52), 34941-34948.

Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2010). Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for

processing cv. Arbequina natural green olives. *Food microbiology*, 27(6), 731-740.

Iwashita, K., Nagahara, T., Kimura, H., Takano, M., Shimoi, H., & Ito, K. (1999). The *bglA* gene of *Aspergillus kawachii* encodes both extracellular and cell wall-bound β -glucosidases. *Applied and environmental microbiology*, 65(12), 5546-5553.

Jeya, M., Joo, A. R., Lee, K. M., Tiwari, M. K., Lee, K. M., Kim, S. H., & Lee, J. K. (2010). Characterization of β -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1473-1484.

Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 75-83.

Jolly, N. Augustyn, O. Pretorius, I. (2006). The role and use of non-saccharomyces yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 15–39.

König, H., Uden, G., & Fröhlich, J. (Eds.). (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-30). Heidelberg: Springer.

Kovács, K., Megyeri, L., Szakacs, G., Kubicek, C. P., Galbe, M., & Zacchi, G. (2008). *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glucosidase on pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(1), 48-55.

Kvitek, D. J., Will, J. L., & Gasch, A. P. (2008). Variations in stress sensitivity and genomic expression in diverse *S. cerevisiae* isolates. *PLoS genetics*, 4(10), e1000223.

Leeuwen, C. V. (2010). Soils and terroir expression in wines. In *Soil and Culture* (pp. 453-465). Springer, Dordrecht.

Lerm, E., Engelbrecht, L., & Du Toit, M. (2010). Malolactic fermentation: the ABC's of MLF.

Levin, L., Herrmann, C., & Papinutti, V. L. (2008). Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 207-214.

Linderholm, A. L., Findleton, C. L., Kumar, G., Hong, Y., & Bisson, L. F. (2008). Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1418–1427.

Maicas, S., & Mateo, J. J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(3), 322-335.

Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E. & Brettin, T. S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature biotechnology*, 26(5), 553-560.

Melikoglu, M., Lin, C. S. K., & Webb, C. (2013). Stepwise optimisation of enzyme production in solid state fermentation of waste bread pieces. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 638-646.

Mesas, J. M., Rodríguez, M. C., & Alegre, M. T. (2012). Basic characterization and partial purification of β -glucosidase from cell-free extracts of *Oenococcus oeni* ST81. *Letters in applied microbiology*, 55(3), 247-255.

Michlmayr, H., Schümann, C., Wurbs, P., Barreira Braz da Silva, N. M., Rogl, V., Kulbe, K. D., & Del Hierro, A. M. (2010). A β -glucosidase from *Oenococcus*

oeni ATCC BAA-1163 with potential for aroma release in wine: cloning and expression in *E. coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1281-1289.

Narasimha, G., Sridevi, A., Ramanjaneyulu, G., & Rajasekhar Reddy, B. (2016). Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Properties*, 19(3), 652-661.

Ng, I. S., Li, C. W., Chan, S. P., Chir, J. L., Chen, P. T., Tong, C. G., ... & Ho, T. H. D. (2010). High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource technology*, 101(4), 1310-1317.

Nikolaou, E., Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., & Tzanetakis, N. (2006). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food microbiology*, 23(2), 205-211.

Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., ... & Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16333-16338.

OIV, (2010). Definition of terroir. <http://www.oiv.int/public/medias/400/viti-2012-1-en.pdf>

Palma, M., Guerreiro, J. F., & Sá-Correia, I. (2018). Adaptive response and tolerance to acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A physiological genomics perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 1–16.

Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., & Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, 149-162.

Park, S. K., Boulton, R. B., & Noble, A. C. (2000). Formation of hydrogen sulfide and glutathione during fermentation of white grape musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), 91-97.

Qi, M., Jun, H. S., & Forsberg, C. W. (2008). Cel9D, an atypical 1, 4- β -d-glucan glucohydrolase from *Fibrobacter succinogenes*: characteristics, catalytic residues, and synergistic interactions with other cellulases. *Journal of bacteriology*, 190(6), 1976-1984.

Qian, L., Fu, S., Zhou, H., Sun, J., & Weng, X. (2012). Optimization of fermentation parameters for β -glucosidase production by *Aspergillus niger*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(5), 583-591.

Rainieri, S. (2000). Selection and improvement of wine yeast Constructing a synthetic *Saccharomyces cerevisiae* pan-genome neo-chromosome View project Acquatrode: System to Detect the Level of Stress / Discomfort of Aquatic Animals View project. Article in *Annals of Microbiology*, June.

Raza, F., Raza, N. A., Hameed, U., Haq, I., & Maryam, I. (2011). Solid state fermentation for the production of β -glucosidase by co-culture of *Aspergillus niger* and *A. oryzae*. *Pak. J. Bot*, 43(1), 75-83.

Regodón, J. A., Pérez, F., Valdés, M. E., De Miguel, C., & Ramirez, M. (1997). A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology*, 14(3), 247-254.

Riou, C., Salmon, J. M., Vallier, M. J., Günata, Z., & Barre, P. (1998). Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3607-3614.

Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Van Broock, M., Valles, S., Ramón, D., & Caballero, A. C. (2004). Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 84–95.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 169-180.

Sangorrín, M. P., Zajonskovsky, I. E., Lopes, C. A., Rodríguez, M. E., Giraudo de van Broock, M. R., & Caballero, A. C. (2001). Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). *Journal of Basic Microbiology*, 41(2), 105–113.

Seeberger, P. H., & Werz, D. B. (2007). Synthesis and medical applications of oligosaccharides. *Nature*, 446(7139), 1046-1051.

Settanni, L., Sannino, C., Francesca, N., Guarcello, R., & Moschetti, G. (2012). Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(6), 606–614.

Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Rajasree, K. P., Mathew, A., Gottumukkala, L., & Pandey, A. (2011). Properties of a major β -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. *Process Biochemistry*, 46(7), 1521-1524.

Sonia, K. G., Chadha, B. S., Badhan, A. K., Saini, H. S., & Bhat, M. K. (2008). Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), 599-604.

Spiropoulos, A., Tanaka, J., Flerianos, I., & Bisson, L. F. (2000). Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine

isolates of *Saccharomyces*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(3), 233-248.

Sponholz, W. R., Kliewer, M., Rapp, A., & Versini, G. (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In *Proc Int Symp on Nitrogen in Grapes and Wines* (pp. 156-164).

Stratford, M., & Rose, A. H. (1985). Hydrogen sulphide production from sulphite by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 131(6), 1417-1424.

Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Advances in applied microbiology*, 57, 131-175.

Thomas, C. S., Boulton, R. B., Silacci, M. W., & Gubler, W. D. (1993). The effect of elemental sulfur, yeast strain, and fermentation medium on hydrogen sulfide production during fermentation. *American journal of enology and viticulture*, 44(2), 211-216.

Tristezza, M., Fantastico, L., Vetrano, C., Bleve, G., Corallo, D., Grieco, F., & Mita, G. (2014). Molecular and technological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural fermentation of Susumaniello grape must in Apulia, Southern Italy. *International journal of microbiology*, 2014.

Tromp, A. (1984). The effect of yeast strain, grape solids, nitrogen and temperature on fermentation rate and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 5(1), 1-6.

Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., & Dequin, S. (2007). Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS yeast research*, 7(2), 317-329.

Vallmitjana, M., Ferrer-Navarro, M., Planell, R., Abel, M., Ausín, C., Querol, E., ... & Pérez-Pons, J. A. (2001). Mechanism of the family 1 β -glucosidase from *Streptomyces* sp: catalytic residues and kinetic studies. *Biochemistry*, 40(20), 5975-5982.

Van Leeuwen, C., & Seguin, G. (2006). The concept of terroir in viticulture. *Journal of wine research*, 17(1), 1-10.

Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M., Álvarez, M. L., & Ramírez, M. (2016). Using mixed inocula of *Saccharomyces cerevisiae* killer strains to improve the quality of traditional sparkling-wine. *Food Microbiology*, 59, 150–160.

Venturi, L. L., de Lourdes Polizeli, M., Terenzi, H. F., dos Prazeres Melo Furriel, R., & Jorge, J. A. (2002). Extracellular β -D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 42(1), 55-66.

Vervoort, Y., Herrera-Malaver, B., Mertens, S., Guadalupe Medina, V., Duitama, J., Michiels, L., ... & Verstrepen, K. J. (2016). Characterization of the recombinant *Brettanomyces anomalus* β -glucosidase and its potential for bioflavouring. *Journal of applied microbiology*, 121(3), 721-733.

Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S., & Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*, 25(6), 778-785.

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(1), 145-157.

Vos, P. J. A., & Gray, R. S. (1979). The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30(3), 187-197.

Wang, X. D., Bohlscheid, J. C., & Edwards, C. G. (2003). Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), 349-359.

Webb, A. D., & Ingraham, J. L. (1963). Fusel oil. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 5, pp. 317-353). Academic Press.

Withers, S. G., & Street, I. P. (1989). β -glucosidases: Mechanism and inhibition.

Yadav, P. S., Shruthi, K., Prasad, B. S., & Chandra, M. S. (2016). Enhanced production of β -glucosidase by new strain *Aspergillus protuberus* on solid state fermentation in rice husk. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 5(12), 551-564.

Yang, J. L., Ma, J., Pierce, J. M., & Eriksson, K. E. L. (2004). U.S. Patent No. 6,767,728. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Ye, M., Yue, T., & Yuan, Y. (2014). Changes in the profile of volatile compounds and amino acids during cider fermentation using dessert variety of apples. *European Food Research and Technology*, 239(1), 67-77.

Yeoman, C. J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C. M., Mackie, R. I., & Cann, I. K. (2010). Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Advances in applied microbiology*, 70, 1-55.